



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2019년 2월

석사학위 논문

애기장대의 근단분열조직의 구성에  
필수적인 소포계류인자를 암호화하는

*DEFECTIVE QUIESCENT*  
*CENTER* 유전자의 특성 연구

조선대학교 대학원

생명과학과

김 요 한

애기장대의 근단분열조직의 구성에  
필수적인 소포계류인자를 암호화하는

*DEFECTIVE QUIESCENT  
CENTER* 유전자의 특성 연구

Characterization of DEFECTIVE QUIESCENT CENTER  
gene encoding a vesicle tethering factor required for  
root meristem organization in Arabidopsis

2019년 2월 25일

조선대학교 대학원

생명과학과

김 요 한

애기장대의 근단분열조직의 구성에  
필수적인 소포계류인자를 암호화하는

*DEFECTIVE QUIESCENT*  
*CENTER* 유전자의 특성 연구

지도교수 송 상 기

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2018년 10월

조선대학교 대학원

생명과학과

김 요 한

## 김요한의 석사학위논문을 인준함

위원장    조선대학교    교    수                    박현용            (인)

위    원    조선대학교    교    수                    조태오            (인)

위    원    조선대학교    조교수                    송상기            (인)

2018년 11월

조선대학교 대학원

## CONTENTS

LIST OF TABLE	i
LIST OF FIGURES	ii
ABBREVIATIONS	iv
ABSTRACT	vi
국문초록	ix
I. 서론	1
1. 모델식물로서 애기장대의 가치	1
2. 활성표지 도입을 통한 돌연변이 선별	2
3. 애기장대의 뿌리 형성 과정	3
4. 애기장대의 생장에 관여하는 옥신	4
5. 식물의 종자 표면 점액질의 기능	6
6. 막 수송 및 소포 수송을 통한 소포 이동 경로	7
7. 수송 단백질 입자 복합체	9
8. 애기장대 세포내막계의 테더링 복합체	10
9. TRAPP complex의 기능	11

II. 재료 및 방법	12
1. 연구 식물 준비와 및 생장조건	12
2. 배지 및 조성	13
2-1. Luria-Bentani (LB) broth 배지	13
2-2. Murashige and Skoog 배지	13
3. Genomic DNA 추출	14
4. Primer 디자인	15
5. 중합효소연쇄반응 (PCR)	15
6. TAIL-PCR 진행	16
7. PCR 생성물의 정제 및 전기영동	17
8. Ligation	17
9. 형질전환	17
10. Colony PCR	18
11. Plasmid DNA purification	18
12. GUS 발현 분석	19
13. Seed coat mucilage 염색	19
14. 뿌리 길이 측정	20
15. 뿌리 굴중성 분석 실험	20

III. 결과.....	22
1. 5x UAS 활성화표지를 이용한 돌연변이 선별.....	22
2. TAIL-PCR을 통한 T-DNA 삽입 위치 확인.....	26
3. <i>DQC</i> 및 유사 단백질의 아미노산 서열간의 유사도 비교.....	29
4. 추가적인 T-DNA 삽입 돌연변이의 선별.....	32
5. 야생형과 <i>dqc</i> 돌연변이의 뿌리 생장 곡선 및 리포터 유전자 발현 양상 조사.....	35
6. <i>dqc</i> 돌연변이와의 상보성 검정.....	37
7. <i>dqc</i> 돌연변이의 T-DNA 삽입 위치 확인.....	39
8. <i>dqc</i> 돌연변이 배경에서의 다양한 발달에 관련된 리포터 유전자 발현 양상 조사.....	41
9. 뿌리 굴중성과 관련된 옥신 반응 유전자의 발현 양상 조사.....	43
10. 옥신의 유출에 관여하는 막 단백질인 PIN1의 발현 조사.....	46
11. <i>dqc</i> 돌연변이의 세포내막계 표적 단백질 발현 양상 조사.....	51



12. 종피 점액층의 발달 양상 및 PSV 형태 조사.....	54
IV. 논의.....	56
V. 참고문헌.....	64

## LIST OF TABLE

Table 1. List of PCR primers used in this study.....21

## LIST OF FIGURES

Figure 1. A schematic overview of the endomembrane system.....	8
Figure 2. <i>dqc-1</i> is defective in root meristem development displaying aberrant quiescent center.....	24
Figure 3. <i>dqc-1</i> displays reduced root meristem activity.....	25
Figure 4. The results of TAIL-PCR gel electrophoresis by using the <i>dqc-1</i> genomic DNA as a template.....	27
Figure 5. <i>dqc-1</i> phenotype is induced by a T-DNA insertion which is located in the open reading frame of At5g16280.....	28
Figure 6. Multiple amino acid sequence alignment among the conserved TRS85 motifs of DQC and DQC-related proteins from model organisms.....	30
Figure 7. Phylogenetic relationship visualized among the amino acid sequences of DQC and related proteins.....	31
Figure 8. Root phenotypes of the <i>dqc</i> mutants.....	33
Figure 9. The inflorescence and floral phenotypes of the <i>dqc</i> mutants.....	34
Figure 10. Growth and cell proliferation in <i>dqc</i> roots are suppressed.....	36
Figure 11. The complementation test of <i>dqc-1</i> with <i>dqc-2</i> .....	38
Figure 12. A schematic diagram of the T-DNA insertion sites of the <i>dqc</i> mutants.....	40
Figure 13. Various reporter gene expression patterns in the background of WT and <i>dqc</i> mutants.....	42
Figure 14. <i>DQC</i> is required for the root gravitropism.....	44

Figure 15. The expression patterns of *DR5p:GFP-GUS* and *DR5rev:GFP* in WT and *dqc* mutants.....45

Figure 16. The subcellular localization of PIN1-GFP is compromised in *dqc* mutants.....48

Figure 17. Confocal microscopic images displaying the subcellular localization of endocytic marker FM4-64 in WT and *dqc-2*.....50

Figure 18. The subcellular localization patterns of the markers for endomembranes in WT and *dqc* mutants.....52

Figure 19. The phenotypes of seed coat mucilage and PSVs in WT and *dqc* mutants.....55

## ABBREVIATIONS

ABRC	<i>Arabidopsis</i> biological research center
ARF	auxin response factor
BFA	brefeldin A
CaMV	cauliflower mosaic virus
Col	Columbia-0
DEG1	degenerative primer1
<i>dqc</i>	<i>defective quiescent center</i>
EE	early endosome
ER	endoplasmic reticulum
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GA	Golgi apparatus
GUS	$\beta$ -glucuronidase
IAA	indole-3-acetic acid
LE	late endosome
MS	Murashige and Skoog
MVB	multivesicular body
PCR	polymerase chain reaction
PM	plasma membrane
PSV	protein storage vacuole
PVC	prevacuolar complex
QC	quiescent center

SCR	SCARECROW
SHR	SHORT-ROOT
TAIL-PCR	thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction
TRAPP	transport protein particle
TGN	trans-Golgi network

## ABSTRACT

Characterization of *DEFECTIVE QUIESCENT CENTER*  
gene encoding a vesicle tethering factor required for root  
meristem organization in Arabidopsis

Yo-Han Kim

Advisor : Assistant Prof. Sang-Kee Song, Ph.D.

Department of Life Science,

Graduate School of Chosun University

The growth and development of roots mainly relies on the continuous cell divisions in the root meristem and cell elongation occurring in the differentiation zone. Cells in the quiescent center (QC), where cell division is inactivated in the root, constitute root meristem together with surrounding stem cells to provide a source of cells for the generation of all the tissues in the root. To understand the regulation mechanism of the root meristem development new mutants were isolated by the introduction of *UAS* activation tags in the *Q2610* enhancer trap line expressing *GAL4* transcription factor specifically in the root. A recessive mutant exhibiting short root and reduced cell-elongation

phenotypes was selected and designated *defective quiescent center-1* (*dqc-1*) due to the defects in the QC shape and the expression pattern of *WOX5p:GUS*, a QC reporter.

To determine the T-DNA insertion site that induces the phenotype of *dqc-1*, thermal asymmetric interlaced-PCR was performed and the T-DNA including the *UAS* sequences was localized at the At5g16280 locus. *DQC* encodes a putative transport protein particle (TRAPP) III-specific subunit, AtTRS85. The putative open reading frame of *DQC* is 7,969 base pairs in length and composed of 28 exons and 27 introns. Two T-DNA insertion mutant alleles, SALK\_208572 and SALK\_130580 possessing *dqc* phenotypes were verified by the PCR genotyping and named *dqc-2* and *dqc-3*, respectively. It was confirmed that the *dqc-2* is the *dqc* alleles by the genetic crosses with *dqc-1*. Interestingly, the new *dqc* alleles displayed defective responses to gravity. To understand the defects of *dqc* in the gravitropism, the expression pattern of *DR5p:GFP-GUS*, an auxin response reporter and the subcellular localization of PIN1-GFP, an auxin-efflux carrier were examined. In the *dqc* mutants, the expression region of *DR5p:GFP-GUS* in columella was expanded and the PIN1-GFP signal was abnormally accumulated in the putative lytic vacuoles together with normal accumulation in the basal plasma membrane, which suggests that the auxin transport in *dqc* mutants is partially compromised. The endocytosis of FM4-64 to the tonoplast-like membrane in *dqc* mutant is facilitated as compared to that in the wild-type background. To understand the roles of DQC in the endomembrane trafficking, the expression patterns of



various organelle-specific markers were introduced and examined in the *dqc* mutants. The expression patterns of endoplasmic reticulum/plasma membrane labeled with mCherry-NIP1;1 and Golgi apparatus labeled with mCherry-SYP32 in *dqc* mutant were indistinguishable to those in the wild type. Interestingly, the endomembrane labeled with mCherry-VTI12, the trans-Golgi network (TGN)/early endosome (EE) marker, in the *dqc-2* exhibited aberrant vacuolated structures instead of the puncta-shaped structures found in wild-type background. The expression of late endosome (LE)/prevacuolar complex (PVC), labeled with mCherry-RabF2a was increased and more stably maintained in the *dqc* mutants. In addition, the vacuoles labeled with mCherry-VAMP711 in *dqc-2* displayed fragmented and round structures unlikely to the tubular and interconnected structures found in the wild-type background. In addition, the protein storage vesicles found in mature embryo of *dqc* mutant were also smaller and more fragmented as compared with those in wild type. These results suggest that *DQC* might be involved in the endomembrane trafficking from TGN/EE, LE/PVC, to vacuole in Arabidopsis.

## 국문초록

# 애기장대의 근단분열조직의 구성에 필수적인 소포계류인자를 암호화하는 *DEFECTIVE QUIESCENT CENTER* 유전자의 특성 연구

김요한

지도교수 : 송상기

생명과학과

조선대학교 대학원

뿌리의 성장 및 발달은 주로 뿌리 분열조직에서의 지속적인 세포 분열과 분화 지역에서의 세포 신장에 의존한다. 뿌리에서 세포분열이 불활성화된 정지중심부의 세포는 뿌리의 모든 조직에 대해 세포 원천을 제공하기 위해 인접한 줄기세포와 함께 뿌리 분열조직을 구성한다. 뿌리 분열조직 발달의 조절기작을 이해하기 위해서 뿌리에 특이적으로 발현하는 GAL4 전사인자를 가진 *Q2610* 인핸서 트랩라인에 *UAS* 활성화 표지를 도입하여 새로운 돌연변이들이 선별되었다. 짧은 뿌리 및 세포 신장 감소 표현형을 나타내는 열성 돌연변이가 선택되었고, 정지중심부의 형태이상 및 정지중심부 reporter 유전자인 *WOX5p:GUS* 의 발현 양상의 결함으로 인해 이 돌연변이를 *defective quiescent center-1 (dqc-1)* 으로 명명하였다.

*dqc-1* 의 표현형을 유도하는 T-DNA 삽입 위치를 파악하기 위해서 TAIL-PCR 을 수행한 결과 *UAS* 서열을 포함한 T-DNA 가 At5g16280 유전자좌위에 위치하는 것을 확인하였다. *DQC* 유전자는 잠재적인 수송 단백질 복합체(TRAPP)III 특이적 소단위체인 AtTRS85 를 암호화한다. *DQC* 의 open reading frame 은 7,969 염기쌍이며 28 개의 엑손과 27 개의 인트론으로 구성된다. *dqc* 표현형을 갖는 두 개의 T-DNA 삽입 돌연변이 대립유전자 SALK\_208572 와 SALK\_130580 을 PCR genotyping 으로 확인하고 *dqc-2* 와 *dqc-3* 로 명명하였다. 교배에 의한 상보성 검정 시험을 통해서 *dqc-2* 가 *dqc-1* 의 대립 유전자라는 것이 확인되었다. 흥미롭게도 새로운 대립 유전자는 중력에 대한 결함 반응을 나타냈다. *dqc* 의 굴중성 결함을 이해하기 위해서 옥신 반응 리포터인 *DR5p:GFP-GUS* 의 발현 양상과 옥신 유출 수송체인 PIN1-GFP 의 세포 내 위치를 조사하였다. *dqc* 돌연변이의 근관 중축에서 *DR5p:GFP-GUS* 의 발현 영역은 확장되었고, PIN1-GFP 신호는 기저 원형질막에서의 정상적인 축적과 함께 잠재적인 lytic vacuole 에서도 비정상적으로 축적되었다. 이러한 결과들은 *dqc* 돌연변이에서의 옥신 수송경로가 부분적으로 손상되었음을 암시한다. *dqc* 돌연변이에서 endocytosis 를 통한 FM4-64 의 유사 액포막으로의 전달은 야생형 배경에 비해서 촉진되었다. 내막 수송에서의 *DQC* 의 역할을 이해하기 위해서, *dqc* 돌연변이에서 다양한 세포 소기관 특이적 마커들을 도입하여 발현 양상을 조사하였다. *dqc* 돌연변이에서 소포체와 원형질막을 표지하는 mCherry-NIP1;1 와 골지체를 표지하는 mCherry-SYP32 의 발현 양상은 야생형과 구별할 수 없었다. 흥미롭게도, *dqc* 돌연변이 배경에서 trans-Golgi network (TGN) / early endosome (EE) 마커인 mCherry-VTI12 로 표지된 막은 야생형 배경에서 발견된 반점 모양의 구조 대신 비정상적인 액포막성 구조를 나타냈다. mCherry-

RabF2a 로 표지된 late endosome (LE) / prevacuolar complex (PVC) 의 발현은 *dqc* 돌연변이 배경에서 증가하였고 안정적으로 유지되었다. 또한, *dqc* 돌연변이에서 mCherry-VAMP711 로 표지된 액포막은 야생형 배경에서 발견되는 관상의 상호 연결된 구조와는 다르게 보다 분절되고 둥근 형태의 구조를 나타냈다. 또한, *dqc* 돌연변이의 성숙한 배아에서 관찰되는 단백질 저장 액포도 마찬가지로 야생형과 비교하여 작고 분절화되었다. 이러한 결과는 애기장대에서 *DQC* 가 TGN / EE, LE / PVC 에서 액포로 진행되는 내막 수송에 관여한다는 것을 제시한다.

# I. 서론

## 1. 모델식물로서 애기장대의 가치

애기장대(*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh)는 배추과에 속하는 쌍자엽식물로서 짧은 생장주기, 자가수분능, 종자의 대량생산능 및 작은 유전체 크기에 기인한 돌연변이체 생성의 용이성 등의 장점으로 인하여 모델 식물로서의 가치가 높다 (Somerville and Koornneef, 2002). 애기장대는 최초로 염기서열이 모두 밝혀진 식물로써 진핵생물들 사이에서 보존된 분자생물학, 분자유전학 및 생화학적인 조절과정을 포괄적으로 비교하고, 광범위한 식물 특이적 유전자의 기능을 인지할 수 있는 중요한 모델 시스템이다 (Kaul et al., 2000). 애기장대의 유전체는 5쌍의 염색체로 구성되어있고, 기존의 연구를 통하여 다수의 돌연변이들이 확보되었고 해당 유전자들의 기능이 분석되었으며, 관심대상 유전자의 기능이 상실된 T-DNA 삽입 돌연변이의 확보가 용이하며, 상호교배를 통한 다중 돌연변이의 제작이 용이하여 해당 유전자의 기능을 표현형의 변화를 통해서 쉽게 유추할 수 있다 (Alonso et al., 2003).

## 2. 활성표지 도입을 통한 돌연변이 선별

유전학적인 경로를 파악하기 위한 주요 방법은 그러한 경로를 차단 또는 저해하는 기능상실 돌연변이를 선별하는 것이다. 그러나 기능상실 표현형에 의한 선별과정은 중복적으로 기능을 하는 유전자들을 식별하기 어려운 단점이 있다. 역유전학적인 연구방법을 통해서 이러한 중복성이 나타나는 유전자군의 기능을 인지할 수 있지만, 극단적으로 중복된 유전자들의 기능이나 배발생 또는 유식물 치사성으로 인해 표현형을 관찰하기 어려운 경우에는 역유전학적인 방법으로도 해당 유전자의 기능을 밝히기는 어렵다. 이러한 한계를 극복하기 위해서 Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S 인핸서를 이용한 활성표지 방법이 개발되었다 (Weigel et al., 2000). 35S 인핸서는 인접한 유전자들의 과대발현을 유도하기 때문에 다수의 유전자의 기능 획득 표현형을 확인할 수 있었지만, 35S 인핸서의 경우 모든 기관에서 높은 수준으로 인접한 유전자의 발현을 향상시키기 때문에 때로는 치사성을 유도할 수도 있다 (Odell et al., 1985). 최근에는 조직 특이적으로 과대발현을 할 수 있는 활성표지 도입 방법이 개발되었다. 효모에서 발견된 GAL4 전사인자는 UAS 인핸서에 특이적으로 결합하여 전사를 촉진한다. GAL4 유전자가 reporter 유전자 대신에 enhancer trap으로 작용하면 특정조직에서 GAL4 전사인자가 과대발현되는 애기장대를 확보할 수 있다. 이러한 애기장대의 유전체에 UAS요소가 5번 연속으로 반복된 활성표지를 무작위적으로 도입하면 활성표지에 인접한 유전자를 조직특이적으로 과대발현시켜 표현형을 확인할 수 있고 치사성이나 불염성을 회피하여 종자를 확보할 수 있다 (Webster et al., 1988; Gardner et al., 2008; Waki et al., 2013).

### 3. 애기장대의 뿌리 형성 과정

식물과 동물은 모두 하나의 세포인 접합자부터 배발생이 시작되며 초기 배 발생 과정은 세포분열, 패턴화와 기관 형성과정을 거쳐 분화와 성장을 한다. 하지만 식물은 동물과 다르게 성장하면서 지속적으로 전에는 없던 새로운 기관들을 형성한다. 식물의 후-배발생 기관 형성은 분열조직의 활성을 통해 발생하는데 지상부의 대부분은 정아분열조직(shoot apical meristem)에 의해 형성되며, 지하부의 대부분은 근단분열조직(root apical meristem)에 의해 형성된다. 두 분열조직은 배 발생과정 중에서 심장형 배아 단계에서 형성된다. 수정 후 접합자는 정단세포와 기저세포로 분열하게 되는데 정단세포는 지속적인 분열을 통해 배본체(embryo proper)를 형성하며 식물조직의 기본이 된다. 기저세포의 경우 여러 번의 분열을 통해 배에 영양분을 공급하는 역할을 하는 배병(suspensor)을 형성하게 된다. hypophysis라고 불리는 기저세포에서 유래한 제일 위쪽의 세포는 배본체(embryo proper)에 포함되어 근단분열조직의 중축근관(collumella root cap)과 정지중심부 세포의 기원이 된다. Hypophysis 세포는 비대칭적 분열 진행으로 상층부에 렌즈형태의 세포를 형성하게 되고 근단분열조직에서 미분화 세포들의 성숙 억제 역할을 하는 정지중심부로 발달하게 된다. 정지중심부 주위로 물관부/체관부, 피층 시원세포, 피층/내피 시원세포, 표피/측근관 시원세포, 내초가 존재하며, 줄기 세포의 역할을 수행하면서 지속적으로 미분화된 세포를 형성한다 (Benfey and Scheres, 2000; Cederholm et al., 2012).

## 4. 애기장대의 생장에 관여하는 옥신

고등식물에 존재하는 주요 옥신인 indole-3-acetic acid(IAA)는 세포분열, 세포 신장, 세포 분화 및 기관 형성 개시에 영향을 주는 고전적인 식물 호르몬이다 (Davies, 1995). 옥신의 중요성은 식물의 발달과 환경에 대한 반응, 비생물학적 스트레스 및 다른 생장호르몬과의 상호작용 등 거의 모든 측면에서 세포의 결정에 편재적으로 참여하는데서 강조된다 (Chandler, 2016). 식물체에서 옥신의 농도를 정량적으로 분석한 결과 주요한 옥신 합성 부위를 선별하였다. 신속하게 분열하는 조직, 경단분열조직, 발달과정의 열매나 종자, 신장 및 성숙과정의 근단분열조직처럼 어리거나 성숙 과정에 있는 조직과 기관에서는 옥신의 농도구배가 명확하게 관찰되었지만 완전하게 성숙한 기관과 조직에서는 옥신의 농도구배가 관찰되지 않았다 (Edlund et al., 1995). 또한 최근에는 뿌리에서 원형질체를 분리하여 조직특이적인 GFP의 발현세포를 형광활성화세포분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS)방법을 통해 옥신의 농도를 측정된 결과, 뿌리에서의 가장 높은 옥신 농도는 근단의 정지중심부에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 애기장대 근단에서의 옥신 농도의 고해상도 지도가 작성되었다 (Petersson et al., 2009). 옥신의 농도구배는 세포 또는 조직간의 합성효율 차이에 의해서만 결정되는 것이 아니라 옥신의 능동적인 수송에 의해서도 결정된다. 옥신은 유입 및 유출 운반 단백질을 통해 이동하는데 (Robert and Friml, 2009) 옥신 투과효소인 AUX1 단백질은 세포내로 옥신을 유입하는 유입 단백질로 증축, 측면 근관 그리고 중심주 조직에서 특이적으로 발현된다 (Marchant et al., 1999). 또한 AUX1



단백질들에 의해서 옥신의 수송이 촉진된다 (Muday and DeLong, 2001; Marchant et al., 2002). PIN 단백질은 세포막에 극성 분포를 가진 단백질로 옥신의 유출 단백질 (Heisler et al., 2005)이며 큰 gene family에 의해 암호화 되어 세포특이적인 발현양상을 보인다 (Křeček et al., 2009). 또한 세포 내에서 비대칭적으로 배열 (Dolan et al., 1993; Dhonukshe et al., 2008)되며 PIN 단백질들의 분포가 옥신의 농도구배 형성에 기여한다 (Křeček et al., 2009). ABCB transporter 또한 옥신 유출 단백질로 다양한 발현 패턴을 나타낸다 (Wu et al., 2007; Titapiwatanakun and Murphy, 2008). ABCB 유전자의 기능은 표현의 여러 패턴과 세포의 위치에 의해 부분적으로 결정되며 아직까지 특징이 없는 것도 존재하며 ABCB 단백질들은 PIN 단백질들을 안정화시킨다 (Titapiwatanakun and Murphy, 2008). 애기장대에서는 PIN과 ABCB라는 두 종류의 수송 단백질이 식물체 전체로의 옥신 흐름을 지시한다. 옥신의 신호 전달은 옥신 반응 유전자의 프로모터에 위치한 옥신 반응 요소(auxin response element)에 결합하는 옥신 반응 인자(auxin response factor, ARF) 단백질들의 종류에 따라 유전자의 발현의 활성화되거나 억제된다 (Chandler, 2016). 식물의 신호전달 경로는 리프레서 단백질의 불활성화를 통해 신호가 전달되는데 옥신 수용체인 SCF 복합체 성분인 TIR1과 리프레서 단백질인 AUX/IAA가 옥신과 결합하여 유비퀴틴화된 후에 프로테아솜에 의해 분해되면 불활성 전사인자인 ARF가 활성 이량체가 되어 전사가 활성화 되어 신호전달이 이루어지게 된다.

## 5. 식물의 종자 표면 점액질의 기능

종자 수분 공급시 방출되는 종피 또는 과피에 의한 친수성 점액의 생성은 피자식물에서 일반적으로 발견되는 적응이다. 이들은 주로 수화 시에 실질적인 팽창을 겪는 펙틴(pectin)과 헤미셀룰로오스(hemi-cellulose)로 구성된다. 골지체에서 합성되고 분비성 소포를 통해 분비되는 점액에는 미세 소관과 함께 원형질막에서 합성되는 셀룰로오스 미세 섬유 또는 셀룰로오스 섬유가 포함될 수 있다. 점액층의 변화는 배아의 보호를 가능하게 하고 궁극적으로 분화와 발아 촉진까지 포함된다. 리그닌이나 수베린과 같은 불침투성 고분자를 침착시키거나 2차 대사산물 합성을 통해 형성하는 경우도 있지만 애기장대 종자의 경우 종자 표면으로부터 생성된 주변 과피에 친수성의 펙틴성 점액을 침착시킨다 (Fahn, 1967; Grubert, 1974; Boesewinkel and Bouman, 1984). 애기장대의 과피 주변에 두 가지의 층이 존재함을 확인하였는데 최외각에 존재하는 흔들리며 쉽게 추출이 가능한 확산층과 내부에 강하게 밀착된 조밀한 층이다 (Harpaz-Saad et al., 2011).

식물 종자 표면에 형성 되는 점액층이 탁월한 친수성과 인상적인 팽윤 및 수분 보유 능력으로 인해 종자 수화 및 후속 발아를 위한 물 저장소로서의 역할을 한다고 밝혀졌다. 또한 수화된 펙틴 점액은 점착성이 매우 뛰어나 씨앗이 토양이나 다른 표면에 부착하는 접착제 역할을 하는 것으로 확인되었다 (Fahn, 1967; Grubert, 1974; Kreitschitz, 2009).

## 6. 막 수송 및 소포 수송을 통한 소포 이동 경로

세포내막계의 수송 경로 중 소포 수송을 통해 막과 화물을 공유하는 방법은 크게 5단계로 나누어진다. 첫 번째로 소포가 공여 막에서 생성되는 단계로 발아단계(budding)라고 한다. 두 번째는 수송단계(transport)로 공여 막에서 생성된 소포가 모터 단백질의 도움을 받아 미세소관 경로를 따라서 표적 막으로 이동하는 단계이다. 세 번째는 테더링단계(tethering)로 소포가 표적 막 근처에 도달하면 소포에 존재하는 Rab GTPase와 표적 막의 테더링 분자 또는 복합체(tethering molecule or complex)와 결합하게 되는 단계이다. 네 번째는 결합단계(docking)로 고정된 소포에 존재하는 v-SNARE와 표적 막에 존재하는 t-SNARE의 결합으로 trans-SNARE 복합체 형태가 되어 소포가 타이트하게 묶여 정착하게 되는 단계이다. 마지막 단계는 융합단계(fusion)로 cis-SNARE 복합체로 변환되어 소포와 표적 막을 융합시키게 되고 소포 내부의 소포화물을 표적 구획에 전달하게 된다 (Ravikumar et al., 2017). 막 수송 외에 소포 수송에도 소포를 통해 내용을 공유하며 각 이동 경로로의 수송에 많은 테더링 복합체가 연관되어 소포 수송을 진행시킨다 (Figure 1).

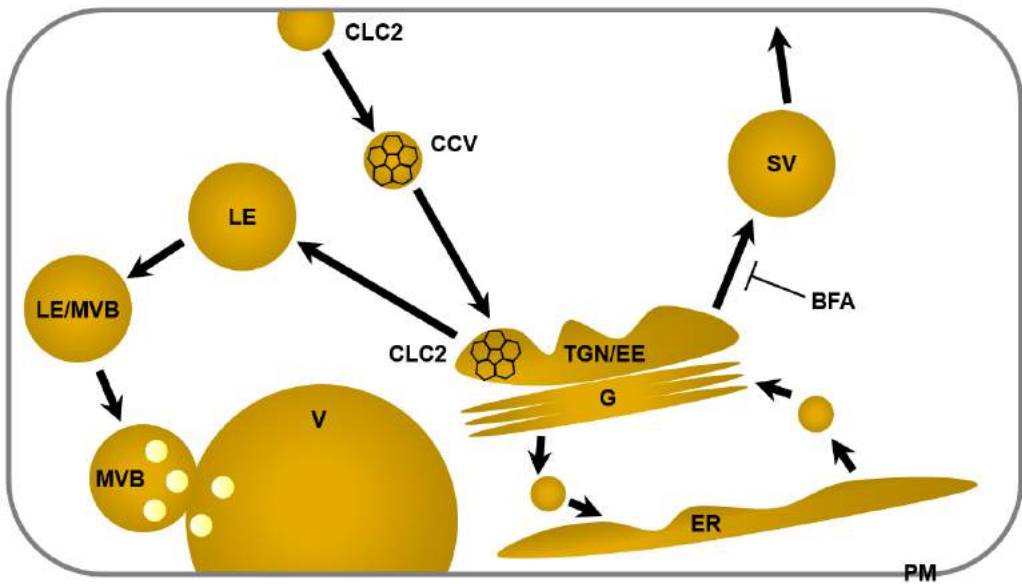


Figure 1. A schematic overview of the endomembrane system.

In plant cell endomembrane system, appears the location of the specific vesicle trafficking stage.

## 7. 수송 단백질 입자 복합체

세포 내 구획 사이의 수송은 소포에 의해 매개되며 고도로 보존된 Ypt/Rab GTPase, 뉴클레오티드 교환체, 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(guanine nucleotide exchange factor, GEF) 및 이들의 하위단계 적응인자에 의해 조절된다 (Lipatova et al., 2012). 다중 단백질 복합체는 공여체 구획에서의 소포 형성, 후속 표적화, 테더링 및 수용체 구획과의 융합을 용이하게 하는데 그러한 복합체 중 하나인 수송 단백질 입자 복합체 (transport protein particle complex, TRAPP complex)는 고도로 보존된 다중-소단위체 단백질 복합체이다 (Kim et al., 2016). 효모를 이용한 연구를 통해 세 개의 TRAPP 복합체가 알려져 있는데 TRAPP I은 소포체에서 골지체로의 수송을 담당 (Bröcker et al., 2010), TRAPP II는 골지체 및 트랜스 골지네트워크(TGN)로의 수송에 관여 (Yorimitsu et al., 2014), TRAPP III는 자가포식 관련 막 수송과 골지체로부터 세포외배출의 기능을 한다고 알려져 있다 (Jones et al., 2000). 3종류의 TRAPP 복합체에는 모두 공통적인 소단위체가 존재하며 TRAPP II 복합체에만 특이적으로 존재하는 Trs65, Trs120, Trs130이 포함되어 있다. TRAPP III 복합체는 Trs85가 특이적으로 존재한다 (Thomas et al., 2018).

## 8. 애기장대 세포내막계의 테더링 복합체

세포내막계(endomembrane system)는 원형질막을 포함하여 소포체와 연결되어 있거나 소포체에서 유래된 세포의 모든 막에 적용되는 시스템이다. 세포내막계의 일부 구성요소는 이러한 세포내막계와 직접적이고 영구적인 연결을 가지고 있는 반면, 다른 구성요소는 한 구성요소에서 다른 구성요소로 소포를 수송함으로써 막과 내용물을 공유한다. 식물의 세포는 세포벽에 싸여 있기 때문에 식물 성장과 발달의 조절은 동물에서 전형적으로 나타나는 세포의 운동이 없이 방향성 있는 세포 분열과 세포 신장에 의존한다 (Vukašinović and Žárský, 2016). 이렇게 정확하게 위치한 세포 분열과 세포 신장을 달성하기 위해서 막 구획의 동질성과 역학 관계는 세포 골격과 막 관련 단백질뿐만 아니라 막 지질과 관련된 복잡한 조절 네트워크에 의해 제어된다 (Zerial and McBride, 2001; Woollard and Moore, 2008). 내막 수송 소포의 표적화는 적절한 육상 식물의 성장과 발달을 위해 가장 중요하다. 식물 세포의 부동성을 고려할 때, 국소화된 막 소포 분비 및 재활용은 적절한 세포, 조직 및 전체 식물 형태 형성을 유도하는 주요 과정에 속한다 (Vukašinović and Žárský, 2016). 세포 내부의 구획 사이에서 발생하는 내막 수송 과정에는 막을 운반하는 소포와 표적 막을 인식하기 위한 명확하고 특징적인 메커니즘이 필요하다 (Grosshans et al., 2006). 테더링 인자(tethering factor)는 표적이 되는 막과 도착하는 소포의 막 사이에서 첫 번째 접촉을 중재하는 단일 단백질 또는 단백질 복합체이며, 테더링 복합체는 small GTPase 조절과 작동인자의 역할을 수행한다 (Koumandou et al., 2007).

## 9. TRAPP complex의 기능

식물은 효모에서 필수적인 모든 TRAPP I 및 TRAPP II 소단위체와 TRAPP III 특이적 소단위체인 Trs85에 대한 ortholog를 보유하고 있다 (Thellmann et al., 2010). 효모에서처럼 TRAPP II 복합체는 세포외방출과 함께 late Golgi 수송 단계에 연관되어 있다 (Rybak et al., 2014). 하지만 식물에서의 TRAPP I 복합체 및 TRAPP III 복합체에 대한 기능은 현재 알려지지 않았다.

본 연구에서 애기장대의 뿌리 성장을 조절하는 새로운 유전자를 얻기 위해 GAL4-UAS 활성화표지를 도입하여 *defective quiescent center-1* (*dqc-1*) 돌연변이를 선별하게 되었다. *dqc-1*은 열성 돌연변이로 과대발현이 아닌 암호화 지역의 T-DNA 삽입으로 나타나는 기능상실 돌연변이다. 아직까지 *dqc-1*에 대한 연구가 전혀 보고된 바 없기 때문에 *dqc-1* 및 *DQC* 유전자의 암호화 지역 내에 삽입된 T-DNA로 인해 나타나는 여러 삽입 돌연변이들의 표현형과 조직 특이적 발현 양상을 조사하여 정확한 기능을 이해하고자 시도하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구 식물 준비와 생장조건

본 연구를 진행하는 데 사용된 애기장대 야생형은 Columbia-0 (Col-0), Q2610-Col를 이용하였고, 뿌리 신장에 결함이 있는 *dqc-1*을 사용하였다. 또한, AT5g16280 유전자 주위에 T-DNA가 삽입되어 있는 돌연변이 SALK\_208572c와 SALK\_130580를 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC)에서 주문하여 실험을 수행하였다. 애기장대는 무균상태의 배지와 흙에서 배양하였는데 무균상태의 배지에서 배양하기 위해서 주위 환경을 무균상태로 유지하고자 clean bench 내에서 종자를 0.7% NaOCl 용액으로 표면 살균한 후 증류수로 8회 세척하여 최대한 NaOCl이 남아 있지 않도록 진행하였고 멸균된 파스퇴르 피펫을 이용하여 0.7% gelite가 고형화된 1/2 MS 배지 위에 파종한 후 오염 방지를 위해 배지 테두리를 감싸준 후에 4°C에서 3 일간 배양한 후 23°C 배양상에서 24 시간 광주기 조건을 유지시켜주면서 수직으로 세워서 배양하였고 발아 후 약 7 일 후에 유식물을 배양토에 이식하여 배양하였다. 흙에서 배양하는 경우에는 Osmocote 14-14-14 약 1 g/pot을 함유하고 있는 1:1:1 비율의 흙 : 펠라이트 : 질석 혼합물 (Sunshine Mix #5, Sungro)이 포함된 pot에 종자를 파종하여 4°C에서 5 일간 배양한 뒤 23°C 24 시간 광주기 조건이 맞춰져 있는 배양상에서 배양시켰다.



## 2. 배지 및 조성

### 2-1. Luria-Bentani (LB) broth 배지

1 L 기준으로 Luria broth (tryptone, yeast extract, NaCl) 혼합물 25 g과 1 L 증류수를 2 L 용량의 삼각 플라스크에 첨가한 후 흔들어서 완전히 녹인 후 삼각 플라스크에 agarose powder를 총량의 1.5% 넣어준 후 오염을 방지 하기 위해 알루미늄 호일로 입구를 밀봉해 준 뒤 autoclave 시행하였고 65°C 항온수조에서 1~2 시간 정도 두면서 식힌 뒤에 0.2  $\mu\text{m}$  필터로 멸균한 항생제를 투입하여 흔들어 준 후에 petri dish에 분주하였다. 상온에서 굳힌 뒤 10개씩 밀봉하여 4°C에서 보관하였다.

### 2-2. Murashige and Skoog 배지

1 L를 기준으로 2 L 용량의 삼각 플라스크에 sucrose 10 g과 MES 0.2 g, 증류수 1 L를 넣고 녹인 뒤 1 M  $\text{MgSO}_4$  2 ml, 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  2 ml, 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 ml, 20 mM FeEDTA 2.5 ml를 넣고 녹인 후에 1 M KOH를 극소량으로 여러 번에 걸쳐 첨가하여 pH 5.8을 맞춰 주었다. 마지막으로 Gelite 6 g을 첨가해준 뒤 알루미늄 호일로 입구를 밀봉하여 autoclave 진행하였고, 65°C 항온수조에 넣고 온도를 식혀준 후에 square dish에 분주하였다. 상온에서 굳힌 뒤 비닐로 밀봉하여 4°C에서 보관하였다.

### 3. Genomic DNA 추출

순도가 높은 genomic DNA를 추출하기 위해서 애기장대의 어린 잎 조직을 잘라서 막자사발에 넣고 액체질소를 부어주면서 갈아준 후에 샘플을 1.5 ml microcentrifuge tube에 모아 뚜껑을 닫고 액체질소에 넣고 30 초간 냉각시킨다. 냉각된 샘플 튜브 안에 cell lysis 용액 300  $\mu$ l를 첨가하고 65°C의 항온수조에서 60 분간 두었다. RNaseA (4 mg/ml) 1.5  $\mu$ l를 첨가하고 inverting 진행하여 혼합시킨 뒤, 37°C 항온수조에서 30 분간 반응시키고 꺼내 상온에서 5 분간 온도를 낮춰준 뒤에 protein precipitation 용액을 100  $\mu$ l 첨가하고 1 분간 vortexing 진행하였다. 이후에 10,000 rpm으로 5 분간 원심분리 진행한 후에 상층액을 새 튜브에 담고 100% isopropanol 300  $\mu$ l 첨가한 뒤에 inverting 진행하였다. 10,000 rpm으로 1 분간 원심분리 진행하고나서 상층액은 버리고 WB (80% ethanol) 500  $\mu$ l를 첨가하여 inverting 해주고 10,000 rpm으로 1 분간 원심분리 시킨 후 상층액 제거하였다. 한번 더 10,000 rpm으로 2 분간 원심분리 시켜 튜브 안에 있는 ethanol을 완전하게 제거해준 뒤에 15 분간 상온에서 건조시킨 후 DNA hydration 용액을 20~100  $\mu$ l 넣어준 뒤 vortex 진행하여 추출하였다.

genotyping을 위한 genomic DNA의 추출은 간단하고 빠른 방법으로 시행하였다 (Edwards et al., 1991). 어린 잎 1~2개를 자른 후 1.5 ml Eppendorf tube에 담고 extraction buffer (250 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH 7.5, 25 mM EDTA pH 8.0, 0.5% SDS) 200  $\mu$ l를 넣은 후 blue pestle을 이용하여 열이 발생하지 않도록 최대한 밀착시킨 채로 천천히 갈아준 다음 vortexing 진행하고 14,000 rpm으로 4°C에서 5 분간 원심분리 시행하고,

상층액 150  $\mu$ l을 새 tube에 담아준 뒤 isopropanol 150  $\mu$ l를 넣고 2 분간 상온에서 반응시켰다. 다시 14,000 rpm으로 상온에서 2 분간 원심분리 시행한 후에 상층액을 제거한 후 70% ethanol을 넣고, 14,000 rpm으로 1 분간 상온에서 원심분리 시행하였다. tube 안의 ethanol을 제거하고, 15 분간 눕혀서 건조한 뒤 멸균된 증류수 50  $\mu$ l를 넣고 녹여서 genomic DNA를 추출하였다.

#### 4. Primer 디자인

T-DNA 삽입 위치를 찾기 위해 진행하는 thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction (TAIL-PCR)에 사용하기 위한 degenerative primer를 제작하였다 (Liu and Whittier, 1995). 또한 genotyping을 통해 homozygous인 식물을 선별하기 위해 프라이머를 디자인 하였다. 디자인된 프라이머들은 MacroGen을 통해 주문하여 제작하였다 (Table 1).

#### 5. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

애기장대에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하고 제작한 특정 primer (MacroGen)와 Taq PCR용 buffer와 polymerase, Pfu PCR용 buffer와 polymerase (Nanohelix)를 사용하여, 94 $^{\circ}$ C에서 3 분, 94 $^{\circ}$ C 30 초, 52 $^{\circ}$ C에서 30 초, 72 $^{\circ}$ C에서 2 분을 25회 진행하고 72 $^{\circ}$ C에서 5 분간 반응하였다.

## 6. TAIL-PCR 진행

TAIL-PCR은 3차에 걸쳐 진행하였으며 진행 방법은 아래와 같다 (Liu and Whittier, 1995). pBIB-UAS vector (Waki et al., 2013)의 left border에 상보적인 3종류의 프라이머(pBIBLB172, pBIBLB272, pBIBLB372)를 1차부터 3차까지 순서대로 사용하였고 degenerative primer인 DEG1을 공통으로 사용하여 Taq polymerase를 사용하여 PCR 반응물의 총량이 20  $\mu$ l가 되도록 만들어 진행하였다. 1차 PCR 조건은 93 $^{\circ}$ C로 1 분, 95 $^{\circ}$ C로 1 분간 반응시키고, 다음 단계에서 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초씩 5회 동안 반응시키고, 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 25 $^{\circ}$ C부터 72 $^{\circ}$ C까지 0.2 $^{\circ}$ C/sec의 조건으로 3 분을 반응시켰다. 그리고 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초, 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초 반응시켰고, 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 44 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초를 15회 진행하고, 72 $^{\circ}$ C에서 5 분간 반응하였다. 2차 PCR 조건은 1차 PCR 생성물을 1/50 희석시켜 주형으로 사용하였으며 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초, 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 60 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초를 진행하고, 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 44 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초를 12회 진행하고, 72 $^{\circ}$ C로 5 분동안 반응하였다. 3차 PCR에서는 2차 PCR의 생성물을 1/10 희석시켜 주형으로 사용하여 94 $^{\circ}$ C로 30 초, 44 $^{\circ}$ C로 1 분, 72 $^{\circ}$ C로 2 분 30 초를 20회 진행하고, 72 $^{\circ}$ C로 5 분간 반응하였다.

## 7. PCR 생성물의 정제 및 전기영동

PCR 진행을 통해 증폭된 DNA는 Nanohelix 사의 purification kit 이용하여 정제하였다. 정제된 산물은 0.5% TBE buffer와 agarose, 그리고 NeoScience 사의 Neogreen을 10 ml/0.5  $\mu$ l 사용하여, 1% TBE agarose gel을 만들어 full voltage로 30 분간 전기 영동을 진행하였으며, Enzymomics 사의 1kb(+) DNA ladder marker를 gel에 같이 걸어 밴드 사이즈를 확인하였다.

## 8. Ligation

Ligation은 Thermo 사의 CloneJET PCR cloning kit와 Roche 사의 ligase를 사용하여 총량 10  $\mu$ l를 만든 후 알루미늄 호일로 튜브를 감싼 뒤 상온으로 16 시간 반응을 진행하였다.

## 9. 형질전환

Ligation 진행으로 형성된 plasmid를 *E.coli* (*Escherichia coli*)에 삽입시키는 방법(Hanahan, 1985)으로 낮은 RPM과 온도로 천천히 배양시킨 DH5  $\alpha$ 에 CaCl<sub>2</sub> 를 처리하고 Eppendorf tube에 분주한 뒤 -80°C deep freezer에서 개별 보관하던 competent cell 100  $\mu$ l을 얼음에 넣고 서서히 녹여준 후 ligation 생성물 5  $\mu$ l을 첨가해주고 얼음에서 10 분간 반응 시킨 뒤 42°C 항온수조에서 43 초간 heat shock을 가해준 후 바로 얼음에 2 분 동안

반응시킨다. Clean bench 내에서 LB 액체배지를 500  $\mu$ l를 넣어준 후 37°C 배양기에서 20 분간 배양시키고 진탕 배양기에서 40 분간 배양했다. ligation을 진행한 vector의 종류에 따라 특이적인 항생제가 함유된 LB 고체배지에 고르게 도말하여 37°C 배양기에서 15 시간을 배양하였다.

## 10. Colony PCR

형질전환 진행 후 항생제 배지에 형성된 콜로니를 주형으로 사용하고 삽입된 plasmid의 내의 원하는 유전자의 프라이머를 이용하여 colony PCR을 시행하여 원하는 DNA가 삽입된 콜로니를 선별하였다.

## 11. Plasmid DNA purification

Clean bench 내에서 14 ml round-bottom tube (Falcon)에 증폭시키고자 하는 colony에 맞는 항생제가 추가된 LB 액체배지 3 ml를 넣은 후 선별된 colony를 접종하여 37°C 진탕 배양기에 넣고 15 시간 배양을 하고 다음 날 Pavorgen 사의 Plasmid extraction mini kit를 사용하여 플라스미드를 정제하였다.

## 12. GUS 발현 분석

GUS 발현을 분석하기 위해 GUS 염색 시약(100 mM Na<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)에 5 mg/ml X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucurionide cyclo hexeyl ammonium salt)을 넣어 시약을 제조한 후 1/2 MS 배지에서 자란 식물체 중에서 관찰하고자 하는 부위의 조직을 잘라서 넣고 28℃ 배양기에서 15 시간 반응시킨 후 광학현미경(Zeiss, Axioskop) 또는 실체현미경(Leica, MZ10F) 을 이용하여 GUS 염색 패턴을 관찰하였다.

## 13. Seed coat mucilage 염색

종자의 겉표면에 존재하는 점액층(Mucilage)을 확인하기 위해 두가지 방법으로 염색을 진행하였다. 첫 번째 방법은 종자를 Eppendorf tube에 넣고 50 mM EDTA 800 ml를 첨가한 뒤 진탕 배양기에서 27℃, 200 RPM으로 2 시간 가량 배양시킨 후에 파스퇴르 파이펫을 이용하여 EDTA를 최대한 제거해주고 0.01% ruthenium red (Sigma-Aldrich) 희석액을 800 ml 첨가한 뒤 27℃, 200 RPM으로 1 시간 배양시켰다. ruthenium red 희석액을 제거하고 dH<sub>2</sub> O로 교체해준 뒤 slide glass 위에 dH<sub>2</sub> O를 소량 떨어뜨린 뒤 그 위에 종자를 올려놓고 실체현미경(Leica, MZ10F)으로 관찰하였다. 두 번째 방법은 50 mM EDTA와 진탕 배양기에서의 배양을 진행하지 않고 바로 0.01% ruthenium red 희석액 800 ml를 종자가 담겨 있는 tube에 넣고 최대한 움직임을 최소화하여 상온에서 2 시간 가량 염색 시켰다.

## 14. 뿌리 길이 측정

측정하고자 하는 대상의 종자를 1/2 MS 배지에 파종하고 밀봉해준 뒤 4℃에서 3 일간 보관하고 23℃ 성장상으로 옮겨 배양한다. 식물이 발아하기 시작한 시점부터 7 일간 동일한 시간에 관찰하였으며 샘플의 개수 또한 동일하게 하였다. 실체현미경(Leica, MZ10F)으로 관찰 후 일정 배율로 사진을 찍은 후에 측정하였으며 측정 위치는 식물의 하배측과 뿌리의 경계부터 뿌리 끝부분까지 측정하였다.

## 15. 뿌리 굴중성 분석 실험

뿌리의 굴중성 분석을 위해 종자를 1/2 MS 배지에 심고 밀봉한 후 4℃를 유지시켜주면서 3 일간 보관한 뒤에 23℃ 성장상으로 옮겨 5 일간 수직으로 배양하였다. 이후에 모든 식물을 새로운 1/2 MS 배지로 옮기고, 명조건으로 23℃에서 1 시간 동안 배양한 다음 배지를 90° 로 회전시킨 후 16 시간 배양하였다.



Table 1. List of PCR primers used in this study

Target gene	primer	Sequence
<i>dqc-2</i>	Forward	5'-TTGACACCCATAAACTTATGACG-3'
	Reverse	5'-TGTGTTCCGCGTTTACTATCC-3
<i>dqc-3</i>	Forward	5'- ACTTGGATGTGCTCTCACTGG -3'
	Reverse	5'- ATGGTTCACCGCATCACTTAC -3'
<i>tpst</i>	Forward	5'-TGTTGTGTGGTTAAGGCTGTG-3'
	Reverse	5'-GGCTTTTGAATTTCTGCACAC-3'
pBIBLB372		5'-GCAGCTGGCACGACAGGTTTC-3'
pBIBLB272		5'-GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT-3'
pBIBLB172		5'-GTCGACAGATCTCATGCCTGCA-3'
DEG1		5'-WGCNAGTNAGWANAAG-3'

### III. 결과

#### 1. 5x UAS 활성화표지를 이용한 돌연변이 선별

애기장대의 뿌리 성장을 조절하는 새로운 유전자를 선별하고자 뿌리 부분에서 GAL4-VP16 전사인자를 과량으로 발현하는 Q2610 배경에 UAS요소가 5번 직렬로 배열된(5x UAS) 활성화표지 (Waki et al., 2013)를 도입하였다. 형질전환된 T<sub>1</sub> pool에서 형질전환된 식물을 선별하기 위하여 hygromycin B 항생제가 포함된 1/2 MS 배지에 과중하여 선별한 다음 표현형을 관찰한 결과 야생형과는 다른 형태를 나타내는 형질전환된 식물체들을 선별하였고 이들을 *defective root development-5* (*drd-5*) 돌연변이라고 명명하였다 (Song, 2016). 이들중에서 *drd-5*는 뿌리의 길이가 짧고 뿌리털의 간격이 좁으며 뿌리털의 신장이 억제된 특징을 가진 열성 돌연변이였다. 야생형과 *drd-5* 돌연변이의 뿌리 표현형 차이를 보다 상세하게 비교하기 위해 공초점 현미경으로 야생형과 *drd-5*의 뿌리를 관찰하였다. 그 결과 야생형의 정지중심부는 일정한 크기와 형태를 유지하고 있었으나 *drd-5*의 정지중심부는 형태가 불규칙적이고 수축된 형태를 가지고 있음을 확인하였다. 또한 정지중심부(quiescent center, QC)에서 특이적으로 발현되며 증축근관세포의 분화를 억제하는 것으로 알려진 유전자인 *WOX5* (Sarkar et al., 2007)의 발현 양상을 조사하기 위하여 교배를 통해서 *WOX5p:GUS* 리포터 유전자를 *drd-5* 배경에 도입하였다. 그 결과, *WOX5p:GUS*는 야생형 배경과는 달리 *drd-5* 배경에서 다수의 세포에서 불규칙적으로 발현되는 것을

관찰하였는데 이는 *dqc-1* 정지중심부의 정체성에 이상이 나타났음을 의미한다 (Figure 2). 이러한 표현형의 특징에 근거하여 *drd-5*를 *defective quiescent center-1 (dqc-1)*이라고 명명하였다.

정지중심부는 인접한 stem cell initial들의 발달을 조절하는 역할을 수행하기 때문에, QC의 형태 및 정체성 이상으로 인해 *dqc-1* 뿌리 발달에 이상이 나타났을 가능성이 있다. 따라서 야생형과 *dqc-1* 돌연변이의 분열조직 사이에 어떠한 차이가 존재하는지를 확인하기 위하여 분열조직의 세포수와 분열조직의 길이를 측정하였다. 측정 결과 *dqc-1* 분열조직의 세포수 및 길이는 야생형에 비해서 유의미하게 감소하였음을 확인하였다 (Figure 3). 이러한 결과는 *DQC* 유전자는 정지중심부의 정체성 수립과 근단분열조직의 유지를 위해서 필수적인 역할을 수행하고 있음을 의미한다.

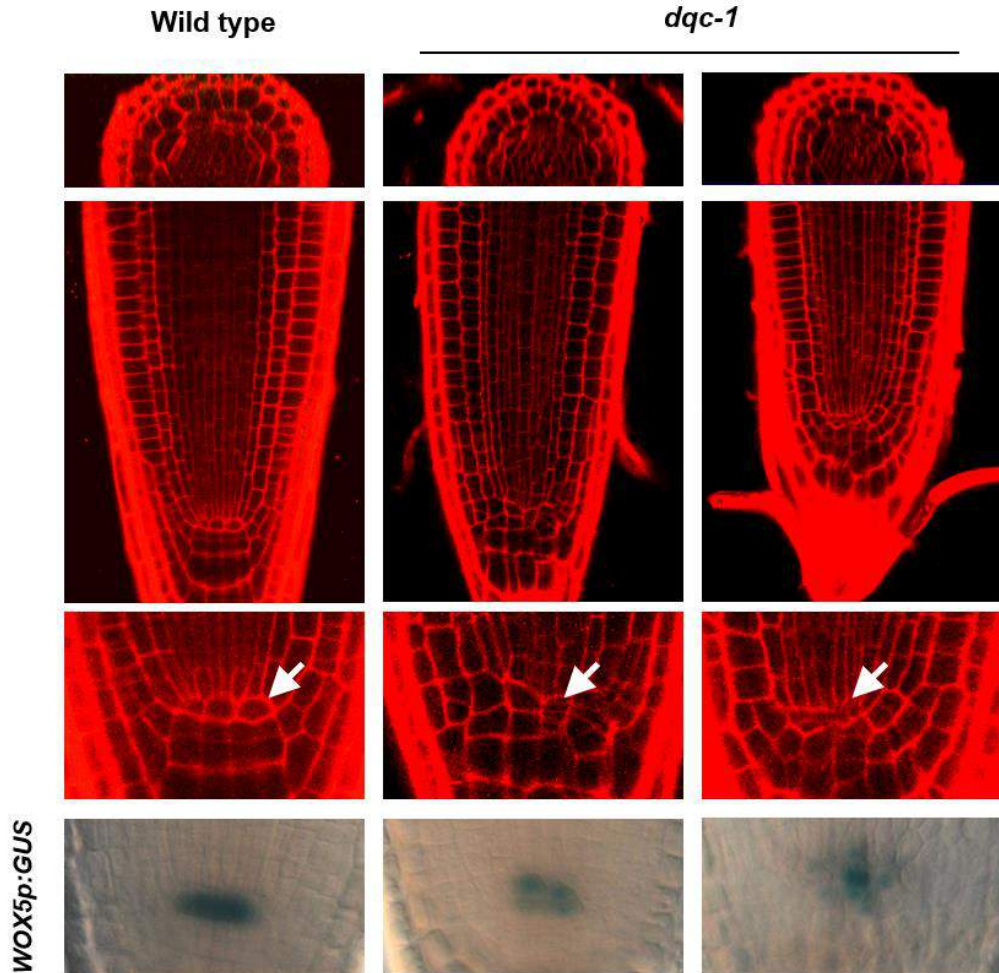


Figure 2. *dqc-1* is defective in root meristem development displaying aberrant quiescent center.

Confocal microscopic images of WT and *dqc-1* root meristem stained with propidium iodide. Arrows indicated the position of quiescent center (QC). The expression pattern of *WOX5p:GUS*, a QC marker is compromised in *dqc-1*.

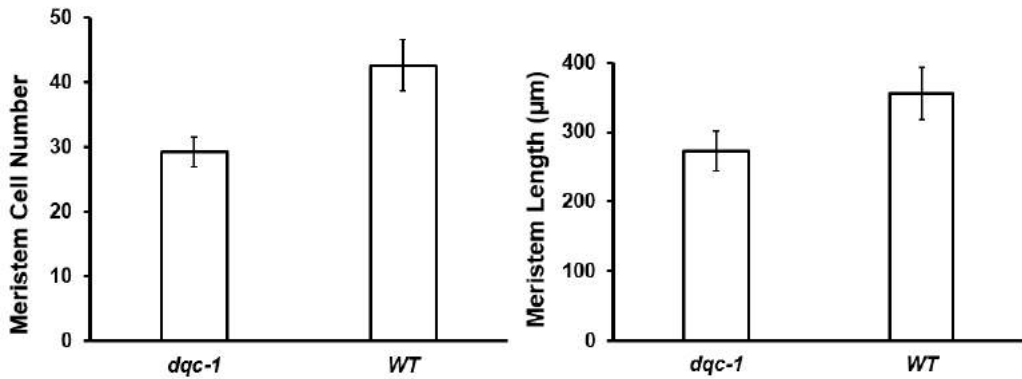


Figure 3. *dqc-1* displays reduced root meristem activity.

The number of cells and length of root meristematic zone were measured based on the shape of non-elongated cortex cell. Error bars indicate standard deviation.

## 2. TAIL-PCR을 통한 T-DNA 삽입 위치 확인

*dqc-1*의 돌연변이 표현형을 유도하는 T-DNA 삽입 위치를 확인하기 위하여 genomic DNA를 추출하였고 pBIB-UAS vector (Waki et al., 2013)의 left border에 상보적인 primer (LB172, LB272, LB372)와 degenerated primer (DEG1)을 사용하여 TAIL-PCR을 진행하였다. LB372 primer를 사용한 1차 PCR부터 LB172를 사용한 3차 PCR까지 진행한 결과 3차 PCR 생성물의 크기가 2차 PCR 생성물과 비교하여 감소하는 형태를 나타내는 것을 확인하였다 크기는 약 900bp 정도였다 (Figure 4). 3차 PCR 결과로 획득한 DNA를 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 pBIB-UAS 벡터에서 기원한 5개의 UAS 활성표지의 존재가 확인되었고 T-DNA는 At5g16280 좌위의 26번째 엑손의 1010번째 아미노산에 삽입된 것을 확인하였다 (Figure 5).

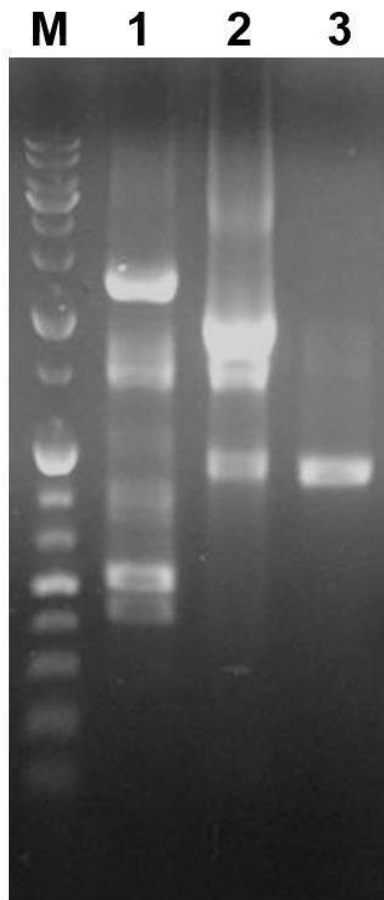


Figure 4. The results of TAIL-PCR gel electrophoresis by using the *dqc-1* genomic DNA as a template.

The PCR product size of the third reaction was smaller than that of the second reaction. By adding Neogreen (NeoScience), an ethidium bromide substitute, the DNA was visualized.

```

tgaattagaattttgctcaactttcagGATTGAGAAAAATCCGGGACTGAAGACGAGGAAACCACGTCCCTTCCAGCCAAACTG 1008
          D C R K S G T E D E E T T S L P P S Q T
ATGTAAATTTGATACTCAGGATGACGATGAAAAGCTTTTCGATATCGTTAGCTCACCTTTAGCAAGCTTCCATGAAAGTAAAAGGTCAT 1028
D V K L Y T Q D D D E K L F D I V S S P L A S F H E S E R S
GTCAGGGACCCTCGGTTTCAGGtaagcgaatatcctctttcagggtcataaatcttatgtatgtcttatgtgcgtgagatttttttgaa 1058
C Q G P S V Q
atatgtattactctcttaaacacagatcaacttccctggtaacttatcatcggaactgtggtgaaactcaaatttctttgatgaaacagGT 1065
          V
AAGTCCAAATACTGTTGACTTCATCCTAATCTCTCGCCTGGCGAAAAGCAGCAGTCCATCAGCAGTTCGGATTTACCAAAGATTTTGTC 1066
S P N T V D F I L I S R L A K S S S P S A V P D L P K I L S
TCACCATTCATGTCATAACAGGtaaaagtaccogcaagatatctttctgcagattgcaaacctattgtccacttctaataccogttggtg 1096
H H S C H N S
tcaattacagtATCAGAAGCTCGAGCCCGATCTCGTGGTCACTAGACGGTCCCCAAAACCATACACCACGACTTTTCGACCTCCTTGTGTG 1103
          I R S S S P I S W S L D G P Q T I H H D F S T S L C
AAATAAAACTAAAGATGGTAATCAGAAACACATCTGATGGAATATCATCTGTGACCATCAACACGAATGATTTTCTACCAGACGCAGCAG 1129
E I K L K M V I R N T S D G I S S V T I N T N D F L P D A A
CAACTACTTCTTCTCTGGAAACCAATCCGGGTGGCGCTACGTGCCAACCATCAGAGGAAATGAAACTAACTTCAGATGTGATGGGAA 1159
A T T S S S G N Q S G W R Y V P T I T E E M K L T S D V M G
GCCGCTGGGAAAACCGCCATCTCCATGGAAAGCTCACCTCCCTTTTCATATGTTGTCAGGTTTAAAGTTCCACAAAGATCCAAATCCAGCCAT 1189
S R L G K P P S S M E S S P P F I W S G L S S T K I Q I Q P
TATCCACACCGAAATACCGCTGCAGATATCAGTTTTCTCTCCAGGTATCTACGATCTGTCTTCATATGAACTTAACTGGGAGCTATCTG 1219
L S T T E I P L Q I S V F S P G I Y D L S S Y E L N W E L S
AGCATGAAAGTGCAACATCATCAGGGACATGCCAAGTTATCCTTATTACCTTACTGTTCTTCAGTCTGAGTGAagcttttatagttctct 1249
E H E S A T S S G T C Q G Y P Y Y L T V L Q S E *
  
```

Figure 5. *dqc-1* phenotype is induced by a T-DNA insertion which is located in the open reading frame of At5g16280.

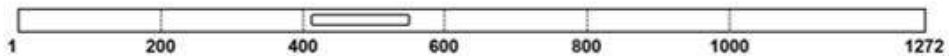
The site of T-DNA insertion inducing *dqc-1* phenotype was determined by the sequencing analysis of the TAIL-PCR product. A part of nucleotide sequence of the At5g16280 is shown. The bold and underlined A letter indicates the bordering sequence of Arabidopsis genomic DNA where the T-DNA was inserted. The bold and underlined TGA sequence indicates the stop codon.



### 3. DQC 및 유사 단백질의 아미노산 서열간의 유사도 비교

DQC 유전자에 의해서 잠정적으로 암호화되는 아미노산 서열을 확보하여 EMBL-EBI (european molecular biology laboratory-european bioinformatics institute)의 proteins 항목에서 단백질 서열 분석 및 분류를 진행해주는 InterPro tool을 통해서 다른 종에서 존재하는 유사한 유전자와 보존된 아미노산 서열 motif를 탐색하였다. DQC의 아미노산 서열은 효모에서 사람에 이르기까지 진핵세포에서 보존된 TRAPPIII의 특이적 소단위체인 Trs85와 유사한 것으로 나타났으며, DQC의 411번째 아미노산부터 546번째의 아미노산 서열에는 보존된 tetratricopeptide repeat like superfamily protein (TPR) 영역이 존재하는 것을 확인하였다 (Figure 6A). TPR 영역은 단백질간의 상호작용을 담당하는 것으로 알려져 있다. DQC 내부에 존재하는 보존된 TRS85 유사 아미노산 서열들과 다른 모델 생물에 존재하는 TRS 유사 아미노산 서열간의 유사도를 비교하였다 (Figure 6B). 또한 PAUP4.0 프로그램을 활용하여 여러 모델생물과의 분지도를 구성한 결과 애기장대의 DQC의 아미노산 서열은 벼에 존재하는 OsTRS85와 가장 높은 유사도를 나타냈다 (Figure 7).

**A**



**B**

<i>C_elegans</i>	GLKRDLEADKAMAHAHAHALEMCCVALHSAQPQLNANQPMIKYLETVPVSLLIHAKFRYP	457
<i>P_patens</i>	LLSDDYKTDKAWKRYAGVQEMIGLCLFMMDQSR---REAEISLESAYNVYQKCGGN-TAK	430
<i>A_thaliana</i>	LIYTDYNIKAWKHYAGVQEMRGLAYFISDQPK---KDS-ECMENAFSTYMKLGKS-G <b>Q</b>	411
<i>O_sativa</i>	LLSTDYKLDKAWKRFAGVQEMSGLCYFMLDQSR---KDAEYCLDSAFSTYLRIGSS-GKR	394
<i>D_melanogaster</i>	QAKRDFNADSAWQYYAGALEMAALSAPMLGTAQ---RKYDYMEDAIVCYLTVCKL--QQ	504
<i>M_musculus</i>	TAKKDFLNDQAMLYAAGALEMAAVSAFLQPGAP--RPYPAHYMDTAIQTYRDICKN--MV	500
<i>H_sapiens</i>	TAKKDFLNDQAMLYAAGALEMAAVSAFLQPGAP--RPYPAHYMDTAIQTYRDICKN--MV	500
	* * * * * . . . . .	
<i>C_elegans</i>	SILRCAFNIADIYSDLGLHKEAALNLAKVS-----SIEGDHLVAV--AQTLAAEQFEKA	509
<i>P_patens</i>	YATRTSMWLAIEHKARGQFREAAANVLFRAFMLKIEGGQGVSLRAGVLLQAAQCYLRLSP	490
<i>A_thaliana</i>	<b>NATRCGLWAEMLKARDQHKAAASVYFRIC-----GEEP-LHAAVMLEQASVCFMLTKP</b>	464
<i>O_sativa</i>	NATRCGIWAEMLKTRGQYREASSVYRVSS-----NEEPSLRSALLLEQAACCVLSKP	448
<i>D_melanogaster</i>	FATRATLLSMECLKTARLYSEVAKQLIRMT-----NEESDLRSALLLEQAAYCFVLTQP	558
<i>M_musculus</i>	LAERCVLLSAEILKSQSKYSEAAALLIRLT-----SESDLSRALLLEQAACHFINMKS	554
<i>H_sapiens</i>	LAERCVLLSAEILKSQSKYSEAAALLIRLT-----SESDLSRALLLEQAACHFINMKS	554
	* : : . . * : : . . . . .	
<i>C_elegans</i>	GMGRKASFHRVLAANRFSNAAIPALSFDCYRLALPAFDKHHWGVLDLHVLAVRLEEGQKA	569
<i>P_patens</i>	FMLRKFQGFHMVLAGNRYTVCFQRKHAMRVYRSVLSIFEGQGWKYSISDHVHFHGLRSLHFL	550
<i>A_thaliana</i>	<b>AMLHKYGFHLVLSGDHYKNCQVNHAIPTYKSAISVYKSTTWSHIKDHLVFHIGQWYALV</b>	524
<i>O_sativa</i>	FMLRKYGFHLVLAGNSYIISDQKQHAVRAYRNALFVYKQHPWSYINDHVHFNWGRVYGV	508
<i>D_melanogaster</i>	FMHRKYAFHIVLAGNRYSRAGQRKHAIRCYRQAYQVFQKREWSLAEDHIQYTVAKQAYML	618
<i>M_musculus</i>	PMVRKYAFHMIAGHRFSKAGQKKHALRCYCQAMQVYKKGWSLAEDHINFTIGRQSYTL	614
<i>H_sapiens</i>	PMVRKYAFHMIAGHRFSKAGQKKHALRCYCQAMQVYKKGWSLAEDHINFTIGRQSYTL	614
	* : * . * : * : . . . . .	
<i>C_elegans</i>	GVMTTDIASECIRRLVAVCPKLSPLQTERLRTIVNALDIYFPHRNEPVEMLTDIPKVM	629
<i>P_patens</i>	--GNNDLAIHFHMKL-VTCSHQSPANQSNFLREFLYVVENTVGKN--KVLDELPTINA	604
<i>A_thaliana</i>	<b>--GMHDVAVRNMLKV-LDCGYQSKA</b> PQEIFLDRDFDVIKKTGMKH---EVVGLQLPILNM	578
<i>O_sativa</i>	--GIFDVAIKHLLV-IACSHQSLTTQSMFLNDFHFFVQSMGKFF---DVYKQLPVIINM	562
<i>D_melanogaster</i>	--KQLEASRSFAHLLRPGSLQSAQQQTSFLKEYIQTQNELVKRSPGLLPHALPQVVQ	676
<i>M_musculus</i>	--RQLDNAVSAFRHILINESKQSAQQGAFLERELYLVYKNNVQLSPDGPLPQLPLPYINS	672
<i>H_sapiens</i>	--RQLDNAVSAFRHILINESKQSAQQGAFLERELYLVYKNNVQLSPDGPLPQLPLPYINS	672
	* : * : : . . . . .	

Figure 6. Multiple amino acid sequence alignment among the conserved TRS85 motifs of DQC and DQC-related proteins from model organisms.

(A) A TRS85 motif exists in the coding region of *DQC*. (B) The amino acid sequence of the TRS85 motif in *DQC* is indicated in the box. The asterisks indicate identically conserved amino acid residues among the proteins, whereas single and double dots refer to highly and moderately conserved residues.

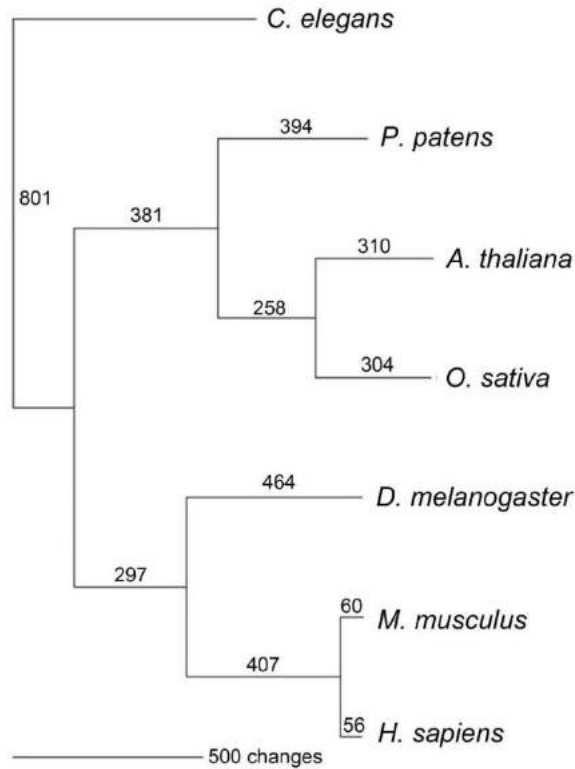


Figure 7. Phylogenetic relationship visualized among the amino acid sequences of DQC and related proteins.

A phylogenetic tree of the DQC and related proteins. Bootstrap values (500 replicates) for the tree are shown above the branches. The bar numbers indicate the respective amino acid sequence differences.

Accession numbers : *C. elegans* (NP\_491642), *P. patens* (XP\_024378593), *A. thaliana* (NP\_197132), *O. sativa* (XP\_015631968), *H. sapiens* (NP\_055754), *D. melanogaster* (XP\_001973363), *M. musculus* (NP\_796012).

#### 4. 추가적인 T-DNA 삽입 돌연변이의 선별

At5g16280 좌위에 T-DNA가 삽입된 2종류의 돌연변이인 SALK\_208572c와 SALK\_130580의 종자들을 ABRC에서 주문하여 genotyping을 시행하였고 동형접합 돌연변이들을 선별하였고 이들을 각각 *dqc-2*과 *dqc-3*로 명명하였다. 이들의 표현형을 관찰한 결과, *dqc-2*와 *dqc-3*은 모두 *dqc-1*과 유사하게 뿌리의 길이가 짧고, 뿌리털이 발생한 간격이 단축되었으며, 뿌리털이 파상형(wavy)의 형태를 나타내었다 (Figure 8). 이들의 차이는 지상부 기관의 발달 과정에서도 명확하게 구별되었다. 야생형과 *dqc* 돌연변이 줄기의 형태를 비교한 결과 야생형 줄기는 수직으로 성장하는 반면, *dqc* 돌연변이의 줄기가 지그재그 형태로 자라는 것이 관찰되었다 (Figure 9A). 또한 *dqc-1*을 포함한 *dqc* 돌연변이의 수술은 야생형에 비하여 짧은 것으로 관찰되었다 (Figure 9B).

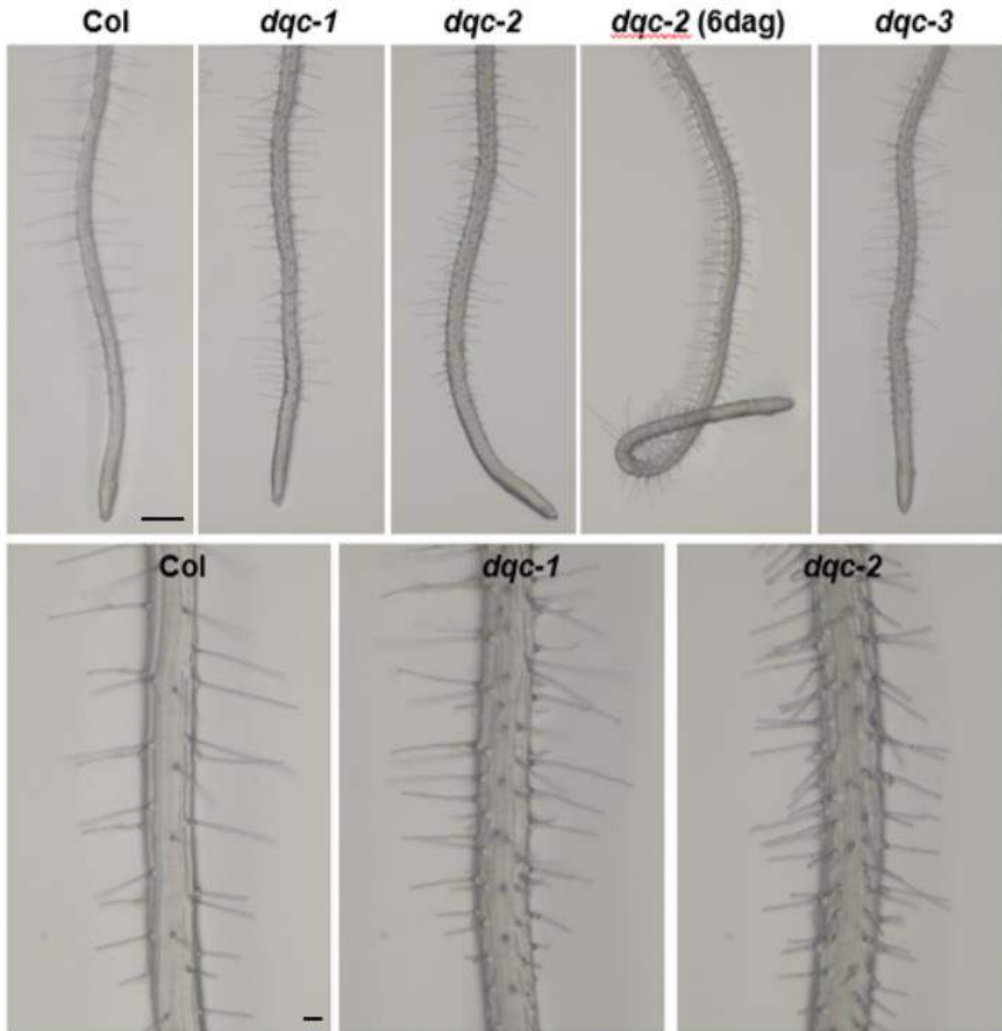


Figure 8. Root phenotypes of the *dqc* mutants.

The upper panels show the overall root phenotypes and lower panels show the spacing and shapes of the root hairs. *dqc* mutants clearly show reduced elongation of root epidermal cells and wavy and inflated root hairs. *dqc-2* is also defective in response to gravity. Scale bars = 0.5 mm.



Figure 9. The inflorescence and floral phenotypes of the *dqc* mutants.

(A) Inflorescence phenotypes, (B) Floral phenotypes. Scale bars = 5 mm.

## 5. 야생형과 *dqc* 돌연변이의 뿌리 성장 곡선 및 리포터 유전자

### 발현 양상 조사

근단분열조직에 특이적인 리포터 유전자의 발현과 뿌리의 분열조직 차이 비교를 통해 *dqc-1*이 정지중심부 형성 및 형태에 차이를 보이는 것을 확인하였고 결과적으로 정지중심부의 이상이 뿌리의 신장뿐만 아니라 뿌리털의 형태에도 영향을 주는 것을 조사 결과를 통해 확인하였다. 유전자의 기능상실이 원근 성장에 얼마나 차이를 보이는지 확인하기 위해서 야생형과 *dqc* 돌연변이와의 길이를 조사하였다. *dqc-1*의 경우 Q2610 배경이기 때문에 대조군이 되는 야생형을 Q2610 Col로 진행하였는데 원근 길이에 상당한 차이를 보이는 것을 확인하였다 (Figure 10A). *dqc-2*의 경우 대조군이 되는 야생형을 Col로 비교하였고 *dqc-2* 또한 야생형에 비해 원근의 길이가 짧은 것으로 확인되었다 (Figure 10B). 세포분열주기의 G2 / M 시기의 세포에서 강하게 발현되는 특성을 가지고 있는 *CYCB1;1p:GUS* 리포터 유전자 (Doerner et al., 1996)를 교배를 통해 *dqc-1*과 *dqc-2*의 배경에 도입하여 발현양상을 비교해 보았다. 확인 결과 야생형의 *CYCB1;1p:GUS* (Colón-Carmona et al., 1999) 발현은 강하게 나타났다. 하지만 *dqc-1*의 경우 *CYCB1;1p:GUS* 발현이 야생형에 비해 감소하였으며 발현범위 또한 축소되었다. *dqc-2*는 야생형보다는 약하긴 했지만 *dqc-1*에 비해서는 높은 발현을 보였다 (Figure 10C). 이러한 결과는 *dqc-1*과 *dqc-2*의 뿌리 생장의 저해가 세포분열의 감소에서 기인한 것임을 의미한다.

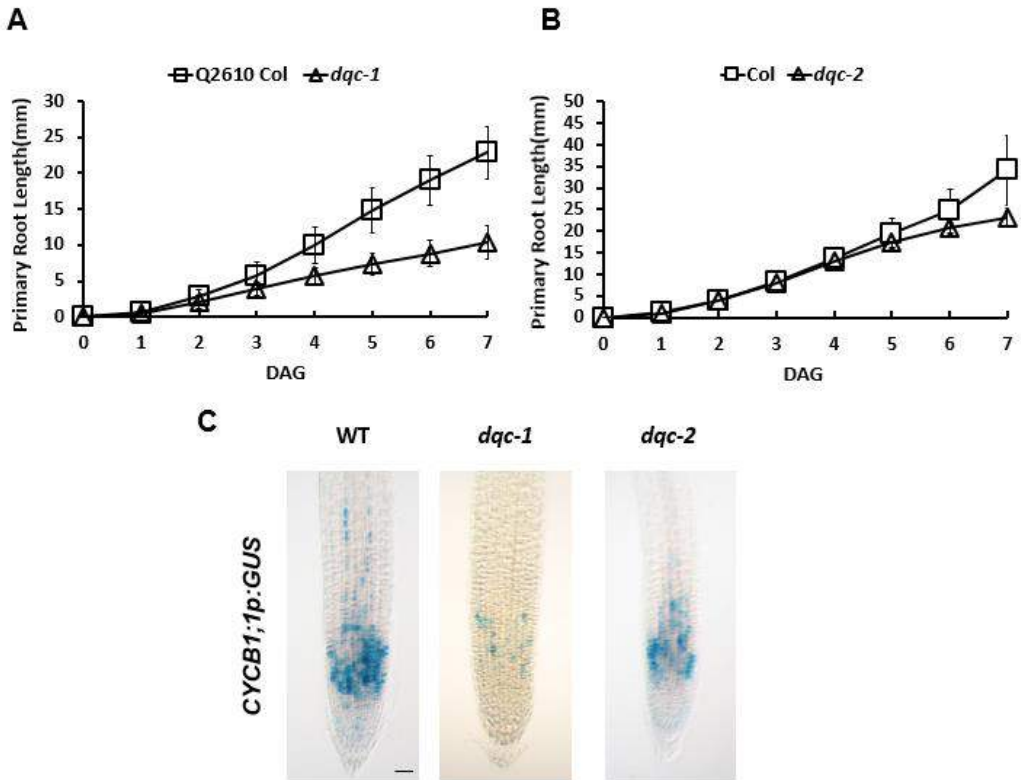


Figure 10. Growth and cell proliferation in *dqc* roots are suppressed.

(A) The root growth curve of Q2610 Col and *dqc-1* seedlings, (B) The root growth curve of Col and *dqc-2*. DAG = day after germination, Error bars indicate standard deviation. (C) The expression of *CYCB1;1p::GUS*, a G2/M phase marker is reduced in *dqc* mutants as compared with that in WT.



## 6. *dqc* 돌연변이와의 상보성 검정

*dqc-1*과 거의 비슷한 표현형을 나타내는 T-DNA 삽입 돌연변이가 같은 유전자에 의해 발생한 것인지 아니면 서로 다른 유전자에 의해서 발생한 것인지를 확인하기 위해 상보성 검정을 진행하였다. *dqc-1*과 *dqc-2*를 교배하여 얻은 F<sub>1</sub> 종자를 1/2 MS 배지에 과중한 뒤 배양하여 뿌리의 형태를 관찰한 결과 야생형의 뿌리 형태가 아닌 돌연변이 표현형을 나타내는 것을 확인하였으며 대조군으로는 *dqc-1*과 표현형이 유사한 TPST (tyrosylprotein-sulfotransferase, At1g08030) 유전자에 T-DNA가 삽입된 *tpst* 돌연변이인 SALK\_009847 종자를 *dqc-1*과 교배하여 얻은 F<sub>1</sub> 종자 또한 1/2 MS 배지에 과중 후 배양하여 뿌리를 관찰한 결과 *tpst* 돌연변이 뿌리 형태와 전혀 다른 야생형 식물의 뿌리 형태로 회복된 것을 확인하였다 (Figure 11). 이러한 결과는 *dqc-1*과 *dqc-2*의 돌연변이가 같은 유전자에 의해 발생한 것이며, 대조군으로 설정했던 *tpst* 돌연변이와 *dqc-1*은 다른 유전자에 의해 돌연변이가 발생했음을 알 수 있다.

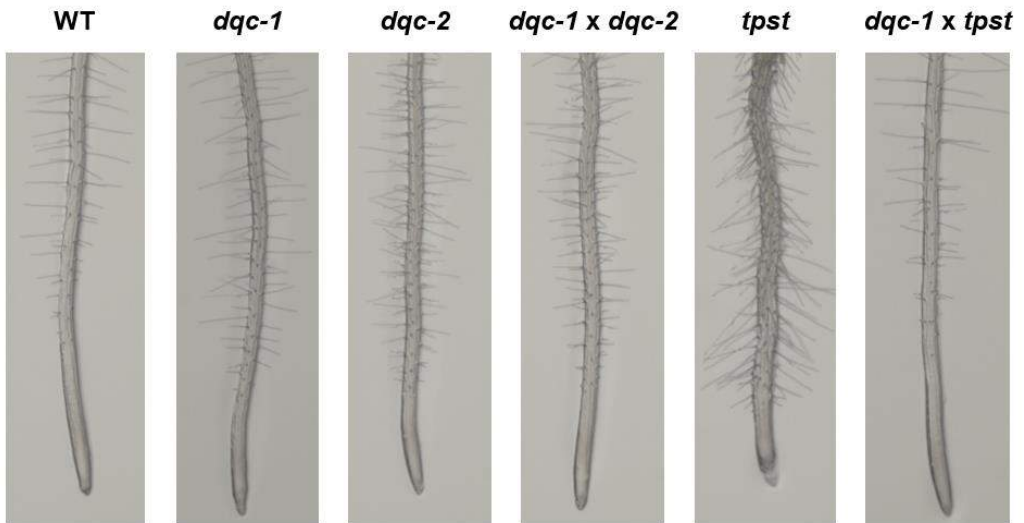


Figure 11. The complementation test of *dqc-1* with *dqc-2*.

Complementation test by genetic crosses show that *dqc-1* and *dqc-2* are localized in the same locus whereas *tpst* is located in another locus.

## 7. *dqc* 돌연변이의 T-DNA 삽입 위치 확인

*dqc-1*의 경우 TAIL-PCR을 통해서 26번째 엑손 앞부분에 T-DNA가 삽입되어 있음을 확인한 바 있다. *dqc* 돌연변이 또한 상보성 검정을 통해 같은 유전자에 의해 발생한 것이 입증되었고 At5g16280 좌위 내에 *dqc-2*와 *dqc-3*의 T-DNA 삽입지역을 확인하기 위하여 T-DNA와 애기장대 유전자 사이의 영역을 PCR 진행 후에 염기서열을 분석하였다 (Figure 12). 그 결과 *dqc-2*는 2번째 인트론에 T-DNA가 삽입되었으며 *dqc-3*은 10번째 인트론에 삽입되었다.

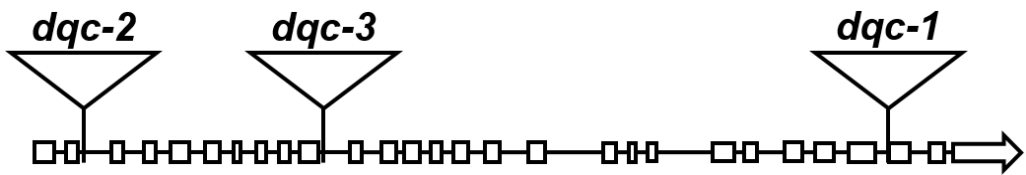


Figure 12. A schematic diagram of the T-DNA insertion sites of the *dqc* mutants.

T-DNA insertion sites of the *dqc* mutants within the coding region of At5g16280 are indicated as reversed triangles.

## 8. *dqc* 돌연변이 배경에서의 다양한 발달에 관련된 리포터 유전자 발현 양상 조사

*dqc-1*과 *dqc-2*에서 관찰되는 뿌리 결함의 특성과 원인을 이해하고자 뿌리 생장에 중요한 역할을 하는 여러 종류의 표지 유전자들의 발현 양상을 조사하였다. 인헨서 트랩 라인을 통해 무작위적으로 형질전환 시킨 식물 라인 중 정지중심부에서 특이적으로 발현하는 QC25 (Colón-Carmona et al., 1999)로 발현 양상을 조사한 결과 야생형을 비롯한 *dqc-1*과 *dqc-2* 모두 정지중심부에서 QC25의 발현이 확인되었지만 *dqc* 돌연변이에서는 정지중심부에서의 발현 형태가 야생형과는 달리 경계가 불규칙적이었다 (Figure 13). 전사인자인 *SHORT-ROOT(SHR)*는 뿌리의 관다발(vascular tissue)에서 발현되어 내피층으로 단백질이 이동하며 *SCARECROW(SCR)*는 내피와 QC에서 발현되어 단백질이 동일한 세포층에 머물게 된다. 형광현미경을 이용하여 *SHRp:SHR-GFP*와 *SCRp:GFP-SCR*의 발현을 확인한 결과 야생형과 *dqc* 돌연변이에서 모두 GFP 융합단백질의 발현을 관찰할 수 있었으며 뿌리의 내피층과 중심주 부분에서 발현하는 GFP 발현이 야생형과 차이가 없었다 (Figure 13). 이러한 결과는 뿌리 결함의 원인이 내피층과 중심주 부분의 결함에 의한 것이 아니라고 해석할 수 있다.

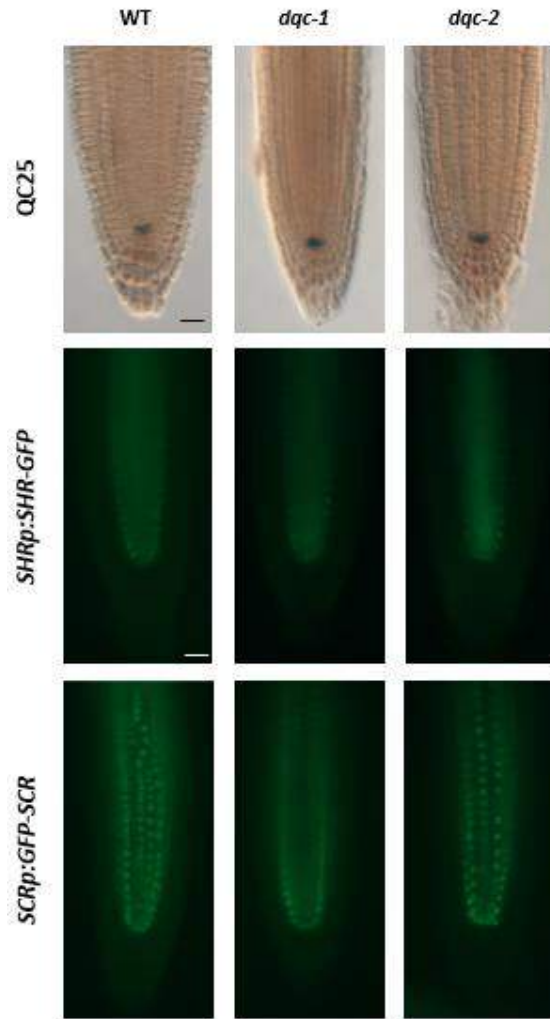


Figure 13. Various reporter gene expression patterns in the background of WT and *dqc* mutants.

The expression patterns of QC25 in *dqc* mutants are compromised whereas those of *SHRp:SHR-GFP* and *SCRp:GFP-SCR* in *dqc* mutants are not apparently altered. Scale bars = 0.05  $\mu$ m.

## 9. 뿌리 굴중성과 관련된 옥신 반응 유전자의 발현 양상 조사

MS 고형 배지에서 배양한 *dqc-2* 유식물의 뿌리는 야생형과 다르게 수직으로 자라지 않고 휘어서 자라거나 수평으로 자라는 등 굴중성 이상 표현형을 관찰할 수 있었다. 이러한 표현형은 *dqc-2*가 옥신 반응에 이상이 있음을 제시한다. *dqc* 돌연변이에서 나타난 뿌리 굴중성 이상을 정량화하기 위하여 90° 각도로 배지의 위치를 회전하여 배양한 다음 중력에 대한 반응을 비교하였다. 그 결과 *dqc-1*과 *dqc-3*에 비해 *dqc-2*가 중력에 대해서 더 민감하게 반응하는 것을 확인하였다 (Figure 14). 굴중성의 비교 실험을 바탕으로 *dqc* 돌연변이가 옥신에 대하여 좀 더 민감하게 반응할 것이라는 예상이 되었기 때문에 옥신에 대해서 반응하는 프로모터인 DR5에 의해서 조절되는 *DR5p:GFP* (Philosoph-Hadas et al., 2005)와 *DR5rev:GFP* (Benková et al., 2003) 발현 양상을 조사하였다. 공초점 현미경을 통한 *DR5p:GFP*의 발현 조사 결과 야생형에 비해 *dqc-2*의 옥신 반응이 더 많이 일어나며 옥신 반응의 반경 또한 훨씬 더 넓게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 15A). *DR5rev:GFP*의 발현을 관찰한 결과 야생형과 *dqc* 돌연변이 모두 정지중심부에서부터 columella initial과 중축근관(columella root cap)까지 발현이 나타나지만 *dqc-1*은 야생형에 비해 발현 폭이 좁고 *dqc-2*는 발현의 폭이 더 넓다 (Figure 15B). 결과적으로 *dqc-1*은 정지중심부의 이상으로 인해 옥신 반응이 낮아져 세포 신장에 문제를 야기시키며 *dqc-2*는 정지중심부는 정상적이거나 옥신 반응이 야생형에 비해 높기 때문에 약간의 굴중성을 나타낸다고 할 수 있다.

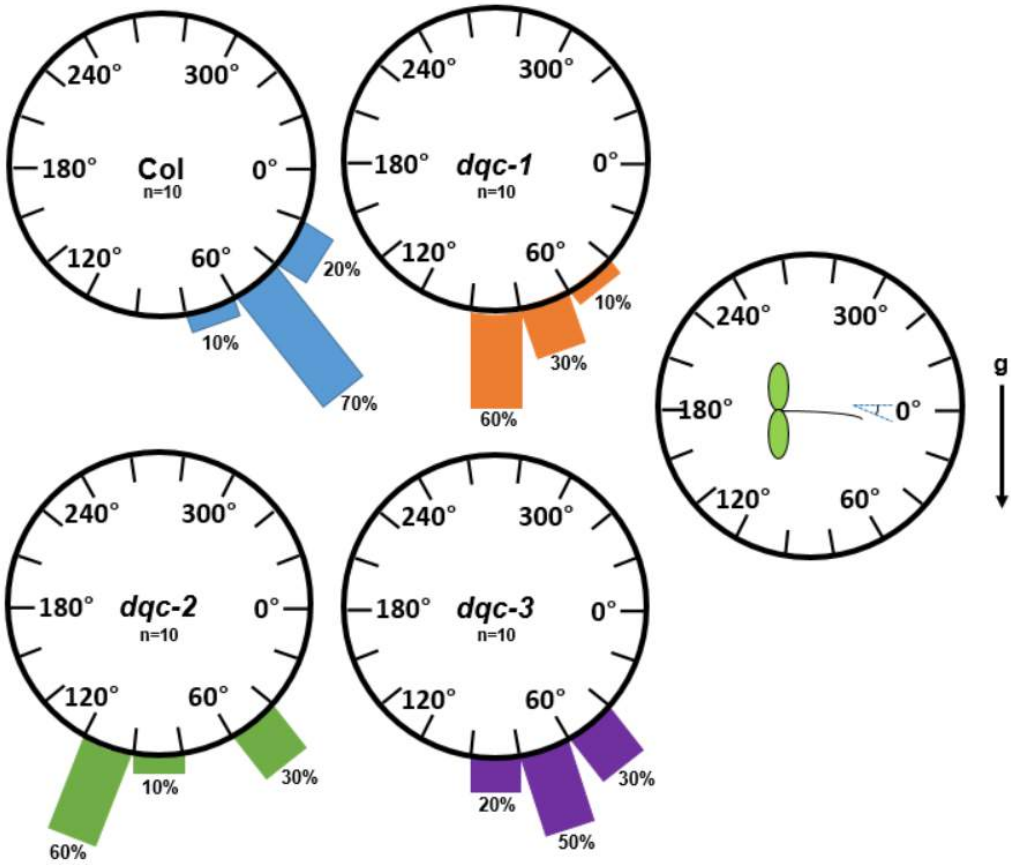


Figure 14. *DQC* is required for the root gravitropism.

Root gravitropism of WT and *dqc* seedlings at 5 DAG. Root angles were measured at 16 h after 90° reorientation.



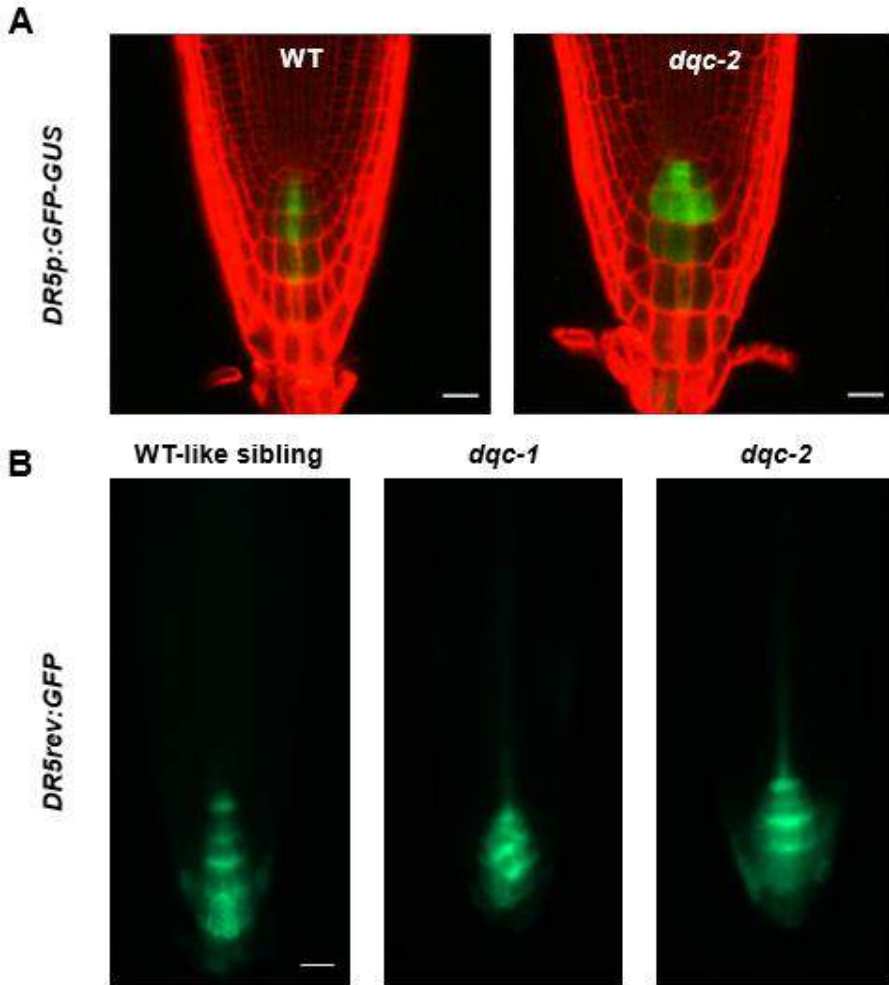


Figure 15. The expression patterns of *DR5p:GFP-GUS* and *DR5rev:GFP* in WT and *dqc* mutants.

(A) Confocal microscopic images of *DR5p:GFP-GUS* expression pattern in WT and *dqc* mutants. red color indicates the propidium iodide signal. (B) *DR5rev:GFP* expression pattern in WT and *dqc* mutants. Scale bars = 20  $\mu$ m.

## 10. 옥신의 유출에 관여하는 막 단백질인 PIN1의 발현 조사

옥신 반응성 유전자의 발현을 통해서 *dqc* 돌연변이가 야생형에 비해 옥신 반응에 더 민감하다는 결과를 얻게 되었고 조금 더 정확한 문제 원인을 찾고자 원형질막에 위치하며 옥신 유출에 관여하는 막 단백질인 PIN1의 발현을 조사하였다. 일반적으로 PIN1 단백질은 원형질막에 존재하면서 수송체의 역할을 하기 때문에 옥신의 유입과 유출을 통해 순환하는 형태를 나타내는 것이 정상적이다. 하지만 PIN1-GFP를 통한 조사 결과 *dqc-1*과 *dqc-2* 모두에서 야생형에서는 관찰할 수 없는 PIN1-GFP가 응집된 형태의 막성 반점을 관찰하였다 (Figure 16A). 막성 반점의 정체를 확인 하기 위해 lytic vacuole marker인 Lysotracker red를 *dqc-2*에 처리한 후에 확인한 결과 PIN1-GFP에서 확인되었던 반점(green)과 Lysotracker red 처리 후 관찰된 반점(red)이 겹치는 것을 확인하였다 (Figure 16B). 이외에도 소포 형성과 수송을 억제하는 저해제인 brefeldin A(BFA)를 처리하여 관찰한 결과 야생형에서는 소포 수송이 억제되면서 응집되어 BFA body를 형성하기 때문에 세포 주변이 깨끗하지만 *dqc-2*는 BFA body를 이루고 있는 세포도 존재하고 소포가 수송되어 액포가 관찰되는 세포가 존재하였다 (Figure 16C). 좀 더 자세한 결과를 도출해내기 위해서 endocytic dye인 FM4-64가 처리된 PIN1-GFP *dqc-2* 라인에 BFA를 처리하여 관찰한 결과 PIN1-GFP의 반점(green)과 BFA body (red)가 겹치는 것도 존재하고 겹치지 않는 것도 존재하였다 (Figure 16D). 식물의 뿌리 세포에서 endocytic 경로를 추적하기 위해 FM4-64 색소를 처리를 한 후 시간의 경과에 따라 축적되는 세포내 장소를 비교한 결과 *dqc-2*는 야생형과는 달리 엔도솜과 같은 반점의 형성이

감소하고 90분 이내에 색소가 tonoplast에 도달한 것을 확인하였다 (Figure 17). 이러한 결과는 *dqc-2*에서 일어나는 endocytosis가 비정상적이라는 것을 의미한다.

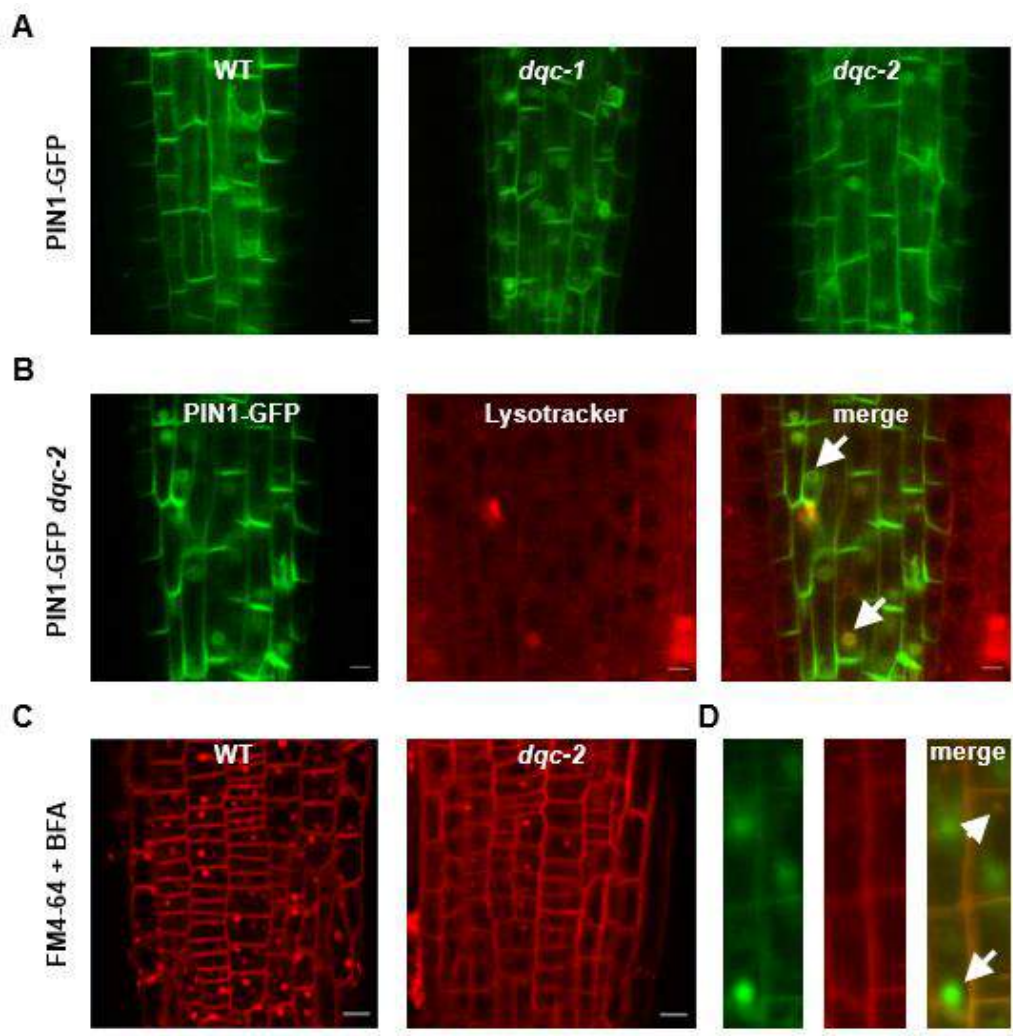


Fig. 16.

Figure 16. The subcellular localization of PIN1–GFP is compromised in *dqc* mutants.

(A) PIN1–GFP in *dqc* mutants aggregated in the intracellular vesicular structures in addition to the base of plasma membrane. (B) The intracellular PIN1–GFP compartments in *dqc-2* were co-stained with LysoTracker red (2  $\mu$ M; 1 h), a lytic vacuole marker. Arrows indicate putative lytic vacuoles. (C) The subcellular localization of FM4–64 (4  $\mu$ M; 1 h) in root epidermal cells treated with BFA (50  $\mu$ M). In *dqc-2*, FM4–64 signal is observed both in BFA bodies and vacuole-like structures. (D) The PIN1–GFP aggregates observed in *dqc-2* (green; arrow) are distinct from BFA body (yellow; arrowhead). Scale bars (upper panels) = 5  $\mu$ m, Scale bars (middle and lower panels) = 10  $\mu$ m.

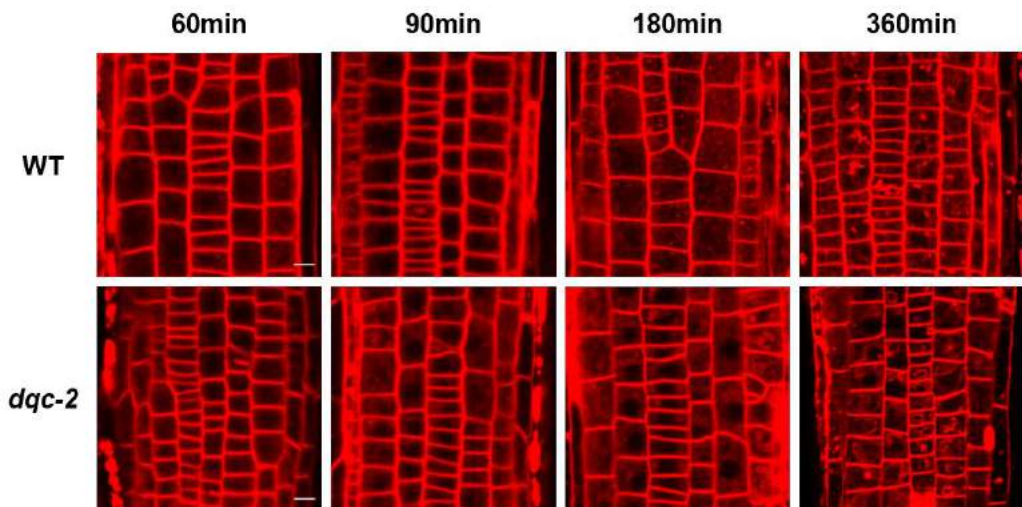


Figure 17. Confocal microscopic images displaying the subcellular localization of endocytic marker FM4-64 in WT and *dqc-2*.

Endocytosis of FM4-64 is abnormal in the *dqc-2* as the formation of endosome-like puncta is reduced and the dye reaches to tonoplast within 90 min in *dqc-2*. Scale bars = 10  $\mu$ m.

## 11. *dqc* 돌연변이의 세포내막계 표적 단백질 발현 양상 조사

소포 수송 억제제 처리에도 불구하고 소포가 액포까지 수송되었다는 결과를 통해 *dqc* 돌연변이가 소포 수송에 결함이 존재하며 그로 인해 세포내막계에 이상이 생겼음을 확인하였다. *dqc* 돌연변이의 표현형이 정확히 어떤 단계의 수송에서 문제가 발생했는지를 확인하기 위해 세포내막계를 구성하는 조직 소포 수송 경로를 파악하였고 각 표적 단백질의 발현 양상을 조사하였다. 소포체(endoplasmic reticulum, ER)와 원형질막(plasma membrane, PM)의 표적 단백질인 NIP1 (Boursiac et al., 2005)과 골지체(Golgi apparatus)의 표적단백질인 SYP32 (Sanderfoot et al., 2000)의 발현 양상을 조사한 결과 야생형과 차이가 없었다. trans-Golgi network (TGN)와 초기 엔도솜(early endosome, EE)의 표적 단백질인 VTI12 (Sanderfoot et al., 2000)와 액포의 표적 단백질인 VAMP711 (Sanderfoot et al., 2000)의 발현 양상에서는 확실한 차이를 보였다. VTI12의 경우 *dqc-2*에서 비정상적 액포막성 구조가 확인되었다. VAMP711의 경우 야생형은 액포가 하나로 응집되어 상호연결된 관 형태의 구조를 나타내지만 *dqc-2*는 액포가 분절화되고 둥근 형태의 구조를 띠고 있었다. 후기 엔도솜(late endosome, LE)의 표적 단백질인 RabF2a (Rutherford and Moore, 2002) 또한 차이를 보였는데 야생형에 비해 *dqc* 돌연변이에서 후기 엔도솜의 발현이 증가한 것을 확인하였다 (Figure 18).

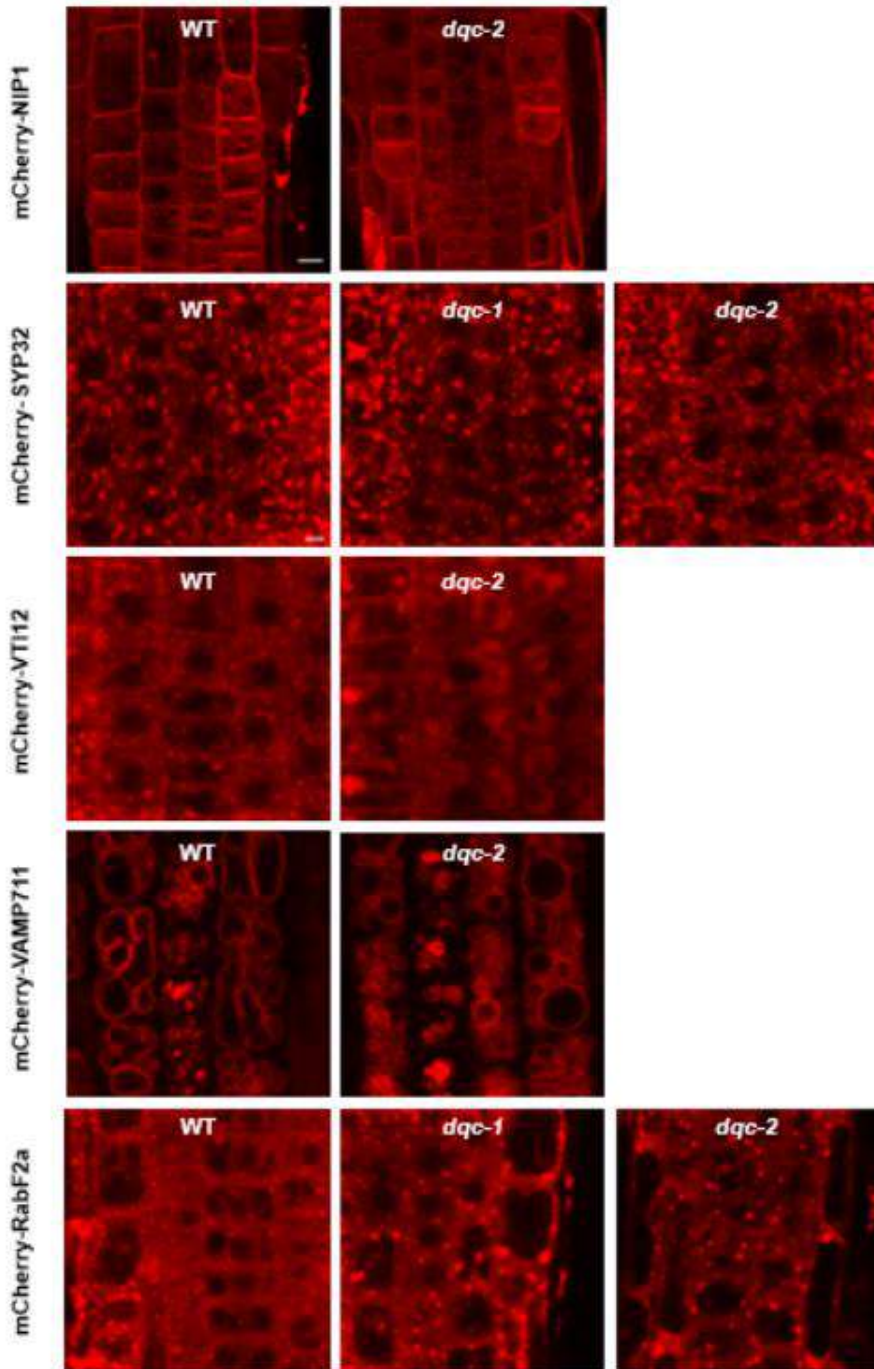


Fig. 18.



Figure 18. The subcellular localization patterns of the markers for endomembranes in WT and *dqc* mutants.

The root epidermal cells were observed with confocal microscope. mCherry-NIP1;1, a marker for endoplasmic reticulum/plasma membrane; mCherry-SYP32, a marker for Golgi apparatus; mCherry-VTI12, a marker for trans-Golgi network/early endosome; mCherry-VAMP711, a marker for vacuole; mCherry-RabF2a, a marker for late endosome /prevacuolar complex. Scale bar = 10  $\mu$ m.

## 12. 종피 점액층의 발달 양상 및 PSV 형태 조사

종자를 MS 고형 배지에 배양할 때마다 야생형과 다르게 항상 종자가 여러 개 겹쳐서 파종 되었고 종자 점액층의 형성이 분비성 소포와 관련이 있다는 것을 알게 되면서 *dqc* 돌연변이가 종피의 점액층에도 영향을 미칠 것으로 추측하였다. 종피 점액층의 발현을 확인하기 위해 ruthenium red로 종자를 염색한 뒤 관찰한 결과 50 Mm의 EDTA를 처리하고 외부에서 물리적인 힘을 현탁배양기에서 가하여 준 경우 (McFarlane et al., 2013)는 야생형과 *dqc* 돌연변이 모두 점액층 방출이 높아져 점액층이 명확하게 관찰되었으나 *dqc* 돌연변이는 점액층의 형태가 불규칙적인 것을 확인하였다 (Figure 19A). 염색 후 vortex에 의한 보다 강한 물리적인 힘을 가한 경우 야생형은 점액층이 온전한 형태를 유지하였으나 *dqc* 돌연변이는 점액층의 형태가 손상되었다 (Figure 19B). 이러한 결과는 *dqc* 돌연변이의 소포 수송 문제에 의해 점액층의 형성과 형태에 이상을 초래했다고 볼 수 있다.

저장 단백질은 식물 종자 발달 및 성숙과정에서 단백질 저장 액포(protein storage vacuole, PSV)에 안정적으로 축적된다 (Shimada et al., 2003). 종피 점액층의 발현 양상 결과를 바탕으로 *dqc* 돌연변이의 PSV도 차이가 존재하는지 조사한 결과 야생형의 자엽세포는 전반적으로 균일한 크기의 PSV로 포장되어 있지만 *dqc* 돌연변이의 자엽세포는 크기가 불균일하고 훨씬 더 작으며 많은 PSV로 포장되어 있다 (Figure 19C).

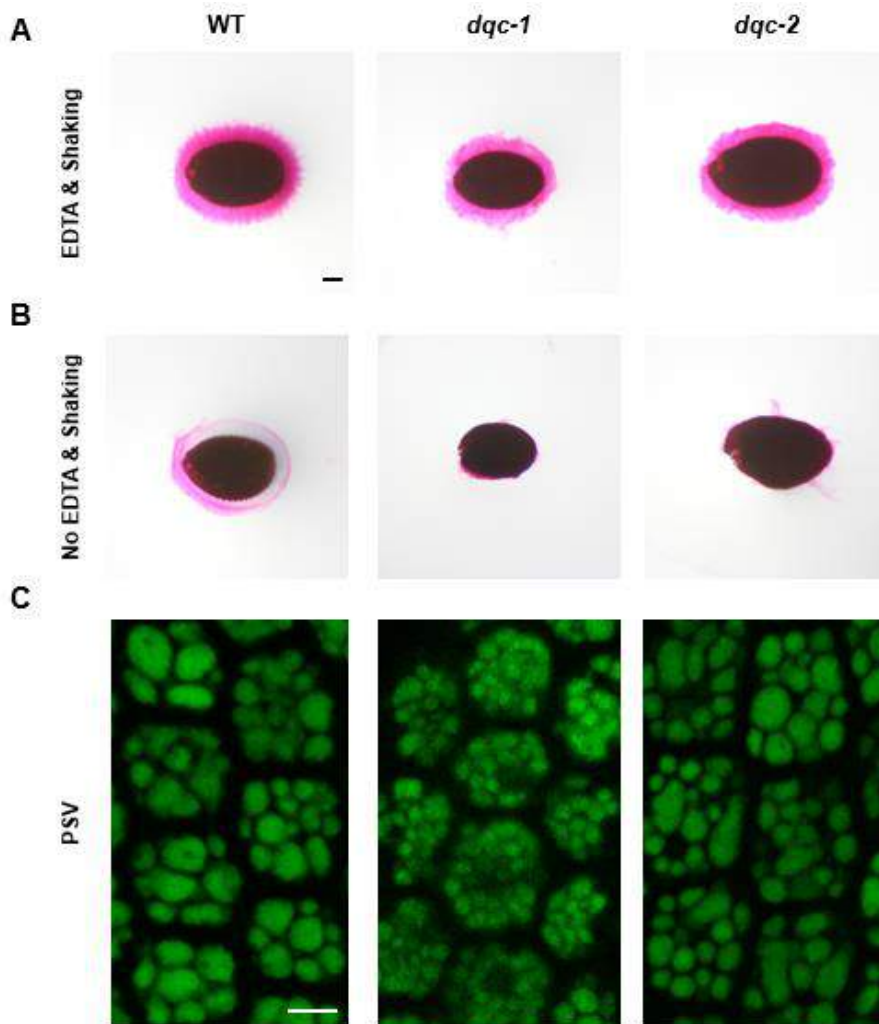


Figure 19. The phenotypes of seed coat mucilage and PSVs in WT and *dqc* mutants.

(A–B) Observation of seed coat mucilage stained by 0.01% ruthenium red. Scale bar = 0.1 mm (C) Autofluorescence of PSV is compromised in *dqc* mutants. Scale bar = 10  $\mu$ m

## IV. 논의

애기장대의 유전 경로를 파악하기 위해서는 해당하는 해당 경로를 방해하는 기능상실 돌연변이 확보가 필수적이다. 하지만 이러한 기능상실 돌연변이 확보는 용이하지 않은데 그 이유는 애기장대 유전체의 중복성으로 인해 모든 유전자에 상응하는 표현형을 선별하기 힘들다는 것이다. 이러한 유전체 중복성의 한계를 극복하기 위해 35S 인핸서를 이용한 활성 표지 방법이 개발되었다 (Weigel et al., 2000). 하지만 이 방법은 모든 기관에서 높은 수준으로 항시적인 발현이 일어나기 때문에 유식물 치사성, 배발생 치사성과 같은 문제를 유발하여 조직 특이적으로 확인이 불가능하다 (Odell et al., 1985). 최근 이런 단점을 보완하기 위해 조직특이적으로 발현을 시킬 수 있는 GAL4-UAS 활성표지 방법이 도입되었다. 활성표지가 뿌리에서만 작용하기 때문에 유식물 치사성을 극복할 수 있고 종자 확보가 가능케 되었다 (Waki et al., 2013). 본 연구에서도 활성표지가 뿌리에서만 발현하게끔 설계되었으나 5x UAS는 At5g16280 좌위에 삽입되어 AtTRS85의 기능이 상실된 *dqc-1*을 확보하게 되었다. 그 결과로 *dqc-1*을 확보하게 되었다.

GAL4-UAS 활성표지 도입방법은 유전자 내에 무작위적으로 작용하며 *dqc-1* 또한 TAIL-PCR을 통해 *dqc-1* 표현형을 유발하는 T-DNA가 종결 코돈에서 1025bp 떨어진 암호화 지역 내에 삽입되어 있다는 점을 확인하였다.

*dqc* 돌연변이의 다양한 표현형은 정지중심부의 결함에 기인한다.

*dqc-1*의 유식물의 뿌리는 야생형과 달리 뿌리가 짧고 뿌리털의 간격이 좁아 세포 신장의 결함을 보이고 있으며 뿌리털의 형태 또한 파상형(wavy)으로 나타난다. 정확한 차이를 확인하고자 공초점 현미경으로 야생형과 *dqc-1*을 관찰함과 동시에 뿌리 생장에 주요한 역할을 하는 *WOX5*의 발현 양상을 조사한 결과 *dqc-1*의 정지중심부가 손상되어 있었다. 이 외에도 정지중심부 주위의 분열조직 차이는 존재하는가에 대해 뿌리의 cortex층의 길이와 세포 수를 비교한 결과 길이와 세포 수 모두 확연한 차이를 보였다. 세포 분열주기의 G2 / M 시기의 세포에 강하게 발현되는 *CYCB1;1p:GUS* 발현 분석 결과 야생형에 비해 *dqc* 돌연변이의 GUS 발현이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 정지중심부의 결함이 직접적 또는 간접적으로 뿌리의 생장에 영향을 끼쳐 길이에 차이를 보였다고 설명할 수 있다.

*dqc-1* 외에 또 다른 T-DNA 삽입 돌연변이를 선별하였고 *dqc-2*와 *dqc-3*를 찾았다. *dqc-2*와 *dqc-3* 또한 뿌리 신장의 이상과 뿌리털의 형태 차이를 보였으며 지상부에서는 *dqc* 돌연변이 모두 야생형에 비해 키가 작고 줄기가 곧게 뻗지 않고 어긋난 형태로 자라며 꽃차례에서도 수술의 길이가 암술에 비해 훨씬 짧아 자가수분에 한계를 보였다. *dqc-2*의 표현형의 발생이 *dqc-1*과 같은 유전자에 의해 발생한 것인지를 확인하기 위해 상보성 검정을 진행하였고 결과적으로 *dqc-2*가 *dqc-1*과 같은 유전자에 의해 발생했음을 알 수 있다.

*dqc* 돌연변이의 뿌리 신장 이상 원인을 이해하고자 정지중심부에서 특이적으로 발현하는 QC25의 GUS 발현 관찰 및 전사인자인 *SHR* 및 *SCR* 유전자의

GFP 발현을 관찰한 결과 내피와 중심주 부분에서는 큰 차이점을 보이지 않았으나 정지중심부에서는 약간의 불규칙적인 형태를 보이는 것을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 *dqc* 돌연변이의 표현형은 정지중심부의 결함 때문임을 입증하는 자료라고 볼 수 있다 (Figures 10 and 11).

### ***dqc-2*의 굴중성 이상은 옥신 반응의 위치에 의해 발생한다.**

*dqc-2*를 고품 배지에 배양할 때마다 유식물의 뿌리가 휘어서 자라거나 공중으로 뜨는 등 굴중성 이상 표현형을 관찰하였다. 이러한 표현형은 옥신 반응에 이상이 있음을 제시하며 굴중성 이상을 정량화 하기 위하여 실험을 진행한 결과 야생형에 비해 *dqc* 돌연변이 모두 굴중성이 심하게 나타남을 확인하였다. 정확한 원인을 이해하고자 옥신 반응성 프로모터인 *DR5* 유전자의 GFP 발현을 확인하였고 결과적으로 정지중심부 이상뿐만 아니라 *dqc-2*에서는 epidermis 와 LRC에서 옥신 반응이 일어나는 것을 확인할 수 있었다 (Figures 12 and 13). 이 결과를 통해 알 수 있는 점은 정지중심부의 옥신 반응이 낮아져 세포 신장에 문제를 야기시키며 특히 *dqc-2*의 경우 전혀 다른 조직에서의 옥신 반응으로 인해 약간의 굴중성이 나타났다고 볼 수 있다. 하지만 이 결과는 굴중성에 관한 100% 신뢰할 수 있는 자료가 아니며 추후에 굴중성과 관련이 있는 PIN2 또는 PIN3 단백질의 발현 양상을 조사할 필요성이 있다.

*dqc* 돌연변이는 소포 수송 및 endocytosis에 결함이 존재한다.

옥신 반응에 문제가 있다는 점을 근거로 옥신 수송에 관여하는 옥신 유출 캐리어인 PIN1의 발현을 조사하였다. 관찰 결과 PIN1-GFP가 recycling되는 형태도 보이지만 순환하지 못하고 모여 응집된 형태의 반점을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 자세한 원인을 파악하고자 lytic vacuole marker인 Lysotracker red를 처리하니 vacuole과 겹치는 반점도 존재하였으나 전혀 겹치지 않는 독자적인 반점 또한 존재하였다. 반점의 정체를 파악하기 위해 소포 형성과 수송을 억제하는 Brefeldin A(BFA)를 처리한 결과 역시 BFA에 의해 수송이 되지 않아 BFA body를 형성하면서 어떤 세포는 수송이 진행 되어 vacuole까지 들어간 형태도 볼 수 있었다 (Figure 14). Lysotracker red 와 BFA 처리를 통해 전혀 파악되지 않은 형태의 반점이 생성되는 것을 확인하였고 *dqc* 돌연변이가 endocytosis에 문제가 있을 것이라는 추측을 하게 되었다. 식물 뿌리의 endocytic 경로를 추적할 수 있는 FM4-64를 처리 후 시간에 따라 비교한 결과 *dqc-2*의 endocytosis가 비정상적으로 나타나며 엔도솜의 감소와 더불어 90 분 이내에 염색이 이미 tonoplast까지 도달한 것을 확인하였다. 관련 논문과의 유사성을 확인한 결과 최근 효모와 포유류에서 소포로의 cargo sorting과 관련된 주요 조절 인자인 adaptor protein(AP) complex가 식물에서 존재하는 것으로 확인되었고 AP-3 complex 돌연변이의 PIN1-GFP 발현 양상이 *dqc* 돌연변이와 유사하였으며 AP-3 complex가 액포 기능을 위한 수송에 관여한다는 사실이 밝혀졌다 (Zwiewka et al., 2011). 또한 AP-2 complex의 165번째 아미노산인 페닐알라닌을 알라닌으로 바꾼 F165A 돌연변이도 같은 현상이 나타났다.

하지만 *dqc* 돌연변이와의 차이점이 있다면 FM4-64 + BFA 처리 결과에서는 BFA body와 PIN1-GFP 특이적 반점이 형성되었으나 FM4-64 + Lysotracker red 처리 시에는 반점이 겹치지 않아 lytic vacuole이 아니었다 (Sancho-Andrés et al., 2016). 이러한 결과는 *dqc* 돌연변이가 endocytosis와 소포 수송에 문제가 있으며 vacuole과 연관되어 있을 가능성을 제시한다 (Figure 15).

BFA 처리에도 불구하고 소포가 수송 되었다는 결과를 통해 소포 수송 경로를 파악하기 위해 세포내막계 조직의 수송 경로를 확인하였고 (Figure 16), 각각의 조직에서 발현하는 여러 단백질의 발현 양상을 조사한 결과 ER과 PM 그리고 Golgi의 표적 단백질 발현에서는 야생형과 차이를 보이지 않았다. 그러나 TGN과 EE, Vacuole, 그리고 LE의 표적 단백질 발현 양상에서는 큰 차이를 보였다. 먼저 TGN/EE의 표적단백질인 VTI12-mCherry를 통한 관찰 결과 *dqc-2*에서 비정상적인 액포막성 구조가 확인되었다. vacuole의 경우 야생형에서는 액포가 하나의 상호연결된 관상의 형태가 관찰 되었으나 *dqc-2*에서는 액포가 분절되고 둥근 형태의 구조를 나타내었다. LE의 표적 단백질인 RabF2a-mCherry 관찰 결과 *dqc* 돌연변이의 LE의 발현이 증가한 것을 확인하였다 (Figure 17). 이 결과를 통해서 알 수 있는 점은 *dqc* 돌연변이 유전자에 결함이 생겼고 그 결과 소포 수송 및 endocytosis에 문제가 생겨 기존의 수송 경로가 아닌 또 다른 경로로 우회하여 수송한다고 생각할 수 있다.



*dqc* 돌연변이는 종피 점액층의 형성 및 PSV의 크기에 영향을 미친다.

종자 수분 공급시 방출되는 점액층의 생성은 일반적으로 나타나는 적응으로 골지체에서 합성되고 secretory vesicle을 통해 분비된다. 그러나 *dqc* 돌연변이는 소포 수송에 결함이 존재하며 결과적으로 야생형 종자에 비해 점액층의 강도가 약해져 쉽게 손상 된다. 또한 점액층의 형성이 약화되기 때문에 수분 보유 능력이 떨어지게 되어 후속 발아를 위한 물 저장소로서의 역할을 제대로 수행하지 못하게 되어 발아율이 많이 떨어지게 된다. 실제로 고휘 배지에 *dqc* 돌연변이를 파종할 때 야생형과 달리 종자가 여러 개 붙어서 파종 되었다. 이러한 결과는 *dqc* 돌연변이가 소포 수송에 문제가 있다는 것을 추가적으로 알 수 있는 좋은 근거가 된다.

저장 단백질은 식물의 종자 발달 및 성숙 과정에 필수적이며 PSVs에 안정적이고 높은 수준으로 축적된다. 발아 동안 PSVs에 축적되어 있던 저장 단백질이 빠른 속도로 감소하면서 식물의 발달과 성숙에 필요한 영양분으로 사용된다. 하지만 *dqc* 돌연변이의 경우 야생형과 비교했을 때 PSV 각각의 크기가 눈에 띄게 작고 개수는 야생형에 비해 오히려 많다. 저장 단백질과 관련된 논문을 통해 *dqc* 돌연변이에서 나타난 PSV의 유사성을 확인한 결과 vacuolar protein sorting (VPS) 돌연변이의 PSV 형태가 *dqc* 돌연변이와 유사하였으며 결과적으로 VPS-38이 autophagy를 통한 vacuole trafficking과 관련이 있음을 알 수 있었다 (Liu et al., 2018). 이러한 결과를 통해 예상할 수 있는 점은 *dqc* 돌연변이가 소포를 통한 vacuole로의 수송 뿐만 아니라 autophagy를 통한 수송에도 영향을 줄 수 있다는 가능성을 제시한다.

*dqc* 돌연변이는 TRS85의 결함으로 인해 생긴 결과이다.

*dqc-1*의 유전자 내에 막 수송과 관련된 motif가 존재하는지 확인하기 위해 *dqc-1* 유전자를 아미노산으로 번역하여 아미노산 서열 분석을 시행한 결과 *dqc-1* 내에 TRAPP complex 내의 TRAPPⅢ 특이적 소단위체인 TRS85 서열이 존재한다는 것을 확인하였다. 결과적으로 *dqc* 돌연변이에서 나타난 결함이 TRAPPⅢ의 특이적 소단위체인 TRS85의 이상으로 인해 나타난 결과라고 해석할 수 있다. 식물에서 기능하는 TRAPP complex에 대한 실험적 데이터가 완벽하게 존재하지 않으며 심지어는 기능뿐만 아니라 정확한 위치가 파악되어 있지 않기 때문에 효모와 동물의 데이터를 기반으로 하여 식물의 tethering complex에서 수용 가능성이 있음을 추측한 예상 모식도를 논문들을 통해 확인할 수 있었다. 모식도를 통해 확인할 수 있는 점은 TRS85 소단위체를 특이적으로 가지고 있는 TRAPPⅢ 복합체가 autophagy가 관련된 막 수송에 관여할 가능성이 있다고 추측하였다 (Vukašinović and Žárský, 2016). 최근 발표된 논문에 따르면 TRAPP complex 중에서 post-Golgi trafficking에 관여한다고 밝혀진 TRAPPⅡ의 소단위체 중 TRS120이 endocytosis과 관련이 있다는 것이 밝혀졌다 (Rybak, 2014). 그렇다면 TRS85도 TRS120과 유사하게 autophagy 뿐만 아니라 endocytosis에 영향을 미치고 있으며 TRS85의 결함으로 나타난 돌연변이가 *dqc* 돌연변이일 가능성이 존재한다. 식물의 endocytosis 및 membrane & vesicle trafficking에 많은 연구가 이루어지고 있으며 최근에는 애기장대의 proteomic 연구에서 endosomal and secretory pathway에 의해 TRS85 소단위체가 RABD2a/ARA5로 표지된 단백질과의 상호작용하는 것을 확인하였다 (Heard et al., 2015).

*dqc* 돌연변이와 야생형과의 비교를 통해 소포 수송에 관여하는 TRAPPⅢ 복합체의 결함으로 인해 생긴 현상임을 알게 되었다. 정확하게는 TRAPPⅢ의 소단위체인 TRS85에 결함이 생겼고 그 결과 기존의 수송 경로가 아닌 전혀 밝혀지지 않은 경로 또는 틀을 벗어난 강제적인 우회 경로를 통해 수송이 진행되었다고 설명할 수 있다. 하지만 지금까지 진행한 실험 결과를 바탕으로 판단하기에는 아직 부족하며 정확한 결론을 내리기 위해서는 TRAPP Complex를 구성하고 있는 여러 소단위체와의 신호전달 과정이나 막 수송에 관여하는 여러 표적 단백질, 특히 TGN/EE와 Vacuole, LE와 관련된 다양한 표적 단백질의 발현 양상과 상호작용을 관찰해야 할 필요성이 있다.

## V. 참고문헌

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., and Cheuk, R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Benfey, P.N., and Scheres, B.** (2000). Root development. *Current Biology* **10**, R813-R815.
- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., and Friml, J.** (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* **115**, 591-602.
- Boesewinkel, F., and Bouman, F.** (1984). The seed. *Embryology of Angiosperms*. Springer-verleg **12**, 567-598.
- Boursiac, Y., Chen, S., Luu, D.-T., Sorieul, M., van den Dries, N., and Maurel, C.** (2005). Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant physiology* **139**, 790-805.
- Bröcker, C., Engelbrecht-Vandré, S., and Ungermann, C.** (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current biology* **20**, R943-R952.
- Cederholm, H.M., Iyer-Pascuzzi, A.S., and Benfey, P.N.** (2012). Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **1**, 675-691.
- Chandler, J.W.** (2016). Auxin response factors. *Plant, cell & environment* **39**, 1014-1028.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* **20**, 503-508.
- Davies, P.J.** (1995). The plant hormone concept: concentration, sensitivity and transport. In *Plant hormones* (Springer), pp. 13-38.
- Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A.P., Prasad, K., Blilou, I.,**

- Geldner, N., Xu, J., and Uemura, T.** (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* **456**, 962.
- Doerner, P., Jørgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.
- Edlund, A., Eklof, S., Sundberg, B., Moritz, T., and Sandberg, G.** (1995). A microscale technique for gas chromatography-mass spectrometry measurements of picogram amounts of indole-3-acetic acid in plant tissues. *Plant Physiology* **108**, 1043-1047.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19**, 1349.
- Fahn, A.** (1967). *Plant anatomy*. (Pergamon Press New York).
- Gardner, M.J., Baker, A.J., Assie, J.-M., Poethig, R.S., Haseloff, J.P., and Webb, A.A.** (2008). GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *Journal of experimental botany* **60**, 213-226.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D., and Novick, P.** (2006). Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 11821-11827.
- Grubert, M.** (1974). Studies on the distribution of myxospermy among seeds and fruits of Angiospermae and its ecological importance. *Acta Biol. Venez* **8**, 315-551.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning* **1**, 109-135.
- Harpaz-Saad, S., McFarlane, H.E., Xu, S., Divi, U.K., Forward, B., Western, T.L., and Kieber, J.J.** (2011). Cellulose synthesis via the FEI2 RLK/SOS5 pathway and cellulose synthase 5 is required for the structure of seed coat mucilage in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **68**, 941-953.

- Heard, W., Sklenar, J., Tome, D.F., Robatzek, S., and Jones, A.M.** (2015). Identification of regulatory and cargo proteins of endosomal and secretory pathways in *Arabidopsis thaliana* by proteomic dissection. *Molecular & Cellular Proteomics*, mcp. M115. 050286.
- Heisler, M.G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G.V., Long, J.A., and Meyerowitz, E.M.** (2005). Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current biology* **15**, 1899-1911.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F., and Segev, N.** (2000). The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Molecular biology of the cell* **11**, 4403-4411.
- Kaul, S., Koo, H.L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L.J., Feldblyum, T., Nierman, W., Benito, M.I., and Lin, X.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *nature* **408**, 796-815.
- Kim, J.J., Lipatova, Z., and Segev, N.** (2016). TRAPP complexes in secretion and autophagy. *Frontiers in cell and developmental biology* **4**, 20.
- Koumandou, V.L., Dacks, J.B., Coulson, R.M., and Field, M.C.** (2007). Control systems for membrane fusion in the ancestral eukaryote; evolution of tethering complexes and SM proteins. *BMC evolutionary biology* **7**, 29.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., and Zažímalová, E.** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome biology* **10**, 249.
- Kreitschitz, A.** (2009). *Functional Surfaces in Biology: Little Structures, Big Effects.*
- Lipatova, Z., Belogortseva, N., Zhang, X.Q., Kim, J., Taussig, D., and Segev, N.** (2012). Regulation of selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201121299.
- Liu, F., Hu, W., and Vierstra, R.D.** (2018). The Vacuolar Protein Sorting-38 Subunit of The *Arabidopsis* Phosphatidylinositol-3-Kinase Complex Plays Critical Roles in Autophagy, Endosome Sorting, and Gravitropism. *Frontiers in Plant Science* **9**, 781.
- Liu, Y.-G., and Whittier, R.F.** (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable

amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**, 674-681.

**Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Muller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C., and Bennett, M.J.** (1999). AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *The EMBO journal* **18**, 2066-2073.

**Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M., and Sandberg, G.** (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *The Plant Cell* **14**, 589-597.

**McFarlane, H.E., Gendre, D., and Western, T.L.** (2013). Seed coat ruthenium red staining assay. *The Plant Cell*.

**Muday, G.K., and DeLong, A.** (2001). Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in plant science* **6**, 535-542.

**Odell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.-H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810.

**Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K.** (2009). An auxin gradient and maximum in the Arabidopsis root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell* **21**, 1659-1668.

**Philosoph-Hadas, S., Friedman, H., and Meir, S.** (2005). Gravitropic bending and plant hormones. *Vitamins & Hormones* **72**, 31-78.

**Ravikumar, R., Steiner, A., and Assaad, F.F.** (2017). Multisubunit tethering complexes in higher plants. *Current opinion in plant biology* **40**, 97-105.

**Robert, H.S., and Friml, J.** (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature chemical biology* **5**, 325.

**Rutherford, S., and Moore, I.** (2002). The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Current opinion in plant biology* **5**, 518-528.

**Rybak, K.** (2014). Tethering complexes required for plant cytokinesis (Universität

München).

- Rybak, K., Steiner, A., Synek, L., Klaeger, S., Kulich, I., Facher, E., Wanner, G., Kuster, B., Zarsky, V., and Persson, S.** (2014). Plant cytokinesis is orchestrated by the sequential action of the TRAPP1 and exocyst tethering complexes. *Developmental cell* **29**, 607-620.
- Sancho-Andrés, G., Soriano-Ortega, E., Gao, C., Bernabé-Orts, J.M., Narasimhan, M., Müller, A., Tejos, R., Jiang, L., Friml, J., and Aniento, F.** (2016). Sorting motifs involved in the trafficking and localization of the PIN1 auxin efflux carrier. *Plant physiology*, pp. 00373.02016.
- Sanderfoot, A.A., Assaad, F.F., and Raikhel, N.V.** (2000). The Arabidopsis genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiology* **124**, 1558-1569.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811.
- Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2003). Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 16095-16100.
- Somerville, C., and Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature reviews. Genetics* **3**, 883.
- Song, S.-K.** (2016). Misexpression of AtTX12 encoding a Toll/interleukin-1 receptor domain induces growth defects and expression of defense-related genes partially independently of EDS1 in Arabidopsis. *BMB reports* **49**, 693.
- Thellmann, M., Rybak, K., Thiele, K., Wanner, G., and Assaad, F.F.** (2010). Tethering factors required for cytokinesis in Arabidopsis. *Plant physiology*, pp. 110.154286.
- Thomas, L.L., Joiner, A.M., and Fromme, J.C.** (2018). The TRAPP1 complex activates the GTPase Ypt1 (Rab1) in the secretory pathway. *J Cell Biol* **217**, 283-298.
- Titapiwatanakun, B., and Murphy, A.S.** (2008). Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein



- maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1093-1107.
- Vukašinović, N., and Žárský, V.** (2016). Tethering complexes in the Arabidopsis endomembrane system. *Frontiers in cell and developmental biology* **4**, 46.
- Waki, T., Miyashima, S., Nakanishi, M., Ikeda, Y., Hashimoto, T., and Nakajima, K.** (2013). A GAL 4-based targeted activation tagging system in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **73**, 357-367.
- Webster, N., Jin, J.R., Green, S., Hollis, M., and Chambon, P.** (1988). The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**, 169-178.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blázquez, M.A., Borevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrándiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., and Neff, M.M.** (2000). Activation tagging in Arabidopsis. *Plant physiology* **122**, 1003-1014.
- Woollard, A.A., and Moore, I.** (2008). The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Current opinion in plant biology* **11**, 610-619.
- Wu, G., Lewis, D.R., and Spalding, E.P.** (2007). Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *The Plant Cell* **19**, 1826-1837.
- Yorimitsu, T., Sato, K., and Takeuchi, M.** (2014). Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Frontiers in plant science* **5**, 411.
- Zerial, M., and McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**, 107.
- Zwiewka, M., Feraru, E., Möller, B., Hwang, I., Feraru, M.I., Kleine-Vehn, J., Weijers, D., and Friml, J.** (2011). The AP-3 adaptor complex is required for vacuolar function in Arabidopsis. *Cell research* **21**, 1711.