



이학석사 학위논문

RHS10의 하위인자인 CLC-C와 SOR1에 의한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 뿌리털 생장 조절 신호전달 메커니즘 연구

A study on the root hair growth signaling mechanism of RHS10 downstream factor CLC-C and SOR1 in *Arabidopsis thaliana*

2023년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

전은주

RHS10의 하위인자인 CLC-C와 SOR1에 의한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 뿌리털 생장 조절 신호전달 메커니즘 연구

A study on the root hair growth signaling mechanism of RHS10 downstream factor CLC-C and SOR1 in *Arabidopsis thaliana*

지도교수 조형택

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함 2023년 2월 서울대학교 대학원 생명과학부

전은주

전은주의 이학석사 학위논문을 인준함

2023년 2월

위 위	원 장 _	최연희	(인)
부 위	원장	조형택	(인)
위	원	현유봉	<u>(인)</u>

프로모터 부위에 Root Hair-specific cis-Element(RHE)를 가지고 있는 뿌리 털 세포 특이적으로 발현하는 유전자인 RHS(Root Hair Specifc)들 중 하나인 RHS10은 세포벽과 연결된 수용체성 인산화 효소 단백질(receptor-like kinase, RLK)을 암호화한다. *rhs10* 기능 상실 돌연변이체는 뿌리털의 길이가 길어지는 표현형을 가지며, RHS10 과발현체(RHS10ox)는 뿌리털이 거의 없 는 표현형을 가진다. 이 논문에서는 뿌리털 생장에 영향을 주는 RHS10의 신 호전달 과정에 관여하는 요소를 찾기 위한 실험을 진행하였다. 선행연구에 의 해 수행된 RHS10 인산화단백질체학 분석과 RHS10ox에서의 EMS-돌연변이 선발로부터 RHS10의 하위 인자 후보 pTOR(phospho-proteomics Target Of RHS10), SOR(Suppressors Of RHS10ox)가 선별되었고, 선정된 후보자가 RHS10의 하위 인자로서 뿌리털 성장을 억제하는 신호를 전달하는지 확인하 였다.

먼저, RHS10 인산화단백질체학으로부터 선정된 pTOR 중 하나인 CLC-C가 뿌리털 발달에 영향을 미치며 RHS10의 하위 인자인지 확인하였다. CLC-C는 액포막에 존재하는 단백질로서 염화(Cl⁻)이온을 액포 내로 수송하는 음이온 수송체이다. *clcc* 돌연변이체를 통해 CLC-C의 발현이 증가함에 따라 뿌리털 길이가 짧아짐을 확인하여 뿌리털 길이 생장에 CLC-C가 필요함이 확 인되었다. CLC-Cox에서 세포 내에 형광단백질 관찰을 통해 CLC-C가 액포 막에 위치함을 확인하였다. WT 배경에서의 CLC-C 과발현은 뿌리털 길이를 짧게 하였고, *rhs10* 배경에서의 CLC-C 과발현은 WT 배경에서만큼 뿌리털 의 길이를 짧게 하지 못함에 따라 CLCC 신호전달을 위해 RHS10이 필요함이 확인되었다. in-vitro phosphorylation assay를 통해 RHS10에 의해 CLC-C N-말단과 C-말단이 각각 인산화됨을 확인하였다. CLC-C N-말단의 경우 T50/S51 인산화-결함 단백질에서 인산화가 약화됨에 따라 T50/S51이 RHS10에 의한 인산화 표적 잔기임을 확인하였다.

다음으로 RHS10ox에서의 EMS-유도 돌연변이체들로부터 선정된 SOR 중 하나인 SOR1이 뿌리털 생장에 영향을 미치며 RHS10의 하위인자인 지 확인하였다. SOR1은 지금까지 연구되지 않은 단백질로, RHS10와 마찬가 지로 세포막에 존재하는 RLK로 예상된다. *sor1* 돌연변이체의 뿌리털의 길이 가 야생형에 비해 길어졌다. 또한, SOR1ox의 경우 뿌리털의 길이가 야생형에 비해 짧아졌다. 이를 통해 SOR1의 RHS10과 같이 뿌리털 길이 생장 저해 작용을 함이 확인되었다. 또한, RHS10과 SOR1 이중 돌연변이체인 *rhs10xsor1-1*의 뿌리털의 길이는 야생형보다 길고 *rhs10*이나 *sor1* 돌연변이 체에 비해 짧게 나타났다. 이를 통해, SOR1과 RHS10의 신호전달 관계는 독 립적이지 않고 연관되어 있음을 확인하였다.

결론적으로, CLC-C는 뿌리털 생장에 필수적인 유전자로 RHS10의 하 위 인자로 작용하여 뿌리털 생장 억제에 관여한다. 이때, RHS10이 CLC-C의 N-말단과 C-말단을 직접 인산화하여 하위신호를 전달한다. 또한, SOR1은 RHS10과 마찬가지로 뿌리털 생장 억제 작용을 하는 유전자로 RHS10의 하위 인자로서 작용한다. 이로써 CLC-C와 SOR1은 RHS10의 하위 인자로서 작용 하여 뿌리털 생장 억제 작용에 관여한다.

주요어: 단백질 인산화, 뿌리털, 수용체성 인산화효소, 신호전달, 애기장대, 이 온 수송체

학번: 2020-28403

목 차

초록1
목차
LIST OF FIGURES AND TABLES4
약어5
1. 서론6
2. 실험 재료 및 방법9
2.1 식물 재료 및 생장 조건9
2.2 단백질 구조 예측, 단백질 인산화 데이터 베이스 및
eFP-browser 유전자 발현 패턴9
2.3 서열 정렬 및 계통수 분석9
2.4 단백질 발현 관찰
2.5 뿌리털 표현형 관찰
2.6 형질전환 재조합 유전자의 제작
2.7 단백질 블롯 분석
2.8 In-vitro phosphorylation assay·····12
2.9 다중 돌연변이체 제작
2.10 Accession numbers
3. 결과
3.1.1 RHS10 발현 유도는 뿌리털 길이 생장을 저해한다13
3.2.1 CLC-C는 RHS10에 의한 인산화 후보 자리를 가진다13
3.2.2 CLC-C는 세포 내 액포막에 위치한다
3.2.3 <i>clcc</i> 돌연변이체는 뿌리털이 짧은 표현형을 가진다20
3.2.4 CLC-C 과발현체는 뿌리털이 짧은 표현형을 가진다20
3.2.5 CLC-C는 <i>rhs10</i> 돌연변이 배경에서 과발현 기능을 하지 못한
다
3.2.6 RHS10은 in-vitro에서 CLC-C의 N 말단과 C 말단 도메인을
각각 인산화한다

3.3.1 SOR1은 수용체성 kinase이다
3.3.2 <i>sor1</i> 돌연변이체는 긴 뿌리털 표현형을 가진다30
3.3.3 SOR1의 과발현체는 짧은 뿌리털 표현형을 가진다30
3.3.4 SOR1은 RHS10과 연관된 신호전달 관계를 가진다33
4. 논의····································
5. 참고문헌
6. ABSTRACT in English 42
감사의 말

LIST OF FIGURES AND TABLE

Figure 1. RHS10-mediated root hair growth inhibition in an estradiol-inducible RHS10 expression system.

Figure 2. Putative RHS10-phosphorylation target residues by of CLC-C.

Figure 3. CLC-C is phosphorylated by RHS10.

Figure 4. The expression pattern of CLC-C in the Arabidopsis root.

Figure 5. Phylogenies of CLC-C homologs and conservation of

T50/T51 and S672 among close CLC-C homologs.

Figure 6. The subcellular localization of CLC-C.

Figure 7. T-DNA insertion and CLCC transcript level in the clcc mutants.

Figure 8. Root hair phenotype of Arabidopsis clcc mutant.

Figure 9. Root hair phenotype of Arabidopsis pE7:GFP:cCLCC@WT.

Figure 10. Root hair phenotype of Arabidopsis pE7:GFP:cCLCC@rhs10.

Figure 11. Protein blot analysis and in-vitro phosphorylation assay of

CLC-C by the RHS10 kinase domain.

Figure 12. SOR1 is a suppressor of RHS10.

Figure 13. A Phylogeny of SOR1 homologs in Embryophytes.

Figure 14. T-DNA insertion and SOR1 transcript level in the sor1-1 mutant.

Figure 15. Root hair phenotype of Arabidopsis sor1-1 mutant.

Figure 16. Root hair phenotype of Arabidopsis SOR1 overexpression lines.

Figure 17. Root hair phenotype of Arabidopsis rhs10xsor1-1 double mutant.

Figure 18. The model for RHS10 signaling via CLC-C and SOR1.

Table 1. List of primers used for PCR

약 어

ABA At	Abscisic acid <i>Arabidopsis thaliana</i>
CLC-C	CHLORIDE CHANNEL C
GFP	Green fluorescence protein
LORE	PRR LIPOOLIGOSACCHARIDE -SPECIFIC REDUCED ELICITATION
MS	Murashige and Skoong
NHX	SODIUM HYDROGEN EXCHANGER
OX	Over-expression
PCR	Polymerase chain reaction
pE7	Promoter of the EXPANSIN A7 gene
PERK	Pro-rich extensin-like receptor kinase
PI	Propidium Iodide
РМ	Plasma membrane
pTOR	Phosphoroteomics target of RHS10
RH	Root hair
RHD6	ROOT HAIR DEFECTIVE 6
RHE	Root hair specific cis-element
RHS	Root hair specific
RHS10	Root hair specific gene 10
RLK	Receptor like kinse
ROS	Reactive oxygen species
RSL2	RHD6-LIKE2
RSL4	RHD6-LIKE4
SE	Standard error
SOR	Suppressors of RHS10ox
WS	WASSILEWSKIJA
WT	Wild type
YFP	Yellow fluorescence protein
@	background for transformant

1. 서론

뿌리털의 발달은 세포 운명 결정, 개시, 벌지 형성, 팁 성장의 과정을 통해 이 루어진다(Grierson and Schiefelbein, 2002, 2008). 표피세포의 뿌리털로의 분화 결정, 세포운명 결정은 피층 세포와 접하는 개수가 1개 또는 2개인지에 따라 non-hair cell과 hair cell로 나뉘게 되며 다른 신호전달 과정을 통해 세 포가 발달하게 된다. 세 가지의 다른 hair/non-hair 패턴(무작위, 길이 방향, 방사형 패턴)이 다른 운명 결정 매커니즘에서 유래되고 그것은 관다발 식물에 서 관찰된다(Dolan, 1996; Clowes, 2000; Schiefelbein, 2000). ROOT HAIR DEFECTIVE 6(RHD6)는 주된 뿌리털 개시의 촉진 조절자로 인지되어 왔고(Masucci and Schiefelbein, 1996; Menand *et al.*, 2007), 그것의 분자 적 기능은 이끼와 애기장대 사이에 보존되어 있다(Menand *et al.*, 2007). RHD6는 직접적으로 두 개의 하위 bHLH 전사인자, RHD6-LIKE2(RSL2)와 RHD6-LIKE4(RSL4)를 조절한다. 그리고 RSL4는 뿌리털 형태유전학을 포함 한 다양한 형태유전학적 유전자를 조절한다(Yi *et al.*, 2010).

이전 연구에서 뿌리털 특이 유전자 발현을 유도하는 cis-element(RHE, Root Hair-specific cis-Element)를 확인했고, RHE가 구 조적으로, 기능적으로 속씨식물에 보존되어 있음이 설명되었다. RHE를 프로 모터에 가진 뿌리털-특이 유전자를 애기장대 유전체에서 확인한 결과 19개의 뿌리털-특이 유전자(RHS, Root Hair Specific)가 in planta 프로모터:리포터 어세이를 통해 확인되었다(Won *et al.*, 2009). RHS 유전자들은 세포벽 관련, kinase, 신호전달 관련 유전자 등의 형태 유전학적 유전자들을 포함한다(Won *et al.*, 2009). 이러한 RHS 유전자 중 RHS10은 Proline Rich Extensin-like receptor Kinase(PERK)를 암호화하고 뿌리털 길이 생장과 팁 생장에 억제적 인 역할을 한다(Won *et al.*, 2009).

뿌리털 세포의 정단-생장 동안, 세포질은 극히 극성화 되어 있다. 생 장하는 뿌리털의 관에는 커다란 중심 액포를 중심으로 세포질이 얇은 층을 이 루고 액포를 감싸고 있고, 세포질은 주로 세포의 말단과 말단 바로 아래쪽에 집중되어 있다. 팁-생장은 물의 다량 공급으로 이루어지며 이때 액포가 수분 을 공급받을 시 포타슘(K⁺)이온과 염화(Cl⁻)이온이 이동하며 이온 농도 조절 이 관여한다(Claire Grierson et al., 2014).

pTOR(phosphoroteomics Target Of RHS10)로 선정된 CLC-C는 기 공의 개폐에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Mathieu Jossier et al., 2010). 기공의 개폐는 공변세포의 팽창과 수축으로 조절되며, CLC-C는 뿌리털의 액포막에도 존재하여 뿌리털 생장과 연관이 있을 것으로 보인다. 삼 투 물질은 외부에서 공변세포로 들어가거나 세포 내부에서 만들어져 액포 내 로 저장된다. 이러한 용질에는 양이온인 K⁺과 음이온인 Cl⁻, 질산염(NO3⁻) 그 리고 말산(Mal²⁻), 당류가 있다. 주된 삼투 물질인 K⁺을 NHX가 수송하고, CLC-A가 Cl⁻, 질산염을, CLC-C가 Cl⁻이온을 수송한다. 액포 내로 용질이 유 입되면 삼투 변화로 세포 외에서 세포 내, 액포로 물이 유입되고 두 개의 공 변세포 짝이 부풀어 올라 기공이 열린다. 이때 양이온이 액포 내로 유입되면, 그에 따라 액포 내외부의 전하 균형을 유지하기 위해 음이온이 액포 내로 수 송된다. CLC-C는 Cl⁻이온을 수송하여 액포 부피 조절과 그에 따른 기공 개폐 에 관여한다(Enrico Martinoia, 2018). 애기장대의 clcc 돌연변이체에서 빛에 대한 반응으로의 기공 열림이 감소했다. Col-0의 clcc-1 돌연변이체와 WS의 clcc-2 돌연변이체를 3시간동안 빛에 노출했을 때, 두 돌연변이체 잎의 표피 세포 모두 대조군 만큼 기공이 열리지 못했다. 또한, 기공 닫힘을 촉진하는 ABA(Abscisic acid)를 처리했을 때 10 µm, 100 µm, 2 hr 처리 후에서 모두 기공 닫힘이 유도되지 못했다. 따라서 CLC-C는 애기장대의 기공 개폐에 관 여한다(Mathieu Jossier et al., 2010). CLC-C가 관여하는 빛 유도 기공 열 림을 KNO3, KCl 존재하에서 확인하였다. 애기장대 잎 표피를 30mm KCl에 서 배양했을 때 모든 *clcc* 돌연변이가 상당히 손상된 기공 열림을 보였다. 이 것은 Cl⁻가 질산염으로 대체되었을 때 *clcc-3* mutant와 wild-type (WS)의 기공 열림에 차이가 없었고, clcc-1와 Col-0 차이가 크게 감소했기 때문에 CI~에 의존적임을 알 수 있다. 따라서 CLC-C는 CI~이 제공되었을 때 빛 유도 기공 열림에 기여한다(질산염의 존재하에서는 이와 같이 조절되지 않는 다)(Mathieu Jossier et al., 2010). CLC-C가 기공에서 염화이온 항상성에 기여함을 확실히 하기 위해, X-ray 마이크로분석을 이용해 애기장대 기공 세포에서 CI-과 K+의 함량을 측정했다. CI-과 K+은 16시간 암처리 이후 일반 공기에서 건드리지 않은 기공에서 측정되었다. Cl⁻은 WT보다 돌연변이체에서 함량이 적었고 K⁺은 차이가 없었다. 추가로, 질산염 함량의 경우도 차이가 없 었다. 따라서 CLC-C는 기공의 움직임에 대해 기공 세포에서 Cl⁻ 항상성에 주 요한 역할을 한다(Mathieu Jossier et al., 2010).

EMS-돌연변이체 선발로 선정된 SOR1(suppressors of RHS10ox)에 대한 선행연구는 진행된 바 없고, 동족체인 렉틴 단백질(Lectin-like receptor)이 다수 존재하여 분류와 도메인 구조가 분석되어있다. SOR1은 렉 틴 단백질 중 G-타입에 해당된다. 다수의 G-lectin 단백질 중 연구된 가장 가까운 paralog는 lectin-like kinase 수용체인 LORE(PRR LIPOOLIGOSACCHARIDE-SPECIFIC REDUCED ELICITATION)이다. LORE는 SOR1과 동일한 단백질 도메인 구조를 가지며 세포막에 발현하는 것 이 확인되었다. LORE는 면역기능에 관여하여 돌연변이의 경우 P. aeruginosa H4의 LPS(Lipopolysaccharide) 처리에 반응하지 않고, 과발현체 의 경우 활성산소(ROS)가 증가하는 반응이 유도된다. LPS의 지질 A에 LORE 가 반응하는 것으로 확인된다(Stefanie Ranf et al. 2015). 따라서 SOR1의 경우도 세포막에 존재하며 LORE와 유사한 구조를 가지므로 면역반응에 관여 할 가능성이 높다.

RHS10에 의해 인산화되는 CLC-C와 이외의 액포에 존재하는 수송자 의 작용에 관한 연구가 부족하다. 수송자의 작용으로 세포의 삼투압이 변화한 후, 세포막과 액포막을 통한 물의 이동으로 세포의 부피가 변화하고, 이에 따 라 뿌리털 세포가 생장한다. 이에 대한 메커니즘을 밝혀 뿌리털 세포를 포함 한 세포의 생장에 관한 탐구가 필요하여 본 연구를 진행한다. SOR1은 RHS10ox EMS-돌연변이체 선발에서 뿌리털이 회복된 eRHS10ox에서 단일 염기 돌연변이가 발생한 위치의 유전자로 발견되었다. 따라서 SOR1은 뿌리털 발생에 있어 중요한 인자로 생각된다. 하지만 SOR1은 단백질로서 기능하는지 조차 연구되지 않았다. SOR1은 RHS10와 마찬가지로 수용체성 kinase로서 세포막에 존재하여 뿌리털 팁-생장에 있어 중요한 신호전달 인자로 역할 할 것이다. 따라서 SOR1을 연구함으로써 뿌리털의 정단-생장 메커니즘의 신호전 달 과정을 밝힐 수 있을 것이다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 식물 재료 및 생장 조건

애기장대 야생형은 clolumbia(Col-0)를 사용하였으며, 형질전환 벡터는 Agrobacterium tumefaciens 균주 C58C1(pMP90)을 이용하여 식물체 내로 도입하였다(Bechtold and Pelletier, 1998). 형질전환된 식물은 hygromycin 포함 배지(50 µgmL⁻¹)에서 선별되었다. 모든 종자는 Murashige & Skoog(MS) 배지(4.3 gL⁻¹ MS nutrient mix[Duchef], 1 % sucrose, 0.5 gL⁻¹ MES, pH 5.7, 0.8 % agarose)에서 키웠다. 종자는 3일간 저온처리 후 23℃에서 발아하여 16시간/8시간(광/암) 광주기의 배양기 내에서 생장시켰다. 동형접합 형질전환체는 항생제가 포함되지 않은 배지에서 자랐으며, T1 및 T2세대는 hygromycin을 포함한 배지에서 키웠다. 각 종자는 곰팡이와 세균 을 제거하기 위해 소독과정을 거쳤다. 소독은 70% 에탄올, 소독제(50 % 표백 제 및 0.01% Triton X-100)를 통해 소독 후 단계마다 멸균된 물로 헹구어 주었다. Hygromycin은 뿌리털 발달을 특별히 저해하지 않았으며, hygromycin에 대한 대조구 식물로 proE7:YFP@WT 형질전환체를 이용하여 뿌리털 길이를 비교 관찰하였다.

2.2 단백질 구조 예측, 단백질 인산화 데이터 베이스 및 eFP-browser 유전 자 발현 패턴

단백질 구조(topology) 예측은 Protter 사이트(https://wlab.ethz.ch/protter) 에서 얻었다. 단백질 인산화 자리는 PeptideAtlas PTM summary(http://www.peptideatlas.org)에서 확인하였다. CLC-C와 SOR1의 뿌리에서의 발현량은 TAIR(http://arabidopsis.org)의 eFP-browser를 통해 얻은 결과이다.

2.3 서열 정렬 및 계통수 분석

NCBI 데이터베이스의 BLAST 검색을 통해 At*CLCC*와 At*SOR1*의 상동유전자 정보를 얻었다. AtCLCC와 AtSOR1의 전체 아미노산 서열을 non-redundant

단백질 서열 데이터 베이스를 기반으로 BLAST에 이용하였다. 단백질 서열은 CLUSTAL-W를 이용해 정렬하였다. MEGAX software package (https://www.megasoftware.net)을 이용해 Neighbor-Joining 계통수를 산출 했다(Tamura et al., 2007). Bootstrap 수치는 1000이며, bootstrap consensus tree를 결과로 첨부하였다.

2.4 단백질 발현 관찰

GFP(녹색), Propidium Iodide(PI, 적색), FM4-64(적색)의 형광은 LSM 510 공초점 레이저 현미경(Carl Zeiss)을 사용하여 관찰하였다. 녹색형광은 488/505~530 nm, 적색형광은 587/615 nm excitation/emission filter 세트 를 사용하여 검출하였다. 형광 이미지는 Zeiss LSM image browser를 사용 하여 디지털화하였다. GFP로 표지된 CLC-C 단백질의 위치정보는 발아 후 4 일된 유식물체로부터 관찰되었다. PI(10mgL⁻¹)는 5분 염색, 1분 세척 후 세포 벽을 관찰하였고, FM4-64(2 μM)는 5분 염색, 90-120분 세척 후 액포를 관 찰하였다.

2.5 뿌리털 표현형 관찰

뿌리털 길이는 Lee and Cho (2006)에 따라 측정하였으며, 실체현미경(MZ FLIII, Leica, Heerbrugg, Switzerland)에서 40x 배율로 뿌리 부위의 사진을 얻은 후 뿌리털 길이를 정량화하였다. 뿌리털 길이는 뿌리의 각 측면으로부터 5-8개의 뿌리털로부터 길이를 측정하여 뿌리의 두 측면으로부터 총 10-15개 의 뿌리털의 평균 길이를 한 개체의 뿌리털 길이로 계산하였으며, 이것은 LAS software V2.8.1(Leica) 프로그램과 Image J 프로그램을 통해 정량화했 다. 뿌리털 길이는 3-4일차 유식물체에서 측정했다.

2.6 형질전환 재조합 유전자의 제작

클로닝 자리가 수정된 *pCAMBIA1300-NOS* 벡터(Lee et al., 2020)가 형질 전환 클론 제작을 위해 이용되었다. At*EXPA7* 프로모터(Cho and Cosgrove, 2002)가 뿌리털 특이적 발현을 위해 사용되었다. At*EXPA7* 프로모터는 *pCAMBIA1300* 벡터의 *HindIII, SalI* 제한효소 자리에 삽입되었고, downstream의 제한효소 자리에 잘린 PCR 산물을 삽입하였다. At*EXPA7*의 프로모터(pE7)가 포함된 *pCAMBIA1300* 벡터에 *Arabidopsis* 유식물체의 cDNA에서 PCR로 증폭된 cCLCC를 *XmaI, AscI* 자리에, GFP를 *BamHI, ApaI* 자리에 삽입하여 *pE7:GFP:cCLCC*를 제작하였다. *pE7:gSOR1*은 선행연 구(Baik and Cho, 2019)에서 제작되었다. 형질전환 유전자의 발현은 형질전 환체에서 genomic DNA 추출 후 클론 특이적 프라이머를 이용한 PCR을 통 해 모든 T1 개체의 유전자형을 확인하였다. 각 유전자의 PCR 산물은 Table 1에 설명된 프라이머를 이용하여 증폭되었다.

CLCC-N 말단(CLCC-Nt), CLCC-C 말단(CLCC-Ct), RHS10 kinase 도메인을 *Escherichia coli*에서 발현시켜 단백질 블롯 분석과 in-vitro phosphorylation assay를 실행하기 위해서, CLCC-Nt, CLCC-Ct, RHS10 kinase 도메인의 cDNA 서열이 Table1의 프라이머를 이용하여 *Arabidopsis* 유식물체의 cDNA 라이브러리로부터 PCR로 증폭되었다. PCR 산물은 N 말단 에 glutathione S-transferase(GST)이 연결된 단백질을 생산하는 *pGEX-4T-1* 벡터(GE Healthcare, Incheon, Korea)의 자리에 삽입되었다. CLCC-Nt, CLCC-Ct, 인산화-결함 단백질(phospho-defective protein)인 CLCC-Nt S27A, CLCC-Nt S34A, CLCC-Nt S27A/34A RHS10 kinase 도 메인은 *EcoRI, SalI* 제한효소 자리에, CLCC-Nt T50A/S51A *BamHI* 자리에 삽입되었다.

2.7 단백질 블롯 분석

RHS10 kinase 도메인 단백질과 CLC-C N-말단과 C-말단 그리고 인산화-결 함 단백을 *Escherichia coli*를 통해 각 단백질 배양 조건에 맞게 배양한다. 배 양액을 lysis Buffer(1X B-per, 100X protease inhibitor, 50X Lysozyme, 1000X DNase)로 정제한다. 정제된 단백질을 5x protein loading dye(10% SDS, 500 mM DTT, 50% glycerol, 500 mM Tris-HCL, 0.05% bromophenol blue dye)를 추가하여 5분간 끓인 후에 10% w/v SDS-PAGE gel로 전기영동 시켰다. SDS-PAGE gel을 transfer-blot turbo 시스템 (690BR024670, Bio-Rad, Singapore)을 통해 블롯팅 멤브레인으로 이동시킨 다. 블롯팅 멤브레인의 단백질을 anti-GST 항체 처리(skim milk 1%, 10000X anti-GST probe)하여 Davinch-Chemi(CAS-400M, Davinch-K, Korea)로 감지시켜 촬영했다.

2.8 In-vitro phosphorylation assay

정제된 RHS10 kinase 도메인 단백질과 CLC-C N-말단과 C-말단 그리고 인 산화-결함 단백질은 10x kinase buffer(100 mM Pipes pH7.0, 100 mM MgCl₂m 20 mM MnCl₂, 10 mM DTT)와 10 uCi [32P]_X-ATP를 최종 20 µ l으로 혼합한 후 상온에서 1시간 동안 배양했다. 5x protein loading dye(10% SDS, 500 mM DTT, 50% glycerol, 500 mM Tris-HCL, 0.05% bromophenol blue dye)를 추가하여 kinase 반응을 멈췄고, 5분간 끓인 후에 10% w/v SDS-PAGE gel로 전기영동 시켰다. SDS-PAGE gel은 Coomassie blue로 염색하여 반응한 단백질량을 확인하였다. 인산화된 단백질 밴드는 SDS-PAGE gel을 imaging plate에 24시간 노출시킨 후 방사능검출 영상분석 기(BAS 2500, Fufifilm, Japan)로 감지시켜 확인했다.

2.9 다중 돌연변이체 제작

다중돌연변이체와 형질전환체는 RHS10과 유전적 관계를 보이기위해 제작되었고 개별의 라인을 교배하여 만들어졌다. 순종 여부는 genotyping으로 입증되었다.

2.10 Accession numbers

이 논문의 서열 정보 및 돌연변이는 다음의 accession number를 이용하여 TAIR(http://arabidopsis.org)에서 확인할 수 있다. AT1G70460 (RHS10), AT5G49890 (CLC-C), AT1G61460 (SOR1), *rhs10* (SALK_075892), *clcc-2* (SALK_115644.28.60.x), *clcc-3* (GK-633B04-022802), *sor1-1* (SAIL_130_F05.v1).

3. 결과

3.1.1 RHS10 발현 유도는 뿌리털 길이 생장을 저해한다

Estradiol-유도 RHS10 라인(pRHS10:gRHS10@*rhs10*)에서 RHS10을 유도 시켜 시간별로 뿌리털의 생장을 확인하였다(Figure 1). 그 결과 Estradiol을 처리하지 않은 Mock의 경우 시간이 지나며 뿌리털의 길이가 점점 생장하는 반면, Estradiol을 처리한 Est의 경우 2시간 이후부터 뿌리털 길이의 생장이 중단됨을 확인하였다. 따라서 RHS10은 뿌리털 길이의 생장을 억제하는 인자 이다.



Figure 1. RHS10-mediated root hair growth inhibition in an estradiol-inducible RHS10 expression system.

Root hair growth images of estradiol (Est)-inducible RHS10 expression line (pMDC7:pRHS10:gRHS10@*rhs10*) after administration of Est. Est, estradiol-induced. Estradiol was treated at 0 hr. The scale bar is 100 μ m.

3.2.1 CLC-C는 RHS10에 의한 인산화 후보 자리를 가진다

CLC-C는 779 아미노산 크기의 단백질로 voltage-gated-ClC와 CBS-pair-SF 두 가지 도메인으로 이루어져 있다(Figure 3A). 뿌리털에서의 전사체의 발현은 뿌리털이 아닌 표피세포보다 높은 편이다(Figure 4A, B). 선 행연구의 RHS10 인산단백질체학 결과(Baik and Cho, 2019)에 의하면 CLC-C는 RHS10에 의한 인산화 자리로 S27, S34, T50/S51, S672의 5가지 자리를 가진다(Figure 2). CLC-C는 액포막에 존재하는 막성 단백질로 세포 질에 존재하는 말단을 N-과 C-말단 양쪽에 가지고 있다. 인산화 자리인 27S, 34S, 50T/501S는 CLC-C의 N-말단에 존재하며, S672는 CLC-C의 C-말단에 존재한다(Figure 3A, B). In-vitro phosphorylation assay에서 유 의미하게 나온(Figure 11B, C) N-말단의 T50/S51와 C-말단의 S672의 경우 PeptideAtlas PTM summary에 따르면 애기장대의 단백질에서 인산화되는 자리임이 확인되었다(Figure 3C). CLC-C의 계통수를 살펴보면, CLC-C는 CLC-A, CLC-B, CLC-G, CLC-D의 유사한 단백질 서열의 paralog를 가진다 (Figure 5B). CLC-C 단백질 서열은 식물을 거쳐 동물까지 homolog를 가지 며 보존되어 있다(Figure 5A). In-vitro phosphorvlation assav에서 유의미하 게 나온(Figure 11B) N 말단의 T50/S51의 경우 그 서열이 단자엽까지 보존 되어 있으며, C 말단의 S672도 단자엽까지 서열이 보존되어 있다(Figure 5C, D).

		Intensity							t-test			
Modification site	Protein name	RHS10ind_ est_Set_1	RHS10ind_es t_Set_2	RHS10ind_ est_Set_3	Average	RHS10ind_ mock_Set_1	RHS10ind_ mock_Set_ 2	RHS10ind_ mock_Set_3	Average	log2(es t /moc k)	t-test S- ignifica nt	-log10(t-t est p-val ue)
KIS(ph)GILDDGSVGFR	sp Q96282 CLCC_ARATH	5.86E+08	2.95E+08	7.59E+07	3.19E+08	(2.25E+08	3.56E+08	1.94E+08	0.719		0.278
KNTT(ph)S(ph)QIAIVGAN TCPIESLDYEIFENDFFK	sp Q96282 CLCC_ARATH	7.96E+07	2.61E+07	c	3.52E+07		9.96E+06	C	3.32E+06	3.408		0.604
TTFGS(ph)QILR	sp Q96282 CLCC_ARATH	4.70E+08	2.17E+08	9.99E+07	2.62E+08	6.13E+06	2.15E+08	C	7.35E+07	1.834		0.656

		Intensity							t-test		
Modification site	Protein name	RHS10ind_ est_Set_1	RHS10ind_es t_Set_2	RHS10ind_e st_Set_3	Average	RHS10ind_ mock_Set_1	RHS10ind_ mock_Set_ 2	RHS10ind_ mock_Set_ 3	Average	log2(es t/moc k)	-log1 t-test Sig(t-tes nificant t p-va lue)
KIS(ph)GILDDGSVGFRQPL LAR	sp Q96282 CLCC_ARATH	1.09E+09	2.02E+09	1.65E+09	1.59E+09	4.80E+07	1.01E+09	1.19E+09	7.50E+08	1.08	0.8
KIS(ph)GILDDGS(ph)VGFR QPLLAR	sp Q96282 CLCC_ARATH	C	3.71E+07	c	1.24E+07		2.97E+07	0	9.90E+06	0.32	0.00
QRTTFGS(ph)QILR	sp Q96282 CLCC_ARATH	C	9.53E+06	1.05E+07	6.68E+06	1.00E+07	C	6.12E+06	5.39E+06	0.31	0.36
TTFGS(ph)QILR	sp Q96282 CLCC_ARATH	5.13E+08	8.81E+08	7.12E+08	7.02E+08	1.02E+09	4.94E+08	7.70E+08	7.62E+08	-0.12	0.1
KIS(ph)GILDDGSVGFR	sp Q96282 CLCC ARATH	2.82E+08	4.71E+08	3.30E+08	3.61E+08	4.88E+08	4.94E+08	4.89E+08	4.90E+08	-0.44	1.0

Figure 2. Putative RHS10-phosphorylation target residues by of CLC-C. Phospho-proteomics result of RHS10 mediated phosphorylation by LC-MS/MS analysis. (A) Phosphorylated-sites of CLC-C in the 1st biological sample with 3 MS technical triplicates (RHS10ind_est(mock)_set_1~3). (B) Phosphorylated-sites of CLC-C in the 2nd biological sample with 3 MS technical triplicates (RHS10ind_est(mock)_set_1~3). Red letters with ph are phosphorylated amino-acid sites. Red boxes mean important peptides identified by in-vitro phosphorylation assay. Intensity means detected amount of each peptide set by MS.

А



Figure 3. CLC-C is phosphorylated by RHS10. (A) The schematic domain structure of CLC-C with RHS10-phosphorylation targets (\bigstar). (B) The predicted topology of CLC-C (from Protter site; https://wlab.ethz.ch/protter/start) with RHS10-phosphorylation targets (\bigstar). (C) Phosphorylated sites of CLC-C determined by previous phospho-proteomic studies (from PeptideAtlas PTM summary; http://www.peptideatlas.org). RHS10-phosphorylation target sites are marked with red stars (\bigstar).



Tissue	Expression	Standard Deviation	Tissue	Expression Level	Standard Deviation	
har 9 437.03		0.0	non root hair cell 9	304.86	0.0	
nair 10	343 7	0.0	0 0 non root hair cell 10		0.0	
bair 11	320.29	0.0	non root hair ceil 11	223.43	0.0	
hair 12	161.75	0.0	non root hair ceil 12	112.83	0.0	
hair 1	138.47	0.0	0.0 non root hair cell 1		0.0	
hair 2	140.29	0.0	0.0 non root hair cell 2		0.0	
nair 3	74 87	0.0	0.0 non root hair cell 3		0.0	
sair 4	183.36	0.0	non root hair cell 4	127.91	0.0	
hair 5	173.61	0.0	non root hair cell 5	121.1	0.0	
hair 6	182.89	0.0	0.0 non root hair cell 6		0.0	
hair 7	201.46	0.0	non root hair ceil 7	140,53	0.0	
hair 8	183.07	0.0	non root hair	127.71	0.0	

Figure 4. The expression pattern of *CLC-C* **in the** *Arabidopsis* **root.** (A) e-FP browser image of CLC-C expression level at root (http://arabidopsis.org). (B) Tables of expression values of CLC-C at root hair/non root hair(http://arabidopsis.org).

В



0.20



Figure 5. Phylogenies of CLC-C homologs and conservation of T50/T51 and S672 among close CLC-C homologs.

(A, B) Phylogenies of CLC-C homologs in organism (A), and *Arabidopsis* (B). Phylogenetic trees were generated by the Neighbor-Joining method using the MEGAX software package (https://www.megasoftware.net) after CLUSTAL W alignment of the whole amino acid sequences. Bootstrap values are given at the node as a percentage of 1000 replicates. Scale bar indicates the number of amino acid substitutions per site. (C, D) The alignment of amino acid sequences around T50/T51(C) and S672(D) of CLC-C homologs showing the conservation of T50/T51 and S672 in close CLC-C homologs. Atha, *Arabidopsis thaliana*, Brara, *Brassica rapa*, Ahyp(AH), *Amaranthus hypochondriacus*, Aqcoe, *Aquilegia coerulea*, Bradi, *Brachypodium distachyor*, Brast, *Brachypodium stacei*, Cucsa, *Cucumis sativus*, Dcar, *Daucus carota*, Gorai, *Gossypium raimondii*, LOC_Os, *Oryza sativa*, orange, *Citrus sinensis*, Pavir, *Panicum virgatum*, Potri, *Populus trichocarpa*, Seita, *Setaria italica*, Stub, *Solanum tuberosum*, VIT, *Vitis vinifera*, Zm, *Zea mays*, Zosma, *Zostera marina*, Sphfalx, *Sphagnum fallax*, Mapoly, *Marchantia polymorpha*, Cre, *Chlamydomonas reinhardtii*, See, *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast); Dre, *Danio rerio*, Mmus, *Mus musculus*, Ddis, *Dictyostelium discoideum*, Cele, *Caenorhabditis elegans*, Dmel, *Drosophila melanogaster*, Hsap, *Homo sapiens*. Red boxes indicate CLC-C and green box indicate CLC-C paralogs. An Orange box shows conserved T50A/S51 in CLC-C homologs and a blue box shows conserved S672 in CLC-C homologs.

3.2.2 CLC-C는 세포 내 액포막에 위치한다

CLC-C를 뿌리털 특이 프로모터인 EXPANSIN 7(pE7, Cho and Cosgrove, 2002)으로 과발현시킨 형질전환체 pE7:GFP:CLCC@WT T2 라인에서 형광 단백질을 이용하여 CLC-C의 세포 내 위치를 확인하였다(Figure 6). PI(Propidium Iodide)를 이용하여 세포벽을 염색하여 비교하였다. CLC-C는 적색으로 염색된 세포벽 내에 분명히 구분된 녹색으로 발현하여 존재하는 것 을 확인하였다(Figure 6A). 세포 내에서 거품의 형태를 띠기도 함을 확인하여 (Figure 6B), 야생형에서 FM4-64로 액포를 염색한 것(Figure 6C)과 유사한 형태로 나타나 CLC-C가 세포 내 액포막에 존재함을 확인하였다.



Figure 6. The subcellular localization of CLC-C. (A, B) The CLC-C (ProE7:GFP:CLCC in WT) green with the cell wall-marked PI(Propidium lodide) red signal. The transformant seedlings were treated with PI for 5 min. (C) Control WT, the tonoplast marked FM4-64 red signal. WT seedlings were treated with FM4-64 for 5 min and washed for 90-120 min. The scale bar is 20 μ m in all images.

3.2.3 clcc 돌연변이체는 뿌리털이 짧은 표현형을 가진다

clcc 돌연변이체 라인을 knock-out 라인인 clcc-2와 knock-down 라인인 clcc-3를 확보하였다(Figure 7). 각 라인에서의 뿌리털의 표현형을 확인한 결 과 clcc-2에서 뿌리털의 길이는 야생형보다 18% 짧아졌고, clcc-3에서 6% 짧아졌다(Figure 8). 따라서 뿌리털의 길이 생장은 CLC-C의 발현 정도가 커 짐에 따라 비례해 억제됨이 확인되었다. 또한 CLC-C가 뿌리털의 정상적인 생장에 필수적임이 확인되었다.



Figure 7. T-DNA insertion and *CLCC* **transcript level in the** *clcc* **mutants.** (A) A schematic diagram showing T-DNA insertion sites of *clcc-2* and *clcc-3* mutants in the *CLC-C* genomic DNA region. Exons are denoted by black boxes. (B) RT-PCR results showing transcript levels of *CLC-C* in WT, *clcc-2* and *clcc-3* mutants where *ACTIN2* served a loading control.

3.2.4 CLC-C 과발현체는 뿌리털이 짧은 표현형을 가진다

CLC-C를 뿌리텈 특이 프로모터인 pE7으로 과발혂시킨 형질전화체 pE7:GFP:CLCC@WT(CLC-Cox) T2의 3개 라인에서 뿌리털의 표현형을 관 찰하였다. CLC-Cox의 뿌리털 길이는 컨트롤인 pE7:YFP@WT 보다 #5 라인 의 경우 35%, #6 라인의 경우 46%, #9 라인의 경우 10% 감소하였다. 3개의 라인에서의 뿌리털의 길이를 종합하였을 때 CLC-Cox의 뿌리털의 길이는 컨 트롤보다 31% 감소하여 나타났다(Figure 9). 따라서 CLC-C의 뿌리털에서의 과발현은 뿌리털의 길이 생장을 억제시킴이 확인되었다.



Figure 8. Root hair phenotype of *Arabidopsis clcc* mutant. (A, B) Representative root images of 3DAG *Arabidopsis* WT, *rhs10, clcc-2* and *clcc-3* mutant. The scale bar is 500 μ m in all images. (C, D, E, F) Root hair length violin plots and tables of 3DAG WT, *rhs10, clcc-2* and *clcc-3* mutant. Data represent RH length from 620-727 root hairs from 40-52 seedlings in *clcc-2* a*Arabidopsis* nd 332-376 root hairs from 41-45 seedlings in *clcc-3* mutant. Three biological repeats. Statistically significant differences are denoted with different letters(one-way ANOVA with Tukey's unequal N-HSD post hoc test, P < 0.05).



Figure 9. Root hair phenotype of *Arabidopsis* **pE7:GFP:cCLCC@WT.** (A) Representative root images of 4DAG *Arabidopsis* Control(pE7:YFP@WT), pE7:GFP:CLCC@WT #5, 6, 9 T2. The scale bar is 500 μm in all images. (B, C, D, E) Root hair length violin plots and tables of 4DAG *Arabidopsis* pE7:YFP@WT, pE7:GFP:CLCC@WT #5, 6, 9 T2. Data represent RH length from 176-297 root hairs from 19-30 seedlings in pE7:GFP:CLCC@WT. Three biological repeats. Asterisk indicates significant difference from the control value(Student's t test).

3.2.5 CLC-C는 *rhs10* 돌연변이 배경에서 과발현 기능을 하지 못한다 CLC-C를 뿌리털 특이 프로모터인 pE7으로 *rhs10* 돌연변이 배경에서 과발현 시킨 형질전환체 pE7:GFP:CLCC@*rhs10* T2의 3개 라인에서 뿌리털의 표현 형을 관찰하였다. 형질전환체의 뿌리털의 길이를 pE7:YFP@WT보다 20% 뿌 리털이 길게 나타나는 *rhs10* 돌연변이체와 비교하면, #5 라인의 경우 7%, #9 라인의 경우 15%, #12 라인의 경우 3% 감소하였다. 3개의 라인에서 뿌 리털의 길이를 종합하였을 때 형질전환체 뿌리털의 길이는 *rhs10* 돌연변이체 보다 8% 감소하는 것으로 나타났다(Figure 10). pE7:GFP:CLCC@WT 형질 전환체의 뿌리털은 컨트롤에 비해 31% 억제되지만, pE7:GFP:CLCC@*rhs10* 형질전환체 뿌리털의 길이는 배경 대조군인 *rhs10* 돌연변이체보다 8% 밖에 억제되지 않는다. 따라서 CLC-C가 정상적으로 기능하기 위해서는 RHS10 신 호가 필요함이 확인되어 CLC-C가 RHS10의 하위 인자임을 알 수 있다.



CLCCox@rhs10

D





					E			
통합	rhs10	CLCCox@rhs10 #5	CLCCox@rhs10 #9	CLCCox@rhs10 #12		통합	rhs10	CLCCox@rhs10
평균	644.0497	599.6966676	558.8715259	624.4727799		평균	644.0497	594.3469911
편차	125.145	104.3893401	106.2138199	103.2240994		편차	125.145	104.6090865
오차	7.54653	5.636494562	9.8617056	6.414033449		오차	7.54653	7.304077871
RH 개수	275	343	116	259		RH 개수	275	718
seedlings	27	33	12	26		seedlings	27	71



Figure 10. Root hair phenotype of *Arabidopsis* **pE7:GFP:cCLCC@***rhs10.* (A) Representative root images of 4DAG *Arabidopsis* control(pE7:YFP@WT), pE7:GFP:CLCC@*rhs10* #5, 9, 12 T2. The scale bar is 500 μm in all images. (B, C, D, E) Root hair length violin plots and tables of 4DAG *Arabidopsis rhs10*, pE7:GFP:CLCC@*rhs10* #5, 9, 12 T2. Data represent RH length from 116-343 root hairs from 12-33 seedlings in pE7:GFP:CLCC@WT. (F) Relative root hair length of pE7:YFP@WT, *rhs10*, CLCCox@WT, CLCCox@*rhs10*. Three biological repeats. Asterisk indicates significant difference from the control value(Student's t test).

3.2.6 RHS10은 in-vitro에서 CLC-C의 N 말단과 C 말단 도메인을 각각 인 산화한다

anti-GST 항체를 이용한 단백질 블롯 분석결과 GST-fustion 단백질인 CLC-C N 말단 도메인(CLCC-Nt)은 35kD 크기로, RHS10 kinase 도메인 (RHS10KD)은 75kD 크기로 나타났다(Figure 11A). In-vitro phosphorylation assay를 통해 인산화를 확인한 결과, RHS10KD는 자가-인 산화되며 CLCC-Nt을 인산화시킴이 확인되었다(Figure 9B, C). 또한, RHS10 인산단백질체학을 통해 확인한 RHS10에 의한 CLC-C의 인산화 자리가 기능 함을 확인하기 위해 인산화결함 단백질의 인산화 여부를 확인하였다. 그 결과 CLCC-Nt의 T50A/S51A 결함 단백질의 경우 CLCC-Nt 본연의 단백질보다 인산화가 약하게 나타났다(Figure 11B). 또한 CLCC-Nt의 S27A, S34A, S27A/S34A의 경우 인산화가 CLCC-Nt 본연의 단백질과 유사한 정도로 나타 났다(Figure 11C). 따라서 CLC-C의 50T/51S가 RHS10에 의한 인산화 자리 이고, 27S, 34S는 인산화자리가 아님이 in-vitro에서 확인되었다. 또한, GST-fustion 단백질인 CLC-C C 말단 도메인(CLCC-Ct)의 경우, anti-GST 항체를 이용한 단백질 블롯 분석결과 49kD의 크기로 나타났다(Figure 11A). In-vitro phosphorylation assay를 통해 인산화를 확인한 결과, RHS10KD는 자가-인산화되며 CLCC-Ct을 인산화시킴이 확인되었다(Figure 11D).



Figure 11. Protein blot analysis and in-vitro phosphorylation assay of CLC-C by the RHS10 kinase domain.

(A) Protein blot analyses of GST-fusion proteins of CLC-C N terminal domain (CLCC-Nt), CLC-C C terminal domain(CLCC-Ct) and RHS10 kinase domain using anti-GST antibody. Arrow heads indicate the fusion proteins for CLCC-Nt, CLCC-Ct and RHS10 kinase domain whose calculated molecular sizes are 35, 49 and 75 kD, respectively. (B, C, D, E, F) In vitro phosphorylation assay images and phosphorylation intensity graphs of CLCC-Nt native, phospho-defective form proteins, CLCC-Ct and RHS10. GST-affinity-purified proteins were used for the phosphorylation assay including [32P]ã-ATP.

3.3.1 SOR1은 수용체성 kinase이다

선행연구의 EMS-돌연변이 선발로 선정된 SOR1(suppressors of RHS10ox) 은 발생한 단일염기 돌연변이가 RHS10ox의 뿌리털의 회복시키는 만큼 강력 한 RHS10의 하위인자로 생각되는 단백질이다(Baik and Cho, 2019). SOR1 은 749개의 아미노산 길이 단백질로, B-lectin, S-locus, PAN-like, Kinase, DUF34 5개의 도메인으로 구성되어있다(Figure 12A). 수용체성 kinase로서 세포질 내부에 kinase 도메인을 가지며 단일염기 돌연변이가 kinase 도메인 인 G461에 발생하여 kinase의 활성을 변화시켰을 것이라 예상된다(Figure 12A, B). 뿌리털에서의 전사체의 발현은 낮게 나타나며 뿌리털이 아닌 표피세 포보다는 높게 나타난다(Figure 12C, D). SOR1의 계통수를 살펴보면, SOR1 은 애기장대 내 다수의 paralog를 가지고 있고, 단백질 서열은 속씨식물의 Brassicaceae family까지 보존되어 있다(Figure 13).



Figure 12. SOR1 is a suppressor of RHS10.

(A) The schematic domain structure of SOR1 and a single nucleotide polymorphism site(\star). (B) The predicted topology of CLC-C (from Protter site; https://wlab.ethz.ch/protter/start) and a single nucleotide polymorphism site(\star). (C) e-FP browser image of SOR1 expression level at root (http://arabidopsis.org). (D) Tables of expression values of SOR1 at root hair/non root hair (http://arabidopsis.org). A single nucleotide polymorphism site is marked with a red star(\star).



Figure 13. A Phylogeny of SOR1 homologs in Embryophytes. A Phylogenetic tree was generated by the Neighbor-Joining method using the MEGAX software package (https://www.megasoftware.net) after CLUSTAL W alignment of the whole amino acid sequences. Bootstrap values are given at the node as a percentage of 1000 replicates. Scale bar indicates the number of amino acid substitutions per site. Atha, *Arabidopsis thaliana*, Brara, *Brassica rapa*, Eucgr, *Eucalyptus grandis*, Solyc, *Solanum lycopersicum*, Potri, *Populus trichocarpa*

3.3.2 sor1 돌연변이체는 긴 뿌리털 표현형을 가진다

sor1 돌연변이체 라인으로 knock-out 라인인 *sor1*-1을 확보하였다(Figure 14). 뿌리털의 표현형을 확인한 결과 *sor1*-1에서 뿌리털의 길이는 야생형보 다 10% 짧아졌다(Figure 15). 따라서 SOR1이 뿌리털의 길이 생장을 억제함 이 확인되었다.



Figure 14. T-DNA insertion and *SOR1* **transcript level in the** *sor1-1* **mutant.** (A) A schematic diagram showing T-DNA insertion sites of *sor1-1* mutants in the *SOR1* genomic DNA region. Exons are denoted by black boxes. (B) RT-PCR results showing transcript levels of *SOR1* in WT, *sor1-1* mutant where *ACTIN2* served a loading control.

3.3.3 SOR1의 과발현체는 짧은 뿌리털 표현형을 가진다

SOR1을 뿌리털 특이 프로모터인 pE7으로 과발현시킨 형질전환체 pE7:SOR1@WT(SOR1ox) T3의 3개 라인에서 뿌리털의 표현형을 관찰하였다. SOR1ox의 뿌리털 길이는 야생형보다 #1 라인의 경우 11%, #4 라인의 경우 8%, #9 라인의 경우 10% 감소하였다. 3개의 라인에서의 뿌리털의 길이 를 종합하였을 때 SOR1ox의 뿌리털의 길이는 야생형보다 10% 감소하여 나타났다(Figure 16). 따라서 SOR1의 뿌리털에서의 과발현은 뿌리털의 길이 생장을 억제시킴이 확인되었다.



Figure 15. Root hair phenotype of *Arabidopsis sor1-1* mutant. (A) Representative root images of 3DAG *Arabidopsis* WT, *rhs10* and *sor1-1* mutant. The scale bar is 500 μ m in all images. (B, C) A root hair length violin plot and a table of 3DAG *Arabidopsis* WT, *rhs10* and *sor1-1* mutant. Data represent RH length from 178-240 root hairs from 31-35 seedlings in WT, *rhs10* and *sor1-1* mutant. Three biological repeats. Statistically significant differences are denoted with different letters(one-way ANOVA with Tukey's unequal N-HSD post hoc test, P < 0.05)



Figure 16. Root hair phenotype of *Arabidopsis* **SOR1 overexpression lines.** (A) Representative root images of 4DAG *Arabidopsis* WT and SOR1 overexpression lines(SOR1ox, pE7:SOR1@WT). The scale bar is 500 µm in all images. (B, C, D, E) Root hair length violin plots and tables of 4DAG *Arabidopsis* WT and SOR1ox lines #1, 4,9. Data represent RH length from 344-366 root hairs from 37-40 seedlings in WT and SOR1ox lines. Three biological repeats. Asterisk indicates significant difference from the WT value(Student's t test) WT value(Student's t test).

3.3.4 SOR1은 RHS10과 연관된 신호전달 관계를 가진다

RHS10과 SOR1의 신호전달 관계를 확인하기 위해 *sor1* 돌연변이체를 *rhs10* 돌연변이체와 교배시켜 이중 돌연변이체인 *rhs10xsor1-1*를 제작하였다. 뿌리 털 표현형을 확인한 결과 이중 돌연변이체의 뿌리털의 길이는 야생형보다는 9% 길고 *rhs10, sor1-1* 돌연변이체 보다는 뿌리털의 길이가 짧은 것으로 나 타났다(Figure 17). 이중 돌연변이체가 SOR1과 RHS10의 개별된 뿌리털의 길이 생장의 영향의 합을 나타내지 않은 것으로 보아 SOR1과 RHS10은 개별 된 신호전달 관계보다 연관된 신호전달 관계에 가까운 것으로 생각된다.



Figure 17. Root hair phenotype of *Arabidopsis rhs10xsor1-1* **double mutant.** (A) Representative root images of 3DAG *Arabidopsis* WT, *rhs10*, *sor1-1* and *rhs10xsor1-1* (A) Representative root images of 3DAG Arabidopsis W1, *ms10*, sor1-1 and *ms10xs0r1-1* double mutant. The scale bar is 500 μ m in all images. (B, C) A root hair length violin plot and a table of 3DAG *Arabidopsis* WT, *rhs10*, *sor1-1* and *rhs10xsor1-1* double mutant. Data represent RH length from 353-368 root hairs from 37-39 seedlings. Three biological repeats. Statistically significant differences are denoted with different letters(one-way ANOVA with Tukey's unequal N-HSD post hoc test, P < 0.05)

Subject	Primer	Sequence (5' to 3')				
CLCCox	CLCC_Xma1_F	ACAGTCCCCCGGGATGGATGATCGGCACGAAGG				
cloning	CLCC_Asc1_R	ATTTTTGGCGCGCCTCACTTGAGGGGATCAATGTG				
RT-PCR to	CLCc 2490F	GACAAAGTCCTCCGCACATATAG				
confirm clcss mutants	CLCC 3114R	CTCATCAATTACAGGGAAACCATTATGTCTTGTC				
	CLCC-C cdsF	CGGAATTCATGAGGGGGGGTCTATGACCAGATTG				
	CLCC-C cdsR	TTTTGTCGACTCACTTGAGGGGATCAATGTGAG				
CLCC	CLCC-N cdsF	CGGAATTCATGGATGATCGGCACGAAGGAGAC				
in-vitro	CLCC-N cdsR	TTTTGTCGACTCACTTCTTCCTAGACCTCCAGTC				
on assav	CLCC-N 27A R	GGTTTCGAGAGGAAGATAGCTGGGATTCTAGACG				
cloning	CLCC-N 34A R	CTAGACGATGGAGCTGTCGGATTTCGAC				
	CLCC-N 50A51A F	GAAAGAACACAGCTGCTCAGATCGCTATTGTC				
	CLCC-N 50A51A R	GAATCGAAAGAACACAGCTGCTCAGATCGCTATTGTC				
	1g61460 1161F	CTTAATATGGAACCAAGACTTCATG				
RT-PCR to	1g61460 2202R	CTTGAGGCATGAGTCACGATGGAG				
mutant	1g61460 1302F	CTAGAACTCCATTGATACTATTCG				
	1g61460 2739R	CACAGAGAAGACCAATCT				

Table 1. List of primers used for PCR



Figure 18. The model for RHS10 signaling via CLC-C and SOR1.

4. 논의

RHS10은 뿌리털 정단 생장에 억제적인 역할을 하며(Won et al., 2009), 세 포벽에 위치한 수용체로 외부에서의 자극을 세포 내 신호로 전달한다. 그 신 호전달에 관여하는 RHS10의 하위 인자를 찾기 위해 본 연구를 진행하였다.

RHS10은 수용체성 kinase로 자가-인산화 하며 다른 단백질을 인산화 할 것으로 예상되었다. 따라서 RHS10에 의해 인산화되는 단백질과 그 서열을 알기 위해 RHS10 인산단백질체학이 진행되었다(Baik and Cho, 2019). RHS10 인산단백질체학에 의해 RHS10 인산화 후보 단백질로 선정된 pTOR 중 CLC-C가 RHS10에 의해 인산화되는 이온 수송체임이 확인되었다. CLC-C는 액포막에 존재하는 Cl⁻ 수송체로 기공의 개폐에 영향을 미쳤다 (Mathieu Jossier et al., 2010). CLC-C가 공변세포의 크기를 조절하여 기공 의 크기에 영향을 미치는 만큼 뿌리털의 길이 생장에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되었다. CLC-C의 뿌리털 생장에의 영향을 알아보기 위해 clcc 돌연변이체와 CLC-C 형질전환 과발현체를 확보 및 제작하였다. *clcc* 돌연변 이체에서 뿌리털의 길이가 CLC-C의 발현 정도에 따라 짧아져 뿌리털의 정상 적인 길이 생장에 CLC-C가 필수적인 기능을 함이 확인되었다. CLC-C 과발 현체에서 뿌리털의 길이가 크게 짧아짐이 확인되어 CI-의 액포내로 과도한 수 송은 뿌리털의 길이 생장을 저해함을 확인하였다. rhs10 돌연변이체 배경에서 의 CLC-C의 과발현을 확인한 결과 WT 배경에서의 과발현만큼의 뿌리털 길 이 생장 억제가 되지 못함이 확인되었다. 따라서 RHS10에 의한 신호전달이 CLC-C의 정상적인 기능에 필수적임이 확인되었다. RHS10에 의한 CLC-C의 직접적인 인산화 여부를 확인하기 위해 In-vitro phosphorvlation assav를 진행하였고 그 결과 RHS10 kinase 도메인에 의해 CLC-C의 N-말단과 C-말 단이 각각 인산화되며 CLC-C N-말단의 경우 T50/S51이 인산화에 영향을 미치는 표적 잔기임이 확인되었다. 종합적으로, CLC-C는 뿌리털의 정상적인 길이 생장에 필수적이며 in-vivo에서 RHS10의 하위 신호전달 인자로서 뿌리 털 길이 생장에 관여함이 확인되었고 in-vitro 결과 RHS10에 의해 직접 인산 화될 가능성이 있음이 확인되었다. CLC-C가 RHS10의 신호전달을 직접 함을 확실히 하기 위해 in-vivo에서 상호작용 여부를 확인하는 추가적인 실험이 필 요하다.

RHS10의 하위신호를 전달하는 인자를 알기 위한 다른 접근 방법으로 EMS-돌연변이 선발이 선행연구로 진행되었고(Baik and Cho, 2019), RHS10 의 강력한 하위신호전달 인자 후보로 SOR1이 선정되었다. SOR1은 연구되지 않은 단백질로 다수의 연구 진행이 필요하고, 우선적인 실험으로 뿌리털 발달 에의 기능을 확인하기 위한 돌연변이체와 과발현체 확보 및 제작이 진행되었 다. *sor1* 돌연변이체에서 뿌리털의 길이가 야생형보다 길게 나타나고, SOR1 과발현체에서 뿌리털의 길이가 짧게 나타남에 따라 SOR1이 RHS10과 마찬가 지로 뿌리털 길이 생장에 억제적인 작용을 함이 확인되었다. 또한, *rhs10*x*sor1-1* 이중 돌연변이체의 뿌리털 표현형을 확인한 결과 뿌리털의 길 이가 야생형보다 길지만 *rhs10* 돌연변이체나 *sor1* 돌연변이체보다 짧게 나타 나 SOR1과 RHS10이 연관된 신호전달 관계에 가까운 것으로 생각된다. 따라 서 SOR1은 RHS10의 하위 인자로 뿌리털 길이 생장에 영향을 미치는 것으로 생각되며, 직접적인 상호작용을 하는 신호전달 관계 인지를 확인하기 위해 추 가적인 in-vivo 실험이 필요하다. 또한, SOR1의 세포 내 단백질 활성이 확인 되지 않아 이에 관한 추가 실험이 필요하다.

RHS10이 뿌리털 생장을 억제하기 위한 하위 인자 탐색으로 CLC-C 와 SOR1을 하위 인자로 얻었다. RHS10은 더 다양한 하위 인자를 통해 뿌리 털 생장에 관여할 것이므로, 인산화단백질체학을 통해 더 많은 하위 인자의 탐색이 필요하다. 또한, RHS10은 전사체를 조절함으로써 또 다른 하위신호를 전달할 것이므로 RHS10에의해 발현되는 전사체와 전사인자에 대한 탐색이 필요하다. 이로써 RHS10이 어떤 하위 인자와 매커니즘을 통해 뿌리털 생장을 억제시키는 지 알게 되면 세포 팁-생장에 대한 매커니즘 연구에 기여할 수 있게 될 것이다.

5. 참고문헌

- Baik, S., Cho H-T. (2019). RHS10에 의한 애기장대(Arabidopsis thaliana) 뿌리털 생장 조절 신호전달 메커니즘 연구. 서울대학교대학원
- Bechtold, N. and Pelletier, G. (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. Methods Mol Biol. ;82:259-66. https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:259
- Cho, H-T. and Cosgrove, DJ. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in Arabidopsis. Plant Cell 14: 3237-3253
- Clowes, FAL. (2000). Pattern in root meristem development in angiosperms. New Phytologist 146, 83-94. https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00614.x
- Dolan, L. (1996). Pattern in the root epidermis: an interplay of diffusible signals and cellular geometry. Annals Bot. 77, 547-553. https://doi.org/10.1093/aob/77.6.547
- Grierson, C. and Schiefelbein, J. (2002). Root hairs. The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. doi/10.1199/tab.0060,
- Grierson, C. and Schiefelbein, J. (2008). Genetics of root hair formation. Plant Cell Monographs. Springer: Heidelberg.
- Grierson, C., Nielsen, E., Ketelaarc, T., Schiefelbein, J., et al. (2014). Root hairs. Arabidopsis Book. http://dx.doi.org/10.1199/tab.0172
- Hwang, Y., Lee, H., Lee, Y-S., Cho H-T., et al. (2016). Cell wall-associated ROOT HAIR SPECIFIC 10, a proline-rich receptor-like kinase, is a negative modulator of Arabidopsis root hair growth. J Exp Bot. 6, 2007–2022. https://doi:10.1093/jxb/erw031

Jossier, M., Kroniewicz, L.T., Dalmas, F., Thiec, D.L. Ephritikhine, G., Thomine, S.B., Barbier-Brygoo, H.L., Vavasseur, A., Filleur, S., Leonhard, N. et al. (2010). The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. Plant J. 64, 563-576. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04352.x

- Kim, DW., Lee, SH., Choi, S-B., Won, S-K., Heo, Y-K., Cho, M., Park,
- Y-I. and Cho, H-T., et al. (2006) Functional conservation of a root hair cell-specific cis-Element in angiosperms with different root hair distribution patterns. Plant Cell 18: 2958-2970. https://doi.org/10.1105/tpc.106.045229
- Lee, SH. and Cho, H-T. (2006). PINOID positively regulates auxin efflux in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. The Plant Cell 18, 1604–1616. https://doi.org/10.1105/tpc.105.035972
- Martinoia, E. (2018). Vacuolar Transporters Companions on a Longtime Journey. Plant Physiol. 176, 1384–1407.
- Masucci, JD. and Schiefelbein, JW. (1996). Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the Arabidopsis root. The Plant Cell 8, 1505–1517. https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1505
- Menand, B., Yi, K., Jouannic, S., Hoffmann, L., Ryan, E., Linstead, P.,
- Schaefer, DG., Dolan, L., et al. (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. Science 316, 1477-1480. https://doi.org/10.1126/science.1142618
- Ranf, S., Gisch, N., Schäffer, M., Illig, T., Westphal, L., Knirel, Y.A.,

Sánchez-Carballo, P.M., Zähringer, U., Hückelhoven, R., Lee, J., Scheel,

- D., et al. (2015). A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in Arabidopsis thaliana. Nature Immunolog. 16, 4. https://doi.org/10.1038/ni.3124
- Schiefelbein, JW. (2000). Constructing a plant cell: The genetic control of root hair development. Plant Physiol 124: 1525-153. https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1525
- Won, S-K., Lee, Y-J., Lee, H-Y., Heo, Y-K., Cho, M. and Cho, H-T.,
- et al. (2009). Cis-element- and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in

Arabidopsis. Plant physiol 150:1459-1473. https://doi.org/10.1104/pp.109.140905

Yi, K., Menand, B., Bell, E., Dolan, L., et al. (2010). A basic helix-loophelix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. Nature Genetics 42, 264–267. https://doi.org/10.1038/ng.529

6. ABSTRACT IN ENGLISH

A study on the root hair growth signaling mechanism of RHS10 downstream factor CLC-C and SOR1 in *Arabidopsis thaliana*

Eun-Ju Cheon

SEOUL NATIONAL UNIVERSITY Department of Biological Sciences

RHS10 (Root Hair Specific 10), one of the genes which are specifically expressed in root hair and have Root Hair-specific cis-Element (RHE) in the promotor region, encodes a receptor-like kinase that is thought to be associated with cell walls. The rhs10 loss-of-function mutant showed а longer root hair length phenotype. and RHS10 overexpression (RHS10ox) has almost no root hair phenotype. In this paper, I did experiments about the factors that are involved in the RHS10 signaling pathway. In our previous study, RHS10 downstream candidates, such as pTORs (phospho-proteomics targets of RHS10), of RHS10ox), were screened from RHS10 SORs (suppressors phospho-proteomics and RHS10ox EMS-mutagenesis screening. Here, I confirmed if some of the candidates transduce the repressing signal of root hair elongation by RHS10.

First, I confirmed if CLC-C, one of the pTORs screened from RHS10 phospho-proteomics affects the root hair development and acts as an RHS10 downstream factor. CLC-C is a tonoplast-located ion transporter protein that transports chloride ions into the vacuole. CLCC-less expressing *clcc* mutant showed shorter root hair and it proved that CLC-C is necessary for normal root hair elongation. protein of CLC-C overexpression Observation of fluorescent allele(CLC-Cox) showed tonoplast intracellular localization of CLC-C. CLC-C overexpression in the WT background made root hair length shorter and CLC-C overexpression in the *rhs10* background didn't make root hair length shorter that much. It means RHS10 is needed for the root hair growth signaling of CLC-C. RHS10 phosphorylated each of CLC-C N and C terminal domains in an in-vitro phosphorylation assay. As for CLC-C N terminal domain, T50/S51 phospho-defectve protein was less phosphorylated than its native form and it proved that CLC-C T50/S51 are phosphorylation target sites by RHS10.

Next, I confirmed if SOR1, one of the candidates of RHS10ox EMS-mutagenesis affects the root hair development and act as an RHS10 downstream factor. SOR1 is an unstudied protein and expected as a receptor-like kinase protein located in the plasma membrane like RHS10. *sor1* mutant showed longer root hair length and SOR1 overexpression made the root hair length shorter. It means SOR1 represses root hair elongation like RHS10. *rhs10xsor1* double mutant showed longer root hair length than the wild type but shorter root hair length than *rhs10* or *sor1* mutant. It proved that SOR1 and RHS10 signaling pathway is related, and RHS10 and SOR1 do not act independently.

Key words: *Arabidopsis thaliana,* Ion transporter, Protein phosphorylation, Receptor-like kinase, Root hair, Signal transduction

student number: 2020-28403

감사의 말

먼저, 연구 기회를 주신 조형택 교수님께 감사드립니다. 실험과 연구 과정뿐만 아니라 연구자의 자세에 대해서도 많이 배웠습니다. 몇 년간 실험실에서 배운 것들이 다른 일을 할 때도 도움이 많이 될 것 같습니다.

심사해주신 최연희 교수님, 현유봉 교수님 감사드립니다. 심사 중 해 주신 질문을 통해 연구 내용의 더 많은 부분을 고민해 보게 되었습니다.

연구실 선배, 친구들에게도 고맙다는 말을 전합니다. 광호 오빠, 상소, 성아, 경훈이, 용이 모두 함께 해줘서 고마워.

마지막으로, 언제나 응원해주시는 부모님과 언니, 동생에게도 고맙다 는 말을 전합니다. 항상 걱정해주시고 지지해주셔서 감사합니다.