J Plant Biotechnol (2016) 43:30–36
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2016.43.1.30

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

벼 Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor Kinase의 기능에 관한 연구

연진욱 · 김회택 · 노일섭 · 오만호

Functional analysis of the rice BRI1 receptor kinase

Jinouk Yeon · Hoy-Taek Kim · Ill-Sup Nou · Man-Ho Oh

Received: 12 March 2016 / Revised: 19 March 2016 / Accepted: 19 March 2016
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Brassinosteroids (BRs) are essential plant steroid hormones required for cell elongation, plant growth, development and abiotic and biotic stress tolerance. BRs are recognized by BRI1 receptor kinase that is localized in the plasma membrane, and the BRI1 protein will eventually autophosphorylate in the intracellular domain and transphosphorylate BAK1, which is a co-receptor in *Arabidopsis thaliana*. However, little is known of the role OsBRI1 receptor kinase plays in *Oryza sativa*, monocotyledonous plants, compared to that in *Arabidopsis thaliana*, dicotyledonous plants. As such, we have studied OsBRI1 receptor kinase *in vitro* and *in vivo* with recombinant protein and transgenic plants, whose phenotypes were also investigated. A OsBRI1 cytoplasmic domain (CD) recombinant protein was induced in BL21 (DE3) *E.coli* cells with IPTG, and purified to obtain OsBRI1 recombinant protein. Based on Western blot analysis with phospho-specific pTyr and pThr antibodies, OsBRI1 recombinant protein and OsBRI1-Flag protein were phosphorylated on Threonine residue(s), however, not on Tyrosine residue(s), both *in vitro* and *in vivo*. This is particularly intriguing as AtBRI1 protein was phosphorylated on both Ser/Thr and Tyr residues. Also, the OsBRI1 full-length gene was expressed in, and rescued, *bri1-5* mutants, such as is seen in normal wild-type plants where AtBRI1-Flag rescues *bri1-5* mutant plants. Root growth in seedlings decreased in Ws2, AtBRI1, and 3 independent OsBRI1 transgenic seedlings and had an almost complete lack of response to brassinolide in the *bri1-5* mutant. In conclusion, OsBRI1, an orthologous gene of AtBRI1, can mediate normal BR signaling for plant growth and development in *Arabidopsis thaliana*.

Keywords Brassinosteroids, Autophosphorylation, Receptor kinase, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*

J. Yeon · M.-H. Oh (✉)
충남대학교 생물과학과
(Department of Biological Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea)
e-mail: manhooh@cnu.ac.kr

H.-T. Kim · I.-S. Nou (✉)
순천대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Sunchon National University, Sunchon 57922, Korea)
e-mail: nis@sunchon.ac.kr

서 론

브라시노스테로이드(Brassinosteroids; BRs)는 동물의 스테로이드 호르몬과 구조적으로 유사한 식물 스테로이드 호르몬으로(Clouse et al. 1996), 식물 세포분열 촉진, 식물의 생장과 발달, 광형태형성, 종자발아, 관다발형성, 다양한 비생물학적, 생물학적 스트레스 내성등에 관여하는 스테로이드 호르몬이다(Clouse 2011; Jiang et al. 2014; Wang et al. 2014; Zhang et al. 2014). Brassinosteroid Insensitive1 (BRI1)은 세포막에 존재하는 BR 호르몬의 수용체로Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like-Kinase (LRR-RLK) family로 구분되는 단백질로서, extracellular domain, transmembrane domain, intracellular cytoplasmic domain으로 구분할 수있다. 아미노산 서열에 기초하여 extracellular domain의 N-말단에 signal peptide와 25개의 Leucine-Rich-Repeat (LRR), 21번째와 22번째 LRR 사이에 70개의 아미노산으로 이루어진 BR이 결합할 수 있는 island domain이 존재한다. Intracellular cytoplasmic domain은 juxtamembrane region (JM)과 kinase domain (KD)과 C-termianl tail (CT)로 이루어져 있다(Schumacher and Chory 2000; Clouse 2011; Gruszka 2013; Wang et al. 2014).

BR 호르몬이 BRI1 수용체 단백질의 extracellular domain에 결합하면 BRI1 수용체 단백질의 intracellular cytoplasmic

domain의 serine, threonine 그리고 tyrosine 아미노산 등에서 인산화 반응이 일어나 kinase가 활성화 되면, BRI1의 co-receptor, BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE (BAK1)과 함께 이형이량체(heterodimerization)를 형성하여 이들 단백질 복합체는 세포질에 존재하는 BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 (BES1)과 BRASSINAZOLE-RESISTANT 1(BZR1)를 인산화 시키는 BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2(BIN2)를 억제하고, 탈 인산화 시키는 BRI1 SUPPRESSOR 1(BSU1)을 촉진시켜 BES1과 BZR1의 인산화된 불활성 상태를 탈 인산화된 활성 상태로 전환시킨다. 이렇게 활성화된 BES1과 BZR1은 핵 내부로 이동하여 BR에 의해 유도되는 다양한 유전자들의 발현을 조절한(Yin et al. 2002; Wang et al. 2005; Li and Jin 2006; Gendron and Wang 2007; Gruszka 2013; Zhao et al. 2013; Wang et al. 2014). Oh et al. (2000)은 단백질 생화학적 연구 기법을 활용하여 애기장대 BRI1 수용체의 단백질 이 Ser/Thr 수용체 kinase 임을 입증함과 동시에 *in vitro*에서 BRI1 재조합 단백질(BRI1-CD)를 활용하여 *in vitro* 인산화 부위들을 판별하였다. 이후 지속적인 단백질 생화학적인 연구 등을 통하여 BR 수용체인 BRI1 kinase는 Ser/Thr 수용체 kinase 일뿐 아니라 Tyrosine 아미노산 잔기에서도 인산화되는 dural specificity kinase 활성을 가지는 매우 흥미로운 LRR-RLKs family에 속하는 단백질임을 입증하였다(Oh et al. 2009). 이와 같은 축적된 연구 및 여러 연구자들의 적극적인 연구의 대부분은 쌍자엽 식물임과 동시에 모델 식물인 애기장대의 BRI1 유전자 및 단백질에 대한 연구에 집중되어 온 반면, 단자엽 식물이며 농업적으로 매우 중요한 작물인 벼의 BR 수용체 단백질, OSBRI1의 기능 및 특징 구명은 매우 빈약할 뿐 아니라 쌍자엽 식물과 단자엽 식물에서의 BRI1 단백질의 특징 구명에 대한 비교 연구 및 OsBRI1 단백질 engineering에 대한 기초 자료는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구의 시도는 단자엽과 쌍자엽 식물에 존재하는 BR 수용체 단백질의 비교 연구를 통한 작물에서의 단백질 engineering의 기초 자료를 제공하게 될 것이다.

재료 및 실험방법

OsBRI1 단백질의 유연관계

OsBRI1의 단백질의 유연관계를 확인하기 위해, 배추(*Brassica rapa* FPsc/Chiifu), 양배추(*Brassica oleracea*), 유채(*Brassica napus*), 옥수수(*Zea mays*)의 BRI1의 단백질의 서열을 애기장대는 TAIR (www.arabidopsis.org), FPsc와 옥수수, 벼 그리고 Brachypodium은 Phytozyme (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html), Chiifu는 Brassica database (www.brassicadb.org/brad), 유채는 GENOSCOPE (http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/)에서 각각 단백질 서열을 다운 받아 Clustal omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)에서 alignment를 시행한 후, MEGA6.0 프로그램을 이용하여 계통수를 완성 하였다.

*E.coli*에서 BRI1-CD 수용체 재조합 단백질의 발현

AtBRI1-CD과 OsBRI1-CD를 pFlag-Mac Gateway백터에 클로닝하였으며 BL21 (DE3) pLysS 세포(Novagen, Rockland, MA, USA)에서 재조합 단백질을 발현 시켰다. 재조합 Flag-tagged 단백질들은 anti-Flag M2 affinity gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 단백질을 분리하였다(Oh et al. 2012). Bead로부터 분리 정제한 재조합 단백질은 1000X 완충 용액(20 mM MOPS, pH7.5, 1 mM DTT)에서 dialyze 하였다.

전기영동과 Immunoblotting

1차원 전기영동을 하기 위하여 재조합 단백질은 1X SDS-PAGE 샘플 용액(1M Urea, 0.7M β-mercaptoethanol, 5 mM NaF, 1 mM Na_2MoO_4, 1 mM Na_3VO_4, 1 mM aminoethylbenzenesulfonyl fluoride, 2 mM EDTA)과 혼합하여 95°C에서 5분 동안 배양하였다. 단백질 농도는 dye-binding assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법으로 결정하였으며, 단백질들은 12% polyacrylamide (0.1% SDS) 겔에서 분리하였고 polyvinylidene difluoride (PVDF) fluorescence-specific membranes (Millipore, Bedford, MA, USA)에 transfer 하였다. 재조합 단백질들이 결합된 PVDF membrane은 phosphate-buffered saline (PBS; 5 mM NaH_2PO_4, 150 mM NaCl, Ph 7.4)에 2% (v/v) fish gelatin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 첨가된 용액에서 1시간 동안 배양하였다. PVDF membrane blots은 monoclonal antibodies (pTyr, 1: 500, Invitrogen, CA, USA), Flag antibody (1:1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 polyclonal antibody (pThr, 1:500, Invitrogen, CA, USA)로 probe 하였다. 또한 blot는 ProQ diamond phosphoprotein stain (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)와 coomassie Brilliant Blue (CBB) stain 하였다. 상온에서 1시간 동안 1차 항체와 배양 한 후 blots은 PBST (PBS + 0.1% Tween-20)로 wash 하였으며, Alexa Fluor 680-conjugated 2차 항체(Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA)를 PBST에서 1:20,000로 1시간 동안 배양한 후 immunoblot imaging과 densitometry 분석은 LI-COR Odyssey Infrared Imaging System (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) 이용하여 수행하였다.

펩타이드 kinase assay

펩타이드 substrate 인산화 assay는 기질로서 80μgml^{-1} SP11 펩타이드(sequence: GRJRRIA**S**VEJJK)을 이용하여 수행하

였다. 기질과 BRI1 재조합 단백질의 반응은 상온에서 수행하였으며, 펩타이드 kinase 활성은 filter paper binding assay를 이용하여 측정하였다.

OsBRI1의 하배축과 뿌리의 표현형 관찰

본 연구에 이용한 유식물체의 하배축과 뿌리의 표현형을 관찰하기 위해 1/2 Murashige and Skoog 배지(1% Sucrose, 0.05% MES, 1/2 Murashige and Skoog, 1.2% Plant Agar)에 Ws2, *bri1-5*, AtBRI1-Flag, OsBRI1-Flag 형질전환 식물체를 심은 후 호일로 싸서 2일 동안 춘화처리(4°C) 한 후, 암조건은 호일로 감싸 7일 동안 수직으로 22°C에서 키웠다. 7일후 사진을 찍고 ImageJ 프로그램으로 하배축과 뿌리의 길이를 측정하였다.

OsBRI1의 형질전환체 표현형 관찰

형질전환 식물체의 표현형을 관찰하기 위해 멸균된 흙(상토 5 : 버미큘라이트 1 : 펄라이트 1)을 화분에 15개씩 종자를 심어 4°C에서 2일간 춘화처리를 한 후, 22°C에서 식물을 21일간 키워 식물체의 사진을 촬영했다. BR에 의한 뿌리 억제를 관찰하기 위해 1/2 Murashige and Skoog 배지(1% Sucrose, 0.05% MES, 1/2 Murashige and Skoog, 1.2% Plant Agar)에 각각 0nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM의 24-epBL이 첨가된 배지에 Ws2, *bri1-5*, AtBRI1-Flag, OsBRI1-Flag 형질전환 식물체 종자를 심은 후 암조건에서 2일 동안 춘화처리를 한 후, 22°C에서 10일 동안 수직으로 키웠다. 10일 후 사진을 찍고 ImageJ 프로그램으로 길이를 측정하였다

결 과

OsBRI1의 단백질의 유연관계

OsBRI1 단백질은 1,121개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 예측되는 단백질의 분자량은 120.03 kDa이며, pI는 5.93이다. OsBR1 단백질은 다른 식물의 BRI1 단백질과 높은 유사성을 보였다(Fig. 1). 애기 장대 BRI1과는 전체적으로 약 52.87%의 유사성을 가지고 있다. 단백질의 부분별 유사성 비교 결과 extracellular domain은 43.34%, juxtamembrane domain은 46.48%, kinase domain은 84.48%, C-terminal region

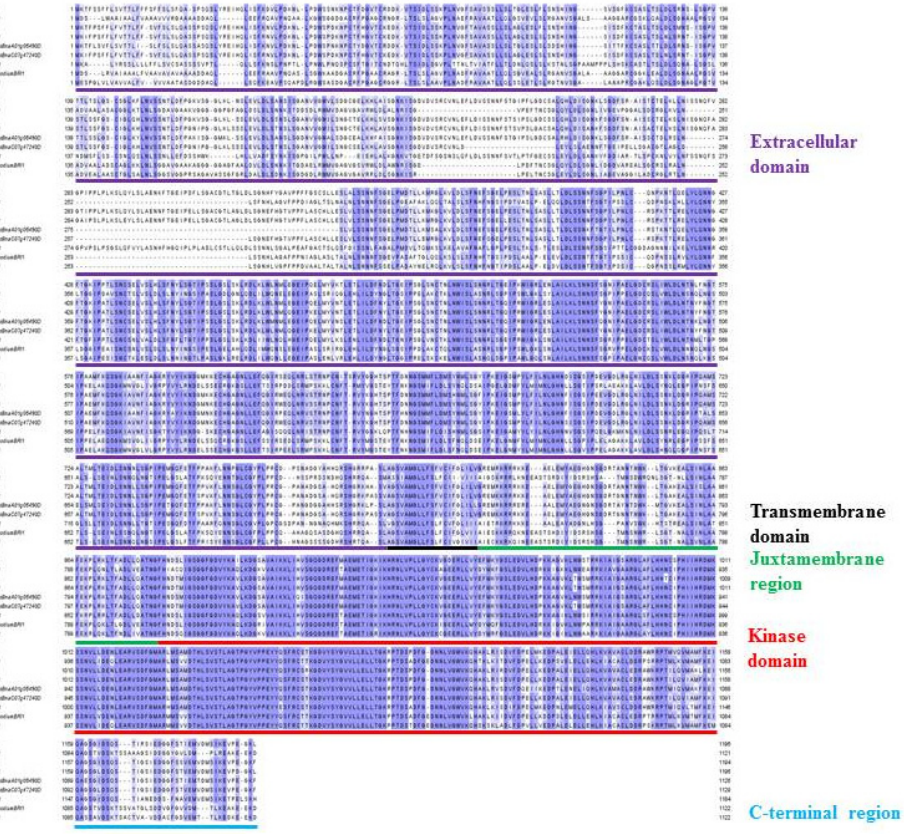

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of BRI1 proteins. Multiple alignment of the deduced OsBRI1 protein with brassinosteroid insensitive 1 (BRI1) from various species (*Arabidopsis thaliana*; *Brassica napus*; *Brassica oleracea*; *Brassica rapa*, *Glycine max*; *Zea mays*; *Brachypodium distachyon* and *Oryza sativa*) by Clustal Omega

은 36.84%의 유사성을 보였다(Fig. 1). Figure 1의 결과에 기초하였을 때 단자엽과 쌍자엽 식물체의 BRI1 단백질들은 extracellular domain과 비교하여 kinase domain이 매우 보존된 아미노산 서열을 보여주었다. 또한 아미노산 alignment 결과에 기초한 계통수 분석 결과, 배추과 식물인 애기장대와 배추, 양배추, 그리고 유채와 한 그룹을 이루며, 쌍자엽 식물인 콩은 배추과의 식물과 구분되어 다른 그룹을 만든다. 단자엽 식물인 벼, 옥수수는 쌍자엽 식물과 구분되어 그룹을 만들고, OsBRI1은 Brachypodium BRI1과 가장 근접한 유연 관계에 있음을 알 수 있었다(data not shown).

*E.coli*에서 BRI1의 autophosphorylation

Flag-AtBRI1 (애기장대)과 Flag-OsBRI1 (벼) 재조합 단백질의 autophosphorylation을 phospho-specific antibodies (pThr, pTyr)을 이용하여 분석하였다. *E.coli*에서 IPTG 첨가(300 μM) 후 상온에서 16시간 동안 배양 한 후 Flag-AtBRI1과 Flag-OsBRI1 단백질의 인산화 상태의 분석 결과, 흥미롭게도 Flag-AtBRI1에서는 강한 Threonine 뿐 아니라 Tyrosine 인산화가 강하게 일어나는 반면에 Flag-OsBRI1 단백질에서는 Tyrosine 인산화는 일어나지 않고 오직 Threonine 인산화 반응만

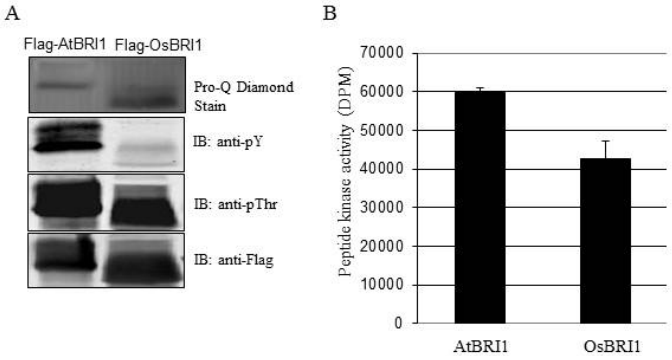

Fig. 2 Flag-AtBRI1 and Flag-OsBRI1 are phosphorylated on Threonine and/or Tyrosine residues *in vitro*. (A) Immunoblot analysis of purified Flag-BRI1 protein harvested from cells at different stages of induction, using a variety of generic antibodies. Staining with ProQ Diamond phosphoprotein stain reported phosphorylation at all Serine, Threonine, and Tyrosine residues. (B) Peptide kinase activity of BRI1 purified at 16 hrs induction. The SP11 peptide (sequence: GRJRRIASVEJJKK, where J is Norleucine) was used and the reaction mixtures were incubated for 20 min at room temperature

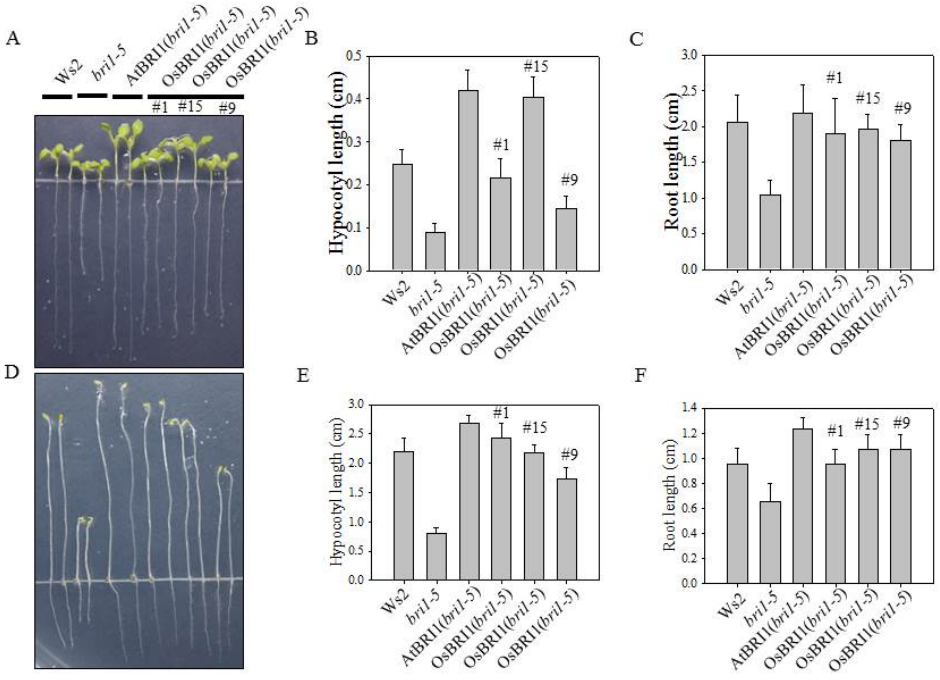

Fig. 3 OsBRI1 restores hypocotyl and root elongation of the weak *bri1-5* under light (A) and dark conditions (D). Ws2, *bri1-5*, AtBRI1 and 3 independent OsBRI1 transgenic lines (T3) generations for each construct are shown after 7 days of growth under light and dark conditions. OsBRI1 transgenic plants rescue hypocotyl and root length under light (B and C) and dark (E and F). Values are mean ± SEM; n = 6

감지되었다(Fig. 2A). 그렇기 때문에 dual-specificity kinase 활성을 갖는 AtBRI1과 비교하여 OsBRI1 단백질은 Ser/Thr 수용체 kinase 임을 확인할 수 있었다. 또한 Flag-AtBRI1과 Flag-OsBRI1 재조합 단백질의 peptide kinase 활성을 SP11 peptide를 이용하여 분석한 결과, AtBRI1 kinase의 활성이 OsBRI1 kinase 활성보다 현저하게 강한 효소 활성을 보여주었다(Fig. 2B).

OsBRI1 형질전환 식물체의 하배축과 뿌리의 표현형 관찰

1/2 MS 배지(1% Sucrose, 0.05% MES, 1/2 Murashige and Skoog, 1.2% Plant Agar)에 종자를 심어 7일 동안 키운 다음 하배축과 뿌리의 길이를 측정하였다. 명 조건에서 *bri1-5* 돌연변이 식물체는 Ws2와 AtBRI1-Flag, OsBRI1-Flag 형질전환 식물체보다 하배축과 뿌리의 길이가 현저히 짧은 것이 관찰되었다. OsBRI1 형질전환체 식물들의 뿌리는 Ws2와 길이가 비슷하였으며, OsBRI1-Flag의 형질전환식물체(#15)는 AtBRI1 형질전환체의 하배축 길이에 큰 차이 없이 유사하였으나 Ws2 보다는 하배축의 길이가 현저한 차이를 보였으며, OsBRI1 형질전환 식물체의 하배축과 뿌리의 길이등을 분석한 결과, AtBRI1 형질전환 식물체와 비교하여 하배축의 길이는 약간 짧았으나 뿌리의 길이는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 3A, B, C). 암 조건에서 *bri1-5* 돌연변이 식물의 하배축과 뿌리의 길이는 다른 식물체들보다 짧았으며, OsBRI1 형질전환체의 경우 Ws2, AtBRI1 식물체의 하배축과 뿌리의 길이등에서 큰 차이 없이 정상적인 생장을 보인 것으로 보아 OsBRI1 단백질은 애기장대 식물체에서 정상적인 BR 호르몬 신호전달 메커니즘을 수행하는 것으로 입증되었다(Fig. 3D, E, F).

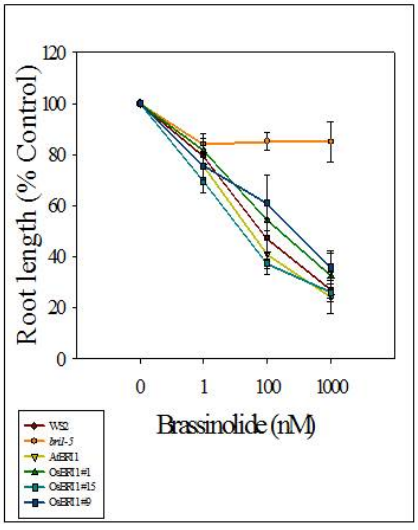

Fig. 4 Analysis of BR signaling through root growth inhibition assay with brassinolide treatments. The dose response of brassinolide for root growth inhibition in 7-day-old light -grown seedlings (16 h light/8 h dark). Note the decreased root growth at Ws2, AtBRI1, and 3 independent OsBRI1 transgenic seedlings and near complete lack of response to brassinolide of seedling in the *bri1-5* mutant. Values are mean ± SEM; n = 10

Brassinolide (BL) 농도에 따른 뿌리 생장 억제

BL를 처리하게 되면 식물의 뿌리 생장은 현저하게 억제된다(Clouse et al. 1996). 이와 같은 식물 생리학적인 사실에 근거하여 BL 농도 증가에 따른 뿌리 억제 실험등을 수행 하였다. 1/2 MS 배지(1% Sucrose, 0.05% MES, 1/2 Murashige and Skoog, 1.2% Plant Agar)에 종자를 심어 10일 동안 키운 다음 뿌리 길이를 측정하였다. *bri1-5* 돌연변이 식물체의 경우 농도에 따라 길이 변화의 차이는 보이지 않았지만 야생형인 Ws2와, AtBRI1-Flag, OsBRI1-Flag 형질전환 식물체의 경우 epi-BL 농도가 증가할수록 뿌리의 생장은 감소하였다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 *bri1-5* 식물체를 제외한 Ws2와, AtBRI1-Flag, OsBRI1-Flag 식물체들이 BR 호르몬의 존재하는 조건에서 정상적인 호르몬 신호전달 메커니즘이 진행됨을 의미한다.

OsBRI1 유전자에 의한 *bri1-5* 돌연변이 식물체 회복 및 BR 호르몬 신호전달 검증

BR 호르몬에 반응하지 않는 *bri1-5* 돌연변이 식물체에 OsBRI1 유전자를 형질전환 시킨 후 정상적인 OsBRI1 단백질의 발현 수준과 BR 호르몬 신호전달의 downstream 구성 성분인 BES1 단백질을 분석하여 OsBRI1에 의한 BR 신호전달 메커니즘을 분석하였다. Figure 5에서 보여주는 바와 같이 벼 식물의 BR 수용체 kinase인 OsBRI1를 쌍자엽 식물인 애기장대의 BR insensitive 돌연 변이체인 *bri1-5*

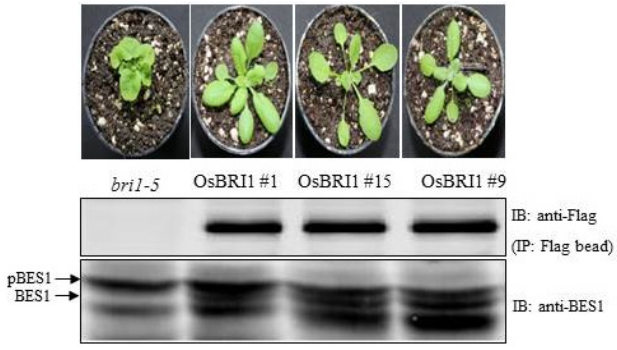

Fig. 5 Rescue of the weak *bri1-5* mutant by the expression of OsBRI1-Flag. The 3 independent OsBRI1 transgenic lines are shown and are representative of 10 additional lines. The immunoblot indicates the similar expression levels of the OsBRI1-Flag transgene in the different transgenic lines. BES1 phosphorylation status in plants expressing *bri1-5* and OsBRI1-Flag in *bri1-5* background. Total protein extracts of light-grown plants were used for immunoblotting with anti-BES1 antibody

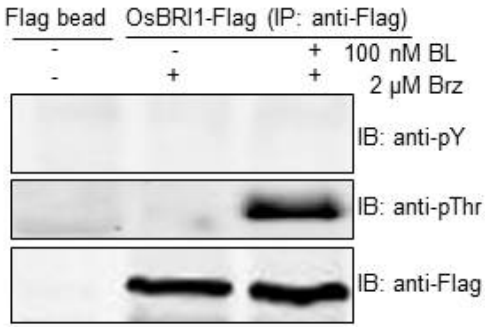

Fig. 6 OsBRI1 is phosphorylated on Threonine residues *in vivo*. BL-dependence of OsBRI1-Flag phosphorylation on Threonine residues *in vivo*. Homozygous transgenic plants expressing OsBRI1-Flag in the *bri1-5* mutant background were treated with the BR biosynthesis inhibitor Brz (2 μM added after 6 d of initial growth), and were then treated with 100 nM BL or solvent, for 90 min on day 11. OsBRI1-Flag protein was immunoprecipitated from solubilized microsomal membranes and analyzed by immunoblotting as indicated

돌연변이 식물체에 형질전환 시킨 결과, 모든 형질전환 식물체들은 정상 식물체로 회복되었으며, OsBRI1 단백질의 발현 역시 적절한 수준으로 탐지되었다. 특히 흥미로운 점은 *bri1-5* 돌연변이 식물체, 즉 BR 호르몬 신호 전달이 진행되지 못하는 경우, 또는 BR이 없는 조건에서와 같이 pBES1 (인산화 BES1) 단백질의 양은 증가하고 BES1 (탈인산화 BES1) 단백질은 탐지되지 않는 반면에 OsBRI1 형질전환 식물체들의 경우, pBES1 단백질도 존재하지만 신호전달측면에서 활동적인 BES1 단백질이 현저히 증가하는 것으로 보아 OsBRI1 단백질에 의해 정상적인 BR 호르몬 신호전달이 일어나고 있음을 시사한다(Fig. 5). 또한 *in vitro*에서의 결과와 같이 *in vivo*에서 OsBRI1-Flag 단백질은 Tyrosine 인산화는 일어나지 않고 오직 Threonine 인산화 반응만 감지되었다(Fig. 6). 이와 같은 연구 결과는 쌍자엽과 단자엽 식물체에서의 BRI1 수용체 kinase의 특징으로 사료되나 이에 대한 생리학적 그리고 신호전달 측면에서 의미는 향후 연구에 중요한 분야가 될것으로 사료된다.

고 찰

본 연구에서는 벼(*Oryza sativa*)의 BRI1 유전자를 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 BR 수용체 돌연변이체인 *bri1-5*에 형질전환 시킨 식물을 이용하여 표현형 및 BR에 대한 반응을 관찰함으로써 OsBRI 수용체 kinase를 post-translational modification 수준에서 수용체 kinase의 활성및 특이성을 구명함과 동시에 단자엽과 쌍자엽 식물에 존재하는 BR 수용체 단백질의 비교 분석을 활용한 기능탐색, 그리고 단백질 engineering 측면에서 기초 연구 자료를 확보하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

흥미로운 연구 결과로서, *in vitro*와 *in vivo*에서 Flag-AtBRI1에서는 강한 Threonine 뿐 아니라 Tyrosine 인산화가 강하게 일어난다는 연구 결과가 보고되었다(Oh et al. 2009). 본 연구의 *in vitro*와 *in vivo* 결과에서 Flag-OsBRI1 단백질에서는 Tyrosine 인산화는 일어나지 않고 오직 Ser/Thr 인산화 반응만 감지되었다. 그렇기 때문에 이들 BR 수용체 단백질들의 kinase 활성과 특이성 측면, 그리고 *in vivo*에서의 식물의 생장과 발달등을 포함한 biotic/abiotic stresses 등 식물 생리적인 차이등이 존재할 것으로 사료된다. OSBRI1를 쌍자엽 식물인 애기장대의 BR insensitive 돌연 변이체인 *bri1-5* 돌연변이 식물체에 형질전환 시킨 결과, 모든 형질전환 식물체들은 정상 식물체로 회복되었을 뿐 아니라 pBES1 (인산화 BES1)과 BES1 (탈인산화 BES1) 단백질 양상 결과, OsBRI1 형질전환 식물체들의 경우, pBES1 단백질도 존재하지만 신호전달측면에서 활동적인 BES1 단백질이 현저히 증가하는 것으로 보아 OsBRI1 단백질에 의해 정상적인 BR 호르몬 신호전달이 일어나고 있음을 시사한다.

또한 애기장대와 벼 BRI1 단백질의 부분별 유사성 비교 결과, extracellular domain에 비하여 kinase domain에서 매우 높은 유사성을 보였다 할지라도 애기장대 BRI1은 dual-specificity kinase 활성을 보인 반면에 벼 BRI1 단백질은 tyrosine 인산화는 일어나지 않은 것으로 보아 일부 아미노산 유사상의 차이가 kinase 활성에 매우 결정적인 역할을 한다는 것을 시사한다. 아미노산 alignment 결과에 기초한 계통수 분석 결과, 배추과 식물인 애기장대와 배추, 양배추, 그리고 유채와 한 그룹으로 구분되며, 단자엽 식물인 벼, 옥수수는 쌍자엽 식물과 구분되어 그룹을 만들고, OsBRI1은 Brachypodium BRI1과 가장 근접한 유연관계를 보이는데 애기장대 BRI1과 배추, 양배추 BRI1의 단백질 분석 결과 이들 단백질들의 인산화는 dural-specificity kinase 활성을 보인다(data not shown).

이와 같은 연구 결과 등을 종합하여 쌍자엽과 단자엽 식물체의 BRI1 단백질의 활성등에 특이적으로 중요한 아미노산등을 비교 분석 한 후 단백질 공학 측면에서 응용 가능하게 함으로서 궁극적으로 작물 개량에 기여할 수 있을 것이다.

사 사

This work was supported in part by the research fund of Chungnam National University and Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (No. 2014R1A1A401006751) and Golden Seed Project (Center for Horticultural Seed Development, No.

213003-04-4-SB110), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA), Ministry of Oceans and Fisheries(MOF), Rural Development Administration (RDA) and Korea Forest Service (KFS).

References

Clouse SD, Langford M, McMorris TC (1996) A brassinosteroid-insensitive mutant in Arabidopsis thaliana exhibits multiple defects in growth and development. Plant Physiol 111:671-678

Clouse SD (2011) Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. The Plant Cell 23:1219-1230

Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron J M, Chen H, Shibagaki N, Ferl R J, Ehrhardt D, Chong K, Burlingame AL, Wang ZY (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. Developmental cell, 13:177-189

Gendron JM, Wang ZY (2007) Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. Current opinion in plant biology, 10:436-441

Gruszka D (2013) The brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. International Journal of Molecular Sciences 14:8740-8774

Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY, Lin WH (2013) Brassinosteroid regulates seed size and shape in Arabidopsis. Plant Physiol 162:1965-1977

Li D, Wang L, Wang M, Xu YY, Luo W, Liu YJ, Xu ZH, Li J, Chong K (2009) Engineering OsBAK1 gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield. Plant Biotechnology Journal 7:791-806

Li J, Jin H (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. Trends in Plant Science 12:37-41

Nakamura A, Fujioka S, Sunohara H, Kamiya N, Hong Z, Inukai Y, Miura K, Takatsuto S, Yoshida S, Ueguchi-Tanaka M, Hasegawa Y, Kitano H, Matsuoka M (2006) The role of OsBRI1 and its homologous genes, OsBRL1 and OsBRL3, in rice. Plant Physiol 140:580-590

Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Yoshida S, Yuan H, Feldmann KA, Tax FE (1999) Brassinosteroid-insensitive dwarf mutants of Arabidopsis accumulate brassinosteroids. Plant Physiol 121:743-752

Oh MH, Ray WK, Huber SC, Asara JM, Gage DA, Clouse, SD (2000) Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro. Plant Physiol 124:751-766

Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC (2009) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA 106:658-663

Oh MH, Clouse SD, Huber SC (2012) Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase occurs via a posttranslational modification and is activated by the juxtamembrane domain. Frontiers in Plant Science 3:1-14

Schumacher K, Chory J (2000). Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. Current opinion in plant biology 3: 79-84

Wang M, Sun S, Wu C, Han T, Wang Q (2014) Isolation and Characterization of the Brassinosteroid Receptor Gene (GmBRI1) from Glycine max. International Journal of Molecular Sciences 15:3871-3888

Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD (2005) Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. The Plant Cell 17:1685-1703

Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. Cell 109:181-191

Zhang C, Bai MY, Chong K (2014) Brassinosteroid-mediated regulation of agronomic traits in rice. Plant Cell Reports 33: 683-696

Zhao J, Wu C, Yuan S, Yin L, Sun W, Zhao Q, Zhao B, Li X (2013) Kinase activity of OsBRI1 is essential for brassinosteroids to regulate rice growth and development. Plant Science 199: 113-120