

2단계
최종보고서

BSNB1190-2000059-5

Water stress 관련 신호전달체계 연구를 통한
가뭄내성 식물체 개발

Study of water stress-related signaling
mechanism and development of drought-resistant
plants

생명공학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 생명현상 및 기능연구사업의 세부과제인 Water stress 관련 신호전달체계 연구를 통한 가뭄내성 식물체 개발에 관한 연구의 2단계 최종보고서로 제출합니다.

2000. 9.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

주관연구책임자 : 배현숙

연구원 : 조혜선

연구원 : 이상숙

연구원 : 윤경미

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자(1): 황인환

협동연구책임자(2): 윤대진

요 약 문

1. 제목

Water stress 관련 신호전달체계 연구를 통한 가뭄내성 식물체 개발

2. 연구개발의 목적 및 필요성

고작 생활을 하는 식물은 외부환경의 변화를 늘 감지하여 그에 대해서 적절한 반응을 하면서 살아가게 된다. 여러 가지 다양한 외부 환경 중에서 식물체에 대단히 커다란 영향을 미치는 외부 요인 중의 하나가 가뭄 현상이다. 가뭄현상은 식물체에 water stress를 초래하게 되는데 water stress는 가뭄 뿐 만 아니라 높은 염도나 낮은 온도 등에 의하여 초래되기도 한다. water stress (또는 water deficit)은 식물의 성장, 발육, 그리고 수확에 이르기까지 여러 방면에 대단히 크게 영향을 미치며 water deficit이 심할 경우에는 식물세포에 심각한 손상을 초래하게 되며 식물체의 죽음에까지 이를 수가 있으므로, 특히 농업적인 관점에서 대단히 중요한 연구대상의 하나였다. water deficit으로부터 세포가 손상되는 것을 막는 것에 대하여 많은 연구가 되어져 왔는데 주로 생리적

인 변화나 생화학적인 변화가 주된 연구 대상 이었다. 반면 어떤 기작을 통해 식물체가 water deficit을 인식하고 그 스트레스에 대응하여 다양한 세포 내 변화를 유도하여 water deficit으로부터 세포가 손상되는 것을 막는지에 대하여 현재 잘 알려져 있지 않다. 본 연구과제에서는 식물의 water stress관련 새로운 신호전달 유전자를 분리하고 그 기능을 탐구 하므로써 식물세포의 osmotic stress 신호전달과정에 관하여 연구하였다

3. 연구개발의 내용 및 범위

(1) 연구범위

가. 식물의 water stress 신호전달 기작의 이해

나. water stress 신호전달 component의 조작을 통한 가뭄내성 식물체 개발

(2) 연구내용

가. water stress관련 유전자군의 탐색과 단백질 분석

water stress에 전사가 유도되는 유전자의 screening과 yeast의 osmotic stress mutant에 complementation 할 수 있는 식물유전자의 screening을 수행하여 *NtCDPK1* (calcium-dependent protein kinase), *NtTMK1* (receptor-like kinase), *AtGSK1* (glycogen synthase kinase-like protein kinase), *AtCP1* (calcium-binding protein), *AtSIZ1* (zinc finger transcription factor) 유전자들을 cloning하였다. 그 후 이 유전자들과 encode되는 각각의 단백질의 성질을 분자생물학적, 생화학적으로 분석하였다. 이들 단백질들의 세포내 위치는 GFP tagging 및 immunocytochemistry를 이용하여 분석하였다.

나. water stress관련 단백질들의 세포내 기능조사 및 가뭄내성 식물체 개발

위에서 클로닝된 단백질들의 water stress에 관한 기능을 조사하기 위하여 antisense, sense transgenic plants를 제조하였고 T-DNA tagging mutant를 screening하였다. 그 결과 *NtCDPK1*의 과대발현 형질전환체와 *AtGSK1*의 T-DNA tagging mutant는 고염도배지에서 엽록체발생과 뿌리발달 등 전반적인 식물체 성장에서 control보다 높은 내성을 보였다. 특히 *AtGSK1*의 mutant는 water stress에 유도되는 여러 방어 유전자들이 염처

리시 control보다 매우 높게 발현되어 AtGSK1의 본래의 기능이 water stress 신호전달의 negative regulator 인 것을 제시한다. 현재 이러한 mutant의 염내성 기작을 연구하였다. 따라서 본 연구팀은 이 과제의 수행을 통하여 water stress관련 신호전달체계를 연구하였고 그 결과 얻은 water stress 신호전달 component를 조작하여 model 식물에서 가뭄내성이 증가된 NtCDPK1 과대발현 형질전환체와 AtGSK1 mutant 식물체를 제조하였다. 결국 이러한 유전자들을 조절하여 경제적 주요작물의 염내성과 가뭄내성을 증가시킬 수 있으리라고 생각된다.

3. 연구개발결과

과제 수행 결과로 6편의 발표된 논문과 2편의 manuscript를 제출함.

1) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein

Gyeong-Mee Yoon, Hye-Sun Cho, Hyun-Jung Ha, Jang Ryol Liu, and

Hyun-sook

Pai*

Plant Molecular Biology 39: 991-1001 (1999)

2) An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Abscisic acid.

Piao HL, Pih KT, Lim JH, Kang SG, Jin JB, Kim SH, Hwang I*
Plant Physiology 119:1527–1534 (1999)

3) Cloning and characterization of *NtTMK1* gene encoding a TMK-homologous receptor-like kinase in tobacco.

Hye Sun Cho and Hyun-sook Pai*
Molecules and Cells, 10: 317–324 (2000)

4) Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress.

Jang HJ, Pih KT, Kang SG, Lim JH, Jin JB, Piao HL, Hwang I*
Plant Mol Biol 37:839–847 (1998)

5) Expression patterns of the NPP1 protein phosphatase gene and biochemical activity of its encoded protein.

Gyeong Mee Yoon, Sang Sook Lee, and Hyun-sook Pai*
Journal of Plant Biology 42: 247–251 (1999)

6) Structure and function of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase in tobacco.

Gyeong Mee Yoon, Sang Sook Lee, and Hyun-sook Pai*

Journal of Plant Biotechnology 2: 79–82 (2000)

7) constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis.

Piao Hai Lan, Soo Jin Kim, Young A Kim, Gang-Won Cheong, Inhwan Hwang

Manuscript submitted.

8) Expression of an ER-localized and osmotic stress-inducible b-glucosidase homolog enhances resistance to NaCl stress in transgenic plants

Piao Hai Lan, Jeong Hwa Lim, Kyeong Tae Pih, Gang-Won Cheong, Inhwan Hwang

Manuscript submitted.

4. 연구개발결과의 활용계획

1) 이 과제 수행을 통하여 water stress 신호전달 관련 유전자를 분리하여 단백질의 특성을 탐구하고 water stress 신호전달체계의 분자적 기작을 조사하였다. 이 연구 결과는 osmotic stress 신호전달 component를 동정하고 신호전달의 flow를 이해하는데 중요한 결과이며 이 결과를 바탕으로 osmotic stress 신호전달 component간의 상호조절작용과 신호전달체계의 network를 탐구하는데 활용한다

2) 새롭게 분리된 water stress 신호전달 조절유전자를 조작하여 model 식물에서 가뭄내성이 증가된 NtCDPK1 과대발현 형질전환체와 AtGSK1 mutant 식물체를 제조하였다. 이러한 유전자들의 활성을 유전공학적으로 조절하여 경제적 주요작물에 도입 함으로서 염내성과 가뭄내성이 증가된 작물을 개발한다.

SUMMARY

1. Title

Study of water stress-related signaling mechanism and development of drought-resistant plants

2. Purposes and necessities of the research project

Water stresses cause hyperosmotic stress, imbalance in the cellular ion concentration, and general toxicity that adversely affects plant development. Water stresses including drought and high salinity cause significant loss of agricultural productivity throughout the world. Thus extensive efforts have been put to increase drought- and high salinity-resistance in major crops through breeding and genetic engineering. Numerous studies have been conducted to delineate the cellular changes that occur upon exposure to osmotic stress. It has been noted that different plant

species employ a variety of different mechanisms to cope with osmotic stress. Though responses are well understood with regard to physiological and metabolic changes, the mechanisms of osmotic stress signaling in plants are less well understood. The purpose of our study was to investigate molecular mechanisms of osmotic stress signaling by isolating new signaling components and probing their functions in the signaling pathway in *Arabidopsis* and tobacco. The second purpose of this study was to develop genetically engineered plants with increased resistance to water stress by genetically manipulating newly identified signaling components.

3. Contents and boundary of the research project

1) Identification and molecular characterization of water stress-related genes and proteins

We screened cDNA fragments of which expression is stimulated by salt stress or which complement yeast osmotic stress mutants. As a result, *NtCDPK1* (calcium-dependent protein kinase), *NtTMK1*

(receptor-like kinase), *AtGSK1* (glycogen synthase kinase-like protein kinase), *AtCP1* (calcium-binding protein), *AtSIZ1* (zinc finger transcription factor), *AtBG1* (β-glucosidase) gene were cloned. Their protein products were biochemically characterized, and their subcellular localization was investigated.

2) Investigation of gene functions related with water stress and development of drought-resistant plants

To probe gene functions related with water stress, antisense and sense transgenic plants that express a variety of newly cloned genes were generated, and T-DNA tagging mutants were screened. NtCDPK1-overexpressing transgenic plants and the T-DNA tagging mutant of *AtGSK1* showed higher resistance to high salt in chlorophyll maintenance and root development when compared to the wild type. Especially, in the *AtGSK1* mutant, many salt stress-inducible defense genes were highly induced upon salt treatment, suggesting that *AtGSK1* is a negative regulator in osmotic stress signaling pathway. Thus by genetically manipulating

NtCDPK1 and AtGSK1 genes in plant cells, water stress resistance could be enhanced in plants.

4. Results of the research project

As results of this research project, six published articles and two manuscripts are attached behind. The list of the articles and manuscripts is as follows.

1) Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein

Gyeong-Mee Yoon, Hye-Sun Cho, Hyun-Jung Ha, Jang Ryol Liu, and Hyun-sook Pai*

Plant Molecular Biology 39: 991-1001 (1999)

2) An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Abscisic acid.

Piao HL, Pih KT, Lim JH, Kang SG, Jin JB, Kim SH, Hwang I*

Plant Physiology 119:1527-1534 (1999)

3) Cloning and characterization of *NtTMK1* gene encoding a TMK-homologous receptor-like kinase in tobacco.

Hye Sun Cho and Hyun-sook Pai*

Molecules and Cells, 10: 317-324 (2000)

4) Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress.

Jang HJ, Pih KT, Kang SG, Lim JH, Jin JB, Piao HL, Hwang I*

Plant Mol Biol 37:839-847 (1998)

5) Expression patterns of the NPP1 protein phosphatase gene and biochemical activity of its encoded protein.

Gyeong Mee Yoon, Sang Sook Lee, and Hyun-sook Pai*

Journal of Plant Biology 42: 247-251 (1999)

6) Structure and function of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase in tobacco.

Gyeong Mee Yoon, Sang Sook Lee, and Hyun-sook Pai*

Journal of Plant Biotechnology 2: 79-82 (2000)

7) constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis.

Piao Hai Lan, Soo Jin Kim, Young A Kim, Gang-Won Cheong, Inhwan Hwang

Manuscript submitted.

8) Expression of an ER-localized and osmotic stress-inducible β -glucosidase homolog enhances resistance to NaCl stress in transgenic plants

Piao Hai Lan, Jeong Hwa Lim, Kyeong Tae Pih, Gang-Won Cheong, Inhwan Hwang

Manuscript submitted.

5. Application of the results from the research project

1) The genes encoding novel signaling components were isolated by screening water stress-inducible genes and genes that complement yeast osmotic stress mutants. Those genes and their encoded

proteins were characterized, and their functions in water stress signaling pathway were examined using antisense and sense transgenic plants as well as T-DNA tagging mutants in Arabidopsis. The results provided important information on signaling components involved in water stress and the action mechanism of the individual component in the signaling pathway. Based on these results, further investigation in water stress signal transduction will be carried out to identify other signaling components that interact with the components previously identified and to determine the hierarchy of various components in the signaling network.

2) This study revealed that AtGSK1 and NtCDPK1 genes are useful to enhance plants' resistance to water stress. NtCDPK1 overexpressing transgenic plants and AtGSK1 T-DNA tagging mutants showed increased resistance to high salt and drought. By introducing these genes into crop plants after genetic manipulation, drought and high salinity-resistant crops may be developed.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. State of art

Chapter 3. The contents and results of the research

Section 1. Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein

Section 2. An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Abscisic acid.

Section 3. Cloning and characterization of *NtTMK1* gene encoding a TMK-homologous receptor-like kinase in tobacco

Section 4. Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress.

Section 5. Expression patterns of the NPP1 protein phosphatase gene

and biochemical activity of its encoded protein.

Section 6. Structure and function of NtCDPK1, a calcium–dependent protein kinase in tobacco.

Section 7. constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis.

Section 8. Expression of an ER–localized and osmotic stress–inducible b–glucosidase homolog enhances resistance to NaCl stress in transgenic plants

Chapter 4. Objectives of R&D and contribution to plant biotechnology

Chapter 5. Application

Chapter 6. References

목 차

제 1장 서론

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein

제 2절 An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Abscisic acid.

제 3절 Cloning and characterization of *NtTMK1* gene encoding a TMK-homologous receptor-like kinase in tobacco

제 4절 Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress.

제 5절 Expression patterns of the NPP1 protein phosphatase gene

and biochemical activity of its encoded protein.

제 6절 Structure and function of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase in tobacco.

제 7절 constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis.

제 8절 Expression of an ER-localized and osmotic stress-inducible b-glucosidase homolog enhances resistance to NaCl stress in transgenic plants

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서론

고작 생활을 하는 식물은 외부환경의 변화를 늘 감지하여 그에 대해서 적절한 반응을 하면서 살아가게 된다. 여러 가지 다양한 외부 환경 중에서 식물체에 대단히 커다란 영향을 미치는 외부 요인 중의 하나가 가뭄 현상이다. 가뭄현상은 식물체에 water stress를 초래하게 되는데 water stress는 가뭄 뿐 만 아니라 높은 염도나 낮은 온도 등에 의하여 초래되기도 한다. water stress는 이미 수 십년 동안 꾸준히 연구되어온 식물체에 있어서 대단히 중요한 연구 주제 중의 하나였다. water stress (또는 water deficit)은 식물의 성장, 발육, 그리고 수확에 이르기까지 여러 방면에 대단히 크게 영향을 미치며 water deficit이 심할 경우에는 식물세포에 심각한 손상을 초래하게 되며 식물체의 죽음에까지 이를 수가 있으므로, 특히 농업적인 관점에서 대단히 중요한 연구대상의 하나였다. 어떻게 water deficit을 식물체가 인식하고, 식물체 내에 그것에 대응하여 다양한 변화를 일으키므로서 water deficit으로부터 세포가 손상되는 것을 막는 것에 대하여 많은 연구가 되어져 왔는데 주로 생리적인 변화나 생화학적인 변화가 주된 연구 대상 이었다. 따라서 식물체에 water deficit이 왔을 때에 식물체에 일어나는 생리적인 변화나 생화학

적인 변화에 대해서는 대체로 잘 알려져 있다.

지금까지의 연구 결과에 의하면 식물들은 식물의 종류에 따라서 다른 다양한 반응을 보이는 것으로 알려져 있다. 식물체의 water stress에 대한 반응은 대체로 크게 나누면 세가지로 나눌 수가 있는데 그 중에 첫번째는 drought escape mechanism이고, 두 번째는 drought tolerance at high tissue water potential 방법이고, 세 번째 것이 drought tolerance at low water potential 방법이다. 또한 같은 식물이라고 할 지라도 water deficit의 정도나, 기간, 식물의 발육의 정도, 환경적인 요인 등에 따라서 다른 반응을 나타내는 것으로 알려져 있는데, water deficit이 심하지 않을 때에는 단순히 기공을 닫아 수분의 증발을 막고 광합성 반응을 중지 하거나 식물의 성장 및 분화 등을 중단 하게 되며 점점 water deficit의 정도가 심해짐에 따라 osmotic pressure를 조절하기 위해 osmotin이라는 단백질, proline과 같은 아미노산, osmolyte, sugar등과 같은 여러 가지 물질을 만들어 water deficit에 의한 식물세포의 손상을 막는 것으로 알려져 있다. 그리고 위에서 열거한 여러 가지 water deficit에 대한 방어적인 반응들 뿐만 아니라 water deficit을 해소하기 위한 능동적인 반응이 있는데 그 대표적인 것 중의 하나가 water uptake를 증가 시키기 위하여 뿌리의 root hair를 많이 만들거나 뿌리의 길이를 길게 하여 뿌리의 표면적을 넓게 하는 반응이다.

위에서 열거한 여러 가지 연구들을 밑바탕으로 하여 식물체에 water deficit (water stress 또 osmotic stress)가 왔을 때에 그에 대하여 (식물 세포의 손상을 방지하기 위하여) 일어 나는 여러 가지 생리학적, 생화학적, 발생학적 반응에 대하여 많은 연구가 되어져 왔는데 그 대표적인 것 중의 하나가 water deficit이 식물 세포에 가해지면 세포 내에 abscisic acid (ABA) 의 양이 대단히 많이 증가 된다는 것이다. 따라서 ABA가 drought response에 관여하는 secondary messenger 역할을 할 것으로 추측되어지며 이에 대한 많은 연구가 되어져 왔다. 이러한 추측을 바탕으로 ABA의 binding protein 또는 receptor molecule을 찾고자 하는 노력이 있어 왔으며 몇몇 ABA binding 단백질들이 보고되어 졌지만 이들이 ABA signal을 전달하는데 어떠한 역할을 하는지 아직 잘 알려져 있지 않고, ABA의 생성과정 및 식물체 내에서의 이동, 세포 내에서의 분포 상황 등도 확실하지 않다.

1980년대 후반에 들면서 water stress에 대한 식물체의 반응을 분자 수준에서 연구를 하려고 하는 새로운 경향이 나타났다. water stress에 대한 이 새로운 연구 방향의 밑바탕에 깔려있는 중심 생각은 많은 생리학적, 생화학적, 발생학적 반응들이 유전자 발현을 통해서 이루어질 것이라는 것이다. 이러한 생각은 유전학적인 방법으로 여러 가지 식물들에서 water stress에 대단히 민감한 돌연변이종들을 만들어 냄으로서 확실한

지지를 받게 되었다. 잘 알려진 예로는 maize의 *viviparous mutant*와 *Arabidopsis*의 *abi mutant*들이 있다. 따라서 water deficit에 의해서 식물체 내에 새로이 만들어지거나 만들어지는 양이 증가 되는 단백질이나 유전자들을 찾고자 하는 노력이 여러 방면에서 있어 왔다. 그러한 방법들 중의 하나가 two dimensional PAGE를 이용하는 방법인데 drought stress가 식물체에 주어졌을 때 two dimensional PAGE상에서 drought condition에 의해서 새로이 나타나거나 발현이 증진된 단백질들을 볼 수가 있다. 또 하나의 방법은 differential screening을 통해서 drought condition에서 발현이 증진된 유전자를 찾는 방법이다. 이 방법을 통하여 여러 가지 유전자들이 cloning 되어졌으며 그들이 coding하는 단백질의 일차적인 구조가 DNA sequencing을 통하여 유추되어졌다. 그러나 그렇게 찾아진 유전자들의 생물학적인 활성이나 생물학적인 기능에 대해서는 아직 이렇다 하게 진전이 없다. 또한 그렇게 발현이 증진되어진 유전자들이 모두 식물의 drought resistance나 drought tolerance를 증진 시키는데 필요한 단백질들인지에 대해서는 확실하지 않다.

drought condition에 의해서 발현이 증진된 여러 가지 유전자들을 크게 세가지 유형으로 분류할 수가 있는데, 첫번째 그룹은 식물체를 drought 으로부터 보호하고 water stress에 식물세포가 적응하는데 필요한 단백질을 coding하는 유전자들이며 두 번째 그룹은 drought condition에 식

물 세포들이 손상을 입어서 발현이 증진된 것 들이며, 세 번째 그룹은 유전자의 발현이 증진되기는 하지만 drought resistance나 drought tolerance에 직접적인 관련이 없이 간접적인 이유로 발현이 증진된 것 들이다. 첫번째에 속하는 유전자들 중에서도 기능에 따라서 이들을 다시 몇 개의 세부 그룹으로 나눌 수 있다. 어떤 유전자들은 수분의 손실에 대해서 세포내의 구조를 보호하는데 필요로 하는 단백질을 coding 하는 것들로, 대표적인 것으로 seed maturation에 있어서 desiccation process 동안에 발현이 증진되어지는 LEA protein을 coding하는 lea 유전자들을 들 수 있겠다. 이러한 lea 유전자들은 발현이 발생학적인 조절을 받고 있으며 water deficit에 의해서 많은 식물들에서 발현이 증진되어 진다는 것이 알려져 있다. 어떤 세부 그룹은 삼투압을 조절하는데 필요로 하는 polyamine, sugar alcohol과 같은 osmoprotectant나, glycine-betaine, proline과 같은 osmolyte들을 만드는데 필요한 단백질을 coding하는 것들, 삼투압 조절에 필요로 하는 channel protein (water pump) 또는 H⁺-ATPase등을 coding하는 유전자들로 생각되어진다. 또 다른 하나의 세부 그룹은 water stress를 인식하여 이를 유전자 발현에 전달하는 신호전달 체계에 관여하는 단백질들을 coding하는 유전자들로 생각되어진다. 위에서 언급한 것과 같이 drought condition에 의해서 발현이 증진 되어지는 유전자들이 거의 모든 농작물이나 실험대상 식물

에서 알려져 있지만 아직 식물세포가 정확하게 어떻게 water stress를 인식하고 그 신호가 어떤 경로를 통하여 drought responsive한 유전자들의 발현을 증진시키거나 하는 유전자 발현의 조절작용에 관여 하는지에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 단지 대단히 복잡하고 아마도 여러 가지 여러 신호전달 체계를 통하여 이루어 질것이라는 것이 현재의 가장 주된 생각이다.

이러한 drought 신호전달에 관여 할 것이라고 생각되어지는 물질중의 하나가 위에서 언급한 ABA이다. 식물체 내에 ABA의 농도가 drought condition에서 크게 증가되어 지는 것은 잘 알려져 있다. 또한 drought에 의하여 발현이 증진되어지는 유전자들이 외부에서 더해진 ABA에 의하여 발현이 증진되어 질 뿐만 아니라 식물의 다른 여러 가지 drought response를 유도할 수 있다는 것이다. drought 신호전달에 관여된 mechanism을 연구하기 위한 하나의 방법으로 어떻게 ABA가 유전자 발현에 관여 하는지에 대하여 연구가 있어 왔다. ABA에 의해서 발현이 증진되어지는 여러가지 유전자들 (Em, rab16, rab17, rab18, 등)이 cloning 되어졌으며 이들 유전자의 promoter에서 ABA에 의해서 유전자의 발현이 조절되어지는 것을 매개하는 cis-element가 ABRE라는 것이 밝혀졌으며 이 ABRE binding하는 transcription factor인 EmBP-1가 밀로부터 cloning 되어졌다. 그렇지만 drought signal transduction pathway가 그

렇게 간단하지는 않은 것처럼 보인다. 어떤 유전자들은 drought에 의해서 발현이 증진되지만 ABA에 의해서 induction이 되지 않고, ABA에 의해서 발현이 증진되지만 ABRE를 가지고 있지 않는 것도 알려져 있다. 따라서 여러 가지 cis-element들이 있으며 이에 따라서 다양한 transcription factor들이 있을 것으로 생각되어진다. 또한 ABA 뿐만 아니라 cytokinin이나 GA 같은 다른 식물 hormone도 식물의 drought response에 관련이 있을 것으로 생각되는 실험 결과들이 계속 발표되고 있다.

이러한 많은 연구에도 불구하고 여전히 신호전달 과정에 대하여 거의 이해되지 않고 있다. 본 연구과제에서는 식물체에 있어서 osmotic stress가 식물의 생식작용, 특히 개화 및 수분, 그리고 embryo 발육과정에 미치는 영향을 생리학적, 분자생물학적으로 연구하고, 또한 이들 신호가 궁극적으로 세포 내로 전달되어 세포의 생리변화나 대사의 변화, 또는 유전자의 발현의 변화를 유도하는 식물세포의 osmotic stress 신호전달 과정에 관하여 연구하였다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

1) 국외의 연구개발 실적

가) 식물의 water stress (dehydration stress) 신호전달 체계에 대한 연구

가뭄이나 높은 염도에 의한 water stress는 이미 수 십년 동안 꾸준히 연구되어온 식물에 있어서 대단히 중요한 연구주제 중의 하나였다. Water stress (또는 water deficit)은 식물의 성장, 발육, 그리고 수확에 이르기까지 여러 방면에 대단히 크게 영향을 미치며 water deficit이 심할 경우에는 식물세포에 심각한 손상을 초래하게 되며 식물체의 죽음에까지 이를 수가 있으므로, 특히 농업적인 관점에서 대단히 중요한 연구 대상의 하나였다.

물부족에 의한 dehydration stress를 식물체가 어떻게 인식하고, 식물체 내에 이에 대응하여 다양한 변화를 일으켜 water deficit으로부터 세포가 손상되는 것을 막는 것에 대하여 많은 연구가 되어져 왔는데, 주로 생리적인 변화나 생화학적인 변화가 주된 연구 대상 이었다. 따라서 식

물체에 water deficit이 왔을 때에 식물체에 일어나는 생리적인 변화나 생화학적인 변화에 대해서는 대체로 잘 알려져 있다. 지금까지의 연구 결과에 의하면 식물들은 종류에 따라서 다양한 반응을 보이는 것으로 알려져 있는데 대체로 크게 나누면 세가지로 나눌 수 있겠다.

첫번째는 drought escape mechanism이고, 두 번째는 drought tolerance at high tissue water potential 방법이고, 세 번째 것이 drought tolerance at low water potential 방법이다. 또한 같은 식물이라도 water deficit의 정도나 기간, 식물의 발육의 정도, 환경적인 요인 등에 따라서 다른 반응을 나타내는 것으로 알려져 있다. Water deficit이 심하지 않을 때에는 단순히 기공을 닫아 수분의 증발을 막고 광합성 반응을 중지 하거나 식물의 성장 및 분화 등을 중단 하게 되며, 점점 water deficit의 정도가 심해짐에 따라 삼투압을 조절하기 위하여 osmotin과 같은 단백질을, proline과 같은 아미노산, osmolyte, sugar, 등과 같은 화학물질을 만들어 water deficit에 의한 식물세포의 손상을 막는 것으로 알려져 있다. 그리고 위에서 열거한 여러 가지 water deficit에 대한 방어적인 반응들 뿐 만 아니라 water deficit을 해소하기 위한 능동적인 반응이 있는데 그 대표적인 것 중의 하나가 water uptake를 증가 시키기 위하여 뿌리의 root hair를 많이 만들거나 뿌리의 길이를 길게 하여 뿌리의 표면적을 넓게 하는 반응이다.

1980년대 후반에 들면서 dehydration stress(water deficit)에 대한 식물체의 반응을 분자 수준에서 이해하고자 하는 새로운 경향이 나타났다. Water stress(dehydration stress)에 대한 이 새로운 연구 방향의 밑바탕에 깔려있는 중심 생각은 많은 physiological, biochemical, 그리고 developmental response 들이 gene expression을 통해서 이루어질 것이라는 것이다. 이러한 생각은 유전학적인 방법으로 여러 가지 식물들에서 water stress에 대하여 대단히 민감한 mutant들을 만들어 냄으로서 확실한 지지를 받게 되었다. 잘 알려진 예로는 maize의 *viviparous* mutant와 *Arabidopsis*의 *abi* mutant들이 있다. 따라서 water deficit에 의해서 식물체내에 새로이 만들어지거나 만들어지는 양이 증가 되어지는 단백질의 유전자들을 찾고자 하는 노력이 여러 방면에서 있어 왔다.

그러한 방법들 중의 하나가 two dimensional PAGE를 이용하는 방법인데 dehydration stress가 식물체에 주어졌을 때 two dimensional PAGE상에서 drought condition에 의해서 새로이 나타나거나 발현이 증진되어진 단백질들을 볼 수가 있다. 또 하나의 방법은 differential screening을 통해서 dehydration condition에서 발현이 증진되어진 유전자를 찾는 방법이다. 이 방법을 통하여 여러 가지 유전자들이 cloning 되어졌으며 그들이 coding하는 단백질의 일차적인 구조가 DNA sequencing을 통하여 유추되어졌다.

Dehydration stress condition에 의해서 발현이 증진되어진 여러 가지 유전자들을 크게 세가지 유형으로 분류할 수가 있는데, 첫번째 group은 식물체를 water deficit (osmotic stress)으로부터 보호하고 water stress에 식물세포가 적응하는데 필요한 단백질을 coding하는 유전자들이며 두 번째 group은 dehydration condition에 식물 세포들이 손상을 입어서 발현이 증진된 것 들이며, 세 번째 group은 유전자의 발현이 증진되기는 하지만 dehydration resistance나 dehydration tolerance에 직접적인 관련이 없이 간접적인 이유로 발현이 증진되어진 것들이다.

첫번째에 속하는 유전자들 중에서도 기능에 따라서 이들을 다시 몇 개의 세부 그룹으로 나눌 수 있다. 어떤 유전자들은 수분 손실에 대해서 세포내의 구조를 보호하는데 필요로 하는 단백질을 coding 하는 것들로 대표적인 것으로 seed maturation에 있어서 desiccation process 동안에 발현이 증진되어지는 LEA protein을 coding하는 lea 유전자들을 들 수 있겠다. 이러한 lea 유전자들은 발현이 발생학적으로 조절을 받고 있으며 water deficit에 의해서 많은 식물들에서 발현이 증진되어 진다는 것이 알려져 있다. 어떤 세부 그룹은 삼투압을 조절하는데 필요로 하는 polyamine, sugar alcohol과 같은 osmoprotectant나, glycine-betaine, proline과 같은 osmolyte들을 만드는데 필요한 단백질을 coding하는 것 들, 삼투압 조절에 필요로 하는 channel protein (water pump) 또는

H⁺-ATPase등을 coding하는 유전자들로 생각되어진다. 또 다른 하나의 세부 그룹은 water stress를 인식하여 이를 유전자 발현에 전달하는 신호 전달 체계에 관여하는 단백질들을 coding하는 유전자들로 생각되어진다. 이러한 dehydration signal transduction에 관여 할 것이라고 생각되어지는 물질들 중의 하나가 위에서 언급한 ABA이다. 식물체 내에 ABA의 농도가 dehydration condition에서 크게 증가되어지는 것은 잘 알려져 있다. 또한 dehydration stress에 의하여 발현이 증진되어지는 유전자들이 외부에서 더해진 ABA에 의하여 발현이 증진되어질 뿐 만 아니라 식물의 다른 여러 가지 dehydration response를 유도할 수 있다는 것이다. Dehydration signal transduction에 관여되어지는 mechanism을 연구하기 위한 하나의 방법으로 어떻게 ABA가 gene expression에 관여 하는지에 대한 연구 결과가 보고되었다.

ABA에 의해서 발현이 증진되어지는 여러 가지 유전자들 (Em, rab16, rab17, rab18, 등)이 cloning되어졌으며 이들 유전자의 promoter에서 ABA에 의해서 유전자의 발현이 조절되는 것을 매개하는 cis-element가 ABRE라는 것이 밝혀졌으며 이 ABRE에 binding하는 transcription factor인 EmBP-1가 밀로부터 cloning 되었다. 그렇지만 dehydration signal transduction pathway가 그렇게 간단하지는 않다. 어떤 gene들은 dehydration에 의해서 발현이 증진되지만 ABA에 의해서 induction이 되

지 않고, ABA에 의해서 발현이 증진되지만 ABRE를 가지고 있지 않는 것도 알려져 있다. 따라서 여러 가지 cis-element들이 있으며 이에 따라서 다양한 transcription factor들이 있을 것으로 생각되어진다. 또한 ABA 뿐 만 아니라 cytokinin이나 GA 같은 다른 식물 hormone도 식물의 dehydration response에 관련이 있을 것으로 생각되어지는 실험 결과들이 계속 발표되고 있다 .

이들 신호전달을 위한 신호 물질들에 대한 연구 외에도 신호전달 과정에 관여할 것으로 예측되어지는 단백질들에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다. 이들 중에 대표적인 것 중의 하나가 단백질의 인산화 과정에 관여하는 protein kinase에 대한 연구이다. 대표적인 것으로는 밑에서 발견되어진 protein kinase의 일종인 PKABA1과 Arabidopsis에서 cloning되어진 ARSK1과 Ca^{2+} -dependent protein kinase의 homolog들이 있다. 이 중에서 Ca^{2+} -dependent protein kinase의 homolog는 특히 흥미로운 kinase의 일종이다. 이는 식물세포에서 가뭄에 의한 dehydration stress가 plasma membrane의 membrane potential의 변화를 유도하고 이 membrane potential의 변화가 Ca^{2+} 의 농도의 변화를 초래할 것이라는 가설 때문이다. 이 가설이 확실한 지지를 받기 위하여서는 좀더 실험적인 연구가 요구된다.

나) 내염성 형질전환 식물체의 개발연구

아직 외국의 경우에도 전반적으로 이 분야에 대한 연구는 개념의 정립단계에 머무르고 있다. 하지만 이 분야의 연구의 중요성을 인식하고 활발한 연구를 수행하고 있다. 이러한 연구의 중심에는 외부의 유전자를 도입하여 이들 유전자를 overexpression 시키므로써 이들 overexpression 되어진 단백질들이 식물세포에서 osmoprotectant를 많이 만들어 가뭄이나 높은 염도에 의하여 초래되어지는 dehydration stress에 대하여 내성을 가지도록 하는 시도이다. 이들 연구는 제한적인 성공을 거두고 있는 것으로 보고되어지고 있다. 가장 중심에 있는 대상 중의 하나는 osmoprotectant의 일종인 betaine 계통의 물질을 생합성하는 단백질의 유전자를 식물체에 overexpression 시켜서 betaine의 농도를 높임으로써 가뭄내성 또는 내염성 식물체를 만들고자 하는 시도이다.

다) water stress가 식물 생식과정에 미치는 영향 연구

여러 생리학적 연구를 통해 토양 내 존재하는 water level이 꽃발생, 수분작용, male-sterility, 배발생 등의 식물 생식에 큰 영향을 미친다는 것이 보고되었다. 그러나 최근까지도 어떻게 water deficit의 신호가 꽃에 전달되어 생식작용에 영향을 주는지 등 분자생물학적인 연구는 많이

되어 있지 않다.

cereal에서 어느 기간동안 water deficit이 계속되면 meristem에서 spikelet이 생성되는 것과 이미 생성된 spikelet이 분화하는 것이 모두 영향을 받는다. 특히 apical meristem은 가뭄에 매우 민감하여 water stress에 의해 그 활성이 완전히 중지되는 경우도 있다. 이미 존재하는 meristem은 주로 적게 영향 받는다. water stress는 보리의 spikelet 원기의 꽃기관 발생 속도를 더디게 하며 stress를 없앨 경우 spikelet이 빠르게 생성하게 된다. 옥수수에서는 tassel이 생성될 때 water stress가 오면 tassel이 작아지고 성장도 더디게 된다. 또한 lateral branch의 spikelet에 불임이 높은 확률로 일어난다. 보리와 밀에서는 Male gametogenesis가 특히 영향을 받는다. 밀에서 premeiotic stage, meiotic stage, 그리고 meiosis직후에 water stress를 받으면 화분이 정상적으로 발생하지 못하고 융성불임이 일어난다고 보고되었다.

일반적으로 토양의 수분함량이 높을 때 femaleness가 촉진된다고 보고되었다. Moss와 Downey는 옥수수에서 발아한 후 59일간 물부족일 때 female inflorescence (cobs) 안에서도 male organ이 발생하는 것을 관찰하였다. 몇 열대성 식물에서는 화아의 dormancy에 토양의 수분함량이 영향을 미친다. 또한 담배등의 식물에서 개화기에 물이 부족할 때 개화시기가 단축되고 종자의 발생이 방해되는 등 water stress가 식물생식에

미치는 영향이 관찰되었다.

식물의 호르몬인 ABA는 노화, stress반응, 성장 저해등에 관여하는데 외부에서 ABA를 처리하면 종자의 발아가 억제된다. ABA를 합성하지 못하거나 ABA에 반응하지 않는 *Arabidopsis* mutant는 종자가 성숙되지 않았을 때 발아하는 성질을 보인다. *abi3* mutant의 배아는 미성숙 상태에서 발아하며 건조에 매우 약하고 저장단백질이나 *lea* 단백질 등 종자의 성숙기에 특이적으로 발현되는 mRNA를 합성 시키지 못하는 성질을 보인다. 그러므로 ABI3 유전자의 산물은 저장단백질의 축적, 종자의 건조, dormancy등을 조절하는 것 같다. ABI3 유전자의 산물은 transcription factor로 옥수수의 *viviparous-1* 유전자와 유사하다. *abi3* mutant와는 반대로 *abi1*와 *abi2* mutant의 배아는 저장단백질이나 *lea* 단백질의 합성 등 종자의 성숙과정이 정상적으로 일어난다. 그러므로 ABI1, ABI2 loci는 배아의 dormancy에만 특이적으로 관여하는 것 같다. ABI1유전자는 Ca^{++} -dependent phosphatase를 encode하는데 신호전달에 관여하는 serine/threonine phosphatase와 유사하다.

2) 국내 연구개발 실적

가) Water stress에 대한 식물체의 신호전달체계 및 신호전달 물질

이미 앞에서 기술한 바와 같이 선진 외국에서는 이미 수 십년 동안 식물의 가뭄에 대한 반응에 관하여 많은 연구가 되어져 왔다. 특히 가뭄에 의해 농작물의 생산성이 크게 영향을 받으므로써 이 분야 연구의 중요성은 일찌기 인식되어져 왔다. 1980년대 들어서 전반적으로 생명과학 분야에 있어서 분자생물학적인 방법이 크게 발전함에 따라 1980년대 후반부터 식물 연구에 분자생물학적인 방법들이 도입되어지기 시작하였다. 따라서 식물의 가뭄에 대한 반응과 적응 기작을 연구 하는데 이러한 분자생물학적인 방법들을 이용하여 molecular level에서 연구가 되어지기 시작하였다. 하지만 국내의 이 분야에 대한 연구는 일천하다 하겠다. 아직 체계적으로 이 분야에서 연구를 수행하는 연구팀들이 많지 않으며 연구 결과의 국제학술회지나 국내전문학술회지에 발표 또한 많지 않은 상태이다.

나) 앞으로의 전망

이미 앞에서 기술한 바와 같이 이미 수 십년 동안 식물의 dehydration response에 대한 많은 연구가 되어져 왔다. 특히 가뭄에 의해 농작물의 생산성이 크게 영향을 받으므로써 이 분야 연구의 중요성은 일찌기 인식

되어져 왔다. 1980년대 들어서 전반적으로 생명과학 분야에 있어서 분자 생물학적인 방법이 크게 발전함에 따라 1980년대 후반부터 식물 연구에 분자생물학적인 방법들이 도입되어지기 시작하였다. 따라서 식물의 dehydration response를 연구하는데 있어서 이러한 분자생물학적인 방법들을 이용하여 molecular level에서 연구가 계속되어질 것이다. 분자생물학자들의 기본생각은 dehydration response가 gene expression을 통한 새로운 유전자들의 발현에 의하여 biochemical 및 physiological response를 세포 내에 일어나게 할 것 이라는 것이다. 따라서 여러 가지 식물 system에서 dehydration에 의해서 발현이 증진되어지는 유전자들을 cloning하여 그들의 특성을 연구하고 이들이 식물체의 dehydration stress에 어떠한 역할을 하고 있는지에 대하여 연구가 활발할 것으로 예측된다. 특히 다른 신호전달체계에서 보여준 바와 같이 식물체의 dehydration response에도 단백질의 인산화가 중요한 조절 기작으로 작용할 것으로 예측되어지고 있다. 본 연구팀 중에서 이미 이러한 단백질의 인산화에 관여할 것으로 생각되어지는 유전자를 cloning하였다. 따라서 이러한 부분에서 좀더 정확한 신호전달 체계에 대한 연구도 계속되어질 것으로 사료된다. 그리고 이러한 식물의 dehydration stress나 osmotic stress에 대한 적응 기작을 이해하고 이들에 관여된 여러 가지 유전자들이 이용 가능해지면 이들 이용하여 형질전환식물체를 개발하고

자 할 것으로 예측되어진다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 Characterization of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana tabacum*, and the activity of its encoded protein

제 2절 An Arabidopsis GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants is induced by NaCl and Abscisic acid.

제 3절 Cloning and characterization of *NtTMK1* gene encoding a TMK-homologous receptor-like kinase in tobacco

제 4절 Molecular cloning of a novel Ca²⁺-binding protein that is induced by NaCl stress.

제 5절 Expression patterns of the NPP1 protein phosphatase gene and biochemical activity of its encoded protein.

제 6절 Structure and function of NtCDPK1, a calcium-dependent protein kinase in tobacco.

제 7절 constitutive overexpression of AtGSK1 induces NaCl stress responses in the absence of NaCl stress and results in enhanced NaCl tolerance in Arabidopsis.

제 8절 Expression of an ER-localized and osmotic stress-inducible b-glucosidase homolog enhances resistance to NaCl stress in transgenic plants

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

(1) water stress 관련 신호전달 component의 분리 및 분자생물학적 생화학적 분석

본 연구팀은 팀은 water stress관련 신호전달 component를 screen하여 NtCDPK1 kinase, NtTMK1kinase, AtGSK1 kinase, AtCP1, AtBG1, AtSIK1, AtSIZ1등의 유전자들을 cloning하여 그 유전자와 단백질을 분자생물학적, 생화학적으로 분석하였다. 또한 위의 단백질의 기질 및 조절 단백질을 탐구하기 위해 yeast two hybrid system을 사용하여 NtCDPK1과 상호작용하는 두 종류의 단백질을 구했으며 그 상호작용의 특이성을 증명하였다. AtGSK1의 경우에는 yeast를 이용하여 연구를 계속하였고 이 결과로부터 AtGSK1의 식물세포 내에서의 특성을 추정하였다. 본 연구팀은 water stress시의 식물반응의 분자적 기작과 신호전달체계 연구목표를 100% 달성했다고 생각한다.

(2) 형질전환 식물체의 제조

본 연구팀은 분리한 신호전달 유전자를 식물체에 도입하여 내염 내가뭄성 형질전환 식물체를 제조하였다.

가. NtCDPK1 kinase의 water stress 관련 기능을 탐침하기 위하여 세종류의 형질전환 식물체 (antisense RNA 발현 식물체, 전체 NtCDPK1 cDNA 과대발현 식물체, kinase domain 과대발현 식물체)를 제조하여 transgene의 존재와 발현을 분석을 수행하였다. 그 중 전체 NtCDPK1 cDNA 과대발현 식물체의 T1 seedling이 high salt 배지에서 control보다 높은 성장을 보였다.

나. AtGSK1이 overexpression되는 Arabidopsis는 high NaCl condition에서 잘 자란다는 것을 밝혔다.

다. AtCP1의 경우에는 담배에 넣었을 때에 NaCl stress resistance를 나타내지 않았다. 또한 AtSIK에 T-DNA가 insertion된 mutant를 확보하여서 AtSIK의 특성을 연구할 수 있는 기틀을 마련하였다.

라. AtSIZ라는 새로운 water stress inducible 유전자를 cloning 하고 T-DNA insertion mutant 및 overexpression line을 구축하였다. 이들의 특성을 연구하여 이들 유전자를 overexpression하였을 때에 이들 유전자가 식물체에 water stress에 저항성을 나타내는지를 계속 연구할 수 있는 기틀을 구축하였다. 그러므로 식물반응의 분자적 기작과 신호전달 체계를 이용한 osmotic stress 내성을 가진 식물체 제조 연구 목표를

100% 달성했다고 생각한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. water stress (또는 water deficit)은 식물의 성장, 발육, 그리고 수확에 이르기까지 여러 방면에 대단히 크게 영향을 미치며 water deficit이 심할 경우에는 식물세포에 심각한 손상을 초래하게 되며 식물체의 죽음에까지 이를 수가 있으므로, 특히 농업적인 관점에서 대단히 중요한 환경 요인이라 하겠다. 본 연구는 어떻게 water deficit을 식물체가 인식하고, 식물체 내에 그것에 대응하여 다양한 변화를 일으키므로서 water deficit으로부터 세포가 손상되는 것을 막는 것에 대한 연구로서 이 과제 수행을 통하여 water stress 신호전달 관련 유전자를 분리하여 단백질의 특성을 탐구하고 water stress 신호전달체계의 분자적 기작을 조사하였다. 이 연구 결과는 water stress 신호전달 component를 동정하고 신호전달의 flow를 이해하는데 중요한 결과로서, water stress를 식물체가 인지하고 그 신호를 세포 내로 전달하는 기작에 관한 정보를 제공하고 있다. 이 결과를 바탕으로 water stress 신호전달 component간의 상호조절작용과 신호전달체계의 network를 구체적으로 탐구하는데 활용한다

나. 본 연구팀은 새롭게 분리된 water stress 신호전달 조절유전자를 조작하여 model 식물에서 가뭄내성이 증가된 NtCDPK1 과대발현 형질 전환체와 AtGSK1 mutant 식물체를 제조하였다. 이러한 유전자들의 활성을 유전공학적으로 조절하여 경제적 주요작물에 도입 함으로서 염내성과 가뭄내성이 증가된 작물을 개발한다.

제 6 장 참고문헌

1. Jones, M.M., Turner, N.C., and Osmond, C.B. (1981). Mechanisms of drought resistance. In *The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, LG Paleg and D. Aspinall, eds (New York, Academic Press), pp.15–37.
2. Blum, A. (1988). *Plant breeding for stress environments*. (Boca Raton, FL: Press).
3. Rhodes, D. (1987). Metabolic responses to stress. In *The Biochemistry of Plants: A comprehensive Treatise*. Vol. 12: *Physiology of Metabolism*. P.K. Stumpf et al., eds (New York: Academic Press), pp. 201–241.
4. Zeevaart, J.A.D., and Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 439–473.

5. Hsiao, T.C. (1973). Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 519–570.

6. Greenway, H., and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 149–190.

7. Bradford, K.J., and Hsiao, T.C. (1982). Physiological responses to moderate water stress. In *Physiological Plant Ecology*, O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, and H. Ziegler, eds (New York: Springer-Verlag), pp. 263–324.

8. Hanson, A.D., and Hitz, W.D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 163–203.

9. Niu, X. Zhu, J.-K., Narasimahan, M.L., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1993). Plasma-membrane H⁺-ATPase gene expression is regulated by NaCl in cells of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Planta* 190: 433–438.

10. Maurel, C. Reizer, J. Schroeder, J.I. and Chrespeels, M.J. (1993). The vacuolar membrane protein –TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. EMBO J. 12: 2241–2247.

11. Kononowicz, A.K., Raghothama, K.G., Casas, A.M., Reuveni, M., Watad, A.E.A., Liu, D., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1993). Osmotin: regulation of gene expression and function. In Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress, TJ Close and EA Bray, eds (American Society of Plant Physiology).

12. Nelson, D.E., Raghothama, K.G., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1992). Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. Plant Mol. Biol. 19: 577–588.

13. Singh, N.K., Nelson, D.E., Kuhn, D., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. (1989). Molecular cloning of osmotin and regulation of its expression by ABA and adaptation to low water potential. Plant Physiol. 90: 1096–1101.

14. Rajagopal, V. and Andersen, A.S. (1978). Does Abscisic acid influence proline accumulation in stress leaves? *Planta* 143: 85–88.
15. Aspinall, D. and Palag, L.G. (1981). Proline accumulation: physiological aspects. In *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants*, LG Paleg and D Aspinall, eds (Sydney, Academic Press), pp. 243–259.
16. Delauney, A. and Verma, D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215–223.
17. Kramer, P.J. (1983). *Water Relations of Plants*, (New York, Academic Press).
18. Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035–1040.
19. Sliver, K. and Mundy, J. (1990). Gene expression in response to

abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503–512.

20. Austin, R.B., Henson, I.E., and Quarrie, S.A. (1982). Abscisic acid and drought resistance in wheat, millet, and rice. In *Drought Resistance in Crops with Emphasis on Rice*, M.R. Vega, ed (Los Banos, The Philippines: International Rice Research Institute), pp. 171–180.

21. Henson, I.E. (1984). Effects of atmospheric humidity on abscisic acid accumulation and water status in leaves of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 54: 569–582.

22. Mohapatra, S.S., Poole, R.J., and Dhindsa, R.S. (1988). Abscisic acid-regulated gene expression in relation to freezing tolerance in alfalfa. *Plant Physiol.* 87: 468–473.

23. McCarty, D.R., Carson, C.B., Stinard, P.S., and Robertson, d.S. (1989). Molecular analysis of *viviparous-1*: An abscisic acid-insensitive mutant of maize. *Plant Cell* 1: 623–532.

24. Parry, A.D. (1993). Abscisic acid metabolism. *Methods Plant*

Biochem 9: 381–402.

25. Piatkowski, D. Schneider, K., Salamini, F., and Bartels, D. (1990). Characterization of five abscisic acid–responsive cDNA clones isolated from the desiccation–tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water stress genes. *Plant Physiol.* 94: 1682–1688.

26. Espelund, M., Saeboe–larssen, S., Hughes, D.W., Galau, G.A., Larsen, F., and Jakobsen, K.S. (1992). Late embryogenesis–abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially ab abscisic acid and osmotic stress. *Plant J.* 2: 241–252

27. Yamaguchi–Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1993). The plant hormone abscisic acid mediates the drought–induced expression but not the seed–specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 238: 17–25.

28. Gultinan, M.J. Marcotte, W.R. Jrr, and Quatrano, R.S. (1990).

A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267–271.

29. Pla, M., Vilardell, J., Gultinan, M.J., Marcotte, W.R., Niogret, M.F., Quatrano, R.S., and Pages, M. (1993). The cis-regulatory element CCACGTGG is involved in ABA and water-stress responses of the maize gene *rab28*. *Plant Mol. Biol.* 21: 259–266.

30. Guerrero F.D., Jones, J.T., Mullet, J.E. (1990). Tugar-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11–26.

31. Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S., and Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one cDNA clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33: 217–224.

32. Plant, A.L., Cohen, A., and Bray, E.A. (1991). Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and ABA-induced gene of tomato. *Plant Physiol.* 97: 900-906.
33. Michel, C., Salamini, F., Bartels, D., Dale, P., Baga, M., and Szalay, A. (1993). Analysis of a desiccation and ABA-responsive promoter from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.* 4: 29-40.
34. Hubick, K.T., Taylor, J.S., and Reid, D.M. (1986). The effect of drought on levels of abscisic acid, cytokinins, gibberellins and ethylene in aeroponically-grown sunflower plants. *Plant Growth Regulation* 4: 139-151.
35. Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I-Huan, and Davis, R. (1994). An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265, 806-808
36. Han, J., Lee, J.-D., Bibbs, L., and Ulevitch, R.J. (1994). A

map kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808–890.

37. Thomas, J.C., Smigocki, A.C., and Bohnert, H.J. (1995). Light-induced expression of *itp* from *Agrobacterium tumefaciens* results in cytokinin accumulation and osmotic stress symptoms in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 27, 225–235

38. Brewster, J.L., de Vajpor, T., Dwyer, N., Winter, E., and Gustin, M. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259, 1760–1763.

39. Glaser, H.-U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin-Kerjan, Y., and Serrano, R. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve in putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12, 3105–3110.

40. Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villabla, J.M., and Serrano, R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important

determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11, 3157–3164.

41. Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., harada, S.–I., Hirokawa, T., and Miyakawam T. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)–mediated FK506–sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 12, 4063–4071.

42. Anderberg, R.J., and Walker–Simmons, M.K. (1993). Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid–inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10183–10187.

43. Hwang, I. and Goodman, H.M. (1995). An *Arabidopsis thaliana* root–specific kinase homolog is induced by dehydration, ABA, and NaCl. *Plant J.* 8, 37–43.

44. Saneoka, H., Nagaska, C., Hahn, D.T., Yang, W.–j., Premachandra, G.S., Joly, R.J., and Rhodes, D. (1995). Salt tolerance of glycinebetaine–deficient and coantaining maize lines.

Plant Physiol. 107, 631–638.

45. Nomura, M., Ishitani, M., Takabe, T., Rai, A. and Takabe, T. (1995). *Synechococcus* sp. PCC7942 transformed with *Escherichia coli* bet genes produces glycine betaine from choline and acquires resistance to salt stress. *Plant Physiol.* 107, 703–708.

46. Pih, KT, Jang HJ, Kang, SG, Piao, HL, and Hwang, I (1997) Isolation of Molecular Markers for Salt Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell* (In press).

47. Lim, C.O., Cho, M.J., and Hwang, I. (1994) A highly efficient method for the construction of a plasmid-based cDNA library. *Mol Cell* 4, 377–380.

48. Shirley, B.W. and Hwang, I. (1995) The interaction trap: in vivo analysis of protein–protein associations. *Method Cell Biol.* 49, 401–416.

49. Lim, C.O., Kim, H.Y., Kim, M.G., Lee, S.I., Chung, W.S., Park, S.H., Hwang, I., Cho, M.J. (1996) Expressed sequence of tags of

chinses cabbage flower bud cDNA. *Plant Physiol* 111, 577–588.