ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2023** Vol. 33. No. 1. 34~42 DOI : https://doi.org/10.5352/JLS.2023.33.1.34

AtERF73/HRE1, an Arabidopsis AP2/ERF Transcription Factor Gene, Contains Hypoxia-responsive *Cis*-acting Elements in Its Promoter

Hye-Yeon Seok[1], Huong Thi Tran[2], Sun-Young Lee[1] and Yong-Hwan Moon[2,3,4]*

[1]*Korean Nanobiotechnology Center, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[2]*Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[3]*Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea*
[4]*Institute of Systems Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea*

Received October 4, 2022 /Revised December 6, 2022 /Accepted December 7, 2022

In a signal transduction network, from the perception of stress signals to stress-responsive gene expression, binding of various transcription factors to *cis*-acting elements in stress-responsive promoters coordinate the adaptation of plants to abiotic stresses. Among the AP2/ERF transcription factor family genes, group VII ERF genes, such as *RAP2.12*, *RAP2.2*, *RAP2.3*, *AtERF73*/*HRE1*, and *AtERF71*/*HRE2*, are known to be involved in the response to hypoxia stress in Arabidopsis. In this study, we dissected the *HRE1* promoter to identify hypoxia-responsive region(s). The 1,000 bp upstream promoter region of *HRE1* showed increased promoter activity in Arabidopsis protoplasts and transgenic plants under hypoxia conditions. Analysis of the promoter deletion series of *HRE1*, including 1,000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp, 100 bp, and 50 bp upstream promoter regions, using firefly *luciferase* and *GUS* as reporter genes indicated that the −200 to −100 region of the *HRE1* promoter is responsible for the transcriptional activation of *HRE1* in response to hypoxia. In addition, we identified two putative hypoxia-responsive *cis*-acting elements, the ERF-binding site and DOF-binding site, in the −200 to −100 region of the *HRE1* promoter, suggesting that the expression of *HRE1* might be regulated via the ERF transcription factor(s) and/or DOF transcription factor(s). Collectively, our results suggest that *HRE1* contains hypoxia-responsive *cis*-acting elements in the −200 to −100 region of its promoter.

Key words : Arabidopsis, AtERF73/HRE1, *cis*-acting element, hypoxia, promoter

서 론

환경 스트레스는 식물에서 다양한 기능을 가진 스트레스 반응 유전자의 발현을 조절한다[19]. 환경 스트레스의 인지부터 스트레스 반응 유전자의 발현에 이르는 신호전달 네트워크를 통한 식물의 환경 스트레스 적응에 있어서 다양한 스트레스 반응 유전자의 프로모터에 위치한 *cis*-조절 요소가 이들 유전자의 스트레스 반응 발현에 관여한다. 전사인자는 표적 유전자의 프로모터에 있는 *cis*-조절 요소에 대한 특이적 결합을 통해 다양한 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있다[1]. 지금까지 AP2/ERF, bZIP, zinc finger, WRKY, MYB, bHLH, NAC 등 환경 스트레스에 반응하여 활성화되는 다양한 전사인자 패밀리가 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 포함한 여러 식물 종에서 밝혀졌다[6, 14].

여러 전사인자 패밀리 중 AP2/ERF 패밀리는 식물 특이적 전사인자 패밀리로 애기장대에 145개 유전자가 있는 것으로 밝혀졌으며, 이 145개 유전자는 AP2, ERF, DREB/CBF, RAV의 4개 서브패밀리로 분류된다[13]. 그 중 ERF 및 DREB/CBF 서브패밀리 유전자는 다시 I에서 X까지 10개 그룹으로 나눠지는데, *RAP2.12*, *RAP2.2*, *RAP2.3*, *AtERF73*/*HRE1* (*HRE1*), *AtERF71*/*HRE2* (*HRE2*)의 5개 유전자가 포함된 그룹 VII (ERF-VII)의 유전자는 저산소 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다[4, 13]. 애기장대 ERF-VII 그룹의 저산소 스트레스 반응에 있어서 RAP2.12 및 RAP2.2는 *cis*-조절 요소인 HRPE에 결합하여 *LBD41* 및 *PCO1*과 같은 하위 유전자를 활성화시키는 반면, HRE1 및 HRE2는 GCC box에 결합하여 하위 유전자의 발현을 조절한다[3, 9, 15, 16].

ERF-VII 그룹 유전자의 발현은 전사 및 전사 후 단계에서 조절된다. ERF-VII 그룹 유전자 발현의 전사 후 조절은

***Corresponding author**
Tel : +82-51-510-2592, Fax : +82-51-513-9258
E-mail : moonyh@pusan.ac.kr
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

N-말단에 있는 N-degron 경로의 표적 아미노산 서열에 의해 매개되는 것이 잘 알려져 있다[4]. 정상 조건에서는 N-degron 경로에 의해 단백질이 분해되지만 저산소 스트레스 조건에서는 N-degron 경로가 활성화되지 못해 단백질이 안정하게 존재할 수 있다[4]. 전사 단계에서 ERF-VII 그룹 유전자의 조절은 *RAP2.2*의 발현 조절이 잘 알려져 있는데, 저산소 스트레스 조건에서 WRKY33 및 WRKY12가 *RAP2.2*의 프로모터에 존재하는 W-box (5′-AGTCAA-3′)에 결합하여 전사를 활성화시킨다[18]. 그러나 WRKY33와 WRKY12는 *RAP2.2* 외에 다른 ERF-VII 유전자의 전사 조절에는 관여하지 않는 것으로 알려졌다[18]. 최근, *HRE2*의 저산소 스트레스 반응에 대한 전사 조절 경로가 밝혀졌는데, HD-Zip II 패밀리인 HAT22/ABIG1이 *HRE2*의 프로모터에 위치한 *cis*-조절 요소인 HD-Zip II-결합 유사 서열(5′-AATGATA-3′)에 결합하여 *HRE2*의 전사를 억제하는 것으로 알려졌다[17]. 그러나 *HRE2*를 제외한 나머지 ERF-VII 그룹 유전자의 프로모터에는 HD-Zip II-결합 서열 또는 유사 서열이 존재하지 않아 HAT22/ABIG1에 의한 전사 억제는 *HRE2*에만 국한된 것으로 여겨진다[17]. 이처럼 지금까지 ERF-VII 그룹 유전자의 발현 조절에 관한 연구는 *RAP2.2*와 *HRE2*를 대상으로만 이루어졌으며, *RAP2.12*, *RAP2.3*, *HRE1*에 대해서는 아직 각 유전자 프로모터의 저산소 스트레스 반응 부위에 대한 연구도 이루어지지 않았다.

*HRE1*은 선택적 스플라이싱에 의해 두 개의 스플라이싱 이소형인 *HRE1α*와 *HRE1β*를 가지며, 저산소 스트레스에 의해 *HRE1*의 발현이 증가하고 두 이소형이 만들어지는 것으로 알려져 있다[15, 16]. 또한, 두 스플라이싱 이소형을 각각 과발현 시킨 애기장대 형질전환체는 모두 야생형에 비해 저산소 스트레스에 대해 더 높은 저항성을 보였다[10, 15, 16]. 반면, 저산소 스트레스를 제외한 고염, 건조 등의 삼투 스트레스에는 *HRE1*이 반응하지 않는 것으로 알려져 있다[16]. 본 연구에서는 *HRE1*의 저산소 스트레스 신호전달의 상위 경로를 더욱 심도 있게 연구하기 위하여 *HRE1*의 프로모터에서 저산소 스트레스 반응에 관여하는 부위를 동정하였다. Firefly *luciferase*와 *β-glucuronidase* (*GUS*)의 두 개 리포터 유전자를 사용한 프로모터 분석을 통해 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 *HRE1*의 저산소 스트레스 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이 부위에 존재하는 저산소 스트레스 반응과 관련된 전사인자 결합 *cis*-조절 요소가 *HRE1*의 전사 활성화에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.

재료 및 방법

벡터 제작

*HRE1*의 프로모터 부위는 전사개시 서열을 +1로 하였을 때 5′ upstream 방향에 위치하는 서열을 사용하였다. −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92, −100에서 +92, −50에서 +92, −1,000에서 −1, −50에서 −1 부위를 야생형 애기장대 genomic DNA로부터 PCR로 증폭한 뒤 제한효소 HindIII와 PstI으로 처리하고 pFGL1495 또는 pFGL539 벡터에 클로닝 하여 firefly *luciferase* 또는 *GUS* 리포터 유전자의 발현이 조절되도록 하였다[17]. 그리고 −200에서 −100 부위 서열이 2번 반복되도록 PCR로 증폭한 후 이를 pFGL1437 벡터의 SalI-EcoRI 자리에 클로닝 하여 firefly *luciferase* 리포터 유전자의 발현이 조절되도록 하였다[17]. *ADH1*의 프로모터 부위는 −737에서 +58 부위를 야생형 애기장대 genomic DNA로부터 PCR로 증폭한 뒤 제한효소 HindIII와 PstI으로 처리하고 pFGL1495 벡터에 클로닝 하여 firefly *luciferase* 리포터 유전자의 발현이 조절되도록 하였다[17]. PCR에 사용한 프라이머 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primers used in cloning

Position	Sequence	Orientation
−1,000	5′- GCGAAGCTTTTGATAATTAAAAAGAAAAT-3′	Forward
−800	5′- GCGAAGCTTAGAGATATAATCTGATAGCA-3′	Forward
−600	5′- GCGAAGCTTTTTTATATATACTAACTTTA-3′	Forward
−400	5′- GCGAAGCTTTTGAAAGGTGAATAAGCCAA-3′	Forward
−200	5′- GCGAAGCTTTAAGATCGAATATATTAAGT-3′	Forward
−100	5′- GCGAAGCTTATGGTAAAATTAACAAAGCC-3′	Forward
−50	5′- GCGAAGCTTCGCCTTGTCGCTCTGCGTAT-3′	Forward
+92	5′- GCGCTGCAGGTTCTTTCATTTTTGCCTGA-3′	Reverse
−1	5′- GCGCTGCAGTTTCTCAGAACTAAAGGGTT-3′	Reverse
−200	5′- CGCGTCGACTAAGATCGAATATATTAAGT-3′	Forward
−100	5′- CGCGAATTCTTTATCCTCATCATAGGTTA-3′	Reverse
ADH1	5′- GCGAAGCTTTGTGATGTATAGTAAAACGC-3′	Forward
ADH1	5′- GCGCTGCAGTATCAACAGTGAAGAACTTG-3′	Reverse

식물 재료 및 생장 조건

애기장대는 Columbia ecotype을 사용하였다. 애기장대 종자는 70% ethanol에서 1분, 10% bleach에서 10분간 표면을 소독한 뒤 멸균한 증류수로 4회 이상 세척하고 4℃의 암조건에서 3일 동안 춘화처리를 하였다. 그 후 vitamin B5, 1.5% sucrose, 0.7% microagar가 포함된 MS (Murashige and Skoog) [12] 배지에 발아시켜 22℃의 단일조건(광조건 8시간/암조건 16시간)에서 배양하였다.

식물 형질전환 및 형질전환 식물체 선별

식물 형질전환용 벡터를 freeze-thaw 방법을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* 균주 GV3101에 도입하였고[7], floral-dipping 방법을 이용하여 애기장대로 형질전환 하였다[2]. 애기장대 형질전환체는 50 mg/l의 kanamycin을 포함한 MS 배지에 발아시켜 선별하였다.

애기장대 원형질체 분리 및 형질전환

애기장대 원형질체 분리 및 PEG-매개 형질전환은 MS 배지에 발아한 지 3주 된 야생형 애기장대의 지상부를 면도칼을 이용하여 1 mm × 1 mm (w×d) 정도의 크기로 자른 뒤 Yoo 등(2007)의 방법에 따라 수행하였다[20]. 원형질체 형질전환에는 5×10^6/ml 농도의 원형질체 300 µl와 2 µg/µl 농도의 DNA 30 µg을 사용하였다. 분리 및 형질전환을 마친 원형질체는 15 ml round bottom tube에 W5 solution (154 mM NaCl, 125 mM $CaCl_2$, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1.5 mM Mes, pH 5.6) 5 ml를 추가하여 잘 섞어준 뒤 22℃의 암조건에서 약 24시간 정도 배양하였다. 이 배양 조건은 침수에 의한 저산소 스트레스에 해당한다[5, 8]. Reference plasmid는 함께 형질전환을 하여 형질전환 효율의 표준화에 이용하였다.

식물체에 저산소 스트레스 처리

저산소 스트레스는 다음과 같이 처리하였다. MS 배지에 발아한 지 10일 된 애기장대 유식물체를 액체 MS 배지로 적신 필터 종이가 담긴 petri dish로 옮기고 이를 다시 암조건의 아크릴 상자에 넣었다. 아크릴 상자에 99.99%의 질소 가스를 12시간 동안 지속적으로 주입하였다.

Luciferase 활성 분석

Firefly luciferase 및 Nano luciferase의 활성은 Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corp., USA)과 GloMax®-Multi Detection System (Promega Corp., USA)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 측정 및 분석하였다. 배양을 마친 원형질체는 1× Glo Lysis Buffer (Promega Corp., USA)를 첨가하여 현탁 시켰으며, ONE-Glo™ EX Luciferase Assay Buffer (Promega Corp., USA)는 firefly luciferase 활성 측정에, NanoDLR™ Stop & Glo® Buffer (Promega Corp., USA)는 Nano luciferase 활성 측정에 사용하였다. 형질전환 효율의 표준화를 위해 reporter plasmid의 firefly luciferase 활성 측정값을 reference plasmid의 Nano luciferase 활성 측정값으로 나누어 상대적인 값을 얻었다.

조직화학적 GUS 분석

조직화학적 GUS 활성 분석을 위해 형질전환체를 X-gluc 용액(2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.5 mM potassium ferricyanide, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0))에 담가 10분 동안 진공 처리를 하여 용액을 침투시킨 뒤 37℃의 암조건에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 50 mM sodium phosphate 용액(pH 7.0)으로 세척하고 ethanol (100%): glacial acetic acid (9:1, v/v) 용액에 하루 동안 담가 탈색 및 고정을 시켰다.

통계분석

통계 분석은 IBM SPSS Statistics 버전 25(IBM Corp., USA)의 ANOVA를 사용하여 수행하였으며, Student's *t*-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

HRE1 프로모터 활성에 있어서 5′ UTR의 영향 확인

*HRE1*은 저산소 스트레스에 의해 발현이 증가한다[10, 15, 16]. 따라서 *HRE1*의 프로모터에 저산소 스트레스에 반응하는 *cis*-조절 요소가 존재할 것으로 생각하고 이를 찾기로 하였다. *HRE1* 프로모터 부위는 전사개시 부위를 기준으로 −1,000에서 −1까지로 정하였다. 우선 *HRE1*의 92 bp의 5′ untranslated region (UTR)이 *HRE1*의 프로모터 활성에 영향을 끼치는지 확인하기 위하여 5′ UTR을 가지는 −1,000에서 +92 및 −50에서 +92 부위, 5′ UTR을 가지지 않는 −1,000에서 −1 및 −50에서 −1 부위를 PCR로 증폭하고, 이들 프로모터 부위가 firefly *luciferase*의 발현을 조절할 수 있는 벡터를 클로닝 하였다(Fig. 1A). 클로닝 한 벡터를 애기장대 원형질체에 형질전환 하고 저산소 스트레스 조건에서 배양한 뒤 firefly luciferase 활성을 비교하였다. 그 결과, −1,000에서 +92 부위와 −1,000에서 −1 부위 모두가 저산소에서 증가된 firefly luciferase 활성을 보였고, −50에서 +92 부위와 −50에서 −1 부위는 모두 증가된 활성을 보이지 않았다(Fig. 1B). 이를 통해 *HRE1*의 1,000 bp 프로모터가 저산소 반응 부위를 포함하고 있는 것으로 재확인 되었으며, 아울러 *HRE1*의 5′ UTR이 *HRE1*의 프로모터 활성에 영향을 끼치지 않는 것으로 결론을 내리고 이후 실험에서는 모두 5′ UTR을 포함하는 프로모터 부위를 이용하였다.

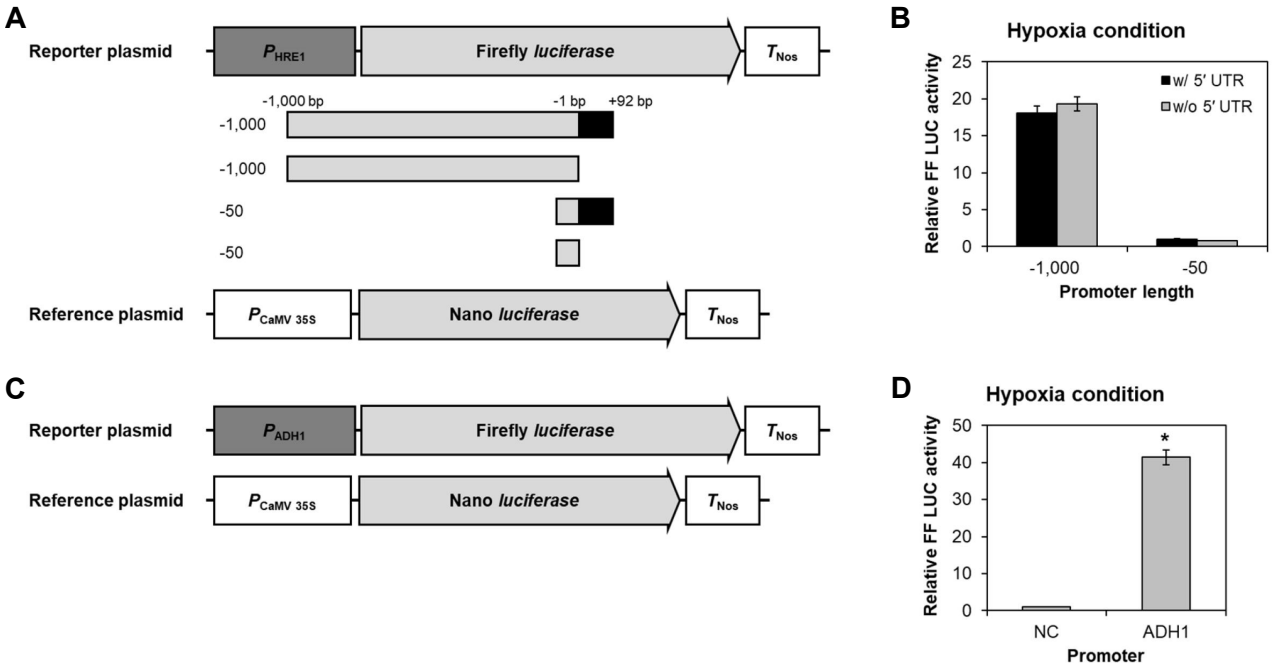

Fig. 1. Analysis of the effect of 5′ UTR on the promoter activity of *HRE1*. (A) Schematic maps of reporter and reference plasmids for promoter activity analysis. P_{HRE1} and T_{Nos} indicate promoter of *HRE1* and terminator of *Nos*, respectively. −1,000 and −50 indicate 1,000 bp and 50 bp upstream promoter regions of *HRE1*, respectively. (B) Relative firefly luciferase activity in Arabidopsis protoplasts under hypoxia conditions. Transformation efficiency was normalized with Nano luciferase activity of the reference plasmid. Normalized firefly luciferase activity of −50 to +92 was set as 1. Data shown are means ± S.D. (n=3). (C) Schematic maps of reporter and reference plasmids for *ADH1* promoter activity analysis. P_{ADH1} indicates promoter of *ADH1*. (D) Relative firefly luciferase activity in Arabidopsis protoplasts under hypoxia conditions. Transformation efficiency was normalized with Nano luciferase activity of the reference plasmid. Normalized firefly luciferase activity of negative control was set as 1. Data shown are means ± S.D. (n=3). * t-test p<0.05. NC, negative control.

본 논문에서 사용한 원형질체의 배양 조건이 저산소 스트레스 조건이 맞는지를 확인하기 위하여 저산소 스트레스 마커 유전자로 잘 알려진 *ADH1*의 프로모터 활성을 확인해보았다. *ADH1* 프로모터를 PCR로 증폭한 뒤 *HRE1* 프로모터와 동일하게 firefly *luciferase*의 발현을 조절할 수 있도록 클로닝 하였다(Fig. 1C). 클로닝 한 벡터를 애기장대 원형질체에 형질전환 하고 저산소 스트레스 조건에서 배양한 뒤 firefly luciferase 활성을 확인한 결과, *ADH1* 프로모터에 의해 firefly luciferase의 활성이 강하게 증가하였다(Fig. 1D). 이러한 결과는 원형질체의 배양 조건에서 저산소 스트레스가 적절하게 처리되고 있음을 보여준다.

애기장대 식물체에서 1,000 bp *HRE1* 프로모터의 저산소 스트레스 반응 재확인

*HRE1*의 1,000 bp 프로모터의 저산소 스트레스 반응을 애기장대 식물체에서 재확인하였다. 이를 위하여 −1,000에서 +92 및 −50에서 +92 부위와 firefly *luciferase* 리포터 유전자가 클로닝 된 벡터를 야생형 애기장대에 형질전환한 뒤 형질전환체를 선별하였다(Fig. 2A). 선별한 애기장대 형질전환체에 저산소 스트레스를 처리한 뒤 firefly luciferase 활성을 분석한 결과 −50에서 +92 부위는 저산소 스트레스 처리 전과 처리 후 모두 매우 낮은 firefly luciferase 활성을 보인 반면, −1,000에서 +92 부위는 저산소 스트레스 처리 후 firefly luciferase 활성이 매우 강하게 증가하였다(Fig. 2B). 이러한 결과는 애기장대 원형질체에서 firefly luciferase의 활성을 확인한 결과와 동일하며, 이를 통해 *HRE1*의 1,000 bp 프로모터가 저산소 반응 부위를 가지고 있음을 재확인 할 수 있었고, 아울러 애기장대 원형질체를 대상으로 한 저산소 스트레스 처리 방식이 적절함을 확인할 수 있었다.

Firefly *luciferase* 리포터 유전자를 이용한 *HRE1* 프로모터의 저산소 스트레스 반응 부위 분석

*HRE1*의 프로모터 중 저산소 스트레스 반응에 중요한 부위를 동정하기 위하여 *HRE1* 프로모터를 다양한 길이로 나누어 클로닝 한 뒤 리포터 유전자인 firefly *luciferase*의 발현을 확인하는 실험을 수행하였다. *HRE1*의 프로모터로는 −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92, −100에서 +92, −50에서 +92 부위를 이용하였다(Fig. 3A). 7개의 각 프로모터 부위가 클로닝

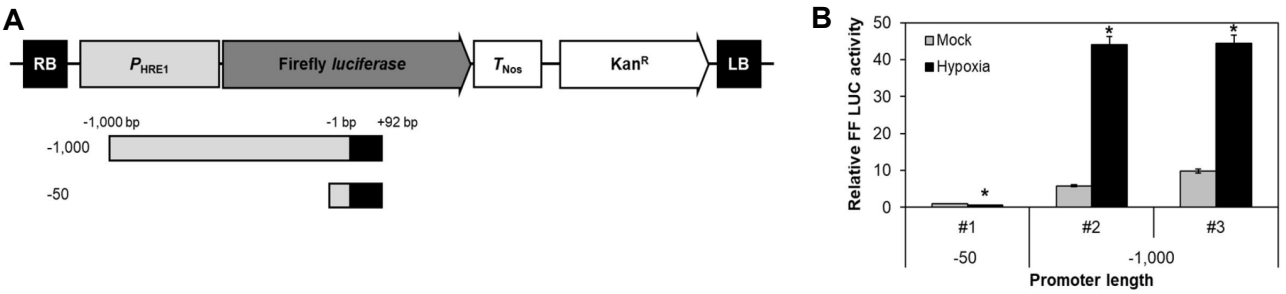

Fig. 2. Validation of the hypoxia response of the 1,000 bp *HRE1* promoter in Arabidopsis transgenic plants. (A) A schematic map of vector for *HRE1* promoter activity analysis. −1,000 and −50 indicate 1,000 bp and 50 bp upstream promoter regions of *HRE1*, respectively. (B) Relative firefly luciferase activity of Arabidopsis T_2 transgenic plants harboring *HRE1* promoter at 15 days after germination (DAG) under short-day (SD) conditions with or without hypoxia treatment. Hypoxia was treated using N_2 gas for 12 hr. Firefly luciferase activity of mock in −50 to +92 region was set as 1. Data shown are means ± S.D. (n=3). * t-test p<0.05. Mock indicates normal condition.

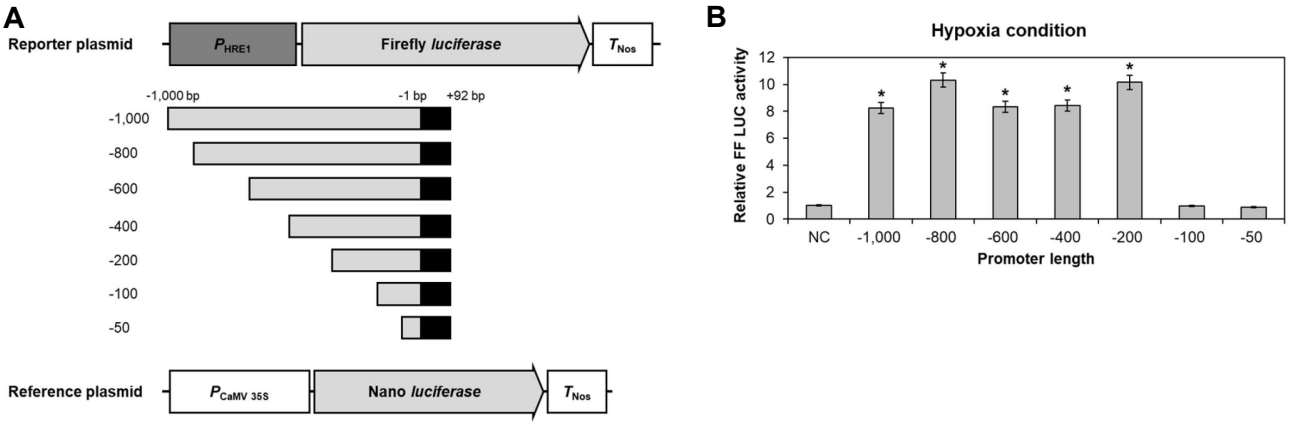

Fig. 3. Analysis of *HRE1* promoter deletions under hypoxia condition using firefly *luciferase* reporter gene. (A) Schematic maps of reporter and reference plasmids for *HRE1* promoter deletion analysis. −1,000, −800, −600, −400, −200, −100, and −50 indicate 1,000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp, 100 bp, and 50 bp upstream promoter regions of *HRE1*, respectively. (B) Relative firefly luciferase activity in Arabidopsis protoplasts under hypoxia conditions. Transformation efficiency was normalized with Nano luciferase activity of the reference plasmid. Normalized firefly luciferase activity of negative control was set as 1. Empty reporter plasmid was used as a negative control. Data shown are means ± S.D. (n=3). * t-test p<0.05. NC, negative control.

된 벡터를 애기장대 원형질체에 형질전환 하고 저산소 스트레스 조건에서 firefly luciferase 활성을 확인한 결과 −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92 부위는 모두 높은 firefly luciferase 활성을 보인 반면 −100에서 +92, −50에서 +92 부위는 거의 활성을 보이지 않았다(Fig. 3B).

GUS 리포터 유전자를 이용한 *HRE1* 프로모터의 저산소 스트레스 반응 부위 분석

Firefly *luciferase* 리포터 유전자를 이용한 *HRE1* 프로모터 분석 결과를 애기장대 식물체에서 재확인 하기 위하여 동일한 7개의 *HRE1* 프로모터 부위를 *GUS* 리포터 유전자가 포함된 벡터에 클로닝 하고 야생형 애기장대에 형질전환을 한 뒤 형질전환체를 선별하였다(Fig. 4A). 선별한 애기장대 형질전환체에 저산소 스트레스를 처리하거나 또는 하지 않은 뒤 조직화학적 GUS 분석을 수행하였다. 그 결과 저산소 스트레스를 처리하지 않은 조건에서는 −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92, −100에서 +92, −50에서 +92 부위 모두 GUS 활성을 거의 보이지 않았다. 반면에 저산소 스트레스를 처리한 조건에서는 −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92 부위는 모두 높은 GUS 활성을 보인 반면 −100에서 +92, −50에서 +92 부위는 GUS 활성을 보이지 않았다(Fig. 4B). Firefly luciferase 활성과 조직화학적 GUS 활성 분석 결과를 종합하면 *HRE1*의 저산소 스트레스 반응에서 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

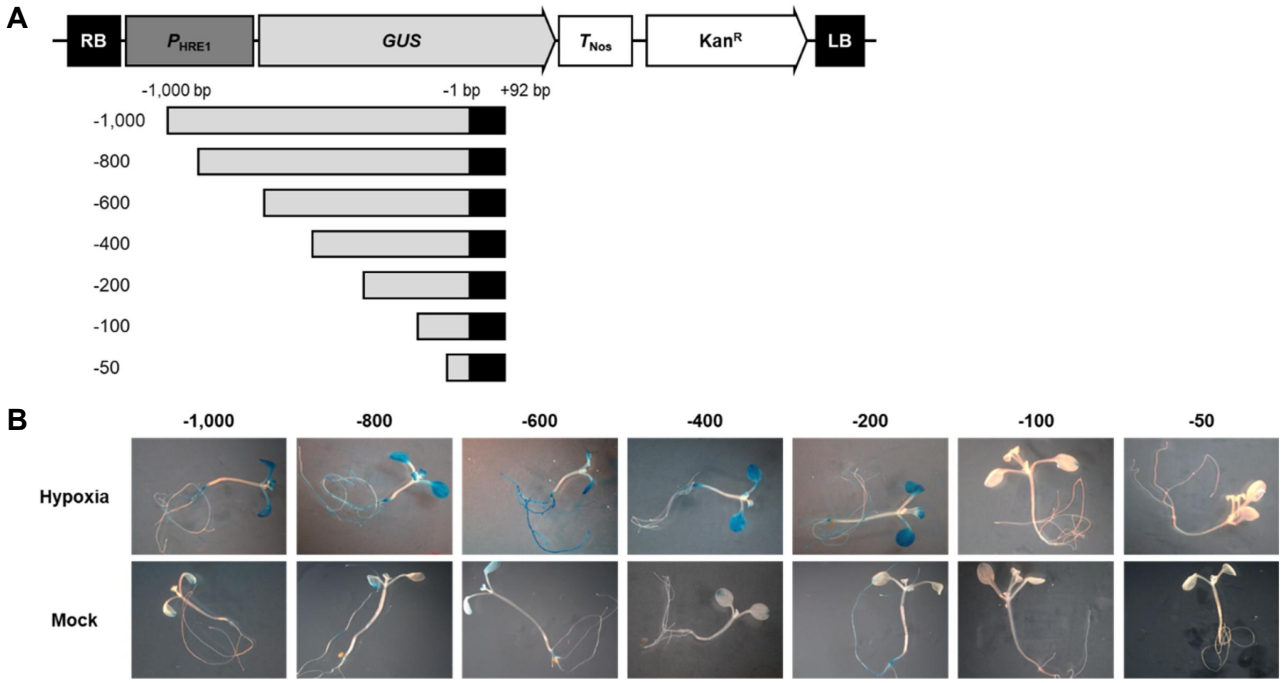

Fig. 4. Analysis of *HRE1* promoter deletions under hypoxia condition using *GUS* reporter gene. (A) A schematic map of vector for *HRE1* promoter deletion analysis. −1,000, −800, −600, −400, −200, −100, and −50 indicate 1,000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp, 100 bp, and 50 bp upstream promoter regions of *HRE1*, respectively. (B) Histochemical GUS assay of Arabidopsis T_2 transgenic plants harboring the deletion series of *HRE1* promoter at 12 DAG under SD conditions with or without hypoxia treatment. Hypoxia was treated using N_2 gas for 12 hr. GUS activity was observed in at least 15 transgenic plants from three individual lines for each construct with the representative staining results are shown here. Mock indicates normal condition.

HRE1 프로모터의 −200에서 −100 부위의 저산소 스트레스 반응 재확인

본 연구에서 분리한 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 저산소 스트레스 반응 부위가 맞는지 재확인하기 위하여 −200에서 −100 부위가 2번 반복된 절편과 firefly *luciferase* 리포터 유전자가 클로닝 된 벡터를 준비하였다 (Fig. 5A). 준비한 벡터를 애기장대 원형질체에 형질전환 한 뒤 저산소 스트레스 조건에서의 firefly luciferase 활성을 −1,000에서 +92 부위 및 −200에서 +92 부위 *HRE1* 프로모터와 함께 비교하였다. 그 결과 두 번 반복된 −200에서

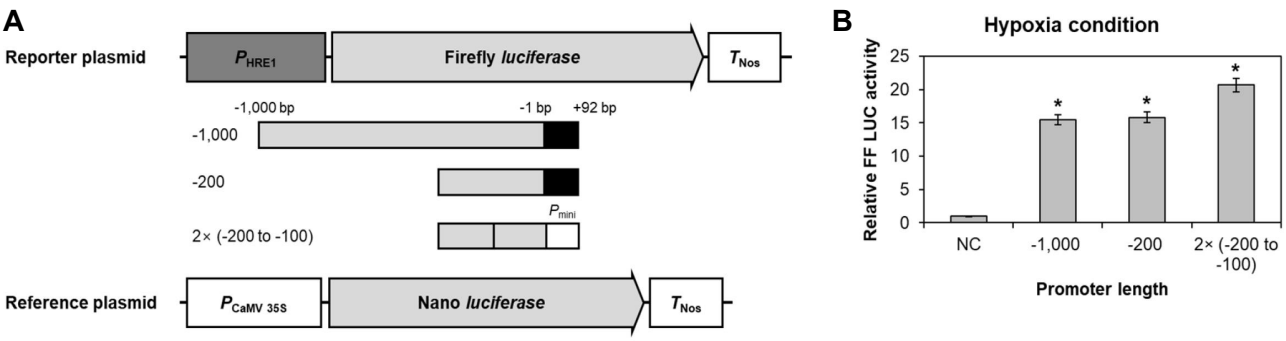

Fig. 5. Confirmation of the hypoxia response of the −200 to −100 region of *HRE1* promoter. (A) Schematic maps of reporter and reference plasmids for promoter activity analysis. −1,000 and −200 indicate 1,000 bp and 200 bp upstream promoter regions of *HRE1*, respectively. 2× (−200 to –100) indicates tandem repeats of −200 to –100 regions of *HRE1* promoter. (B) Relative firefly luciferase activity in Arabidopsis protoplasts under hypoxia conditions. Transformation efficiency was normalized with Nano luciferase activity of the reference plasmid. Normalized firefly luciferase activity of negative control was set as 1. Empty reporter plasmid of reference plasmid was used as a negative control. Data shown are means ± S.D. (n=3). * t-test p<0.05. NC, negative control.

−100 부위가 −1,000에서 +92 부위 및 −200에서 +92 부위보다 약간 더 높은 firefly luciferase 활성을 보였다(Fig. 5B). 이를 통해 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 저산소 스트레스 반응에 중요한 역할을 한다는 것을 다시 확인하였다.

HRE1 프로모터의 −200에서 −100 부위의 *cis*-조절 요소 분석

−200에서 −100 부위가 저산소 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하므로 이 부위에 저산소 스트레스 반응 *cis*-조절 요소가 위치하고 있을 것으로 생각된다. 따라서 기존에 알려진 저산소 스트레스 반응과 관련된 *cis*-조절 요소가 있는지 온라인 분석 툴인 PLACE (https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/)를 이용하여 알아보았다. 그 결과 저산소 스트레스 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 ERF 전사인자가 결합할 수 있는 *cis*-조절 요소 서열인 5′-ATATT-3′가 −189와 −192에 각각 위치하는 것을 확인하였다(Table 2). 더불어 DOF 전사인자 결합 서열인 5′-CTTT(T/A)-3′와 일치하는 서열이 −129에 위치하는 것을 확인하였다(Table 2). 이러한 결과는 이 세 *cis*-조절 요소가 *HRE1* 프로모터의 저산소 스트레스 반응에 중요한 역할을 할 가능성이 있음을 보여준다.

고 찰

애기장대 AP2/ERF 패밀리 중 ERF-VII 그룹 유전자는 식물의 저산소 스트레스 반응에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다[4]. 애기장대의 ERF-VII 그룹 유전자인 *RAP2.12*, *RAP2.2*, *RAP2.3*, *HRE1*, *HRE2*의 발현은 N-degron 경로에 의해 전사 후 단계에서 조절된다[4]. 하지만 이들의 저산소 스트레스 반응 *cis*-조절 요소를 포함한 상위 전사인자에 의한 전사 조절은 최근에 밝혀진 *RAP2.2* 및 *HRE2*의 전사 조절 외에는 잘 알려져 있지 않다[17, 18].

선행 연구에서 *HRE1*의 발현이 저산소 스트레스에 의해 증가하고 두 선택적 스플라이싱 이소형인 *HRE1α* 및 *HRE1β*가 생성되는데, 두 이소형의 애기장대 과발현 형질전환체는 야생형에 비해 저산소 스트레스에 더 높은 저항성을 가지는 것으로 확인되었다[10, 15, 16]. 아울러 HRE1α 및 HRE1β의 전사활성화 부위 및 모티프를 밝혔으며 저산소 스트레스 반응과 관련된 하위 유전자들도 확인하였다[15]. 하지만 *HRE1*은 저산소 스트레스에만 특이적으로 반응하며 그 외에 고염이나 건조 등의 삼투 스트레스에는 반응하지 않는 것으로 알려져 있다[16]. 본 연구에서는 *HRE1*을 경유하는 저산소 스트레스 반응의 신호전달 경로를 더욱 심층적으로 연구하기 위하여, *HRE1*의 프로모터 분석을 통해 저산소 스트레스 반응 부위를 밝혀냈다.

애기장대 원형질체를 이용한 저산소 스트레스 반응이 적절한지 확인하기 위하여 애기장대 형질전환체를 이용하여 *HRE1* 프로모터 활성을 분석한 결과, 애기장대 원형질체에서와 동일한 결과를 확인할 수 있었고 이후 애기장대 원형질체에서 *HRE1* 프로모터 분석을 수행하였다(Fig. 2). 먼저, *HRE1*의 1,000 bp 프로모터가 애기장대 원형질체와 형질전환체 모두에서 저산소 스트레스에 의해 리포터 유전자를 활성화시킨 결과를 통해 해당 프로모터가 저산소 스트레스 반응 부위를 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 1, Fig. 2). 이후 −1,000에서 +92, −800에서 +92, −600에서 +92, −400에서 +92, −200에서 +92, −100에서 +92, −50에서 +92의 7개 길이의 프로모터를 분석한 결과와, 그리고 저산소 스트레스 반응 부위(−200에서 −100)만 따로 이용한 분석 결과를 통해 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 저산소 스트레스에 의한 *HRE1* 전사 활성화에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다(Fig. 3 – Fig. 5).

HRE1 프로모터의 −200에서 −100 부위에 기존에 저산소 스트레스 반응과 관련된 것으로 알려진 *cis*-조절 요소가 있는지 알아보기 위하여 해당 부위의 서열을 분석하였다. 그 결과 ERF-결합 서열이 2개, DOF-결합 서열이 1개가 있는 것을 알 수 있었다(Table 2). ERF 전사인자는 AP2/ERF 전사인자 패밀리에 속하며 주로 식물의 생물 스트레스 또는 환경 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[13]. 본 연구의 대상 유전자인 *HRE1*을 포함한 ERF-VII 그룹 유전자들 모두 저산소 스트레스 반응과 관련된 역할을 하는 것이 잘 밝혀져 있다[4, 11]. ERF-VII 그룹 전사인자 외에 다른 ERF 전사인자 또한 저산소 스트레스 반응과 관련되어 있을 가능성이 높아 ERF-VII 그룹 전사인자 또는 그 외 ERF 전사인자가 *HRE1*의 저산소 스트레스 반응 프로모터 부위에 있는 *cis*-조절 요소에 결합하여 전사를 활성화시킬 가능성이 있다. DOF 전사인자 또한 기존에 잘 알려진 저산소 스트레스 반응 유전자인 *ADH1* 및 *HB1*을 포함한 여러 저산소 스트레스 반응 유전자의 전사 조절과 관련된 것이 알려져 있다[11]. 따라서 *HRE1*의 저산소 스트레스에 의한 전사 활성화는 *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위에 위치한 ERF 전

Table 2. Putative hypoxia-responsive *cis*-acting elements in the −200 to −100 region of *HRE1* promoter

cis-acting element	Core sequence	Sequence in *HRE1* promoter	Location in *HRE1* promoter
ERF-binding site	5′-ATATT-3′	5′-ATATT-3′	−189 to −185
		5′-AATAT-3′	−192 to −188
DOF-binding site	5′-CTTT(T/A)-3′	5′-AAAAG-3′	−129 to −125

사인자 또는 DOF 전사인자가 결합할 수 있는 *cis*-조절 요소를 통해 조절될 것으로 추측된다. *HRE1*을 통한 저산소 스트레스 신호전달 경로를 더욱 심화시키기 위해서는 ERF 전사인자 또는 DOF 전사인자와 *HRE1*의 전사 활성화에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

ERF-VII 그룹은 RAP2.12, RAP2.2, RAP2.3의 RAP 타입과 HRE1, HRE2의 HRE 타입으로 구분된다[4]. 최근, *HRE2*의 프로모터 분석 및 상위 전사인자 분석을 통해 *HRE2* 프로모터의 −116에서 −2 부위가 저산소 스트레스 반응에 중요하며, HD-Zip II 패밀리인 HAT22/ABIG1이 이 부위에 있는 HD-Zip II-결합 유사 *cis*-조절 요소에 결합하여 *HRE2*의 전사를 억제하는 것으로 밝혀졌다[17]. *HRE1* 프로모터의 염기서열 분석 결과, −200에서 −100의 저산소 스트레스 반응 부위에는 *HRE2* 프로모터의 HD-Zip II-결합 서열 또는 유사 서열이 존재하지 않았다. 아울러, 본 연구에서 *HRE1*의 저산소 스트레스 반응 부위에 존재하는 것으로 확인된 ERF-결합 서열과 DOF-결합 서열 또한 *HRE2* 프로모터의 −116에서 −2 저산소 스트레스 반응 부위에 존재하지 않았다. 이러한 결과는 *HRE1*과 *HRE2*의 저산소 스트레스 반응 신호전달 경로가 서로 다를 수 있음을 보여준다.

본 연구의 결과를 종합하면, *HRE1* 프로모터의 −200에서 −100 부위가 저산소 스트레스에 의한 *HRE1*의 전사 활성화에 중요한 역할을 하며, ERF 전사인자 또는 DOF 전사인자가 *HRE1*의 전사 조절에 관여할 가능성이 높다고 생각된다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Borkotoky, S., Vijayakumar, S., Amit, J., Bipul, D., Suresh, S., Ayaluru, M. and Lakshmi, P. T. V. 2013. The Arabidopsis stress responsive gene database. *Int. J. Plant Genom.* **2013**, 949564.
2. Clough, S. J. and Bent, A. F. 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
3. Gasch, P., Fundinger, M., Müller, J. T., Lee, T., Bailey-Serres, J. and Mustroph, A. 2016. Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved *cis*-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* **28**, 160-180.
4. Giuntoli, B. and Perata, P. 2018. Group VII ethylene response factors in Arabidopsis: Regulation and physiological roles. *Plant Physiol.* **176**, 1143-1155.
5. Guo, J., Morrell-Falvey, J. L., Labbe, J. L., Muchero, W., Kalluri, U. C., Tuskan, G. A. and Chen, J. G. 2012. Highly efficient isolation of *populus* mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays. *PLoS One* **7**, e44908.
6. Hirayama, T. and Shinozaki, K. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant J.* **61**, 1041-1052.
7. Hofgen, R. and Willmitzer, L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9877.
8. Im, J. H., Cho, Y. H., Kim, G. D., Kang, G. H., Hong, J. W. and Yoo, S. D. 2014. Inverse modulation of the energy sensor Snf1-releated protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **37**, 2303-2312.
9. Lee, S. Y., Hwang, E. Y., Seok, H. Y., Tarte, V. N., Jeong, M. S., Jang, S. B. and Moon, Y. H. 2015. Arabidopsis AtERF71/HRE2 functions as transcriptional activator via *cis*-acting GCC box or DRE/CRT element and is involved in root development through regulation of root cell expansion. *Plant Cell Rep.* **34**, 223-231.
10. Licausi, F., van Dongen, J. T., Giuntoli, B., Novi, G., Santaniello, A., Geigenberger, P. and Perata, P. 2010. *HRE1* and *HRE2*, two hypoxia-inducible ethylene response factors, affect anaerobic response in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **62**, 302-315.
11. Licausi, F., Weits, D. A., Pant, B. D., Scheible, W. R., Geigenberger, P. and van Dongen, J. T. 2011. Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors and miRNAs that are determined by the actual oxygen availability. *New Phytol.* **190**, 442-456.
12. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
13. Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. and Shinshi, H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol.* **140**, 411-432.
14. Nakashima, K., Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2009. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol.* **149**, 88-95.
15. Seok, H. Y., Ha, J., Lee, S. Y., Bae, H. and Moon, Y. H. 2020. Two alternative splicing variants of AtERF73/HRE1, HRE1α and HRE1β, have differential transactivation activities in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6984.
16. Seok, H. Y., Tarte, V. N., Lee, S. Y., Park, H. Y. and Moon, Y. H. 2014. Arabidopsis HRE1α, a splicing variant of AtERF73/HRE1, functions as a nuclear transcription activator in hypoxia response and root development. *Plant Cell Rep.* **33**, 1255-1262.

17. Seok, H. Y., Tran, H. T., Lee, S. Y. and Moon, Y. H. 2022. *AtERF71*/*HRE2*, an Arabidopsis AP2/ERF transcription factor gene, contains both positive and negative *cis*-regulatory elements in its promoter region involved in hypoxia and salt stress responses. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 5310.
18. Tang, H., Bi, H., Liu, B., Lou, S., Song, Y., Tong, S., Chen, N., Jiang, Y., Liu, J. and Liu, H. 2021. WRKY33 interacts with WRKY12 protein to up-regulate *RAP2.2* during submergence induced hypoxia response in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **229**, 106-125.
19. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 781-803.
20. Yoo, S. D., Cho, Y. H. and Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2**, 1565-1572.

초록 : 애기장대의 AP2/ERF 전사인자인 *AtERF73/HRE1*의 프로모터에 있어서 저산소 반응 *cis*-조절 요소의 분석

석혜연[1] · 쩐 티 후옹[2] · 이선영[1] · 문용환[2,3,4]*
([1]부산대학교 한국나노바이오테크놀로지센터, [2]부산대학교 생명시스템학과, [3]부산대학교 분자생물학과, [4]부산대학교 생명시스템연구소)

환경 스트레스 신호 인지부터 스트레스 반응 유전자의 발현에 이르는 신호전달 네트워크에 있어서, 스트레스 반응 프로모터의 *cis*-조절 요소와 거기에 결합하는 다양한 전사인자는 환경 스트레스에 대한 식물의 적응을 조절한다. 애기장대 AP2/ERF 전사인자 패밀리 중 그룹 VII ERF는 *RAP2.12*, *RAP2.2*, *RAP2.3*, *AtERF73*/*HRE1*, *AtERF71*/*HRE2* 유전자를 포함하며, 저산소 스트레스 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 *HRE1* 프로모터의 저산소 반응 부위를 동정하였다. 이를 위해 1,000 bp, 800 bp, 600 bp, 400 bp, 200 bp, 100 bp, 그리고 50 bp *HRE1* 프로모터 부위를 포함하는 벡터를 제작하여 프로모터 활성을 분석한 결과, −200에서 −100 프로모터 부위가 *HRE1*의 저산소 반응에서 중요함을 확인하였다. *HRE1*의 −200에서 −100 프로모터 부위에는 저산소 반응 *cis*-조절 요소로 알려진 ERF-결합 부위와 DOF-결합 부위가 존재하는데, 이는 *HRE1*의 발현이 ERF 전사인자와 DOF 전사인자에 의해 조절될 수 있음을 시사한다. 전체적으로, 본 연구를 통해 *HRE1* 의 저산소 스트레스 반응에는 −200에서 −100 프로모터 부위에 존재하는 *cis*-조절 요소가 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.