Construction of novel promoters based on the characteristics of drought stress specific *cis*-regulatory element

Kihwan Kim¹ · Byeonggyu Kim² · Juhyung Shin² · Won-Chan Kim^{1,2}

가뭄 스트레스 특이적인 *cis*-regulatory element의 특성을 기반으로 한 신규 프로모터 구축

김기환¹ · 김병규² · 신주형² · 김원찬^{1,2}

Received: 9 November 2020 / Accepted: 31 December 2020 / Published Online: 31 March 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract Droughts are one of the abiotic stresses that hinders the growth and productivity of crop plants. Coping with abiotic stress is necessary to understand the molecular regulatory networks that makes plants respond to adverse environmental conditions. In our experiment to find a combination that can cope with abiotic stress (respond to drought), we screened 5 stress-inducible promoters that are expressed only under stress conditions. This founded 36 *cis*-elements in stress-inducible promoters. With the result we designed 2 synthetic promoters (BL1, BL2) for fine-controlled regulation by assembling *cis*-elements from the native promoters, which are expressed only under stress caused by droughts. Analysis of the transgenic plant (BL1-GUS, BL2-GUS) showed that the synthetic promoters increased the expression of β -glucuronidase (GUS) in transgenic plants under desiccation. Also in the transient activation assay demonstrated that synthetic promoters induced the co-transformation of effector DREB1A and DREB2C. These results

expect that the synthetic promoter with a combination of drought-specific elements can be used to respond to various abiotic stress and is resistant to stress without causing growth retardation.

Keywords *Cis*-regulatory element · Drought · Fine-controlled regulation · Synthetic promoter

서론

식물은 가뭄, 염분, 고온 및 저온 또는 이산화탄소와 같은 비생물학적 스트레스에 빈번히 노출되고 있다. 이러한 비생물학적 스트레스는 전 세계적으로 농작물 손실의 주요 원인이며, 주요 농작물에서 평균 수확량 손실의 50% 이상이 비생물학적 스트레스에 의해 발생하고 있다[1]. 비생물학적 스트레스 중 가뭄에 의한 환경 스트레스는 다양한 생리적 발달 변화를 일으키며, 식물의 성장, 발달 등의 저해로 많은 문제를 일으키는 주요한 환경 요인이다. 옥수수과 같은 식용 작물들은 가뭄 스트레스에 민감하게 반응하며, 작물의 품질 저하 및 생산성 저하 등의 부작용이 가뭄 스트레스에 의해 나타나고 있다. 이러한 문제를 해결하고자 가뭄 스트레스에 대한 내성이 향상된 작물을 개발하려는 시도가 많이 이루어져 왔다. 식물의 모든 조직에서 높은 수준으로 유전자를 발현시키는 35S cauliflower mosaic virus (CaMV) 프로모터를 이용한 여러 후보 유전자에 관한 연구가 축적되어왔으며, 모델 식물을 이용한 이들 후보 유전자의 과발현을 통해 의미 있는 연구 결과들이 도출되어오고 있다[2-4]. 하지만, CaMV 35S 프로모터의 특징인 항상성으로 인해 정상적인 생육조건에서도 유전자의 발현이 강하게 유도되어 식물

Won-Chan Kim (✉)
E-mail: kwc@knu.ac.kr

¹Department of Applied Biosciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

²Department of Integrative Biology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

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.

생육에 부정적인 영향을 미치는 문제점의 해결은 여전히 부족한 실정이다[5,6].

효율적인 스트레스 내성 형질전환 작물의 개발을 위한 전략 중 하나는, 유전자의 발현을 조절하는 것이다. 전사 수준에서 유전자 발현을 조절하는 프로모터는 전사 시작 부위의 상류에 위치하는 *cis-regulatory element*에 의해 조절된다[7,8]. *Cis-regulatory element*는 비 생물학적 스트레스를 포함한 다양한 생리적, 생화학적 및 유전자 조절 네트워크의 조절에 관여하는 중요한 요소이다. 실제로, 효모 프로모터의 *cis-regulatory element*의 조합을 통해 유전자 발현을 조절할 수 있다는 보고가 있다[9].

일부 식물 프로모터는 비 생물학적 스트레스에 활성화되는 것으로 알려져 있으며, 이들 프로모터는 ABA-responsive element (ABRE)와 dehydration-responsive element/C repeat (DRE/CRT) 등과 같은 비 생물학적 스트레스에 주요 *cis-regulatory element*를 가지고 있다[10-17]. ABRE (PyACGTGGC)는 ABA-dependent regulatory system을 통해 하위 유전자의 발현을 조절한다[18]. DRE/CRT (GCCGAC)는 ABA-independent regulatory system을 통해 유전자 발현을 조절한다[19,20]. 이 외에도 MYB (C/TAACNA/G), MYC (CANNTG), LTRE (CCGAC)와 같은 *cis-regulatory element*도 삼투 스트레스 및 ABA에 대한 반응으로 유전자 발현을 조절한다[21,22].

본 연구에서는 가뭄 스트레스에 특이적인 *cis-regulatory element*의 새로운 조합을 통한 합성프로모터를 구축하고 다양한 비 생물학적 스트레스에 반응하여 유전자 발현을 조절할 수 있음을 확인하였다. 이는 정상적인 생육조건에서는 유전자 발현이 되지 않고, 비 생물학적 스트레스 조건에서만 특이적으로 유전자 발현이 유도되어 효율적인 스트레스 내성 작물 개발에 도움이 될 것으로 생각된다.

재료 및 방법

식물재료 및 식물성장조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 야생형(Col-0)을 실험에 사용하였다. 애기장대의 종자는 70% ethanol을 이용하여 5분간 소독 후 종자 소독제(25% 표백제 및 0.01% Triton X-100)를 이용하여 10분간 표면을 살균하여 사용하였다. 표면 멸균된 종자는 증류수로 행군 뒤 0.5×Murashige and Skoog 한천 배지 (0.002% MS, 6 mM MES, 1% Sucrose, 0.6% Agar, pH5.7)에 파종하여 춘화 처리 후 생육시킴에 사용하였다. 생육조건은 생장상에서 장일조건(16시간 명 처리/8시간 암 처리, 23 °C)으로 생육시켰다.

가뭄 스트레스 처리 및 가뭄 스트레스 해소 조건

가뭄 스트레스에 특이적으로 발현이 유도되는 유전자를 선별하기 위한 가뭄 스트레스 처리 실험에서는 8일간 생육시킨 애기장대를 시간대별로 자연 건조하여 사용하였다[10]. 합성프로모터의 성능을 검증하기 위한 가뭄 스트레스 처리 실험은 Polyethylene glycol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)가 첨가된 -0.77 MPa 0.5×Murashige and Skoog 한천 배지에서 3일간 생육하여 사용하였다[23]. 가뭄 스트레스 해소는 가뭄 스트레스 처리된 애기장대를 새로운 0.5×Murashige and Skoog 한천 배지에 옮겨 심어 3일간 생육시켜 사용하였다.

RNA 추출 및 RT-PCR

Total RNA의 추출은 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, Carlsbad, USA)를 사용하여 가뭄 스트레스 처리된 애기장대 및 대조군의 잎과 뿌리를 추출하였다. 추출된 total RNA는 Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 역전시켰다.

Table 1 List of primers used for RT-PCR amplification

Gene name	AGI Locus Identifier	Primer sequence (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon length (bp)
P5CS1	AT2G39800	F: GGACCAAGGGCAAGTAAGATACTG R: CCGACTGGACCACGAGCATGG	59.9 64.4	314
LTI30	AT3G50970	F: GGTTCATCATGGTGCTACTGGTAC R: GATGACCTGGCAGTTGCTCTTTAATC	59.8 61.3	313
ATHB-7	AT2G46680	F: GGTTCAATTAGCTAGAGAGCTAGGG R: CGGTTCTCTTCGTTTTCTGATTCATG	59.3 59.9	306
PP2C	AT1G07430	F: GCGGTGACTCAAGAGCAGTTCTTTG R: CATCGTACACGCTGCCTCGTTC	63.5 63.1	308
LEA4-5	AT5G06760	F: GCAGTCGATGAAAGAAACAGCTTCG R: GAGCCGACATCTGATGTGTCCC	62.1 62.0	308
ATGOLS2	AT1G56600	F: CGGTATGTTCTGTTTACGAGCCTAAC R: CCCACCAITTTCTTGACCAGCATC	61.0 61.0	308
ERF53	AT2G20880	F: GGGTTGCCGAGATCCGTAAGC R: GCATTGAACCATGCCTCAGCC	62.4 61.5	304
RD29A	AT5G52310	F: GCTTTCTGGAACAGAGGATGTAACG R: CTCTTTGAATCTTTGCTTCTCGTCG	60.9 60.1	307
ACTIN8	AT1G49240	F: CATCATTTGTTGGAATGGAA R: ATACTCTGCCTTAGAGATCCACAT	51.0 57.6	296

다. RT-PCR은 생성된 cDNA를 주형으로 사용하여 수행되었으며, 증폭된 DNA 단편을 1% Agarose (Invitrogen)에서 분리하고 ethidium bromide (BioBasic, Toronto, CAN)로 염색하여 확인하였다. RT-PCR에 사용된 프라이머는 Table 1에 별도로 표기하였다.

cis-regulatory element 분석

TAIR (<https://www.arabidopsis.org>)를 활용하여 CDS (coding sequence)의 상위 2 kb 프로모터 영역을 획득하였으며, PlantPAN 3.0 (<https://www.plantpan.its.ncku.edu.tw>)를 사용하여 프로모터 영역에 존재하는 cis-regulatory element를 확인하였다[24,25].

합성프로모터 제작 및 식물 형질전환

cis-regulatory element가 조합된 합성프로모터는 Integrated DNA Technology를 통해 합성을 진행하였다. 제작된 합성프로모터들은 *SpeI*과 *BamHI*의 제한효소를 통해 pCB308 벡터[26]에 삽입하여 재조합 벡터를 제작하였다. 재조합 벡터들은 아그로박테리움(GV3101)을 이용한 floral dip method [27]를 통해 실시하였다.

조직 GUS 염색 및 정량적 GUS 활성 분석

조직 β -glucuronidase (GUS) 염색은 가뭄 스트레스 처리된 애기장대와 대조군을 함께 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA)를 함유하는 GUS 반응 혼합물에 24시간 침지 후, 70% ethanol을 사용하여 염록소를 제거하여 확인하였다[28]. 염록소가 제거된 애기장대는 Leica사(Wetzlar, DEU)의 EZ4E 모델 현미경을 사용하여 관찰하였다. GUS 단백질의 활성을 측정은 4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside의 분해 산물인 4-methylumbelliferone을 Spectra Max Gemini XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 측정하였다[29]. 단백질의 농도는 Bradford reagent (Bio-Rad, CA, Hercules, USA)를 통해 정량 분석하였다[30]. GUS 단백질의 활성은 밀리그램 단백질 당 분당 피코 몰 4-methylumbelliferone으로 표현되었다.

식물 원형질체 분리 및 Transient activity assay

합성프로모터의 성능을 확인하기 위하여 애기장대의 잎으로부터 원형질체를 추출하고[31] effector와 reporter 벡터는 pTrGUS 벡터[32]를 제작하여 실험하였다. Effector 벡터의 구축을 위하여는 *DREB1A* (At4g25480) 및 *DREB2C* (At2g40340)의 cDNA를 CaMV 35S 프로모터 하류에 삽입시켰고, reporter 벡터는 합성프로모터를 *GUS* 리포터 유전자 상류에 삽입하여 제작하였다. 이렇게 제작된 effector 및 reporter 벡터는 원형질체 내부로 도입시켜 실험하였다[33]. Effector와 reporter 벡터를 동시에 형질전환시킨 원형질체는 상온에서 12시간 반응시킨 후 생성된 GUS 단백질을 추출하고, 이를 이용한 반응의 분해 산물인 4-methylumbelliferone을 Spectra Max Gemini XS (Molecular Devices)로 정량하였다. Effector 및 reporter의 형질전환 수율은 Neuraminidase (NAN)을 형질전환을 통해 보정하였다[34].

통계 분석

모든 실험 결과는 3회 반복으로 시행하여 평균 $\pm$ 표준편차 (standard deviation, SD)를 사용해 표기하였다. 통계 분석은 Student's t-test를 사용하여 *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

가뭄 스트레스에 반응하는 프로모터 선별

애기장대 내에서 가뭄 스트레스에 특이적으로 반응하는 유전자를 선별하기 위해 기존의 논문들을 통해 가뭄 스트레스 내성 유전자들을 선정하였다(Table 2). 선정된 가뭄 스트레스 내성 유전자들은 시간대별로 자연 건조를 통해 가뭄 스트레스 처리된 애기장대 및 가뭄 스트레스 해소된 애기장대 내의 mRNA의 양을 RT-PCR을 통해 측정하였다(Fig. 1). 그 결과, 애기장대의 잎과 뿌리에서 가뭄 스트레스가 증가할수록 모든 가뭄 스트레스 내성 유전자의 mRNA의 양이 증가함을 확인할 수 있었다. 하지만 자연 건조 후 2시간과 4시간 뒤의 애기장대를 새로운 배

Table 2 List of drought stress resistance gene

AGI Locus Identifier	Gene name	Biological/molecular function	Reference
AT2G39800	ATP5CS, DELTA1-PYRROLINE-5-CARBOXYLATE SYNTHASE 1, P5CS1	ABA, Cold, Osmotic, Salinity	[12]
AT3G50970	LOW TEMPERATURE-INDUCED 30, LTI30, XERO2	Cold, Drought,	[17]
AT2G46680	ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 7, ATHB-7, ATHB7, HB-7, HOMEBOX 7	Drought, ABA	[11]
AT1G07430	AIP1, AKT1 INTERACTING PROTEIN PHOSPHATASE 1, ATAIP1, HAI2, HIGHLY ABA-INDUCED PP2C GENE 2, HON	ABA signaling, Drought	[16]
AT5G06760	ATLEA4-5, LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT 4-5, LEA4-5	Drought	[14]
AT1G56600	ATGOLS2, GALACTIONL SYNTHASE 2, GOLS2	Drought	[13]
AT2G20880	ATERF53, ERF DOMAIN 53, ERF53	Drought, salt, osmotic stress, ABA	[15]
AT5G52310	COLD REGULATED 78, COR78, LOW-TEMPERATURE-INDUCED 78, LTI140, LTI78, RD29A, RESPONSIVE TO DESICCATION 29A	ABA, Salt, Drought	[10]

Fig. 1 Reverse-transcriptase PCR showing the expression of genes responsive to drought stress. Total RNA was extracted from the leaves (A) and/or roots (B) of *Arabidopsis thaliana* Col-0. *A. thaliana* Col-0 was dried for 0, 0.5, 1, 2, 4 hours in clean bench and the samples dried for 2, 4 h were transferred to fresh media for re-watering and grown for 2 days. The RT-PCR product of *Actin8* was used as a control

Fig. 2 Venn diagram representing prediction transcription binding site of stress-inducible promoters. The numbers in the Venn diagram indicate the number of TF-matrix-ID or TF-motif-sequence found to be shared among the indicated promoters. Specific-inducible promoter involved *PP2C*, *LEA4-5*, *ATGOLS2*, *ERF53*, *RD29A*. Continuous-inducible promoter involved *P5CS1*, *LTI30*, *ATHB-7*. Non-inducible promoter involved promoter that does not response to drought stress

Fig. 3 Design strategy of the synthetic promoters. Different TF-matrix-ID are marked with different color rectangles and approximately placed according to their actual position on the promoter. Rectangles indicated the forward strand of DNA

지로 옮겨 가뭄 스트레스를 해소한 애기장대 잎의 *P5CS1* (At2g39800), *LTI30* (At3g50970), *ATHB-7* (At2g46680) 유전자의 경우에는 mRNA의 양이 감소하지 않았으며, *PP2C* (At1g07430), *LEA4-5* (At5g06760), *ATGOLS2* (At1g56600), *ERF53* (At2g20880), *RD29A* (At5g42310) 유전자의 경우에는 mRNA의 양이 감소하였다(Fig. 1A). 이와 유사하게 애기장대의 뿌리에서도 같은 결과를 보였다(Fig. 1B). 이 결과는 *PP2C*, *LEA4-5*, *ATGOLS2*, *ERF53*, *RD29A* 유전자의 경우 가뭄 스트레스에 의해 발현이 유도되며, 가뭄 스트레스가 해소된 조건에서는 발현이 억제되는 것으로 보아 각 유전자의 프로모터는 가뭄 스트레스에 특이적으로 발현이 조절되는 *cis-regulatory element*를 가질 것으로 생각된다.

가뭄 스트레스에 특이적인 *cis-regulatory element* 선별 및 합성프로모터 설계

RT-PCR을 이용한 가뭄 스트레스에 대한 유전자의 mRNA의 발현량 변화를 바탕으로 가뭄 스트레스에 특이적인 *cis-regulatory element* 선별을 위해 각 유전자를 3개의 그룹으로 나누어 분석을 진행하였다. *PP2C*, *LEA4-5*, *ATGOLS2*, *ERF53*, *RD29A*는 specific-inducible promoter, *P5CS1*, *LTI30*, *ATHB-7*는 continuous-inducible promoter, 가뭄 스트레스에 반응하지 않은 유전자는 non-inducible promoter로 분류하였다. 각 그룹에 해당하는 유전자들의 프로모터 영역의 *cis-regulatory element*를 분석한 결과, specific-inducible promoter는 42개, Continuous-inducible promoter는 71개의 공통적인 TF-matrix-ID가 있음을 확인하였다(Fig. 2A, B). 또한, 각 그룹에서 공통적인 TF-matrix-ID와 non-inducible promoter를 분석한 결과에서는 31개의 공통적인 TF-matrix-ID가 존재하며, specific-inducible promoter만 가지는 3개의 TF-matrix-ID, specific-inducible promoter와 continuous-inducible promoter의 공통적인 2개의 TF-matrix-ID가 있음을 확인하였다

(Fig. 2C). 이 결과는 specific-inducible promoter이 가지는 3개의 TF-matrix-ID는 가뭄 스트레스에 특이적인 요소로 판단되며, specific-inducible promoter와 continuous-inducible promoter의 공통적인 2개의 TF-matrix-ID는 가뭄 스트레스에 반응하기 위한 요소로 판단된다. 3가지 그룹에 공통적인 31개의 TF-matrix-ID는 프로모터로 작용하기에 최소한의 요소라 생각된다. 상기의 결과를 바탕으로 합성프로모터의 제작을 위해 36개의 TF-matrix-ID를 선정하였다(Table 3). 합성프로모터의 제작은 가뭄 스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되고, 가뭄 스트레스 해소에 의해 발현이 빠르게 감소하는 *ERF53*과 *RD29A*의 프로모터를 이용하였다(Fig. 1). 특히, *ERF53* 유전자[16,35,36]와 *RD29A* 유전자[10,37,38]는 가뭄, 염해 등과 같은 비 생물학적 스트레스에 의해 발현이 유도되는 결과와 일치한다. 따라서, *ERF53* 유전자의 상위 2 kb 영역의 프로모터와 *RD29A* 유전자의 상위 1 kb 영역의 프로모터에서 각 TF-matrix-ID에 해당하는 *cis-regulatory element*의 서열만 남기고 해당하지 않는 DNA 서열은 제거하여 각각 BL1 및 BL2의 합성프로모터를 설계하였다(Fig. 3).

가뭄 스트레스에 대한 합성프로모터의 발현 양상과 활성 분석
합성프로모터에 의해 유도된 *GUS* 유전자의 발현은 *GUS* 반응 혼합물에 의해 확인되었다(Fig. 4). 본 실험에서는 음성 대조군으로 pCB308 (공 벡터)가 형질전환된 식물을 사용하였으며, 양성 대조군으로는 기존에 스트레스에 의해 유도된다고 잘 알려진 *RD29A* 프로모터와 *GUS* 유전자가 연결된 벡터가 형질전환된 식물을 대표적으로 사용하였다[10,37,38]. *RD29A* 프로모터와 *GUS* 유전자가 연결된 벡터가 형질전환된 식물, BL1 프로모터 및 BL2 프로모터와 *GUS* 유전자가 연결된 벡터가 형질전환된 식물은 가뭄 스트레스에 반응하여 *GUS* 염색이 증가하였다. 특히, 정상적인 생육조건 및 스트레스 해소 조건에서 2개의

Fig. 4 Histochemical localization of β -glucuronidase (GUS) activity in transgenic *Arabidopsis* plants. *Arabidopsis* plants containing various promoter constructs were grown on 1/2 MS agar for 8 days. After 8 days, the samples were transferred to PEG agar and grown for 3 days. Each of samples was transferred to fresh 1/2 MS agar. The transferred transgenic plants were grown during 3 days for re-watering

합성프로모터(BL1, BL2)는 *RD29A* 프로모터보다 GUS 염색이 적었다. 그러나, 음성 대조군으로 사용된 pCB308 (공 벡터) 형질전환 식물은 가뭄 스트레스에 상관없이 염색이 되지 않았다. 합성프로모터의 반응성을 정량적으로 분석하기 위해 GUS 단백질의 활성을 측정하였다(Fig. 5). 앞에서의 GUS 단백질의 활성을 측정한 결과 *RD29A* 프로모터, BL1 프로모터 및 BL2 프로모터가 형질전환된 식물은 가뭄 스트레스에 의해 GUS 단백질의 활성이 각각 약 49배, 17배, 10배가 증가하였다(Fig. 5A). 이와 유사하게 뿌리에서도 GUS 단백질의 활성이 각각 약 5배, 15배, 6배가 증가함을 확인하였다(Fig. 5B). 그러나, pCB308이 형질전환된 식물은 가뭄 스트레스와 상관없이 잎과 뿌리 모두에서 GUS 단백질의 활성 차이가 없었다. 특히, 잎과 뿌리에서 *RD29A* 프로모터가 형질전환된 식물의 GUS 단백질의 높은 활성은 가뭄 스트레스가 해소된 조건에서도 발현되었던 단백질들이 많이 남아있어 활성이 높은 수준으로 존재하는 것으로 생각된다. 이런 결과는 Yamaguchi-Shinozaki와 Shinozaki의 연구 [39]로 보고된 *RD29A* 프로모터는 가뭄 스트레스에 반응하여 높은 수준으로 발현이 유도되어 가뭄 스트레스에 적응 및 대처가 높을 수 있지만, 가뭄 스트레스 상황이 지난 후에도 유도되었던 단백질의 활성이 남아있어 정상적인 생육 상태로 회복하기에는 다소 효율적이지 못할 것으로 생각된다. 이에, 2개의 합성 프로모터(BL1, BL2)는 가뭄 스트레스에 의해 유도되는 발현량은 낮으나 가뭄 스트레스 상황이 해소되었을 경우, 유도되었던 단백질의 활성이 거의 남아있지 않기 때문에 정상적인 생육 상태로 효율적으로 회복할 수 있을 것이라 예상되며, turn on 및

off가 가능한 합리적인 프로모터라고 생각된다.

Transient activity assay

2개의 합성프로모터(BL1, BL2)가 가뭄 스트레스뿐만 아니라 다른 비 생물학적 스트레스에도 반응하는지 확인하기 위하여 비 생물학적 스트레스 중 추위에 의해 발현이 유도되는 전사조절인자인 DREB1A [40]와 고온에 의해 발현이 유도되는 전사조절인자인 DREB2C [41]에 대한 반응성을 조사하였다. 비 생물학적 스트레스인 추위 및 고온에 의해 유도되는 대표적인 전사조절인자인 DREB1A와 DREB2C에 대한 합성프로모터의 반응성 확인은 애기장대 잎으로부터 추출한 원형질체를 이용한 transient activity assay를 통해 수행되었다. 추출된 원형질체 내부로 effector 벡터, reporter 벡터 및 internal control 벡터를 PEG를 이용하여 동시에 형질전환 시켰다(Fig. 6A). Effector로는 DREB1A 또는 DREB2C 전사조절인자를 사용하였고, reporter로는 합성프로모터인 BL1과 BL2 프로모터를 *GUS* 유전자 앞에 삽입한 것을 사용하였고, internal control로는 NAN 단백질을 사용하였다. 그 결과 effector 벡터를 넣어 주지 않고 reporter 벡터만 넣어준 대조 구보다 DREB1A 전사조절인자는 positive control로 사용한 *RD29A* 프로모터와 합성프로모터인 BL1 프로모터, BL2 프로모터에 각각 약 26배, 3배, 23배 정도의 *GUS* 유전자의 발현을 활성화하였다(Fig. 6B). DREB2C 전사조절인자는 *RD29A* 프로모터와 합성프로모터인 BL1 프로모터, BL2 프로모터에 각각 약 17배, 3배, 13배 정도의 *GUS* 유전자의 발현을 활성화하였다(Fig. 6C). 이 결과는 본 연구에서

Table 3 List of selected *cis*-regulatory element

TF-matrix-ID	<i>cis</i> -regulatory element	TF-family
TF_motif_seq_0237	AGATA, AGATG, CGATG, GGATA, GGATG, TGATA, AGATC	GATA;tify
TF_motif_seq_0239	AAAGA, AAAGC, AAAGT, AAGGA, AAGGT	Dof
TF_motif_seq_0240	ACGTC, ACGTT, ACGTA, ACGTG	bZIP
TF_motif_seq_0241	ATTAA, ATTAC, ATTAG, ATTAT	ZF-HD
TF_motif_seq_0243	GATAA, GATAC, GATAG, GATAT	GATA;tify
TF_motif_seq_0246	TGACA, TGACG	Homeodomain;TALE
TF_motif_seq_0248	AACAG, AACGA, AACTG, AATGG, ACCGG, ATCGG, TACGG, AAAGG, AACGT, AAGGG, CACGG	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0249	AAGTG, ACATG, ACTTG, AGGTG, ATGTG, ACGCG	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0252	GGATT, AGATT	Myb/SANT;MYB;ARR-B
TF_motif_seq_0254	ATATA, ATCAA, ATCCA, ATCGA, ATCTA, ATCTC, ATCTG, ATCTT, ATGTA, ATTAA, TTCTA, ACCTA, CTCTA	AP2;ERF
TF_motif_seq_0257	ACAAT, CAAAT, CCAAA, CCAAG, CCAAT, CCATT, CCCAT, CGAAT, CTAAT, GCAAT, TCAAT, CCAAT, CCTAT	NF-YB;NF-YA;NF-YC
TF_motif_seq_0258	ACGAC, CCCAC, CCGAA, CCGAC, CCGTC, CTGAC, CAGAC, TCGAC	Dehydrin
TF_motif_seq_0261	AAGAC, GAAAC, GAGAA, GAGAC, GAGAG, GAGAT	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0263	ACCAC, GCCAA, GCCAT, GCCGC, GCCTC, GGCAC, TCCAC, GACAC, GCCAC	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0265	GGACC, GGGCT, GGGGC, GGTCC, GGGCC, GTGCC	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0267	GGTAC, GTGAC, GTTAA, GTTAC, GTTAG, GTTAT, GTTCC, GTTGC, GTTTC, CTTAC, GTAAC, GTCAC	Trihelix
TF_motif_seq_0268	TGATT, CGATT	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0270	TGACC, TGACT	WRKY
TF_motif_seq_0271	TGAAG, TGAGG, TGATG, TGCCG, TTACG, AGACG, CGACG	bZIP
TF_motif_seq_0275	TAGAC, TGGAC, TTCAC, TTGAA, TTGAC, TTGAG, TTGAT, TTGGC, TTGTC, TTTAC, ATGAC	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0300	CACGTC, CACGTT, CACATG, CACGCG, TACGTG	bHLH
TF_motif_seq_0302	CAATTG, CATGTG, CATTTG	bHLH
TF_motif_seq_0321	GAAAAA, GAAAAT, GATAAT, GGAAAA, GATAAA, GGTAAT	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0343	AAACAAA, AAACACA, AAACAAT, AAACAGA	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0349	ACCGACT, ACTGACA, ACAGACA, ACCGACA, GCCGACA	(Others)
TF_motif_seq_0377	TAACAAG, TAACACG, TAACATA, TAACAAA	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0410	ATAAGTTT, ATACACGT, ATACATT, ATACGTTA, ATACCTAT, ATACGTGT, TTACGTAT	bHLH
TFmatrixID_0131	AAAAAATAAA, TTGTATAAA, ACGTATAAA, AGGAATAAA, CAGGATAAA, TAAAATAAA, TATAATAAA	AT-Hook
TFmatrixID_0136	AAAATAAA, ATAATAAA	AT-Hook
TFmatrixID_0193	ACACAAGT, ACACGTTA, ACACTTCT, ACATGGGT, ACACGCGT, ACATGAGT	bZIP
TFmatrixID_0357	GGAATATTCT	Myb/SANT;G2-like;MYB
TF_motif_seq_0009	AAGTCAAAGC, ACATCTTAGT, ACGTCATCTT, ACATCATTC, ACGACGTAAA, ACGTCACACC	(Motif sequence only)
TF_motif_seq_0450	TGACGACA, TGACTTGA, TTACGTCG, CGACGTAA, TGACATCA, TGACCACA, TGACGTCA	(Motif sequence only)
TFmatrixID_0005	AAATTAATTA	AT-Hook
TFmatrixID_0007	TAATTAAGTA, AAATTAATTT	AT-Hook
TFmatrixID_0227	CATTGAAGA, AGTTTGAAAG	TCR;CPP

제작한 합성프로모터가 가뭄 스트레스뿐만 아니라 저온 및 고온에 해당하는 비 생물학적 스트레스에도 발현을 유도할 수 있으므로, 다양한 비 생물학적 스트레스 환경에 효과적으로 대응 가능할 수 있을 것으로 사료된다. 종합적으로 상기의 결과들로

부터 가뭄 스트레스에 특이적인 *cis*-regulatory element의 조합을 통한 합성프로모터는 가뭄 스트레스에 효율적으로 발현이 유도되는 것으로 판단되며, 추가적인 연구를 진행한다면 기존에 알려진 가뭄 스트레스 관련 *cis*-regulatory element 외에 새로운

Fig. 5 Comparison of GUS activities of synthetic promoters in transgenic *Arabidopsis*. Total protein was extracted from the leaves (A) and/or roots (B) of transgenic *Arabidopsis* plants. The *Arabidopsis* plants containing various promoter constructs were exposed to water deficit condition. The samples grown on 1/2 MS agar and then transferred to PEG agar. Each of samples was transferred to fresh 1/2 MS agar for re-watering. Plant carrying *RD29A-GUS* was used as inducible-expressive control. T2 transformed *Arabidopsis* plants were sampled to quantify GUS activity. Average GUS activities (pmol product min⁻¹ mg protein⁻¹) were measured in five representative transgenic lines. Values are shown as the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, Student's t-test)

Fig. 6 Analysis of transcriptional activities of synthetic promoters using *Arabidopsis* protoplasts. Transcription factors were co-expressed in *Arabidopsis* leaf protoplast with the *GUS* reporter gene. (A) Diagram of the effector, reporter and internal control constructs used in the transcriptional activation assay. Transcriptional activation analysis showing the effects of the transcription factor on induction of DREB1A (B) and DREB2C (C). NAN activity was used as an internal control. Values are mean $\pm$ SD (n=3). (* p < 0.05, ** p < 0.01, Student's t-test)

cis-regulatory element의 조합을 선별하기 위한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이라 생각된다.

초 록

가뭄은 작물의 성장과 생산성을 방해하는 비 생물학적 스트레스 중 하나다. 비 생물학적 스트레스에 대응하기 위해서는 식물이 불리한 환경 조건에서 스트레스에 나타내는 분자 조절 네트워크를 이해해야 한다. 비 생물학적 스트레스 (가뭄에 대응)에 대처할 수 있는 조합을 선별하기 위한 실험에서 스트레스 조건에서만 발현되는 5개의 가뭄 스트레스 유도성 프로모터를 선별하였으며, 이 중 36개의 *cis*-regulatory element를 선별하였

다. 그 결과 가뭄 스트레스에서만 발현되는 유전자의 프로모터에서 *cis*-regulatory element를 새롭게 조합하여 미세 제어 조절을 할 수 있는 2 개의 합성프로모터(BL1, BL2)를 제작하였다. 합성프로모터를 포함한 형질전환식물(BL1-GUS, BL2-GUS)의 분석은 합성프로모터가 건조 조건에서 형질전환식물 내의 GUS 유전자의 발현을 증가시키는 것을 통하여 확인하였다. 또한 Transient activation assay를 통해 DREB1A와 DREB2C에 의해 합성프로모터가 활성화되는 것도 확인하였다. 이러한 결과는 가뭄 특이적인 *cis*-regulatory element의 조합에 의해 제작한 합성프로모터가 다양한 비 생물학적 스트레스에 반응하고, 식물의 성장 지연을 유발하지 않고 스트레스에 효과적으로 대응할 수 있을 것이라 예상할 수 있다.

Keywords 가뭄스트레스 · 미세 제어 조절 · 시스 조절 요소 · 합성프로모터

감사의 글 본 논문은 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(세부과제번호: PJ01365701)의 지원에 의해 이루어진 것임

References

- Daryanto S, Wang L, Jacinthe PA (2016) Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PLoS One* 11(5): e0156362
- Zhou Y, Tao Y, Zhu J, Miao J, Liu J, Liu Y, Yi C, Yang Z, Gong Z, Liang G (2017) GNS4, a novel allele of DWARF11, regulates grain number and grain size in a high-yield rice variety. *Rice* 10(1): 1–11
- Ramakrishna C, Singh S, Raghavendrarao S, Padaria JC, Mohanty S, Sharma TR, Solanke AU (2018) The membrane tethered transcription factor EcbZIP17 from finger millet promotes plant growth and enhances tolerance to abiotic stresses. *Sci Rep* 8(1): 1–14
- Yang L, Wu L, Chang W, Li Z, Miao M, Li Y, Yang J, Liu Z, Tan J (2018) Overexpression of the maize E3 ubiquitin ligase gene ZmAIRP4 enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem* 123: 34–42
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17(3): 287–291
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS* 103(35): 12987–12992
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* 10(2): 88–94
- Hernandez-Garcia CM, Finer JJ (2014) Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci* 217: 109–119
- Leavitt JM, Tong A, Tong J, Pattie J, Alper HS (2016) Coordinated transcription factor and promoter engineering to establish strong expression elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol J* 11(7): 866–876
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 236(2–3): 331–340
- Söderman E, Mattsson J, Engström P (1996) The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant J* 10(2): 375–381
- Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 254(1): 104–109
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 29(4): 417–426
- Hundertmark M, Hincha DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9(1): 118
- Bhaskara GB, Nguyen TT, Verslues PE (2012) Unique drought resistance functions of the highly ABA-induced clade A protein phosphatase 2Cs. *Plant Physiol* 160(1): 379–395
- Hsieh EJ, Cheng MC, Lin TP (2013) Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor AtERF53 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 82(3): 223–237
- Shi H, Chen Y, Qian Y, Chan Z (2015) Low temperature-induced 30 (LTI30) positively regulates drought stress resistance in *Arabidopsis*: effect on abscisic acid sensitivity and hydrogen peroxide accumulation. *Front Plant Sci* 6: 893
- Kim JS, Mizoi J, Yoshida T, Fujita Y, Nakajima J, Ohori T, Todaka D, Nakashima K, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2011) An ABRE promoter sequence is involved in osmotic stress-responsive expression of the DREB2A gene, which encodes a transcription factor regulating drought-inducible genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 52(12): 2136–2146
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol* 24(5): 701–713
- Kim HJ, Kim YK, Park JY, Kim J (2002) Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 29(6): 693–704
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9(10): 1859–1868
- De Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 111(2): 381–391
- Van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot* 51(350): 1555–1562
- Chang WC, Lee TY, Huang HD, Huang HY, Pan RL (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* 9(1): 561
- Mubeen H, Raza S (2010) In Silico approach to identify transcription factor binding sites and Cis-regulatory elements in tubulin gene promoter. *IJSPR* 6(5): 31–33
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40(4): 711–717
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16(6): 735–743
- Jefferson RA (1988) Plant reporter genes: the GUS gene fusion system. In *Genetic engineering* (pp. 247–263). Springer, Boston
- Vitha S, Beneš K, Michalova M, Ondřej M (1993) Quantitative β -glucuronidase assay in transgenic plants. *Biol Plant* 35(1): 151–155
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1–2): 248–254
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J (2007) *Arabidopsis* is mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2(7): 1565
- Ko JH, Kim WC, Han KH (2009) Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 60(4): 649–665
- Kim WC, Ko JH, Kim JY, Kim J, Bae HJ, Han KH (2013) MYB 46 directly regulates the gene expression of secondary wall-associated cellulose synthases in *Arabidopsis*. *Plant J* 73(1): 26–36
- Kirby J, Kavanagh TA (2002) NAN fusions: a synthetic sialidase reporter gene as a sensitive and versatile partner for GUS. *Plant J* 32(3): 391–400
- Gong W, He K, Covington M, Dinesh-Kumar SP, Snyder M, Harmer SL, Zhu YX, Deng XW (2008) The development of protein microarrays and their applications in DNA-protein and protein-protein interaction analyses of *Arabidopsis* transcription factors. *Mol Plant* 1(1): 27–41
- Cheng MC, Hsieh EJ, Chen JH, Chen HY, Lin TP (2012) *Arabidopsis* RGLG2, functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and

- negatively regulates the plant drought stress response. *Plant physiol.* 158(1): 363–375
37. Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) A combination of the Arabidopsis DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought-and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol* 45(3): 346–350
38. Msanne J, Lin J, Stone JM, Awada T (2011) Characterization of abiotic stress-responsive Arabidopsis thaliana RD29A and RD29B genes and evaluation of transgenes. *Planta* 234(1): 97–107
39. Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6(2): 251–264
40. Maruyama K, Takeda M, Kidokoro S, Yamada K, Sakuma Y, Urano K, Fujita M, Yoshiwara K, Matsukura S, Morishita Y, Sasaki R, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant physiol* 150(4): 1972–1980
41. Chen H, Hwang JE, Lim CJ, Kim DY, Lee SY, Lim CO (2010) Arabidopsis DREB2C functions as a transcriptional activator of HsfA3 during the heat stress response. *Biochem. Biophys Res Commun.* 401(2): 238–244