

포도 *VIASR* 유전자 프로모터의 분리 및 발현 분석

길준영 · 피재호*

단국대학교 분자생물학과 / 나노센서바이오텍연구소

Received July 31, 2007 / Accepted August 14, 2007

Cloning and Expression Analysis of a Grape *asr* gene, *VIASR* Containing a Promoter Region. Joon Yeong Kihl and Jaeho Pyee*. *Department of Molecular Biology and Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin-si, 448-701, Korea* - *VvMSA*, a grapevine ASR which is highly inducible by sugar and abscisic acid signals was previously shown to be a transcription factor for a hexose transporter gene *VvHT1*. We isolated a cDNA clone, *VIASR* which is regulated temporally during the grape berry development by ACP RT-PCR (annealing control primer reverse transcriptase-polymerase chain reaction) and it proved identical to *VvMSA*. RT-PCR and real-time PCR analyses revealed that the *VIASR* gene was expressed in berries at fruit set and that its expression increased as berries aged but decreased at the late ripening stage. In order to understand the regulatory mechanism of the *asr* gene, a genomic fragment was cloned from grapevine. The genomic DNA was 1375 bp long and a sugar box (sucrose box 3 and sucrose responsive element 1) was identified in the 611 bp upstream region of the open reading frame. Analysis of the *VIASR* promoter::reporter gene fusion demonstrated that this promoter was expressed in transgenic *Arabidopsis* even without sucrose treatment. This result suggests that the ASR/*VvHT1*-mediated sugar/ABA signaling, previously reported in grapevine, may not function in *Arabidopsis* which has no ASR homologue.

Key words – Grape *asr* gene, promoter, fruit ripening, sugar box

서 론

과실발달 과정에서 일어나는 생리 및 생화학적 변화에 대한 연구가 그동안 다양한 식물체를 대상으로 진행되어 왔다[15,32]. 그 중 tomato와 같은 climacteric fruit의 ripening 과정이 관심을 가장 많이 받아왔다[34]. Ripening은 color, texture, flavor 등 다양한 변화를 수반하는 과정이며, 이러한 변화는 대개 식물호르몬에 의해 조절된다. Climacteric fruit의 경우 ethylene과 abscisic acid (ABA)에 의한 조절 작용이 잘 알려져 있다[9,20]. 특히 ABA는 과실발달 과정에서 수분스트레스 반응에 관여한다[36]. 과실발달 과정에서 ABA 및 수분스트레스에 의해 조절되는 유전자로는 Iusem 등[18]에 의해 토마토에서 분리되어 처음 보고된 *asr* (abscisic acid, stress, ripening-induced) 유전자가 대표적인 것으로, 토마토의 pericarp 조직에서 ripening 시기에 많이 발현되고, 잎에서도 수분스트레스에 의해 발현이 유발된다. 토마토에는 3-4개의 *asr* 유사유전자가 gene family를 이루고 있으며, 이 중 *asr1*과 *asr2* 유전자는 염기 및 아미노산 서열에서 80% 이상 비슷하다[1]. 한편, pummelo [3], Chaco potato [31], taeda 소나무[4], 옥수수[25], 살구[24], 배[17], 백합[35], 벼[33], 포도[2] 등에서도 *asr* 유전자가 분리되었는데, 이들 유전자 사이에는 40-50% 정도의 유사성이 있다. 그러나 이들 유전자의

발현 패턴은 각기 서로 다른 조직 혹은 기관 특이성을 보인다. 예를 들어, taeda 소나무의 *asr* gene family의 경우 4개의 유사 유전자로 구성되어 있는데, 이 중 *lp3*과 *lp3-1c*는 각각 needle과 stem에서 수분스트레스에 의해 전사가 유발되거나 뿌리에서는 두 유전자 모두 항상 발현된다[26].

ASR은 alanine과 histidine이 특히 많은 13 kDa 크기의 염기성 단백질로서 이미 알려진 다른 단백질과는 유사성이 거의 없다. 그동안 여러 식물체로부터 분리된 ASR 단백질의 구조를 비교하면 흥미로운 사실을 발견할 수 있다. ASR 단백질은 N-단말과 C-단말에 각각 20여개와 80여개의 아미노산으로 구성된 conserved domain을 가지고 있으며, 이들 domain 사이에는 80% 이상의 유사성이 있다[21]. 특히 모든 ASR 단백질의 C-terminal domain에는, 30-40여개의 아미노산으로 구성된 putative nuclear targeting signal이 있다[14,16,26]. 한편, *E. coli*에서 발현된 단백질을 이용하여 immunolocalization 실험을 수행한 결과, ASR 단백질이 ripening 시기의 과실이나 수분스트레스를 받은 잎의 핵에서 검출되었다[22,23]. 이러한 결과로부터 ASR 단백질이 일종의 nonhistone chromosomal protein으로서, 핵 내 DNA topology를 변화시켜 chromatin 구조를 유지하는데 관여할 것으로 제안되었다[29]. 그러나 실험적인 증거는 아직 제시되지 못했다. 최근, Cakir 등이 포도 ASR (*VvMSA*) 단백질이 sugar 신호 및 ABA 신호 전달과정에 관여하며, hexose transporter 유전자의 전사를 조절한다는 것을 밝혔다[2]. 특히 *VvMSA* 유전자가 hexose transporter 유전자와 함께 su-

*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3197, Fax : +82-31-8005-3191

E-mail : jpyee1@dankook.ac.kr

crose 및 ABA에 의해 발현이 유도되며, hexose transporter 유전자의 프로모터에 있는 sugar box (sucrose box 3 및 sucrose responsive element 1)가 ASR 단백질이 결합하는 cis-element임을 동정하였다[2,10,11].

지금까지 토마토[29], melon [14], 야생감자(*Solanum tuberosum*) [7] 등으로부터 각각 *asr* 유전자의 프로모터가 분리되었다. 이 중 토마토의 *asr2* 프로모터는 형질전환체에서 ABA에 의해 발현이 유도되었으나 *Solanum tuberosum*의 *StDS2* 프로모터는 ABA에 의해서는 변화가 없고, drought에 의해서만 발현이 유도되었다. 그러나 melon의 *asr* 프로모터에 대해서는 더 이상 보고된 바 없다. 한편, 포도 *asr* 유전자가 hexose transporter 유전자 *VvHT1*의 전사를 조절하고[2], 이것으로부터 *asr* 유전자가 ripening 과정에서 중요한 역할을 하는 sugar 신호와 ABA [6] 신호의 crosstalk에 관여할 가능성이 제시되었기 때문에, sugar sensing 및 signaling 과정에서 이 유전자의 기능을 규명하는 것은 매우 흥미로운 연구가 될 것이다. 따라서 본 연구진은 sugar 신호전달계 상에서 포도의 *asr* 유전자의 조절기작을 밝히기 위해, 먼저 이 유전자의 프로모터를 분리하고, 프로모터 내에 sugar 반응과 연관이 있는 cis-element를 동정하고자 하였다. 이 논문은 본 연구의 일부 결과를 포함하고 있다.

재료 및 방법

실험 재료

농업진흥청 산하의 수원 원예연구소의 포도 과원 (*Vitis labracana* cv. Campbell early)에서 개화시기부터 일주일 간격으로 과실을 수확하였다. 착립 후 8 주부터는 수확한 포도 과실로부터 과육과 과피를 분리하여 각각 액체 질소로 급냉시킨 뒤, -80°C에 보관하였다. 또한 포도의 잎, 줄기 그리고 뿌리도 같은 방법으로 채취하여 -80°C에 보관하였다.

Total RNA 분리

-80°C에 보관되어 있는 재료로부터 5 g을 채취하여 막자사발에 옮겨 고운 가루로 만든 후, 25 ml의 extraction buffer (2% CTAB, w/v; 1.4 M NaCl; 1% PVP, w/v; 0.2% β-mercaptoethanol, v/v; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.4 g PVPP/g)를 첨가한 다음, 40 ml의 polypropylene tube로 옮겨 70°C의 항온 수조에서 5분간 정치시켰다. 이후 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 13,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮겨서 0.6 배의 isopropanol을 넣고, -20°C에서 30 분간 침전시킨 뒤, 13,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. Pellet에 0.6 ml의 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리 멸균 증류수를 넣고 녹여서 1.5 ml의 eppendorf tube로 옮긴 다음, 동량의 4 M LiCl를 넣고 4°C에서 12~14 시간 정치

시킨 다음 원심 분리하였다. Pellet을 70% ethanol로 씻고, 30~50 μl의 DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80°C에 보관하며 사용하였다. Total RNA의 정량은 UV Spectrophotometer (BIO-RAD)를 사용하였으며 1.8%의 formaldehyde - agarose gel에서 RNA 분리 상태를 확인하였다.

ACP based GeneFishing RT-PCR

포도 과실의 발달 시기 중 착립 후 1 주와 4 주 시료로부터 분리한 total RNA를 사용하여 ACP (annealing control primer) RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) (씨젠, 한국) 실험을 수행하였다. 증폭된 PCR product를 agarose gel 상에 전개하여 두 시료 간에 발현 차이가 확실한 DNA 밴드를 분리하여 TOPO TA cloning vector (Invitrogen)에 클로닝 하였다.

염기 서열 분석

(주)마크로젠(한국)에서 dideoxy chain termination 방법을 이용하여 각 클론의 염기서열을 작성하였으며, NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 TIGR (<http://www.tigr.org/>) database를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 프로모터 내 cis-element의 분석은 PLACE (Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements) database [12]와 PlantCARE (Plant Cis-Acting Regulatory Element) database [28]를 이용하여 수행하였다.

Semi-quantitative real time RT-PCR

10 unit M-MLV (Promega), 2 μg total RNA, 1× RT buffer, 0.5 mM dNTPs 및 30 pmole oligo dT를 혼합하고 DEPC-water로 최종 20 μl를 맞춘 후, 37°C에서 1 시간, 75°C에서 5 분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 1× buffer, 0.2 mM dNTP, 0.25 pmol primer, 0.05× SYBER Green 그리고 0.025 unit Taq polymerase (Bioworld)를 혼합하고 멸균된 증류수를 넣어 총 20 μl가 되도록 한 다음, PCR 반응을 수행하였다. Sense primer로는 5' -GCTCATGGAA AGAAGCATCA CCATC-3' 를, anti-sense primer로는 5' -AAGGGTTCA CAAGGACACA CAGAG-3' 을 사용하였다. Real time PCR은 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)를 사용하였으며, 반응조건은 94°C에서 5 분간 일차 처리한 다음, 95°C 30 초, 58°C 30 초, 72°C 30 초로 설정된 증폭주기를 총 40회 반복하였다.

Northern blot 분석

각 조직별, 그리고 시기별 시료로부터 추출한 RNA 20 μg에 loading buffer를 넣고 70°C에서 10 분간 처리한 후, 1 μl의 ethidium bromide (0.1 mg/ml)를 넣고 1.8% formaldehyde가 포함되어 있는 1.3% agarose gel에서 50 V로 전

기영동하였다. 전기영동한 gel을 DEPC-water로 15 분 세척하고 20× SSC 용액으로 20분 동안 침윤시킨 뒤, Sambrook 등의 방법으로 membrane에 옮긴 후 UV cross linker (Fisher)로 고정시켰다[30]. Membrane을 5× SSC, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 0.2% (w/v) SDS, 1% blocking reagent가 포함된 pre-hybridization 용액에 넣고 60°C에서 2 시간 동안 교반시켰다. Pre-hybridization이 끝난 뒤, probe를 넣고 55°C에서 18 시간 hybridization 반응을 시켰다. Probe로는 cDNA 클론을 주형으로 DIG-dUTP (Roche)와 함께 PCR을 수행한 후 PCR product를 사용하였으며, primer를 포함한 반응조건은 RT-PCR 실험과 동일하였다. 혼성화반응이 끝난 후 1차 washing buffer (2× SSC, 0.1% SDS)로 실온에서 15분씩 3회 세척하고 다시 2차 washing buffer (0.5× SSC, 0.1%)로 55°C에서 15분간 세척하였다. CSPD detection kit (Roche)을 사용하여 X-ray film에 감광시켰다.

Genomic DNA 분리

Doyle & Doyle 방법을 이용하여 total genomic DNA를 분리하였다[8]. 포도 잎 2 g을 액체 질소를 이용하여 고운 가루로 간 뒤, 10 ml의 CTAB buffer (0.25 M NaCl, 0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 2.5% PVP, 50 mM EDTA, 0.1% β-mercaptoethanol)에 넣고 70°C에서 10분 동안 배양하였다. 동량의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1/v:v:v)을 넣은 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 다음, 상층액을 회수하였다. 이곳에 다시 동량의 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 넣고 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액의 부피에 0.6 배에 해당하는 isopropanol을 넣어 -20°C에서 30분간 방치한 다음, 13,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. Pellet을 70% ethanol로 세척한 다음 100 μl의 멸균된 증류수를 넣어 녹였다. RNA가 남아 있을 경우에는 RNase (10 mg/ml)를 사용하여 RNA를 제거하였다.

GenomeWalker PCR

GenomeWalker kit (CLONTECH)을 이용하여 포도 genomic DNA로부터 genomic DNA library를 제작하였다. 이를 주형으로 1× PCR buffer와 함께 0.2 pmol adaptor primer 1 (AP1), 0.2 pmol gene specific primer 1 (GSP1), 1.1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.05 unit Taq polymerase를 넣고 PCR 반응을 수행하였다. 94°C에서 10 초, 64°C에서 3 분 반응 7 회, 94°C에서 10 초, 60°C에서 3 분 반응 32 회를 반복한 다음, 마지막에 추가적으로 60°C에서 7 분간 반응시켰다. AP1과 GSP1 primer는 각각 5'-GTAATACGAC TCACTATAGG GC-3', 5'-ACCCAGGAAA CAAGACACAA ACTCATCCA-3' 이었다. 첫 번째 PCR product를 1/50로 희석해서 주형으로 사용하고, 1× PCR buffer와 함께 0.2 pmol adaptor primer 2 (AP2), 0.2 pmol gene specific primer 2 (GSP2), 1.1 mM

MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.05 unit Taq polymerase를 넣고 2차 PCR 반응을 수행하였다. 94°C에서 5 초, 64°C에서 3 분 반응 5 회, 94°C에서 5 초, 60°C에서 3 분 반응 25 회를 반복한 다음, 마지막에 추가적으로 67°C에서 7 분간 반응시켰다. AP2과 GSP2 primer는 각각 5'-ACTATAGGGC ACGCGTGGT-3' 와 5'-CGCGGCAATC TCTTCTTCTA TCTTGTGCT-3' 이었다. PCR product를 1.5% agarose gel에 전개하여 size를 확인한 다음, gel 상에서 보이는 band를 Gel extraction kit (GENECLEAN® Turbo Kit, Q-Biogene)을 이용하여 정제하고 TOPO-TA cloning vector에 클로닝하였다.

VIASR promoter (VIASRp)::GUS construct 제작

pBI121 vector DNA를 HindIII와 XbaI으로 처리하여 35S CaMV promotr 부위를 제거하고, 여기에 PCR을 통해 genomic clone으로부터 증폭한 VIASR promoter 부위를 치환하여 VIASR promoter (VIASRp)::GUS construct를 제작하였다. PCR 반응에 사용한 sense 및 antisense primer는 각각 5'-GGAAGCTTCG ATGGCCCGGG CTGGTA-3', 5'-GGTCTAGAGG TGGTGGTGAT GATCAA-3' 이었다.

Arabidopsis thaliana 형질전환

제작된 VIASR promoter (VIASRp)::GUS construct를 사용하여 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain을 형질전환하였다[13]. *Arabidopsis* 형질전환은 23°C에서 약 2 주간 키운 *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0에 floral-dip method를 사용하여 수행하였다[5]. T1 형질전환체로부터 얻은 seed를 파종한 다음 23°C 식물배양기에 배양하여 2 주간 발아시킨 후, seedling을 0, 50, 100 mM sucrose 용액에 0-24 시간 처리하였다.

Histochemical GUS assay

Sucrose 용액으로 처리한 seedling을 1 mM X-glucuronic acid (X-gluc)를 포함한 GUS solution (50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide)에 넣고 37°C에서 24 시간 반응시켰다. Dehydration은 25, 50, 70, 90% 에탄올에 각각 30 분씩 방치한 후, 마지막으로 70% 에탄올에 넣어서 색소를 완전히 제거하였다[19]. GUS 발현은 해부현미경(Alpha SYSTEC SV-35)을 이용하여 촬영하였다.

결과 및 고찰

VIASR 유전자 프로모터의 분리

포도 과실의 발달 시기 중 착립 후 1 주와 4 주 시료로부터 분리한 total RNA를 사용하여 ACP RT-PCR GeneFishing 실험을 수행하였다. 증폭된 PCR product를 agarose gel 상에

전개하여 두 시료 간에 발현 차이가 확실한 DNA 밴드를 분리하여 TOPO TA cloning vector에 클로닝하고 DEG (differentially expressed gene) 클론이라 명명하였다(Fig. 1). 이 중 *DEG11*을 선택하여 염기서열을 작성하였다. *DEG11* 클론은 총 447 개의 염기로 구성되어 있으며, BLAST database를 이용하여 염기서열을 분석한 결과, 2003년 Cakir 등에 의해 포도에서 분리되어 보고된 *asr* 유전자 (*VvMSA*)와 몇 개의 뉴클레오티드를 제외하고는 일치하였다[2]. 또한 토마토 등 다른 식물체에서 분리된 *asr* 유전자와 매우 유사하였다. Open reading frame(ORF)에서 유래된 polypeptide의 아미노산 서열은 다른 ASR 단백질의 C-terminus 부분과 80% 이상 유사하였다(data unpublished). 따라서 이 *DEG11* 클론을 *VIASR* 유전자로 명명하고 다음 실험을 수행하였다. 먼저 이 유전자의 전체 ORF와 프로모터를 분리하기 위해 확보된 염기서열을 토대로 primer를 제작하고 이를 이용하여 GenomeWalker PCR을 수행하였다. PCR 산물을 agarose gel에 전개하여 최소한 500 bp 이상되는 절편을 골라 TOPO TA cloning vector에 클로닝하였다. 이로부터 총 1,375 개의 염

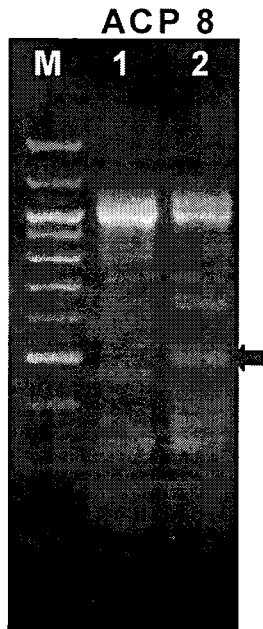


Fig. 1. ACP-based GeneFishing PCR for identification of differentially expressed genes (DEGs) from grape berry. Messenger RNA (mRNA) was isolated from grape berries one and four weeks post-flowering and employed for ACP RT-PCR using the protocol in the kit. PCR products were separated on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide for visualization. Bands for differentially expressed genes (DEGs) were excised from the gel for further cloning and sequencing. The arrow indicates a PCR product designated *DEG11*. Lane M, molecular marker; 1, one week; 2, four weeks post-flowering.

기로 구성된 클론을 얻을 수 있었으며, 이 유전자 클론은 open reading frame region내에 100 개의 nucleotide로 구성된 intron을 포함하고 있다(Fig. 2). Intron의 경계에는 GT, AG를 포함하는 conserved splicing site가 존재한다. 또한 비록 전사개시 부위가 확실치는 않지만 약 600 bp의 프로모터를 포함하고 있다(Fig. 2).

VIASR 유전자의 발현 특이성

포도 과실의 발달 단계별로 *VIASR* 유전자의 발현양상을 분석하기 위해 Semi-quantitative real time RT-PCR을 수행하였다. 그림 3(A)에서 보는 것처럼, 이 유전자는 fruit set (착과) 시기에 검출되기 시작하여 과실이 발달하면서 점점 더 증가하여 착과 후 10 주에 가장 많이 발현되었다. 착과 후 7-8 주는 과피에 색소가 침착되고 과육이 ripening되기 시작하는 veraison 시기인데, *VIASR* 유전자는 이 시기에 급격히 많이 발현되기 시작하다가 성숙기 후반에는 도리어 발현량이 감소하였다. 이러한 발달 단계별 유전자 발현 패턴은 northern blot 분석 실험을 통해서도 다시 확인되었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 이미 Cakir 등에 의해 포도에서 분리된 *asr* 유전자 (*VvMSA*)의 발현 양상과 매우 흡사하다[2]. 다른 식물체와는 달리 포도 내에는 *asr* 유전자가 single copy로 존재할 가능성이 매우 높기 때문에[2] 이처럼 품종이 서로 달라 발현 특징이 유사할 것으로 판단된다. 특이한 점은 착과 후 8-12 주 시료의 경우에 수확 후 과피와 과육을 분리하여 사용하였는데, *VIASR* 유전자는 과육에 비해 과피에 훨씬 더 많이 발현되었다. 과피에 더 많이 발현되는 현상은 본 연구진에 의해 수행된 다른 독립적인 실험을 통해서도 확인되었다. 즉, mRNA differential display 방법을 이용하여 ripening 시기에 포도 과피에서 더 많이 발현되는 유전자를 클로닝한 결과, 그 중 한 개의 유전자(*CAP71*, AF176655)가 *VIASR* 유전자로 밝혀졌다(data unpublished). 조직별 발현 패턴을 비교하면 *VIASR* 유전자는 과실에 비해 잎에서는 매우 적은 양 발현되며, 꽃이나 뿌리에서는 거의 검출되지 않았다(Fig. 3B). 이상의 결과는 이 유전자가 주로 포도 과실의 ripening 시기에 어떤 기능을 하며 이러한 역할이 과육보다는 과피에서 더 활발히 이루어지고 있음을 시사하고 있다. 포도 ASR (*VvMSA*) 단백질이 sugar 신호 및 ABA 신호 전달 과정에 관여하고 hexose transporter 유전자의 전사를 조절한다는 점에 비추어볼 때[2], 이 유전자가 당 대사(sugar metabolism)가 활발히 일어나는 과육보다 과피에서 더 많이 발현된다는 것은 매우 특이한 현상이다. 다만, 과피가 외부 환경요인에 대한 보호 기능을 위해 다양한 이차대사산물을 생산하며, 많은 이차대사산물이 배당체 형태로 액포에 저장된다[37]는 점에서, ASR과 hexose transporter 단백질이 관여하는 sugar sensing/signaling 체계가 과피에서 어떤 역할을 하는지는 앞으로 좀 더 연구되어야 할 것이다.

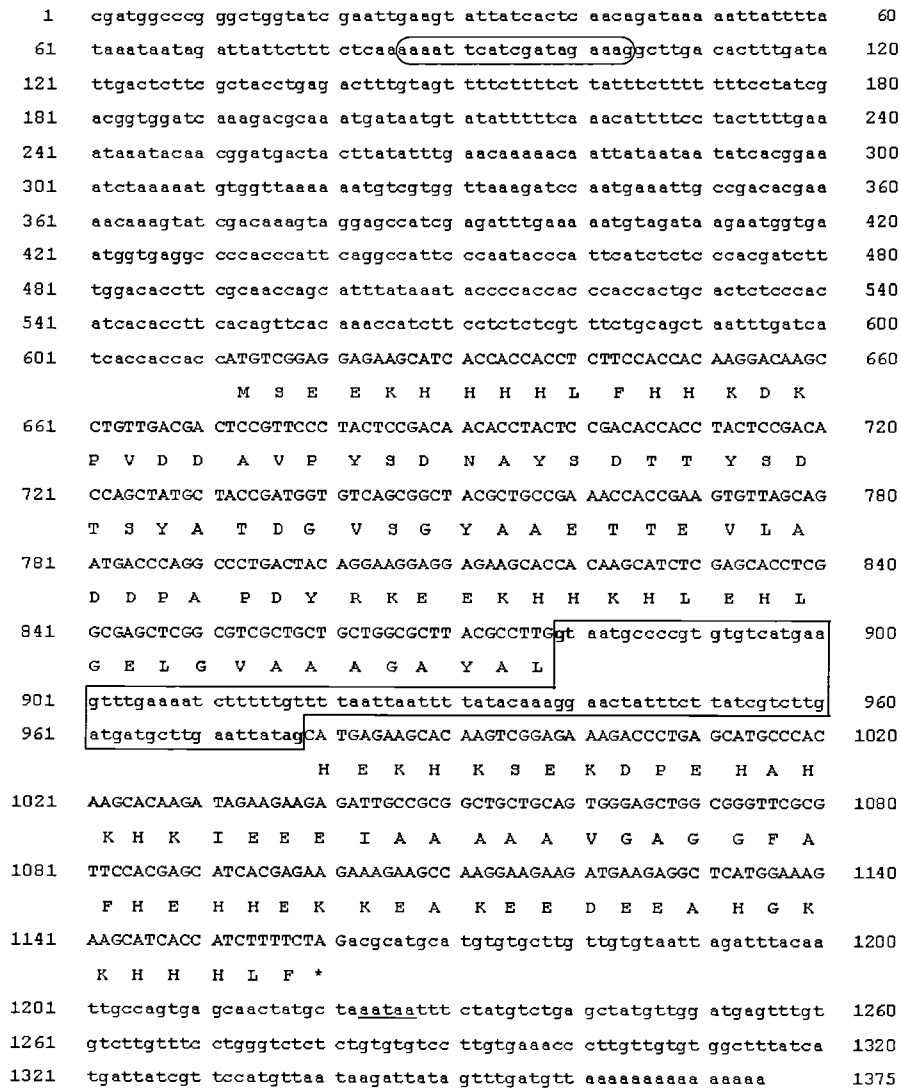


Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the grapevine *VIASR* gene. The 5' - and 3' -untranslated regions are indicated in lower-case letters. The underlined sequences indicate a putative poly-adenylation signal. The star designates the stop codon. The bold letters represent the conserved sequences of splicing sites. Rectangle box designates an intron and the ellipse indicates S3S1 box (sucrose box 3 and sucrose responsive element 1).

VIASR 유전자 프로모터내 cis-element 동정

Sugar 신호 및 ABA 신호에 의해 hexose transporter 유전자 *VoHT1*의 전사가 증가하고 이러한 전사 조절에 *asr* 유전자가 관여한다는 점에서, *asr* 유전자는 sugar 및 ABA 신호전달계상에서 hexose transport의 상위에 존재한다[2]. 그러나 *asr* 유전자를 조절하는 또 다른 전사 조절인자에 대해서는 전혀 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구자들은 포도 *asr* 유전자의 조절기작을 밝히기 위해, 이 유전자의 프로모터를 분리하였다. GenomeWalker PCR을 통해 확보한 총 1,375 bp의 genomic DNA 절편은 비록 전사개시 부위를 확인하지 않았지만 약 600 bp의 프로모터를 포함하고 있다(Fig. 2). 특히 *asr* 유전자도 sugar 및 ABA에 의해 전사가 증가한다는 연구

결과를 바탕으로[2], *asr* 유전자의 프로모터 내에 sugar나 ABA 반응과 연관이 있는 cis-element가 있는 지를 동정하였다. PLACE (Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements) database [12]와 PlantCARE (Plant Cis-Acting Regulatory Element) database [28]를 이용하여 프로모터 내 cis-element를 분석한 결과, sugar 신호전달과 연관이 있는 것으로 알려진 sugar box인 sucrose box 3 (S3, 5' -AAAATCA---TAA-3') [11]와 sucrose responsive element 1 (S1, 5' -AATAGAAAA-3') [10]과 유사한 cis-element가 확인되었다(Fig. 4). 한편, ABA 반응과 연관이 있는 ABRE (ABA response element)는 동정되지 않았다. 물론, 분리된 *VIASR* 유전자 프로모터의 길이가 600 여 bp로 비교적 짧기 때문에 보

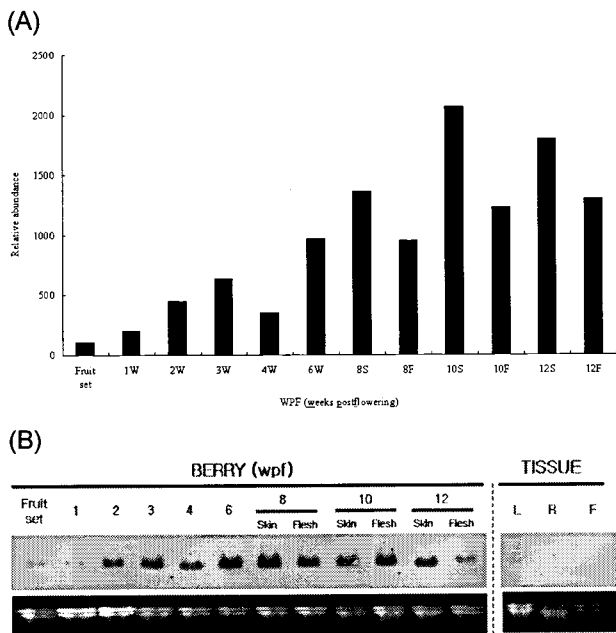


Fig. 3. Real time RT-PCR and northern blot analyses of the VIASR gene expression in berries and other tissues. (A) Semi-quantitative real time RT-PCR analysis of the VIASR gene during grape berry development. RNA levels were determined by real-time RT-PCR using total RNAs isolated from grape berry sampled at fruit set and 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks post-flowering (wpf). (B) Northern blot analysis of the VIASR gene during grape berry development and in various tissues. Total RNAs were isolated from leaf (L), root (R), flower (F) and grape berry sampled at different developmental stages, subjected to electrophoresis, transferred to nylon membranes and hybridized with the corresponding DIG-labeled cDNA probe. Ribosomal RNA (rRNA) is shown as an RNA loading control. Skin and flesh tissues were separated from berries sampled 8, 10 and 12 weeks post-flowering.

다 더 5'-upstream에 위치하는 ABA 조절 부위가 동정되지 않았을 수도 있다. 혹은 전혀 다른 cis-element를 가지고 있을 수도 있다. 실제로 *L. esculentum* (L20756), *S. tuberosum* (AJ320154) 및 *C. melo* (AF426404) 등에서 분리된 *asr* 유전자의 프로모터에 대해 같은 방법으로 cis-element를 분석한 결과, ABRE가 *S. tuberosum*를 제외하고는 훨씬 upstream에 위치해 있으며, ABA에 의해 조절되는 유전자인 포도 hexose transporter 유전자 *VvHT1* (AJ001062)에서도 ABRE 부위는 -1 kb 이상에 위치한다(Fig. 4). *VvHT1* 프로모터에 있는 sugar box (S3 및 S1)에 ASR 단백질이 결합하여 sucrose에 의한 전사조절을 매개한다고 보고되었는데[2], 특이한 점은, *asr* 유전자의 프로모터에도 완전하지는 않지만 sucrose box가 존재한다는 것이다. 이 sucrose box에 ASR 단백질이 결합하여 self-regulation이 가능한지 혹은 전혀 새로운 조절인자가 결합하는지는 앞으로 더 규명해야 할 부분이다.

Arabidopsis 형질전환체를 이용한 VIASR 프로모터 분석

지금까지 토마토[28], melon [14], 야생감자(*Solanum tuberosum*) [7] 등으로부터 *asr* 유전자 프로모터가 분리되었으며, 이 중 토마토와 야생감자의 *asr* 유전자에 대해서는 형질전환체를 이용하여 프로모터의 조절 기능이 연구되었다. 토마토의 *asr2* 프로모터는 ABA에 의해 발현이 유도되었으나, *Solanum tuberosum*의 *StDS2* 프로모터는 ABA에 의해서는 변화가 없고, 대신 drought에 의해서만 조절되었다. 그러나 melon의 *asr* 프로모터에 대해서는 더 이상 보고된 바가 없다. 한편, 포도 *asr* 유전자가 hexose transporter 유전자 *VvHT1*의 전사를 조절하고[2], ripening 과정에서 중요한 역할을 하는 sugar 신호와 ABA 신호의 crosstalk에 관여할 가능성이 제시되었기 때문에[6], 본 연구진은 sugar sensing 및 signaling 과정에 이 유전자가 연관되어 있는지를 알아보았다. Sugar 신호에 의해 포도 *asr* 유전자의 전사가 조절되는

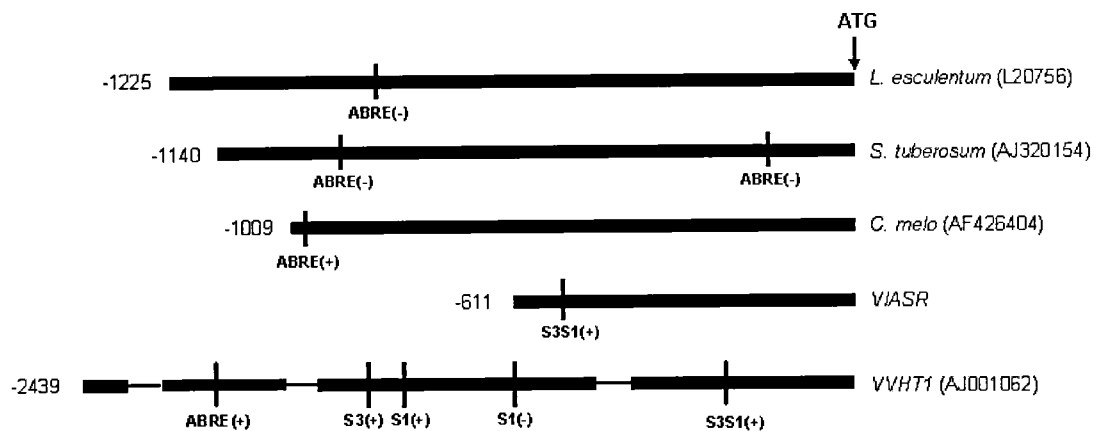


Fig. 4. Conserved DNA sequence motifs in the 5' upstream regions of the *asr* homologous genes from grapevine and other plants. Heavy black lines represent the 5' upstream region of the homologous gene. ABRE, ABA-response element [27]; S3, sucrose box 3; S1, sucrose responsive box 1 [2]. + and - represent plus and minus strand of double-stranded DNA, respectively.

지를 확인하기 위해, 먼저 이 유전자 프로모터와 reporter 유전자(GUS)를 연결한 *VIASRp::GUS* construct를 제작하고 이를 *Agrobacterium* 방법으로 *Arabidopsis*에 도입하였다. 파종한 지 2 주된 *Arabidopsis* 형질전환체의 seedling을 각각 50 mM 및 100 mM 농도의 sucrose 용액에 0-24 시간 처리한 후, GUS 발현 양상을 분석하였다. Sucrose 농도와 시간 등 처리 조건과는 상관없이 GUS가 항상 발현되었으며, sucrose를 처리하지 않은 형질전환체에서도 프로모터가 작동하였다(Fig. 5). 이러한 결과는, *VIASR* 프로모터에 있는 sugar box (5' -AAAA(T)TCA--GATAGAAAG-3')가 *VvHT1* 유전자의 S3S1 box (5' -TAAATCA--GATAGAAAG-3') [2]와는 완전히 동일하지 않아서 생길 것으로 볼 수도 있다. 또 다른 가능성은 *asr* 유전자가 없는 *Arabidopsis*에서는 *ASR/VvHT1*을 매개로 하는 sugar/ABA 신호전달계가 작동되지 않아서 생길 수도 있다. 즉 *VIASR* 프로모터에 sugar box가 있다고

하더라도, 이러한 *asr* 유전자의 on/off를 조절하는 조절인자가 *Arabidopsis*에 없으면 형질전환체가 GUS를 항상 발현하게 된다는 가정이다. 이것에 대한 결론은 보다 더 긴 *asr* 유전자 프로모터를 분리하여, 일련의 연구가 더 진행되어야 규명될 것으로 보인다. 이러한 연구가 성공적으로 수행될 경우, 포도 과실발달과정에서 ABA 호르몬의 작용 및 수분스트레스에 대한 반응과 sugar 신호전달계의 기작을 규명하는데 중요한 기초자료를 제공할 것이다.

요 약

포도 ASR (*VvMSA*) 단백질은 hexose transporter 유전자 *VvHT1*의 전사를 조절하는 조절 인자 중의 하나로서 sugar 및 abscisic acid (ABA) 신호에 의해 발현이 유도된다. 본 연구진은 ACP RT-PCR (annealing control primer reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 포도 과실발달 과정에서 조절되는 유전자 중 *VvMSA*와 동일한 cDNA (*VIASR*)를 클로닝하였다. 이 유전자는 착과 시기에 발현되기 시작하여 과실이 발달하면서 점점 증가하여 착과 후 10 주에 가장 많이 발현되며, 숙기 후반에는 도리어 발현양이 감소하였다. 포도 *asr* 유전자의 조절기작을 밝히기 위해, 이 유전자의 genomic clone을 분리하였다. 총 1375 bp로 이루어진 이 유전자 절편에는 open reading frame과 100 bp의 intron을 포함하고 있다. 약 600 bp 길이의 프로모터 내에는 sugar 신호전달과 연관이 있는 것으로 알려진 sugar box (sucrose box 3 +sucrose response box 1)가 있다. 프로모터 절편을 reporter 유전자와 연결하여 *Arabidopsis*에 도입하고 형질전환체를 분석한 결과, reporter 유전자는 sucrose 처리와 상관없이 항상 발현되었다. 이러한 결과는 포도에서 보고된 *ASR/VvHT1*를 매개로 하는 sugar/ABA 신호전달계가 *asr* 유전자가 없는 *Arabidopsis*에서는 작동되지 않음을 시사하고 있다.

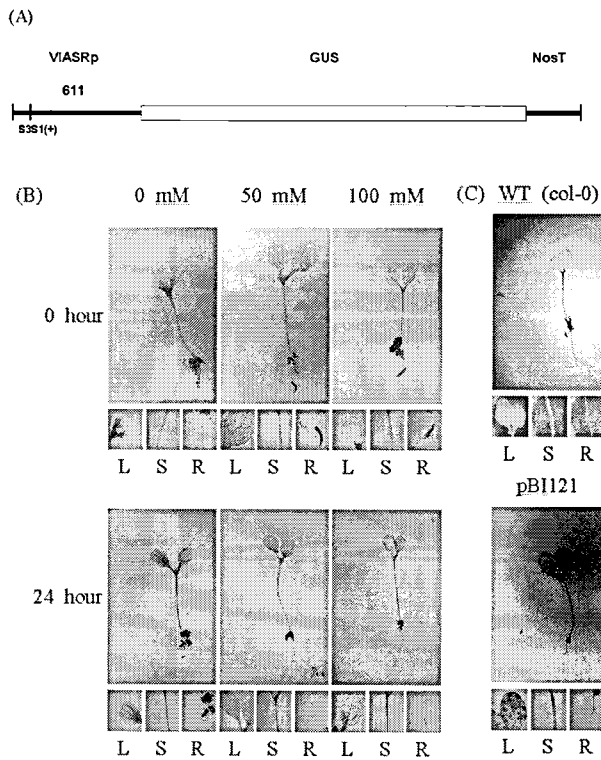


Fig. 5. Histochemical staining of transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing the *GUS* gene driven by *VIASR* promoter. (A) A schematic diagram of the construct *VIASR* promoter (*VIASRp*):*GUS* reporter gene. (B) Histochemical staining of transgenic *Arabidopsis* seedlings. Seedlings were dipped in 0, 50 or 100 mM sucrose for 0, 12 or 24 hr, applied to GUS staining and photographed using an anatomical microscope. (C) Wild type (Col-0) and pBI121 were used as negative and positive control, respectively. L, S, and R represent leaf, stem, and root, respectively.

감사의 글

이 논문은 단국대학교 2005년도 교내연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고 문헌

1. Amitai-Zeigerson, H., P. A. Scolnik and D. Bar-Zvi. 1994. Genomic nucleotide sequence of tomato *asr2*, a second member of the stress/ripening-induced *asr1* gene family. *Plant Physiol.* **106**, 1699-1700.
2. Cakir, B., A. Agasse, C. Gaillard, A. Saumonneau, S. Delrot and R. Atanassova. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell*

- 15, 2165-2110.
3. Canel, C., J. N. Bailey-Serres and M. L. Roose. 1995. Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol.* **108**, 1323-1325.
 4. Chang, S., J. D. Puryear, D. M. Dias, E. A. Funkhouser, R. J. Newton and J. Cairney. 1996. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol. Plantarum* **97**, 139-148.
 5. Clough, S. J. and A. F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
 6. Coombe, B. G. 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 101-110.
 7. Dóczy, R., C. Csanaki and Z. Bánfalvi. 2002. Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*. *Plant Cell and Environment* **25**, 1197-1203.
 8. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**, 13-15.
 9. Finkelstein, R. R. and S. I. Gibson. 2002. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 26-32.
 10. Grierson, C., J. S. Du, S. De Torres Zabala, K. Beggs, C. Smith, M. Holsworth and M. Bevan. 1994. Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene. *Plant J.* **5**, 815-826.
 11. Hattori, T., S. Nakagawa and K. Nakamura. 1990. High level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown in vitro on sucrose medium. *Plant Mol. Biol.* **14**, 595-604.
 12. Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) databases: 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**, 297-300.
 13. Hoefgen, R. and L. Willmitzer. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9877.
 14. Hong, S. H., I. J. Kim, D. C. Yang and W. I. Chung. 2002. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J. Exp. Bot.* **53**, 2271-2272.
 15. Hrazdina, G., G. F. Parsons and L. R. Mattick. 1984. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **35**, 220-227.
 16. Huang, J. C., S. M. Lin and C. S. Wang. 2000. A pollen-specific and desiccation associated transcript in *Lilium longiflorum* during development and stress. *Plant Cell Physiol.* **41**, 477-485.
 17. Itai, A., K. Tanabe, F. Tamura and T. Tanaka. 2000. Isolation of cDNA clones corresponding to genes expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai): involvement of the ethylene signal transduction pathway in their expression. *J. Exp. Bot.* **51**, 1163-1166.
 18. Iusem, N. D., D. M. Bartholomew, W. D. Hitz and P. A. Scolnik. 1993. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol.* **102**, 1353-1354.
 19. Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporters* **5**, 387-405.
 20. Lucille, A. and G. Don. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* **53**, 2039-2055.
 21. Maskin, L., E. Gustavo, G. Gudesblat, J. E. Moreno, F. Carrari, N. Frankel, A. Sambade, M. Rossi and N. D. Iusem. 2001. Differential expression of the members of the *asr* gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* **161**, 739-746.
 22. Maskin, L., N. Frankel, G. Gudesblat, M. J. Demergasso, L. I. Pietrasanta and N. D. Iusem. 2007. Dimerization and DNA-binding of *ASR1*, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **352**, 831-835.
 23. Maskin, L., S. Maldonado and N. D. Iusem. 2007. Tomato leaf spatial expression of stress-induced *ASR* genes. *Mol. Biol. Rep.* Epub ahead of print. 2007 Jun 30.
 24. Mbeguie-A-Mbeguie, D., R. M. Gomez and B. Fils-Lycaon. 1997. Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-, stress-, ripening-induced (*ASR*)-like protein from apricot fruit. *Plant Physiol.* **115**, 1287-1289.
 25. Meyer, P. 1995. Understanding and controlling transgene expression. *Trends in Biotechnol.* **13**, 332-337.
 26. Padamanabhan, V., D. M. Dias and R. J. Netwon. 1997. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Mol. Biol.* **35**, 801-807.
 27. Pla, M., J. Vilardell, M. J. Guiltinan, W. R. Marcotte, M. F. Niogret, R. S. Quatrano and M. Pagès. 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.
 28. Rombauts, S., P. Dehais, M. Van Montagu and P. Rouze. 1999. PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element databases. *Nucl. Acids Res.* **27**, 295-296.
 29. Rossi, M. and N. D. Iusem. 1994. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. *Plant Physiol.* **104**, 1073-1074.
 30. Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. Molecular Cloning: A laboratory Manual. pp. 7.35-7.40, 3rd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 31. Silhavy, D., G. Hutvágner, E. Barta and Z. Bánfalvi. 1995. Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 587-595.
 32. Stephanie, K. C. and G. D. May. 1997. Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol.* **115**, 463-469.
 33. Vaidyanathan, R., S. Kuruwila and G. Thomas. 1999. Characterization and expression pattern of an abscisic

- acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Sci.* **140**, 21-30.
34. Vrebalov, J., D. Ruezinsky, V. Padmanabhan, R. White, D. Medrano, R. Drake, W. Schuch and J. Giovannoni. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science* **296**, 343-346.
35. Wang, C. S., Y. E. Liao, J. C. Huang, T. D. Wu, C. C. Su and C. H. Lin. 1998. Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress. *Plant Cell Physiol.* **39**, 307-314.
36. Welbaum, G. E., T. Tissaoui and K. J. Bradford. 1990. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) : III. Sensitivity of germination to water potential and abscisic acid during development. *Plant Physiol.* **92**, 1029-1037.
37. Yazaki, K. 2005. Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 301-307.