

Analysis of Putative Downstream Genes of Arabidopsis AtERF71/HRE2 Transcription Factor using a Microarray

Hye-Yeon Seok, Sun-Young Lee, Dong-Hyuk Woo, Hee-Yeon Park and Yong-Hwan Moon*

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Received August 2, 2012 / Revised September 16, 2012 / Accepted October 5, 2012

Arabidopsis AtERF71/HRE2, a transcription activator, is located in the nucleus and is involved in the signal transduction of low oxygen and osmotic stresses. In this study, microarray analysis using *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants was performed to identify genes downstream of AtERF71/HRE2. A total of 161 different genes as well as *AtERF71/HRE2* showed more than a twofold higher expression in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants compared with wild-type plants. Among the 161 genes, 24 genes were transcriptional regulators, such as transcription factors and DNA-binding proteins, based on gene ontology annotations, suggesting that AtERF71/HRE2 is an upstream transcription factor that regulates the activities of various downstream genes via these transcription regulators. RT-PCR analysis of 15 genes selected out of the 161 genes showed higher expression in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants, validating the microarray data. On the basis of Genevestigator database analysis, 51 genes among the 161 genes were highly expressed under low oxygen and/or osmotic stresses. RT-PCR analysis showed that the expression levels of three genes among the selected 15 genes increased under low oxygen stress and another three genes increased under high salt stress, suggesting that these genes might be downstream genes of *AtERF71/HRE2* in low oxygen or high salt stress signal transduction. Microarray analysis results indicated that *AtERF71/HRE2* might also be involved in the responses to other abiotic stresses and also in the regulation of plant developmental processes.

Key words : Arabidopsis, *AtERF71/HRE2*, transcription activator, microarray, downstream genes

서 론

식물은 다양한 환경 스트레스에 직접 노출되어 있으며, 이에 의해 성장과 발달이 저해되어 생산성의 심각한 감소가 일어난다[19]. 식물은 이러한 여러 환경 스트레스에 적응하기 위해 세포 내 신호전달 과정을 통한 방어 기작을 가지도록 진화해 왔다[19,20]. 복잡하고 다양한 신호전달 경로를 거쳐 핵 내로 전달된 환경 스트레스 신호는 방어에 관여하는 여러 유전자의 전사를 활성화 시키며, 이러한 활성화는 주요 전사인자에 의해 조절되며 이로 인해 식물은 환경 스트레스에 대한 저항성을 가지게 된다. 따라서, 전사인자는 다양한 방어 유전자의 전사과정을 동시에 조절함으로써, 식물의 환경 스트레스에 대한 신호전달 과정을 조작하는데 강력한 수단이 된다[3]. 애기장대의 경우 유전자의 5% 이상이 전사인자에 해당하는 것으로 밝혀졌으며, AP2/ERF, bZIP/HD-ZIP, MYB, WRKY 또는 zinc-finger 등의 DNA-결합 도메인을 가지는 여러 전사인자가 다양한 종류의 스트레스에 반응하여 발현되어 스트레스에 대한 반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[26].

애기장대의 경우, AP2/ERF family 전사인자는 145개의 유

전자로 구성되며, AP2/ERF DNA-결합 도메인 염기서열의 상동성을 기준으로 AP2 subfamily, RAV subfamily, DREB/CBF subfamily, ERF subfamily의 네 개 subfamily로 분류된다[8,9,27]. 이들 유전자는 다양한 생물 스트레스 및 환경 스트레스 자극뿐만 아니라 에틸렌, jasmonic acid 등에 반응하여 관련된 유전자의 발현을 조절한다[9,27]. DREB/CBF subfamily에 속하는 유전자는 환경 스트레스, 특히 건조와 저온에 반응하여 하위 유전자의 발현을 유도하는데[34], DRE/CRT로 알려진 *cis*-acting element를 인지하여 하위 유전자의 발현을 조절한다[31,34]. RAV subfamily 유전자는 B3-like 도메인과 AP2/ERF 도메인을 모두 가지고 있는 것으로 알려져 있다[16]. 에틸렌에 반응하는 AP2/ERF 유전자는 모두 ERF subfamily에 속하며, 애기장대의 경우 60여 개 유전자가 ERF subfamily에 포함되어 있다[23,27]. 일반적으로 ERF subfamily 전사인자는 GCC box로 알려진 *cis*-acting element를 인지하는 것으로 보고되어 있다[11]. 하지만 최근 연구결과에 따르면, ERF subfamily에 속하는 일부 전사인자는 DRE/CRT *cis*-acting element에도 결합하는 것으로 밝혀졌다[33,36,38].

이전 연구 결과에 따르면 *AtERF71/HRE2*는 ERF subfamily에 속하는 전사인자를 암호화하는 유전자이며, 특히 ERF subfamily의 다양한 subgroup 중 subgroup VII에 속한다[23,27]. *AtERF71/HRE2*는 저산소 및 고염, 건조 등의 삼투 스트레스

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2592, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : moonyh@pusan.ac.kr

에 의해 발현이 증가하며 특히 저산소에 의해 발현이 매우 강하게 증가하는 유전자이다[13,21,24]. 또한 *AtERF71/HRE2*의 과발현 형질전환체는 저산소 및 저산소를 유발하는 침수, 그리고 고염과 건조에 대해 저항성을 보여[21,24], 저산소 및 삼투 스트레스 등의 환경 스트레스 신호전달 과정에서 중요한 기능을 할 것으로 생각된다. *AtERF71/HRE2* 외에도 벼의 *Sub1*, *SK1*, *SK2*를 비롯하여 애기장대의 *AtERF73/HRE1*, *RAP2.12*, *RAP2.2* 등이 같은 subgroup VII에 속하며, 이들 유전자는 저산소 스트레스 반응에서 역할을 하는 것으로 알려져 있다[12,14,21,25,37]. 일반적으로 저산소 스트레스에 대한 신호전달 과정에는 에틸렌이 중요한 것으로 알려져 있는데, *AtERF71/HRE2*는 에틸렌에 의해 조절되지 않는 에틸렌-비의 존적 경로를 통해 기능을 수행할 것으로 생각되고 있다[13]. 최근 연구결과에 따르면 *AtERF71/HRE2*는 핵에 위치하고 C-말단 부위에 전사활성화 활성을 가져, 다른 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 작용할 것으로 예상된다[24]. 하지만 저산소 또는 삼투 스트레스 신호전달에 있어서, *AtERF71/HRE2*에 의해 발현이 조절되는 하위 유전자는 아직 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 *AtERF71/HRE2*의 과발현체를 대상으로 마이크로어레이 실험을 수행하여 *AtERF71/HRE2*에 의해 발현이 조절되는 하위 유전자를 조사함으로써 *AtERF71/HRE2*에 의해 매개되는 신호전달 과정을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료 및 생장 조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 Col-0 ecotype을 사용하였다. 애기장대 종자는 70% 에탄올에서 1분, 10% 클로락스에서 10분간 표면살균한 뒤 증류수로 4회 이상 세척하고, 4°C 암조건에서 2일 동안 두어 춘화처리한 다음, 비타민 B5, 1.5% sucrose, 0.7% microagar가 포함된 MS (Murashige and Skoog) [22] 배지에 발아하였다. 발아된 애기장대 종자는 22°C의 단일 조건(광조건 8시간/암조건 16시간)에서 키웠다. *AtERF71/HRE2* 과발현 형질전환체는 기존 연구에서 제작된 것을 사용하였다[24].

마이크로어레이 수행 및 분석

단일 조건에서 발아한 후 14일된 야생형과 *AtERF71/HRE2* 과발현 형질전환체의 유식물체로부터 Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하고, Agilent Bioanalyzer (Agilent technologies, CA, USA)로 분리한 total RNA의 상태를 검사하였다. 샘플당 1 µg의 total RNA를 Low Input Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies, CA, USA)를 이용하여 C₃로 표지한 뒤, 표지된 RNA를 50 µl 혼성화용액(Agilent technologies, CA, USA)과 섞어주었다. 혼합

액을 Agilent SurePrint Arabidopsis 4x44k array (Agilent technologies, CA, USA) 상에 떨어뜨리고 Gasket 4-plex slide (Agilent technologies, CA, USA)로 덮은 후 65°C 오븐에서 17시간 동안 혼성화 시켰다. 혼성화 된 슬라이드를 Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent technologies, CA, USA)의 buffer 1로 상온에서 1분간 세척하고, buffer 2로 37°C에서 1분간 세척한 후, 3,000 rpm에서 20초간 원심분리하여 건조시켰다. 마이크로어레이는 Agilent scanner를 이용하여 분석하였으며, 유전자 발현 레벨은 Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent technologies, CA, USA)을 이용하여 계산하였다.

Genevestigator 데이터베이스 분석

마이크로어레이 데이터베이스인 Genevestigator 데이터베이스를 이용하여 유전자 발현 변화를 분석하였다. Genevestigator 데이터베이스 분석은 인터넷 웹페이지 <https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp> 에서 수행하였으며, 애기장대의 ATH1: 22k array platform에서 수행하였다.

프로모터 분석

프로모터 부위는 각 유전자의 전사개시 서열을 +1로 하였을 때 5' upstream 방향에 위치하는 서열을 사용하였다. 먼저, 이웃하는 유전자와 같은 방향으로 발현되는 경우, 해당 유전자의 5' upstream 서열이 1,500 bp 이상일 때는 -1,500 ~ -1 bp를 분석에 사용하였으며, 5' upstream 서열이 1,500 bp 미만일 때는 5' upstream 서열 전체를 분석에 사용하였다. 이웃하는 유전자와 반대 방향으로 발현되어 5' upstream 서열을 공유할 경우, 공유하는 5' upstream 서열이 100 bp 이상일 때는 5' upstream 서열의 절반을 분석에 사용하였고, 100 bp 미만일 때는 조사대상에서 제외하였다. 프로모터에 존재하는 cis-acting element 분석은 Plant Cis-acting Regulatory DNA Element (PLACE)의 인터넷 웹페이지 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>에서 수행하였다.

저산소, 고염 스트레스 처리

저산소와 고염 스트레스 처리에는 단일 조건에서 발아한 후 10일된 야생형 유식물체를 이용하였다. 저산소 스트레스 처리를 위하여 액체 MS 배지로 적신 필터 종이 위에 야생형 유식물체를 넣고 암상태에서 99.9% 질소가스를 0, 1, 3, 6시간 동안 처리하였다. 고염 스트레스 처리를 위하여 300 mM NaCl로 적신 필터 종이 위에 야생형 유식물체를 넣고 0, 2, 4, 8시간 동안 처리하였다.

Total RNA 분리 및 semi-quantitative RT-PCR

식물체에서 total RNA는 Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 5 µg total RNA에 2 unit RNase-free DNase I (Promega, WI, USA)을 처리한 후, 2 µM

poly-T 프라이머, 10 mM dNTP mixture, 200 unit M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RNA 발현량을 확인하기 위해, 합성한 cDNA를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 유전자-특이적인 프라이머는 Table 1에 나타내었다. PCR 반응은 1 µl cDNA, 1 unit F-taq DNA 중합효소(Solgent, Korea), 25 pmole 프라이머(정방향, 역방향), 0.5 mM dNTP mixture, 5 µl 10x 완충용액을 포함하는 50 µl 반응액에서 수행하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 변성 후, 94°C에서 45초, 56°C에서 45초, 72°C에서 45초의 PCR cycles을 반복하고, 72°C에서 10분간의 추가 신장 단계를 거쳐 수행하였

다. RT-PCR의 cycle은 *GAPc*는 24 cycles, 그 외에 유전자는 27-30 cycles를 수행하였다.

결과 및 고찰

AtERF71/HRE2 과발현체 대상 마이크로어레이 분석

이전 연구에서 *AtERF71/HRE2*의 과발현체와 T-DNA 삽입 돌연변이체를 대상으로 기존에 알려진 ABA-의존 및 ABA-비의존 경로에서 작용하는 환경 스트레스 반응 유전자의 발현을 조사한 결과, 조사한 유전자 모두 야생형에서의 발현과 별다른 차이를 보이지 않았다[24]. 이러한 결과는 *AtERF71/HRE2*

Table 1. List of primers used for semi-quantitative RT-PCR

Genes	Orientation	Sequences
<i>GAPc</i>	Forward	5'-CACTTGAAGGGTGGTGCCAAG-3'
<i>GAPc</i>	Reverse	5'-CCTGTTGTGCGCAACGAAGTC-3'
<i>AtERF71/HRE2</i>	Forward	5'-ATCTGTACAGAGGGATAAAGG-3'
<i>AtERF71/HRE2</i>	Reverse	5'-CATCAGGTCTCCGATAAAGC-3'
<i>ADHI</i>	Forward	5'-GAAACAGAGTCTGCCGTGAC-3'
<i>ADHI</i>	Reverse	5'-TGCTGCCTTCTCGGTAGAGA-3'
<i>RD29A</i>	Forward	5'-TGAATGTGGCTAAACCCAAG-3'
<i>RD29A</i>	Reverse	5'-GATGAGTCTTGAAGGCATCG-3'
At5g62430	Forward	5'-CCTCGCCATTTTGTAAAGC-3'
At5g62430	Reverse	5'-ACTGGCATGCTCCAATAAAGG-3'
At1g71030	Forward	5'-GAGGTCGAAACTACGTAAGG-3'
At1g71030	Reverse	5'-TCAGGCAAATGACTTCGTCC-3'
At5g51990	Forward	5'-AGCTGGGAGGAAGAAGTTTC-3'
At5g51990	Reverse	5'-AAAAACACCACCATTCTGC-3'
At4g27310	Forward	5'-TGTCAGTCTCTTACGCCGTG-3'
At4g27310	Reverse	5'-TCCGCTTCTCCGTCAGAAAG-3'
At2g39010	Forward	5'-TCCGACGGATACAATGTTGG-3'
At2g39010	Reverse	5'-AATGGCTGCACCCACAAATG-3'
At1g78650	Forward	5'-GAAGAGCGTGACTGGAAGTGC-3'
At1g78650	Reverse	5'-TTGCCTGTCTTCTTTGCTGG-3'
At4g15780	Forward	5'-TACAGCTATCGCCAAAAGTC-3'
At4g15780	Reverse	5'-CATGACAAAACCGATATCCAG-3'
At4g16880	Forward	5'-CACAAACCTCGAGAGACTAG-3'
At4g16880	Reverse	5'-AACTCCTTGTAGCACATACC-3'
At1g66100	Forward	5'-GGCACAAAATCAAGTTGACG-3'
At1g66100	Reverse	5'-GTACAGACTGTAGAACATGC-3'
At3g62000	Forward	5'-AGGGTGTITAGTTGCCGTG-3'
At3g62000	Reverse	5'-TCCTGATGACTATCTCTTGC-3'
At1g74650	Forward	5'-TCCTGACTACCAAAACCTC-3'
At1g74650	Reverse	5'-CCTCTAAAGACACGTCCATG-3'
At5g66030	Forward	5'-ATGCTCTATCTGAGAGGGAC-3'
At5g66030	Reverse	5'-GTGAGCACGGATCTTGTAAG-3'
At4g24210	Forward	5'-AGAACTAGTGTACGAGGTG-3'
At4g24210	Reverse	5'-CTCATCTTCTCGTAGTATCG-3'
At1g73490	Forward	5'-GTTAGTAAGGTACGGATCC-3'
At1g73490	Reverse	5'-CGTCCTCCCAAATGACTTCC-3'
At4g08870	Forward	5'-TGGAGGACCCGTGGATATTC-3'
At4g08870	Reverse	5'-ACATCAGCCCCACCAAATC-3'

유전자가 조사 대상이 아닌 다른 하위 조절 유전자를 통해 환경 스트레스 저항성에 관여하는 것을 나타낸다. 본 연구에서는 마이크로어레이 실험을 수행하여 *AtERF71/HRE2*의 하위 유전자를 조사하고자 하였다. 이를 위하여 *AtERF71/HRE2* 과발현체를 대상으로 마이크로어레이 실험을 수행하였다. 이전 연구[24]에서 제조된 *AtERF71/HRE2* 과발현체 중 독립된 2개의 T₁ 라인에서 유래한 T₃ 유식물체를 섞은 후 이로부터 분리한 RNA를 마이크로어레이 실험에 사용하였다. 마이크로어레이 실험을 수행하기 전에 semi-quantitative RT-PCR을 수행하여 *AtERF71/HRE2*의 과발현을 확인하였다(Fig. 1A). 마이크로어레이 실험 결과를 분석하여 야생형보다 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 2배 이상 증가 또는 감소한 probe를 선별하였다. 마이크로어레이의 probe 수는 모두 45,220개이며, 이들 중 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 2배 이상 증가한 것은 303개로 전체 probe 중 약 1%, 2배 이상 감소한 probe는 1,216개로 전체 probe 중 약 3%였다(Fig. 1B).

AtERF71/HRE2 과발현체에서 발현이 2배 이상 증가 또는

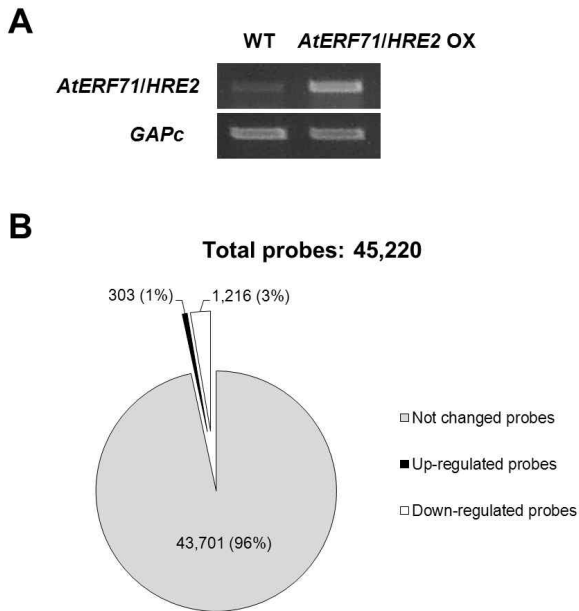


Fig. 1. Microarray expression profile in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants. (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of *AtERF71/HRE2* in wild-type plants and *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants used for microarray analysis. Fourteen-day-old seedlings of wild-type plants and *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants grown under SD condition were used. *GAPC* was used as internal control. Similar results were obtained from at least two technical replicates, with one shown here. (B) A pie graph showing the relative distribution (%) of more than 2-fold up- or down-regulated probes in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants compared to wild-type plants.

감소한 probe를 대상으로 gene ontology를 조사하였다. 먼저, 2배 이상 발현이 증가한 303개의 probe를 대상으로 생물학적 과정 범주의 gene ontology 분석 결과, 전사조절에 관여하는 probe가 20개로 가장 많았으며, 수송에 관여하는 것이 9개, 광합성에 관여하는 probe가 8개로 나타났다. 분자 기능 범주에 대한 분석에서는 전사인자 활성을 가지는 probe가 24개로 가장 많았으며, 그 뒤를 이어 DNA 결합 기능을 가진 것이 19개, 단백질 결합 기능을 가진 probe가 15개로 확인되었다(data not shown). 한편, *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 2배 이상 감소한 1,216개의 probe를 대상으로 생물학적 과정 범주의 gene ontology 분석 결과, 전사조절에 관여하는 probe가 56개로 가장 많았으며, 단백질 인산화에 관여하는 probe가 43개였다. 분자 기능 범주에 대한 gene ontology 분석에 의하면 ATP 결합 기능을 가지는 probe가 99개로 가장 많았고, 그 다음으로 단백질 결합 기능을 가지는 것이 83개, 전사인자 활성을 가진 것이 64개, DNA 결합 기능을 가지는 probe가 60개로 확인되었다(data not shown). 이러한 결과는 *AtERF71/HRE2*에 의해 발현이 증가되는 하위 유전자 중에 전사조절에 관여하는 유전자가 큰 비중을 차지하고 있음을 나타낸다.

조사 대상 유전자 선별 및 분류

최근 연구 결과에 따르면, *AtERF71/HRE2*는 핵에 존재하며 전사활성화 기능을 가지고 있어 하위 유전자의 전사를 활성화 시킬 것으로 여겨진다[24]. 따라서 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 2배 이상 증가한 303개 probe를 대상으로 이후 추가 분석에 사용할 조사 대상 유전자를 선별하였다. 303개 probe를 분석한 결과, 유전자 정보가 있는 probe가 238개, 유전자 정보가 없는 probe가 65개였으며, 유전자 정보가 있는 238개 probe는 230개의 서로 다른 유전자에 해당되었다(data not shown). 이들 230개 유전자 중 68개 유전자는 hypothetical 단백질을 암호화 하였고, 이들 68개를 제외한 162개 유전자 중 하나는 *AtERF71/HRE2*였다. 162개 유전자 중 *AtERF71/HRE2*를 제외한 161개 유전자에 대해 추가 분석을 수행하였다.

먼저, 161개 유전자를 기능에 따라 분류하였다(Table 2). 그 결과, 예상대로 전사인자, DNA-결합 단백질 등 전사조절자가 24개로 가장 많았으며, 전사 후 단백질 변형 및 조절에 관련된 유전자가 18개, 단백질의 세포 내 운송이나 분비에 관여하는 유전자가 11개, 그 외에 신진대사나 방어기작 등에 관여하는 유전자가 다수 존재하였다(Table 2). 2배 이상 발현이 증가한 유전자 중 전사조절 기능을 가진 유전자가 다수로 확인되어, *AtERF71/HRE2*는 하위의 전사조절 유전자의 발현 조절을 통해 더 많은 유전자의 발현을 조절하는 상위 전사인자로서의 기능을 가질 것으로 추정할 수 있었다.

Table 2. Functional classification of 161 genes up-regulated more than 2-fold in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants

Functional category	Number of genes
Information storage and processing	
Transcription (transcription factor, DNA-binding)	24
Chromatin structure and dynamics	4
Translation, ribosomal structure, and biogenesis	3
Replication, recombination, and repair	3
RNA processing and modification	1
Cellular processing and signaling	
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	18
Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	11
Defense mechanisms	7
Signal transduction mechanisms	4
Cytoskeleton	3
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2
Cell motility	1
Metabolism	
Energy production and conversion	8
Inorganic ion transport and metabolism	8
Lipid transport and metabolism	7
Carbohydrate transport and metabolism	5
Amino acid transport and metabolism	4
Coenzyme transport and metabolism	3
Nucleotide transport and metabolism	2
Poorly characterized	
General function prediction only	43
Total	161

마이크로어레이 분석 결과 검증

마이크로어레이 분석 결과에서의 유전자 발현 증가를 RT-PCR을 수행하여 검증하였다. 이를 위해 Table 2의 161개 유전자 중 전사조절에 관여하는 유전자, RNA 변형에 관여하는 유전자, 스트레스 반응에 관여하는 유전자, 수송에 관여하는 유전자를 포함하는 15개 유전자를 선별하였으며(Table 3), 이들을 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 결과, 15개 유전자 모두 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 야생형보다 발현이 증가한 것을 확인하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 마이크로어레이 결과가 신뢰성이 있으며, 마이크로어레이 결과를 이용한 유전자 발현 변화 분석이 의미가 있음을 나타낸다.

조사 대상 유전자의 스트레스 반응

기존 연구 결과에 따르면, *AtERF71/HRE2*는 저산소, 고염, 건조 등의 환경 스트레스에 의해 발현이 증가하며, 이들 환경 스트레스에 대한 저항성에 관여한다[21,24]. 환경 스트레스 반응에 있어서 *AtERF71/HRE2*의 하위 유전자를 알아보기 위하여 선별한 161개 유전자를 대상으로 환경 스트레스에 의해 발현이 증가되는 유전자를 조사하였다. 이를 위해 마이크로어레이 데이터베이스인 Genevestigator 데이터베이스를 이용하

여 각 유전자의 발현 변화를 분석하였다. Genevestigator 데이터베이스 분석은 Genevestigator 데이터베이스에 probe가 존재하지 않는 28개 유전자를 제외한 133개 유전자를 대상으로 수행하였으며, *AtERF71/HRE2*가 저산소, 고염, 건조 등의 환경 스트레스 신호전달에 관여하므로[21,24] 이들 세 가지 스트레스를 대상으로 발현 변화를 조사하였다. 즉, Genevestigator 데이터베이스 중 저산소, 고염, 건조 스트레스 조건의 마이크로어레이 결과에서 133개 유전자의 발현 변화를 조사하였으며, 같은 종류의 스트레스에 해당하는 2개 이상의 마이크로어레이 결과에서 발현이 2배 이상 증가할 경우 해당 스트레스를 결과에 나타내었다(Table 4). 저산소 스트레스에 해당하는 hypoxia, anoxia, 침수(submergence) 조건에서 발현이 증가한 유전자는 23개였으며, 삼투 스트레스에 해당하는 고염, 건조, 삼투 조건에서 발현이 증가한 유전자는 17개였고, 저산소와 삼투 스트레스 모두에서 발현이 증가한 유전자는 11개였다(Table 4). 저산소 및 삼투 스트레스에서 발현이 증가하는 이들 51개 유전자는 *AtERF71/HRE2*에 의해 매개되는 저산소, 삼투 스트레스 신호전달 과정에 있어서 *AtERF71/HRE2*의 하위 유전자로 작용할 가능성이 높을 것으로 여겨진다. 분석 대상인 133개 유전자에서 51개를 제외한 82개 유전자 중 20여개 유전

Table 3. List and promoter analysis of 15 genes selected for RT-PCR

Probe ID	Gene symbol	Fold change	Gene name	<i>cis</i> -acting element	Element locus	Element sequence
A_84_P792153	At5g51990	3.44	C-REPEAT-BINDING FACTOR 4 (CBF4)	- *	-	-
A_84_P19525	At4g27310	2.79	zinc finger (B-box type) family protein	-	-	-
A_84_P824053	At5g62430	2.48	CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)	DRE/CRT	-1,300	5'-ACCGAC-3'
A_84_P12444	At1g71030	2.33	ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2 (MYBL2)	-	-	-
A_84_P19051	At1g74650	2.25	MYB DOMAIN PROTEIN 31 (MYB31)	GCC	-1,501	5'-GCCGCC-3'
A_84_P786741	At1g73490	9.06	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	-	-	-
A_84_P154605	At1g78650	4.01	POLD3	-	-	-
A_84_P22268	At3g62000	2.09	O-methyltransferase family 3 protein	-	-	-
A_84_P826728	At5g66030	2.58	ATGRIP	-	-	-
A_84_P822606	At4g24210	2.53	SLEEPY1 (SLY1)	-	-	-
A_84_P13509	At2g39010	2.35	PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2E (PIP2E)	DRE/CRT	-744	5'-GTCGGC-3'
A_84_P242243	At4g15780	2.03	ATVAMP724	-	-	-
A_84_P15283	At1g66100	3.05	thionin, putative	-	-	-
A_84_P10009	At4g08870	2.29	arginase, putative	DRE/CRT	-480	5'-ACCGAC-3'
A_84_P22425	At4g16880	2.22	disease resistance protein-related	GCC, DRE/CRT	-188, -1,189	5'-GCCGCC-3', 5'-ACCGAC-3'

* Dashes represent no GCC or DRE/CRT in promoters.

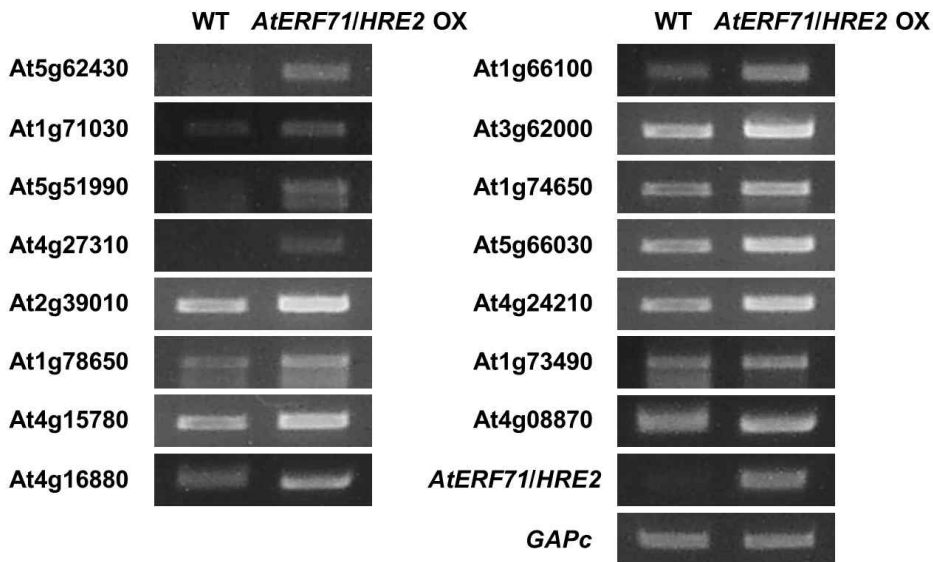


Fig. 2. Semi-quantitative RT-PCR analysis of 15 genes up-regulated in *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants. Semi-quantitative RT-PCR was performed using 14-day-old seedlings of wild-type plants and *AtERF71/HRE2*-overexpressing transgenic plants grown under SD condition. *GAPc* was used as internal control. Similar results were obtained from at least two biological replicates, with one shown here.

자는 저온, 고온, 강한 광과 같은 환경 스트레스에 의해 발현이 증가하였으며, 나머지 유전자는 환경 스트레스에 의한 발현 증가는 없었고 주로 발아, 수분, 종자발달, 노화와 같은 식물 발달 과정에서 발현이 증가하였다. 이러한 분석 결과는 *AtERF71/HRE2*가 저산소 및 삼투 스트레스 반응뿐만 아니라, 다른 환경 스트레스 반응과 식물 발달 조절에도 관여할 수

있음을 시사한다.

선별 유전자의 저산소 스트레스 반응

기존의 연구에 따르면 *AtERF71/HRE2*는 저산소 스트레스에 의해 발현이 증가하고 과발현체는 저산소 스트레스에 대해 저항성을 가진다[13,21,24]. 이러한 결과는 *AtERF71/HRE2*가

Table 4. List of 51 genes up-regulated by low oxygen and/or osmotic stresses in Genevestigator database

Probe ID	Gene symbol	Fold change*	Gene name	Stress
A_84_P18854	At5g16760	6.78	inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase"	drought(3**)
A_84_P750751	At1g66040	4.68	VIM4 (VARIANT IN METHYLATION 4)	hypoxia(2)
A_84_P15740	At4g27030	3.48	small conjugating protein ligase	drought(2)
A_84_P792153	At5g51990	3.44	CBF4 (C- REPEAT-BINDING FACTOR 4)	drought(4), salt(3)
A_84_P14774	At4g22610	3.38	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	hypoxia(2), drought(5), salt(2)
A_84_P89769	At2g35930	3.21	PUB23 (PLANT U-BOX 23)	salt(3), drought(8), hypoxia(9)
A_84_P763587	At4g12550	3.04	AIR1	hypoxia(2)
A_84_P858122	At5g19780	2.88	TUA5	hypoxia(2)
A_84_P12031	At5g01300	2.86	phosphatidylethanolamine-binding family protein	drought(4), osmotic(3), salt(5)
A_84_P18856	At5g17490	2.71	RGL3 (RGA-LIKE PROTEIN 3)	drought(5), hypoxia(3)
A_84_P604152	At1g74870	2.59	protein binding / zinc ion binding	salt(2), hypoxia(4)
A_84_P20129	At2g39110	2.57	protein kinase, putative"	hypoxia(2)
A_84_P803569	At1g18020	2.54	12-oxophytodienoate reductase, putative"	drought(2), hypoxia(5), salt(2)
A_84_P20202	At3g08940	2.51	LHCB4.2 (light harvesting complex PSII)	hypoxia(2)
A_84_P824053	At5g62430	2.48	CDF1 (CYCLING DOF FACTOR 1)	drought(3), salt(2)
A_84_P844205	At4g23160	2.47	protein kinase family protein	drought(3), osmotic(2)
A_84_P293284	At2g36780	2.43	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	drought(5), salt(4)
A_84_P24021	At3g27690	2.41	LHCB2.3	hypoxia(2)
A_84_P13509	At2g39010	2.35	PIP2E (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2E)	hypoxia(2)
A_84_P12444	At1g71030	2.33	MYBL2 (ARABIDOPSIS MYB-LIKE 2)	drought(2), salt(2), hypoxia(2)
A_84_P786619	At3g15790	2.32	MBD11	drought(4)
A_84_P11261	At5g61800	2.32	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	drought(3)
A_84_P12472	At1g71710	2.31	inositol polyphosphate 5-phosphatase, putative"	drought(2), salt(3)
A_84_P18497	At4g00900	2.31	ECA2 (ER-TYPE CA2+-ATPASE 2)	salt(2)
A_84_P177654	At2g18950	2.31	HPT1 (HOMOGENITISATE PHYTYLTRANSFERASE 1)	drought(3), salt(2)
A_84_P10009	At4g08870	2.29	arginase, putative"	drought(2)
A_84_P815070	At1g22530	2.29	PATL2 (PATELLIN 2)	salt(2), hypoxia(2)
A_84_P20278	At3g24660	2.29	TMKL1 (transmembrane kinase-like 1)	hypoxia(2)
A_84_P264370	At5g14000	2.27	anac084 (Arabidopsis NAC domain containing protein 84); transcription factor	hypoxia(2)
A_84_P19051	At1g74650	2.25	MYB31 (MYB DOMAIN PROTEIN 31)	submergence(2)
A_84_P786499	At3g25760	2.25	AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1)	drought(8), hypoxia(5), salt(5), submergence(2)
A_84_P18782	At1g64380	2.25	AP2 domain-containing transcription factor, putative"	drought(9), hypoxia(4), osmotic(4), salt(3)
A_84_P169963	At4g40090	2.22	AGP3 (arabinogalactan-protein 3)	hypoxia(2), submergence(2)
A_84_P807037	At2g34430	2.20	LHB1B1	hypoxia(3)
A_84_P808711	At2g05070	2.19	LHCB2.2	hypoxia(2)
A_84_P836433	At3g55090	2.15	ATPase, coupled to transmembrane movement of substances"	salt(2), osmotic(2), drought(2)
A_84_P11054	At4g36040	2.15	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein (J11)	drought(2), hypoxia(4)
A_84_P19133	At2g22310	2.10	ATUBP4 (ARABIDOPSIS THALIANA UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 4)	hypoxia(5)
A_84_P16813	At5g19140	2.10	AILP1	hypoxia(13)
A_84_P13439	At2g39980	2.09	transferase family protein	drought(7), osmotic(2), submergence(2), salt(2)
A_84_P10887	At3g53820	2.08	zinc finger (C2H2 type) family protein	hypoxia(3)
A_84_P21406	At4g25100	2.08	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)	salt(3)
A_84_P800020	At1g06780	2.06	GAUT6 (Galacturonosyl transferase 6)	drought(2)
A_84_P19062	At1g52230	2.06	PSAH2 (PHOTOSYSTEM I SUBUNIT H2)	hypoxia(3)
A_84_P851677	At5g54270	2.04	LHCB3 (LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING PROTEIN 3)	hypoxia(3)
A_84_P810829	At3g54890	2.04	LHCA1	hypoxia(4)
A_84_P14306	At1g69490	2.03	NAP (NAC-like, activated by AP3/PI)	drought(13), osmotic(4), salt(5)
A_84_P788801	At1g05620	2.02	URH2 (URIDINE-RIBOHYDROLASE 2)	hypoxia(2)
A_84_P14443	At2g29310	2.01	tropinone reductase, putative / tropine dehydrogenase, putative"	hypoxia(3)
A_84_P153128	At4g16980	2.01	arabinogalactan-protein family	hypoxia(2)
A_84_P785527	At4g04830	2.01	methionine sulfoxide reductase domain-containing protein / SeIR domain-containing protein	hypoxia(2)

* Fold change in *AtERF71/HIRE2*-overexpressing transgenic plants

** Parenthesized numbers represent the number of up-regulated arrays in Genevestigator database.

저산소 스트레스 반응에 관여함을 나타낸다. 본 연구에서는 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 증가한 유전자 중 저산소 스트레스 반응에 관여하는 유전자를 알아보았다. 이를 위해 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 증가하는 것으로 확인된 15개 유전자를 대상으로 저산소 스트레스 조건하에서 이들 유전자의 발현 양상을 RT-PCR을 수행하여 조사하였다. 그 결과 *At1g71030*, *At4g15780*, *At3g62000*의 3개 유전자가 저산소 처리 6시간 이후에 발현이 증가하였고, 나머지 유전자는 발현 변화가 없었다(Fig. 3). 이러한 결과는 *At1g71030*, *At4g15780*, *At3g62000* 유전자가 *AtERF71/HRE2*에 의해 매개되는 저산소 스트레스 신호전달 과정에서 *AtERF71/HRE2*의 하위 유전자일 수 있음을 의미한다.

먼저, *At1g71030*은 MYBL2를 암호화 하는 유전자이며,

MYBL2는 MYB-BHLH-WDR (MBW) 복합체의 flavonoid 생합성 기능에 있어서 negative regulator로 작용하는 것으로 알려져 있다[6]. *MYBL2*에 대한 기존 연구 중에 저산소 스트레스와 관련되어 알려진 바는 없으나 본 연구의 RT-PCR 분석 결과와 Genevestigator 데이터베이스 분석 결과에 의하면 *MYBL2*는 저산소 스트레스 반응에 관여할 가능성이 높은 것으로 여겨진다(Fig. 3, Table 4). 한편, *At3g62000*은 O-methyltransferase를 암호화하는 유전자이다. O-methyltransferase는 S-adenosyl-L-methionine의 메틸기를 하이드록실 그룹으로 전달하는 기능을 가지는 것으로 알려져 있다[15]. Methyltransferase는 식물에서 매우 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있는데, 그 중 담배의 methyltransferase인 *trans caffeoyl coA-3-O-methyltransferase*는 건조, 고염 스트레스 반응에 관여하고[30],

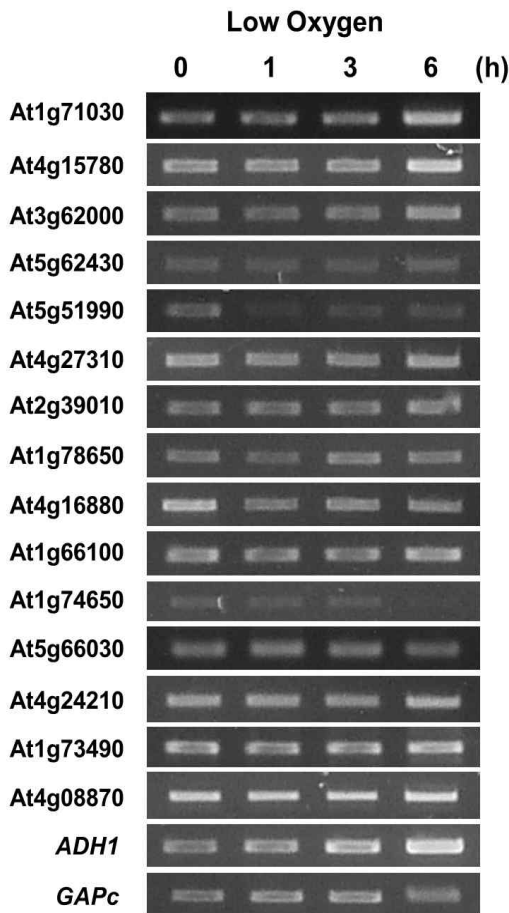


Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of 15 genes under low oxygen stress treatment. Semi-quantitative RT-PCR was performed using 10-day-old seedlings of wild-type plants grown under SD condition. Low oxygen stress was treated for indicated time under 99.9% nitrogen gas. *GAPc* was used as internal control and *ADH1* was used as control for low oxygen treatment. Similar results were obtained from at least two biological repeats, with one shown here.

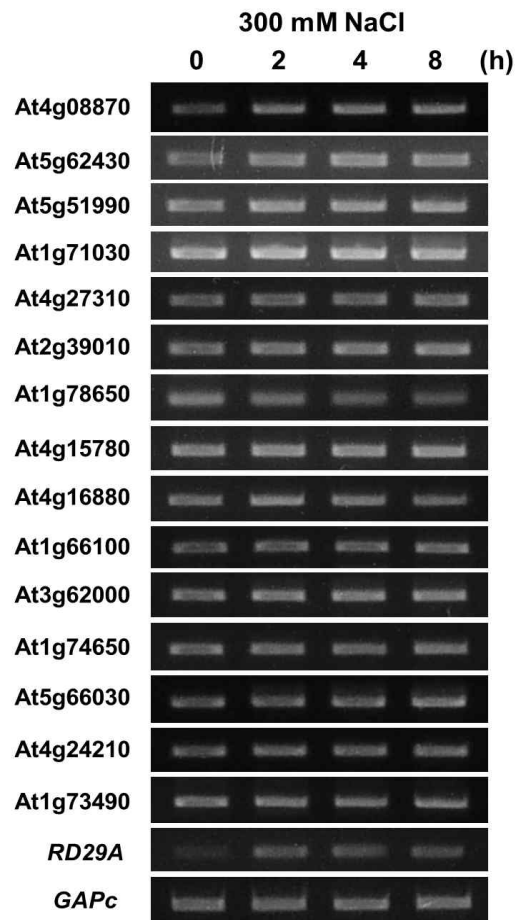


Fig. 4. Semi-quantitative RT-PCR analysis of 15 genes under salt stress treatment. Semi-quantitative RT-PCR was performed using 10-day-old seedlings of wild-type plants grown under SD condition. Salt stress was treated for indicated time under 300 mM NaCl. *GAPc* was used as internal control and *RD29A* was used as control for salt treatment. Similar results were obtained from at least two biological repeats, with one shown here.

담배의 γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT)는 고염 스트레스 반응에 관여하며[1], 또한 애기장대의 γ -TMT는 산화 스트레스 반응에 관여하는 것으로 보고되었다[29]. 이와 같이 methyltransferase 중에는 환경 스트레스 반응에 관여하는 것들이 있으며, 본 연구의 결과에 따르면 At3g62000도 저산소 스트레스 반응에 관여할 것으로 기대된다. 끝으로 At4g15780은 AtVAMP724를 암호화 하는데, AtVAMP724는 식물에 존재하는 세 가지 R-SNARE인 Sec22-, YKT6-, VAMP7- 중 VAMP7-에 속하는 것으로, 세포 내 분비에 관여하는 것으로 알려져 있다[35]. 기존 연구에 의하면 애기장대의 t-SNARE인 SYP41은 고염 스트레스 반응에, 벼의 Qc-SNARE인 OsSYP71은 산화 스트레스 반응에, 그리고 담배의 Q-SNARE인 SYP121은 ABA와 건조 스트레스 반응에 관여하는 것으로 보고되었다[2,18,32]. 이처럼 식물에 존재하는 SNARE 유전자는 다양한 환경 스트레스 반응에 관여하며, AtVAMP724 또한 저산소 스트레스 반응에 관여할 것으로 여겨진다.

선별 유전자의 고염 스트레스 반응

기존 연구에 의하면 AtERF71/HRE2는 저산소 스트레스뿐만 아니라 삼투 스트레스 반응에도 관여하는 것으로 알려져 있다[24]. AtERF71/HRE2 과발현체에서 발현이 증가한 유전자들을 대상으로 삼투 스트레스 반응에 관여하는 유전자들을 조사하기 위해 삼투 스트레스의 하나인 고염을 처리한 야생형 식물체를 이용하여 앞서 선별한 15개 유전자들을 대상으로 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 고염 스트레스 처리 후 2시간째부터 At4g08870, At5g62430, At5g51990 세 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 AtERF71/HRE2에 의해 매개되는 삼투 스트레스 신호전달에 있어서 이들 세 유전자가 AtERF71/HRE2의 하위 유전자일 수 있음을 의미한다.

먼저, At5g51990은 CBF4를 암호화 하는데, CBF4는 DREB1D로도 알려져 있다. CBF4는 DREB/CBF 그룹 전사인자인 CBF1, CBF2, CBF3와 마찬가지로 건조 스트레스 반응에 관여하며[10], 또한 CBF4의 과발현체는 건조뿐만 아니라 저온 스트레스에 대해서도 저항성을 보이는 것으로 보고된 바 있다[10]. 본 연구 결과에서 CBF4가 고염 스트레스에 의해 증가하는 것으로 확인되어(Fig. 4), CBF4는 건조와 고염을 포함하는 삼투 스트레스 반응에 관여할 것으로 기대된다. 한편, At5g62430은 CDF1을 암호화하며, CDF1은 개화를 촉진하는 주요 유전자인 CONSTANS의 negative regulator로써 식물의 개화 시기를 조절하는데 있어서 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다[28]. CDF1에 관한 기존 연구 결과에는 환경 스트레스와 관련된 부분이 없으나 본 연구의 Genevestigator 데이터베이스 분석에 따르면 CDF1은 고염과 건조 스트레스에 의해 발현이 증가하고(Table 4), RT-PCR 분석 결과에 의하면 고염 스트레스에 의해 발현이 증가하는 것으로 확인되어(Fig.

4), CDF1은 삼투 스트레스 반응에 관여할 것으로 여겨진다. 끝으로 At4g08870은 arginase인 ARGAH2를 암호화 한다. ARGAH2는 미토콘드리아에 위치하며 신호전달물질의 하나인 일산화질소의 축적 및 유출과 관련하여 기능을 하는 것으로 알려져 있다[4]. 기존 연구에 의하면 오이에서 일산화질소가 고염 스트레스에 의한 유식물체의 피해를 감소시키는 기능을 하는 것으로 보고되었으며[7], 겨자에서는 염화칼슘과 일산화질소가 상호작용하여 고염 스트레스에 대한 저항성을 증가시켰다는 결과가 보고된 바 있다[17]. 따라서 ARGAH2의 일산화질소 축적 및 유출 기능이 고염 스트레스 반응과 관련되어 있을 가능성이 높은 것으로 생각된다. 또한 ARGAH2는 MeJA에 의해 발현이 증가하는 것이 알려져 있으며, 생물 스트레스 반응에도 관여하는 것으로 보고되어 있다[5]. Genevestigator 데이터베이스 분석 결과, ARGAH2는 CDF1과 마찬가지로 건조 스트레스에 의해 발현이 증가할 것으로 기대되며(Table 4), 실제 고염 스트레스에 의해 발현이 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 ARGAH2가 생물 스트레스 반응뿐만 아니라 고염 및 건조의 삼투 스트레스 반응에도 관여할 수 있음을 나타낸다.

RT-PCR을 통한 저산소 및 고염 스트레스 반응 조사에서, 흥미롭게도 저산소에 의해 발현이 증가한 3개 유전자와 고염에 의해 발현이 증가한 3개 유전자는 서로 달랐다(Fig. 3, Fig. 4). 또한 저산소 스트레스 반응 유전자는 대부분 스트레스 처리 후 6시간째에 발현이 증가하였으나(Fig. 3), 고염 스트레스 반응 유전자는 2시간째부터 발현이 증가하여(Fig. 4) 각 스트레스에 대한 반응 시간의 차이를 보였다. 이러한 스트레스 반응 유전자의 차이와 스트레스 반응 시간의 차이는 AtERF71/HRE2에 의해 매개되는 저산소 스트레스 신호전달 경로와 고염 스트레스 신호전달 경로가 서로 독립적임을 의미한다.

RT-PCR을 수행한 15개 유전자 중 저산소 또는 고염 스트레스에 의해 발현이 증가한 유전자는 모두 6개였으며, 나머지 9개 유전자는 발현이 증가하지 않았다(Fig. 3, Fig. 4). 이러한 결과는 Genevestigator 데이터베이스 분석 결과에서 언급한 AtERF71/HRE2가 저산소 및 삼투 스트레스 반응뿐만 아니라 다른 환경 스트레스 반응과 다양한 식물 발달 조절에도 관여할 수 있다는 주장을 뒷받침한다.

기존 연구 결과에 의하면 AP2/ERF 전사인자의 일부는 cis-acting element인 GCC box 또는/그리고 DRE/CRT에 결합하여 하위 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있으며[11], AP2/ERF 전사인자 그룹에 속하는 AtERF71/HRE2도 GCC box와 DRE/CRT 모두에 결합하는 것으로 확인되었다(unpublished data). 따라서 RT-PCR 분석을 통해 AtERF71/HRE2 과발현체에서 발현이 증가하는 것으로 확인된 15개 유전자의 프로모터를 분석하여 GCC box와 DRE/CRT 서열의 유무를 조사하였다. 프로모터 서열 분석은 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) 프로그램을 이용하여 수행하였으며, 각 cis-acting element의 core 서열은

GCC box는 5'-GCCGCC-3', DRE/CRT는 5'-(A/G)CCGAC-3'이다. 프로모터 분석 결과, GCC box를 가지는 유전자는 At1g74650 1개, DRE/CRT를 가지는 유전자는 At5g62430, At2g39010, At4g08870의 3개, 그리고 GCC box와 DRE/CRT를 모두 가지는 유전자는 At4g16880 1개로 확인되었다(Table 3).

결과를 요약하면, 본 연구에서는 마이크로어레이 분석을 통해 저산소 및 삼투 스트레스 신호전달에 관여하는 전사인자로 알려진 AtERF71/HRE2에 의해 직, 간접적으로 발현이 조절되는 하위 유전자를 확인할 수 있었으며, 특히 *AtERF71/HRE2*는 저산소 및 삼투 스트레스 반응뿐만 아니라, 다른 환경 스트레스 반응과 식물 발달 조절에도 관여할 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Abbasi, A. R., Hajirezaei, M., Hofius, D., Sonnewald, U. and Voll, L. M. 2007. Specific Roles of α - and γ -Tocopherol in Abiotic Stress Responses of Transgenic Tobacco. *Plant Physiol.* **143**, 1720-1738.
- Bao, Y. M., Sun, S. J., Li, M., Li, L., Cao, W. L., Luo, J., Tang, H. J., Huang, J., Wang, Z. F., Wang, J. F. and Zhang, H. S. 2012. Overexpression of the Qc-SNARE gene *O&SYP71* enhances tolerance to oxidative stress and resistance to rice blast in rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **504**, 238-244.
- Broun, P. 2004. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 202-209.
- Brownfield, D. L., Todd, C. D. and Deyholos, M. K. 2008. Analysis of *Arabidopsis* arginase gene transcription patterns indicates specific biological functions for recently diverged paralogs. *Plant Mol. Biol.* **67**, 429-440.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., Fitt, G. P., Sewelam, N., Schenk, P. M., Manners, J. M. and Kazana, K. 2007. MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2225-2245.
- Dubos, C., Gourrierc, J. L., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Alboresi, A., Weisshaar, B. and Lepiniec, L. 2008. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **55**, 940-953.
- Fan, H. F., Dua, C. X. and Guo, S. R. 2010. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environ. Exp. Bot.* In Press.
- Gong, W., Shen, Y. P., Ma, L. G., Pan, Y., Du, Y. L., Wang, D. H., Yang, J. Y., Hu, L. D., Liu, X. F., Dong, C. X., Ma, L., Chen, Y. H., Yang, X. Y., Gao, Y., Zhu, D., Tan, X., Mu, J. Y., Zhang, D. B., Liu, Y. L., Dinesh-Kumar, S. P., Li, Y., Wang, X. P., Gu, H. Y., Qu, L. J., Bai, S. N., Lu, Y. T., Li, J. Y., Zhao, J. D., Zuo, J., Huang, H., Deng, X. W. and Zhu, Y. X. 2004. Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol.* **135**, 773-782.
- Gutterson, N. and Reuber, T. L. 2004. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**, 465-471.
- Haake, V., Cook, D., Riechmann, J. L., Pineda, O., Thomashow, M. F. and Zhang, J. Z. 2002. Transcription Factor CBF4 Is a Regulator of Drought Adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 639-648.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M. and Sarai, A. 1998. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem.* **273**, 26857-26861.
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X. J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H. and Ashikari, M. 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* **460**, 1026-1030.
- Hess, N., Klode, M., Anders, M. and Sauter, M. 2011. The hypoxia responsive transcription factor genes *ERF71/HRE2* and *ERF73/HRE1* of *Arabidopsis* are differentially regulated by ethylene. *Physiol. Plant* **143**, 41-49.
- Hinz, M., Wilson, I. W., Yang, J., Buerstenbinder, K., Llewellyn, D., Dennis, E. S., Sauter, M. and Dolferus, R. 2010. *Arabidopsis* *RAP2.2* an ethylene response transcription factor that is important for hypoxia survival. *Plant Physiol.* **153**, 757-772.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A. and Bantignies, B. 1998. Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and Classification. *Plant Mol. Biol.* **36**, 1-10.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K. and Hattori, T. 1999. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res.* **27**, 470-478.
- Khan, M. N., Siddiqui, M. H., Mohammad, F. and Naeem, M. 2012. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. *Nitric Oxide* **27**, 210-218.
- Kim, S. J. and Bassham, D. C. 2011. TNO1 Is Involved in Salt Tolerance and Vacuolar Trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156**, 514-526.
- Knight, H. and Knight, M. R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**, 262-267.
- Lexer, C. and Fay, M. F. 2005. Adaptation to environmental stress: a rare or frequent driver of speciation? *J. Evol. Biol.* **18**, 893-900.
- 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 responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **62**, 302-315.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.

23. 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.
24. Park, H. Y., Seok, H. Y., Woo, D. H., Lee, S. Y., Tarte, V. N., Lee, E. H., Lee, C. H. and Moon, Y. H. 2011. AtERF71/HRE2 transcription factor mediates osmotic stress response as well as hypoxia response in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **414**, 135-141.
25. Perata, P. and Voesenek, L. A. 2007. Submergence tolerance in rice requires *Sub1A*, an ethylene-response-factor-like gene. *Trends Plant Sci.* **12**, 43-46.
26. Rushton, P. J. and Somssich, I. E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 311-315.
27. Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **290**, 998-1009.
28. Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A. and Imaizumi, T. 2007. FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in *Arabidopsis*. *Science* **318**, 261-265.
29. Semchuk, N. M., Lushchak, O. V., Falk, J., Krupinska, K. and Lushchak, V. I. 2009. Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem* **47**, 384-390.
30. Senthil-Kumar, M., Hema, R., Suryachandra, T. R., Ramegowda, H. V., Gopalakrishna, R., Rama, N., Udayakumar, M. and Mysore, K. S. 2010. Functional characterization of three water deficit stress-induced genes in tobacco and *Arabidopsis*. An approach based on gene down regulation. *Plant Physiol. Biochem* **48**, 35-44.
31. Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. and Thomashow, M. F. 1997. *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 1035-1040.
32. Sutter, J. U., Campanoni, P., Tyrrell, M. and Blatt, M. R. 2006. Selective Mobility and Sensitivity to SNAREs Is Exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ Channel at the Plasma Membrane. *Plant Cell* **18**, 935-954.
33. Tang, M., Sun, J., Liu, Y., Chen, F. and Shen, S. 2007. Isolation and functional characterization of the *JcERF* gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Mol. Biol.* **63**, 419-428.
34. Thomashow, M. F. 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 571-599.
35. Uemura, T., Satob, M. H. and Takeyasu, K. 2005. The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **579**, 2842-2846.
36. Wu, L., Chen, X., Ren, H., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, J., Wang, X. C. and Huang, R. 2007. ERF protein JERF1 that transcriptionally modulates the expression of abscisic acid biosynthesis-related gene enhances the tolerance under salinity and cold in tobacco. *Planta* **226**, 815-825.
37. Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A. M., Bailey-Serres, J., Ronald, P. C. and Mackill, D. J. 2006. *Sub1A* is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* **442**, 705-708.
38. Zhang, G., Chen, M., Li, L., Xu, Z., Chen, X., Guo, J. and Ma, Y. 2009. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco. *J. Exp. Bot.* **60**, 3781-3796.

초록 : 마이크로어레이를 이용한 애기장대 *AtERF71/HRE2* 전사인자의 하위 유전자 분석

석혜연 · 이선영 · 우동혁 · 박희연 · 문용환*

(부산대학교 자연과학대학 분자생물학과)

애기장대에서 *AtERF71/HRE2*는 핵에서 전사인자로 작용하여 하위 유전자의 발현을 증가시키는 역할을 수행함으로써 저산소와 삼투 스트레스 반응에 관여할 것으로 여겨지는 유전자이다. 본 연구에서는 *AtERF71/HRE2*에 의해 직, 간접적으로 발현이 조절되는 하위 유전자를 알아보기 위해 *AtERF71/HRE2* 과발현체를 대상으로 마이크로어레이 실험을 수행하였다. 야생형에 비해 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 2배 이상 증가한 기능이 알려진 유전자는 *AtERF71/HRE2* 자신을 제외하고 161개였다. 161개 유전자 중 전사인자와 DNA-결합 단백질 등과 같은 전사조절자가 24개로 확인되어, *AtERF71/HRE2*는 하위 전사조절 유전자의 발현 조절을 통해 더 많은 유전자의 발현을 조절하는 상위 전사인자로서의 기능을 가질 것으로 추정되었다. 161개 유전자 중 15개 유전자를 대상으로 RT-PCR을 수행하여 마이크로어레이 결과의 신뢰성을 검증하였다. Genevestigator 데이터베이스 분석 결과, 161개 유전자 중 51개 유전자는 저산소 및 삼투 스트레스에 의해 발현이 증가하는 것으로 확인되었다. RT-PCR 분석 결과 *AtERF71/HRE2* 과발현체에서 발현이 증가한 15개 유전자 중 3개 유전자가 저산소에 의해 발현이 증가하였고, 다른 3개 유전자가 삼투 스트레스에 의해 발현이 증가하였으며, 이러한 결과는 이들 유전자가 *AtERF71/HRE2*에 의해 매개되는 저산소 또는 고염 스트레스 신호전달의 하위 유전자일 수 있음을 의미한다. 또한 본 연구의 마이크로어레이 분석 결과는 *AtERF71/HRE2*가 저산소 및 삼투 스트레스 반응뿐만 아니라 다른 환경 스트레스 반응과 식물 발달 조절에도 관여할 수 있음을 시사한다.