J Plant Biotechnol (2015) 42:356-363
DOI:http://dx.doi.org/10.5010/JPB.2015.42.4.356

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 분리한 non-specific Lipid Transfer Protein (*ns-LTP*) 프로모터의 특성 분석

조진성 · 노설아 · 최영임

Characterization of a non-specific Lipid Transfer Protein (*ns-LTP*) promoter from poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*)

Jin-Seong Cho · Seol Ah Noh · Young-Im Choi

Received: 3 November 2015 / Revised: 10 December 2015 / Accepted: 17 December 2015
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In order to study genetic engineering in trees, the characterization of genes and promoters from trees is necessary. We isolated the promoter region (867 bp) of *Pagns-LTP* from poplar (*P. alba* × *P. glandulosa*) and characterized its activity in transgenic poplar plants using a *β-glucuronidase* (GUS) reporter gene. High-level expression of the *Pagns-LTP* transcript was found in poplar roots, while comparatively low-level expression was found in the young leaves. *Pagns-LTP* mRNA was not detected in other poplar tissues. Additionally, transgenic poplar plants that contained a *Pagns-LTP* promoter fused to a GUS reporter gene, displayed tissue-specific GUS enzyme activity localized in root tissue. *In silico* analysis of the *Pagns-LTP* promoter sequence reveals the presence of several cis-regulatory elements responsive to phytohormones, biotic and abiotic stresses, as well as those regulating tissue-specific expression. These results demonstrate that the *Pagns-LTP* promoter has tissue-specific expression activity in poplar roots and leaves that may be involved in organ development and plant resistance to various stresses. Therefore, we anticipate that the *Pagns-LTP* promoter would be a useful tool to genetically optimize woody plants for functional genomics.

Keywords Poplar, Promoter-GUS fusion, Non-specific Lipid Transfer Protein, Tissue specific

J.-S. Cho
국립산림과학원 산림유전자원부
(Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 16631, Republic of Korea)
경희대학교 식물 · 환경신소재공학과
(Department of Plant and Environmental New Resources, Kyung Hee University, Giheung-Gu, Yongin-Si, Gyeonggi-Do, Republic of Korea)

S. A. Noh
국립산림과학원 산림유전자원부
(Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 16631, Republic of Korea)

Y.-I. Choi (✉)
국립산림과학원 산림유전자원부
(Department of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 16631, Republic of Korea)
e-mail: yichoi99@korea.kr

서 론

최근 자연 친화적인 목재 가공품의 수요 증가와 나무를 이용한 신재생 에너지 개발의 필요성이 대두됨에 나무의 생장과 스트레스 내성을 증진시키기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 연구를 위해서는 나무 고유의 유전자 및 이를 조절하는 프로모터의 특성을 분석하는 일이 기반이 된다. 또한, 유전자의 기능을 연구함에 있어서 조직별 발현양상 분석과 이를 조절하는 프로모터의 특성 분석은 유전자 고유의 기능을 구명하는데 토대가 된다.

포플러는 조직배양을 통한 개체의 증식과 형질전환 시스템이 매우 잘 확립되어 있는 몇 안 되는 목본 수종 중 하나이며, 목본의 모델식물로서 많은 연구가 이루어지고 있다(Choi et al. 2005). 포플러에서 보고된 조직 특이적 프로모터로는 관다발 조직에서 발현하는 cinnamyl alchohl dehydrogenase (CAD) 프로모터와 발달 중인 목질부에서 발현하는 Developing Xylem15 (DX15) 프로모터, 잎과 줄기에서 발현하는 Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase small

subunit (RbcS) 프로모터 등이 보고되었다(Feuillet et al. 1995; Ko et al. 2012; Wang et al. 2013). 이러한 목본 고유의 조직 특이적 프로모터는 목본에서의 효과적인 유전자 연구를 위해 유용한 도구로써 이용될 수 있다는 점에서 그 중요성이 크다.

Non-specific Lipid Transfer Protein (ns-LTP)은 프롤라민 super family에 속하는 식물 특이적 단백질로써, 40 종이 넘는 개화식물에 존재하며 많은 식물 종에서 그 구조와 특성이 보고되었다(Kader et al. 1984; Kreis et al. 1985; Shin et al. 1995; Lee et al. 1998; Boutrot et al. 2008; Lascombe et al. 2008). Ns-LTP는 N-말단에 신호 펩타이드를 가지고 있으며, 세포의 지질 이중층 사이에서 다양한 지질 분자들을 수송하는 역할을 한다(DeBono et al. 2009; Lee et al. 2009). 또한 애기장대에서는 장거리 신호 시스템을 통해 병원체에 대한 방어 기작에 관여하며, 개자리속 콩과식물인 Medicago에서는 질소 고정균과의 공생관계를 유지하는데 관여한다고 보고되었다(Maldonado et al. 2002; Lascombe et al. 2008; Pii et al. 2009). 이 밖에 콩에서는 뿌리 특이적으로 발현되며 뿌리 발달에 관련이 있을 것으로 보고되었다(Choi et al. 1996). 이렇듯 ns-LTP의 기능은 식물 종에 따라 여러 방면에서 다양한 기능이 보고되고 있어, 명확한 생물학적 기능은 정립되어 있지 않다.

목본의 ns-LTP 역시 명확한 기능에 대해 정립되어 있지 않을 뿐만 아니라, 모델 식물인 포플러 ns-LTP의 유전자 및 프로모터 특성 구명에 대한 연구가 매우 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 ns-LTP 유전자의 조직별 발현양상과 프로모터 내의 *cis*-element를 조사하고 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)에서 ns-LTP (Pagns-LTP) 프로모터를 분리한 후 활성을 분석하였다. 그 결과 프로모터 조절에 따른 유전자의 발현이 어린잎과 발달 중인 뿌리에서 한정되는 흥미로운 양상을 보이는 것을 확인하였고, 더불어 목본에서의 생장 및 스트레스 관련 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

식물재료 및 배양조건

본 연구를 위해 사용된 공시재료는 현사시나무(*Populus alba* × *P. glandulosa*)이다. Sucrose 30 g/l와 IBA 0.2 mg/l, phytoagar 0.75%가 첨가된 MS배지(Murashige and Skoog 1962)에서 기내 배양된 현사시나무의 정단을 약 2 cm 길이로 잘라 치상하였다(Choi et al. 2005). 이를 온도 24±1°C, 조도 200 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 광주기 16시간에서 5주간 배양하여 형질전환 재료로 사용하였다.

Pagns-LTP 유전자의 qRT-PCR 분석

Pagns-LTP 유전자의 조직 특이적 발현 양상을 분석하기 위해 기내에서 배양한 2주령 현사시나무의 어린뿌리와 4주령 현사시 나무의 어린잎, 노화된 잎, 줄기, 노화된 뿌리 조직에서 RNeasy plant kit (Qiagen, Hiden, Germany)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA로부터 Prime script RT reagent kit (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 미국사시나무(*P. tremuloides*)의 cDNA 염기서열(NCBI accession no. XM 002313777)을 바탕으로 정방향 프라이머(5′-TTCGTGTAAGCCATCAGTTC-3′)와 역방향 프라이머(5′-ATTGCCAAGTTGGGATCTAT-3′)를 제작한 후 2× iQ™ SYBR® Green supermix (Bio Rad, Hercules, USA)를 이용하여 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 발현수준을 정량화하기 위해 *Actin2* (정방향 5′-GCCATCTCTCATCGGAATGGAA-3′, 역방향 5′-AGGGC-AGTGATTTCCTTGCTCA-3′)를 대조 유전자로 사용하여 $2^{-\triangle\triangle ct}$법에 따라 상대 정량(Pfaffl. 2001)하였다.

현사시나무에서 ns-LTP 유전자의 프로모터 분리 및 염기서열 결정

현사시나무로부터 ns-LTP 유전자의 프로모터를 분리하기 위해 DNeasy plant kit (Qiagen, Hiden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. Ns-LTP 유전자의 프로모터를 특이적으로 증폭할 수 있도록 정방향 프라이머(5′-CAAAACAGCATCTCATCCTTCA-3′)와 역방향 프라이머(5′-GGCAAGTGAATAAGACCAACG-3′)를 제작하여 분리된 genomic DNA로부터 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하여 ns-LTP 유전자의 프로모터 부위를 분리하였다. 분리된 PCR 산물은 PCR 클로닝 벡터인 pGEM-T (Promega Madison, WI, USA) 벡터에 삽입하여 염기서열을 확인하였다.

Pagns-LTP 유전자의 프로모터 분석

Ns-LTP 유전자의 프로모터 염기서열에서 *cis*-element를 분석하기 위해 PLACE (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/) 데이터 베이스를 이용하여 분석을 실시하였다.

형질전환용 플라스미드 제작

현사시나무로부터 분리한 ns-LTP 유전자의 프로모터를 형질전환시키기 위해 GUS 유전자가 삽입되어 있는 binary 벡터인 pBI121 (Clonetech, Polo Alto, USA)를 이용하여 Pagns-LTP 프로모터 기능 분석용 운반체를 제작하였다. 정방향 프라이머(5′-AAGCTTTTTACGTACGGGCAATGCTA-3′)에

Hind III 제한효소 인식부위를 첨가하고 역방향 프라이머(5′-CAGTAGCTTGTCGACATTTTGAGGATCC-3′)에 *Bam* HI 제한효소 인식부위를 첨가하여 전장 프로모터를 PCR로 증폭하였다. pBI121 벡터를 기본골격으로 사용하였고, *Hind* III와 *Bam* HI 제한 효소를 처리하여 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S 프로모터를 제거한 후 GUS 유전자 앞에 PCR로 증폭된 ns-LTP 유전자의 프로모터 영역을 클로닝하였다.

포플러 형질전환

Pagns-LTP 프로모터의 기능 분석을 위해 pBI121 벡터에 삽입된 Pagns-LTP::GUS와 양성대조군인 CaMV35S::GUS를 freeze-thaw 방법(Holsters et al. 1978)으로 아그로박테리아(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404)에 도입하였다. 형질전환된 아그로박테리아를 기내에서 배양한 현사시나무 줄기에 Choi 등(2005)의 방법으로 형질전환을 수행하였다. 6주간 배양한 현사시나무의 줄기를 약 5 mm의 길이로 잘라 아그로박테리아와 15분간 공조 배양하였다. 이를 캘러스유도배지(MS, 2,4-D 1.0 mg/L, BAP 0.1 mg/L, NAA 0.01 mg/L)에서 2일간 암배양 한 후, kanamycin 50 mg/L가 첨가된 캘러스유도배지에서 4주간 배양하였다. 선발 배지에서 유도된 캘러스로부터 신초를 유도하기 위해 줄기유도배지(WPM, Zeatin 1.0 mg/L, BAP 0.1 mg/L, NAA 0.01 mg/L, kanamycin 50 mg/L)로 옮겼다. 식물체는 24±1°C, 조도 200 μmol $m^{-2}s^{-1}$, 광주기 16시간에서 배양하였다.

선발배지에서 재분화된 개체로부터 외래 유전자의 도입여부를 확인하기 위해 genomic DNA PCR 분석을 수행하였다. DNeasy plant kit (Qiagen, Hiden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 형질전환 현사시나무의 검증을 위해 GUS 유전자를 증폭할 수 있는 정방향 프라이머(5′-CGCACTTACAGGCGATTAAAG-3′)와 역방향 프라이머(5′-TAATAACGGTTCAGGCACAGC-3′)를 제작하여, Ex-Taq DNA polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan)로 중합효소연쇄반응을 실시하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 최초 변성 후, 94℃에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 40초간 총 30회 반응시키고, 72°C에서 5분 연장시켰다. PCR 산물은 1.0% 아가로스젤에 전기영동하여 확인하였다.

GUS 발현 분석

형질전환 포플러에서 GUS 발현을 분석하기 위해 histochemical staining과 fluorometric assay를 수행하였다. Pagns-LTP::GUS 형질전환 포플러와 대조구인 CaMV35S::GUS 형질전환 포플러 및 야생형 포플러를 GUS 염색하였다. 선발된 개체를 계대 후 기내에서 1주일, 2주일, 4주일 배양하여 X-gluc (cyclohexyl ammonium salt) 20 mM, $NaH_2PO_4H_2O$ 100 mM, NaEDTA 10 mM, Triton X-100 0.1%가 첨가된 GUS 분석 용액(pH 7.5)에 침지하여 37°C에서 하룻밤 처리하였다. 이후 70% 에탄올에 침지하여 엽록소를 완전히 제거한 후, 현미경으로 관찰하였다.

4-methylumbelliferyl-β-glucuronide (4-MUG)를 이용하여 fluorometric assay를 수행하였다. 형질전환 포플러를 계대하여 기내에서 2주간 배양한 후 어린뿌리와 어린잎을 분리하여 GUS 분석 용액(2 mM 4-MUG, 10 mM β-mercaptoethanol, 50 mM sodium phosphate pH 7.0, 0.1% sodium lauroyl sarcosine, 10 mM Na_2EDTA, 0.1% Triton X-100)에서 단백질을 추출하였다. 단백질의 양은 Bradford 분석법(Bradford et al. 1976)을 통해 정량하였다. 이후 4-MUG를 첨가하여 GUS 활성을 반응시킨 후 0.2 M Na_2CO_3를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 이를 excitation 파장 365 nm, emission 파장 455 nm에서 측정하여 GUS 활성을 분석하였다.

결과 및 고찰

Pagns-LTP 유전자의 발현양상 분석

현사시나무에서 Pagns-LTP 유전자의 조직별 발현 특성을 알아보기 위해 2주령의 어린잎과 어린뿌리, 4주령의 성숙된 잎과 뿌리 그리고 줄기 조직에서 RNA를 분리하여 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 그 결과 Pagns-LTP 유전자는 2주령의 어린잎에서 약하게 발현되고 어린뿌리에서는 강하게 발현되었으며, 줄기에서는 발현되지 않았다. 가장 높게 발현되는 조직은 계대 후 2주령의 어린뿌리였고, 계대 후 4주령의 정단을 포함한 어린잎이 두 번째로

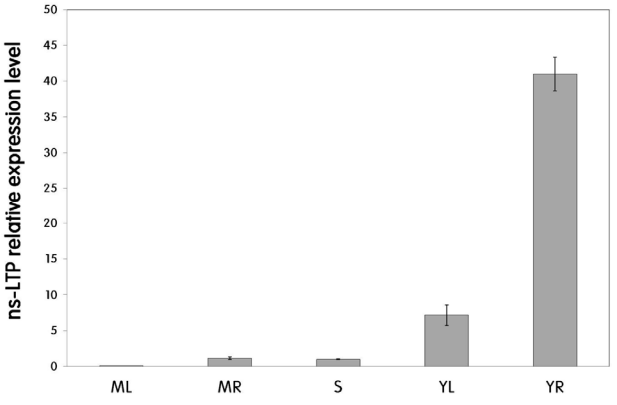

Fig. 1 Expression pattern of ns-LTP in poplar. Transcript level of ns-LTP gene was measured in various tissues using quantitative real time PCR. ML, mature leaf; MR, mature root; S, stem from 4 weeks plantlet. YL, young leaf; YR, young root from 2 weeks plantlet. Values are the means ± SE of triplicates

높았다. 줄기와 성숙된 잎에서는 Pagns-LTP 유전자의 발현이 매우 미비하였으며, 4주령의 뿌리는 성숙된 잎과 줄기보다 상대적으로 높은 발현 수준을 보였다(Fig. 1). 이를 통해 Pagns-LTP 유전자는 식물의 세포신장과 세포분열이 활발히 일어나는 조직에서 특이적으로 발현되는 유전자임을 확인하였다. 또한 성숙된 뿌리는 활발한 생장을 하지는 않지만 세포분열이 일어나는 생장점을 포함하고 있기 때문에 성숙된 잎과 줄기보다 상대적으로 발현이 높은 것으로 추측된다. 여러 식물 종에서 보고된 ns-LTP 유전자는 다양한 조직에서 발현된다. 콩의 ns-LTP 유전자는 뿌리에서 특이적으로 발현되어 뿌리 발달에 관여하고, 유포르비아속의 lagascae에서는 발아하는 종자, 담배에서는 신장하는 세포벽에서 발현된다고 보고되었다(Choi et al. 1996; Edquist and Farbos 2002; Nieuwland et al. 2005). 본 연구 결과에서도 Pagns-LTP 유전자가 어린뿌리와 생장점에서 특히 강하게 발현하는 것으로 보아, Pagns-LTP 유전자는 초기 뿌리 발달 및 세포분열과 신장에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

Pagns-LTP 유전자의 프로모터 분리와 *cis*-element 분석

포플러의 게놈 서열을 바탕으로 ns-LTP 유전자의 프로모터를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하여 현사시의 genomic DNA로부터 Pagns-LTP 프로모터를 분리하였다. Pagns-LTP 유전자의 시작 코돈으로부터 상류의 867 bp에 해당하는 PCR 산물을 pGEM-T 벡터에 삽입하여 염기서열을 확인하였다. PLACE 데이터베이스를 이용하여 Pagns-LTP 유전자의 프로모터 부위를 분석한 결과, 뿌리에서만 또는 자엽과 뿌리에서 특이적인 OSE2ROOTNODULE와 SORLIP1AT *cis*-element가 존재하였다(Vieweg et al. 2004; Jiao et al. 2005). 이것으로 보아 ns-LTP 유전자의 발현이 이러한 *cis*-element에 의해 조절되었음을 예측할 수 있다. 또한 식물의 생장 및 생리적 현상 등을 조절하는 호르몬 신호와 관련된 *cis*-element가 존재함을 확인하였다. Pagns-LTP 프로모터 내의 호르몬 신호에 반응하는 *cis*-element 중 ARR1AT motif는 authentic response regulator transcription factor (ARR)에 결합하는 element로서 사이토카인에 반응한다(Sakai et al. 2000). 사이토카인 호르몬은 식물의 어린기관과 뿌리의 끝에 가장 많이 존재하며 세포분열을 촉진시켜 기관형성을 유도한다(Werner and Schmülling 2009). 또한 지베렐린 호르몬 반응 element인 WRKY710S와 auxin에 반응하는 ARFAT element (Zhang et al. 2004; Baumann et al. 1999)가 존재하였다(Fig. 2). 지베렐린은 미성숙 종자에 가장 많이 존재하나, 어린잎이나 근단 분열조직이 있는 뿌리 끝에서도 생산되어 주로 세포분열 및 세포신장을 촉진하는 역할을 하며, 옥신은 정단 분열조직이 있는 줄기 끝의 잎에서 생산되어 뿌리의 신장을 촉진하는 효과를 나타낸다(Takatsuka and Umeda 2014; Nonogaki 2014; Liu et al. 2014). 식물의 생장과 발달에 관련된 많은 유전자들은 다양한 식물 호르몬과 상호작용에 의해 역할을 수행한다. 따라서 포플러의 ns-LTP는 이러한 호르몬들과 관련하여 뿌리의 발달 등을 조절할 것으로 생각된다.

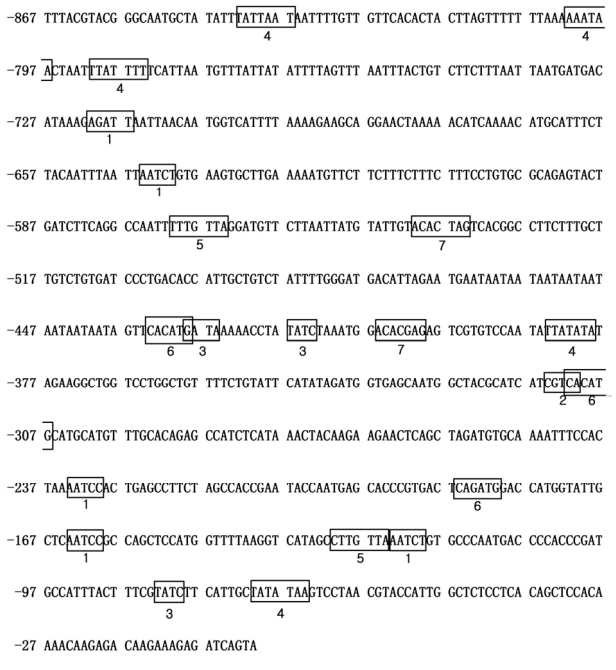

Fig. 2 Promoter sequence of the Pagns-LTP gene. The boxed regions indicate the potentially functional elements predicted by PLACE software. 1. ARR1-binding element; 2. ASF-1 binding site; 3. GATA BOX; 4. TATA BOX; 5. GA-responsive element; 6. E BOX; 7. DPBF-1 and 2 binding sequence

이 밖에 병원성, 저온, 건조, 염, 상해, ABA 호르몬 등과 같은 생물학적, 비생물학적 스트레스와 관련된 BIHD1OS, CURECORECR, DPBFCOREDCDC3, GT1GMSCAM4, MYCCONSENSUSAT, RYREPEATBNNAPA, WBOXNTERF3와 같은 7개의 다양한 *cis*-element들이 존재하였다(Table 1). 애기장대와 담배에서 ns-LTP는 잎의 피층에 축적되어 병원체와 건조 등 다양한 스트레스 방어기작에 관여함으로써, 잎을 보호한다고 보고되었다(Cameron et al. 2006; DeBono et al. 2009; Lee et al. 2009).

Pagns-LTP의 프로모터 내에는 호르몬 신호에 반응하여 생장에 관여하는 *cis*-element와 스트레스에 반응하는 *cis*-element가 동시에 존재한다. 이것으로 보아, 생장뿐만 아니라 생물학적, 비생물학적 스트레스에 대해서도 전사적 조절을 할 것으로 예상되며, 향후 이에 대한 검정이 필요하다고 생각된다.

현사시나무의 형질전환

Pagns-LTP 프로모터의 유전자 발현조절 양상을 분석하기

Table 1 Summary of the function prediction of cis-elements identified in the Pagns-LTP promoter sequence using PLACE database

Element	Element core sequence	Element Number	Function
ACGTABOX	TACGTA	2	Responsible for suger repession
ACGTATERD1	ACGT	4	Involved in etiolation
AMYBOX1	TAACARA	1	Involved in alpha-amylase gene
ARFAT	TGTCTC	1	Response to auxin
ARR1AT	NGATT	5	Response to cytokinin regulator
ASF1MOTIFCAMV	TGACG	1	Response to auxin and salicylic acid
BIHD1OS	TGTCA	3	Response to disease
CCAATBOX1	CCAAT	14	Element for heat shock
CACTFTPPCA1	YCAT	11	Element for phosphoenolpyruvate carboxylase
CURECORECR	GTAC	8	Involved in oxygen-response
DOFCOREZM	AAAG	9	Involved in carbon metabolism
GATABOX	GATA	3	Response to light
GATEAT	TAACAAR	2	Involved in gibberellin biosynthesis
EBOXBNNAPA	CANNTG	6	Response to light and tissue-specific activation
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	3	Response to ABA
GT1CONSENSUS	GRWAAW	4	Response to light
GT1GMSCAM4	GAAAAA	2	Pathogenesis and salt related element
IBOXCORE	GATAA	1	Response to light
INRNTPSADB	YTCANTYY	2	Response to light
MYCCONSENSUSAT	CANNTG	6	Response to ABA, drought and cold signals
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	3	Activated in infected cells of root nodules
POLASIG2	AATTAAA	3	Response to polyA signal
POLASIG3	AATAAT	9	Response to plant polyadenylation signal
RYREPEATBNNAPA	CATGCA	5	Response to ABA
SORLIP1AT	GCCAC	1	Regulate light-induced cotyledon and root-specific genes
WBOXNTERF3	TGACY	5	Response to wounding
WRKY710S	TGAC	9	Involved in gibberellin signaling pathway

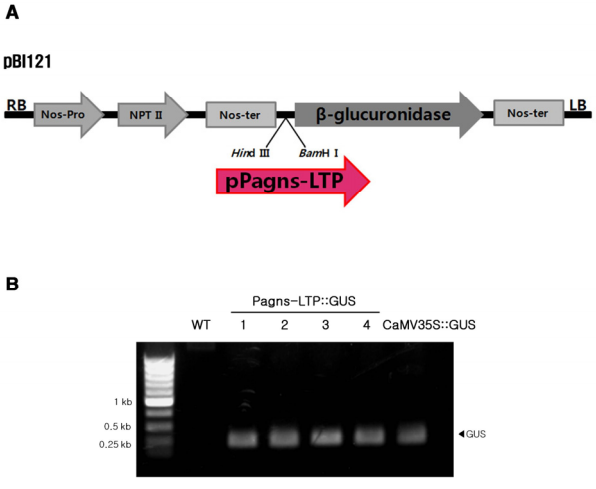

Fig. 3 Identification of Pagns-LTP::GUS transgenic poplars. A. Schematic of Pagns-LTP::GUS vector. GUS reporter gene driven by the Pagns-LTP promoter. B. Confirmation of Pagns-LTP::GUS transgenic poplar with a GUS reporter gene by genomic DNA PCR. The CaMV35S::GUS transgenic were used for positive control

위해 pBI121 벡터를 기본골격으로 하여 Pagns-LTP::GUS construct를 제작하였고, CaMV35S::GUS construct를 양성대조구로 이용하였다(Fig. 3A). 이를 아그로박테리움에 도입한 후 현사시나무에 형질전환하였다. 형질전환 여부는 GUS 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 이용하여 genomic DNA PCR 분석을 통하여 확인하였다. 야생형 포플러에서는 GUS 유전자의 발현이 나타나지 않은 반면, Pagns-LTP::GUS 형질전환 포플러의 4개 계통과 CaMV35S::GUS 형질전환 포플러에서 동일한 크기의 GUS 유전자가 증폭되어 형질전환 여부를 확인하였다(Fig. 3B).

Pagns-LTP 프로모터 활성분석

Pagns-LTP::GUS 형질전환체에서 GUS의 발현 양상을 확인하기 위해 형질전환 포플러를 계대 후 1주일, 2주일, 4주일째의 식물체를 GUS 염색하였다. 이를 통해 발달 시

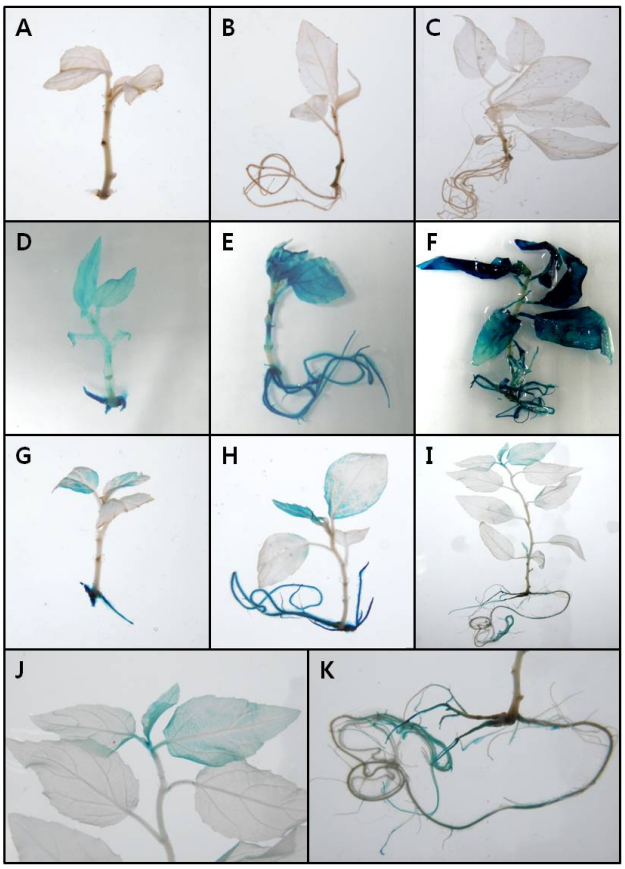

Fig. 4 Histochemical analysis of Pagns-LTP::GUS transgenic poplar. GUS expression was detected by X-Gluc solution from the 1~4 weeks old transgenic poplar plantlets. A~C. For negative controls wild type poplar. D~F. For positive controls poplar transformed with the 35S::GUS. G~I. Pagns-LTP::GUS transgenic poplar. From left to right; 1, 2, 4 weeks age. J~K. Young leaf and developed root zone of 4 weeks old Pagns-LTP::GUS transgenic poplar

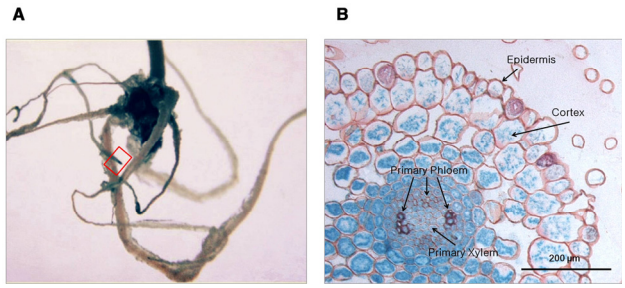

Fig. 5 Cellular localization of GUS activity. A. Root of 4 weeks old transgenic poplar. Red box indicated zone of cross section. B. Cross section of a root tip showing GUS activity

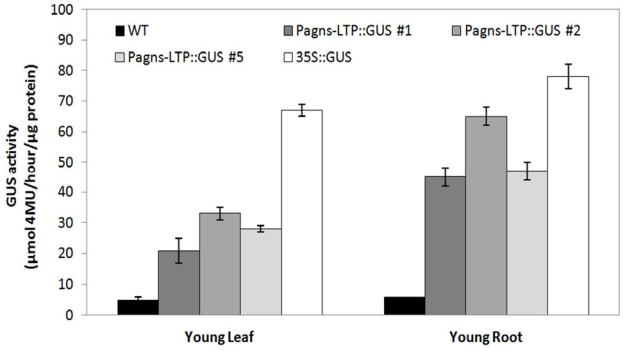

Fig. 6 Comparison of GUS activity in different Pagns-LTP lines and CaMV35S transgenic line. GUS activity was measured in the young leaf and young root from transgenic poplars. Fluorometric quantification of GUS activity among different transgenic poplar lines. GUS activity in young leaf and young root of transgenic poplar. The GUS activity is expressed in pmol 4-MU/hr/μg protein. Error bars represent SE within the three replicates

기별 다양한 조직에서의 Pagns-LTP 프로모터 활성은 유전자의 조직별 발현특성과 동일한 양상을 보여주는 것을 알 수 있었다(Fig. 1, 4). 야생형 현사시나무에서는 GUS 활성이 나타나지 않은 반면, 양성 대조구인 CaMV35S::GUS 형질전환체는 모든 개체의 식물체 전신에서 GUS가 발현되는 것을 확인하였다. Pagns-LTP::GUS 형질전환체는 계대 후 1주일에서 2주일째의 어린뿌리와 어린잎에서 GUS가 발현되었다(Fig. 4). Pagns-LTP 프로모터는 생장이 활발하게 일어나는 부위에서 발현되며 어린뿌리의 전신에서 GUS 활성이 보인다. 이는 뿌리가 신장되는 시기의 세포들은 정단 분열조직으로써 모든 세포들이 같은 비율로 분열되기 때문인 것으로 추측된다(Seo et al. 2007). 4주일 후에는 어린잎에서 GUS가 발현되지만 발달이 멈춘 노화된 뿌리조직에서는 발현되지 않았다. 그러나 새롭게 생성되고 있는 어린 뿌리조직과 뿌리의 끝 부분에 있는 생장점에서는 발현이 지속되고 있는 것을 확인하였다. 뿌리 세포는 시간이 경과함에 따라 비활성화 되어 분열하는 능력이 빠르게 사라진다(Seo et al. 2007). 따라서 Pagns-LTP 프로모터는 세포분열이 왕성하게 일어나는 부위에서만 특이적으로 발현되기 때문에 노화된 뿌리에서는 활성이 나타나지 않는 것으로 추측된다.

성숙된 뿌리 조직 중 GUS 발현이 나타나는 생장점 부위의 뿌리 단면을 절단하여 관찰하였다. 그 결과 표피와 피층에서는 GUS의 발현이 관찰되지 않거나 매우 약한 반면, 정단 분열조직에서 형성된 1차 사부와 전형성층이 분화한 1차 물관부에서는 강하게 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 뿌리 끝 분열 조직에서 중심에 위치하고 있는 1차 사부와 1차 물관부 세포는 왕성하게 분열하여 뿌리의 성장을 유도한다(Beemster and Baskin 1998). 따라서 Pagns-LTP 프로모터는 발달 중인 뿌리 조직 중 왕성하게 분열하는 세포에서 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다.

형질전환체에서 GUS의 활성을 측정하기 위해 형광분석을 수행하였다. 현사시나무의 어린잎과 발달 중인 뿌리조직에서 GUS의 활성을 분석한 결과 어린잎에 비해 발달 중인 뿌리에서 GUS의 활성이 높았다. 그러나 양성 대조구인 CaMV35S promoter 형질전환체의 어린잎과 발

달 중인 뿌리에서보다 낮은 GUS 활성을 보였다(Fig. 6). 결론적으로 Pagns-LTP 프로모터는 어린잎과 발달 중인 뿌리에서와 같이 세포분열이 왕성하게 일어나는 조직에서 특이적으로 발현되는 것을 구명하였다.

본 연구는 포플러의 ns-LTP 유전자와 프로모터의 발현 특성을 구명한 것으로서 그 동안 초본류의 ns-LTP에 대한 많은 연구가 보고된 반면, 목본류에서는 많이 이루어지지 않았다는 점에서 그 의의가 크다. 또한 목본의 조직 특이적 프로모터를 구명함으로써, 목본에서의 생장 및 스트레스 관련 연구에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

나무의 유전 공학적 연구를 위해서는 목본 고유의 유전자 및 프로모터 연구가 필수적이다. 우리는 포플러(*P. alba* × *P. glandulosa*)의 *Pagns-LTP* 유전자의 867 bp 프로모터를 분리하였고, β-glucuronidase (GUS) reporter 유전자를 이용한 프로모터의 형질전환 포플러를 제작하여 특성 분석하였다. *Pagns-LTP* 유전자는 어린뿌리에서 강하게 발현되었고 어린잎에서는 약하게 발현되었으며, 그밖에 다른 조직에서는 발현되지 않았다. 또한, 프로모터의 활성은 뿌리와 어린잎에서 한정되었으며 어린뿌리의 세포 전체에서 강한 활성을 나타내었다. 이에 포플러 ns-LTP 프로모터 내의 *cis*-element를 조사하고 현사시나무에서 *Pagns-LTP* 프로모터를 분리한 후 활성을 분석하였다. 프로모터 내의 *cis*-element를 분석한 결과, 조직 특이적 발현과 호르몬 및 스트레스에 반응하는 다양한 *cis*-element가 존재함을 확인하였다. 이를 통해 포플러의 ns-LTP는 생장뿐만 아니라, 스트레스에도 관여할 것이라고 추측할 수 있었다. 본 연구는 목본의 유전자 기능 분석 및 다양한 응용 연구를 위해 유용하게 이용될 수 있는 도구로서의 가능성을 제시하였다.

사 사

본 연구는 2015년도 국립산림과학원 석·박사연구원십의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999) The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants. Plant Cell Online. 11:323-333

Beemster GT, Baskin TI (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol. 116:1515-1526

Boutrot F, Chantret N, Gautier MF (2008) Genome-wide analysis of the rice and Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. BMC Genomics. 9:86

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. 72:248-254

Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. Plant Physiol. 140:176-183

Choi DW, Song JY, Oh MH, Lee JS, Moon JH, Suh SW, Kim SG (1996) Isolation of a root-specific cDNA encoding a ns-LTP-like protein from the roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Plant Mol Biol. 30:1059-1066

Choi YI, Noh EW, Lee HS, Han MS, Lee JS, Choi KS (2005) An efficient and novel plant-selectable marker based on organomercurial resistance. Plant Biol. 48:351-355

DeBono A, Yeats TH, Rose JK, Bird D, Jetter R, Kunst L, Samuels L (2009) *Arabidopsis* LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. Plant Cell. 21:1230-1238

Edqvist J, Farbos I (2002) Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphoribia lagascae*. Plant. 215:41-50

Feuillet C, Lauvergeat V, Deswarte C, Pilate G, Boudet A, Grima-Pettenati J (1995) Tissue- and cell-specific expression of a cinnamyl alcohol dehydrogenase promoter in transgenic poplar plants. Plant Molecular Biology. 27:651-667

Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Genet Genomics. 163:181-187

Jiao Y, Ma L, Strickland E, Deng XW (2005) Conservation and Divergence of Light-Regulated Genome Expression Patterns during Seedling Development in Rice and Arabidopsis. Plant Cell. 17:3239-3256

Kader JC, Julienne M, Vergnolle C (1984) Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transfer proteins in the poaceae family. Mol Cells. 24:215-223

Ko JH, Kim HT, Hwang ID, Han KH (2012) Tissue-type-specific transcriptome analysis identifies developing xylem-specific promoters in poplar. Plant Biotech J. 10:587-596

Kreis M, Forde BG, Rahman S, Miflin BJ, Shewry PR (1985) Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. J Mol Biol. 183:499-502

Lascombe MB, Bakan B, Buhot N, Marion D, Blein JP, Larue V, Lamb C, Prange T (2008) The structure of 'defective in induced resistance' protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. Prot Sci. 17:1522-1530

Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1998) Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 A crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. J

Mol Biol. 276:437-448

Lee SB, Go YS, Bae HJ, Park JH, Cho SH, Cho HJ, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC (2009) Disruption of glycosylphosphatidylinositon-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules and enhanced susceptibiliy to infection by the fungal pathogen, *Alternaria brassicicola*. Plant physiol. 150:42-54

Liu J, Rowe J, Lindsey K (2014) Hormonal crosstalk for root development : a combined expreimental and modeling perspective. Front Plant Sci. 5:116

Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. Nature 419:399-403

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bkoassay with tabacco cultures. Physiol Plantarum. 15(3):473-497

Nieuwland J, Feron R, Huisman BA, Fasolino A, Hibers CW, Derksen J, Mariani C (2005) Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. Plant Cell. 17:2009-2019

Nonogaki H (2014) Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. Front Plant Sci. 5:233

Pfaffl MW (2001) Development and validation of an externally standardised quantitative Insulin like growth factor-1 (IGF-1) RT-PCR using LightCyclear SYBR Green I technology. In: Meuer S, Witter C, Nakagawara K (eds), Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg. 281-191

Pii Y, Astegno A, Peroni E, Zaccardelli M, Pandolfini T, Crimi M (2009) The *Medicago truncatula* N5 gene encoding a root-specific lipid transfer protein is required for the symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. Mol Plant Microbe Interact. 329:223-226

Sakai H, Aoyama T, Oka A (2000) Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. Plant J. 24:703-711

Seo SK, Kang SW, Kim W, Hong JS, Kim MJ, Lee KP, Kim SH (2000) Mechanisms in Plant Development. WORLDSCIENCE, pp.7-8

Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. Structure. 3:189-199

Takatsuka H, Umeda M (2014) Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. J Exp Bot. 65:2633-2643

Vieweg MF, Fruhling M, Quandt HJ, Heim U, Baumlein H, Puhler A, Kuster H, Andreas MP (2004) The promoter of the Vicia faba L. leghemoglobin gene VfLb29 is specifically activated in the infected cees of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. Mol Plant Microbe interact. 17:62-69

Wang L, Li L, Xu L, Zhou J, Zhuang H, Gong X, Wang M, Sun SSM, Zhuge Q (2013) Isolation and Functional Analysis of the Poplar RbcS Gene Promoter. Plant Mol Biol Rep. 31:120-127

Werner T, Schmülling T (2009) Cytokinin action in plant development. Curr Opin Plant Biol. 12:527-538

Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho T-hD, Shen QJ (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. Plant Physiol. 134:1500-1513