

인삼으로부터 Acyl-CoA-binding Protein 유전자의 동정 및 계통적 분석

인준교 · 류명현 · 최광태 · 최관삼¹ · 김세영² · 양덕춘*

한국인삼연초연구원 신사업연구부, ¹충남대학교 응용생물화학부, ²경희대학교 농학과

Isolation and Phylogenetic Analysis of Acyl-CoA-binding Protein Gene from *Panax ginseng* C.A. Meyer

IN, Jun Gyo · RYU, Myong Hyun · CHOI, Kwang Tae · CHOI, Kwan Sam¹ · KIM, Se Young² · YANG, Deok Chun*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

¹Department of Applied Biology, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea

²Department of Agronomy, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea

ABSTRACT Acyl-CoA binding proteins (ACBP) are small highly-conserved cytosolic proteins that bind long-chain acyl-CoAs. A cDNA encoding ACBP was identified from cDNA library constructed from hairy root poly A⁺ RNA in expressed sequence tags (EST) analysis. The cDNA clone was 453 bp long and carried an open reading frame of 264 bp (10 kDa). The ginseng ACBP amino acid sequence was compared with other reported plant ACBPs using the CLUSTALW. Ginseng ACBP is 89%, 81%, 80%, and 73% identical with ACBP from castor bean, lilly, *Digitalis* and *Arabidopsis*, respectively. However, ginseng ACBP is 5 amino acids smaller than *Arabidopsis* and rape seed ACBPs. Also there is no any known signal peptide sequence in ginseng ACBP.

Key word : Acyl-CoA-binding protein (ACBP), EST, hairy root, *Panax ginseng*

서 론

Acyl-CoA 결합단백질 (ACBPs)은 약 10 kDa 정도 되는 작은 단백질로서 지방산이나 CoA가 아닌 긴 사슬의 acyl-CoA와 결합한다. 이 단백질들은 광범위한 지질기질의 수송에 관련된 식물의 지질전이단백질과는 구조적으로 완전히 다르다 (Bourgis et al. 1997). ACBP는 *in vitro* 분석에서 염소의 지방산 합성효소를 자극하는 단백질로서 소의 간에서 처음으로 정제되었으며 (Mogensen et al. 1997), 진핵생물에서는 어디에나 존재하는 수용성 단백질로 알려져 있다.

긴사슬 acyl-CoA와 ACBP는 효소의 활성화와 유전자 발현의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 많은 *in vitro* 연구에서 긴사슬 acyl-CoA는 대장균에서 다른 acetyl-CoA carboxylase (ACCase), AMP kinase kinase와

FadR 단백질들 사이를 조절하고 있다는 것을 보여주었는데 (Faergemann and Knudsen 1997), 이들은 모두 지질생합성의 조절과 관련되어 있는 효소와 단백질들이다. 비록 이들 단백질들이 *in vivo*에서 긴사슬 acyl-CoA에 의하여 억제되지는 않지만, 그 단백질이나 다른 단백질들을 억제시킴으로써 자신의 합성을 조절할 가능성이 제시되고 있다. 두 경우 모두에서 ACBP는 긴사슬 acyl-CoA와 결합함으로써 효소활성의 억제를 완화시킬 수 있다. 게다가 ACBP는 *in vitro*에서 긴사슬 acyl-hydrolase로부터 긴사슬 acyl-CoA를 보호할 수 있다 (Engeseth et al. 1996). ACBP는 쥐의 간에서 유래된 미토콘드리아에서 글리세롤지질 (glycerollipid) 합성이나 베타 산화를 위한 미립체막 (microsomal membrane)에 긴사슬 acyl-CoA를 공여한다 (Rasmussen et al. 1994). 이러한 결과는 ACBP가 세포질에서 안정화된 긴사슬 acyl-CoA pool 형성에 관여하고 있다는 것을 제시하고 있다.

ACBP의 cDNA는 동물에서는 쥐 (Mocchetti et al. 1986), 인간과 소 (Webb et al. 1987)로부터 분리되었는데, 이들 유전

*Corresponding author. Tel 042-866-5434 Fax 042-862-2522

E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

자들은 아미노산 서열을 비교한 결과 90개의 아미노산(약 10 kDa)으로 구성되어 있으며 고도로 보존되어 있어 ACBP의 생리적인 역할이 진화하는 동안에 보존되어 왔다는 것을 나타낸다. 식물에서는 *Brassica napus* (Hills et al. 1994)에서 처음으로 ACBP의 homologue가 보고되었다. 이 ACBP는 92개의 아미노산으로 구성되어 있으며 mRNA는 발달중인 배, 꽃 그리고 자엽 등에서 강하게 발현하였다. 이밖에도 *Arabidopsis thaliana* (Engeseth et al. 1996), cotton (Reddy et al. 1996), castor bean (Erber et al. 1997) 등의 식물체에서도 보고되었다.

본 연구에서는 인삼으로부터 대량으로 유용유전자 분리를 위한 EST분석을 통하여 분리된 ACBP 유전자의 특성과 다른 식물체에서 보고된 ACBP 유전자와 아미노산 서열비교를 통한 유연관계 분석을 한 결과에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

모상근의 유도 및 계대배양

인삼 3년근 뿌리조직을 차아염소산 나트륨으로 멸균한 후 24시간 액체배지에서 배양한 *Agrobacterium rhizogenes* R1000을 접종하여 모상근 (hairy root)을 유도하였다. 유도된 모상근은 호르몬이 첨가되지 않은 1/2 MS 액체배지에 옮겨 암소에 배양하면서 세포주를 계대·유지하였으며, 생장량 및 saponin 함량을 측정하여 우수한 세포주 (KGHR-8, 특 605222호)를 선발하였다.

Total RNA의 추출 및 cDNA library 제작

4주간 암소에서 생장시킨 모상근을 수거하여 수분을 완전히 제거한 후 생체중 10g을 사용하여 Shirras 등 (1984) 방법을 약간 변형하여 total RNA를 추출하였다. 모상근으로부터 추출한 total RNA는 mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech)을 사용하여 mRNA만을 분리·정제하였으며, 그 중 5 µg을 ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE)을 이용하여 cDNA library를 제작하였다.

Acyl-CoA-binding protein 유전자의 분리 및 분석

인삼의 유전자 대량분석을 위하여 제작된 cDNA library로부터 mass excision을 통하여 plasmid를 뽑아 낸 후에 대장균 (SOLR cell)에 형질전환하여 LB배지에서 하루밤 배양한 후 Plasmid Purification Kit (Kisan Biotech, Korea)을 사용하여 plasmid를 분리하였으며, PCR 증폭을 통하여 insert 크기를 확인한 후 300 bp 이상의 clone만을 선별하여 염기서열 분석 (ABI377)을 하였다. 분석된 clone은 NCBI의 BLAST

프로그램을 사용하여 homology 검색을 실시하였다. 그리고 DNAsis (Hitachi)를 사용하여 유전자 분석을 하였고 CLUSTALW 프로그램을 사용하여 유연관계를 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

Acyl-CoA-binding protein은 약 10 kDa 정도 되는 작은 단백질로 지질의 합성과 분해에 있어서 아주 중요한 역할을 하고 있다. 진핵세포에서는 acyl-CoA에 결합하는 ACBP 유전자가 세포질에서 발현하고, 세포질에 존재하는 acyl-CoA와 ACBP가 결합함으로써, acyl-CoA 합성효소의 생산억제를 완화시켜 ACBP-acyl-CoA의 pool을 생성하고, 불안정한 acyl-CoA의 가수분해를 억제하며, free acyl-CoA에 의한 부적절한 대사 및 신호과정의 변동을 억제하게 된다.

인삼으로부터 유용유전자의 대량분석을 위하여 *A. rhizogenes* R1000의 감염에 의해서 유도된 모상근 중에서 Rg1 포함세포주로 선발된 KGHR-8 세포주로부터 total RNA를 추출하였다. 정제된 mRNA를 사용하여 cDNA library를 제작하고 무작위로 선발하여 EST 분석한 결과 인삼 모상근의 cDNA library로부터 한 개의 ACBP full length cDNA를 확보할 수 있었다. 인삼의 ACBP는 전장의 길이가 453 bp로 5' non-coding 영역이 26 bp, 3' non coding 영역이 163 bp로 구성되어 있다 (Figure 1). 27번째 염기부터 ATG 코돈으로 시작되는 단백질 번역부위 (open reading frame)는 288번째의 TAA 코돈으로 종결되었다. 그리고 345~350 bp에 polyadenylation 신호인 AATAAA가 존재하고 있으며 22개의 poly A가 연결되어 있었다. 인삼의 ACBP는 G/C 함량이 37%로 cotton (Reddy et al. 1996)의 56%에 비하여 비교적 낮은 편이었으며, 87개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자량은 약 10 kDa 정도 되는 것으로 추정되었다.

```

1  AGCAGATTTTATACTACACAGAGAAAATGGGTTTGACGAGGGAATTTGAGGAGCATGCTG  60
                                     M G L Q E E F E E H A E
61  AGAAAGCAAAGACCCCTGCCAGAGACTACCAACGAGAAATAAGCTTATATTGTATGGAT  120
    K A K T L P E S T T N E N K L I L Y G L
121 TGTACAAGCAAGCCACAGTTGGACCAAGTGAACACAAGCCGCTCGTATTTTCAACATGA  180
    Y K Q A T V G P V N T S R P G I F N M R
181 GGGATAGGGCAAAGTGGGATGCATGGAAAGGCTGTTGAAGGAAAATCCAAAGAGGAGGCAA  240
    D R A K W D A W K A V E G K S K E E A M
241 TGGGTGATTATATCACTAAGGTGAAGCAGTTGCTGAAGAAGCTGCTTAATTTTCATGAGA  300
    G D Y I T K V K Q L L E E A A *
301 TTATATGCTCTAAATATGAATGATAACTGTTGTTGTGGAATAATATTTATTTATGT  360

361  ACTTTGGTAGCCTAAAGTAATGATGCCTGTAATTTGTGTAAACCTTGTCTATTTAAATC  420

421  AGATAAATTAAGTCCATATACTGGAATTATCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  475
    
```

Figure 1. A cDNA and deduced amino acid sequence of acyl-CoA-binding protein isolated from *Panax ginseng*. The putative polyadenylation signal is underlined. The asterisk is indicated the stop codon.

<i>Arabidopsis</i>	MGLKEEFEEHAEKVNTLTELPSNEEDLLILYGLYKQAKFGPVDTSRPGMFSMKERAKWD	60
Castor bean	MGLKEDFEFHAEKAKTLPENTTNNENKLLIYGLYKQATVGPVNTSRPGMFMKDRAKWD	60
Cotton	MGLKEEFEEHAEKVKTLPAAPSNDMLLIYGLYKQATVGPVNTSRPGMFMKDRAKWD	60
Digitalis	MALKDEFEFHAEKAKTLPSTSNENKLLIYGLYKQATVGNVNTSRPGIFNFKDRAKWD	60
Lily	MALKKEEFEEHAEKAKTLPSTSNENKLLIYGLYKQATVGPVDTGPPGMSFPRERAKWD	60
Ginseng	MGLKEEFEEHAEKAKTLPSTSNENKLLIYGLYKQATVGPVNTSRPGIFNFKDRAKWD	60
Rape	MGLKEDFEFHAEKVKKLTASPSNEEDLLILYGLYKQATVGPVNTSRPGMFSMKERAKWD	60
	* *	
<i>Arabidopsis</i>	KAVEGKSSEAMNDYITKVKQLLEVAASKAST	92
Castor bean	KAVEGKSTEEAMSDYITKVKQLLEVAASAA--	90
Cotton	KAVEGKSKEEAMGDYITKVKQLLEVAAGSS--	89
Digitalis	KAVEGKSQEEAMGEYITKVKQLCEAATASS--	90
Lily	KAVEGKSKEEAMGDYITKVKQLLEESA----	87
Ginseng	KAVEGKSKEEAMGDYITKVKQLLEESA----	87
Rape	KAVEGKSTDEAMSDYITKVKQLLEEAASSASA	92
	***** * * * * *	

Figure 2. Comparison of the amino acid sequence of *Panax ginseng* ACBP (AB071376) with *Arabidopsis thaliana* (AF380634), castor bean (Y08996), cotton (AI731976), *Digitalis lanata* (AJ249834), lily (AF031541), rape (X77134). Amino acid sequences were aligned using the CLUSTALW program.

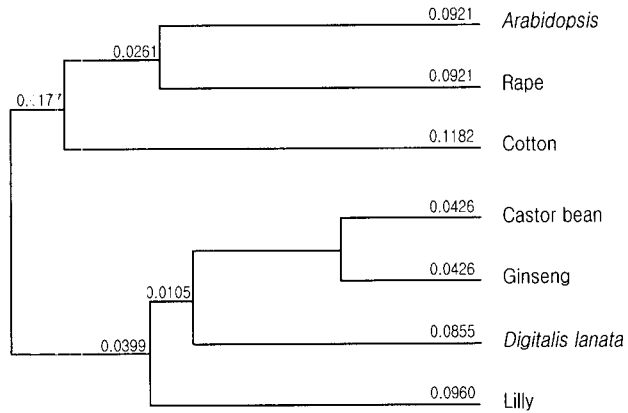


Figure 3. Phylogenetic analysis of acyl-CoA-binding proteins isolated from plants based on amino acid sequences. The phylogenetic tree was reconstructed by UPGMA.

과 식물체에서 보고된 ACBP의 아미노산 서열을 비교한 결과 *Arabidopsis*와 rape는 92개의 아미노산으로 구성되어 있고, castor bean과 *Digitalis lanata*는 90개, cotton은 89개, lilly는 인삼과 같은 87개의 아미노산으로 구성되어 있었다 (Figure 2).

인삼의 ACBP와 다른 식물체에서 보고된 것의 아미노산 서열의 상동성을 비교한 결과 castor bean이 89.5%로 제일 높게 나타났으며, lilly가 81.8%, *Digitalis lanata*가 80.7%, *Arabidopsis*와 cotton이 73%, rape가 71.9%의 상동성을 보였는데 반하여, human과 yeast 등은 41%와 45%로서 비교적 낮은 상동성을 나타내었다.

인삼의 ACBP와 다른 식물체에서 보고된 ACBP들의 아미노산 서열을 이용하여 계통분석을 실시하여 본 결과, 아미노산 서열에서 89.5%로 매우 높은 상동성을 나타낸 castor bean이 인삼과 매우 가까운 유연관계에 있는 것으로 나타났으며, *Digitalis lanata*와 lilly가 동일한 그룹으로 구분되었고,

Arabidopsis, rape와 cotton이 인삼과는 다른 그룹으로 나누어져, 인삼의 ACBP와는 비교적 먼 유연관계에 있는 것으로 나타났다 (Figure 3).

식물에서 ACBP에 대한 생리적인 기능에 대한 자세한 연구는 아직 미비한 실정이다. 최근에 *Arabidopsis* (Chye 1998)에서 24 kDa 정도의 막관련 단백질이 보고되었는데 C-말단부위에 acyl-CoA binding domain이 존재한다는 보고가 있다. 이 단백질은 기존의 ACBP 단백질들과는 낮은 상동성을 나타내었는데 종자에서 지질대사에 관련되어 있다고 한다.

인삼은 약용식물로서 많은 연구가 되어 왔으나 기내배양이 어려워 실험실에서 연구하기에는 많은 어려움이 있다. 그러나 인삼의 뿌리 절편에서 *Agrobacterium*을 매개로 하여 외래유전자가 도입되어 유도된 모상근 (hairy root)은 성장속도가 매우 빠르고 유효성분도 다량 함유하고 있어 매우 좋은 유용물질의 생산체로서 기대되고 있으며, 또한 기내에서 대량배양을 통한 유용물질의 대량생산 측면에서도 아주 좋은 실험체이다. 인삼의 모상근은 생리적인 활성이 왕성한 세포주로서 토양에서 자란 인삼뿌리와 비교를 통하여 유용물질의 생산계를 연구하는데 있어서도 아주 유용하다. 인삼의 모상근 cDNA library로부터 분리된 인삼 ACBP 유전자의 생리적인 기능뿐만 아니라 인삼의 주요 약효성분인 saponin 합성 유전자들에 대한 유전적인 연구에 있어서도 좋은 재료로서 지속적인 연구를 통하여 모상근에서 ACBP의 생리적인 역할을 규명할 것이다.

적 요

Acyl-binding protein (ACBP)은 긴사슬 acyl-CoA와 결합하는 고도로 보존되어 있는 세포질 단백질이다. 인삼의 유용 유전자를 대량으로 분석하기 위하여 제작된 인삼 모상근 cDNA library로부터 인삼 ACBP 유전자가 분리되었다. 이 유전자는 길이가 453 bp이고 264 bp의 open reading frame (10kDa)을 가지고 있었다. 인삼 ACBP의 아미노산 서열을 다른 식물체에서 보고된 것과 비교한 결과 castor bean과 89.5%로 매우 높은 유사성을 나타내었으며, lilly, *Digitalis*, *Arabidopsis*, rape 등과 각각 81.8%, 80.7%, 73%, 71.9%의 유사성을 나타내었다. 그러나 인삼의 ACBP는 *Arabidopsis*와 rape의 ACBP보다 5개의 아미노산이 적은 87개의 아미노산으로 이루어져 있었고 어떠한 signal peptide로 발견되지 않았다. 그리고 현재 보고되어 있는 다른 식물체의 ACBP와 계통분석을 한 결과 인삼의 ACBP는 *Arabidopsis*나 cotton 보다는 castor bean과 매우 가까운 유연관계에 있는 것으로 나타났다.

사사 - 본 연구는 21세기 프론티어 사업인 자생식물 사업단의 연구비 지원 (PF003101-01)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Bourgis F, Kader JC** (1997) Lipid-transfer proteins: tools for manipulating membrane lipids. *Physiol Plant* **100**:78-84
- Chye ML** (1998) Arabidopsis cDNA encoding a membrane-associated protein with an acyl-CoA binding domain. *Plant Mol Biol* **38**:827-838
- Engeseth NJ, Pacovsky RS, Newman T, Ohlrogge J** (1996) Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch Biochem Biophys* **331**:55-62
- Erber A, Horstmann C, Schobert C** (1997) A cDNA Clone for Acyl-CoA-binding Protein from Castor Bean (Accession No. Y08996) (PGR97-075). *Plant Physiol.* **114**:396
- Faergemann NJ, Knudsen J** (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323**:1-12
- Hills MJ, Dann R, Lydiate DL, Sharpe A** (1994) Molecular cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. for a homologue of acyl-CoA-binding protein. *Plant Molecular Biology* **25**:917-920
- Mocchetti E, Einstein R, Brosius J** (1986) Putative diazepam binding inhibitor peptide : cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:7221-7225
- Mogensen IB, Schulenberg H, Hansen HO, Spener F, Knudsen J** (1997) A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. *Biochem J* **241**:189-192
- Rasmussen JT, Faergemann NJ, Kristiansen K, Knudsen J** (1994) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochem J* **299**:165-170
- Reddy AS, Ranganathan B, Haisler RM, Swize, MA** (1996) A cDNA Encoding Acyl-CoA-binding Protein from Cotton (U35015). (PGR96-028). *Plant Physiol.* **111**:348
- Shirras AD, Northcote DH** (1984) Molecular cloning and characterisation of DNAs complementary to mRNAs from wounded potato (*Solanum tuberosum*) tuber tissue. *Planta* **162**:353-360
- Webb NR, Rose TM, Malik N, Marquardt H, Shoyab M, Todaro GJ, Lee DC** (1987) Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. *DNA* **6**:71-79

(접수일자 2001년 6월 20일)