

Functional Analysis of a Grapevine UDP-Glucose Flavonoid Glucosyl Transferase (UFGT) Gene in Transgenic Tobacco Plants

Ji-Yeon Park, Sung-chool Park and Jaeho Pyee*

Department of Molecular Biology, BK21 Graduate Program for RNA Biology and Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin-si, 448-701, Korea

Received November 11, 2009 / Accepted February 8, 2010

Anthocyanin, a phenolic compound, is a pigment that shows blue or red color in the fruit, petal and other tissues. It is an important factor in grape berry skin pigment and accumulates only in the skin. This skin-specific accumulation of anthocyanin has been reported to be regulated by the *ufgt* gene which encodes UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase that participates in the biosynthesis of anthocyanin. The *ufgt* gene is expressed only in berry skin, while the other genes involved in the biosynthetic pathway are expressed in both skin and flesh tissues. In order to determine whether anthocyanin accumulation is primarily regulated by compartment of UFGT, a *ufgt* cDNA clone was isolated from grape berry, its open reading frame was ligated in pBI121 vector in either a sense or an antisense orientation under the control of the CaMV35S promoter and the recombinant constructs were incorporated into tobacco plants. Several transgenic lines were selected and characterized to determine the level of expression of the grapevine *ufgt* transcript and endogenous homologs of tobacco. Compared to the wild-type, the amount of anthocyanins in sense transgenic plants increased by 44%, while the amount of anthocyanins in antisense transgenic plants decreased by 88%. In addition, the color of flowers became intense in the sense transgenic plants. These results suggest that over-expression or repression of the *ufgt* gene affected the accumulation of anthocyanin in flowers of tobacco.

Key words : Anthocyanin, *ufgt* gene, grapevine, tobacco

서 론

식물에 있어서 색깔은 중요한 의미를 갖는다. 꽃의 색깔은 수분매개자를 유도하는데 유용하며, 과일의 색깔은 동물에 의해 종자를 멀리까지 퍼지도록 하는데 이용된다[18,24]. 플라보노이드의 하나인 안토시아닌은 식물의 과일, 꽃잎 등 여러 조직에서 적색 또는 청색 등을 나타내는 수용성 색소로, 다양한 분야에서 연구되어왔다[10,11,16,29]. 안토시아닌의 생합성에 관여하는 유전자는 옥수수, 페튜니아, 사과, 포도, 쌀 등 여러 식물에서 분리 되었으며, 각각의 분자생물학적인 특성에 대해 많은 연구가 진행되었다[1,8,9,25]. 그러나 이러한 연구에도 불구하고, 안토시아닌의 조직 특이적인 축적에 대해서는 아직 충분히 규명되지 못하였다[5,15,22,26]. 안토시아닌 축적에 핵심으로 알려진 *ufgt* 유전자를 이용하여 화색의 변화를 확인한 실험은 여러 식물을 대상으로 수행되었다. 페튜니아의 경우, *ufgt* 유전자의 발현양을 증가시키거나 감소시켰을 때, 꽃의 색깔이 변하였다[2,30]. 그리고 Arabidopsis에는 *ufgt* family (UGT78D1, UGT78D2, UGT78D3, UGT3GTs)가 존재하는데, 그 중 UGT78D2 유전자를 과발현시킬 경우 발달 중인 씨앗의 겉껍질에서만 색소가 침착되는 것이 관찰되었다[23].

이는 *ufgt* 유전자가 꽃 색소 생성뿐만 아니라 침착에도 관여하고 있음을 의미한다.

포도는 품종과 조직에 따라 안토시아닌 색소의 침착 여부가 뚜렷하게 달라서, 색소 생합성 유전자의 발현 조절 기작을 연구하는데 매우 좋은 모델이 되고 있다. 포도는 non-climateric (비급등형) 과일로서, 과실 발달은 이중 sigmoid 성장 곡선을 가지며, 발달단계에 따라 과피의 색깔이 달라진다. 포도의 발달은 4단계로 나눌 수 있는데, 일차생장기인 단계 1과 2에서는 과실이 형성되고, 씨앗의 배가 만들어진다[19]. 그리고 세포분열이 빠르게 일어나서 최종 과실의 총 세포 수가 결정된다. 이 시기 동안에, 히드록시남산과 타닌 등이 축적됨에 따라 부피도 커진다. 이차생장기인 단계 3, 4에서는 과실의 크기가 두 배로 커지며 안토시아닌의 침착으로 과피가 색상을 띠게 된다[19]. 또한 일차생장기 동안에 과피에 축적되었던 타닌은 감소하거나 펙틴과 안토시아닌으로 변환된다. 안토시아닌 합성에는 여러 효소들이 작용하지만, 그 중에서도 특히 7가지가 중요한 역할을 한다. Phenylalanine ammonia lyase (PAL)로부터 시작하여 chalcone synthase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) 그리고 UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UFGT)를 거치면서 페닐알라닌은 안토시아닌으로 변환된다[4,6,12]. UFGT는 안토시아닌 착색의 중요한 단계에 작용하는 효소로

*Corresponding author

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

E-mail: jpyee1@dankook.ac.kr

안토시아닌에 당을 첨가하여 배당체인 안토시아닌을 만든다. 각각의 효소를 암호화하는 유전자에 대해 많은 연구가 진행되었으며, 이들 안토시아닌 합성 유전자는 과육의 발달 단계에 따라 발현 양상이 달라진다[6]. 특히 *ufgt*는 다른 안토시아닌 합성 유전자들과는 다른 특이한 발현 양상을 보인다. 즉 일차생장기에는 *ufgt* 유전자를 제외한 모든 유전자가 발현되며 안토시아닌이 축적되기 시작하는 이차생장기에는 *ufgt* 유전자를 포함하여 모든 유전자들이 발현된다[6]. 포도의 과피에서 착색이 시작되는 시기와 동일하게 *ufgt* 유전자의 발현이 시작되고, 성숙기에 그 발현 양이 최대에 이른다. 그리고 포도 품종 중에서도 적포도의 과피에서만 발현되며, 적포도의 과육이나 백포도의 과육과 과피에서는 전혀 발현되지 않는다[7,21]. 이러한 결과로부터, 안토시아닌 침착과 *ufgt* 유전자의 발현이 밀접한 연관을 가질 것으로 추정되어 왔다[20].

따라서 본 연구에서는 담배 꽃을 이용하여 안토시아닌의 축적이 *ufgt*의 양에 의해 조절되는지를 규명하고자 하였다. 이를 위해 포도(*Vitis vinifera* L. X *Vitis labrusca* L. cv Kyoho or *Vitis labruscana*)로부터 *ufgt* cDNA를 분리하고 이를 sense 혹은 antisense 방향으로 발현시키는 벡터를 제작한 다음, 담배에 도입하였다. 담배 형질전환체를 분석하여 포도 *ufgt* 유전자가 도입된 line을 선발하고, 선발된 형질전환체의 꽃에서 *ufgt* 전사체의 양 및 안토시아닌 함량을 분석하고 화색을 비교하였다. 이를 통해 *ufgt* 전사체의 양이 증가하면 조직내 안토시아닌 함량이 증가하며 꽃의 색깔도 진해진다는 것을 관찰하였다.

재료 및 방법

식물 재료

천안시 입장 소재의 거봉 포도 과원으로부터 개화 이후 일주일 간격으로 포도(*Vitis vinifera* L X *Vitis labrusca* L. cv Kyoho)를 수확하였다. 과피에 안토시아닌 색소가 축적된 포도 과실 중 일부를 무작위로 선정해서 과피, 과육, 씨를 분리하고 이를 급속 냉동시켰다. 야생형 담배(*Nicotiana tabacum* cv Wisconsin) 및 담배 형질전환체는 식물생장기 내에서 27°C (16 시간 낮) 조건으로 키웠다.

포도 혹은 담배 조직으로부터 total RNA의 추출

-80°C에 보관되어 있는 시료로부터 5 g을 채취하여 막자사발에 옮겨 고운 가루로 만든 후, 25 ml의 추출완충용액(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)을 첨가하여 섞고, 60°C의 항온 수조에서 5 분간 정치시켰다. 같은 양의 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1, v/v/v)을 첨가하여 혼합시킨 뒤 12,000× g로 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮겨서 0.6 배의 이소프로

판올을 넣고, 얼음에서 30 분간 침전시킨 뒤, 12,000× g로 10 분간 원심분리하였다. 원심분리 후 핵산 침전물을 0.6 ml의 0.1% DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리 멸균 증류수에 녹였다. 같은 양의 4 M LiCl를 넣고 4°C에서 16시간 동안 정치시킨 다음 원심분리하였다. 침전물을 70% 에탄올로 씻고 20 μ l의 0.1% DEPC 처리 멸균 증류수에 녹여서 -80°C에 보관하며 사용하였다. Total RNA는 UV Spectrophotometer (BIO-RAD)를 사용하여 정량하였으며, 1.8%의 formaldehyde-agarose gel에서 RNA 상태를 확인하였다.

포도 *ufgt* cDNA 클로닝

포도 과피에서 분리한 2 μ g의 total RNA로부터 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하고 이를 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 프라이머는 기존에 포도(*Vitis vinifera* L.)에서 보고된[28] *ufgt* 유전자의 염기서열을 바탕으로 제작하였으며, forward 및 reverse 프라이머는 각각 5'-GCGTGGCAGC GGATCCATGT CTCAAACCAC CACC-3'와 5'-GCTCCAAACA GGTGGTACAA-3'이었다. PCR 반응을 위해 1 μ l의 cDNA 주형, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 25 pmole의 프라이머 쌍, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100 그리고 2.5 units의 Taq DNA polymerase (Promega)를 혼합하여 94°C에서 3 분간 변성시키고, 94°C에서 30 초, 55°C에서 1 분, 그리고 72°C에서 1 분간의 반응을 30 회 반복하였다. 그리고 마지막으로 72°C에서 10 분간 더 반응시켰다. PCR 산물은 gel에서 확인하고 정제한 다음 pCR 2.1 TOPO vector에 ligation하였으며, ligation 혼합물로 *E.coli* TOP10을 형질전환시켰다.

염기서열 작성 및 분석

Dideoxy chain termination 방법을 이용하여, 거봉 포도로부터 클로닝한 *ufgt* cDNA의 염기서열을 작성하였으며, NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 TIGR (<http://www.tigr.org/>) database를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

CaMV 35S::*ufgt* cDNA construct 제작 및 담배 형질전환

10 μ g의 pBI121 벡터 DNA를 *SacI*과 *SmaI*로 처리한 다음, GUS 부위를 제외한 나머지 부위만을 DNA.RNA extraction kit (VIOGENE)을 이용하여 분리하였다. 분리하여 얻은 DNA는 gap-filling을 한 뒤 self-ligation시켰다. 거봉 포도로부터 클로닝한 *ufgt* cDNA의 양쪽 끝에 제한효소 *XbaI* 인지부위를 붙이기 위해 5'-GGTCTAGA(*XbaI*)CA GCGGATCCAT GTCT CAAA-3'와 5'-GGTCTAGA(*XbaI*)GA CATCCTTTGG TTTTG ACA-3'를 각각 forward 및 reverse 프라이머로 사용하여 PCR을 수행한 다음 PCR 산물을 *XbaI*으로 처리하였다. *XbaI*으로 처리하여 준비한 포도의 *ufgt* cDNA를, 역시 같은 제한효소로 처리한 pBI121 벡터에 각각 sense와 antisense방향으로 li-

gation시킨 뒤 이를 사용하여 *E.coli* TOP10을 형질전환시켰다. 확인된 transformant로부터 DNA를 분리하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하고, 이를 사용하여 leaf disc 방법으로 야생형 담배를 형질전환시켰다[17]. 캘러스 유도 및 재분화는 일반적인 방법을 이용하였다.

담배 형질 전환체 및 야생형 담배로부터 *ufgt* 유전자 발현 분석

담배 형질전환체 및 야생형 담배의 조직에서 분리한 2 µg의 total RNA로부터 M-MLV reverse transcriptase (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하고 이를 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. Forward 및 reverse 프라이머는 각각 5'-GGGGCTTTTGTAACACATTG-3'와 5'-GCTCCAAACA GGTGGTACAA-3'이었다. PCR 반응은 포도로부터 *ufgt* cDNA를 클로닝할 때와 같은 조건에서 수행하였으며, PCR 산물은 gel에서 확인하였다.

담배 형질 전환체로부터 안토시아닌 추출 및 정량 분석

담배 형질전환체와 야생형 담배로부터 꽃을 채취한 다음 0.1% HCl-Methaol 용액에 넣고 고르게 분쇄하였다. 최종 부피를 각각 50 ml로 맞추고 0°C 암조건에서 20시간 방치한 다음, 용액을 거름종이로 걸렀다[14]. 안토시아닌 함량은 Fuleki와 Francis [13]의 방법을 변형하여 안토시아닌의 흡수 파장을 포함하는 500~600 nm 범위의 파장에서 각각의 흡수 스펙트럼을 scanning하여 계산하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 과피와 과육에서 안토시아닌의 축적이 뚜렷하게 다른 포도를 모델로 이용하여, *ufgt* 유전자의 발현이 증가하거나 감소하였을 때 안토시아닌 함량이 변하는지를 실험하고자 하였다. 이를 위해 우선 개화 이후 13주가 지난 거봉 포도 (*Vitis vinifera* L. X *Vitis labrusca* L. cv Kyhoho)의 과피로부터 total RNA를 추출하고 이로부터 RT-PCR을 수행하여 *ufgt* cDNA를 얻었다. RT-PCR을 위해, 기존에 보고된[28] 포도 *ufgt* 유전자의 염기서열을 분석하여, open reading frame의 시작 및 끝 부위로부터 PCR 프라이머를 구상하여 제조하였다. 거봉 포도로부터 분리한 *ufgt* cDNA의 염기서열은 기존에 보고된 포도(*Vitis vinifera* L.)의 *ufgt* 유전자(AB047099)와 비교하여 99.2% 동일하였다(data not shown). 분리한 거봉 포도 *ufgt* 유전자를 sense 및 antisense 방향으로 벡터에 넣어 야생형 담배를 형질전환시켰다(Fig. 1A). 유전자가 도입된 담배 형질전환체를 선별한 다음, 각각의 형질전환체 내에서 *ufgt* 유전자의 발현 양을 RT-PCR로 분석하였다(Fig. 1B). 이를 위해 거봉 포도 *ufgt* cDNA의 염기서열을 바탕으로 프라이머를 제작하였다. RT-PCR 분석 결과, 형질전환체에서 *ufgt* 유전자의 발현 양이 야생형 담배에 비해 눈에 띄게 달라졌다. 먼저 포도 *ufgt*

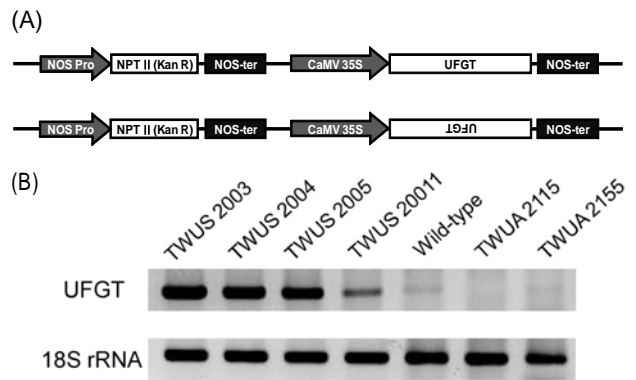


Fig. 1. Expression of *ufgt* mRNA in wild-type and transgenic tobacco plants. (A) Schematic diagrams of the *ufgt* sense and antisense constructs used for transformation of tobacco plants. (B) Transcripts of *ufgt* gene were detected by semi-quantitative RT-PCR in wild type and transgenic tobacco lines. 18S rRNA was used as a quantitative control. Compared to wild-type, the expression of *ufgt* mRNA increased in transgenic tobacco plants (TWUS) transformed with the sense construct, with decreased in transgenic tobacco plants (TUWA) with the antisense construct (TWUS, Tobacco Wisconsin UFGT cDNA Sense; TWUA, Tobacco Wisconsin UFGT cDNA Antisense).

유전자가 sense 방향으로 들어간 sense 형질전환체(TWUS)에서는 전체적으로 *ufgt* 발현 양이 많았는데 비해, antisense 방향으로 들어간 antisense 형질전환체(TWUA)에서는 *ufgt* 발현이 거의 검출되지 않았다. 야생형 담배에서도 *ufgt* 유전자가 약하게 증폭되었으나(Fig. 1B), sense 형질전환체에 비하면 *ufgt* 유전자의 발현이 월등히 적었다. 그러나 담배 형질전환체 및 야생형 담배를 분석하기 위해 사용한 프라이머가 담배 *ufgt* 유전자에 특이적인 것이 아니기 때문에, RT-PCR 실험으로 야생형 담배 내 *ufgt* 유전자의 발현을 정확히 측정했다고는 볼 수 없다. 즉 실험에 사용된 프라이머로 증폭되지 않은 *ufgt* 전사체가 존재할 가능성도 충분히 있다고 사료된다. 한편 *ufgt* 유전자의 발현 양에 따른 형질전환체의 표현형을 비교하였다. 식물 생장 속도 및 잎, 줄기 등의 색깔이나 크기는 야생형 담배와 비교하여 거의 차이가 없었다(data not shown). 그리고 안토시아닌의 축적 여부를 확인하기 위해 꽃 색깔을 비교하였다(Fig. 2). Sense construct가 들어간 형질전환체 중에서도, 특히 TWUS2003과 TWUS2005에서 야생형 담배에 비해 꽃 색깔이 조금 더 진한 분홍색을 띠었다. 그러나 antisense construct가 들어간 형질전환체에서는 야생형 담배와 비교하여 꽃 색깔이 거의 차이가 없었다. 이러한 결과는 RT-PCR 실험에서 *ufgt* 유전자의 발현 양이 야생형 담배와 antisense 형질전환체에서 확연하게 차이 나는 것과는 대조적이다(Fig. 1B).

꽃의 안토시아닌 함량에 변화가 없는지 확인하기 위해, 각각의 형질전환체와 야생형 담배의 꽃에서 안토시아닌 함량을 측정하였다(Fig. 3). 실험 결과, sense 형질전환체(TWUS)에서



Fig. 2. Phenotypes of wild-type and transgenic tobacco flowers. Flowers of transgenic tobacco plants expressing UFGT in a sense (TWUS) or an antisense (TWUA).

안토시아닌 함량이 야생 담배에 비해 30~44% 정도 증가하였다. 반면, antisense 형질전환체(TWUA) 내 안토시아닌 함량은 야생형 담배에 비해 88% 정도 감소하였다. TWUS 형질전환체에서는 RT-PCR, 안토시아닌 분석, 그리고 꽃 색깔 관찰 등을 통해 외부에서 도입된 포도의 *ufgt* 유전자가 담배의 안토시아닌 축적에 관여하여 꽃 색깔을 더 짙게 만들었을 것으로 추정된다. 결론적으로, 담배 형질전환체에서 *ufgt* 유전자의 발현량을 조절함으로써 안토시아닌 축적을 변화시킬 수 있음을 확인하였다. 하지만, TWUA 형질전환체에서는 RT-PCR 결과와 안토시아닌 함량의 결과가 일치하는데 반해, 꽃 색깔은 예상과 다르게 나왔다. 즉, *ufgt* 발현 양과 안토시아닌 함량이 매우 적은 것에 비해 꽃 색깔은 거의 변화가 없었다. 이러한 결과가 나온 이유로는 다음과 같은 두 가지를 생각해 볼 수 있다. 첫째, 본 연구에서 RT-PCR 실험에 사용된 프라이머의 특이성을 들 수 있다. 담배에는 EST fragment를 포함하여 총 11개의 putative *ufgt* 유전자(AM784928, EH621643, FS406409, EB694038, AM780771, FG167598, AB072918, TC52675, TC58274, TC47227, TC50160)가 보고되어 있다. 이들 *ufgt* 유전자 중에서 해당 부위의 염기서열이 알려진 6개(AB072918, TC52675, TC58274, TC47227, TC50160)만을 골라, 본 연구에서 사용된

프라이머와 비교하였을 때, 유사성이 forward 프라이머는 최대 75%, reverse 프라이머는 최대 60%에 불과하였다(data not shown). 즉, 실험에서 사용된 프라이머가 담배의 모든 *ufgt* 유전자를 증폭하지는 못했을 가능성이 있다. 또한 담배와 거봉 포도의 *ufgt* 유전자의 염기서열 상 차이는 도입된 포도의 antisense *ufgt* cDNA가 담배가 가지고 있는 본래의 *ufgt* 유전자의 발현을 완전히 제어하지 못했음을 의미하며, 이에 따라 담배의 꽃 색깔에도 큰 영향을 주지 않았을 것으로 추정된다. 둘째, 안토시아닌 뿐만 아니라, 비배당체인 안토시아닌딘이 색깔을 나타냈을 가능성이 있다. 즉 *ufgt* 유전자가 암호화하는 UFGT 효소는 안토시아닌딘을 배당체인 안토시아닌으로 변환시키는 기능을 가지는데, *ufgt* 유전자가 발현되지 않더라도 축적된 안토시아닌딘이 여전히 색깔을 가질 가능성이 있다는 것이다. Arabidopsis에서 *ufgt* 유전자 중의 하나인 *UGT78D2*에 돌연변이가 일어나도 표현형에는 큰 변화를 주지 않았다는 보고가 있다[23]. 이 논문에 의하면 개화기 때, 야생형 Arabidopsis에 비해 줄기의 아래 부분에서만 약간 색이 얼어졌을 뿐이며, 이러한 결과가 나온 이유로 안토시아닌 뿐만 아니라 안토시아닌딘도 색깔을 나타내기 때문이라고 설명되었다. 또 다른 논문에 의하면, cyanidin에서 cyanidin-3-glucoside 변환 단계에 UFGT가 관여하는데, cyanidin을 epicatechin으로 변환하는 anthocyanidin reductase (ANR) 유전자를 overexpression시켰을 때 담배의 꽃 색깔이 얼어졌다[3,27]. 이와 유사하게 본 실험의 TWUA 형질전환체에서도 도입된 포도의 antisense *ufgt* cDNA가 담배의 모든 *ufgt* 유전자의 발현을 억제하였음에도 불구하고 안토시아닌으로 변환되지 않은 안토시아닌딘에 의해 색깔이 그대로 표현되었을 가능성이 있다. 이러한 추정들은 앞으로 추가적인 연구를 통해 보다 명확히 밝혀질 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 단국대학교 2008년도 연구비의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Bae, K. S., J. Y. Kihl, and J. Pyee. 2008. A set of anthocyanin biosynthetic genes are differentially expressed in strawberry (*Fragaria x ananassa cv* Maehyang) during the fruit development process. *J. Life Science* 18, 234-240.
2. Beld, M., C. Martin, H. Huits, A. R. Stuitje, and A. G. Gerats. 1989. Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 13, 491-502.
3. Bogs, J., M. O. Downey, J. S. Harvey, A. R. Ashton, G. J. Tanner, and S. P. Robinson. 2005. Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin

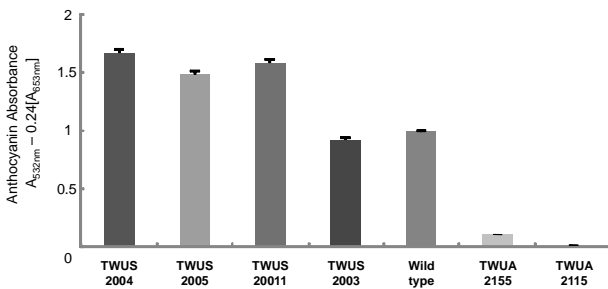


Fig. 3. Anthocyanin contents in wild-type and transgenic tobacco flowers. Anthocyanin was extracted using the protocol previously described in Materials and Methods. The absorbance of the extraction solution was measured from 500 to 600 nm. The anthocyanin concentrations were calculated with the formula $[A_{532} - (0.24 \times A_{653})]$ according to method of Fuleki and Francis [13]. The bar shows the mean standard deviation (n=3).

- reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *Plant Physiol.* **139**, 652-663.
4. Bogs, J., A. Ebadi, D. McDavid, and S. P. Robinson. 2006. Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiol.* **140**, 279-291.
 5. Borevitz, J. O., Y. Xia, J. Blount, R. A. Dixon, and C. Lamb. 2000. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
 6. Boss, P. K., C. Davies, and S. P. Robinson. 1996. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiol.* **111**, 1059-1066.
 7. Boss, P. K., C. Davies, and S. P. Robinson. 1996. Expression of anthocyanin biosynthesis pathway genes in red and white grapes. *Plant Mol. Biol.* **32**, 565-569.
 8. Cone, K. C., S. M. Cocciolone, F. A. Burr, and B. Burr. 1993. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of *c1* that functions in the plant. *Plant Cell* **5**, 1795-1805.
 9. Consonni, G., F. Geuna, G. Gavazzi, and C. Tonelli. 1993. Molecular homology among members of the *R* gene family in maize. *Plant J.* **3**, 335-346.
 10. Davies, K. M. and K. E. Schwinn. 2006. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis, pp. 143-218, In Anderson, O. M. and K. R. Markham (eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Taylor & Francis, Boca Raton.
 11. Dixon, R. A. and C. L. Steele. 1999. Flavonoids and iso-flavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* **4**, 394-400.
 12. Ford, C. M., P. K. Boss, and P. B. Hoj. 1998. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **273**, 9224-9233.
 13. Fulecki, T. and F. J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *J. Food Sci.* **33**, 72-77.
 14. Gong, Z. Z., E. Yamagishi, M. Yamazaki, and K. Saito. 1999. A constitutively expressed *Myc*-like gene involved in anthocyanin biosynthesis from *Perilla frutescens*: molecular characterization, heterologous expression in transgenic plants and transactivation in yeast cells. *Plant Mol. Biol.* **41**, 33-44.
 15. Halbwrith, H., I. Puhl, U. Haas, K. Jezik, D. Treutter and K. Stich. 2006. Two-phase flavonoid formation in developing strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 1479-1485.
 16. Holton, T. A. and E. C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
 17. Horsch, R. B. and H. J. Klee. 1986. Rapid assay of foreign gene expression in leaf discs transformed by *Agrobacterium tumefaciens*: Role of T-DNA borders in the transfer process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4428-4432.
 18. Irwin, R. E. 2005. Flower color microevolution in wild radish: evolutionary response to pollinator-mediated selection. *Am. Nat.* **165**, 225-237.
 19. Kennedy, J. 2002. Understanding grape berry development. *Practical Winery & Vinyard*, 1-5.
 20. Kobayashi, S., N. Goto-Yamamoto, and H. Hirochika. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* **304**, 982.
 21. Kobayashi, S., M. Ishimaru, C. K. Ding, H. Yakushiji, and N. Goto. 2001. Comparison of UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase (UGFT) gene sequences between white grapes (*Vitis vinifera*) and their sports with red skin. *Plant Sci.* **160**, 543-550.
 22. Kobayashi, S., M. Ishimaru, K. Hiraoka, and C. Honda. 2002. *Myb*-related genes of the Kyoho grape (*Vitis labruscana*) regulate anthocyanin biosynthesis. *Planta* **215**, 924-933.
 23. Lee, Y., H. R. Yoon, Y. S. Paik, J. R. Liu, W. I. Chung, and G. Choi. 2005. Reciprocal regulation of arabidopsis UGT78D2 and BANYULS is critical for regulation of the metabolic flux of anthocyanidins to condensed tannins in developing seed coat. *J. Plant Biol.* **48**, 356-370.
 24. Mol, J., E. Cornish, J. Mason, and R. Koes. 1999. Novel coloured flowers. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 198-201.
 25. Quattrocchio, F., J. Wing, K. van der Woude, E. Souer, N. de Vetten, J. Mol, and R. Koes. 1999. Molecular analysis of the *anthocyanin 2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *Plant Cell* **11**, 1433-1444.
 26. Quattrocchio, F., J. F. Wing, H. Leppen, J. Mol, and R. E. Koes. 1993. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* **5**, 1497-1512.
 27. Ross, J., Y. Li, E. Lim, and D. J. Bowles. 2001. Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biol.* **2**, reviews3004.1- reviews3004.6.
 28. Sparvoli, F., C. Martin, A. Scienza, G. Gavazzi, and C. Tonelli. 1994. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.* **24**, 743-755.
 29. Springob, K., J. Nakajima, M. Yamazaki, and K. Saito. 2003. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanin *s. Nat. Prod. Rep.* **20**, 288-303.
 30. Yamazaki, M., E. Yamagishi, Z. Gong, M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, Y. Tanaka, T. Kusumi, M. Yamaguchi, and K. Saito. 2002. Two flavonoid glucosyltransferases from *Petunia hybrida*: molecular cloning, biochemical properties and developmentally regulated expression. *Plant Mol. Biol.* **48**, 401-411.

초록 : 담배 형질전환체를 이용한 포도 UDP-glucose flavonoid glucosyl transferase (UGFT) 유전자의 기능 분석

박지연 · 박성출 · 피재호*

(단국대학교 분자생물학과, BK21 RNA 전문인력양성팀, 나노센서바이오텍연구소)

페놀화합물인 안토시아닌은 과일, 꽃잎 등 식물 조직에서 청 혹은 적색을 나타내는 색소이다. 포도의 경우, 안토시아닌은 적포도 품종의 과피에만 축적되는데, 이것은 안토시아닌 생합성에 관여하는 효소 중에서 UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase(UGFT)를 암호화하는 *ugt* 유전자에 의해 조절된다고 보고된 바 있다. *ugt* 유전자에 의해 안토시아닌의 축적 양상이 변하는지를 검증하기 위해, 포도로부터 *ugt* cDNA를 분리한 다음, 각각 sense와 antisense 방향으로 발현하는 벡터를 제작하고, 이를 야생형 담배에 도입하였다. 담배 형질전환체를 선발하여 RT-PCR을 수행한 결과, 포도 *ugt* 유전자가 sense 방향으로 들어간 sense 형질전환체에서는 야생형 담배에 비해 *ugt* 전사체의 양이 증가하였고, antisense 방향으로 들어간 antisense 형질전환체에서는 전사체의 양이 도리어 감소하였다. 한편, 담배 형질전환체의 꽃을 분석한 결과, sense 형질전환체의 안토시아닌 함량은 야생형 담배에 비해 최고 44% 증가하였고, antisense 형질전환체에서는 최고 88% 감소하였다. 또한 sense 형질전환체의 꽃 색깔은 야생형 담배에 비해 더 진해졌다. 이러한 결과는 외부로부터 도입된 포도 *ugt* 유전자의 발현으로 *ugt* 전사체의 양이 증가하면 담배 내 안토시아닌의 함량이 높아지고 꽃 색깔이 진해진다는 것을 시사한다.