

Next generation sequencing 방법을 이용한 적육계 복숭아와 백육계 복숭아의 전사체 분석

김세희 · 남은영 · 조강희 · 신일섭 · 김현란 · 황해성

Comparison of transcriptome analysis between red flash peach cultivar and white flash peach cultivar using next generation sequencing

Se Hee Kim · Eun Young Nam · Kang-Hee Cho · Il Sheob Shin · Hyun Ran Kim · Hae Seong Hwang

Received: 9 November 2012 / Accepted: 23 November 2012

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Differences of gene expression between red flash peach cultivar and white flash peach cultivar were investigated by Next-generation sequencing (NGS). EST from the red flash peach cultivar and white flash peach cultivar were selected for nucleotide sequence determination and homology searches. The levels of transcripts coding for proteins involved in pathogenesis related proteins, temperature stress, ethylene signal pathway were significantly higher in white flash peach cultivar than in red flash peach cultivar. On the other hand, the up-regulation of proteins involved in anthocyanin and flavonol biosynthesis and protein degradation and sorbitol metabolism were observed in red flash peach cultivar. Chalcone synthase was preferentially expressed in the red flesh peach cultivar, agreeing with the accumulation of anthocyanin and expression of other previously identified genes for anthocyanin biosynthesis. Anthocyanin pathway related genes CHS, F3H, DFR, LDOX, UFGT differentially expressed between red flash peach cultivar and white flash peach cultivar. These results suggest that red flash peach cultivar and white flash peach cultivar have different anthocyanin biosynthesis regulatory mechanisms.

서 론

복숭아(*Prunus persica* (L.) Batsch)는 장미과(Rosaceae) 자두속(*Prunus*) 복숭아아속(*Amygdalus*)에 속하는 온대 낙엽성 과수(Childers 1988)로 $n=8$, 2배체이며 같은 장미과에 속하는 사과의 742Mbp에 비해 비교적 작은 genome size로 220~230Mbp 정도이다(Pozzi 2009). 기존에 보고된 복숭아의 전사체는 28689개, 유전자는 27582개로 밝혀져 있으나 2000년도 초기부터 시작되었던 *Prunus* species의 transcriptome 연구는 최근 genome이 모두 밝혀지면서 post-genomic 시대에 많은 가능성을 제공해준다(Ahmad et al. 2011). 복숭아의 성분은 polyphenol 함량이 높아 항암효과가 있는 것으로 알려져 있으며 황육계 또는 적육계 복숭아는 백육계에 비해 carotinoid와 anthocyanin이 많아 항산화 성분 등 기능성 함량이 높다. 최근 유색 복숭아 품종에 대한 소비자의 요구가 증대하고 있어 색소 함량이 높은 황육계, 적육계 복숭아 품종의 육성이 필요하며 유색과 관련되어 있는 carotinoid, flavonoid 성분과 관련된 유전자 발현에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. Flavonoid는 식물의 잎, 줄기, 열매, 뿌리, 꽃, 종자 등 모든 부위에 존재하며 식물의 생장과 발육, 미생물과 해충에 대한 방어, 약리적 효과(인체의 항균, 항바이러스, 항염증), 강력한 항산화 활성 등으로 최근 그 중요성이 강조되고 있다(Forkmann and Martens 2001). 고등식물의 Flavonoid들은 6가지의 주요 subgroup, 즉 chalcone, flavones, flavonol, flavan 3,4-diol (leucoanthocyanidin), proanthocyanidin으로 구분되며 넓은 의미로는 anthocyanin도 포함된다(Park et al. 2002). 꽃이나 과실의 착색은 pelargonidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside 그리고 delphinidin 3-glucoside 등 액포에 집적되는 anthocyanin에 기인하며 anthocyanin 합성 반응은 chalcone synthase,

S. H. Kim (✉) · E. Y. Nam · K.-H. Cho · I. S. Shin · H. R. Kim · H. S. Hwang
농촌진흥청 국립원예특작과학원 과수과
(Fruit Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon 440-706, Korea)
e-mail: ezsehee@korea.kr

chalcone isomerase, flavanone 3-hydroxylase, dihydroflavonol 4-reductase, anthocyanidin synthase, flavonoid 3-O-glucosyltransferase에 의하여 촉매된다(Holton and Cornish 1995). 이러한 anthocyanin pathway 관한 생합성 조절에 대한 이해는 transposon tagging과 positional cloning과 같은 분자유전적 방법을 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 proanthocyanidin과 anthocyanin 생합성에서 특이적인 대사경로의 마지막 단계 효소들의 발현을 조절하는 유전자들에 대한 연구가 많이 보고되었다. 그러나 유전자 발현 연구에 있어서 hybridization에 바탕을 둔 기술은 많은 한계점이 있다. Microarray 방법은 알려진 유전자를 중심으로 probe를 디자인해야 하는 점과, detector의 noise에 의해 영향을 받고, 실험간의 큰 편차도 단점으로 지적되어왔다. 유전자와 exon의 발현 및 발현된 유전자의 각종 변이 등을 한꺼번에 연구 할 수 있는 대체 기술이 RNA-Seq이다. 최근에 등장한 Next Generation Sequencing(NGS)은 전통적인 방법에 비해 빠르고 저렴한 비용으로 대용량의 단편 염기서열 데이터를 얻을 수 있는 차세대 염기서열 분석 기술을 말한다. 염기서열에 바탕을 둔 방법들은 microarray 기술에 비해 바로 cDNA의 염기서열을 결정할 수 있다는 장점이 있고, 유전자 발현 연구에 있어서 새로운 시각 및 다양한 연구 방향을 제시할 것이다. 그리고 각 유전자의 발현 정도나 특이 유전자 발굴 등에 유용하며, 분석 대상의 염기서열 정보가 없어도 유전자 발현 분석이 가능하다. 현재 NGS기술이 보다 일반화되면서 transcriptome(전사체) 분야를 포함하여 유전자 발현연구에 있어 NGS 기술이 PCR이나 microarray 기술을 대체하게 될 것이다. 이미 광범위하게 수행되고 있는 유전자 레벨에서의 발현뿐만 아니라 exon 레벨에서의 발현, 변이, splicing 등 지금까지 연구가 활발하지 못했던 분야에서의 연구도 가능하게 되었다. 이는 단순한 발현의 정도에 의한 biomarker를 포함하여 유전자의 구조적 변이에 의한 질적인 발현 정보를 이용하여 각종 marker를 개발 할 수 있다는 가능성을 제시한다. 최근 후생유전학 분야에서 histon post-translational modifications(PTM)의 위치나 genome-wide DNA methylation 양상을 분석하기 위해 chromatin immunoprecipitation(ChIP)을 microarray 기술(ChIP-chip)에 적용한 연구 결과들과 함께 NGS기술을 이용한 ChIP-Seq 결과들도 다수 보고되고 있다. NGS 기술은 유전체와 후생유전체를 포함하여 많은 분야에서 이용될 것이지만 데이터의 복잡성으로 인해 소수의 생물정보학 전문가만이 다룰 수 있는 제약성이 따른다. 앞으로 농업, 원예분야에서 NGS 기술을 제대로 활용할 수 있는 연구체계 구축이 필요한 시점이다. 본 연구에서는 NGS 기술을 사용하여 백육계와 적육계에서 차등으로 발현되는 유전자 연구를 통해 생명공학과 관련된 농업분야에서의 연구방향을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료와 total RNA 추출 및 mRNA 분리

본 연구에 사용한 재료는 농촌진흥청 국립원예특작과학원에서 보존 중인 복숭아 2품종을 이용하였다. 국내육성 품종인 미백도와 국내수집 품종인 조생혈도를 sampling 하여 액체질소를 사용하여 분쇄하였다. 백육계 품종인 미백도와 적육계 품종인 조생혈도의 샘플 시기는 만개 후 5주 뒤부터 일주일 간격으로 수확하여 미백도는 6월 9일부터 8월 19일까지 11회 수확, 조생혈도는 6월 9일부터 7월 6일까지 5회 수확하여 모든 샘플의 RNA을 분리하였다. RNA 분리 방법은 Pine Tees Methods(Shujun et al. 1993)에 따라서 다음과 같이 수행하였다. 분쇄한 3 g의 sample에 15 ml의 추출용액(2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 2.0 M NaCl, 0.5 g/L spermidine, 2% β -mercaptoethanol 사용 직전에 첨가)을 첨가하였다. 동량의Chloroform: isoamyl alcohol(24:1)을 첨가하여 15000 rpm에서 25분 동안 원심분리 하였다. 상동액에 $\frac{1}{4}$ volume의 10 M LiCl를 첨가한 후 4°C에서 overnight 하였다. 15000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 침전물을 500 ul의 SSTE에 녹이고 동량의Chloroform: isoamyl alcohol(24:1)을 첨가하였다. 15000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상동액을 분리한 후 2배의 에탄올 첨가 후에 -70°C에서 40분 동안 저장 후 DEPC 처리한 멸균수에 녹였다. Total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위해 polyA Tract mRNA isolation kit(Promega, USA)를 사용하였다. Polysaccharid를 제거하기 위해 oligo(dT) cellulose column을 사용하는 대신에 biotinylated oligo(dT) 와 paramagnetic particles를 사용하였다. One mg의Total RNA의 최종 부피를 500 ul로 맞춘 후 65°C에서 10분간 저장 후 3 ul의 biotinylated oligo(dT) probe와 13 ul의 20 x SSC를 첨가 후 상온에 저장하였다. SA-PMPs(streptavidin paramagnetic particles)이 tube안에서 완전하게 섞이도록 한 후에 magnetic Stand에 세워서 particle을 분리하고, total RNA와 혼합하여 10분 동안 저장 후에 magnetic stand에서 0.3ml의 0.1 x SSC로 4번 washing 한 뒤에 0.1ml의 DEPC 처리한 멸균수를 첨가하였다.

Next generation sequencing과 bioinformatics analysis

분리된 mRNA는 cDNA 합성과정을 거쳐 high throughput sequencing 방법(Margulies et al. 2005)으로 Roche GS FLX를 사용하였고, GS FLX sequencer를 통해 생성된 sequence들은 Roche GS FLX software(2.6 version) 프로그램을 이용해 de novo transcriptome assembly를 진행하였다. 생성된 isotig(transcript)들은 blast(2.2.25+ version)(Altschul et al. 1990)

를 이용해 GO Database(Released on 27-08-2011) (Ashburner et al. 2000)와 NCBI의 NR database(download date: 2012/05/07)에 alignment를 수행하였다. Singleton에 대해서는 SeqClean과 Lucy(Hui-Hsien and Michael 2001)라는 software를 이용하여 sequence trimming(low quality, low-complexity, vector sequence 등)을 진행하였고 trim된 singleton들은 isotig와 동일하게 blast를 이용하여 GO 및 NR DB에 alignment를 수행하였다.

Real time PCR

Real-time RT-PCR 분석은 7500 Fast Real-time PCR machine (Applied BioSystems)으로 수행하였다. DNA polymerase로는 SYBR Green master Mix(Takara)를 사용하였으며 추출한 RNA를 cDNA 합성을 위해 Oligo dT primer(50 pmol) 1 μ L, dNTP Mixture(10 mM each) 4 μ L, template RNA(200 ng) 1 μ L, 최종볼륨이 10 μ L가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. 65°C에서 5분간 heating 한 후 이 혼합물에 5[°] Reverse transcriptase buffer(Takara) 4 μ L, RNase inhibitor (Promega) 20 units, Reverse transcriptase(PrimeScript, Takara) 100 units 넣은 후 20 μ L 가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. 혼합물을 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 heating 하였다. 96-well plate에 SYBR® Premix Ex Taq(2x, Takara) 10 μ L, Forward primer 0.2 μ L, Reverse primer 0.2 μ L, ROX Reference Dye II(50x, Takara) 0.4 μ L, 합성한 cDNA 2 μ L를 넣고 20 μ L가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. Standard curve를 위해 positive 샘플을 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³로 희석하였으며, 각각의 샘플들은 20⁻¹로 희석하여 PCR을 수행하였다. Primer는 references(Ogundiwin et al. 2008, Ying et al. 2012)를 참조하였고 PCR 조건은 95°C에서 10분 동안 holding 후 95°C에서 5초, 60°C에서 1분간 40회 처리하였으며, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 95°C에서 30초, 60°C에서 15초로 melt curve stage를 처리하였다. Analysis tool은 Applied Biosystems에서 제공한 Delta Delta CT값을 기준으로 비교하였다.

결과 및 고찰

GS FLX 454을 이용한 Next generation sequencing

Anthocyanin pathway에 관련된 유전자들의 RT PCR 실험 결과 미백도는 7월 6일 샘플, 조생혈도는 7월 1일의 샘플을 사용하여 NGS 분석을 하였다. Roche GS FLX454을 이용한 미백도의 총 read 수는 263,559이며 총 염기서열 길이는 83,456,951이고, read의 평균 염기서열 길이는 316 bp이다. 조생혈도의 총 read 수는 447,690이며 총 염기서열 길이는 144,794,666이고, read의 평균 염기서열 길이는 323bp이다.

미백도와 조생혈도의 gene ontology 분석

미백도의 gene ontology 분석 결과(Fig. 1) 기능별로 차지하는 유전자군을 보면 생화학수준에서 유전자 생산물에 관여하는 molecular function에 해당하는 유전자가 28%, 생물학적으로 다양한 목적에 관여하는 biological process는 28%를 차지하고 유전자 생산물의 위치에 관여하는 cellular component를 구성하는 유전자는 23%, 보고된 유전자와 상동성을 나타내지 않는 transcriptome이 21%이다. 이에 비해 조생혈도의 gene ontology 결과는 biological process에 관여하는 유전자가 27%, molecular function에 해당하는 유전자가 27%, cellular component는 21%, 보고된 유전자와 상동성을 나타내지 않는 transcriptome이 25%이다. 이와 같은 결과는 백육계 복숭아에 대한 연구는 계속 진행되어 왔지만 적육계 복숭아에 대한 연구가 아직 활발하지 못하여 상동성을 나타내지 않는 transcriptome이 많이 나왔고, 앞으로 이에 대한 연구와 분석을 필요로 한다. Gene ontology 분석 결과 미백도의 biological process(Fig. 2)에 해당하는 transcriptome을 보면 unclassified가 25%, metabolic process 22%, response to stimulus 16%, biological regulation 10%, cellular process 8%, establishment of localization 6%, developmental process 6%의 유전자가 차지하고 있고, 조생혈도에서는 unclassified가 26%, metabolic process 23%, response to stimulus 15%, biological regulation 10%, cellular process 8%, developmental process 7%, establishment of local-

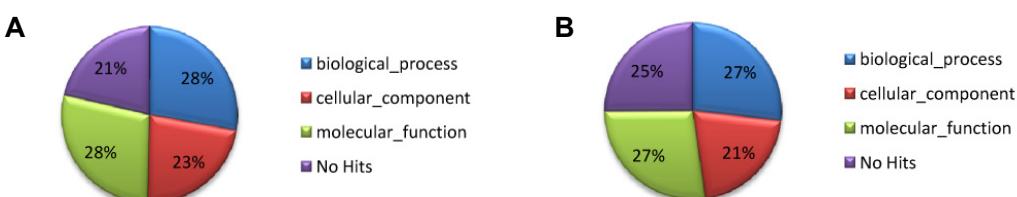


Fig. 1 Result of GO analysis. (A) GO analysis of Mibaekdo (B) GO analysis of Josaeng Hyuldo

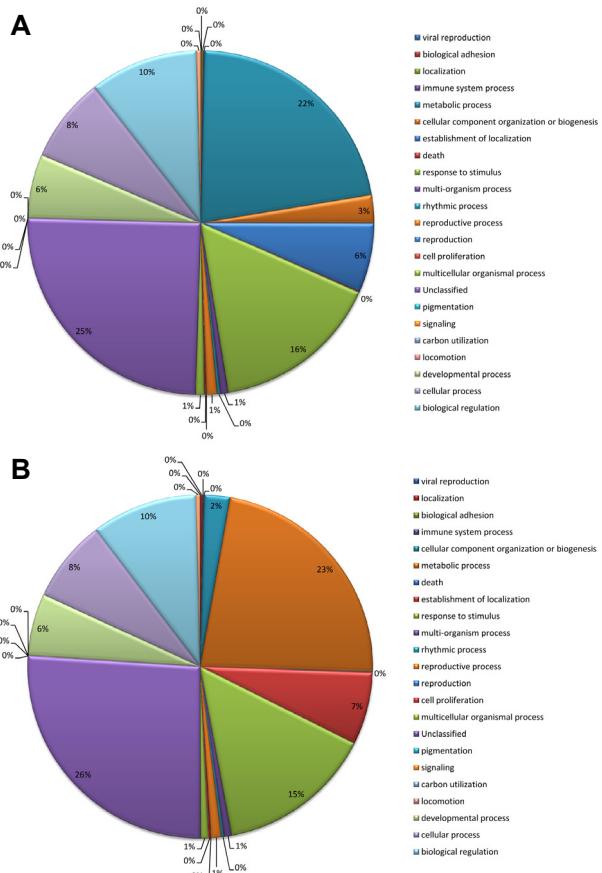


Fig. 2 Biological process of GO analysis. (A) GO analysis of Mibaekdo (B) GO analysis of Josaeng Hyuldo

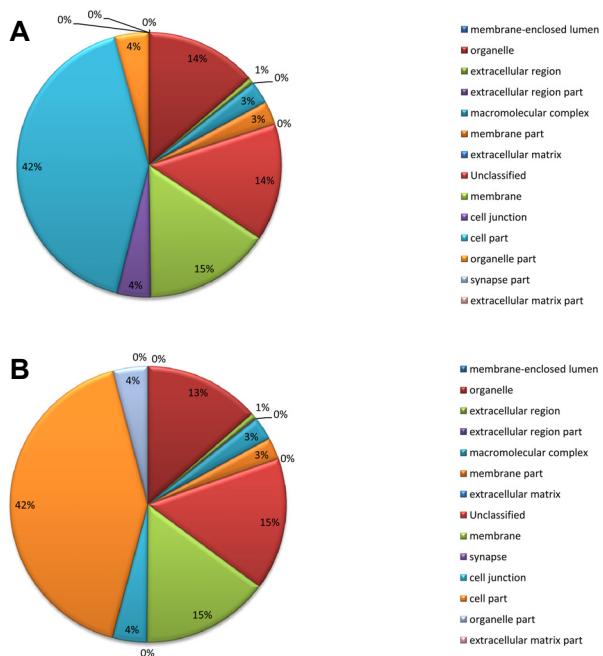


Fig. 3 Cellular component of GO analysis. (A) GO analysis of Mibaekdo (B) GO analysis of Josaeng Hyuldo

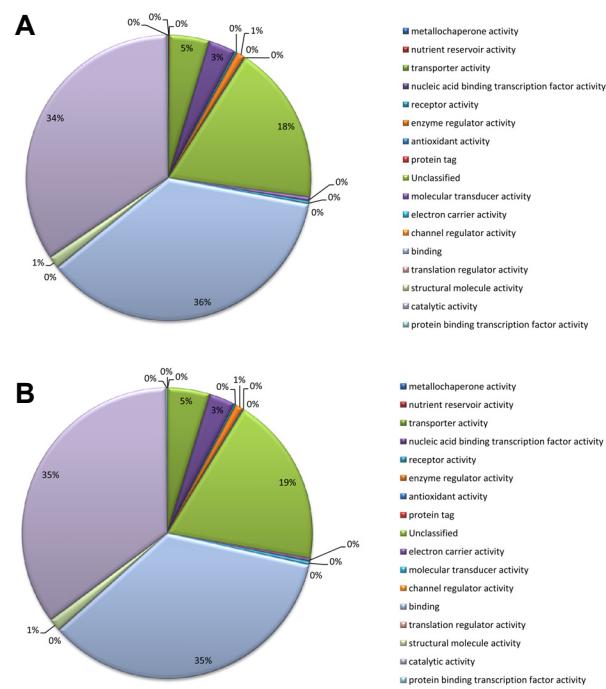


Fig. 4 Molecular function of GO analysis. (A) GO analysis of Mibaekdo (B) GO analysis of Josaeng Hyuldo

ization 6% 외에도 cell proliferation이나 cellular component organization 또는 biogenesis, multi-organism process에 속하는 다양한 transcriptome 이 존재한다. 미백도에서 유전자 생산물의 위치에 관여하는 cellular component 분석 결과 (Fig. 3)는 cell part 42%, unclassified 14%, membrane 15%, organelle 14%, cell junction 4%, organelle part 4%, membrane part 3%, macromolecular complex 3%를 차지하고 있고, 조생혈도에서는 cell part 42%, unclassified 15%, membrane 15%, organelle 13%, cell junction 4%, organelle part 4%, membrane part 3%, macromolecular complex 3%로 미백도와 비슷한 transcriptome 분포를 보이고 있다. 생화학수준에서 유전자 생산물에 관여하는 molecular function에 해당하는 transcriptome 분석 (Fig. 4)에서는 미백도가 binding 36%, catalytic activity 34%, unclassified 18%, transporter activity 5%, nucleic acid binding transcription factor activity 3%, enzyme regulator activity 1%, structural molecule activity 1%를 나타내고 있고, 조생혈도에서는 catalytic activity 35%, binding 35%, unclassified 19%, nucleic acid binding transcription factor activity 5%, transporter activity 3%, structural molecule activity 1%, enzyme regulator activity 1%를 차지하고 있다.

미백도와 조생혈도의 유전자 분석

NGS 분석 결과를 바탕으로 미백도에서는 발현량이 거의 없거나 아주 낮은데 반하여 조생혈도에서 높은 발현

Table 1 The levels of transcripts coding for proteins were significantly higher in Josaeng Hyuldo (J) than in Mibaekdo (M)

| M | J | Gene |
|------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0.00 | 203.06 | aspartate transaminase [<i>Malus × domestica</i>] |
| 0.00 | 203.06 | No hit |
| 0.00 | 203.28 | predicted protein [<i>Populus trichocarpa</i>] |
| 0.00 | 207.78 | No hit |
| 8.07 | 1943.78 | unknown [<i>Glycine max</i>] |
| 0.00 | 224.55 | No hit |
| 0.00 | 225.88 | No hit |
| 0.00 | 226.88 | 21 kDa protein precursor, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 0.00 | 241.48 | 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [<i>Malus hupehensis</i> var. <i>mengshanensis</i>] |
| 0.00 | 241.72 | beta xylosidase [<i>Fragaria × ananassa</i>] |
| 0.00 | 242.39 | microsomal omega-3 desaturase [<i>Phaseolus lunatus</i>] |
| 0.00 | 255.94 | No hit |
| 0.00 | 281.11 | No hit |
| 0.00 | 283.00 | No hit |
| 1.97 | 863.12 | chalcone synthase [<i>Prunus persica</i>] |
| 3.81 | 1409.10 | PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase makorin-like [<i>Vitis vinifera</i>] |
| 0.00 | 294.80 | polymerase [Apple chlorotic leaf spot virus] |
| 0.00 | 295.64 | hypothetical protein VITISV_001809 [<i>Vitis vinifera</i>] |
| 0.00 | 311.46 | Omega-3 fatty acid desaturase, endoplasmic reticulum, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 0.00 | 319.10 | unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>] |
| 0.00 | 321.41 | microsomal omega-3 fatty acid desaturase [<i>Betula pendula</i>] |
| 0.00 | 365.29 | polymerase [Apple chlorotic leaf spot virus] |
| 0.00 | 372.28 | No hit |
| 0.00 | 408.99 | No hit |
| 0.00 | 420.87 | unnamed protein product [<i>Vitis vinifera</i>] |
| 0.00 | 461.75 | chalcone synthase [<i>Prunus persica</i>] |
| 0.00 | 471.10 | heme oxygenase-1 [<i>Cucumis sativus</i>] |
| 0.00 | 623.35 | polyubiquitin, partial [<i>Gladiolus grandiflorus</i>] |
| 0.00 | 2071.02 | endopolygalacturonase [<i>Prunus persica</i>] |
| 0.00 | 3537.65 | endo-polygalacturonase [<i>Prunus persica</i>] |
| 0.00 | 4942.66 | endo-polygalacturonase [<i>Prunus persica</i>] |

량을 나타내는 유전자들은 Table 1과 같다. Endo-polygalacturonase는 세포벽 조직의 연화 및 생리적 변화에 관여하는 enzyme(Lester et al. 1994)으로 조생혈도는 이름 그대로 조생종으로 만개 후 8주 만에 과실이 성숙하여 10주가 되기 전에 수화를 마치게 된다. 따라서 중생종인 미백도와 비교해서 조생혈도에서는 이미 endo-polygalacturonase가 발현이 되어 세포벽의 연화가 진행된다. Polyubiquitin은 DNA repair, cell cycle control, circadian rhythm, stress response, apoptosis 그리고 진핵세포에서 중요한 유전자 산물의 세포적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다(Martin and Boris 2010). 또한 ubiquitin-dependent protein 분해 기작은 주로 비정상 단백질이나 짧은 수명의 단백질을 분해하는 과정에서 볼 수 있다(Drexler 1997). 이러한 ubiquitin의 발현 역시 세포의 apoptosis에서 볼 수 있는 기작으로 조생종의 특성에서 기인한 유전자의 발현으로 생각된다. Heme oxygenase-1은 세포증식이나 성장조절물질의 생산에 관여하며(Raffaella et al. 2010) 주로 뿌리 생성에서 많이 발현이 되고, microsomal omega-3 fatty acid desaturase는 fatty acyl chain의 탄소 사이의 이중결합을 유도하여 지방산의

불포화를 조절하는 enzyme이다(Kristin et al. 2005). Beta xylosidase는 가수분해효소로 xylan degradation, xylobiose와 xylooligosaccharides를 xylose로 가수분해하는 효소로 알려져 있다(Carolina Di Santo et al. 2009). 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase는 카로티노이드 전구체의 절단에서 생성되는 ABA의 생합성을 조절하는 효소로(Zhang et al. 2009) 과실의 성숙 단계에서 ABA의 증가 뒤에 에틸렌의 증가를 가져오게 되는데, 조생혈도의 빠른 성숙단계와 관련이 있는 유전자군으로 생각된다. Aspartate transaminase는 aspartate aminotransferase라고도 하며 amino acid metabolism에 관여하여 aspartate와 alpha-ketoglutarate를 oxaloacetate와 glutamate로 전환시키는 효소이다(Goffreds et al. 1991).

NGS 분석 결과를 바탕으로 미백도에서는 발현량이 높은데 비하여 조생혈도에서 발현되지 않거나 낮은 발현량을 나타내는 유전자들은 Table 2와 같다. Chlorophyll A/B binding protein은 고등식물의 엽록체에서 틸라코이드 막의 주요한 구성성분이다(Butler 1978). 광합성과정에서 이 복합체는 빛의 수용체로서 작용을 하고 여기된 에너지는 광계 I과 광계 II로 전이된다(Thornber 1975). 이 단백

Table 2 The levels of transcripts coding for proteins were significantly higher in Mibaekdo (M) than in Josaeng Hyuldo (J)

| M | J | Gene |
|---------|------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 593.95 | 0.00 | predicted protein [<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>] |
| 534.34 | 0.00 | chlorophyll A/B binding protein, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 387.16 | 0.00 | No hit |
| 1108.51 | 2.19 | Histidine-containing phosphotransfer protein, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 299.69 | 0.00 | No hit |
| 281.44 | 0.00 | No hit |
| 279.30 | 0.00 | unknown [<i>Populus trichocarpa</i> × <i>Populus deltoides</i>] |
| 275.94 | 0.00 | No hit |
| 275.70 | 0.00 | No hit |
| 275.66 | 0.00 | No hit |
| 275.49 | 0.00 | unknown [<i>Populus trichocarpa</i> × <i>Populus deltoides</i>] |
| 274.89 | 0.00 | plasma membrane intrinsic protein 2:5 [<i>Mimosa pudica</i>] |
| 271.02 | 0.00 | hypothetical protein MTR_5g051160 [<i>Medicago truncatula</i>] |
| 266.26 | 0.00 | No hit |
| 266.26 | 0.00 | No hit |
| 254.84 | 0.00 | No hit |
| 249.62 | 0.00 | No hit |
| 242.18 | 0.00 | No hit |
| 238.80 | 0.00 | No hit |
| 237.14 | 0.00 | No hit |
| 234.06 | 0.00 | PREDICTED: oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic [<i>Vitis vinifera</i>] |
| 228.70 | 0.00 | chlorophyll A/B binding protein, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 227.65 | 0.00 | No hit |
| 223.19 | 0.00 | hypothetical chloroplast RF1 [<i>Prunus persica</i>] |
| 223.19 | 0.00 | No hit |
| 220.59 | 0.00 | No hit |
| 210.79 | 0.00 | No hit |
| 210.79 | 0.00 | No hit |
| 1223.81 | 4.82 | Histidine-containing phosphotransfer protein, putative [<i>Ricinus communis</i>] |
| 208.47 | 0.00 | PREDICTED: dehydration-responsive protein RD22-like [<i>Glycine max</i>] |
| 207.90 | 0.00 | No hit |

질 유전자들은 다양한 쌍자엽 식물과 단자엽 식물종에서 분리되었고, 3에서 16개 정도의 유전자군으로 구성되어 있다(Dunsmuir 1985). 이 유전자의 발현은 배 형성과정에서 증가하고, 잎과 줄기에서 높은 발현량을 보이는데 반하여 뿌리에서는 거의 발현되지 않으며 주로 전사수준에서 조절된다고 알려져 있다(Walling et al. 1988). Histidine-containing phosphotransfer protein은 에틸렌 신호전달 기작에서 sensor kinase에 붙어 있는 C-말단의 receiver domain으로부터 다른 receiver로 인산기의 전달에 있어서 phosphohistidine intermediate로서 작용한다(Wurgler et al. 1997). Plasma membrane intrinsic protein은 세포막을 통한 물의 이동인 symplastic pathway에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 식물체에서 이들 유전자의 발현은 조직 특이적이거나 환경스트레스에 매우 특이적인 경우가 보고되고 있어서, 이들이 식물의 환경스트레스 내성 증진, 특히 물 흡수 및 유지와 관련된 내한발성과 관련이 되어 있을 것으로 생각되어 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Zhu et al. 2005, Peng et al. 2007). Oxygen-evolving enhancer protein

은 엽록체에서 볼 수 있는 단백질로 식물체의 방어 기작에서 발현이 되는 것으로 알려져 있다(Mayfield et al. 1987). Dehydration-responsive protein RD22는 salt stress 또는 수분 부족에 의해 발현되는 단백질로 oxygen-evolving enhancer protein처럼 외부로부터의 스트레스에 대한 방어기전에서 발현이 된다(Hanana et al. 2008). NGS 분석 결과를 보면 미백도에서 발현되는 유전자들은 주로 병저항 관련 단백질, 온도 스트레스, 에틸렌 신호전달과 관련된 단백질에 코딩하는 전사체의 발현 수준이 높았고, 조생혈도에서는 anthocyanin과 flavonol 생합성의 up-regulation에 관여하는 단백질, 단백질 분해, sorbitol 대사과정과 관련된 단백질이 관찰되었다.

Anthocyanin pathway 관련 유전자들의 발현

본 연구에 있어 가장 관심이 있었던 anthocyanin pathway에 관련된 transcriptome 중, 미백도에서는 발현량이 매우 낮으나 조생혈도에서 높은 발현량을 나타낸 유전자는 CHS

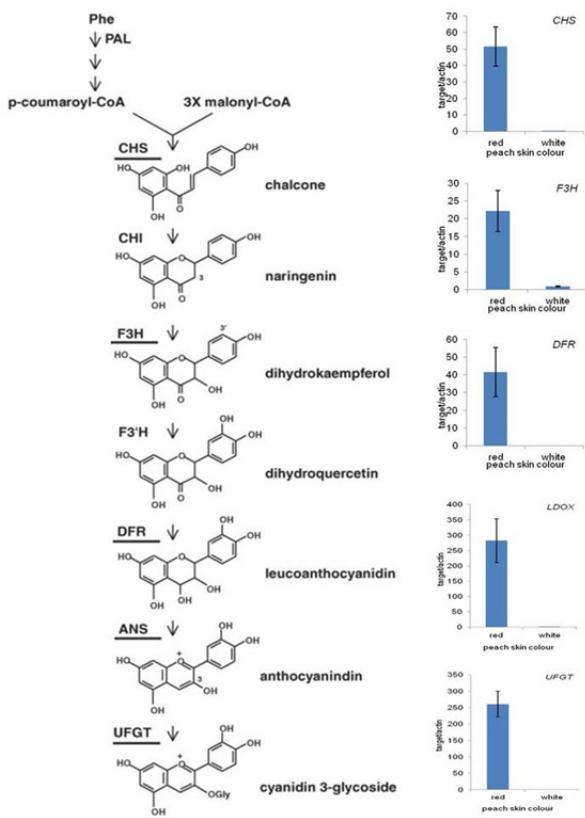


Fig. 5 Molecules of anthocyanin biosynthesis pathway and Real Time PCR of anthocyanin biosynthesis pathway

(Chalcone synthase)이다. CHS는 anthocyanin 생합성 첫 단계에 관여하는 유전자로서 NGS 분석 결과(Table 1)와 동일하게 real time PCR 분석(Fig. 5)에서도 조생혈도에서 높은 발현량을 나타냈다. 두 번째 단계인 CHI(Chalcone isomerase)는 chalcone을 naringenin으로 만드는 효소로 식물체 내에 CHI가 없더라도 chalcone은 자연적으로 isomerization되기도 한다. 미백도와 조생혈도에서는 CHI의 발현은 크게 차이가 나지 않았다. F3H(Flavanone 3-Hydroxylase) 와 DFR 유전자는 미백도와 조생혈도에서 발현차이가 높게 나타나는 것으로 관찰되었다. DFR 유전자는 미백도에서는 발현량이 거의 없으나 조생혈도에서는 매우 높은 발현량을 나타낸다(Fig. 5). Leucoanthocyanidin dioxygenase는 flavonoid biosynthesis에 관여하는 효소로 복숭아에서 처음 발견되었고, 조생혈도에서는 높은 발현량을 보이고 있다. UDP glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase(3GT)는 옥수수에서 *Bz1* 유전자가 transposon tagging에 의하여 처음 분리되었으며, 이 유전자는 다른 anthocyanin biosynthesis 관련 유전자들과 마찬가지로 미백도에서는 발현량이 낮으나 조생혈도에서 높은 발현량을 나타냈다. 과실의 성숙시기와 관련된 유전자들을 제외한 flavonoid biosynthesis에 관련된 유전자들의 발현량을 다시 확인하기 위하여 real time PCR을 수행한 결과(Fig. 5) NGS data 분석과 동일한 결과를 확인하였다.

Anthocyanin pathway의 첫 번째 단계인 CHS 부터 미백도와 조생혈도의 발현 차이가 다르게 나타나고 F3H, DFR, LDOX, UFGT와 같은 유전자들이 순차적으로 조생혈도에서 높게 발현되는 것으로 보아 미백도와 조생혈도의 anthocyanin pathway의 생합성 조절 기작이 다를 것으로 예상된다. 적육계 복숭아는 높은 anthocyanin 성분으로 건강을 위해서는 좋지만 일반적으로 산미가 강해 소비자의 기호도가 떨어지고, 백육계 복숭아는 풍부한 향과 단맛으로 소비자들이 많이 찾지만 anthocyanin이 축적되지 않아 항산화 기능성분이 부족하다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 전통적인 복숭아 육종연구가 현재 진행되고 있으나 전통육종방법에서는 특정형질만 발현시키는데 오랜 시간과 노력이 필요하다. 과수분야에서 식물체내에서 특정 유전자를 발현시키는 분자육종 연구는 사과, 포도, 키위 등에서 연구가 되고 있다. 식물의 전체 대사경로가 일차대사와 이차대사 산물의 상호 전환 및 여러 단계의 복잡한 조절 기작으로 얹혀있다는 점을 주목해 볼 때 전체 flavonoid 함량을 증진시키거나 특정 성분 쪽으로 대사의 흐름을 바꾸는 데는 좀 더 정교한 대사 변경 기술이 요구되고 있다. 특히 외래 flavonoid 생합성 유전자를 추가로 발현시킬 경우 내재 유전자의 발현은 정확하게 예측하기 어려우며, 식물 유전자와 상동성이 낮은 미생물 유래의 유전자를 사용하는 것이 내재 유전자의 cosuppression을 막는데 어느 정도 효과가 있다는 연구가 제시되기도 하였다(Fraser et al. 2002). 또한 비교적 일차 대사율이 낮은 종자나 과실 등의 조직에서는 특이적으로 flavonoid 생합성을 유도하는 것이 promoter의 개발을 통해 가능한 결과이다. 본 연구에서는 NGS 기술을 사용하여 백육계와 적육계에서 차등으로 발현되는 유전자들을 분석하였고, 앞으로 anthocyanin의 내재 생합성 조절 기작에 대한 연구와 인위적인 유전자 조작을 통해 기존에 보고되지 않은 새로운 복숭아 유색관련 marker 개발과 flavonoid가 풍부하면서 백육계의 상품성을 갖고 있는 분자육종의 연구방향을 제시하고자 한다.

인용문헌

- Ahmad R, Parfitt DE, Fass J, Ogundiwin E, Dhingra A, Gradziel TM, Lin D, Joshi NA, Martinet-Garcia PJ, Crisosto CH (2011) Whole genome sequencing of peach (*Prunus Persica L.*) for SNP identification and selection
 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
 Ashburner M, Bell CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genet* 25(1):25–29

- Butler WL, and Strasser RJ (1978) Effect of divalent cations on energy coupling between the light harvesting chlorophyll a/b complexes and photosystem II. In Proceedings of the 4th International congress on Photosynthesis, Hall DO Coombs J, Goodwin T eds (London:Biochemical Society):9-20
- Carolina Di Santo M, Pagano EA, Sozzi Go (2005) Differential expression of alpha-1-arabinofuranosidase and alpha-1-arabinofuranosidase/beta-d-xylosidase genes during peach growth and ripening. *Plant Physiol Biochem* 47(7):562-569
- Childers NF (1988) The peach. P. 1-8. Somervill:Somerset press
- Drexler HC (1997) Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(3):855-860
- Dunsmuir P (1985) The petunia chlorophyll a/b binding protein genes: a comparison of *Cab* genes from different gene families. *Nuc Acids Res* 13:2503-2518
- Forkmann G, Martens S (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr Opin in Biotech* 12:155-160
- Fraser PD, Romer S, Shipton CA, Mills PB, Kiano JW, Misawa N, Drake RG, Schuch W, Bramley PM (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1092-1097
- Goffreds JC, Armstrong Nick JM, Mehlenbacher SA, Vorsa N (1991) Inheritance of isozymes in peach x *Prunus Kansuensis* and peach x *Prunus davidiana* hybrids. 54:161-168
- Hanana M, Deluc L, Fouquet R, Daldoul S, Leon C, Barrieu F, Ghorber A, Mliki A, Hamdi S (2008) Identification and characterization of "rd22" dehydration responsive gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.) C R Biol 331(8):569-578
- Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7:1071-1083
- Hui-Hsien C Michael HH (2001) DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17(12):1093-1104
- Kristin B, Lavanya P, David S, Paul B (2005) Mutations in soybean microsomal omega-3-fatty acid desaturase genes reduce linolenic acid concentration in soybean seeds. *Crop Science* 45(5):1830-1836
- Lester DR, Speirs J, Orr G, Brady CJ (1994) Peach (*Prunus persica*) endopolygalacturonase cDNA isolation and mRNA analysis in melting and nonmelting peach cultivars. *Plant Physiol* 105(1):225-231
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380
- Martin S and Boris S (2010) Mechanisms of mono-and poly-ubiquitination: Ubiquitination specificity depends on compatibility between the E2 catalytic core and amino acid residues proximal to the lysine. *Cell Division* 5:19-23
- Mayfield SP, Rahire M, Frank G, Zuber H, Rochaix JD (1987) Expression of the nuclear encoding oxygen-evolving enhancer 2 is required for high levels of photosynthetic oxygen evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(3):749-753
- Ogundiwin EA, Peace CP, Nicolet CM, Rashbrook VK, Gradziel TM, Bliss FA, Parfitt D, Crisosto CH (2008) Leucoanthocyanidin dioxygenase gene (PpLDOX): a potential functional marker for cold storage browning in peach. *Tree Genetics & Genomes* 4(3): 543-554
- Park JS, Kim JB, Kim KH, Ha SH, Han BS, Kim YH (2002) Flavonoid biosynthesis: Biochemistry and metabolic engineering. *Korean J. Plant Biotechnology* 29(4):265-275
- Peng Y, Lin W, Cai W, Arora R (2007) Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic Arabidopsis plants. *Planta* 226:729-740
- Pozzi C, Vecchietti A (2009) Peach structural genomics. In: Folta KM, Gardiner SE (eds) *Genetics and genomics of Rosaceae*. Springer, New York, pp 235-257
- Raffaella G, Viktoria J, Miguel PS (2010) Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:323-354
- Shujun C, Jeff P, John C (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11(2):113-116
- Thornber JP (1975) Chlorophyll-proteins: light-harvesting and reaction centre components of plants. *Annu Rev Plant Physiol* 26:127-155
- Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI (2003) High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of 'Chardonnay' (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and anti-microbial peptide genes. *Plant Cell Rep* 22:252-260
- Walling LL, Chang YC, Demmin DS, Holzer FM (1988) Isolation, characterization and evolutionary relatedness of three members from the soybean multigene family encoding chlorophyll a/b binding proteins Nuc. Acids Res 16:10477-10492
- Wurgler-Murphy SM and Saito H (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* 22:172-176
- Ying Z, Dong G, Jing L, Jun C, Hui Z, Chao G, Sue G, Yue-Peng H (2012) Coordinated regulation of anthocyanin biosynthesis through photorespiration and temperature in peach (*Prunus persica* F. *atropurpurea*)
- Zhang M, Leng P, Zhang G, Li X (2009) Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *J Plant Physiol* 166(12):1241-1252
- Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schaffner AR (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot* 56:2971-2981