

배추 유래 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase 관련 *Brmecp* 유전자의 발현 및 분자적 특성

정유진 · 최장선 · 선주남 · 노일섭 · 조용구 · 강권규

Molecular and functional characterization of a *Brmecp* gene encoding 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase from *Brassica rapa*

Yu Jin Jung · Jang Sun Choi · Ju Nam Sun · Ill Sup Nou · Yong Gu Cho · Kwon Kyo Kang

Received: 30 August 2012 / Accepted: 10 September 2012
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In plants, the fifth step of the plastidial 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway is catalyzed by 2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (MECP; EC: 4. 6. 1. 12), an enzyme proposed to play a key role in the regulation of isoprenoid biosynthesis. Here we report the isolation and functional characterization of a 823 bp *Brassica rapa* MECP (*Brmecp*) cDNA encoding a deduced polypeptide of 230 amino acid residues. Transcription levels of *Brmecp* were two-fold higher in petal compared to leaves. In addition, *Brmecp* expression in cabbage seedlings treated with ABA, H₂O₂ and drought was

higher than control seedlings. These results were consistent with changes in chlorophyll contents in transgenic *Arabidopsis*. Thus, the *Brmecp* may contribute to the production of primary (chlorophylls and carotenoids) isoprenoid end-products in chloroplasts.

Keywords *Brassica rapa*, 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase, isoprenoid biosynthesis, 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway, transgenic *Arabidopsis*

Y. J. Jung · K. K. Kang (✉)
한경대학교 유전공학연구소
(Institute of Genetic Engineering, Hankyong National University,
Ansung, 456-749, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

J. N. Sun · K. K. Kang
한경대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Hankyong National University,
Ansung, 456-749, Korea)

J. S. Choi
국립원예특작과학원
(National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon,
440-706, Korea)

I. S. Nou
순천대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Suncheon National University,
Suncheon, 540-742, Korea)

Y. G. Cho
충북대학교 식물자원학과
(Department of Crop Science, Chungbuk National University,
Cheongju, 361-763, Korea)

서론

자연계 화합물 중 23,000 종류나 발견된 isoprenoid는 가장 넓은 범위의 천연화합물의 하나로 수많은 분자로 구성되어 있다. 이러한 isoprenoid 그룹에 속하는 terpenoids 합성물은 상업적으로 많이 사용되고 있다. 특히 음료 및 화장품 산업에는 menthol, nootkatone, sclareol 등의 향과 향기를 부여하고, 농업적인 측면에서는 꽃과 과실에 linalool 등의 향을 입혀서 시각, 후각을 자극한다. 또한 의학적인 면에서는 Taxol, perilla alcohol 등의 항암효과, 향말라리아, 위궤양방지, 미생물억제, 이노작용 등이 알려져 있고, 환경적 측면에서는 terpenoids의 일종으로 오이의 쓴맛을 내는 cucurbitacin, 고추의 매운 향인 polygodial 등이 알려졌다(Hirai et al. 2000; Adam et al. 2002; Han et al. 2003).

한편 isoprenoid는 식물의 생장과 발달에 중요한 식물 호르몬(GAs, ABA, cytokinin), 색소의 일종인 카로티노이드, 광합성에 관련된 클로로필, 호흡에 필요한 ubiquinones, 막 구성에 필요한 sterol 등의 생합성 관련 유용 이차대사

산물을 생산하는 중요한 화합물로서 알려졌다(Adam et al. 1998; Lichtenthaler et al. 1997; Steinbacher et al. 2002; Hunter et al. 2003; Shi et al. 2007). 최근 들어 고등식물에서 isoprenoid의 생합성은 세포질에서 합성하는 메발론산 acetate/mevalonate(MVA) 경로와 세포내 소기관의 하나인 엽록체에서 생합성하는 비메발론산 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate(MEP) 경로가 알려졌다(Lang & Croteau 1999b; Gao et al. 2006; Gabrielsen et al. 2004, 2006). 그 중 MEP 경로는 pyruvate와 glyceraldehyde-3-phosphate의 결합에 의해 시작되어 DXR, IspD, IspE, IspF 등의 효소에 의해 경로가 진행되며, 마지막 단계에서 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl D-erythritol 2-phosphate와 2-C-methyl D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate 등을 촉매반응을 하는 효소들이 알려져 있다(Campos et al. 2001; Dubey et al. 2003; Hunter 2007).

지금까지 식물에서 MEP 경로 마지막 단계에 관여하는 효소반응 및 유전자들의 연구는 *E. coli*와 애기장대가 매우 유사하며 같은 역할을 한다고 하였다(Dubey et al. 2003; Gao et al. 2006; Hunter 2007). 본 연구에서는 배추 유래 MEP 경로상에 존재하는 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase 관련 *Brmecp* 유전자의 기능분석을 위해 기관 및 발육단계별 발현분석 및 형질전환 애기장대를 육성하여 색소체 형성과정에 미치는 영향을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

실험에 사용한 배추(*Brassica rapa*) 종자는 70% ethanol에서 1분간 표면 살균한 후, 2% 차염소산나트륨으로 20분간 처리하고 멸균수로 5회 세척하였다. 살균된 종자는 1.5g/L sucrose와 0.8% phytigel이 첨가된 1/2 MS(Murashige and Skoog) 배지에 파종하여 23°C에서 16 hr 일장으로 14일간 배양하였다. 배양된 배추 잎을 잘게 자른 후 DNA 추출은 FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini kit (Favorgen Biotech Corp. Taiwan) 를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

MECP 유전자 분리 및 염기서열 분석

Total RNA는 RNase H-Reverse Transcriptase(Gibco BRL, Rockville, MD, USA) protocol에 따라 수행하였으며, first strand cDNA는 total RNA 5 µg으로부터 합성하였다. 합성된 cDNA 2 µl를 주형으로 하여 10×PCR buffer(200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) 5 µl와 50 mM MgCl₂ 1.5 µl, 10 mM dNTP mix 1 µl, Taq DNA polymerase(5 units/µl) 0.4

µl, forward primer(10 µM), reverse primer(10 µM)를 각각 1 µl씩 첨가하고 멸균수 38.1 µl로 최종 부피 50 µl로 하여 PCR 분석을 행하였다. PCR을 위해 사용한 primer는 NCBI data base로부터 얻어진 MECP 유전자들의 정보로부터 보존영역을 이용하여 forward primer; 5'-GAACTTGAAGGTACTG-3'와 reverse primer; 5'-AGTTTTGCGCTTCAGGCA-3'를 합성하여 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 4분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension 과정을 35 cycles로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel상에 영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. 증폭된 산물은 pGEM T-Easy vector(Promega)에 cloning하여 염기서열을 조사하였고, 유전자간상동성 비교는 BLAST 분석에 의하여 실시하였다. Full length cDNA를 분리하기 위하여 얻어진 단편의 염기서열을 토대로 RACE용 primer를 합성하여 5' RACE 및 3' RACE kit(TAKARA사)를 이용하여 미지의 영역을 증폭하여 염기서열을 조사하였다. 또한, 유전자간의 계통수 유연관계는 MEGA version 3.0 프로그램(Kumar et al. 2001)을 이용 하였다.

Northern 및 qRT-PCR 분석

배추 wild type 기관별에서 *Brmecp* 유전자의 발현을 확인하기 위하여 배추 절편 조직으로부터 유도한 캘러스를 포함하여 잎, 줄기, 뿌리, 꽃잎, 암술대를 각각 채취하였다. 채취한 조직을 TRIzol Reagent(Life Technologies)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. Northern Blot 분석을 위하여 Total RNA 10 µg을 1.2%(w/v) agarose gel(1 x MOPS, 8%(w/v) formaldehyde)에 전기영동한 후, 나이론 membrane에 0.05 N NaOH 용액으로 하룻밤동안 RNA를 옮겨 고정시킨 후 사용하였다. Prehybridization 및 hybridization은 42°C에서 행하였으며, probe는 AlkPhos Direct Labeling kit(GE Healthcare Life Sciences)에 의해 labelling 하였다. Washing 및 detection은 AlkPhos Direct Labeling system에서 권장하는 방법에 의해 수행하였다. qRT-PCR 분석은 합성된 cDNA를 사용하여 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO co., Japan)를 사용하여 권장하는 방법에 의해 수행하였다. Threshold cycle(Ct) 값에 의한 발현양 변이분석은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 으로 계산하였으며, $\Delta\Delta Ct$ 은 처리식물체의 ($Ct_{target\ gene} - Ct_{actin\ gene}$) - 대조식물체의 ($Ct_{target\ gene} - Ct_{actin\ gene}$)에 의해 계산하여 수치화 하였다(Livak & Schmittgen 2001).

발현벡터구축 및 *Arabidopsis* 형질전환

옥수수 유래 ubiquitin 1의 프로모터를 포함하고 있는

pBigs vector를 *sfil*(A)와 *sfil*(B) 제한효소 처리에 의해 693 bp의 *Brmecp* 유전자를 삽입시켰다. 이 재조합된 vector는 *E. coli*(DH5a)에 형질전환 시킨 후, hygromycin 50 mg/L를 포함한 LB 배지에서 선발된 단일 colony로부터 plasmid를 추출하여 insert DNA의 유무를 확인하였다. 확인된 plasmid는 액체질소를 이용하여 Vacuum infiltration method(Bechtold and Pelletier 1998)에 의해 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404에 형질전환 시켰다. *Agrobacterium* 균주의 배양은 50 mg/L hygromycin이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 2 일 동안 28°C에서 배양하였다. 얻어진 T1종자를 50 mg/L hygromycin이 포함된 MS배지에서 정상적으로 생육한 식물체를 선발하여 T2 세대를 육성하여 이용하였다.

식물체의 다양한 환경스트레스 처리

다양한 환경스트레스 처리에서 *Brmecp* 유전자의 반응을 알아보기 위해 스트레스 처리 후 채취한 조직에서 유전자의 발현양상을 qRT-PCR 분석에 의해 조사하였다. 스트레스 종류는 100 µM ABA, 250 mM NaCl, 4°C cold, 4 5°C heat, drought, water, 15% polyethylene glycol(PEG) 6000, 3% H₂O₂로 하였다. 처리방법은 종자 발아 후, 4주된 배추 유묘를 1/2 MS 배지를 이용하여 각각 처리한 후 25°C에서 시간대별로 채취하여 total RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 분석하였다.

엽록소 측정

엽록소 a, b, 카로테노이드 및 안토시아닌을 측정하기 위해 각각의 시료 적당량(10-200 ml)을 준비하여 유리섬유 여지(GB/C, 45 mmD)로 여과한 다음 유리섬유여지를 조직마쇄기에 넣고 아세톤 적당량(5-10 ml)을 넣어 마쇄한다. 마쇄한 시료를 마개 있는 원심분리관에 넣고 밀봉하여 42°C 어두운 곳에서 하룻밤 방치한 다음 500 x g의 원심력으로 20 분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 측정한 다음 상등액의 일부를 취하여 10 mm 흡수셀에 옮겨 검액으로 하고, 바탕시험액으로는 아세톤 용액을 취하여 대조액으로하여 663 nm, 645 nm, 750 nm, 630 nm에서 검액의 흡광도를 측정하고 계산식(엽록소 농도 (µg/mg-Fw) = {20.29 X A₆₄₅ + 8.02 X A₆₆₃} X 아세톤양(ml) / 생체중(mg))에 따라 클로로필 a, b량을 계산하였고, 카로테노이드와 안토시아닌 색소는 측정 기계를 사용하였다.

결과 및 고찰

배추 유래 MECP 유전자의 분리 및 분자적 특성

배추 유래 mRNA로부터 MECP 관련 유전자를 분리하기

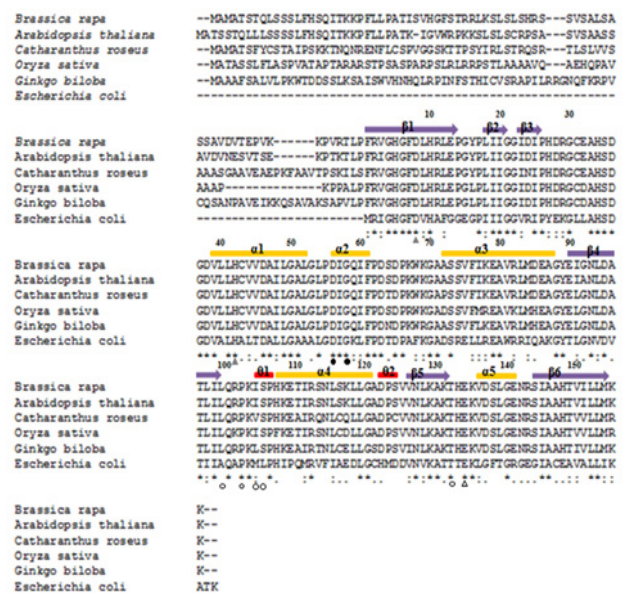


Fig. 1 Sequence alignment of MECP synthase from plants and *E. coli*. The secondary structure elements based on the *E. coli* enzyme structure are colored and labeled. Residues whose identity is strictly conserved in all three sequences are asterisks, conservative substitutions by dots, gray triangles mark Zn²⁺ ligands, and an open triangle the Mn²⁺ binding Glu-135. Circles mark CDP-binding residues (open and filled to distinguish subunits)

위하여, RT-PCR을 수행한 결과 단일 band가 얻어졌다. PCR 증폭 산물은 TA-Cloning 벡터에 cloning하여 염기서열을 조사한 결과 배추 유래 *Brmecp* 유전자의 총 길이는 823 bp로서 693 bp의 ORF와 5' UTR 영역 10 bp, 3-UTR 영역 120 bp로 구성되었다. MECP 단백질은 230개의 아미노산으로 구성되었으며, 약 25.3KDa이었으며 *Brmecp*로 명명하였다. 배추 유래 *Brmecp* 유전자는 *Catharanthus*, 애기장대, 벼, 은행나무 및 *E. coli* 유래 *mecp* 유전자들과 68-94%의 높은 상동성을 보였다. 또한 *BrMECP* 단백질은 기존에 알려진 MECP 단백질과 동일하게 beta 1, beta 2, beta 3, alpha 1, alpha 2, alpha 3, beta 4, theta 1, alpha 4, theta 2, beta 5, alpha 5, beta 6의 사슬을 이루는 아미노산 구조가 잘 보존되어 있었다(Fig. 1). 또한 Zn²⁺ ligands, Mn²⁺ binding(Glu-135) 및 CDP-binding 영역이 존재하고 있는 특징 등 다른 아미노산과 거의 유사 하였다.

Brmecp 유전자의 유연관계분석

이미 보고되어져 있는 MECP 관련 유전자들의 아미노산 배열과 본 실험에서 분리된 *Brmecp* 유전자의 아미노산 배열을 이용해 유연관계를 분석하였다(Fig. 2). 현재 보고되어진 대표적인 MECP 유전자들은 3 group으로 *Arabidopsis*와 *Brassica rapa*, *Ginkgo biloba*와 *E. coli*, 및 *Oryza sativa*와 *Catharanthus roseus* 등으로 나누어졌다.

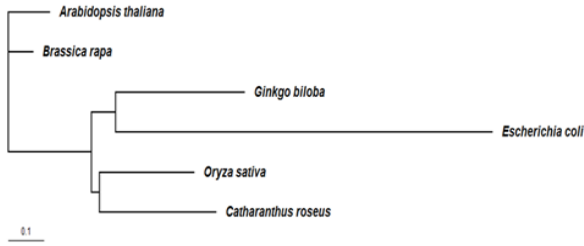


Fig. 2 The phylogenetic tree of the *mecP* gene from plants and *E. coli*. A phylogenetic tree was constructed using CLUSTAL-W alignments. The neighbor-joining method was used to construct the tree.

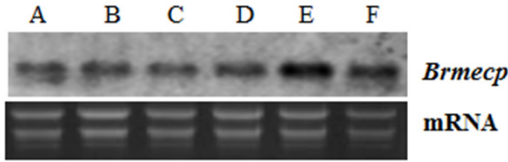


Fig. 3 Expression profile of *BrmecP* in tissues collected from *Brassica rapa* as determined using RT-PCR analysis. *BrmecP* transcripts were detected in calli (A), leaves (B), stems (C), roots (D), petals (E) and stigmas (F)

BrmecP 유전자의 기관별 발현분석

배추 유묘로부터 분리한 *BrmecP* 유전자의 기관별 발현 분석을 위하여 캘러스를 포함하여 잎, 줄기, 뿌리, 꽃잎 및 주두 등 총 6개 기관을 사용하여 northern blot을 수행한 결과, 꽃잎에서 가장 높게 발현하였으며, 다음으로 주두, 잎, 뿌리 및 callus 순으로 나타났다(Fig. 3).

스트레스 처리에 따른 *BrMECP* 유전자의 발현분석

다양한 스트레스 처리에 따른 *BrmecP* 유전자의 발현양상을 알아보기 위해 발아 후 4주된 배추 유묘에 ABA, cold, drought, heat, H₂O₂, PEG, salt, water 스트레스를 각각 4시간씩 처리하여 qRT-PCR 분석하였다(Fig. 4a). *BrmecP* 유전자는 cold, PEG, salt, water 스트레스에서 높게 발현하였으나 heat 스트레스 처리구에서는 낮게 발현되었다. 이 중 ABA, H₂O₂ 및 drought 처리 후 시간대별로 발현양상을 분석한 결과 ABA와 H₂O₂는 처리 후 30분이 지나서 발현이 증가하여 24시간까지 높게 유지되었으며, Drought 처리에서는 *BrmecP* 유전자가 8시간이 지나면서 발현이 증가하기 시작하였다(Fig. 4b-d).

애기장대 형질전환을 위한 벡터 구축 및 발현 검정

BrmecP 유전자의 기능을 알아보기 위해 애기장대에 형질전환실험을 수행하였다. 먼저 형질전환을 위해 *BrmecP* 유

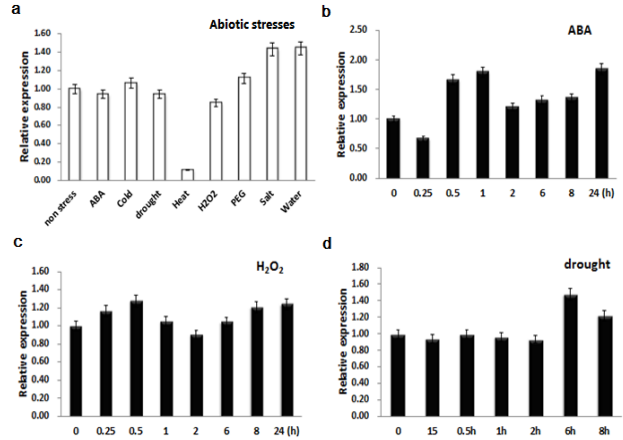


Fig. 4 a: Expression profiles of *BrmecP* gene under the various stress treatments administered to *Brassica rapa* seedlings (4 hr). b: ABA 100 μM stress treatments administered to *Brassica rapa* seedlings. c: H₂O₂ (3%) stress treatments administered to *Brassica* seedlings. d: drought stress treatments administered to *Brassica* seedlings

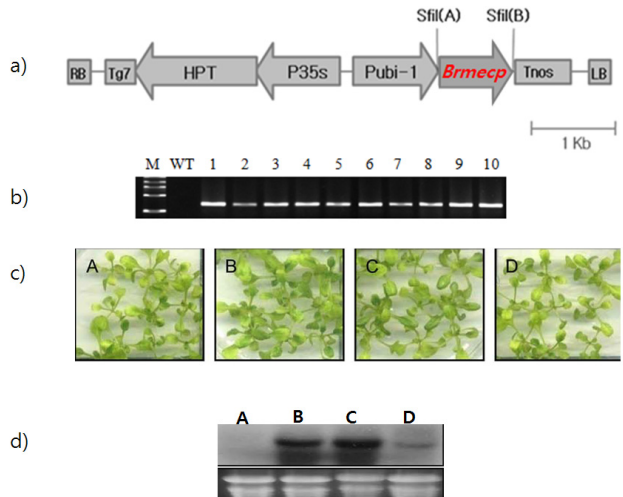


Fig. 5 Development of transgenic *Arabidopsis* overexpressing *BrmecP* gene. a) pBIG2113SF vector using two different *SfiI* sites, b) PCR analysis of genomic DNA from transgenic *Arabidopsis*. Lane WT; wild type plant, Lane 1~10; Transgenic plants of T1 generation. c) Phenotypics of Transgenic *Arabidopsis* lines. d) Northern blot analysis of transgenic plants

전자를 Ti-plasmid 벡터(pBig vector)의 *sfiI* site에 sense 방향으로 구축하였다(Fig. 5a). 따라서 *BrmecP* 유전자는 옥수수 유래 ubiquitin 1 프로모터의 지배하에 발현되며, 선발 마커로 hygromycin 저항성을 보이는 HPT 유전자를 사용하여 *Agrobacterium* 법에 의해 형질전환시킨 결과 T0 세대로부터 10개체의 형질전환체를 확인하였다(Fig. 5B). T1 및 T2세대를 육성하고 도입유전자가 안정적으로 발현하는 호모계통(#6, #7, #8)을 육성하였다(Fig. 5C). 형질전환 호모계통(#6, #7, #8)들에서 *BrmecP* 유전자의 발현양상을 northern blot 분석에 의해 조사한 결과 #6 및 #7

계통에서 높은 발현량을 보였다(Fig. 5D).

형질전환 애기장대의 스트레스별 엽록소함량

Brmecp 유전자가 엽록소를 생성하는 과정에서 각각의 stress에 따라 어떠한 변화를 보이는지를 확인하고자 형질전환된 애기장대에 salt 및 drought stress를 처리한 것으로부터 엽록소 a 와 b, 카로티노이드, 안토시아닌의 양을 비교 분석하였다. 먼저 MECP 유전자가 도입된 형질전환체와 wild type을 이용하여 발아 후, 4주된 유묘에 salt 와 drought 스트레스를 가하여 색소체를 측정된 결과 정상적인 환경에서의 성장한 애기장대에 비하여 salt stress하에서는 엽록소는 3~4배 정도 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 카로티노이드 또한 1.16~1.6배 감소되는 것을 알 수 있었다. 상대적으로 안토시아닌은 9 배에서 최대 17.5배까지 유전자의 발현양이 증가하는 것으로 확인되었다. Drought 처리구에서도 wild type에 비해 형질전환체는 색소체들이 스트레스를 받은 후에도 1.5배에서 3배 이상 보존되고 있음이 확인되었다(Table 1). 또한 cold stress에 따른 각 유전자의 발현양의 변화를 알아보기 위하여 발육단계별 애기장대를 4°C에서 배양하며, 2주 간격으로 엽록소 a, b 및 total chlorophyll, 카로티노이드 및 안토시아닌을 비교하였다. 저온 배양 2주후의

유전자 발현양은 정상 배양 조건에 비하여 표준 편차 범위 내에서의 차이만을 보이는 것으로 확인되었으며 (Table 2), 저온 배양 4주차에는 엽록소는 평균 1.5배 정도 발현양이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 카로티노이드는 형질전환체에서 3.3~5.3배로 많은 양이 감소되는 것을 알 수 있었으며, wild type은 평균 6.7배까지 발현양이 감소되는 것을 확인하였다. 상대적으로 안토시아닌은 wild type(평균 4배)에 비하여 형질전환체(13~15배)가 더 많은 유전자의 발현양이 증가하는 것으로 확인되었다. 저온 배양 6주차에서도 유사한 패턴으로 발현양의 증가와 감소가 확인되는바 저온 배양 상에서 시간이 지날수록 엽록소와 카로티노이드는 발현이 감소하는 것을 알 수 있었으며, 안토시아닌은 wild type은 4배, 형질전환체는 최대 34배까지 증가되는 것을 알 수 있었다. 특히적으로 꽃잎에서 안토시아닌은 wild type은 9배, 형질전환체는 최대 77배까지 증가되는 것을 알 수 있었다(Table 2). 식물체가 고염, 건조, 삼투압 등 수분관련 스트레스로 인해 팽압의 변화로 ABA의 생합성이 촉진되어 잎 기관에 ABA 함량이 급속히 증가하고 ABA시그널을 감지한 수용체에 의해 기공을 닫아 수분스트레스에 대응한다 (Araki et al. 2000). 이런 관점으로 볼 때, *Brmecp* 유전자는 Non-Mevalonate 경로에서 마지막 카로티노이드 생합성에 관여하는 효소 생성 유전자이므로 환경스트레스를 받았

Table 1 Effect of growth condition under salt and drought stresses for the content of chlorophyll a, b and total chlorophyll (T. Chlorophyll), carotenoids and anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* wild type and transgenic lines (4-week-old plants)

Stress type	Lines	Chlorophyll a ug/ml	Chlorophyll b ug/ml	Total chlorophyll ug/ml	Carotenoids ug/ml	Anthocyanin umol/cm ²
non stress	WT	25.87±1.4	12.36±1.9	40.17±2.7	7.18±1.3	0
	#6	25.90±2.6	12.14±1.9	41.17±5.0	7.97±0.77	0
	#7	28.16±0.73	14.70±2.0	46.28±3.0	8.45±32	0
	#8	27.72±0.33	13.32±0.7	44.21±1.0	8.38±0.13	0
salt	WT	8,79±,28*	3,45±,17*	12,66±,32*	4,48±,13*	9,14±2,5*
	#6	13,26±,61*	4,76±,25*	19,49±,97*	6,82±,4*	17,53±4,59*
	#7	12,07±1,5*	4,28±,58**	17,72±2,25*	6,04±,79*	12,36±,8
	#8	12,07±,61*	4,34±,19**	17,78±,85*	5,98±,32*	14,61±,28*
drought	WT	7.72±0.56*	2.75±0.34*	11.24±0.81*	2.45±0.12	0
	#6	9.26±0.12*	4.52±0.21*	14.99±0.37*	2.96±0.02*	0
	#7	7.74±1.3*	3.57±0.94*	12.35±2.43*	2.45±0.4	0
	#8	10.06±0.14*	6.95±0.61*	18.07±0.54*	2.48±0.2	0
LSD at 0.05		N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE

*The mean difference is significant at the 0.05 level
 Red star: Highly significant
 Blue star: Weakly significant
 N.S: Not significant
 ±SE: standard error

Table 2 Effect of cold stress for the content of chlorophyll a, b and total chlorophyll (*T. chlorophyll*), carotenoids and anthocyanin in leaves of *Arabidopsis thaliana* wild type and transgenic lines

cold stress	Lines	Chlorophyll a ug/ml	Chlorophyll b ug/ml	Total chlorophyll ug/ml	Carotenoids ug/ml	Anthocyanin umol/cm ²
4weeks old ; 2 weeks of exposure to 4°C	WT	26.70±0.32	11.61±0.16*	41.64±0.55*	9.39±0.11	0
	#6	29.36±0.22*	16.94±0.59*	49.97±0.9*	9.58±0.04*	0
	#7	28.08±0.41*	14.21±0.29*	44.87±1.3*	8.79±0.59	0
	#8	28.65±0.64*	15.83±1.8*	48.27±2.5*	9.55±0.17*	0
6weeks old ; 4 weeks of exposure to 4°C	WT	14.46±1.0	13.15±0.46*	30.14±0.99	1.07±0.13	4.99±1.27*
	#6	14.49±0.65	10.62±1.03*	27.45±0.40	2.03±0.48	15.34±1.16*
	#7	17.28±2.3*	9.73±1.76*	29.59±3.0	2.56±1.17*	10.13±1.7
	#8	13.74±0.46*	11.55±1.25	27.63±0.85	1.56±0.55	13.82±5.12*
8weeks old ; 6 weeks of exposure to 4°C	WT	19.19±1.18*	6.77±0.47*	28.19±1.67*	6.72±0.36*	4.87±1.3*
	#6	15.27±0.84*	5.12±0.28*	22.2±1.2*	6.85±0.38*	34.33±1.47*
	#7	16.46±0.93*	5.16±0.36*	22.98±1.3*	6.60±0.39*	11.43±0.67*
	#8	14.77±0.50*	4.59±0.14*	21.23±0.7*	6.47±0.21	27.49±1.85*
8weeks old ; 6 weeks of exposure to 4°C	WT	12.16±0.11	4.73±0.73	23.84±0.32*	7.09±0.11*	9.69±1.08*
	#6	11.92±0.16	5.54±1.37	18.72±2.24*	8.94±0.81*	67.86±4.27*
	#7	11.89±0.11	6.30±0.71	22.78±0.45*	6.43±0.18*	56.33±0.53*
	#8	12.03±0.27	5.17±2.03	21.65±1.82	7.66±0.85*	77.41±5.14*
LSD at 0.05		N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE	N.S Sig.* ±SE

*The mean difference is significant at the 0.05 level

Red star: Highly significant

Blue star: Weakly significant

N.S: Not significant

±SE: standard error

을 때 카로티노이드 축적은 항산화물질로서 스트레스에서 발생하는 활성산소 등의 radicals의 생성을 억제하기 때문에 유전자의 발현이 증가했을 것이라고 생각되어진다. 또한 H₂O₂를 처리하여 식물에 산화 스트레스를 주었을 때 식물체는 엽색질의 응축, 핵의 응축, 세포의 축소 뿐만 아니라 apoptosis 상태인 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 것 등이 일어난다(Julliard and Douce 1991; Bouvier et al. 1998; Milborrow and Lee 1998; Lang and Croteau 1999a; Bernal et al. 2005). 본 실험에서 지속적이 아닌 2시간 정도의 산화적 스트레스는 식물이 저온스트레스를 받았을 때 나타나는 현상과 유사하다고 판단된다. 따라서 MEP 경로상에 존재하는 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase 관련 *Brmecp* 유전자의 발현은 몇몇 스트레스에서 증가하고, 카로티노이드 등 색소생성에 영향을 주고 있음을 시사한다.

사 사

본 연구는 농림기술개발사업(과제번호: 111098-03-1-HD110)

과 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: PJ008085)의 일환으로 수행되었다.

인용문헌

- Adam KP, Zapp J (1998) Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes; *Phytochemistry* 48:953-959
- Adam P, Hecht S, Eisenreich W, Kaiser J, GRAWERT T, Arigoni BA, Rohdich F (2002) Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase. *Proc Natl Acad Sci* 99:12108-12113
- Araki N, Kusumi K, Masamoto K, Iba K (2000) Temperature sensitive *Arabidopsis* mutant defective in 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase with in the plastid non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Physiol Plant* 108:19-24
- Bechtold N, Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82:259-66
- Bernal C, Palacin C, Boronat A, Imperial S (2005) A colorimetric assay for the determination of 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase activity. *Anal Biochem*

- 337:55-61
- Bouvier F, d'Harlingue A, Suire C, Backhaus RA, Camara B (1998) Dedicated roles of plastid transketolase during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits; *Plant Physiol* 117:1423-1431
- Campos N, Rodriguez-Concepcion M, Seemann M, Rohmer M, Boronat A (2001) Identification of *gcpE* as a novel gene of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 488:170-173.
- Dubey VS, Bhalla R, Luthra R (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J Biosci* 40:637-646
- Gabrielsen M, Rohdich F, Eisenreich W, Grawert T, Hech, S, Bacher A, Hunter, WN (2004) Biosynthesis of isoprenoids: a bifunctional IspDF enzyme from *Campylobacter jejuni*. *Eur J Biochem* 271:3028-3035
- Gabrielsen M, Kaiser J, Rohdich F, Eisenreich W, Laupitz R, Bacher A, Bond CS, Hunter WN (2006) The crystal structure of a plant 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase exhibits a distinct quaternary structure compared to bacterial homologues and a possible role in feedback regulation for cytidine monophosphate. *FEBS J* 273:1065-1073
- Gao S, Lin J, Liu X, Deng Z, Li Y, Sun X, Tang K (2006) Molecular cloning, characterization and functional analysis of a 2-C-methyl-D-erythritol 2, 4-cyclodiphosphate synthase gene from ginkgo biloba. *J. Biochem Mol Biol* 39: 502-510
- Han YS, Roytrakul S, Verberne MC, van der Heijden R, Linthorst HJM, Verpoorte R (2003) Cloning of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Morinda citrifolia* and analysis of its expression in relation to anthraquinone accumulation. *Plant Sci* 164:911-917
- Hirai N, Yoshida R, Todoroki Y, Ohigashi H (2000) Biosynthesis of abscisic acid by the non-mevalonate pathway in plants, and by the mevalonate pathway in fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:1448-1458
- Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis *J Biochem* 282:21573-21577
- Julliard JH, Douce R (1991) Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin (vitamin B1) in higher plant chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2042-2045
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17:1244-1245
- Lange BM, Croteau R (1999a) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365:170-174
- Lange BM, Croteau R (1999b) Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: isopentenyl monophosphate kinase catalyses the terminal enzymatic step *Proc Natl Acad Sci* 96:13714-13719
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. *FEBS Lett* 400:271-274
- Livak K.J, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25:402-408
- Milborrow BV, Lee HS (1998) Endogenous biosynthetic precursors of (+) abscisic acid. VI. Carotenoids and abscisic acid formed by the non-mevalonate triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Aust J Plant Physiol* 25:507-512
- Shi W, Feng J, Zhang M, Lai X, Xu S, Zhang X, Wang H (2007) Biosynthesis of Isoprenoids: Characterization of a Functionally Active Recombinant 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate Cytidyltransferase (IspD) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Biochem Mol Biol* 40:911-920
- Steinbacher S, Kaiser J, Wungsintaweekul J, Hecht S, Eisenreich W, Gerhardt S, Bacher A, Rohdich F (2002) Structure of 2-C-methyl-d-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids. *J Mol Biol* 316:79-88