

국화흰녹병균 *Puccinia horiana* 유전체 분석과 약물 표적으로서의 sterol 14-demethylase

김정구* · 박상근¹ · 박하승² · 권수진 · 김승환 · 이동준 · 손성한 · 이병무 · 배신철 · 안일평 · 김창훈³ · 백정훈³

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ¹국립원예특작과학원 원예작물부,

²충청남도 농업기술원 예산국화시험장, ³주식회사 마크로젠

Genome Sequence Analysis of *Chrysanthemum* White Rust pathogen *Puccinia horiana* and Sterol 14-demethylase as Drug Target

Jeong-Gu Kim*, Sang Kun Park¹, Ha-Seung Park², Soo-Jin Kwon, Seung Hwan Kim, Dong-Jun Lee, Seong-han Sohn, Byoung Moo Lee, Shin-Chul Bae, Il-Pyung Ahn, Changhoon Kim³ and Jeong hun Baek³

Department of Agricultural Biotechnology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

¹Floriculture Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Suwon 441-440, Korea

²Yesan Chrysanthemum Experiment Station, Chungcheongnam-do Agricultural Research and Extension Services, Yesan 340-915, Korea

³Macrogen Inc., Seoul 153-801, Korea

(Received on November 14, 2013. Revised on November 30, 2013. Accepted on December 16, 2013)

Abstract *Chrysanthemum* is an economically important horticultural plant in many countries. The white rust is one of the most devastating diseases caused by an obligate fungal pathogen *Puccinia horiana*. This is being controlled mostly by application of chemicals. In Korea, 26 items are registered and 10 items contain 6 triazole compounds. To identify and to obtain the information of the drug target for triazoles, possible sterol 14-demethylase orthologues were extracted. From the draft genome information, the nucleotide sequence of the sterol 14-demethylase gene was identified. The amino acid sequence was deduced and the tertiary structure of the enzyme was predicted. This protein showed no less than 84% amino acid sequence identities to those of genus *Puccinia* and no more than 68% to those of other genus.

Key words *Puccinia horiana*, *Chrysanthemum* white rust, genome, drug target, sterol 14-demethylase

서 론

국화흰녹병은 세계적으로 다수의 재배종 국화에 발생하는 병해로서 현재 국내 화훼산업에 가장 큰 피해를 주고 있다(농림수산식품부, 2012). 국화흰녹병을 일으키는 병원체는 국화흰녹병균으로 담자균류에 속하는 진균으로서 살아있는 기주식물에서만 성장하는 절대활물기생균이며 국화중에서도

10여종의 종에만 병을 일으킨다(Hiratsuka 1957). 1895년 일본에서 처음으로 발견된(Hennings 1901; Hiratsuka 1957) 이후 중국과 남아프리카로 전파되었다(Priest 1995). 1963년 이후에는 영국을 포함한 유럽 여러국가에서 발견되었으며(Baker 1967), 국화를 재배하는 모든 국가에서 발생하고 있다(Whipps 1993; Eppo 2004). 유럽과 국내 연구진에 의하여 병원균 DNA를 표적으로 하는 진단기술개발 연구와 병저항성 국화육종연구가 이루어지고 있다(Pedley et al., 2009).

국화흰녹병균의 발달 분화, 생리, 생화학적 특징에 대한 정보를 총체적으로 얻기 위하여 유전체 분석 연구가 수행되

*Corresponding author

Tel: +82-31-299-1644, Fax: +82-31-299-1622

E-mail: jkim5aug@korea.kr

고 있다. 유전체정보에 의하여 약물표적을 상정한 방제약제 개발등의 방제기술 개발이 뒷받침 될 수 있다.

본 연구는 국내에서 최초로 수행되는 절대기생성 식물병 원균 유전체연구이며, 같은 속에 속하는 밀녹병균 *Puccinia graminis*의 유전체염기서열 분석결과가 2011년 프랑스 연구진에 의하여 발표된 바 있는데(Dupressis *et al.*, 2011), *P. graminis*는 단자엽식물인 밀을 기주로 하고, 국화흰녹병균은 쌍자엽식물인 국화를 기주로 한다는 점에서 이들의 비교 분석도 학문적으로 중요한 의미를 갖는다.

국화흰녹병에 대하여 국내에는 26개 농약품목이 등록되어 있으며, 이 중 10개가 트리아졸계 살균제이고, 주성분 물질은 디페노코나졸, 이미벤코나졸, 테부코나졸, 테트라코나졸, 플루퀸코나졸, 헥사코나졸의 6종이다(한국작물보호협회, 2012). 2005년 기준으로 세계살균제 시장규모는 89억 USD를 넘으며 트리아졸계 및 기타 이졸계가 25.3%를 차지하여 가장 많은 비중을 차지한다. 이들 약제들은 진균의 세포막의 구성에 필수적인 에르고스테롤의 생합성을 억제하는 물질들로서 특히 sterol 14-demethylase 효소의 활성을 저해한다(Yoshida 2000).

세계 살균제시장의 20%를 넘는 비중을 차지하며 현재 국화흰녹병균 방제에 가장 많이 사용되고 있는 트리아졸계 농약의 표적이 되는 sterol 14-demethylase 효소 단백질의 아미노산 염기서열과 구조를 예측하였다.

재료 및 방법

DNA 분리

충남 부여군 세도면 조성대 농가의 국화 대량재배 온실에서 약 60 kg의 이병식물체를 채취하였다. 이병된 국화조직에서 약 4 g의 균개를 분리하고, MG Genomic DNA purification kit (MacroGen)를 사용하여 제조자가 제시한 방법에 따라 35 µg의 genomic DNA를 분리하였다.

유전체 염기서열 결정

HiSeq2000의 shotgun library kit (TruSeq DNA Sample Prep Kit v2 Support : FC121-2001)를 이용하여 유전자은행을 제조하였으며, De novo 방식으로 유전체 서열을 결정하기 위해서 Illumina사에서 제공되는 프로토콜을 따라서 fragment library (insert 크기, 300~500 bp; TruSeq DNA PCR-free 프로토콜)와 mate-pair library (insert 크기, 2 kb; Nextera Mate Pair, Gel-plus 프로토콜)를 각각 제작하였다. 제작된 library는 HiSeq2000 (Illumina Inc.)을 이용하여 101 bp X2 (Paired-End)로 시퀀싱되었다.

유전체 염기서열 데이터의 신뢰성 검증

Fragment library와 2 kb Mate pair library로부터 각각

213,786,218 read와 171,020,188 를 얻었으며 Q20 (Q30)의 비율은 각각 95.12% (89.16%)와 96.13% (88.99%)에 해당하였다. 모든 read pair에 대하여 각 read에서 Q20이 90%가 넘는 read pair들만을 추출 하여 최종적으로 de novo assembly에 사용하였다. 즉, 최종 데이터에는 fragment library와 mate pair library에 대해서 각각 177,323,660 와 103,882,342 read가 포함되었으며, Q20 (Q30)은 각각 99.18% (95.19%) 와 98.96% (94.44%)에 해당하였다.

Table 1. Classification of the deduced genes by functional category

Functional Category	Number
Cell communication	2
Cell growth and death	46
Cell motility	8
Transport and catabolism	65
Membrane transport	5
Signal transduction	62
Signaling molecules and interaction	2
Folding, sorting and degradation	168
Replication and repair	48
Transcription	87
Translation	208
Cancers	21
Immune diseases	3
Infectious diseases	9
Neurodegenerative diseases	4
Substance dependence	1
Amino acid metabolism	35
Carbohydrate metabolism	96
Energy metabolism	66
Glycan biosynthesis and metabolism	32
Lipid metabolism	65
Metabolism of cofactors and vitamins	36
Metabolism of other amino acids	9
Metabolism of terpenoids and polyketides	12
Nucleotide metabolism	62
Overview	122
Xenobiotics biodegradation and metabolism	3
Digestive system	1
Endocrine system	5
Environmental adaptation	2
Excretory system	5
Immune system	3
sum total	1,293

유전체 염기서열 데이터의 가공

Nextera mate pair에서는 jumping library가 만들어질 때 생겨나는 junction 부분을 알 수 있게 되어 있기 때문에, 일루미나에서 제공하는 mate pair junction 서열을 이용하여 양쪽 mate를 서로 분리하여 assembly에 이용하였다.

결과 및 고찰

유전체 염기서열 분석결과

Jellyfish (version 1.1.5)를 이용하여, k-mer 분석을 수행한 결과(K = 25) 국화흰녹병균의 유전체 크기는 대략 91.8Mb로 추정되며, 약 41x coverage로 시퀀싱된 것으로 추정되었다. 위에서 언급한 과정을 따라서 filter된 read set을 input으로 하여 AllPathLG (build R40214)를 이용하여 de novo assemble을 진행하였을 때, 8,961 (13,862) 개의 scaffold (contig)가 얻어졌으며, N50 값은 166 kb (40 kb)에 해당하는 결과를 얻었다. Scaffold의 길이의 총합은 약 139.4 Mb로서 예상보다 훨씬 크게 얻어졌다.

이는 국화흰녹병균을 prep하는 과정에서 숙주인 국화 및 여타 미생물들의 오염에 의한 결과로 보여진다. 이런 오염 원으로부터 국화흰녹병균의 유전체만을 분리하기 위하여, 각 scaffold에 대하여 GC%, 평균 read depth 및 scaffold length를 기준으로 분석을 수행하여 다음 조건에 해당하는 scaffold만을 선별하였다: Scaffold 길이 \geq 5 kb; 평균 read depth, 40 이상 100미만; GC%, 35% 이상 50% 미만. 이렇게 해서 총 448개의 scaffold를 얻었으며, 이들의 총합은 약 65.8 Mb에 해당하였다. 이는 추정된 유전체 크기를 기준으로 할 때, 약 72%의 유전체 서열을 해독하였음을 의미한다. 모든 scaffold들을 NT database에 blasting하여보았을 때, 위의 조건에 부합하는 대부분의 scaffold는 *Puccinia graminis*의 서열과 유사성을 보여주었으나, 위의 조건에 부합하지

않은 대부분은 여러 가지 미생물 및 식물 등에 유사성을 보여주는 것을 확인 할 수 있었다.

얻어진 scaffold 서열을 이용하여 FGENESH 프로그램으로 유전자를 예측하였을 때, 10,325개의 유전자가 예측되었으며, KEGG gene set와 비교하여 functional category 별로 정리하였다.

예측된 유전자의 기능범주별 구분 결과

8,961개의 Scaffold에 대하여 non redundant nucleotide sequence에 대한 BLAST 검색을 실시하여 10,318개의 subject에 match되었으며, 31개의 기능범주(functional category) 별로 구분한 결과는 Table 1과 같다.

예측된 유전자 중 약물 표적의 검색 결과

얻어진 유전체염기서열을 *Puccinia graminis*에 존재하는 유전자 세트와 비교하였을 때, 12개의 cytochrome P450 유전자가 발견되었다. 이들의 목록은 Table 2에 제시하였다.

얻어진 유전체염기서열에서 sterol 14-demethylase 유전자로 예측되는 것은 단 하나가 존재하였는데, 현재 *Puccinia*속에서 보고된 상동단백질 3개와 높은 유사성을 보였다. 즉, 기 보고된 단백질들이 각각 507, 536, 545개의 아미노산 잔기로 구성된 것으로 보고되어 있는데 국화흰녹병균 sterol 14-demethylase 효소는 530개의 아미노산 잔기로 구성된 것으로 예측되었으며, 이들과 84.0 내지 85.5%의 아미노산 서열 일치도를 보였다. 이들 4개 단백질의 아미노산 서열의 multiple alignment 결과는 Fig. 1에 나타내었다.

또한 국화흰녹병균 sterol 14-demethylase 단백질 아미노산서열과 높은 상동성을 보이는 대표적인 14개 단백질들의 그것을 multiple alignment를 실시하여 phylogenic tree를 작성하면 Fig. 2와 같았다. 즉, *Puccinia* 속끼리 한 개의 clade를 형성하며 이들과 비교적 가까운 것은 *Phakopsora*

Table 2. List of cytochrome P450 genes found in the draw of *Puccinia horiana* genome

Name	Length	Description
scaffold_4_AA_00118	201	PGTG_03841 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> cytochrome P450 67 (558 aa)
scaffold_644_AA_00001	348	PGTG_09163 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (515 aa)
scaffold_66_AA_00017	452	PGTG_07113 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (464 aa)
scaffold_145_AA_00011	282	PGTG_21421 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (524 aa)
scaffold_190_AA_00005	317	PGTG_14706 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (524 aa)
scaffold_494_AA_00006	325	PGTG_07113 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (464 aa)
scaffold_384_AA_00006	329	PGTG_16636 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (545 aa)
scaffold_407_AA_00004	533	PGTG_08907 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (560 aa)
scaffold_7_AA_00104	324	PGTG_21947 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (621 aa)
scaffold_10_AA_00013	341	PGTG_04658 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (543 aa)
scaffold_10_AA_00005	185	PGTG_09701 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (534 aa)
scaffold_494_AA_00002	373	PGTG_07100 <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> hypothetical protein (475 aa)



Fig. 1. Multiple sequence alignment of the three reported and newly deduced amino acid sequences of *Puccinia* sterol 14-demethylase's by ClustalOmega 1.2.0.

*pachyrhizi*였다.

SWISS-MODEL Workspace Modelling 프로그램(Arnold 2006)을 이용하여 국화흰녹병균 sterol 14-demethylase 단백질의 구조를 예측한 결과 그 구조는 인체 lanosterol 14-alpha-demethylase (cyp51)의 결정구조로부터 얻어진 PDB 3juv Chain A의 구조와 가장 유사하였다.

본보에서 보고하는 국화흰녹병균 sterol 14-demethylase

효소단백질의 구조로부터 이 효소를 약물표적으로 하는 약물의 개발이 가능할 것으로 기대되며, 이 효소 또는 이와 유사한 다수의 cytochrome P450 효소의 돌연변이는 이러한 약물에 대한 병원균의 주요한 약제 저항성 기작이 될 수 있다. 따라서 향후 병원균에서의 약제 저항성 기작 구명에도 중요한 정보가 될 것이다.

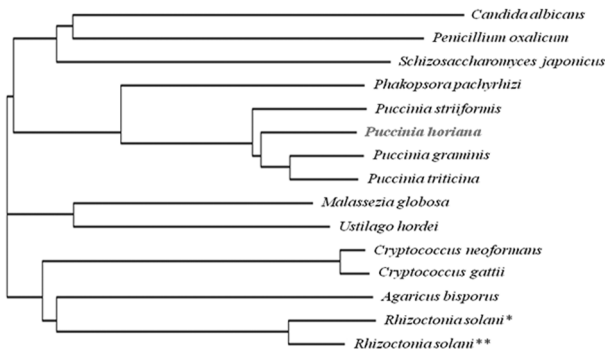


Fig. 2. Phylogenetic tree of the amino acid sequences for *Puccinia horiana* sterol 14-demethylase and homologues.

감사의 글

본 연구는 2013년도 농촌진흥청 국립농업과학원 농업기초연구사업(과제번호: PJ009405)의 지원으로 수행되었으며, 연구개발비 지원에 감사드립니다.

Literature Cited

Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*, 22:195-201.
 Baker, J. J. (1967) Chrysanthemum White Rust in England and

Wales 1963-66. *Plant Pathology*, 16:162-166.
 EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (2004) EPPO Standards, Diagnostic protocols for regulated pests, PM 7/27 *Puccinia horiana*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34:209-211.
 Hennings, P. (1901) Einige neue japanische Uredineen [Some new Japanese rusts]. *Hedwigia*, 40:25-26.
 Hiratsuka, N. (1957) Three species of chrysanthemum rust in Japan and its neighboring districts. *Sydowia*, 2:34-44.
 Korean Crop Protection Association (2013) 2012 Agrochemicals Use Guide Book.
 Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (2012) 2011 Current Status of Korean Flower Cultivation Industry, pp. 34-35.
 Pedley, K. F. (2009) PCR-based assays for the detection of *Puccinia horiana* on chrysanthemums. *Plant Disease*, 93:1252-1258.
 Priest, M. J. (1995) Chrysanthemum white rust in New South Wales. *Australasian Plant Pathology*, 24:65-69.
 Whipps, J. M. (1993) A review of white rust (*Puccinia horiana* Henn.) disease on chrysanthemum and the potential for its biological control with *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas. *Annals of Applied Biology*, 122:173-187.
 Yoshida, Y., Y. Aoyama, M. Noshiro and O. Gotoh (2000) Sterol 14-Demethylase P450 (CYP51) Provides a Breakthrough for the Discussion on the Evolution of Cytochrome P450 Gene Superfamily. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 273(3): 799-804

국화흰녹병균 *Puccinia horiana* 유전체 분석과 약물 표적으로서의 sterol 14-demethylase

김정구* · 박상근¹ · 박하승² · 권수진 · 김승환 · 이동준 · 손성한 · 이병무 · 배신철 · 안일평 · 김창훈³ · 백정훈³

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생명자원부, ¹국립원예특작과학원 원예작물부, ²충청남도 농업기술원 예산국화시험장, ³주식회사 마크로젠

요약 국화는 한국을 비롯한 여러나라에서 중요한 화훼작물이며 국화흰녹병은 절대기생성 진균인 *Puccinia horiana*에 의하여 유발되는 병으로 국화에 가장 심한 피해를 초래하는 병해 중의 하나이다. 이 병의 방제는 주로 약제 방제에 의존하고 있는데 국내에서는 26개 농약품목이 등록되어 있으며 그 중 10개 품목의 주성분은 트리아졸계 화합물이다. 트리아졸 화합물에 대한 약물표적의 유전자 존재를 확인하고 그 정보를 얻기 위하여 국화흰녹병균 유전체 염기서열 분석의 중간결과로서 병원균의 세포막 구성의 중요성분인 에르고스테롤 생합성에 관여하며 트리아졸계 화합물의 표적이 되는 sterol 14-demethylase 유전자의 염기서열을 확인하고 그 아미노산 서열과 삼차구조를 예측하였다. 이 단백질은 *Puccinia*속내에서는 84% 이상의 상동성을 보였으나 다른 속에서는 68% 이하의 상동성을 보였다.

색인어 국화흰녹병균, 유전체, 약물표적, sterol 14-demethylase