

인삼에서 Farnesyl Diphosphate Synthase 과발현이 진세노사이드 생합성에 미치는 영향

박홍우* · 김옥태*[†] · 현동윤* · 김장욱* · 김영창* · 방경환* · 차선우* · 최재율**

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, 충남대학교 농업생명과학대학

Overexpression of Farnesyl Diphosphate Synthase by Introducing *CaFPS* Gene in *Panax ginseng* C. A. Mey.

Hong Woo Park*, Ok Tae Kim*[†], Dong Yun Hyun*, Yong Bum Kim*, Jang Uk Kim*,
Young Chang Kim*, Kyong Hwan Bang*, Seon Woo Cha* and Jae Eul Choi**

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

ABSTRACT : FPS (farnesyl diphosphate synthase) plays an essential role in organ development in plants. However, FPS has not previously been identified as a key regulatory enzyme in triterpene biosynthesis. In order to investigate the effect of FPS on ginsenosides biosynthesis, we over-expressed FPS of *Centella asiatica* (*CaFPS*) in *Panax ginseng* adventitious roots. PCR analysis showed the integrations of the *CaFPS* and hygromycin phosphotransferase genes and we ultimately selected three lines. The result of Southern blot analysis demonstrated the introduction of the *CaFPS* gene into genome of ginseng. In addition, the results of RT-PCR analysis revealed that *CaFPS* gene overexpression induced an accumulation of its transcription in the ginseng adventitious roots. To determine whether or not the overexpression of the *CaFPS* gene contributes to the downstream gene expression associated with triterpene biosynthesis, the level of mRNAs was analyzed by real-time PCR. The result showed that no differences were detected in any expression of all genes. To determine quantitatively the content of ginsenosides in transgenic ginseng adventitious roots, HPLC analysis was conducted. The content of total 7 ginsenosides was increased to 1.8, 1.4, and 1.7 times than that of the controls, respectively. This indicated that the overexpression of *CaFPS* in ginseng adventitious roots causes an increase in ginsenoside content, although down stream genes of *FPS* gene were suppressed by *CaFPS* overexpression.

Key Words : *Panax ginseng*, *CaFPS* (*Centella asiatica* Farnesyl Diphosphate Synthase), Ginsenoside

서 언

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Mey.)은 두릅나무과 (Araliaceae), 인삼속 (*Panax*)에 속하는 다년생의 쌍떡잎 식물로써 한반도, 중국 (만주지역), 러시아 (극동의 연해주지역) 등에서 자생하고 있다. *Panax*의 어원은 그리스의 *pan* (모든)과 *axos* (치료)의 만병 통치약이란 뜻으로서 1843년 러시아의 식물학자 Carl Anton Meyer에 의해 명명되었다. (Hu, 1976; Gillis, 1997). *Panax* 속 (屬) 중에서 의학적으로 가치를 인정받아 한약재로 이용되고 있는 종은 *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius*의 3종으로 주로 극동아시아, 북아메리카에서 재배되고 있다 (Wen and Zimmer, 1996; Chung *et al.*, 1998; Kwon and Choi, 2006; Choi, 2008). 인삼은 강장제, 항암, 백신, 항 스트레스, 그리고 노

화방지 (Proctor and Bailey, 1987; See *et al.*, 1997; Scaglione *et al.*, 1996; Takahashi, 1992) 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 인삼은 우수체형 선발, 다수성 품종 육성 등의 육종연구와 인삼의 대표적인 약리성분으로 알려진 사포닌에 관한 연구가 주로 진행 되었으며, 최근에는 생명공학 기술을 이용한 사포닌의 생합성 조절기전 구명 등의 연구가 매우 활발히 추진되고 있다 (Ahn *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009).

식물에서 terpenoids의 생성에는 acetate-mevalonate (Ac-MVA) pathway와 non-mevalonate (non-MVA)의 2개의 pathway가 있다 (Lichtenthaler 1999; Rohmer 1999). Triterpenoid 사포닌과 sterols 같은 물질은 세포질 내에서 mevalonic acid로부터 isoprenoid pathway로 합성되는데 triterpenoid 사포닌은 고등식물에서 isoprenoid의 생성에 의해 나타나는 2차 대사산

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5569 (E-mail) kimot@korea.kr

Received 2012 October 17 / 1st Revised 2012 November 2 / 2nd Revised 2013 December 17 / Accepted 2012 January 24

물이다. 사포닌은 식물에서 생명작용과 관련하여 광범위하게 존재하며 다양한 구조를 갖는데, 이들 중에서도 triterpenoid 화합물은 의약적으로 중요한 가치가 있다 (Vogler *et al.*, 1999; Zwenger and Basu, 2008, Doh *et al.*, 2010; Yamunadevi *et al.*, 2011, Nam *et al.*, 2011). 식물에서의 화합물들은 기초 대사경로 상에서 형성된 물질들로부터 유도되는데, 생장을 위한 기본요소 (building blocks)로 polysaccharides, sugars, proteins, fats 등이 있다. 또는 식물에 매우 낮은 농도로 존재하는 2차 생성물에는 alkaloids, terpenoids, phenolics, steroids, flavonoid 등이 있다. 근래에 식물로부터 대략 100,000여 종의 다른 화합물들이 유도되는 것으로 추정되는데 해마다 새로운 화합물들이 추가 되고 있다 (Verpoorte *et al.*, 1998).

인삼 뿌리에는 triterpenoids 사포닌인 진세노사이드가 다양한 형태로 존재하고 있으며, 총 사포닌 함량은 중심부에 비해 표층에서 높다고 보고 하였다 (Kim *et al.*, 1987). 생합성 경로에서 인삼의 triterpene 효소를 coding하는 유전자를 밝히는 것은 생물공학 분야에서 주된 관심사 중의 하나이고 또한 대사공학기법에 의한 phytosterol과 triterpene 생성을 증가시키기 위한 연구는 천연물 분야에 있어서 매우 중요하게 여겨지고 있다. Ginsenosides의 생합성과 관련 기작과 연관된 유전자들을 이해하기 위해서는 식물체를 유전적 변경하여 ginsenosides 생성을 연구해야 한다고 하였다 (Han., 2010).

Farnesyl diphosphate synthase (FPS)는 식물 체내에서 생합성 되는 2차대사 물질인 sesquiterpenoids, phytoalexins, triterpenoids 등의 합성을 조절하는 효소로 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2000; Gaffe *et al.*, 2000; Masferrer *et al.*, 2002). 애기장대 식물에서 FPS의 과발현은 cytokinin의 합성에 영향을 줌으로써 지상부 표현형의 변화가 있었다 (Masferrer *et al.*, 2002; Manzano *et al.*, 2004). 또한 형질전환 된 속에서 chimeric FPS 유전자의 과발현으로 artemisin이 증가하였는데, sesquiterpene 화합물 생성에 영향을 미치는 것으로 보고하였으나 triterpene saponins에서 FPS의 조절역할에 대해서는 아직까지 명확하게 구명되지 않았다 (Chen *et al.*, 2000).

따라서 본 연구는 병풀의 *Centella asiatica* farnesyl diphosphate (CaFPS) 유전자를 인삼에 도입하여 인삼 부정근에서 FPS 유전자의 발현기작과 사포닌의 변화를 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 식물재료 및 배양조건

실험에 사용된 종자는 육종포에서 채취한 4년근 재래종 종자를 개갑처리 및 휴면타파 후 사용하였으며, 70% EtOH에 30초, 2% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 멸균한 후 멸균수로 3회 세척하였다. 표면 살균된 종자에서 접합배를 적

출하여 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) 배지에 3% sucrose, 0.27% gerlrite, 5 mg/L Gibberellic Acid (GA₃)를 첨가하여 상기의 배를 치상하였다. 배양 5주 후에 무균성의 발아체 뿌리 (10 mm) 절편 조각을 이용하였다. 발아 후 뿌리절편은 1/2 MS 배지에 3% sucrose, 0.27% gerlrite, 3 mg/L Indole-3-Butyric Acid (IBA)에서 10주간 증식배양 하였다.

2. CaFPS 유전자 발현 벡터의 구성 및 박테리아 공동배양

부정근의 형질전환을 위한 *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) strain GV1301은 hygromycin phosphotransferase (HPT) gene을 갖고 CaMV 35S promoter와 nopaline 합성 terminator가 있는 binary vector pCAMBIA 1300에 *Centella asiatica* farnesyl diphosphate synthase (CaFPS) 유전자를 도입하여 형질전환 하였다. 박테리아의 현탁배양은 gyratory shaker (220 rpm, 28°C, 24h)를 이용하여 배양하였는데, hygromycin 50 mg/L을 첨가한 yeast broth (YEB) medium (5 g/L yeast extract, 5 g/L bacto-petone, 5 g/L sucrose, pH 7.2)가 사용되었다.

*Agrobacterium*의 현탁배양은 gyratory shaker (220 rpm)에서 37°C 조건으로 overnight하여 OD₆₀₀ 값이 1.0~1.5 될 때까지 배양하였으며, 배양된 *Agrobacterium tumefaciens*는 falcon tube에 넣어 15분 동안 3,000 rpm에서 분리하였다. 상등액은 버리고 pellet은 MS 액체배지에 다시 배양하였다. 10 mm의 부정근 절편은 5분간 bacterial 현탁배지에 침지하였다. 식물체 절편은 멸균된 filler paper로 박테리아 집중잔액을 충분히 제거한 후 공동배양을 위해 1/2 MS 고체배지 (3 mg/L IBA, 400 mg/L, cefotaxime, pH 7.2)에서 배양하였다. Petri-dish plate는 parafilm을 사용하여 wrapping하였고 3주 동안 암조건 (25°C)에서 배양하였다. Negative 선발마커인 hygromycin phospho transferase gene (HPT)의 발현을 이용하여 형질전환 부정근의 선발을 위해 1/2 MS 고체배지 (3 mg/L IBA, 300 mg/L cefotaxime, 50 mg/L, pH 5.8)의 조건에서 3개월간 3주 주기로 계대배양하고 그 후 hygromycin 첨가배지에서 선발된 개체들은 28일을 주기로 부정근 절편체를 10~15 mm 크기로 잘라 계대배양하였다. 6개월 후 분석을 위한 형질전환체를 선발하여 증식하였다. 사용된 모든 선발배지는 멸균전에 pH 5.8로 조정하고 배지응고제인 gelrite (Cat. No. Sigma Aldrich, CP Kelco US: G1910)는 0.34% 농도로 사용하였으며 멸균시간은 120°C에 20분간 멸균하였다. 선발된 부정근은 transgenic adventitious root (TG)로 명명하여 선발된 순서에 따라 각 형질전환체에 번호를 부여하였다.

3. Southern blot 분석

Southern hybridization을 위한 genomic DNA는 DNeasy plant Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 형질전환 개체로부터 분리하였다. DNA는 제한효소 *Hind* III 처리후 0.8% agarose

gel에서 전기영동 하였고 capillary blotting (Sambrook *et al.*, 1989)에 의해 positively-charged nylon membrane으로 옮겼다. Southern blot 분석을 위한 full-length *HPT*의 cDNA는 non-radioactive AlkPhos direct system (Amersham, Buckinghamshire, UK)과 함께 표지하였다. Hybridization은 55°C에서 12시간 동안 수행하여 깨끗이 세척하였다. 표지는 CDP-Star detection kit (Cat. No. Amersham Buckinghamshire, UK: RPN3680)로 제 조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

4. *HPT*와 *CaFPS* 유전자의 Polymerase chain reaction (PCR)

Hygromycin 첨가배지상에서 선발된 부정근 개체의 형질전환 여부를 확인하기 위해 부정근으로부터 DNA를 분리하였는데, DNA 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. Qiagen, USA: 69106)를 이용하였다. *HPT* 유전자의 증폭을 위해 primer-F (5'-TGCGCCCAAGCTGCATCAT-3')와 primer-R (5'-TGAAGTACCGCGACGTCTGT-3')를 이용하였고, target gene *CaFPS*를 위한 primer는 forward primer (5'-AAAGAGCTCATGAGC-GATCTGAA-3')와 reverse primer (5'-ATTCTCGAGCTTTTGCCCTCTT-GTA-3')를 적용하였다. DNA Thermal cycler (Biometra DE/T Professional 96 gradient)에서 30 cycle로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 1분간 denaturation, 58°C에서 1분간 annealing, 72°C 1분간 extension 하였으며 최종적으로 72°C에서 10분 동안 extension 하였다. cDNAs는 선발마커 삽입 개체들 중 *CaFPS* gene의 존재가 확인된 4개의 부정근으로부터 total RNA를 추출하여 합성하였다. 2 µg의 RNA는 AMV enzyme (Promega, Madison, WI) 30 units로 역전사 cDNA를 합성하였고, 역전사 반응물과 주형 RNA는 1시간 동안 42°C 조건에서 배양하였다. mRNA로 전사된 단일사슬의 cDNA는 gene specific primers로 PCR 증폭을 실시하였다. 목표 유전자 *Centella asiatica* farnesyl diphosphate synthase (*CaFPS*) triterpen의 발현에 따른 인삼의 squalene synthase (*PgSS*), squalene epoxidase (*PgSE*), dammarenediol synthase (*DDS*), β-amyryn synthase (*PNX*), cycloartenol synthase (*PNY*)의 발현을 확인하였다. 발현 유전자의 표준화를 위해 인삼으로부터 actin primer를 디자인하여 적용하였다. 또한 *CaFPS*의 downstream 유전자들을 정량하기 위하여 Real-time PCR (Chromo4™ Detector, Bio-Rad)을 수행하였다. 반응액은 25 µl였고, Real-time PCR 조건은 94°C에서 10분간 pre-denaturation 후, 94°C에서 30초, 58°C 1분, 72°C 1분으로 35 cycle을 실시하였다. CT값은 Threshold cycle (CT) 수로 PCR 형광 (SYBR green I, Bio-rad, USA)방출되는 signal을 MJ opticon monitor 3 software (Bio-rad, USA)로 분석하였다. 유전자들의 발현은 대조구와 형질전환체의 CT값을 바탕으로 산출하고 최대값을 1로 하여 상대정량하였다 (Livak *et al.*, 2001).

5. 시포닌함량 분석

Ginsenoside 표준품 7종은 SH급 (Chroma Dex Inc., USA)으로 Rg₁ (CAS No: 22427-39-0), Re (CAS No: 52286-59-6), Rf (CAS No: 52286-58-5), Rb₁ (CAS No: 41753-43-9), Rc (CAS No: 11021-14-0), Rb₂ (CAS No: 11021-13-9), Rd (CAS No: 52705-93-8)을 이용하였고, 분석용 컬럼은 Capcell-pak C18 (3.0 mm ID×100 mm × 3 µm, Shiseido, Japan)을 사용하였다.

실험에 사용된 샘플은 액체질소에서 급냉한 시료는 초저온 냉장고에 보관하였고, ginsenosides 분석전에 Freeze dryer (EYELA, JP/FDU-2206)에서 온도 -80°C, 시간 72 h로 동결건조하여 분쇄 후 시료로 사용하였다. 0.1 g씩 칭량한 시료는 Ultrasonic bath (Powersonic 410, 화신테크, 한국)에서 1시간씩 동안 초음파로 2회 추출한 후, 1.75 ml로 volume up하였고 0.45 µm PVDF membrane syringe filter (Whatman, USA)로 filtering하여, 진세노사이드 패턴분석을 위해 Agilent HPLC 1100 series로 분석 하였다. HPLC 조건은 injection volume 20 µl, detector DAD 203 nm, run time 105분으로 분석하였다 (Yu *et al.*, 2000). 진세노사이드는 다음과 같이 [Calculated result (ng/µl) × Final volume (ml)] / Sample weight (g) = Result (ppm) 값을 구하고 Result (ppm) × 10⁻⁶(ppm) × 100로 함량(%)을 계산하였다. 모든 샘플은 3반복 처리하여 28일간 액체배양 후 실험을 위해 사용되었다.

결과 및 고찰

1. 유전자의 도입확인

형질전환의 효율은 *Agrobacterium*의 종류, 접종기간, 공동배양 시간, 초기 선발기간, 배지에서 항생제농도와 반응물질, 식물재료와 유전형, 벡터의 구성에 따라 영향을 받는다 (Wu *et al.*, 2006).

형질전환된 부정근들 중 감수성을 보이는 개체들은 hygromycin 포함 배지에서 지속적인 분화를 못하였다 (Lu *et al.*, 2007). 선발 배지상에서 뿌리가 갈변, 기형, 생장정지, 도태 등을 보였고 저항성을 나타내는 개체들은 지속적으로 계대 배양 되었으며 도입한 유전자의 삽입 여부를 판별하기 위해 positive control과 negative control을 대조구로 하여 비교하였다. *HPT*와 *CaFPS* 유전자를 증폭할 수 있는 primer set으로 PCR 분석 후 형질전환체를 선발하였다. 그 결과 선발마커와 목표유전자가 도입되지 않은 개체에서는 증폭산물을 얻지 못하였으나, 부정근 내에 선발마커와 목표유전자가 도입된 형질전환체에서 증폭산물을 확인하였다. *HPT*는 700 bp의 크기였고 *CaFPS*의 크기는 1000 bp였다 (Fig. 1A).

따라서 형질전환체의 DNA 증폭산물로 부정근 내에 외래 유전자 *CaFPS*의 삽입 확인을 위하여 선발되었다. Hygromycin 저항성을 갖고 생장이 우수한 형질전환체들은 분석을 위해 증식 배양하였다.

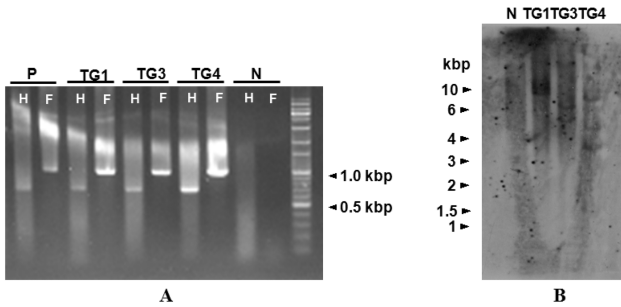


Fig. 1. Detection of selection maker and target gene in transgenic *P. ginseng* adventitious root lines by PCR analysis on genomic DNA. A; P, plasmid DNA isolated from *A. tumefaciens* (pCAMBIA 1300-CaFPS), TG, (TG1, TG3, TG4); N, negative control (wild type ginseng); H, *HPT* selection maker; F, *CaFPS* gene. B; Southern blot analysis of *HPT* gene. *P. ginseng* genomic was digested with the restriction endo nuclease enzyme (*Hind* III), separated by electrophoresis, and hybridized with the alkaline phosphatase-labeled PCR product. N, negative control (wild type ginseng); TG, transgenic adventitious root.

2. Southern blot 분석

형질전환체들의 독립된 개체여부의 확인을 위해 *HPT*의 full-length cDNA를 사용하여 Southern blotting을 수행하였다. *HPT* gene probe로 Southern blot을 실시한 결과 선발된 형질전환체들은 서로 다른 위치에서 유전자의 삽입이 확인되어, 독립된 개체임이 증명되었다. Fig. 1B에서와 같이 TG1, TG3, TG4 각각 1, 2, 3 copy가 탐지되었으나, 대조구에서는 탐지되지 않았다. 따라서 외래 유전자인 *HPT* 유전자를 확인할 수 있었다. 실험을 위해 선발된 TG1, TG3, TG4 형질전환체들은 고체배지 배양과 액체배지 배양에서 뿌리의 성장형태에 있어서 차이를 보이기도 하였다. *FPS* 유전자는 *Arabidopsis thaliana*에서 적어도 2개 이상의 유전자 (*FPS1* and *FPS2*)가 확인되었고 유사한 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 초기에 mRNA *FPS1*은 뿌리와 꽃 그리고 *FPS2*는 꽃에서 전사되었다는 결과를 보고하였다 (Cunillera *et al.*, 1997, 2000). 형질전환체들은 *FPS* 유전자가 서로 다른 위치에 삽입된 독립된 개체로 확인되었다.

3. CaFPS 유전자 발현분석

DNA수준에서 PCR을 실시하여 선발된 형질전환체 중에서 *CaFPS* 유전자의 정상적인 발현 확인을 위해 total RNA의 추출로 cDNA를 합성하여 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 2와 같이 *CaFPS*의 유전자 증폭산물을 얻을 수 있었으며, 이 유전자가 형질전환개체에 정상적으로 삽입되었음이 확인되었다. 형질전환체 중에서 genomic DNA 수준에서 목표유전자가 삽입된 것을 확인하였고 cDNA를 합성하여 RT-PCR로 선발표지 유전자와 목표유전자를 확인한 결과 *CaFPS* 유전자가 발현되지 않는 개체들이 있었다. 이러한 결과는 삽입된 유전자의 잠재, 삽입 위치의 차이 및 escape된 것으로 추측되었다.

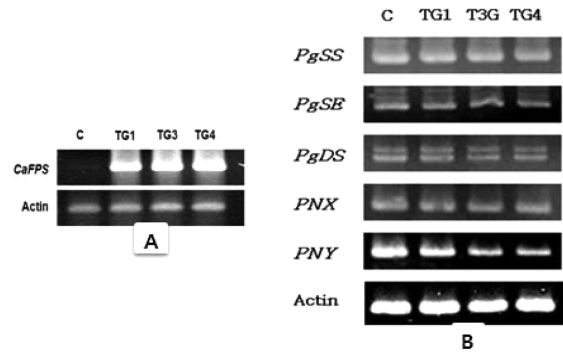


Fig. 2. Expression of mRNA by RT-PCR in *P. ginseng* adventitious root. A; *CaFPS*, *Centella asiatica* farnesyl diphosphate. B; *PgSS*, squalene synthase; *PgSE*, squalene epoxidase; *PgDS*, dammarenediol synthase; *PNx*, cycloartenol synthase; *PNY*, β -amyrin synthase. The actin gene was used to verify standard RNA loading. C, control; TG, transgenic adventitious root.

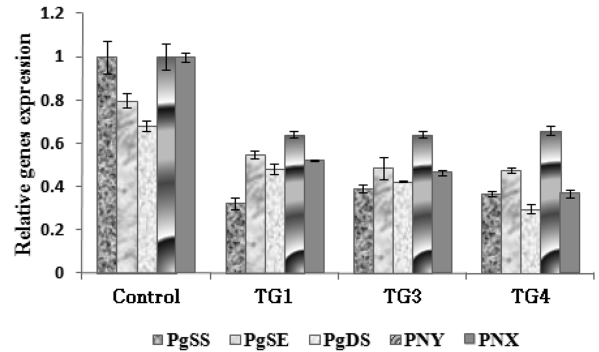


Fig. 3. Expression of *FPS* down stream genes in *P. ginseng* transgenic adventitious roots. *PgSS*, squalene synthase; *PgSE*, squalene epoxidase; *PgDS*, dammarenediol synthase; *PNx*, cycloartenol synthase; *PNY*, β -amyrin synthase. C, control; TG, transgenic adventitious root; as assessed by real-time RT-PCR during after four weeks cultivation. *Error bars represent \pm SE from three independent samples (n=3).

4. RT-PCR과 real-time RT-PCR

형질전환체들은 4주간 액체배지 조건에서 배양 후 RNA 수준에서 RT-PCR을 수행하여 분석한 결과 downstream에 위치한 유전자 *PgSS*, *PgSE*, *PgDS*, *PNx*의 발현량에서 가시적으로 차이가 없었다 (Fig. 2B). 그러나 *PNY*의 발현은 대조구에 비해 형질전환체는 낮은 발현을 보였다. *PNY*는 β -amyrin을 합성하는 유전자로 이는 진세노사이드 Ro의 생성과 연관되어 있어 5환성 triterpene saponin 생합성 메커니즘에는 변화가 있을 것으로 추측된다. 따라서 RT-PCR 분석에 사용된 triterpenoids의 생합성에 관여하는 유전자들의 증폭산물은 전기영동 결과만으로는 *CaFPS*의 발현에 따른 downstream 유전자들의 변화를 구분하기 어려웠다 (Fig. 1).

대조구와 형질전환체 downstream 유전자의 발현량을 정량하기 위하여 real-time RT-PCR 분석을 실시하였다. Fig. 3에

Table 1. Ginsenosids contents (%) by HPLC analysis.

Ginsenosides	C	TG1	TG3	TG4
Rg1	0.12±0.031a	0.18±0.056a	0.14±0.003a	0.16±0.012**a*
Re	0.10±0.041b	0.24±0.066a	0.18±0.004a	0.21±0.016a
Rf	0.03±0.001a	0.04±0.007a	0.03±0.001a	0.03±0.008a
Rb1	0.02±0.000c	0.04±0.014b	0.04±0.003b	0.06±0.002a
Rc	0.03±0.001a	0.04±0.010a	0.03±0.002a	0.03±0.005a
Rb2	0.01±0.002c	0.02±0.005b	0.02±0.002b	0.03±0.004a
Rd	0.01±0.002b	0.02±0.006a	0.03±0.007a	0.02±0.002a
Total	0.32±0.065b	0.57±0.162a	0.46±0.013ab	0.55±0.027a

*Mean values followed by the same letter not significant 5% level. TG; adventitious roots of transgenic *P. ginseng*. C; control.

**Values are means ±SD.

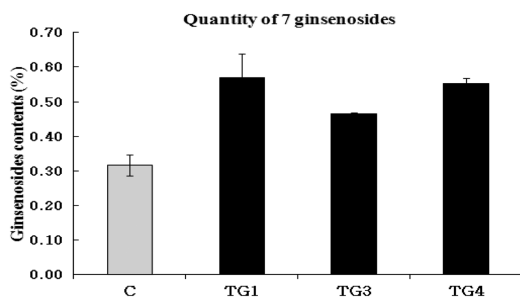


Fig. 4. Contents of 7 ginsenosides by HPLC analysis. C, control; TG, transgenic adventitious root. *Error bars represent ±SE from three independent samples (n=3).

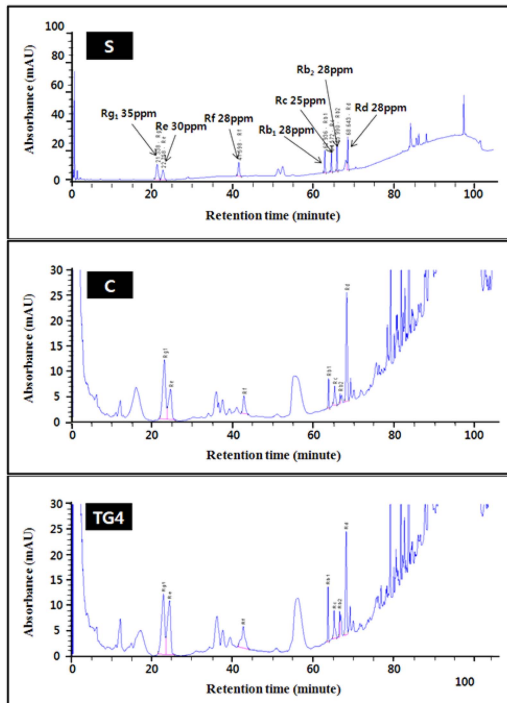


Fig. 5. Chromatogram of the extract from *P. ginseng* overexpressed *CaFPS*. S; standard chromatogram. C (control) pattern is normal peak in *P. ginseng* wild-type; TG4 (transgenic adventitious root) is specific peak in *P. ginseng* transgenic line.

서와 같이 발현량의 상대정량결과 TG1, TG3, TG4가 동일한 패턴의 유전자 발현을 보였고, 발현량에 있어서 대조구와 비교할 때 낮은 발현을 보였다. 대조구비해 형질전환체의 downstream 유전자 발현량이 *PgSS* 36%, *PgSE* 48%, *PgDS* 40%, *PNY* 65% 그리고 *PNX* 45% 수준으로 발현되었다. 이러한 결과들은 Kim 등. (2010)의 결과와는 차이를 보인다. 병풀에 *PgFPS* 유전자가 삽입된 형질전환체들의 RT-PCR 수행 결과 triterpen 생합성과 관련된 *CaDDS*(*C. asiatica* dammarenediol synthase)와 *CaCYS*(*C. asiatica* cycloartenol synthase)의 mRNA 수준에서 형질전환체들 (hairy root line)은 과발현되었으나 *CaSQS*(*C. asiatica* squalene synthase)는 차이가 없었다. 그러나 *CaSQS*의 낮은 발현에도 squalene의 함량은 증가한 것으로 보고하였다 (Kim *et al.*, 2010). 또한 인삼의 부정근에서 squalene synthase 과발현에 따른 squalene의 함량은 대조구보다 낮았다고 보고하였다 (Lee *et al.*, 2004). 이러한 결과에 따라 형질전환체에서 triterpen saponin 생합성 관련 유전자의 downregulation이 추측되었다.

5. HPLC에 의한 사포닌 분석

진세노사이드 분석결과 대조구는 Rg₁과 Re 함량에서 wild-type과 유사한 패턴을 보였고, *FPS* 유전자가 삽입된 형질전환체들은 특이한 패턴을 보였다 (Fig. 5). 배양된 형질전환체 대조구와 TG1, TG3 및 TG4의 사포닌 함량을 HPLC로 분석한 결과, 진세노사이드 Rg₁, Rf, Rc의 함량에는 유의성이 없었고 진세노사이드 Re, Rb₁, Rb₂, Rd 함량은 유의적인 차이를 보였다. Table 1에서 Re는 높은 수준으로 각각 2.6, 1.8, 1.7배 증가하였으며, Rb₁의 함량은 각각 1.9, 1.9, 2.8배, Rb₂는 2.7, 3.4, 4.6배로 높은 증가를 나타냈다. 한편 Rd는 각각 1.6, 2.3, 1.8배 증가하였다. 따라서 분석된 7종의 진세노사이드의 총함량은 형질전환체에서 높았다 (Fig. 4, Table 1).

Real-time PCR 분석결과 *CaFPS* 유전자가 발현된 부정근에서 *FPS* downstream의 유전자는 전반적으로 down-regulation 되는 결과를 보였지만 진세노사이드 Re, Rb₁, Rb₂ 그리고 Rd의 함량이 증가된 결과 값을 얻었다 (Table 1). Fig. 5에서

보여지는 바와 같이 7종의 total ginsenoside 함량이 대조구에 비하여 형질전환체에서 TG1, TG3, TG4가 각각 1.8, 1.4, 1.7배 증가하였다.

인삼의 triterpene 생합성에 연관된 squalene 합성과 squalene epoxide 그리고 β -amyrin synthase 유전자의 전사는 Methyl Jasmonate의 처리에 의해 증가된다는 결과들이 보고되었다 (Suzuki *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). 하지만 인삼에서는 triterpene 사포닌 생성을 위한 FPS의 기능에 관한 연구결과는 보고된바 없다. NCBI Blastp Program을 사용하여 분석해본 결과 FPS를 coding하는 amino sequence들의 유사도에서 *Panax ginseng* (고려인삼)과 *Centella asiatica* (병풀)은 *Panax* 속 다음으로 가장 유사한 95%의 유사도를 보였다. 인삼의 FPS 유전자와 가장 유사도가 높은 병풀의 유전자가 도입된 부정근에서 triterpene saponin 생성과 연관되는 유전자 및 7종의 사포닌을 분석하였다. 그 결과 대조 부정근에 비해 형질전환체들은 FPS 유전자가 overexpression 되었고, downstream 유전자들은 down-regulation 되었다. 이와는 반대로 사포닌 함량은 형질전환체 모두 대조구에 비하여 증가하였다. *CaFPS* 유전자가 발현되었고 사포닌의 함량이 증가 되었음에도 불구하고 downstream 유전자가 과발현되지 않은 것은 α - β -amyrin 합성 (Meesapyodsuk *et al.*, 2007), cytochrome 450-independent carboxylase/hydroxylase (Schuler and Werck-Reichhart, 2003; Ehltling *et al.*, 2008), 그리고 glucosyltransferase (Lairson *et al.*, 2008)와 관계에 의해 downstream 유전자들의 발현이 억압되었을 것으로 생각되어진다. 따라서 FPS의 과잉발현이 이들 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서는 아직까지 보고되지 않은 유전자들의 클로닝이 이루어져야 할 것으로 사료된다. 실험을 통해 밝혀진 결과들은 triterpene 생합성에서 FPS의 조절작용을 구명하는데 기여할 것으로 생각된다.

LITERATURE CITED

- Ahn IO, Lee SS, Lee JH, Lee MJ and Jo BG. (2008). Comparison of ginsenoside contents and pattern similarity between root parts. Korean Journal of Breeding Science. 32:15-18.
- Chen D, Ye H and Li G. (2000). Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Science. 155:179-185.
- Choi KT. (2008). Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C. A. Meyer. Acta Pharmacologica Sinica. 29:1109-1118.
- Chen DT, Ye HC and Li GF. (2000). Expression of a chimeric farnesyl diphosphate synthase gene in *Artemisia annua* L. transgenic plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Plant Science. 155:179-185.
- Chung YY, Lee MG, Chung CM and Jo JS. (1998). Comparison of plant growth and morphological characteristics among the Korean ginseng, the American ginseng and the bamboo ginseng. Journal of Ginseng Research. 22:147-153.
- Cunillera N, Boronat A and Ferrer A. (1997). The *Arabidopsis thaliana* FPS1 gene generates a novel mRNA that encodes a mitochondrial farnesyl-diphosphate synthase isoform. The Journal of Biological Chemistry. 272:15381-15388.
- Cunillera N, Boronat A and Ferrer A. (2000). Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase genes *FPS1* and *FPS2*. Plant Molecular Biology. 44:747-758.
- Doh ES, Chang JP, Lee KH and Seong NS. (2010). Ginsenoside change and antioxidation activity of fermented ginseng. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 18:255-265.
- Ehltling J, Sauveplane V, Olry A, Ginglinger JF, Provart NJ and Reichhart DW. (2008). An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology. 8:1-19.
- Gaffe J, Causse M, Vidal A, Stamitti-Bert L, Carde JP and Gallusci P. (2000). LEFPS1, a tomato farnesyl pyrophosphate gene highly expressed during early fruit development. Plant Physiology. 123:137-1362.
- Gillis CN. (1997). *Panax ginseng* pharmacology: Anitricoxidelink?. Biochemical Pharmacology. 54:1-8.
- Han JY, In JG, Kwon YS and Choi YE. (2010). Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. Phytochemistry. 71:36-46.
- Hayashi H, Huang PY and Inoue K. (2003). Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra*. Plant and Cell Physiology. 44:404-411.
- Hu SY. (1976). The genus *Panax*(Ginseng) in Chinese medicine. Economic Botany. 30:11-28.
- Kim MW, Ko SR, Choi KJ and Kim SC. (1987). Distribution of saponin various sections of *Panax ginseng* root and change so fits contents according to root age. Journal of Ginseng Research. 11:10-16.
- Kim OT, Kim MY, Huh SM, Bai DG, Ahn JC and Hwang B. (2005). Cloning of a cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase associated with asiaticoside biosynthesis from *Centella asiatica* (L.) urban. Plant Cell Reports. 24:304-311.
- Kim OT, Kim SH, Ohyama K, Muranaka T, Choi YE, Lee HY, Kim MY and Hwang B. (2010). Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase. Plant Cell Reports. 29:403-411.
- Kim YS, Han JY, Lim SL and Choi YE. (2009). Ginseng metabolic engineering: Regulation of genes related to ginsenoside biosynthesis. Journal of Medicinal Plants Research. 3:1270-1276.
- Kwon YD and Choi HH. (2006). Analysis of international competitiveness of Chinese ginseng in comparison with Korean ginseng. Research Institute for Agricultural Sciences and Technology. Chungnam National University. 33:43-56.
- Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ and Withers SG. (2008). Glycosyl-transferases: Structures, functions, and mechanisms. Annual Review Biochemistry. 77:521-555.

- Lee MH, Jeong JH, Seo JW, Shin CG, Kim YS, In JG, Yang DC, Yi JS and Choi YE.** (2004). Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene. *Plant and Cell Physiology*. 45:976-984.
- Livak KJ and Schmittgen TD.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{CT} method. *Methods*. 25:402-408.
- Lichtenthaler HK.** (1999). The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Plant Molecular Biology*. 50:47-65.
- Lu G, Zou Q, Guo D, Zhuang X, Yu X, Xian X and Cao J.** (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*. *Plant Cell Reports*. 26:1585-1593.
- Manzano D, Fernández-Busquets X, Schaller H, González V, Boronat A, Arró M and Ferrer A.** (2004). The metabolic imbalance under lying lesion for mationin *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase(isoform1s) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta*. 219:982-992.
- Masferrer A, Arró M, Manzano D, Schaller H, Fernández V, Boronat A, Arró M, Fernández B, Cunillera N, Boronat A and Ferrer A.** (2002). Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase(FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal*. 30:123-132.
- Mesapoudsuk D, Balsevich J, Reed DW and Covello PS.** (2007). Saponin biosynthesis in *Saponaria vaccaria*: cDNAs encoding β -amyrin synthase and a triterpene carboxylic acid glucosyltransferase. *Plant Physiology*. 143:959-969.
- Murashige T and Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Nam KY, Park JD and Choin JE.** (2011). Radioprotective potential of *Panax ginseng*: Current status and future perspectives. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:287-299.
- Proctor JTA and Bailey WG.** (1987). Ginseng: Industry, botany and culture. *Horticultural Reviews*. 9:187-236.
- Rohmer M.** (2003). Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution. *Pure and Applied Chemistry*. 75:375-387.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T.** (1989). Molecular cloning. A Laboratory Manual(2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York, USA. p.931-958.
- Scaglione F, Cattaneo G, Alessandria M and Cogo R.** (1996). Efficacy and safety of the standardized ginseng extract G 115 for potentiating vaccination against common cold and/or influenza syndrome. *Drugs under Experimental and Clinical Research*. 22:65-72.
- See DM, Broum N, Sah IL and Till JG.** (1997). In vitro effects of Echinacea and ginseng on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronicfatigue syndrome or acquired immunodeficiency efficiency syndrome patients. *Immunopharmacology*. 35:229-235.
- Schuler MA and Werck-Reichhart D.** (2003). Functional genomics of P450s. *Annual Review of Plant Biology*. 54:629-637.
- Suzuki H, Achnine L, Xu R, Matsuda SPT and Dixon RA.** (2002). A genomic approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*. 32:1033-1048.
- Takahashi M.** (1992). Anti-stress effect of ginseng on the inhibition of the development of morphine tolerance in stressed mice. *Japanese Journal of Pharmacology*. 59:399-404.
- Yu KW, Gao WY, Son SH and Paek KY.** (2000). Improvement of ginsenoside production bt jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng(*Panax ginseng* C. A. Meyer). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 36:424-428.
- Verpoorte R, Heijden VD, Hoopen HJ and Memelink J.** (1998). Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 4:3-20.
- Vogler BK, Pittler MH and Ernst E.** (1999). The efficacy of ginseng. A systematic review of randomized clinical trials. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 55:567-575.
- Wen J and Zimmer EA.** (1996). Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 6:167-177.
- Wu Y, Chen Y, Liang X and Wang X.** (2006). An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53:252-284.
- Yamunadevi M, Wesely EG and Johnson M.** (2011). Phytochemical studies on the terpenoids of medicinally important plant *Aerva lanata* L. using HPTLC. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 1:220-225.
- Zwenger S and Basu C.** (2008). Plant terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 3:1-7.