식물조직배양학회지 제28권 제5호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 28, No. 5, 255~261(2001)

포도 캠벨 품종으로부터 과육 특이발현 VVTL1-homolog 유전자의 분석

김인중* · 김석만
한국과학기술원 생물과학과

Gene Analysis of A Fruit-specific Thaumatin-like Protein, VVTL1-homolog, from Campbell Cultivar of Grape

KIM, In-Jung* · KIM, Seok-Mahn
Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701, Korea

ABSTRACT *Vitis vinifera* thaumatin-like protein (VVTL1) is a fruit-specific and ripening-related protein in grape. In order to isolate VVTL1-homolog gene and fruit-specific promoter from Campbell cultivar, we isolated a genomic clone containing VVTL1-homolog gene from grape genomic library through plaque hybridization. VVTL1-homolog gene has an intronless genomic structure, which the pattern is matched with those of other PR5 genes such as osmotin and osmotin-like protein genes. Transcription start site was determined by primer extension analysis. The promoter region of VVTL1-homolog gene contains a sequence or structure, especially the location and number of TCA box and ABRE (abscisic acid-responsive element), distinct from other reported plant PR5 genes, though with several known functional elements such as a TATA box and CAAT box. These results suggested that VVTL1-homolog gene may be regulated by a plant hormone, abscisic acid, and one or several stresses such osmotic pressure and pathogen infection. The isolation of fruit-specific promoter may be helpful to breed a genetically modified grape with valuable phenotype or materials in fruits.

Key words: Campbell, grape, promoter, Thaumatin-like

서 론

포도는 90년대 이후부터 과일소비량의 증대와 WTO 등장에 의한 벼재배농가의 과수재배 농가로의 전환에 의해 국내 재배면적이 매년 크게 확대되고 있는 작물이다. 그러나 국내의 경우 이에 대한 분자생물학적 연구와, 이를 이용한 유전자변형식물의 개발과 연구가 거의 이루어지지 않았다. 이에 본 연구에서는 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 캠벨 품종으로부터 과육성숙에 관련되는 유전자의 게놈 DNA를 분석하고, 유전자변형식물 개발에의 promoter 이용가능성을 검토하였다.

포도는 non-climacteric 형의 과실로서, 다른 과일과 마찬가지로 성숙과정 동안 mRNA와 단백질의 조성변화에 의한 크기의 변화, 클로로필의 분해, 당 함량의 증가, 색깔의 변화 등과 같은 많은 구조적인 변화와 생화학적인 변화를 겪는다 (Biale 1964). 포도에서 성숙과정 동안 당의 함량이 증가하면서 항곰팡이 (antifungal) 활성을 나타내는 것으로 알려진 여러 단백질들이 발달과정에 따라 축적된다고 알려졌다. 현재 이러한 단백질들은 thaumatin 유사 단백질 (TLP, thaumatin-like protein)과 chitinase, 지질전달 단백질 (LTP, lipid transfer protein) 등으로 밝혀지고 있다 (Tattersall et al. 1997; Salzman et al. 1998).

이 중 과육성숙과정에서 가장 많이 축적되는 단백질은 24 kDa의 TLP인 VVTL1이고, 이 유전자의 발현은 발달과정에 따라 조직 (과육)특이적으로, 성숙과정에 따라 증가한다고 Tattersall 등 (1997)이 보고하였다. 또한 포도에서 VVTL1은 같은 종이라도 품종이 달라 핵형 (genotype)이 다르면, 염기

*Corresponding author. Tel 042-869-2664 Fax 042-869-2610
E-mail ijkim@bioneer.kaist.ac.kr

서열과 아미노산 서열에도 차이가 나타난다고 보고하였다 (Tattersall et al. 1997; Salzman et al. 1998; Davies and Robinson 2000). 현재까지 VVTL1과 상동성을 보이는 포도 TLP 유전자는 Sultania (Loulakakis 1997)와 Shiraz (Davies and Robinson 2000), *Vitis riparia* (GenBank accession no AF178653), Muscat of Alexandria (Tattersall et al. 1997) 등의 품종에서 분리되었다. TLP는 PR (pathogenesis-related) 단백질 중의 PR5 계열에 속하는 것으로서, 삼투압 (osmotic pressure)에 대한 방어기작, 내한성, actin 결합능, 수용체 (receptor)의 세포외 부위 (extracellular domain), 막투과 단백질, β-1,3-glucan 결합능, endo-β-1,3-glucanase 효소활성 등을 가지고 있어 병원균에 대한 저항성을 식물체에 부여한다고 알려져 있으나 (Salzman et al. 1998; Trudel et al. 1998; Grenier et al. 1999; Ye et al. 1999; Barre et al. 2000), 아직까지 정확한 기작은 밝혀져 있지 않은 상태이다. RR5 계열에는 thaumatin, TLP, osmotin, osmotin 유사단백질, zeamatin, permatin 등의 서로간에 상동성을 나타내는 단백질들이 포함된다 (Stintzi et al. 1993).

지난 10여 년 동안에 TLP 유전자의 cDNA가 담배 (Cornelissen et al. 1986)에서 처음 분리된 후, 토마토 (Pressey 1997), 옥수수 (Malehorn et al. 1994), 밀 (Rebmann et al. 1991), 애기장대 (Capelli et al. 1997; Hu and Reddy 1997; Shih et al. 2001), 바나나 (Barre et al. 2000), 배 (Sassa and Hirano 1998), 체리 (Fils-Lycaon et al. 1996), 벼 (Reimmann and Dudler 1983) 등의 많은 식물종에서 분리되었고, 그들의 발현도 여러 스트레스와, 조직의 발달과정에 따른 변화 등이 조사되었다.

그러나 게놈 DNA의 구조는 지금까지 감자와 담배 등의 식물로부터 osmotin과 osmotin 유사단백질 (Nelson et al. 1992; Zhu et al. 1995)에서 이루어졌고, TLP의 게놈 DNA 구조에 대해서는 담배 (van Kan et al. 1989)에서만 알려졌었으나, 최근에 애기장대의 전체 게놈 염기서열이 보고되면서 TLP의 게놈 DNA 염기서열도 알게 되었다. 이를 통해 전사의 조절에 중요하게 작용하는 TCA box와 ABRE (abscisic acid-responsive element) 등이 보고되었다 (Goldsbrough et al. 1993). 그러나 과육의 성숙과정에 반응하여 축적되는 TLP에 대한 게놈 DNA 분석은 전혀 이루어지지 않았고, 발현조절에 관련되는 promoter 부위도 보고된 적이 없다. 또한 현재까지 보고된 포도의 TLP는 국내에서는 재배되지 않는 품종으로부터 분리된 것으로, 다른 유전자 구조를 가지고 있을 것으로 추정되는 국내 재배 품종에 대한 연구도 수행되어야 할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 가장 많이 재배되고 있는 품종의 하나인 캠벨 (*Vitis Vinifera* cv. Campbell early)로부터 VVTL1-homolog 유전자를 분리하여, 이의 염기서열 및 아미노산 서열을 VVTL1을 비롯한 다른 포도품종의 TLP와 비교하고, promoter 염기서열분석을 통해 발현조절에 대한 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

공시재료는 포도 캠벨 (*Vitis Vinifera* cv. Campbell early) 품종을 사용하였다. 본 실험에 사용한 식물 재료는 노지에서 재배한 포도의 과실과 잎의 조직을 채취하여 사용하였다.

게놈 DNA 분리 및 VVTL1-homolog probe의 제작

포도 잎으로부터의 DNA 분리는 Dellaporta 등 (1983)의 방법에 따라 수행하였다. VVTL1-homolog 유전자를 분리하기 위한 probe를 확보하기 위해 분리된 100 μg DNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다. 먼저 Tattersall 등 (1997)에 의해 보고된 VVTL1의 cDNA 염기서열로부터 각각 두 개의 sense primer (TL5P1, TL5P2)와 antisense primer (TL3P1, TL3P2)를 합성하였다. 각각의 염기서열은 다음과 같다. TL5P1, 5′ -ATGCAGCCACCTTCGACATC-3′ ; TL5P2, 5′ -CTGGACAATCACCGTCAACC-3′ ; TL3P1, 5′ -ACACGGGTTGTTGCATCCAC-3′ ; TL3P2, 5′ -AGG GTGGTGTTGAAGCGCAT-3′ . PCR 반응조건은 94℃에서 1분간, 57℃에서 1분간, 72℃에서 30초간으로 총 30회 증폭한 후, agarose 겔에 전기영동하여 GeneCleanII kit (Bio101, Inc.)로 DNA를 추출하였다. 이들 DNA를 pGEM-T 벡터 (Promega)에 삽입한 후, *E. coli* JM109에 형질전환시켰다. 염기서열을 분석하여, pGEM-T 벡터에 삽입된 PCR 산물이 VVTL1-homolog의 단편인지를 확인하였다. 확인된 DNA 중 TL5P1과 TL3P1의 primer를 사용하여 증폭된 산물을 [α-^{32}P]dCTP와 random primer labeling kit (Promega)을 사용하여 표지한 후, probe로 사용하였다.

게놈 DNA 유전자은행 작성과 유전자 탐색

In vivo excision이 가능하고, 삽입 DNA의 크기가 작아 조작이 쉬운 λ-ZapII 벡터를 사용하여 게놈 DNA 유전자은행을 제작하였다. 또한 subcloning 단계를 줄이기 위해, Southern blot 결과를 바탕으로 *Sac*I 분해산물의 band 크기가 VVTL1-homolog 유전자와 promoter 지역을 충분히 포함하고 있을 정도로 긴 것으로 추정되어, 분리된 게놈 DNA (10 μg)를 *Sac*I으로 절단한 후, λ-ZapII 벡터의 *Sac*I 부위에 연결하였다. 그런 다음, 이들 DNA를 GigapackIII gold cloning kits (Stratagene)에 packaging하였다. 이렇게 하여 만들어진 게놈 DNA 유전자은행과 probe를 이용하여 통상의 plaque lift method (Sambrook and Russell 2000)를 사용하여 VVTL1-homolog 유전자를 탐색하였다. 1~2시간 동안 42℃에서 30% formamide, 5x Denhardt's 용액, 5x SSPE, 100

μg/ml denatured salmon sperm DNA 혼합액에서 prehybridization한 후, probe를 넣고 24시간 동안 혼성화 (hybridization)를 수행하였다. Filter는 2x SSC, 0.05% SDS 혼합액에서 42℃, 15분간 흔들어주면서 세척한 후, 0.2x SSC, 0.1% SDS 혼합액에서 42℃, 10분간 2회와 68℃, 15분간 3회 세척하였다.

Southern blot 분석은 게놈 DNA를 *Hin*dIII, *Bam*HI, *Sac*I, *Xba*I으로 절단한 후, 0.7% agarose 겔에서 전기영동하였다. DNA를 Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia)에 옮긴 후, 앞에서 언급된 방법과 동일한 방법으로 혼성화 실험을 수행하였다.

mRNA 분리 및 primer extension 분석

RNA는 hot phenol RNA 분리방법 (Verwoerd et al. 1989)에 따라 veraison 단계의 과육으로부터 추출하였다. Poly(A)$^+$ RNA는 PolyATract mRNA isolation System II (Promega)을 사용하여 분리하였다. VVTL1-homolog 유전자의 게놈 DNA 염기서열의 208-227에 해당되는 20 bp의 antisense primer (5′-ATGCGCTTCAACACCACCCT-3′)를 합성한 후, T4 DNA polynucleotide kinase와 [γ-^{32}P]ATP를 사용하여 말단을 표지하였다. 포도과육으로부터 분리한 mRNA (1 μg)를 앞에서 표지한 primer와 혼성화시켰다. MMLV 역전사효소 (Promega)를 사용하여 cDNA를 합성한 후, 6% sequencing 겔에서 분석하였다 (Sambrook and Russell 2000).

염기서열 분석

DNA의 염기서열은 Sanger 등 (1977)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 Sequenase 2.0 kit (Amersham)를 사용하여 결정하였다. 이 때 사용된 primer는 통상적으로 사용되는 T7 promoter primer와 T3 promoter primer를 사용하여 양 말단의 염기서열을 결정하였고, 연속적으로 primer를 합성하여 전체 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 PCGENE 프로그램 (IntelliGenetics Inc., Release 6.60)과 Clustal X (version 1.64b) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 등전점 (pI, isoelectric point)의 계산은 web상의 'EMBL WWW Gateway to isoelectric point (www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl)' 프로그램을 사용하여 추정하였다.

결과 및 고찰

캠벨 품종로부터 VVTL1-homolog 유전자의 게놈 DNA 구조

국내에서 많이 재배되고 있는 캠벨 품종으로부터 VVTL1-homolog 유전자를 분리하기 위해, Muscat of Alexandria 품종의 VVTL1 유전자의 염기서열로부터 4종류의 primer를 합성하여 PCR을 수행하여, probe를 확보하였다. 각 조합에 의해 4종류의 산물을 얻었으며, 이들은 한 종류의 유전자로부터 증폭된 것임을 염기서열 분석을 통해 확인하였다. 또한 이들의 염기서열은 VVTL1과 비슷하지만, 동일하지는 않았다. 이

Figure 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the VVTL1-homolog genomic clone of Grape (cv. Campbell). Uppercase letters represent exons, and lowercase letters indicate 5′-upstreams and 3′-downstreams regions. TATA and CCAAT boxes are represented by uppercase letters in bold. The potential promoter elements are represented both by underlines and letters above: ABRE, abscisic acid-responsive element; TCA box, conserved sequence in several stress-induced genes. The other underlined letters indicate the poly(A) signal. Transcription start sites are represented by uppercase letters in bold with dot.

러한 결과는 포도의 VVTL1은 품종마다 염기서열과 아미노산 서열에 차이가 존재한다는 예전의 보고와 일치하는 결과를 보여준다 (Tattersall et al. 1997; Salzman et al. 1998; Davies and Robinson 2000).

4개의 PCR 산물 중 TL5P1과 TL3P1에 의해 얻어진 약 320 bp 산물을 probe로 사용하였다. 그 결과 22개의 클론을 분리하였고, 이 중 PCR을 통해 VVTL1-homolog를 가지고 있을 것으로 추정되는 1개 클론의 염기서열을 결정하여, GenBank에 등록 (accession No. AF227324)하였다. 분석된 게놈 DNA의 크기는 1,440 bp로서, intron이 없는 한개의 exon으로 이루어진 VVTL1-homolog 유전자의 게놈 DNA를 가지고 있음을 확인하였다 (Figure 1). 이러한 intron이 없는 게놈구조는 담배의 osmotin (Nelson et al. 1992), 감자 (2종류)(Zhu et al. 1995)와 Benincasa의 osmotin 유사단백질 (Shih et al. 2001)의 구조와 유사하다. 이러한 PR5 유전자의 공통한 게놈 구조는 유전자 발현시 splicing 단계를 제거하여 단백질을 단시간에 많이 합성하는 데 기여하는 것으로 추정된다.

이들 게놈 DNA의 염기서열로부터 추론된 VVTL1-homolog의 cDNA와 VVTL1 cDNA의 염기서열을 각각 5′ UTR, ORF, 3′ UTR에 대해서 비교해보았을 때, 각각 98.6%, 93.7%, 87.3%의 상동성을 보여주었다. 이러한 결과는 캠벨 품종에서 분리한 VVTL1-homolog 유전자가 Muscat of Alexandria 품종에서 분리한 VVTL1 유전자와 같은 기능을 하는 유전자임을 나타낸다.

게놈 Southern blot 분석

분리한 VVTL1-homolog 유전자가 게놈 내에서 몇 copy로 존재하는지를 알아내기 위해 Southern blot 분석을 수행한 결과, 4개의 서로 다른 제한효소로 처리한 모든 시료에서 단일 band를 보여주었다 (Figure 2). 이러한 결과는 VVTL1-homolog 유전자가 포도 게놈 내에서 단일 copy로 존재함을 나타내며, 현재까지 밝혀진 대부분의 TLP가 단일 copy로 존재한다는 연구결과들 (Capelli et al. 1997; Hu and Reddy 1997; Sassa and Hirano 1998; Oh et al. 2000; Shih et al. 2001)과도 일치한다. 또한 Tattersall 등 (1997)의 Southern blot 분석 결과와 비슷한 크기의 동일한 band 양상은 본 연구에 의해 분리된 클론이 염기서열과 아미노산 서열에 차이를 보일지라도 VVTL1 유전자와 같은 유전자임을 제시해준다.

캠벨에서 분리한 VVTL1-homolog 유전자와 다른 포도품종의 유전자 비교

현재까지 포도에서 분리되어 보고된 7가지의 TLP 유전자의 염기서열로부터 추론된 아미노산서열을, 본 연구를 통해 캠벨 품종에서 분리된 유전자의 아미노산 서열과 비교해보았

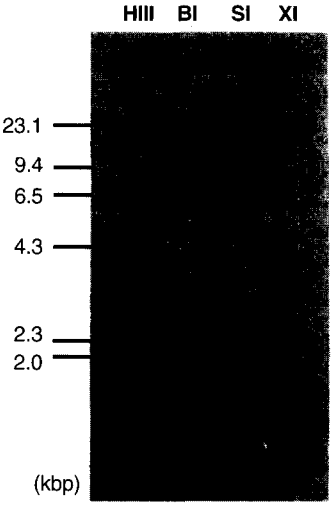

Figure 2. Genomic Southern blot analysis of VVTL1-homolog. Genomic DNA (10 μg) was digested with *Hin*dIII (HIII), *Bam*HI (BI), *Sac*I (SI), and *Xba*I (XI) for each DNA sample. Size markers (kbp) are indicated on the left. The blot was done with probe DNA labeled with [α-^{32}P]dCTP.

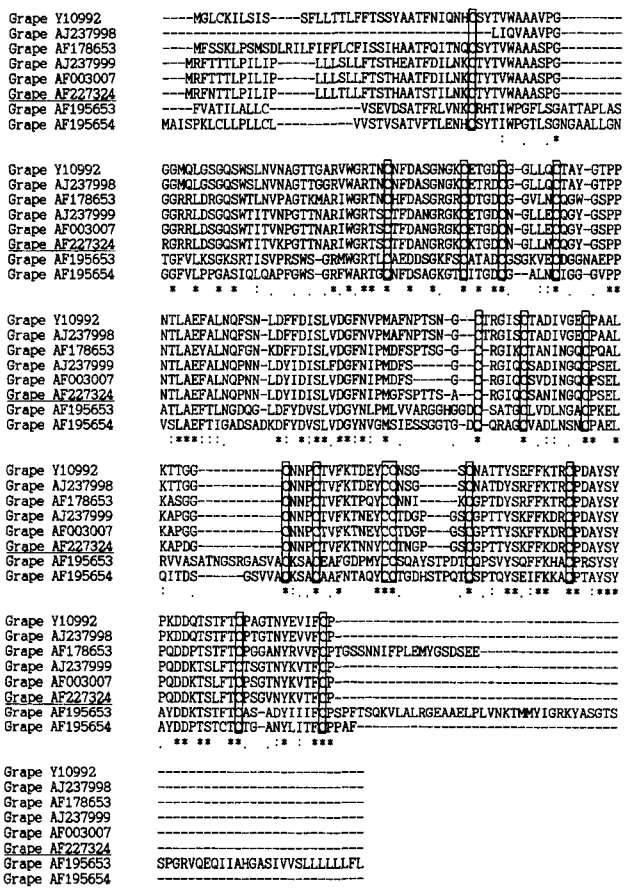

Figure 3. Comparison of the deduced amino acid sequence among TLP isolated from several grape cultivars. The gene identities are described by plant names and GenBank accession numbers. The predicted amino acid sequences of the grape TLP were aligned using the Clustal X (version 1.64b) and manually adjusted to obtain optimal alignment. Gaps are marked with dashes. Amino acid residues which are conserved are marked with asterisks. The positions of almost conserved cysteine residues are boxed.

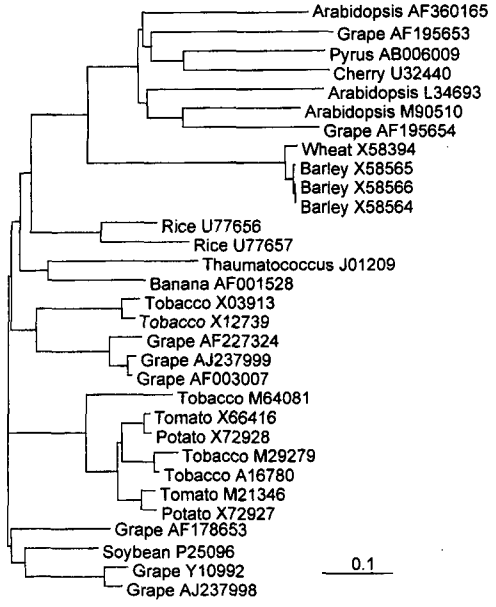

Figure 4. Phylogenetic relationship of the grape VVTL1-homolog to other various plants TLP. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of TLP from various species. The tree was generated by Clustal X (version 1.64b) and TreeView (version 1.6.1). The cDNA sequences used for amino acid translation was retrieved from GenBank. The respective accession number is described next to plant name.

다 (Figures 3, 4). VVTL1-homolog 단백질은 다른 포도 TLP들과 비슷한 크기와 상동성 있는 아미노산 서열을 가지고 보였고, TLP에서 disulfide 결합을 이루고 있다고 알려진, 16개의 cysteine도 보존되어 있었다 (Figure 3, boxed). 이러한 결과는 VVTL1-homolog 유전자가 포도 세포내에서 실제로 활성을 나타내는 단백질을 발현하고 있음을 가리킨다.

이러한 아미노산 서열의 비교와 이를 바탕으로 한 분류계통수의 작성을 통해 포도에서 분리된 8개의 TLP는 4개의 type으로 나눌 수 있었다 (Figures 3, 4). 일반적으로 TLP 유전자들은 상동성을 보이지만, 다른 유전자로 구별되는 여러 개의 유전자 family로 구성되어 있다고 보고되었다 (Hu and Reddy 1997; Tattersall et al. 1997; Davies and Robinson 2000). 따라서 이들 중, 종이 다른 *Vitis riparia*에서 분리한 AF178653을 제외하고, 포도에서는 적어도 3개 type의 유전자들이 게놈 내에 존재하고 있지만, 서로 다른 조건이나 조직에서 발현되는 것으로 추정되었다.

이들 보고된 포도의 TLP 중, 아미노말단의 지역이 부족하게 분리된 AJ237998을 제외한 나머지 단백질들은 모두 아미노말단에 소수성의 특징을 보이는 신호 펩티드 (signal peptide)로 추정되는 지역이 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 그리고 AF178653과 본 연구의 AF227324를 제외하고는 모두 산성의 등전점을 나타내었다. 또한 AF195653와 AF178653을 제외한 나머지 6개의 단백질은 액포 (vacuole)로 전달되는 데 필요한 카복시 말단의 펩티드 지역이 존재하지 않아 단백질의 존재위치가 세포 외부일 것으로 추정되었다. 본 연구를 통해 캠벨 품종에서 분리된 VVTL1-homolog 단백질은 등전점이 약한 염기성을 나타내었다. 즉, 캠벨 품종의 VVTL1-homolog는 8.1 (preprotein의 경우) 또는 8.0 (mature protein의 경우)의 등전점을 보였다. 산성의 등전점을 갖는 TLP는 세포 외부에 존재하고, 염기성 등전점을 갖는 단백질은 액포에 존재한다고 Stintzi 등 (1993)에 의해 제시되었다. 그러나 그 이후에 이들과 반대되는 경향을 보이는 단백질, 즉 염기성의 등전점을 갖는 TLP가 세포외부에 존재한다는 예도 보고되었다 (Grenier et al. 1999). 이와 같은 여러가지의 결과와 정보들을 종합해 볼 때 캠벨 품종의 VVTL1-homolog 단백질이 존재하는 위치는, 카르복시 말단의 액포 전달 펩티드 영역 (vacuolar targeting extension)이 존재하지 않고, 아미노말단에 신호펩티드 영역이 존재하는 것으로 판단할 때, 세포외부일 것으로 추정되었다.

캠벨 품종에서 분리한 VVTL1-homolog 유전자의 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열을 다른 식물체에서 분리한 TLP 계열의 아미노산 서열과 비교하여 분류 계통수를 작성하였다. 그 결과 TLP는 크게 6그룹으로 구분될 수 있음을 보여준다 (Figure 4). 다른 연구자의 계통수는 3개의 그룹으로 구분되었으나 (Sassa and Hirano 1998; Barre et al. 2000), 6그룹으로의 다양화는 분리되는 유전자의 수가 증가됨에 따라 계통수의 양상이 복잡해진 것으로 사료되었다.

Promoter 지역의 염기서열 분석

Primer extension 분석에 의해 유전자의 전사개시는 번역 (translation) 개시 부위로부터 -238 bp upstream에의 A+T 함

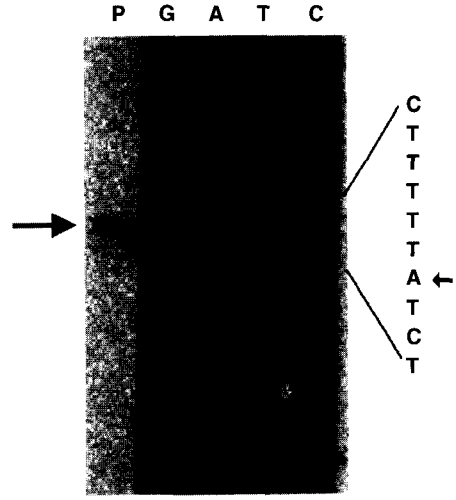

Figure 5. Primer extension analysis. Autoradiogram of the primer extension products separated on a 6% sequencing gel. Lanes: P, primer extension products; G, A, T, C, sequencing ladders. Sequencing ladders were obtained by priming sequencing reactions with the same 20-nucleotide primer and the isolated genomic clone as a template. The arrows point to a transcription start site.

량이 높은 부위 (TTTTTATCTGTAAT)에서 일어나고 있음을 알 수 있었다 (Figures 1, 5). 높은 A+T 함량은 DNA 두 가닥의 분리를 잘 일으켜 RNA 중합효소의 접근과 전사개시의 효율을 높이는 데 관여한다고 알려져 있다 (Umek et al. 1988).

전사개시 부위의 upstream 부위에서 전사의 조절에 중요한 부위로 추정되는 서열을 상동성 비교를 통해 조사하였다. 전사개시 부위의 약 39 bp upstream에, 전사에 필수적인 element인 TATA box로 추정되는 염기서열 (TATAA)이 존재하였고, 한 개의 CAAT box로 추정되는 서열 (CCAAT)도 116 upstream 부위에 존재하였다 (Figure 1). 현재까지 PR5 유전자들은 ABA (abscisic acid)와 NaCl, 상처, 곰팡이 감염 등의 여러 자극에 반응하여 발현이 활성화된다고 보고되었다. VVTL1-homolog의 5′ upstream 지역에 이들에 반응하는 *cis*-element가 존재하는지를 살펴보았다. 그 결과 하나 이상의 자극에 대하여 반응한다고 알려진 TCA box (Goldsbrough et al. 1993)로 추정되는 부위 4개가 전사개시 부위로부터 -1151, -1111, -443, -425에 존재하였고, 한 개의 ABRE는 -97 부위에서 발견할 수 있었다 (Figure 1). 이러한 element의 존재 양상을 담배 osmotin 등의 다른 PR5 유전자의 promoter와 비교해보면, TCA box는 모든 PR5 promoter에 존재하지만 개수와 위치가 다르고, ABRE는 몇몇 promoter에만 존재하는 양상을 관찰할 수 있었다 (Figure 6). 이러한 차이는 PR5 유전자의 발현이 다양하게 조절되고 있음을 제시해준다. 따라서 포도의 VVTL1-homolog 유전자는 여러 혹은 특정 자극 (또는 스트레스)에 의해 발현이 조절되고 있으며, 과육성숙과정 동안 합성된 abscisic 산에 의해서 발현이 유도 또는 활성화되고 있음을 추론할 수 있다. 그러나 다른 TLP 유전자의 promoter에서 관찰된 H-box, E-8, as-1-like elements, G-box 등은 VVTL1-homolog 유전자의 promoter 지역에서는 관찰할 수 없었다.

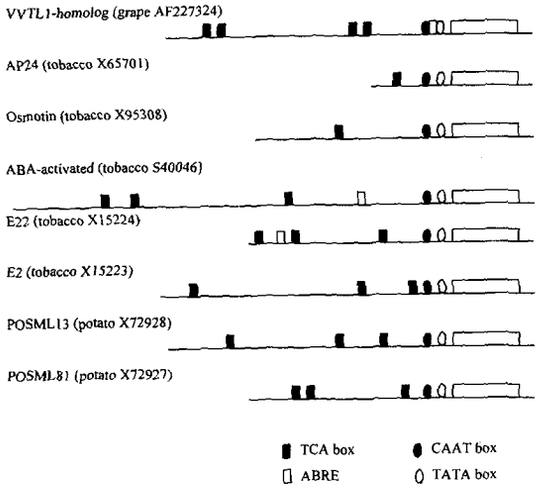

Figure 6. Comparison of genomic structure and *cis*-element with other thaumatin/PR5-like genes. ABRE, abscisic acid-responsive element; TCA box, conserved sequence in several stress-induced genes.

이러한 연구결과들을 통해 캠벨의 VVTL1-homolog 유전자의 발현에 중요하게 작용하는 여러 개의 *cis*-element들을 추정할 수 있었지만, 이들의 활성과 과육성숙 또는 스트레스에 반응하는 정확한 기작을 규명하기 위한 연구가 필요하다. 즉, 추정된 element들의 돌연변이 유도와 순차적인 promoter 지역을 이용하여, 외부 또는 생리적 자극에 대한 반응성 정도를 조사한다면 발현조절의 기작에 대한 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

적 요

VVTL1은 포도 과육에서 특이적으로 다량 발현되는, PR5 계열의 thaumatin과 높은 상동성을 나타내는 단백질로서, 품종에 따라 염기서열의 차이를 나타낸다고 알려져 있다. 현재까지 포도의 VVTL1에 대해서 몇몇 연구가 진행되었지만, 우리나라에서 가장 많이 재배되는 품종인 캠벨에서는 전혀 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 캠벨 품종으로부터 VVTL1-homolog 유전자의 게놈 DNA를 분리하여, 염기서열을 분석하였다. VVTL1-homolog 유전자는 일반적으로 PR5 유전자의 구조와 동일한 구조인, intron이 없는 하나의 exon으로만 구성되어 있었다. 염기서열로부터 추론된 VVTL1-homolog 단백질의 아미노산 서열은 VVTL1을 비롯한 다른 품종의 포도에서 분리된 TLP와는 달리 염기성의 등전점을 가지고 있었다. Primer extension 분석을 통해 전사개시 부위를 결정하였고, promoter 영역을 포함하는 5′ upstream 지역에 전사에 중요한 TATA box (4개)와 CAAT box (1개)가 존재하였으나, 이들의 위치와 수는 다른 PR5 유전자의 promoter와는 다랐다. 이러한 연구결과는 VVTL1-homolog 유전자의 발현이 과육 성숙과정동안 abscisic acid와 스트레스 또는 자극에 의해 발현이 유도되고 있음을 제시해준다. 포도 과육특이발현 promoter인 VVTL1-homolog 유전자의 promoter 분리는, 유전자의 도입에 의해 유용형질을 과육에 나타내는 포도품종을 개발하고자 할 때 효율적으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

Barre A, Peumans WJ, Menu-Bouaouiche L, van Camme EJM, May GD, Herrera AF, van Leuven F, Rougé P (2000) Purification and structural analysis of an abundant thaumatin-like protein from ripe banana fruit. Planta **211**:791-799

Biale JB (1964) Growth, maturation, and senescence in fruits. Science **146**:880-888

Capelli N, Diogon T, Greppin H, Simon P (1997) Isolation and

characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. Gene **191**(1):51-56

Cornelissen BJ, Hooft van Huijsduijnen RA, Bol JF (1986) A tobacco mosaic virus-induced tobacco protein is homologous to the sweet-tasting protein thaumatin. Nature **321**: 531-532

Davies C, Robinson SP (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. Plant Physiol **122**:803-812

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JBA (1983) Plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol Biol Rep **1**:19

Fils-Lycaon BR, Wiersma PA, Eastwell KC, Sautiere P (1996) A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like. Plant Physiol **111**:269-273

Goldsbrough AP, Albrecht H, Stratford R (1993) Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. Plant J **3(4)**:563-571

Grenier J, Potvin C, Trudel J, Asselin A (1999) Some thaumatin-like proteins hydrolyze polymeric β-1,3-glucans. Plant J **19(4)**:473-480

Hu X, Reddy AS (1997) Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. Plant Mol Biol **34(6)**:949-959

Loulakakis KA (1997) Nucleotide sequence of a *Vitis vinifera* L. cDNA (accession no. Y10992) encoding for osmotin-like protein (PGR97-064). Plant Physiol **113**:1464-1465

Malehorn DE, Borgmeyer JR, Smith CE, Shah DM (1994) Characterization and expression of an antifungal zeamatin-like protein (Zlp) gene from *Zea mays*. Plant Physiol **106**:1471-1481

Nelson DE, Raghothama KG, Singh NK, Hasegawa PM, Bressan RA (1992) Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. Plant Mol Biol **19(4)**:577-588

Oh DH, Song KJ, Shin YU, Chung WI (2000) Isolation of a cDNA encoding a 31-kDa, pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) protein abundantly expressed in apple fruit (*Malus domestica* cv. Fuji). Biosci Biotechnol Biochem **64(2)**:355-362

Pressey R (1997) Two isoforms of NP24: A thaumatin-like protein in tomato fruit. Phytochemistry **44(7)**:1241-1245

Rebmann G, Mauch F, Dudler R (1991) Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. Plant Mol Biol **17(2)**:283-285

Reimmann C, Dudler R (1993) cDNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced thaumatin-like protein from rice (*Oryza sativa*). Plant Physiol **101(3)**:1113-1114

Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. Plant Physiol **117**:465-472

Sambrook J, Russell DW (2000) Molecular cloning: A Laboratory Mannual (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**:5463-5467

Sassa H, Hirano H (1998) Style-specific and developmentally regulated accumulation of a glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Planta **205**:514-521

Shih C-YT, Wu J, Jia S, Khan AA, Ting K-LH, Shih DS (2001) Purification of an osmotin-like protein from the seeds of *Benincasa hispida* and cloning of the gene encoding this protein. Plant Science **160**:817-826

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie **75(8)**:687-706

Tattersall DB, van Heeswijck R, Høj PB (1997) Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin-like protein that accumulates at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in grapes. Plant Physiol **114**:759-769

Trudel J, Grenier J, Potvin C, Asselin A (1998) Several thaumatin-like protein bind to β-1,3-glucans. Plant Physiol **118**:1431-1438

Umek RM, Eddy MJ, Kowalski D (1988) DNA sequences required for unwinding prokaryotic and eukaryotic replication origins. Cancer Cells **6**:473-478

van Kan JAL, Van de Rhee MD, Zuidema D, Cornelissen BJC, Bol JF (1989) Structure of tobacco genes encoding thaumatin-like proteins. Plant Mol Biol **12**:153-155

Verwoerd TC, Dekker BM, Hoekema A (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. Nucl Acids Res **17**:2362

Ye XY, Wang HX, Ng TB (1999) First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from french bean legumes and demonstration of its antifungal activity. Biochem Biophys Res Comms **263**:130-134

Zhu B, Chen TH, Li PH (1995) Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. Plant physiol **108(3)**:929-937

(접수일자 2001년 8월 7일)