

더덕의 주근에서 유래한 Dehydrin 1 (*Dhn1*) 유전자의 분리 및 분석

이강, 양덕춘^{1)*}

(주)바이오피아, ^{1)*}경희대학교 생명과학대학 및 한방재료가공센터

Isolation and Characterization of Dehydrin 1 (*Dhn1*) gene from *Codonopsis lanceolata*

Kang Lee, Deok-Chun Yang^{1)*}

Biopia Co., Ltd, Yongin 449-701, Korea

^{1)*}College of Life Science & Center for Oriental Medicinal Materials and
Processing, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

ABSTRACT

During the life cycle, plants have to suffer from various environmental stresses. A common element in response to many environmental stresses is cellular dehydration. Dehydrins are a family of proteins commonly induced by environmental stresses associated with low temperature or dehydration and during seed maturation drying. For the study in the defense mechanism against various stresses, a cDNA clone encoding a dehydrin gene was isolated from a cDNA library prepared from tap root mRNAs of *Codonopsis lanceolata*. The cDNA, designated *CIDhn1*, is 893 nucleotides long and has an open reading frame of 480 bp with a deduced amino acid sequence of 159 residues. The *CIDhn1* amino acid sequence is highly hydrophilic and possesses two conserved repeats of characterized lysine-rich K-segment (KIKEKLPG), and a 7-serine residue stretch prior to the first lysine-rich repeat that is common to many dehydrins. The DEYGNP conserved motif is, however, modified in the sequence of *CIDhn1* gene. The deduced amino acid sequence of *CIDhn1* was compared with other plant dehydrin1s and showed high homology with *Solanum commersonii* (Commerson's wild potato; Y15813 ; 57% identity).

Key words : Dehydration, cDNA sequence, Homology, KIKEKLPG

서언

식물들은 일생 동안 다양한 종류의 환경 스트레

스를 겪는다. 여러 환경 스트레스로 인한 공통의 반응은 세포의 탈수 현상이다. 토양 수분의 부족, 낮은 습도, 상처로 인한 수분 손실, 온도의 상승, 그리고,

*교신저자 : E-mail : dcyang@khu.ac.kr

병원균으로 인한 물관부의 수분 전달 능력 감소 등은 식물 조직의 수분 포텐셜에 영향을 미쳐 수분 부족 증상을 일으킬 수 있다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Bray, 1997). 이에 따라, 식물들은 스트레스에 대항하여 자신을 방어하는 다양한 메커니즘을 지니고 있다.

Late-embryogenesis-abundant protein group II(LEA)로도 알려진 dehydrin 은 환경 스트레스에 의해 유도되는 가장 일반적인 단백질로 건조 및 저온 스트레스와 관련하여 가장 광범위하게 연구되어 왔으며(Close, 1996; Close, 1997), 상처에 의해 유도되는 경우도 몇몇 보고 되어 있다(Luo *et al.*, 1992; Danyluk *et al.*, 1994).

Dehydrin은 DEYGNP 모티브와 한 개 또는 그 이상의 lysine-rich 구역(KIKEKLPG), 그리고, 대부분 dehydrin의 공통적 특징인 일련의 serine 잔기를 포함하는 보존적인 아미노산 모티브에 의해서 특징지어진다(Dure *et al.*, 1989; Close, 1997). Lysine-rich 구역은 더 길거나 dehydrin에서 glycine이 반복되는 또 다른 특징이 나타날 수도 있다(Close, 1996; Close, 1997). 특히 dehydrin과 용화성(친화성)용질이 단백질과 핵산 같은 고분자를 안정화시키는데 상승 작용을 하여 원형질이 안정화되는 것에 기여한다는 가설을 제시하였다(Close, 1996).

Dehydrin 합성 펩타이드(KIKEKLPG)를 인식하는 특이적인 항체를 사용하여 15~120 kDa 에 달하는 dehydrin이 몇몇 종의 외떡잎과 쌍떡잎식물, 그리고, 겉씨식물 중 2개의 family인 Pinaceae와 Gingoaceae에서 존재함을 보고하였으며(Close, 1997), 현재까지 dehydrin 과 연관된 연구는 주로 저온 순응, 결빙과 건조에 대한 내성 등에 초점이 맞춰져 왔다(Arora and Wisniewski, 1994; Finch-Savage *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*, 1996; Artlip *et al.*, 1997). 이미 다양한 식물 종으로부터 얻은 dehydrin 유전자에 대한 정보가 연구되고 있으나, 이 유전자가 더덕과 같은 약용 작물에서 알려진 바는 거의 없다.

더덕(*Codonopsis lanceolata* Benth, et Hook)은 초롱꽃과 (Campanulaceae)에 속하는 다년생 만성초본으로 산간 지방에 야생하며 인도와 동아시아에 약 40

여종이 분포하고 있다(Lee, 1980). 한국에서는 예부터 식용으로 상용 되어 왔으며, 한방에서는 사삼(沙蔘)이란 약으로 이용되어 오고 있는 중요한 자원 식의 하나이다. 더덕에는 성분적으로는 사포닌이 함유되어 있으며, 적혈구, 헤모글로빈의 증가, 종소, 해독, 배농, 거담, 최유, 폐옹, 폐괴저, 유선 염, 장옹, 종독, 나력, 편도염, 유즙부족, 백대(강장, 해열, 해독)의 치유 기능을 가지고 있다고 한다(Park *et al.*, 1985).

또한 80년대 이후 자연건강식품에 대한 국민들의 선호도가 증가함에 따라 기호 식품으로 호평을 받게 되었을 뿐만 아니라, 최근에는 약용, 관상용으로 사용되어 수요가 증가하고 있다. 이에 따라 더덕은 농가 소득을 올리는 중요한 작물로 각광을 받기 시작하여 일반 농가의 재배면적이 점차 확산되는 추세이다(Kim and Choi, 1998). 짧은 작물화 역사를 지닌 약용 작물의 대표식물로서 식품과 약재로 이용되는 더덕의 뿌리에서의 dehydrin에 대한 분자생물학적 연구는 환경 스트레스와 관련하여 점차 확산되는 더덕 재배에 기여할 수 있을 것이다. 우리는 이번 실험에서 염기 서열 분석과 RT-PCR을 통해 더덕의 cDNA로부터 분리한 dehydrin 유전자(*Cldhn*)를 동정하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서는 충남농업기술원에서 재배된 4년생 더덕(*Codonopsis lanceolata* Benth, et Hook)의 주근을 사용하였다.

RNA 추출과 cDNA library의 제작

Aqueous phenol extraction을 사용하여 더덕(*Codonopsis lanceolata*)의 주근으로부터 전체 RNA를 추출하였다. cDNA를 합성하는 과정은 공급자 매뉴얼에 따라 cDNA synthesis kit(Clontech, SMART cDNA library construction kit, USA)를 이용하여 수행하였다.

```

1  GGCCTTACGG CCGGGGATCT TTATCATCAC ATCAGCATTT ACAAAAACAG TAGTCTACTT
61  TAGTCTACTT GAGCATTCTT GGTCTTGTTG TATCTTGAAA AAGAGAGAGA AAATGGCAGG
                                     M A G 1
121 TTACGGAGAT TCGTTTCAAA CTGGGAGGGA TCAGGCTCGC CAAACCGACG ACTATGGCAA
    Y G D S F Q T G R D Q A R Q T D D Y G N 4
181 CCTTGTCCGC CAAACCGACG AACACGGCAA TCCAATTCAC CCCACCACTG GTGGTACCAT
    L V R Q T D E H G N P I H P T T G G T I 24
241 AGGTGACCAT ATCAGCACCG GCGGTTACGG CACGGGTACT GGTGAGCATA ATGCAGGTCA
    G D H I S T G G Y G T G T G E H N A G H 44
301 TCAGGGGCAG CAGCACCATG GTGATACTGG TGGTGTAACT GGCCTGCTCC ATCGTTCGGG
    Q H H G D T G G V T G V L H R S G Q G Q 64
361 CAGCTCCAGC TCCAGCTCTT CGGAGGACGA TGGGATGGGT GGAAGGAGGA AGAAGGGGAT
    S S S S S S S E D D G M G G R R K K G I 84
421 AAAGGAAAAA ATCAAGGAGA AGCTGCCGGG GGGGCGTAAG GAGGAGCAGA GAACTTCAAC
    K E K I K E K L P G G R K E E Q R T S T 104
481 AACTACTCCG GGGACGGGGG CCGTGTATGG CGGGCACGAG GTGGAGCCTG AGAAGAAAGG
    T T P G T G A V Y G G H E V E P E K K G 124
541 ATTGGTGGAG AAAATCAAGG AGAAGCTTCC TGGGGCGCAC GCGCACCCT AATAATAAAA
    L V E K I K E K L P G A H A H H * 144
601 TCTATGTCTC TTGAATGATG TGGGTCGGGT CGTGTGTTTCG TATTCGTATT CCTATTCCTA
661 TTTATGTATG GGGATATATA TACGTCTCTGT TTGGCTTATA AGCTTAAGTA TGTCATTTGG
721 AGTGCAATGA ATAAGCAGTT GACTTTGCCC TTGTTGTTGG CAGAGGCAGC CGCACCCGCAT
781 GTCAGTCATA TGTATGTTTT GTACGATGTA ATGTCATTCT ATTTGAGCAT TTTATTTT
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *CIDhm1*, dehydrin1 cDNA, from *Codonopsis lanceolata*. The positions of nucleotides are shown on the left and the positions of amino acids on the right. Asterisk shows the termination codon. Underline indicats PCR primer.

DNA 및 단백질 서열 분석

λpTriplEx2 에서 pTriplEx phagemid들을 분리하여 염기 서열 분석을 위한 template로 사용하였다. 무작위적으로 선별된 cDNA insert 들의 5' 영역을 벡터 특이적인 시퀀싱 프라이머를 이용하여 automatic DNA sequencer (ABI prism 3700)로 sequencing 하였다. 분석된 EST clone들의 기능 동정은 NCBI 의 blastx 프로그램을 사용하여 GeneBank의 중복되지 않은 단백질 database와의 비교를 통해 이루어졌다. 뉴클레오타이드와 아미노산의 서열 분석 및 비교는 DNASIMAX(Hitachi) 프로그램을 사용하였으며, 분석된 염기 서열의 비교는 NCBI의 DNA와 아미노산

database를 바탕으로 Blast 연산을 통해 수행된 후, DDBJ ClustalW(Thompson, 1994)와 GeneDoc (Nicholas and Nicholas, 1997) 프로그램에 의해 디스플레이 되었다. 아미노산 서열 분석에는 단백질의 등전점(pI), 분자량, signal peptide 등의 추측을 위해, ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>)와 PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)을 사용하였다.

RT-PCR 분석

본 연구에서는 *CIDhm1* 유전자의 발현 분석을 위하여 더덕(*Codonopsis lanceolata*)의 callus, 줄기, 잎, 주근으로부터 전체 RNA를 추출하였다(easy

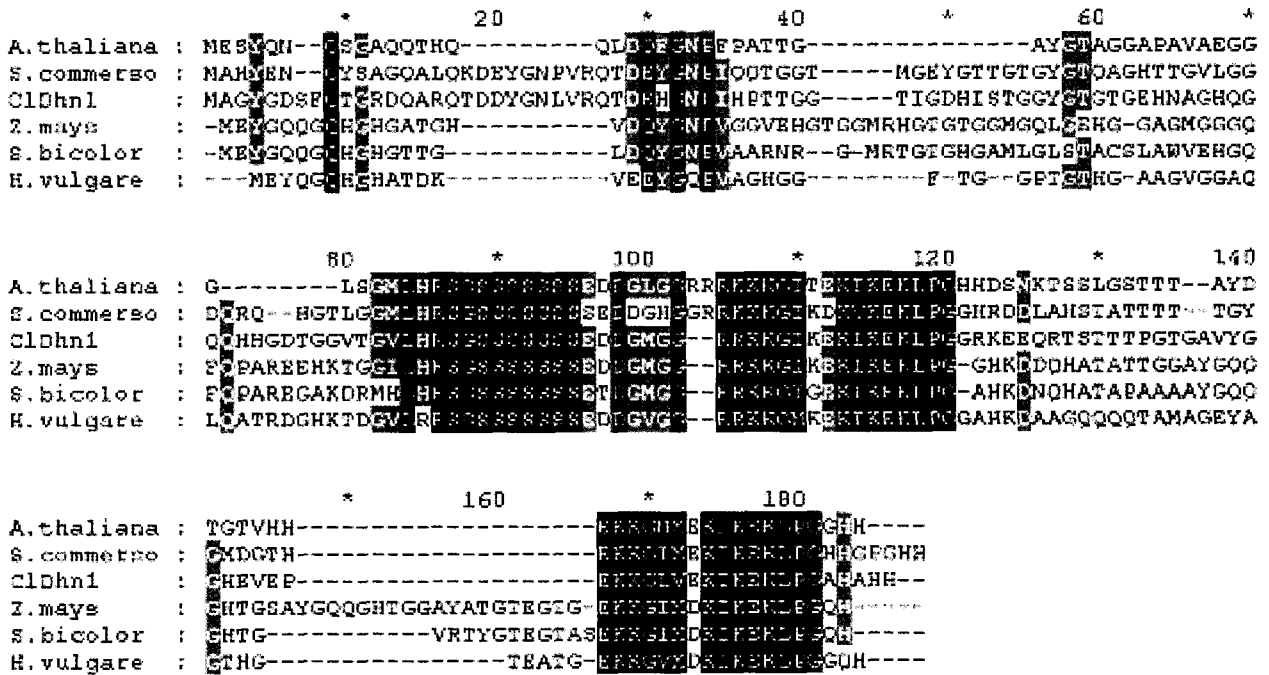


Fig. 2. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of *CIDhn1* with those of dehydrin genes from other plants; *A.thaliana* (AAB00375), *Z.mays* (CAA33364), *S.bicolor* (AAA19693), *H.vulgare* (AAD02253) and *S.commerse* (CAA75798). Sequence data was obtained from GeneBank listed and aligned using DDBJ ClustalW and GeneDoc. Gaps are marked with dashes. The conserved amino acid residues are shaded. Serin segment was marked with black box. White letters in a black box indicate 6 out of 6 matches, white letters in gray box indicate 5 out of 6 matches.

BLUE™ RNA Extraction Kit, iNtRON). oligodT (18mer)를 프라이머로 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성(Promega)한 후, *CIDhn1*에 특이적인 primer를 이용하여 유전자의 ORF 부분을 증폭하였다 (TopTaq™). 대조구로는 actin을 사용하였으며, PCR 증폭은 94℃, 5분을 개시로 94℃ 40 초, 54℃/58℃ 40 초, 72℃ 1분 30초의 25 cycle 조건으로 하였다. PCR 을 위한 *CIDhn1* 유전자의 특이적인 primer는 ORF 내에서 디자인 하였고, sense primer(5' -TTG GATC CAT GGC AGG TTA CGG AG-3') 및 antisense primer (5' -TAG GAT CCT TAG TGG TGC GCG TG-3')을 이용한 PCR에서 ORF와 동일한 480 nucleotide 길이의 산물을 생산하였다.

결과 및 고찰

더덕의 뿌리로부터 제작된 cDNA library로부터 1000개의 clone을 확보하였다. 각 positive clone들에 대한 염기 서열에 대한 blastx 검색 결과, 그 중에서 6 개의 clone들이 기존의 dehydrin 유전자와 상동성을 나타내는 full clone 이었다. 분리된 dehydrin cDNA 는 *CIDhn1* 으로 명명하고, 본 실험에서는 *CIDhn1*의 sequence 에 대한 분석과 RT-PCR을 통한 조직별 발현 양상을 기술하였다.

*CIDhn1*의 cDNA는 828 bp 길이로, 159 개 아미노산으로 번역되는 ORF를 가지고 있으며(Fig 1), 분자량은 약 16.7 kDa, pI 값은 6.87 로 추정되었다. 전체 아미노산 조성을 보면 이 단백질은 대부분 친수성을 띠는 Thr, Asn, Gln, Ser, Asp, Glu 와 Gly 같은 극성 그리고 charge를 띠는 아미노산이 풍부하다. 또한 Cys

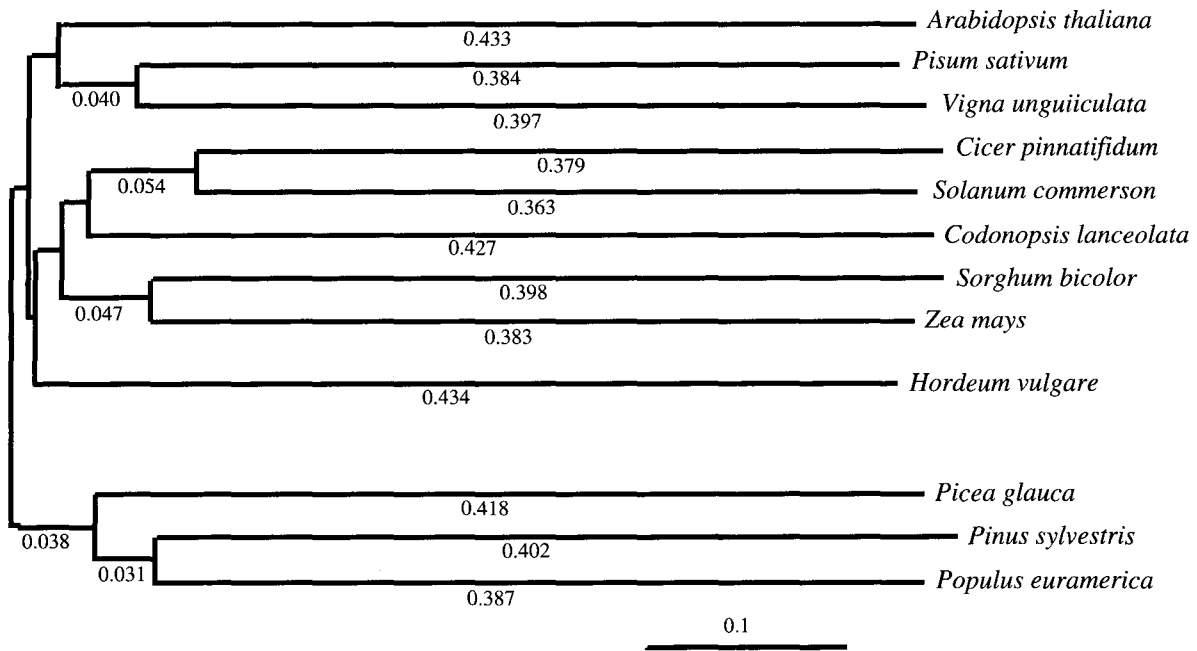


Fig. 3. phylogenetic relationship of CIDhn1 to other plant Dhn1. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of Dhn1 from various plant species mentioned in Fig. 2 and including *P. sativum* (CAA44787), *V. unguiculata* (AAF07274), *C. pinnatifidum* (AAN77521), *S. bicolor* (AAA19693), *P. glauca* (AAD28175), *A. thaliana* (AAB00375), *V. corymbosum* (AAB84258), *P. sylvestris* (CAB93666) and *P. euramericana* (CAC35772). The tree was generated by DNAsis max(Hitach). The scale on the bottom shows similarity between two clusters and 0.1 means 0.1 nucleotide substitutions per site.

와 Trp 가 조성에 나타나지 않았다. 이러한 조성은 dehydrin 단백질의 일반적인 특징과 일치한다(Close, 1997). CIDhn1은 여러 종의 식물들에서 발견되는 dehydrin 유전자와 전형적인 특징 몇 가지를 공유하고 있다. CIDhn1에 의해 코딩되는 단백질을 볼 때, 15개의 아미노산으로 이루어진 K-반복 구간이 카르보닐기 영역에 2개 존재한다. 그리고, 8개의 serine 잔기가 첫 번째 K-반복구간의 앞쪽에 늘어서 있다. Ser 잔기는 인산화될 수 있다 그리고, 인산화는 핵에 국한된 시그널 펩타이드와 결합하는데 연관되어 있어 최종적으로 핵으로 이동하게끔 한다고 옥수수과 토마토에서 연구되어 보고된 바 있다(Goday et al., 1994; Goday et al., 1994). 그러나, CIDhn1 유전자에서는 아미노기 영역에 위치한 (V/T)DEYGNP 보존 구간이 다른 식물과 달리 방향족을 포함하고 있는 Y(Tyr) 대신에 기본 구조의 H(His)으로 치환되어 있다. CIDhn1 유전자의 전체 구조는 "YSK" 명칭 체계

(Close TJ, 1996)에 의해 YSK₂ 구조라 나타낼 수 있다. YSK₂ 형태의 옥수수 dehydrin과 SK₃ 형태의 밀 dehydrin가 각각 endomembrane 및 원형질막과 상호 작용한다(Egerton-Warburton et al., 1997; Danyluk et al., 1998)는 기존의 보고를 바탕으로 더덕의 CIDhn1의 세포 내 작용 위치를 추측해 볼 수 있을 것이다.

CIDhn1의 예측된 아미노산 서열을 다른 식물의 dehydrin1과 비교해 볼 때, *S. commersonii* (Commerson's wild potato; Y15813)와 높은 상동성

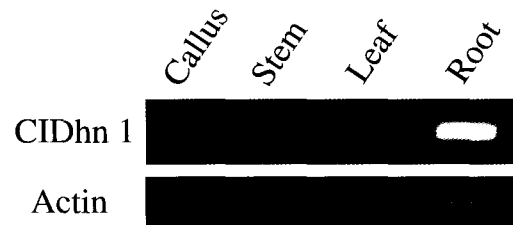


Fig. 4. Tissue-specific expression of CIDhn1 in *Codonopsis lanceolata*.

(57% identity)을 나타냈으며(Fig 2), 아미노산 서열을 바탕으로 한 계통발생학적 분석 역시 *S. commersonii*가 더덕과 가장 가까운 유연 관계를 나타냈다(Fig 3). 또한 모든 목본 식물들은 카르보닐기 영역의 Y 구간의 부재로 인해 더덕과 계통발생적으로 가장 멀게 나타났다.

RT-PCR을 이용하여 전사 단계에서 나타나는 더덕의 조직(callus, 줄기, 잎, 주근)별 *CIDhn1*의 발현 차이를 확인한 결과, 뿌리 조직에서 높은 발현 양상을 보인 반면에, 줄기와 잎에서는 발현 양이 적었으며, callus 조직에서는 아예 발현이 나타나지 않았다. 이는 *CIDhn1*의 RT-PCR이 더덕의 주근 라이브러리에서 유래된 dehydrin 유전자의 ORF 특이적으로 수행되었기 때문이라고 생각할 수 있으며, dehydrin 유전자가 family로 존재한다는 점을 감안할 때 dehydrin 특이적인 구간을 바탕으로 RT-PCR을 수행할 경우, 다른 발현 양상이 나타날 수 있을 것이라고 추측할 수 있다. 또한 탈분화 상태의 callus에서 *CIDhn1*의 발현 밴드가 나타나지 않은 것은 후기 배 발생 단계에서 과발현 된다는 dehydrin 유전자의 특성 과도 일치한다고 할 수 있다.

몇몇 dehydrin 유전자의 transcript가 상처나 저온 스트레스에 의해 유도되거나 증가된다는 보고가 있었다(Close, 1997; Armand, 2000). 따라서, 우리는 *CIDhn1*과 환경 스트레스 사이의 관계를 연구하고, *CIDhn1* 유전자의 재도입을 통해 환경 스트레스에 대해 내성을 나타내는 더덕 형질전환체를 최종적으로 생산할 것이다.

적요

더덕 뿌리에서 유래한 EST 라이브러리로부터 dehydrin 유전자와 높은 상동성을 나타내는 full clone cDNA를 얻었다. 더덕의 dehydrin, *CIDhn1*은 893 bp의 cDNA로 159개의 아미노산을 코딩하는 480 bp의 ORF를 가지고 있다. *CIDhn1*의 아미노산을 분석해 보면, 전체적으로 높은 친수성을 나타내며, lysine이 풍부한 K 반복구간(KIKEKLPG)을 카르보

닐기 쪽에 2개 가지고 있다. 또한, 여러 dehydrin들의 공통적인 특징인 7개의 연속적인 serine 잔기가 첫 번째 K 반복 구간 앞에 위치한다. 그러나, 아미노기 쪽의 DEYGNP 보존 구간은 변형(DEHGNP)되어 있다. *CIDhn1* 유전자는 전사 단계에서 더덕의 뿌리에서 가장 높은 발현 양상을 보이며, 줄기와 잎에서는 적은 양이 발현되었다.

사사

본 연구는 농진청 Biogreen 21사업의 특용작물사업단의 연구지원금에 의해서 수행되었으며 이에 대해 심심한 감사를 표하는 바이다.

인용문헌

- Armand, S. 2000. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol Biol.* 43:1-10.
- Arora, R. and Wisniewski, M.E. 1994. Cold acclimation in genetically related delicious and evergreen peach (*Prunus persica* [L.] Batsh). II. A 60-kilodalton bark protein in cold-acclimated tissues of peach is heat stable and related to the dehydrin family of proteins. *Plant Physiol.* 105:95-101.
- Artlip, T.S., Callahan, A.M., Brassett, C.L. and Wisniewski, M.E. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling delicious and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsh). *Plant Mol. Biol.* 33:61-70.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48-54.
- Lee, C.B. 1980. a pictorial book of the Korean flora. Hyang mun-sa, Seoul. p724. (in Korean)
- Park, B.D., Park, Y.G. and Choi, K.S. 1985. Screening test for antitumor activity of *Codonopsis lanceolata*

- and *C. pilosula*. J. Korean SOC. FOOD NUTR. 14(3):274-279. (in Korean)
- Kim, J.H. and Choi, J.S. 1998. Incidence of disease in *Codonopsis lanceolata* with different cultivation method. Kor. J. Plant Pathol. 14(6): 676-681. (in Korean)
- Close, T.J. 1996. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97:795-803.
- Close, T.J. 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to the dehydration and low temperature. *Physiol. Plant* 100:291-296.
- Danyluk, J., Houde, M., Rassart, E. and Sarhan, F. 1994. Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant gramineae species. *FEBS Lett.* 344:20-24.
- Dure, L.I. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12:475-486.
- Finch-Savage, W.E., Pramanik, S.K. and Bewley, J.D. 1994. The expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* 98:995-1002.
- Goday, A., Jensen, A.B., Cullianez-Macia, F.A., Alba, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M. and Pages, M. 1994. The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6:351-361.
- Goday, J., Lunar, R., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. and Pintor-Torro, J.A. 1994. Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Mol Biol.* 26:1921-1934.
- Jarvis, S.B., Taylor, M.A., Macleod, M.R. and Davis, H.V. 1996. Cloning and characterization of cDNA clones of three genes that are differentially expressed during dormancy-breaking in the seeds of Douglas fir. *J. Plant Physiol.* 147:559-566.
- Luo, M. 1992. Characterization of the gene family encoding abscisic acid and environmental stress-inducible proteins of *Alfalfa*. *J. Biol. Chem.* 267:15367-15374.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc : analysis and visualization of genetic variation. <http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.html>.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opi. Biotechnol.* 7:161-167.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gilbson T.J. 1994. CLUSTALW : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

(접수일 2003. 9. 5)

(수락일 2003. 10. 5)