

## 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 잎 ESTs database에서 Energy 대사 관련 유전자 분석

이종일, 윤재호<sup>1</sup>, 송원섭<sup>1</sup>, 이범수<sup>2</sup>, 인준교<sup>2</sup>, 김은정<sup>2</sup>, 양덕춘<sup>3\*</sup>

순천대학교 자연과학대학, <sup>1</sup>순천대학교 농업생명과학대학, <sup>2</sup>(주)바이오피아, <sup>3</sup>경희대학교 한방재료가공학과

### Gene Analysis Related Energy Metabolism of Leaf Expressed Sequence Tags Database of Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Jong-Il Lee, Jae-Ho Yoon<sup>1</sup>, Won-Seob Song<sup>1</sup>, Bum-Soo Lee<sup>2</sup>, Jun-Gyo In<sup>2</sup>,  
Eun-Jeong Kim<sup>2</sup> and Deok-Chun Yang<sup>3\*</sup>

School of Natural Science, Suncheon National Univ., Suncheon 540-742, Korea

<sup>1</sup>School of Agriculture and Life Science, Suncheon National Univ., Suncheon 540-742, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Biotechnology, BioPia Co., Ltd, Yongin 449-598, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Oriental Medicine Material and Processing, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

**Abstract** - A cDNA library was constructed from leaf samples of 4-year-old *Panax ginseng* cultured in a field. 3,000 EST from a size selected leaf cDNA library were analyzed. The 349 of 2,896 cDNA clones has related with energy metabolism genes. The 349 known genes were categorized into nine groups according to their functional classification; aerobic respiration(48.4%), accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation(17.2%), glycolysis and gluconeogenesis(3.4%), electron transport and membrane associated energy conservation(2.9%), respiration(2.0%), glycolysis methylglyoxal bypass(1.7%), metabolism of energy reserves(0.6%) and alcohol fermentation(0.3%).

**Key words** - ESTs database, Metabolism, Leaf, Energy, *Panax ginseng*

## 서 언

광합성은 생물계에 에너지를 공급하는 근원적 mechanism으로 광합성에 대한 이해는 학문적 가치 이외에도 식량자원 및 기타 농업 생산성 증대 등 그 가치가 매우 크기 때문에 광합성과 관련한 많은 연구가 이루어져 왔다. 특히 최근에는 식량문제가 심각해지고 식물자원의 경제적 가치가 더욱 중요해지고 있으며, 생화학 및 분자생물학 등의 연구방법이 발달함에 따라 광합성에 관한 연구가 더욱 활발해지고 있다. 대표적인 에너지 대사 관련 소기관인 엽록체는 식물체에서 광합성을 수행하는 세포내 소기관으로서 광합성을 이해하는데 매우 중요하므로 생리학적(Park *et al.*, 1990), 유전학적(De *et al.*, 1984; Hsu and Mullin, 1988) 면에서 연구가 수행

되어 왔다. 또한 엽록체가 별도의 유전자를 갖는다는 것이 밝혀진 이래(Palmer, 1985) 엽록체에 대한 분자생물학적 접근이 이루어져 pea(Bergmann *et al.*, 1985; Cozens and Walker, 1986), *Chlamydomonas* (Dron *et al.*, 1982) 등에서 생리학적, 분자생물학적 구조와 특성이 대표적으로 연구가 수행되었다.

인삼은 반음지성 작물로서 해가림 구조아래에서 안정적으로 광합성을 하여 생육하지만, 30% 이상의 자연광에 노출되면 잎에 도달하는 광량의 증가로 엽록소의 엽소현상(bleaching) 현상이 발생하여 잎이 말라죽는다(John *et al.*, 1995). 이는 인삼 엽록체에서 저광도의 광 에너지를 효율적으로 화학에너지로 변화되고 있음을 나타내고 있으며, 고풍도에서는 너무 많은 광에너지의 흡수로 광합성 과정에서의 광반응계 전자전달기작의 과부하로 생성되는 singlet oxygen에 의해 엽록소 및 엽육세포가 파괴되어 나타나는 것으로 알려져 있다(Yang *et al.*, 1989; Yang, 1990).

\* 교신저자(E-mail) : dcyang@khu.ac.kr

본 연구에서는 고려인삼의 잎에서 분리된 ESTs 분석을 통하여 인삼의 잎에서 발현되는 에너지 대사 관련 유전자의 발현양상을 조사하고자, GenBank에 보고 되어있는 염기서열과 비교 분석하여 인삼의 잎에서 발현이 되는 에너지 관련 유전자를 분리 및 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에 사용한 인삼 잎은 (구)한국인삼연구소 연구원의 실험포장에 이식한 후 차광을 하여 4년간 생장시킨 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 천풍의 잎을 5월 중순에 채취한 후 무게를 측정하여 액체질소로 얼린 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다.

### RNA추출 및 cDNA library의 제작

인삼 천풍의 잎으로부터 aqueous phenol extraction 방법을 사용하여 total RNA를 추출하였다(Morris *et al.*, 1990). 추출한 total RNA로부터 mRNA 분리는 poly(A) quick mRNA isolation kit(Stratagene, USA)를 사용하여 oligo(dT) cellulose column으로 정제하였으며, cDNA 합성은 시판되고 있는 SMART cDNA library construction kit(Clontech, USA)을 사용하였다. Single-strand cDNA를 합성하기 위해서 2 ug의 정제된 mRNA를 사용하였다. Double-stranded cDNA는 RNase H로 mRNA를 제거한 후 E.coli DNA polymerase를 사용하여 합성하였다.

PCR을 이용하여 primer extension 시켜 ds cDNA를 합성한 후 Sfa I 효소로 절단 하고 Chroma spin-400 column(Clontech, USA)을 사용하여 크기별로 분획하였고 500 bp 이상의 cDNA를 포함하고 있는 분획을  $\lambda$  Triplex2 vector(Clontech, USA)에 도입한 후 Gigapack III Gold Packaging Extract kit(Stratagene, USA)를 사용하여 packaging한 후 1차례 증폭하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관 하여 사용하였다.

### Nucleotide sequences 분석

플라스미드는 Sambrook 등(1989)에 따라 IPTG/X-GAL/ampicillin plates에서 blue and white color screening 방법으로 선발하였다. Single-run partial sequencing은 무작위로 선발된 cDNA clone으로 수행하였다. Minipreps 및 enzyme digestion으로 확인된 플라스미드 DNA를 ABI 3700 automatic DNA sequencer(PE

Applied Biosystems)로 염기서열을 결정하였다. Primer는 T3 primer(5'-AATTAACCCCTCACTAAAGGG-3')을 사용하였으며, DNA sequence kit(BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction mixture, PE Applied Biosystems)로 염기서열결정을 위한 반응을 한 후 100% 에탄올과 3 M sodium acetate(pH 4.8)를 이용하여 정제한 다음 automatic DNA sequencer(PE Applied Biosystems)로 분석하여 부분적인 염기서열을 얻었다.

### Computer analysis of sequences

Raw sequences는 Phred program(ver. 0.000925, c., Phill Green & Brent Ewing)을 이용하여 분석 하였으며, nucleotide sequence는 phrap/cross\_match/swat(ver. 0.990329)을 사용하여 벡터와 정확하지 않는 sequence를 제거하였고, 그리고 98% 이상의 정확성과 연속적으로 400 bp 이상을 가진 sequence를 분류하였다.

상동관계 탐색은 NCBI에서 제공하는 advanced gapped BLASTX(Altschul *et al.*, 1990)을 이용하며 sequence database를 비교·분석하였다. Sequence 데이터들은 six reading frames으로 번역하였고, 번역된 아미노산 sequence는 NCBI database BLASTX를 이용하여 분석하였다. BLASTX score가 80보다 높으면 ESTs와 이미 알려진 sequence와 상동관계가 있는 것으로 보았다(Newman *et al.*, 1994). 그리고 판독이 어려운 104개 clone은 제외시키고 2,896개 clone의 sequence 데이터를 조사하였다. 이 중 에너지 대사와 관련 있는 349개의 유전자를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

인삼 잎으로부터 추출한 mRNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후 size-fraction을 하여 500 bp 이상 되는 fraction만을 모아서 cDNA library를 제작하였다(Fig. 1).

인삼 잎의 ESTs 분석을 위해서 제작된 cDNA library로부터 무작위로 3,000 개를 선발하여 sequencing primer를 이용하여 5' 말단 한쪽에서 염기서열 분석을 실시하였다. 인삼 잎의 cDNA library에서 무작위로 선발된 ESTs의 유전자 단편의 길이가 최소 400 bp 이상인 3,000개 clone의 염기서열을 분석한 결과 판독 불가능한 염기서열 결과를 제외한 총 2,896개의 ESTs clone에 대한 염기서열을 결정하여 database화 하였다.

인삼 잎에서 분석된 유전자의 database를 이용하여 에너지 대사 유전자를 분석하였다. 전체 cDNA library에서 선발한 2,896개의 유전자중 349(12.1%)개의 에너지 대사 관련

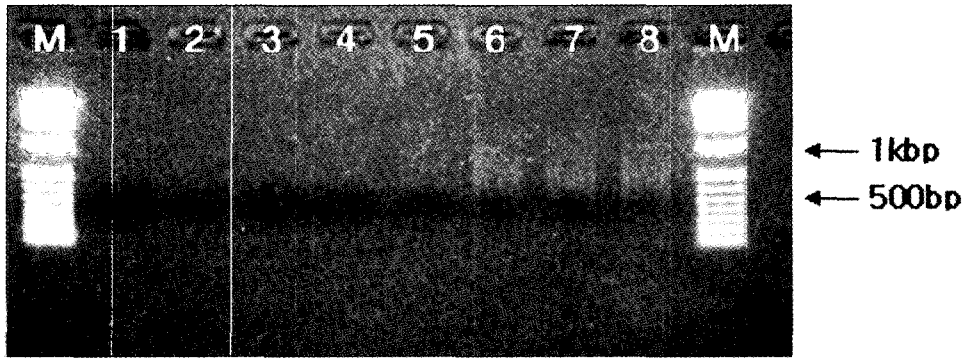


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of size-fractionated ginseng leaf cDNA.

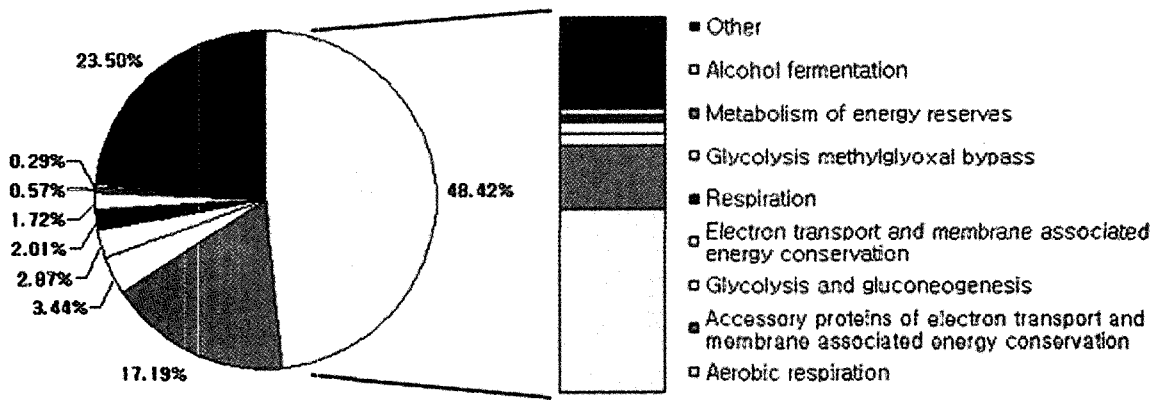


Fig. 2. Functional classification of ginseng leaf ESTs. The ESTs that had sequence similarity to known genes were classified based on energy related functions.

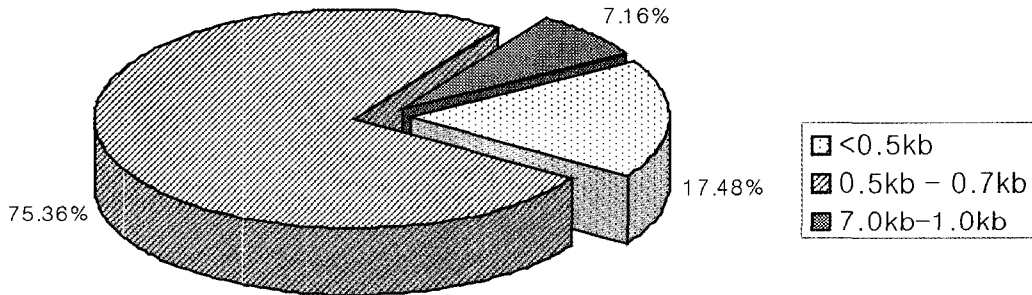


Fig. 3. Size distribution of related energy metabolism in ginseng leaf.

유전자가 검색이 되었다(Fig 2).

선발된 349개의 에너지 대사 유전자의 단편을 분석 한 결과 17.48%의 clone이 0.5 kb 미만의 유전자 단편을 가지고 있었으며, 75.36%의 clone은 0.5 - 0.7 kb의 유전자 단편을 갖고 있었다. 그리고 0.7 - 1.0 kb 이상인 유전자 단편은 7.16%의 비율로 존재하였다. 또한 cDNA library의 삽입 단

편의 평균 길이는 약 0.49 kb으로 나타났다(Fig 3). 이는 평균적으로 0.9 kb의 유전자 단편을 보인 *Arabidopsis thaliana*(Kaneko *et al.*, 2000; Stephen, 2003)보다 작은 유전자 단편을 보였지만, *Carthamus tinctorius*(Loo *et al.*, 2002)의 꽃봉우리에서 제작된 cDNA library의 0.5 kb와 비슷한 양상을 보였다.

Table 1. Categorization of 349 energy metabolism related genes.

Energy	Number	%
Aerobic respiration	169	48.4
Accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation	60	17.2
Glycolysis and gluconeogenesis	12	3.4
Electron transport and membrane associated energy conservation	10	2.9
Respiration	7	2.0
Glycolysis methylglyoxal bypass	6	1.7
Metabolism of energy reserves	2	0.6
Alcohol fermentation	1	0.3
Other	82	23.5

Table 2. Most abundant ESTs clones related to energy metabolism in ginseng leaf.

Putative identification	Source	Acc. No.	No. of child	E-value
Chlorophyll a/b binding protein of lhcl type I	<i>P. ginseng</i>	AF034631	128	2E-76
Chlorophyll a/b-binding protein	<i>D. carota</i>	AF207690	26	4E-77
Photosystem II oxygen-evolving complex protein 3	<i>S. oleracea</i>	S00008	23	5E-66
Chlorophyll a/b-binding protein type II (CAB-7)	<i>L. esculentum</i>	S07408	16	E-68
Photosystem I chain II	<i>C. sativus</i>	A60695	13	E-53
Chlorophyll a/b-binding protein (CAB-11)	<i>L. esculentum</i>	S14305	11	2E-89
Chlorophyll a/b-binding protein type I (CAB-6a)	<i>L. esculentum</i>	S00443	10	E-123
Photosystem ii oxygen-evolving complex protein 1	<i>N. tabacum</i>	T02066	8	E-162
Early light inducible protein	<i>M. sativa</i>	AF383622	6	7E-57
Chlorophyll a/b-binding protein cp26	<i>A. thaliana</i>	T04049	6	E-124
Photosystem I chain II	<i>L. esculentum</i>	S00449	5	4E-48
Early light-inducible protein	Soybean	JC5876	5	8E-38
Chlorophyll a/b binding protein	<i>A. graveolens</i>	AGCHLABBP	4	4E-84
Chlorophyll a/b binding protein 4	<i>Mus musculus</i>	BC002118	4	E-125
Latex plastidic aldolase protein	<i>H. brasiliensis</i>	AF467803	3	E-83
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>S. chloroplast</i>	T09012	3	3E-63
Photosystem ii protein w protein	<i>Oryza sativa</i>	AP003269	3	3E-15
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>N. tabacum</i>	G3PA	3	E-134
Light harvesting chlorophyll a/b binding protein	<i>H. helix</i>	HHLHC	3	5E-46
Ubiquinol-cytochrome-c reductase? 14K chain	<i>S. tuberosum</i>	T07368	2	5E-46
Glycolate oxidase	<i>L. esculentum</i>	LEGLYCOX	2	1E-55
Fructose-bisphosphate aldolase? M3E9.40	<i>A. thaliana</i>	T05051	2	E-101
Cytochrome p450	<i>A. thaliana</i>	AB018112	2	E-29
Photosystem i chain psi-e isoform b	<i>N. tabacum</i>	T16963	2	8E-41
Glycolate oxidase	<i>M. crystallinum</i>	MCU80071	2	E-124
Hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	T47672	2	8E-50
Oxygen-evolving enhancer protein 1	<i>S. tuberosum</i>	PSBO	2	8E-73
Chlorophyll a/b-binding protein cab10b	<i>L. esculentum</i>	S11878	2	3E-90
Chlorophyll a/b-binding protein	<i>A. thaliana</i>	A86423	2	2E-82
Chlorophyll a/b-binding protein type III (CAB-13)	<i>L. esculentum</i>	CDTO33	2	5E-34

*Arabidopsis thaliana* 유전인자들을 각각의 유전자 기능에 따라서 분류한 Munich Information Centre for Protein Sequences(MIPS, <http://mips.gsf.de/>) database를 이용해서 인삼 잎에서 발현된 에너지 대사 유전자 349개의 ESTs를 비교하여 기능별로 분류 하였다(Hofte *et al.*, 1996; Boguski *et al.*, 1993). 선발된 349개의 에너지 대사 유전자들은 9개 functional groups으로 나눌 수 있었다. 9개의 기능 중에 aerobic respiration와 관련된 유전자의 발현 빈도가 48.42%로 가장 높게 나타났으며, accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation에 관련된 유전자들이 17.2%로 나타났다(Table 1).

에너지 관련 유전자들의 세부 기능별 발현을 분석한 결과 aerobic respiration(48.4%), accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation(17.2%), glycolysis and gluconeogenesis(3.4%), electron transport and membrane associated energy conservation(2.9%), respiration(2.0%), glycolysis methylglyoxal bypass(1.7%), metabolism of energy reserves(0.6%)와 alcohol fermentation(0.3%)의 기능을 같은 유전자들이 분포하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 에너지 관련 기능을 나타내는 유전자들은 chlorophyll a/b binding protein LHC II type I(Cab)이 가장 많이 발현이 되었다(Funk *et al.*, 1995). CAB의 기능은 빛 에너지를 잡기 위한 안테나 시스템으로서 광합성을 위해 빛을 모으는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Flachmann and Kuhlbrandt, 1995; Millar and Kay, 1996). 고려인삼은 생육 과정에서 30% 이상의 고광도에서는 엽소현상으로 잎이 말라죽는 피해를 입게 되는데 고광도에서 너무 많은 광에너지의 흡수로 광합성 과정에서의 광반응계 전자전달기작의 과부하로 생성되는 singlet oxygen에 의해 엽록소 및 엽육세포가 파괴되어 나타나는 것이다(Park *et al.*, 2001; John *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994). 인삼은 반음지성 식물로 진화하면서 저광도의 광에너지를 효율적으로 화학에너지로 변환하는 능력을 획득한 것으로 보인다. 이러한 인삼의 생리적 특징은 재배환경에서 고비용과 차광으로 인한 병원균의 증식 등의 원인을 제공하고 있다.

따라서 본 연구에서는 인삼의 에너지에 대한 분자생물학적인 반응을 연구하고자 인삼 잎에서 제작된 cDNA database를 이용하여 에너지 대사 유전자를 분석하였고 이들의 발현 및 기능에 대한 연구를 지속적으로 수행할 것이다.

## 적 요

본 연구에서는 인삼 잎으로부터 정제한 mRNA를 이용하여 cDNA library를 제작하였다. 이 cDNA library로 부터 349개의 에너지 대사 관련 유전자를 선발 하였다. 에너지 대사 관련 유전자의 평균 사이즈는 0.49 kb이며, 에너지 관련 유전자들의 세부 기능별 발현을 분석한 결과 aerobic respiration(48.4%), accessory proteins of electron transport and membrane associated energy conservation(17.2%), glycolysis and gluconeogenesis(3.4%), electron transport and membrane associated energy conservation(2.9%), respiration(2.0%), glycolysis methylglyoxal bypass(1.7%), metabolism of energy reserves(0.6%)와 alcohol fermentation(0.3%)의 분포를 보였다. 인삼 잎에서 발현되는 유전자중 가장 많이 발현된 Chlorophyll a/b binding protein of lhcII type I(36.6%), Photosystem II oxygen-evolving complex protein(6.6%) 등이 발현되었다.

## 사 사

이 논문은 2003년 순천대학교 학술연구비 공모과제로 연구되었습니다.

## 인용문헌

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bergmann, P., M. Schneider, G. Burkard, J.H. Weil and J.D. Rochaix. 1985. Transfer RNA gene mapping studies on chloroplast DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci.* 39: 133-140.
- Boguski, M.S., T.M. Lowe and C.M. Tolstoshev. 1993. dbEST-database for "expressed sequence tags". *Nature Genetics* 4: 332-333.
- Cozens, A.L. and J.E. Walker. 1986. Pea chloroplast DNA encodes homologues of *Escherichia coli* ribosomal subunit S2 and the beta-subunit of RNA polymerase. *Biochem. J.* 236: 453-460.
- De, H., A.G. Jochemsen, P.T. Willemsen and G.S. Groot. 1984. Protein synthesis during chloroplast development in *Spirodela oligorhiza*. Coordinated synthesis of chloroplast-encoded and nuclear-encoded subunits of ATPase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Eur. J. Biochem.* 2: 161-168.
- Dron, M., M. Rahir and J.D. Rochaix. 1982. Sequence of the chloroplast DNA region of *Chlamydomonas reinhardtii* containing

- th gene of the large subunit of ribulose biphosphate carboxylase and parts of its flanking genes. *J. Mol. Biol.* 17: 775-793.
- Flachmann, R. and W. Kuhlbrandt. 1995. Accumulation of plant antenna complexes is regulated by post-transcriptional mechanisms in tobacco. *The Plant Cell* 7: 149-160.
- Funk, C., W.P. Schroder, A. Napiwotzki, S.E. Tjus, G. Renger and B. Andersson. 1995. The PSII-S protein of higher plants; A new type of pigment-binding protein. *Biochemistry* 34: 11133-11141.
- Hofte, H., T. Desprez, J. Amelelm, H. chiapello, M. Caboche, A. Moisan, M.F. Jourjon, J.L. Charpentreau, P. Berthomieu, D. Guerrier, J. Giraudat, F. Quigley, F. Thomas, D.Y.Y, R. Mache, M. Raynal, R. Cooke, F. Grellet, M. Deseny, Y. Parmentier, G.D. Matcillac, C. Giot, J. Fleck, G. Philipps, M. Axelos, C. Mardet, D. Tremousaygue and B. Lescure. 1993. An inventory of 1,152 expressed sequence tags obtained by partial sequencing of cDNA from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 4: 1051-1061.
- Hsu, C.L. and B.C. Mullin. 1988. A new protocol for isolation of mitochondrial DNA from cotton seedlings. *Plant Cell Rep.* 7: 356-360.
- John, I., R. Drake, A. Farrell, W. Cooper, P. Lee, P. Horton and D. Gireson. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC oxydase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis. *The Plant J.* 7: 483-490.
- Kaneko, T., T. Katoh, S. Sato, A. Nakamura, E. Asamizu and S. Tabata. 2000. Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. II. Sequence features of the 4,251,695 bp regions covered by 90 P1, TAC and BAC clones. *DNA Res.* 30: 217-221.
- Lee, J.H., Y.P. Lim, J.C. Park and K.T. Choi. 1994. Cloning of rubulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene from Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korean J. Ginseng Sci.* 19: 51-55.
- Loo, W.T., M.N. Cheung and L.W. Chow. 2002. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of flower buds in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Life Sci.* 26: 191-200.
- Millar, A.J. and S.A. Kay. 1996. Intrgration of circadian and phototransdiction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 15491-15496.
- Morris, P.C., A. Kumar, D.J. Bowles and A.C. Cuming. 1990. Osmotic stress and abscisic acid regulate the expression of the *Em* gene of wheat. *Eur. J. Biochem.* 190: 625-630.
- Newman, T., F.J. Bruijn, P. Green, K. Keegstra, H. Kende, L. McIntosh, J. Ohlrogge, N. Raikhel, S. Somerville and M. Thomashow. 1994. Genes galore a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* 106: 1241-1255.
- Palmer, J. D. 1985. Comparative Organization of Chloroplast Genomes. *Ann. Review of Genetics.* 19: 325-354.
- Park, H., B.G. Cho and M.K. Lee. 1990. Nitrogen Compounds of Korea ginseng and Their Physiological Significance. *Korean J. Ginseng Sci.* 14: 317-331.
- Park, S.W., S.W. Kim, Y.G. Lee, S.W. Kang, C.H. Lee, H.C. Lee and S.Y. Chol. 2001. Expression of CAB (chlorophyII a/b binding protein) gene in transformed plants. *Korean J. Plant Tissue Culture* 28: 41-45.
- Sambrook, J., E.F. Rfitch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2nd Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.
- Stephen, R. 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences. *Plant Science* 8: 321-329.
- Yang, D.C. 1990. Lipid peroxidation of ginseng thylakoid membrane. *Korean J. Ginseng Sci.* 14: 135-141.
- Yang, D.C., M.W. Kim, Q. Chae and M.S. Kim. 1989. Effects of active oxygen species ( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) and scavengers on the chlorophyll bleaching of leaf burning disease from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Korean J. Ginseng Sci.* 13: 98-104.

(접수일 2005. 9. 30 ; 수락일 2006. 2. 2)