

## 안개초(*Gypsophila paniculata* L.)로부터 dihydroflavonol 4-reductase 유전자의 분리 및 분석

민병환 · 정동춘

### Molecular cloning, sequences analysis and *in vitro* expression of the dihydroflavonol 4-reductase gene from *Gypsophila paniculata* L.

Byung Whan Min · Dong Chun Cheong

Received: 9 March 2010 / Accepted: 12 March 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) is a key enzyme of the flavonoid biosynthesis pathway which catalyses the NADPH-dependent reduction of 2R,3R-trans-dihydroflavonols to leucoanthocyanidins. In this study we describe cloning and expression of the genes encoding the flavonoid-bio-synthetic enzyme DFR in *Gypsophila paniculata* L. Inspection of the 1279 bp long sequence revealed an open reading frame 1063 bp, including a 36 bp 5' leader region and 181 bp 3' untranslated region. Comparison of the coding region of this DFR cDNA sequence including the sequences of *Arabidopsis thaliana*, *Citrus sinensis*, *Dianthus caryophyllus*, *Ipomoea batatas*, *Matthiola incana*, *Nierembergia sp*, *Petunia hybrida*, *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* reveals an identity higher than 69% at the nucleotide level. The function of this nucleotide sequences was verified by comparison with amino acid sequences of the amino-terminus and tryptic peptides from purified plant enzyme, by northern blotting with mRNA from wild type and mutant plants, by *in vitro* expression yielding and enzymatically active reductase, as indicated by the small leucopelargonidin peak. Genomic southern blot analysis showed the presence of only one gene for DFR in *Gypsophila paniculata*.

#### 서론

꽃과 과일을 비롯한 여러 식물체의 화려한 색소는 이미 유전자학자, 화학자 및 생화학자들의 관심의 대상이 되었으며 최근에 와서는 식물분자생물학의 발전에 따라 분자생물학자들의 연구대상으로 부각되고 있다. 아울러 지난 10여년간에는 지속적인 화훼시장에서의 수요의 증가에 따라 생산의 양적인 증가와 더불어 질적인 면에서 다양성을 추구하는 화훼육종의 필요성이 더욱 절실하며 이 분야의 선구자적인 위치에 있는 네덜란드의 화훼산업은 지속적인 발전을 하고 있다. 근래의 세계적인 동향을 살펴보면 전통적인 육종방법에 DNA재조합기술과 유전자전이 및 조직배양기술이 가미되어 새롭고 다양한 화색의 창출을 유도하는 효과적인 방법으로 각광을 받고 있으며 실지로 1987년에 독일 Max-Planck 식물육종연구소의 Meyer그룹은 petunia에 옥수수의 A1유전자를 전이시켜 지구상에 존재하지않는 주홍색의 petunia를 만들었다는 보고가 있고 (Meyer et al. 1987), 네덜란드 자유대학의 Mol 그룹은 anthocyanin 생합성과정의 첫 번째 효소인 chalcone synthase (CHS) 유전자를 antisense로 전이시켜 역시 petunia의 다양한 색소변화를 관찰한 바 있다 (Krol et al. 1988). 그러나 이러한 보고는 아직 기초적인 단계로써 색소유전자의 전이를 통하여 색소발현을 유도하는 가능성을 시사하였으며 최근에 와서는 다양한 색소유전자의 cloning과 inbred line의 확보를 통하여 화훼산업의 발전에 새로운 장을 열었다. 근래에 와서는 오스트레일리아의 Florigene사와 일본의 Suntory사가 카네이션에 delphinidin유도체를 도입하여 보라색의 카네이션을 개발하여 상품화 하였으며 Davies 등은 1998년에 알팔파에서 분리한 chalcone ketide

B. W. Min (✉)  
경북대학교 생태환경대학 생태환경시스템학부  
(Division of Ecological and Environment System, Kyungpook  
National University, Sangju, Korea)  
e-mail: minbw@knu.ac.kr

D. C. Cheong  
전북농업기술원 남원고령지화훼시험장  
(Namwon Alpine Floricultural Experiment Station, Namwon,  
Korea)

reductase (CHKR) 유전자를 페튜니아에서 발현시켜 노란색의 발현을 유도하였다. 그 외에도 최근에 와서는 적색의 카네이션을 유전자의 도입을 통해 delphinidin의 발현을 강화하여 자주색의 카네이션으로 변환시킨 보고도 있으며 (Brugliera et al. 2000) cyanidin과 delphinidin의 발현을 동시에 강화하여 흑색에 근접한 색소의 발현을 유도하였고 (Koes et al. 2000), 장미에 있어서도 대사공학을 이용한 delphinidin발현의 유도로 청색에 근접한 장미의 개발에 성공했다는 보고도 있다 (Katsumoto et al. 2007). Anthocyanin 생합성의 중요한 중간기질인 dihydroflavonol로부터 flavan-3,4-diols로의 효소활성에 대한 연구는 *Pseudotsuga* 세포배양으로부터 분리한 효소로부터 최초로 행하여 졌고 (Stafford and Lester 1982), 1985년 Heller 등에 의하여 *Matthiola incana*의 흰꽃의 돌연변이종을 연구한 결과 dihydroflavonol 4-reductase가 anthocyanin 생합성에 관여한다고 보고하였다. 효소 DFR은 dihydroflavonol로부터 flavan-3,4-diols로의 stereospecific reduction을 NADPH를 조효소로 사용하여 촉매하며(Fig. 1) 이미 꽃으로부터 DFR을 추출하여 효소활성에 대한 실험은 *Matthiola incana* 이외에도 *Callistephus chinensis* (Ruhnau and Forkmann 1988), *Petunia hybrida* (Forkmann and Ruhnau 1987) *Dahlia hybrida* (Fisher et al. 1988) 그리고 *Dianthus caryophyllus* (Stich et al. 1992) 등이 보고된 바 있다.

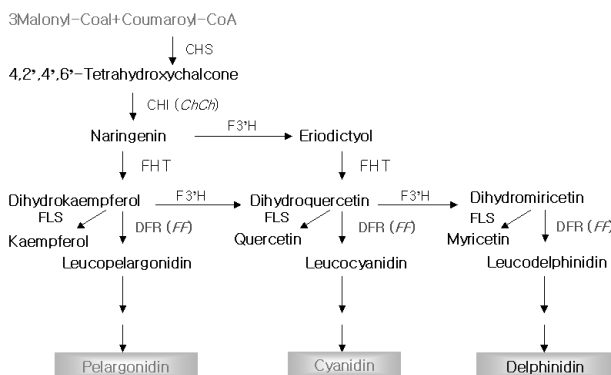
분자생물학적 접근을 위한 DFR 유전자의 분리에 대한 보고는 *Zea mays* (O'Reilly et al. 1985), *Antirrhinum majus* (Martin et al. 1985), *Petunia hybrida* (Beld et al. 1989), *Hordeum vulgare* (Kristiansen and Rohde 1991), *Arabidopsis thaliana* (Schirley et al. 1992), *Gerbera hybrida* (Helariutta et al. 1993), *Lycopersicon esculentum* (Bongue-Bartelsman et al. 1994), *Rosa hybrida* (Tanaka et al. 1995), *Matthiola incana* (Min et al. 1998), *Dianthus caryophyllus* (Lee et al. 2004) 그리고 *Callistephus chinensis* (Min 2006) 등이 있다. 본 연구에 사용된 식물체인 안개초는 영명으로 baby's breath으로

불러지며 이미 꽃시장의 상당부분을 점유하고 있는 상업성이 높은 고급초화이나 이에 대한 생화학 및 분자생물학적 기초연구는 거의 이루어지지 않았다. 또한 안개초는 화색의 종류가 다양하지 못하여 핑크색의 색소발현체계를 가진 품종인 'Flamingo'와 'Red Sea'를 제외하고는 전부 백색의 표현형을 나타내고 있어 고전 육종의 중요한 표지식물로 가치가 있는 것으로 알려져 왔다. 이러한 특징을 가진 안개초에 적합한 flavonoids 생합성 관련 유전자를 형질전환을 통해 도입하여 색소발현체계를 변형시키면 상업적 측면에서 매우 가치있는 시도라고 사료된다. 본 실험에서는 백색계통의 안개초에 색소유전자를 전이하여 새로운 색소발현체계를 가진 품종을 육종하기 위하여 핑크색 계통의 품종인 'Red Sea'의 꽃봉오리로부터 mRNA를 분리하여 cDNA-library를 만들고, 이 library로부터 DFR 유전자를 cloning 하였으며 sequencing을 통하여 그들의 염기서열을 분석하였고 나아가 분리유전자의 다양한 발현에 대한 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

안개초 (*Gypsophila paniculata* L.) 품종 중 핑크색의 색소발현체계를 가진 'Red Sea'(Fig. 2)는 남원 고령지 화훼시험장으로부터 분양받아 학교 내의 온실에서 화분에 심어 재배하였으며 cDNA-library의 제작을 위한 재료 및 효소활성 측정을 위한 재료로 사용하였다. 또 다른 핑크색의 색소발현체계를 가진 'Flamingo'와 일반적으로 가장 많이 재배하는 품종인 백색의 'Bristol Fairy'는 화원에서 구입하여 사용하였으며 Northern blot 분석 등에 사용하였다. 재료는 각 조직별로 수확하여 즉시 액체질소로 냉동 후 -70°C에 저장하여 필요에 따라 사용하였다



**Fig. 1** Schematic flavonoid pathway DFR: flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase, F3'H: flavonoid 3'-hydroxylase DFR: dihydroflavonol 4-reductase, ANS: anthocyanidin synthase



**Fig. 2** *G. paniculata* L. cultivar 'Red Sea'

## mRNA의 분리

10 g의 안개초의 꽃봉오리로부터 guanidine hydrochloride 방법 (Logemann et al. 1987)을 변형하여 total RNA를 분리하였고, 이 total RNA로부터 mRNA를 분리하기 위하여 oligo-dt-cellulose (Sigma, USA)를 사용하였고 buffer A [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.4 M NaCl, 0.2% SDS]와 buffer B [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 M NaCl, 0.2% SDS]로 씻어 준 후 분리하였다. 분리된 mRNA의 순도를 측정하기 위하여 UV-spectrophotometer를 통하여 확인하였다 (Sambrook et al. 1989).

## cDNA-library의 합성

안개초 cDNA-library 구축을 위하여 핑크색의 색소발현 체계를 가진 품종인 'Red Sea'의 꽃봉오리로부터 5  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>)-mRNA를 분리하여 사용하였다. cDNA-library를 합성하기 위하여 Pharmacia (USA) 제품인 cDNA-library 합성 kit를 사용하여 cDNA를 합성하고 이 ds-cDNA는 Lambda-ZAP II vector에 삽입시킨 후 재조합시켰으며 재조합된 lambda-zap II는 in vitro packaging (Stratagene, USA) 과 amplification을 통하여 cDNA-library를 완성하였다.

## 유전자의 기내발현

분리한 DFR 유전자가 목적했던 유전자임을 확인하기 위하여 분리유전자를 template로 T7 RNA polymerase를 사용하여 기내에서 transcription 시키고 [<sup>35</sup>S]-methionine (Amersham, USA)을 사용한 reticulocyte lysate system (Promega, USA)에 의해 translation 시켜 기내발현을 수행하였다. *In vitro* translation을 위하여 2  $\mu$ l의 1 mM amino acid mixture (Promega, USA), 5  $\mu$ g의 poly(A<sup>+</sup>) RNA 및 40  $\mu$ l reticulocyte lysate (Promega, USA)를 혼합한 후 이 혼합물은 1 시간 동안 30°C에서 incubation 하고 Sephadex G50 (Pharmacia, USA) column을 사용하여 전체량을 1 ml에 맞추고 enzyme buffer [0.1 M Tris/HCl (pH 7.5), 20 mM sodium ascorbate]를 통하여 정제하였다.

## Genomic DNA의 분리 및 Southern blot 분석

유전자의 분석을 위하여 안개초의 어린꽃잎으로부터 Manning (1991)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리된 안개초의 DNA를 제한효소 *EcoRV*와 *XhoI*으로 각각 절단한 후 0.8% agarose gel에 전기영동하고 이를 nylon membrane (Hybond-N, Amersham, USA)으로 옮긴 후 안개초의 DFR cDNA를 probe로 이용하여 Southern blot hybridization을 실행하였다 (Southern 1975).

## Northern blot 분석

Northern blot 분석을 위해서는 핑크색인 'Flamingo'와 'Red Sea' 및 백색인 'Bristol Fairy'의 어린 꽃봉오리로부터 total RNA를 추출하였고 (Logemann et al. 1987), 전기영동은 1.2% formaldehyde agarose gel 상에서 수행하였으며 Sambrook 등(1989)의 방법에 준하여 안개초의 DFR cDNA의 1.3 kb 절편을 <sup>32</sup>P로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 50% formamide, 5 X SSC, 0.05 mol phosphate buffer, Denhardt's solution을 이용하여 42°C에서 수행하였다.

## DFR 효소 활성의 측정

DFR 효소활성 측정은 Heller 등(1985)의 방법에 의하여 수행하였다. 기본적인 효소활성의 측정을 위해서 전체 용량을 50  $\mu$ l로 하였으며 자세한 조성은 5-50  $\mu$ l의 효소 추출액, 0.04 nM 방사성기질 ([<sup>14</sup>C]-dihydrokaempferol, 167Bq), 250 nM NADPH, 2.8 mM 2-mercaptoethanol을 첨가한 0.1M Mcllvaine buffer (pH 6.8) 그리고 10% (v/v) glycerol 등이다. 이 혼합물을 25°C에서 30 분간 항온기에서 각각의 반응을 유도한 후 즉시 2번 (50, 30  $\mu$ l) 반복하여 ethyl acetate로 추출한 후 추출액은 thin layer chromatography (TLC)를 통하여 분석하였고 여기에 사용된 solvent system은 chloroform/acetic acid/water (10 : 9 : 1)로 혼합하였다. TLC 위의 방사선의 정량분석은 TLC analyzer (Berthold, Germany)을 사용하여 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 안개초로부터 DFR 유전자의 분리 및 염기서열 분석

10 g의 꽃봉오리로부터 guanidium chloride 방법을 사용하여 total RNA를 분리한 결과 4.841 mg을 얻었고 1차 oligo-dt-cellulose column을 통하여 38  $\mu$ g의 mRNA를 얻었으며 2차 column을 통과한 후 15  $\mu$ g의 순수한 mRNA를 분석하였다. 이 중 5  $\mu$ g의 mRNA를 cDNA-library의 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA-library로부터 카네이션의 DFR-cDNA를 probe로 하여 screening하여 본 결과 5개의 positive clone을 분리하였고 이것으로부터 phage-DNA를 분리하여 *EcoRI*으로 처리해 본 결과 5개 clone 모두 1.2 kb-1.5 kb 크기의 insert를 가지고 있었다. 이 clone들을 페튜니아의 DFR 유전자를 probe로 Southern blot 분석을 통해 검정해 본 결과 모두 DFR 유전자임을 확인하였다. 분리한 5개의 서로 다른 크기의 DFR 유전자를 각각 G1-G5로 명명하였고, 벡터 pUC19에 cloning 하여 염기서열분석을 수행한 결과 1.5 kb 크기의 clone G3만이 full size clone임

```

-36  atttgaacat aacaaat tgacctaat attgt acaag
1  ATGGTTCTTCTAATAACACTACCGAGACACTAGACGGTAAACATGACACTAAGCCCGTGCAGGTGAGACCCTGCGTCACCTGGCGCGTCCGGCTTCATCGGTTCA TGCGCTCATCATG
1  M V S S N N T T E T L D G K H D T K P V Q G E T V C V T G A S G F I G S W L I M
121  AGACTCCTTGAGCGTGGCTACACTGTCCGAGGCACAGTTCGAGACCCCGATAACACGAAAAGTGCAGCATCTGTTGGATTGCGCTCAAGCCAAAGACTAACTTGACATTATGGAAGCG
41  R L L E R G Y T V R G T V R D P D N T K K V Q H L L D L P Q A K T N L T L W K A
241  GACCTTAACGAAGAAGGCAGCTTCGACAAAGCCGTGACGAGTGCCTCCGAGTGTTCACATAGCCACACCTATGGACTCGAGTCCAAAGATCCCGAGAACGAGATGATAAAGCCGACA
81  D L N E E G S F D K A V D G C S G V F H I A T P M D F E S K D P E N E M I K P T
361  ATAAATGGGATGTTGGACATAATGAAGTGTGTGCAGAGGCCAAAGTAAAGAGGGTAGTGTTTACATCATCGGGTGGAAACAGTGAAATGTGAAAGAGACACAAAAGCTGAGTATGATGAG
121  I N G M L D I M K S C A K A K V K R V V F T S S G G T V N V E E T Q K A E Y D E
481  ACTTGTGGAGTGTCTCGACTTCATTCGCTCTGTAAAGTAGCTGGTTGGATGTATTCGTGTGCAGAAATACTGGCAGAGCAAGCAGCATGGAAAGTATGCGAGCAAAAACACCTCGAC
161  T C W S D L D F I R S V K M T G W M Y F V S K I L A E Q A A W K Y A A E N N L D
601  TTCATCAGCATCATCCGCTCTGTGTGTTGGACCCCTTCATGATGCGATCCATGCGCTCCTAGCCGCACTTACCAGCCTCTCTCGATCAGCAAGACTGAACTCCTACTATACAATATAAAG
201  F I S I I P P L V V G P F I M P S M P P S L I T A L S P I T R T E S H Y T I I K
721  CAAGGCAAAATTGTGCACCTGGATGATCTTTGTATGGCTCACATTTCATATAGAGAACTCCTAAGGCGCAGGGTGGTATATTGCTCGGCTTGTGATGCAACAAATTTATGACATTGCA
241  Q G Q F V H L D D L C M A H I F L Y E N P K A Q G R Y I A S A C D A T I Y D I A
841  AAGATGCTCAGGGAGAGTACCCTGAGTACAATGTGCCACCAAAATTCAGGACTACAAAAGAGACATGGACTTGGTACATTTCTGTCAGAAAGACTGACCGAGTATGGGTTCCAGTTCC
281  K M L R E E Y P E Y N V P T K F K D Y K E D M D L V H F S S K K L T E L G F E F
961  AAGTACGGTTGAAGGACATGTACACAGGAGCTGTGAGACGTGCAGAGCAAAAGGGCTTCCCTCTTCACTAGAAAACCATGAAAATGATATGCTTGGATat aagatttgtgtt to
321  K Y G L K D M Y T G A V E T C R A K G L L P L S L E N H E N V Y A *
1081  ctgtgcttaaat aat aaaggccacatcatattgtgtctat agattt gggt atact cct catgt ttaataat cagtcoccatataatgatgotgatatttggagagtgatctataaat ttaat
1201  tt tggagtga aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
    
```

Fig. 3 Nucleotide and predicted amino-acid sequence of DFR-cDNA clone from *G. paniculata*

을 확인하였다. 염기서열 분석 결과를 보면 안개초의 DFR 유전자는 1471 bp 이며 이 중 coding region은 1047 bp 였고 349 amino acid를 인지하였다. 또 이 유전자는 190 bp의 leader sequence와 288 bp의 trailer sequence 및 18 bp의 poly(A) tail을 가지고 있었다 (Fig. 3). Start codon과 stop codon을 살펴보면 start codon은 AAAATGG로 Joshi (1987a)가 발표한 식물체의 고유의 codon과 일치하며 ATG의 -3 위치에 purin 염기가 나타났다. 유전자의 3' 말단에 나타나는 polyadenylation signal AATAAA 는 TAA translation stop codon으로부터 41 bp downstream 위치에 있으며 polyadenylation site에서 172 bp upstream 위치에 존재하였다 (Joshi 1987b). 이들 유전자의 염기서열의 유사성을 *Dianthus gratianopolitanus* (Yagishita et al. 2000), *Dianthus caryophyllus* (Lee et al., 2004), *Brassica oleracea* (Min et al. 2002), *Forsythia intermedia* (Rosati et al. 1997), *Petunia hybrida* (Beld et al. 1989), *Nierembergia sp* (Ueyama et al. 2006), *Rosa hybrid* (Tanaka et al. 1995), *Callistephus chinensis* (Min 2006), *Gerbera hybrid* (Helariutta et al. 1993) 등의 DFR 유전자와 비교해 보면 nucleotide level 에서는 각각 89, 89, 66, 66, 66, 66, 68, 63, 62%를 나타내었고 amino acid level에서도 역시 같은 수치의 유사성을 나타내었다 (Fig. 4). 이러한 수치에서 보듯 안개초의 DFR 유전자는 같은 *Caryophyllaceae*과에 속하는 카네이션 (*Dianthus caryophyllus*)과 nucleotide level 에서 89%, amino acid level에서 89%로 가장 높은 일치성을 보였다. 또한 같은 *Solanaceae*과에 속하는 *Petunia hybrid* 와 *Nierembergia sp*의 경우도 88%의 높은 일치성을 나타

NUCLEOTIDE	AMINO ACID									
	Gp	Dg	Dc	Bo	Fi	Ph	Ns	Rh	Cc	Gh
Gp	*	89	89	66	66	66	66	68	63	62
Dg	89	*	95	66	63	64	65	67	62	62
Dc	89	95	*	64	62	62	63	67	61	60
Bo	66	66	64	*	63	59	60	67	64	65
Fi	66	63	62	63	*	70	69	66	67	68
Ph	66	64	62	59	70	*	88	64	69	70
Ns	66	65	63	60	69	88	*	65	68	69
Rh	68	67	67	67	66	64	65	*	66	66
Cc	63	62	61	64	67	69	68	66	*	79
Gh	62	62	60	65	68	70	69	66	79	*

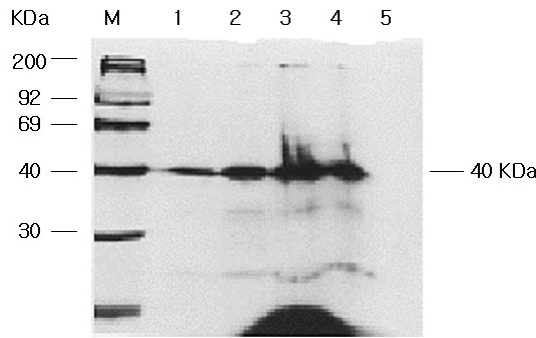
Fig. 4 Comparison of the nucleotide and amino acid homology of DFR (%).

Gp: *G. paniculata* Dg: *Dianthus gratianopolitanus* Dc: *Dianthus caryophyllus* Bo: *Brassica oleracea* Fi *Forsythia intermedia* Ph: *Petunia hybrida* Ns: *Nierembergia sp* Rh *Rosa hybrid* Cc: *Callistephus chinensis* Gh: *Gerbera hybrid*

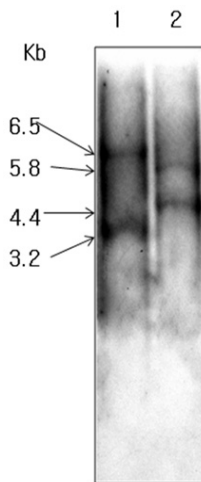
내었다. 유사한 결과는 다른 색소유전자인 CHS (Niesbach-Klöggen et al. 1987)와 DFR (Lee et al. 2004)의 염기서열분석에서도 보고된 바 있으며 식물분류학이나 진화학적 측면에 큰 의미가 있다고 사료된다.

유전자의 기내 발현

분리한 유전자의 발현을 증명하기 위하여 *in vitro* transcription과 translation을 통하여 protein의 생성 여부를 알아보았다. 먼저 유전자를 Bluescript KS<sup>+</sup> vector에 cloning한 후 T7-RNA-Polymerase 와 T3-RNA-Polymerase를 이용하여 transcription 시키고 생성된 mRNA를 다시 reticulocyte system과 [<sup>35</sup>S]-Methionin labelling을 이용하여 translation을



**Fig. 5** *In vitro* expression of the DFR cDNA clone of *G. paniculata*. M: [<sup>14</sup>C]-methylated markerprotein, 1-4: Sense mRNA of *G. paniculata* (1, 2, 5, or 8μl) 5: Antisense mRNA of *G. paniculata* as a negative control

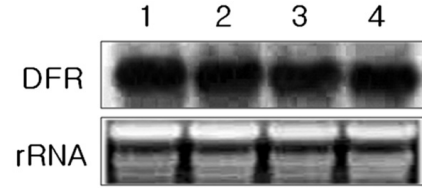


**Fig. 6** Southern blot analysis of genomic DNA from wild type *G. paniculata* 1: Digestion with *EcoRV*. 2: Digestion with *XhoI*

유도한 후 생성된 protein을 SDS-PAGE를 통해 확인해 본 결과 분리한 DFR 유전자와 같은 40 kDa 크기의 protein을 확인하였다 (Fig. 5).

**분리유전자의 Southern blot 분석**

분리한 안개초의 DFR 유전자가 genome에 얼마나 존재하는지 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 수행하였다. cDNA-library 제작에 사용하였으며 핑크색의 색소발현체계를 가진 ‘Red Sea’의 꽃잎으로부터 DNA를 분리한 후 cDNA상에 1개의 cutting site를 가진 제한효소인 *EcoRV* 과 *XhoI*으로 처리하고 DFR cDNA를 probe로 hybridization을 해 본 결과 각각의 lane에 동일한 강도를 가진 두개의 band를 보였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 제한효소 *EcoRV*로 처리한 경우 각각 6.5 kb, 3.2 kb 크기의 band가, *XhoI*으로 처리한 경우 각각 5.8kb, 4.4kb 크기의 band를 나타냄으로써 안개초의 DFR 유전자는 genome 내에 오직 한

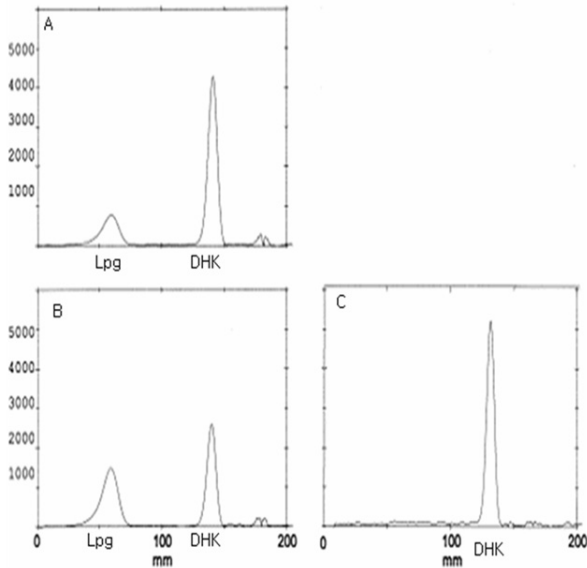


**Fig. 7** Northern blot analysis of poly(A<sup>+</sup>)RNA from the wild type and mutant of *G. paniculata*. 1: Wild type cultivar ‘Flamingo’ (pink) 2: Wild type cultivar ‘Red Sea’ (pink) 3, 4: Mutant cultivar ‘Bristol Fairy’ (white) Hybridization of the same blot with a rRNA probe was performed to test equal loading

개가 존재한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 이미 보고된 금어초 (Martin et al. 1985), 페튜니아 (Beld et al. 1989), 카네이션 (Lee et al. 2004), 과꽃 (Min 2006), stock (Min et al. 1998), 옥수수 (O’ Reilly et al. 1985), 오렌지 (Lo Piero et al. 2006) 등과 일치하며 페튜니아의 DFR 유전자는 3개의 copy를 보였으나 실제로 오직 하나의 유전자 *DFR-A* 만이 DFR 기능을 가지고 있음을 증명하였고, 장미 (Tanaka et al. 1995)의 경우 많은 copy 수를 확인하였으나 식물재료가 inbred line이 아니며 tetraploid 식물이기 때문에 정확한 copy 수를 단정하기 힘들다는 어려움이 있고 거베라 (Helariutta et al. 1993)의 genome에는 다양한 수의 DFR 유전자가 존재하고 있는 것으로 알려졌으며. 다른 flavonoid 생합성 관련 유전자의 경우 Beld 등 (1989)의 보고에 의하면 페튜니아는 적어도 8개의 CHS 유전자와 2개의 CHI 유전자가 존재하며 *Ipomoea batatas* (Shiokawa et al. 1999)의 경우는 3개의 서로 다른 염기서열을 가진 FHT 유전자를 분리했다는 보고가 있다. 그 외 대부분 식물의 genome에는 단지 하나의 DFR 유전자가 있음이 보고되었다.

**백색인 Bristol Fairy의 Northern blot 분석**

본 실험의 최종 목적은 현재 백색과 핑크색의 색소발현체계를 가진 안개초를 적합한 유전자의 형질전환을 통하여 다양한 색소발현체계를 가진 품종의 육성이므로 기존의 백색 안개초에 대한 발현 검정은 필수적인 기초실험이다. 우선 현재 가장 많이 재배되고 있는 안개초 품종인 ‘Bristol Fairy’에 있어 어떠한 유전자가 blocking되어 백색을 나타내는지 검정하기 위하여 본 실험에서 분리한 안개초의 DFR cDNA를 probe로 사용하여 DFR 유전자의 발현을 Northern blot 분석을 통하여 조사하였다. ‘Bristol Fairy’의 꽃봉오리로부터 mRNA를 분리하고 Northern blot 분석을 수행한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 1.3 kb크기의 강한 signal을 보였고, positive control로 사용한 핑크빛의 색소발현체계를 가진 ‘Flamingo’와 ‘Red Sea’의 경우도 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 분석해 보



**Fig. 8** Radioscan of TLC (Thin Layer Chromatography) on cellulose from DFR assays using [ $^{14}$ C]-naringenin as substrate. **A.** Assay with *in vitro* synthesized DFR using poly(A<sup>+</sup>)RNA from flower buds of wild-type *Gypsophila*. **B.** Assay with crude extract of wild-type *Gypsophila*. as a positive control **C.** Assay with reticulocyte lysate as a negative control. **Lpg:** leucopelargonidin **DHK:** dihydrokaempferol

면 백색의 안개초인 ‘Bristol Fairy’의 DFR 유전자는 적어도 flavonoid 생합성 과정에서 온전하게 발현됨을 알 수 있었다. DFR 유전자를 제외한 다른 flavonoid 생합성 관련 유전자의 blocking 가능성을 추측할 수 있는데 DFR 이후의 유전자인 ANS (anthocyanidin synthase)와 FGT (flavonoid glucosyl transferase) 유전자 중 하나가 blocking 되거나 혹은 double blocking의 가능성도 생각할 수 있다. CHS 유전자의 경우는 진화학적으로 매우 안정되어 있기 때문에 blocking될 가능성이 희박하며, CHI 유전자가 blocking될 경우는 chalcone의 축적에 의해 황색의 색소발현을 나타내므로 역시 blocking될 가능성이 적다 (Heller 1993). 적어도 본 실험에서는 DFR 유전자는 정상적으로 발현하고 있음을 증명하였고 그 밖의 유전자는 계속적으로 분리하고 있으므로 앞으로 분석을 수행할 예정이다.

#### DFR 유전자의 효소 활성 측정

분리한 유전자의 효소활성을 측정하기 위하여 Sephadex G50 column을 통해 Translation mixture를 정제하여 DFR 활성 실험을 수행하였다. DFR 활성은 NADPH를 cofactor로 사용하여 ( $^{14}$ C)dihydrokaempferol(DHK)이 ( $^{14}$ C)leucopelargonidin (Lpg)으로 전이되는 양을 TLC 위에서 측정하였다. Fig. 8의 결과에서 보는 바와 같이 translation products의 경우 작은 leucopelargonidin peak를 나타냄으로써 기대했던 DFR 효소 활성을 보였고 (Fig. 8A), negative control로 reticulocyte

lysate만 넣어준 경우는 전혀 효소 활성을 보이지 않았다 (Fig. 8C). 반면에 positive control로 사용한 ‘Red Sea’의 꽃으로부터 분리한 효소를 사용한 활성 측정의 결과는 translation products 보다 높은 활성을 나타내었다(Fig. 8B). 이러한 결과를 종합하면 분리한 DFR-cDNA는 진정한 DFR 유전자임을 확인할 수 있다.

#### 적 요

Dihydroflavonol 4-reductase(DFR)는 flavonoid 생합성 경로의 가장 중심부에 작용하는 효소로 2R,3R-trans-dihydroflavonols로부터 leucoanthocyanidins 으로의 변환을 촉매한다. 본 연구에서는 색소유전자의 전이를 통하여 새로운 색소발현체계를 가진 품종을 육종하기 위한 기초연구로 안개초 (*Gypsophila paniculata* L.)의 꽃봉오리로부터 cDNA-library를 합성하였고 카네이션의 DFR 유전자를 probe로 사용하여 anthocyanin 합성경로의 중요 효소의 하나인 DFR 유전자를 분리하였다. 염기서열분석을 수행하여 분리 유전자의 크기가 1279 bp이며 이 중 coding region은 1063 bp임을 확인하였다. 이미 밝혀진 다른 식물체의 DFR 유전자와 서로 염기서열의 일치성을 비교해 본 결과 Cheddar pink, 카네이션, 양배추, 개나리, 페튜니아, cup flower, 장미, 과꽃 및 거베라에서 각각 62% 이상을 나타내었다. 분리 유전자의 발현을 확인하기 위하여 Northern blot 분석 및 인위적으로 기내에서의 transcription과 translation을 수행하였고, 분리한 유전자의 효소활성을 측정해 본 결과 leucopelargonidin의 작은 peak를 확인하였다. Southern blot 분석 결과 안개초의 DFR 유전자는 다른 대부분의 식물체와 유사하게 한 개가 존재함을 확인하였다.

#### 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업단의 지원을 받아 수행하였다.

#### 인용문헌

- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, and Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol Biol* 13:491-502
- Bongue-Bartelsman M, O'Neill SD, Tong Y, and Yoder JI (1994) Characterization of the gene encoding dihydroflavonol 4-reductase in tomato. *Gene* 138(1-2):153-157
- Brugliera F, Tull D, Holton TA, Karan M, Treloar N, Simpson K, Skurozynska J, and Nason JG (2000) Introduction of a

- cytochrome b5 enhances the activity of flavonoid 3'5' in transgenic carnation. Sixth International Congress of Plant Molecular Biology. University of Laval, Quebec, 6-8
- Davies K, Bloor S and Spiller G (1998) Production of yellow colour in flower: redirection of flavonoid biosynthesis in petunia. *Plant J* 13:259-266
- Fisher D, Stich K, Britsch L and Grisebach H (1988) Purification and characterization of (+) dihydroflavonol (3-hydroxyflavanone) 4-reductase from flower of *Dahlia varabilis*. *Arch Biochem Biophys* 264:40-47
- Forkmann G and Ruhnau B (1987) Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from flowers of *Petunia hybrida*. *Z Naturforsch* 42c:1146-1148
- Helariutta Y, Elomaa P, Kotilainen M, Seppänen P and Teeri TH (1993) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and characterization of *dfr* expression in the corollas of *Gerbera hybrida* var. Regina (Compositae). *Plant Mol Biol* 22:183-193
- Heller W, Forkmann G, Britsch L and Grisebach H (1985) Enzymatic reduction of dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from *matthiola incana* and its role in anthocyanin biosynthesis. *Planta* 165:284-287
- Joshi CP (1987a) An inspection of the domain between putative TATA box a translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res* 15:6643-6653
- Joshi CP (1987b) Putative polyadenylation signals in nuclear genes of higher plants: a compilation and analysis. *Nucleic Acids Res* 15:9627-9640
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara N, Togami J, Pigeaire A, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG and Tanaka Y (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthesis pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48:1589-1600
- Kristiansen KN and Rohde W (1991) Structure of the *Hordeum vulgare* gene encoding dihydroflavonol 4-reductase and molecular analysis of *ant18* mutants blocked in flavonoid synthesis. *Mol Gen Genet* 230:49-59
- Koes R, De Vetten N and Mol J (2000) Cytochrome b5 from petunia. PCT-international Patent Application No. WO 00/09720
- Krol AR van der, Lenting PE, Veenstra J, van der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM and Stuitje AR (1988) An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333:866-869
- Lee HJ, Nahm SH, Ahn BJ, Joung HY and Min BW (2004) Cloning of cDNA coding for dihydroflavonol 4-reductase (DFR) and characterization of *dfr* expression in carnation petals. *J Kor Soc Hort Sci* 45:49-54
- Logemann J, Schell J and Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal Biochem* 163:16-20
- Manning K (1991) Isolation of nucleic acid from plants by differential solvent precipitation. *Analytical Biochem*. 195:45-50
- Martin C, Carpenter R, Sommer H, Saedler H and Coen E (1985) Molecular analysis of instability in flower pigmentation of *Antirrhinum majus*, following isolation of the pallida locus by transposon tagging. *EMBO J* 4:1625
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G and Saedler H (1987) A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330:677-678
- Min BW, Kim SW, Oh SC and Liu JR (1998) Cloning and characterization of dihydroflavonol 4-reductase (DFR) from *Matthiola incana* R. Br. *Korean J Plant Tissue Culture* 25: 341-346
- Min BW and Park SY (2003) *Brassica oleracea* dihydroflavonol 4-reductase (DFR) mRNA accession number AY228487 EMBL-library
- Min BW (2006) Cloning and expression study of dihydroflavonol 4-reductase from summer aster. *Hort Environ Biotechnol* 47:222-229
- O'Reilly C, Shephard N, Pereira A, Schwarz-sommer Zs, Bertram I, Robertson DS, Peterson PA and Saedler H (1985) Molecular cloning of the *al* locus of *Zea mays* using the transposable elements *En* and *Mu1*. *EMBO J* 4:877
- Rosati C, Cadic A, Duron M, Renou JP and Simoneau P (1997) Molecular cloning and expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase gene in flower organs of *Forsythia x intermedia*. *Plant Mol Biol* 35:303-311
- Ruhnau B and Forkmann G (1988) Flavan-3,4-diols in anthocyanin biosynthesis, enzymatic formation with flower extracts from *Callistephus chinensis*. *Phytochemistry* 27:1035-1039
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Shiokawa K, Murata T, Noguchi H, Hoshino A and Iida S (1999) Ipomoea batatas mRNA for flavanone 3-hydroxyrase, complete cds accession number AB023790 EMBL-library
- Shirley B, Hanley S and Goodman HM (1992) Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. *Plant Cell* 4:333-347
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Stafford HA and Lester HL (1982) Enzymic and nonenzymic reduction of (+)-dihydroquercetin to its 3,4-diol. *Plant Physiol* 70:695-698
- Stich K, Eidenberger T, Wurst F and Forkmann G (1992) Enzymatic conversion of dihydroflavonols to flavan-3,4-diols using flower extracts of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). *Planta* 187:103-108
- Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Holton TA, Higgins E and Kusumi T (1995) Molecular cloning and characterization of *Rosa hybrida* dihydroflavonol 4-reductase gene. *Plant Cell Physiol* 36:1023-1031
- Ueyama Y, Katsumoto Y, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Ohkawa H, Kusumi T, Iwashita T and Tanaka Y (2006) Molecular characterization of the flavonoid biosynthetic pathway and flower color modification of *Nierembergia* sp. *Plant Biotechnol* 23:19-24
- Yagishita Y, Ohya T and Kita N (2000) *Dianthus gratianopolitanus* dihydroflavonol 4-reductase mRNA accession number AF291097 EMBL-library