

## 감귤로부터 분리한 Sucrose Synthase 유전자 특성 분석

김인중<sup>1,2\*</sup>, 김찬식<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> 제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

<sup>2</sup> 제주대학교 방사선응용과학연구소

<sup>3</sup> 제주대학교 아열대농업생명과학연구소

\*교신저자: 064-754-3357(전화)

064-756-3351(Fax)

E-mail: ijkim@cheju.ac.kr

### Genetic Analysis of Sucrose Synthase cDNA from Citrus

In-Jung Kim<sup>1,2\*</sup> and Chan-Shick Kim<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biotechnology, College of Applied  
Life Sciences, Cheju National University, Jeju  
690-756, Korea

<sup>2</sup> Applied Radiological Science Research  
Institute, Cheju National University, Jeju  
690-756, Korea

<sup>3</sup> Research Institute for Subtropical  
Agriculture and Biotechnology, Cheju National  
University, Jeju 690-756, Korea

\*Corresponding author: Tel. 064-754-3357

Fax. 064-756-3351

E-mail: ijkim@cheju.ac.kr

### Abstract

Sucrose synthase regulates the contents of sugar and control the plant development by the catalysis of the cleavage of sucrose. Sucrose content is a key factor determining the fruit quality. In this work we isolated a

sucrose synthase cDNA (*CitSS*) from Citrus cDNA library. The clone is 2892 bp in size and contains an open reading frame encoding 811 amino acids. The sequence analyses indicated that *CitSS* showed a high degree of similarity to dicots sucrose synthase more than those of monocots at the nucleotide and amino acid sequence levels.

### 서론

Sucrose는 광합성 조직인 잎으로부터 발달중인 과일로 수송되는 주요 광합성산물로서 과일에서 6탄당으로 전환된다. 과일로의 sucrose 수송속도는 잎과 과일사이의 sucrose 농도 기울기에 의해 조절되며, 과일내에서 sucrose 함량과 유입 속도 간에는 반비례관계가 있다. 따라서 sucrose를 대사하는 효소는 과일내로의 sucrose 유입을 조절한다고 알려져 있다.

Sucrose synthase는  $\text{sucrose} + \text{UDP} \rightleftharpoons \text{UDP-glucose} + \text{fructose}$ 의 가역반응을 촉매하는 효소로 sucrose를 분해하여 과일내의 sucrose 함량을 낮추어 sucrose 유입과 전분생합성 속도조절에 중요한 영향을 미치는 등의 에너지 대사기작과 대사구조 기능, 저장기능으로의 전이에 중요한 역할을 담당한다. 따라서 sucrose synthase는 과일의 sink 세기를 결정하는데 중요한 역할을 담당하며 과실의 발달에도 영향을 미친다 (Sun et al., 1992).

Sucrose synthase(SS)의 활성을 감소시킨 돌연변이체에 대한 연구는 antisense 유전자를 발현시킨 형질전환 감자(Zrenner et al., 1995)와 벌노랑이(*Lotus japonicus*) (Skot et al., 1997), 토마토(D'Aoust et al., 1999)뿐만 아니라, 옥수수(Chourey and Nelson, 1976)와 완두(Craig et al., 1996)에서도 수행되었다. 옥수수와 감자에서 5%이하의 sucrose synthase 활성의 억제에는 전분함량을 각각 40%와 70%로 감소하였다. Antisense 기법으로 형질전환시킨 토마토의 경우에는 sucrose synthase 뿐만아니라 sucrose phosphate synthase 유전자의 발현도 동시에 감

소하여, 전분축적이 약간 감소한 양상을 보여주었다. 그러나 토마토의 생장률을 감소시켜 성숙시기에 개체당 결실된 과일의 수가 현저하게 감소된 특징을 보여주었다.

Sucrose synthase 유전자는 단자엽인 옥수수(Werr et al., 1985)와 벼(Yu et al., 1992), 보리(Sanchez de la Hoz et al., 1992)에서 분리되었고, 쌍자엽식물인 감자(Salanoubat and Belliard, 1987), 녹두(mung bean) (Arai et al., 1992), 토마토(Wang et al., 1993), 사탕무(Heim et al., 1993), 완두콩(pea) (Buchner et al., 1998)에서도 분리되었다. 옥수수와 보리, 벼 등의 단자엽 식물에서는 2개 내지 3개의 isoform이 분리되었고, 이들은 발현양상과 서열특성에 의해 두 그룹으로 분류되었다. 쌍자엽식물에서도 2개 이상의 유전자가 분리되었고 전체적인 서열과 구조면에서 단자엽식물과는 다른 특성을 보였다.

본 연구를 통해 감귤의 당도와 관련된 효소인 sucrose synthase 유전자를 성공적으로 분리하여 염기서열과 아미노산 서열 수준에서 분석을 수행하였고, 쌍자엽식물 간의 유연관계를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

RNA 추출에 사용한 감귤 품종은 Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa-Wase)으로서 난지농업연구소 감귤연구센터의 노지에서 재배된 것을 사용하였다. 감귤로부터 잎과 과실을 채취하여 본 실험에 이용하였다.

### 2. 감귤 Sucrose Synthase 유전자 단편 분리

전체 RNA는 hot phenol RNA 추출방법에 따라 감귤 과실과 잎에서 추출하였다. SS 유전자의 단편 cDNA를 증폭하기 위해, sense primer로서 DCitSS5(5'-AGTGATGG[A/C]AAC[A/C]TTGTTGC-3')를 사용하였고, antisense primer로 DCitSS3(5'-CTCTCATA[C/T]TGACCAACAGT-3')를 사용하였다. 이들 primer는 오렌지를 비롯한 다른 식물체에서 분리된 SS유전자의 염기서열의 보존된 부위의 서열을 바탕으로 합성되었다.

일차 cDNA의 첫 번째 가닥은 poly(A)+RNA로부터 random primer와 역전사효소에 의해 합성되었다. 이를 주형으로하여 다음과 같은 조건에서 PCR이 수행되었다: 94°C 1분, 50°C 1분, 72°C 30초 (총 30 cycle). 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T vector (Promega)에 연결한 후, 염기서열을 분석하였다. 이 클로닝된 PCR 단편은 궁천온주 cDNA library로부터 SS 유전자의 전체 cDNA를 분리하기 위해 사용되었다.

### 3. cDNA 유전자은행 작성

Poly(A) + RNA를 PolyATtract mRNA Isolation System III (Promega)을 사용하여 전체 RNA로부터 분리하였다. 감귤 fruit cDNA library는 Zap-cDNA synthesis kit와 Gigapack III gold cloning kits(Stratagene)를 이용하여 제조자의 설명에 따라 제작하였다. pBluescript SK+ plasmids로의 *in vivo* excision은 *Escherichia coli* SOLR 균주에서 수행하였다. Library는 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP의 방사선 동위원소로 표지된 PCR 산물을 이용하여, 표준 plaque lift methods에 따라 screening이 수행되었다. Solution A (30% formamide, 5x Denhardt's solution, 5x SSPE, 100 g/ml denatured salmon sperm DNA)의 용액에서 42°C 1시간 내지 2시간 동안 prehybridization을 수행한 후에 probe를 넣고 18시간 동안 hybridization을 수행하였다. 그 후에 막을 2x SSC와 0.05% SDS 용액에서 42°C 15분간 2회, 0.2x SSC와 0.1% SDS 용액에서 68°C 15분간 2회 세척하였다.

### 4. 염기서열 분석

DNA의 염기서열은 dideoxy chain termination 방법에 따라 수행하였으며, 이 때 사용된 primer는 T7 universal primer와 T3 universal primer를 사용하여 cDNA 양 말단의 염기서열을 결정하였고, 연속적인 primer 합성과 염기서열 결정을 통해 전체 염기서열을 완성하였다. 결정된 염기서열은 BlastX와 BlastN, BlastP, Clustal X(version 1.64b) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. SS 유전자 단편 분리

역전사과정과 PCR 과정을 통해 약 250bp 크기의 cDNA 산물을 얻을 수 있었다. 이 산물을 pGEM-T easy vector에 연결한 후, 염기서열을 분석하였다(Fig. 1). 서열을 BlastN과 BlastX 프로그램을 통해 상동성을 분석한 결과, 획득된 PCR 산물은 다른 식물체의 SS 유전자와 높은 상동성을 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과를 종합할 때 확보한 cDNA 단편은 온주밀감의 SS 유전자단편으로 결론내릴 수 있었다.

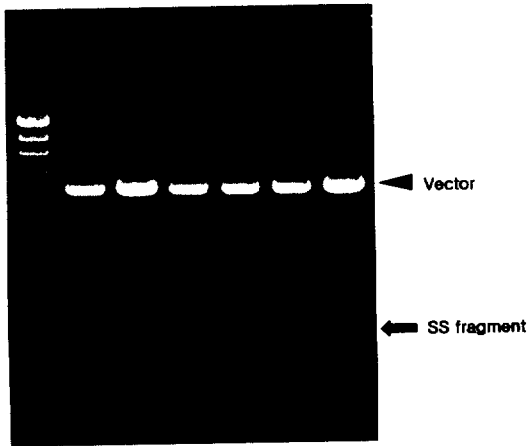


Figure 1. Subcloning of *CitSS* cDNA partial fragment into pGEM-T easy vector. Recombinant plasmid was treated with *EcoRI* restriction enzyme and electrophoresed onto agarose gel (1.0%). The left lane is  $\lambda$ /*HindIII* digest DNA as a size marker.

### 2. SS 유전자의 염기서열 특성

감귤 cDNA library로부터 분리한 SS 유전자의 cDNA(*CitSS*) 크기는 2892 bp였다(Fig. 2 & 3). BlastN 프로그램을 통해 염기서열 수준에서 다른 식물체의 SS 유전자와 상동성을 비교해본 결과 일본배(*Pyrus pyrifolia*)와 BlastN score 1047, 완두콩(*Pisum sativum*)과는 720, 커피(*Coffea arabica*)와는 529의 상동성을 나타내었다. 반면에 단자엽 식물인 옥수수(*Zea mays*)와는 212, 벼(*Oryza sativa*)와는 168의 낮은 상동성을 나타내었다. 이러한 결과는 SS 유전자에 있어서 쌍자엽

유래의 진화적 유연관계를 제시해준다.

이 *CitSS* cDNA는 2436bp의 중단되지 않는 번역역(ORF)를 한개 가지고 있음을 확인하였고(Fig. 3), 이를 통해 811개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하고 있는 유전자임을 알 수 있었다.

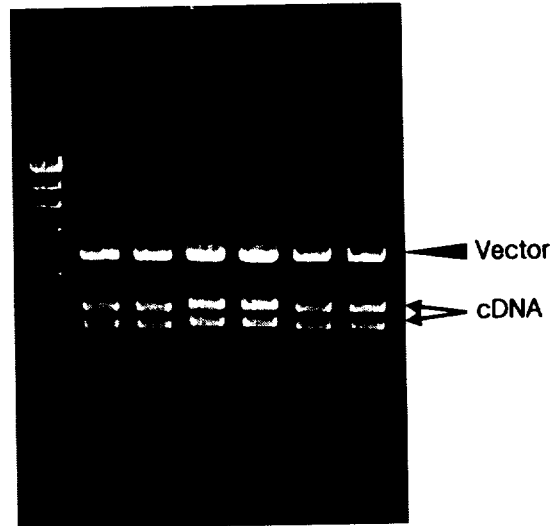


Figure 2. pBluescript SK(+) plasmid containing *CitSS* full-length cDNA. The plasmid was treated with *EcoRI* and *XhoI* restriction enzymes and then electrophoresed onto agarose gel (1.0%). The left lane is  $\lambda$ /*HindIII* digest DNA as a size marker.

### 3. SS 단백질 서열 특성

*CitSS* 단백질의 크기는 약 93 KDa으로서 예상되는 등전점(pI)는 6.04였다. Domain 탐색을 수행한 결과 이 단백질은 sucrose synthase domain과 glycosyltransferase domain의 2개가 발견되었다(Fig. 4). BlastP 프로그램을 이용하여 아미노산 서열 수준에서 상동성을 비교해 보았을 때 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와의 BlastP score가 1479, 일본배와는 1447, 커피와는 1446임을 나타내었다. 그리고 단자엽 식물인 옥수수는 1434, 벼와는 1235임을 확인하였다. 이러한 결과는 염기서열 수준에서와 동일한 결과인 쌍자엽 유래의 진화적 유연관계를 나타내준다.

이러한 유전자는 생명공학기법을 통해 감귤을 비롯한 당도의 제어가 필요한 작물에 도입할 수 있는 유용유전자로 이용될 수 있을 것이다.

GACGAAACCGCACTGTAGTCTTCGCTACTGCCAGSACTTGCACCTGTCACTCCTTG TTTGGTTAACTTTTCTCTTTTGTATGCTGACAGACTCTCTTTTGAACAAGATTGSETG	60 120	YSDGNLVLASLLAYKMGITQC CTATAGTGTGAAACCTTGTTCATCTTTTASCATATAAATGGGAATACCAGTG	434 1440
MAAPKLSRIPSIRE ATTCAGGAGCAACAAATCATGGCAGCCCTAAGCTAAGTCCGATTCCGAGCATCAGAGA	14 180	TIHALEKTKYPPDSDIYWKK CAQCATTGCACATGCATTGGAGAAAACAAAGTACCAGATTGAGATATATATTGGAGAA	454 1500
RVEDTLSVHRNELVSLLSRY GCGGTGGAGGACACTCTCTGTTTCACTAATGAACCTGTTTCTCTCTCCAGETA	34 240	FDEKYHFSCQFTADLIAMNN GTTTGATGAAAAATATCATTTTTTTCATGCCAATTCCTGCTGACCTGATAGCCATGAACAA	474 1560
VAGGKGILOPHYLIDELDNI TGTGGCTCAAGGCAAGGGATTTTGAACCCATGCTACTGATCCAGAGCTTGAATACAT	54 300	ADFIITSTYQEIAGTKNTVG TGCAGATTTTATCATCACAGTACATACCAAGAGATTGCTGGAGCAAAAATACTGTTGG	494 1620
FGDDEGRQMLLRDGPFSEVIK TTTTGGCGAGATGAAGTCCGGCAGAACCTTAGGGATGTCGGTTTAGCGAAGTTATCAA	74 360	QYESHTAFTLPGLYRVVHGI TCAGTATGAGAGCCACACTGCATTCACCTTCCAGGCTTATATCGAGTGTTCATGGCAT	514 1680
SADAEIVLPPFVAIAVYRPRP ACTGCTCAGGAGCGATAGTGTGCTCCGTTTGTGGCTATAGCAGTCCGTCAGAGCC	94 420	DVFDPKFNIVSPGADMDIYF TGATGTTTTTATCCGAGTCAATATTGTGCCCGGGGCGAGCATGGACATTTATTT	534 1740
GVWEYVRVNVYELSVEQLSV AGGTGTTTGGGAATATGTCGCTGTTAATGCTATAGCACTTAGCGTGGAGCACTAAGTGT	114 480	PYSEKQKRLTALHGSIEQLL CCCATACTCTGAAAAGCAGAAAAGACTCACAGCCCTACATGGTGTATAGAGCAGTGTCT	554 1800
SEYLHFKEELYDAAFNERFV TTCGAACTACTCAGTCAAGAGCACTTAGAGTGGGGTAAATGAAGATTGTT	134 540	FDPEQNDENVGTLSDRSKPI GTTTGATGCTGAACAGAAATGATGAGCATGTTGGTACAGTGTATCGGTGGAGCCCAT	574 1860
LELDFEPPFNATFPRPNRSSS GCTTGAAGTGTATTTGACCATCAATGCACTTTCTCCGCGAATCGTGTTCATC	154 600	VFSMARLDHYKNMTGLVECY TGTCTTTTCCATGGCGAGCTTGACCATGTGAAAACATGACAGGTTGGTTGAGTGTGA	594 1920
IGNGVQFLNRHLSSSMFRNK AATTGTAATGGGTTGAGTCCCAACCTCAGCTTTCTCAAGTATGTTCCGCAACAA	174 660	GKNSRLRELVNLVYVAGYID TGTAGAATAGCCGACTGAGGGAAGTAACTGTAGTGTAGCTGTTACATAGA	614 1980
DCLEPLLDFLRAHKYKGHLL AGACTGTTTGGAGCCCTACTGATTTGCTGAGCAGCAGAAATATAAAGGCATCTATT	194 720	VNKS KDREEIAEIEKMHEN TGTAAATAGTCCAAAGCAGAGAGAGATAGCAGAAATGAGAGATGATGAGCTTAT	634 2040
MLNDRIQSISRLLQSSLSKAE GATGTGAATGATCGGATCAAAACATTTCCGCACTCAGTCACTCTGTCCAGGCGAGA	214 780	KTYKLDGQFRWIAAQTNRAR GAAGGATCAAGTTGGATGCTGATTTTGTGGATAGCAGCTCAAAACAAATAGGCGAG	654 2100
DHLSKALPPDTPFSQFEYVLD GGACCATCTTCCAGCTTCCAGCTGATACACCCTTTCTCAGTTTGAATATGTTTACA	234 840	NGELYRYIADTKGAFVQPAF TAATGAGCTCTATGCTATATAGCCGACACCAAGGAGTGTCTTTTGGCAGGCTGCTT	674 2160
GMGFEEKWGDTAEHVLEMMH AGGAATGGTTTTGAGAAAGTTGGGAGACTACTCAGAGCATGCTGCGAGATGATGCA	254 900	YEAFLTLVVEAMTCGLPTFA TTATGAAGCTTTTGGATTAAAGCTTGTGGAGCTATGACTTGTGGACTCCGACATTCGC	694 2220
LLLDILQAPDPSTLEKFLGR TCTTCTGTGATATGCTCAGGCTCCTGATCCCTACATAGAGAAATTCCTTGGAG	274 960	TCHGGPAEIEHGHASGFHID CACTTGCATGTTGGCCCTGCAGAGATATCGAGCATGTTGGGTCAGGTTCCATATGGA	714 2280
LPWFVNVVILSPHGYFGQAN ATTAOCGATGTTTAAATGTTTATCTTGTCCGACATGATATTTGGGCAAGCGAA	294 1020	PYHPDQAAELMADFFGKCKE TCCATATCACCTGATCAAGCTGCTGAACCTATGCCAGATTTCTTGGAAAGTCAAGGA	734 2340
VLGLPDTGGQVYVYILDQVRA TGTTCAGTCTCCCTGACACTGTTGGAGGTTGTTTATATCTGGACCAAGTGGGTGC	314 1080	NPSHWKKISDGGGLKRIYERY AAATCCAGCCATTGGAAAAAATCTCTGACGGAGGCTTAAAGGATTTATGAAGGTA	754 2400
LENEMLLRIKROGLDISPKI TCTGGAGATGAATGCTCTTGAATAAAGAGGCAAGGACTGGACATCTCCCAAAAT	334 1140	TWKIYSERLMTLAGVYGFWK CACTGGAGATTTATCTGAAAGCCTAATGACATGGCTGGGTTATATGTTTCTGGAA	774 2460
LIVTRLIPDAKGTTCNQRLE TCTTATGCTAGTGGTTAATGCTGATGCAAAAGGCACTACTGCAACCAAGGCTTGA	354 1200	YVSKLERRETRRYLEMFYIL GTATGTTCAAACTTGAGAGGCTGAGACCCGAGGTACTTGGATGTTCTACATGCT	794 2520
RVSGTEHTHILRVPRSEK AAGAGTCACTGGAGCAGAACACCCATATTCTGCGTGTCTCTTTAGATCAGAGAAAGG	374 1260	KFRDLVKSYP LASENQH* AAGTTCCGTTGTTGTTGAGTCTGTTCTTTGGCAGTGGAGAACACACTAANGCTC TGTACTCAGGAACTGCTAATAATTACCAGCTACTCCGTAACATAGTGCAAAAT AAGAGTACTTTTGTATGATATGTAATGCTTTATGTTGATGTTAAAGGATATTCG AGTCTCTGACACTTAACTCTCCTGCTATTGTCAGAGTGTTCACATGCTGGCTGTC GTGAAAATTTGATGCTAAGACATTTAATATTTATGTTTCTGTTAGTGGACAT TACTTTAGCAATTAACATCTATTGGGTAATTTAGAGAGGAAATTCGATCCCTCAAG CCCGCATAATA 2892	2580 2640 2700 2760 2820 2880
ILRQWISRFDYWPYLETFTE CAITCTCTGCTGATGCTGAGATGATGCTGCGCTTACTTGGAGCTTACTGA	394 1320		
DVGSEITAELQGFPDFIIGN GGATGTAGGAGGCAATCACTGCTGAATGCAAGGTTTCCCTGATTTATATTGGCAA	414 1380		

Figure 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *CitSS* cDNA isolated from Citrus cDNA library.



Figure 4. Domain prediction of *CitSS* protein. "Sucrose\_synth" and "Glycos\_transf\_1" mean sucrose synthase and glycosyl transferase domains, respectively. Numbers is the length of polypeptide chain of *CitSS*.

사사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2005030103440)과 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

- Arai M, Mori H and Imaseki H (1992) Expression of the gene for sucrose synthase during growth of mung bean seedlings. *Plant Cell Physiol* 33: 503-506
- Chourey PS and Nelson SE (1976) The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutation in maize. *Biochem Genet* 14: 1041-1055
- Craig J, DeJardin A, Handley L, Hedley CL, Wang TL and Smith AM (1996) A mutation that affects sucrose synthase in pea alters the C and N metabolism of seeds and nodules. *Plant Physiol* 111: 139
- D'About MA, Nguyen-Quoc B and Yelle S (1999) Upstream regulatory regions from the maize Sh1 promoter confer tissue-specific expression of the GUS gene in tomato. *Plant Cell Rep* 18: 803-808
- Heim U, Weber H, Baumlein H and Wobus U (1993) A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 191: 394-401
- Salanoubat M and Belliard G (1987) Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (*Solanum tuberosum* L.): preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. *Gene* 60: 47-56
- Skot L., Gordon, AJ, Timms E, James CL, Webb KJ and Mizen S (1997) Down-regulation of sucrose synthase expression and activity in transgenic hairy roots of *Lotus japonicus*. *symbiosis* 22: 241-254
- Sun JD, Loboda T, Sung SS and Black CC (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* 98: 1163-1169
- Wang F, Smith AG and Brenner ML (1993) Isolation and sequencing of tomato fruit sucrose synthase cDNA. *Plant Physiol* 103: 1463-1464
- Werr W, Frommer WB, Maas C and Starlinger P (1985) Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. *EMBO J* 4: 1373-1380
- Yu WP, Wang AY, Juang RH, Sung HY and Su JC (1992) Isolation of rice sucrose synthase cDNA and genomic DNA. *Plant Mol Biol* 18: 139-142
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L and Sonnewald U (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 7: 97-107