항 곰팡이 단백질 유전자 분석에 의한 국내 무 품종간 유연성에 관한 연구

황 철 원*

한동대학교 기초학부(생명과학연구소)

Received July 2, 2007 / Accepted July 19, 2007

Study of Distance Relationships among Domestic Radish (*Raphanus sativus* L.) by Analyzing its Anti-fungal Protein Gene. Cher Won Hwang*. *School of Global Leadership (Institutes of Bioscience and Technology), Handong Global University, Pohang, 791-708, Korea* — To define diversity of domestic radish, we analysis genetic relationship of anti-fungal protein genes from several domestic radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. We have isolated from domestic radish (Baekwoon) anti-fungal protein named RAP[12]. In this report, we isolate RNAs and raw protein from radish seeds then, RT-PCR analysis was done with another known anti-fungal sequences of radish from Gene Bank/EMBL and anti-fungal, anti-yeast activity were done against *Botrytis cinerea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* with it's raw proteins. The anti-fungal activity was shown used all seeds but anti-yeast activity was shown only two seeds (Myungsan, Baekwoon). RT-PCR products (about 0.2 Kb) were not shown only two seeds. To identify the sequencing relationship of the domestic radish, we have cloned and sequenced RAP genes of the radish and analysis the sequence relationship with clustalw program. Thus we report the result that there are some different relationship between domestic radish and known other radish's anti-fungal protein[15].

Key words — Radish (*Raphanus sativus* L.), anti-microbial protein, distance relationship

서 론

무는 전통음식인 김치재료로서 우리민족에게 매우 익숙한 채소이다. 우리나라에는 한사군 때에 들어왔다고 하나 이익의 '성호사설'에 의하면 그 이전으로 추정되며 현재 재배현황은 우리나라의 경우 2002년도 전체 채소면적의 10%에 해당하는 31,387 ha로 예년보다 감소추세이나 여전히 김치재료로서 필요성은 더욱 더 강조되고 있다. 한편 이러한 국내산 무 종자의 지하부 내병성은 계절, 토질에 따라 각각 다르며 국내 유통되고 있는 무의 종자 별 내병성에 관한 품종의 다양성 연구가 필요하다고 생각된다.

지하부식물은 다양한 지하 환경에서 살아가기 위해 많은 천연물질들을 갖고 있으며 특히 지하부의 다양한 미생물의 침입에 대응하기 위해 많은 항균물질(defensin) 가지고 있다 [1,5,8,9,15].

가장 많이 알려진 지하부 식물의 defensin protein으로는 lectins, pathogenesis-related proteins, hydroxyl protein - rich glycoprotein, cyclophilin - like protein, ribosome - inactivating proteins 과 protease inhibitors 등이 있다[13]. Anti-microbial peptide (AMPs)은 insect, mammalian의 그것과 비슷한 구조이지만 식물이나 mammalian 모두에게 nontoxic하며[10,11] 매우 다양한 종류를 나타내고 있다. 또

한 이들 AMPs는 미생물 세포막의 receptor를 매개기구로 하여 세포막이 붕괴되어 항균작용을 하는 것으로 알려져 있으나[6] 아직 확실한 mechanism은 알려지지 않았지만 몇몇 연구가 활발히 진행 중이다[3,4]. Wheat의 AMPs에 관하여는 그 다양성에 관한 연구, 다양성에 따른 Wheat 분류 등의 연구가 진행되고 있으며[16], 무에 관한 국내 재배종과 Wild 집단의 RAPD분석에 의한 유전적 다양성 또한 연구되고 있다 [7]. 저자는 이미 한국산 무 및 씨앗에서부터 항 진균 단백질의 분리 및 이에 대한 항 진균성 이용성에 대해 연구를 하였으며[2,12], 본 연구는 이러한 연구를 바탕으로 국내시판되는 무 씨앗 단백질의 항 진균 정도를 확인하고 항 곰팡이 단백질(KRs-AFP, Korean radish - Anti fungal protein) 유전정보에 의해 국내시판중인 무 품종의 항 진균 관련 유전자를 cloning, sequence 하여 이들의 유연 관계를 비교 분석하고 기존의 Rs-AFP와 유연성에 관한 분석 결과를 보고한다.

우선 본 연구에 사용된 항 진균 및 항 효모활성 측정을 위한 조 단백질 분리를 위해, 20 mM Tris - HCl (pH 8.0)을 첨가한 무 종자 분쇄 액을 4℃에서 1일간 침지시킨 다음, 거즈 및 여과지를 통해 1회씩 거른 후 얻어진 여 액을 12,000 rpm에서 원심 분리하여 0.4 µm 여과 막을 통해 고형물을 제거한 후 조 단백질 용액을 얻어냈다. 조 단백질 용액을 각 종 항 곰팡이 실험에 사용하였으며 이후 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다.

항 곰팡이 (*Botrytis cinerea*) 항 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*) 활성 측정을 위해 Disk assay 방법이 [14] 사용되었다.

*Corresponding author

Tel : +82-54-260-1304, Fax : +82-54-260-1319

E-mail : chowon@handong.edu

100 μ l 의 *Botrytis cinerea*의 포자 현탁액을 PDA plate에 도말 한 후 Disks로 접촉 시키고 그 위에 sample을 흡수시켜 24°C에서 약 72시간 배양 후 inhibition zone을 특정 하였다.

항 효모활성 측정에는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*를 전 배양 후 100 μ l를 취해, 하루 본 배양 시킨 다음 12시간 켜 의 배양액을 100 μ l 취해 항 곰팡이 test와 같은 방법을 사용하였다.

국내 시판 무의 항 진균 단백질의 유전자를 획득 하기 위해 농가에서 재배되고 있는 각종 무 종자 Songbaek, Myungsan, Jangwon, Palkwang, Beakja, Chungwoon, Baekwoon (Nongwoo Bio Co., Suwon, Korea) 50 g을 수세 후 20배 부피의 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충액을 첨가 하여 상용 Homogenizer를 사용하여 분쇄한 후 iNtRON사의 (iNtRON. Co., Sungnam, Korea) easy - Blue™ Total RNA extraction Kit를 사용하여 RNA시료를 제조하였다. 이렇게 제조된 RNA 시료로부터 Anti fungal protein encoding gene 을 Taq DNA polymerase를 사용하여 PCR amplification 하였다. Gene Bank/EMBL (NCBI, USA)상에서 획득한 항 곰팡이 단백질 서열을 토대로 AMPs의 degenerating primer를 제작하였으며 (Table 1) cloning을 위해 sense primer에는 NcoI site를 anti sense primer에는 XhoI 을 site를 삽입하여 pET-28a plasmid (WWW.Promega.com)를 이용하여 cloning 하였다. 선별된 clone들은 DNA sequencing 통해 open reading frame의 in - frame을 확인하였으며, 또한 다중 염기서열 분석을 수행하였다.

염기서열 분석된 DNA 단편의 sequence를 FASTA format 으로 정리한 뒤 pairwise alignment 및 유연성(distance)를 관찰하기 위해 Clustal W program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)을 통해 분석하였다.

저자는 이미 무 씨앗 (Baekwoon) 에서 항 곰팡이 단백질을 분리하여 MALD-ToF mass spectrometry 이용한 PMF 분석에서 이미 발표된[15] 항 곰팡이 단백질 (Rs-AFP) 와 많은 상동성이 있음을 보고 한 바가 있다.[12] 이에 본 연구에서는 먼저 이들 종자로부터 분리한 조 단백질을 이용하여 항 곰팡이 및 항 효모 활성을 확인 하고 또한 각 종자로부터 분리한 Total RNA시료와 Table 1의 Primer를 이용하여 RT- PCR

Table. 1. Degenerating primer used for cloning KRAs-AFP genes from Gene Bank/EMBL (AMPs)

Primer name	Sequence(5'-3')	
RAPf	cgt toc atg gcY aag ttt gYK tcY act	Sense primer
RAPr	cgt toc tcg aga caW ggR aaR taR cag ata cac	Antisense primer

Table 2. The list of antimicrobial activity from seed protein and genetic products by PCR amplification from seed total RNA.

Seed name	Symbol	^a Antiyeast	^a Antifungal	^b PCR amplification
Songbaek	A	—	+	+
Myungsan	B	+	+	—
Jangwon	C	—	+	+
Palkwang	D	—	+	+
Baekja	E	—	+	+
Chungwoon	F	—	+	—
Beakwoon	G	+	+	+

^aFor the antimicrobial test, the seed crude extracts (freezing dried) were diluted with distilled water and tested at the concentration of 10 mg/disks, respectively.

^bFor PCR amplification, the degenerating primer from Gene Bank/EMBL (Table1) for cloning KRAs-AFP genes was used.

amplification을 행한 반응 결과를 Table 2에 나타내었다.

PCR반응의 경우 약 0.2 kb의 product가 Myungsan과 Chungwoon을 제외한 모든 종자에서 검출 되었으며 항 효모 활성은 Myungsan과 Baekwoon에서만 검출되었다. 이와는 달리 각 시료의 항 곰팡이 (*Botrytis cinerea*) 활성은 항 효모와는 달리, 사용된 모든 시료에서 검출되었다. Terras등[15]에 의해 분리된 Rs-AFP1, Rs-AFP2, Rs-AFP3, Rs-AFP4는 항 곰팡이 활성은 나타내나 항 효모활성은 나타나지 않은 것으로 알려져 있어 Myungsan과 Baekwoon 그리고 Chungwoon에서 나타난 항 곰팡이 단백질의 특성은 기존의 Rs-AFP와는 다른 단백질일 가능성을 시사하였으며 특히 Myungsan의 경우 본 실험에서 사용된 primer에 의한 RCR 반응에도 산물이

Fig. 1. Multiple alignment of amino acid sequences cloned KRAs-AFPs

Fig. 2. Genetic neighbor-joined by between KRs-AFP clone and Rs-AFP [15]

검출되지 않아 기존의 AMPs들과는 전혀 다른 것임을 시사하였다. 그러나 Chungwoon의 경우 항 효모 및 항 곰팡이 활성은 조 단백 실험에서 나타나나 기존의 Rs-AFP 유전자를 주형으로 한 PCR 반응이 나타나지 않아 단백질의 활성화에 관한 추가 실험이 요구된다고 할 것이다.

이렇게 확보한 0.2 Kb의 PCR산물 (5개 품종 에서만 PCR산물 검출) 을 pET-28a 의 cloning site에서 cloning한 후 이들 clones (약 30개) 중 무작위로 각 종자의 7개 Clone을 염기분석 하여 아미노산 서열을 다중 정렬한 결과를 Fig. 1에서 나타내었다.

그림에서 보듯이 30잔기의 Signal peptide를 가진 총 80개의 아미노산으로 된 서열로 각 품종간의 유사성이 매우 높음을 나타내었다.

지하부 작물인 무의 경우 많은 항 곰팡이 단백질의 유전자가 cloning되어 그들의 유전적 정보가 제공되고 있다[15]. 이들의 유전적 다중적 서열을 Gene Bank상에서 확인 후, 본 연구에서 획득한 항 곰팡이 단백질의 유전자 염기서열에서 유추된 아미노산 서열을 pairwise alignment하여 상호 유연성(distance)를 관찰하기 위해 Clustal W program (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)을 통해 분석하였다.

그 결과, Palkwang무로 부터 얻어낸 clone pRAP D1은 Rs-AFP2와 매우 유사한 경향을 보여 동종의 항 진균 단백질을로서 추정되며 나머지는 0.01이내의 distance를 보여 국내 시판 무의 항 진균 단백질은 Terras등[15]에 의해 분리된 Rs-AFP 와는 다름을 시사 하였다. (Fig. 2)

특히 본 연구에 사용된 primer에 의해 clone된 것들 중 항 효모 활성을 가지는 Baekwoon의 pRAP G3 clone은 항 효모 활성도 가지고 있어 기존에 발표된 항 곰팡이 단백질과는 그 유전적 특성이 매우 다름을 시사하여 향후 이들 단백질의 항 곰팡이 mechanism의 차이 또한 매우 흥미롭게 생각된다.

이상에서 살펴보았듯이 국내 시판 무의 항 곰팡이 특성은 이미 알려진 항 곰팡이의 그것과는 유전적 특성이 다름을 알 수 있고 국내 시판 무끼리도 약간의 유연성은 보이나 상기 결과를 토대로 이들의 항 곰팡이 내병성의 정도는, 앞으로

재배 토질과 기후에 따른 정밀한 재배 실험을 병행함으로써 보다 정확한 결과를 기대할 수 있을 것이다.

요 약

국내 시판 무 (Baekwoon) 의 씨앗으로부터 항 진균 단백질을(RAP-1,2)분리 하였으며[12] 이들 항 진균 단백질을 MALDI-TOF실험결과, 2S storage albumin, Rs-AFP등 지하부 식물의 defensin protein과[15] 일치함을 확인하였고 이에 시판되는 7종의 각각의 무 씨앗으로부터 조 단백질과 Total RNA를 분리하여 항 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*.) 및 항 곰팡이 (*Botrytis cinerea*) 에 대한 항 진균성을 실험한 결과 항 곰팡이 활성은 모든 품종에서 보였으나 항 효모 활성은 2종 (Myungsan, Baekwoon) 의 무에서만 보였다. 또한 기존에 알려진 항 진균 단백질 (Rs-AFP)의 유전자를 Gene Bank/EMBL 에서 획득하여 씨앗으로부터 분리한 Total RNA에 RT-PCR한결과, 7종 중 2종은 0.2kb 의 산물이 보이지 않았다. 이들 Ks-AFP 유전자산물을 염기서열을 분석하였으며 이 염기서열에서 얻어진 아미노산 서열을 Clustal W를 이용한 pairwise alignment 분석에 의해 국내 시판 무의 품종간 각clone의 계통수를 분석한 결과를 보고한다.

감사의 글

본 연구는 농특 과제 (202068-03-3-SB010) 사업 일환으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Broekaert, W. F., B. P. A. Cammue, M. F. C. De Bolle, K. Thevissen, G. W. De Samblanx and R. W. Osborn. 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. plant Sci.* 16, 297-323.
2. Choi, Y. H. and C. H. Hwang. 2005. The biochemical properties of Korean radish (*Raphanus sativus* L.) and its

- seed protein as a natural preservative: The influences on antigenotoxicity and cytotoxicity. *J. Life Science* **15**(4), 561-565.
3. Colilla, F. J., A. Rocher and E. Mendez. 1990. Gamma - purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS Lett.* **270**, 191-194.
 4. Douliez, J. P., S. Jegou, C. Pato, C. Larre, D. Molle and D. Marion. 2001. Identification of a new form of lipid transfer protein (LTP1) in wheat seeds. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1805-1808.
 5. Garcia, O. F., P. Rodriguez Palenzuela, A. Molina, J. M. Alamillo, E. López Solanilla, M. Berrocal Lobo and C. Poza Carrión. 2001. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* **498**, 219-222.
 6. Hnacock, R. E. W. and R. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *TBTECH* **16**, 82-86.
 7. Hur, M. K. and Oh. Ohnish. 2003. Genetic diversity and relationship among natural and cultivated population of radish in Korea revealed by RAPD. *Korean J. Genetics* **25**(2), 119-125.
 8. Kim, K. Y., M. Davison and H. J. Chung. 2000. Antimicrobial effectiveness of pine needle extract on food borne illness bacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 227-232.
 9. Leah, R., H. Tommerup, I. Svendsen and J. Mundy. 1991. Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J. Biol. Chem.* **266**, 1564-1573.
 10. Osborn, R. W., G. W. De Samblanx, K. Thevisson, I. Goderis, S. Torrekens, F. Van Leuven, S. Attenborough, S. B. Rees and W. F. Broekaert. 1995. Isolation and characterization of plant defensin from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae*. *FEBS Lett.* **368**, 257-262.
 11. Ovalia, M., C. C. Hager and T. N. Oeltmann. 1990. An antimelanoma - barley ribosome inactivating protein conjugate is cytotoxic to melanoma cells in vitro. *Anticancer Drug* **10**, 671-675.
 12. Park, J. H., H. K. Shin and C. W. Hwang. 2001. New antimicrobial activity from Korean radish seeds (*Raphanus sativus* L.) *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 337-341.
 13. Selitrennikoff, P. C. 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2883-2894.
 14. Seo, Y. W., K. W. Cho, H. S. Lee, T. M. Yoon and J. H. Shin. 2000. New polyene macrolide antibiotics from *Streptomyces* sp. M90025. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 176-180.
 15. Terras, F. R. G., H. M. E. Schoofs, M. F. C. De Bolle, F. Van Leuven, S. B. Rees, J. Vanderleyden, B. P. A. Cammue and W. F. Broekaert. 1992. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* **267**, 15301-15309.
 16. Tsezi, A. Egorov, O. Tatyana I., P. Vitaliy A. and G. Eugene V. 2005. Diversity of wheat anti - microbial peptide. *PEPTIDE* **26**, 2064-2073.