토마토 (*Solanum lycopersicum*) 과육의 숙성정도에 따른 peptide:N-glycanase 발현 분석

위수진 · 박기영

Characterization of peptide:N-glycanase from tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits

Soo Jin Wi · Ky Young Park

Received: 11 September 2014 / Revised: 15 September 2014 / Accepted: 15 September 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract In eukaryotes, proteins that are secreted into ER are post-translationally modified by *N*-glycosylation, the patterns of which are significantly different between plant and animal cells. Biotechnology industry has already produced a number of therapeutic glycoproteins in plant cells. However, the aberrant glycosylation of therapeutic recombinant proteins in plant systems can cause immune problems in humans. Therefore, it is important to develop strategies for producing non-glycosylated forms to preserve biological activity and native conformation by a peptide: *N*-glycanase (PNGase). In this study, we try to isolate *PNGase T* gene from tomato, which can use as a platform plant for biotechnology industry. We isolated a cDNA (GenBank Accession number KM401550) from tomato leaves with 1,767 bp, which encoded a polypeptide of 588 amino acids with a predicted molecular mass of 65.8 kDa. We also investigated the expression patterns of *PNGase T* during fruit ripening of tomato. The transcripts of *PNGase T*, which were constitutively induced in tomato fruit from green stage, were significantly increased and reached a peak at orange stage. After which, those transcripts were continuously reduced. The expression pattern of *PNGase T* was coincided well with transcripts profiles of metacaspase gene, *LeMCA*, and senescence-related gene members of ACC synthase, *LeACS2*, *LeACS4*, and *LeACS6*, for ethylene biosynthesis during fruit ripening. These results suggest that *PNGase T* is

involved in a de-glycosylation process associated with senescence and fruit ripening.

서론

Peptide:*N*-glycanase (PNGase 또는 glycoamidase, peptide-N⁴-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)asparagine amidase; EC 3.5.1.52)는 식물, 동물 및 미생물 등 거의 모든 생물체에 존재하는데 *N*-결합형 당단백질(glycoproteins/glycopeptides)의 β-aspartyl-glycosylamine 결합을 가수분해시키는 효소이다(Suzuki et al. 2002). PNGase의 작용에 의하여 당단백질의 아스파라긴산 잔기의 NH₂에 결합되어 있는 *N*-결합형 당사슬이 분리된다. PNGase는 아몬드 종자에서 PNGase A가 처음 분리된 이후(Takahashi, 1977; Taga et al. 1984) 박테리아인 *Flavobacterium meningosepticum*에서 PNGase F (Plummer et al. 1984)가 분리되었으며 이후 수많은 종의 박테리아를 비롯하여 효모(PNGase Y) 및 다양한 식물과 동물 모두에서 PNGase가 분리되었다.

당질화(glycosylation)는 진핵단백질이 번역된 후 일어나는 가장 중요한 변형의 하나로서 모든 진핵세포에서 일어난다. 세포부착에 관여하는 단백질을 비롯하여 세포 인지에 관여하는 항체에 이르기까지 매우 다양한 생리적 기능을 갖는 당단백질이 존재한다. 당단백질의 생리적 기능은 일반적으로 단백질의 아스파라긴산 잔기에 부착되어 있는 oligosaccharide의 종류에 따라 다르게 나타난다.

당질화는 소포체 막의 세포질 쪽에서 돌리콜(dolichol) 지질에 부착된 당사슬이 합성되기 시작한 후 이것이 소포체 루멘 속으로 유입되어 당사슬 합성이 완성된 후 아스파라긴산-X-세린/트레오닌의 아미노산 서열 모티프(NxS/T)

S. J. Wi · K. Y. Park (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 생물학과
(Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon,
Chonnam 540-742, Korea)
e-mail: plpm@suncheon.ac.kr

에 존재하는 아스파라긴산 잔기에 아마이드 결합(amide bond, N-glycosylation)을 통하여 단백질에 결합하여 당단백질을 이루게 된다(Song et al. 2011). 당사슬이 지질로부터 단백질로 이동되는 과정은 단백질이 번역되어 분비되기 위해 소포체 속으로 이동되는 과정에서 일어난다. 분비되는 단백질에 존재하는 NxS/T 모티브의 약 70% 정도에서 실제 당질화가 일어난다(Mellquist et al. 1998).

이렇게 형성된 당단백질은 골지체에서 종에 따른 특이적 변형이 일어나는데 식물에서는 여러 개의 만노오스(mannose)가 결합된 구조에서 만노오스 한개가 mannosidase에 의해 잘려 나간 후 *N*-acetylglucosaminetransferase 1에 의해 *N*-acetylglucosamine moiety가 만노오스에 결합한다. 이 반응은 이후 두 종류의 당사슬이 형성되는 반응이 이어진다. 한가지 반응은 α -1,3 결합으로 fucose 잔기가 첫 번째 *N*-acetylglucosamine에 결합하거나 혹은 만노오스 끝에 β -1,2 xylose가 결합하는 반응이 일어난다(Song et al. 2011). 그러나 동물의 당단백질에서는 α -1,3 fucose 대신에 α -1,6 fucose가 *N*-acetylglucosamine에 결합하고 이후 당사슬에 β -1,4 galactose가 추가된다. 이후 골지체를 거치면서 매우 다양한 당사슬이 추가되어 최종적으로 조직 특이적인 당단백질이 생성된다. 동물의 당단백질을 탈당질화(deglycosylation)시키는 효소인 PNGase F는 식물의 α -1,3 fucose가 결합된 식물의 당사슬은 인지할 수 없다.

진핵세포에서 소포체나 혹은 골지체에서 만노오스에 의한 당질화는 단백질의 접합에 영향을 주게 된다(Helenius and Aebi 2004). 동물세포에서 단백질의 당사슬은 생리적 역할이 많이 연구된 것은 아니지만 일반적으로 수용체 결합, 세포 신호, 단백질 접합, 세포 내 구획 이동 및 분포, 단백질 안정성, 면역반응인지, 내포작용, 염증반응 및 병원성에 관여하는 것이 보고되고 있다(Song et al. 2011). 그러나 식물세포에서의 당단백질의 생리적 기능에 대해서는 연구된 내용이 더욱 없는 편이다. 식물 세포에서의 당단백질의 역할은 당단백질로 이루어진 효소의 촉매활성, 열안정성, 단백질 접합, 세포 내 구획 이동 및 분비 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 연구 결과를 보면 병원균 인지를 비롯하여 세포간의 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지며 조직의 분화 등에도 생리적 기여를 할 것으로 예상되고 있는 정도이다(Haweker et al. 2010). 특히 탈당질화 과정을 거쳐서 생성된 유리형의 *N*-당사슬이 분화와 발달 등 생장에 중요한 생리적 역할을 수행할 것으로도 예측하여 볼 수 있다. 진핵세포에서는 분비될 목적으로 새롭게 합성되는 단백질은 새로 생성된 단백질의 3차 구조가 정확하게 만들어졌는가를 판단하는 질적 평가 단계가 소포체에서 진행되는데 만약 단백질의 접합에 오류가 발생되면 이를 분해시켜 제거하는 과정인 소포체 매개 분해과정(ER-associated degradation, ERAD)을 거치게 된다(McCracken and Brodsky

1996). 접합에 오류가 발생한 당단백질은 ERAD 단백질 복합체에 결합되어 세포질로 이동한 후 PNGase에 의해 β -aspartylglucosaminyl 결합이 가수분해 됨으로써 당사슬이 제거되며 이후 당 사슬이 제거된 단백질은 proteasome에 의해 분해된다(Plempner and Wolf 1999).

최근 치료용 단백질과 항체들이 유전자 재조합 과정을 거쳐 발현용 숙주로서 대장균이나 효모에서 생산되었지만 당질화 패턴이 인간의 당단백질과는 다르게 나타나고 있다. 따라서 높은 단백질 활성과 고유의 단백질 구조를 요구하는 고부가가치 의약품 당단백질은 인간과 당사슬 부착이 유사한 동물세포를 이용하여 생산하고 있다.

그러나 최근 동물 유래 병원성 단백질이나 바이러스의 인체 감염 가능성이 증가하면서 동물세포에서 생산되는 재조합 의약품 단백질의 오염가능성에 대한 우려가 높아져 가고 있다. 따라서 이러한 우려에 대한 대안으로서 의약품 재조합 단백질을 비교적 동물 유래 병원성 단백질이나 바이러스 오염으로부터 안전한 식물시스템을 이용하기 위해 식물생명공학을 활용하는 시도들이 증가하고 있다. 또한 식물생명공학적 방식의 재조합 단백질 생산은 동물세포를 활용하는 것보다 비교적 경제성도 우수한 것으로 분석되고 있다.

식물세포에서 생산된 재조합단백질은 당질화 유형은 세포질에서 이루어지는 과정은 동일하지만 골지체에서 진행되는 당질화 과정은 종 특이성이 높기 때문에 동물 세포에서 진행되는 당질화 유형과 상당히 다른 유형을 띠게 된다. 특히 식물세포 특이적인 당질화가 부가되어 생산된 재조합 단백질은 인체에서 면역반응을 야기할 가능성이 있다. 필요에 따라서는 당단백질의 당사슬을 제거해야 하는 경우도 존재한다. 특히 식물에서 비정상적인 유형의 당질화가 일어났을 경우 재조합 단백질의 생리적 특성을 유지하고 고유의 단백질 구조를 유지하기 위해서는 당단백질에서 당사슬을 절단하는 과정이 필요하다(Mamedov et al. 2012).

그 동안 많이 활용되고 있는 당사슬을 제거하는 효소로는 박테리아(*Flavobacterium meningosepticum*)에서 유래한 PNGase F를 주로 사용하고 있는데 PNGase F는 식물에서 생성된 당단백질의 α -1,3 fucose 당사슬은 제거할 수 없다(Tarentino and Plummer 1981). 따라서 식물을 이용한 유전자 재조합 단백질의 경우 *N*-acetylglucosamine에 α -1,3 fucose 결합 당사슬을 절단하기 위해서는 미생물 유래의 PNGase F와는 다른 식물의 아몬드 종자에서 분리된 PNGase A를 활용하고 있다(Altmann et al. 1998). 아몬드로부터 정제되어 판매되고 있는 PNGase A는 비교적 고가이며, PNGase F와는 달리 당단백질의 전처리로서 펩티드 상태로 전환시키는 과정을 필요로 한다(Kolarich and Altmann 2000). PNGase A의 이러한 한계점을 극복하기 위하여 효모인 *Yarrowia lipolytica*로부터 PNGase를 분리하여 활용하려는

시도(특히 10-2012-0053963)를 비롯하여 다양한 연구들이 진행되고 있으나 PNGase의 효소활성이나 분자생물학적 조절에 관련한 연구는 거의 없는 실정이다.

이 논문에서는 분자농업에서 의약품단백질 생산에 많이 활용되고 있으며 PNGase의 염기서열 정보가 보고되어 있는 토마토로부터 PNGase의 유전자를 분리한 후 토마토의 과육에서 PNGase의 발현 정도를 분석하였다. 이는 PNGase의 근본적인 작용기작을 이해하는데 많은 도움이 될 것이며, 토마토를 이용한 분자농업에 활발하게 이용될 수 있을 것이다. 즉, 토마토의 과육에서 PNGase의 활성이 높은 시점에서 분리 정제된 재조합단백질은 비교적 당질화 정도나 낮아졌을 가능성이 있어 추가적인 탈당질화 과정을 수행하지 않아도 될 것을 가정해 볼 수 있다. 또한 가지과 식물인 담배 식물체에도 PNGase T의 유전자를 도입한 후 재조합단백질의 유전자를 도입하여 발현시킨다면 추가적인 탈당질화 과정이 생략될 가능성도 추측하여 볼 수 있다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에서는 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv Micro Tom) 잎에서 분리한 total RNA로부터 합성된 cDNA를 전남대학교에서 분양받아 토마토 PNGase 유전자 분리에 사용하였다. Quantitative real time RT-PCR 분석을 위한 재료는 부여 토마토시험장에서 분양받은 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv Styx TY) 과육으로부터 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 사용하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

Total RNA 분리는 액체질소하에서 약 0.1 g의 조직을 막자사발로 완전히 마쇄한 후 1 ml의 TRI Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc.)와 30초간 혼합한 뒤 실온에서 5분간 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻는 상등액을 새 tube에 옮기고, 0.1 ml의 BCP (1-bromo-3-chloropropane)를 첨가하여 30초간 혼합하고, 5분간 실온에 방치하였다. 4°C, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리를 재차 수행하여 얻은 상등액을 새로운 tube에 옮기고 0.5 ml의 isopropanol을 첨가하여 상온에서 10분간 RNA를 침전시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전된 RNA pellet은 70% 에탄올로 세척하였고 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 증류수에 녹여 spectrophotometer (UV-1601; Shimadzu, Japan)를 이용하여 RNA 순수도 및 양을 확인한 후 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다. 유전자 클로닝 및 유전자 발현 분석을 위해 필요한

1st strand cDNA는 PrimeScript[™] 1st strand cDNA synthesis kit (Takara Bio Inc. Japan) 를 사용하여 합성하였다. cDNA 합성의 주형으로는 1 µg의 total RNA를 사용하였으며, oligo dT primer를 사용하여 1st strand cDNA를 합성하였다.

cDNA 클로닝과 염기서열 분석

합성된 cDNA를 이용하여 토마토 게놈 [Locus: LOC100316898 [3,613,961 nucleotide (nt)~3,616,373 nt, GenBank accession No. NC_015447]에 위치해 있는 PNGase 유전자를 outer primer (forward, 5'-TCTACAGTATATTTTAGTCA-3'; reverse, 5'-AGCTTTAGCAGCAAATGAGTG-3')와 inner primer (forward, 5'-CCATGGCTATGGCTGCCTCTCTTCC-3'; reverse, 5'-TCTAGATCAACCAGGAAGAGACCGC-3)를 제조하여 nested PCR 반응을 통하여 증폭하였고 PCR[®] 4-TOPO cloning kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 plasmid에 삽입하였다. 완성된 plasmid를 열충격 방법으로 대장균 *DH5α*에 도입한 후, 항생제 screening을 거쳐 배양한 다음 plasmid midi kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid는 전기영동으로 분리하고 염기서열을 확인하였으며 NCBI에 유전자를 등록하였다(GenBank accession No. KM401550).

Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 분석

Real time qRT-PCR 분석을 위하여 토마토 열매의 성숙 과정을 6단계의 stage를 나누어 조직을 수확하였는데 1단계는 mature green (MG), 2단계는 Turning (T), 3단계는 Orange (O), 4단계는 Orange-Red (OR), 5단계는 Light-Red (LR), 6단계는 Mature Red (MR)로서 구분하였다. 각 단계의 토마

Table 1 Sequences of oligonucleotide primers for real-time qRT-PCR

Gene	Strand	Sequence
<i>LeActin</i>	Forward	CATGTTCCCTGGTATTGCTGA
	Reverse	ATCCTCCAATCCAGACACTGT
<i>PNGase T</i>	Forward	TGATGGGTTGTGGTTTGAGATT
	Reverse	ATTAGGTGGATTCCCATTCCAA
<i>LeMCA</i>	Forward	TCGTTACGGATTGCTGAGGAAGACA
	Reverse	AGCAGGTAACCTAGTTCATGTCCA
<i>LeACS2</i>	Forward	CGAGGATTCGGAGGTCGTAGGTGT
	Reverse	GGTGAGGGAGGAATAGGTGACGAAAG
<i>LeACS3</i>	Forward	CTATCCTGGATTCGATAGAGACCTCA
	Reverse	GGTTGGTCACTAGAACACCTTTCACT
<i>LeACS4</i>	Forward	GCAAGGATTCGGATGTTTATGGATGC
	Reverse	TGCTCGCACTACGAGCGAGGAATTG
<i>LeACS6</i>	Forward	TGATCCTGGTGTATGCATTTCTAGTTC
	Reverse	CTTCTTCTAAGGCTTCTTTGTTACC

토 열매에서 total RNA를 추출하여 cDNA 합성에 사용하였다. qRT-PCR을 이용하여 분석하고자 하는 유전자들의 특이적 primer는 제조사의 제작방법을 이용하여 제작하였고(Tabel 1), real-time qRT-PCR 분석은 Chromo 4TM Continuous Fluorescence Detector (MJ Research, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. Strip PCR tube에 iQTM SYBR[®] Green supermix (2×, Bio-Rad, USA) 10 µl, Forward primer 0.25 µl, Reverse primer 0.25 µl, 합성한 cDNA 1 µl를 넣고 20 µl가 되도록 DEPC로 처리한 멸균수를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 15분 동안 holding 후 95°C에서 30초, 57°C에서 30초, 72°C에서 30초로 45 cycle 반응시킨 후 72°C에서 10 분간 처리하였으며, 95°C에서 65°C까지 0.2°C 간격으로 1초씩 melt curve stage를 진행하였다. 데이터 분석은 Opticon MonitorTM software version 3.1 (MJ Research, MA, USA)을 이용하여 Applied Biosystems에서 제공한 Delta Delta CT 값을 기준으로 계산하여 비교하였다.

결과 및 고찰

토마토의 과육에서 *PNGase T* cDNA 분리 및 유전자 분석

탈당질화는 식물 세포에서 당단백질을 분해하는 과정으로서 단백질의 접힘 오류가 발생할 때 오류가 생긴 당단백질을 분해하는 과정에서 일어나지만 탈당질화 과정이나 혹은 이의 산물인 N-당사슬이 식물의 분화와 발달이나 생장 등의 생리적 과정에서 작용하는 역할에 대해서는 거의 연구된 바가 없다. 만노오스의 연쇄결합이 긴 유형의 N-당사슬의 양이 토마토 과육의 숙성 과정에서 증가한다는 연구보고가 있어(Nakamura et al. 2009) *PNGase*의 생리적 기능을 연구하기 위하여 우선 토마토 과육으로부터 *PNGase* cDNA를 분리하고자 하였다.

토마토 게놈(Locus: LOC100316898 [3,613,961 nucleotide (nt) ~ 3,616,373 nt, GenBank accession No. NC_015447)에 위치해 있는 *PNGase* 유전자 정보를 활용하여 *PNGase* 특이적 primer를 제작하여 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv Micro Tom) 잎에서 분리한 total RNA로부터 합성된 cDNA를 주형으로 사용하여 nested PCR을 수행하여 *PNGase T*의 full length cDNA를 분리하였다(Fig. 1). 분리된 *PNGase T*의 ORF는 총 1,767 bp, 588개의 아미노산으로 이루어져 있었으며 예상된 분자량은 65.8 kDa이었으며, 예상된 pI 값은 8.69로 조사되었다.

Micro Tom 토마토 품종으로부터 분리된 *PNGase T*의 염기서열은 분석하는데 사용한 프라이머의 유전자 정보를 제공하였던 heinz 1706 토마토의 10번 염색체에 존재하는 *PNGase* 유전자와(GenBank accession No. NW_004194361)는 뉴클레오타이드 염기 1개가 달랐다. 그러나 Momotaro

토마토 품종에서 분리된 *PNGase-Le* (GenBank accession no. FJ804752)의 유전자 염기서열 정보와 비교하여 보면 (Hossain et al. 2010) ORF의 염기서열 1,767 bp 중 3개의 염기가 달랐으나 아미노산 서열은 588개 중 586개가 동일하여 99.7%의 동일성을 나타내었다. *PNGase T*의 N 말단 부위에는 ribosome을 소포체로 표적시키는 21개의 아미노산으로 이루어진 signal sequence가 존재하였다. 당단백질의 N-당질화 부위인 아스파라긴산-X-세린/트레오닌의 아미노산 서열 모티프(NxS/T)는 총 9개(아미노산 서열 부위 266, 386, 397, 447, 481, 489, 551, 556, 570)가 존재하였는데 이는 10개의 N-당질화 부위가 존재하는 *PNGase-Le*

```

ATGGTGCCTCCTCTTCCATTTTCTTAGTTTATTTCTGCTACCCCTTATTTTCCACAGCA 1
M A A S S S S I F L V Y F L L P L F S T A 1
ACCTCCACAGTACTTCTCTCTTTATAGATCCCACTCACTCACTCAAGAAATCTTCA 61
T L H S T S S L Y R S Q L I T Q E S 21
CCCAAAATGCCACCCCAACATTTTGAAGTCACAAACCTATAAAATACCCAAA 121
P K N A T P T T F F E V T K P I K L P K 41
ACCAACCTTTTACACCTAATCTTGAACATGATTTGGTCCACCTACAGAAACCC 181
T K P F S H L I L E H D F G S T Y R K P 61
CCAATTTCTGCTAACTACACCCCTTTAATTTGCCATCTCAGAAATTTCCAAAAT 241
P I L A N Y T P P F N C P S Q K F S K I 81
GTGCTGGAATGGAGAGCACTTGAAGGTAGCAATTTGATAGAATTTTGGTGTGG 301
V L E W R A T C K G R Q F D R I F G V W 101
GTTAGTGGGTTGAGATTTTCAAGCTGCACTGTGAACCACTAAAATGGGATCTTT 361
V S G V E I F R S C T A E P T K N G I F 121
TGGACTGTCAAGAAGGACATTACTAGGTATTTCTTTGCTTATGAAAAATCAATCTTT 421
W T V K K D I T R Y S S L L M K N Q I F 141
GCTGTTTATTAGGGAATATTGTTGATAGTACATACCTGTTGTACCATGTGGAAAT 481
A V Y L G N I V D S T Y T G V Y H V E I 161
TTTGTCTCTTTTCTGCTAAAGTGAGATGGGTGGATTTGATTTGGGGCTGATTG 541
F V H F P A K V R L G F D S G A D L 181
ATTGTTCCCATTCAGAAATATGATTTGAATGATGGGTGTGGTTGAGATTTGAAAT 601
I V P I S R N M H L N D G L W F E I E N 201
TCAGCAGATGTACAGTCAAAGGATTTCAAGATTTCCCAATGTGTATAGGGCTGTATT 661
S A D V Q S K D F K I P P N V Y R A V L 221
GAAATTTATGTTCTTATCATGAGAATGATGATTTTGAATGGGAATCCACATATGAG 721
E V Y V S F H E N D E F W N G N P P N E 241
TATATAAGTTGAATAATCTTAGTATCGCGGGGAATGGAGCTTTACGGAGGTGGTGGT 781
Y I S S N N L S I A G N G A F R E V V V 261
AGTTTGGATGAATGGTAGTTGGTAGTTTGGCCCTTTACTGTGATCTACTGGGGT 841
S L D E M V V G V V V P F T V I Y T G G 281
GTTAATCCCTCTTTGGAGACCGATTAGTGGAAATGGATCGTTCGATCTCTCTTAT 901
V N P L F W R P I S G I G S F D L P S Y 301
GACATTTGAATATCCCGTGTGTAGGAAAGATTTAGATGGAAATAGTCATAAGATTTCA 961
D I E I T P L L G K I L D G N S H K I S 321
TTTGGATCCAGGATGCTCTGAACGTGTGGTATGTTGATGCAATTTGATCTTTGGTTG 1021
F G V T D A L N V W Y V D A N L H L W L 341
GACGGGAAAGTAAGAAACGGAAGGAAGTTGTTGAGATACAGCTTATTGCCCTTTCT 1081
D G K S K K T E G K L L R Y S L L P L S 361
TTATCGGTCTGACCAATTTTACAGTTTGTATGATCTCTTATCAGCAATGCTAGTAG 1141
L S V L T N F T G F D G S F I T N A S R 381
TCCATCAGATTGACCGAATGGTGAAGTCGTCTTATGGAATATCACTACTAAGTCGTCT 1201
S I T L T G M V K S S Y G T I T T K S S 401
CAAAGTTTAAAGTTATAGCAACCATATGTTAATGGGAATGAAGGGAACCTTGCAATATG 1261
Q S L S Y S N H M V M G N E G N L Q I V 421
GATCAGATATCGAATTCATGATCTGTTATGCCACGACGCCATCTTCTATGTTTAC 1321
D Q I I E F N D T V Y A T T P S S Y V H 441
TCGCTTGAGTCCTTCAAAAGTATCTGTTGAAGTTGATTTGACATGTAGATCAAGGA 1381
S L E S F K K Y L L K L Y S D N V D Q G 461
AACCAAGCTATACCTCGATATCAACTTGACGTTGGGATTAGATCAAGAGGGGTAAAG 1441
N Q S Y L T S I S N L T L G L D D K R V K 481
GGTTCAGATGATGATCCTCAGTCAGTCGTGAATAATTTGCAAAACGCGAGGGCTAT 1501
G S K Y G S S V S S V N N L Q N A Q G Y 501
ATGATTGTAAGGGCCACTTAGTAGTCAAGGACCTTGAAGTACCAAGTATATATAA 1561
M I V K G H L V V K G L G S T Q Q V Y K 521
CATAAGATGATGCTGCTACTCCAGGAACATAAGCAGCTCAATTAACACATATCT 1621
H N D D S C C Y S R N I S S S N Y T I L 541
TACGATAAGGTAAGCAATAGTCGACGAATAGTACTTGGTCTCATTGGCCCTTGGAGATT 1681
Y D K V S N S C S N S T W S H W P L R I 561
GACAAAAGCGGTCTCTTCTGGTTGA 1741
D K K R S L P G * 581

```

Fig. 1 Nucleotide sequence of *PNGase T* (GenBank Accession number KM401550) and deduced amino acid sequence. The signal sequence finished at 21 is underlined with blue bold letters. Putative nine N-glycosylation sites are indicated in red bold

보다 한 개가 적었다.

특히 그 동안 보고된 12개의 *PNGase* 유전자 member들의 염기서열을 GenBank에서 정보를 획득한 후 *N*-당질화 부위를 비교하여 보면 아미노산 서열에서 비교적 보존성이 높은 부위로는 6개가 존재하였다. *N*-당질화 부위 주변으로 아미노산 서열의 유사성이 비교적 높은 부위가 존재하므로 이들 부위가 *PNGase*의 활성부위일 것으로 판단된다(Fig. 2).

기존에 보고된 여러 식물체로부터 분리된 *PNGase* 유전자를 비교하여 본 결과 아미노산 서열상의 동일성은 castor bean, 포플라, 포도 등과는 약 61~62%의 동일성을 나타내었으며, 애기장대의 2개의 gene members와는 각각 54%, 38%의 동일성을 나타내었다. 벼의 2개의 *PNGase*의 gene members와는 50%, 43%의 동일성을 나타내었다. 다른 외떡잎 식물인 수수와 옥수수와 *PNGase*와는 42% 정

도의 동일성을 나타내었다. 따라서 총 10종의 식물체로부터 분리된 12개의 *PNGase* 유전자의 단백질 서열을 분석한 계통수를 보면 *PNGase T*는 역시 *PNGase-Le*와 가장 높은 유연관계를 나타내었고 다음으로는 포도의 *PNGase*와 비교적 높은 유연관계를 나타내었다(Fig. 3).

최근 단백질의 접힘의 오류로 당단백질이 분해되는 과정인 ERAD에 작용하는 *PNGase*인 *AtPNG1* 유전자가 애기장대에서 분리되었는데 기존에 보고된 *PNGase* 유전자와는 아미노산 서열상의 동일성이 나타나지는 않았지만 *PNGase*가 결핍되어 있는 *Saccaromyces cerevisiae* 돌연변이체에 *AtPNG1* 유전자를 도입하여 배양하면 N-glycanase의 활성을 회복하였다(Diepold et al. 2007). 그러나 *AtPNG1*은 세포질에 존재하는 transglutaminase-like superfamily에 속하는 단백질로서(Suzuki et al. 2002) *N*-당질화 부위를 절단함으로써 ER AD 과정을 통하여 단백질의 3차구조의 정

Fig. 2 Alignment of deduced amino acid sequence of *PNGase T* with *PNGase* genes from various plant species. Sequence alignment was performed and then was box-shaded by Clustal Omega. The asterisks (*) indicate sequence identity. Putative *N*-glycosylation sites are indicated in red letters. The conserved sequences are highlighted in black. Arabidopsis 1 (ara1) (GenBank Accession No. NP188110), Arabidopsis 2 (ara2) (NP568155), tomato (TomLe) (FJ804752), *PNGase T* (tomT) (KM401550), moss (XP001764866), grape (XP002285454), castor bean (EEF37846), rice1 (EAA10975), rice2 (BAB92157), poplar (pop) (XP002316856), sorghum (sor) (XP002454967) and Zea (NP001152324)

Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of deduced amino acids of *PNGase* homologues from 12 organisms. Phylogenetic tree analysis for multiple sequence alignment obtained by Clustal Omega was performed by MEGA6 program

확성을 유지하는데 관여한다고 보고되었지만 실제 식물체 내에서 ERAD 과정에서 N-glycanase의 역할을 할지에 대해서는 더욱 많은 연구가 필요하다. AtPNG1과 *PNGase*는 peptide-N(4)-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase로 알려져 있지만 서로 염기서열의 동일성이 존재하지 않는 동형의 유전자로 여겨진다.

토마토 과육의 숙성에 따른 *PNGase T*의 전사 조절 분석

N-glycanase로서 기존에 여러 식물체에서 유전자 분리가 보고된 *PNGase*가 식물체의 발달과 분화 과정에서의 생리적 역할에 대하여 거의 연구된 바가 없기 때문에 이를 우선 조사하고자 한다.

토마토 과육의 숙성 과정에 따른 *PNGase*의 역할을 조사하기 위하여 우선 *PNGase T* 유전자의 발현양을 조사하였다. 우선 토마토(*Solanum lycopersicum* L. cv Styx TY)의 과육의 성장이 완성된 이후 숙성 정도에 따라 녹색과에서부터 주황색 단계를 거쳐 짙은 주황색을 거쳐 진행된 적숙과로 구분하여 6단계로 나누어 과육을 수확하였다(Fig. 4). 각각의 단계에서 수확된 과육으로부터 total RNA를 분리하여 cDNA를 제조한 후 *PNGase T* 유전자 특이적 primer를 이용하여 real-time quantitative RT-PCR을 수행하였다.

기준 유전자로 *actin* 유전자를 이용하여 비교한 *PNGase T*의 상대적 발현량을 보면 녹색과에서는 다른 유전자들에 비하여 비교적 높은 수준으로 항시적으로 발현되는 양상을 나타내었다(Fig. 4). 그러다가 이후 적색으로 전환되는 과정의 과육에서부터 *PNGase T*의 전사체 양이 증가하다가 오렌지색의 과육에서 2.3배 이상 증가하여 가장 높은 전사체 양을 보았다. 그러나 이후 적숙과로 이어지는 후숙되는 과정에서 *PNGase T*의 전사체 양은 점차

Fig. 4 Transcription levels of *PNGase T* in tomato fruits at different ripening stages by real time qRT-PCR. MG, mature green fruit; T, turning fruit; O, orange fruit; OR, orange-red fruit; LR, light-red fruit; MR, mature red fruit. Expression levels, normalized to the reference gene α -actin (*LeActin*), were calculated after qRT-PCR using gene-specific primers. Relative mRNA expression levels are the mean $\pm$ SDs of three independent measurements

감소하였다. 전사체의 양에서 지속적으로 감소가 일어났음에도 불구하고 충분히 숙성이 된 적숙과에서는 *PNGase T*의 전사체 양이 녹색과에 비하여 1.7배 높았다.

이러한 결과는 *PNGase T*가 과육에서 비교적 높은 수준을 보일 정도로 항시적으로 발현되더라도 과육의 숙성과정에서 이의 전사체 양이 더욱 증가함으로써 과육의 숙성 및 노화과정에서 전사의 조절이 일어나는 것으로 여겨진다.

다음으로는 과육이 숙성되는 노화과정에서 작용하는 caspase-like proteolytic 활성 증가가 나타나게 되는데 이때 관여하는 cysteine protease인 metacaspase type II 유전자의 전사체 양을 조사하여 보았다. Metacaspase는 식물에서 병원균이 감염되었을 때(Hoebericht et al. 2003)나 혹은 산화적 스트레스 등의 환경적 스트레스가 주어졌을 때 프로그래밍된 세포사를 초래하는데 관여할 뿐만 아니라 배 발생 등 다양한 종류의 발달과정에도 관여하는 효소이다(Wen et al. 2013).

Metacaspase II의 유전자인 *LeMCA* 유전자의 전사체 양을 조사하여 보면 역시 녹색과에서는 비교적 낮은 수준이었지만 과육이 숙성되어 노화되어 가는 과정에서 *LeMCA*의 전사체량이 크게 증가하였다(Fig. 5). 녹색과에서 오랜 지색으로 전환되는 시기인 T 시기에 *LeMCA*의 전사체량이 2.5배 증가하였으며, 이후 오렌지색과(O 시기)에서 최대치를 기록하였는데 녹색과 시기와 비교하면 *LeMCA*의

Fig. 5 Transcription levels of metacaspase (*LeMCA*) gene in tomato fruits at different ripening stages by real time qRT-PCR. MG, mature green fruit; T, turning fruit; O, orange fruit; OR, orange-red fruit; LR, light-red fruit; MR, mature red fruit. Relative mRNA expression levels are the mean $\pm$ SDs of three independent measurements

전사체량이 5.4배로 크게 증가하였다. 이후 점차 감소하였지만 적숙과에서 비교적 높은 수준의 *LeMCA* 전사체량을 보였다.

이러한 결과는 protease 일종인 metacaspase의 유전자 발현 패턴과 *PNGase T*의 발현 패턴이 모두 오렌지와 상태에서 가장 높은 전사체량을 유지하는 점에서 서로 유사하였다. 따라서 *PNGase T*에 의해 당사슬이 절단되는 과정이 당단백질이나 그 외의 단백질 분자들이 노화나 PCD 등의 과정에서 분해되기 위해 일어나는 과정인지 혹은 이의 생성물인 당사슬이 어떤 의미있는 생리적 역할의 필요에 의해 일어나는 과정인지에 대한 보다 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 여겨졌다.

에틸렌 생합성 관련 유전자와의 상호관련성 분석

다음으로는 *PNGase T*의 발현량이 토마토 과육의 숙성과정에서 크게 증가함으로 토마토 과육의 숙성과정에서 중요한 역할을 하는 식물호르몬인 에틸렌의 생합성에 관여하는 ACC synthase 유전자군의 발현 패턴과 비교하여 보았다. 토마토의 ACC synthase의 유전자군은 최소한 7 개 동형의 유전자 이상이 존재할 것으로 여겨진다(Nakatsuka et al. 1998). 토마토 과육에서는 열매가 숙성되는 과정에서 에틸렌의 생합성량이 증가하는데 특히 과육의 노화과정에는 *Le-ACS2*와 *Le-ACS6*가 관여하고 있다. 또한 *Le-ACS3*는 과육이 성장하고 발달하는 과정에서 항시적으로 발현

Fig. 6 Transcription levels of senescence-related ACC synthase gene members (*LeMCS2*, *LeACS4*, and *LeACS6*) in tomato fruits at different ripening stages by real time qRT-PCR. MG, mature green fruit; T, turning fruit; O, orange fruit; OR, orange-red fruit; LR, light-red fruit; MR, mature red fruit. Relative mRNA expression levels are the mean $\pm$ SDs of three independent measurements

되는 동형의 유전자로 알려져 있다(Nakatsuka et al. 1998).

토마토 과육이 녹색과에서 적숙과까지 숙성과 함께 노화되는 과정의 6단계에서 조사하기 위하여 qRT-PCR을 수행하여 보면 녹색과에서는 *LeACS2*, *LeACS4*, *LeACS6* 모두 녹색과에서는 거의 발현이 이루어지지 않다가 점차 숙성이 진행되면서 오렌지와 상태에서 3가지 동형의 유전자가 모두 가장 높은 전사체량을 나타내었다(Fig. 6). 이중 기준 유전자인 actin 유전자와 비교한 상대적인 발현량이 가장 높은 동형의 유전자는 *LeACS2* 이었으며, *LeACS4*

Fig. 7 Transcription levels of stress signal-specific ACC synthase gene member (*LeACS3*) in tomato fruits at different ripening stages by real time qRT-PCR. MG, mature green fruit; T, turning fruit; O, orange fruit; OR, orange-red fruit; LR, light-red fruit; MR, mature red fruit. Relative mRNA expression levels are the mean $\pm$ SDs of three independent measurements

와 *LeACS6*인 것으로 나타났다. 이는 이들 세포내에서 노화 특이적인 ACC synthase의 유전자군과 함께 거대분자의 가수분해가 수반되는 노화과정에서 특이적으로 발현이 증가하는 ACC synthase의 유전자군과 발현 패턴이 유사하였다.

그러나, 과육의 발달 과정에서 작용하여 노화과정에서는 발현량이 급격히 감소하는 ACC synthase의 유전자군인 *LeACS3*의 전사체는 과육에서는 거의 발현되지 않았다(Fig. 7).

따라서 PNGase T의 전사체 발현량의 패턴은 세포 죽음과 관련된 가수분해 효소인 metacaspase의 전사체 발현과 과육의 숙성 및 노화와 관련된 ACC synthase의 유전자군의 발현과 유사한 패턴을 나타내는 것으로 보아 PNGase T는 식물체에서 노화 특이적으로 발현되는 유전자인 것으로 사료된다. 따라서 식물체 내에서 생성된 거대분자로서의 당단백질을 분해하는 효소로서도 작용하는 것으로 여겨진다.

이는 단백질의 접힘 오류를 해소하고 단백질 구조의 질적 조절을 위하여 진행되는 ERAD 과정에서 당사슬을 제거하는 작용의 PNGase 역할보다는 노화 과정에서 보다 효과적으로 작용할 것으로 판단된다.

따라서 재조합 단백질을 생산하는 분자농업 과정에서 의학용 고부가가치 단백질을 생산하기 위하여 인체에서의 면역 부작용을 초래할 가능성이 있는 아스파라긴산 잔기에 부착되어 있는 당사슬을 제거하기 위해서 PNGase를 활용할 때 PNGase가 식물의 노화를 유도할 가능성이 있어 PNGase 생산을 위한 재조합 단백질 생산용 식물체를

제조할 때 생산시기에 특이적으로 유도하여 발현되는 유도 프로모터를 사용하는 것이 더 바람직할 것이다.

또한 다른 활용방안으로는 특정 시기에 발현되는 특이적 프로모터를 사용하여 일차적으로 형질전환함으로써 PNGase 발현 유도 작물을 제조한 후 이에 다시 특정 의학용 재조합 단백질 유전자를 도입하여 PNGase와 특정 의학용 단백질을 동시에 발현되는 식물체를 제조한다면 단백질 분리 후 N-당사슬을 제거하는 공정을 생략할 수 있을 것이며, 이는 재조합단백질의 처리 공정을 단순화시켜 보다 경제적으로 의학용 재조합 단백질을 생산할 수 있을 것이다.

특히 PNGase의 유전자의 염기서열 유사성이 60% 정도에 불과하므로 가지과 식물로서 담배 식물체나 토마토 식물체에서 재조합단백질을 생산할 경우 N-당사슬을 절단하기 위해서 비교적 단백질의 유사성이 높은 토마토 유래 PNGase T를 활용하는 것이 아몬드 유래의 PNGase A 나 박테리아 유래의 PNGase F보다 효과적일 것으로 사료된다.

적 요

진핵생물의 유전자 발현 과정에서 생성된 단백질은 전사 후 변형 과정을 통해 소포체와 골지체에서 당질화가 일어난다. 당질화된 당단백질은 접힘의 오류가 있는 경우를 비롯하여 식물의 분화 조절 등의 경우 당단백질이 분해되며, 이 때 PNGase에 의해 N-당사슬이 단백질의 아스파라긴산 잔기로부터 절단된다. 그러나 식물의 발달과 분화 과정에서 PNGase의 발현 조절에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 기존에 보고된 유전적 정보를 활용하여 토마토의 잎에서 제조된 cDNA library에서 nested RT-PCR을 통하여 PNGase T의 유전자(GenBank Accession number KM401550)를 분리하였는데 이의 ORF는 1,767 bp, 588개의 이미노산으로 이루어졌으며, 분자량은 65.8 KDa이었다. PNGase T의 유전자는 토마토 과육에서 높은 수준으로 항시적으로 발현되었으며, 특히 녹색과보다는 오렌지색으로 숙성되는 과정에서 PNGase T의 전사체량이 크게 증가하였다. 이러한 발현 패턴은 토마토 과육에서 세포죽음의 과정에서 증가하는 단백질 가수분해 효소인 metacaspase의 전사체 증가 패턴과 유사하였으며, 이 시기에는 에틸렌의 생합성 효소 중 노화관련 ACC synthase의 유전자 members (*LeACS2*, *LeACS4*, *LeACS6*)의 발현 패턴과도 유사하였다. 따라서 토마토 과육에서 PNGase T의 유전자 발현은 거대분자가 분해되는 시기에서 과육의 숙성과 노화 과정에서 특이적인 생리적 기능을 나타내는 것으로 판단된다. 향 후 고가의 의학용 재조합단백질의 면역부작용을 완화하기 위하여 식물체 유래의 당단백질의 탈당질화과정에

서 PNGase T를 활용함으로써 식물생명공학 분야에서 활용 가치가 높을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원의 첨단생산기술 개발사업(312037-5)의 지원을 받아 수행하였다.

References

- Altmann F, Paschinger K, Dalik T, Vorauer K (1998) Characterisation of peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A and its N-glycans. *Eur J Biochem* 252:118–123
- Diepold A, Li G, Lennarz WJ, Nürnberger T, Brunner F (2007) The Arabidopsis *AtPNGI* gene encodes a peptide: N-glycanase. *Plant J* 52:94–104
- Häweker H, Rips S, Koiwa H, Salomon S, Saijo Y, Chinchilla D, Robatzek S, von Schaewen A (2010) Pattern recognition receptors require N-glycosylation to mediate plant immunity. *J Biol Chem* 285:4629–4636
- Helenius A, Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73:1019–1049
- Hoeberichts FA, ten Have A, Woltering EJ (2003) A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217:517–522
- Hossain MA, Nakano R, Nakamura K, Kimura Y (2010) Molecular identification and characterization of an acidic peptide: N-glycanase from tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *J Biochem* 147:157–165
- Kolarich D, Altmann F (2000) N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole. *Anal Biochem* 285:64–75.
- Mamedov T, Ghosh A, Jones RM, Mett V, Farrance CE, Musiyshuk K, Horsey A, Yusibov V (2012) Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant Biotechnol J* 10:773–782
- McCracken AA, Brodsky JL (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132:291–298
- Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, Shakin-Eshleman SH (1998) The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* 37:6833–6837
- Nakamura K, Inoue M, Maeda M, Nakano R, Hosoi K, Fujiyama K, Kimura Y (2009) Molecular cloning and gene expression analysis of tomato endo- β -N-acetylglucosaminidase, an endoglycosidase involved in the production of high-mannose type free N-glycans during tomato fruit ripening. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:461–464
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A (1998) Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol* 118:1295–1305
- Plemper RK, Wolf DH (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* 24:266–270
- Plummer TH Jr, Elder JH, Alexander S, Phelan AW, Tarentino AL (1984) Demonstration of peptide: N-glycosidase F activity in endo- β -N-acetylglucosaminidase F preparations. *J Biol Chem* 259:10700–10704
- Song W, Henquet MG, Mentink RA, van Dijk AJ, Cordewener JH, Bosch D, America AH, van der Krol AR (2011) N-glycoproteomics in plants: perspectives and challenges. *J Proteomics* 74:1463–1474
- Suzuki T, Park H, Lennarz WJ (2002) Cytoplasmic peptide: N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *FASEB J* 16:635–641
- Taga EM, Waheed A, Van Etten RL (1984) Structural and chemical characterization of a homogeneous peptide N-glycosidase from almond. *Biochemistry* 23:815–822
- Takahashi N (1977) Demonstration of a new amidase acting on glycopeptides. *Biochem Biophys Res Commun* 76:1194–1201
- Tarentino AL, Plummer TH Jr (1987) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl) asparagine amidase and endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol* 138:770–778
- Wen S1, Ma QM, Zhang YL, Yang JP, Zhao GH, Fu DQ, Luo YB, Qu GQ (2013) Biochemical evidence of key residues for the activation and autoprocessing of tomato type II metacaspase. *FEBS Lett* 587:2517–2522