

## 고추에서 분리한 Cinnamate 4-Hydroxylase 유전자의 분자생물학적 특성

김계원<sup>1</sup>, 하선화<sup>1</sup>, 조강진<sup>1</sup>, 김은주<sup>2</sup>, 이민경<sup>2</sup>, 유재주<sup>2</sup>, 김종국<sup>3</sup>, 이신우<sup>1,2\*</sup>  
<sup>1</sup>농업생명공학연구원, <sup>2</sup>진주산업대학교, 작물생명과학과, <sup>3</sup>경북대학교, 미생물학과

### Molecular Characterization of Cinnamate 4-Hydroxylase gene in Red Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Kye-Won Kim<sup>1,4</sup>, Sun-Hwa Ha<sup>1</sup>, Kang-Jin Cho<sup>1</sup>, Eun-Ju Kim<sup>2</sup>, Min-Kyung Lee<sup>2</sup>, Jae-Ju Yu<sup>2</sup>  
Jong-Guk Kim<sup>3</sup>, Shin-Woo Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

<sup>2</sup>Department of Crop Science & Biotechnology, Jinju National University, JinJu 660-758, Korea

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

<sup>4</sup>Present address : Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA 99164, USA

**ABSTRACT** Three different cDNAs for cinnamate 4-hydroxylase (C4H) which are involved in the second step of the general phenylpropanoid pathway were isolated and designated as *pc4h1* (1,755 bp), *pc4h2* (1,655 bp), and *pc4h3* (1,316 bp), respectively. The nucleotide sequence analysis revealed that both *pc4h1* and *pc4h2* clones encode polypeptides of 505 amino acids frame but *pc4h3* clone was truncated at the 5'-end of coding region. The alignment of the deduced amino acid sequences showed that PC4H1 and PC4H2 are highly homologous (95.8% identical) with each other and contain three conserved domains which are typical in cytochrome P450 monooxygenase: proline-rich region, threonine-containing binding pocket for the oxygen molecule, and heme binding region. In addition, result of the phylogenic tree analysis revealed that both pepper C4Hs belong to Class I. *pc4h2* transcription was strongly induced in wounded fruit (400%) and root (200%) relative to its very low basal level but not in leaf or stem tissue. In case of *pc4h1*, the basal level of transcription was higher than *pc4h2* but induction by wounding was lower in fruit and root while leaf and stem tissues did not respond to wounding. The basal level of *pc4h3* transcripts was not, if any, detectable and response to wounding was not observed.

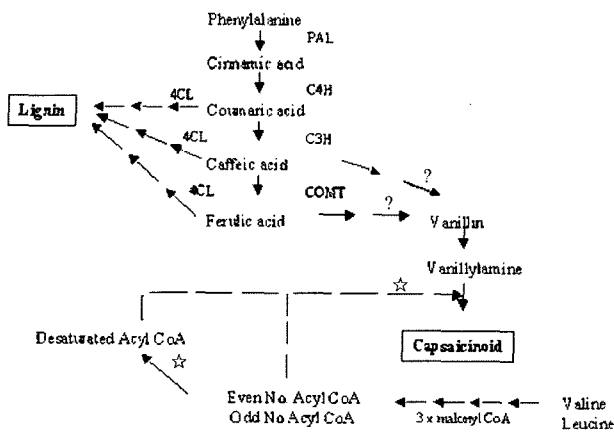
**Key words:** Cinnamate 4-hydroxylase, cytochrome P450 monooxygenase, phenylpropanoid pathway

#### 서 론

식물은 phenylpropanoid 대사경로를 통하여 다양한 종류의 2차 대사 산물, 즉 리그닌, flavonoids 화합물 및 다양한 기능을 갖는 에스테르 화합물을 생산하여 외부환경으로

부터 오는 다양한 종류의 생물학적 혹은 비생물학적 스트레스에 적절하게 대응하며 분화한다고 알려져 있다 (Hahlbrock and Scheel 1989). 최근에는 이러한 다양한 기능을 갖는 화합물을 생산하는 대사과정을 분자생물학적으로 조절하여 보다 우수한 농작물을 생산하고자 하는 연구결과가 많이 발표되었다 (Blount et al. 2000; Blount et al. 2002; Nakamura et al. 2005).

\*Corresponding author Tel +82-55-751-3227 Fax +82-55-751-3229  
E-mail: shinwlee@jinju.ac.kr



**Figure 1.** A proposed biosynthetic pathway of capsaicinoid compounds. PAL, phenylalanine ammonia-lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; C3H, p-coumarate 3-hydroxylase; COMT, caffeic acid o-methyltransferase and 4CL, 4-Coumarate CoA Ligase. The other enzymes that have not been fully characterized are marked with "?". The last enzyme involved in the biosynthetic pathway of capsaicinoids, capsaicinoids synthetase has not been fully characterized and marked with "☆".

고추는 수분 (pollination) 후 열매의 발달이 진행됨에 따라 매운맛 성분이 축적되는 것으로 알려져 있으며 (Kim et al. 2000), 매운맛 성분인 capsaicinoids 화합물은 general phenylpropanoid 대사경로를 시작으로 보다 복잡한 경로를 거쳐 합성되는 것으로 알려져 있다. Figure 1은 capsaicinoids의 생합성경로를 요약한 것으로 5탄당 인산경로와 shikimic acid 경로를 거쳐 만들어진 phenylalanine 혹은 tyrosine에서 출발하여 cinnamic acid, coumaric acid가 먼저 합성되며, coumaric acid가 다시 caffeic acid, ferulic acid, vanillin, vanillylamine으로 되며, 최종적으로 3분자의 malonyl-CoA가 amide기에 연결됨으로써 capsaicinoids가 합성되는 것으로 알려져 있으나 아직 여러 단계에 관여하는 효소들이 밝혀지지 않아 많은 연구가 필요한 분야 이다(Bennett and Kirby, 1968; Suzuki et al, 1981).

Cinnamate 4-hydroxylase (C4H; *trans*-cinnamate 4-monooxygenase, *trans*-cinnamate, NADPH:oxygen oxidoreductase, EC1.14.13.11)는 phenylpropanoid pathway의 second step reaction을 촉매 하여 *trans*-cinnamic acid를 *p*-coumaric acid (4-hydroxy *trans*-cinnamic acid)로 전환하는 효소로 cytochrome P450 기능을 갖는 것으로 알려진 CYP73 family에 속한다 (Teutsch et al. 1993). P450 monooxygenase는 식물 뿐만 아니라 동물에도 존재하는 효소로서 NADPH 혹은 NADH를 이용하여 공기 중의 산소를 분해하여 다양한 기능을 갖는 유기화합물을 합성하는 heme-dependent mixed-function oxidase system으로서 주요 유기화합물의 hydroxylation, epoxidation, dealkylation, isomerization, dimerization, dehydration, carbon-carbon cleavages, decarboxylations, nitrogen and sulfur oxidations,

dehalogenations, 그리고 deaminations 등에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Schuler 1996; Werck-Reichhart and Feyereisen 2000).

최근에 발달된 genomics project에 의하여 모든 genome의 염기서열이 완성된 생물 종을 비교하여 조사한 결과, 식물의 P450 유전자는 다른 생물 중 즉 무척추동물, 곤충, 선충, 효모 등과 비교하여 훨씬 더 많은 종류가 존재하는 것으로 밝혀져 *Aarabidopsis*는 272종류 (Paquette et al. 2000; Werck-Reichhart et al. 2002), 벼는 458종류 ([http:// drnelson. utmem. edu/rice.htm](http://drnelson. utmem. edu/rice.htm))이었으나 인간 (*Homo sapiens*)은 55종류, 초파리는 83종류, *Caenorhabditis elegans*는 80종류 (Tijet et al. 2001)로 조사되었다 (<http://drnelson. utmem. edu/cytochromeP450.htm>). 특히 Schuler와 Werck-Reichhart (2003)은 다양한 화학반응과 대사과정에 관여하여 식물의 발달 및 환경에 적응하는데 필수적인 수 많은 종류의 화합물을 생산하는데 관여하는 P450 유전자에 대하여 현재까지 밝혀진 효소를 기능별로 분류하였으며, 또한 gene-chip을 이용한 expression profiling 결과, silencing 및 over-expression 기술을 이용한 phenotypic 분석결과를 종합하여 보고하였다.

본 연구는 이러한 기초연구를 바탕으로 고추열매의 capsaicinoid 생합성 조절 기작을 연구하고자 general phenylpropanoid pathway의 진입과정에 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 *c4h* 유전자 family에 속하는 3종류를 분리하여 이들에 대한 조직특이적 발현 양상 및 상처 특이적 발현을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

국내 재래종 고추 품종인 수비초를 농촌진흥청 농업생명공학연구소의 유리온실에서 재배하여 사용하였다. 6주간 재배된 고추 식물체로부터 잎, 뿌리, 줄기 조직을 분리하여 예리한 칼로 상처를 준 다음 수분을 충분히 공급한 다음 30°C에서 6시간 혹은 12시간 정치시킨 후 액체질소를 사용하여 냉동시킨 다음 냉동고 (-80°C)에 보관하여 total RNA를 분리하기 위한 시료로 사용하였다. 고추 과실의 경우 개화 후 45일째 되는 과실을 수확하여 역시 예리한 칼로 상처를 준 후 상기한 방법대로 처리하였다.

### 시약 및 효소

cDNA 유전자 은행작성에는 Stratagene (CA, USA)의 Lamda ZAP-cDNA Synthesis kit를 사용하였고, *In vitro* packaging에는 같은 회사의 Gigapack II gold를 사용하였다.

**Table 1.** Gene-specific primers used for amplification of the individual members of the pepper *c4h* gene family by RT-PCR

Name	Sequence (5' to 3')	Use
92F	CTG TAT ACG GTG AGC ATT GG	Forward (common)
93R	CTC CCT TCT GTT AGA CCT C	Reverse (common)
42F	GTC AAT TGA ATG GGG TAT CG	Forward (universal)
44R	AGG CAG AAC TTA CAA TGA ATC	Reverse ( <i>pc4h1</i> , 3'-UTR)
45R	TCA ACT TTC TCC AGA GCC C	Reverse ( <i>pc4h2</i> , 3'-UTR)
46R	GGC TAT ACA ATC TCT TAT GGG	Reverse ( <i>pc4h3</i> , 3'-UTR)
67F	GGC TGG ATT TGC TGG TGA TG	Actin (Forward)
68R	CCG CCT GAA TAG CAA CAT AC	Actin (Reverse)

*E. coli* 균주 배양을 위한 Bacto-trypton, yeast extract, Bacto-agar 등은 Difco (MI, USA)사의 제품을 사용하고 그 밖의 모든 시약은 Sigma (Mo, USA)사의 제품을 사용하였다. 제한효소는 Boehringer-Mannheim사의 제품, PCR에는 Takara사의 *Ex-Taq* polymerase, PCR 산물의 cloning에는 TA cloning vector PCR™ 2.1 (Invitrogen) 또는 pGEM-T Easy (Promega)를 사용하였다.

#### 유전자 분리

*c4h* 유전자를 분리하기 위해 다른 식물 종에서 이미 알려져 있는 cDNA 염기서열을 비교하여 진화적으로 비교적 잘 보존된 부위를 이용하여 되도록 낮은 complexity를 갖도록 degenerate primer를 디자인하여 합성하고 PCR을 수행하였다. 각 PCR산물은 agarose gel에 전기영동한 후, 예상 크기의 DNA 밴드를 칼로 잘라내어 Gel Extraction kit (Qiagen)을 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector에 클로닝하고 염기서열로 *c4h* 유전자임을 확인한 후 full-length를 얻기 위한 cDNA library를 screening 하기 위한 probe로 사용하였다.

#### DNA 염기서열 결정 및 분석

5'-untranslated region (UTR)의 염기서열을 이용하여 분리한 clone들을 분류하였고 전 염기서열을 분석하고자 하는 clone은 pGEM-7Zf (+), pBluescript KS (+) 혹은 SK (+)에 subcloning한 후, T7, T3, BK, Reverse, SK, 그리고 KS primer 등 이들 플라스미드의 multicloning site 주변에서 design 한 것으로 상용으로 공급되는 universal primer를 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 또한, 전 염기서열을 결정하기 위해서는 Double-strand nested deletion kit (Pharmacia)을 이용하여 deletion series를 작성하거나, 합성 oligonucleotide primer를 이용하였다. 얻어진 DNA 염기서열 정보는 NCBI 및 EMBL data bank로부터 검색된 accession number들과 비교 분석하였으며, 염기서열 정보로부터 얻은 아미노산서열에 대한 alignment, homology 비교, evolutionary tree 분석은 Bioedit 및 DNAMAN program (Version 4.1.1.1, Lynnon Biosoft Co.)을 사용하였다.

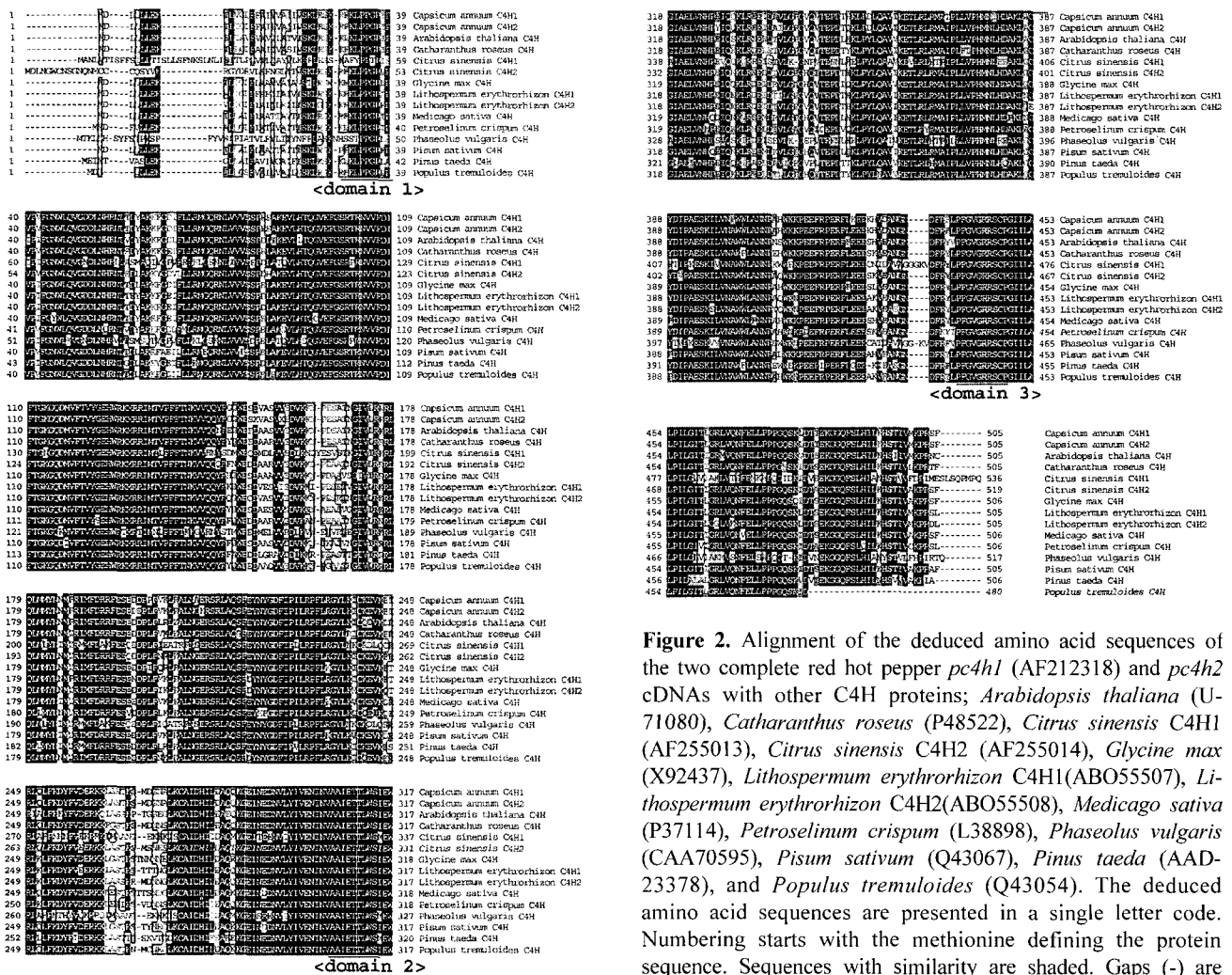
#### Semi-quantitative RT-PCR analysis

RT-PCR을 위한 total RNA는 Invitrogen에서 제공하는 TRI-reagent와 BCP (1-Bromo-3-chloropane, Aldrich Chemical, B6240-4)를 사용하여 reagent와 함께 제공되는 실험 방법에 따라 분리하였다. RT-PCR은 Superbio사에서 제공하는 All/In/One RT/PCR premix 를 사용하여 이와 함께 제공되는 실험 방법에 따라 수행하였다. RT-PCR을 위한 유전자 특이 프라이머는 각 유전자의 3'-UTR 부위에서 각각의 reverse primer를 디자인 하였으며 forward primer는 3'-영역의 coding sequence로부터 동일한 염기서열 부위에서 universal primer를 제작하였다. 또한 Gen Bank로부터 조사한 *c4h* 유전자의 genomic clone에 대한 염기서열정보로부터 intron을 포함하는 common primer set를 디자인하여 RT-PCR product에 대한 genomic DNA의 오염 여부를 판단하기 위한 지표로 사용하였다. 본 연구에 사용된 프라이머는 Table 1에 요약하였다.

#### 결과 및 고찰

고추의 total RNA를 사용하여 제작한 cDNA library로부터 고추의 열매에 축적되는 capsaicin의 생합성 대사에 관여하는 C4H 효소를 암호화하는 3종류의 cDNA clone을 확보하여 DNA 염기서열을 분석한 결과 각각 그 크기가 1,775 bp, 1,655 bp, 그리고 1,316 bp로 *pc4h1*, *pc4h2*, 그리고 *pc4h3*로 각각 명명하였다. *pc4h1*과 *pc4h2*는 5'- 및 3'-UTR까지를 포함하여 505개의 아미노산으로 구성된 펩티드를 암호화하는 full-length의 open reading frame (ORF)를 갖추고 있는 것으로 확인되었다. 그러나 *pc4h3*는 5'-말단 쪽의 단편이 소실된 partial fragment 인 것으로 판단되었다. *pc4h1*은 Gen Bank에 등록하여 accession number (AF212318)를 부여 받았다.

각 cDNA clone의 DNA 염기서열로부터 환산된 아미노산 염기서열을 다른 식물로부터 보고된 C4H를 Gen Bank에서 검색하여 alignment를 수행한 결과를 Figure 2에 나타내었다. N-말단 혹은 C-말단의 일부 영역을 제외한 거의 모든 영역에서 높은 유사성을 나타내었으며, 특히 모든 cyto-



**Figure 2.** Alignment of the deduced amino acid sequences of the two complete red hot pepper *pc4h1* (AF212318) and *pc4h2* cDNAs with other C4H proteins; *Arabidopsis thaliana* (U-71080), *Catharanthus roseus* (P48522), *Citrus sinensis* C4H1 (AF255013), *Citrus sinensis* C4H2 (AF255014), *Glycine max* (X92437), *Lithospermum erythrorhizon* C4H1(ABO55507), *Lithospermum erythrorhizon* C4H2(ABO55508), *Medicago sativa* (P37114), *Petroselinum crispum* (L38898), *Phaseolus vulgaris* (CAA70595), *Pisum sativum* (Q43067), *Pinus taeda* (AAD-23378), and *Populus tremuloides* (Q43054). The deduced amino acid sequences are presented in a single letter code. Numbering starts with the methionine defining the protein sequence. Sequences with similarity are shaded. Gaps (-) are inserted to optimize the alignment. The conserved domains of cytochrome P450s are underlined and indicated as domain 1, 2 and 3, respectively. Protein sequence alignment was performed using BioEdit program.

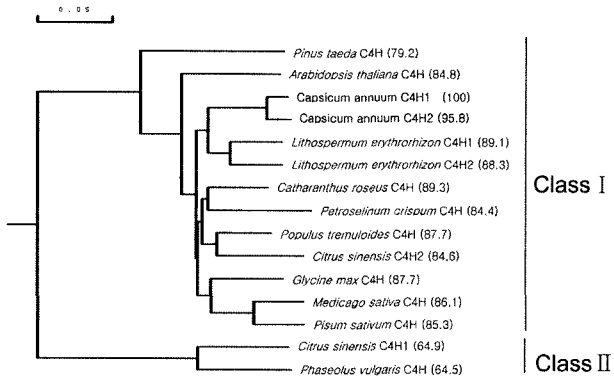
chrome P450 효소에서 진화학적으로 보존되어 있는 3종류의 conserved region 즉 domain 1 (proline-rich region), domain 2 (threonine-containing binding pocket for the oxygen molecule), 그리고 domain 3 (heme binding region)을 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었다 (Chapple,1998).

Proline rich region의 보존된 아미노산 서열은 (P/I)PGPx(G/P)xP로서 N-terminal의 hydrophobic séquence가 끝나는 직후에 존재하며 이 부분을 제거할 경우 C4H효소의 기능이 완전히 상실 되었다고 보고된 바 있다 (Chapple 1998). 그러나 *Citrus sinensis*에서 분리한 C4H1은 이 부분이 'PPTPIS'로 다소 차이를 나타내었다 (Betz et al. 2001). Domain 2의 'AATETT'와 domain 3의 'FGVGRRSCPG'는 15종류의 모든 C4H가 완전히 일치 하였으며, 특히 그 주변에도 유사성이 높은 보존영역이 조사 되었다. P450은 heme 단백질로서 보존된 cysteine 염기가 heme iron과 결합하는데 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Von

Wachenfeldt and Johnson 1995).

특이하게도 *Citrus sinensis* C4H1과 C4H2 그리고 *Phaseolus vulgaris* C4H는 다른 종과 비교 하였을 때 N-말단 아미노산 서열이 큰 차이를 나타내었을 뿐만 아니라 그 길이도 긴 것으로 조사되었다. 또한 *Citrus sinensis* C4H1과 *Phaseolus vulgaris*는 heme binding region의 바로 앞 부위에 4-5개의 아미노산 ('GGGKV' 와 'GGKV')이 추가되었으며, C-말단의 경우에도 *Citrus sinensis* C4H1는 8-9개의 아미노산이 추가 되었으나 포플라의 경우에는 오히려 20개의 아미노산이 소실된 것으로 조사 되었다 (Figure 2).

Figure 3은 15종류의 C4H의 아미노산 서열의 유사성에 근거한 phylogram으로 두 그룹 즉 *Citrus sinensis* C4H1과 *Phaseolus vulgaris*가 한 그룹을 형성하며 나머지는 또 다른 한 그룹을 형성한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Nedelkina 등 (1999)이 보고한 결과와 비교할 때 본 연구에서 분리한 2종류의 C4H는 모두 Class I에 속하는 것으로



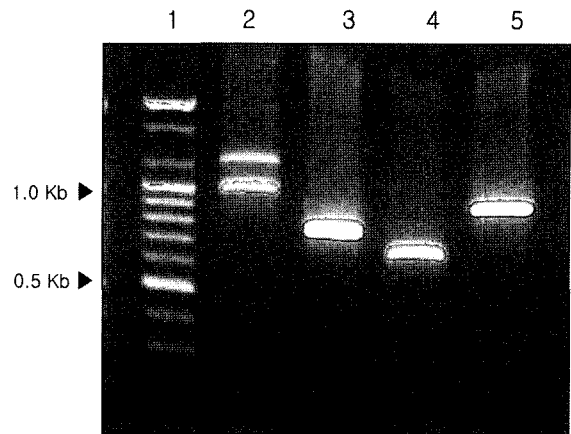
**Figure 3.** Phylogenetic tree of plant C4H proteins. This tree was set up with the distance matrix using the Neighbor-joining method. The scale bar indicates the distance between the two sequences. The maximum distance is 1.0, which indicates no homology between the two sequences. Numbers in parentheses indicate % homology to *C. annuum* C4H1. Red hot pepper C4Hs (PC4H-1 and PC4H-2) are included in Class I as specified by Nedelkina et al (1999) and Betz et al (2001).

서로 간에는 95.8%의 유사성을 나타내어 거의 동일한 유전자인 것으로 조사되었다. 특히 Class II로 분류된 *Citrus sinensis* C4H1과 *Phaseolus vulgaris* C4H와는 단지 64.9에서 64.5%의 homology를 나타낸 반면, 동일한 class로 분류된 다른 C4H와는 80% 이상의 homology를 나타내었다.

고추에서 밝힌 3종류의 *c4h* 유전자에 대한 각각의 특이적 발현양상을 RT-PCR 기술을 이용하여 조사하고자 각각의 유전자에 대한 특이 프라이머를 3'-UTR부위에서 제작하였으며, forward primer는 3'-말단의 상동성이 높은 coding region에서 3종류의 유전자의 염기서열이 100% 동일한 oligomer를 합성하여 사용하였다 (Table 1).

먼저 고추에서 분리한 genomic DNA를 주형으로 사용하여 일반 PCR을 수행한 결과 이들 primer들은 각각의 유전자를 특이하게 증폭한다는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 4). 특히 common primer set는 intron을 포함한 유전자단편을 증폭하도록 디자인하였기 때문에 예상한 RT-PCR 산물 (510 bp)보다는 큰 2개의 단편 (1.0과 1.2 kb)을 증폭한 것으로 나타났으며 이는 2개의 유전자가 서로 다른 크기의 intron을 포함하고 있는 것을 암시하였다. 따라서 모든 RT-PCR 실험에서 common primer set (92F와 93R)는 대조구로 사용하여 genomic DNA의 오염 여부를 판단할 수 있었다. 한편 Table 1에서 요약한 프라이머를 사용하여 *pc4h1* 특이 프라이머 set (42F+44R)는 760 bp, *pc4h2* 특이 프라이머 set (42F+45R)는 650 bp, *pc4h3* 특이 프라이머 set (42F+46R)는 860 bp, 그리고 67F와 68R을 사용하여 350 bp의 *actin* 유전자들을 각각 예상한 크기에 정확하게 증폭되었음을 확인 할 수 있었다 (Figure 4).

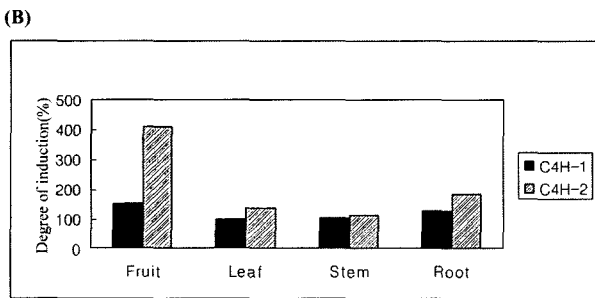
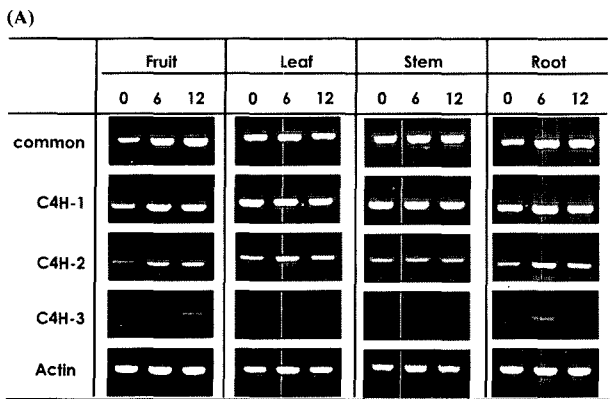
고추 식물체의 조직부위별 및 상처에 대한 *c4h* 유전자의 유전자특이 발현 양상을 조사하고자 상처를 가한 후 6시간



**Figure 4.** Specificity of gene-specific primers designed for the amplification of the individual members of the pepper *c4h* gene family. Each primer set for the gene-specific amplification (see Table 1) was used to perform PCR reaction with a genomic DNA of red hot pepper. Lane 1, 100 bp size marker; lane 2, common primers, 92F and 93R generating fragments common to all three *c4h* genes including introns; lane 3, 42F and 44R specific for *pc4h1*; lane 4, 42F and 45R specific for *pc4h2*; lane 5, 42F and 36R specific for *pc4h3*.

및 12시간에 해당하는 각각의 조직으로부터 total RNA를 분리하여 상기한 각각의 유전자 특이 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과를 Figure 5에 요약하여 나타내었다. Common primer set를 사용한 경우 단일밴드로 예상한 크기인 단 하나의 RT-PCR 산물 (510 bp)가 증폭되어, Figure 4에서 설명한 intron을 포함하는 1.0 kb 이상의 단편은 나타나지 않았으므로 본 연구에서 분리한 total RNA에는 genomic DNA가 오염되지 않았다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 *actin* 유전자에 대한 RT-PCR 결과 모든 처리 구에서 동일한 양의 단편이 확인 되어서 본 연구에 사용한 total RNA는 각 처리구별로 동일한 양을 사용하였다는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 5A).

이러한 control 실험결과를 바탕으로 각 처리구별로 얻은 RT-PCR 결과를 Gel-Doc시스템과 함께 제공된 scanning program을 사용하여 주어진 RT-PCR 산물의 intensity를 비교하여 상처를 주지 않은 control시료를 100%로 하고 이에 대한 상대값 (%)을 Figure 5B에 나타내었다. 그 결과를 요약하여 보면 *pc4h1* 유전자의 경우 상처를 처리하지 않은 대조 구의 basal transcriptional level이 *pc4h2* 보다 높았으며 열매와 뿌리에서 상처를 처리한 후 6시간대에 약 150%에 해당하는 발현증가를 확인 하였으나 잎과 줄기조직은 거의 상처에 반응하지 않는 것으로 조사되었다. 한편 *pc4h2*는 아주 낮은 basal transcriptional level에서 상처 후 6시간 후에는 열매의 경우 400%, 뿌리는 200% 까지 증가 되었다. 잎과 줄기에서의 발현증가 정도는 약하였으나 120에서 150%로 *pc4h1*보다는 다소 높았다. 특히 하계도 *pc4h3*는 모든 조직에서 basal level 자체도 아주 낮았으며 상처에 의



**Figure 5.** Semi-quantitative RT-PCR analyses of *pc4h* gene expression in response to wounding. For wounding treatment, leaves, stems, roots and fruits were sliced with sharp razor blades and incubated at 30°C for 6 and 12 h. The control sample (0 h) and treated samples were frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. (A) Total RNAs (1 to 10 ng) from wounded tissues for 0, 6 and 12 h were analyzed by RT-PCR using primers specific to each *c4h* gene. RT-PCR products were resolved on 1.5% agarose gels containing 1X TBE buffer. (B) The relative ratio of the *c4h* gene expression after induction by wounding. The RT-PCR products resolved on agarose gels were scanned to obtain the areas of each band by using Gel-Doc system. Values for *pc4h1* (solid bars) and *pc4h2* (hatched bars) are the relative amounts of wounded tissues (6 h) to the zero time value for each case (100%). *Actin* gene was used for the normalization of total RNA applied to each RT-PCR reaction. All values represent the average of three or more replicate experiments.

하여서도 전혀 반응을 하지 않았다 (Figure 5).

이러한 연구결과를 다른 연구자들의 보고와 비교하여 보면 보다 많은 스트레스인자의 처리와 다양한 조직 혹은 배양세포 등을 이용한 연구 결과가 집적되어야 이들 유전자에 대한 정확한 기능을 밝힐 수 있을 것으로 사료된다. 예를 들면 옥수수의 경우 두 종류의 class에 해당하는 각각의 *c4h* 유전자가 모두 분리 되었으며, 특히 Class II에 해당하는 *c4h* 는 에탄올에 의하여 전사수준 (transcription level)이 증가 된다고 보고되었다 (Potter et al. 1995). 또한, Yamamura 등 (2001) 역시, phenylpropanoid pathway를 통하여 shikonicin과 rosmarinic acid를 생산하는 *Lithospermum erythrorhizon* 으로부터 분리한 *c4h* 유전자가 빛의 조사, 오옥신 및 jasmonate의 첨가 등 다양한 환경자극인자를 처리하

였으나 mRNA 수준이 증가되지 않고 일정하게 발현되는 것으로 보고 하였다.

고추에서는 아직까지 C4H를 암호 하는 유전자에 관한 연구 보고가 없었으며, 향후 다양한 종류의 외부 환경스트레스는 물론, 이 효소가 주요한 역할을 하는 것으로 알려진 phenylpropanoid pathway를 통하여 고추 과실 내에서의 합성되는 capsaicinoids 화합물의 축적과 관련된 유전자 발현 특이성에 관한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 적 요

본 연구는 고추열매의 capsaicinoid 생합성 조절 기작을 연구하고자 general phenylpropanoid pathway의 2번째 단계에 작용하는 것으로 알려진 3종류의 *c4h* cDNA clone을 확보하여 염기서열을 분석한 결과, *pc4h1*와 *pc4h2*의 크기는 각각 1,775 bp와 1,655 bp으로 505개의 아미노산으로 구성된 펩티드를 암호하는 full length의 ORF를 갖추고 있었으나 *pc4h3*는 5'-말단의 coding 영역 일부가 소실 되었다. 이들은 공히 모든 cytochrome P450 효소에서 진화학적으로 보존되어 있는 3종류의 conserved region 즉 domain 1 (proline-rich region), domain 2 (threonine-containing binding pocket for the oxygen molecule), 그리고 domain 3 (heme binding region)을 포함하고 있었으며 evolutionary tree분석을 통하여 *pc4h1*와 *pc4h2*는 모두 Class I에 속하는 것으로 서로 간에는 95.8%의 유사성을 나타내어 거의 동일한 유전자인 것으로 조사되었다. 특히 Class II로 분류된 *Citrus sinensis* C4H1과 *Phaseolus vulgaris* C4H와는 단지 64.9에서 64.5%의 homology를 나타내었다. 또한 *pc4h2*는 상처를 주지 않은 조직에서는 비교적 적은 양의 mRNA 발현수준을 보였으나 상처를 가한 후 6시간의 열매에서는 400%, 뿌리에서는 200%까지 그 발현 양이 증가하였다. 이와 유사하게 *pc4h1*의 전사량도 상처에 의하여 유도는 되나 basal level이 *pc4h2*보다 높아서 발현증가 비율은 그다지 높지 않았다. 반면에 *pc4h3* 유전자는 상처를 주지 않은 모든 조직에서 거의 발현되지 않았으며 상처에 의하여서도 전혀 반응을 하지 않았다.

## 인용문헌

- Bennett DJ, Kirby GW (1968) Constitution and biosynthesis of capsaicin. J Chem Soc C:442-446
- Betz C, McCollum TG, Mayer RT (2001) Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in Valencia orange (*Citrus sinensis* Osbeck). Plant Mol Biol 46:741-748
- Blount JW, Korth KL, Masoud SA, Rasmussen S, Lamb C,

- Dixon R (2000) Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiol* 122: 107-116
- Blount JW, Masoud SA, Sumner LW, Huhman D, Dixon R (2002) Over-expression of cinnamate 4-hydroxylase leads to increased accumulation of acetosyringone in elicited tobacco cell-suspension cultures. *Planta* 214: 902-910
- Chapple C (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 311-343
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369
- Kim KW, Varindra R, Cho KJ, Kim JG, Lee SW (2000) Comparison of accumulation of capsaicinoid contents with capsaicinoid synthetase activity at different developmental stages of *Capsicum annuum* L. *Agric Chem Biotechnol* 43: 152-155
- Nakamura M, Satoh T, Tanaka SI, Mochizuki N, Yokota T, Nagatani A (2005) Activation of the cytochrome P450 gene, CYP72C1, reduces the levels of active brassinosteroids in vivo. *J Exp Bot* 56:833-840
- Nedelkina S, Jupe SC, Blee KA, Schalk M, Werck-Reichhart D, Bolwell GP (1999) Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from french bean: engineering expression in yeast. *Plant Mol Biol* 39: 1079-1090
- Paquette SM, Bak S, Feyereisen R, (2000) Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol* 19: 307-317
- Potter S, Moreland DE, Kreuz K, Ward E (1995) Induction of cytochrome P450 genes by ethanol in maize. *Drug Metabol Drug Interact* 12: 317-327
- Schuler MA (1996) Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Crit Rev Plant Sci* 15: 235-284
- Schuler MA, Werck-Reichhart D (2003) Functional genomics of P450s. *Annu Rev Plant Biol* 54: 629-667
- Suzuki T, Kawada T, Iwai K (1981) Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits. *Plant Cell Physiol* 22: 23-32
- Teutsch RG, Hasenfratz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, Durst F, Werck-Reichhart D (1993) Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4102-4107
- Tijet N, Helvig C, Feyereisen R (2001) The cytochrome P450 genes superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* 262: 189-198
- Von Wachenfeldt C, Johnson EF (1995) Structures of eukaryotic cytochrome P450 enzymes. In : Ortiz de Montellano PR (eds), *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and Biochemistry*, Vol. 2. pp183-223
- Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* 1: 3003-3009
- Werck-Reichhart D, Bak S, Paquette S (2002) Cytochrome P450. In the *Arabidopsis Book*, eds. CR Somerville, EM meyerwitz, American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0028, <http://aspb.org/publications/arabidopsis>.
- Yamamura Y, Ogihara Y, Mizukami H (2001) Cinnamic acid 4-hydroxylase from *Lithospermum erythrorhizon*: cDNA cloning and gene expression. *Plant Cell Rep* 20: 655-662

(접수일자 2005년 8월 22일, 수리일자 2005년 9월 1일)