

Analysis of Expression Pattern of the Limonoid UDP-glucosyltransferase Gene as an Indicator for Delayed Bitterness from the *Citrus* Species Endemic in Jeju

Young Mee Kim¹, Do Seung Lee², Deokhyoen Jeon², Yeonwoo Song²,
Dong-Sun Lee^{2,3}, Key Zung Ryu^{2,3}, Moonjae Cho¹, Dong Hoon Lee⁴ and Somi Kim Cho^{2,3*}

¹Department of Medicine, Medical School, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

⁴Citrus Research station, National Institute of horticultural & Herbal Science,
Rural Development Administration, Seogwipo 697-943, Korea

재래귤의 성숙시기별 리모노이드 쓴맛 표시자로서 limonoid UDP-glucosyltransferase 발현 분석

김영미¹ · 이도승² · 전덕현² · 송연우² · 이동선^{2,3} · 류기중^{2,3} · 조문제¹ · 이동훈⁴ · 김소미^{2,3,*}

¹제주대학교 의과대학 의학과, ²제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

³제주대학교 아열대산업원에 연구소, ⁴국립원예특작과학원 감귤시험장

Abstract

Limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT) is an enzyme that converts limonoids into their corresponding glucosides and ultimately ameliorates limonoid bitterness in *Citrus* species. In this paper, the LUGT gene was cloned via PCR from 10 Jeju *Citrus* species. All the deduced glucosyltransferase proteins harbored a highly conserved plant secondary product glucosyltransferase (PSPG) motif within the C terminal region. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequence comparison of the LUGT proteins from 10 *Citrus* species generated three distinct types. The expression patterns of LUGT gene in three representative species from each type were quite different with that of *C. unshiu* Marc. cv. Miyagawawase(Gungcheon), which has without distinctive juice delayed bitterness. Our results show that at some *Citrus* species such as *Citrus leiocarpa* HORT(Bingul), *Citrus erythrosa* HORT(Dongjunggul), and *Citrus tachibana* TANAKA(Honggul) endemic in Jeju may be susceptible to intense juice delayed bitterness due to delay in expression of LUGT.

Key words : *citrus*, cDNA, delayed bitterness, limonoid UDP-glucosyltransferase

서론

리모노이드 화합물은 테르펜 유도체로서, 상당량의 리모노이드 화합물들이 감귤류에 존재하며 감귤에서는 약 36종의 분리되었다(1-4). 이들은 limonoid aglycones와 limonoid glucoside 형태로 발견되며 감귤이 성숙되어 과정 중에 생합성된다고 알려져 있다(5). 리모노이드 화합물 중에서 리모닌은 limonoid bitterness를 유발하여 감귤 주스의 시장가치를

저하시키는 화합물인 반면, limonoid glucoside는 쓴 맛이 없으며 물에 잘 녹는 활성 물질이다(1). 몇몇 감귤 품종에서 주스 공정 때 점진적으로 발생한다고 보고된 limonoid bitterness는 'delayed bitterness'라 일컫기도 하며 이는 냉동 및 기계적인 상해가 가해졌을 때에도 발생한다(6). 보통 감귤 과실조직은 쓴맛이 없는 리모닌 전구체인, limonoate A-ring lactone (LARL)를 지니고 있는데, 주스 가공 시 pH 6.5 이하의 산성 조건에서는 LARL이 리모닌으로 전환된다(7). 한편, 동남 아시아권에서 생식용이나 주스 가공용으로 가장 인기 있는 감귤품종인 온주밀감(*Citrus unshiu* Marc.)

*Corresponding author. E-mail : somikim@jejunu.ac.kr
Phone : 82-64-754-3348, Fax : 82-64-756-3351

의 경우에는 다른 감귤 품종에 비해, 'delayed bitterness'가 매우 약한데, 온주는 과실의 성숙 초기 단계에서부터 당전달 효소(glucosyltransferase;GT) 작용에 의해 LARL이 쓴맛이 없는 리모닌 글루코사이드로 전환되기 때문인 것으로 보고되고 있다(8). 대체적으로 감귤의 성숙 과정이 진행되는 동안 리모노이드 배당체 형태로 전환됨에 따라 리모노이드 함량은 감소한다고 보고되고 있으나(9), 리모노이드 배당체의 축적 패턴은 감귤 종마다 다르다.

동물세포에서와 유사하게 감귤과 같은 고등식물에서도 당전달 효소(glucosyltransferase)의 작용에 의해 당공여체인 당핵산(sugar-nucleotide)으로부터 식물의 이차대사산물이나 호르몬에 당이 첨가되며 이러한 당화반응은 식물체 대사의 항상성을 유지하는 핵심적인 기작이 되고 있다(10). UDP-glucose-dependent 당전달 효소는 식물유래 2차대사 산물들의 생물학적인, 약학적인 연구할 때 매우 관심을 끌고 있는 연구 주제이지만 아직까지는 매우 제한적인 연구만이 진행되어 당전달효소의 특성에 대해 밝혀진 바가 많지 않다(11). 쓴 맛의 리모닌을 리모닌 배당체로 전환시키는 반응은 Limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT)에 일어나는데 LUGT 유전자는 일본 연구자들에 의해 온주밀감 (*Citrus unshiu* Marc.)으로부터 클로닝되었다(12). 그 이후 대사체 프로파일과 기능유전체학적인 접근을 통해 생체 내, 생체 밖에서의 재조합단백질 LUGT의 기질 선호도에 대한 예측 연구가 진행 된 바 있다(12,13). 특히 delayed bitterness에 대한 분자적 기작은 아직도 감귤 연구에서 주요한 의문점으로 남아 있는데 Fariborz 등(14)은 Satsuma mandarin (without distinctive juice delayed bitterness)의 LUGT 유전자와 동일한 염기서열을 지닌 sweet lime (with intense juice delayed bitterness)의 경우처럼, 특정 감귤 종에서 발생하는 delayed bitterness의 원인이 LUGT유전자의 결핍이나 유전자 결합에 의한 것이 아니라 LUGT 발현시기가 지연됨으로써 과일 내 리모닌 글루코사이드 축적이 저조한 것에 기인한다고 보고하였다.

제주도에만 자생하는 재래귤은, 민속자료 및 동의보감에 의하면 한방학적 효과가 탁월하고 다른 과실에는 찾아볼 수 없을 정도로 특이한 성분과 기능성 물질을 함유하고 있다고 보고되고 있다. 특히, 제주산 재래귤인 당유자에 대한 선행 연구결과에서 리모노이드 함량이 상당량 보고되었으며 기능성 소재로서 개발 가능성이 높다고 제기되었다(15). 하지만 재래귤은 생식용으로는 맛이 없고 쓴맛이 강해 점차 새로운 품종으로 개량되어 지금은 병귤, 당유자, 동정귤, 홍귤, 진귤, 빈귤, 사두감, 감자, 유자, 편귤 등 몇 가지 재래종만이 남아 있다.

본 연구에서는 식품가공 소재로서 재래귤을 재조명할 수 있도록 LUGT 유전자 염기서열 및 성숙시기별 LUGT 유전자 발현양상의 분석을 통해 재래귤의 delayed bitterness에 대한 기초 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

본 실험에 사용된 10가지 종류의 감귤 종인 *C. grandis* (L.) Osbeck(당유자), *C. benikoji* Hort. Ex Tanaka(감자), *C. erythrosa* Hort. Ex Tanaka(동정귤), *C. pseudogulgul* Hort. Ex Tanaka(사두감), *C. tangerina* Hort. Ex Tanaka(편귤), *C. sunki* Hort. Ex Tanaka(진귤), *C. junos* sieb. Ex Tanaka(유자), *C. leiocarpa* Hort. Ex Tanaka(빈귤), *C. unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase(궁천조생), *C. tachibana* (Mak.) Tanaka(홍귤)은 제주 국립원예특작과학원으로부터 제공받았다. 모든 샘플은 채집 즉시 액체 질소에 얼려졌고, 사용 전까지 -80℃에서 냉동보관 하였다.

RT-PCR

Total RNA 추출을 하기 위해 RNAeasy Trizol kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 사용하였고, 1.0% 아가로스 겔 전기영동을 통해 확인하였다. 추출된 RNA의 농도는 260 nm 파장에서 UV흡광광도계를 이용하여 측정하였다. RNA로부터 cDNA합성은 ImProm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wis)을 이용하여 42℃에서 1분 동안 합성하였다. 궁천조생의 limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT) 유전자(16)로부터 유래한 forward primer 5'- AATTTTAGAACAAATCATTTCGAGAATA와 reverse primer 5'-AGTGCTTTGAGTCAGAACTTCCAA를 이용하여 PCR 과정을 통해 LUGT유전자를 증폭시켰다. 실험에 사용된 감귤 종들의 LUGT유전자는 pGEM-T Easy vector(Promega, Madison, Wis)에 삽입하여 *E. coli* JM109에 형질전환 시킨 뒤 서열 분석을 하였다.

서열 분석

시료들의 염기 서열은 BigDye 3.1 terminating sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 결정하였고, 상동성 분석은 BLAST 알고리즘을 이용하여 수행되었다. NCBI Genbank, Motifscan, ExPASy sever의 Prosite, EBI server의 ClustalW database에 등록된 염기서열의 비교는 FASTA program을 통해 수행되었다. 각각의 서열에서 일어날 수 있는 가능한 모든 motif를 Motifscan과 Prosite를 통해 밝혔다. DNA와 단백질의 다중서열정렬을 위해 ClustalW를 사용하였고, Genebee를 통해 종들간의 계통발생 관계를 분석하였다. 계통수는 PhyloDraw program (14)을 통해 그려졌다.

결과 및 고찰

재래감귤의 LUGT 염기 서열 비교

이전의 연구에서 보고된 LUGT 유전자의 코딩지역에 해

Table 1. Different motifs and sites in citrus Limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT)

Citrus spp. Motif function	<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck (Dangyuja)	<i>C. junos</i> sieb. Ex Tanaka (Yuja)	<i>C. sunki</i> Hort. Ex Tanaka (Jingul)	<i>C. leiocarpa</i> Hort. Ex Tanaka (Bingul)	<i>C. erythrosa</i> Hort. Ex Tanaka (Dongjunggul)	<i>C. tangerina</i> Hort. Ex Tanaka (Pyungul)	<i>C. benikoji</i> Hort. Ex Tanaka (Gamja)	<i>C. pseudogulgul</i> Hort. Ex Tanaka (Sadugam)	<i>C. tachibana</i> (Mak.) Tanaka (Honggul)	<i>C. unshiu</i> Marc. cv. Miyagawa wase (Gungcheon)	
N-glycosylation site	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	54 NFTY 57 363 NSTM 366	
cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	465 RRRS 468	
Casein kinase II phosphorylation site	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497	40 TTPE 43 108 SAEE 111 164 SEKE 167 219 TFYE 222 253 TVRD 256 342 SPQE 345 364 STME 367 412 SRDE 415 494 TAND 497
N-myristoylation site	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR 403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409 426 GLKAAE431	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 398 GLRLCR403	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 398 GLRLCR403	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 398 GLRLCR403	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 398 GLRLCR403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409	135 GLPSAM 140 204 GQYENL209 323 GLPDGF 328 398 GLRLCR403 398 GLRLCR 403 404 GQAENR409
Protein kinase C phosphorylation site	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506	164 SEK 166 253 TVR 255 453 SDR 455 474 SSK 476 504 SRR 506
Cell attachment sequence	83 RGD 85				83 RGD 85		83 RGD 85	83 RGD 85	83 RGD 85	83 RGD 85	
Tyrosine kinase phosphorylation site	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	82 RRGDLdQY 89	
UDP-glucosyltransferases signature	341384	341384	341384	341384	341384	341384	341384	341384	341384	341384	

당하는 프라이머를 이용하여(16), 10 종류의 재래감귤, *C. grandis* (L.) Osbeck(당유자), *C. benikoji* Hort. Ex Tanaka(감자), *C. erythrosa* Hort. Ex Tanaka(동정귤), *C. pseudogulgul* Hort. Ex Tanaka(사두감), *C. tangerina* Hort. Ex Tanaka(편귤), *C. sunki* Hort. Ex Tanaka(진귤), *C. junos* sieb. Ex Tanaka(유자), *C. leiocarpa* Hort. Ex Tanaka(빈귤), *C. unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase(궁천), *C. tachibana* (Mak.) Tanaka(홍귤)로부터 분리한 RNA에 대해 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Kita 등 (16)이 보고된 바와 동일한 크기의 1,536 bp에 해당하는 유전자 단편을 확인할 수 있었고, 아미

노산 잔기에 의해 추론된 분자량은 57.5 kDa을 나타냈는데 이는 Hasegawa 등(17)이 보고한 바와 일치하였다. 10종의 감귤 LUGT 아미노산 서열을 이용하여 multi-alignment analysis 을 실시한 결과, C-말단에 UDP-binding domain으로 밝혀진 44개의 아미노산 잔기를 포함하여 암호화 염기 서열 전 지역에 걸쳐 상당한 유사성을 나타냈다 (Fig. 1.) 이들 아미노산 서열의 C-말단에 존재하는 44개의 아미노산 잔기는 PSPG (plant secondary product GTase) - box라고 불리는데 UTP-sugar로부터 소수성의 분자에 당을 전달하는 효소인 UDP-glucosyltransferase (GTase)에서 공통적으로 발견되는 서열이다(18). 특히 Fig. 1에 박스로 표시한

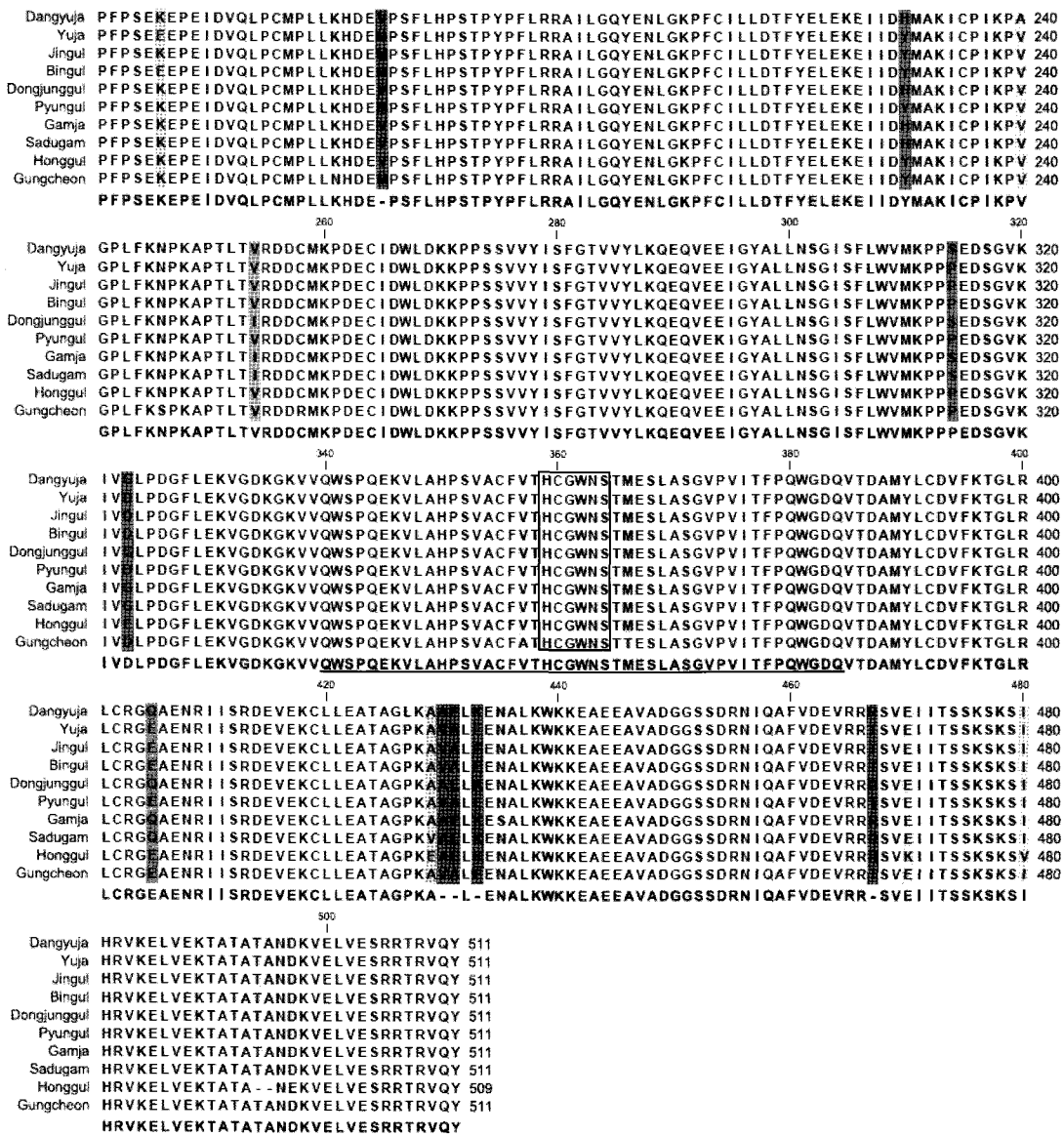


Fig. 1. Amino acid sequence comparison of limonin UDP glucosyltransferase (LUGT) of 10 citrus species.

C. grandis (L.) Osbeck (Dangyuja), *C. benikoji* Hort. Ex Tanaka (Gamja), *C. erythrosa* Hort. Ex Tanaka (Dongjunggul), *C. pseudogulgi* Hort. Ex Tanaka (Sadugam), *C. tangerina* Hort. Ex Tanaka (Pyungul), *C. sunki* Hort. Ex Tanaka (Jingul), *C. junos* sieb. Ex Tanaka (Yuja), *C. leiocarpa* Hort. Ex Tanaka (Bingul), *C. unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase (Gungcheon), *C. tachibana* (Mak.) Tanaka (Honggul). Multiple sequence alignment was calculated with ClustalW. Gray shading shows amino acid identities and black shading shows amino acid similarity. Underlining indicates the signature sequence (PSPG box) of glucosyltransferases. The conserved domain of LUGT is boxed.

PSPG-box 서열 내부에 존재하는 H³⁵⁹CGWNS³⁴ 펩타이드는 거의 대부분의 식물 당전달효소에 잘 보존되어 있는 서열이다(19). 따라서 10종류의 감귤류의 LUGT가 당전달효소의 특징적인 서열을 잘 보존하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 지역을 제외한 나머지 부분에서는 등록된 동, 식물 당전달효소와 유사성을 나타내지 않았다.

감귤 LUGT 계통 분석

DNAStar software를 사용하여 10 종류의 감귤 LUGT에 대해 계통분석을 한 결과는 Fig. 2에 나타났다. 재래귤 당유자는 감자 동정귤, 사두감과 가까운 계통인 반면, 편귤 진귤

유자, 빈귤, 그리고 궁천 간에는 상당히 높은 유사성이 있음을 알 수 있다. 흥미롭게도 실험에 사용한 10종의 감귤 중에서 홍귤만이 네이블과 근친성을 나타내고 있어 홍귤은 실험에 사용한 재래귤과는 다소 다른 계통에 속함을 알 수 있다. 당유자의 LUGT 아미노산 서열은 유자, 진귤, 빈귤, 궁천, 편귤과 96%의 상동성을 나타냈으며, 동정귤, 감자, 사두감과는 98%의 상동성을, 딸기(*Fragaria x ananassa*)와는 64%의 상동성을, 그리고 포도(*Vitis labrusca* and *Vitis vini*)와는 26%의 상동성을 나타냈다.

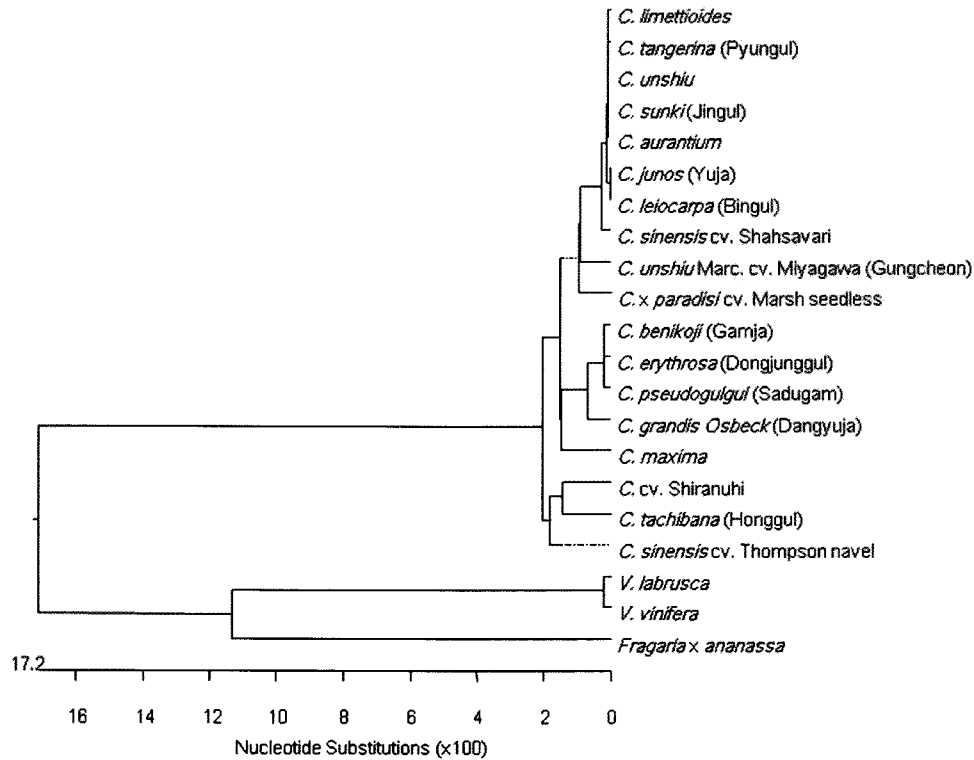


Fig. 2. Phylogenetic tree of citrus LUGT.

The protein sequences used to construct the tree and accession number are as follows: *C. x paradisi* (ACD14144.1), *C. maxima* (ABY27084.1), *C. unshiu* (Q9MB73.1), *C. aurantium* (ACD14146.1), *C. limettioides* (ACD14143.1), *C. sinensis* cv. Shahsavari (ACD14145.1), *C. sinensis* cv. Thompson navel (ACD14147), *C. cv. Shiranuhi* (ABL63751.1), *Vitis labrusca* (Q0P114_9MAGN), *Vitis vinifera* (A5ATH4_VITV), *Fragaria x ananassa* (AAU09443.1).

과일 성숙 기간 중 LUGT 발현 양상

감귤 품종의 delayed bitterness가 LUGT 유전자의 결핍이나 돌연변이에 의해서 뿐만 아니라 발현 시기에 의해서도 발생한다고 보고되고 있는 바, Fariborz 등(14)은 delayed bitterness를 나타내지 않는 품종인 만다린의 경우에는 개화 후 60일부터 수확시기까지 LUGT 유전자가 발현되는 반면, delayed bitterness을 나타내는 품종인 sour orange와 sweet lime의 경우에는 각각 개화 후 120일과 210일에 LUGT 유전자가 발현된다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 다수의 제주산 재래귤을 대상으로 리모노이드 쓴맛의 수준을 예측하기 위해, 분자적인 표시(molecular indicator)로서 LUGT 유전자를 활용하고자 했다. 이를 위해 delayed bitterness가 뚜렷하지 않은 제주산 궁천 온주밀감의 성숙단계별 LUGT 유전자 발현 양상과. 계통수분석 결과에 근거하여 선택한 빈굴, 동정굴, 홍굴 등 3종의 재래귤의 성숙단계별 LUGT 유전자 발현 양상을 비교했다. 궁천은 제주지역에서 재배되는 조생온주밀감 중 가장 많이 심어져 있는 품종으로 그 수확시기는 10월 하순이므로 시료 채취기간을 7월(개화 후 약 60일)부터 11월까지, 그리고 재래귤인 빈굴, 동정굴, 홍굴은 개화 후 익년 1월까지를 시료 채취 기간으로 설정하고 5단계의 성숙 시기별 LUGT 유전자 발현을 분석한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 빈굴과 동정굴은 개화 후

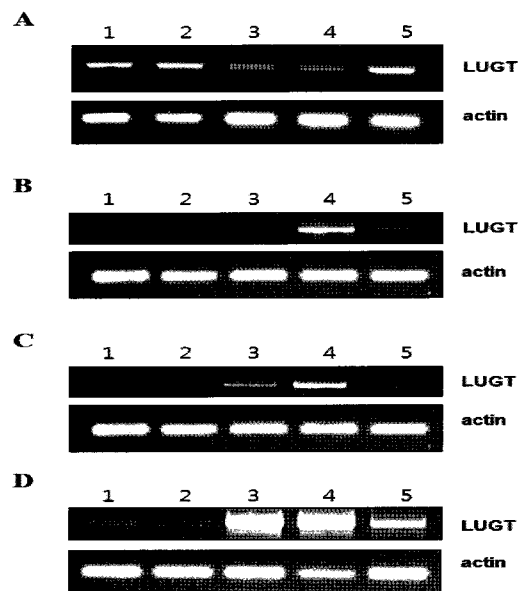


Fig. 3. Expression patterns of the LUGT gene in the five different developmental stages of Jeju citrus.

The number 1-5 represents July, August, September, October, and November, respectively in (A), whereas it represents July, September, November, December, and January, respectively in (B), (C), and (D). The actin gene was used as the control. The expression patterns were analyzed via RT-PCR, which was amplified after 30 cycles with specific primer pairs for the LUGT gene. (A) *C. unshiu* Marc. cv. Miyagawa wase (Gungcheon), (B) *C. leiocarpa* Hort. Ex Tanaka (Bingul), (C) *C. tachibana* (Mak.) Tanaka (Honggul), (D) *C. erythrosa* Hort. Ex Tanaka (Dongjunggul).

60일부터 LUGT 유전자가 발현되기 시작한 반면 홍귤의 경우에는 180일 이후부터 발현을 감지할 수 있었다. 4종의 감귤 품종 간에 LUGT 발현양의 정도와 발현시기에 뚜렷한 차이점을 확인할 수 있었는데, delayed bitterness가 거의 없는 궁천의 경우에는 성숙초기부터 일정한 수준의 LUGT 유전자를 발현 했으며 과실이 성숙됨에 따라 그 발현양이 점진적으로 증가하여 수확시기에 최대치에 도달했다. 한편 재래귤인 빈귤, 홍귤, 동정귤의 경우, 대체적으로 미성숙과에서는 발현양이 미미했으나 성숙이 진행될수록 발현양이 급격히 증가하다가 성숙 후기에는 오히려 감소하는 경향을 나타냈다. 특히 홍귤은 성숙초기에 LUGT 유전자 발현을 거의 확인할 수 없어서 전형적인 delayed bitterness를 유발하는 품종으로 사료된다. 동정귤의 경우에는 낮은 수준이지만 미성숙시기에도 LUGT 유전자 발현이 확인되었고 또한 성숙기로 접어들면서 급격한 발현양의 증가를 나타내고 있어 시험 대상인 재래귤 중 delayed bitterness에 대해 가장 둔감할 것으로 예상할 수 있다.

요 약

Limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT)는 리모노이드에 포도당을 붙여줌으로써 궁극적으로 감귤에서 발생하는 limonoid bitterness를 제거해 주는 효소이다. 본 연구에서는 10종의 제주산 감귤로부터 LUGT 유전자를 PCR 클로닝하고 그 염기서열을 비교했다. 실험에 사용한 모든 종에서 카르복실기 말단에 식물 당전달 효소에서 발견되는 전형적인 아미노산 서열인 plant secondary product glycosyltransferase (PSPG) 모티프가 존재했다. 아미노산 서열에 의한 계통수 분석을 실시해본 결과 10종의 제주산 감귤은 3그룹으로 분류했다. 각 그룹의 대표적인 3종 재래귤 품종 빈귤, 동정귤, 홍귤의 성숙 시기별 LUGT 발현양상은 delayed bitterness가 거의 없는 궁천과는 다른 양상을 나타내었다. 이러한 결과들은 빈귤, 동정귤, 홍귤과 같은 일부 재래귤 품종에서의 쓴맛은 LUGT 발현이 지연됨에 따라 발생하는 delayed bitterness에 기인할 수 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 (KRF-2008-331-F00063) 지원과 대학중점연구소 지원사업(2010-0029630)으로 수행된 연구임

참고문헌

1. Hasegawa S, Bennet RD, Fong CH, Herman Z and Peter

- OU (1989) Glucosides of acidic limonoids in citrus. *Phytochemistry*, 28, 2777-2781
2. Hasegawa S, Peter OU, Fong CH, Herman Z, Coggins CW Jr and Atkin DR (1991) Changes in limonoate A-ring lactone and limonin 17-beta-D-glucopyranoside content of Navel oranges during fruit growth and maturation. *J Agric Food Chem*, 39, 262-265
3. Fong CH, Hasegawa S, Miyake M, Ozaki Y, Coggins CW Jr and Atkin DR (1993) Limonoids and their glucosides in Valencia orange seeds during fruit growth and development. *J Agric Food Chem*, 41, 112-115
4. Maier VP, Bennet RD and Hasegawa S (1997) *Citrus Science and Technology 1. Nutrition, Anatomy, Chemical Composition and Bio-regulation*. Avi: West Port, CT, p 355-396
5. Ruberto G, Renda A, Tringali C, Napoli EM and Simmonds MSJ (2002) Citrus limonoids and their semi-synthetic derivatives as anti-feedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem*, 50, 6766-6774
6. Maier VP, Beverly GD (1968) Limonin monolactone, the nonbitter precursor responsible for delayed bitterness in certain citrus juices. *J Food. Sci*, 33, 488-496
7. Maier VP, Hasegawa S, and Hera E (1969) Limonin D-ring-lactone hydrolase. A new enzyme from citrus seeds. *Phytochemistry*, 8, 405-407
8. Ozaki Y, Ayano S, Inaba N, Miyake M, Berhow MA and Hasegawa S (1995) The potential of citrus limonoids as anticancer agents. *J Food. Sci*, 60, 186-189
9. Hashinaga F, Itoo S (1981) Seasonal changes of limonoids in the component parts of several citrus fruits. *Proc. Int Soc Citriculture*, 2, 901-905
10. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Be' langer A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louiset P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF and Nebert DW (1997) The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7, 255-269
11. Claire MM, Gachon (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci*, 10, 542-549
12. Li Y, Baldauf S, Lim EK and Bowles DJ (2001) Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyl transferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 276, 4338-4343

13. Kubo A, Aral Y, Nagashima S and Yoshikawa T (2004) Alteration of sugar donor specificities of plant glycosyltransferases by a single point mutation. *Arch Biochem Biophys*, 429, 198-203
14. Fariborz ZN, Saman H, Zabihollah Z, Asad Asadi-Abkenard and Reza (2008) Delay expression of limonoid UDP-glycosyltransferase makes delayed bitterness in citrus. *Biochem Biophys Res Comm*, 371, 59-62
15. Boo KH, Kim HN, Riu KZ, Kim YW, Cho M, Cho S (2007) Analysis of the limonoid contents of dangyuja (*Citrus* spp.) by the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 50, 238-243
16. Endo, T, Kita M, Shimada T, Moriguchi T, Hidaka T, Matsumoto R, Hasegawa S and Omura M (2002) Modification of limonoid metabolism in suspension cell culture of citrus. *Plant Biotechnol*, 19, 397-403
17. Hasegawa S, Suhayda CG, Hsu WJ and Robertson GH (1997) Purification of limonoid glycosyltransferase from navel orange albedo tissues. *Phytochemistry*, 46, 33-37
18. Hundle BS, O'Brien DA, Alberti M, Beyer P and Hearst JE (1992) Functional expression of zeaxanthin glycosyltransferase from *Erwinia herbicola* and a proposed uridine diphosphate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 9321-9325
19. Vogt T and Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends Plant Sci*, 5, 380-386

(접수 2010년 7월 28일 수정 2010년 11월 18일 채택 2011년 3월 18일)