

토마토에서 분리한 3종류의 Phenylalanine ammonia-lyase gene에 대한 염기서열 및 특성비교

여윤수* · 예완해 · 이신우 · 배신철 · 류진창 · 장영덕¹

농촌진흥청 농업과학기술원 생물자원부, ¹충남대학교 농과대학 농생물학과

Complete Nucleotide Sequence Analysis and Structural Comparison of 3 members of Tomato Phenylalanine ammonia-lyase gene

YEO, Yun Soo* · WEH, Wan Hae · LEE, Shin Woo · BAE, Shin Churl · RHU, Jin Chang · CHANG, Young Duck¹

National Agricultural Sciences and Technology Institute, Department of Bioresources, Suweon 441-707, Korea

¹Chung Nam National University, Department of Agricultural Biology, Taejon, 305-764, Korea

ABSTRACT Phenylalanine ammonia-lyase (PAL; EC 4,3,1,5) genomic clones were isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) genomic DNA libraries using tomato PAL5 cDNA sequences as probes. The nucleotide sequences of *tPAL1*, *tPAL4* and *tPAL5* were compared. *tPAL5* contains an open reading frame encoding a polypeptide of 722 amino acids, interrupted by a 710 bp intron in the codon for the amino acid 139. *tPAL1* encodes a polypeptide of 249 amino acids which is much shorter than *tPAL5* gene due to a premature stop codon and does not contain an intron. *tPAL4* encodes a polypeptide of 357 amino acids, interrupted by a 305 bp intron in the codon for the amino acid 138. Premature stop codons observed in *tPAL1* and *tPAL4* gene produce a short polypeptide rather than a normal polypeptide (722 aa). *tPAL1* shows 87.2% homology with *tPAL4* and 85.3% homology with *tPAL5* gene whereas *tPAL4* shows 91.4% homology with *tPAL5* at nucleotide level. In general, phylogenetic analysis showed that genes isolated from tomato, potato, and sweet potato were belong to the same group and another dicot plants such as parsley, bean, soybean, pea and alfalfa formed another group. PAL genes isolated from rice and yeast showed very low homology with other PAL genes and formed the other group.

Key words: Polypeptide, stop codon, phylogenetic analysis

서 론

식물은 phenylpropanoid 대사과정을 통하여 다양한 기능의 2차 대사 산물 전구체를 합성하는데, 합성된 전구체는 식물의 성장기간 동안에 그 기능에 따라 다양하게 분포한다. 이러한 산물들에는 분화시에 식물의 세포벽을 형성하는 lignin, 코르크 형성층, 내피조직의 구성성분인 suberin 등을 포함할

뿐만 아니라 (Esau 1977), 색소관련 물질인 anthocyanine을 생산하는 flavonoid 대사과정 등도 포함된다 (Forkmann 1993). 또한 phenylpropanoid 화합물은 외부환경 스트레스에도 민감하게 반응하여 다양한 화합물을 합성하는데 UV 조사 시 방어물질로 생성되는 isoflavonoid protectant (Schmelzer et al. 1988), 상처 또는 병원균 침입시 합성되는 lignin, suberin, 세포벽 관련물질 (Cottle and Kolattukudy 1982) 등이 있다. 특히 어떤 식물에서는 병원균 또는 elicitor 처리시 병원균을 저지하는 작은 분자인 phytoalexin을 생성한다 (Jahnen and Hahlbrock 1988). 이렇게 복잡한 phenylpropanoid 화합물은 식물기관의 발달, 또는 외부환경 스트레

*Corresponding author. Tel 0331-290-0351

E-mail ysyeo@niast.go.kr

스에 따라 식물 조직에 특이적으로 다양하게 축적된다 (Lamb et al. 1989).

이러한 다양한 종류의 2차 대사산물을 생산하는 phenylpropanoid 대사과정은 shikimate 합성과정에 의한 phenylalanine이라는 단순한 분자로부터 개시되며, 이는 그 다음 단계인 *trans*-cinnamic acid로 전환되는데 이 단계에 관여하는 매우 중요한 인자가 phenylalanine ammonia-lyase (PAL: EC 4.3.1.5)라는 효소이다. 특히 이 효소는 phenylalanine의 암모니아기를 제거하는 촉매 작용을 하며, phenylpropanoid 대사과정에 있어서 가장 중요한 조절 요인으로 알려져서 많은 연구가 이루어졌다. 이미 잘 알려진 예로 상처, 병원균의 침입, 빛의 조사 등의 자극을 가하였을 때 PAL 효소의 활성은 크게 증가하면서 앞으로 열거한 phenylpropanoid 화합물들의 합성량이 증가되는데 (Lee et al. 1992a) 특히 초기 침입 단계에서 병 저항성 식물은 감수성 식물보다 phenylpropanoid 유도체가 다량으로 생산되는 것으로 밝혀졌다 (Robb et al. 1987).

이러한 생화학적 연구를 보다 분자생물학적 수준에서 이해하고자 Edwards 등 (1985)이 최초로 bean에서 PAL cDNA clone을 확보하는데 성공하였고, parsley (Lois et al. 1989), bean (Cramer et al. 1989), 벼 (Minami et al. 1989), *Arabidopsis* (Ohl et al. 1990), 토마토 (Lee et al. 1992b) 등의 식물로부터 genomic clone을 분리하게 되었다. 분리한 genomic clone을 사용하여 유전자의 구조, 전사 수준에서의 외부환경에 대한 발현의 조절 기작 등을 밝히는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

현재까지 분리한 결과들을 종합하여 보면 PAL 유전자는 대개 2-6개의 유전자들로 구성된 하나의 작은 family로 존재한다고 보고되었다 (Wanner et al. 1995). 그러나, 감자 (Joos and Hahlbrock 1992)에서는 40개 이상이 있으며, Whetten과 Sederoff (1992)는 loblolly pine인 경우 단일유전자로 존재한다고 보고하였다. 특히 토마토의 경우, PAL 효소는 5개의 유전자가 코딩하고 있는 것으로 밝혀졌으나, PAL5 유전자를 제외한 나머지 유전자에 대한 정보는 아직 부족한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 3종의 토마토에서 PAL 유전자를 분리하여 완전한 염기서열을 행하였고 각 유전자의 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

Genomic DNA분리 및 유전자은행 작성

토마토 DNA분리에는 Rogers와 Bendich (1988)의 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)방법을 다음과 같이 수정하여 수행하였다. 4주일 정도 자란 토마토 (Var. Seokwang)의 잎 10g을 액체질소와 함께 마쇄하여 2 × CTAB

Buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris. pH 8.0, 20 mM EDTA, 2% -mercaptoethanol) 10 mL를 넣고 잘 혼합한 후 65°C water bath에 10분간 두었다. 그후 동량의 chloroform:isoamylalcohol (24:1) 을 첨가하여 15분간 저속 혼합기를 이용하여 혼합하였다. 이 혼합액을 15분간 원심분리 (5000 rpm)하여 상등액을 취하고 chloroform: isoamylalcohol 추출을 1회 반복하고 2% potassium acetate가 들어있는 동량의 95% ethanol을 넣고 깨끗한 튜브에 spool하였으며 최종적으로 CsCl 밀도구배법을 이용하여 DNA를 분리하였다.

분리된 토마토의 genomic DNA를 사용하여 다음과 유전자은행을 같이 제작하였다. Seokwang의 경우는 genomic DNA를 Sau3AI으로 불완전하게 절단한 후 sucrose 밀도구배 원심분리에 의하여 크기가 15-29 kb인 fraction을 따로 분획하여 정제한 다음 BamHI으로 절단된 EMBL3 arm (Stratagene) vector와 ligation 반응후 Gigapack gold kit (Stratagene)를 사용하여 *in vitro* packaging하였다. 이외에도 미국 코넬대학의 Tanksley 실험실에서 분양받은 것 (var. VFNT Cherry)과 Stratagene회사에서 구입한 것 (var. VFN8)을 각각 유전자은행으로 사용하였다.

염기서열 분석

Genomic DNA 유전자 은행으로부터 검색된 clone들에 대하여 삽입단편의 크기 및 특성을 파악한 후 5'-flanking 지역이 포함되어 있는 것으로 추정되는 EcoRI 단편을 Xba I, EcoRI으로 자른 후 2.4 kb의 PAL1 유전자와 2.3 kb의 PAL4 유전자를 각각 pUC18 vector에 클로닝하여 Sanger 등 (1977)의 chain termination 방법으로 T7 sequencing kit (Pharmacia)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 DNASIS 프로그램과 Clustal V 프로그램 (Higgins et al. 1988)을 이용하여 DNA homology를 검색하였으며 계통수 유연관계는 PAUP 3.1 프로그램 (Swofford 1993)을 이용하였다.

결과 및 고찰

토마토의 PAL 유전자군에 대한 염기서열 비교

토마토에서 현재까지 분리한 PAL 유전자군의 구성원들은 한 종류 (*tPAL5*) 외에는 모두 5'-upstream 영역뿐만 아니라 첫 번째 exon을 포함하지 않은 클론들이었다 (Lee et al. 1992b). 따라서 본 연구에서는 *tPAL* 유전자군의 구성원들에 대한 발현기작을 연구하고자 아직 분리하지 못한 이들의 5'-upstream영역을 클론하였다. Lee 등 (1992b)이 보고한 PAL1, 2, 3, 4 유전자의 3'-말단부위를 probe로 사용하여 잃

어버린 앞부분을 본 연구에서 작성한 genomic DNA 유전자 은행으로부터 검색하였다.

EMBL vector 내에 포함된 genomic 클론을 다시 pUC18 plasmid에 subclone하여 염기서열 분석을 행하였다. 염기서

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
tPAL5	ATGGCATCAT	CAATCGTACA	AAATGGACAT	GTTAATGGAG	AAG—CTAT	GGATTATATG	AAGAAATCAA	TTAATGTAA	TGATCCATTG	AAITGGGAAA
tPAL1	C G	T C		T	T	G C		C		
tPAL4	C	T C		A	TAG	G C		C		
tPAL5	TGGCTGCTGA	ATCATTAGA	GGGAGTCATT	TGGATGAAGT	GAAAAAGATG	GTGGATGAAT	TTAGAAAGCC	AAITGTGAAA	CTGGGGGTG	AAACTTTAAC
tPAL1	T T	T T		AA	A	T C			A G	
tPAL4	T T		C C							GT
tPAL5	AGTTGCACAA	GTTCATCCA	TTGCAAAATGT	TGATAACAAA	AGTAATGGGG	TCAAAGTGA	ACTTTCTGAA	AGTGCAGGGG	CTGGTGTGAA	AGCTAGTAGT
tPAL1	T		A	G	G	C		C	CC	
tPAL4				G		T				
tPAL5	GATTGGGTAA	TGGATAGTAT	GGGAAAAGT	ACAGATAGTT	ACGGTGTGAC	TACTGGATTT	GGTGCACAT	CTCATAGAG	AACTAAAAAT	GGCGGTGCAC
tPAL1	T T		A T		T T	AA			T	T T
tPAL4	T		A T		T T		A		A	T T
tPAL5	TTCAAAGGA	ACTTATCAG	GTTCCTGAATG	CTGGAGTTTT	TGGAAATGGA	ACAGAAATCAT	CTCATACTTT	GCCACATTC	GCAACAAGGG	
tPAL1				A	C	C	C			
tPAL4	A A	T		T	T	T	C A			
tPAL5	CAGCTATGCT	TGTTAGGATC	AACTACTGTC	TTCAAAGCTA	CTCTGGCATT	AGATTTGAAA	TTTTGGAGC	AAITACTAAG	TTGATCAACA	GCAACATTAC
tPAL1	G	A	C	T			C		T C	
tPAL4			C				G C	C	T	C
tPAL5	CCCGTGTGTT	CCCTTCGTG	GGACGATCAC	TGCATCGGGT	GATCTTGCC	CGTGTGCATA	CAITGCTGGT	TTGCTCACTG	GCAGGCCATA	CTCCAAGGCT
tPAL1			A CG	C	A	TC C		A		T
tPAL4		T C	C	C	C	T C T			A	T
tPAL5	GTGGACCTA	ATGGTGAAG	ACTTAATGCT	GAGGAACGGT	TCGCGTGGC	TGGTGTACT	AGTGGATTTT	TGGAGTGA	GCCCAAGGAA	GGAATTCAC
tPAL1	A	C	G C	C T	GCA	A A	C G G	C	TAG	
tPAL4	C			GCT	T	A G G	A G G		T	STOP
tPAL5	TTGTGAATGG	TACTGCAGTT	GGTCTGAGTA	TGGCATCAAT	GGTACTGTTT	GAGTCCAACA	TTCTTGTCTG	CATGCTGAA	GTCTGTGAG	CGAATTTCCG
tPAL1		AA	C	C	C C A	C	T	T	T A G	T
tPAL4	C A		C		A C		T C	C T	T A	T A T
tPAL5	TGAAGTGAAT	AACGGAAAGC	CTGAATTCAC	TGACTATTTG	ACACACAAGT	TGAAGCATCA	COCTGGCCAG	AITGAGGCTG	CTGCTATTAT	GGAACACATT
tPAL1	T G AT		C				T			
tPAL4							T			
tPAL5	ITGGATGGAA	GCTCTTATGT	CAAGGCAGCT	CAGAAGCTCC	ATGAAATGGA	TCCTCTTCAA	AAACCAAGC	AAGATCGTAA	TGCTCTTCCA	ACATCTCCAC
tPAL1									CT	
tPAL4			G T				G		C	CT
tPAL5	AGTGGCTTGG	ACCTCAAAT	GAACTCATCC	GTGCGCAAC	AAAGATGATT	GAGAGAGAGA	TTAACTCAAT	GAACTGCAAC	CCATTGATCG	ATGTTTCAAG
tPAL1	A	C	T	T	C	G	C	A	T	
tPAL4	AA	G	T	T	T	C	G		T	
tPAL5	AAACAAGGCC	TTACAGGTG	GAAACTTCCA	AGGTACCCTT	ATTGGTGTGT	CCATGGATAA	TACAAGATTG	GCCCTTGCAT	CTATTGGGAA	ATTGATGTTT
tPAL1	A	T	C		T		T	A T	GCATC	AAT G A T
tPAL4	T	T	C	A		C		A	A T	G
tPAL5	GCCCAATTTT	CGGAATTTGT	CAACGACTAT	TACAACAATG	GGTTGCCACT	CAATCTCACA	GCTGGAAAGG	ATCCAAGCTT	GGATTATGGA	CTCAAGGGTG
tPAL1	C TA T C	G AGCT GTC	A C GACTAT	ACA CA TG	T C AT A	A			C T T	A
tPAL4	C A G		C	C	TC T	G	A		C T T	C
tPAL5	CTGAAATTC	AATGCTTCT	TACTGCTGG	AACITCAAAT	CTTGGCAAA	CCAAGTACTA	ACCATGTTCA	AAGTGTGAG	CAACACAACC	AAGATGTGAA
tPAL1	C	C						G	CA	
tPAL4	C	T C G	ACAANA	TGTC TC A	TCA TGGTT	TAGAAITG T GA	TA T G	AGTGAATC	ITG G AT	CTTG CGA T
tPAL5	TTCTTGGGC	TTAATCTCAG	CAAGGAAAGC	AGCTGAGGCT	GTGACATCT	TGAAGCTAAT	GTCAACAACC	TATCTGTGG	CGCTTTGCCA	AGCTATCGAC
tPAL1	C A A		GA		C	A		A	A	A
tPAL4	CC TA TT G	G GT GTT	TG ATGTCCA	ITGATGTGTA	T C TAG T	CT TG TGG	TCTCGASTTA	G	GT	IAT AAGGT ITA ACT
tPAL5	TTGAGGCATT	TGGAGGAGAA	TTTGAAGAA	GCTGTGAAA	ACACTGTAG	CCAAGTAGCC	AAAAAGACTC	TGGCAATGG	TGCTAATGGC	GAACTTCATC
tPAL1	C	G T C G	C	A T C G	A T	T	TGG GA T	A T A	T T	
tPAL4	TGTAA GA	AA GAA A T	AG A T	CT C A GTT	TA GAAGTA	GTTTTG T G	TTTTTA ACA	GCTAT ATAT	CTAGCTCA A	ATGGA T GA
tPAL5	CAGCAAGATT	CTCGAAAG	GAATTCCTAC	AAGTGGTGA	AAGGGAAT	TGTTTACT	ATGCTGATGA	CCCTCGAGC	TCCACTTACC	CTTTGATGCA
tPAL1	T	T G	T G C A	C A TAC	GT AC TA	TGTTGATGAC	TGCAGCT C AC TAC			
tPAL4	GGTG TTC	GATATGGTT	AA CCT	TGAAAAGATC	TTTTC	CGA	CGCCAAGTT	GCA GAT TT	GATT CATA	A T A GAA A GC C AT

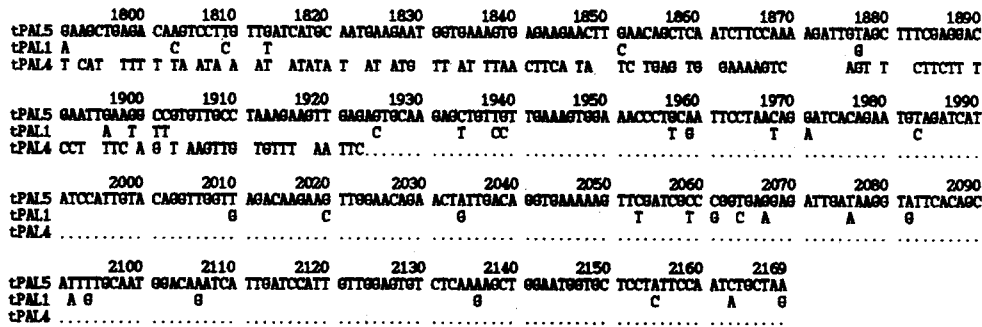


Figure 1. Nucleotide sequence comparison of tomato phenylalanine ammonia-lyase genes. Different nucleotide sequences of *PAL1* and *PAL4* gene were marked on the basis of the sequence of *PAL5* gene. Intron and unusual stop codon sites were marked in a box.

열을 기존의 알려진 *tPAL5* 유전자와 비교한 결과 *PAL1* 유전자는 다른 유전자와는 특이하게도 intron을 갖고 있지 않는 것으로 나타났으며, 하나의 reading frame을 포함한 것으로 확인되었다 (Figure 1). 한편 *tPAL4* 유전자의 경우는 첫 번째 exon과 단 하나의 intron (305 bp)을 가지고 있어서 이는 이미 알려진 다른 종으로부터 분리한 *PAL* 유전자와 동일하였다 (Cramer et al. 1989; Minami et al. 1989; Wanner et al. 1995). Intron을 포함하지 않으며 2130 bp 크기의 한 exon으로 된 *tPAL1* 유전자인 경우 *tPAL5* 유전자의 염기서열과 비교하여 보면 9개 혹은 12개씩의 염기서열이 여러 부위에서 삭제되어서 총 42개가 삭제되었다 (Figure 1). 또한 *tPAL4* 유전자인 경우는 413 bp와 658 bp인 두 개의 exon과 305 bp인 하나의 intron으로 구성되어 있었으나 1414 bp 부터는 (Figure 1의 화살표 참조) 염기서열이 기존의 알려진 *tPAL5* 염기서열과는 전혀 다른 것으로 나타나서 3'-end 부분의 약 750 bp가 chromosome rearrangement 등에 의한 새로운 DNA 단편인 것으로 추정된다 (Figure 1 참조).

***tPAL1* 과 *tPAL4* 유전자에 나타난 비정상적인 stop codon**

tPAL1 과 *tPAL4* 유전자의 염기서열을 이용하여 아미노산 서열을 조사한 결과 다음과 같은 특이할 만한 사실을 발견하였다. *tPAL1* 유전자를 보면 정상적으로 722개의 아미노산을 코딩하고 있는 *tPAL5* 유전자에서 나타난 stop codon의 위치에서도 stop codon을 나타내지만 번역개시점인 ATG에서

249번 아미노산 다음 위치 (775 bp)에서 첫 번째로 비정상적인 stop codon이 나타났으며 그 이후에도 여러 개의 stop codon이 나타나서 만약 *tPAL1* 유전자가 전사가 되고 정상적으로 번역이 된다면 정상적인 *PAL* 효소 (78 kDa)보다 훨씬 작은 26 kDa인 *PAL* polypeptide가 만들어진다고 볼 수 있다 (Figure 1 참조).

tPAL4 유전자 역시 정상적인 *tPAL5* 유전자보다는 훨씬 짧은 polypeptide를 생산하도록 stop codon의 위치가 *tPAL1* 유전자와 비슷하게 ATG로부터 1090 bp (357번 아미노산 다음) 위치에 나타나서 약 38 kDa인 polypeptide를 생산하는 것으로 나타났다 (Table 1 참조). 특히 *tPAL1* 유전자의 경우는 첫 번째 비정상적인 stop codon 이후에도 정상적인 크기의 *tPAL5* 유전자와 거의 유사한 homology를 나타내었으나 *tPAL4* 유전자의 경우는 이미 언급한 바와 같이 1414 bp 이하로부터 *tPAL5* 유전자의 정상적인 stop codon까지에 해당하는 약 750 bp가 전혀 homology를 나타내지 않은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 genomic sequence에서 나타난 stop codon이 처음부터 짧은 *PAL* 효소를 생산하여 나름대로의 기능을 나타낼 수도 있다는 가설 (Lee et al. 1992b)을 뒷받침 하여준다. 특히 최근에 보고된 식물로부터 정제한 *PAL* 효소의 크기를 비교하여 보면, Bolwell 등 (1985)이 bean에서 77, 70, 53 kDa에 해당하는 subunit를 확인하였으며, Jorin 과 Dixon (1990)은 alfalfa에서 71, 67, 56 kDa 에 해당하는 subunit를 분리하였다고 보고하였다. 특히 Lim 등 (1997)은 Mustard에서 단지 약 37 kDa에 해당하는 단일 크기의

Table 1. Features of the sequenced regions of the *L. esculentum* *PAL* genes.

<i>PAL</i> gene	Genomic <i>Eco</i> RI fragment size (kb)	Sequenced region	5'non-coding ^a	Exon 1 ^a	Intron ^a	Exon 2 ^a	3' non-coding ^a	Predicted number of amino acids	Predicted mol.wt (Da)
1	8.7 kb	3616	1498	390	—	357	1379	249	26365
4	5.5 kb	3910	1697	413	305	658	821	357	38278
5	≈ 16 kb	4250	1151	416	710	1750	462	722	78491

^a Length of sequenced region (bp)

Table 2. Sequences of exon-intron splice junctions in the *PAL* gene. Exon sequences are represented by capital letter. The junction is underlined.

Sample	Sequence
<i>PAL 4</i>	---TAG <u>g</u> taaacaaa---gatattttttgtag---
<i>PAL 5</i>	---CAG <u>g</u> taaat---atttattttcttcag---
Monocot consensus	<pre> A a tttt ttttttttt c ---CAG<u>g</u>ta g --- tg ag--- G t ctcn ccgacacggn n </pre>
Dicot consensus	<pre> A tatt ttttttatt gc ---N <u>G</u>gtaag --- t ag--- T ataa aanaaataa at </pre>

Table 3. Amino acid sequence homology among *PAL* proteins^a.

Gene	tPAL-1	tPAL-4	tPAL-5	GeneBank accession number reference
<i>tPAL-1</i>	100.0	84.4	85.7	-
<i>tPAL-4</i>	84.4	100.0	93.0	-
<i>tPAL-5</i>	85.7	93.0	100.0	-
Potato	86.8	90.6	91.8	S21174
Garden pea	79.6	83.5	83.3	S25303
Muskmelon	79.1	83.3	81.0	S52632
Parsley	78.8	82.7	82.8	S04463
Soybean	78.1	81.7	83.7	S22991
Bean-2	78.1	83.2	82.9	S04127
<i>A. thaliana</i>	77.8	80.5	81.7	PQ0140
Alfalfa	77.4	81.7	82.2	S17444
Bean-3	69.3	71.9	71.9	S04128
Rice	68.2	70.9	67.5	S06475
<i>R. rubra</i>	32.5	34.8	37.5	S01999
<i>R. toruloides</i>	35.5	38.4	34.8	A56628

* a: Percentage of sequence homology.

subunit를 분리 정제하였다고 보고하였다. 이들 보고된 *PAL* 효소의 subunit를 비교하여 보면 토마토에서 분리한 *tPAL1*과 *tPAL4* 유전자 내에 존재하는 비정상적인 stop codon이 짧은 polypeptide를 정상적으로 생산할 것이라는 사실을 간접적으로 증명하여 앞으로 토마토 내에서의 *PAL* 효소의 정제에 관한 연구를 더욱더 진행시켜야 할 것으로 사료된다.

Exon-intron junction 부위의 염기서열 비교

tPAL4 유전자의 exon과 intron을 결정하기 위하여 기존에 Lee 등 (1992b)에 의하여 보고된 *tPAL5* 유전자의 염기서열과 비교하여 exon-intron 연결부위를 결정하였다. *tPAL1* 유전자인 경우는 intron을 함유하지 않고 exon 부위만 있으나 *tPAL4* 유전자는 *tPAL5* 유전자와 마찬가지로 하나의 intron과 두개의 exon을 함유하고 있었는데 ATG로 시작되는 translation start site로부터 downstream 쪽으로 413 bp 떨어

져서 시작되며, 길이가 305 bp인 intron을 지나서 두 번째 exon이 시작되었다. 토마토 *PAL* 유전자의 exon과 intron의 splice junction 부위를 다른 식물의 *PAL* 유전자의 염기서열과 비교해본 결과 *tPAL4*인 경우에는 intron의 5'-말단과 3'-말단 부위의 consensus sequence가 쌍자엽 식물의 consensus sequence와 유사하였으며, *tPAL5*인 경우는 3'-말단에서는 쌍자엽과 단자엽 식물에 모두 유사한 염기서열을 보인 반면, 5'-말단에서는 단자엽 식물의 consensus sequence와 높게 일치하였다 (Table 2). Minami 등 (1989)은 벼에서의 *PAL* 유전자에 대한 consensus sequence 분석에서 3'-말단인 경우는 단자엽 식물과 매우 유사하였으나 5'-말단에서는 쌍자엽 식물의 consensus sequence가 단자엽 식물보다 더 유사하였다고 하였으며, 이는 토마토 *PAL5* 유전자에서 얻은 결과와는 일치하지 않았다. 또한 *tPAL4* 유전자의 intron은 305 bp와 138번째의 아미노산 codon인 arginine에서 split되는 데 이는 bean (Cramer et al. 1989), parsley (Lois et al. 1989), 벼 (Minami et al. 1989), alfalfa (Gowri et al. 1991), pea (Yamada et al. 1992) 등에 밝혀진 codon과 일치하였다. 지금까지 밝혀진 *PAL* 유전자의 intron 길이는 102~1070 bp (Cramer et al. 1989; Minami et al. 1989; Wanner et al. 1995)까지 매우 다양한데 이는 어떤 조절기작과 관련이 있는 것으로 사료된다고 하였다.

PAL 유전자군 간의 유연관계 분석

본 연구에서 분리하여 결정한 염기서열 결과로부터 얻어진 *tPAL1*, *tPAL4* 유전자의 아미노산 서열을 기존에 이미 보고된 *tPAL5* 유전자의 아미노산 서열 (Lee et al. 1992)과 비교하고 또한 기존의 보고된 감자를 포함한 11종에서 분리 보고된 *PAL* 유전자의 아미노산의 homology를 분석한 결과 *tPAL1*과 *tPAL4*는 84.4%, *tPAL1*과 *tPAL5*는 85.7%, *tPAL4*와 *tPAL5*는 93%로 나타나서 *tPAL1* 유전자는 다른 두 유전자보다는 다소 근연관계가 떨어지는 결과를 나타내었다 (Table 3). 다른 식물체와 yeast에서 밝혀진 *PAL* 유전자와 토마토 *PAL* 유전자의 아미노산 서열을 비교 분석해 보면 대부분의 쌍자엽 식물체와는 77% 이상의 homology를 보인 반면, 단자엽 식물인 벼에서는 65-70% 정도의 homology를 보였으며 yeast인 *Rhodotorula rubra*, *Rhodospidium toruloides*와는 매우 낮아서 40% 미만의 homology를 보였다.

이러한 아미노산 서열의 상동성 결과를 기초로 하여 지금까지 밝혀진 *PAL* 유전자의 분류 계통수를 다음과 같이 작성하였다 (Figure 2). 토마토에서 분리한 *tPAL 1, 4, 5* 유전자들은 감자 (Joos et al. 1992), 고구마 (Tanaka et al. 1989)와 동일한 한 그룹을 형성하였으며, 같은 쌍자엽 식물인 parsley (Appert et al. 1994), bean (Cramer et al. 1989), soybean (Frank et al. 1991), pea (Kawamata et al. 1992), alfalfa (Gowri et al. 1991) 등은 다른 또 하나의 그룹을 형성하였다.

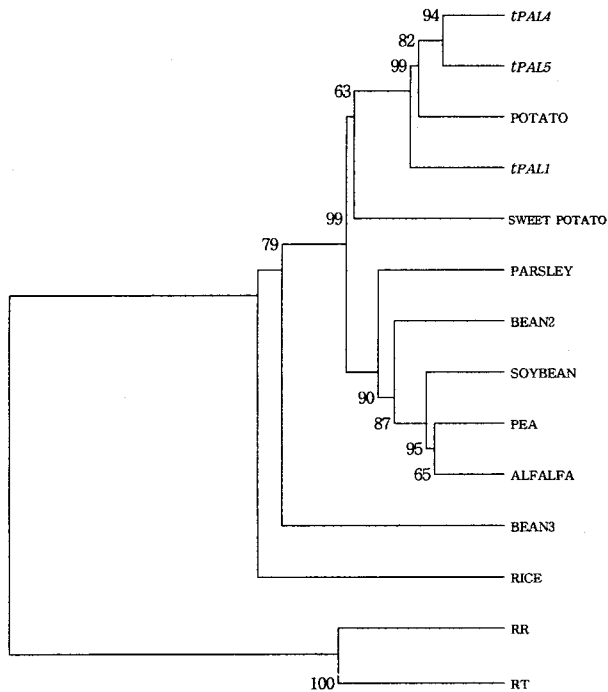


Figure 2. Phylogenetic relationships among plant PAL proteins. Bootstrap values above 60% from 500 bootstrap replications of heuristic search analysis (PAUP3.1) are given to the corresponding nodes.

특히 토마토에서 분리한 *tPAL4*와 *tPAL5* 유전자는 동일한 토마토 종에서 분리한 *tPAL1* 유전자보다 오히려 감자에서 분리한 것과 근연거리가 가까운 것으로 나타났는데 이는 아마도 동일한 유전자 조상을 갖고 있는 유사한 특정기능을 갖고 있을 것으로 추정된다. 이러한 현상은 bean의 경우에서도 나타나서 bean 2 유전자는 bean 3 유전자보다 soybean이나 parsley와 더 가까운 것으로 나타났다. 단자엽 식물인 벼의 경우는 또 다른 그룹을 형성하여서 토마토 PAL 유전자와의 근연관계는 매우 먼 것으로 나타났다. 효모의 경우도 역시 전혀 다른 또 하나의 그룹을 나타내었다.

적 요

토마토의 genomic DNA library로부터 분리한 *tPAL1*, *tPAL4* 유전자의 염기서열을 분석하여 *tPAL5* 유전자와 비교 분석한 결과는 다음과 같다. *tPAL5* 유전자는 722개의 아미노산과 710 bp의 intron을 가지고 있으나 *tPAL1*은 intron을 가지고 있지 않으며 또한 *tPAL5* 유전자와 비교하여 249개의 짧은 polypeptide를 가지고 있었다. *tPAL4* 유전자인 경우 357개의 아미노산과 305 bp의 intron을 가지고 있었다. *tPAL* 효소간의 아미노산 homology는 *tPAL1* 유전자와 *tPAL4* 유전자간은 87.2%, *tPAL1*과 *tPAL5*는 85.3%, *tPAL4*와 *tPAL5*는 91.4%의 homology를 보였다. 또한, *tPAL1*, *tPAL4* 유전

자는 정상적인 polypeptide를 가지는 *tPAL5* 유전자와 비교하여 비정상적인 stop codon을 가진 짧은 polypeptide로 구성되어 있었다. 다양한 식물 종으로부터 분리된 PAL 유전자의 염기서열을 비교한 결과 토마토 (*Lycopersicon esculentum*), 감자 (*Solanum tuberosum*), 고구마 (*Ipomoea batatas*)간의 유연관계가 높았으며, parsley (*Petroselinum crispum*), bean (*Phaseolus vulgaris*), pea (*Pisum sativum*), alfalfa (*Medicago sativa*) 등이 각각 서로간에 유연관계가 높았다. 또한, 토마토에서 분리한 family내에서 *tPAL4*와 *tPAL5* 유전자는 homology가 매우 높았고 (93.0%), *tPAL1*와 *tPAL4* 유전자 사이는 다소 낮았으며 (84.4%), 특히 *tPAL4*는 감자의 PAL 유전자와 매우 높았다 (90.6%).

인용문헌

- Appert C, Logemann E, Hahibrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym). *Eur J Biochem* **225**:491-499
- Bernards MA, Ellis BE (1991) Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiol* **97**:1494-1500
- Bolwell GP, Sap J, Cramer CL, Lamb CJ, Schuch W, Dixon RA (1985) L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: Partial degradation of enzyme subunits *in vitro* and *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* **881**:210-221
- Cottle W, Kolattukudy PE (1982) Biosynthesis, deposition, and partial characterization of potato suberin phenolics. *Plant Physiol* **69**:393-399
- Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol* **12**:367-383
- Edwards K, Cramer CL, Bolwell GP, Dixon RA, Schuch W, Lamb CJ (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:6731-6735
- Esau K (1977) *Anatomy of Seed Plants*, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons
- Forkmann G (1993) Control of pigmentation in natural and transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* **4**:159-165
- Frank RL, Vodkin LO (1991) Sequence and structure of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Glycine max*. *DNA sequence J* **1**:335-346
- Gowri G, Pavia NL, Dixon RA (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol Biol* **17**:415-429

- Higgins DG, Sharp PM** (1988) Clustal: A package for performing multiple sequence alignment on a computer. *Gene* **73**:237-244
- Jahnen W, Hahlbrock K** (1988) Cellular localization of nonhost resistance reactions of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection. *Planta* **173**:453-458
- Joos HJ, Hahlbrock K** (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of 2 selected genes and modes of expression. *Eur J Biochem* **204**:621-629
- Jorin J, Dixon RA** (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) II. Purification, characterization, and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol* **92**:447-455
- Kawamata S, Yamada T, Tanaka Y, Sriprasertsak P, Kato H, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Oku H** (1992) Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA from *Pisum sativum*. *Plant Mol Biol* **20**:167-170
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA** (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**:215-224.
- Lee SW, Nazar NR, Powell DA, Robb J** (1992a) Reduced PAL gene suppression in *Verticillium*-infected resistant Tomatoes. *Plant Mol Biol* **18**:345-352
- Lee SW, Robb J, Nazar NR** (1992b) Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Bio Chem* **267**:11824-11830
- Lim HW, Park SS, Lim CJ** (1997) Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from leaf Mustard. *Mol Cells* **6**: 715-720
- Lois R, Dietrich A, Hahlbrock K, Schuch W** (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley : Structure, regulation, and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J* **8**:1641-1648
- Minami E-I, Ozeki Y, Matsuoka M, Koizuka N, Tanaka Y** (1989) Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants. *Eur J Biochem* **185**:19-25
- Ohl S, Hedrick SA, Chory J, Lamb CJ** (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **2**:837-848
- Robb J, Powell DA, Street PFS** (1987) Time course of wall-coating secretion in *Verticillium*-infected tomatoes. *Physiol Mol Pathol* **31**:217-226
- Rogers SO, Bendich AJ** (1988) Extraction of DNA from plant tissues. In: *Plant Molecular Biology Manual* Gelibin et al.(eds). pp 6-10
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467
- Schmelzer E, Jahnen W, Hahlbrock K** (1988) *In situ* localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:2989-2993
- Swofford DL** (1993) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 3.1. Computer package. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL
- Tanaka Y, Matsuoka M, Yamamoto N, Ohashi Y, Kano-Murakami Y, Ozeki Y** (1989) Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of seet potato. *Plant Physiol* **90**:1403-1407
- Wanner LA, Li G, Ware D, Somssich IE, Davis KR** (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **27**:327-338
- Whetten RW, Sederoff RR** (1992) Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine: purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol* **98**:380-386
- Yamada T, Yanaka Y, Sriprasertsak P, Kato H, Hashimoto T, Kawamata S, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Oku, H** (1992) Phenylalanine ammonia-lyase gene from *Pisum sativum*: structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol* **33**:715-725

(접수일자 1998년 11월 30일)