

감자로부터 Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A)

유전자의 동정 및 발현 분석

인준교 · 신동호¹ · 최관삼¹ · 양덕춘*

한국인삼연초연구원 신사업연구부, ¹충남대학교 응용생물화학식품학부

Isolation and Characterization of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF-5A) from Potato

IN, Jun Gyo · SHIN, Dong Ho¹ · CHOI, Kwan Sam¹ · YANG, Deok Chun*

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, 305-345, Korea

¹Division of Applied Biology, Chemistry and Food Science, Chungnam National University, Taejon, 305-764, Korea

ABSTRACT Differential display based on PCR was employed to identify genes expressed during tuber-developing stage of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler). An eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A) clone isolated from a cDNA library constructed with developing micro-tuber using a probe of PCR fragment. We isolated three positive clones and one of them contained open reading frame. This clone revealed high sequence similarity to tomato eIF 5A cDNA. At the DNA level, there is 94.8% identity with the tomato eIF-5A4, whereas at the protein level there is a high identity with 97.5%. The potato eIF 5A clone is 716 bp in length and contains a single open reading frame from 57 to 539 bp, a 56 bp 5' -untranslated region and a 177 bp 3' -untranslated region. The deduced protein composed of 160 amino acid residues, with a predicted molecular mass of 17.4 kD and an estimated pI of 5.5. The sequence of 12 (STSKTGKHHGAK) amino acids among eIF-5A proteins is perfectly conserved from yeast to human. That sequence in potato eIF-5A protein is also conserved at position 46 to 57 amino acid. This region embeds the post-translational modification site of the lysine residue (at the seventh K) to hypusine that is crucial to eIF-5A activity. The northern blot analysis of eIF5A has shown abundant expression, mainly in flower organs (stamen, ovary, petal, sepal), fruit and stolon.

Key word: Differential display, eIF5A, hypusine, micro-tuber

서론

Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A)는 이전에 eIF-4D로 불렸던 것으로 단백질 합성의 초기단계를 촉진하는 많은 단백질 중의 하나이다 (Moldave 1985). eIF-5A는 세포질에 존재하는 단백질로 pI가 5~6이고 16~18 kDa 정도의 작은 산성 단백질로 보존되어 있으며 포유동물에서는

모든 조직에서 비교적 풍부하게 존재하고 있는 단백질이다 (Gordon et al. 1987).

이 단백질에는 hypusine이라고 하는 독특한 아미노산이 존재하는 것이 큰 특징이다 (Smit-McBride et al. 1989a). Hypusine은 spermidine의 구조적인 기여에 의하여 단백질의 특정한 리진 (lysine) 잔기가 번역 후 수식과정에 의하여 형성된다. eIF5A에서 hypusine은 *in vitro* 상에서 methionylpuro-mycin의 합성을 자극하는 데 있어서 필요하고 *in vivo* 상에서는 단백질의 합성에서 80S 초기 복합체와의 반응을 위해서 필요한 것으로 알려져 있다 (Park 1989; Smit-McBride et al.

* Corresponding author. Tel 042-866-5434 Fax 042-862-2522
E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

1989b).

eIF5A는 사람 (Jenkins et al. 2001), 초파리, 효모 등에서 보고가 되었는데, Schnier 등 (1991)에 의하면 효모에서는 이 단백질의 수식에 의한 hypusine 생성이 세포생장과 생존에 필수적이라고 하였다. Kang과 Hershey (1994)는 eIF5A의 발현을 극도로 억제시킨 세포를 이용한 연구결과에서 eIF5A의 활성은 선택적으로 어떤 mRNA의 번역을 위해서 필요하거나 또는 일반적인 단백질 합성을 위해서 절대적으로 필요한 것보다는 세포의 일부 대사과정에 관여하고 있을 가능성을 제시하였다. 그러나 아직까지 eIF5A와 그것의 hypusine에 대한 정확한 기능에 대해서는 설명이 되지 않고 있다.

본 연구에서는 감자의 괴경형성과정 (tuberization) 동안에 발현하는 유전자들의 발현양상을 알아보고자 비교적 재료의 채취가 용이한 감자의 기내 배양계를 사용하여 고농도의 sucrose를 처리하여 괴경을 유도한 후 각 조직별로 재료를 채취하여 differential display법을 사용하여 많은 유전자 단편을 확보할 수 있었다. 이들 확보된 DNA 단편들을 각각 sequencing하여 homology 검색을 하여 그 기능을 조사하여 본 결과 그 중에 한 DNA 단편이 eIF5A 유전자에 높은 유사성을 나타내어, 이 유전자 단편을 probe로 사용하여 감자의 micro-tuber로 만든 cDNA library screening을 통하여 eIF5A의 full-length cDNA를 분리한 후 그 특성을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

식물재료

실험에 사용한 감자 (*S. tuberosum* L. cv. Irish Cobbler)는 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962) 고체배지에 3%의 sucrose를 첨가하여 기내배양을 하였으며, 25°C, 16시간 광조건 아래에서 4주 간격으로 계대배양을 하였다. 감자에서 microtuber의 유도를 위하여 고체배지에서 자란 감자의 한 마디를 잘라 30 ml의 1/2 MS 액체배지에서 3주간 생장시킨 후, 정상부위를 메스로 잘라내고 10%의 sucrose를 첨가한 1/2 MS 액체배지를 넣어 18°C의 암실에서 3주간 배양하였다.

Total RNA의 추출 및 cDNA library 제작

기내배양을 통하여 유도된 microtuber를 수거한 후 생체중 5 g을 사용하여 Shirras 등 (1984)의 방법을 약간 변형하여 total RNA를 추출하였다. Micro-tuber로부터 추출한 total RNA는 Poly (A) Quick mRNA Isolation Kit (STRATAGENE)을 사용하여 mRNA만을 분리·정제하였으며, 그 중 5 µg을 ZAP-cDNA Synthesis Kit (STRATAGENE)을 이용하여 cDNA library를 제작하였다.

eIF5A의 유전자 발현을 분석하기 위해서 포장에서 채배한 감자의 각 조직과 기내에서 유도한 microtuber 등에서 total RNA extraction kit (Kisan Biotech, Korea)을 사용하여 total RNA를 추출한 후 agarose gel 전기영동과 spectrophotometer를 사용하여 정량하였고, -70°C에 보관하면서 사용하였다.

Differential display 분석

기내에서 3주간 생육시킨 감자에 10%의 sucrose를 처리한 후 암실로 옮겨 배양하면서 시기별로 재료를 채취하여, total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 사용하여 변성 primer (NMT₁₂)와 10-mer (Operon) primer를 조합하여 cDNA를 합성한 후 Liang과 Pardee 등 (1992)의 방법에 따라서 differential display를 실시하였다.

cDNA library Screening 및 Northern 분석

Differential display를 통하여 분리된 eIF5A 유전자 단편을 사용하여 cDNA library로부터 full-length cDNA clone의 분리를 시도하였다. 10,000 plaque를 nytran membrane (Schleicher & Schuell)에 고정된 후 PCR 단편을 [α]-³²P로 라벨하여 probe로 사용하여, 5개의 positive clone을 선별하였다.

eIF5A 유전자의 발현을 분석하기 위해서 감자의 각 조직으로부터 분리한 total RNA를 각각 10 µg씩 전기영동을 한 후 nytran membrane (Schleicher & Schuell)에 고정하였다. Probe는 full-length eIF5A cDNA clone으로 부터 *Eco* RI과 *Xho* I을 사용하여 잘라낸 후 [α]-³²P로 라벨하여 사용하였으며, hybridization은 42°C의 50% formamide (v/v), 6×SSC, 0.2% SDS, 10×Denhardt's solution (Sambrook et al. 1989)과 10 mg/ml 변성 salmon sperm DNA 용액에서 하룻밤 동안 반응을 시켰다. Membrane filter는 65°C에서 2×SSC, 0.1% SDS 용액으로 30분 세척한 후 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액에서 30분 세척하였으며, whatman paper 위에서 10분간 건조시킨 후 -70°C에서 X-ray film에 48 hr 동안 노출시켰다.

DNA Sequencing 및 계통 분석

감자의 cDNA library screen을 통하여 분리된 eIF5A cDNA 유전자는 sequencing을 하기 위해서 대장균 (XL1-blue)에 형질전환하여 LB배지에서 하룻밤 배양한 후 Plasmid Purification Kit (Kisan Biotech, Korea)을 사용하여 plasmid를 분리·정제한 후 ABI377 (Perkin elmer) 기기를 사용하여 sequencing을 하였다. 분석된 clone은 NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 homology 검색을 실시한 후 DNAsis (Hitachi) 유전자 분석 프로그램을 사용하여 유전자 분석을 실시하였고 CLUSTALW 프로그램을 사용하여 다른

생물에서 분리된 eIF5A 유전자들과의 유연관계를 비교·분석하였다.

결과 및 고찰

감자는 벼, 옥수수, 밀과 함께 세계 4대 식량작물로서 그 중요성 때문에 품종의 육성 및 재배뿐만 아니라, 유전자의 연구도 비교적 활발히 이루어지고 있다. 감자에서 주로 식량원으로 소비되는 괴경 (tuber)은 토양 속에서 지하경 (stolon)이 발달한 후 그 선단부분을 구성하고 있는 세포가 팽창하고 그곳에 다양한 저장단백질과 녹말의 축적이 이루어지는 일련의 과정 (tuberization)이다.

본 연구에서는 이러한 괴경의 형성과정에서 발현하는 유전자들을 다량으로 확보하여 감자의 괴경형성에 대한 발현유전자들의 전반적인 양상을 조사하고자 differential display법을 실시하였다. 본 실험을 위한 재료는 채취가 용이한 감자의 기내 배양계를 이용하여 고농도 (10%)의 sucrose를 처리한 후 17°C의 암실에서 3주간 배양하면서 각 조직별로 재료를 채취하였고 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 random primer와 변성 oligo-dT primer를 조합하여 PCR 반응을 시킨 후 변성 PAGE를 실시하여 100개의 DNA 단편을 선별할 수 있었다. 그 중에서 토마토의 eIF5A 유전자에 높은 상동성을 나타낸 DNA 단편을 probe로 사용하여 감자의 micro-tuber로 만든 cDNA library screening한 결과 4개의 clone을 선별하였으나, sequencing을 한 결과 그 중에서 한 clone만이 eIF5A의 full-length cDNA를 포함하고 있었다.

감자의 eIF5A cDNA의 구조적인 특징을 살펴보면, 전장의 길이가 716 bp로 상류의 5' 비번역 부위 (untranslated region)에 56 bp, 하류의 3' 비번역 부위 (untranslated region)에 117

bp로 구성되어 있으며, 토마토의 eIF5A cDNA 염기서열과 94.8%의 매우 높은 상동성을 나타내었다 (Figure 1). 57번째 염기부에 있는 ATG 코돈으로 시작되는 단백질 번역 부위 (opening reading frame)는 666번째의 TAG 코돈으로 종결되었다. 그리고 697~702 bp 사이에 polyadenylation 신호인 AATAAA가 존재하고 있으며, 그 뒤에는 16개의 poly A가 연결되어 있다. 감자의 eIF5A는 160개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 17.4 kDa 정도이고 pI는 5.5 정도로 추정되었다.

eIF5A 유전자는 다양한 생물체에서 보고되어 있는데 대부분이 다중유전자족 (multigene family)으로 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 이들 eIF5A의 아미노산 서열을 비교한 결과 158~160개의 아미노산으로 구성되어 있으나, 인간의 경우에는 153개의 아미노산으로 구성되어 있어 식물체보다 그 크기가 짧았다 (Figure 2). 감자의 eIF5A와 다양한 생물체에서 보고된 eIF5A 유전자들을 아미노산 서열의 비교를 통하여

```

1 CAAAACAAAGAGAAGTTCATAACAGAAGAAGAGAGAGAGAGAATTTAGCTATGT 60
      M S
61 CTGATGAAGAACCACCATTTGACTGCCAAAGCTGATGCTGGTCCCTCAAAACTTACCCTC 120
  D E E H H F E S K A D A G A S K T Y P Q
121 AACAAAGCGGTACTATTGCAGAAGTGGTATATAGTTATCAAAGCCAGACTTGAAGG 180
  Q A G T I R K S G Y I V I K G R P C K V
1E1 TTGTTGAGGTCCTCCACTTCCAAACTGGCAAGCACGGACATGCAAAATGTCACTTTGTGG 240
  V E V S T S K T G K H G H A K C H F V A
241 CAATCGACATTTCAATGGAAAGAAGCTTGAAGATATTGTTCTTCATCCCACAATTGTG 300
  I D I F N G K K L E D I V P S S H N C D
3C1 ATGTGCCACATGTCAATCGTACTGACTATCAACTGATTGACATCTCTGAAGATGGTTTGT 360
  V P H V N R T D Y Q L I D I S E D G F V
3E1 TGTCTCTTCTTACTGAAAATGGAAACACCAAGAATGACCTCAGACTCCACCACGATGACG 420
  S L L T E N G N T K D O L R L P T D D A
421 CCCTGTTGAACCAGGTTAAAGGTGGATTGAGGAAGAAAGGATCTCGTGTGTCTGTGA 480
  L L N Q V K G G F E E G K D L V L S V M
4E1 TGTGCTCAATGGGTGAAGAGCAGATCTGTGCTGTGAAGGACATTTGGTACCAAGAGCTAGT 540
  S A M G E E Q I C A V K D I G T K S *
541 TGGCTCATTCTGCAGCATAAATAATTGCTTTTAGCCAAGACGCTTATATCTTGTAT 600
6X1 CGTGGTACTTTGCAATCCGTTTTATCGTGAAGAAACCGCTTATATCTATTGGCATTGGCTGA 660
6E1 ATAGTGAACCTCTATAGTTTTGTTTGGCAAAAGGCCAATAAAGCTGGATTTGATAGCAAAA 720
721 AAAAAAAAAA 732
    
```

Arabidopsis	MSD-EEHFHF-SSDAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKNRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	58
Corn	MSDSEEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKNRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	60
Dianthus	MSD-DDHFESSADAGASKTYPQQAGTIRKSGHIVIKNRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Manihot	MSD-EEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKNRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Medicago	MSD-EEHFEPADAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKSRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Potato	MSD-EEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKSGYIVIKGRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Rice	MSDSEEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKNRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	60
Tobacco	MSD-EEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKNGHIVIKGRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Tomato	MSD-EEHFESKADAGASKTYPQQAGTIRKNGYIVIKGRPKVVEVSTSKTKGHGHAACH	59
Drosophila	MA-ELDDHF-ETDTSASTTYPMCCSALPKNGVVLKSRPKIVEMSTSKTKGHGHAACH	58
Human	MAD--EIDF--TTGDAGASSTYPMCCSALPKNGVVLKSRPKIVEMSTSKTKGHGHAACH	57
Yeast	MSD-EEHTFE--NADAGASATYPMCCSALPKNGFVVIKGRPKIVDMSTSKTKGHGHAACH	58
	* *	
Arabidopsis	FVAIDIFTGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTONGSKDOLKLPN	118
Corn	FVAIDIFNGKLEDIVPSSHNCIDIVHNRTEYOQLIDISEDFVSLLTDSGNTKDLRLPT	120
Dianthus	FVAIDIFNGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDITEDGFVSLLTDSGNTKDLRLPA	119
Manihot	FVGIIDIFNGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTETGNTKDLRLPT	119
Medicago	FVAIDIFNGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTONGSKDOLKLPN	119
Potato	FVAIDIFNGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTENGTNDKDLRLPT	119
Rice	FVAIDIFNGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTESGGTKDLRLPS	120
Tobacco	FVAIDIFTGKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTENGTNDKDLRLPT	119
Tomato	FVAIDIFNAKLEDIVPSSHNCVPHVNRDYOQLIDISEDFVSLLTENGTNDKDLRLPT	119
Drosophila	MVGIIDIFSNKLYEDICPSTHNDVPHVNRDYOQLIADISDFSLTLMTESGDLREDLKVP	117
Human	LVGIIDIFTGKYEDICPSTHNDVPHVNRDYOQLICIDSGYSLTLETGETVREDLKLP	115
Yeast	LVTLDIFTGKLEDLSPSTHNLEVPVFKRSEYQLLDIDGYSLLTMDGGETKDDVKAP	116
	* *	
Arabidopsis	DDTLNQIKSGFDGKDLVSVMSAMGEEQINALKDIPK--	158
Corn	DETLVAQIKEGFESGKDLVVTQVAMGEEQICALKDVPK-	160
Dianthus	DEALVQMKKEGFAGKDLVLSVMAMGEEQICAVKDVSGK-	160
Manihot	DENLLSQIKDGFAGKDLVSVMSAMGEEQICSLKDIIPKN-	160
Medicago	DDSLLTQIKDGFADGKDLVSVMSAMGEEQICALKDIPK--	159
Potato	DDALLNQVKGGFEEGKDLVLSVMAMGEEQICAVKDIPTKS-	160
Rice	DEALLTQIKDGFAGKDLIVTVMSAMGEEQICALKDIPKN-	161
Tobacco	DDNLLTQIKDGFAGKDLVSVMSAMGEEQICALKDIPK--	159
Tomato	DDTLLNQVKGGFEEGKDLVLSVMAMGEEQICAVKDIPTKT-	160
Drosophila	EGELGEQLRLOFDSGKDLVCTLVKACGEECVIAIKNTNALOK	159
Human	EGELGKEIEGKYNAGEDVQVSVMSAMGEEYAVAIKPK----	153
Yeast	EGELGDSMGAADFDEGKDLVMTIISAMGEEAIIAFKAPRSD-	157
	* *	

Figure 2. Comparison of the amino acid sequence of eIF5A in *Arabidopsis thaliana* (AF296082), corn (Y07920), *Dianthus caryophyllus* (AF296081), *Manihot esculenta* (AF266464), *Medicago sativa* (AF416338), potato (AB004823), rice (AJ252135), tobacco (X63542), tomato (AF296086), *Drosophila melanogaster* (AAF 80375), human (NP_065123) and yeast (FIBYA2). Amino acid sequences were aligned using the CLUSTALW program. The shadow region embeds the post-translational modification site of the lysine residue (at the seventh K) to hypusine that is crucial to eIF-5A activity.

Figure 1. A cDNA and deduced amino acid sequence of eIF5A cDNA isolated from potato. The putative polyadenylation signal is underlined. The asterisk is indicated the stop codon.

상동성 조사를 한 결과 토마토와 97.5%로 가장 높은 유사성을 나타내었으며, 같은 가지과 (Solanaceae)에 속하는 tobacco에서 91.8%, 그 이외의 식물에서는 83~88%로 비교적 높은 상동성을 나타내었으나, *Drosophila melanogaster*는 51.5%, human에서는 55%, yeast에서는 56.8%로 비교적 낮은 상동성을 나타내었다. 그럼에도 불구하고 eIF5A 단백질에서 12개의 아미노산 서열 (STSKTGKHHGAK)은 효모에서 사람에 이르기까지 완벽하게 보존되어 있었다 (Figure 2). 이 영역은 eIF5A 단백질의 활성을 나타내는 데 있어서 필수적인 hypusine을 생성하는 전사 후 수식 부위가 들어 있는 아주 중요한 곳이다.

감자에서 eIF5A 유전자의 발현분석을 위해서 감자의 다양한 조직에서 total RNA를 추출하여 northern blot 분석을 실시하였다. Probe는 eIF5A clone으로부터 *Eco* RI과 *Xho* I 두 효소로 처리한 후 agarose gel 전기영동을 하여 정제한 후 [α]-³²P로 표지하여 사용하였다. 그 결과 control로 사용한 감자의 cathepsin D inhibitor의 분화적인 발현양상과는 다르게 eIF5A는 감자의 각 조직에서 그 발현을 볼 수 있었다. 특히 꽃기관들 (stamen, ovary, petal, sepal), 과실 (fruit)과 stolon 등에서 비교적 많은 발현을 하고 있으며, 잎에서는 그 발현량이 비교적 낮게 나타났다 (Figure 3). 이것으로 보아 eIF5A 유전자는 감자에서 이미 성숙된 조직인 잎이나 성숙된 괴경에서 보다는 활발히 세포 분열이나 물질 축적이 이루어지고 있는 조직에서 활발히 발현하고 있는 것으로 생각된다. 감자와 같은 가지과 (Solanaceae)에 속하는 담배에서는 NeIF-5A1과 NeIF-5A2 두 clone이 분리되어 보고되었는데 (Chamot and Kuhlemeier 1992), NeIF-5A1 clone의 3' 특이적인 probe를 사용하여 이들의 발현분석을 한 결과 꽃받침, 꽃잎, 잎조직에서 다량으로 발현하였으나, 과실에서는 그 발현이 매우 낮았고 뿌리조직에서는 관찰이 되지 않았다. NeIF-5A2의 경우에는 모든 조직에서 그 발현이 관찰이 되었고 특히 잎에서의 발현이 높게 나타났으며, NeIF-5A1과는 다르게 과실과 뿌리 조직에서도 다량으로 그 발현이 관찰되어, 감자의 eIF5A와 유사한 발현 양상을 나타내었다.

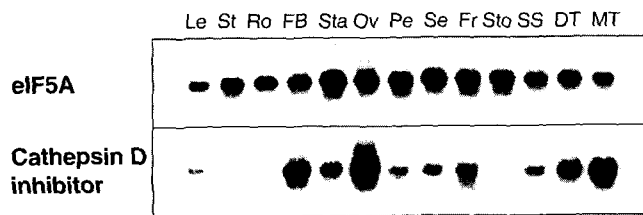


Figure 3. Northern blot analysis of the differential expression of eIF5A in various organs of potato. Ten micrograms of total RNA were loaded into each line. The membrane was reprobred with cathepsin D inhibitor cDNA isolated from potato. Le, leaf; St, stem; Ro, root; FB, flower bud; Sta, stamen; Ov, ovary; Pe, petal; Se, sepal; Fr, fruit; Sto, stolon; SS, swelling stolon; DT, developing tuber; MT, Mature tuber.

eIF5A 유전자는 식물체에서는 토마토 (Wang et al. 2001), 옥수수 (Dresselhaus et al. 1999), 알팔파 (Pay et al. 1991), 담배 (Chamot and Kuhlemeier 1992)와 이외에도 여러 식물체들에서 분리되어 유전자 은행에 등록되어 있는데 이들의 아미노산 서열을 비교하여 서로 간의 유연관계를 조사하는 것은 감자에 있어서 eIF5A의 기능을 알아보는 데 있어서 유용하다. 다양한 생물체에서 보고된 eIF5A 유전자들의 아미노산 서열을 비교·분석한 결과 식물체의 eIF5A 단백질 (Group I)과 초파리, 사람, 효모 등 (Group II)의 두 그룹으로 크게 나누어졌으며, 식물체들에서 eIF5A의 단백질들은 단자엽 식물과 쌍자엽 식물의 구분 없이 분포하는 것으로 나타났다 (Figure 4).

감자의 eIF5A는 같은 가지과 (Solanaceae) 식물인 토마토와 매우 가까운 유연관계를 나타내었으나, 같은 가지과인 담배의 경우에는 감자보다는 단자엽 식물인 벼와 비교적 가까운 유연관계에 있는 것으로 나타났다. 그리고 이들 두 그룹 (Group I과 Group II)의 상동성은 51~56% 정도로 낮음에도 불구하고 eIF5A 단백질들에서 12개의 아미노산 서열 (STSKTGKHHGAK)이 효모에서 사람에 이르기까지 완벽하게 보존되어 있는 것으로 보아 eIF5A 단백질은 진화과정에 있어서 그 기능이 잘 보존되어 있는 것으로 생각된다. 이 영역은 번역 후 수식에 의한 hypusine의 생성이 이루어지는 곳으로 eIF5A의 기능을 밝히기 위해 많은 연구가 진행되었으나 아직까지 명확하게 해명된 보고는 없다. 효모에 있어서 eIF5A의 hypusine 수식은 세포의 성장과 생존에 필수적이라는 보고도 있으나 (Schnier et al. 1991), Kang과 Hershey 등 (1994)에 의하면 eIF5A의 활성이 선택적으로 어떤 mRNA의 번역을 위해서 필요하거나 또는 일반적인 단백질 합성을 위해서 절대적으로 필요하기보다는 세포의 일부 대사과정에

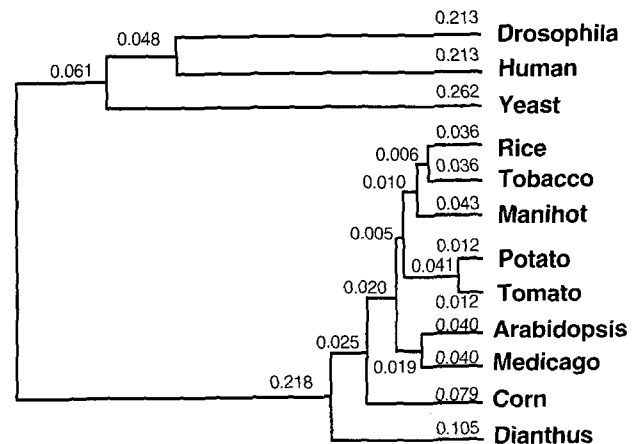


Figure 4. Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of eIF5A isolated from *Arabidopsis thaliana* (AF296082), corn (Y07920), *Dianthus caryophyllus* (AF296081), *Manihot esculenta* (AF266464), *Medicago sativa* (AF416338), potato (AB004823), rice (AJ252135), tobacco (X63542), tomato (AF296086), *Drosophila melanogaster* (AAF80375), human (NP_065123) and yeast (FIBYA2). The phylogenetic tree was reconstructed by UPGMA.

관여할 가능성을 제시하고 있어 이들 eIF5A의 기능을 명확히 구명하기 위해서는 앞으로 지속적인 연구를 필요로 하고 있다.

적 요

감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. Irish Cobbler)의 괴경형성과정 (tuberization) 동안에 발현하는 유전자들의 발현양상을 조사하고자 differential display법을 실시하였다. Differential display를 이용하여 분리된 eIF5A DNA 단편을 probe로 사용하여 감자의 cDNA library screening을 통하여 eIF5A full-length cDNA를 감자에서 처음으로 분리하였다. 감자의 eIF5A clone은 토마토의 eIF5A cDNA 염기서열과 94.8%, 아미노산 서열에서는 97.5%로 매우 높은 유사성을 나타내었다. 감자의 eIF5A 유전자는 길이가 716 bp로 하나의 단백질 code 영역 (ORF)을 포함하고 있었다. 이 영역은 분자량 17.4 kD, pI 5.5로 추정되는 160개의 아미노산으로 구성된 eIF5A 단백질을 code하고 있었다. eIF5A 단백질에서 12개의 아미노산 서열 (STSKTGKHHGAK)은 효모에서 사람에게 이르기까지 완벽하게 보존되어 있는 것으로 알려져 있는데, 감자에서도 또한 잘 보존되어 있었다. 이 영역은 eIF5A 단백질의 활성을 나타내는 데 있어서 필수적인 hypusine을 생성하는 전사 후 수식 부위가 들어 있는 아주 중요한 곳이다. 감자에서 eIF5A 유전자의 발현양상을 조사한 결과 감자의 전조직에서 발현을 보였는데, 성숙잎이나 괴경보다는 세포분열 및 물질축적이 활발히 일어나고 있는 꽃기관들 (stamen, ovary, petal, sepal), 과실 (fruit)과 stolon 등의 조직들에서 비교적 활발히 발현되고 있었다.

언용문헌

- Chamot D, Kuhlemeier C** (1992) Differential expression of genes encoding the hypusine-containing translation initiation factor, eIF-5A, in tobacco. *Nucl Acids Res* **20**:665-669
- Dresselhaus T, Cordts S, Lorz H** (1999) A transcript encoding translation initiation factor eIF-5A is stored in unfertilized egg cells of maize. *Plant Mol Biol* **39**:1063-1071
- Gordon ED, Mora R, Meredith SC, Lee C, Lindquist SL** (1987) Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes. *J Biol Chem* **262**:16585-16589
- Jenkins ZA, Haag PG, Johansson HE** (2001) Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *J Genomics* **71**:101-109
- Kang HA, Hershey JWB** (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**:3934-3940
- Liang P, Pardee AB** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**:967-971
- Moldave K** (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem* **54**:1109-1149
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Park MH** (1989) The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). *J Biol Chem* **264**:18531-18535
- Pay A, Heberle-Bors E and Hirt H** (1991) Isolation and sequence determination of the plant homologue of the eukaryotic initiation factor 4D from alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Mol Biol* **17**:927-929
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA and Hershey JWB** (1991) Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Bio* **11**:3105-3114
- Shirras AD, Northcote DH** (1984) Molecular cloning and characterisation of DNAs complementary to mRNAs from wounded potato (*Solanum tuberosum*) tuber tissue. *Planta* **162**:353-360
- Smit-McBride Z, Dever TE, Hershey JWB and Merrick WC** (1989a) Sequence determination and cDNA cloning of eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein. *J Biol Chem* **264**:1578-1583
- Smit-McBride Z, Schnier J, Kaufman RJ, Hershey JWB** (1989b) Protein synthesis initiation factor eIF-4D. *J Biol Chem* **264**:18527-18530
- Wang TW, Lu L, Wang D, Thompson JE** (2001) Isolation and characterization of senescence-induced cDNAs encoding deoxyhypusine synthase and eukaryotic translation initiation factor 5A from tomato. *J Biol Chem* **276**:17541-17549