Jour. Korean For. Soc. Vol. 94, No. 4, pp. 236~242 (2005)

한국임학회지

JOURNAL OF KOREAN FOREST SOCIETY

포플러의 Phytochrome B 유전자 분리 및 특성구명

강호덕[1]* · 이금영[1] · 강상구[2] · 배한홍[3]

[1]동국대학교 산림자원학과, [2]영남대학교 생명공학부

[3]USDA-ARS, Plant Science Institute, Beltsville Agricultural Research Center, 10300 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705-2350, USA

Isolation and characterization of Phytochrome B gene in Poplar

Hoduck Kang[1]*, Keum-Young Lee[1], Sang-Gu Kang[2] and Han-hong Bae[3]

[1]Department of Forest Resources, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

[2]School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

[3]USDA-ARS, Plant Science Institute, Beltsville Agricultural Research Center, 10300 Baltimore Avenue, Beltsville, MD 20705-2350, USA

요 약: 다양한 광조건에서 식물의 생장조절에 관여하는 광수용체인 phytochrome B(PhyB) 유전자를 교잡종 포플러 수항1호에서 분리하였다. 염기서열분석 결과, PhyB cDNA는 길이가 3,456 bp 이었으며 1,156개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하고 있는 것으로 나타났다. PhyB 단백질은 아미노산 수준에서 *Populus balsamifera* PhyB1과 98%의 높은 상동성을 나타내었다. Northern blot 분석 결과, PhyB 유전자는 광조건에서는 높은 수준으로 발현되지만, 암조건에서는 발현되지 않는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과들을 종합하여 볼 때 PhyB는 빛에 의하여 발현이 유도되며 광수용체 역할을 하는 것으로 여겨진다.

Abstract: Phytochrome B (PhyB) gene, which is a photoreceptor that controls plant growth under various light conditions, was cloned from Chinese hybrid poplar 'Soohang 1'. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences PhyB cDNA of 'Soohang' is consisted with 3,456 nucleotides and 1,156 amino acids. The cloned PhyB fragment showed 98% homology of amino acid sequences with *Populus balsamifera* PhyB1. According to Northern blot analysis, PhyB was up-regulated by light, while PhyB transcript was not detected under dark condition. According to this study, the cloned PhyB is induced by light and functions as photoreceptor.

Key words : *cDNA library, Phytochrome,* Populus, *Shade avoidance*

서 론

Phytochrome은 색소체 단백질(chromoprotein)로서 식물의 광합성 기작에서 다양한 빛을 흡수하여 energy를 전달시키는 광수용체 이다(Christensen and Quail, 1989; Kendrick and Kronenberg, 1994). Phytochrome은 식물체 내에서 서로 다른 2가지 형태로 존재하는데 Pr이라고 하는 적색광 흡수형으로 합성된 다음 광파장이 낮은 적색광(Red: 650-680 nm)에 의해 Pfr이라고 불리는 근적외광을 흡수하는 형태로 전환된다(Clack *et al.*, 1994; Furuya, 1993; Reed *et al.*, 1993). 반면, 광파장이 높은 원적색광(Far Red: 710-740 nm)에 노출되거나 야간이 되면 다시 Pfr이 Pr로 천천히 바뀐다(Furuya and Song, 1994). 식물의 phytochrome은 종자의 발아와 유식물의 발달에 관여할 뿐만 아니라, 줄기와 엽병의 길이생장과 엽록체의 발달 등 다양한 생리적 작용에 관여한다(Howe *et al.*, 1995; Howe *et al.*, 1996; Kendrick and Kronenberg, 1994; Reed *et al.*, 1993). Phytochrome 유전자는 구조적 특성에 따라 PhyA, PhyB, PhyC, PhyD, PhyE로 구분된다(Sharrock and Quail, 1989). Phytochrome의 작용기작에 관한 연구는 애기장대(*Arabidopsis*)에서 가장 많이 연구되었으며, 다양한 식물에서 다수의 phytochrome 관련 유전자가 밝혀졌으나 포플러에서는 PhyB와 유사한 PhyB1과 PhyB2 유전자가 보고된 바 있다(Clack *et al.*, 1994; Smith, 1995; Quail, 1991; 1997). 특히 PhyB 유전자는 광 조건에서 자란 식물체에 많이 존재하고 있으며, 임관내에서 상호경쟁

*Corresponding author
E-mail: hdk0225@dongguk.edu

이 되는 이웃나무의 존재를 감지하여 직경생장 보다는 수고 생장을 촉진시키는 역할을 한다.

본 연구에서는 PhyB 유전자의 작용기작과 발현양상을 연구하기 위하여 포플러의 PhyB 유전자를 분리한 다음 그 특성을 구명하였다. 분리한 PhyB 유전자는 빛에 의한 생육조절이 가능한 형질전환 포플러 육성 및 밀식환경에서의 식물체 광 생리현상 연구에 활용할 예정이다.

재료 및 방법

1. 포플러 genomic DNA와 total RNA 분리

건조지역에서 생육이 가능한 포플러 교잡종인 '수항1호' (*Populus deltoides* × *P. nigra*)를 중국임업과학원으로부터 도입하여 식물재료로 이용하였다. Genomic DNA는 CTAB 방법으로 분리하였다(Murray and Thompson, 1980). Total RNA는 Guanidium-Acid-Phenol Extraction 방법을 변형하여 분리하였다(Mathews and Sharrock, 1997). 포플러 잎 6 g을 액체질소를 사용하여 마쇄한 후, phenol-chloroform 혼합액 20 ml와 extraction buffer(2.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, 0.2 M EDTA, pH 8.0, 5% PVP-10, 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 20 ml, 20% SDS 3.3 ml를 넣고 섞어주었다. 원심분리 후 상층액을 모아 3M NaOAc(0.1 volume)와 95% ethanol(2 volumes)을 넣고 -70°C에 두어 RNA를 침전시켰다. 원심분리 후 pellet을 suspension buffer(50 mM Tris-HCl pH 9.0, 100 mM NaCl, 10% SDS)에 녹였다. Phenol-chloroform 혼합액을 동일량 넣고 섞은 후, 원심분리하고 상층액을 덜어내었다. 3M NaOAc(0.1 volume)와 95% ethanol(2 volumes)을 넣은 후 -70°C에 30분간 방치하였다. 원심분리하여 pellet을 모으고, 0.5ml TE buffer에 녹인 후 spectrophotometer로 농도를 확인하였다.

2. PhyB 유전자 단편의 Cloning

GenBank로부터 식물의 PhyB 유전자들을 검색하여 서열정렬을 하였다. 서열정렬의 결과를 이용하여 degeneracy primer를 제작하였다. 제작된 primer들을 조합하여 RT-PCR 방법으로 PhyB 유전자 단편을 증폭하였다. PCR 증폭산물을 정제하여 pGEM-T Easy vector(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하였다. Plasmid mini-preparation 방법으로 plasmid DNA를 분리한 다음 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystem, Forster City, CA, USA)와 ABI PRISM 377 sequencer(ABI)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

3. cDNA library의 제작

cDNA synthesis kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 cDNA library를 제작하였다. Total RNA로부터 oligo(dT) column을 사용하여 poly(A)$^+$를 가진 mRNA를 분리하였다. mRNA로부터 reverse transcriptase를 사용하여 first-strand cDNA를 만든 다음, RNaseH를 사용하여 mRNA를 제거하였다. DNA polymerase를 사용하여 second-strand cDNA를 만든 후, *Eco*RI adaptor를 부착하였다. 제한효소 *Xho*I과 *Eco*RI으로 절단한 후 Lambda ZAP cDNA library vector arm에 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation시켰다. 작성된 cDNA library는 DMSO를 넣고, -80°C에 보관하여 사용하였다.

4. PhyB cDNA의 분리 및 특성분석

cDNA library screening은 Stratagene 방법에 따라 실시하였다. cDNA phage들을 XL1-Blue MRF 박테리아에 접종한 후, NZY agar plate에 도말하여 plaque를 형성시켰다. Phage를 nytran membrane(Schleicher and Schuell, N.H., USA)으로 옮긴 다음, 변성, 중화 및 세정과정을 거치고 UV crosslinking시켰다. Membrane을 hybridization solution(high stringency; 6X SSC, 50% deionized formamide, 5X Denhardt's reagent, 0.1% SDS, 0.1 mg/ml sonicated Salmon Sperm DNA)에 넣고 42°C에서 3시간 동안 prehybridization을 시킨 다음, 방사능 표지된 phytochrome cDNA probe을 첨가하여 42°C에서 12시간 동안 hybridization시켰다. Membrane을 2xSSC-0.1% SDS 용액에서 10분, 0.2xSSC-0.1% SDS 용액에서 30분간 세정한 다음 -80°C에서 18시간동안 X-ray film에 감광시켰다.

Screening을 통해 선발된 PhyB cDNA의 염기서열을 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystem, Forster City, CA)와 ABI PRISM 377 DNA sequencer(ABI)를 사용하여 분석하였다. 밝혀진 염기서열들은 NCBI의 BLASTX algorithm과 DNAsis program을 사용하여 기존에 보고된 phytochrome 유전자들과 비교분석을 실시하였다.

5. Northern Blot 분석

수항1호 포플러의 1년생 가지를 채취하여 삽목방법으로 2개월간 실내온실에서 증식하였다. PhyB 유전자의 발현 여부를 검정하기 위해 1일 16시간 광조건(40 μmol $m^{-2}s^{-1}$)과 무광상태의 암조건에서 삽목묘로부터 측아를 유도하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA를 50% foramide, 6.2% formaldehyde, 20 mM MOPS, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA와 함께 65°C에서 10분간 변성시켰다. RNA를 formaldehyde가 포함된 1.2% agarose gel에 전기영동하였다. RNA를 nytran membrane에 옮긴 후 UV crosslinker를 이용하여 RNA를 안정화시키고 hybridization 과정을 수행한 뒤 X-ray film에 감광시켰다.

결과 및 고찰

1. Phytochrome B cDNA의 분리

포플러로부터 Phytochrome B(PhyB) 유전자를 분리하기 위하여 GenBank에 보고된 PhyB 유전자들의 염기서열을 분석하여 PhyB 유전자에 특이적인 primer들을 제작하였다(Table 1). 이 primer들의 적절한 조합을 통하여 PhyB 유전자의 cDNA 단편들을 RT-PCR로 증폭한 결과, 크기가 1,482, 1,300 그리고 600bp인 cDNA 단편들을 얻었다(Figure 1). 증폭된 cDNA 단편들의 염기서열을 분석한 결과 PhyB 유전자의 일부분임을 확인하였다.

Full-length의 PhyB 유전자를 얻기 위하여 수항1호 포플러로부터 mRNA를 분리하여 cDNA library를 제작하였다. 제작된 cDNA library로부터 무작위로 클론을 취한 후 T7과 T3 primer를 이용하여 PCR 증폭한 결과, cloning된 cDNA들의 평균 크기는 1 kb 이상으로 확인되었다.

RT-PCR 증폭으로 분리한 600 bp 크기의 PhyB cDNA 단편을 probe로 사용하여 포플러의 cDNA library에 대한 screening을 실시하여 PhyB 유전자의 full-length cDNA 클론을 분리한 후 DNA 염기서열을 결정하였다(Figure 2).

Table 1. Primers for cloning of poplar cDNA.

Primers name	Sequence (5'->3')
POP-1U	ATGGCATCACAATCACAAAGA
POP-1482L	TCAGCTAACCTGTCTGTGCTT
POP-2086U	GGTGAGGAGGATAAGAACGTG
POP-2679L	GAGCACTTCTTTTCCTGCTGT
POP-3436L	TTAATAGACGTTACAGACCAA
POP-816U	AAGGGCTGATTTGGAACCTTA
POP-2215L	TGTAACATCCTGACCGACAAA
POP-2510U	GGCAAGATACAGACAAGCTAC
POP-3436L2	TTAATAGACGTTACAGAC
ppophyB-1482-483L	GGGACTGATGTAAGGACCCTT
1U-1482L-326L	GCCATCAACATCTACAGCAAA

2. cDNA 염기서열 결정과 특성분석

PhyB 유전자의 cDNA 염기서열을 DNAsis program으로 분석한 결과, PhyB cDNA의 총길이는 3,456 bp 이었으며 1,156개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 것으로 나타났다(Figure 3). 또한, 본 실험에서 사용한 수항포플러의 PhyB 유전자는 *Populus balsamifera* subsp. Trichocarpa Phytochrome B1(GenBank Accession No. AF309807)와 98%의 높은 상동성을 나타내었다(Figure 4).

수항포플러의 PhyB 유전자로부터 연역된 단백질의 아미노산 서열을 이용하여 이미 보고된 phytochrome 단백질과의 상동성 분석을 실시하였다. 그 결과, 수항포플러의 PhyB 단백질은 *Populus balsamifera*의 PhyB1과 98%의 상동성을 보였으며 PhyB2(*Populus balsamifera* subsp. Trichocarpa)와는 92%의 상동성을 나타내었다(Figure 4). 또한, 담배(*Nicotiana plumbaginifolia*)의 PhyB와는 87%의 상동성을 보였으며 토마토(*Lycopersicon esculentum*)의 PhyB2와는 80%의 상동성을 보였다. 다소 *Populus* PhyB들과 그 상동성에 차이는 있었으나 대체로 높은 상동성을 보이는 것으로 보아 수항포플러의 phytochrome B cDNA

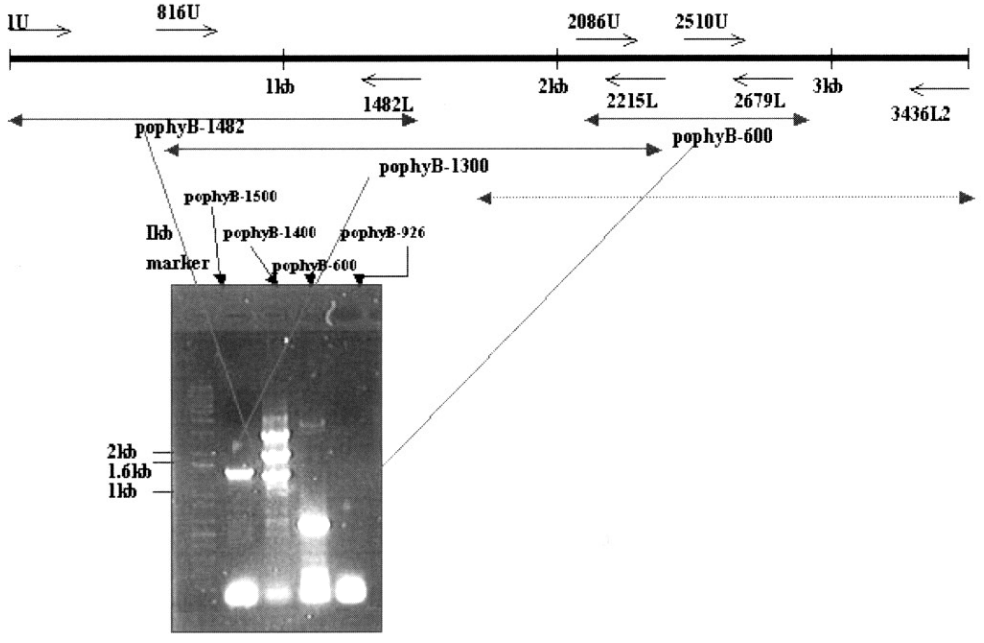

Figure 1. Pytochrome B cDNA fragments that were generated by RT-PCR with different primers. Three different sizes of cDNA fragments, 1,482 bp, 1,300 bp, and 600 bp were amplified.

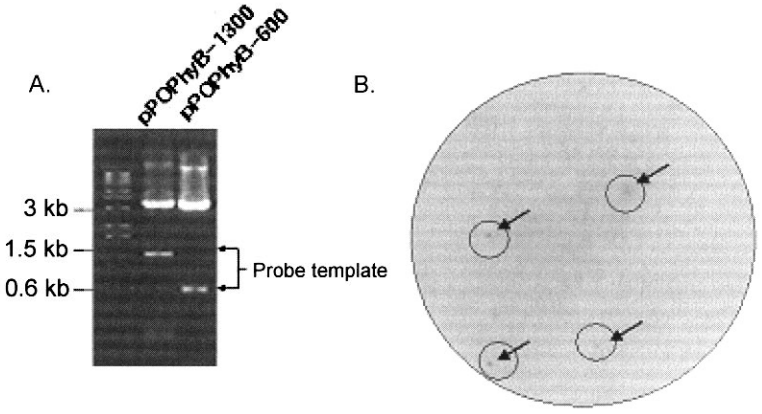

Figure 2. Screening phytochrome B gene cDNA library of 'Soohang' poplar. (A) PhyB-1300 and PhyB-600 were used as probes. (B) Lambda phages containing phytochrome B.

```
   1 ATGGCATCACAATCACAAAGACAAAGCAACCAGCGGCAGCACCAG
     M  A  S  Q  S  Q  R  Q  S  N  Q  R  Q  H  Q  15
  46 AATCAAGCGGCGCAGTCTTCTGGTACCAGTAACATGAGGCAACAT
     N  Q  A  A  Q  S  S  G  T  S  N  M  R  Q  H  30
  91 CATCACGCCACAGAATCAGTAAGCAAAGCAATTGCACAATACACT
     H  H  A  T  E  S  V  S  K  A  I  A  Q  Y  T  45
 136 GTCGATGCACAACTCCATGCAGTTTTTGAACAATCTGGCGGGTCT
     V  D  A  Q  L  H  A  V  F  E  Q  S  G  G  S  60
 181 GGTAAGTCGTTTGATTATTCACAGTCAGTTAGAACTACTAGTCAG
     G  K  S  F  D  Y  S  Q  S  V  R  T  T  S  Q  75
 226 TCAGTACCCGAGGAACAAATCACTGCTTATTTATCAAAAATCCAA
     S  V  P  E  E  Q  I  T  A  Y  L  S  K  I  Q  90
 271 AGGGGTGGTCATATCCAGCCATTTGGGTGCATGATTGCTGTAGAT
     R  G  G  H  I  Q  P  F  G  C  M  I  A  V  D 105
 316 GAAGGGTCGTTTAGGGTCATTGCATATAGCGAAAATGCCAAAGAA
     E  G  S  F  R  V  I  A  Y  S  E  N  A  K  E 120
 361 ATGCTTGGTTTAACTCCACAGTCAGTCCCTTCTCTAGATAAACAG
     M  L  G  L  T  P  Q  S  V  P  S  L  D  K  Q 135
 406 GAAATTCTCTCTGATGGGACTGATGTAAGGACTCTTTTTAGGCCT
     E  I  L  S  D  G  T  D  V  R  T  L  F  R  P 150
 451 TCGAGCTCCGCTATGCTTGAAAAAGCATTTGGTGCAAGGGAAATA
     S  S  S  A  M  L  E  K  A  F  G  A  R  E  I 165
 496 ATTTTGTTGAATCCAATTTGGATCCATTCCAAGAATTCCGGGAAG
     I  L  L  N  P  I  W  I  H  S  K  N  S  G  K 180
 541 CCTTTTTACGCAATTTTGCATAGGATTGATGTTGGTATTGTTATT
     P  F  Y  A  I  L  H  R  I  D  V  G  I  V  I 195
 586 GATTTAGAGCCTGCTAGGACTGAAGACCCTGCTTTATCCATAGCA
     D  L  E  P  A  R  T  E  D  P  A  L  S  I  A 210
 631 GGGGCTGTACAGTCTCAGAAATTAGCAGTTCGTTCGATTTCACAA
     G  A  V  Q  S  Q  K  L  A  V  R  S  I  S  Q 225
 676 TTACAATCACTTCCTGGTGGGGATATTAAGTTATTGTGTGATACT
     L  Q  S  L  P  G  G  D  I  K  L  L  C  D  T 240
 721 GTAGTGGAGAGTCTCAGAGAGCTTACCGGGTATGATAGAGTTATG
     V  V  E  S  V  R  E  L  T  G  Y  D  R  V  M 255
 766 GTTTATAAGTTTCATGAAGATGAGCATGGTGAGGTTGTGGCTGAG
     V  Y  K  F  H  E  D  E  H  G  E  V  V  A  E 270
 811 AATAAAAGGGCTGATTTGGAACCTTATATTGGTTTGCATTATCCT
     N  K  R  A  D  L  E  P  Y  I  G  L  H  Y  P 285
 856 TCTACGGATATACCACAAGCTTCAAGGTTTTTGTTCAAAGCAGAAT
     S  T  D  I  P  Q  A  S  R  F  L  F  K  Q  N 300
 901 AGGGTTAGGATGATTGTGGATTGCCATGCTACACCTGTCCGTGTT
     R  V  R  M  I  V  D  C  H  A  T  P  V  R  V 315
 946 ATCCAGGATGAGGCGCTTATGCAGCCTTTATGCTTGGTTGGTTCA
     I  Q  D  E  A  L  M  Q  P  L  C  L  V  G  S 330
 991 ACTCTTCGAGCTCCTCATGGTTGTCATGCTCAGTATATGGCGAAT
     T  L  R  A  P  H  G  C  H  A  Q  Y  M  A  N 345
1036 ATGGGGTCAATTGCTTCATTGGCCATGGCTGTTATTATTAATGGA
     M  G  S  I  A  S  L  A  M  A  V  I  I  N  G 360
1081 AATGAGGAAGAAGCTATTGGTGGGAGGAATTCAACGAGGCTTGG
     N  E  E  E  A  I  G  G  R  N  S  T  R  L  W 375
1126 GGTTTGGTTGTTTGCCATCACACTTCTGCTAGGTGTATTCCATTT
     G  L  V  V  C  H  H  T  S  A  R  C  I  P  F 390
1171 CCGCTTCGTTATGCATGTGAGTTTTAATGCAGGCTTTTGGACTT
     P  L  R  Y  A  C  E  F  L  M  Q  A  F  G  L 405
1216 CAATTGAACATGGAATTGCAGTTAGCGTCACAGTTGTCAGAGAAA
     Q  L  N  M  E  L  Q  L  A  S  Q  L  S  E  K 420
1261 CATGTCTTGAGGACTCAGACTCTCTTGTGTGATATGCTTCTCCGT
     H  V  L  R  T  Q  T  L  L  C  D  M  L  L  R 435
1306 GACTCTCCTACTGGCATTGTCACTCAAAGTCCCAGTATCATGGAT
     D  S  P  T  G  I  V  T  Q  S  P  S  I  M  D 450
1351 CTTGTGAAGTGTGACGGGGCAGCTCTTTATTACCAAGGACAGTAT
     L  V  K  C  D  G  A  A  L  Y  Y  Q  G  Q  Y 465
1396 TATCCATTGGGCGTGACCCCAACCGAAGCCCAAATAAAAGATATT
     Y  P  L  G  V  T  P  T  E  A  Q  I  K  D  I 480
1441 GTGGAGTGGTTGTTGGCCCTTCACGGAGACTCAACTGGTTTAAGC
     V  E  W  L  L  A  L  H  G  D  S  T  G  L  S 495
1486 ACAGACAGTTTAGCTGATGCTGGGTATCCTGGGGCAGCCTCACTT
     T  D  S  L  A  D  A  G  Y  P  G  A  A  S  L 510
1531 GGCAATGCAGTTTGTGGAATGGCTGTTGCTTATATTACTAAGAGA
     G  N  A  V  C  G  M  A  V  A  Y  I  T  K  R 525
1576 GATTTTCTTTTCTGGTTTCGGTCTCACACTGCAAAGGAGATCAAA
     D  F  L  F  W  F  R  S  H  T  A  K  E  I  K 540
1621 TGGGGTGGTGCGAAGCATCACCCAGAGGACAAGGATGATGGGCAG
     W  G  G  A  K  H  H  P  E  D  K  D  D  G  Q 555
1666 AGGATGCATCCACGTTCTTCATTCAAGGCATTTTTGGAGGTGGTG
     R  M  H  P  R  S  S  F  K  A  F  L  E  V  V 570
1711 AAGAGCCGGAGTTTACTGTGGGAGAATGCAGAAATGGATGCCATT
     K  S  R  S  L  L  W  E  N  A  E  M  D  A  I 585

1756 CATTCTTTGCAGCTTATTTTGCGAGACTCATTTAGGGACGTTGAA
     H  S  L  Q  L  I  L  R  D  S  F  R  D  V  E 600
1801 GCAACCAATTCTAAGGCAGTTGTACATGCCCAGCTCGAGGATACA
     A  T  N  S  K  A  V  V  H  A  Q  L  E  D  T 615
1846 GAATTGCAAGGGATGGATGAGCTCAGTTCGGTCGCAAGAGAAATG
     E  L  Q  G  M  D  E  L  S  S  V  A  R  E  M 630
1891 GTGAGACTAATAGAGACTGCAACTGCTCCGATATTTGCTGTAGAT
     V  R  L  I  E  T  A  T  A  P  I  F  A  V  D 645
1936 GTTGATGGCTGCATAAATGGGTGGAATGCAAAGGTCGCTGAGTTG
     V  D  G  C  I  N  G  W  N  A  K  V  A  E  L 660
1981 ACTGGGCTCTCAGTTGACAAGGCCATGGGGAAGTCTTTGGTTCAC
     T  G  L  S  V  D  K  A  M  G  K  S  L  V  H 675
2026 GATCTTGTTTATAAGGAATATGAAGAAACAGTTGACAAACTCCTT
     D  L  V  Y  K  E  Y  E  E  T  V  D  K  L  L 690
2071 CATCGTGCTTTAAGAGGTGAGGAGGATAAGAACGTGGAGATAAAA
     H  R  A  L  R  G  E  E  D  K  N  V  E  I  K 705
2116 TTGAGGACATTTGGCTCTGAACACCAAAAAAAGGCCCTTTTTGTG
     L  R  T  F  G  S  E  H  Q  K  K  A  L  F  V 720
2161 GTGGTAAATGCTTGTTCTAGCAAGGATTACATGAATAATATAGTT
     V  V  N  A  C  S  S  K  D  Y  M  N  N  I  V 735
2206 GGAGTCTGCTTTGTCGGTCAGGATGTTACAGGTCAAAAGGTGGTA
     G  V  C  F  V  G  Q  D  V  T  G  Q  K  V  V 750
2251 ATGGACAAATATGTCCATATACAAGGTGATTATAAGGCTATTGTA
     M  D  K  Y  V  H  I  Q  G  D  Y  K  A  I  V 765
2296 CACAGCCCCAATCCTTTGATCCCTCCTATATTTGCTTCAGATGAA
     H  S  P  N  P  L  I  P  P  I  F  A  S  D  E 780
2341 AACACATGTTGCTTGGAGTGGAACACTGCCATGGAAAAATTCACG
     N  T  C  C  L  E  W  N  T  A  M  E  K  F  T 795
2386 GGGTGGTCCCGGGGGGAAGTTATTGGGAAGATGTTGGTTGGGGAG
     G  W  S  R  G  E  V  I  G  K  M  L  V  G  E 810
2431 GTTTTTGGCAGTTGCTGTCAGCTCAAGGGTTCAGATGCACTGACA
     V  F  G  S  C  C  Q  L  K  G  S  D  A  L  T 825
2476 AAATTCATGATTGCTCTGCACAATGCAATTGGAGGGCAAGATACA
     K  F  M  I  A  L  H  N  A  I  G  G  Q  D  T 840
2521 GACAAGCTACCATTTTCATTTTTTGACCGGAATGGAAAGTATGTG
     D  K  L  P  F  S  F  F  D  R  N  G  K  Y  V 855
2566 CAAGCTCTCTTGACAGCGAACAAGAGGGTAAATATGGAGGAGAG
     Q  A  L  L  T  A  N  K  R  V  N  M  E  G  E 870
2611 ATTGTTGGAGCCTTCTGCTTCTTGCAGATTGCAAGTAATGAGTTG
     I  V  G  A  F  C  F  L  Q  I  A  S  N  E  L 885
2656 CAGCAAGCTTTGAAAGTCCAGAGACAGCAGGAAAAGAAGTGCTCT
     Q  Q  A  L  K  V  Q  R  Q  Q  E  K  K  C  S 900
2701 GCAAGGATGAAAGAGTTGGCTTACATCTGCCAGGAAATAAGGAAT
     A  R  M  K  E  L  A  Y  I  C  Q  E  I  R  N 915
2746 CCTTTAAGCGGTCTACGCTTTACCAACTCGCTTTTGGAGAACACG
     P  L  S  G  L  R  F  T  N  S  L  L  E  N  T 930
2791 GACTTGACTGAAGATCAAAAGCAGTTTCTTGAGACTAGTGCTGCT
     D  L  T  E  D  Q  K  Q  F  L  E  T  S  A  A 945
2836 TGTGAAAAGCAGATATTGAAGATCACTCGAGATGTTGATCTTGAG
     C  E  K  Q  I  L  K  I  T  R  D  V  D  L  E 960
2881 AGCATCGAAAATGGTTTACTGGAGCTTGAGAAGGCTGAATTCTTA
     S  I  E  N  G  L  L  E  L  E  K  A  E  F  L 975
2926 TTCGGGAGTGTCATAAATGCTGTTGTTAGCCAAGCAATGCTATTG
     F  G  S  V  I  N  A  V  V  S  Q  A  M  L  L 990
2971 CTGAGGGAAAGAAATCTGCAATTGCTTCGTGATATTCCAGAAGAA
     L  R  E  R  N  L  Q  L  I  R  D  I  P  E  E 1005
3016 ATAAAAACGCTGGTGGTTTATGGTGATCAGGCAAGAATTCAACAA
     I  K  T  L  V  V  Y  G  D  Q  A  R  I  Q  Q 1020
3061 GTACTGGCTGATTTCTTGTTGAATATGGTGCGTTATGCTCCATCT
     V  L  A  D  F  L  L  N  M  V  R  Y  A  P  S 1035
3106 TCAGCAGGTTGGGTAGAGATTCATGTTTGTCCAACACTGAAGCAA
     S  A  G  W  V  E  I  H  V  C  P  T  L  K  Q 1050
3151 ATCTCTGATGGACACACTCTCGTGCATATGGAGTTCAAGTATGCT
     I  S  D  G  H  T  L  V  H  M  E  F  K  Y  A 1065
3196 CTCCTCAACTCTTTGCATGTCTTCCTCGTAATTAGTTCAAGAC
     L  L  N  S  F  A  C  L  P  P  E  L  V  Q  D 1080
3241 ATGTTCCATAGTAGTAGATGGGTTACTCAAGAGGGCCTAGGGCTC
     M  F  H  S  S  R  W  V  T  Q  E  G  L  G  L 1095
3286 AGCATGTGCAGGAAGATTTTAAAGCTAATGAATGGTGAGGTCCAA
     S  M  C  R  K  I  L  K  L  M  N  G  E  V  Q 1110
3331 TATATTAGAGAGTCAGAAAGATGCTATTTCTTAGTTATCCTCGAA
     Y  I  R  E  S  E  R  C  Y  F  L  V  I  L  E 1130
3376 GTACCCATGCCTAATAAGTGTGAGAGGTATAACTGTAAAAAGTGC
     V  P  M  P  N  K  C  E  R  Y  N  C  K  K  C 1145
3421 TGCAGACTAGGATGCTTGGTCTGTAACGTCTATTAA 3456
```

Figure 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of PhyB of 'Soohang'. PhyB cDNA of 'Soohang' is consisted with 3,456 nucleotides and 1,156 amino acids.

는 그 기능이 식물의 PhyB1과 같을 것으로 추정된다. 이러한 높은 상동성은 수항1호 포플러에서 분리한 PhyB 유전자 산물이 그 기능이 이미 보고된 다른 식물의 PhyB와 동일하다는 것을 의미하는 것으로 판단된다.

3. Phytochrome의 기능적 domain의 분석

수항1호 포플러의 PhyB 단백질의 기능적 domain을 분석한 결과, PhyB 단백질의 정상적인 기능에 필수적인 GAF, phytochrome, PAS 그리고 PAC domain이 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다. 또한, bacteriophytochrome(light-regulated signal transduction histidine kinase)과 chromophore가 결합하는 domain이 확인되었다. 이와 유사한 결과로써 phytochrome domain은 cGMP 인산화효소의 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Choi *et al.*, 1999; Elich and Chory, 1997; Friedrich *et al.*, 1997; Grimm *et al.*, 1989).

Phytochrome domain 영역의 아미노산 서열을 GenBank에 등록된 다른 식물종의 phytochrome 단백질과 비교하였다(Figure 4). 그 결과 귀리(*Avena sativa*)의 phytochrome A type 3(GenBank Accession No. P06593), 공작고사리(*Adiantum capillus-veneris*)의 phytochrome 1(P42496), 이끼류인 피스코미트렐라(*Physcomitrella patens*)의 phytochrome 1(P36505), 감자(*Solanum tuberosum*)의 phytochrome B(P34094)와 거의 일치하는 것으로 나타나, 식물종 및 phytochrome 유전자의 종류에 관계없이 phytochrome domain이 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다(Hershey *et al.*, 1985; Heyer and Gatz, 1992; Kolukisaoglu *et al.*, 1993; Okamuro *et al.*, 1993).

Phytochrome 유전자는 N-terminal과 C-terminal 부위에 중요한 기능을 가지고 있다. N-terminal 부위에 chromophore라는 open-chain에 tetrapyrrol이 붙는 부분이 존재하며, chromophore는 광반응에 매우 중요한 역할을 한다(Furuya and Song, 1994). C-terminal 부위에는 두개의 transmitter kinase domain이 존재한다(Elich and Chory, 1997).

4. PhyB의 Phylogenic 분석

수항1호 포플러의 PhyB 유전자와 기존에 보고된 포플러(*Populus balsamifera* subsp. *trichocarpa*) PhyB1(GenBank Accession No. AF309806), 감자(*Solanum tuberosum*)의 PhyB(CAA74908), 토마토(*Lycopersicon esculentum*)의 PhyB1(CAA05293), 담배(*Nicotiana plumbaginifolia*)의 PhyB(P29130), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 PhyB(AAR32737), 완두(*Pisum sativum*)의 PhyB(AF069305), 대두(*Glycine max*)의 PhyB(P42499), 석죽과(*Stellaria*)의 PhyB(AF544029), 옥수수(*Zea mays*)의 PhyB1(AAP06788), 수수(*Sorghum bicolor*)의 PhyB(AAB41398), 벼(*Oryza sativa*: japonica cultivar-group)의 PhyB(BAC76432)를 multiple sequence alignment program인 CLUSTAL W를 사용하여 분석한 결과, 수항1호 포플러의 PhyB는 *Populus* balsamifera PhyB1과 가장 높은 유사성을 나타냈으며, 담배, 감자 그리고 토마토의 PhyB와도 높은 유사관계를 보

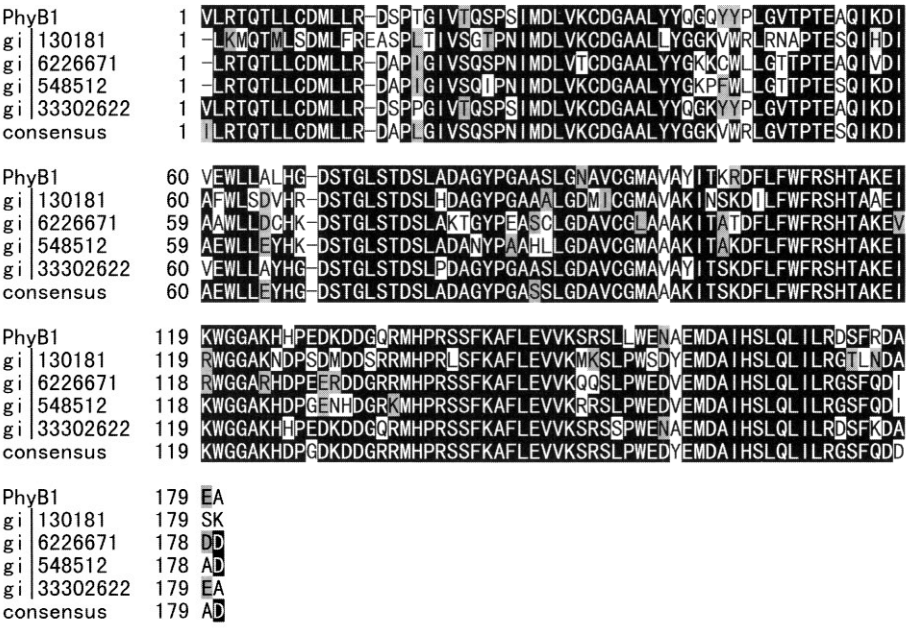

Figure 4. Amino acid sequence alignment of phytochrome domains of plant phytochromes. Phytochrome domains of PhyB1 were selected amino acid sequences from 422 to 601 of PhyB1 protein. PhyB1, *Populus* phyB1 in this research; GenBank Accession numbers: 130181(P06593) for *Avena sativa* phyB; 6226671 for *Adiantum capillus-veneris* phyB; 548512 for *Physcomitrella patens* phyB; and 33302622 for *Solanum tuberosum* phyB.

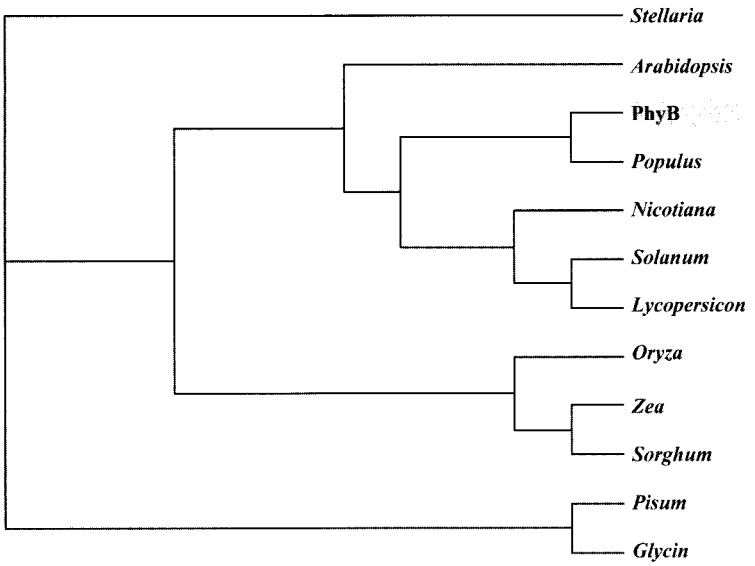

Figure 5. Phylogenetic tree of the amino acid sequences of phytochrome B protein. PhyB1(PhyB) is phytochrome protein of 'Soohang'.

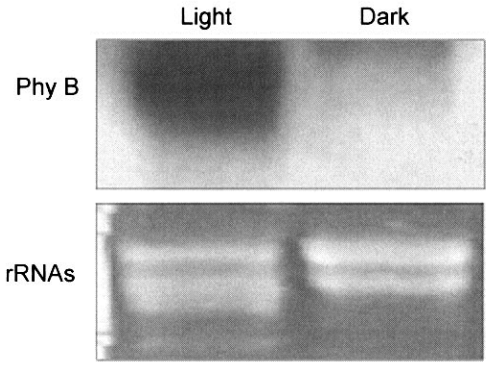

Figure 6. Northern blot analysis of 'Soohang' poplar. Total RNA isolated from leaf was electrophoresed on 1.4% formaldehyde gel. PhyB, Phytochrome B probe. rRNA, ribosomal RNA as a loading control.

였다. 이러한 phylogenic 분석 결과를 바탕으로 phytochrome B 아미노산 서열의 계통도를 작성하였다(Figure 5). 그 결과 일반적으로 수항1호 포플러를 포함한 기타 식물의 PhyB 유전자들은 서로 유사성이 대단히 높았으며, 크게 4개의 group인 ① 석죽과, ② 애기장대, 수항1호 포플러, 포플러(*Populus balsamifera*), 담배, 감자, 토마토, ③ 벼, 옥수수, 수수, ④ 완두, 대두로 나뉘어졌다.

5. RNA Blot 분석

수항1호 포플러에서 분리한 PhyB 유전자의 광 의존성 발현여부를 확인하기 위하여 광 조건 및 암 조건을 각각 처리한 식물체로부터 total RNA를 분리하여 northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과, 광 조건하에서 생장한 포플러에서는 PhyB의 전사체가 높은 수준으로 관찰되었으나, 암 조건에서 생장한 포플러에서는 거의 나타나지 않았다 (Figure 6). 따라서 분리한 PhyB 유전자 자체는 빛에 의하여 발현이 유도되며, 광수용체(photoreceptor)의 역할을 하는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 고등식물의 PhyB 연구의 결과와 일치함으로 본 연구에서 cloning한 수항1호 포플러의 cDNA는 photoreceptor의 기능을 지닌 *Populus* phytochrome B 유전자인 것으로 판명되었다.

결 론

다양한 광조건에서 식물의 생장조절에 관여하는 광수용체(photoreceptor)인 phytochrome B(PhyB) 유전자를 교잡종 포플러인 수항1호(*Populus deltoides* × *P. nigra*)에서 분리하였다. GenBank에 등록된 PhyB 유전자들의 염기서열을 분석하여 PhyB 유전자 특이적인 primer들을 제작한 다음, 이 primer들의 적절한 조합을 통하여 PhyB cDNA 단편들을 RT-PCR 방법으로 분리하였다. 그 결과, PCR을 통해 크기가 1,482, 1,300, 600 bp인 cDNA 단편들을 얻었다. 수항1호 포플러의 잎으로부터 분리한 mRNA를 주형으로 cDNA library를 제작하였고, RT-PCR 산물을 probe로 사용하여 screening을 실시하여 full-length의 PhyB 유전자를 선발한 다음 DNA 염기서열을 결정하였다. 분리한 PhyB 유전자는 3,456bp이며, 1,156개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하는 것으로 나타났다. 염기서열 분석결과, 분리한 PhyB 유전자 산물은 아미노산 수준에서 *Populus balsamifera* PhyB1 유전자 산물과 98%의 높은 상동성을 보였다. 수항1호 포플러의 PhyB 유전자 산물의 기능적 domain을 분석한 결과, GAF, phytochrome, PAS, PAC domain이 잘 보존되어 있었으며, 이는 본 실험에서 분리한 유전자 산물이 포플러에서 phytochrome B의

기능을 가짐을 의미하는 것으로 생각된다. Northern blot 분석 결과, 광조건 하에서 생장한 포플러에서는 PhyB의 전사체가 높은 수준으로 관찰되었으나, 암 조건에서 생장한 포플러에서는 거의 나타나지 않았다. 따라서 분리한 PhyB 유전자는 빛에 의하여 발현이 유도되며, 광수용체의 역할을 하는 것으로 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 본 실험에서 수항1호 포플러로부터 분리한 PhyB 유전자는 빛에 의한 생육조절이 가능한 형질전환 포플러 육성 및 밀식환경에서의 식물체 광 생리현상 연구에 사용될 수 있을 것이라 판단된다.

사 사

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 신진교수연구과제 지원사업에 의해 수행되었습니다(KRF-2002-003-F00015).

인용문헌

1. Choi, G., H. Yi, J. Lee, Y.K. Kwon, M.S. Soh, B. Shin, Z. Luka, T.R. Hahn, and P.S. Song. 1999. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. Nature 401 : 610-613.
2. Christensen, A.H. and P.H. Quail. 1989. Structure and expression of a maize phytochrome encoding gene. Gene 85 : 381-390.
3. Clack, T., S. Mathews, and R.A. Sharrock. 1994. The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. Plant Mol. Biol. 25 : 413-427.
4. Elich T.D. and J. Chory. 1997. Phytochrome: if it looks and smells like a histidine kinase, is it a histidine kinase? Cell 91 : 713-716.
5. Friedrich B., J.M. Andrew, A.K., Steve, and F. Masaki. 1997. Phytochrome-induced intercellular signalling activates cab: luciferase gene expression. Plant 12 : 839-849.
6. Furuya M. 1993. Phytochromes-their molecular species, gene families and functions. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44 : 617-645.
7. Furuya M. and P.S. Song. 1994. Assembly and properties of holophytochrome. *In*: Kendrick R.E., G.H.M. Kronenberg, eds. Photomorphogenesis in plants. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. pp 105-140.
8. Grimm R., D. Gast and W. Rudiger. 1989. Characterization of a protein kinase activity associated with phytochrome from etiolated oat seedlings. Planta 178 : 199-206.
9. Hershey, H.P., R.F. Barker, K.B. Idler, J.L. Lissemore and P.H. Quail. 1985. Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequences for two gene products expressed in etiolated *Avena*. Nucleic Acids Res. 13 : 8543-8559.
10. Heyer, A. and C. Gatz. 1992. Isolation and characterization of a cDNA-clone coding for potato type B phytochrome. Plant Mol. Biol. 20 : 589-600.
11. Howe, G.T., W.P. Kackett, G.R. Furnier, and R.E. Klevorn. 1995. Photoperiodic responses of a northern and southern ecotype of black cottonwood. Physiol. Plant. 93 : 695-708.
12. Howe G.T., G.M. Gardner, G.M. Gardner, W.P. Hackett, and G.R. Furnier. 1996. Phytochrome control of short-day induced bud set in black cottonwood. Physiol. Plant. 97 : 95-103.
13. Kendrick, R.E. and G.H.M. Kronenberg. 1994. Photomorphogenesis in Plants. Dordrecht: Kluwer Academic. p 420.
14. Kolukisaoglu, H.U., B. Braun, W.F. Martin and H.A. Schneider-Poetsch. 1993. Mosses do express conventional, distantly B-type-related phytochromes. Phytochrome of *Physcomitrella patens* (Hedw.). FEBS Lett. 334 : 95-100.
15. Mathews, S. and R.A. Sharrock. 1997. Phytochrome gene diversity. Plant Cell Environ. 20 : 666-671.
16. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8 : 4321-4325.
17. Okamuro, J.K., B.G.W. den Boer and K.D. Jofuku. 1993. Regulation of *Arabidopsis* flower development. Plant Cell 5 : 1183-1193.
18. Quail P.H. 1991. Phytochrome: A light-activated molecular switch that regulates plant gene expression. Ann. Rev. Gen. 25 : 389-409.
19. Quail, P.H. 1997. An emerging molecular map of the phytochromes. Plant Cell Environ. 20 : 657-665.
20. Reed, J.W., P. Nagpal, D.S. Poole., M. Furuya, and J. Chory. 1993. Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. Plant Cell. 5 : 147-157.
21. Sharrock, R.A. and P.H. Quail. 1989. Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev. 3 : 1735-1757.
22. Smith, H. 1995. Physiological and ecological function within the phytochrome family. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 46 : 289-315.

(2005년 2월 28일 접수; 2005년 8월 2일 채택)