

S-Adenosylmethionine decarboxylase 유전자의 upstream open reading frame이 *in vivo* 에서 translational inhibitor로서의 작용 기작

최유진 · 박기영

Action mechanism of upstream open reading frame from *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene as a *in vivo* translational inhibitor

Yu Jin Choi · Ky Young Park

Received: 14 March 2011 / Accepted: 20 March 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract *S*-Adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.4.50), a key enzyme for polyamines biosynthesis, was tightly regulated for homeostatic levels. *Carnation SAMDC* gene (*CSDC9*) has an small upstream open reading frame (uORF) of 54 amino acids in 5'-leader sequence. To explore the functional mechanism of uORFs in controlling translation, we used a *GUS* reporter gene driven with the 35S promoter and uORF region of *SAMDC* gene for making transgenic tobacco plants. In our experiment, there were a translational inhibition of its downstream GUS ORF by *SAMDC* uORF sequence or SAMDC uORF protein. Especially, translational inhibition was most effective in point-mutated construct, in which the start codon was changed. Therefore, this results suggested the ribosomal stalling might be involved in this translational inhibitory process. The frame shift in amino acid sequence of *SAMDC* uORF with start codon and stop codon resulted in a moderate increasing in GUS activity, suggesting the native amino acid sequence was important for a function as a translational inhibitor. Also, we showed that the production of GUS protein was significantly inhibited in the presence of the small uORF using histochemical analysis of GUS expression in seedlings and tobacco flowers. Importantly, the small uORF sequence induced a real peptide of 5.7 kDa, which was

provided the presence of *SAMDC* uORF peptide band using an *in vitro* transcription/translation system. The peptide product of uORF might interact with other components of translational machinery as well as polyamines, which was resulted from that polyamine treatment was inhibited GUS protein band in SDS-PAGE experiment.

서론

폴리아민은 식물, 동물 그리고 미생물에서 다양한 생리적인 발달과정에 관여하는 것으로 알려진 매우 작은 양이온 분자물질이다. 대표적인 형태로는 amine기의 갯수에 따라 diamine인 putrescine, triamine인 spermidine, tetraamine인 spermine이 있으며 생물체에서 보통 micromolar 수준에서 millimolar 이상의 수준으로 다양하게 존재하고 있다 (Smith 1985; Kakkar and Sawhney 2002). 현재 동물에서 폴리아민은 암을 포함한 여러 가지 질병과 관련하여 비교적 널리 연구되고 있으며 (Agostinelli and Bachrach 2007), 식물에서는 세포분화를 촉진하고 여러 가지 환경적인 스트레스에 대한 저항에 관여하며 노화를 지연시키고 캘러스로부터 배 발생 및 식물체 재분화를 촉진하며 꽃의 발달과 과일의 성숙을 조절하는 등 식물발달 전반에 걸친 여러 생리과정에 관여하고 있기 때문에 식물 생장조절물질로 간주되고 있다 (Evans and Malmberg 1989; Kakkar and Rai 1993; Galston et al. 1997; Bouchereau et al. 1999; Kakkar et al. 2000). 그러나 폴리아민이 이렇게 다양한 생명현상에 관여하는 생장조절물질로 알려져 있는 것에 비해 너

Y. J. Choi · K. Y. Park (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 생물학과
(Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon,
Chonnam 540-742, Korea)
e-mail: plpm@suncheon.ac.kr

무 광범위한 역할과 작용 때문에 정확한 조절 기작에 대해서는 아직 확실히 밝혀져 있지 않다.

특히 *S*-Adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.1.50)는 폴리아민 생합성 과정의 반응속도를 조절하는 주요소이며 methionine으로부터 *S*-adenosylmethionine (SAM) synthetase에 의하여 합성된 SAM은 SAMDC에 의하여 decarboxylated SAM (dcSAM)으로 전환되어 putrescine에 aminopropyl group을 공급해서 spermidine 및 spermine을 합성하게 된다 (Park and Lee 1994).

약 10%~25% 정도의 진핵생물의 mRNA에는 5'-untranslated region (UTR)에 하나 이상의 upstream open reading frame (uORF)이 존재한다 (Neafsey and Galagan 2007). 주로 homebox 유전자, proto-oncogene, growth factor, growth factor receptor, transcription factor, signal transduction pathway와 관련된 물질을 유도하는 유전자들이 uORF에 해당되며 모두 생물체 내에서 중요하게 조절되는 유전자 집단이다 (Geballe and Morris 1994; Geballe 1996). 이러한 uORF는 대부분 downstream ORF의 translation을 증가시키거나 억제하면서 유전자 발현의 translation 조절 과정에서 중요한 역할을 하고 있다 (Nyikó et al. 2009). 많은 유전자들이 transcription 단계에서 유전자 발현이 조절되지만 transcription regulation factor 등의 일부 단백질의 경우 유전자 발현의 정도를 좀 더 안전하게 조절하기 위하여 translation 단계에서도 그 발현을 조절하는 것으로 여겨지기 때문이다.

*SAMDC*의 uORF에 대한 연구는 처음으로 포유동물의 *SAMDC* 유전자를 이용하여 시작되었는데 uORF로부터 만들어진 단백질과 폴리아민이 상호작용하여 uORF의 종결코돈 근처에서 ribosomal stalling이 일어나서 main ORF에 의해 유도되는 peptide의 합성을 억제한다는 것이다 (Law et al. 2001). 이러한 내용은 uORF의 translation 종결 단계에서 폴리아민이 보조억제인자로 작용한다는 것을 의미한다 (Raney et al. 2002). 한편 식물의 *SAMDC* 유전자는 비교적 긴 5'-UTR을 가지며 보통 3~4개의 아미노산으로 이루어진 upstream tiny uORF와 48~54개의 아미노산으로 이루어진 downstream small uORF가 존재하고 서로 다른 종의 uORF에서 아미노산 서열의 동일성도 상당히 높은 편이다 (Franceschetti et al. 2001). 그러나 식물의 *SAMDC* uORF는 동물의 *SAMDC* uORF와 염기서열상 유사성이 전혀 없어 조절양상이 조금 다를 것으로 생각된다. 특히 세포 내 폴리아민의 양이 비정상적인 수준으로 증가하거나 감소하게 되면 식물체의 발달에 막대한 영향을 초래하는데 (Kumar et al. 1996), 최근에 세포 내 폴리아민의 농도가 과도하게 증가하면 small uORF로부터 만들어진 단백질이 main ORF의 translation을 억제하고, 반면에 폴리아민의 농도가 저하되면 tiny uORF가 main ORF의 translation을 유도하여 식물 *SAMDC*의 translation을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Hanfrey et al. 2005). 특히 폴리아

민의 이러한 다양한 역할 때문에 세포내 폴리아민의 농도는 매우 정교하게 조절되어 세포내 함량의 항상성을 유지하게 되는데 그 이러한 조절기작을 일으키는 핵심 조절인자가 바로 uORF일 것으로 여겨진다.

따라서 본 연구에서는 카네이션 *SAMDC* 유전자의 uORF를 이용하여 식물체 스스로가 살아가기 위해 폴리아민 양을 적절히 조절하는 uORF의 조절기작을 규명하고자 한다. 또한 이러한 연구내용을 바탕으로 폴리아민 생합성물을 적절하게 조절한다면 식물의 성장률 극대화 및 노화 지연을 이용한 농작물의 생산성 향상과 고품질의 화훼 작물을 개발하는데 기여할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

식물재료

Lee 등 (1997)이 분리한 카네이션 (*Dianthus caryophyllus* L.) *SAMDC* cDNA (GenBank Accession No. U38526) 중에서 2개의 아미노산으로 이루어진 tiny uORF와 54개 아미노산으로 이루어진 small uORF를 다양한 형태로 재조합하였다. Figure 1에서와 같이 35S 프로모터에 의해 조절되는 binary vector pBI121의 *Xba*I과 *Bam*HI 부위에 재조합하고 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun)에 형질전환하여 제조된 T1세대 식물체를 사용하였다.

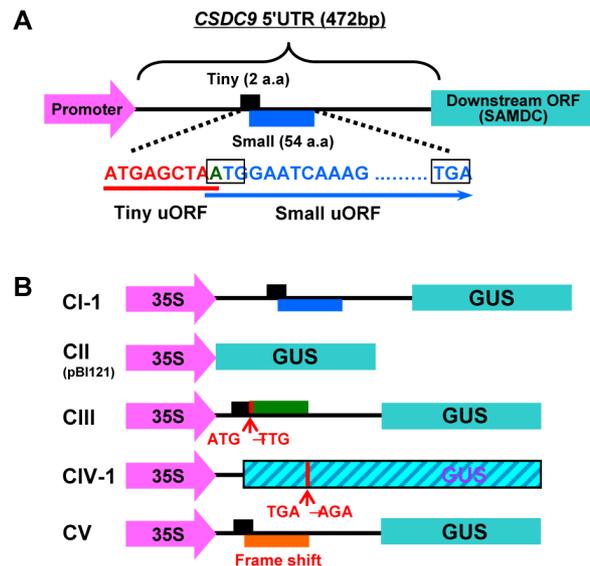


Fig. 1 Structure of the Carnation *SAMDC* (*CSDC9*) mRNA. (A) Schematic representation of *SAMDC* mRNA. The upstream tiny ORF and downstream small ORF consist of 2 and 54 codons, respectively, overlapping by one nucleotide, being the last base of the tiny uORF termination codon and the first base of small uORF ATG codon. (B) Schematic representation of constructs used in transgenic tobacco plants

In vitro transcription/translation (TNT) 반응

Promega의 transcription과 translation coupled (TNT[®]) wheat germ extract system을 사용하였다. T3 RNA polymerase와 wheat germ extract를 사용하여 30°C에서 *in vitro* transcription/translation시켰으며 이 때 DNA는 1 µg을 사용하였고 만들어지는 단백질은 ³⁵[S]-methionine (1000Ci/mmol)을 사용하여 radio-labelling 시켰다. 이 후 SDS-PAGE sample loading buffer와 섞어 곧바로 100°C에서 10분간 끓이고 SDS-PAGE를 수행하였다. 이 SDS-PAGE gel을 Coomassie Brilliant Blue R-250에 염색하여 5% methanol과 7.5% acetic acid 용액에서 탈색시켰다. 그리고 amplify (Amersham) 용액에 30분간 담가 두었다가 gel dry한 후 -70°C에서 X-ray film에 감광시켰다.

GUS 활성 측정

In vitro 분석은 Promega의 transcription과 translation coupled (TNT[®]) wheat germ extract system을 사용하여 cold methionine (1 mM)을 기질로 30°C에서 90분 동안 반응을 시켰다. 반응 후 합성된 생성물을 가지고 GUS assay buffer (50 mM NaHPO₄, pH 7.0, 10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% sodium lauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100, 2 mM MUG)를 넣어 다시 37°C에서 60분간 반응을 시켰다. 또한 *in vivo* 분석은 Jefferson 등 (1987) 방법에 따라 수행하였으며 추출물의 단백질양은 Bradford 방법 (Bradford 1976)을 이용하였다. 반응을 중지시키기 위해서 0.2 M Na₂CO₃ 용액을 첨가하고 Spectrofluorometer (365 nm excitation/456nm emission)를 이용하여 형광도를 측정하였다.

GUS staining

GUS staining 용액 (0.1 M phosphate buffer, 10 mM EDTA, pH 7.0, 0.5 mM K-ferricyanide, pH 7.0, 0.5 mM K-ferrocyanide, pH 7.0, 0.4 mM X-glucuronide, 0.1% triton X-100, 0.1% mercaptoethanol)에 형질전환 담배의 각 조직부위를 담근 후 vacuum incubation을 10초 간격으로 3번 수행하였고 37°C, 암소에서 하루정도 배양하였다. 그 다음 70% EtOH를 처리하여 엽록소 등의 색소를 제거하였다.

결과 및 고찰

Point-mutation 된 SAMDC uORF가 *in cis* 상태에서 downstream ORF의 translation에 미치는 *in vivo*에서의 영향

uORF는 대부분 downstream에 있는 main ORF의 translation

을 증가시키거나 억제하면서 유전자 발현의 translation 조절 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Hinnebusch 1990). 따라서 카네이션 SAMDC 유전자의 uORF가 여러 가지 형태로 도입된 형질전환 담배 식물체를 이용하여 GUS 단백질의 활성 변화를 비교하였다. 그 결과 35S CaMV 프로모터의 조절을 받아 GUS 단백질이 발현되는 CII (pBI121) 식물체에 비해 정상적으로 uORF가 존재하는 CI-1 #3 식물체에서는 GUS 활성이 약 4.2배 정도로 낮게 측정되었다 (Fig. 2). 이는 어떤 유전자들의 두개의 ORF가 동일한 특정 유전자의 mRNA 염기서열 내에 존재하여 dicistron 상태인 *in cis* 형태로 카네이션 SAMDC uORF가 존재할 때 downstream ORF인 GUS 단백질의 translation이 억제되었음을 확인 할 수 있는 결과이다. 이러한 결과는 포유동물의 SAMDC 유전자를 T cell에 도입시켜 6개의 아미노산으로 이루어진 uORF (MAGDIS)에 의하여 downstream ORF의 translation이 억제되는 결과 (Hill and Morris 1992) 및 애기장대 SAMDC uORF를 담배에 형질전환시켜 downstream ORF의 translation이 억제되는 것을 관찰한 결과와 일치하였다 (Colin et al. 2002). 따라서 SAMDC uORF가 SAMDC ORF가 아닌 GUS의 ORF에도 translation 억제를 일으킴을 확인한 것으로 아마도 SAMDC uORF의 끝 부분에서 ribosomal stalling 등의 기작을 통하여 GUS의 translation이 억제되어 GUS 활성이 낮아진 것으로 여겨진다. 그러나 또한 SAMDC uORF 단백질이 생성되어 ribosomal 단백질과 상호작용함으로써 translation의 활성을 억제하여 나타난 현상으로도 해석할 수 있을 것으로 여겨진다.

따라서 그 다음으로는 downstream ORF의 translation을 억제하는데 있어서 uORF 단백질의 interaction이나 ribosomal stalling에 의한 작용가능성을 확인해보기 위하여 uORF의 길이, 염기 및 아미노산 서열 등이 *in cis* 상태로 존재하는 GUS ORF의 translation에 영향을 주는지를 확인하였다. 특히 CI-1 #3 식물체와 비교하여 uORF의 개시코돈을 point mutation시켜 uORF 단백질이 합성되지 않는 CIII #1 식물

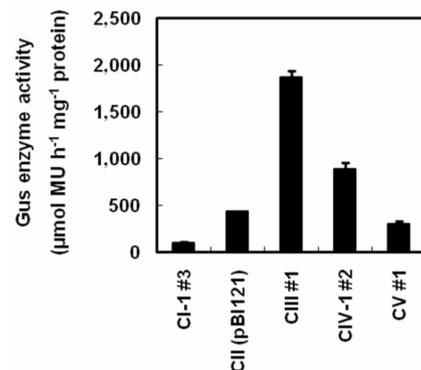


Fig. 2 Comparison of GUS activity in transgenic tobacco plants transformed with different constructs. GUS activity was measured in 6-week-old seedlings

체에서는 GUS의 활성이 약 18배 증가하였으며, 종결코돈을 point mutation 시킴으로써 예상되는 ribosomal stalling이 억제되었을 것으로 여겨지는 uORF와 GUS 융합 단백질을 합성하는 CIV-1 #2 식물체에서는 GUS 활성이 약 8.6배 높게 측정되었다. 이는 SAMDC uORF 단백질의 translation이 이루어지지 않으면 downstream에 존재하는 GUS의 translation이 매우 높게 증가한다는 결과로 SAMDC uORF 단백질이 translation 자체가 downstream ORF의 translation에 직접적으로 영향을 주게 되며, 그 기작으로서 ribosomal stalling이 가장 주요하게 작용하는 것으로 여겨진다. 다음으로는 ribosomal stalling이 일어나지 않도록 종결코돈을 없앤 CIV-1 #2 식물체에서도 GUS 활성이 8.6배가 증가한 결과를 보면 GUS 단백질의 N 말단 부위에 존재하는 SAMDC uORF 단백질이 직접적으로 translation machinery에 작용함으로써 GUS의 translation을 억제하여 활성이 낮아졌을 가능성이 있으며, 그 외에도 GUS 단백질에 SAMDC uORF 결합되어 있는 융합단백질 형태이므로 단백질량에는 변화가 없지만 효소활성이 저하되었을 가능성도 배제할 수 없다.

또한, 종결코돈은 그대로 존재한 상태에서 개시코돈 바로 다음에 오는 염기 G를 제거하고 uORF의 종결코돈 바로 앞에 염기 T를 삽입하여 아미노산의 서열만 바꾸어 준 CV #1 식물체에서도 약 3배로 GUS 활성이 높게 나타났다. 이는 SAMDC uORF의 translation의 개시와 종결에 차이가 없었으므로 ribosomal stalling 등의 물리적 기작을 통하여 GUS의 translation이 크게 억제되었다고 여겨진다. 그러나 SAMDC uORF translation이 개시와 종결에 정상적으로 일어났음에도 불구하고 GUS의 활성이 3배로 증가한 것은 SAMDC uORF의 단백질이 비정상적인 서열로 인해 단백질의 구조가 GUS ORF의 translation을 높여줌으로써, 즉 SAMDC uORF 단백질이 translational inhibitor로서 정상적으로 작용하지 못해 GUS ORF의 translation이 증가한 것으로 여겨진다. 이는 SAMDC uORF의 작용기작으로서 직접적으로 종결코돈에서 이루어질 것으로 예상되는 ribosomal stalling이 주요하게 작용하지만 그 외에도 SAMDC uORF 단백질이 translation machinery에 직접적으로 작용하여 downstream ORF의 translation을 억제했을 가능성을 제시한다.

Point-mutation 된 SAMDC uORF가 in cis 상태에서 조직별 GUS ORF의 translation에 미치는 영향

uORF가 과다발현 되게 도입된 형질전환 담배 식물체에서 GUS 단백질의 활성이 억제될 때 식물체의 발달 정도 및 조직과 기관에 따른 차이점을 분석하기 위하여 조직 화학적 GUS 염색을 실시하였다. 6주 정도 자란 유식물에서 GUS 염색을 실시한 결과 정상적인 uORF가 도입된

CI-1 #3 식물체보다는 uORF가 단백질로 유도되지 않는 CIII #1, CIV-1 #2, CV #1 식물체와 카네이션 SAMDC uORF가 전혀 도입되지 않은 CII (pBI121) 식물체에서 GUS 염색이 진하게 관찰되었다. 특히 식물체 전체 중에서도 잎맥과 줄기, 뿌리, 배축 부분에서 GUS 유전자가 강하게 발현되는 것을 확인하였다. Construct 별 GUS 염색의 정도는 형질전환식물체에서의 GUS 활성 실험의 결과와 유사하게 나타났는데 SAMDC uORF의 개시코돈이 제거된 CIII #1에서 역시 가장 진한 GUS 염색이 나타났으며, 종결코돈이 제거된 CIV-1 #2에서도 비교적 높은 수준으로 GUS가 염색되었다. 또한 CV #1에서는 다른 construct보다 월등하게 낮은 수준으로 GUS가 염색되었다. Figure 2에서 보여주는 downstream GUS 활성 억제 결과와 유사하게 uORF가 단백질로 유도되는 식물체에서는 main ORF인 GUS 발현이 크게 감소하였음을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이로서 실제 GUS 활성과 GUS 염색 정도를 연구한 실험에서 유사한 결과를 얻은 것과 같이 SAMDC uORF가 downstream에 존재하는 GUS ORF의 translation 억제와 함께

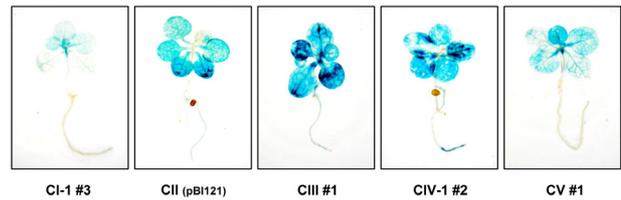


Fig. 3 Comparison of GUS expression in transgenic tobacco plants transformed with different constructs. GUS expression was monitored in 6-week-old seedlings by histochemical staining

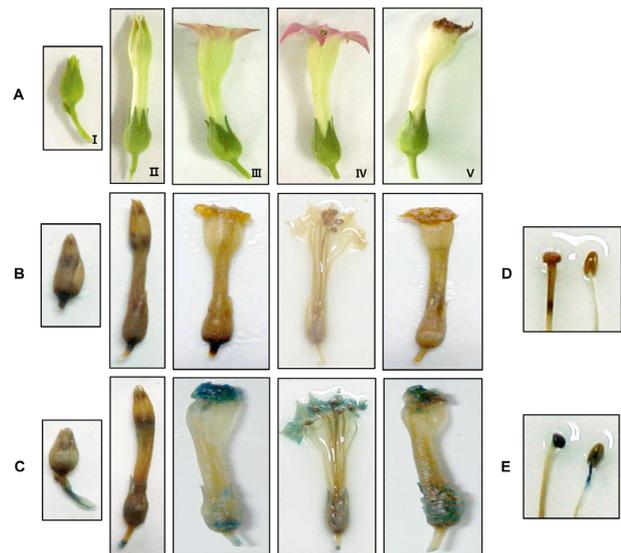


Fig. 4 Histochemical analysis of GUS expression through developmental stages of flowers. (A) Flowers at stage I, II, III, IV and V unstained for the GUS expression pattern. (B) CI-1 #3 tobacco flower. (C) CIII #1 tobacco flower. (D) Anther and stigma of B. (E) Anther and stigma of C

ribosomal machinery와의 interaction이 일어날 것으로 여겨진다.

또한 담배의 생식기관인 꽃에서도 발달 단계에 따라 GUS 발현 패턴을 비교하였다. uORF가 도입된 CI-1 #3 식물체와 uORF가 단백질로 유도되지 않는 식물체 중에서 GUS 활성 및 발현이 가장 높은 CIII #1 식물체의 담배 꽃을 개화와 노화의 발달단계에 따라 5단계로 나눈 후 각 단계마다 GUS 염색을 실시하였다. 발달단계 I은 수술과 암술이 충분히 분화되었지만 꽃잎이 녹색을 띠는 단계이고, II는 화관이 길어지고 꽃잎은 여전히 녹색이지만 약간 열리는 시기이다. III는 화관의 가장자리가 반쯤 열리고 주두와 수술머리가 보이는 단계이며, IV는 꽃이 완전히 열리고, 수술머리가 갈라지며 화분이 밖으로 터져 나오며 화관 가장자리가 충분히 확장되고 짙은 분홍색을 띠는 단계이다. 마지막으로 V는 수술머리의 화분이 다 떨어져 나가고, 꽃잎이 시들기 시작하는 시기이다. I에서 II 단계는 약 90시간이 걸리며, II에서 III 단계는 약 24시간, III에서 IV 단계는 약 20시간, IV에서 V 단계는 약 70시간이 걸렸다.

담배 꽃을 이용하여 GUS 발현 분석을 수행한 결과 유식물 뿐만 아니라 생식기관인 꽃에서도 정상적인 uORF가 도입된 CI-1 #3 식물체보다 uORF가 단백질로 유도되지 않는 CIII #1 식물체에서 GUS 발현이 강하게 확인되었다. 특히 꽃잎, 수술머리, 암술머리의 경우에는 발달단계 IV에서 가장 강하게 발현되었다. 따라서 uORF가 도입된 CI-1 #3 식물체는 유식물 뿐만 아니라 꽃에서도 GUS 발현이 억제되었으므로 식물체의 조직 및 기관에 따른 차이점은 없는 것으로 사료된다.

SAMDC uORF에 의한 downstream ORF의 translation 억제 과정에서 폴리아민의 영향

세포 내 폴리아민의 양이 비정상적인 수준으로 증가하거나 감소하면 식물체의 발달에 영향을 미쳐 주로 성장이 저해되거나 비정상적인 표현형을 나타낸다 (DeScenzo and Minocha 1993; Kumar et al. 1996). 따라서 세포 내 폴리아민의 함량을 일정한 수준으로 유지하도록 폴리아민 생합성 효소의 활성을 피드백 저해로 조절하게 되는데 이러한 과정에서 폴리아민이 보조인자로 작용할 가능성이 있다. 따라서 SAMDC 효소의 최종산물인 폴리아민이 uORF의 작용에 미치는 영향을 알아보기 위해서 pBluescript SK+ vector의 T3 프로모터에 uORF와 GUS 유전자가 재조합된 CI-1 construct를 이용하여 다양한 농도의 폴리아민을 처리하였다. Putrescine, spermidine, spermine을 각각 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 10 mM의 농도로 첨가하고, *in vitro* transcription/translation (TNT) 반응을 실시한 후에 GUS 활성을 측정하였다. 그 결과 거의 모든 농도에서

putrescine과 spermine의 경우에는 GUS 활성에 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 putrescine과 spermine을 각각 합성하는 효소에 의한 작용과 관련된 것으로 여겨진다. 특히 putrescine을 합성하는 효소는 arginine을 agmatine으로 전환시켜 putrescine을 합성하는 arginine decarboxylase (ADC)와 ornithine에서 직접 putrescine을 합성하는 ornithine decarboxylase (ODC)가 있다. 또한 spermidine에서 spermine을 합성하는 spermine synthase (SPDS)가 있다. 이들 효소의 유전자에도 uORF가 있기는 하지만 이들 uORF는 SAMDC uORF와 염기서열이 매우 다르고 서로 영향을 주지 않기 때문에 putrescine과 spermine은 SAMDC uORF가 관여하는 translation과정에는 영향을 주지 않는다고 생각된다. 따라서 SAMDC uORF와 연결된 downstream ORF인 GUS의 transcription/translation에 영향을 주지 않아 GUS 활성에는 변화가 없는 것으로 사료된다. 그러나 spermidine의 경우 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM의 농도에서 GUS 활성이 약 30% 정도 증가하였다. 이는 spermidine의 처리로 세포 내 spermidine의 농도가 일정하게 유지되기 위해 SAMDC mRNA의 transcription과 translation이 억제됨에 따라 SAMDC uORF 단백질의 생성도 억제되었기 때문에 SAMDC uORF 단백질과 interaction하는 ribosomal machinery 등의 작용이 영향을 받아 downstream의 GUS 유전자의 translation 등이 억제되어 GUS 활성이 낮아졌을 가능성을 배제할 수는 없을 것으로 여겨진다. 그러나 1 mM과 10 mM 등의 높은 농도에서는 GUS 활성의 차이는 크게 나타나지 않았다 (Fig. 5).

또한 CI-1 construct와 T3 프로모터에 uORF의 개시코돈을 point mutation시켜 GUS 유전자를 재조합한 CIII construct에 각각의 폴리아민을 1 mM 농도로 첨가하고 ³⁵S 동위원소를 이용하여 *in vitro* TNT 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 최종 산물은 15% SDS-PAGE를 실시하여 자가 방사법으로 이를 분석하였다. 그 결과 CI-1 construct에서 66

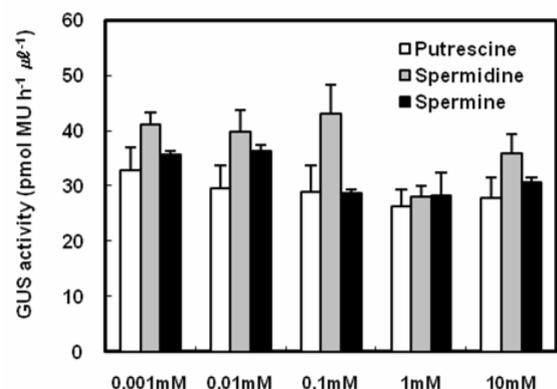


Fig. 5 The analysis of GUS activity after the treatment with polyamine in various concentration by *in vitro* transcription/translation (TNT) system

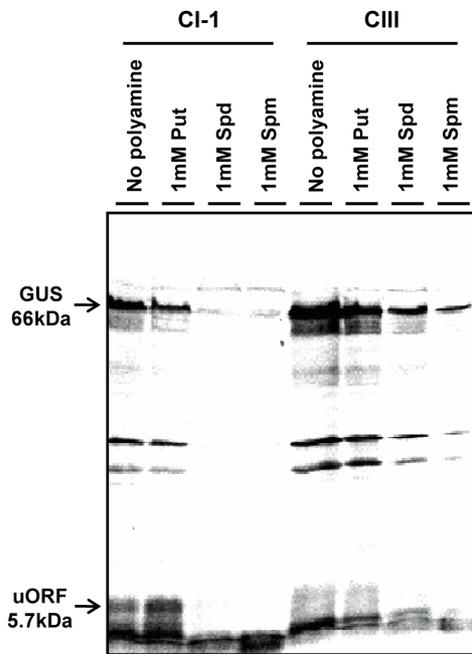


Fig. 6 SDS-PAGE analysis of ^{35}S -methionine labeled polypeptide by *in vitro* transcription/translation products after polyamine treatment. The 66 kDa GUS protein and 5.7 kDa uORF peptide are indicated

kDa의 GUS 단백질과 5.7 kDa의 uORF 단백질이 합성되는 것을 확인하였는데 (Fig. 6), 이는 카네이션 *SAMDC* uORF가 *in vitro* 상에서 실제로 단백질로 합성된다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 카네이션 *SAMDC* uORF가 *in vitro* 상에서 실제로 단백질로 합성된다는 증거이며, 포유동물의 *SAMDC* uORF가 단백질로 합성되는 것을 확인한 결과와 유사했다 (Raney et al. 2000). 그러나 *SAMDC* uORF의 개시코돈이 point-mutation되어 제거된 CIII construct에서는 GUS 단백질 크기의 band가 확인되었으며, 그 단백질 양은 CI-1 construct보다 월등하게 많은 것으로 보아 *SAMDC* uORF의 translational inhibitor로서의 작용이 일어나지 않았음을 의미한다.

특히 1 mM의 폴리아민을 처리하면 spermidine 처리구 뿐만 아니라 putrescine과 spermine의 처리구 모두에서 GUS 활성에 차이가 없었기 때문에 SDS-PAGE를 이용한 단백질 수준에서 uORF와 GUS 단백질의 발현 양상을 확인하고자 하였다. 따라서 각각의 construct에 1 mM의 농도로 putrescine, spermidine, spermine을 처리하여 TNT 반응 후 SDS-PAGE를 수행한 결과를 살펴보면 putrescine을 처리시 CI-1 construct에서 *SAMDC* uORF의 양이 크게 증가하였으며, spermidine과 spermine을 처리한 경우에는 GUS 단백질이 급격하게 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이는 putrescine은 아민기가 2개인 2가 양이온이지만 spermidine은 3가 양이온, spermine은 4가 양이온이기 때문이다. 따라서 spermidine과 spermine의 다가 양이온적 특성으로 tran-

scription이 일어날 *GUS* 유전자나 transcript에 직접적으로 결합할 가능성이 있기에 *in vitro* transcription 혹은 translation 과정에 영향을 미쳐 uORF 및 GUS 단백질이 발현되지 않는 것으로 여겨진다. 또한 기존에 생성된 *SAMDC* uORF 단백질에 결합하여 *in vitro* 상에서 transcription 혹은 translation 단계의 발현 억제 작용이나 *SAMDC* uORF 단백질의 분해를 촉진하여 uORF 단백질이 발현되지 않을 가능성도 있다 (Fig. 6). 또한 small uORF 개시코돈을 point mutation시켜 uORF 단백질이 합성되지 않는 CIII construct에서도 1 mM의 농도로 각각의 폴리아민을 처리했을 때 GUS 단백질이 감소했다. 이러한 결과 역시 폴리아민의 다가양이온적 특성이 영향을 미친 것으로 사료되는데 아마도 transcription이 일어날 *GUS* 유전자나 transcript에 직접적으로 결합하여 *in vitro* 상에서 *GUS*의 transcription 혹은 translation 과정을 억제했기 때문에 GUS 단백질의 양이 감소한 것으로 여겨진다. 따라서 spermidine과 spermine은 식물체 내에서 transcription 단계에서 feed-back 억제 작용에 의해 폴리아민의 세포내 함량을 정확하게 조절하는 것으로 잘 알려져 있지만 (Tiburcio et al. 1997), *in vitro* 상에서 조사된 우리의 연구결과를 보면 오히려 *SAMDC* uORF 유전자가 포함된 *in vitro* construct의 발현을 억제하는 것으로 나타났는데 이러한 억제현상이 실제 식물체 내에서도 일어날 가능성이 있음을 암시한 결과로 여겨진다.

적 요

*SAMDC*는 폴리아민 생합성 과정에서 주효소로 작용하며 항상성을 유지하기 위해 정교하게 조절된다. 카네이션 *SAMDC* 유전자는 5'-leader sequence에 54개 아미노산으로 구성된 small uORF가 존재한다. Translation 과정을 조절하는 uORF의 작용기작을 연구하기 위하여 35S 프로모터에 *SAMDC* 유전자의 uORF 부위와 *GUS* 유전자를 재조합한 형질전환 담배 식물체를 이용하였다. 본 실험에서는 *SAMDC* uORF 염기서열 혹은 *SAMDC* uORF 단백질에 의해서 downstream GUS ORF의 translation이 억제되었다. 특히 translation 억제는 개시코돈이 point-mutation된 construct에서 효과적으로 이루어졌다. 따라서 이러한 결과는 ribosomal stalling이 translation 억제 과정에 관여한 것으로 사료된다. 개시코돈과 종결코돈을 가진 *SAMDC* uORF의 아미노산 서열을 frame shift 시키면 GUS 활성이 증가하였는데 이는 translation inhibitor로서 작용할 때 아미노산 서열이 중요하다 하는 것을 의미하며, 결국은 *SAMDC* uORF의 단백질 구조가 중요하게 작용할 가능성을 제시한다. 또한 유식물과 담배 꽃 등의 *in vivo* 상에서도 GUS 발현을 조직화학적으로 분석했을 때 small uORF가 존재할 경우 GUS 염색이 크게 저하되었지만, 개시코돈이나 혹은 종결코돈이

제거되도록 point-mutation 시킨 construct가 도입된 형질전환식물체에서는 SAMDC uORF의 억제효과가 크게 완화된 것이다. 또한 가장 중요한 관찰 결과로는 small uORF 염기서열로부터 *in vitro* 시스템에서 5.7 kDa의 단백질이 실제적으로 합성되었음을 관찰하였다. 폴리아민 처리 후 GUS 단백질이 억제된 결과는 uORF로부터 합성된 단백질이 폴리아민 뿐 만 아니라 translation 과정에 관여하는 다른 요소들과 상호작용을 이루어 조절될 수 있음을 암시한다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 중견연구자지원사업 (R01-2007-000-11791-0)의 지원을 받아 수행하였다.

인용문헌

- Agostinelli E, Bachrach U (2007) Polyamines and their analogs in cancer and other diseases. *Amino Acids* 33:173
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140:103-125
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Colin H, Marina F, Melinda JM, Crista I, Michael AJ (2002) Abrogation of upstream open reading frame-mediated translational control of a plant *S*-adenosylmethionine decarboxylase results in polyamine disruption and growth perturbations. *J Biol Chem* 277:44131-44139
- DeScenzo RA, Minocha SC (1993) Modulation of cellular polyamines in tobacco by transfer and expression of mouse ornithine decarboxylase cDNA. *Plant Mol Biol* 22:113-127
- Evans PT, Malmberg RL (1989) Do polyamines have roles in plant development? *Annu Rev Plant Mol Biol* 40:235-269
- Franceschetti M, Hanfrey C, Scaramagli S, Torrigiani P, Bagni N, Burtin D, Michael AJ (2001) Characterization of monocot and dicot plant *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylase gene families including identification in the mRNA of a highly conserved pair of upstream overlapping open reading frames. *Biochemical Journal* 353:403-409
- Galston AW, Kaur-Sawhney R, Altabella T, Tiburcio AF (1997) Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Bot Acta* 110:197-207
- Geballe AP, Morris DR (1994) Initiation codons with 5' leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci* 19:159-164
- Geballe AP (1996) Translational control mediated by upstream AUG codons. In: Hershey J, Mathews M, Sonenberg N, (eds), *Translational control*. Cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, pp 173-197
- Hanfrey C, Elliott KA, Franceschetti M, Mayer MJ, Illingworth C, Michael AJ (2005) A dual upstream open reading frame-based autoregulatory circuit controlling polyamine-responsive translation. *J Biol Chem* 280:39229-39237
- Hill JR, Morris DR (1992) Cell-specific translation of *S*-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. *J Biol Chem* 267:21886-21893
- Hinnebusch AG (1990) Involvement of an initiation factor and protein phosphorylation in translational control of *GCN4* mRNA. *Trends Biochem Sci* 15:148-152
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901-3907
- Kakkar RK, Rai VK (1993) Plant polyamines in flowering and fruit ripening. *Phytochemistry* 33:1281-1288
- Kakkar RK, Nagar PK, Ahuja PS, Rai VK (2000) Polyamine and plant morphogenesis. *Biol Plant* 43:1-11
- Kakkar RK, Sawhney VK (2002) Polyamine research in plants—a changing perspective. *Physiol Plant* 116:281-292
- Kumar A, Taylor MA, Mad Arif SA, Davies HV (1996) Potato plants expressing antisense and sense *S*-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant J* 9:147-158
- Law GL, Raney A, Heusner C, Morris DR (2001) Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 280:24-28
- Lee MM, Lee SH, Park KY (1997) Characterization and expression of two members of the *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene family in carnation flower. *Plant Mol Biol* 34:371-382
- Neafsey DE, Galagan JE (2007) Dual modes of natural selection on upstream open reading frames. *Mol Biol Evol* 24:1744-1751
- Nyikó T, Sonkoly B, Mérai Z, Benkovics AH, Silhavy D (2009) Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol* 71:367-378
- Park KY, Lee SH (1994) Effects of ethylene and auxin on polyamine biosynthesis in suspension cultured tobacco cells. *Plant Physiol* 90:382-390
- Raney A, Baron AC, Mize GJ, Law GL, Morris DR (2000) *In vitro* translation of the upstream open reading frame in the mammalian mRNA encoding *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *J Biol Chem* 275:24444-24450
- Raney A, Law GL, Mize GJ, Morris DR (2002) Regulated translation termination at the upstream open reading frame in *S*-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. *J Biol Chem* 277:5988-5994
- Smith TA (1985) Polyamines. *Ann Rev Plant Physiol* 36:117-143
- Tiburcio AF, Altabella T, Borrell A, Masgrau C (1997) Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol Plant* 100:664-674