

옥수수 5-methyltryptophan 저항성 돌연변이주(MR1)의 Anthranilate Synthetase 특성

姜權圭* · 盧一燮** · 李孝淵** · 申東永** · 龜谷壽昭***

Characterization of Anthranilate Synthetase from a 5-methyltryptophan Resistant Mutant(MR1) in Maize

Kwon Kyu Kang* · Ill Sup Nou** · Hyo Yeon Lee** · Dong Young Shin**
and Kameya Toshiaki***

ABSTRACT : 5-methyltryptophan (5MT) resistant mutant plants (MR1) were analyzed for characterization of anthranilate synthetase (AS) and tryptophan synthetase (TS) enzymes. The enzyme was measured in crude extracts from MR1 and control seedlings of Danggin inbred line. There was no significant difference in the level of AS between MR1 and control seedlings when grown on MS medium without 5MT. However, MR1 seedlings grown on MS medium with 25mg /L 5MT showed the level of AS twice higher than that of control seedlings. The activity of AS was inhibited to 50% in untreated plants when 4mg /L L-tryptophan was added to their extracts. Extracts from MR1 plants required about four times higher concentration of amino acid to cause equal inhibition. In the TS assay, the activity observed in MR1 seedlings was four times higher than that of control seedlings. We have also isolated and sequenced the gene which encoding the tryptophan synthetase B subunit (TSB) from maize. The gene encodes polypeptides with high homology to TSB isolated from other plants, and is expressed in all the developmental stages examined. Northern hybridization analysis indicated that the gene expression in MR1 seedlings grown on MS medium showed a higher level than in control seedlings.

Key words : 5MT-resistant mutant, Anthranilate synthetase, Tryptophan synthetase, Gene expression

아미노산 생합성과 관련된 효소활성의 대사 조절은 다수의 식물체에서 보고되었다. anthranilate synthetase는 고등식물, 곰팡이류 및 세균류에 있

어서 tryptophan의 생합성을 위한 aromatic 아미노산 경로로부터 첫번째 반응을 촉매한다¹⁾. 특히 고등식물에 있어서 tryptophan의 생합성 경로는

* 한국원자력연구소(Radiation Genetic Engineering Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejeon 305-606, Korea)

** 순천대학교 농과대학(College of Agriculture, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea)

*** 일본 동북대학 유전생태연구소(Institute of Genetic Ecology, Tohoku University, Sendai, 980, Japan)

〈'94. 10. 7. 接受〉

마지막 산물인 L-tryptophan에 의한 anthranilate synthetase의 feedback inhibition에 의해 조절된다¹⁵⁾. 5-methyltryptophan 저항성을 갖는 담배와 당근의 변이세포주로부터 추출한 anthranilate synthetase의 활성은 정상세포주와 비교하여 L-tryptophan이나 다른 analog 에 의해 억제되지 않았으며 또한, 5MT 저항성 돌연변이주는 대조식물체보다 free tryptophan을 많이 축적하는 것이 보고되었다^{4,13)}.

Brevibacterium Spp.에 있어서 tryptophan 생합성은 다음 두가지 메커니즘에 의하여 조절된다는 것이 알려져 있다. 첫째는 anthranilate synthetase, anthranilate phosphoribosyl transferase 및 tryptophan synthetase에 대하여 tryptophan에 의한 feedback inhibition이고, 둘째는 tryptophan 및 tryptophan enzyme들에 의한 억제작용이다¹¹⁾. tryptophan synthetase는 생합성 경로의 마지막 단계를 촉매하며 tryptophan synthetase A (indole glycerol phosphate to indole)와 tryptophan synthetase B (indole plus serine to tryptophan)의 두가지 기능적 domain을 포함하고 있다.

필자들은 전 논문에서 50mg/L의 5-MT를 처리하여도 저해받지 않는 5MT 저항성 돌연변이주(MR1)를 선발하고, 이들의 종자가 높은 수준의 free tryptophan을 축적하며, 돌연변이주의 저항성은 핵게놈에 존재하는 단일 우성 유전자에 의해 조절된다는 것을 보고하였다⁵⁾.

본 논문에서는 옥수수 MR1과 대조식물조의 유로부터 추출한 추출물에 있어서 anthranilate synthetase (AS)와 tryptophan synthetase (TS)의 활성 및 L-tryptophan에 의한 AS의 feedback inhibition 메커니즘에 대하여 검토하였다.

材料 및 方法

공시재료

EMS처리에 의해 선발된³⁾ 5MT 저항성 식물체(MR1)와 대조식물체로 품종, 당진을 공시하였다. 유묘는 25mg/L의 5-MT가 포함된 MS배지⁸⁾와

5-MT를 포함하지 않은 MS배지에서 성장시켰으며, 14일째의 유묘를 효소 활성 실험과 RNA 발현 실험에 이용하였다.

Feeding 실험

자식에 의해 수확한 MR1과 대조식물체의 종자들을 멸균수에 24시간 침적시킨 후, 다양한 농도의 L-tryptophan을 포함한 MS배지에 치상하였다. 발아 후 14일째의 유묘들을 채취하여 80℃, 48시간 건조시킨 후 건물중을 측정하였다.

효소 활성의 측정을 위한 crude extract의 준비

생체중 20g을 50ml의 냉acetone이 들어 있는 polytron-breeder에 넣은 후, 18,000rpm의 속도로 2분간 분쇄시켰다. 효소 활성 측정을 위한 기본적인 절차는 Widholm¹⁵⁾의 방법에 의해 행하였으나, initial extraction만은 0.1M DTT, 0.1mM disodium EDTA, 10% glycerol, 20mM L-glutamine 및 4mM MgSO₄를 포함한 0.1M Tris-HCl (pH 7.5, 0℃) buffer를 사용하였다.

AS 및 TS의 활성 조사

AS의 효소활성은 Widholm¹⁴⁾의 방법에 따랐으며, Sephadex G-25 column을 통과시키지 않은 2ml의 추출물을 사용하였다. Indole에서 tryptophan으로 전환되는 효소활성도 Widholm¹⁴⁾의 방법에 의해 측정하였다. 단백질정량은 Lowary등⁶⁾의 방법에 따랐다.

RNA 추출, cDNA cloning, Screening 및 Sequencing 분석

전 RNA 및 poly(A⁺) RNA의 추출과 λ gt10을 이용한 cDNA library 작성은 Sano등¹⁰⁾의 방법에 의해 행하였다. 합성된 primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)에 의해 증폭된 옥수수의 TSB cDNA probe로 약 30,000개의 재조합 plaque가 screening되었다. 사용한 forward primer, 5'-CACCGGGCGCTCACAAGA-3' 및 reverse primer, 5'-ACGGTTTGGACATCCT-TATC-3'는 TSB를 encoding하는 유전자에 높게 보존되어 있는 amino acid 배열로부터 합성된 것

이다. Hybridization probe는 ^{32}P -dCTP에 의해 표지되었으며, 조건은 Sano등¹⁰⁾의 방법에 따랐다. 양성 clone들은 pUC118 plasmid Vector에 sub-clone하였으며, DNA염기 배열은 Taq Dye primer cycle sequencing kit(Applied Biosystems, USA)를 이용하여, 자동DNA Sequencer, 373A (Applied Biosystems, USA)에 의해 결정하였다.

mRNA의 추출 및 정제

전 RNA시료는 RNase-free DNase (0.1 Units per microgram of RNA)를 실온에서 15분간 처리한 후, first strand cDNA 합성 직전에 10분간, 90°C에 열처리를 하였다. cDNA 합성은 Takara社 (Japan)의 technical manual에 따라 random hexamer primer를 이용하였다. 합성 반응은 20 μl 의 전량내에 10ng의 poly(A⁺) RNA를 넣었으며, 합성된 cDNA산물은 TE buffer (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7.5)로 3회 희석시켰다. PCR에 의한 TSB유전자 특이적 cDNA 증폭조건은 denature 94°C (1분) annealing 55°C (2분) 및 extension 72°C (4분)의 30회 반복하였으며, 각 반응액은 2%의 agarose gel에 분획하였다. Southern blot분석용 probe는 옥수수의 TSB유전자를 이용하였다.

Northern blot분석

MR1 및 대조식물의 유묘로부터 추출한 30 μg 량의 전 RNA를 변성시켜, 1% formaldehyde-agarose gel에 분획시킨 후 nylon membrane(hybond N⁺, Amersham)에 blotting 시켰다. Northern blot분석은 Sano등¹⁰⁾의 방법에 의해 수행하였다.

結 果

5MT 저항성 돌연변이주의 성장에 관한 L-tryptophan의 효과

L-tryptophan을 포함한 MS배지상에 MR1 및 대조식물의 종자를 치상하여 14일간 성장시킨 후, 건물중 측정을 위해 시료를 준비하였다. MR1 및 대조식물은 공히 tryptophan을 포함한 배지에서 성장

Table 1. Effect of tryptophan supplementation on MR1 and control seedlings of 14 days after germination and growth in MS culture medium

Plants	Tryptophan concentration (mg/L)	Dry weight (mg/plants)	Inhibition percent
MR1	0	900+50	0
	100	798+72	11.7
	250	721+44	19.8
	500	660+47	26.5
	1000	520+24	42.1
Control	0	915+12	0
	100	702+65	23.2
	250	662+45	27.6
	500	469+27	48.7
	1000	325+29	64.4

Table 2. Activity of the anthranilate synthetase in maize seedlings at 14 days after germination

Plants	Total tissue protein. mg/g dry wt.	Anthranilate synthetase n mol/h x mg protein	
		Not 5MT treated	5MT treated
MR1	279.6	3.34±0.5	1.98±0.5
	264.1	3.16±0.5	0.85±0.5

MR1 : 5MT resistant line

시킨 것이 무처리보다 건물중이 낮았다(Table 1). 100mg/L 및 1000mg/L를 포함한 MS배지상에서 성장한 MR1 유묘의 건물중은 무처리에 비교하면 각각 88.7% 및 57.9% 수준이었다. 그러나 같은 조건의 대조식물의 유묘는 76.8%와 35.6% 수준으로 나타났다. 즉 L-tryptophan의 농도를 높여도 MR1의 성장저해율이 대조식물보다 낮은 경향을 보였다.

효소 활성 측정

25mg/L의 5MT 및 5MT를 전혀 포함하지 않은 MS배지상에서 성장시킨 MR1 및 대조식물에 있어서 AS활성을 측정하였다. 5MT가 들어있지 않은 배지상의 MR1 및 대조식물의 AS활성은 각각 3.34±0.5 n mole/h mg protein 및 3.16±0.5 n mole/h mg protein을 나타냈다(Table 2). 그러나, 5MT를 포함시킨 MS배지상의 MR1의 활성

수준은 대조식물보다 약 2배 이상 (1.98 / 0.85) 높게 나타났다.

L-tryptophan을 포함한 MS배지상에서 MR1 및 대조식물의 생육저해 정도를 조사하기 위하여 0.1, 1, 10, 100, 1,000, 10,000mg /L의 처리구에서 성장시킨 결과, 공히 1,000mg /L처리구에서 완전히 생육이 저해되었다(Fig. 1). 50%의 생육저해율을 나타내기 위하여는 MR1에 있어서는 20mg /L L-tryptophan이 필요하였으며, 대조식물에서는 4 mg /L L-tryptophan이 필요하였다.

Table 3은 Indole의 소멸값에 따라 비례적으로 변하는 pyridoxal phosphate량으로써 측정된 TS의 활성결과를 나타낸 것이다. MR1과 대조식물에 있어서 TS의 활성은 각각 156.35 ± 72 n mole / h mg protein 및 40.59 ± 92 n mole / h mg protein을 나타냈다. 즉, 대조식물보다 MR1은 약 4배 정도의 높은 TS값을 나타내어 효소활성이 높아짐에 따라 저항성 정도가 높은 것을 입증하였다.

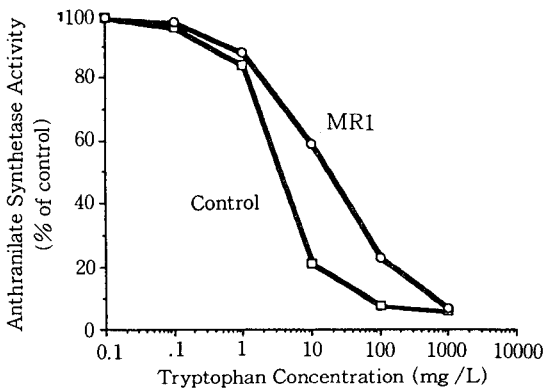


Fig. 1. Feedback inhibition by L-tryptophan of anthranilate synthetase activity in extracts MR1 and control seedling.

Table 3. Activity of tryptophan synthetase in maize seedlings at 14 days after germination

Plants	Total tissue protein mg / g dry wt.	Tryptophan synthetase n mol / h mg protein
MR1	279.6	159.35 ± 72
Control	264.1	40.59 ± 92

MR1 : 5MT resistant line

TSB를 encoding하는 유전자의 아미노산 배열 비교

PCR로 증폭된 단편을 probe를 이용하여 옥수수 잎조직의 cDNA library를 3차에 걸쳐 screening하였다. 양성 plaque를 자동 DNA Sequencer에 의하여 sequencing 한 결과 DNA염기 배열로부터 총 396개의 아미노산배열을 추정할 수 있었다(Fig. 2). *Arabidopsis*의 TSB(A-TSB)유전자와 비교하면 아미노산 수준에서 약 89%의 상동성을 보였으며, 효소로부터의 TSB유전자와는 63%의 상동성을 보였음에도 불구하고, 잎을 제외한 다른 식물기관과는 46~53%의 상동성을 보여 TSB유전자의 분화는 기관분화 이전에 중분화 이상수준의 분화가 일어난 것으로 추측되었다.

TSB 유전자의 발현

대조식물의 기관별, 발육단계별로 전 RNA를 추출하여 first strand cDNA를 합성한 후 이것을 주형 DNA로 이용하였다. TSB 특이적 단편은 forward와 reverse primer를 이용한 PCR법에 의해 증폭되었다. 그 결과 TSB유전자는 옥수수의 모든 기관 (줄기, 수꽃대, 수염, 이삭, 뿌리)에서 발현하였다(Fig. 3). MR1과 대조식물에서 TSB유전자

M-TSB1	QRPOSFGRFG RFGKAVYFET LKRAHLELEN AHVALITDDE FQRRELDQTI	50
A-TSB	QRNSEGRFG RFGKAVYFET LKRAHLELEN AHVALITDDE FQRRELDQTI	50
M-TSB1	KDYVGRSPL YFAERLTEMV RRLDQIDPLI YKREDCMT GAKKINNAV	100
A-TSB	KDYVGRSPL YFAERLTEMV RRLDQIDPLI YKREDCMT GAKKINNAV	100
M-TSB1	QALLAKRLQK RRLTAETGAG QHWATATVC ARFQENITY MOGSDQNER	150
A-TSB	QALLAKRLQK RRLTAETGAG QHWATATVC ARFQENITY MOGSDQNER	150
M-TSB1	QALVFRRLC LGAEVFAHS GTATLADATS PATRQVINY ETTRYLGSV	200
A-TSB	QALVFRRLC LGAEVFAHS GTATLADATS PATRQVINY ETTRYLGSV	200
M-TSB1	AGHPYPMV REFRATGKE TRKQALENG QAPDVLVACV GQGSNAGLF	250
A-TSB	AGHPYPMV REFRATGKE TRKQALENG QAPDVLVACV GQGSNAGLF	250
M-TSB1	HEFVEEDVR LALAEAGFNTDQKHAATL TKQDGVGNG ANSYLLQDD	300
A-TSB	HEFVEEDVR LALAEAGFNTDQKHAATL TKQDGVGNG ANSYLLQDD	300
M-TSB1	QGVIEPHSIS AGLDYPGVP KNSFEKNGR AEYYSITDDE ALEAKRISR	350
A-TSB	QGVIEPHSIS AGLDYPGVP KNSFEKNGR AEYYSITDDE ALEAKRISR	350
M-TSB1	LEGIPALET SHALAYLKL CPTLSQIRV VLSFSGRDK DQPLS	396
A-TSB	LEGIPALET SHALAYLKL CPTLSQIRV VLSFSGRDK DQPLS	396

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequences of the tryptophan synthetases B from *Arabidopsis* and *Maize*.

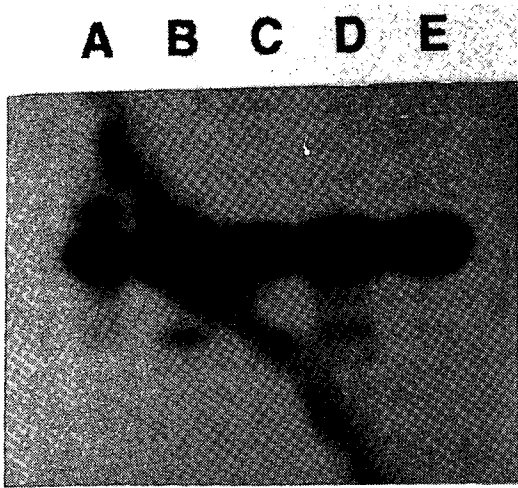


Fig. 3. Detection of TSB-specific RNAs. The DNA products were amplified from $10\mu\text{g}$ of poly (A⁺) RNA, and Southern hybridization was conducted with maize TSB gene probe. A:14 days old seedling shoots, B:14 days old seedling roots, C: Tassel, D: Silk, E: Ear.

의 발현수준을 결정하기 위하여 25mg /L 5MT를 포함한 MS배지상에서 성장시킨 식물체와 5MT를 포함시키지 않은 배지상에서 성장시킨 식물체로부터 각각 전 RNA를 추출하여 Northern blot 분석에 이용하였다. TSB유전자는 지상부(shoot) 보다 뿌리에서 높게 발현하였으며, 5MT를 넣지 않고 생육시킨 식물체보다 5MT를 넣은 식물체에서 낮게 발현하였다(Fig. 4).

考 察

EMS처리에 의하여 얻어진 옥수수의 5MT 저항성 돌연변이에 있어서 free tryptophan 수준은 증가하며, 그 특성은 유전한다³⁾. 많은 tryptophan analog 저항성 돌연변이주에서 선발된 5MT 저항성 세포주는 tryptophan 생합성 효소, anthranilate synthetase의 feedback 조절 때문에 free tryptophan을 많이 축적한다¹⁶⁾. 또한 돌연변이주는 효소의 정상적인 feedback inhibition을 하지 않는 조절영역 때문에 경로상의 마지막 산물을 과

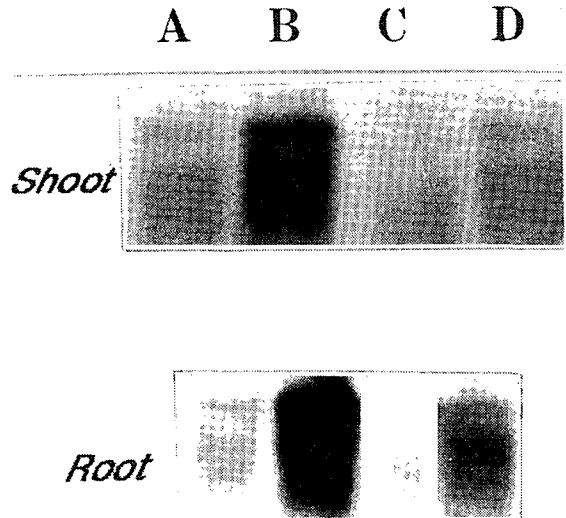


Fig. 4. Northern hybridization analysis of TSB gene in maize. A $30\mu\text{g}$ sample of total RNA was fractionated by 1.2% agarose gel electrophoresis, transferred to nylon membrane, hybridized with radioactivity labelled TSB cDNA probe. A: Control (not treatment), B: MRI(not treatment), C: Control(25mg /L 5MT treatment), D: MRI(25mg /L 5MT treatment).

잉 생산하는 것 같다.

tryptophan 생합성 효소 활성의 측정에 있어서 MR1과 대조식물은 공히 chorismic acid를 anthranilate acid로, indole을 tryptophan으로 전환시킬 수 있다. Table 2의 5MT가 없는 배지에서 자란 유묘에 있어서 저항성주의 anthranilate synthetase 활성은 대조식물의 유묘와 비슷하였다. 그러나, 5MT를 포함한 배지에서 성장시킨 유묘에 있어서는 저항성 돌연변이주의 활성이 대조식물의 유묘보다 2배정도 높았다. Creightan등²⁾은 L-tryptophan의 생합성 경로는 tryptophan에 의한 anthranilate synthetase의 생합성 경로에 의하여 조절된다고 보고하였다. 본 실험에서도 역시 저항성 돌연변이주는 L-tryptophan에 의해 성장 저해율이 낮았고, anthranilate synthetase의 생산도 저해되었다. 이러한 relaxed feedback 조절 때문에 돌연변이주의 free tryptophan량이 4배정도 높은 것으로 추정되었다. 또한 tryptophan synthetase

의 활성이 대조식물보다 MR1이 3.9배 정도 높은 결과는 Kang and Kameya³⁾가 지적한 바와 같이 MR1의 free tryptophan량의 증가 때문인 것이다. Tryptophan의 생합성 관련 유전자를 cloning하기 위하여 옥수수의 TSB유전자의 아미노산 배열을 추정하였다. M-TSB유전자는 *Arabidopsis* ATS-B¹⁾와 높은 상동성을 나타냈는데, 본 연구에 있어서도 5MT를 포함하지 않고 MS배지상에서 생장한 MR1유묘의 anthranilate synthetase 활성은 대조식물의 유묘와 유사하였으며 L-tryptophan에 의한 feedback inhibition에 덜 민감한 결과를 보였다. 또한, MR1은 대조식물에 비교하면 tryptophan synthetase 활성도 높았고, TSB유전자의 발현도 높았다. 즉, 대조식물에 비교하면 5MT 저항성 돌연변이주는 tryptophan 전구체로써의 IAA 생합성뿐만 아니라, 전구체로써 tryptophan이 관여하는 다른 화학물질의 생합성을 위한 alternative 메커니즘을 왕성히 돕는 것으로 추측된다.

摘 要

옥수수의 5-methyltryptophan 저항성 돌연변이주(MR1)로부터 anthranilate synthetase(AS)와 tryptophan synthetase(TS)의 특성을 분석하였다. 대조구 식물로써 사용한 옥수수 품종 당진의 순계와 저항성주에 있어서 AS와 TS의 효소 활성은 5-MT를 포함하지 않은 MS기본배지에서 생장시켰을 때는 차이를 보이지 않았다. 그러나, 25mg/L의 5-MT를 포함한 MS배지에서 생장한 MR1에 있어서 AS의 활성은 대조구보다 2배 높았다. 또한, 4mg/L의 L-tryptophan을 처리 했을때의 AS의 활성은 50% 저해 되었다. MR1의 조추출물로부터 대조구와 동일한 활성저해율을 나타내기 위해서는 약 4배의 아미노산이 필요하였다. MR1의 TS활성은 대조 식물보다 4배가 더 높았다. 그리하여 tryptophan synthetase B subunit (TSB)를 encoding하는 유전자를 cloning하여 염기배열을 결정하였다.

TSB유전자는 상이한 기관으로부터 cloning된 TSB와 높은 상동성을 보였으며, 모든 발육단계에

서 발현하였다. Northern hybridization 분석에서 MR1의 TSB발현량은 대조식물보다 높게 나타났다.

引用文獻

1. Berlyn, M. B., Last, R. L., and Fink, G. (1989). A gene encoding the tryptophan synthetase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4604-4608.
2. Creighton, T. E. and Yanofsky, C. (1970). Chorismate to tryptophan(E. coli) Anthranilate synthetase, PR transferase, PRA isomerase, InGP synthetase, and tryptophan synthetase. Methods in Enzymology(Colowick, S. P. and N. O. Kaplan, ed.) 17:365-380.
3. Kang, K. K. and Kameya, T. (1993). Selection and characterization of a 5-methyltryptophan resistant mutant in *Zea mays* L. Euphytica(in press).
4. Lee, H. Y. and Kameya, T. (1989) Utilization of resistant cell lines to 5-methyltryptophan for cell fusion in rice. Japan J. Breed. 39:319-325.
5. Lee, H. Y. and Kameya, T. (1991) Selection and characterization of a rice mutant resistant to 5-methyltryptophan. Theor. Appl. Genet. 82:405-408.
6. Lowary, O. H., Rosenbrough, N. L., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275
7. Maniatis, T., Fritsch, E. T., and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory. Cold spring Harbor N Y.
8. Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-

- assay for tobacco tissue cultures. *Phy-
siologia Planetarium* 15, 473-97.
9. Nagao, R. T. and Moore, T. C. (1972). Partial purification and properties of tryptophan synthetase of pea plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 149:402-413.
 10. Sano, H. and Youssefian, S. (1991) A novel *ras*-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine induced dwarf rice. *Mol. Gen. Genet.* 228:227-232.
 11. Shio, I., Miyajima, R., and Nakagawa, M. (1972). Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. I. Regulation of anthranilate synthetase. *J. Biochem. (Tokyo)* 72:1447-1455.
 12. Singh, M. and Widholm, J. M. (1974). Measurement of the five enzymes which convert chorismate to tryptophan in wheat plants (*Triticum aestivum* L. var. Kal-yansona) *Physiol. Plant.* 32:240-246.
 13. Sugimoto, S. and shio, I. (1982). Tryptophan synthetase and production of L-tryptophan in regulatory mutants. *Agric. Biol. Chem.* 46:2711-2718.
 14. Widholm, J. M. (1972a). Anthranilate synthetase from 5-methyltryptophan-susceptible and resistant cultured *Daucus carota* cells. *Biochem. Biophys. Acta* 279:48-57.
 15. Widholm, J. M. (1972b). Cultured *Nicotiana tabacum* cells with an altered anthranilate synthetase which is less sensitive to feedback inhibition. *Biochem. Biophys. Acta* 261:52-58.
 16. Widholm, J. M. (1974). Control of aromatic amino acid biosynthesis in cultured plant tissues: Effect of intermediates and aromatic amino acids on free levels. *Physiol. Plant.* 30:13-18.