

반복배열된 토마토 phenylalanine ammonia-lyase(PAL X1, PAL X2) 유전자의 구조해석

여윤수* · 이신우

농업과학기술원 생물자원부, 수원시 권선구 서둔동 441-707

초 록 : 토마토의 genome 내에는 적어도 5개 이상의 PAL 유전자 좌가 존재한다는 사실을 이 등(1992)이 이미 genomic Southern blot hybridization으로 확인하여 보고하였다. 그러나 본 연구에서 제작한 genomic DNA libraries를 대상으로 검색한 결과 기존에 보고된 PAL 유전자 이외에 약 15 kb 와 10 kb에 해당하는 큰 EcoRI 단편을 확보할 수 있었다. 이들 단편을 BamHI, HindIII 등 9종의 제한효소를 사용하여 Southern blot hybridization을 행한 결과 PAL X1의 경우는 모든 효소에 대하여 2개의 단편이 hybridization 되었으며, 특히 BamHI으로 절단하여 얻은 3개의 단편중 두 개는 PAL5 유전자의 exon 2 부위에서 취한 oligomer(18 mer)와 primer extension 반응이 진행되어서 약 200 bp의 PAL 유전자와 아주 높은 상동성을 갖는 염기서열이 확인되었다. 따라서 PAL X1 유전자는 2 copy의 유전자가 나란히 존재하거나 아니면 염색체 재배열이 진행된 것으로 추정된다. 이러한 결과는 적어도 7개 이상의 PAL 유전자 좌가 토마토 염색체 내에 존재하는 것으로 사료된다.(1998년 11월 27일 접수, 1999년 2월 2일 수리)

서 론

PAL은 식물의 방어유전자중에서 가장먼저 확인된 유전자로서 전사단계에서 상처, 병원균의 침입 등에 의하여 발현이 조절됨이 확인된 바 있다.¹⁰ PAL 유전자는 많은 종류의 식물체로부터 분리되어서 염기서열분석이 행하여졌으며, 대부분이 2~6개로 이루어진 작은 gene family로 구성하고 있다는 사실이 bean,^{3,6} alfalfa,⁷ tomato,¹¹ parsley,¹³ rice,^{14,15} Arabidopsis,^{16,21} poplar,¹⁸ sweet potato¹⁹ 등의 식물에서 보고되었다. 특히 최근, potato 인 경우 40종류이상의 PAL 유전자가 존재한다는 보고가 있었으며⁹ 소나무의 경우는 단지 한 종류만이 존재한다고 알려졌다.²² PAL 효소가 첫단계의 반응을 촉매 하여 진행되는 phenylpropanoid metabolism은 각종 branch pathway를 거쳐서 최종산물로 lignin, suberin, flavonoid 화합물 등 다양한 종류의 phenolic compound를 합성한다. 이러한 화합물은 실제로 식물의 빛 조사, 상처, 병원균 침입시 등 외부환경스트레스에 그 양이 증가한다고 알려져 있다.^{1,4,8} 특히, Edward 등⁹은 최초로 PAL 유전자를 분리한 후 식물체에 외부환경자극을 가하면 PAL mRNA 양이 급격히 증가한다고 하였다. 그 후 여러 식물체로부터 분리된 PAL 유전자들은 각종 스트레스 뿐만 아니라 식물의 조직부위별, 혹은 성장시기별로 개개의 발현 양상이 서로 다르다는 사실이 이미 parsley,¹³ Arabidopsis thaliana,^{16,21} potato,⁹ bean,¹² alfalfa,⁷ poplar¹⁸ 등의 식물체를 대상으로 한 연구에서 밝혀진 바 있다.

토마토의 경우 곰팡이인 시들음병원균(*Verticillium albo-atrum*)이 침입할 경우 저항성을 나타내는 토마토 품종의 PAL 유전자에 대한 반응을 조사하고자 PAL 유전자를 분리

하는 과정에서 5가지의 PAL 유전자가 존재한다고 보고한 바 있다.¹¹ 그러나 본 연구에서 여러 종류의 genomic DNA library를 대상으로 검색하는 과정에서 기존의 보고된 것과는 전혀 다른 구조를 갖고 있으며 아직 밝혀지지 않은 새로운 종류의 PAL 유전자가 인접한 상태로 2회 반복배열 되어 존재하고 있을 것이라는 가능성을 확인하여 그 구조를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

Nuclear DNA의 분리

토마토(*Lycopersicon esculentum* var Bony Best) 식물체로부터의 핵 DNA는 Vallejos 등²⁰이 기술한 방법을 다음과 같이 수정하여 이용하였다. 4주 정도 자란 토마토잎(10~20 g)을 omnimixer homogenizer(Sorvall Inc., Newton, Conn.)에 넣고 적당량의 homogenization buffer[100 mM 2-(N-M-morpholino) ethane-sulfonic acid, pH 5.5, 2.5 mM DTT, 2.5 mM EDTA, 10 mM KCl, 0.25 M sucrose]와 함께 20~30초간 마쇄하고 miracloth (Calbiochem Co., Sandiego, CA.)로 여과하여 triton X-100용액을 최종농도가 1% 되도록 첨가하여 핵막을 분해시켰다. 이를 200×g에서 15분간 원심분리 한 후 얻은 침전물을 다시 homogenization buffer에 현탁시킨 후 lysis buffer(0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 2 M NaCl, 2% SDS)를 동량 가하여 65°C에서 20분간 방치한 후 핵 DNA를 분리 정제하였다.

유전자 은행제작 및 PAL 유전자의 cloning

PAL 유전자를 분리하기 위하여 genomic DNA library를

찾는말 : PAL 유전자, 유전자 좌, 반복배열, 토마토

*연락처

먼저 제작하였다. Vector로는 λ charon 3A, 4A, 30A 등 3종류를 사용하여 각각의 특징²³⁾에 맞게 제작하였다. 정제한 토마토 DNA를 λ charon 3A와 4A vector에 ligation하기 위하여서 *EcoRI* 제한효소, 그리고 λ charon 30A vector를 위하여서는 *HindIII* 제한효소를 각각 사용하였다. 특히 λ charon 4A vector를 위하여서는 보다 큰 단편을 얻기 위하여 불완전하게 절단하여 큰 단편을 얻도록 하였다. 또한 positive 단편은 pTZ 19U plasmid의 *EcoRI* site에 cloning하여 southern hybridization하였다.

Southern blot hybridization

제한효소로 절단한 genomic DNA를 electroblothing 방법²⁾으로 nylon membrane(Zeta Bind from Cuno Inc. Meriden, Conn.)에 transfer 한 다음 membrane을 prehybridization 용액(50% formamide, 0.9 M NaCl, 1% SDS, 50 mM sodium phosphate, pH7.7, 5 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin, 0.1% Ficoll 400, 0.1% polyvinylpyrrolidone 400)과 섞은 후 37°C에서 4~5시간 방치하였다. Hybridization은 prehybridization 용액에 probe를 넣은 후 37°C에서 16시간 동안 행하였다. Probe는 이미 분리하여 염기서열이 밝혀진 PAL5 유전자¹¹⁾에 있는 첫 번째 exon부위의 primer A(5'-ATGGCATCATCAATCGTA-3')와 P5/2(5'-TCCATTACCC-AATCACT-3')를 사용하여 PCR로 증폭하고(probe1:300 bp) 두 번째 exon을 *EcoRI*로 절단한 probe2(580 bp)단편을 사용하여(Fig. 1 참조) nick translation방법²¹⁾으로 제작하여 사용하였다.

결과 및 고찰

현재까지 알려진 토마토의 PAL 유전자는 5종으로서 이미 genomic 제한효소 지도작성 및 일부 단편들의 염기서열분석이 알려져 있다.^{11,24)} 그러나 약 60여개의 positive한 PAL 유전자 clone을 3종류의 genomic DNA library로부터 얻어서 조사하여 본 결과 알려지지 않은 약 10.0 kb 이상의 *EcoRI* 단편이 삽입된 2개의 clone을 확인하였다(Table 1). 이들 단편은 Lee 등¹¹⁾이 *EcoRI* 효소로 절단하여 얻은 genomic Southern blot hybridization 결과에서 언급되지 않았으며 clone 들도 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서 새로이 검색된 이들 큰 유전자 단편을 PAL X1과 PAL X2로 명명하고 구조 및 특성을 연구하고자 몇 가지 분석을 행하였다.

Lee 등¹¹⁾이 분리한 PAL5 유전자의 2번째 exon의 중간부

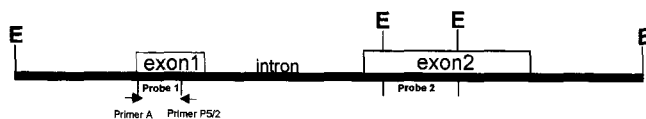


Fig. 1. The location of probes in tomato PAL5 gene used for analysis of PAL X1 and PAL X2 gene fragment. -Primer A: 5'-ATGGCATCATCAATCGTA-3'. -Primer P5/2: 5'-TCCATTACCC-AATCACT-3'.

위에 해당하는 *EcoRI* 단편(probe2:580 bp)을 사용하여 genomic Southern blot hybridization을 시행한 결과 Lee 등¹¹⁾이 보고한 PAL1에서 PAL5 유전자까지 5종류 이 외에 이들 보다 훨씬 크기가 큰 2개의 단편이 hybridization 됨을 확인하였다(Fig. 2). 이때 사용한 genomic DNA는 토마토의 잎으로부터 분리하여 *EcoRI* 제한효소로 절단한 것이다. Hybridization결과를 보면 기대한 것과 같이 제일 작은 단편은 PAL5 유전자의 *EcoRI* 단편인 probe 그 자체로서 가장 강하게 나타났다. 반면에 PAL2와 PAL4유전자는 PAL1과 PAL3에 비하여 비교적 약한 band를 나타내었다. 이러한 결과는 아마도 copy number의 차이 혹은 sequence homology의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

본 연구에서 특이하게 확인한 PAL X1과 PAL X2를 포함하면 토마토의 경우 PAL 유전자는 최소한 7종류 이상의 member를 가진 gene family를 이루고 있다고 볼 수 있으며 Table 1에서와 같이 요약할 수 있었다. 현재까지 clone된 단편들을 Table 1에서 크기순으로 명명하였을 때 PAL1, 2, 3, 4, 5, X1, X2이었으며 이중 PAL5의 full sequence는 이미 Lee 등¹¹⁾이 보고하였으며, PAL1과 PAL4의 전체염기서열도

Table 1. Summary of cloned PAL gene fragments from tomato (*Lycopersicon esculentum*)

Name	5'-upstream, exon1 intron	exon2, 3'-un- translation
PAL 1	4.6 Kb	3.7 Kb
PAL 2	-	2.0 Kb
PAL 3	6.0 Kb	1.4 Kb
PAL 4	5.5 Kb	0.96 Kb+4.0 Kb
PAL 5	8.0 Kb	0.58 Kb+8.0 Kb
X1	> 15.0 Kb	> 15.0Kb
X2	> 9.0 Kb	-

*Each fragment was generated by *EcoRI* restriction endonuclease digestion.

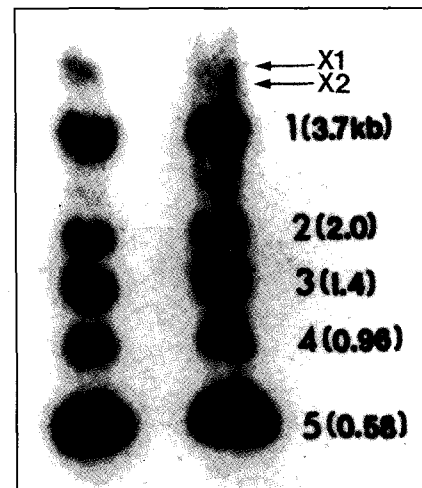


Fig. 2. Genomic Southern blot hybridization of tomato PAL genes. Genomic DNA was digested with *EcoRI*, fractionated on a 0.8% agarose gel, electroblotted onto a nylon membrane and hybridized with the labeled 580 bp *EcoRI* fragment encoding the carboxyl end of a tomato PAL enzyme (PAL5 gene fragment). The size of each fragment (in brackets) was determined using known size markers..

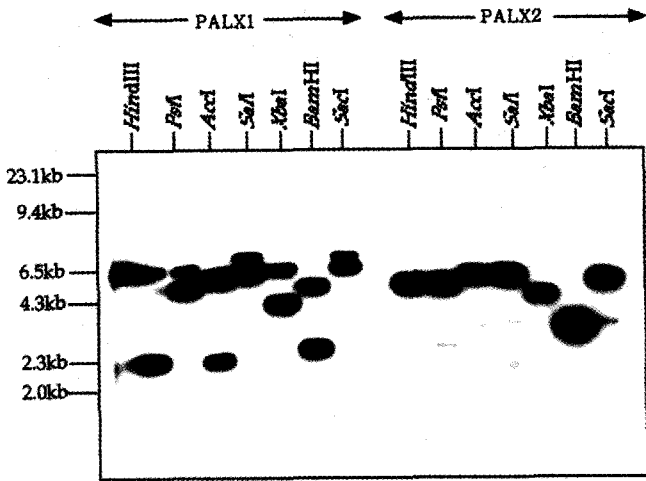


Fig. 3. Southern blot hybridization of PAL X1 and PAL X2 clones. Bacteriophage DNAs containing PAL X1 and PAL X2 genomic clones digested with *EcoRI*, fractionated on a 0.8% agarose gel and hybridized with the labeled 300 bp fragment (probe1 in Fig. 1) which is the exon1 region of PAL5 gene.

보고된바 있다.²⁴⁾ PAL 2는 아직 exon 2 부위만을 포함하는 단편을 확보하였으며, PAL3는 full length clone을 확보하였으나 염기서열 분석은 아직 진행 중에 있다. 본 연구에서 확인한 PAL X1 clone과 PAL X2 clone은 λ charon4A vector로 작성한 genomic DNA library로부터 clone된 것이다. PAL X1과 PAL X2 clone의 *EcoRI* 단편을 pTZ 19U plasmid에 subclone하여 제한효소로 처리하여 정확한 크기를 확인한 결과 약 15 kb와 10 kb에 해당하는 *EcoRI* 단편이었다.

이들 단편을 pTZ19U plasmid의 multicloning site에 존재하는 제한효소로 절단한 후 PAL5유전자의 exon1에 해당하는 단편을(Fig. 1) 사용하여 southern blot hybridization한 결과 PAL X1의 경우 모든 사용한 제한 효소 즉 *HindIII*, *PstI*, *AccI*, *SmaI*, *XbaI*, *BamHI*, *SacI* 등 7종류에 대하여 2개의 크기가 서로 다른 hybridization band를 확인 할 수 있었으나, PAL X2의 경우는 하나의 band만이 모든제한효소에 대하여 확인되었다(Fig. 3). 그러나 PAL5유전자의 exon 2의 중간부위에서 *EcoRI* 제한효소로 얻은 580 bp에 해당하는 단편(Fig. 4)을 probe로 하여서 똑같은 hybridization 실험을 행한 결과 exon 1에서 분리한 단편을 probe로 사용한 경우와는 반대로 나타났다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 PAL X1의 경우는 모든 사용한 제한효소로 절단한 경우 단지하나의 단편만이 hybridization 되었으나 PAL X2의 경우는 2개의 단편이 hybridization 됨을 알 수 있었다. 이러한 결과를 종합하여 보면 PAL X1, X2 단편 모두 2 copy 이상의 단편이 서로 반복되어 연결되어 있으면서 PAL X1의 경우는 아마도 한 copy의 exon 2 부위를 잃어버린 단편이 clone되었으며, 반대로 PAL X2의 경우는 exon 1부위를 잃어버린 경우로 사료된다.

따라서 이러한 추측을 보다 확실하게 증명하기 위하여 PAL X1 단편을 *HindIII*과 *EcoRI*을 동시에 처리한 것과, *BamHI*만을 처리한 후 다시 subclone 하여 얻은 단편을 조사하여 본 결과 1.5 kb에 해당하는 단편이 *HindIII/EcoRI*을

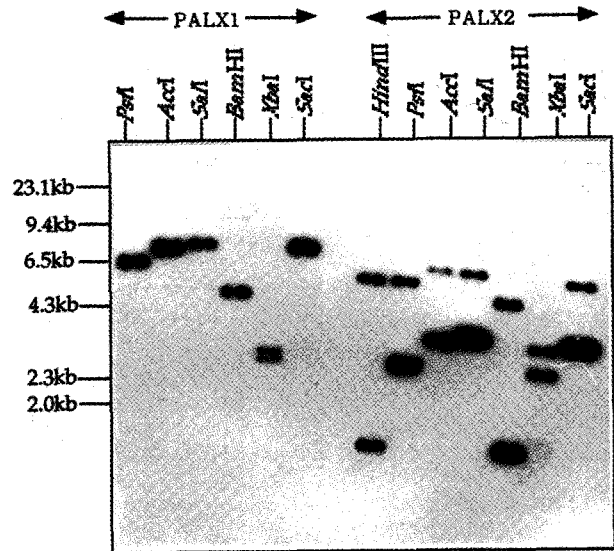


Fig. 4. Southern blot hybridization of PAL X1 and PAL X2 clones. Bacteriophage DNAs containing PAL X1 and PAL X2 genomic clones were treated as described in Fig. 3 and hybridized with the labeled 580 bp fragment (probe2 in Fig. 1) which is the exon2 region of PAL5 gene.

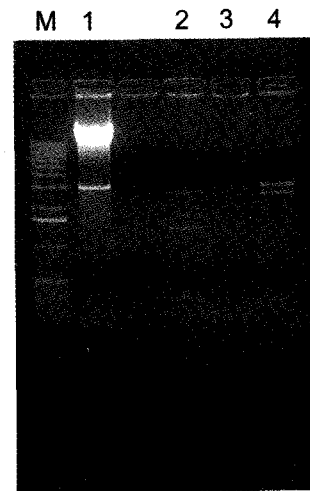


Fig. 5. Subcloning of PAL X1 fragment (16.0 kb). *EcoRI* fragment (16.0 kb) of PAL X1 clone was digested with several restriction endonucleases and subcloned into a new plasmid vector (pTZ19U). Lane M, 1 kb ladder; PAL X1 digested with *EcoRI*; lane2, A subcloned DNA digested with *HindIII/EcoRI*; lane3 and 4, A subcloned DNA digested with *BamHI*.

처리하여 얻을 수 있었으며 *BamHI*으로 절단한 경우는 3개의 단편 즉 6.0, 3.0, 2.4 kb에 해당하는 단편을 얻을 수 있었다(Fig. 5). *BamHI*으로 절단된 단편의 clone에 대하여 염기서열 분석을 행하고자 primer는 PAL5 유전자의 첫 번째 exon부위의 중간에서 에서 취한 18 mer oligomer를 사용하여 primer extension반응을 진행한 결과 6.0 kb 단편이 삽입된 clone과 3.0, 2.4 kb 단편이 동시에 삽입된 clone에서 동시에 primer extension이 일어나서 약 200 bp의 염기서열을 확인 할 수 있었으며 특히 서로간에 단지 몇 개의 염기서열이 차이를 나타내는 PAL 유전자에 해당하는 단편이었다. 아

직 전체 단편의 염기서열 결과를 제시할 수는 없지만 현재까지의 결과를 종합하여 보면 PAL X1과 PAL X2 clone은 적어도 2 copy의 서로 다른 PAL 유전자가 토마토 chromosome 내에 반복배열 되어있는 것으로 사료된다.

참고문헌

- Baker, C. J., O'Neill, N. R. and Tomerlin, J. R. (1989) Accumulation of phenolic compounds in incompatible clone/race interactions of *Medicago sativa* and *Colletotrichum trifolii*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* **35**, 231-241.
- Bittner, M., Kupferer and Morris, C. F. (1980) Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* **102**, 459-471.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J. and Schuch, W. W. (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol.* **12**, 367-383.
- Dalkin, K., Edwards, R., Edington, B. and Dixon, R. A. (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **92**, 440-446.
- Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Schuch, W. and Lamb, C. J. (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 6731-6735.
- Frank, R. L. and Vodkin, L. O. (1991) Sequence and structure of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Glycine max*. *J. DNA Sequencing Mapping* **1**, 335-346.
- Gowri, G., Paiva, N. L. and Dixon, R. A. (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa*). 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.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **40**, 347-369.
- Joos, H. J. and 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.
- Kuhn, D. N., Chappell, J., Boudet, A. and Hahlbrock, K. (1984) Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1102-1106.
- Lee, S. W., Robb, J. and Nazar, R. N. (1992) Truncated phenylalanine ammonia-lyase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Biol. Chem.* **267**, 11824-11830.
- Liang, X., Dron, M., Schmid, J., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1989) Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase- β -glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 9284-9288.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. and Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, rdgulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.* **8**, 1641-1648.
- Minami, E., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N. and Tanaka, Y. (1989) Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase of rice plants. *Eur. J. Biochem.* **185**, 19-25.
- Minami, E. and Tanaka, Y. (1993) Nucleotide sequence of the gene for phenylalanine ammonia-lyase of rice and its deduced amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Acta* **1171**, 321-322.
- Ohl, S., Hedrick, S. A., Chory, J. and Lamb, C. J. (1990) Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**, 837-848.
- Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977) Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
- Subramaniam, R., Reinold, S., Molitor, E. K. and Douglas, C. J. (1993) Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* \times *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase gene. *Plant Physiol.* **102**, 71-83.
- Tanaka, Y., Matsuoka, M., Yamanoto, N., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y. and Oseki, Y. (1989) Structure and characterization of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. *Plant Physiol.* **90**, 1403-1407.
- Vallejos, S. D., Tanksley, S. D. and Bernatzky, R. (1986) Localization in the tomato genome of DNArestriction fragments containing sequences homologous to the rRNA (45s), the major chlorophyll a/b binding polypeptide and the ribulose biphosphate carboxylase genes. *Genetics* **112**, 93-105.
- Wanner, L. A., Li, G., Ware, D., Somssich, I. E. and Davis, K. R. (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 327-338.
- Whetten, R. W. and Sederoff, R. R. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine: purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol.* **98**, 380-396.
- Williams, B. and Blattner, F. (1979) Construction and characterization of the hybrid bacteriophage lambda charon vectors for DNAcloning. *J. Virol.* **29**(2), 555-575.
- Yeo, Y. S. (1997) Organization and expression of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase in tomato. Ph. D Thesis, Univ. of Chungnam, Korea.

Structural Analysis of Repeated Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene (PAL X1, PAL X2)

Yun-Soo Yeo* and Shin-Woo Lee(National Agricultural Sciences and Technology Institute, Department of Bioresources, SuWeon, 441-707, Korea)

Abstract : We observed the structure of phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL) which is one of the best studied plant defense-related genes responding to pathogen infection by producing suberin, lignin, and phytoalexins. In tomato, at least 5 different genetic loci have been identified by genomic southern blot hybridization and nucleotide sequence analyses of partially cloned gene fragments (Lee *et al.* 1992). However, our results suggest that two other isoforms designated as PAL X1 and PAL X2 are located on the chromosome in tomato plant. Furthermore, the preliminary results obtained from southern blot hybridization analyses of subcloned fragment digested with several restriction endonuclease indicated that PAL X1 and PAL X2 clones contain at least two copies of PAL gene and partial nucleotide sequence analyses of each subcloned fragment with the same primer taken from known nucleotide sequence of PAL5 gene indicated that they are located side by side on the same chromosome.

Key words : phenylalanine ammonia-lyase gene, genetic loci, repeated structure, tomato.

*Corresponding author