

쇠무릎 (*Achyranthes japonica* Nakai)으로부터 Ecdysteroid 생합성에 관련된 유전자의 분리

부경환 · 김소미¹ · 진성범 · 채현병 · 이도승 · 김대운 · 조문제² · 류기중*

제주대학교 원예생명과학부, ¹아열대원예산업연구센터, ²의과대학

(2001년 8월 13일 접수, 2001년 8월 18일 수리)

Ecdysteroid 생합성에 관련된 식물 유전자를 분리할 목적으로 ecdysteroid 생성능이 확인된 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)으로부터 RNA를 분리하고, ecdysteroid 생합성에 관여한다고 알려진 cytochrome P450 family 유전자 4개와 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 유전자의 다중정렬 분석결과를 토대로 상동성이 높은 부위의 염기서열에 상응하는 degenerate primer를 사용하여 RT-PCR을 행하고, 고유한 염기서열을 가진 partial cDNA clone 14개를 선별했다. 기존에 ecdysteroid 생합성에 관여한다고 알려진 cytochrome P450 family 유전자들과의 염기 및 아미노산 서열의 상동성을 분석한 결과, 선별된 cDNA 중 6개가 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이 중에서 4개의 clone은 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 유전자와도 상동성이 높아 ecdysteroid 생합성에 관련된 유전자로 추정되었다.

Key words : ecdysteroid, 유전자, 쇠무릎, RT-PCR, cytochrome P450

서 론

곤충 호르몬의 하나인 ecdysteroid는 곤충의 탈피를 촉진하는 활성을 가지고 있어서 곤충탈피호르몬으로 불리고 있다. 이러한 곤충호르몬은 보통 매우 낮은 농도에서 작용하는데 만약 과량의 호르몬에 노출되면 곤충은 생리대사가 교란되어 기형이 되거나 죽게 되므로 해충방제에 이용될 수 있다. 곤충호르몬 중에서도 탈피호르몬인 ecdysteroid는 처음에 곤충에서 분리 동정되었지만,¹⁾ 식물에서도 합성될 뿐만 아니라 식물체 중에 함유되어 있는 수준이 곤충에서 보다 훨씬 높아 이들 phytoecdysteroid를 합성하는 식물을 재료로 사용하면 곤충 호르몬 생합성 관련 유전자의 분리가 가능하며, 이를 작물에 도입한다면 매우 광범위한 해충에 대해 저항성을 나타내는 품종을 만들 수 있을 것으로 기대된다.

곤충에서 ecdysteroid는 cholesterol이 산화, 환원과정을 반복하면서 수산화되어 생성된 여러 가지 중간체를 거쳐 최종적으로 ecdysone과 20-hydroxyecdysone이 생합성된다.²⁾ 식물에서도 mevalonic acid로부터 squalene을 거쳐 만들어진 cholesterol이 곤충과 유사한 과정으로 수산화되어 ecdysone과 20-hydroxyecdysone등이 생합성되는 것으로 추정되고 있으나 중간체들은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. Ecdysteroid의 생합성에는 cytochrome P450 family에 속하는 효소들이 관여하는 것으로 알려져 있는데 이 계열의 효소들은 곤충(*Manduca sexta*)에서 ecdysteroid 생합성과정 중 cholesterol의 7,8-dehydrogenation에 관여하는 것으로 밝혀져 있고, cholesterol의 마지막 수산화 과정인 C-25, -22, -2 위치의 수산화에도 관여하는 것으로 알려져

있다.^{2,8)} 또한 곤충의 ecdysteroid 생합성과정 중 ecdysone이 20-hydroxyecdysone(β -ecdysone 또는 ecdysterone으로 불리기도 함)으로 수산화되는 단계에 관여하는 ecdysone 20-mono-oxygenase도 cytochrome P450으로 보고되어 있다. 식물(*Spinacia oleracea*)에서도 ecdysone 20-mono-oxygenase가 cytochrome P450임이 밝혀져 있다.³⁾

Ecdysteroid의 생합성에 관여하는 유전자는 근래까지 분리되지 못하였으나 1999년 곤충(*Locusta migratoria*)에서 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 cytochrome P450 family 유전자(542개의 아미노산 서열)가 처음으로 클로닝되었고,⁴⁾ 식물(spinach)에서는 1998년 ecdysteroid의 생합성에 관여하는 것으로 추정되는 cytochrome P450 family의 부분 유전자(65개의 아미노산서열)가 클로닝되었다. 최근에는 cytochrome P450 family 유전자들이 많이 알려졌기 때문에 이들의 염기서열을 토대로 PCR 기법을 이용하는 효율적인 방법이 이용되고 있다.⁶⁾ 특히 degenerate primer를 이용한 RT-PCR 방법이 많이 사용되고 있는데, 이 방법은 소량의 mRNA 수준에서 클로닝이 가능하며, 연구되어지지 않은 새로운 유전자의 클로닝에도 이용될 수 있고, 클로닝된 유전자의 발현도 쉬워서 시간을 절약할 수 있다는 장점이 있다. 또한 cytochrome P450 family 유전자들의 heme-binding domain이 consensus region으로 알려져 있어서 새로운 cytochrome P450 유전자 클로닝에 이 domain을 이용한 degenerate primer들이 많이 이용되고 있다.⁷⁾

본 실험은 ecdysteroid를 생합성하는 것으로 알려진 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai)으로부터 ecdysteroid 생합성에 관련된 식물 유전자를 선별하고자 ecdysteroid 생합성 관련 유전자 및 cytochrome P450 family 유전자들의 상동부위를 이용하여 설계한 degenerate primer를 사용하여 RT-PCR 방법을 시도하였다.

*연락처

Phone: 82-11-697-6711; Fax: 82-64-756-3351

E-mail : kzriu@cheju.cheju.ac.kr

재료 및 방법

식물재료. 제주도 제주시 아라동 소재 제주대학교 부근 야산에서 쇠무릎(*Achyranthes japonica* Nakai) 씨앗을 채취하였다. 씨앗을 파종한 후 3-4주 성장한 쇠무릎 유묘를 메탄올로 추출하고, 정제하여 HPLC로 분석하였다. 그 결과 ecdysteroid 함량이 2600 µg/g(dry wt.)으로 다른 식물보다 함량이 높은 것으로 평가되어 쇠무릎 유묘를 전체 RNA 추출에 이용하였다.

Degenerate primer 설계. Degenerate primer를 설계하기 위하여 우선 GeneBank Entrez를 검색하여 각기 다른 식물의 cytochrome P450 family 유전자 3개와 steroid hydroxylase로 알려진 식물 유전자 1개 그리고 곤충의 ecdysteroid 생합성 관련 유전자 1개를 선정하였다. 선정된 유전자의 FASTA format으로 된 아미노산 서열을 CODHOPE의 Block 1 Maker 프로그램과 Dialign2 프로그램 및 Gene-Doc 프로그램을 이용하여 다중정렬(multi-alignment)에 의해 서로의 상동성을 분석하였다. 이 중 상동성이 높은 부분을 선정하고 CODHOPE의 primer 설계 프로그램 및 수작업을 통하여 선정된 아미노산 서열에 상응하는 degenerate primer를 설계하였다. Primer 제작은 Bioneer사(Seoul, Korea)에 의뢰하였다.

RNA 추출. 전체 RNA의 추출은 thiocyanate-phenol-chloroform 방법을 사용하였고, RNA 정량은 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Germany)에서 260 nm의 흡광도를 측정하여 계산하였고, 시료 중 A260/A280 nm의 비율이 1.5-2.0 범위 내의 값을 갖는 RNA만을 cDNA 합성에 사용하였다.

RT-PCR. 단일가닥(single strand) cDNA는 쇠무릎 유묘에서 분리한 전체 RNA로부터 M-MuLV-Reverse-Transcriptase(MBI, USA)를 이용하여 합성하였다. 단일가닥 cDNA 합성 primer는 mRNA의 polyA tail에 상보적인 oligo dT(18, mer)에 임의의 27 mer 서열을 연결한 45 mer의 염기서열을 사용하였다(5' CAG GAA TTC GGG CAC TCG AGC TCA AGC TTT TTT TTT TTT TTT 3'). 임의의 27 mer 서열은 다음 과정의 cDNA 증폭을 위한 PCR에 reverse primer서열로 사용하기 위해 추가하였다. 단일가닥 cDNA 합성을 위하여 전체 RNA를 1-5 µg 취한 후 100 pmol의 primer를 1 µl 첨가하여 70°C에 5분간 반응시키고, 5× reaction buffer 4 µl와 10 mM dNTP 2 µl를 첨가, 총 부피가 18 µl가 되도록 탈이온수를 첨가하여 37°C에 5분간 반응시켰다. 이 반응물에 M-MuLV reverse transcriptase 40 units를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시켰다. 이후 반응을 중지시키기 위해서 70°C에서 10분간 방치하였다가 얼음에서 식힌 후 -70°C에 보관하면서 PCR 반응에 template로 사용하였다. PCR에는 Taq DNA polymerase kit (MBI, USA)를 이용하였으며 10×PCR buffer 5 µl, 10 mM dNTP 5 µl, degenerate forward primer와 reverse primer(100 pmols/µl) 각각 1 µl, Taq DNA polymerase(5 units/µl) 0.5 µl, template cDNA 1 µl를 혼합한 후 총 부피가 50 µl가 되도록 탈이온수를 채운 다음 반응을 수행하였다. PCR은 denaturation 과정을 94°C에서 30초간, annealing 과정을 30초간, extension 과정을 72°C에서 1분간으로 하여 총 30 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

cDNA cloning. RT-PCR 산물의 서로 다른 단편 각각을 클로닝하기 위하여 pGEM-T Easy Vector(Promega, USA)를 이용하였다.

RT-PCR 산물을 전기영동하여 cytochrome P450 family 유전자의 크기와 유사한 band가 확인되면, 이 RT-PCR 산물의 농도를 A260 nm에서 측정하여 산출한 후 50 ng을 pGEM-T Easy Vector 클로닝에 이용하였다.

현탁배양한 LB 배지에서 분리, 정제된 plasmid DNA의 클로닝 여부를 확인하기 위하여 pGEM-T Easy Vector의 EcoR I 부위를 절단한 후 insert를 확인하였다. 제한효소 처리에는 EcoR I (MBI, USA)를 이용하였다. 절단 반응물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 클로닝 여부 및 그 크기를 확인하였다.

DNA 염기서열 결정. DNA 클론의 염기서열 결정에는 chain termination 방법을 이용하였으며,⁹⁾ ALFexpress AutoCycle Sequencing Kit(Pharmacia Biotech, USA)를 사용하였다. Sequencing 반응 primer는 ALFred M13-40 forward primer 5'-CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC-3' 또는 ALFred M13 reverse primer 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'를 사용하였다. Sequencing 반응은 denaturation 과정을 94°C에서 15초간, annealing 과정을 forward primer 사용시 65°C, reverse primer 사용시 50°C에서 15초간, extension 과정을 72°C에서 40초로 하여 총 36 cycle을 수행하였다. 반응을 중지시키기 위해서 중지용액(Deionized formamide/blue dextran)을 각각 4 µl 첨가한 후 95°C에 2-3분 반응시키고 얼음에서 식힌 후 sequencing gel에 주입하여 염기서열을 결정하였다.

Sequencing gel 조제에는 urea 28 g, acrylamide/bisacrylamide final 6%, 10×TBE buffer 8 ml, 10% ammonium persulfate 400 µl, TEMED 40 µl를 혼합한 후 총 부피가 80 ml이 되도록 탈이온수를 첨가하여 만든 6% acrylamide/bisacrylamide gel를 사용하였으며 sequencing 기기는 ALFexpress Auto Sequencer (Pharmacia Biotech, USA)를 사용하였다.

상동성 조사. DNA와 아미노산 서열의 상동성 조사는 NCBI의 Blast를 이용하여 실시하였으며, 아미노산 수준에서의 상동성 조사를 위한 DNA 염기서열의 translation은 ExPasy 프로그램의 translation tool을 이용하였다. 또한 클로닝된 유전자들은 부분 유전자이기 때문에 특정 부분의 서열을 반복하여 상동성 조사하는 PSI-Blast도 이용하였다.

NCBI의 Blast와 PSI-Blast 프로그램의 상동성 조사를 통하여 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성이 있는 것으로 확인된 유전자들을 degenerate primer 설계 시 선택하였던 5가지 유전자의 부분적인 아미노산 서열과 다중정렬 한 후 상동성 정도를 분석하였으며 다중정렬에는 Dialign2와 GeneDoc 프로그램을 이용하였다. 그리고 다중정렬 결과에 따라 상동성 정도를 완전히 일치하는 아미노산 서열, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 및 gap의 비율로 나타내어 상대평가 하였다.

결과 및 고찰

전체 RNA 분리. 쇠무릎의 유묘에서 전체 RNA를 추출하

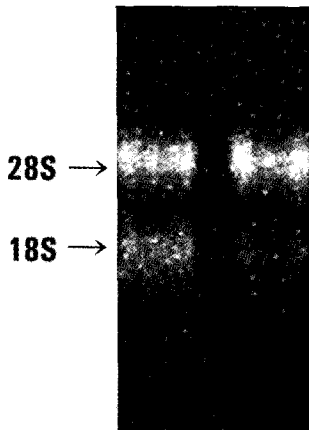


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of total RNA extract from seedlings of *A. japonica*.

여 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 결과 Fig. 1에서 같이 28S와 18S ribosomal RNA가 확인되어 전체 RNA가 추출된 것을 알 수 있었으며, 이를 단일가닥 cDNA 합성에 이용하였다.¹⁰⁾

RT-PCR. RT-PCR에 사용할 degenerate primer를 설계하기

위하여 GeneBank Entrez를 검색하여 현재까지 알려진 유전자 중 서로 다른 식물의 cytochrome P450 family 유전자,¹¹⁻¹³⁾ ecdysteroid와 구조적으로 유사한 brassinosteroid 생합성에 관여하는 것으로 알려진 식물 유전자,¹⁴⁾ 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자를 선정하였다.⁴⁾ 이렇게 cytochrome P450 family 유전자들을 선정한 것은 식물에 있어서 ecdysteroid 생합성에 관여하는 유전자 염기서열에 대해서는 알려진 것이 없지만, 효소 수준에서 cytochrome P450이 관여하는 것으로 알려져 있기 때문이었다.

Degenerate primer 설계에 사용된 5가지 유전자들의 종류와 상동부위를 찾기 위하여 CODHOPE의 Block Maker 프로그램과 Dialign2 프로그램 및 GeneDoc 프로그램을 이용한 다중정렬 후 선정된 4부위를 Fig. 2에 나타내었다. Cytochrome P450은 heme 단백질이기 때문에 heme binding 영역의 상동부위를 우선적으로 선정하였으며, 그 외 상동성이 높은 영역 3부위를 선정하였다.

선정된 상동부위의 아미노산 서열을 토대로 9가지 degenerate primer를 설계하였는데, 아미노산 서열의 degeneracy를 고려하여 하나의 코돈에 해당하는 세 개의 염기 중 마지막 하나의 염기가 높은 상동성을 보이지 않을 때는 어떤 염기와도 결합 가

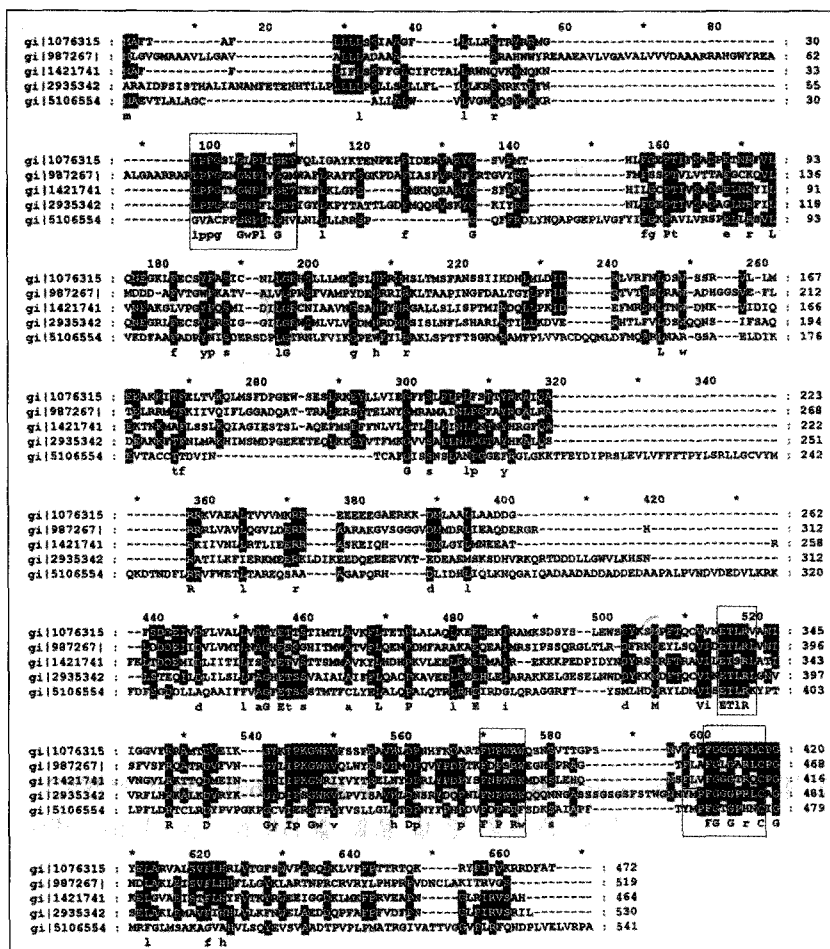


Fig. 2. Multi-alignment of amino acid sequence of plant cytochrome P450s and putative insect ecdysone 20-hydroxylase using GeneDoc program. gi1421741-*Lycopersicon esculentum*; dwarf, gi1076315-*Arabidopsis thaliana*; DWAR, gi2935342-*Arabidopsis thaliana* steroid 22-alpha-hydroxylase; DWF4, gi987267-*Zea mays*; DWARF3, gi106554-*Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase.

Table 1. Degenerate primer sequences designed based on the homology site of plant cytochrome P450s and a putative insect ecdysone 20-hydroxylase

Degenerate primer	Sequence	Size
Forward primer		
Homology site	Leu - Pro - Pro - Gly - X - X - Gly - Trp - Pro	
Primer (DPS1)	5' CTG CCT CCG GGT AAA ATG GGT TGG CC 3'	26 mer
Homology site	Gly - Trp - Pro	
Primer (DPS2)	5' GGW TGG CCW YTN CTN GG 3'	17 mer
Primer (DPS3)	5' GC CCA CCA GGC TGG CCN YTN 3'	20 mer
Homology site	Glu - Thr - Leu - Arg	
Primer (DPS4)	5' GTC ATH WAC GAR ACN CTN CG 3'	20 mer
Primer (DPS5)	5' TGG GTG ATC TCC GAR ACN YTY TN 3'	23 mer
Homology site	Phe - Asn - Pro - Trp - Arg - Trp	
Primer (DPS6)	5' TTT AAT CCT TGG AGA TGG 3'	18 mer
Homology site	Phe - Gly - Gly - Gly - X - Arg - Leu - Cys	
Primer (DPS7)	5' TTT GGA GGA GGG CCA AGI CTI TGT 3'	24 mer
Homology site	Tyr - Met - Pro - Phe - Gly - Gly - Gly	
Primer (DPS8)	5' TAC ATG CCN TTN GGN RBN GG 3'	20 mer
Reverse primer		
Homology site	Phe - Gly - Gly - Gly - X - Arg - Leu - Cys	
Primer (DPS9)	3' AAA CCI CCI CCC GGT TCC GAT ACA 5'	24 mer
Primer (DPS10)	3' CGA ACT CGA GCT CAC GGG CTT AAG GAC 5'	27 mer

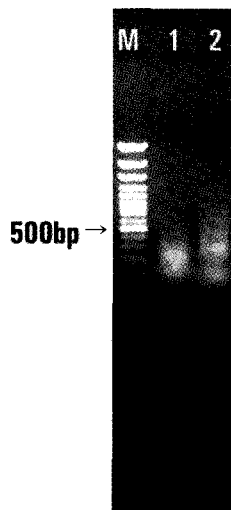


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. M: DNA marker. Lane 1: PCR products amplified with DPS7 & DPS10 primers. Lane 2: PCR products amplified with DPS8 & DPS10 primers.

능한 inosine을 사용하였다(Table 1).

단일가닥 cDNA library에서 cytochrome P450 family 유전자의 screening을 위하여 forward primer로서 cytochrome P450 family 유전자의 상동부위를 이용하여 제작한 8개의 degenerate primer(Table 1의 DPS1-8)를 사용했고, reverse primer로는 cytochrome P450 family 유전자의 상동부위를 이용하여 제작한

1개의 degenerate primer(Table 1의 DPS9)와 단일가닥 cDNA 합성시 oligo dT에 연결한 27 mer의 서열을 이용하여 제작한 primer(Table 1의 DPS10)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, heme binding 영역의 상동부위인 FGGGXRLC와 YMPFGGG 아미노산 서열을 기초로 제작한 DPS7과 DPS8를 forward primer로 하고, DPS10을 reverse primer로 하여 RT-PCR를 실시하였을 때, 쇠무릎 유묘의 단일가닥 cDNA library에서 cDNA가 선발됨을 전기영동으로 확인할 수 있었다(Fig. 3).

RT-PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과, DPS7 primer와 DPS10 primer를 사용한 경우 100-500 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었고, DPS8 primer와 DPS10 primer를 사용한 경우는 100-800 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 이렇게 다양한 크기의 band들이 확인되는 것은 FGGGXRLC와 YMPFGGG 상동부위에 대해서 degenerate primer를 설계할 때 아미노산서열의 degeneracy를 고려하여 상동성이 높지 않은 염기 대신 어떤 염기도 결합 가능한 inosine을 사용하였기 때문에 degenerate primer와 특이성이 적은 cDNA들도 함께 증폭되었기 때문이다. 하지만 cytochrome P450 family 유전자들의 heme binding 영역에서 polyA tail까지의 크기에 해당하는 150-300 bp의 band들도 확인되어 이들을 클로닝 하였다.

Cloning 및 insert 확인. RT-PCR를 이용하여 얻은 PCR 산물들로부터 단일 단편들을 분리하기 위하여 pGEM-T Easy

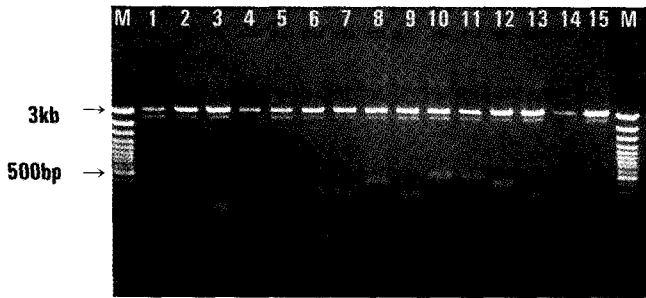


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of digested DNA with EcoR I restriction enzyme. M: DNA marker. Lane 1-15: DNA clones amplified with DPS7 & DPS10 primers.

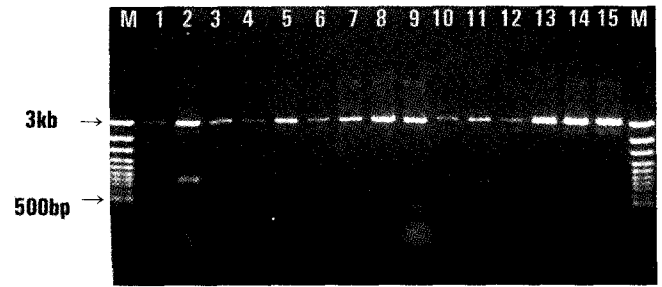


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of digested DNA with EcoR I restriction enzyme. M: DNA marker. Lane 1-15: DNA clones amplified with DPS8 & DPS10 primers.

Vector 클로닝을 실시하였다. 그리고 XL I-Blue competent cell 에 transformation 한 후 X-Gal과 IPTG를 이용한 white/blue 콜로니 선별을 실시한 후, pGEM-T Easy Vector에 RT-PCR 산물들이 클로닝된 것으로 여겨지는 30-40개의 하얀 콜로니를 획득하였다. 하얀 콜로니들을 증식하고 분리, 정제하여 plasmid DNA를 얻은 후 pGEM-T Easy Vector의 EcoR I 영역을 절단

하여 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과 대부분의 하얀 콜로니에서 클로닝된 RT-PCR 산물을 확인할 수 있었다. 단일가닥 cDNA library 선별시 DPS7 primer와 DPS10 primer를 사용하여 얻은 RT-PCR 산물들을 pGEM-T Easy Vector로 클로닝한 경우에는 200-500 bp의 RT-PCR 산물들이 vector에 클로닝된 것을 확인할 수 있었으며, DPS8 primer와 DPS10 primer

Table 2. Sequences of DNA and deduced amino acid of the partial genes cloned with DPS7 & DPS10 primers

Clone	DNA sequence	Deduced amino acid sequence	Length of DNA sequence	Length of amino acid sequence
Clone 1	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtgcaggatctcagttggc taagttaaatattctctactctctgtgcaattggtagtaactcatt ataattggctgtgtgtacaaccagatgaatccattgtttaggac cctctccattcccatctcaaggaatgccccttagagtgctctcc taaaactccaattacataa-3'	F G G G P R L C A G Y Q L A K L N I L I F V H L V V T H Y N X S L V Q P D E S I V M D P L P F P S Q G M P F R V S P K T P I T Stop	192 bp	64
Clone 2	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtgacaagacgctgaacag aggtaactcaatgcatgacaacactctactccttttctcctt gctccttaataccaagggaacttagccgggctctctgaccacaa gcatggcctctaggcttcgagacaactatctctcagagtgccc gaattcctga-3'	F G G G P R L W T R R V N R G T F T C M N N L Y S F S P C S L I Q R G L S R A P R P Q A W P L G F E N N L S L E C P N S Stop	186 bp	62
Clone 3	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtttctctctgctctcog agtgcocgaattcctgaatcgaattcccgccgcccattggcgg cSggagcattgcgactgctgggcccattcgcoccatga-3'	F G G G P R L C S S L A S R V P E F L N R I P A A A M A X G S M R R R A Q F A L Stop	123 bp	41
Clone 4	5'-tttgaggaggccaaggctgtgttcggttctgcagagatc atattctacaaaaatctactttccagtcacaaagctcaaggggt catatttttaagaagtgs-3'	F G G G P R L C S V L Q R S Y S T K I N F S S Q K L K G S Y F L R S	105 bp	35
Clone 5	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtctgatcctcgccttact tatgagattcgaagcatttgggttcaatggttga-3'	F G G G P R L C L I L A L L M R F E A F G F H G Stop	75 bp	25
Clone 6	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtggagatattcctggagtt cgatttaaggttctcaaggttctggttccctkgttagctc tctkcaagggvgaagaaggaaaccaaggtcttaggtgtaatg tgtttgactactcaattttgctactttaa-3'	F G G G P R L W E I F L E F D L R L S R L L V F P X V A L X K X E E G K T K V L G V M C L T T S I L L L Stop	159 bp	53
Clone 7	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtgggtaattttcAAAAA ggaaatgtag-3'	F G G G P R L W G N F P K K E M Stop	51 bp	17
Clone 8	5'-tttgaggaggccaaggctgtgttctctctctctcga atga-3'	F G G G P R L C L S S F S Q Stop	45 bp	15
Clone 9	5'-tttgaggaggccaaggctgtgtaggcscagtgga-3'	F G G G P R L C R X Q Stop	36 bp	12

Table 3. Sequences of DNA and deduced amino acid of the partial genes cloned with DPS8 & DPS10 primers

Clone	DNA sequence	Deduced amino acid sequence	Length of DNA sequence	Length of amino acid sequence
Clone 10	5'-tacatgcocttgggaaatggggccaagattgaggaagtcgact aagctgcttctcctattttag-3'	Y M P L G M G P R L R K S T K L L L L F Stop	63 bp	21
Clone 11	5'-tacatgcocttgggaaatggggcctggtggtcgatggagggc aggggtgggagaagtgattcgagttatggtggcagggatggggga aggggtcgagacagataatgatattgatggtgatggtgtgtggg aagttatggaggttaccagttccaagaatttggaggtggcagatggg gatagagccScagccaagcccaaatDfagaagcttBggatt ggactcaatccagggatcaRagYttgaacctgggagtagKagRa agcccaagSagRagTccctaaagatttHaacctAdgtcccgYgct tagRgKtttgcc#tgtRtRtVtBcgtngtKatg#gggBgcocgRtc gtga-3'	Y M P L G M G P G G R D G G R G G R S D S S Y G G R D G G R G R D R Y D S Y D G D G C G K Y G G Y Q S K N F G G G D G D R G R S P S P N Q K S W D G T Q S R D Q S W N X G R S R S X S R S P E R F N P G P A K X F H E M D X G R Stop	339 bp	113
Clone 12	5'-tacatgcocttgggaaagggggccaagattgaggaagtcgac taa-3'	Y M P L G R G P K I E E V D Stop	45 bp	15
Clone 13	5'-tacatgcocttgggaaatggggcctggtggtcgatggagggc aggggtgggagaagtgattcgagttatggtggcagggatggggga aggggtcgagacagataatgatattgatggtgatggtgtgtggg aagttatggaggttaccagttccaagaatttggaggtggcagatggg gatagagccScagccaagcccaaatDfagaagcttBggatt ggactcaatccagggatcaRagYttga-3'	Y M P L G M G P G G R D G G R G G R S D S S Y G G R D G G R G R D R Y D S Y D G D G C G K Y G G Y Q S K N F G G G D G D R G X S P R P K X R S L X I G L N P G I X X Stop	249 bp	83
Clone 14	5'-tacatgcocttgggaaatggggcctggtggtcgatggagggc aaggttaccaggtggagcttttgaaccttggcctcgctgat gcccagatgcttggcaggttaaaggttaaggagctgaagaat ggaggttggctatgttctccatgttggatttctcgttcaagct attgttaccggaaaggttccatcgagaacctctcagaccactt gctgacctgtggccaacaatgctgggcttacggcaccacttc gtctctgRaaagta-3'	Y M P F G T G P L G E G L D K V Y P G G A F D P L G L A D D P D A F A E L K V K E L K N G R L A M F S M F G F F V Q A I V T G K G P I E N L S D H L A D P V A N N A W A Y G T N F V P X K Stop	282 bp	94

를 사용하여 얻은 RT-PCR 산물들을 pGEM-T Easy Vector로 클로닝한 경우에는 300-800 bp의 RT-PCR 산물들이 vector에 클로닝된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4, 5). 따라서 RT-PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동 하였을 때 확인된 대부분의 산물들이 pGEM-T Easy Vector에 클로닝된 것으로 추정되어 이들의 염기서열을 결정할 수 있었다.

Partial cDNA의 염기 및 아미노산 서열. pGEM-T Easy Vector에 클로닝된 insert DNA의 염기서열을 염기서열 결정법을 통하여 확인하였다. DPS7과 DPS10 primer에 의해서 선발된 유전자들의 클론에서는 DPS7 primer 염기서열을 포함하고 있는 서로 다른 부분유전자(001-009) 9개의 염기서열이 확인되었고, 이들과 동일한 4개의 유전자가 서로 다른 클론에서 확인되었다. 그리고 DPS8과 DPS10 primer에 의해서 선발된 유전자들의 클론에서는 DPS8 primer 염기서열을 포함하고 있는 서로 다른 부분유전자(010-014) 5개의 염기서열이 확인되었고, 이들과 동일한 4개의 유전자가 서로 다른 클론에서 확인되었다.

이러한 부분 유전자 염기서열을 ExPasy의 translation tool을 이용하여 아미노산 서열로 번역하였다. 그 결과, DPS7 primer 염기서열에 해당하는 아미노산 서열에서 중지 코돈까지의 부분적인 open reading frame의 크기는 12-64로 나타났으며, DPS8 primer 염기서열에 해당하는 아미노산 서열에서 중지 코돈까지의 부분적인 open reading frame의 크기는 15-113으로 다양하게 나타났다. 서로 다른 서열을 가진 클론들의 부분적인 open

reading frame에 해당하는 염기 및 아미노산 서열은 Table 2와 3에 정리하였다.

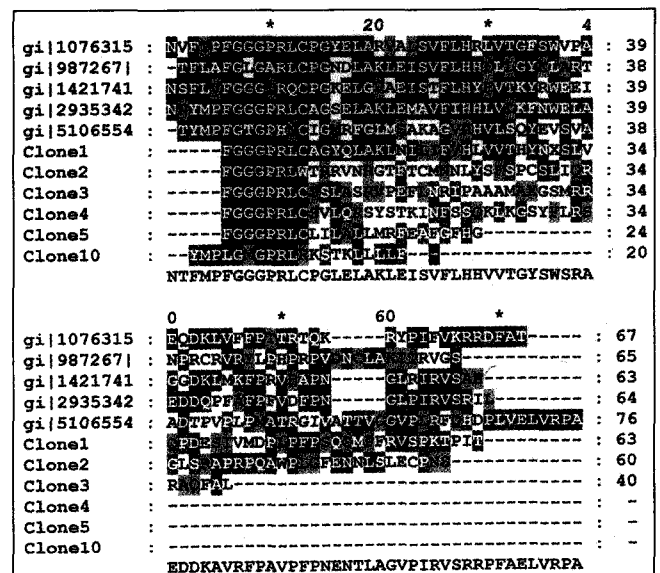


Fig. 6. Multi-alignment of cytochrome P450s and cloned partial gene using GeneDoc program. gi1421741-Lycopersicon esculentum; dwarf, gi1076315-Arabidopsis thaliana; DWAR, gi2935342-Arabidopsis thaliana steroid 22-alpha-hydroxylase; DWF4, gi987267-Zea mays; DWARF3, gi5106554-Locusta migratoria putative ecdysone 20-hydroxylase, Clone1-5 & clone10-cloned partial gene.

Table 4. The number of residues that match exactly, similar or conservative substitutions and gap character between the two sequences in multialignment

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	1	67	25%	38%	44%	14%	25%	11%	11%	14%	14%	10%
	2	0	37%	44%	56%	32%	41%	16%	17%	25%	17%	16%
	3	0	16%	5%	4%	14%	19%	23%	40%	49%	64%	70%
B	1	18	65	29%	27%	13%	28%	15%	12%	15%	12%	9%
	2	27	0	42%	44%	27%	40%	24%	18%	21%	15%	15%
	3	12	0	11%	13%	14%	8%	7%	38%	47%	63%	69%
C	1	26	20	63	45%	11%	23%	10%	12%	11%	12%	6%
	2	30	29	0	62%	28%	36%	17%	15%	17%	17%	14%
	3	4	8	0	1%	19%	14%	19%	36%	46%	61%	68%
D	1	30	19	29	64	19%	31%	10%	15%	14%	17%	15%
	2	38	31	40	0	32%	49%	17%	20%	25%	17%	20%
	3	3	9	1	0	18%	15%	20%	37%	46%	62%	68%
E	1	11	10	9	15	76	14%	10%	6%	7%	7%	9%
	2	25	21	22	25	0	27%	17%	10%	15%	13%	14%
	3	11	11	15	14	0	17%	21%	47%	55%	68%	73%
F	1	18	19	16	22	11	63	14%	14%	15%	15%	10%
	2	30	27	25	34	21	0	25%	22%	22%	15%	13%
	3	14	6	10	11	13	0	4%	36%	46%	61%	74%
G	1	8	10	7	7	8	9	60	16%	11%	13%	9%
	2	12	16	12	12	13	16	0	25%	23%	13%	11%
	3	17	5	13	14	16	3	0	33%	43%	60%	73%
H	1	8	8	8	10	5	9	10	40	30%	25%	13%
	2	12	12	10	13	8	14	15	0	35%	27%	18%
	3	27	25	23	24	36	23	20	0	15%	40%	60%
I	1	10	10	7	9	6	10	7	12	34	26%	13%
	2	17	14	11	16	12	14	14	14	0	32%	18%
	3	33	31	29	30	42	29	26	6	0	29%	54%
J	1	10	8	8	11	6	10	8	10	9	24	29%
	2	12	10	11	11	10	10	8	11	11	0	37%
	3	43	41	39	40	52	39	36	16	10	0	37%
K	1	7	6	4	10	7	7	6	6	5	8	20
	2	11	10	9	13	11	9	7	8	7	10	0
	3	47	45	43	44	56	49	46	26	20	10	0

A: gi1421741-*Lycopersicon esculentum*; dwarf, B: gi1076315-*Arabidopsis thaliana*; DWAR, C: gi2935342-*Arabidopsis thaliana* steroid 22-alpha-hydroxylase; DWF4, D: gi987267-*Zea mays*; DWARF3, E: gi5106554-*Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase, F: Clone1, G: Clone2, H: Clone3, I: Clone4, J: Clone5, K: Clone10

1: The number of residues that match exactly (identical residues) between the two sequences.

2: The number of residues whose juxtaposition yields a greater than zero score in the current scoring table (similar residues or conservative substitutions).

3: The number of residues lined up with a gap character.

cDNA clone과 타 유전자간의 상동성. DNA 염기서열을 번역한 아미노산 서열로 NCBI의 Blast와 PSI-Blast 프로그램에서 상동성 조사를 실시하였다. 그 결과, 식물의 cytochrome P450 family 유전자들과 아주 높은 상동성을 보이는 clone1 DNA 단편을 비롯하여, 상동성이 있는 것으로 확인되는 clone2, 3, 4, 5, 10 DNA 단편 6개를 얻을 수 있었다(Table 2, 3). 그리고 이 6개의 단편 중 clone1, 5, 10은 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자와도 상동성이 있는 것으로 확인되었다.

NCBI의 Blast와 PSI-Blast 프로그램의 상동성 조사를 통하여 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성이 있는 것으로 확인된 6개의 클로닝 유전자들을 degenerate primer 설계시 선택하였던 5가지 유전자의 부분적인 아미노산 서열과 다중정렬 한 후 상동성 정도를 분석하였다. 그 결과 Fig. 6의 다중정렬 결

과에서 보는 것과 같이 clone1과 clone2의 부분적인 open reading frame의 길이는 식물의 cytochrome P450 family 유전자 및 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자들의 부분적인 open reading frame 길이와 유사한 것으로 확인되어 cytochrome P450 family 유전자일 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 특히 clone1은 NCBI의 Blast와 PSI-Blast 프로그램에서 상동성을 조사하였을 때 식물의 steroid hydroxylase로 알려진 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성이 높은 것으로 확인되었을 뿐만 아니라 cholesterol monooxygenase(side-chain-cleaving)와도 상동성이 있는 것으로 확인되어 ecdysteroid 생합성 관련 유전자일 가능성이 높은 것으로 추정되었다.

Fig. 6의 다중정렬 결과에 따라 상동성 정도를 완전히 일치하는 아미노산 서열, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열

및 gap의 비율로 나타내어 상대평가 하였다(Table 4). 그 결과, 식물의 cytochrome P450 family 유전자들간에 정확히 일치하는 아미노산 서열 비율은 25-45% 범위를 나타내었으며, 식물의 cytochrome P450 family 유전자들과 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 추정되는 유전자간에는 조금 낮은 11-19%를 나타내었다. 그리고 식물의 cytochrome P450 family 유전자들간의 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 비율은 37-62% 정도를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, cytochrome P450 family 유전자들과 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 추정되는 유전자간에는 27-32% 정도를 나타내었다. 상대적으로 클로닝된 유전자들 중 clone1은 식물의 cytochrome P450 family 유전자들과 정확히 일치하는 아미노산 서열 비율이 23-31%로 나타나 상동성이 높은 것으로 추정되었으며, clone2, 3, 4, 5, 10은 6-15% 정도를 보여 상동성이 낮아 보였다. 하지만 gap 비율을 고려한다면, 이 부분 유전자들도 상동성이 있는 것으로 추정되었다. 그리고 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 비율을 보면, clone1은 식물의 cytochrome P450 family 유전자들과 36-49% 정도를 보여 상동성이 높은 것으로 추정되었으며, clone2, 3, 4, 5, 10은 14-25% 정도를 보여 상동성이 있는 것으로 추정되었다. 뿐만 아니라 클로닝된 유전자들 중 clone1은 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자와 정확히 일치하는 아미노산 서열 비율이 14%, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 비율이 27%로 상대적으로 높게 나타났으며, clone2와 10도 정확히 일치하는 아미노산서열과 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 비율이 상대적으로 높은 비율을 보여 gap 비율을 고려한다면 상동성이 있는 것으로 추정되었다.

이러한 결과들을 종합하여 볼 때, clone1은 ecdysteroid 생합성 관련 유전자일 가능성이 아주 높은 것으로 추정되었으며, clone2도 ecdysteroid 생합성 관련 유전자일 가능성이 있는 것으로 생각되었다. 그리고 clone5와 10도 부분적인 open reading frame의 길이는 조금 작지만 ecdysteroid 생합성 관련 유전자일 가능성이 있는 것으로 판단되었으며, clone3과 4는 cytochrome P450 family 유전자일 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부의 농림기술개발사업비(과제번호: 295055-5) 및 제주대학교 아열대원예산업연구센터의 연구비에 의해 연구되었으며, 재정지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nakanishi, K., Koreeda, M., Sasaki, L., Chang, M. L. and Hsu,

- H. Y. (1966) Insect hormones. I. the structure of ponasterone A, an insect molting hormones from the leaves of *Podocarpus nakaii* H. *Chem. Comm.* 915-917.
2. Grieneisen, M. L. (1994) Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**, 115-132.
3. Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Benveniste, I. and Feyereisen, R. (1996) Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach, *Spinach oleracha*. *Phytochem.* **30**, 2905-2910.
4. Winter, J., Bilbe, G., Richener, H., Sehringer, B. and Kayser, H. (1999) Cloning of a cDNA encoding a novel cytochrome P450 from the insect *Locusta migratoria*: CYP6H1, a putative ecdysone 20-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 305-310.
5. Chapple, C. (1998) Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**, 311-343.
6. Holton, T. A. and Lester, D. R. (1996) Cloning of novel cytochrome P450 gene sequences via polymerase chain reaction amplification. *Methods Enzymology* **272**, 275-283.
7. Snyder, M. J., Scott, J. A., Andersen, J. F. and Feyereisen, R. (1996) Sampling P450 diversity by cloning polymerase chain reaction products obtained with degenerate primers. *Methods Enzymology* **272**, 304-312.
8. Grieneisen, M. L., Warren, J. T. and Gilbert, L. I. (1993) Early steps in ecdysteroid biosynthesis: evidence for the involvement of cytochrome p-450 enzymes. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**, 13-23.
9. Sambrook, F. M. (1989) In *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 7.3-8.53.
10. Farrel, R. E. (1993) In *RNA Methodologies*. Academic Press, pp. 126-155.
11. Klahre, U., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Nomura, T., Yosida, S. and Chua, N. H. (1998) The arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *Plant Cell*. **10**, 1677-1690.
12. Winkler, R. G. and Helentjaris, T. (1995) The maize Dwarf3 gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*. **7**, 1307-1317.
13. Bishop, G. J., Harrison, K. and Jones, J. D. G. (1996) The tomato Dwarf gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome p450 family. *Plant Cell*. **8**, 959-969.
14. Choe, S. H., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakuriai, A. and Feldmann, K. A. (1998) The DWF4 gene of arabidopsis encodes a cytochrome P450 that mediates 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*. **10**, 231-243.

Isolation of Genes Involved in Ecdysteroids Biosynthesis from *Achyranthes japonica* Nakai

Kyung-Hwan Boo, Somi Kim Cho¹, Hyun-Byung Chae, Kyung-Hwan Boo, Seong-Beom Jin, Do-Seung Lee, Dae-Woon Kim, Moon-Jae Cho² and Key-Zung Riu* (*Faculty of Horticultural Life Science, College of Agriculture; ¹Subtropical Horticulture Research Center; ²Medical School, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea*)

Abstract: In order to isolate genes involved in ecdysteroids biosynthesis in plants, total RNA was isolated from *Achyranthes japonica* Nakai, and RT-PCR was performed using degenerate primers selected based on the results of multi-alignment of four cytochrome P450 genes from plants and a putative ecdysone 20-hydroxylase gene from an insect. Fourteen partial cDNA clones showing unique base sequences were obtained, out of which six showed homologies at the levels of nucleotide and amino acid sequences to the other cytochrome P450 genes known to be involved in the ecdysteroid biosynthesis. Of the six clones, four showed relatively high homologies to a putative ecdysone 20-hydroxylase gene isolated from an insect.

Key words: ecdysteroid, gene, *Achyranthes japonica*, RT-PCR, Cytochrome P450

*Corresponding author