

## 감귤에서 분리한 Metallothionein 유전자의 발현분석 및 게놈 DNA

김인중\*

한국과학기술원 생물과학과

### Expression Patterns and Isolation of Genomic DNA of a Metallothionein-like Gene from *Citrus* (*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa)

KIM, In-Jung\*

Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701, Korea

**ABSTRACT** A cDNA clone encoding metallothionein-like protein (CitMT45), which was reported by Moriguchi et al. (1998), was isolated from *Citrus* fruits cDNA library through differential screening. Our cDNA clone has longer 5' untranslated region, compared to it isolated by Moriguchi et al. (1998). RNA blot analysis showed that the mRNA was abundant in fleshs than peels, leaves, and flowers, as a single transcript. However, regardless of tissue types, the blots showed the similar expression patterns in the process of development with some different profile. These results suggest that CitMT45 may play important roles in the development and/or senescence of various tissues of *Citrus*. A genomic clone corresponding to CitMT45 was isolated and found to have three exons and two introns. A primer extension analysis suggested that the transcription of CitMT45 gene was started at three start sites with different degrees. The 5' -flanking region was shown to contain a putative metal regulatory element (MRE) and low-temperature responsive element which suggests the possibility of metal- and cold-regulated transcription, respectively.

**Key words:** *Citrus*, expression patterns, Metallothionein-like, promoter

## 서 론

과실은 다른 조직과는 다른 형태적, 생리적 특성을 가지고 있으며, 성숙 (ripening)이라는 다른 조직에서 관찰되지 않는, 색깔, 당 함량, 향미 등의 변화가 나타나는 시기를 특징적으로 가지고 있다 (Biale 1964). 이들 과실에 대한 연구는 주로 성숙과정에서 발현되는 유전자에 대해서 토마토 (Davies and Grierson 1989; Pear et al. 1989)를 중심으로 많은 연구결과들이 발표되었고, 바나나 (Clendennen and May 1997), 키위 (Ledger and Gardner 1994), 참외 (Hadfield et al. 2000) 등의 여러 식물종에서도 연구결과들이 보고되고 있다.

감귤은 국내의 경우 주로 제주도에서 생산되는 농산물로서,

일본 (Moriguchi et al. 1998; 2000; Kita et al. 2000)을 중심으로 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있지만, 국내에서는 이에 대한 연구가 미미한 실정이다. 최근에 본 연구실에서는 감귤로부터 ADP-glucose pyrophosphorylase (Kim et al. 2001a)와 phytoene synthase (Kim et al. 2001b)의 유전자를 분리하여 그들의 발현양상을 보고하였다.

본 연구에서는 감귤의 과실에서 중요한 기능을 담당하고 있는 유전자들을 찾기 위해 differential screening을 수행하여 과실의 cDNA 유전자은행으로부터 metallothionein-like (MT) 유전자를 분리하였다. 이 MT 단백질은 작은 분자량을 가지고 있고, 동물과 식물, 곰팡이 등의 다양한 생물에서 발견되고 있는, cysteine을 많이 함유하고 있는 단백질이다. MT 단백질은 cysteine이 존재하는 분포양상과 central domain의 존재 여부에 따라 type 1과 type 2, type 3로 구분된다 (Reid and Ross 1997). 이들 단백질은 금속을 결합하는 능력이 있

\*Corresponding author. Tel 042-869-2664

E-mail: ijkim@bioneer.kaist.ac.kr

어 증금속의 무독화에 중요한 역할을 한다고 보고되었고, 발현에 있어서 여러 조직의 발달 및 노화, 과일성숙과정과의 연관성이 보고되었다 (Robinson et al. 1993; Lohman et al. 1994). 그리고 호르몬, 바이러스, 온도 변화 등의 자극 또는 스트레스에 의한 다양한 발현양상이 여러 식물체에서 관찰되었다 (Evans et al. 1990; de Framond 1991; Buchanan-Wollaston 1994; Zhou and Goldsbrough 1994; Charbonnel-Campaa et al. 2000).

따라서 본 연구에서는 감귤에서의 MT 발현 조절기작과 단백질의 생리적 기능에 대한 정보를 얻기 위해 MT 유전자의 발현양상을 여러 조직의 발달과정에 따라 조사하였고, 게놈 DNA를 분리하여 염기서열을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

공시재료는 감귤 궁천조생 (*Citrus unshiu* Marc. cv. Miyagawa) 품종을 사용하였다. 일반적인 하우스 조건에서 배양하였으며, 과실, 잎, 꽃 등의 조직을 채취하여 본 실험에 사용하였다. 과실은 성숙도와 색깔에 따라 다음의 5단계로 나누어 채취하였다: mini-green (MG, 직경 0.8~1.5 cm), 결실 후 25일; small green (SG, 직경 2~3 cm), 결실 후 55일; full green (FG, 직경 4~5 cm), 결실 후 90일; breaker (BR, 직경 6~7 cm), 결실 후 130일; full yellow (FY, 직경 6~7 cm), 결실 후 160일. 잎도 크기에 따라 다음의 5단계로 나누어 채취하였다: L1 (길이 4~7 cm), L2 (길이 7~9 cm), L3 (길이 9~12 cm), L4 (12~15 cm), L5 (길이 15 cm 이상).

### cDNA 유전자은행 작성과 Differential screening

RNA는 hot phenol RNA 분리방법 (Verwoerd et al. 1989)에 따라 FY 단계의 과실의 과육으로부터 추출하였다. Poly (A)<sup>+</sup> RNA는 PolyA Tract mRNA isolation System II (Promega)을 사용하여 분리하였다. 분리된 mRNA로부터 Zap-cDNA synthesis kit와 Gigapack II gold cloning kit (Stratagene)를 사용하여 감귤 과실 cDNA library를 제작하였다. Differential screening에 사용할 probe는 잎과 과실에서 분리한 mRNA로부터 합성한 cDNA를 방사성 동위원소인 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP로 표지하였다. 이와 같이 만들어진 cDNA library와 probe를 이용하여 통상의 plaque lift method (Sambrook and Russell 2000)를 사용하여 과육특이발현 유전자를 탐색하였다. 1~2시간 동안 42°C에서 30% formamide, 5x Denhardt's 용액, 5x SSPE, 100  $\mu$ g/ml denatured salmon sperm DNA 혼합액에서 prehybridization한 후, probe를 넣고 24시간 혼성화 (hybridization)를 수행하였다. Filter는 2x

SSC, 0.05% SDS 혼합액에서 42°C, 15분간 흔들어주면서 세척한 후, 0.2x SSC, 0.1% SDS 혼합액에서 42°C, 10분간 2회와 68°C, 15분간 3회 세척하였다.

### Northern blot을 통한 발현분석

RNA를 5단계의 과실 (MG, SG, FG, BR, FY)과 잎 (L1, L2, L3, L4, L5)으로부터 분리하였다. 과실은 MG 단계를 제외하고, 나머지 단계에서는 과육 (juice sacs/pulp segments)과 과피로 나누어 각각에 대해서 발현양상을 조사하였다. 혼성화 실험은 앞의 differential screening과 동일한 조건에서 수행하였다. Probe는 differential screening에 의해 분리된 CitMT45 cDNA를 방사성동위원소인 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP로 표지하여 사용하였다.

### 게놈 DNA 분리 및 유전자은행 작성, Southern blot 분석

감귤 잎으로부터의 DNA 분리는 Dellaporta 등 (1983)의 방법에 따라 수행하였다. 이 DNA로부터 *in vivo* excision이 가능하고, 삽입 DNA의 크기가 작아 조작이 쉬운  $\lambda$ -ZapII 벡터를 사용하여 게놈 DNA 유전자은행을 제작하였다. 또한 subcloning 단계를 줄이기 위해, Southern blot 결과를 바탕으로 분리된 DNA를 *Xba*I으로 절단한 후,  $\lambda$ -ZapII 벡터의 *Xba*I 부위에 연결하여 GigapackIII gold cloning kits (Stratagene)에 packaging하였다. 혼성화 실험은 앞의 northern blot에서 언급한 것과 동일한 조건에서 수행하였다.

Southern blot 분석은 게놈 DNA를 *Eco*RI, *Sac*I, *Xba*I으로 절단한 후, 0.7% agarose 겔에서 전기영동하였다. DNA를 Hybond-N membrane (Amersham Pharmacia)에 옮긴 후, 혼성화 실험은 앞의 differential screening과 동일한 조건에서 수행하였다.

### Primer Extension 분석

20개 염기의 antisense primer를 합성한 후, T4 DNA polynucleotide kinase와 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP를 사용하여 말단을 표지하였다. mRNA (1  $\mu$ g)를 감귤잎으로부터 분리한 후, 앞에서 표지한 primer와 혼성화시켰다. MMLV 역전사효소 (Promega)를 사용하여 cDNA를 합성한 후, 6% sequencing 겔에서 분석하였다 (Sambrook and Russell 2000).

### 염기서열 분석

DNA의 염기서열은 Sanger 등 (1977)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 Sequenase 2.0 kit (Amersham)를 사용하여 결정하였다. 이 때 사용된 primer는 통상적으로 사용되는 T7 promoter primer와 T3 promoter primer를 사용하

여 양 말단의 염기서열을 결정하였고, 연속적으로 primer를 합성하여 전체 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 PCGENE 프로그램 (IntelliGenetics Inc., Release 6.60)과 Clustal X (version 1.64b) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

*Differential screening*을 통한 metallothionein 유전자의 분리

감귤 잎 cDNA와 과육 cDNA를 probe로 사용하여, 과육 cDNA 유전자은행의 differential screening을 통해 12개의 clone을 분리한 후, 염기서열을 분석하였다. 그 결과 그 중 한 clone이 Moriguchi 등 (1998)이 분리하여 보고한 MT 유전자 (CitMT45)와 ORF는 완전한 동일한 염기서열을 보이는 유사성을 보였다. 다른 점은 3' UTR (untranslated region)의 길이로서 Moriguchi 등 (1998)은 83 bp의 짧은 서열을 보고 (GenBank accession No. AB008101)하였으나, 본 연구에 의해서 분리한 clone (GenBank accession No. AF320905)은

269 bp의 UTR로, 186 bp의 길이가 긴 것을 보여준다. 지금까지 보고된 대부분의 MT 유전자들은 비교적 긴 3' UTR을 가지고 있으므로, 본 연구에 의해 분리된 clone이 정확한 것으로 사료된다. Moriguchi 등 (1998)에 의해 분리된 cDNA의 3' UTR의 길이가 짧은 것은 여러 개의 추정되는 poly(A) signal중 앞에 존재하는 것에 전사의 종결이 일어났거나, 본 연구에 의해 분리된 cDNA의 361번과 376번 사이의 염기서열이 염기 A가 많아, 이 위치에서 역전사에 의한 cDNA 합성이 일어났기 때문일 것으로 추정되었다.

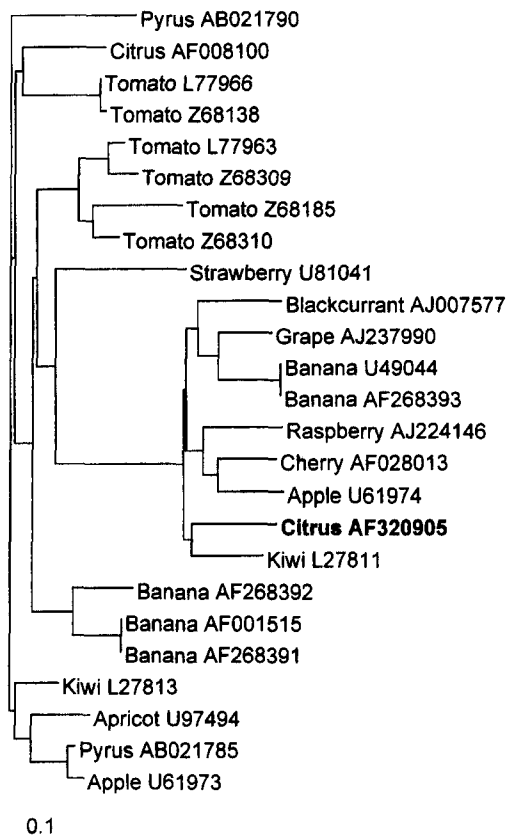
본 연구에서 분리하여 결정한 염기서열 결과로부터 얻어진 CitMT45 유전자의 아미노산 서열을 다른 과실 생산 식물의 MT 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 분류 계통수를 작성 (Figure 1)하였을 때, Kiwi의 MT 단백질 (GenBank accession No. L27811)과 가장 근연거리가 가까운 것으로 나타났다. 또한 이 계통수는 과실 생산 식물로부터 분리된 MT 유전자들은 크게 6개의 그룹으로 구별될 수 있음을 보여준다.

감귤 조직발달 단계별 발현양상 조사

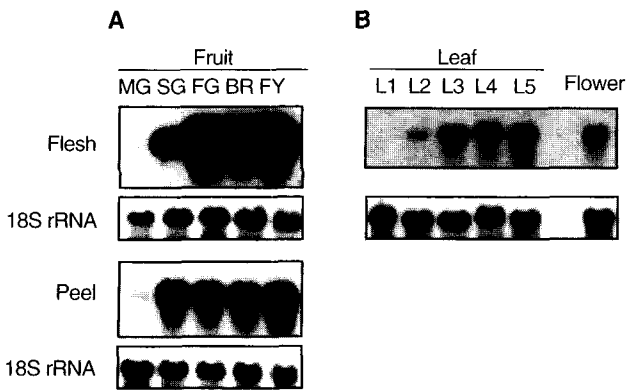
Moriguchi 등 (1998)에 의해 감귤의 MT 유전자의 발현분석이 과육에서 일부 이루어졌으나, 과피의 성숙과정과 잎의 노화과정에서의 발현분석은 이루어지지 않았다. Metallothionein 유전자의 발현은 노화에 의해 유도된다는 보고 (Lohman et al. 1994; Buchanan-Wollaston 1994)가 있기 때문에, 과피와 잎의 노화 또는 발달에 따른 유전자의 발현을 조사할 필요가 있다. 또한 계놈 DNA에 대한 연구는 이루어지지 않아 감귤의 발달과정과 MT 유전자의 발현에 대한 연관성을 해석하는데 많은 정보를 제공하지 못하였다.

따라서 본 실험에서는 과육의 발달과정에 따른 CitMT45의 발현양상을 과피와 잎의 발달과정에서의 발현양상과 비교하였다 (Figure 2). 이를 위해 잎을 크기에 따라 발달단계를 나누고, 과실의 경우 과피와 과육을 분리하여 발현양상을 비교하였다 (Figure 2). 그 결과 CitMT45 유전자의 발현은 과육과 과피, 잎 등의 조사된 모든 조직에서 이루어지고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 발현량은 과육에서 가장 많았으며, 그 다음이 과피, 잎의 순이었다. 발달단계에 따른 유전자의 발현은 과육의 경우, FG (결실 후 90일)와 FY (결실 후 160일) 단계에서 최고를 나타내었으나, 과피의 경우에는 FY 단계 (결실 후 160일)에서 최고 수준을 나타내었다 (Figure 2A). 잎의 경우에도 크기가 커짐에 따라 발현이 증가되었다 (Figure 2B). 과실의 성숙에 따른 MT 유전자의 발현 증가 양상은 토마토 (Giritch et al. 1998), 사과 (Reid and Ross 1997), 바나나 (Clendennen and May 1997), 키위 (Ledger and Gardner 1994), 체리 (Wiersma et al. 1998), 포도 (Davies and Robinson 2000) 등에서도 보고되었다.

이러한 결과를 통해 CitMT45 단백질은 감귤 조직의 발달과정과 노화에서 중요한 역할을 담당하고 있는 것을 알 수



**Figure 1.** Phylogenetic relationship of the *Citrus* CitMT45 to other various fruit-producing plants MT. Phylogenetic analysis is based on the deduced amino acid sequences of MT from various species. The tree was generated by Clustal X (version 1.64b) and TreeView (version 1.6.1). The cDNA sequences used for amino acid translation was retrieved from GenBank. The respective accession number is described next to plant name.



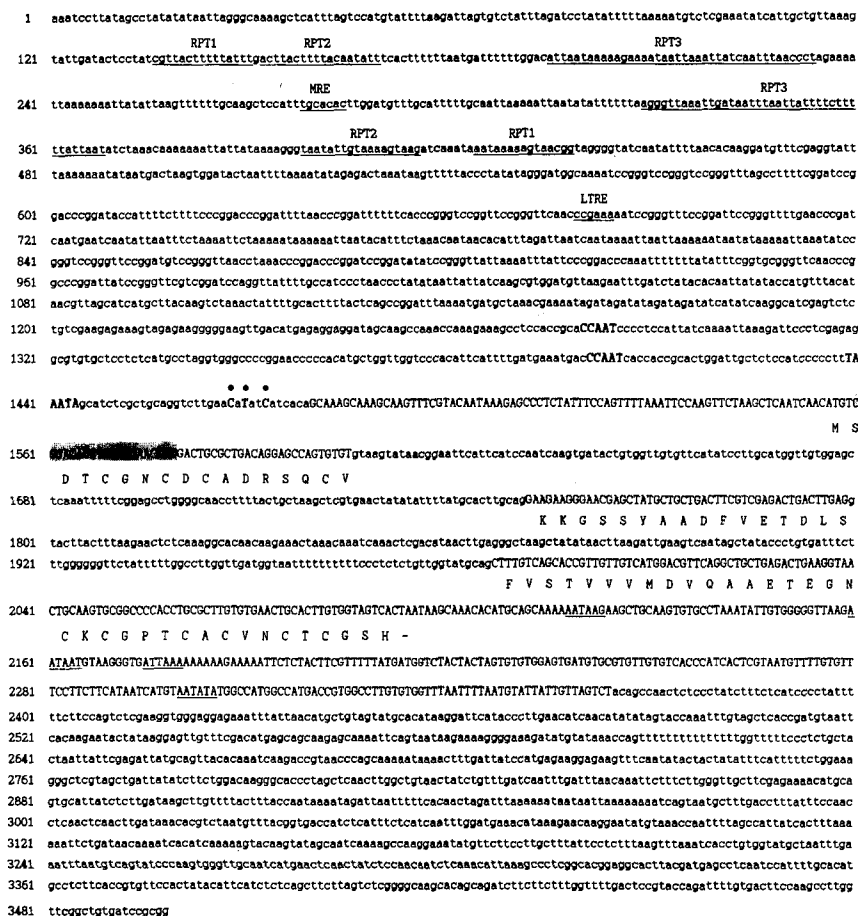
**Figure 2.** Northern blot analysis of CitMT45 gene expression in five developmental stages of edible parts (fleshes) and peels of fruits, and leaves (A), and in flowers (B) of *Citrus*. Total RNA (20  $\mu$ g/lane) was separated on a 1.2% formaldehyde gel, transferred to Hybond-N membrane (Amersham), and hybridized with cDNA probe. The same blot was hybridized with an apple 18S rDNA probe.

있다. 현재까지 MT 단백질은 금속이온의 대사과정, 중금속의 무독화, 활성산소의 무독화, 세포내 환원전위를 조절하는 등의

기능을 가지고 있다고 알려져 있다 (Robinson et al. 1993). 이러한 기능은 MT 단백질의 금속이온 결합능에 의해 유추된 것으로, 금속이온의 결합 능력은 wheat (Lane et al. 1987)와 pea (Evans et al. 1992), macroalgae (Morris et al. 1999)에서 조사되었다.

감귤 CitMT45 유전자의 게놈 DNA 분리

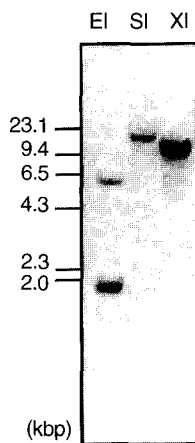
CitMT45 유전자의 게놈 내에서의 구조를 분석하기 위해 게놈 유전자은행으로부터 해당 DNA를 분리하여 염기서열을 결정하였다. 분리된 게놈 DNA (GenBank accession No. AF320906)는 크기가 3,498 bp로서, 크기가 127 bp, 48 bp, 378 bp인 3개의 exon과 양말단의 인접 부위가 GT/AG 규칙에 일치하는 146 bp와 187 bp의 2개의 intron으로 이루어진 CitMT45 유전자 지역이 있었고, promoter 지역을 포함하는 1,466 bp의 전사개시 시작 부위의 5'-upstream 지역과 1134 bp의 3'-downstream 지역으로 구성되었다 (Figure 3). 이러한 3 exon/2 intron의 구조는 *Posidonia*의 Pomt2a (Giordani



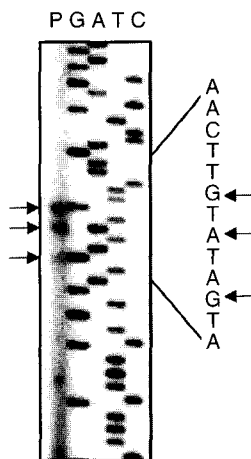
**Figure 3.** Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the CitMT45 genomic clone of *Citrus*. Uppercase letters represent exons, and lowercase letters indicate introns, 5'-upstreams and 3'-downstreams regions. TATA and CCAAT boxes are represented by uppercase letters in bold. The potential promoter elements are represented both by underlines and letters above: MRE, metal responsive element; LTRE, low-temperature responsive elements. The other underlined letters indicate repeat sequences (RPT1, RPT2, RPT3) and the poly(A) signal. An antisense 20-nucleotide primer for primer extension analysis is shaded. Transcription start sites are represented by uppercase letters in bold with dot.

et al. 2000), 벼의 OsMT-2 (Chen et al. 1998), cotton의 MT1-A (Hudspeth et al. 1996)의 구조와 비슷하다. 그러나 토마트 (Whitelaw et al. 1997)와 애기장대 (Zhou and Goldsbrough 1995), 벼 (Hsieh et al. 1995), 옥수수 (de Framond 1991), pea (Evans et al. 1990) 등의 식물체에서 분리된 다른 많은 MT 유전자의 게놈구조는 2개의 exon과 1개의 intron으로 이루어졌다고 보고되었다. 이러한 차이가 주는 의미에 대해서는 아직까지 알려진 것이 없다.

CitMT45 유전자가 게놈 내에서 몇 copy로 존재하는지를 알아내기 위해 Southern blot 분석을 수행한 결과, *EcoRI* 시료를 제외한 다른 시료에서는 단일 band를 보여주었다 (Figure 4). Moriguchi 등 (1998)도 이와 동일한 결과를 얻어,



**Figure 4.** Genomic Southern blot analysis of CitMT45. Genomic DNA (10 µg) was digested with *EcoRI* (EI), *SacI* (SI), and *XbaI* (XI) for each DNA sample. Size markers (kbp) are indicated on the left. The blot was done with previously isolated CitMT45 cDNA probe labeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP.



**Figure 5.** Primer extension analysis. Autoradiogram of the primer extension products separated on a 6% sequencing gel. Lanes: P, primer extension products; G, A, T, C, sequencing ladders. Sequencing ladders were obtained by priming sequencing reactions with the same 20-nucleotide primer and the isolated genomic clone as a template. The arrows point to 3 closely spaced transcription start sites.

CitMT45 유전자가 하나 또는 몇 개의 copy로 존재한다고 제시하였다. 그러나 본 연구의 게놈 DNA의 분리와 분석을 통해 *EcoRI*의 두 band는 첫번째 intron 내에 *EcoRI* 절단 부위가 존재 (Figure 3)하여 생성된 것으로 해석되어, CitMT45 유전자는 게놈 내에서 단일 copy로 존재한다고 결론내릴 수 있었다.

**Promoter 지역의 염기서열 분석**

Primer extension 분석에 의해 전사개시 부위를 결정한 결과, 3개의 개시 부위를 추정할 수 있었다 (Figure 5). 이러한 여러 전사개시 부위에 대한 경향은 다른 식물체에서 분리된 MT 유전자에서도 보고되었다 (de Framond 1991; Charbonnel-Campaa et al. 2000). 전사개시 부위의 upstream 부위에서 전사에 중요한 부위로 추정되는 서열을 상동성 비교를 통해 조사하였다. 전사개시 부위의 약 28 bp upstream에 전사에 필수적인 element인 TATA box로 추정되는 염기서열이 존재하였고, 두개의 CCAAT box로 추정되는 서열도 존재하였다 (Figure 3). 금속조절 부위 (metal regulatory elements, MRE)가 존재한다면, CitMT45 유전자의 발현이 금속이온에 의해 조절되는 것으로 추정할 수 있으므로, MRE의 서열을 탐색하였다. 현재 동물 MT 유전자의 MRE 염기서열비교와 점돌연변이에 의해 'TGRCNC'의 핵심염기서열이 알려져 있다 (Thiele 1992). 현재까지 식물 MT 유전자에서 알려진 MRE는 pea의 PsMT<sub>A</sub> (Evans et al. 1990)와 tomato의 LeMT<sub>B</sub> (Whitelaw et al. 1997)의 두 경우에서만 보고되었다. CitMT45는 하나의 MRE가 전사개시 부위로부터 -1183과 -1189 사이에 존재하며, 5' TGACAC 3'의 염기서열을 보여준다 (Figure 3). 6번째 염기가 A인 것은 CitMT45의 높은 발현에 관여할 것으로 추정된다 (Thiele 1992). 그리고 MRE 양쪽에 3종류 (15 bp, 17 bp, 40 bp)의 완전한 inverted repeat가 존재한다. Inverted repeat의 존재는 pea의 PsMT<sub>A</sub> (Evans et al. 1990)에서도 보고되었다. 그러나 이들 부위들의 활성은 앞으로 조사되어야 할 부분이다. 그 외에도 염기서열이 5' CCGAAA 3'인 저온반응 부위 (low-temperature responsive element) (Dunn et al. 1998)도 전사개시 부위로부터 -783과 -788 사이에 추정되었다 (Figure 3). 이러한 결과는 CitMT45 유전자의 발현이 금속이온과 온도변화와 같은 생리적, 환경적 변화에 의해 조절되고 있을 가능성을 제시해준다. 그러나 토마트의 LeMT<sub>B</sub> (Whitelaw et al. 1997)에서 보고된 G-box like motif와 ethylene-responsive enhancer element는 관찰할 수 없었다.

이러한 연구결과들을 통해 감귤의 CitMT45 단백질은 과육의 발달에 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 추정되며, 이의 발현조절 기작을 규명하기 위해서는 promoter에 존재하는 것으로 추정된 MRE와 저온반응 부위의 활성을 조사할 필요가 있다. 또한 단백질 수준에서의 과육성숙에 따른 발현

양상이 전사수준에서의 발현양상과 일치하는지를 조사해야 한다. CitMT45 promoter는 외래유전자의 도입에 의한 형질을 발현시키고자 할 경우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되어, 현재 당도를 높이는 연구에 사용되고 있다.

## 적 요

Differential screening을 통해 Moriguchi 등 (1998)이 분리한 유전자와 상동성을 나타내는 CitMT45 유전자의 cDNA를 분리하였다. 본 실험에서 분리한 cDNA는 Moriguchi 등 (1998)이 분리한 cDNA에 비해 긴 3' UTR을 가지고 있었다. 잎과 과피, 과육에서 CitMT45 유전자의 발현분석을 northern blot을 통해 수행한 결과, 발달단계에 따라 증가하는 비슷한 양상을 관찰할 수 있었으나, 과육, 과피, 잎의 순으로 그 발현 양이 많았다. 이들의 발현조절에 대한 정보를 얻기 위해 게놈 DNA를 분리한 결과, CitMT45 게놈 구조는 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성되어 있었고, primer extension 분석을 통해 CitMT45 유전자의 발현은 3개의 부위에서 개시되고 있음을 알 수 있었다. 전사개시부위의 5' upstream 지역에서 TATA box와 CCAAT box뿐만 아니라, 금속이온과 온도변화에 의한 조절에 중요한 부위로 알려진 cis-element를 발견하였다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 선도기술개발사업 (G7)에 의해 수행된 연구의 일부임.

## 인용문헌

- Biale JB (1964) Growth, maturation, and senescence in fruits. *Science* **146**:880-888
- Buchanan-Wollaston V (1994) Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. *Plant Physiol* **105**:839-846
- Charbonnel-Campaa L, Lauga B, Combes D (2000) Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. *Gene* **254**: 199-208
- Chen WM, Hsieh H-M, Huang PC (1998) Type 2 rice metallothionein-like gene has two introns. *DNA Seq* **8**(4):223-228
- Clendennen SK, May GD (1997) Differential gene expression in ripening banana fruit. *Plant Physiol* **115**:463-469
- Davies KM, Grierson D (1989) Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) mRNAs that accumulate during ripening and leaf senescence. *Planta* **179**:73-80
- Davies C, Robinson S (2000) Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiol* **122**:803-812
- de Framond AJ (1991) A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*): Cloning and characterization. *FEBS Lett* **290**:103-106
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JBA (1983) Plant DNA miniprep- aration: Version II. *Plant Mol Biol Rep* **1**:19
- Dunn MA, White AJ, Vural S, Hughes MA (1998) Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol* **38**(4):551-564
- Evans IM, Gatehouse LN, Gatehouse JA, Robinson NJ, Croy RRD (1990) A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. *FEBS Lett* **262**(1):29-32
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP, Shi J, Tommey AM, Robinson NJ (1992) Expression of the pea metallothionein-like gene PsMT<sub>A</sub> in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for function PsMT<sub>A</sub>. *Plant Mol Biol* **20**:1019-1028
- Giordani T, Natali L, Maserti BE, Taddei S, Cavallini A (2000) Characterization and expression of DNA sequences encoding putative type-II metallothioneins in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Plant Physiol* **123**:1571-1581
- Giritch A, Ganai M, Stephan UW, Bäumlein H (1998) Structure, expression and chromosomal localization of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol Biol* **37**:701-714
- Hadfield KA, Dang T, Guis M, Pech J-C, Bouzayen M, Bennett AB (2000) Characterizaion of ripening-regulated cDNAs and their expression in ethylene-suppressed charentais melon fruit. *Plant Physiol* **122**:977-983
- Hsieh H-M, Liu W-K, Huang PC (1995) A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Mol Biol* **28**:381-389
- Hudspeth RL, Hobbs SL, Anderson DM, Rajasekaran K, Grula JW (1996) Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton. *Plant Mol Biol* **31**(3):701-705
- Kim I-J, Ko K-C, Kim C-S, Chung W-I (2001a) Isolation and expression patterns of a cDNA encoding phytoene synthase in *Citrus*. *J Plant Physiol* **158**:795-800
- Kim I-J, Noh S-J, Lee B-H, Jo J, Kim Y-S, Chung W-I (2001b) Molecular characterization of cDNA clones for ADP-glucose pyrophosphorylase from *Citrus*. *Biochim Biophys Acta* **1518** (3):324-328
- Kita M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Lett* **469**(2-3):173-178
- Lane B, Kajioka R, Kennedy T (1987) The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. *Biochem Cell Biol* **49**:71-83
- Ledger SE, Gardner RC (1994) Cloning and characterization of five cDNAs for genes differentially expressed during fruit development of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var *deliciosa*). *Plant Mol Biol*

- 25:877-886
- Lohman KN, Gan S, John MC, Amasino RM** (1994) Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **92**:322-328
- Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T, Omura M** (1998) Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* **211**:221-227
- Moriguchi T, Komatsu A, Kita M, Akimitsu K, Endo-Inagaki T, Omura M** (2000) Molecular cloning of a homologue of dad-1 gene in citrus: distinctive expression during fruit development. *Biochim Biophys Acta* **1490**(1-2):198-202
- Morris CA, Nicolaus B, Sampson V, Harwood JL, Kille P** (1999) Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochem J* **338**:553-560
- Pear JR, Ridge N, Rasmussen R, Rose RE, Houck CM** (1989) Isolation and characterization of a fruit specific cDNA and the corresponding genomic clone from tomato. *Plant Mol Biol* **12**:639-651
- Reid SJ, Ross GS** (1997) Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins in apple fruit during cool storage. *Physiol Plant* **100**:183-189
- Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ** (1993) Plant metallothioneins. *Biochem J* **295**:1-10
- Sambrook J, Russell DW** (2000) *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467
- Thiele DJ** (1992) Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucl Acids Res* **20**(6):1183-1191
- Verwoerd TC, Dekker BM, Hoekema A** (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucl Acids Res* **17**:2362
- Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA, Tomsett AB** (1997) The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol* **33**:503-511
- Wiersma PA, Wu Z, Wilson SM** (1998) A fruit-related metallothionein-like cDNA clone from sweet cherry (accession no. AF 0280013) corresponds to fruit genes from diverse species (PGR 98-015). *Plant Physiol* **116**:867
- Zhou J, Goldsbrough PB** (1995) Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* **248**:318-328

(접수일자 2001년 8월 7일)