

## 들깨 $\gamma$ -tocopherol methyltransferase cDNA 유전자의 분리 및 특성

김경환\* · 황선갑 · 김동현 · 이재열<sup>1</sup> · 김용환 · 황영수

농촌진흥청 농업생명공학연구원 신기능소재개발과, <sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 미생물학과

(2002년 9월 26일 접수, 2002년 11월 9일 수리)

$\gamma$ -Tocopherol methyltransferase(TMT)는 토코페롤 생합성 대사의 마지막 단계인 감마 토코페롤을 알파 토코페롤로 변환하는데 관여하는 효소이다. 들깨의 미성숙 종자 cDNA 유전자 은행에서 TMT로 추정되는 유전자를 분리하였으며 이 유전자는 1369개의 염기와 367개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 약 42kDa의 추정된다. 이 cDNA는 Genbank와 상동성 분석결과 애기장대의 TMT 유전자와 아미노산 수준에서 60% 정도의 상동성을 가지고 있으며 methyltransferase domain과 S-adenosyl methionine binding domain을 가지고 있으므로 TMT 유전자로 추정했다. 이 유전자의 특성을 알기 위하여 완전한 크기를 가지는 TMT 유전자를 대장균에서 발현하고 *in vitro*에서 효소의 활성을 측정하였다.

**Key words:** 들깨,  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase, cDNA

### 서 론

알파 토코페롤은 고등식물체에 광범위하게 존재하며 세포막에서 지방산의 산화를 방지하는 항산화제의 역할도 수행한다. 식물체에서 토코페롤의 생합성은 homogentisate와 phytyl pyrophosphate의 축합에 의해서 일어나며, aromatic ring의 부착 위치와 수에 따라  $\alpha$ -토코페롤(5,7,8-trimethyl tocol),  $\beta$ -토코페롤(5,8-dimethyl tocol),  $\gamma$ -토코페롤(7,8-dimethyl tocol),  $\delta$ -토코페롤(8-methyl tocol)로 구별하고 이들을 통틀어 비타민 E로 통칭하고 있다.<sup>1)</sup> 이들은 항산화제의 역할 뿐만 아니라 지질 이중막 내에 존재하는 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)을 안정화시키는 역할도 한다.<sup>2)</sup> 모든 토코페롤은 생체에서 소화시 똑같은 비율로 흡수되나 알파 토코페롤이 우선적으로 간에서 흡수되어 체내로 골고루 분배되므로 식품에 존재하는 토코페롤의 종류중에서 알파 토코페롤이 사람에게 중요하며, 비타민 E로서의 역할도 감마나 다른 토코페롤에 비해서 10배 이상 높다.<sup>3)</sup>

지금까지 토코페롤 생합성 경로에 관여하는 효소들은 동위원소를 이용하여 각 단계별로 존재는 밝혀졌다. 그러나 이들은 주로 엽록체 내막에 존재하는 막단백질로서 여러가지 식물에서 분리가 시도되었지만, 분리가 어려워 효소의 특징이나 구조, 유전자의 염기서열 등에 대해 알려진 바가 적다.<sup>4,5)</sup> 최근 당근과 애기장대로부터 토코페롤 생합성 대사경로에 관여하는 *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase(HPPDase) 유전자가 분리되었다.<sup>6)</sup> 그리고 미생물에서 대사유전자가 operon으로 존재한다는 사실에 기인하여 cyanobacteria에서 토코페롤을 합성하는 효소군을 이 유전자를 이용하여 분리하였다. Cyanobacteria 유전자를 이용하여 Dellapenna 등<sup>7)</sup>이 감마 토코페롤에서 알파 토코

페롤을 합성하는  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase 유전자를 애기장대에서 분리하여 그 특성을 확인하고, 이 유전자를 애기장대에 형질전환함으로써 감마 토코페롤의 대부분을 알파 토코페롤로 변화시켰다. 형질전환체를 HPLC로 분석한 결과 종자의 알파 토코페롤의 양은 80배 정도가 증가하였으며 비타민 E의 활성은 9배 정도 증가됨을 알 수 있었다.

들깨는 우리나라에서 고대로부터 재배하여 온 유지작물로 필수지방산(리놀레산과 리놀렌산)의 함량이 70-80% 대로 불포화도가 높아서 식물유로 이용 시 산패가 최대의 문제이다. 한편 들깨는 전체 토코페롤 함량 중에서 감마 토코페롤의 양이 95% 정도를 차지하고 있어서<sup>8)</sup> 이를 천연항산화제의 일종인 알파 토코페롤로 변환시킬 경우 산패방지와 비타민 E 절대량의 증가로 들깨의 부가가치가 증대할 것으로 기대된다. 한편 옥수수, 유채, 목화, 팥, 콩 등 유지작물도 감마토코페롤의 비율이 알파보다 높아서 이들의 조성 변화를 유도함으로써<sup>9)</sup> 주요작물에서의 비타민E의 양을 증대시킬 수 있으며, 이를 바로 식품으로 섭취하면 질병의 예방적 치료 수준의 많은 양의 비타민 흡수도 가능할 것으로 생각된다.

이를 위한 기초연구로 먼저 들깨에서  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase(TMT) 유전자를 분리하고, 이 유전자를 대장균에서 발현시켜 *in vitro*에서 효소의 활성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

**식물체.** 유전자의 분리에 사용한 들깨는 작물시험장에서 분양받은 옥동(*Perilla frutescens* var. Okdong)을 이용하였으며, 농촌진흥청 포장에서 자연상태에서 재배한 후 필요시 수확하였으며 식물체는 액체질소를 이용하여 급냉한 후 -80°C에서 보관하면서 실험에 이용하였다.

**PCR을 이용한  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase 유전자의 단편분리.** 미성숙 들깨 종자에서 hot phenol을 이용하여 total

\*연락처

Phone: 82-31-299-1736; Fax: 82-31-299-1732

E-mail: kimhwan@rda.go.kr

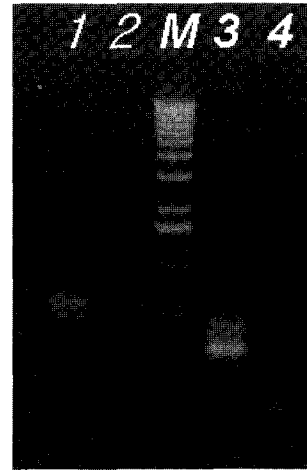
RNA를 분리하였으며<sup>10)</sup> poly(A)<sup>+</sup> RNA는 oligo(dT) 셀룰로스 크로마토그래피(Qiagen, Germany)를 이용하여 분리하였다. 분리한 poly(A)<sup>+</sup> RNA로부터 cDNA kit(Stratagene, USA)를 이용하여 이중가닥의 cDNA 합성한 후 이를 주형으로 PCR반응을 수행하였다. PCR에 사용한 primer는 애기장대의 TMT 유전자의 염기서열을 이용하여 3개를 작성하였으며 염기서열은 N; 5'-GG(GA)TGTGG(GA)ATTGG(GA)GG(GA)GG(GA)AG(CT)TCA-3', C1; 5'-(AT)GGCAT(GA)TG(TC)TC(CT)CCACT(CT)TC-3', C2; 5'-(AT)GG(AT)GC(AT)ACGTT(AC)TC(AT)GACCA(GA)TC(TC)GC-3'이다. 첫번째 PCR은 N-C2 프라이머와 cDNA를 주형으로 이용하였으며, 두번째는 첫번째 PCR산물을 주형으로 N-C1 프라이머를 이용한 nested PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 94°C · 5분(1회), 94°C · 30초/55°C · 30초/72°C · 40초(35회), 72°C · 5분(1회)을 이용하였다. PCR을 이용하여 증폭된 225 bp의 DNA는 PCR 2.1 벡터(Invitrogen)에 클로닝한 후에 염기서열을 결정하였다.

**γ-Tocopherol methyltransferase 유전자의 분리 및 염기서열 결정.** 완전한 크기의 cDNA 유전자를 분리하기 위하여 프로브 단편은 α-<sup>32</sup>P dCTP와 random primed DNA labelling kit(Boehringer Mannheim, Germany)로 labelling하였으며 prehybridization은 62°C에서 4시간, hybridization은 7%(w/v) SDS, 0.5 M sodium phosphate(pH 7.2), 1%(w/v) BSA를 이용하여 62°C에서 24시간동안 실시하였다. Hybridization membrane의 washing은 2×SSC(1×SSC는 0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0)와 0.1% SDS를 이용하여 62°C에서 5분간 3회 실시하였다. 3차 스크리닝한 플라스크를 SK(+) 플라스미드로 *in vivo* excision한 후 제한효소로 절단하여 insert의 크기를 확인한 후 ABI 3700을 이용하여 염기서열을 결정하였다. 그밖의 다른 분자생물학적인 실험들도 일반적인 방법에<sup>11)</sup> 따라 실시하였다.

**대장균에서의 TMT 발현 및 효소 활성측정.** 분리한 TMT 유전자의 효소활성을 측정하기 위하여 대장균 발현용 운반체인 pQE 31 플라스미드(Qiagen)에 transit peptide를 제외한 ORF를 PCR을 이용하여 *Bam* HI과 *Kpn* I 부위에 클로닝한 후 염기서열분석에 의해 frame shift 여부를 확인하였다. 형질전환 된 대장균을 37°C에서 OD<sub>600</sub>=0.7까지 배양한 후 1 mM IPTG를 첨가하여 2시간 동안 배양하며 단백질 발현을 유도하였다. 배양한 세포는 초음파를 이용하여 파쇄한 후, 유도된 단백질은 친화성 His-tag 컬럼을 이용하여 분리하고 SDS-PAGE에 전기영동 하였다. 전기영동 한 단백질은 anti-His tag 항체를 가지고 Wu 등의<sup>12)</sup> 방법에 따라 Western blot으로 단백질의 유도를 확인하였다. 단백질의 유도를 확인한 후 효소의 활성은 D'Harlingue의 방법을<sup>13)</sup> 변형하여 측정하였으며 β-, γ-, δ-토코페롤과 <sup>14</sup>C S-adenosyl methioine, 완충액, 효소를 넣은후 30°C에서 30분간 반응한 후 trichloroacetic acid와 *n*-hexane을 첨가하여 반응을 정지하고 <sup>14</sup>C의 양을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### γ-Tocopherol methyltransferase의 유전자의 분리 및 염기서



**Fig 1. PCR application of γ-tocopherol methyltransferase gene fragments from *Perilla frutescens*.** Electrophoresis patterns of PCR products separated on 1% agarose gel. Lane 1, PCR products of N and C2 primer using perilla cDNA as template. Lane 2, PCR products of N and C2 primer using as *Arabidopsis thaliana* gDNA as template. Lane 3, PCR products of N and C1 primer using lane 1 PCR product as template. Lane 4, PCR products of N and C1 primer using lane 2 PCR product as template.

**열 분석.** 들깨에서 TMT 유전자를 분리하기 위하여 애기장대 TMT 유전자의 아미노산 서열을 이용하여 3개의 degenerate 프라이머를 작성하였으며, 들깨 미숙종자 cDNA와 애기장대 genomic DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 N과 C2 프라이머를 이용하여 첫번째 PCR을 실시한 결과, 주형으로 들깨 cDNA를 사용한 것은 예상과 비슷한 460 bp 정도에서 밴드를 확인할 수 있었으나 애기장대의 genomic DNA를 주형으로 한 경우는 밴드를 확인할 수 없었다. 이 PCR 산물이 들깨 TMT 유전자임을 확인하기 위해 N과 C1 프라이머를 이용하여 두번째 실시한 PCR반응에서는 예상한 200 bp 정도의 밴드를 확인하고, 이를 TA 클로닝 벡터에 클로닝한 후 염기서열을 결정하였다. 이를 애기장대 TMT 유전자와 염기서열을 비교한 결과 225 bp 크기의 TMT 단편임을 확인하였다.

이 PCR 단편은 들깨 종자 cDNA의 유전자은행에서 완전한 크기의 TMT 유전자를 클로닝하기 위한 프로브로 사용하였다. 2.5×10<sup>6</sup> pfu의 파이지 플라스크에서 3차 스크리닝을 통하여 15개의 클론을 분리하였다. 이 클론은 SK(+) 플라스미드로 *in vivo* excision한 후 *Eco*RI과 *Xho*I로 절단하여 크기를 확인하고, 이중 크기가 가장 큰 클론의 염기서열을 분석하였다. 염기서열을 분석한 결과 1369개의 염기와 369개의 아미노산으로 구성된 open reading frame(ORF)을 가진 cDNA 클론을 얻었다. 들깨 TMT의 유전자의 분자량은 약 42 kDa, pI는 7.2이며 NCBI에 accession number AF213481로 등록하였다.

Table 2는 들깨와 애기장대의 TMT, 그리고 cyanobacteria의 C24 sterol methyltransferase 아미노산 서열의 상동성을 비교한 것으로<sup>14)</sup> 애기장대와는 아미노산 수준에서 60%, 염기서열은 50%의 상동성을 나타내고 남조류와는 30% 정도의 상동성을 나타내었다. ChloroP 프로그램으로 분석한 결과 들깨는 70개의

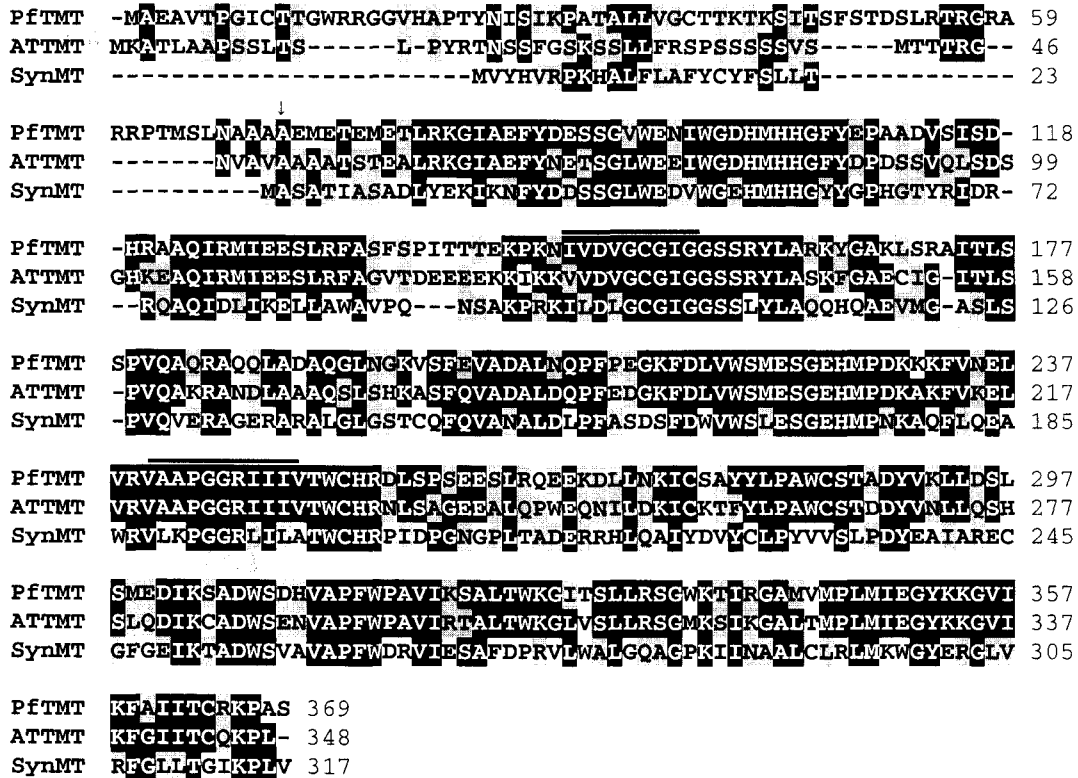


Fig 2. Protein sequence alignment of the deduced amino acid sequence from *Perilla frutescens* (PfTMT) (GenBank accession number AF 213481), *Arabidopsis thaliana* (AtTMT) (GenBank accession number AF104220) and *Synchocystis* PCC6803 (SynMT) (GenBank accession number D64004). Multiple sequence alignment was performed using the BioEdit program (Hall,1999). The putative cleavage site for chloroplast transit peptide was indicated by arrow. Residues that are identical in the two sequences are indicated by shading. Two motifs corresponding to conserved SAM binding domains are indicated as the blue line over sequence alignment.

transit peptide 부위를 N말단에 가지고 있으나, 애기장대는 50개 정도로 transit peptide 부분의 아미노산 수와 상동성에서 차이가 많으며, 그 이외의 부분에서는 상동성이 높음을 알 수 있다. 특히 domain 검색 결과 들깨는 215번부터 253번까지의 아미노산에 methyltransferase binding domain을 가지고 있으며 또한 IVDVCGIG, VAAPGGREEEV의 S-adenosyl methionine binding domain을 가지고 있음을 알 수 있다. 식물에서는 애기장대 TMT만이 유전자의 완전한 염기서열이 알려져 있어서 애기장대와 들깨처럼 다른 식물 간에서도 이와 비슷한 상동성의 양상을 나타내는지는 단정하기가 어렵다. 위에서 보는 바와 같이 들깨의 TMT가 아미노산 수준에서의 상동성은 높은 것이 아니라, 애기장대와 같은 TMT의 특징적인 domain을 가지고 있고 domain내의 상동성이 높아 TMT 유전자로 예상하고 효소의 활성을 측정하여 이 유전자의 기능을 분석하였다.

**대장균에서의 TMT의 발현 및 효소 활성 측정.** 분리한 TMT 유전자의 기능을 확인하기 위하여 pQE 31 플라스미드에 PCR을 이용하여 transit peptide의 70개 아미노산을 제거한 ORF를 subcloning한 후 염기서열분석으로 frame을 확인하였다. TMT 유전자가 형질전환된 대장균 M15를 배양한 후 1 mM의 IPTG를 첨가하여 fusion protein의 발현을 유도하고 균을 원심 분리한 후 초음파로 파쇄하였다. 발현된 단백질은 pQE 31 플라스미드의 N말단에 존재하는 6개의 His-tag을 이용하여 특이적으로 결합하는 친화성 Ni-NTA 아가로스 컬럼에 통과하여 결

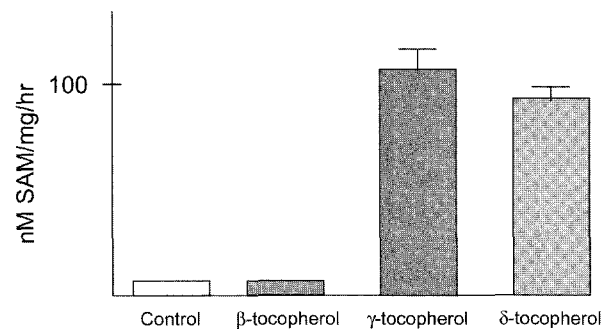


Fig. 3. Substrate specificity of *Perilla frutescens*  $\alpha$ -tocopherol methyltransferase. In vitro  $\gamma$ -TMT assays were performed on extracts from *E. coli* expressing the predicted mature proteins of *Perilla frutescens*  $\gamma$ -TMT. Control; In vitro  $\gamma$ -TMT assays were performed on extracts from *E. coli* expressing the pQE 31 plasmid vector only.

합시킨 후, 100 mM의 imidazole을 가지고 유도단백질을 컬럼에서 분리하였다. 분리한 단백질은 SDS-PAGE로 확인한 후 anti-His-tag 항체를 가지고 Western blot으로 확인한 바 예상크기와 같은 약 34 kDa 크기의 단백질이 세포배양액과 세포내에서 검출되었으며, 세포내의 단백질은 분리과정에서 약간 분해됨을 알 수 있었다(data not shown). 그리고 효소의 활성을 측정하기 위하여 기질로 각각 베타-, 감마-, 델타- 토코페롤과  $^{14}$ C S-adenosyl methionine, 효소로 유도된 단백질을 첨가하여 30°C

에서 30분간 반응한 후 TCA와 hexane을 첨가하여 반응을 정지하고, liquid scintillation counter로  $^{14}\text{C}$  methyl기의 첨가여부로 효소의 활성을 측정하였다.

그림 3에서 보는 바와 같이 감마 토코페롤을 기질로 이용시 효소의 활성이 119 nmol/ $\mu\text{g}$  protein/hrs로 가장 높았으며, 델타 토코페롤에서도 활성을 나타냄을 알 수 있었으나 베타 토코페롤에서는 활성을 나타내지 않았다. 이로써 이 유전자는 감마 토코페롤(7,8-dimethyl tocol)을 알파 토코페롤(5,7,8-trimethyl tocol)로 전환시 필요한 5번 위치에 메틸기를 첨가하는 기능을 가진  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase임을 알 수 있었다. 감마 토코페롤(7,8-dimethyl tocol) 뿐만 아니라 델타 토코페롤(8-methyl tocol)에 활성을 가지는 것으로 보아 5번 위치에 메틸기를 첨가하는 활성을 가지나 효소의 활성 특이성은 낮은 것으로 생각된다. 그리고 베타 토코페롤(5,8-dimethyl tocol)에서는 활성이 없는 것으로 보아 TMT 유전자가 chroman링의 7번 위치에는 메틸기 첨가 활성이 없는 것으로 생각되며, 이러한 실험결과를 종합할 때 5번과 7번의 메틸기 첨가에는 효소의 특이성이 높음을 알 수 있었다.

향후 연구방향을 설정함에 있어서 이 유전자를 여러 종류의 유지작물에 형질전환하여 항산화제의 활성을 높임으로써 식물유의 산패방지 및 비타민 E의 활성이 증가된 작물개발에 사용하려고 한다.

## 문 헌

- Schultz, G., Soll, J., Fiedler, E. and Schulze-Siebert, D. (1985) Synthesis of prenylquinones in chloroplasts. *Physiol. Plant* **64**, 123-129.
- Erin, A. N., Skrypin, V. V. and Kagan, V. E. (1985) Formation of alpha-tocopherol complexes with fatty acids Nature of complexes. *Biochim Biophys. Acta* **815**, 209-214.
- Traber, M. G. and Sies, H. (1996) Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu. Rev. Nutr.* **16**, 321-437.
- Soll, J., Kemmerling, M. and Schultz, G. (1980) Tocopherol and plastoquinone synthesis in spinach chloroplasts subfractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 544-550.
- Shigeoka, S., Ishiko, H., Nakano, Y. and Mitsunaga, T. (1992) Isolation and properties of gamma-tocopherol methyltransferase in *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys. Acta* **1128**, 220-226.
- Norris, S. R., Shen, X. and DellaPenna, D. (1998) Complementation of the Arabidopsis pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* **117**, 1317-1323.
- Shintani, D. and DellaPenna, D. (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* **282**, 2098-2100.
- Shin, H. S. and Kim, S. W. (1994) Lipid composition of perilla seed. *JAOAC* **71**, 619-622.
- Eitenmiller, R. R. (1997) Vitamin E content of fats and oils-nutritional implications. *Food Technol.* **51**, 78-81.
- Pawlowski, K., Kunze, R., De bries, S. and Bisseling, T. (1994) In *Plant Molecular Biology Manual* (2nd ed.): *Isolation of total, poly (A) and polysomal RNA from plant tissues* Kluwer Academic Publishers, Belgium. D5 pp. 1-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Wu, Y., Muench, D. G., Kim, Y. T., Hwang, Y. S. and Okita, T. W. (1998) Identification of polypeptides associated with an enriched cytoskeleton-protein body fraction from developing rice endosperm. *Plant Cell Physiol.* **39**, 1251-1257.
- D'harlingue, A. and Camara, B. (1985) Plastid enzymes of terpenoid biosynthesis. Purification and characterization of  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase from *Capsicum* chromoplasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 1520-1523.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.

### Molecular Cloning and Characterization of $\gamma$ -tocopherol Methyltransferase cDNA from *Perilla frutescens*

Kyung-Hwan Kim\*, Seon-Kap Hwang, Donghem Kim, Jai-Youl Lee<sup>1</sup>, Young-Hwan Kim and Young-Soo Hwang (Plant Metabolic Engineering Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea; <sup>1</sup>Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

**Abstract:**  $\gamma$ -Tocopherol methyltransferase (TMT) is an enzyme catalyzing  $\gamma$ -tocopherol into  $\alpha$ -tocopherol at the final step of  $\alpha$ -tocopherol synthesis pathway. Putative TMT cDNA clone specific to *Perilla frutescens* immature seeds was isolated from cDNA library. The cDNA clone consisted of 1369 bp open reading frame encoding 369 amino acids with a relative Mw of 42 kDa. Results revealed the cDNA has 60% homology to *Arabidopsis thaliana* TMT, and possesses methyltransferase and S-adenosyl methionine-binding domains, suggesting that cDNA encodes a  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase. To characterize the properties of the TMT gene, the cDNA sequences coding for mature TMT were expressed in *E. coli* and assayed to determine the enzyme activity *in vitro*.

Key words: *Perilla frutescens*,  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase, cDNA

\*Corresponding author