

Burley 21 담배에서 Putrescine N-Methyltransferase 유전자의 클로닝

이정현* · 김선원 · 류명현 · 박성원
KT&G 중앙연구원
(2003년 11 월 11 접수)

Molecular Cloning of Putrescine N-Methyltransferase Gene from Burley 21 Tobacco

Jeong Heon Lee*, Sun Won Kim, Myong-Hyun Ryu and Seong Weon Park
KT&G Central Research Institute
(Received November 11, 2003)

ABSTRACT : Recently, many researches for plant alkaloids, one of the largest groups of natural products, are reported because of their various pharmacological activity. This study was carried out to clone putrescine N-methyltransferase (PMT) gene which is a key enzyme in diverting polyamine metabolism towards the biosynthesis of nicotine and related alkaloids from Burley tobacco. To induce expression of PMT gene in tobacco plant, the floral meristem was removed and then mRNA was purified from root. cDNA encoding PMT gene was isolated by RT PCR and cloned. Three different groups of clones were screened by PCR and restriction enzyme digestion analysis and were characterized. The data of these screening revealed that three types of PMT are present in Burley tobacco. Comparison of the nucleotide sequence of this three genes encoding putative PMT with those of other tobaccos revealed that two types of PMT are newly discovered from *Nicotiana tabacum* cv. Br21 tobacco and they were same as PMT2, PMT3 of *N. tabacum* cv. Xanthi.

Key words : tobacco, putrescine N-methyltransferase, cDNA

천연생리활성 물질중에 가장 많이 알려져 있는 식물의 alkaloid는 그 약리적 활성 때문에 생합성과 관련된 많은 연구가 진행(De Luca, 1993; Hashimoto and Yamada, 1992; Hashimoto and Yamata, 1993)된 바 있으며 대량생산에 대한 관심 또한 증가되고 있다(Kinnersley and Dougall, 1980;

Saitoh *et al.*, 1985; Tiburcio *et al.*, 1985a, 1985b).

또한 최근에는 alkaloid의 생합성 과정을 조절하고자 하는 연구도 보고되고 있다(Fumihiko *et al.*, 1999).

담배에서 alkaloid는 최근 분석기술의 발달로 nicotine, nornicotine, anabasin 등 10여종 이상의

*연락처 : 305-805 대전광역시 유성구 신성동 302번지, KT&G중앙연구원

*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-805, Korea (phone: 82-42-866-5438 ; fax:82-42-861-1949; e-mail: leejeon@ktng.com)

alkaloid가 검출 가능하게 되었고, nicotine을 비롯하여 scopolamine, berberine 등과 관련된 몇몇 유전자가 cloning되기도 하였다. 또한 Fumihiko 등 (1999)은 Hibi 등(1994)이 발표한 PMT 유전자를 이용하여 담배에서 alkaloid 생합성 과정을 변형하려는 연구를 수행하기도 하였다.

담배의 alkaloid중 대표적인 nicotine은 tropane alkaloid와 같이 뿌리에서 ornithine과 arginine으로부터 생합성되어진 putrescine이 N-methylputrescine으로 전환되고 diamine oxidase에 의해 산화된 후 4-methylaminobutanol을 거쳐 1-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cation이 되고 nicotinic acid를 거쳐 생합성

된다(Fig. 1). 따라서 putrescine-N-methyltransferase는 nicotine의 생합성과정에서 late limiting enzyme이라고 할 수 있다. Hibi 등(1994)은 low nicotine mutant와 정상 담배를 비교하여 PMT 유전자를 cloning하는데 성공한 바 있다. 또한 Riechers and Timko 등(1999)는 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi로부터 PMT 유전자를 cloning하여 염기서열을 보고하였으며, 그외에도 *N. tomentosiformis*, *N. otophora*, *N. attenuata* 등 *Nicotiana* 속의 여러 종에 대한 PMT 유전자의 분석이 이루어진 바 있다 (Riechers and Timko, 1999; Winz and Baldwin, 2001).

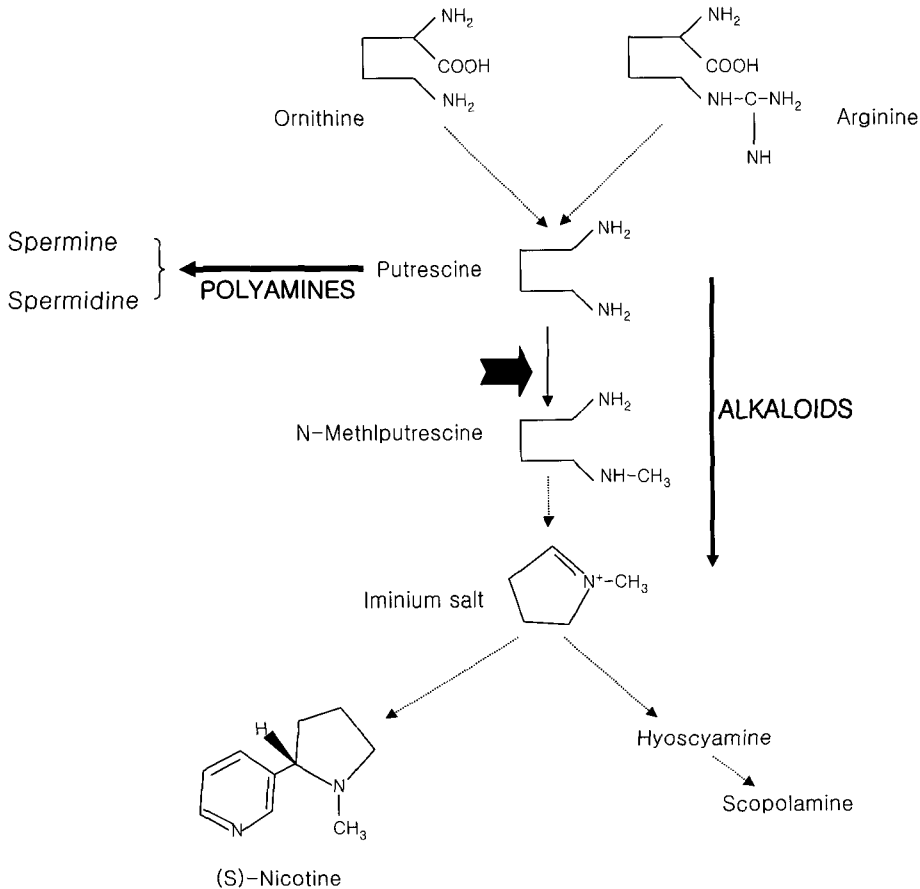


Fig. 1. Biosynthetic pathway of nicotine. Putrescine N-methyltransferase (arrow indicates) is the key enzyme diverting polyamine metabolism towards the biosynthesis of nicotine and related alkaloids.

그러나 PMT 유전자는 *Nicotiana* 속의 여러 종들간에서 그 염기서열상 차이점이 발견되고 있으며, *N. tabacum* 내에서도 cultivar Xanthi로부터는 PMT1, PMT2, PMT3, PMT4등 네가지의 서로 다른 PMT 유전자가 보고되어 있으나 버어리종에는 한 종류의 PMT만이 보고되어 있다.

Nicotiana tabacum cv. Xanthi는 오리엔트종의 대표종으로 그리스의 Xanthi 지방에서 매우 오래 전부터 재배하고 있는 품종으로 대표적인 향미료 품종이지만 국내에서 거의 재배되지 않는 품종인데 반해 *Nicotiana tabacum* cv. Br21은 Burley종으로 *N. longiflora* 및 *N. glutinosa*등 *Nicotiana* 속의 다른 종이 모본으로 교배되어 품종화된 우리나라의 주종 품종이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 주종 품종인 *Nicotiana tabacum* cv. Br21로부터 alkaloid 생합성의 key enzyme인 putrescine N-methyltransferase를 분리하고 분석하고자 하였으며, PMT 유전자중 Burley종 담배로부터는 기존에 밝혀져 있지 않은 2종을 확인하고 이들을 cloning하였다.

재료 및 방법

실험재료 : 본 연구에서 버어리종 담배로부터 PMT 유전자를 분리하기 위해 Burley21(*Nicotiana tabacum* cv. Br21)을 사용하였으며, 유전자의 증식을 위한 균주로서 *Escherichia coli* DH5 α , 식물형질전환용 균주로서 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 사용하였다. 균주의 증식을 위한 배지로는 LB배지(1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였으며 필요에 따라 항생제 ampicillin 및 kanamycin을 첨가하여 사용하였다. 기타 제한효소, ligase, Taq polymerase등은 InvitrogenTM, TakaraTM, LocheTM 등 회사의 제품을 사용하였다.

Total RNA, mRNA의 추출 : PMT 유전자 발현을 유도하기 위하여 꽃봉오리를 제거하는 스트래스를 가한 후, 시간별(24hr, 48hr, 72hr)로 뿌리를 수확하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 보관중인 샘플로부터 RNeasyTM RNA purification kit (QiagenTM)의

user's manual에 제시된 방법을 sample fresh weight, lysis buffer 양 및 lysis reaction 시간 등을 변형하여 total RNA를 추출하였다. Total RNA 160 μ g으로부터 OligotexTM(QiagenTM)를 이용하여 mRNA를 추출하였으며 약 20ng의 mRNA를 cDNA 합성을 위한 RT PCR에 사용하였다

RT PCR, PCR : RT PCR 반응은 QiagenTM사의 One Shot RT PCR cloning kit을 이용하여 수행하였으며 PCR은 PerkinElmerTM 사의 GeneAmp 9600TM에서 TakaraTM사의 ExTaqTM을 사용하여 수행하였으며, RT PCR 반응은 총 20 μ L의 반응액에서 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분30초간 denature, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 anealing, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension의 반응을 35cycle로 하여 반응하였다. 이 후 72 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응하고 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. RT PCR을 통해 얻어진 product를 확인하기 위해 실시한 second PCR의 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 가열한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 30초간 denature, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 anealing, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension의 반응을 35cycle로 하여 반응하였다. RT PCR 및 PCR에 사용한 primer는 *Nicotiana* 속의 다양한 종으로부터 알려진 PMT 유전자의 염기서열을 Gene Bank로부터 검색하여 잘 보존되어 있는 부분을 primer (1F : 5'-ggaagtcatactaccaacac-3', 2R :5'-gccataatgcgctaaactctg-3', 3F : 5'-tttgca ggtgaagcattctcac-3', 4R : 5'-gactcgatcatactctggcg-3', 5R: 5'-atcaactaccacgtcatcg-3')로 제작하여 사용하였다. 결과 반응물은 0.8%~1.2% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였다.

Cloning 및 Sequeencing : PCR product는 InvitrogenTM사의 PCR cloning vector pDriveTM에 ligation하였으며 cloning된 insert를 확인하기 위하여 추출한 DNA를 EcoRI로 절단 후 1% agarose gel에서 전기영동하여 비교하였다. 기타 ligation, 제한효소반응 및 전기영동등은 Sambrook등의 "Melocular cloning laboratory manual" 및 제조회사의 product manual을 따라 수행하였다. Cloning된 유전자는 BigDyeTM cycle sequencing kit으로 반응시킨 후 ABITM사의 autosequencer 377TM에서

sequencing을 수행하였으며 그 결과를 Genebank의 database와 ClustalW을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

cDNA 합성 : PMT 유전자의 발현을 유도하기 위하여 꽃봉오리를 제거한 후 수확한 버리종 담배의 뿌리로부터 total RNA를 추출하여(Fig. 2) total RNA 160 μ g으로부터 mRNA를 추출하였으며 약 20ng의 mRNA를 template로 poly d(T) nucleotide를 primer로 한 RT PCR을 수행하여 증폭된 band를 얻었는데(Fig 3), RT PCR 결과 얻어진 band가 최소한 두가지 이상의 다양한 크기를 보였다. 반복 실험을 통해 얻어진 RT PCR product들에 대하여 이들이 PMT 유전자임을 확인하기 위하여 유전자 내부에 존재할 것으로 예상되는 PMT specific primer들을 이용한 second PCR 수행한 결과(Fig. 4), 얻어진 RT PCR product들은 모두 PMT specific primer에 대해 양성의 반응을

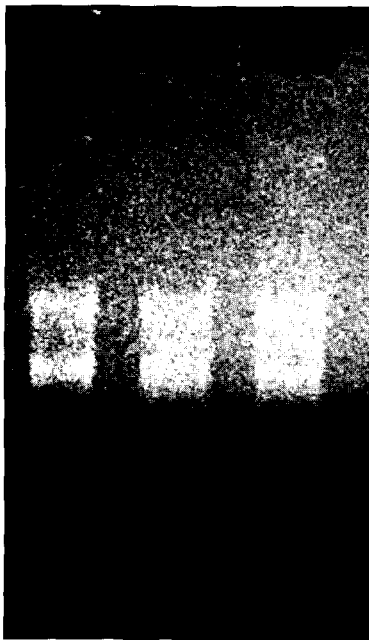


Fig. 2. Total RNA isolated from root of Burley tobacco. Floral meristem of tobacco plant was eliminated to induce PMT gene expression.

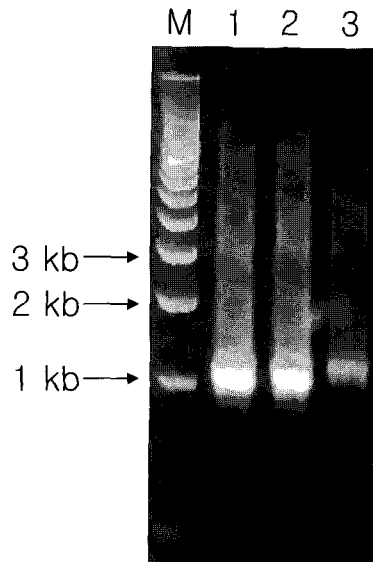


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of RT PCR products from Burley tobacco. Template was total mRNA isolated from root of Burley tobacco and primers 1F(5'-ggaagtcatactaccaacac-3'), 4R(5'-gactcgatcatactctggcg-3') were used (lane M: 1kb ladder, lane 1, 2, 3: RT PCR product).

나타내었다. 또한 primer의 방향을 반대로 수행한 negative control에서는 예상과 같이 음성의 반응을 나타내었다(Fig. 4, lane 4). 이와같은 결과로 Burley 21 담배내에 하나 이상의 PMT 유전자가 존재함을 예측할 수 있었다.

PMT cDNA의 cloning : RT PCR product는 QiagenTM사의 pDriveTM vector와 cloning 하였다. 재조합 plasmid를 template로 하고 primer 1F와 4R을 이용한 PCR을 수행하여 vector 내에 예측한 크기의 cDNA가 삽입되었음을 확인하였으며(Fig. 5), transformation 후 선발된 colony로부터 재조합 plasmid를 추출한 후 제한효소 EcoRI을 반응시켜 screen을 실시하였으며(Fig. 6), 이들 결과로부터 실험에 사용한 담배내에 하나 이상의 PMT 유전자가 존재하는 것으로 예측되었다. Cloning 된

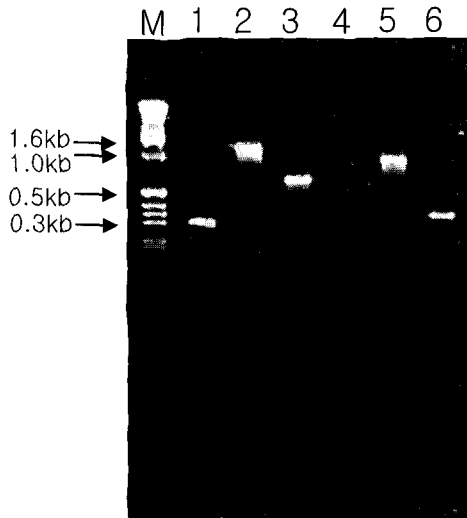


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis analysis of second PCR product to confirm the RT PCR product is not artifacts. RT PCR product was used as template (lane M: molecular size marker, lane 1: primer 1F-2R, lane 2: primer 1F-4R, lane 3: primer 1F-5R, lane 4: primer 3F-2R, lane 5: primer 3F-4R, lane 6: primer 3F-5R).

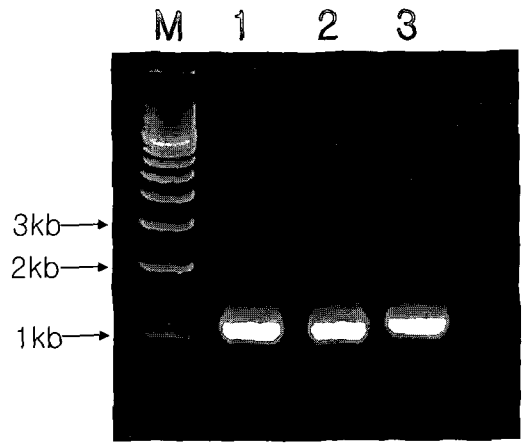


Fig. 5. Agarose gel(1.2%) electrophoresis analysis for confirming RT PCR products were inserted into vector. PCR was performed purified chimeric plasmid was used as template and primers 1F(5'-ggaagtcatactaccaacac-3') and 4R(5'-gactcgatcatac ttctggcg-3') were used. (lane M: molecular size marker, lane 1, 2, 3; PCR products).

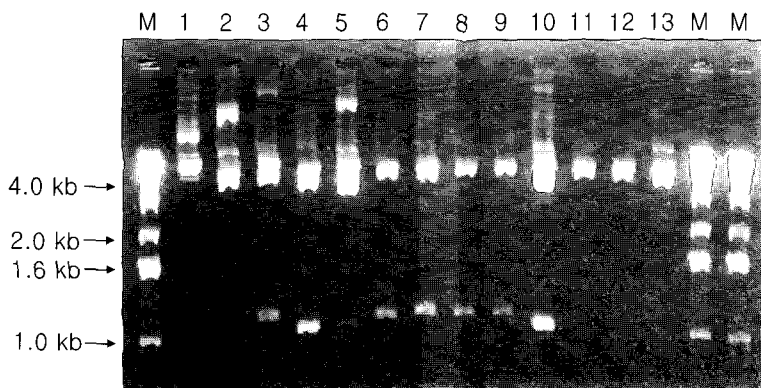


Fig. 6. Restriction enzyme digestion analysis of cloned cDNAs from burley tobacco. Equal amount of DNA were digested with the restriction enzyme *EcoRI*, and electrophoresed on 1.0% of agarose in TBE buffer (lane M:1kb ladder, lane 1:uncut control, lane 2, 11, 12, 13: blue colony control, lane 3-lane 10; white colony).

1	Group 1	--GGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AGTGGTGCCATTCCC	ATGAATGGCCACCAT	AATGGCACT-----	82
2	Group 2	--GGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AATGGTGCCATTCCC	ATGAACGGCCACCAA	AATGGCACTCTGTAA	88
3	PMT1	ATGGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AATGGTGCCATTCCC	ATGAACGGCCACCAA	AATGGCACTCTGTAA	90
4	PMT2	ATGGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AGTGGTGCCATTCCC	ATGAATGGCCACCAT	AATGGCACT-----	84
5	PMT3	ATGGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AATGGTGCCATTCCC	ATGAACGGCCACCAA	AATGGCACTCTGTAA	90
6	PMT4	ATGGAAGTCATATCT	ACCAACACAAATGGC	TCTACCATCTTCAAG	AATGGTGCCATTCCC	ATGAATGGCCACCAG	ATGGAAGTCATCTCAA	90
1	Group 1	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	112
2	Group 2	CACCTCAACGGCTAC	CAGAATGGCACTTCC	AAACACCAAAACGG	CACCAGAATGGCACT	TTCGAAATCGGAA	GCCTCCAGATGGG	176
3	PMT1	CACCTCAACGGCTAC	CAGAATGGCACTTCC	AAACACCAAAACGG	CACCAGAATGGCACT	TTCGAAATCGGAA	GCCTCCAGATGGG	180
4	PMT2	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	-----TCC	114
5	PMT3	CACCAAAAACGGCCAC	CAGAATGGCACTTCC	AAACACCAAAACGG	CACCAGAATGGGATT	TCCGAACACCAAAAC	GCCTCCAGATGGG	180
6	PMT4	CACCTCAACGGCTAC	CAGAATGGCACTTCC	AAACACCAAAACGG	CACCATAATGGCACT	TCCGAACATCGGAA	GCCTCCAGATGGG	180
1	Group 1	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	113
2	Group 2	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	179
3	PMT1	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	181
4	PMT2	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	A-----	115
5	PMT3	ACTTCCGA	-----	-----	-----	-----	-----	189
6	PMT4	ATTTCCGAACACCAA	AACGCCACCAGAAT	GGGACTTCCGAACAT	CGGAACGGCCACCAG	AATGGGATTTCCGAA	CACCAAAAACGGCCAC	270
1	Group 1	-----CT	-----CT	TCCGAAC-----	-----AACA	GAACGGGACAATCAG	CCTTGAATATGGCAA	156
2	Group 2	-----CA	-----CA	TCCGAAC-----	-----AACA	GAACGGGACAATCAG	CCATGACATATGGCAA	222
3	PMT1	-----CA	-----CA	TCCGAAC-----	-----AACA	GAACGGGACAATCAG	CCATGACATATGGCAA	224
4	PMT2	-----CA	-----CA	TCCGAAC-----	-----AACA	GAACGGGACAATCAG	CCTTGAATATGGCAA	158
5	PMT3	-----CA	-----CA	TCCGAAC-----	-----AACA	GAACGGGACAATCAG	CCATGACATATGGCAA	236
6	PMT4	CAGAATGGGACTTCC	GAACACAAAACGGC	CACCAGAATGGGACT	-----	-----	-----	356
1	Group 1	CGAGCTAC-----T	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	240
2	Group 2	CGAGCTAC-----T	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	308
3	PMT1	CGAGCTAC-----T	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	242
4	PMT2	CGAGCTAC-----T	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	326
5	PMT3	CGAGCTACAGCTACT	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	326
6	PMT4	CGAGCTAC-----T	GGGAAGCTCCAATTG	TATTAAGCCTGGTTG	GTTTTCAGAGTTTAG	CGCATTATGGCCAGG	TGAAGCATCTCTACT	440
1	Group 1	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	330
2	Group 2	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	396
3	PMT1	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	398
4	PMT2	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	332
5	PMT3	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	416
6	PMT4	TAAGGTTGAGAGAGTT	ACTGTTCCAGGGGAA	GTCTGACTACCAAGA	TGTCATGCTCTTTGA	GTGAGCAACTTATGG	GAAGGTTCTGACTTT	530
1	Group 1	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	420
2	Group 2	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	486
3	PMT1	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	488
4	PMT2	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	422
5	PMT3	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	506
6	PMT4	GGATGGAGCAATTC	ACACACAGAGAATGG	TGGAATTTCCATAC	TGAAATGATTGTTC	TCTTCCACTTGGTTC	CATCCCAACCCAAA	620
1	Group 1	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	510
2	Group 2	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	576
3	PMT1	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	578
4	PMT2	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	512
5	PMT3	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	596
6	PMT4	AAAGGTTTTGATCAT	CGGGGAGGAAATGG	TTTTACATTAITCGA	AATGCTTCGTTATCC	TACAATCGAAAAAT	TGACATGTTGAGAT	710
1	Group 1	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	600
2	Group 2	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	666
3	PMT1	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	668
4	PMT2	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	602
5	PMT3	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	686
6	PMT4	CGATGACGTGGTAGT	TGATGTATCTAGAAA	ATTTTTCCCTTATCC	GGCAGCTAATTTTAA	CGATCTCGGTGAAC	CCTAGTCTTGGAGA	890
1	Group 1	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	600
2	Group 2	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	756
3	PMT1	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	758
4	PMT2	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	692
5	PMT3	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	776
6	PMT4	TGGGGCTGCAATTTG	AAAGGCTGCACAAGC	AGAAATATTATGATC	TATTATAGTGGACTC	TCTGATCCCATTTGG	TCAGCAAAAAGATT	890
1	Group 1	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	780
2	Group 2	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	846
3	PMT1	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	848
4	PMT2	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	782
5	PMT3	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	866
6	PMT4	GTTTGAGAGGCCATT	CTTTGAGGCAAGTAC	TAAAGCCCTAAGGCC	AGGAGGAGTTGTATG	CACACAGGCTGAAAG	CATTTGGCTTCATAT	980
1	Group 1	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	870
2	Group 2	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	936
3	PMT1	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	938
4	PMT2	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	872
5	PMT3	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	956
6	PMT4	GCATATATTAAAGCA	AATCATTTGCTAACTG	TCGTCAAGTCTTTAA	GGGCTCTGTCAACTA	TGCTTGGACTACTGT	TCCACATATCCCAAC	1070
1	Group 1	CGGTGTGATGGTTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	960
2	Group 2	CGGTGTGATGGTTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	1026
3	PMT1	CGGTGTGATGGTTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	1028
4	PMT2	CGGTGTGATGGTTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	962
5	PMT3	CGGTGTGATGGTTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	1046
6	PMT4	TGTTGATTAATGGTA	TATGCTCTGCTCTAC	TGAAGGACCCAGAAT	TGACTTCAAGAAATCC	AGTAAATCCAAATTA	CAAAGAGACAACCTA	1160
1	Group 1	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1050
2	Group 2	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1116
3	PMT1	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1052
4	PMT2	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1136
5	PMT3	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1250
6	PMT4	AGTCAAGTCCAAAT	AGCACCTCTCAAGTT	CTACAACCTCTGATAT	TCACAAGGACGACTT	CATTTTGGCATCTTT	CGCCAGAAGTATGAT	1250

Fig. 7. Alignment of the nucleotide sequence of PMT genes from Burley tobacco with those of PMT genes from Xanthi tobacco. Sequence data were obtained from GeneBank, listed and aligned using ClustalW.

insert의 크기 및 PCR 결과의 pattern에 따라 각각 group 1, group 2, group 3, group 4 및 group 5 등으로 명명하고 이들을 각각 다음 실험에 사용하였다.

PMT cDNA의 염기서열분석 : PMT의 cDNA로 예상되는 insert를 포함한 group 1, group 2, group 3 및 group 4 plasmid를 T7, SP6, M13reverse, M13forward primer를 이용하여 염기서열을 분석하였으며, 분석결과 얻어진 염기서열을 이용하여 primer를 제작하여 나머지 부분의 염기서열도 완성하였다. 분석완료된 염기서열은 ClustalW을 통해 Genebank에 보고된 PMT 유전자들 염기서열들과 비교하였는데 이중 group 2가 Common tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Br21)에서 이미 밝혀진 PMT(Hibi, 1994)인 것으로 밝혀졌으며, group 3는 group 2의 일부분이므로 실험에서 제외하였다. group 1 과 4는 Hibi 등(1994)이 밝혀 보고한 PMT와는 그 서열이 매우 다른 흥미로운 결과를 보여주었으므로 이들을 Hibi등의 PMT외에 다른 품종 및 종의 PMT 서열을 database로부터 얻어 비교하였는데, 그 결과 group 1은 각각 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi의 PMT 2 (Riechers and Timko, 1999)와 동일함이 밝혀졌으며(Fig. 7), group 4의 염기서열은 PMT 3와 동일한 것으로 생각되었다. 이와 같은 결과는 *Nicotiana tabacum* cv. Br21은 *N. longiflora* 및 *N. glutinosa* 등 *Nicotiana* 속의 다른 종과 교배하여 얻어진 품종임에도 기존에 알려진 PMT 이외에 최소한 2개 이상의 다른 PMT가 존재한다는 사실을 보여주고 있으며 그리스 Xanthi 지방에서 전통적으로 재배되어 온 *N. tabacum* cv. Xanthi 품종의 그것과 유전적으로 매우 잘 보존되어 있음을 보여주는 흥미로운 결과이다. 그러나 본 실험에서 Xanthi tobacco에서 알려진 PMT 3에 대하여 보다 자세한 분석이 필요하며, PMT 4는 발견하지 못하였으므로 향후 이에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다. 또한 PMT 유전자는 nicotine 등 alkaloid의 생합성에 key enzyme이므로 담배내 nicotine 함량을 조절하고자 하는 연구에 매우 유용할 것으로 사료되는 바, 특히 버어리종을 대상으로 하여 nicotine 함량

에 관한 연구를 진행할 때 기존에 밝혀진 PMT 이외에 새로 밝혀진 PMT들에 대한 고려가 함께 진행되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

Nicotine 생합성을 유도하기 위하여 꽃봉오리를 제거하는 스트레스를 가한 *Nicotiana tabacum* cv. Br21 식물체로부터 추출한 mRNA로부터 RT PCR에 의해 nicotine 생합성의 key enzyme인 putrescine N-methyltransferase의 유전자를 cloning하였다. Cloning된 유전자의 크기 및 PCR 결과물의 전기영동 pattern이 기존에 버어리종 담배에서 알려진 PMT와 다른 것이 있음을 발견하고 이를 분석한 결과 기존 밝혀진 버어리종 담배의 PMT와 상이한 새로운 PMT가 존재함이 밝혀졌다. 이 PMT는 기존에 Xanthi tobacco에서 보고된 PMT2 및 PMT3와 동일하였으며 그 결과는 *N. longiflora* 및 *N. glutinosa* 등 *Nicotiana* 속의 다른 종과 교배하여 얻어진 품종인 Burley 21에도 기존에 알려진 PMT 이외에 최소한 2개 이상의 다른 PMT가 존재한다는 사실을 보여주고 있으며 *N. tabacum* cv. Xanthi 품종의 그것과 유전적으로 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있다. 버어리종에서도 PMT 4가 존재할 수 있는 가능성을 보여주고 있으며 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다. 이상과 같은 결과는 향후 PMT 유전자를 이용하여 nicotine 등 alkaloid의 생합성에 관한 연구를 수행하는데 매우 중요한 정보가 될 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

- De Luca, V. (1993) Enzymology of indole alkaloid biosynthesis. In *Method in Plant Biochemistry*, ed. PM Dey, JB Harborne, London. Academic 9: 345-368.
- Fumihiko, S., Takashi, H., Akira, H., Kenichi, T., Choi, K.B., Takashi, M., Hideki, F. and Yasuyuki, Y. (2001) *Metabolic engineering of*

- plant alkaloid biosynthesis *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol98, No.1:367-372.
- Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1992) Tropane alkaloid biosynthesis : regulation and application. In Pro. 7th Annu. Ponn. state Symp. Plant Physiol. Rockville : Amm. Soc. Plant Physiol. Press. 122-134.
- Hashimoto, T. and Yamata, Y. (1993) Nicotine and tropane alkaloids. *J. Plant Res.* Special Issue. 3 : 369-379.
- Hibi, N. (1994) Ph D. Thesis, Biochemical and molecular analysis of putrescine N-methyltransferase in plants. Kyoto university, Kyoto, Japan.
- Hibi, N., Higashiguchi, S., Hashimoto, T. and Yamada, Y. (1994) Gene expression in tobacco low nicotine mutants. *Plant Cell* 6: 723-735.
- Kinnersley, A. M. and Dougall, D. K. (1980) Correlation between the nicotine content of tobacco plants and callus cultures. *Planta* 149: 205-206.
- Riechers, D. E. and Timko, M. P. (1999) Structure and expression of the gene family encoding putrescine N-methyltransferase in *Nicotiana tabacum*: new clues to the evolutionary origin of cultivated tobacco. *Plant Mol. Biol.* 41(3):387-401.
- Saitoh, F., Noma, M. and Kawashima, N. (1985) The alkaloid contents of sixty *Nicotiana* species. *Phytochemistry* 24: 477-480.
- Tiburcio, A. F., Ingersoll, R. and Galston, A. W. (1985) Modified alkaloid pattern developing tobacco callus. *Plant Sci.* 38: 207-212.
- Tiburcio Pinol M. T. and Serrano M. (1985) Effect of UV-C on growth, soluble protein and alkaloids in *Nicotiana rustica* plas. *Environ. Exp. Bot.* 25: 203-210.
- Winz, R. A. and Baldwin, I. T. (2001) Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-Induced ethylene reduces jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransferase transcripts. *Plant Physiol.* 125(4): 2189-2202.
- 이상하, 민영근 (1987) 담배과학 총설, 한국연초학회, 제일문화사, 한국
- 한국인삼연초연구소 (1983) 담배품종도감, 한국인삼연초연구소, 고려서적주식회사, 한국