

석사학위논문

Ecdysteroids 생합성 관련

식물 유전자 탐색



제주대학교 중앙도서관  
제주대학교 대학원 LIBRARY

농화학과

부 경 환

1999년 12월

# Ecdysteroids 생합성 관련 식물 유전자 탐색

지도교수 류 기 중  
부 경 환

이 논문을 농학 석사학위 논문으로 제출함



부경환의 농학 석사학위 논문을 인준함

심사위원장 : \_\_\_\_\_ (인)

위 원 : \_\_\_\_\_ (인)

위 원 : \_\_\_\_\_ (인)

제주대학교 대학원

1999년 12월

**Screening of Plant Genes  
Related with Ecdysteroids Biosynthesis**

Kyung-Hwan Boo

(Supervised by Professor Key-Zung Riu)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE  
OF MASTER OF AGRICULTURE.

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1999. 12

# 목 차

## Summary

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. 식물재료	4
2. Degenerate primer 설계	4
3. RNA 추출	4
4. RT-PCR	5
5. cDNA cloning	6
6. DNA 염기서열 결정	9
7. 상동성 조사	10
III. 결과 및 고찰	
1. Degenerate primer	11
2. Partial cDNA cloning	15
3. Partial cDNA의 염기 및 아미노산 서열	20
4. cDNA clone과 타 유전자간의 상동성	24
IV. 요약	28
V. 참고문헌	29



제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

## Summary

In order to isolate genes related with ecdysteroids biosynthesis in plants, partial cDNAs were cloned from the total RNA of *Achyranthes japonica* Nakai using RT-PCR and sequence homologies of bases and amino acids were analyzed between the cloned cDNAs and other cytochrome P450 family gene which are known to be involved in ecdysteroids biosynthesis.

1. Nine degenerate primers were synthesised based on the homologous base sequences which were selected from the results of multialignment of five cytochrome P450 genes from plants and a putative ecdysone 20-hydroxylase gene from an insect.

2. DNA fragments of which sizes are similar to those expected to be generated from cytochrome P450 genes were successfully amplified from the single strand cDNA library when two degenerate primers among nine were used in PCR.

3. The partial cDNAs obtained from PCR with degenerate primers were reconstructed in pGEM-T Easy vector, transformed into *E. coli* and nucleotide sequences were determined. Fourteen partial cDNA clones showing unique base sequences were obtained.

4. Six clones of the partial cDNAs among fourteen showed homology at the level of amino acid sequence to the other cytochrome P450s which are known to be involved in ecdysteroids biosynthesis. Of the six clones showing homology to cytochrome P450 genes, four clones showed relatively high homology to a putative ecdysone 20-hydroxylase gene isolated from insect.

# I. 서론

Ecdysteroids는 곤충의 탈피를 촉진하는 활성을 가지고 있어서 곤충탈피호르몬으로 불리고 있다 (Fukuda, 1944). Ecdysteroids는 곤충에서 처음 단리 되었지만 (Butenandt & Kalson, 1953) 나중에 식물에서도 단리 되었는데 (Nakanishi, 1966) 그 함량은 곤충보다 오히려 많은 것으로 알려져 있다 (Chou와 Lu, 1980).

Ecdysteroids 생합성 과정에 대해 곤충에서는 비교적 많이 연구되었으나 식물에서는 많이 연구되어 있지 않다. 곤충에 있어서 ecdysteroids는 cholesterol로부터 합성되는데 (Rees, 1985) 곤충은 cholesterol을 생합성할 수 없기 때문에 식물에서 sitosterol, stigmasterol, campesterol등을 섭취한 후 탈알킬화 과정을 거쳐 cholesterol을 생합성하고 있다 (Ikekawa, 1985; Rees, 1985, 1989).

곤충에서 ecdysteroids는 cholesterol이 여러 단계의 수산화 과정을 거쳐 합성되는 것으로 알려져 있다. Cholesterol은 산화, 환원과정을 반복하면서 수산화되어 7-hydroxycholesterol, 7-dehydrocholesterol, 7-dehydrocholesterol 5,6  $\alpha$ -epoxide, 5 $\beta$ -diketol, 5 $\beta$ -ketodiol, 3-dehydro-5 $\beta$ -ketotriol, 5 $\beta$ -ketotriol, 3-dehydro-2-deoxyecdysone, 2-deoxyecdysone, 3-dehydroecdysone 등의 중간체를 거쳐 최종적으로 ecdysone과 20-hydroxyecdysone이 생합성된다 (Grieneisen, 1993). 식물에서도 mevalonic acid에서 squalene을 거쳐 형성된 cholesterol에서 곤충과 유사한 과정으로 수산화되어 ecdysone과 20-hydroxyecdysone등이 생합성되는 것으로 추정하고 있으나 중간체들은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다 (Grebenok & Adler, 1993).

Ecdysteroids의 생합성에는 cytochrome P450 family에 속하는 효소들이 관여하는 것으로 알려져 있는데 이 계열의 효소들은 곤충 (*Manduca sexta*)에서 ecdysteroids 생합성 과정 중 cholesterol의 7,8-dehydrogenation에 관여하는 것으로 밝혀져 있고 (Grieneisen, 1992; Grieneisen et al., 1993), cholesterol의 마지막 수산화 과정인 C-25, -22, -2 위치의 수산화에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Kappler et al., 1986, 1988, 1989). 또한 곤충의 ecdysteroids 생합성 과정 중 ecdysone이 20-hydroxyecdysone ( $\beta$ -ecdysone 또는 ecdysterone으로 불리기도 함)으로 수산화되는 단계에

관여하는 ecdysone 20-monooxygenase도 cytochrome P450으로 보고되어 있다 (Smith, 1985). 식물 (*Spinacia oleracea*)에서도 ecdysone 20-monooxygenase가 cytochrome P450임이 밝혀져 있다 (Grebek, 1996). 그리고 ecdysteroids와 구조적으로 유사한 brassinosteroid의 생합성 경로가 식물에서 자세하게 밝혀져 있는데, 이 brassinosteroid 생합성도 반복적인 수산화 과정을 거치 이루어지며 이 과정에도 역시 cytochrome P450이 관여하는 것으로 알려져 있다 (Choe et al., 1998). 이러한 cytochrome P450은 NADPH와 O<sub>2</sub>에 의존적으로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Chapple, 1998).

Ecdysteroids의 생합성에 관여하는 유전자는 근래까지 분리되지 못하였으나 1999년 곤충 (*Locusta migratoria*)에서 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 cytochrome P450 family 유전자 (542개의 아미노산 서열)가 처음으로 클로닝 되었고 (Winter et al., 1999), 식물 (spinach)에서는 1998년 ecdysteroids의 생합성에 관여하는 것으로 추정되는 cytochrome P450 family의 부분 유전자 (65개의 아미노산서열)가 클로닝 되었다 (Galbraith, 1998).

Cytochrome P450 family 유전자 클로닝은 1988년 이후에 급격하게 증가하였으며 (Daniel et al., 1991) 식물에서는 근래에 기능이 확인된 cinamate 4-hydroxylase가 클로닝된 이후 증가하고 있다 (Holton & Lester, 1996). 기능이 확인된 대부분의 식물 cytochrome P450 family 유전자는 단백질을 정제하고 분석하여 유추한 DNA나 RNA 염기서열에 의해서 클로닝 되었는데 cytochrome P450 단백질은 불안정하고, 특정조직에서 양적인 한계가 있고, 소화효소나 활성저해물질의 방해도 문제가 되어 분리하기가 어렵다. 특히, 식물에서 cytochrome P450은 막단백질로 알려져 있어서 분리 및 정제가 더욱 어려울 뿐 아니라 활성을 유지하기가 어렵다. 따라서 DNA나 RNA에서 유전자를 클로닝하는 molecular cloning 방법이 많이 이용되고 있다. 하지만 molecular cloning을 위해서는 probe를 찾아야 하는데 probe를 찾는 것도 그리 쉬운 일만은 아니다 (Snyder et al., 1996). 최근에는 cytochrome P450 family 유전자들이 많이 알려졌기 때문에 이들의 염기서열을 토대로 PCR 기법을 이용하는 효율적인 방법이 이용되고 있다. 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.

본 실험은 ecdysteroids를 생합성하는 것으로 알려진 쇠무릎 (*Achyranthes japonica* Nakai)으로부터 ecdysteroids 생합성에 관련된 식물 유전자를 선별하고자 시도하였다. 유전자 탐색에는 degenerate primer를 이용한 RT-PCR 방법을 사용하였으며, degenerate primer는 ecdysteroids 생합성 관련 유전자 및 cytochrome P450 family 유전자들의 상동부위를 이용하여 설계하였다. 그리고 쇠무릎에서 전체 RNA를 분리하여 단일가닥 cDNA library를 제작한 후 degenerate primer를 사용하여 유전자들을 screening 하였다. 이렇게 하여 선별된 부분 유전자의 염기서열을 분석한 후 ecdysteroids 생합성 관련 유전자 및 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성을 조사하고 상동성이 높은 부분 유전자를 클로닝하였다.





## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

1998년 12월 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, ecdysteroids 함량이 2600  $\mu\text{g/g}$  (wt/dry wt)으로 다른 식물보다 함량이 높은 것으로 평가되어 쇠무릎 유묘를 전체 RNA 추출에 이용하였다.

### 2. Degenerate primer 설계

Degenerate primer를 설계하기 위하여 우선 GeneBank Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)를 검색하여 각기 다른 식물의 cytochrome P450 family 유전자 3개와 steroid hydroxylase로 알려진 식물 유전자 1개 그리고 곤충의 ecdysteroids 생합성 관련 유전자 1개를 선정하였다. 선정된 유전자의 FASTA format으로 된 아미노산 서열을 CODHOPE의 Block Maker 프로그램 (<http://blocks.fhcrc.org/blockmkr-bin/makeblocks.pl>)과 Dialign 2 프로그램 ([http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign2\\_submit](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/dialign2_submit)) 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.

### 3. RNA 추출

전체 RNA의 추출은 Puissant 와 Houdebine (1990)의 guanidium-thiocyanate-ph

enol-chloroform방법을 사용하였다.

식물체 0.1 g을 취하여 막자사발에서 액체질소를 가하여 잘 마쇄한 후 원심분리관에 옮기고 denaturing 용액 [4.0 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium acetate (pH 7.0), 0.5% sodium N-lauroysarcosine, 0.1 M 2-mercaptoethanol] 0.5 ml를 첨가하여 잘 혼합하였다. 혼합액에 2 M sodium acetate (pH 4.0) 100  $\mu$ l와 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)를 동량 넣고 혼합한 후 15분 동안 얼음에 방치하였다. 4°C, 10,000  $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 새로운 원심분리관에 옮기고, 동량의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 12시간 동안 방치하여 RNA를 침전시켰다. 이 시료를 4°C, 10,000  $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 얻은 RNA pellet에 denaturing 용액 500  $\mu$ l를 넣어 재현탁 시킨 후 앞의 과정을 반복하였다. 다시 원심분리하여 RNA pellet을 얻은 후 차가운 75% 에탄올로 세척하였다. RNA pellet을 실온에서 15분간 건조시킨 후 DEPC (diethyl pyrocarbonate)로 처리된 증류수에 녹여 -70°C에 보관하였다. RNA 정량은 spectrophotometer (Perkin-Elmer, Germany)에서 260 nm의 흡광도를 측정하여 계산하였고, 시료 중 A260/A280 nm의 비율이 1.5 - 2.0 범위내의 값을 갖는 RNA만을 cDNA 합성에 사용하였다.



## 4. RT-PCR

### 4-1. Reverse transcription

단일가닥 (single strand) cDNA는 쇠무릎 유묘에서 분리한 전체 RNA로부터 M-MuLV-Reverse-Transcriptase (MBI, U.S.A.)를 이용하여 합성하였다. 단일가닥 cDNA 합성 primer는 mRNA의 poly A tail에 상보적인 oligo dT (18mer)에 임의의 27mer 서열을 연결한 45mer의 염기서열을 사용하였다 (Table 1). 임의의 27mer 서열은 다음 과정의 cDNA 증폭을 위한 PCR에 reverse primer서열로 사용하기 위해 추가하였다. 단일가닥 cDNA 합성을 위하여 전체 RNA를 1 - 5  $\mu$ g 취한 후 100 pmol의 primer를 1  $\mu$ l 첨가하여 70°C에 5분간 반응시키고, 5 $\times$  reaction buffer 4  $\mu$ l와 10 mM dNTP 2  $\mu$ l를 첨가, 총 부피가 18  $\mu$ l가 되도록 탈이온수를 첨가하여 3

7℃에 5분간 반응시켰다. 이 반응물에 M-MuLV reverse transcriptase 40 units를 첨가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 이후 반응을 중지시키기 위해서 70℃에서 10분간 방치하였다가 얼음에서 식힌 후 -70℃에 보관하면서 PCR 반응에 template로 사용하였다.

Table 1. A primer used for construction of single strand cDNA library.

Primer	Sequence	Size
cDNA합성 primer (CP)	5' CAG GAA TTC GGG CAC TCG AGC TCA AGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'	45mer

#### 4-2. PCR

PCR에는 *Taq* DNA polymerase kit (MBI, U.S.A.)를 이용하였으며 10× PCR buffer 5 μl, 10 mM dNTP 5 μl, 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℃에서 30초간, annealing 과정을 30초간, extension 과정을 72℃에서 1분간으로 하여 총 30 cycle을 수행하였다. PCR 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

### 5. cDNA cloning

RT-PCR 산물의 서로 다른 단편 각각을 클로닝하기 위하여 pGEM-T Easy Vector (Promega, U.S.A.)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. RT-PCR 산물을 vector에 삽입하는 ligation 반응은 RT-PCR products 50 ng, 2× rapid ligation buffer 5  $\mu$ l, pGEM-T Easy Vector 50 ng, T4 DNA ligase (3 units /  $\mu$ l) 1  $\mu$ l를 잘 혼합한 후 총 부피가 10  $\mu$ l가 되도록 탈이온수를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다.

Ligation 반응물을 증폭하기 위하여 XL I - blue competent cell을 이용한 transformation을 실시하였으며, 유전자가 클로닝된 vector를 선별하기 위하여 X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside, Promega, U.S.A.)과 IPTG (isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside, Promega, U.S.A.)를 이용한 white/blue 콜로니 선별을 실시하였다. Transformation은 XL I - blue competent cell을 20 mM CaCl<sub>2</sub> 200 - 300  $\mu$ l에 현탁시킨 후 ligation 반응물을 첨가하여 얼음에 30분간 두었다가 42°C에서 90초간 transformation을 실시하여 LB 액체배지 1 ml을 첨가하고 37°C에서 50분간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액을 버리고 LB 액체배지 100  $\mu$ l에 잘 현탁시켰다. Ampicilline 50 ppm이 첨가된 LB plate에 X-Gal (100 mg / 5 ml dimethyl formamide) 50  $\mu$ l, IPTG (1 g / 50 ml H<sub>2</sub>O) 50  $\mu$ l와 현탁액을 도말한 후 37°C에서 배양하였다. white/blue 콜로니가 형성되면 그 중 하얀 콜로니를 선별하여 그 각각을 ampicilline 50 ppm이 첨가된 LB 액체배지 5 ml에 하룻밤 현탁배양하였다.

현탁배양한 LB 배지 1.5 ml를 취한 후 4°C에서 10,000 ×g로 30초 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거하여 얻은 pellet에 차가운 용액 I [50 mM glucose, 25 mM Tris.Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)] 100  $\mu$ l을 첨가하여 교반한 후, 용액 II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200  $\mu$ l를 첨가하여 혼합하고, 용액 III (5 M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, H<sub>2</sub>O 28.5 ml) 150  $\mu$ l 첨가하여 혼합하였다. 3 - 5분 동안 얼음에 방치하였다가 4°C에서 5분 동안 10,000 ×g로 원심분리하여 상등액을 취한 후 에탄올을 이용하여 침전시켰다. 4°C에서 10,000 ×g로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후 70% 에탄올 1 ml를 가하여 DNA pellet을 세척하고 상등액을 제거하여 잘 건조시켰다. 여기에 TE buffer (pH 8.0) 50  $\mu$ l를 첨가한 후 pellet을 녹여 plasmid DNA를 얻었다.

현탁배양한 LB 배지에서 분리, 정제한 plasmid DNA의 클로닝 여부를 확인하기 위하여 pGEM-T Easy Vector의 EcoR I 부위를 절단한 후 insert를 확인하였다

(Fig. 1). 제한효소 처리에는 EcoR I restriction enzyme kit (MBI, U.S.A.)를 이용하였다. 절단반응은 plasmid DNA 10  $\mu$ l, 10 $\times$  buffer Y+ / TANGO TM 4  $\mu$ l, EcoR I restriction enzyme 2  $\mu$ l (10 units /  $\mu$ l)를 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 반응시킨 후 반응을 불활성화 시키기 위해서 65 $^{\circ}$ C에 20분간 두었다. 이 반응물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 클로닝 여부 및 그 크기를 확인하였다.

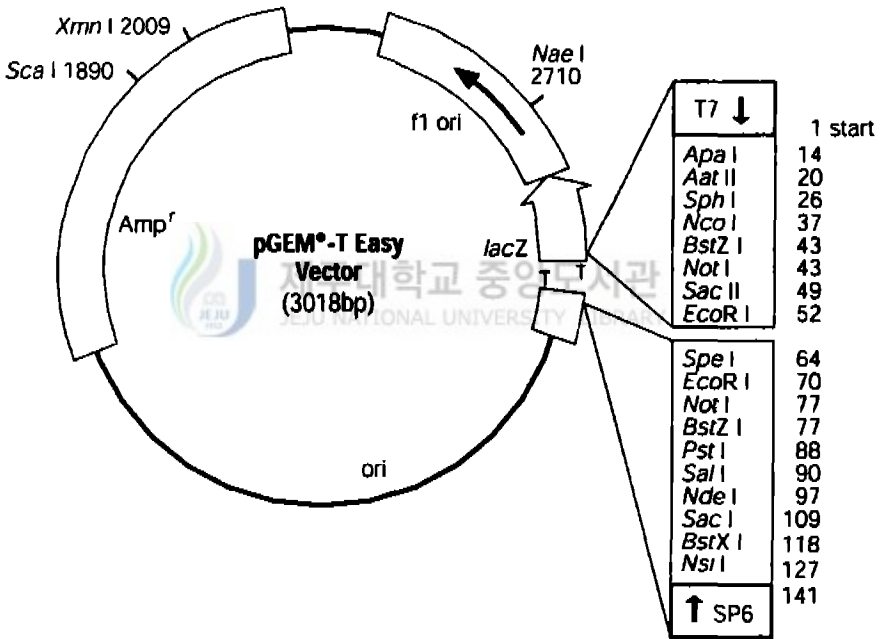


Figure 1. pGEM T-Easy Vector circle map.

## 6. DNA 염기서열 결정

DNA 클론의 염기서열 결정에는 chain termination 방법 (Sambrook et al., 1989)을 이용하였으며, ALFexpress AutoCycle Sequencing Kit (Pharmacia Biotech, U.S.A.)를 사용하였다.

Sequencing 반응에는 DNA template 4  $\mu\text{g}$ , reaction buffer 2  $\mu\text{l}$ , dNTP 5  $\mu\text{l}$ , DMSO 2  $\mu\text{l}$ , cyanine-labelled primer (2.5 pmol /  $\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 후 총 부피가 16  $\mu\text{l}$  되도록 탈이온수를 첨가하고, *Taq* DNA polymerase 2  $\mu\text{l}$  (1.25 units /  $\mu\text{l}$ )를 혼합하였다. 혼합액을 ddNTP (A, C, G, T) 2  $\mu\text{l}$ 가 각각 첨가된 4개의 원심분리관에 4  $\mu\text{l}$ 씩 나누어 넣은 다음 반응을 수행하였다. Sequencing 반응 primer는 ALFred M13-40 forward primer 또는 ALFred M13 reverse primer를 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.

아래는 sequencing 반응에 사용한 primer의 염기서열을 나타낸다.

ALFred M13-40 forward primer 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'  
ALFred M13 reverse primer 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

반응을 중지시키기 위해서 중지용액 (Deionized formamide/blue dextran)을 각각 4  $\mu\text{l}$  첨가한 후 95°C에 2-3분 반응시키고 얼음에서 식힌 후 sequencing gel에 주입하여 염기서열을 결정하였다.

Sequencing gel 조제에는 urea 28 g, acylamide/bisacylamide final 6%, 10 $\times$  TBE buffer 8 ml, 10% ammonium persulfate 400  $\mu\text{l}$ , TEMED 40  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 후 총 부피가 80 ml이 되도록 탈이온수를 첨가하여 만든 6% acylamide/bisacylamide gel를 사용하였으며 sequencing 기기는 ALFexpress Auto Sequencer (Pharmacia Biotech, U.S.A.)를 사용하였다.

## 7. 상동성 조사

DNA와 아미노산 서열의 상동성 조사는 NCBI의 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 이용하여 실시하였으며, 아미노산 수준에서의 상동성 조사를 위한 DNA 염기서열의 translation은 Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) 프로그램의 translation tool을 이용하였다. 또한 클로닝된 유전자들은 부분 유전자이기 때문에 특정 부분의 서열을 반복하여 상동성 조사하는 PSI-Blast ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi\\_blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-psi_blast))도 이용하였다.

NCBI의 Blast와 PSI-Blast 프로그램의 상동성 조사를 통하여 cytochrome P450 family 유전자들과 상동성이 있는 것으로 확인된 유전자들을 degenerate primer 설계시 선택하였던 5가지 유전자의 부분적인 아미노산 서열과 다중정렬 한 후 상동성 정도를 분석하였으며 다중정렬에는 Dialign 2와 GeneDoc 프로그램을 이용하였다. 그리고 다중정렬 결과에 따라 상동성 정도를 완전히 일치하는 아미노산 서열, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 및 gap의 비율로 나타내어 상대평가하였다.



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. Degenerate primer

RT-PCR에 사용할 degenerate primer를 설계하기 위하여 GeneBank Entrez를 검색하여 현재까지 알려진 유전자중 서로 다른 식물의 cytochrome P450 family 유전자 3개 (1, 2, 4), ecdysteroids와 구조적으로 유사한 brassinosteroid 생합성에 관여하는 것으로 알려진 식물 유전자 1개 (3), 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자 (5) 1개를 선정하였다. 이렇게 cytochrome P450 family 유전자들을 선정한 것은 식물에 있어서 ecdysteroids 생합성에 관여하는 유전자 염기서열에 대해서는 알려진 것이 없지만, 효소 수준에서 cytochrome P450이 관여하는 것으로 알려져 있기 때문이었다.

Degenerate primer 설계에 사용된 유전자들은 다음과 같다.

- 1) *Lycopersicon esculentum* cytochrome P450 homolog ; *dwarf* (gi 1421741)
- 2) *Arabidopsis thaliana* cytochrome P450 ; *DWAR* (gi 1076315)
- 3) *Arabidopsis thaliana* steroid 22- $\alpha$ -hydroxylase ; *DWF4* (gi 2935342)
- 4) *Zea mays* cytochrome P450-mediated early step in Gibberellin biosynthesis ; *DWARF3* (gi 987267)
- 5) *Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase ; (gi 5106554)

5가지 유전자의 상동부위를 찾기 위하여 CODHOPE의 Block Maker 프로그램과 Dialign 2 프로그램 및 GeneDoc 프로그램을 이용하여 다중정렬을 실시한 후 상동성이 높은 4부위를 선정하였다 (Fig. 2). 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 설계하



였는데 (Table 2의 DPS 1 ~ DPS 9), 아미노산 서열의 degeneracy를 고려하여 하나의 코돈에 해당하는 세 개의 염기 중 마지막 하나의 염기가 높은 상동성을 보이지 않을 때는 어떤 염기와도 결합 가능한 inosine을 사용하였다.



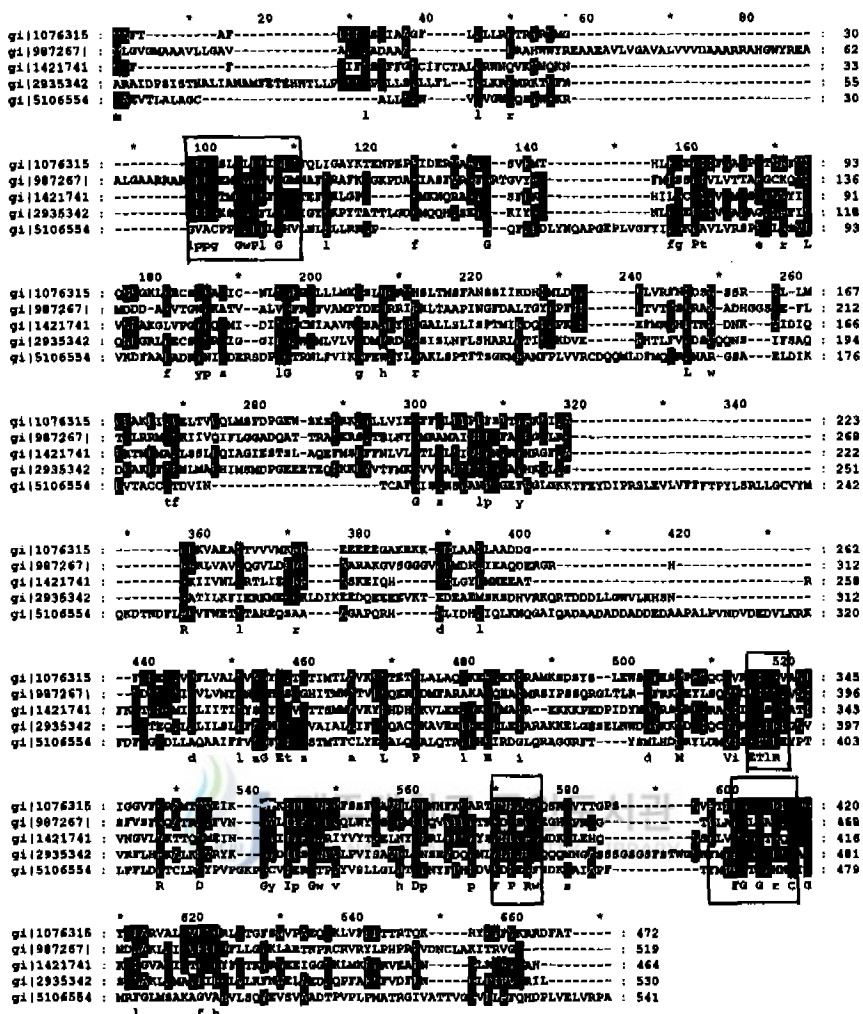


Figure 2. Multialignment of amino acid sequence of plant cytochrome P450s and putative insect ecdysone 20-hydroxylase using GeneDoc program.

- gi|1421741 - *Lycopersicon esculentum* ; dwarf
- gi|1076315 - *Arabidopsis thaliana* ; DWAR
- gi|2935342 - *Arabidopsis thaliana* steroid 22-alpha-hydroxylase ; DWF4
- gi|987267 - *Zea mays* ; DWARF3
- gi|5106554 - *Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase

Table 2. Degenerate primer sequences designed based on the homology site of plant cytochrome P450s and a putative insect ecdysone 20-hydroxylase.

Degenerate primer	Sequence	Size
<b>Forward primer</b>		
Homology site	Leu - Pro - Pro - Gly - X - X - Gly - Trp - Pro	
Primer (DPS 1)	5' CTG CCT CCG GGT AAA ATG GGT TGG CC 3'	26mer
Homology site	Gly - Trp - Pro	
Primer (DPS 2)	5' GGW TGG CCW YTN CTN GG 3'	17mer
Primer (DPS 3)	5' GC CCA CCA GGC TGG CCN YTN 3'	20mer
Homology site	Glu - Thr - Leu - Arg	
Primer (DPS 4)	5' GTC ATH WAC GAR ACN CTN CG 3'	20mer
Primer (DPS 5)	5' TGG GTG ATC TCC GAR ACN YTY TN 3'	23mer
Homology site	Phe - Asn - Pro - Trp - Arg - Trp	
Primer (DPS 6)	5' TTT AAT CCT TGG AGA TGG 3'	18mer
Homology site	Phe - Gly - Gly - Gly - X - Arg - Leu - Cys	
Primer (DPS 7)	5' TTT GGA GGA GGG CCA AGI CTI TGT 3'	24mer
Homology site	Tyr - Met - Pro - Phe - Gly - Gly - Gly	
Primer (DPS 8)	5' TAC ATG CCN TTN GGN RBN GG 3'	20mer
<b>Reverse primer</b>		
Homology site	Phe - Gly - Gly - Gly - X - Arg - Leu - Cys	
Primer (DPS 9)	3' AAA CCI CCI CCC GGT TCC GAT ACA 5'	24mer
Primer (DPS 10)	3' CGA ACT CGA GCT CAC GGG CTT AAG GAC 5'	27mer

## 2. Partial cDNA cloning

### 2-1. 전체 RNA 분리

쇠무릎의 유묘에서 전체 RNA를 추출하여 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 결과 Fig. 3.에서 같이 28S와 18S ribosomal RNA가 확인되어 전체 RNA가 추출된 것을 알 수 있었으며 (Farrel, 1993), 이를 단일가닥 cDNA 합성에 이용하였다.

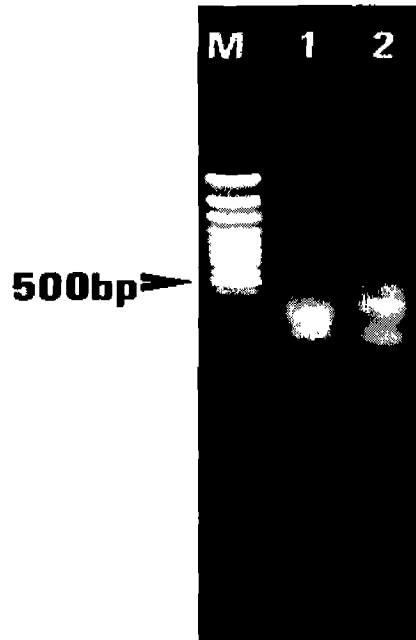


Figure 3. Agarose gel electroporesis of total RNA extract from seedlings of *A. japonica*.

## 2-2. RT-PCR

단일가닥 cDNA library에서 cytochrome P450 family 유전자의 screening을 위하여 forward primer로서 cytochrome P450 family 유전자의 상동부위를 이용하여 제작한 8개의 degenerate primer (Table 2의 DPS 1 - 8)를 사용했고, reverse primer로는 cytochrome P450 family 유전자의 상동부위를 이용하여 제작한 1개의 degenerate primer (Table 2의 DPS 9)와 단일가닥 cDNA 합성시 oligo dT에 연결한 27mer의 서열을 이용하여 제작한 primer (Table 2의 DPS 10)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, heme binding 영역의 상동부위인 FGGGXRLC와 YMPFGGG 아미노산 서열을 기초로 제작한 DPS 7과 DPS 8를 forward primer로 하고, DPS 10을 reverse primer로 하여 RT-PCR를 실시하였을 때, 쇄루를 유묘의 단일가닥 cDNA library에서 cDNA가 선발됨을 전기영동으로 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

RT-PCR 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과, DPS 7 primer와 DPS 10 primer를 사용한 경우 100 - 500 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었고, DPS 8 primer와 DPS 10 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 poly A tail 까지의 크기에 해당하는 150 - 300 bp의 band들도 확인되어 이들을 클로닝하였다.



**Figure 4. Agarose gel electroporesis of RT-PCR products.**

M : DNA marker. Lane 1 : PCR products amplified with DPS 7 & DPS 10 primer.

Lane 2 : PCR products amplified with DPS 8 & DPS 10 primer.

## 2-3. Cloning

RT-PCR를 이용하여 얻은 PCR 산물들로부터 단일 단편들을 분리하기 위하여 pGEM-T Easy Vector 클로닝을 실시하였다. 그리고 XL I-Blue competent cell에 transformation 한 후 X-Gal 과 IPTG를 이용한 white/blue 콜로니 선발을 실시하였다. X-Gal은 lactose의 유사체로써 *lacZ'* 유전자의 발현시 생성되는  $\beta$ -galactosidase에 의해서 glucose와 galactose로 분해되어 진과랑색을 띄는 생성물이 되며, IPTG는  $\beta$ -galactosidase 생성 유도체이다. 따라서 X-Gal과 IPTG를 이용한 white/blue 콜로니 선발을 실시하면 vector에 insert가 ligation 되었을 때  $\beta$ -galactosidase 생성 억제로 하얀 콜로니들이 형성된다. 이러한 원리를 이용하여 하얀 콜로니를 선발하였다. 그 결과, pGEM-T Easy Vector에 RT-PCR 산물들이 클로닝된 것으로 여겨지는 30 - 40개의 하얀 콜로니를 획득하였다.

## 2-4. Insert 확인

하얀 콜로니들을 증식하고 분리, 정제하여 plasmid DNA를 얻은 후 pGEM-T Easy Vector의 EcoR I 영역을 절단하여 1.5% agarose gel에서 전기영동한 결과 대부분의 하얀 콜로니에서 클로닝된 RT-PCR 산물을 확인할 수 있었다. 단일가닥 cDNA library 선발시 DPS 7 primer와 DPS 10 primer를 사용하여 얻은 RT-PCR 산물들을 pGEM-T Easy Vector로 클로닝한 경우에는 200 - 500 bp의 RT-PCR 산물들이 vector에 클로닝된 것을 확인할 수 있었으며, DPS 8 primer와 DPS 10 primer를 사용하여 얻은 RT-PCR 산물들을 pGEM-T Easy Vector로 클로닝한 경우에는 300 - 800 bp의 RT-PCR 산물들이 vector에 클로닝된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5, 6). 따라서 RT-PCR 산물들을 1.5% agarose gel에서 전기영동하였을 때 확인된 대부분의 산물들이 pGEM-T Easy Vector에 클로닝된 것으로 추정되어 이들의 염기서열을 결정할 수 있었다.

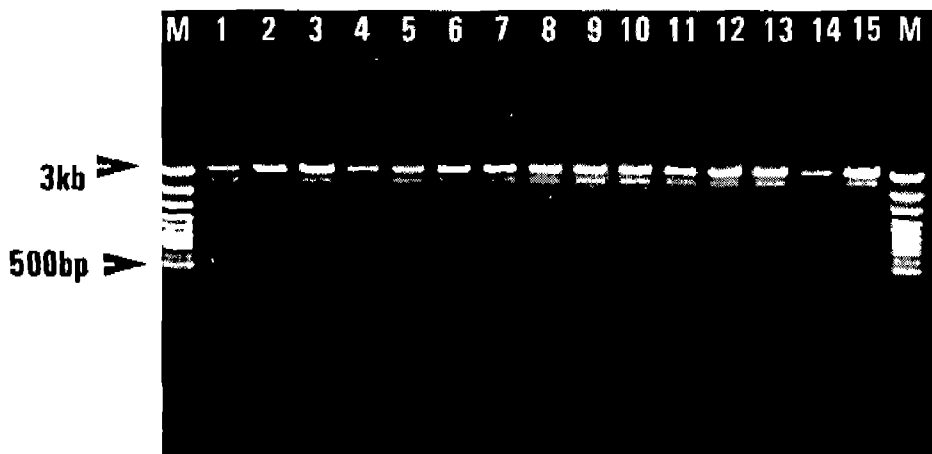


Figure 5. Agarose gel electrophoresis of digested DNA with *EcoR*I restriction enzyme. M: DNA marker. Lane 1 - 15: DNA clones amplified with DPS 7 & DPS 10 primer

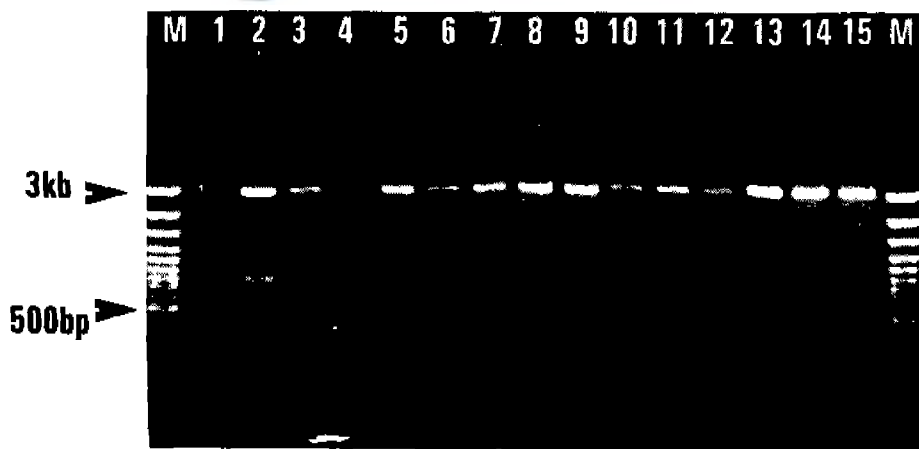


Figure 6. Agarose gel electrophoresis of digested DNA with *EcoR*I restriction enzyme. M: DNA marker. Lane 1 - 15: DNA clones amplified with DPS 8 & DPS 10 primer.

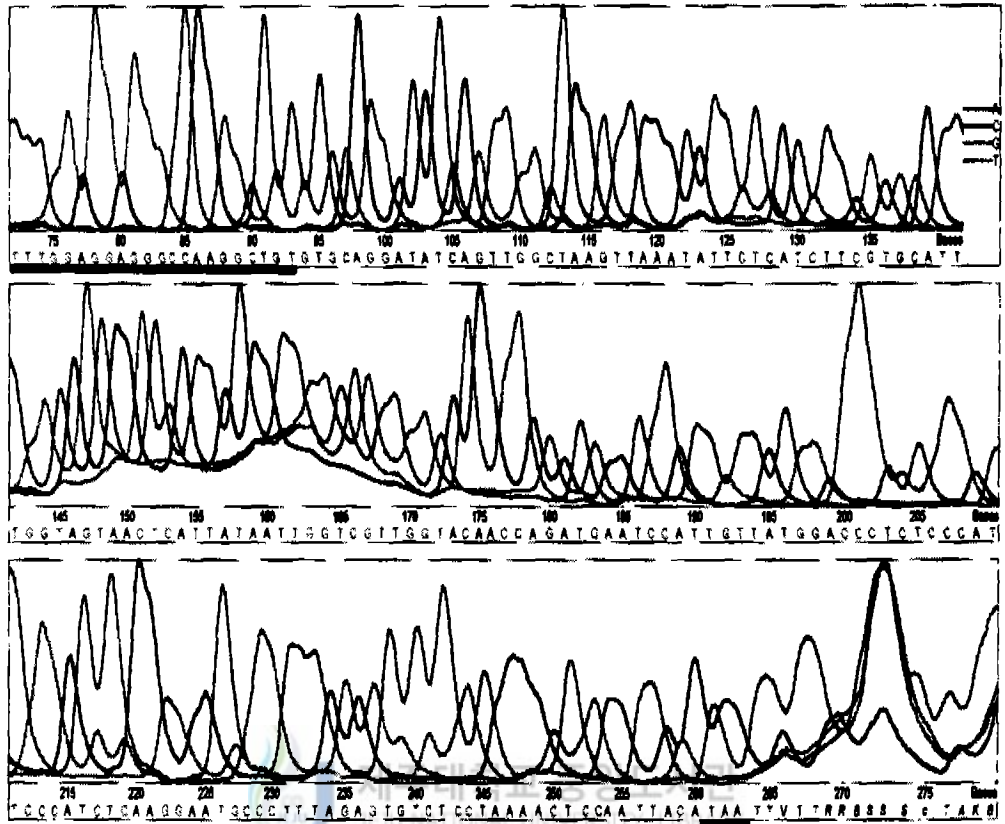


### 3. Partial cDNA의 염기 및 아미노산 서열

pGEM-T Easy Vector에 클로닝된 insert DNA의 염기서열을 염기서열 결정법을 통하여 확인하였다. DPS 7과 DPS 10 primer에 의해서 선발된 유전자들의 클론에서는 DPS 7 primer 염기서열을 포함하고 있는 서로 다른 부분유전자 (001 - 009) 9개의 염기서열이 확인되었고, 이들과 동일한 4개의 유전자가 서로 다른 클론에서 확인되었다. 그리고 DPS 8과 DPS 10 primer에 의해서 선발된 유전자들의 클론에서는 DPS 8 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, DPS 7 primer 염기서열에 해당하는 아미노산 서열에서 중지 코돈까지의 부분적인 open reading frame의 크기는 12 - 64로 나타났으며, DPS 8 primer 염기서열에 해당하는 아미노산 서열에서 중지 코돈까지의 부분적인 open reading frame의 크기는 15 - 113으로 다양하게 나타났다.

염기서열 분석 결과의 예시는 Fig. 7에 나타내었으며, 서로 다른 서열을 가진 클론들의 부분적인 open reading frame에 해당하는 염기 및 아미노산 서열은 Table 3과 4에 정리하였다.



**Figure 7.** An example of sequencing result of the partial gene clone (001)  
 Bold lines :Primer sequence and stop codon.

Table 3. Sequences of DNA and deduced amino acid of the partial genes cloned with DPS 7 & DPS 10 primers.

Clone	DNA sequence	Deduced amino acid sequence	Length of DNA sequence	Length of amino acid sequence
Clone 1	5'-tttgaggaggcccaaggctgtgtgcaggatcagttggc taagttaaatattctcatcttcgtgcatttggtagtaactcatt ataattggctgttggtaaccagatgaatccattgttatggac cctctcccatcccatctcaaggatgcccttttagagtgctcc 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'-tttgaggaggcccaaggctgtggacaagcgcgtgaacag aggtaagttcacatgcatgaacaacctctactcctttctcctt gctccttaatccaaggggacttagccgggctcctcgaccacaa gcatggcctctaggcttcgagaacaactctatctctcgagtgccc 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 W L S L E C P N S Stop	186 bp	62
Clone 3	5'-tttgaggaggcccaaggctgtgtctctcttctctctctog agtcccgcaattcctgaatgcaatcccgccgcccattggcgg cgggagcatgctgagctgggcccatttggcctatga-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'-tttgaggaggcccaaggctgtgtcggttctgcagagatc atattctcacaanaatcaactttcccgctcaaaagctcaaggggt catatttttaagaagtga-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'-tttgaggaggcccaaggctgtgtctgactcctcgcttact tatgagattcgaagcatttgggtttcatggttga-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	tttgaggaggcccaaggctgtggagatattcctggagttoga tttaaggttgtcaaggttgctgtgtttcccttgtagctctct kcaagggvgaagaaggaanaaaccaaggctcttaggtgtaattgtgt ttgactacttcaattttgctactttaa	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 X X E E G X T K V L G V M C L T T S I L L L Stop	159 bp	53
Clone 7	tttgaggaggcccaaggctgtgggtaattttccaaaagga aatgtag	F G G G P R L W G N F P K K E M Stop	51 bp	17
Clone 8	tttgaggaggcccaaggctgtgtttgtctctttctctogcaatg a	F G G G P R L C L S S F S Q Stop	45 bp	15
Clone 9	tttgaggaggcccaaggctgtgtagggcscagtga	F G G G P R L C R X Q Stop	36 bp	12

Table 4. Sequences of DNA and deduced amino acid of the partial genes cloned with DPS 8 & DPS 10 primers.

Clone	DNA sequence	Deduced amino acid sequence	Length of DNA sequence	Length of amino acid sequence
Clone 10	tacatgccgttgggaatggggccaagattgaggaagtcgactaag ctgcttctcctatttttag	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	tacatgccgttgggaatggggcctggtggtcgtgatggaggcaga ggtgggagaagtgattcaggttatggtggcagggatgggggaagg ggtcagacagatatgatagttatgctggtgatggttgtgggaag tatggaggttaccgctccaagaattttggaggtggcgaatggggat agaggccScagcccaaggcccaaatDYagaagctttBggattgga ctcaatccaggatcaRegYttgaaacctgggagtagKagRaagc ccagSegRagTBcctmaagtgthaacctADgtccogYgcttag RgKtttgccWtgrRaVtBogtgngtKatgWgggBggccgRtcgtg a	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 I G R S R S K S R S P E R F N P G P A K K F H E M D X G R Stop	339 bp	113
Clone 12	tacatgccattgggaagggggccaagattgaggaagtcgactaa	Y M P L G R G P K I E E V D Stop	45 bp	15
Clone 13	tacatgccgttgggaatggggcctggtggtcgtgatggaggcaga ggtgggagaagtgattcaggttatggtggcagggatgggggaagg ggtcagacagatatgatagttatgctggtgatggttgtgggaag tatggaggttaccagctccaagaattttggaggtggcgaatggggat agaggccScagcccaaggcccaaatDYagaagctttBggattgga ctcaatccaggatcaRegYttgaa	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	tacatgccgttgggaactggtcccttgggtgaaggcctcgacaag gtttaccaggtggagcttttgaccacttggcctcgtgatgac ccagatgcttggcagctaaaggcttaaggagctgaagaatgga aggttggctatggtctccatggtcggattctctggttcaagctatt gttaccggaaagggtcccaatcgagaacctctcagaccacttggct gacccctgaggccaacaatgocctgggcttacggccaactctggt cctggRaagtga	Y M P F G T G P L G E S 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 X 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

#### 4. 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 clone 1 DNA 단편을 비롯하여, 상동성이 있는 것으로 확인되는 clone 2, 3, 4, 5, 10 DNA 단편 6개를 얻을 수 있었다 (Table 3과 4). 그리고 이 6개의 단편 중 clone 1, 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 다중정렬한 후 상동성 정도를 분석하였다. 그 결과 Fig. 8의 다중정렬 결과에서 보는 것과 같이 clone 1과 clone 2의 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 clone 1은 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 ecdysteroids 생합성 관련 유전자일 가능성이 높은 것으로 추정되었다.

Fig. 8의 다중정렬 결과에 따라 상동성 정도를 완전히 일치하는 아미노산 서열, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 및 gap의 비율로 나타내어 상대평가 하였다 (Table 5). 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 clone 1은 식물의 cytochrome P450 family 유전자들과 정확히 일치하는 아미노산 서열 비율이 23 - 31%로 나타나 상동성이 높은 것으로 추정되었으며, clone 2, 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, clone 1은 식물의 cytochrome p450 family 유전자들과 36 - 49% 정도를 보여 상동성이 높은 것으로 추정되었으며, clone 2, 3, 4, 5, 10은 14 - 25% 정도를 보여 상동성이 있는 것으로 추정되었다. 뿐만 아니라 클로닝된 유전자들 중 clone 1은 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase로 추정되는 유전자와 정확히 일치하는 아미노산 서열 비율이 14%, 유사하거나 치환 가능한 아미노산 서열 비율이 27%로 상대적으로 높게 나타났으며, clone 2와 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, clone 1은 ecdysteroids 생합성 관련 유전자일 가능성이 아주 높은 것으로 추정되었으며, clone 2도 ecdysteroids 생합성 관련 유전자일 가능성이 있는 것으로 생각되었다. 그리고 clone 5와 10도 부분적인 open reading frame의 길이는 조금 작지만 ecdysteroids 생합성 관련 유전자일 가능성이 있는 것으로 판단되었으며, clone 3과 4는 cytochrome P450 family 유전자일 가능성이 있는 것으로 판단되었다.

```

          *           20           *           4
gi|1076315 : NVE PFGGGPRLCPGYELARVA SVFLHRLVTGFSWVPA : 39
gi|987267| : -TFLAFGLGARLCPGNDLAKLEISVELHH L GY L RT : 38
gi|1421741 : NSFL FGGG RQCPKELG AEISTELHY VTKYRWE EI : 39
gi|2935342 : N YMPFGGGGPRLCAGSELAKLEMAVFIHHLV KFNWELA : 39
gi|5106554 : -TYMPFGTGPH CIG RFGLM AKAG HVLSCYEVSVA : 38
Clone1 : -----FGGGPRLCAGYQAKLNI F HLVVTHYNXSLV : 34
Clone2 : -----FGGGPRLWT RVN GTETCM NLYS SPCSLI R : 34
Clone3 : -----FGGGPRLC SL S PEF NRIPAAAM GSMRR : 34
Clone4 : -----FGGGPRLC VLO SYSTKINESS KIKGSYLRS : 34
Clone5 : -----FGGGPRLCLIL LLMRFEAFGPHG----- : 24
Clone10 : --YMPLG GPRL KSTKLLLS----- : 20
NTFMPFGGGGPRLCPGLELAKLEISVELHHVVTGYWSRA

```

```

          0           *           60           *
gi|1076315 : EODKLVFFP TRTQK-----RYPTEVKRRDFEAT----- : 67
gi|987267| : NPCRVR LPHPRPV N LA RVGS----- : 65
gi|1421741 : CGDKLMKFP RV APN-----GLRIRVS----- : 63
gi|2935342 : EDDQPF FPEVDFPN-----GLPIRVSR I----- : 64
gi|5106554 : ADTPVELP ATRGIVATTV GVP RF HDPLVELVRPA : 76
Clone1 : PDE VMDP PFP Q M FRVSPKTPIT----- : 63
Clone2 : GLS APRQAWP FENNL SLECP----- : 60
Clone3 : R FAL----- : 40
Clone4 : ----- : -
Clone5 : ----- : -
Clone10 : ----- : -
EDDKAVRFPAVFPFNENTLAGVPIRVSRPF AELVRPA

```

Figure 8. Multialignment of cytochrome P450s and cloned partial gene using GeneDoc program.

gi 1421741 - *Lycopersicon esculentum* ; dwarf

gi 1076315 - *Arabidopsis thaliana* ; DWAR

gi 2935342 - *Arabidopsis thaliana* steroid 22-alpha-hydroxylase ; DWF4

gi 987267 - *Zea mays* ; DWARF3

gi 5106554 - *Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase

Clone 1~5 & clone 10 - cloned partial gene

Table 5. 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 : gi 1421741 - *Lycopersicon esculentum*, dwarf, B gi 1076315 - *Arabidopsis thaliana*, DWAR, C gi 2935342 - *Arabidopsis thaliana* steroid 22-alpha-hydroxylase, DWF4, D gi 987267 - *Zea mays*, DWARF3, E gi 5106554 - *Locusta migratoria* putative ecdysone 20-hydroxylase, F Clone 1, G Clone 2, H Clone 3, I Clone 4, J Clone 5, K Clone 10

- 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



## IV. 요약

Ecdysteroid 생합성에 관련된 식물 유전자를 분리할 목적으로 ecdysteroid 생성 능이 확인된 쇠무릎 (*Achyranthes japonica* Nakai)으로부터 RNA를 분리하고 RT-PCR에 의해 cDNA들을 클로닝한 후 ecdysteroid 합성에 관여하는 것으로 알려진 cytochrome P450 family 유전자들과의 염기 및 아미노산 서열의 상동성을 비교 검토하였다.

1. 식물의 cytochrome P450 family 유전자 4개와 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 유전자의 다중정렬 분석결과를 토대로 상동성이 높은 부위의 염기서열에 상응하는 degenerate primer 9개를 제작하였다.

2. 쇠무릎 유묘의 전체 RNA로부터 합성한 단일가닥 cDNA의 library를 PCR로 증폭할 때, degenerate primer 9가지 중 2가지를 사용했을 때 cytochrome P450 유전자의 cDNA로부터 증폭될 수 있는 크기의 DNA 단편들이 증폭되었다.

3. 단일가닥 cDNA library을 degenerate primer로 증폭하여 얻은 부분 cDNA들을 pGEM-T Easy Vector에 넣어 *E. coli*에서 클로닝하고, 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석결과 고유한 염기서열을 가진 부분 cDNA clone 14개를 선발할 수 있었다.

4. cDNA clone과 기존에 알려진 cytochrome P450 family 유전자들 간 아미노산서열의 상동성을 분석한 결과 선발된 cDNA 중 6개가 cytochrome P450 유전자들과 상동성이 있는 것으로 나타났다. 이 중에서 4개의 clone은 곤충의 ecdysone 20-hydroxylase 유전자와도 상동성이 높아 ecdysteroid 생합성에 관련된 유전자로 추정되었다.

## V. 참고문헌

Altmann, T. (1998) "A tale of dwarfs and drugs : brassinosteroids to the rescue", TIG., Vol. 14, pp.490-495.

Andersson, S., Davis, D. L., Dahlback, H., Jornvall, H., Russell, D. W. (1989) "Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Steroid 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme", The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, pp.8222-8229.

Bishop, G. J., Harrison, K., Jones, J. D. G. (1996) "The tomato *Dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome p450 family", The plant cell, Vol. 8, pp.959-969.

Chapple, C. (1998) "Molecular-Genetic analysis of Plant Cytochrome P450-Dependent Monooxygenases", Annu. Rev. Plant Physiol. plant Mol. Biol., 49, pp.311-343.

Choe, S. H., Dilkes, B. P., Fujioka, S., Takatsuto, S., Sakuribai, A., Feldmann, K. A. (1998) "The *DWF4* gene of arabidopsis encodes a cytochrome p450 that mediates 22 $\alpha$ -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis", The plant cell, Vol. 10, pp.231-243.

Fallon, A., Booth, R.F.G. , Bell, L.D. (1994) "Application of HPLC", Biochemistry, Elsevier, Vol. 17, pp.243-259.

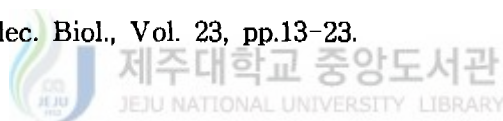
Farrel, R. E. (1993) "RNA Methodologies", Academic Press, pp.126-155.

Frank, M. R., Deyneka, J. M., Schuler, M. A. (1996) "Cloning of Wound-Induced Cytochrome P450 Monooxygenases Expressed in Pea", *Plant Physiol.*, 110, pp.1035-1046.

Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Benveniste, I., Feyereisen, R. (1996) "Ecdysone 20-monooxygenase, a cytochrome p450 enzyme from spinach, *Spinach Oleracha*" (1996) *Phytochemistry*, Vol. 30, pp.2905-2910.

Grieneisen, M. L. (1994) "Recent Advances in our Knowledge of Ecdysteroid Biosynthesis in Insects and Crustaceans", *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 24, pp.115-132.

Grieneisen, M. L., Warren, J. T., Gilbert, L. I. (1993) "Early steps in ecdysteroid biosynthesis: evidence for the involvement of cytochrome p-450 enzymes", *Insect Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 23, pp.13-23.



Griffin, H. G., Griffin, A. M. (1994) "PCR TECHNOLOGY Current innovations", CRC Press, Inc., pp.1-36.

Groves, J. T., Han, Y. Z. (1995) "Models and Mechanisms of Cytochrome P450 Action", *Cytochrome P450*, pp.3-48.

Holland, H. L. (1999) "Recent advances in applied and mechanistic aspects of the enzymatic hydroxylation of steroids by whole-cell biocatalysts", *Steroids*, 64, pp.178-186.

Holton, T. A., Lester, D. R. (1996) "Cloning of Novel Cytochrome P450 Gene Sequences via Polymerase Chain Reaction Amplification", *Methods in Enzymology*, Vol. 272, pp.275-283.

Hotze, M., Schroder, G., Schroder, J. (1995) "Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the function expression of plant cytochrome P<sub>450</sub> proteins as translational fusion with P<sub>450</sub> reductase in *Escherichia coli*", FEBS Letters, 374, pp.345-350.

Kang, M. H., Kang, H. G., Lee, M. G., Kim, S. U., Lee, H. J., Chae, Y. A., Chol, Y. D. (1993) "Isolation of a Genomic Clone for Cytochrome P450 Oxidase from *Mentha piperita*", Mol. Celis., Vol. 3, pp.283-288.

Klahre, U., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yokota, T., Nomura, T., Yosida, S., Chua, N. H. (1998) "The arabidopsis *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis", The plant cell, Vol. 10, pp.1677-1690.

Krochko, J. E., Abrams, G. D., Loewen, M. K., Abrams, S. R., Cutler, A. J. (1998) "(+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase Is a Cytochrome P450 Monooxygenase", Plant Physiol., 118, pp.849-860.

Mizutani, M., Ohta, D., (1998) "Two Isoforms of NADPH : Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana*", Plant Physiol., 116, pp.357-367.

Larkin, J. C. (1994) "Isolation of a cytochrome P450 homologue preferentially expressed in developing inflorescences of *Zea mays*", Plant Molecular Biology, 25, pp.343-353.

Lloyd-Jones, J. G., Rees, H. H., and Goodwin, T. W. (1972) "Biosynthesis of Ecdysterone from cholesterol in *Taxus Baccata*", Phytochemistry, Vol. 12, pp.569-572.

Mihaliak, C. A., Karp, F., Croteau, R. (1993) "Cytochrome P-450 Terpene Hydroxylases", *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 9, pp.261-279.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D. W. (1993) "The P450 Superfamily : Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature", *DNA and Cell Biology*, Vol.12 pp.1-51.

Peter Guengerich, F. (1991) "Reactions and Significance of Cytochrome P-450 Enzymes", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, pp.10019-10022.

Rene Feyereisen (1999) "Insect P450 Enzymes" *Annu. Rev. Entomol.*, 44, pp.507-533.

Sambrook, Fritsch, Maniatis. (1989) "Molecular cloning: A laboratory manual", pp.7.3-8.53.

Schmelz, E. A., Grebenok, R. J., Galbraith, D. W., Browers, W. S. (1998) "Damage-induced accumulation of phytoecdysteroids in spinach" *Journal of chemical ecology*, Vol. 24, pp.339-360

Schuler, M. A. (1996) "The Role of Cytochrome P450 Monooxygenases in Plant-Insect Interactions", *Plant Physiol.*, 112, pp.1411-1419.

Snyder, M. J., Scott, J. A., Andersen, J. F., Feyereisen, R. (1996) "Sampling P450 Diversity by Cloning Polymerase Chain Reaction Products Obtained with Degenerate Primers" *Methods in Enzymology*, Vol. 272, pp.304-312.

Winkler, R. G., Helentjaris, T. (1995) "The Maize Dwarf3 Gene Encodes a Cytochrome P450-Mediated Early Step in Gibberellin Biosynthesis", *The Plant Cell*, Vol. 7, pp.1307-1317.

Winter, J., Bilbe, G., Richener, H., Sehringer, B., Kayser, H. (1999) "Cloning of a cDNA encoding a novel cytochrome p450 from the insect *Locusta migratoria*: CYP6H1, a putative ecdysone 20-hydroxylase", *Biochemical and biophysical research communication*, pp.305-310.

Yokota, T. (1997) "The Structure, biosynthesis and function of brassinosteroids", *Trends in plant science*, Vol. 2, pp.137-143.

高橋信孝, 丸茂普吾, 大岳 望 (1988) "생리활성천연물화학", 대한교과서주식회사, pp.127-165.

양철신 (1997) "HPLC에 의한 식물체중의 ecdysteroid 화합물 분석" 제주대학교 석사학위논문, pp.1-30

## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 격려를 하여주신 류기중 교수님께 진심으로 감사드리며, 심사를 하여 주신 유장걸 교수님, 자연과학대학 화학과 이선주 교수님의 지도, 조언에 깊은 감사를 드립니다.

평소 가르침으로 이끌어주신 강순선 교수님, 고정삼 교수님, 현해남 교수님, 김찬식 교수님께 감사드립니다.

그리고 유기화학 실험실에서 동고동락하는 마음으로 생활하면서 도움을 준 현병이형, 성범이, 도승이, 진환이와 많은 가르침을 준 경용이형 및 조교선생님들께 고마움을 전합니다.

