

# Polyamine 생합성 유전자의 특성 및 발현조절기작

## (Characterization and Expression of the genes for polyamine biosynthesis)

박기영<sup>1\*</sup> · 이순희<sup>2</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 자연과학대학 생물학과; <sup>2</sup>연세대학교 이과대학 생물학과

### I. 서 론

Polyamine에는 diamine인 putrescine과 triamine인 spermidine, tetraamine인 spermine 등이 있는데 이들은 식물, 동물, 미생물 등 모든 생물의 세포내에 존재하는 물질로서 물질대사가 활발하게 일어나는 시기에 생합성 정도가 높으며 세포분열과 세포생장을 촉진하며 과일과 꽃의 발달에도 관여한다 (Tabor and Tabor, 1984; Lee and Park 1991). 또한 무기염류의 농도가 높은 상태나 혹은 낮은 pH나 낮은 온도 등의 환경적인 stress에 의해서 putrescine등이 다량 축적되기도 한다 (Galston, 1989).

식물의 putrescine합성은 arginine으로부터 두가지의 생합성 경로를 거쳐 일어난다. Arginine이 arginase에 의해 ornithine으로 전환된 후 ornithine decarboxylase (ODC)에 의하여 putrescine으로 전환되며 또한 arginine이 arginine decarboxylase (ADC)에 의하여 agmatine으로 전환되었다가 putrescine으로 전환되기도 한다 (Tabor and Tabor, 1984). 세포분열이나 혹은 과일발달이 활발하게 일어나는 시기에는 ODC에 의한 putrescine 생합성이 활발하게 작용하기는 하지만 대부분의 식물조직에서 특히 세포신장이 일어나는 시기에는 ADC가 더 활발하게 작용한다 (Davies et al., 1990). 특히 잎눈이나 꽃눈의 분화초기에는 ADC의 효소활성이 크게 증가한다 (Tiburicio et al., 1988). 그러나 식물과는 다르게 동물이나 곰팡이에서는 putrescine이 ODC에 의해서만 생합성된다 (Smith, 1985).

이렇게 생성된 putrescine은 S-adenosylmethionine (SAM)이 S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)에 의하여 전환된 decarboxylated SAM (dcSAM)으로부터 aminopropyl기를 공급받아 spermidine과 spermine으로 전환된다 (Tabor and Tabor, 1984). 한편 SAM은 과일의 성숙이나 꽃의 노화 등 식물의 노화를 촉진하는 호르몬인 ethylene으로 전환되기도 하는데(Yang and Hoffman, 1984), 여기서 SAM은 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase에 의하여 ethylene의 중간전구물질인 ACC로 전환된다. 따라서 SAM이 ACC로 전환되느냐 혹은 spermidine이나 spermine으로 전환되느냐에 따라 세포생장이 영향을 받게 된다 (Smith, 1985). 특히 polyamine의 생합성에서는 SAM으로부터 polyamine의 생합성 경로로 유입되는 dcSAM을 생성하는 SAMDC가 rate-limiting step으로 작용하고 있다.

이상의 연구보고들이 있음에도 불구하고 식물의 발달과정에서 polyamine이 갖는 생리적인 작용기작이나 polyamine 생합성의 조절기작에 대해서는 아직도 분명하게 밝혀져 있지 않은 편이다. 따라서 본 연구에서는 polyamine 생합성의 조절기작을 밝히기 위하여 우선 polyamine 생합성에 관여하는 유전자들을 cloning하였고 카네이션 꽃과 나팔꽃을 재료로 하여 꽃의 발달과정과 빛에 대한 반응에서 나타나는 이들 유전자들의 발현양상을 조사하였다.

## II. 본 론

### 1. Polyamine 생합성 관련 유전자들의 특성

#### (1) SAMDC 유전자의 특성

SAMDC (EC 4.1.4.50)는 polyamine 생합성의 key enzyme으로서 SAM으로부터 탈탄산 반응을 일으켜 dcSAM을 생성하며 이는 spermidine과 spermine의 생합성에 필요한 aminopropyl기를 공급한다 (Tabor and Tabor, 1984). dcSAM의 세포내 농도는 매우 낮은 편이어서 dcSAM의 유용성 여부가 polyamine 생합성의 속

도를 조절하게 되어 SAM의 탈탄산반응이 polyamine생합성의 rate-limiting step으로 작용한다 (Park and Lee, 1990; Mariè et al., 1992). SAMDC 단백질은 turn-over 되는 속도도 상당히 빠른 편이며 또한 세포내 단백질 중에서 그 양이 무척 적은 편이다. 따라서 SAMDC는 여러 생리적인 자극이나 환경적인 자극에 의해 민감하게 조절되는 단백질이다 (Evans and Malmberg, 1989).

본 연구에서는 SAMDC 유전자를 cloning하기 위하여, 사람과 (Pajunen et al., 1988) 감자에서 (Taylor et al., 1992) 보고된 SAMDC의 유전자를 분석하여 염기서열상 유사성이 매우 높은 conserved sequences를 찾아내어 이를 polymerase chain reaction (PCR)을 위한 oligonucleotide primer로 제조하였다. 이들 primer를 이용한 PCR을 수행하여 458 bp의 PCR 생성물을 얻은 후 이의 염기서열을 밝혀 SAMDC의 유전자임을 확인한 후 카네이션의 꽃잎에서 분리한 mRNA로부터 만든 cDNA library를 screening하여 서로 다른 두 개의 SAMDC clones (CSDC9과 CSDC16)을 얻었다 (Fig. 1; Lee et al., 1996a). 또한 나팔꽃의 genomic DNA library에서는 1개의 genomic clone을 얻었다 (Fig 5).

2개의 SAMDC 유전자들을 이용하여 제한효소지도작성을 수행한 결과 이 두 유전자들은 서로 다른 유전자인 것으로 나타났다. 특히 카네이션의 잎으로부터 분리한 genomic DNA를 이용하여 southern blot analysis를 수행한 결과 카네이션은 최소한 2개 이상의 SAMDC 유전자를 갖고 있는 것으로 나타났다 (Lee et al., 1996c). CSDC9과 CSDC16은 nucleotide 서열상으로는 서로 78.3 %의 동일성을 나타냈으며 amino acid 서열상으로는 81.7 %의 동일성과 86.5 %의 유사성을 나타냈다 (Lee et al., 1996a). CSDC9은 전체길이는 1729 nucleotide로 이루어져 있는데 41,520 Da의 단백질을 유도하는 1146개의 nucleotide로 이루어져 있는 open reading frame을 갖고 있으며 472개 nucleotide의 5' untranslated region과 111개 nucleotide의 3' untranslated region을 갖고 있다. CSDC16은 pCSDC16보다 약간 길어 전체길이는 1826 nucleotide로 이루어져 있는데 41,344 Da의 단백질을 유도하는 1134개의 nucleotide로 이루어져 있는 open reading frame을 갖고 있으며 502개 nucleotide의 5' untranslated region과 190개 nucleotide의 3' untranslated

region을 갖고 있다.

PCGENE의 CLUSTALV program을 이용하여 CSDC9과 CSDC16의 coding region으로부터 유도된 amino acid의 서열을 그동안 밝혀진 다른 식물체에서 분리된 SAMDC의 유전자와 비교하여 보았다 (Fig. 1). CSDC9으로부터 유도된 SAMDC는 amino acid 서열상 감자와는 69.1 %, 시금치와는 74.4 %, periwinkle과는 66.7 %, 나팔꽃과는 65.7 %의 동일성을 나타냈지만 사람의 SAMDC유전자와는 22.5%의 동일성을 나타냈으며 효모의 SAMDC 유전자와는 10.0 %의 동일성을 나타냈다 (Taylor et al., 1992; Bolle et al., 1995; Schröder and Schröder, 1995; Pajunen et al., 1988; Kashiwagi et al., 1990). CSDC16도 CSDC9과 같이 식물의 SAMDC유전자와는 높은 유사성을 나타내었지만 사람이나 대장균과 같은 동물이나 전핵생물과는 amino acid 서열상의 유사성이 매우 낮게 나타났다 (Table 1). 카네이션 SAMDC의 cDNA가 사람이나 대장균의 SAMDC cDNA와의 amino acid 서열상의 유사성이 낮다고 하더라도 식물과 사람 및 대장균의 SAMDC 유전자를 서로 비교한 결과에 의하면 SAMDC 유전자에는 homology가 무척 높은 몇 개의 conserved region이 존재하였다 (Fig. 1).

SAMDC는 proenzyme으로 생성되어 2개의 subunits로 나뉘는 processing이 일어나는데 processing이 일어나는 LSESSLFV 부위가 conserved region인 것으로 나타났다 (Pajunen et al., 1988; Kashiwagi et al., 1990). 또 다른 conserved region은 HITPEDGFSYASFE 부위로서 SAMDC의 단백질이 매우 빠르게 turn-over되는데 기여하는 putative PEST region으로 나타났다 Rogers et al., 1986; Pajunen et al., 1988).

Processing site가 존재하는 카네이션 SAMDC 단백질의 processing을 확인하기 위하여 *in vitro* transcription/translation을 수행하였다. pCSDC9과 pCSDC16의 putative start codon 앞쪽의 ATG site를 제거한 후 T3 RNA polymerase와 wheat germ extract를 사용하여 *in vitro* transcription/translation을 수행한 후 SDS-PAGE로 생성된 단백질을 분석한 결과 3개의 크기가 서로 다른 단백질 band를 확인하였다 (Fig. 2). *in vitro* transcription/translation을 수행한 후 10분

CSDC9	MMVETLGN	SNYNTVSP	MNGDDNNTMAL	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	50
CSDC16	MTIEMMGNTT	-----	DDNNMTI	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	41
MORNING GLORY	MALST	-----	-----	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	28
SPINACH	M	-----	AI	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	26
POTATO	MEM	-----	DLPV	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	30
PERIWINKLE	MALFA	-----	-----	SAIGFEGFEKRL	ETISFFEPGIFV	28
HUMAN	MEAAHF	-----	-----	FEGETEKL	LEVWFSRQOPDA	25
YEAST	MTVTIKEL	TNHNYI	-----	DHELSATL	SDAFEGEPEKLEIETWFFPHKKSI	46

CSDC9	DPEGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	DSL	ANESVDSV	VLSESSLFVVS	100	
CSDC16	DPEGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	DSL	ANESVDSV	VLSESSLFVVS	91	
MORNING GLORY	DPEGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	SSL	SNNEVDSV	VLSESSLFVVP	78	
SPINACH	DPEGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	DSL	ANESVDSV	VLSESSLFVVS	76	
POTATO	DPNGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	DNL	SNDYVDSV	VLSESSLFVVS	80	
PERIWINKLE	DPDGKGLRAL	SKAQLDEIL	GPAECTIV	DSL	SNQYLD	SVLSESSLFVVP	78	
HUMAN	NQSSGDL	RTIPRSEW	DLIK	KEVQCS	ISVTKTDK	QEAIVLSESSLFVSKR	75	
YEAST	TTE	KILERNIG	MDRWTE	ELL	KLVKCE	VLSMKKTKELDAFLI	SESSLFVFDH	95

CSDC9	KIIIKTCG	TTKLLHST	LPIIL	LADGL	CL	-----	DVKS	SVRY	TRGS	139		
CSDC16	KIIIKTCG	TTKLLNS	SIPPI	LRLAET	LEL	-----	DVKS	SVRY	TRGS	130		
MORNING GLORY	KIIIKTCG	TTKLLS	SIPPI	LEALD	GLSL	-----	KVKS	SVRY	TRGS	117		
SPINACH	KIIIKTCG	TTKLLRDL	PPIL	RLACK	L	SL	-----	DVKS	SVRY	TRGS	115	
POTATO	KIIIKTCG	TTKLLLA	PPIL	RLAET	LEL	SL	-----	KVQD	SVRY	TRGS	119	
PERIWINKLE	KIIIKTCG	TTKLLS	IPAL	LKLAES	L	SL	-----	SVRN	SVRY	TRGS	117	
HUMAN	RFILKTCG	TTLIK	ALV	ELL	KLARD	YSGF	-----	SIQS	EFFY	SRKN	116	
YEAST	KLTMKTCG	TTLITL	FCLE	KLFQ	IVE	QEL	SWAF	RTTQGG	KYKPK	FKVY	SR	145

CSDC9	FIFPGAQ	SFPHRS	FSEEVAV	LDK	YFGN	LGT	GSKAF	VMG	SPAK	PQK	WHVYS	189				
CSDC16	FIFPGAQ	SFPHRS	FSEEVAV	LDN	YFAK	L	GAGSK	AI	VMG	SPGK	PQK	WHVYS	180			
MORNING GLORY	FNFPEQ	YPHRS	FSEEVAV	LD	YF	GKLG	TGSK	AV	VMG	GAGK	QQ	WHVYS	167			
SPINACH	FIFPGAQ	SFPHRS	FSEEVAV	LD	YF	GKLA	GSKAF	VMG	DP	PAK	PQK	WHVYS	165			
POTATO	FIFPGAQ	SFPHRS	FSEEVAV	LD	YF	GKLA	GSKAV	VMG	SPD	L	PQK	WHVYS	169			
PERIWINKLE	FIFPGAQ	SFPHRS	FSEEVAV	LD	YF	GKLG	L	SN	AF	VMG	NED	PQK	WHVYS	167		
HUMAN	FMKPS	HQGY	PHRS	FSEEVAV	LDN	YF	GKLG	L	SN	AF	VMG	NED	PQK	WHVYS	162	
YEAST	ELPE	CKQA	AATH	QNWAD	EV	YLN	KFED	N	-----	GKSY	SV	GRND	KS	NHNL	V	191

CSDC9	ATAEP-SYD	DEVY	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	232							
CSDC16	ATAET-NYD	DEVY	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	223							
MORNING GLORY	ASAESA	ENTF	ETV	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	211						
SPINACH	ASAETLS	FEE	EVY	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	209						
POTATO	ASVGS	QSN	DEVY	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	213						
PERIWINKLE	ASVGS	EQSS	DEVY	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	211						
HUMAN	DFPES	RVIS	QEDQ	-----	ILEM	CM	TGLD	KKAS	VFEK	SES	ASA	AV	MTE	206						
YEAST	TETDR	STPK	GKEY	IEDD	DE	IF	EV	LM	TE	ED	PE	CA	SK	VE	CP	PE	AST	AL	VEP	241

CSDC9	SGIRKIL	PDS	AIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	I	259																																			
CSDC16	SGIRKIL	PDS	VIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	I	250																																			
MORNING GLORY	SGIRKIL	PDS	VIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	V	238																																			
SPINACH	SGIRKIL	PDS	KIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	I	236																																			
POTATO	SGIRKIL	PDS	KIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	I	240																																			
PERIWINKLE	SGIRKIL	PDS	KIC	-----	DFDF	EP	CG	YS	MNA	I	238																																			
HUMAN	SGIRDL	IP	GS	VLD	-----	ATME	NP	CG	YS	MNG	233																																			
YEAST	NE	D	K	G	H	N	L	G	Y	Q	M	T	K	N	R	L	D	E	I	Y	V	N	S	A	Q	D	S	L	S	F	H	D	A	E	A	F	T	P	C	G	Y	S	S	M	I	291

CSDC9	EGPAV--STTHITPEDGFSYASFEA-----VGYDEKIVDVNQLVERVLNCFEQ	304
CSDC16	EGPAV--STTHITPEDGFSYASFEA-----VGYDEQVVDINQLVERVLACFE	295
MORNING GLORY	EGGTI--STTHITPEDGFSYASFEA-----MGYDFKDWLDAIQRVASCFQ	283
SPINACH	EGPAL--STTHITPEDGFSYASFEA-----VGYDLAKTIDNQLVERVLACFE	281
POTATO	EGAAV--STTHITPEDGFSYASFEA-----VGVNPKIMELGPLVERVLACFE	285
PERIWINKLE	EEAAI--STTHITPEDGFSYASFEA-----AGYDLKAQNLGMMTERVLACFQ	283
HUMAN	KSDGTYWITHTIPEPEFSYVSEET-----NESQTSYDDLRKVVVEVEK	276
YEAST	LAEKYYVITLNVIPKQWFSYASFEA-----SMIPVFDISQGGQDNLVDLLHINVEQ	341
CSDC9	PREFSTAV--SVDITADKVIIEQYCAVNVASVCRREGGVEGEGVGG--SVLVQ	351
CSDC16	PKRFSTAVHADITADKVLARNCSVNVITGYSRREGGITEELGEG--SVFYQ	344
MORNING GLORY	PAEFSVALHCD-----SIGEKLDSEVELDVKGYACGERSYEAL	321
SPINACH	PSEFSTAIHAEI--AANSMEHNCYVNVNGYSRREGGITEELGFGAASVVEE	329
POTATO	PAEFSVALHADVAI--KLLERI--CSVDVKGYSLABNSPEEFGEGGSIIV--	331
PERIWINKLE	PSEFSVAVHCD--VTCKSLLEQICSLLELKEVSLDEKINEEELGEG--SIIVK	330
HUMAN	PGKFWITLTVNQSSKCRIVLRSP-----Q	300
YEAST	PREFSMTFFTK--NYQNGSFQKLLSINESLPDYIKLDKIVYDLDDYHLFYM	390
CSDC9	KFGKVAIV--SG-----LNKSPKCCRKEEENDEKREC--	381
CSDC16	KFKGTAPVCPA-----PKKTLKCCWKEEEDDEEMEF--	377
MORNING GLORY	GKGGSIMYCGFTSTGSCGSPRSTLLCCNSENEDGEGKKHF	361
SPINACH	KFKCASTGFGATNK-----PKPALKCCWKEEDKFEEEKDY--	363
POTATO	---QKFI RTPYCES-----PKSVLKCCWKEEKEGKE---	360
PERIWINKLE	KFLRIDA-----CGS-----PRSLKCCWKESE--EE---	357
HUMAN	KIEGFKRLDCQSAM-----FNDYNFVFTSEFAKQQQQQS--	334
YEAST	KL-----GKKI--	396

Fig. 1. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of SAMDC. Shaded boxes indicated the identical residuc. '▲' indicates the cleavage site of mammalian SAMDC proenzyme.

Table 1. Identity of the deduced amino acid sequences of SAMDC from various organisms. The values in parentheses represent similarity.

	CSDC9	CSDC16	MGSDC	Periwinkle	Spinach	Potato	Human	Ycast
CSDC9		81.7 (86.5)	65.7 (74.5)	66.7 (78.1)	74.4 (81.8)	69.2 (78.1)	22.5 (36.7)	10.0 (20.0)
CSDC16	81.7 (86.5)		61.8 (70.6)	67.8 (77.9)	73.6 (79.3)	71.7 (80.0)	21.9 (35.0)	11.7 (22.8)
MGSDC	65.7 (74.5)	61.8 (70.6)		66.1 (76.8)	62.1 (72.6)	65.3 (75.0)	25.8 (37.1)	13.0 (22.7)
Periwinkle	66.7 (78.1)	67.8 (77.9)	66.1 (76.8)		62.3 (75.1)	74.2 (82.3)	23.1 (35.0)	12.9 (22.4)
Spinach	74.4 (81.8)	73.6 (79.3)	62.1 (72.6)	62.3 (75.1)		66.7 (75.6)	23.7 (37.4)	13.2 (23.1)
Potato	69.2 (78.1)	71.7 (80.0)	65.3 (75.0)	74.2 (82.3)	66.7 (75.6)		26.1 (38.3)	15.8 (28.9)
Human	22.5 (36.7)	21.9 (35.0)	25.8 (37.1)	23.1 (35.0)	23.7 (37.4)	26.1 (38.3)		24.3 (38.9)
Yeast	10.0 (20.0)	11.7 (22.8)	13.0 (22.7)	12.9 (22.4)	13.2 (23.1)	15.8 (28.9)	24.3 (38.9)	

정도 후부터 관찰된 가장 크기가 큰 단백질 band는 크기가 약 42 kDa 정도인데 이는 proenzyme인 것으로 생각된다. 반응 후 20분부터는 다른 2개의 단백질 band가 나타나기 시작하였는데 이들 단백질의 크기는 약 32 kDa과 9 kDa으로서 예상된 processing site로부터 cleavage가 일어난 것으로 생각된다. SAMDC 단백질의 processing은 translation이 시작된 후 10분까지는 관찰되지 않았지만 20분 후에는 상당히 많은 양의 2개의 subunit가 관찰된 것으로 보아 SAMDC 단백질은 10분 정도의 잠복기를 가진 후 processing이 일어나는 것으로 생각된다. Translation이 중단된 후에도 processing이 진행되는가를 알아보기 위하여 반응 시작 후 20분이 경과했을 때 translation을 중단시키기 위하여 cycloheximide를 처리하여 4시간 40분 동안 더 반응을 진행시킨 후 생성된 단백질을 분석하여 보았다. 이 결과에 의하면 SAMDC 단백질의 translation이 중단된 후에도 지속적으로 processing은 일어나지만 그 속도는 매우 느렸다. 이상의 결과로부터 카네이션의 SAMDC 단백질도 사람이나 periwinkle의 SAMDC 단백질과 같이 같은 cleavage site에서 processing이 일어나는 것으로 나타났다. 카네이션 SAMDC proenzyme의 cleavage는 amino acid의 서열상 pCSDC9은 93번째 residue, pCSDC16은 84번째 residue에 존재하는 serine에서 일어난다 (Fig. 1). 또한 나팔꽃에서는 70 번째 residue에 존재하는 serine에서 일어날 것으로 생각된다 (Fig. 5).

SAMDC의 proenzyme은 효소활성을 나타내지 못하지만 proenzyme은 serine residue에서 autocatalytic하게 2개의 subunit로 나뉘는데 N-terminal 쪽의 단백질은 small ( $\beta$ ) subunit를 이루고 C-terminal 쪽의 단백질은 large ( $\alpha$ ) subunit를 이루게 되는데 이 두 개의 subunit가 모여 이루어진 dimer의 단백질에서만 효소활성을 나타낸다 (Pajunen et al., 1988). Large subunit의 N-terminal 쪽에는 serine residue로부터 유래한 pyruvoyl prosthetic group이 존재한다. 카네이션에서 부분 분리된 SAMDC 단백질에 pyruvoyl prosthetic group의 keton기를 변형시키는 phenylhydrazine이나 혹은 hydroxylamine을 처리하여 주면 효소활성이 크게 억제되는 것으로 보아 (Lee, 1996) 카네이션의 SAMDC 단백질도 pyruvoyl prosthetic group을 갖고 있는 것으로 여겨진다.

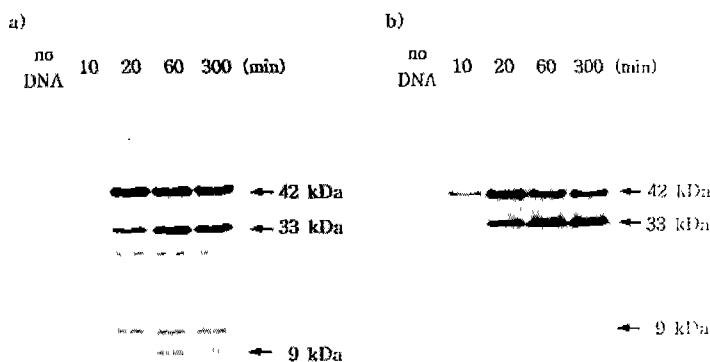


Fig. 2. Polypeptides formed in *in vitro* transcription/translation of pCSDC9 (a) and pCSDC16 (b). The products were analyzed by SDC-PAGE on 12.5% polyacrylamide gels.

카네이션 SAMDC 단백질의 Km 값은  $26.3 \mu\text{M}$ 이며 효소활성은 SAMDC의 비가역적 억제물질인 methylglyoxal-bis (guanylhydrazone) (MGBG)에 의하여 억제되는 특성 등은 다른 식물체에서 분리된 SAMDC의 단백질의 특성과 유사하다 (Lee, 1996). 그러나, 카네이션 SAMDC의 효소활성은  $\text{Mg}^{2+}$ 나 putrescine 등에 의해서 촉진되지는 않았다. 많은 decarboxylase들이 cofactor로서 pyridoxal phosphate를 필요로 하는데 SAMDC의 경우는 pyridoxal phosphate dependent 효소의 활성억제제인 isonicotinic acid hydrazide에 의해서 효소활성이 거의 영향을 받지 않으므로 SAMDC는 pyridoxal phosphate에 독립적인 것으로 나타났다.

SAMDC 단백질은  $\text{Mg}^{2+}$ 나 putrescine 등에 의해서 효소활성이 촉진되는가의 여부에 따라 3 group으로 분류할 수 있다 (Pegg, 1984). 첫째 group은 SAMDC의 효소활성이  $\text{Mg}^{2+}$ 에 의해서는 촉진되지 않지만 putrescine에 의해서는 촉진되는 경우이다. 사람이나 혹은 *Vinca rosea*의 SAMDC의 효소활성은 putrescine에 의해서는 촉진되지만  $\text{Mg}^{2+}$ 에 의해서는 촉진되지 않는다 (Pajunen et al., 1988; Baxter and Coscia, 1973). 둘째 group은 SAMDC의 효소활성이  $\text{Mg}^{2+}$ 에 의해서는 촉진되지만 putrescine에 의해서는 촉진되지 않는 경우이다. 대장균이나 혹은 녹두의 SAMDC 효소활성은  $\text{Mg}^{2+}$ 에 의해서는 촉진되지만 putrescine에 의해서는 촉진되



지 않는다 (Coppoc et al., 1971; Markhan et al., 1982). 셋째 group은 SAMDC의 효소활성이  $Mg^{2+}$ 와 putrescine에 의해서 모두 아무런 영향을 받지 않는 경우이다. 옥수수 SAMDC는  $Mg^{2+}$ 와 putrescine에 의해서 효소활성이 아무런 변화를 나타내지 않는다 (Suzuki and Hirasawa, 1980). 카네이션의 SAMDC는 셋째 group에 속하는 효소로서  $Mg^{2+}$ 와 putrescine에 의해 거의 영향을 받지 않았다 (Lee, 1996).

Putrescine은 SAMDC 단백질의 processing에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 사람의 SAMDC 단백질은 putrescine에 의하여 효소활성이 촉진되는 것 뿐만 아니라 processing도 촉진된다 (Stanley et al., 1994). 그러나 카네이션 SAMDC 단백질의 processing은 putrescine에 의해서 전혀 영향을 받지 않으며 또한  $Mg^{2+}$ 에 의해서도 전혀 영향을 받지 않았다 (Fig. 3). 따라서  $Mg^{2+}$ 와 putrescine에 의하여 SAMDC 단백질의 효소활성이나 processing이 전혀 영향을 받지 않는 점은 사람이나 효모 및 대장균의 SAMDC 단백질과는 특성이 달랐다.

식물 및 동물의 여러 종에서 분리한 SAMDC 유전자를 비교했을 때 나타나는 또 다른 conserved region은 PEST 부위이다 (Fig 1). PEST 부위는 proline, glutamate, serine, threonine 등이 다른 amino acid에 비해 상대적으로 많은 부위로 이러한 PEST 부위를 가지고 있는 단백질은 세포내에서 분해가 빠르게 일어나 half-life가 매우 짧다 (Rogers et al., 1986). SAMDC 단백질은 half-life가 보통 20 ~ 120 분 정도로 half-life가 비교적 짧은 효소이다 (White and Morris, 1989). 카네이션 SAMDC 단백질의 염기서열을 PCGENE program으로 분석하여 보면 PEST 부위로 추정되는 부위가 CSDC9에는 7곳이 있으며 CSDC16에는 6곳이 있다. 특히 포유동물에서 밝혀진 PEST부위인 HIPEPSYVSF sequence가 pCSDC9에서는 268 ~ 281 residue에 존재하며 pCSDC16에서는 259 ~ 272 residue에 존재한다 (Fig 1). Polyamine 생합성에 관여하는 또 다른 효소인 ornithine decarboxylase (ODC)도 half-life가 30분인데 ODC 유전자에서는 2개의 PEST 부위가 있다 (Kahana and Nathans, 1985). 따라서 SAMDC 단백질의 turn-over가 빠른 이유는 여러개의 PEST 부위가 있기 때문인 것으로 생각된다.

카네이션의 SAMDC clones는 다른 clone에 비해 비교적 긴 transcript leader

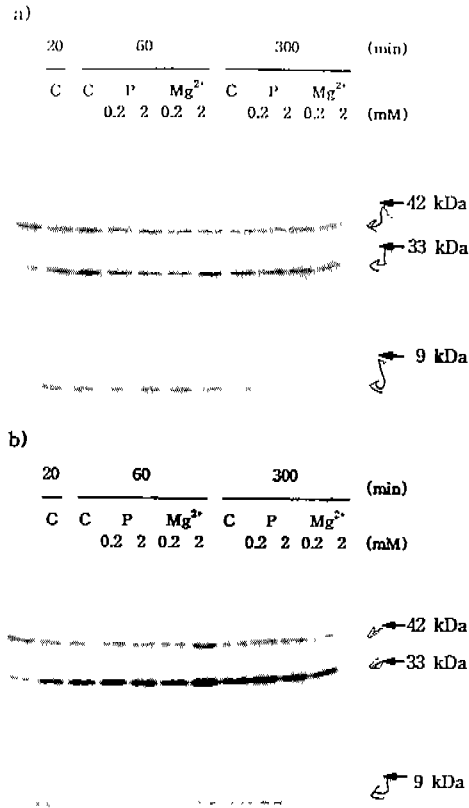


Fig. 3. Effects of putrescine and MgCl<sub>2</sub> on the processing of the polypeptides formed *in vitro* from pCSDC9 (a) and pCSDC16 (b).

를 갖고 있다. CSDC9에는 472 bp, CSDC16에는 502 bp로 이루어진 transcript leader가 있다 (Lee et al., 1996a). Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*)에서 분리된 SAMDC 유전자도 469 bp의 5'-untranslated leader sequence를 갖고 있으며 감자에서 분리된 SAMDC의 유전자도 최소한 500 bp 이상의 긴 transcript leader를 갖고 있다 (Schröder and Schröder, 1995; Mad Arif et al., 1994). 포유동물의 SAMDC도 역시 330 bp 이상의 긴 transcript leader를 갖고 있다 (Pajunen et al., 1988). Polyamine 생합성에 관여하는 효소들은 SAMDC 외에도 ODC를 비롯하여 ADC도 각각 737 bp와 557 bp로 이루어진 transcript leader를 갖고 있다

(Kahana and Nathans, 1985; Percz-Amador et al., 1995).

특히 SAMDC 유전자의 5'-untranslated leader sequence에는 실제로 단백질 합성이 일어나는 AUG start codon 앞쪽에 AUG start codon이 한 개가 더 있으며 이 start codon 뒤에 종결codon이 따라옴으로서 upstream open reading frame (uORF)이 존재하게 된다. Kozak (1987)에 의하면 그가 조사한 유전자 중 약 10% 이하의 유전자에서 uORF가 있는 것으로 밝혀졌다. pCSDC9에는 54개의 amino acid로 이루어진 uORF가 존재하며 pCSDC16에는 52개의 amino acid로 이루어진 uORF가 존재한다 (Fig 4). 또한 periwinkle에는 51개의 amino acid로 이루어진 uORF가 존재한다 (Schröder and Schröder, 1995). 본 연구실에서 분리한 나팔꽃의 SAMDC 유전자의 uORF도 51개의 amino acid로 이루어져 있다 (Fig. 4). 특히 나팔꽃의 SAMDC 유전자는 감자의 SAMDC 유전자에서와 같이 uORF에 intron이 들어 있는데 현재까지 밝혀진 바에 의하면 감자의 경우에는 1개의 intron이 있으며 카네이션의 경우에도 역시 1개의 intron이 존재한다 (Fig. 5). 그러나 동물의 SAMDC 유전자의 uORF에는 intron이 존재하지 않았다. 식물의 SAMDC 유전자에서는 이렇게 긴 uORF가 존재하지만 포유동물의 SAMDC 유전자에서는 6개의 amino acid로 이루어진 uORF가 존재한다. ODC의 경우는 open reading frame 앞쪽에 4개의 AUG 시작 codon이 있는데 이들은 각각 16, 2, 4, 10개의 amino acid 뒤에 종결 codon이 뒤따른다 (Kahana and Nathans, 1985). ADC의 경우는 open

CSDC9	<b>MESKGGKKKSSSSSSSSTKSFAPLGVSTEDLRPKGGIKKFRSAAYSNCAKPKS</b>
CSDC16	<b>MESKGGKKKSSSSSSS--KSFSPPLGVSTEDLRPKGGIKKFRSAAYSNCAKPKS</b>
MORNING GLORY	<b>MESKGGKKKSSSSKSLF---YEAFLGVTVEDVRENGGIKKFRSAAYSNCAKPKS</b>
PERIWINKLE	<b>MESKGGKKKSSSSKSLF---YEAFLGVSTEDVRENGGIKKFRSAAYSNCAKPKS</b>
POTATO	<b>MESKGGKKKSSSSSLF---YVAPLETSTRDVRENGGVKKFRSAAYSNCAKPKS</b>
MAIZE	<b>MESKGGKKSSSSRSM---YEAFLGVSTEDVRE-AGVKKFQSAAYSNCAKPKS</b>

Fig. 4. Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of SAMDC uORF. We modified the potato nucleotide sequence at \* from AA to A.

reading frame 앞쪽에 8개의 amino acid를 encoding하는 1개의 uORF가 있다 (Perez-Amador et al., 1995). 따라서 식물의 SAMDC 유전자는 다른 polyamine 생합성 유전자들의 uORF보다 월등하게 긴 편이며 또한 uORF가 한 개만 존재하는 bicistronic mRNA로 되어 있는 점이 특징이다.

식물의 여러 종에서 분리한 SAMDC cDNA가 amino acid 서열상 coding region에서는 약 65 ~ 75 % 정도의 동일성을 보였으며 pCSDC9과 pCSDC16은 81.7 %의 동일성을 나타냈다. 그러나 uORF에서는 coding region 보다 훨씬 높은 동일성을 나타냈다 (Table 1; Fig. 4). pCSDC9과 pCSDC16의 uORF를 서로 비교하여 보면 amino acid 서열상으로 98.1 %의 동일성을 나타냈으며, 이들 카네이션 SAMDC clones의 uORF들은 나팔꽃, periwinkle 및 감자에서 분리된 SAMDC 유전자의 uORF와도 coding region 보다 높은 약 80% 이상의 동일성을 나타냈다. 따라서 5'-untranslated leader 부위에 coding region 보다 homology가 높은 uORF가 존재하는 것으로 보아 uORF는 어떤 중요한 역할을 갖고 있을 것으로 생각된다. 즉 uORF의 DNA sequence 자체가 어떤 역할을 할 수도 있으며 혹은 uORF로부터 encoding된 작은 단백질 분자가 어떤 역할을 할 수도 있을 것이다.

동물의 SAMDC 유전자의 5'-untranslated leader에 있는 uORF는 T-cell에서만 SAMDC mRNA의 translation 효율을 크게 낮추는 negative regulatory element로 작용한다 (Hill and Morris, 1992; Shantz and Pegg, 199 ). 이의 기작은 uORF의 translation이 시작된 후 종결 codon에서 translation이 종결되던 ribosome이 mRNA와 분리됨으로써 결국 polysomal distribution이 감소하여 uORF의 다음에 위치하는 coding region에 있는 cistron의 translation이 크게 억제된다는 것이다 (Ruan et al., 1994). 특히 uORF를 제거한다든지 혹은 uORF의 translation이 일어나지 못하도록 돌연변이를 일으킨 SAMDC의 돌연변이 유전자를 T-cell에 넣어주면 uORF에 의한 translation의 억제현상이 일어나지 않았다 (Hill and Morris, 1992). 이와 같이 uORF가 mRNA의 translation을 억제한다는 것은 SAMDC의 유전자외에도 다른 유전자에서 밝혀졌다. GCN4 유전자도 5'-untranslated leader에 uORF를 갖고 있는데 이 uORF를 모두 제거하면

translation율이 크게 향상되었다 (Hunt, 1985).

CPA1 유전자의 경우 CPA1의 mRNA의 uORF로부터 encoding된 단백질이 조절유전자의 생성물과 feed-back effector인 arginine이 함께 존재할 때 translation의 억제가 일어난다 (Werner et al., 1987). 따라서 동물의 SAMDC 유전자에서 uORF의 sequence 자체에 의해 translation이 억제되는 것과는 달리 uORF로부터 encoding된 단백질에 의해 translation이 억제될 가능성이 있다. 그러나 5'-untranslated leader에 uORF를 갖고 있는 유전자가 모두 translation이 비효율적으로 일어나는지는 아직 확실하지 않다. Encephalomyocarditis viral DNA는 여러개의 uORF가 존재하는 매우 긴 5'-untranslated leader를 갖고 있지만 이 유전자는 reticulocyte lysate와 숙주세포에서 모두 효율적으로 translation 된다 (Hunt, 1985).

사람이나 bovine의 SAMDC 유전자에서는 uORF가 cap-dependent translation이 일어나는 세포의 translation을 억제하는데 (Hill and Morris, 1992; Ruan et al., 1994) 이의 기작은 uORF의 translation이 일어날 경우 뒤에 있는 open reading frame의 translation이 일어나지 않기 때문이다. 이들 동물의 SAMDC 유전자에서는 cap site와 uORF 사이에 14개 nucleotide가 들어가 있다. 그러나 식물의 경우는 cap site와 uORF 사이의 거리가 동물보다 훨씬 길다. 카네이션의 경우는 이보다 더 길어 최소한 152 bp 이상 떨어져 있다. cDNA인 CSDC9의 경우는 residue 152에서부터 uORF가 시작되며 CSDC16에서는 residue 156에서부터 uORF가 시작되기 때문이다. 카네이션의 경우는 genomic DNA로부터 cap site를 찾아내야만 uORF와의 정확한 거리를 알 수 있지만 나팔꽃과 카네이션을 비롯한 식물의 SAMDC 단백질의 uORF는 cap site로부터 멀리 떨어져 있다. 동물의 SAMDC에서 볼 수 있듯이 uORF의 translation은 eIF-4B의 활성 등의 여러요인에 의하여 조절되기 때문에 카네이션이나 나팔꽃의 uORF가 자체가 open reading frame의 translation을 억제할 가능성은 적을 것으로 생각된다. 특히 식물 SAMDC 유전자의 uORF의 길이가 동물보다 월등하게 길고 이처럼 cap site로부터 멀리 떨어져 있기 때문에 sequence 자체로 인한 것이라기 보다는 오히려 uORF에서 encoding

된 단백질이 SAMDC 유전자의 발현을 조절할 가능성도 있다.

식물에서 polyamine의 생합성은 feed-back inhibition으로 조절되는데 polyamine 생합성에 관여하는 SAMDC, ODC 및 ADC의 유전자 모두가 uORF를 갖고 있으므로 이들 유전자의 uORF가 polyamine 생합성의 feed-back inhibition을 조절할 가능성이 있다. 즉 이들 uORF에서 encoding되는 단백질들이 polyamine 생합성의 feed-back inhibition을 일으키는 특수한 translational repressor로 작용할 가능성을 추측할 수 있다.

## (2) ADC 유전자의 특성

ADC의 유전자가 분리된 토마토 (Rastogi et al. 1993, GenBank accession No. L16582), 귀리(Bell and Malmberg 1990, GenBank accession No. X56802), *E. coli* (Moore and Boyle 1990, GenBank accession No. M31770)의 coding sequences에서 conserved sequence를 찾아 내어 degenerate primers를 만들어 PCR을 수행하였다. Senseprimer의 염기서열은 5'>AACTCGG AAGCTTGGGCT(AGCT)GGAAT(CTA)GA(CT)TA< 3'이었으며 antisense primer의 염기서열은 5' >CGTCGGGAATTC(TA)CC(AG)TC(A G)CT(GA)TC (AG)CA (AGCT)GT < 3이었다. 이러한 primers를 사용하여 PCR을 수행하여 627 bp 크기의 DNA절편을 얻었는데 이의 염기서열을 분석하여 본 결과 토마토의 ADC 유전자와는 68.9 %의 homology를 나타내었고 귀리의 ADC 유전자와는 49 %의 homology를 나타내었다. 한편 대장균의 ADC 유전자와는 30 %의 homology를 나타내었다. 그러나 카네이션의 ADC 유전자의 PCR 부분절편을 귀리나 토마토에서 분리된 ADC 유전자와 비교하여 보면 여러 부위의 conserved region이 존재하였으므로 이를 ADC의 cDNA의 부분절편이라는 결론을 내렸다.

카네이션 cDNA library로부터 PCR로 부터 얻은 627 bp의 ADC cDNA 절편을 probe로 사용하여 screening 한 결과 총 110개의 positive plaques를 얻어 ADC cDNA의 염기서열을 조사하였다 (Fig. 6).

a) Partial sequence of untranslated region of carnation SAMDC genomic DNA

caatgacgtattcactgaaaaataatgatataaccttttatatttctcgtatagcgtatgtttctcgtgaggttgctgctgatatgca 90  
 gaaattccaatactccgtattttattgttaagtcgatttttcatctcgaaggtcacgtgttcaaatcttttgaaaaacttttctcgggt 180  
 atttatctagtttctcgaattcttaattcttaaaatataatatacatttaagtggaaggtcacgtgttcaaatctttcgttcgaatt 270  
 cttaaatgcatggttatttaagcgaaggtccatcaaaattccgagtaactatagtggttgatggtttcagtgctgttatgtgtaactggt 360  
 tgaatgggtatcctaagtcgtcgcgtgatcatgacaacagATTGAATGAGCTAATGGAGTCAAAGGTGGTAAAAAGAAGTCTTCCAGTA 450  
GTAGTAGTAGTAAATCCTTCTTCTCCCACTCGGCTACACCATTGAAGACCTTCGACAAAGGGCGGAATCAAGAAGTTCAGATCAGCTGC 540  
ATACTCCAACGgttcgttctcttatgaagcctcgtctttacatacatgaaattcaatttctgttcttactgtatatagaactcaaccttt 630  
ttgtcttctggttttctggttcgagTCCGCTCGCAAGCCATCCCTGATACGTTTCCAGCGATTCTACCTAGACCACACTAGTGGTCCCTTTT 720  
 TTTTTTTTATTATTATTTTCTTTCTGCAATTAATAATTAGSTCTTTTGATTTCGAGTTCGTTTCTTCTCTGTTTCCCTTCTCTGT 810  
 ACTGCTCGGCTTCTCTTTACGACTATAACATTCTCTCTAGACGACATAACG 863

b) Full sequence of morning glory SAMDC genomic DNA

TCTAGATTTAATGTTCTCGTAGAGATGGAATTTGACTGCCCTAATGATATATTTTTGGATGTCGTTTATCAGTTTTCTTATTTTCG 90  
 ATATTTTTTAAAAAATAGCATATATGATTCGTAACTTATTTCTTTTCGCTTTTTTAACITTTGATGCTTTGGGTTTTATTTAAITTC 180  
 TGGCCTGGTATATTTTCTCTGCGAATTTATCCAAAGTATGGATCTGTTTTGAAAATTTCAAAGATATTGGTCTTTGAAGTACAAATG 270  
 CACGGTTTAGCCTTGATTGTCAGCAGGGTCATTCGTTCTAATATTAGATTTCTAGSTTGTAGGAATGATTAATGAATCATCAGGCACCTC 360  
 GTTGTAAATACTGTTCCGAAGTTCATCTTGACTACTGTAGGATAACACACCAATTCGATGTTTTAAATCTTATCATTTCCAGTTAGTCCCTT 450  
 AGTTCTCGAATTTGAGGAGGAGCGACTCAGCTCTGAGGAGGATAGCATCTGCTCTTCTGTTAGAGAAGGAATATGATTTGGTTTATGCTAT 540  
 GATTTTGTCTGGCAATAGTTTTAAGTGTTTAACCCTTTATACGTTGAAACATTTATGATTTGTTCTGATTTACCTGTGCTGAAT 630  
 CCAATATGCAAGTGAATGAAGTCTGAGGAGTCTAAAGTGGGAAAAAGAAGTCTAGCAGTAGTAAATCTTTGTTCTACGAGGCTCCCTCG 720  
GTTTACACTGTAGAGGACCTTCGACCAACCGAGGAATCAAGAAATTCAGATCTGCTGCTTACTCCAACGgtgagctacttaaatgttct 810  
tcattgtttccttttggtttgatggtttcactttcacttatagatgggtatataatcctcatctatcttcttcttcttattgcaagTGTG 900  
CTCGCAAAACCTCTCGAGGTCCTCCGGGCTTTTTGATAACCAATCAGTGGTTAAATATAGTTAGTTAGTAGAAGATATCATCTGCTCTTT 990  
 CATACTTCTCTCTCACTCGTCTCTGCTATTTCTAATTTAAAACAGCAAGCATTTTCTCTTTTGAACAACAAAAACCTCTCTTTTGG 1080  
 AGCAACACAAAACATCTCTGTGTTTGATTTGAAGTCAAGATGGCCTTGTCAACCTCTGCAATTTGGATTTGAAGGCTATGAAAAGAGGCTTGA 1170  
 M A L S T S A I G F E G Y E K R L E  
 GATCTCATTCTTTGAGGCTGGAATATTTCTGACCCCTGAAGCCGGGGTCTCCGAGCTCTTCTAAGGAGCAATTTGGACAAAGTCTTAA 1260  
 I S F F E A G I F S D P E G R G L R A L S K E Q L D K V L K  
 ACCAGCTGAGTGCACTATTGTCATCATTATCAAATAATGAAGTGTATTCCTATGTTCTTCTGAAATCCAGCCTCTTTGTGTACCCATA 1350  
 P A E C T I V S S L S N N E V D S Y V L S E S S L F V Y P Y  
 CAAGATTATCATAAAACTTGTGGCACTACAAAGCTCCTACTCTCTATCCCTCCCATCTAGAGTTGGCGGATGGACTCAGCCTCAAAGT 1440  
 K I I I K T C G T T K L L L S I P P I L E L A D G L S L K V  
 GAAATCTGTAAATACACTCGTGGGAGTTTTAACTTTCCCTGAGGTTACGCCATATCCGCATCGTAATTTCTCTGGAAGAAGTTGCCATTTCT 1530  
 K S V K Y T R G S F N F P E V P Q Y P H R N F S E E V A I L  
 TGACGGTTACTTTGGTAAACTCGGCACAGGTAGCAAAGCCTATGTGATGGTGGTGTGGGAAACAGCAGCAATGGCATGTTTACTCTGCTG 1620  
 D G Y F G K L G T G S K A Y V M G G A G K Y Q W H V Y S A  
 ATCTGCTGAATCTGCAGAAAAACATTTCCATCTATACCTTGGAGATGTGCATGACTGGCTTGGACAAGAAGATGCATCTGTGTTTTT 1710  
 S A E S A E N T F P I Y T L E M C M T G L D K K S A S V F F  
 CAAGACACAATCTAGTTCTGCTGCTGTGATGACTGATGCTTACAGGCATTAGGAAAATTTCTTCCCTGGATCAGATATATGTGATTTTGATTT 1800  
 K T Q S S S A A V M T D A S G I R K I L P G S D I C D F D F  
 CGAACCATGTGGATACTCAATGAATGCTGTTGAGGGTGGCACAATTTCTACAATTCATGTGACCCCAAGAAGATGGCTCAGCTATGCAAG 1880  
 E P C G Y S M N A V E G G T I S T I H V T P E D G F S Y A S  
 TTTTGAAGCCATGGGTTATGATTTCAAAGATGTGAAGTGGATGTCCTTATCCAGAGAGTGTGTGCTGCTTCCAACTGCTGAATTTCTC 1970  
 F E A M G Y D F K D V N L D A L I Q R V L S C F Q P A E F S  
 TGTGCTTTGCACGTGACTCCATTTGGAGAGAAGCTCGATTCTGTGTTGCAACTGTGATGTGAAAGGATATGCTGTGGACAAGGAGGCTA 2060  
 V A L H C D S I G E K L D S V F E L D V K G Y A C G E R S Y  
 TGAAGCCCTTGGCAAGGGAGGCTCAATATGTACTGTGGCTTCACTAGTACTGGTAGTTGTGGATCTCCGAGATCAACCTGCTCTGCTG 2150  
 E A L G K G G S I M Y C G F T S T G S C G S P R S T L L C C  
 TTGGAGTGAACCGAGGACCGAAGGAGAGAAGAACAACCTTCTAATCAGATG 2203  
 W S E N E D G E G E K K H F

Fig. 5. Nucleotide sequences of SAMDC genomic DNAs of carnation and morning glory.  
 The intron sequences were expressed as lower letters and the uORFs were underlined.

a) Partial sequence of untranslated region of carnation SAMDC genomic DNA

```

caatgacgtattcactgaaaaaataatgataaaccttttataatctcctggtatagcctatggttttctgagggtgctgctgatatgca 90
gaaatccaactactocgtatatttattgtaagtcgatcttcatctcgaaggctcaogtgttcaaatcttttgaaaactttttctcggtt 180
atctatctagtttcggtcgaattcttaattcttaatacattatacattttaagtgaaaggtcacgtgttcaaatctttctggtcgaatt 270
cttaaatgcatggtttatgagcgaagccatcaaaatccgagtaactatagtggttgatggtgttcagtgctgttatggttaactggt 360
tgaaatgggtatcttaagtcgctcggctgatcatgacaacagATTGAATGAGCTAAITGGAGTCAAAGGTGGTAAAAAGAAGTCTCCAGTA 450
GTASTAGTAAATCCTTCTCTCCCACTCGGCTACACCAITGAAGACCTTCGACAAAAGGCGGAATCAAGAGTTCAGATCAGCTGC 540
ATACTCCAACGttcgttctctcttatgagccctcgtctttacatacatgaaatttcaatttctgcttctactgtatagaactcacccttt 630
ttgctctgtttttctgctgagTGGCTCGCAAGCCATCTGTATACGTTTCCAGCGAATCTACCTAGACCACACTAGTGGTCTCTTTT 720
TTTTTTTTTATTATTATTTCCTTCTGCAATTAATAATTAGTCTTTTGATTTCCAGTTCGTTCTCTCTCTGTTTCCCTCTTCTCTGT 810
ACTGCTCGGCTTCCCTTTACGACTATAACATTTCTCTTAGACACATTAACG 863

```

b) Full sequence of morning glory SAMDC genomic DNA

```

TCTAGATTTAATTGTTCTCGTAGAGATGTGGAATTTGACTGSCCTTAATGTATATTTTTTGGATGTCGTTTATCAGTTTTTCGTTATTTTCG 90
ATATTTTTTAAAAAATAGCATATATTGATTCGTAACATTATTTCTTTCGTCCTTTTAACTTTGATGCTTTGCGTTTTTATTTAATTTTC 180
TGGCCTGGTATATTTTCTCTGTCGAATTTATCCAAAGTATGGATTCGTGTTTGAAAATCTAAAGATAITGGCTTTTGAAGTACAAAATG 270
CACCGTTTAGCGTTGATGTCAGCAGGGTCAITCGTCTAATAATTAGATTCITAGGTTGTTAGGAATGATTAATGAAATCATCAGGCACCTC 360
GTGTTAAACTGTTTCGAAGTTCATCTTGACTACTGTAGGATAACACCAAAATTCGATGTTTAAATCTTATCATTCCAGTTAGTCCCTT 450
AGTTCGCAATGAGGAGGAGCAGCTCAGCTCTGAGGAGGATAGCATCTGCTCTCTCTGATAGAGAAGGAATATGATTGGTTTTATGCTAT 540
GATTTGTCCTGGACAATAGTTTTAAGTGTTTAACCCTTTATTACSTTGAACATTAATATGATTTSTTCTGATTTACCTGTGCTGAAT 630
CCAATATGCAAGTGTAAATGAAGTCTAAGGTGGGAAAAAGAAGTCTAGCAGTAAATCTTGTCTTACGAGGCTCCCTG 720
GGTTACACTGTAGAGGACGTTCCGACCAACGGAGGAATCAAGAAATTCAGATCTGCTGCTTACTCCAACGtgagctacttaaatgttct 810
tcattgtttccttttggttgtagtggtttcactttcacttatagatggttatataatcctcactctatcttcttcttggcttatttgagTGTG 900
CTCGCAAACCTATCTGAGGTCGCCGGGCTTTTTGATAACCAATCAGTGGTTAAATATATAGTTAGTTAGAAGATATCATCTGCTCTTT 990
CATACTTCTCTTCTACTCGTCTCTGCTATTCTTAATTTAAACAGCAAGCATTTTCTCTTTGAAACAACAAAACCTCTCTTTTGG 1080
AGCAACACAACATCTCTGTGTTTGTATTGAAGTCAAGATGGCCCTGTCAACCTCTGCAATTTGAAATTTGAAGGCTATGAAAAGAGGCTTGA 1170
M A L S T S A I G F E G E K R L E
GATCTCATTCTTTGAGGCTGGAATATTTTCTGACCCGTAAGGCGGGGCTCCGAGCTCTTCTAAGGAGCAATTTGACAAAAGTCTTAA 1260
I S F F E A G I F S D P E G R G L R A L S K E Q L D K V L K
ACCAGCTGAGTGCATATTGTCTCATCATTAATCAAAATGAAGTTGATTCCTATGTTCTTTCTGAATCCAGCCTCTTTGTGTACCCATA 1350
P A E C T I V S L S L N N E V D S Y V L S E S S L F V Y P Y
CAAGATTATCAATAAAACTTGTGGCACTACAAAGCTCTACTCTCTATCCCTCCCATCCTAGAGTTGGCGGATGGACTCAGCCTCAAAGT 1440
K I I I K T C G T T K L L L S I P P I L E L A D G L S L K V
GAAATCTGTGAAATACACTGTTGGGAGTTTTAACTTTCCTGAGGTCAGCCATATCCGCATGTAATTTCTCTGAAGAAGTGGCATTCT 1530
K S V K Y T R G S F N F P E V P Q Y P H R N F S E E V A I L
TGACGGTTACTTTGGTAAACTCGGCACAGGTAGCAAAGCCTATGTGATGGTGGTGGCTGGGAAACAGCAGCAATGGCATGTTACTCTGC 1620
D G Y F G K L G T G S K A Y V M G A G K Q Q G W H V Y S A
ATCTGCTGAATCTGCAGAAAACACATTTCCCATCTATACCTTGGAGATGTGCATGACTGGCTTGGACAAGAAGATGCATCTGTGTTTTT 1710
S A E S A E N T F P I Y T L E M C M T G L D K K S A S V F F
CAAGACACAATCTAGTTCTGCTGCTGTGATGACTGATGCTTTCAGGCAITTAGGAAAATCTTCCCTGGATCAGATATATGTGATTTTGATTT 1800
K T Q S S S A A V M T D A S G I R K I L P G S D I C D F D F
CGAACCATGTGGATACTCAATGAATGCTGTGAGGTTGGCACAATTTCTACAATTCATGTGACCCAGAAGATGGCTTCAGCTATGCAAG 1880
E P C G Y S M N A V E G G T I S T I H V T P E D G F S Y A S
TTTTGAAGCCATGGGTTATGATTTCAAAGATGTGAACCTGGATGCCCTTATCCAGAGAGTGTGTCTGCTTCCAACCTGCTGAATTTCTC 1970
F E A M G Y D F K D V N L D A L I Q R V L S C F Q P A E F S
TGTTGCTTGGACTGTGACTCCATTTGGAGAGAAGCTCGATTCTGTGTTGCGAACTTGATGTGAAAGGATATGCCTGTGGAGAAAGGAGCTA 2060
V A L H C D S I G E A L D V F L D V K D G Y A C G E R S Y
TGAAGCCCTTGGCAAGGGAGGCTCAATATGACTGTGGCTTCACTAGTACTGGTGTGTTGGATCTCCGAGATCAACCCCTGCTCTGCTG 2150
E A L G K G G S I M Y C G F T S T G S C G S P R S T L L C C
TTGGAGTGAACAGGAGCCAGGAAGGAGAGAAGAACACTTCTAATCAGATG 2203
W S E N E D G E G E K K H F

```

Fig. 5. Nucleotid sequences of SAMDC genomic DNAs of carnation and morning glory. The intron sequences were expressed as lower letters and the uORFs were underlined.



카네이션의 잎으로부터 genomic DNA를 분리한 후 *Eco R I*, *Bam H I*, *Hind III* 및 *Pvu II*로 digestion한 후 high stringency 상태에서 southern blotting을 수행하여 본 결과 *Eco R I*으로 digestion한 경우에는 7 kb, 6 kb, 3.5 kb 크기의 절편이 감지되었으며 *Hind III*로 digestion한 경우에는 23 kb, 12 kb, 4.5 kb 크기의 절편이 각각 감지되었다. 따라서 ADC의 유전자는 genomic DNA에서 최소한 2개 이상의 유전자가 존재하는 multigene family일 것으로 생각된다.

## 2. 카네이션에서 polyamine 생합성 관련 효소들의 효소활성 및 유전자 발현

카네이션 꽃의 발달단계에 따른 polyamine의 생합성 양상을 조사하기 위하여 카네이션의 꽃을 발달단계에 따라 7단계로 나눈 후 각 단계에서 SAMDC와 ADC의 효소활성 및 mRNA의 양을 조사하였다. 카네이션 꽃의 발달에 따른 7단계로는 꽃눈의 상태, 꽃눈이 벌어지려는 상태, 꽃잎이 밖으로 자라 나왔지만 아직은 미성숙한 상태, 개화상태, 개화로부터 3일이 경과한 상태, 개화로부터 6일이 경과한 상태, 그리고 개화로부터 9일이 경과한 상태 등을 Stage A에서 Stage G까지로 나누었다.

### (1) SAMDC의 효소활성 및 유전자의 발현

SAMDC의 효소활성은 Stage D와 Stage E에서 높게 나타났으며 그 이후부터는 감소하다가 ethylene의 생성이 최대를 이루는 Stage F에서는 SAMDC의 효소활성이 크게 감소했다. 그러나 노화가 이미 완료된 상태인 Stage G에서는 오히려 증가했다 (Fig 7).

꽃이 발달하는 과정에서의 mRNA의 양을 측정하기 위하여 각 단계별로 분리한 total RNA를 이용하여 northern blot을 수행하였다. 카네이션으로부터 분리된 SAMDC의 cDNA는 CSDC9과 CSDC16으로 2개의 clone이 분리되었는데 이 두 개의 clone이 염기서열상 homology가 상당히 높은 편이므로 각 clone에 따른 발

현양상을 조사하기 위하여 gene-specific probe를 만들었다. 비교적 homology가 낮은 부위인 3' 부위를 중심으로 PCR을 수행하여 서로 염기서열상의 homology가 낮고 southern hybridization에 의하여 서로 hybridization 하지 않는 pCSDC9sp와 pCSDC16sp의 2개의 probe를 만들었다. 이들 probe를 사용하여 northern blot을 수행한 결과에 의하면 pCSDC9sp에 의하여 인지되는 transcript는 Stage E에서만 강하게 발현되었고 다른 stage에서는 매우 낮은 수준으로 발현되었다. pCSDC16sp의 경우는 모든 단계에서 발현되었으며 그중 Stage D에서 가장 강하게 발현되었다 (Fig 7). 따라서 꽃의 발달에 CSDC9와 CSDC16이 모두 작용하기는 하나 CSDC9보다는 CSDC16이 더 크게 기여하는 것으로 생각된다. SAMDC의 transcript의 양적인 발현양상이 효소활성의 변화와 일치하기 때문에 꽃의 발달단계에 따른 SAMDC의 조절은 이들 유전자가 transcription 되는 단계에서 조절되는 것으로 생각된다.

SAMDC의 효소활성 및 transcript의 양이 꽃잎세포의 신장이 일어나는 시기에 급격하게 증가하므로 이미 꽃눈이 형성된 다음시기에 일어나는 꽃의 발달은 주로 세포신장에 의한 것이므로 이때 SAMDC가 활발하게 작용하다가 노화가 급격하게 일어나는 시기에는 SAMDC의 작용이 크게 저하되었다. 노화가 이미 완료된 시점에서 다시 SAMDC의 활성만이 증가하는 것은 세포내에 존재하고 있는 SAMDC의 효소활성을 일시적으로 증가시켜 polyamine의 생합성 특히 spermine의 생합성을 증가시키는 것으로 생각되는데 이는 amine기를 4개 갖고 있는 spermine의 생합성을 증가시켜 죽어가는 꽃이 갖고 있는 질소원을 spermine에 비축하여 꽃이 떨어지고 난 후 발달할 씨와 열매에 질소를 공급하여 주기 위한 과정으로서 식물이 갖고 있는 경제성의 원리에 따른 과정이 아닌가 생각된다.

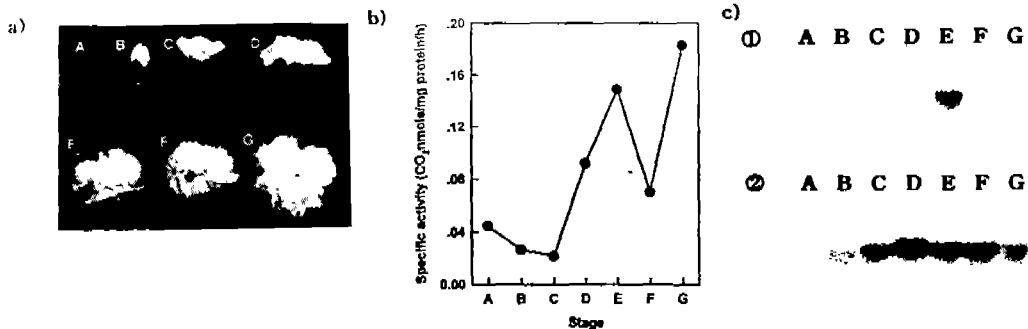


Fig. 7. Analysis of SAMDC activity (b) and transcript accumulation (c) of *CSDC9* (①) and *CSDC16* (②) in the petals during flower development. Panel a shows the stage of flowers used in this experiment.

카네이션의 각 기관별에 따른 SAMDC의 효소활성과 transcript의 양을 조사하여 보았다 (Fig. 8).

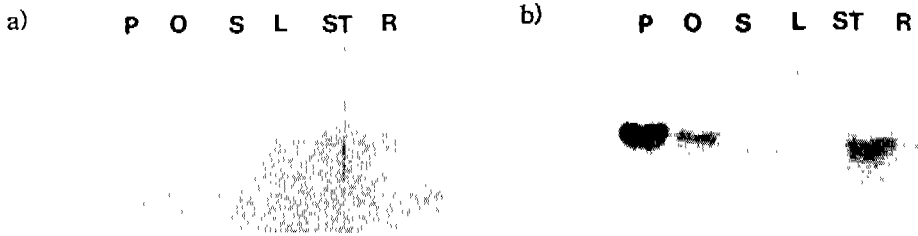


Fig. 8. Northern blot analysis showing the expression levels of *CSDC9* (a) and *CSDC16* (b) in petal (P), ovary (O), style (S), leaf (L), stem (ST) and root (R).

영양기관의 경우 *CSDC9*과 *CSDC16* 모두 줄기에서 가장 많은 transcript의 양이 존재했으며 뿌리에서는 적은 양이 존재했으나 잎에서는 이 두 clone의 mRNA가 거의 감지되지 않았다. 생식기관의 경우는 *CSDC16*의 transcript가 꽃잎에서 강하게 감지되었으며 씨방에서도 적은 양이 감지되었다. 따라서 *CSDC9*과 *CSDC16*은 꽃잎에서 특이하게 많이 발현되는 유전자이며 기타 뿌리나 씨방에서도 발현되는 유전자인 것으로 여겨진다. 그러나 카네이션의 잎에서는 이들 유전자의 transcript가 전혀 감지되지 않았으므로 잎에서 특이하게 발현되는 유전자가 존재할 것으로 생각된다.

## (2) ADC의 효소활성 및 유전자의 발현

꽃잎, 암술, 뿌리, 줄기 잎 등의 기관별에 따른 ADC 효소활성을 조사하여 보면 개화직적인 C시기의 꽃잎에서 가장 높았다 (Fig. 9).

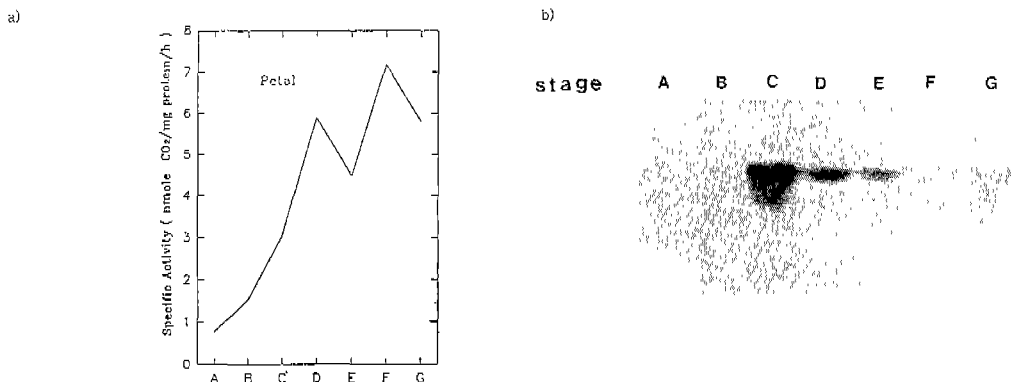


Fig. 9. Analysis of ADC activity (a) and transcript accumulation (b) in the petals during flower development.

꽃잎에서는 개화초기인 A시기에는 ADC의 활성이 매우 낮았으나 꽃잎의 발달이 활발한 시기인 B시기에서부터 D시기까지 급격하게 증가하였으나 노화가 진행되면서 감소하다가 ethylene 생성이 최대를 이루는 F시기에 ADC의 효소활성이 다소 일시적으로 증가하였다. 그러나 노화가 완전히 일어나 꽃이 거의 죽음에 이르는 단계에서는 급격하게 ADC 활성이 낮아졌다. 한편 암술에서의 ADC 효소활성은 꽃잎에서의 ADC 효소활성과 정반대의 양상이 나타났다. 개화 초기인 A시기에는 암술의 ADC 효소활성이 매우 높았으나 개화시기인 D시기까지 급격하게 감소하였으나 style이 길이 신장이 크게 일어나는 시기인 F시기에 ADC의 효소활성이 일시적으로 증가하였지만 그 이후에는 다시 급격하게 효소활성이 떨어졌다 (data not shown). 이로써 꽃잎과 암술 모두에서 길이신장이 크게 일어나는 시기에 ADC의 효소활성이 크게 증가하였으므로 카네이션에서의 ADC도 다른 식물체에서와 마찬가지로 세포분열이 왕성한 시기보다는 과일이 성숙하는 시기나 혹은 기관의 부피팽창이 일어나는 시기에 작용함으로써 세포신장을 유도하는 역할을 하는 것으로 생각된다 (Davies, et al., 1990).

이는 ODC가 세포분열이 왕성한 시기에 효소활성이 크게 증가하는 것과 대조적이다. 따라서 ADC와 ODC가 모두 putrescine 생합성에 관여하지만 이들 효소의 작용은 시기적으로 구분된다.

꽃의 기관이 분화되는 순서를 보면 꽃받침이 가장 처음 분화되어 나오고 그 다음에 꽃잎이 분화되고 다음은 수술이 분화되고 가장 나중에 심피가 분화되어 나오는데 이 심피는 후에 암술머리와 암술대 그리고 씨방 등 3부분으로 분화된다 (Fosket, 1994). 따라서 A시기의 암술에서 ADC의 효소활성이 높은 이유는 암술의 분화에 ADC가 작용하였기 때문으로 생각된다. 그러나 A시기에는 이미 꽃잎의 분화는 완성된 단계이기 때문에 ADC의 효소활성이 낮은 것으로 생각된다. 그러나 분화가 이미 완성된 다음 단계에서는 기관의 신장이 일어나는 시기, 즉 꽃잎에서는 B시기에서 D시기까지 그리고 암술에서는 style의 신장이 일어나는 시기인 F시기에 ADC의 효소활성이 일시적으로 증가하였다. 따라서 ADC는 꽃눈이나 잎눈이 분화되는 시기와 꽃의 기관분화가 일어나는 시기 그리고 꽃의 기관이 신장되는 시

기에 모두 작용하는 것으로 생각된다 (Tiburicio et al., 1988). 또한 꽃잎, 암술, 뿌리, 줄기 잎 등의 기관중에서 ADC효소활성이 꽃잎에서 가장 높은 것으로 보아 ADC의 작용은 세포신장에 의한 꽃잎의 발달에 더욱 중요한 역할을 하고 있는 것으로 생각된다.

꽃잎의 경우 F시기에 일시적으로 ADC의 효소활성이 증가한 것은 G시기에 일어나는 질소원으로서의 spermine의 생합성에 필요한 putrescine을 합성하기 위한 것으로 추측된다. 한편, F시기에는 ethylene 생합성도 최대를 이루는 시기이다. 따라서 F시기에서 ADC의 효소활성이 최대를 이루는 것은 노화가 일어나면서 세포가 수분을 상실하기 때문에 이에 대한 반응으로서 water stress에 대하여 세포내 완충역할을 하는 putrescine을 합성하기 위하여 ADC의 효소활성이 증가하는 것으로도 생각할 수 있다. 꽃잎의 노화가 일어나면서 ethylene 생합성과 polyamine 특히 putrescine의 생합성이 증가하는 결과가 여러 식물체에서 관찰되고 있다. 토마토의 성숙이 완성되어 overripening이 일어난 토마토에서도 조직내 putrescine 함량이 크게 증가한 것이 관찰되었다 (Acosta, 1990). 이들의 주장에 의하면 polyamine 생합성과 ethylene 생합성은 비록 서로 공통의 전구물질인 SAM으로부터 전환되지만 두개의 생합성 경로는 서로 독립적으로 작용한다는 것이다. 또한 putrescine과는 달리 spermidine만이 ethylene 생합성이 일어나기 전에 세포내 함량이 감소하는 것으로 보아 spermidine의 세포내 함량의 감소가 과일의 성숙을 유도하는 신호라고 설명하고 있다.

따라서 식물체가 노화가 일어나 죽는 과정에서 ADC의 효소활성이 먼저 증가하고 이어서 spermine의 세포내 함량이 증가하는 이유는 우선은 노화에 따른 수분손실의 완충역할을 위하여 putrescine의 세포내 함량이 증가하게 되고 이렇게 증가된 putrescine은 결국 amine기의 저장체로서 즉 질소의 저장체로서 spermine의 함량을 증가시키는 것으로 생각된다.

### 3. 나팔꽃에서 SAMDC의 효소활성 및 유전자 발현

12L/12D의 광·암 주기로 7일 동안 키운 나팔꽃 (*Pharbitis nil*)의 떡잎에 빛

을 쪼여주면 1시간 이내에 SAMDC의 활성이 10배 이상 증가하며 동시에 SAMDC의 transcript의 양도 크게 증가하였다 (data not shown). 이는 빛에 의한 SAMDC 효소활성의 증가가 transcription 단계에서 일어나는 것으로 생각된다. 빛은 식물의 발달과정에 중요한 역할을 하는 환경요인이다. 현재까지 밝혀진 유전자 중 빛에 의하여 조절되는 유전자는 광합성에 관련한 유전자 외에도 nitrate reductase (Galangan et al., 1988), phytochrome (Tomizawa et al., 1990) 및 Chalcone synthase (Chappell and Halibrock, 1984) 등의 유전자가 보고 되었다. 빛에 의하여 SAMDC의 활성이 짧은 시간에 증가하는 것은 빛이 polyamine의 생합성을 증가함으로써 식물의 발달에 관여하는 이들 유전자의 발현을 조절할 가능성을 제시할 수 있다 (Hirasawa and Shimada, 1994).

#### 4. Polyamine 생합성과 ethylene 생합성의 상호관계

##### (1) Polyamine과 ethylene의 생합성

개화기 상태에서 절취하여 25°C에서 배양한 카네이션 꽃에서는 노화가 진행되면서 spermidine과 spermine 등의 세포내 polyamine 함량은 배양후 3, 4 일 경에 최고치를 나타내었지만(Fig. 10) ethylene 생성량은 배양후 6일 경에 최고치를 나타내었다 (Fig. 11).

이러한 결과는 과일의 성숙이 일어나는 과정에서 polyamine의 생합성량이 감소하면서 ethylene생합성이 증가하는 보고와 유사하였다 (Apelbaum, 1990). 이러한 결과를 설명할 수 있는 하나의 기작으로 polyamine의 생합성량이 많으면 이들 polyamine에 의하여 ethylene의 생합성체계가 억압되다가 식물의 발달단계에 따라 polyamine의 생합성량이 줄어들면서 억압된 ethylene의 생합성체계가 release되어 ethylene의 생합성이 급격하게 증가되는 것을 제시할 수 있다.

SAM은 ethylene과 polyamine의 공통의 전구물질이다. 따라서 polyamine과 ethylene의 생합성은 전구물질인 SAM에 대하여 서로 경쟁성을 나타낸다는 주장이

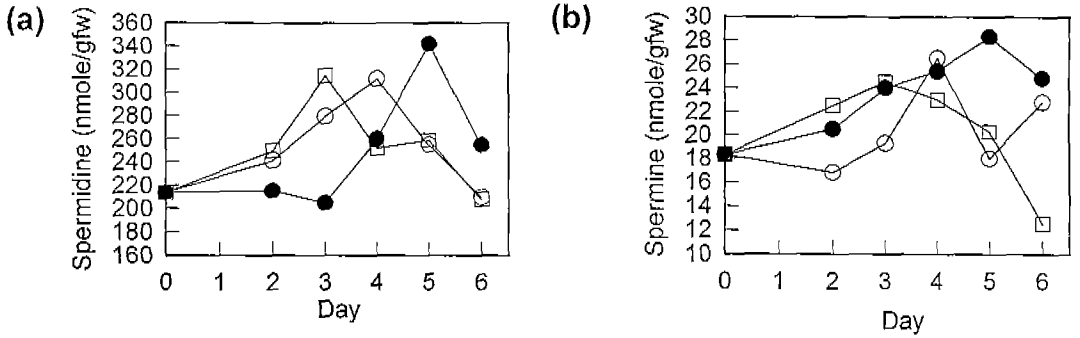


Fig. 10. Changes in polyamine levels from petals of carnation flowers which were held with their stem in DI (○—○), 1 mM spermine (●—●), or 1 mM MGBG (▽—▽) through 6 days after anthesis. (A): spermidine level; (B): spermine level. The values are presented as the mean of two independent experiments.

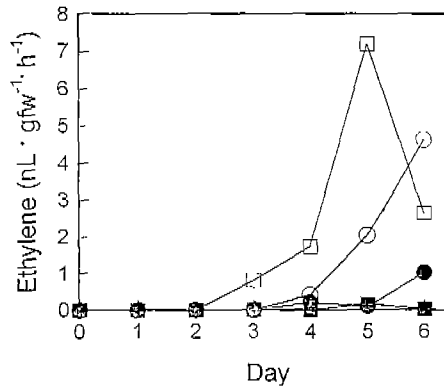


Fig. 11. Ethylene production from petals of carnation flowers which were held with their stem in DI (○—○), 1 mM spermine (●—●), 1 mM MGBG (▽—▽), or both of 1mM spermine and 1 mM MGBG (◻—◻) through 6 days after anthesis. The values are presented as the mean of 6 independent experiments.

있다. 그러나 카네이션에서 꽃의 노화가 진행되면서 SAM synthetase의 transcript의 양은 감소하므로 ethylene 생합성의 급격한 증가는 SAM synthetase transcript의 양적인 증가를 수반하지 않는다 (Woodson et. al., 1992).

Polyamine 생합성의 rate-limiting step의 하나인 SAMDC의 유전자를 antisense의 형태로 감자에 도입시킨 결과 polyamine의 생합성량이 크게 저하됨으로써 식물이 비정상적으로 성장한다는 것이 보고되었다. 절간의 크기가 작았으며 줄기의 곁가지가 많이 생겼으며 잎의 크기도 월등히 작았으며 뿌리의 발육도 크게 저하되었으며 꽃도 맺히지 않았을 뿐만 아니라 덩이줄기도 형성되지 않았으며 ethylene생합성이 크게 증가하여 식물의 노화가 급격하게 진행되었다. 이들은 SAMDC 유전자의 sense 형태로의 도입을 시도하였으나 성공하지 못하였으므로 그 역의 경우는 밝혀져 있지 않다 (Kumar et al., 1996). 이들의 실험결과는 SAMDC 유전자의 발현이 antisense SAMDC gene에 의하여 억제됨으로써 내생 polyamine의 생합성이 억제됨으로써 ethylene의 생합성이 증가했다고 생각할 수 있다.

## (2) Polyamine에 의한 ethylene 생합성의 억제

Polyamine한 SAMDC의 비가역적인 ethylene 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 카네이션한 SAMDC의에 putrescine, spermidine 및 spermine을 처리하였을 때 모두 ethylene의 생합성을 크게 억제했으며 그 중 가장 효과적인 polyamine은 spermine 이었다. Spermine은 ACC synthase와 ACC oxidase의 transcript의 양을 크게 저하시킨다 (Fig. 12). 또한 SAMDC의 비역가적인 억제물질인 MGBG

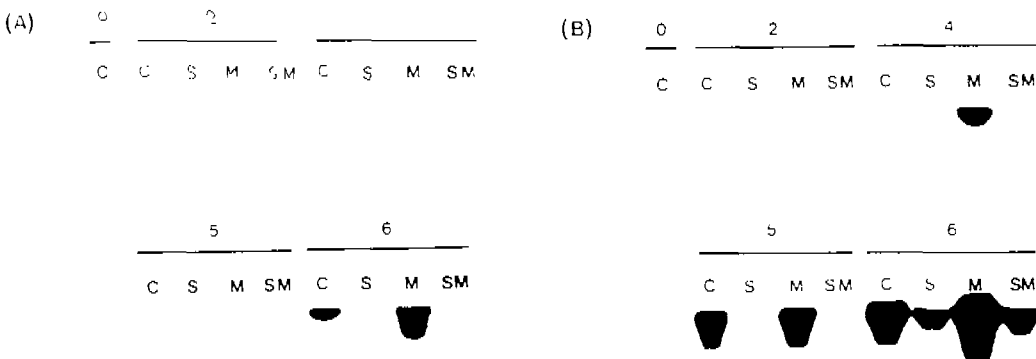


Fig. 12. Accumulation of ACC synthase and ACC oxidase transcripts in the petals of carnation flowers which were held with their stem in DI ( C ), 1 mM spermine ( S ), 1 mM MGBG ( M ), or both of 1mM spermine and 1 mM MGBG ( SM ) through 6 days after anthesis.. (A): ACC synthase transcripts; (B): ACC oxidase transcripts. Numbers indicate the incubation day after harvest. Twenty micrograms of total RNA was loaded per lane.



를 처리하면 ACC synthase와 ACC oxidase의 transcript의 양이 크게 증가하며 꽃의 노화도 촉진된다. MGBG와 spermine을 동시에 처리하면 MGBG의 효과가 spermine에 의하여 사라지게 됨으로써 spermine만 단독으로 처리한 경우와 유사한 정도의 ACC synthase 및 ACC oxidase의 transcript의 양으로 회복하게 된다. 이는 spermine 등의 polyamine은 ethylene 생합성 관련 유전자들의 발현을 억제함으로써 transcription 단계에서 ethylene의 생합성을 크게 억제시킴을 알 수 있다. 이와 같이 내생 polyamine과 같은 저농도의 polyamine도 ethylene의 생합성을 억제할 수 있다는 것이 확인된다면 식물의 발달과정 중 노화가 일어나는 근본적인 기작으로 노화는 내생 polyamine의 감소에 기인한다는 것임을 밝힐 수 있을 것이다.

### III. 결 론

세포의 생장 및 분열, 그리고 과일과 꽃의 발달에 관여하는 polyamine은 ADC, ODC 및 SAMDC에 의하여 생합성된다. 본 연구에서는 카네이션 꽃의 발달과정에 작용하는 ADC와 SAMDC의 cDNA를 cloning하였으며 또한 나팔꽃의 빛에 대한 반응에 관여하는 SAMDC의 genomic DNA를 cloning하였다. 카네이션 꽃이 발달되는 과정에서는 세포신장이 크게 일어나는 시기에 ADC와 SAMDC의 효소활성이 증가하였으며 이러한 효소활성의 증가는 ADC와 SAMDC의 유전자의 transcription의 증가에 기인하였다. 나팔꽃에서는 빛에 노출되었을 때 SAMDC의 효소활성이 급격하게 증가하는데 이와 함께 역시 SAMDC의 transcript의 양도 증가하였다. 이상의 결과로 polyamine 생합성 효소들의 발현은 모두 transcription 단계에서 조절되는 것으로 생각된다.

이들 polyamine 생합성 관련 유전자들을 분석하여 보면 ADC와 SAMDC의 경우 모두 식물에서 분리된 각각의 유전자들끼리는 상당히 높은 염기서열상의 동일성을 나타내었다. SAMDC는 카네이션에서 서로 다른 2개의 cDNA가 분리되었고 southern blot 분석에 의하면 SAMDC 뿐만 아니라 ADC도 multigene family

로 되어 있을 것으로 생각된다. 또한 이들 효소들은 상당히 짧은 half-life를 갖고 있는데 이는 이들 유전자가 갖고 있는 putative PEST sequences에 기인하는 것으로 생각된다. SAMDC는 proenzyme으로 translation된 후 2개의 subunits로 나뉘는 processing 과정을 거친 후 이들 subunits로 이루어진 dimer가 되어야 비로서 효소활성을 갖는 것으로 생각된다.

ADC와 SAMDC 모두 5'-untranslated leader가 상당히 길었으며 이 부위에 uORF가 모두 존재하였다. 특히 식물의 서로 다른 종에서 분리된 SAMDC uORF의 경우 amino acid 상의 동일성이 무척 높은 편이었으므로 uORF가 translation 과정에서 중요한 기능을 나타낼 것으로 여겨지나 아직 밝혀진 바가 없으므로 본 연구진에서는 현재 이를 밝히기 위한 연구를 수행하고 있다. 첫째는 다른 유전자에서 보는 것보다 훨씬 긴 SAMDC의 uORF가 실제로 translation이 되는지를 밝히기 위하여 uORF에 대한 antibody를 만들고 있다. 서로 다른 여러 조건에서 uORF 단백질의 존재여부를 살펴봄으로써 uORF의 기능을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다. 다음은 uORF를 제거한 mutant construct를 제조하여 이의 translation을 조사하여 봄으로써 동물에서 밝혀진 결과인 uORF가 translation을 억제한다는 것을 조사하여 보고자 한다.

Polyamine의 세포내 함량이 비교적 일정하게 유지되는 compensatory nature를 갖고 있다는 점과 (Lee and Park, 1991) feed-back inhibition이 된다는 점으로 보아 이러한 특성이 uORF에 의하여 일어날 가능성이 있다. 카네이션의 SAMDC는 동물의 SAMDC와는 다르게 putrescine에 의하여 processing이 촉진되지 않았는데 이는 결국 SAMDC의 조절이 uORF에 의하여 스스로 조절될 가능성을 더욱 높혀주고 있다. 따라서 SAMDC와 ADC가 갖고 있는 uORF의 기능을 연구함으로써 세포내 polyamine의 생합성 조절기작을 밝힐 수 있을 것이다. 이는 특히 식물의 노화 hormone인 ethylene이 polyamine에 의하여 조절될 수 있는 가능성이 있으므로 식물에서의 polyamine의 생합성 조절기작을 밝히는 것은 식물의 생장과 분화 및 노화에 이르는 식물의 전체적인 발달과정을 밝히는 것에 크게 기여할 수 있을 것이다.

#### IV. 참고 문헌

- Acosta, M., Casas, J.L., del Rio, J.A., Arnao, M.B., Ortuno, A. and Sabater, F. 1990. Polyamine and ethylene metabolisms during tomato fruit ripening. *In* Plant Aging. Basic and Applied Approaches. Rodriguez, R., Sanchez, T.R. and Durzan, D.J. (eds.), Plenum Press, New York. pp. 429-433.
- Apelbaum, A. 1990. Interrelationship between polyamines and ethylene and its implication for plant growth and fruit ripening. *In* Polyamines and ethylene: Biochemistry, physiology, and interaction. Flores, E.F., Arteca, R.N. and Shannon, J.C. (eds.), American Society of Plant Physiology, Rockville. pp. 278-294.
- Baxter, C. and Coscia, C.J. 1973. *In vitro* synthesis of spermidine in the higher plant, *Vinca rosca*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 147-154.
- Bell, E. and Malmberg, R.L. 1990. Analysis of cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *Escherichia coli* arginine decarboxylase and evidence of protein processing. *Mol. Gen. Genet.* 224: 431-436.
- Bolle C., Herrmann R.G. and Oelmüller R. 1995. A spinach cDNA with homology to S-adenosylmethionine decarboxylase. *Plant Physiol.* 107: 1461-1462
- Chappel, J. and Hahlbrock, K. 1984. Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature.* 311: 76-78.
- Coppoc, G.L., Kallio, P. and Williams-Ashman, H.G. 1971. Characteristics of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase from various organisms. *Int. J. Biochem.* 2: 673-681.
- Davies. P.J., Rastogi, R. and Law, D.M. 1990. Polyamines and their metabolism in ripening tomato fruit. *In* Polyamines and Ethylene: Biochemistry,

- Physiology, and Interactions. Flores, H.E., Arteca, R.N. and Shannon, J.C. (eds.), American Society of Plant Physiology, Rockville. pp 112-125.
- Evans, P.T. and Malmberg, R.L. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 40: 235-269.
- Fosket, D.E. 1994. *Plant Growth and Development. A Molecular Approach.* Academic Press, San Diego. 500 pp.
- Galangan, F., Daniel-vodele, F., Moureaux, T., Dorbe, M.F. and Leydecker, M.T. 1988. Expression of leaf nitrate reductase genes from potato and tobacco in relation to light-dark regions and nitrate supply. *Plant Physiol.* 88: 383-388.
- Galston, A.W. 1989. Polyamines and plant response to stress. *In The Physiology of Polyamines.* Bachrach, U. and Heimer, Y.M. (eds.); Vol. 2, CRC Press Inc., Boca Raton. pp 99-106.
- Hirasawa, E., Shimada, A. 1994. The photoresponse of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in leaves of *Pharbitis nil*. *Plant Cell Physiol.* 35: 505-508.
- Hunt, T. 1985. False starts in translational control of gene expression. *Nature.* 316: 581-582.
- Kahana C. and Nathans, D. 1985. Nucleotide sequence of murine ornithine decarboxylase mRNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 1673-1677.
- Kashiwagi, K., Taneja, S.K., Liu, T.Y., Tabor, C.W. and Tabor, H. 1990. Spermidine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Biosynthesis and processing of a proenzyme form of a S-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 265: 22321-22328.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequence from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15, 8125-8148.
- Kumar A., Taylor, M., Mad Arif, S.A. and Davies, H.V. 1996. Potato plants

- expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: Antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant Journal*. 9: 147-158.
- Lee, M.M., Lee, S.H. and Park, K.Y. 1996a. Nucleotide sequence of cDNA (GenBank U38526, U38527) encoding S-adenosylmethionine decarboxylase from carnation flower. *Plant Physiol.* 110: 714.
- Lee, M.M., Lee, S.H. and Park, K.Y. 1996b. Characterization and expression of S-adenosylmethionine decarboxylase gene in carnation flower. *Plant Mol. Biol.* (in submission).
- Lee, M.M., Lee, S.H. and Park, K.Y. 1996c Effects of spermine on ethylene biosynthesis in cut carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers during senescence. *Plant Physiol.* (in submission)
- Lee, M.M. 1996. cDNA cloning of S-adenosylmethionine decarboxylase from carnation (*Dianthus Caryophyllus* L.) petal and studies on the expression. Ph D Thesis. Yonsei University, Seoul.
- Lee, S.H. and Park, K.Y. 1991. Compensatory aspects of the biosynthesis of spermidine in tobacco cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol* 32: 523-531.
- Mad Arif, S.A., Taylor, M.A., George, L.A., Butler, A.R., Burch, L.R., Davies, H.V., Stark, M.J.R. and Kumar, A. 1994. Characterisation of the S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene of potato. *Plant Mol. Biol.* 26: 327-338
- Marié, S.C., Crozat, A. and Jänne, O.A. 1992. Structure and organization of the human S-adenosylmethionine decarboxylase gene. *J. Biol. Chem.* 267: 18915-18923.
- Markham, G.D., Tabot, C.W. and Tabor, H. 1982. S-adenosylmethionine

- decarboxylase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 257: 12063-12068.
- Moore, R.C. and Boyle, S.M. 1990. Nucleotide sequence and analysis of speA gene encoding biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 4631-4640.
- Pajunen, A., Crozat, A., Jänne, O.A., Ihalainen, R., Laitinen, P.H., Stanley, B., Madhubala, R. and Pegg, A.E. 1988. Structure and regulation of mammalian S-adenosylmethionine decarboxylase. J. Biol. Chem. 263: 17040-17049
- Park, K.Y. and Lee, S.H. 1990. Role of S-adenosylmethionine as an intermediate in relation between polyamine and ethylene biosynthesis in suspension-cultured tobacco cells. Korean J. Bot. 33: 87-96.
- Pegg, A.E. 1984. S-adenosylmethionine decarboxylase: a brief review. Cell Biochemical Function 234: 249-262.
- Perez-Amador, M.A., Carbonell, J. and Granell A. 1995. Expression of arginine decarboxylase is induced during early fruit development and in young tissue of *Pisum sativum* (L.). Plant Mol. Biol. 28: 997-1009.
- Rastogi, R., Dulson, J. and Rothstein, S. 1993. Cloning of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) arginine decarboxylase gene and its expression during fruit ripening. Plant Physiol. 103: 829-834.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. Science. 234: 364-368
- Ruan, H., Hill, J.R., Fatemie-Nainic, S. and Morris, D.R. 1994. Cell-specific translational regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase mRNA. J. Biol. Chem. 269: 17905-17910.
- Schröder, G. and Schröder, J. 1995. cDNAs for S-adenosylmethionine decarboxylase from *Catharanthus roseus*, heterologous expression, identification of proenzyme-processing site, evidence for the presence of both subunits in the active enzyme, and a conserved region in the 5'

- mRNA leader. Eur. J. Biochem. 228: 74-78.
- Shantz, L.M., Viswanach, R. and Pegg, A.E. 1994. Role of the 5'-untranslated regions of mRNA in the synthesis of *S*-adenosylmethionine decarboxylase and its regulation by spermine. Biochem. J. 302: 765-772.
- Smith, T.A. Polyamines. 1985. Ann. Rev. Plant Physiol. 36: 117-143.
- Stanley, B.A., Pegg, A.E. and Holm, I. 1989. Site of pyruvate formation and processing of mammalian *S*-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme. J. Biol. Chem. 264: 21073-21079
- Suzuki, Y. and Hirasawa, E. 1980. *S*-adenosylmethionine decarboxylase of corn seedlings. Plant Physiol. 66: 1091-1094.
- Tabor, C.W. and Tabor, H. 1984. Polyamines. Annu. Rev. Biochem. 53: 749-790.
- Taylor, M.A., Mad Arif S.A., Kumar, A., Davies, H.V., Scobie, L.A., Pearce, S.R., Flavell, A.J. 1992. Expression and sequence analysis of cDNAs induced during the early stages of tuberisation in different organs of potato plant (*S. tuberosum* L.). Plant Mol. Biol. 20: 641-651.
- Tiburcio A.F., R. Kaur-Sawhney and A.W. Galston. 1988. Polyamine biosynthesis during vegetative and floral bud differentiation in thin layer tobacco tissue cultures. Plant Cell Physiol. 29: 2141-1249.
- Tomizawa, K.I., Nagalani, A. and Furuya, M. 1990. Phytochrome genes studies using the tools of molecular biology and photo-morphogenetic mutants. Photochem. Photobiol. 51: 265-276.
- Werner, M., Feller, A., Messinguy, F. and Piarard, A. 1987. The leader peptide of yeast gene CPA1 is essential for the translational repression of its expression. Cell. 49: 805-813.
- White, M.W. and Morris, D.R. 1989. *S*-adenosylmethionine decarboxylase genes and expression. In Bachrach, U. and Heimer, Y.M. (eds), The physiology

of polyamines. pp. 331-343. CRC press, Inc, Boca Raton, Florida.

Woodson, W.R., Park, K.Y., Drory, A., Larsen, P.B. and Wang, H. 1992.

Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers. *Plant Physiol.* 99: 526-532.

Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 155-189.