

옥수수 감부균에 의한 페닐알라닌의 대사적 분해

현민우 · 김성환*

단국대학교 미생물학과 및 기초과학연구소

Metabolic Fate of Phenylalanine in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*

Min Woo Hyun and Seong Hwan Kim*

Department of Microbiology and Institute of Basic Sciences, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

(Received 31, October 2011., Accepted 4, November 2011)

ABSTRACT: Cetecol has been known as a component of melanin in teliospores of the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Its metabolic precursor has been assumed to be benzoic acid but it has not been proven yet. This study was carried out to verify the synthesis of benzoic acid and to chase its metabolic origin in *U. maydis*. For this aim, the catabolic process of phenylalanine was investigated by culturing the fungus in the complete medium containing L-¹⁴C-phenylalanine and ¹⁴C-*trans*-cinnamic acid. We detected *trans*-cinnamic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid and hydroxybenzoic acid derivatives from the extracts of the fungus cells and cultural filtrates by thin layered chromatography analysis. We also observed that the fungus could completely catabolize L-¹⁴C-phenylalanine and produce ¹⁴CO₂ in the air. Conclusively, this study provided an evidence that *U. maydis* could produce benzoic acid through catabolic process of phenylalanine.

KEYWORDS: Benzoic acid, Phenylalanine metabolism, *Ustilago maydis*

Ustilago maydis(옥수수 감부균)는 담자균으로서 옥수수 식물의 잎, 줄기, 이삭, 화기 등에 침입하여 검은색의 포자를 돌출시키면서 곰팡이로서는 유일하게 기주식물에 암종(plant tumor)을 일으키는 진핵생물체이며, 우리나라를 비롯하여 세계 각국의 옥수수 생산에 피해를 주는 식물병원균이다 (Agrios, 1988). *U. maydis*가 식물에 세포 비대성 암을 일으키는 데는 식물조직 내에서 유성세대의 포자인 동포자(teliospore)를 형성하기 시작하면서 이루어지는데 동포자는 항상 검고 진한 갈색의 색소를 띠고 있다. 따라서 동포자의 색소 형성과 조직의 암화는 어떠한 연계가 있을 것으로 사려 되고 있다. *U. maydis*가 만드는 동포자의 색소는 catechol 계 멜라닌으로 분석되면서(Piattelli *et al.*, 1965) 이 대사물질의 전구체인 benzoic acid가 세포내에서 만들어질 것으로 추정되는 한편 benzoic acid가 어디서 유래하는지 그 원천에 대한 의문이 있어왔다. 이러한 의문에 대한 하나의 가능성은 phenylalanine 아미노산 분해의 대사산물로부터 유래 할 것으로 추정되었으나 아직 연구보고 된 바 없다. 이에 따라 본 연구에서는 *U. maydis*균이 phenylalanine을 분해하여 benzoic acid를 생성하는지 알아보고자 방사성 동위 원소 추적을 통하여 대사 경로를 조사하였다.

Phenylalanine 분해산물의 분석을 위해서는 효모형태로

자라는 *U. maydis* 518 균을 complete media(Holliday, 1974)에 접종하고 25°C에 배양하여 유지하면서 사용하였다. 방사성 동위원소 추적 실험을 위해서는 phenylalanine ammonia-lyase 효소활성유도 액체배지(Kim *et al.*, 2001b) 50 ml을 담은 2개의 서로 다른 300 ml 유리플라스크에 균체 1 ml (2×10^8 cells)를 접종하여 25°C 암 조건에서 분당 200 rpm 속도로 16시간 씩 각각 회전배양 후 하나의 배지에는 5 Ci L-[U-¹⁴C]-phenylalanine (sp. act. 474 mCi/mmol)를 첨가하고 다른 하나의 배지에는 2 Ci L-[U-¹⁴C]-cinnamic acid (sp. act. 474 mCi/mmol)를 첨가한 후 2시간씩 추가배양을 실시하였다. 배양된 *U. maydis* 균체는 4°C에서 15 min 동안 14,000 × g 조건에서 고속원심분리하여 배양액과 분리하여 수거하였다. 세포추출물은 95% ethanol에서 10 min 동안 끓여서 준비하였고 배양액 추출물은 6N HCl로 산성화 시킨 후 diethyl ether로 분별 추출하여 준비하였다. 준비된 이들 2가지 추출물은 질소가스로 농축시킨 후 Thin layer chromatography (TLC: silica gel type, Merk Co.)를 실시하였다. 1차 전개는 n-butanol : ethanol : water = 4 : 1 : 1을 전개용액으로 사용하였고 2차 전개는 toluene : acetic acid = 4 : 1을 전개용액으로 사용하였다. 전개된 TLC plate는 후두에서 휘발성 유기용매를 건조시킨 후 X-Omat AR film (Kodak)에 1주일간 감광시켰다. Phenylalanine으로부터 유래하는 대사 물질들의 동정을 위해서는 film에 전개되어 나타나는 물질의

*Corresponding author <E-mail : piceae@naver.com>

Rf 값을 측정하고 동시에 같은 Rf 값을 가지는 알려진 물질을 함께 전개하여 확인하였다. *U. maydis*가 배양 중에 phenylalanine을 대사하면서 최종 분해산물로서 ^{14}C 을 발생시키는지 알아보기 위해서는 앞서와 같이 준비된 배양배지에 0.25 Ci의 L-[U- ^{14}C]-phenylalanine을 첨가하여 같은 조건으로 16시간 배양하면서 발생하는 CO_2 호흡산물을 Hyamine-hydroxide를 통해 흡수시킨 후 액체섬광계수기 (LS-6500/Beckman Coulter, Inc. Germany)를 사용하여 흡수된 산물에 ^{14}C 방사성 원소의 존재 유무를 조사하였다.

Phenylalanine 분해 물질 분석

탄소 동위원소가 표지된 L- ^{14}C -phenylalanine 및 ^{14}C -*trans*-cinnamic acid를 첨가한 액체배지에서 2시간 자란 *U. maydis* 균의 대사산물의 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 검출된 물질로는 *trans*-cinnamic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid 등이 있었고 그 밖에 hydroxybenzoic acid derivatives 추정되는 다른 benzoic acid 유래 물질 등이 검출되었다. 이러한 물질들은 균체세포 추출물과 배양액 모두에서 검출되었다. 검출된 물질을 자세히 살펴보면 L- ^{14}C -phenylalanine을 첨가한 배지에서 자란 균체로부터 *trans*-cinnamic acid가

만들어짐을 알 수 있었고 (Fig. 1A) 배양액에 benzoic acid가 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 1B). 한편 ^{14}C -*trans*-cinnamic acid를 첨가한 배지에서 자란 균체로부터 benzoic acid의 존재와 그 밖의 밝혀지지 않은 산물들이 존재함을 알 수 있었고 (Fig. 1C) 배양액으로 부터는 *trans*-cinnamic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid와 그 밖에 다른 hydroxybenzoic acid derivatives 추정물질이 존재함을 볼 수 있었다 (Fig. 1D). 이로 볼 때 첨가된 L- ^{14}C -phenylalanine 및 ^{14}C -*trans*-cinnamic acid를 균체 내에서 대사하여 균체의 세포 밖으로 이들의 대사산물인 *trans*-cinnamic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid 등의 유기산을 배양배지에 배출하는 것을 확인하였다. L- ^{14}C -phenylalanine 보다 ^{14}C -*trans*-cinnamic acid를 첨가한 배지에서 더 다양하게 유기산이 배출되었는데 이는 *U. maydis*균이 자라면서 phenylalanine을 분해하여 대사라도 사용하지만 세포내 단백질 합성에 주로 더 사용하기 때문일 것으로 사료된다. cinnamic acid를 첨가한 경우는 이물질이 농도가 높으면 균체에 독성이 될 수 있는바 빨리 분해 대사하여 세포 밖으로 내보내는 것으로 사료된다. 한편 L- ^{14}C -phenylalanine이 첨가된 배지에서 6시간 동안 배양하면서 포집한 공기 중의 호흡대사물질로 부터는 액체섬광계수기를 이용하여 측정한 결과 배양액에 첨가하였던 방사선량인 0.25 Ci의 0.2% 수준에 달하는 소량의 방사성 탄소가 존재함을 확인할 수 있었다. 이는 첨가해준 L- ^{14}C -phenylalanine을 대사하여 매우 천천히 공기 중으로 CO_2 를 방출함을 시사한다. 이것으로 볼 때 *U. maydis* 균은 phenylalanine을 분해하면서 구조적으로 육각형의 페닐링 구조를 분해시켜 최종적으로 완전히 대사하여 CO_2 를 방출 할 수도 있음을 알 수 있다. 이는 *U. maydis* 균이 phenylalanine이나 cinnamic acid를 에너지원으로 사용 할 수 있음을 보여준다. 미생물 중 페닐링을 분해하는 기능이 있는 균들이 그다지 많지 않은데다 특히 진균류에서 페닐링의 분해에 대한 보고가 많지 않은바 본 연구 결과는 *U. maydis* 균의 대사특성에 대한 새로운 정보를 제공한다.

Phenylalanine 분해 경로

이상의 검출된 결과를 바탕으로 *U. maydis*에 의하여 phenylalanine이 분해되는 이화과정을 도식하여 Fig. 2에 제시하였다. 미생물에 의한 phenylalanine 분해는 주로 phenylalanine deaminase에 의해 분해되는데 사전 실험에서 *U. maydis*의 균체에 대한 phenylalanine deaminase 측정 결과 활성이 없는바 phenylalanine은 첫 단계에서 phenylalanine ammonia-lyase(PAL) 효소에 의해 *trans*-cinnamic acid로 분해된다. *U. maydis*가 PAL 효소를 가지고 있음은 PAL 효소에 대한 정제 연구(Kim *et al.*, 1996)와 PAL 유전자의 클로닝 연구(Kim *et al.*, 2001a)가 있는바 확실한 초기 분해 단계로 볼 수 있다. 본 연구에서는 Fig. 1A 결과에서 L- ^{14}C -phenylalanine로부터 ^{14}C -*trans*-cinnamic acid가 생성된 것을

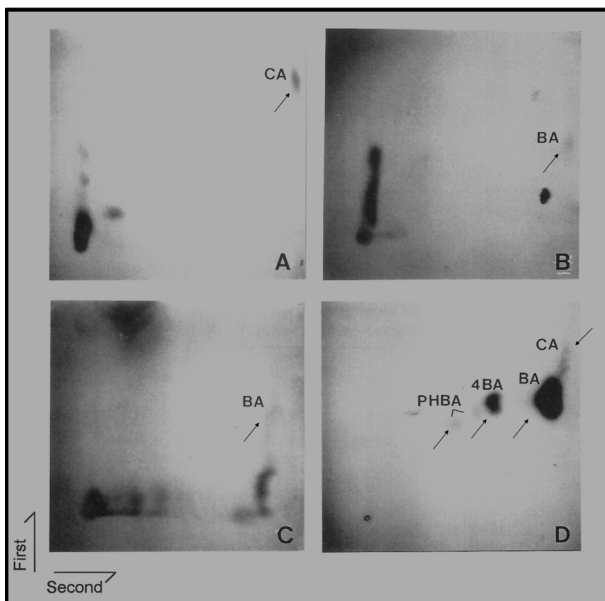


Fig. 1. Autoradiogram of the radioactive phenolics metabolized from L-[U- ^{14}C] phenylalanine or [U- ^{14}C] *trans*-cinnamic acid by *U. maydis*. A and B indicate autoradiograms of cell extract and medium extract, respectively, from the cultures grown in the presence of ^{14}C -phenylalanine. C and D indicate autoradiograms of cell extract and medium extract, respectively, from the cultures grown in the presence of ^{14}C -*trans*-cinnamic acid. The developed TLC plates were exposed to X-ray film for one week. CA : *trans*-cinnamic acid, BA : benzoic acid, 4BA : 4-hydroxybenzoic acid, and PHBA : possible hydroxybenzoic acid derivatives.

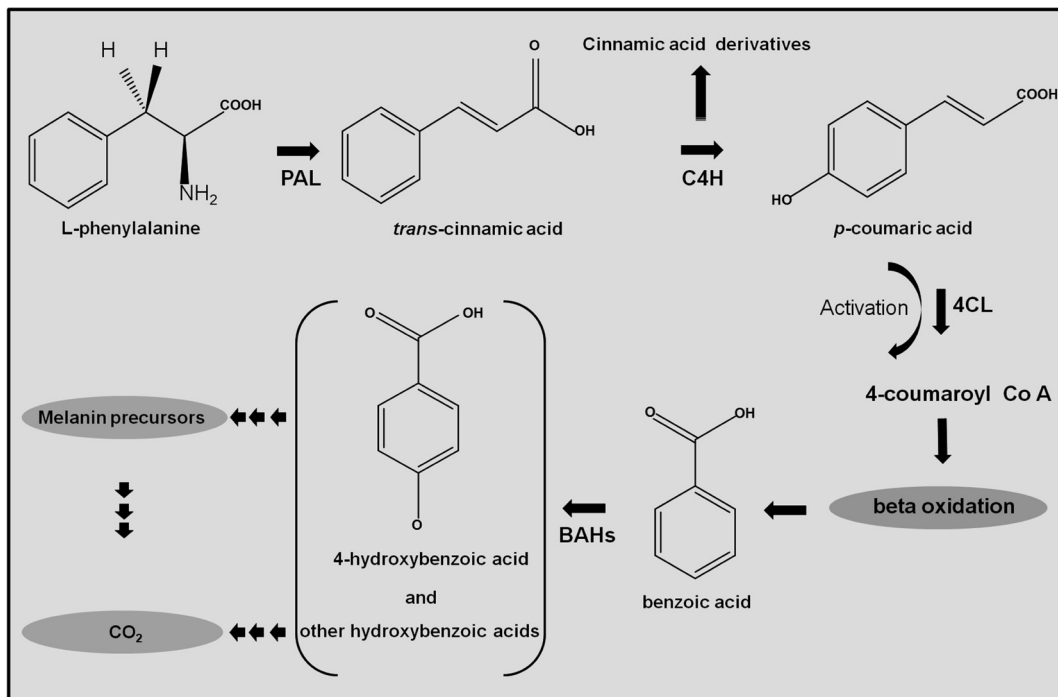


Fig. 2. Schematic diagram of catabolic pathway of phenylalanine in *U. maydis*. PAL:phenylalanine ammonia-lyase, C4H : cinnamic acid 4 hydroxylase 4CL : 4-coumaroyl Co A ligase, BAHs : benzoic acid hydroxylases. Arrows indicate identified way and predicted way.

확인 할 수 있다. 두 번째 단계는 *trans*-cinnamic acid가 *para*-coumaric acid(4-coumaric acid)로 전환하고 *para*-coumaric acid가 *para*-coumaroyl Co A(4-coumaroyl Co A)로 변하는 단계 인데 본 연구에서는 이 물질이 검출되지 않았다. 이들 두 물질 은 생성은 cinnamic acid 4 hydroxylase(C4H)와 4-coumaroyl Co A ligase(4CL)에 의해 이루어지는 것으로 식물에서는 알려져 있다(Douglas, 1996). 이들 두 효소는 식물에서는 잘 알려져 있으나 균류에서는 아직까지 효소학적 연구가 전혀 이루어지지 않았고 유전학적 연구조차 없는 실정이다. 이 두 효소의 활성을 위해서는 ATP hydrolysis가 요구되며 산화환원 반응을 수행하는 연유로 대사진행이 매우 빠르게 진행되는 것으로 식물에서는 알려져 있다. 어쩌면 이러한 연유로 방사성을 띤 L-¹⁴C-phenylalanine이나 ¹⁴C-*trans*-cinnamic acid를 주었을 때 세포내에 존재하는 cinnamic acid를 빠르게 다른 물질로 전환시켜 대사를 진행하였기 때문에 본 연구에서 실시한 배양 6시간 이후의 시기에는 벌써 다른 물질로 변화하여 검출되지 않았을 가능성이 높다고 사료된다. 사실 Fig. 1D의 결과를 보면 이들 두 효소의 대사산물로부터 분해가 더 진행되어야 생성되는 대사산물이 훨씬 더 많이 검출되었음을 알 수 있다. 따라서 추정 할 때 cinnamic acid 이후부터 benzoic acid가 생성되는 중간 단계가 매우 빠르게 진행된다고 볼 수 있다. 실제 β -oxidation 단계는 효소의 역할이 없이 진행되는 매우 빠른 화학적 반응 단계임으로 이러한 추정은 가당하다고 사료된다.

C4H와 4CL 유전자 homologous 염기서열 분석

아직 까지 진균에서 C4H와 4CL에 대한 연구가 없는바 *U. maydis*에서 이들 두 효소의 benzoic acid 형성 가능성에 대한 또 다른 증거를 찾고자 하였다. 현재 GenBank DNA 데이터베이스(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)에 *U. maydis*의 유전체 정보가 있는바(genome ID;UM5074) 포플러(GenBank Accession no. Q43054), 아라비도시스(GenBank Accession no. P92994), 알팔파(GenBank Accession no. P37114) 등 으로부터 알려진 C4H 효소 유전자 염기서열을 이용하여 Blast P 검색을 통해 *U. maydis* genome 으로부터 C4H 효소 유전자 homologous region의 존재를 탐색하였다. 탐색 결과 C4H 효소의 Cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature 인 [FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD]를 가지는 유전자 부위가 존재함을 확인하고 PAUP* software(Swofford, 2002)에 있는 Clustal W 프로그램을 이용하여 multiple alignment를 수행하였다 (Fig. 3). 유사부위는 *U. maydis*와 포플러, 알팔파, 아라비도시스간에 상당히 보존되어 있음을 알 수 있었다. 같은 방법으로 4CL 유전자 homologous region의 존재를 아라비도시스(GenBank Accession nos. 4CL : Q42524, 4CL2 : Q9S725, 4CL3 : Q9S777, 4CL4 : Q9LU36), 테다소나무 (GenBank Accession no. P41636), 담배(GenBank Accession no. AAB18638) 등의 알려진 4CL 효소의 유전자를 이용하여 *U. maydis* genome 정보를 탐색한 결과 3개의 homologous 서열 (GenBank Accession nos. EAK81955, CBQ69176,

Poplar	390	IPAESKILVNAWWLANNPAHWKNPEEFRPERFLEE---	GAKEANGNDFRYLPFGVGRRS	446
Alfalfa	391	IPAESKILVNAWWLNNPAHWKKPEEFRPERFLEE---	ESHVEANGNDFRYLPFGVGRRS	447
Arabidopsis	390	IPAESKILVNAWWLANNPNSWKPEEFRPERFFEE---	ESHVEANGNDFRYVPFGVGRRS	446
U. maydis	410	IPAGTTFFLNSWACNVDAEKFADPFPEFKPERFMDKSASNAHVENKMGVETAFNGRRM		470
*** : : : : * : : : * * : * : : : : : : : : : : * : * : *				
Poplar		CPGIILALPILGITLGRVQNFELLPPP--	QSKIDTSEKGGQFSLHILKHSIVAKPRS	504
Alfalfa		CPGIILALPILGITIGRLVQNVELLPPP--	QSKIDTSEKGGQFSLHILKHSIVAKPRS	505
Arabidopsis		CPGIILALPILGITIGRMVQNFELLPPP--	QSKVDTSEKGGQFSLHILNHSIIVMKPRN	504
U. maydis		CPGVFLALREIYTTLVFLTHFFDIAPDGEYDIDPLTAVEDGRAFSVRPKPFKVRCTPRPG		530
*** : * : : : * : : : * : * : : : : .				
Poplar	F-----			505
Alfalfa	F-----			506
Arabidopsis	C-----			505
U. maydis	VDSLSPVLDKQ			540

C4H alignment

U. maydis 1	RTEDAFIVFSSGTSKPKGVQLVHGNMTAVTTAIVHTFGD--	AISPND-----	RYIGVL	241
U. maydis 2	ATETAFIMFSSGTSKSAKVEITHSNVIHSMALVATHDD--	YFGQKD-----	VQVGFL	248
Arabidopsis 4CL1	PDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYFHSDD-----	VILCVL	254	
Arabidopsis 4CL2	PEDVVALPFSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYFNRDD-----	VILCVL	247	
Pine 4CL	PDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYFHSDD-----	VILCVL	233	
Tobacco 4CL	PDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVDGENPNLYIHSDD-----	VMLCVL	233	
Arabidopsis 4CL4	PEDTVAMPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSIAQKVDGENPNLNFTAND-----	VILCVL	262	
Arabidopsis 4CL3	GDDAAALPFSSGTTGLPKGVMLTHKSLITSVAQQVDGDNPNLYLKSND-----	VILCVL	257	
U. maydis 3	LNDTAYLPFSSGTTGLPKAVEISHGNVIN--	MVEIFRHTPSLFLKHDDGTEMQFRTLNFL	247	
: : : : * : * : * : : : : * : *				

4CL alignment

Fig. 3. Comparison of the partial deduced amino acid sequences of C4H (upper) and 4CL (lower) homologous genes found in *U. maydis* genome with the partial deduced amino acid sequences of C4H and 4CL known from plant species. The amino acid sequences are in one-letter code and have been aligned using Clustal W program in PAUP^{*} software. Protein sequence was obtained from GenBank and their accession numbers were described in the text. Perfectly conserved and well-conserved positions in the alignment are marked as * and :, respectively. Shadowed sequences are the cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature [FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMEAP]-[GAD] present in C4H and AMP binding domain signature LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR] present in 4CL, respectively.

EAK85592)을 발견하였다. 이들 염기서열을 단백질 서열로 변환시킨 결과 4CL 효소의 부위에 특징적으로 존재하는 AMP binding domain signature 인 LIVMFY]-{E}-{VES}-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR]를 가지고 있었다 (Fig. 3). 아라비도시스의 경우 4개의 4CL 효소 유전자가 존재하는바 *U. maydis*에서 검출된 3개의 4CL homologous가 모두 4CL 효소 유전자일 가능성도 있다. 그러나 4CL 효소는 반응 기질로서 4-coumaric acid 외에도 다른 phenolic acids를 기질로 이용할 수 있는바(Allina *et al.*, 1998) 이들의 기질특이성에 대해서는 향후 단백질 수준에서의 후속 연구를 통하여 확인하는 것이 필요하다. Fig. 3의 결과를 바탕으로 생각해 볼 때 *U. maydis*는 C4H와 4CL 효소의 체계를 가지고 있을 것으로 추정된다. 이러한 추정에서 Fig. 2에 제시한 경로대로 *U. maydis*에서 phenylalanine은 benzoic acid로 분해되는 대사 경로를 포함할 것으로 사료된다.

결론으로서 본 연구에서는 *U. maydis*균이 phenylalanine을 분해하여 benzoic acid를 생성하고 CO₂ 분해까지 되는 것을 확인하였다. 현재까지 *U. maydis*의 생활사에 있어서 왜

benzoic를 만드는지에 대한 연구보고는 아직 없다. Pritchard와 Bell(1967)은 *Ustilago*균의 동포자에서 포자발아를 억제하는 물질이 있음을 보고하면서 그 물질이 phenylpropanoid 물질인 cinnamic acid 유도체로 추정하였다. *U. maydis*균의 옥수수 기주식물 침해과정 중 가장 후반기에는 동포자가 만들어지면서 식물에 종양을 형성하고 동시에 기주에서 방출되어 전반될 때 태양의 자외선 등에 견딜 수 있는 검은색의 melanin 색소합성을 하게 된다. Catechol derivatives와 salicylic acid는 식물 melanin로부터 확인되었는데 (Yoshida, 1969) 이들 페놀계 화합물은 *U. maydis*균 동포자의 구성성분으로도 존재함이 밝혀졌다 (Piattelli *et al.*, 1965). Catechol derivatives와 salicylic acid가 benzoic acid로부터 합성될 수 있고 (Yalpani *et al.*, 1993) Fig. 2에서 나타나듯이 phenylalanine의 분해 산물인 cinnamic acid로부터 benzoic acid 유도체가 생성되는 것을 볼 때 결국 *U. maydis*균의 melanin 합성은 적어도 phenylalanine으로부터 생성된 물질에 의하여 구성될 가능성을 배제할 수 없다고 사료된다. 흥미롭게도 phenylalanine 분해산물인 phenylpropanoid 물질이 포유동물의 종양세포인 melanoma cell의 멜라닌 형성에 영향을

미친다는 보고(Park *et al.*, 2003)는 *Ustilago* 곰팡이에서 phenylalanine 분해대사로 생성되어 분비되는 phenylpropanoid 물질이 기주 침해과정 중 식물의 암화에 관여할 가능성이 있음을 시사한다. Phenylpropanoid는 방향족환에 탄소가 3개로된 사슬이 달린 phenol성 물질로서 C6-C3 화합물이며, 여러 형태의 유도체(derivatives)로도 많이 존재하고 식물의 성장, 분화, 발달, 그리고 외부환경에의 저항을 위하여 중대한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Hahlbrock and Scheel, 1989). 이에 반하여 진균에서는 이들 화합물의 역할에 대한 연구가 매우 미진함으로 본 연구는 향 후 *U. maydis*균에서 phenylalanine로부터 생성되는 다양한 cinnamic acid와 benzoic acid 유도체 물질들이 어떠한 역할을 하는지 연구 하는데 중요한 기반을 제공한다.

적요

Ustilago maydis(옥수수껍부기균)에 있어서 동포자 melanin의 구성성분으로 catechol 계 알려진바 이 물질의 전구체인 benzoic acid의 생성 여부와 그 유래 원천을 추적하고자 phenylalanine의 분해 과정을 조사하였다. 방사성 동위원소가 표지된 L-¹⁴C-phenylalanine 및 ¹⁴C-*trans*-cinnamic acid를 첨가한 액체배지에서 균체와 배양액을 대상으로 대사 산물을 추적 조사한 결과 *trans*-cinnamic acid, benzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid와 hydroxybenzoic acid derivatives 추정되는 물질 등이 검출되었다. 또한 L-¹⁴C-phenylalanine을 대사하여 매우 천천히 공기 중으로 ¹⁴CO₂를 방출함을 확인하여 phenylalanine을 완전히 분해 할 수 있음을 밝혔다. 결론적으로 본 연구는 옥수수껍부기균이 benzoic acid를 생성하고 그 유래는 phenylalanine의 분해에서 만들어지는 증거를 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-331-F00005).

참고문헌

- Agrios, G. N. 1988. The smuts. pp. 474-486 in: Plant Pathology. 3rd ed. Academic Press, Inc., San Diego.
- Allina, S. M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D. A., Ellis, B. E. and Douglas, C. J. 1998. 4-coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar; properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiol.* 116:743-754.
- Douglas, C. J. 1996. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci.* 1:171-178.
- Hahlbrock K. and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.
- Holliday, R. 1974. Handbook of Genetics. Ed. by King, RC, p.575. Plenum, New York.
- Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E. 1996. Purification and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* 34:351-357.
- Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E. 2001a. Cloning and disruption of a gene from *Ustilago maydis*. *Current Genetics* 40:40-48. 2001.
- Kim, S. H., Kronstad, J. W. and Ellis, B. E. 2001b. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry* 58:849-857.
- Park, Y. M., Yoon, M. Y., Kim K., W., Cho, N. Y., Lim, H. W., Lee, J. Y., Lee, J. H., Kim Y., J., Kim, J. C. and Sim, S. S. 2003. Effects of phenylpropanoid compounds on melanin production in B16 melanoma cells. *Yakhak Hoeji* 47:398-403.
- Piattelli, M., Fattorusso, E., Nicolaus, R. A. and Magno, S. 1965. The structure of melanins and melanogenesis. *Tetrahedron* 21:3229-3236.
- Pritchard, N. J. and Bell, A. A. 1967. Relative activity of germination inhibitors from spores of rust and smut fungi. *Phytopathology* 57:932-934.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. and Raskin, I. 1993. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103:315-321.
- Yoshida, S. 1969. Biosynthesis and conversion of aromatic amino acids in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 20:41-62.