

항산화효소 유전자를 이용한 산업용 형질전환식물체 개발

이행순 · 김기연¹ · 권석윤 · 곽상수*

한국생명공학연구원 식물세포공학연구실, ¹(주)삼양제넥스 생명공학연구소

Development of Industrial Transgenic Plants Using Antioxidant Enzyme Genes

LEE, Haeng-Soon · KIM, Kee-Yeun¹ · KWON, Suk-Yoon · KWAK, Sang-Soo

Plant Cell Biotechnology Lab., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yusong, Daejeon, 305-333, Korea

¹Samyang Genex Biotech Research Institute, Samyang Genex Corp., Hwaam-dong 63-2, Yusong, Daejeon, 305-348, Korea

ABSTRACT Oxidative stress derived from reactive oxygen species (ROS) is one of the major damaging factors in plants exposed to environmental stress. In order to develop the platform technology to solve the global food and environmental problems in the 21st century, we focus on the understanding of the antioxidative mechanism in plant cells, the development of oxidative stress-inducible antioxidant genes, and the development of transgenic plants with enhanced tolerance to stress. In this report, we describe our recent results on industrial transgenic plants by the gene manipulation of antioxidant enzymes. Transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts were developed and were evaluated their protection effects against stresses, suggesting that simultaneous overexpression of both SOD and APX in chloroplasts has synergistic effects to overcome the oxidative stress under unfavorable environments. Transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene in chloroplasts were showed the protection against the oxidative stress in plants. Transgenic cucumber plants expressing high level of SOD in fruits were successfully generated to use the functional cosmetic purpose as a plant bioreactor. In addition, we developed a strong oxidative stress-inducible peroxidase promoter, *SWPA2* from sweetpotato (*Ipomoea batatas*). We anticipate that *SWPA2* promoter will be biotechnologically useful for the development of transgenic plants with enhanced tolerance to environmental stress and particularly transgenic cell lines engineered to produce key pharmaceutical proteins.

Key words: Antioxidant enzyme, inducible promoter, oxidative stress, reactive oxygen species, transgenic plants

1. 활성산소와 산화스트레스

식물을 포함한 호기성 생물체가 각종 환경스트레스를 받게 되면 생체내 산소 (O_2)는 전자 (electron)와 반응하면서 superoxide anion radical ($SAR, \cdot O_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변한다 (Alscher and Hess 1993). ROS는 생체의 정상적인 대사과정에

서도 약간 발생되지만 외부스트레스를 받으면 과다하게 생성된다. ROS는 강한 산화력을 가지고 있어 지질 과산화, 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성저해, 광합성 억제, 엽록소 파괴, 노화 촉진 등 생체내에서 생리적 장애를 주며 심할 경우 세포사멸을 초래한다 (Alscher and Hess 1993; Inze and Van Montagu 1995). 인체질병의 대부분이 ROS가 관여하고 있음이 최근 연구에 의해 규명되고 있으며, 식물의 경우도 ROS가 세포의 질병, 노화 및 세포사멸에 중요하게 관여하고 있음이 밝혀지고 있다. 이와 같이 과다한 ROS로 인한 세포가 받는

스트레스를 산화스트레스(oxidative stress)라 한다.

식물은 고차생활을 하기 때문에 외부 스트레스에 대한 환경적응능력이 다른 생물체보다 높은 것으로 생각되며, 다른 생물에 비해 많은 종류의 항산화물질을 생산한다(Alsher and Hess 1993). 식물이 생산하는 공통적인 주요 항산화물질로는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 고분자 항산화효소 (Bowler et al. 1994)와 ascorbate (ascorbic acid, AsA, vitamin C), glutathione, α -tocopherol, β -carotene 등의 높은 환원력을 갖는 저분자 항산화물질로 구성된다(Alsher and Hess 1993; Smirnoff and Pallanca 1996). 각종 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 ROS를 제거하거나 예방하는 기능을 지닌 항산화물질은 기능성 건강식품과 의약품의 소재로 많이 이용되고 있고 개발되고 있다. 또한 항산화물질의 대사공학적 연구를 통하여 환경스트레스를 극복할 수 있는 재해내성 농작물 개발에 활용되고 있다.

여기에서는 식물의 항산화기구에 대해 엽록체 항산화기구, 배양세포의 항산화기구로 나누어 간단히 소개하고, 항산화효소 유전자를 이용한 엽록체 항산화기구 조절에 의한 스트레스내성 식물 개발과 SOD를 과실에 도입한 신기능성 오이 식물체 개발에 관한 연구팀의 최근 연구결과를 소개한다. 아울러 고구마에서 분리한 산화스트레스 유도성 POD promoter에 대한 특성 및 산업적 활용에 대하여 소개한다.

2 식물의 항산화기구

2.1. 엽록체의 항산화기구

엽록체 (chloroplast)는 태양에너지를 이용하여 이산화탄소를 고정하여 인간의 생존에 필요한 산소, 식량뿐 아니라 각종 의약품과 산업소재를 생산하는 지구상에서 가장 이상적이고 효율적인 공장이다. 엽록체는 높은 농도의 산소와 광합성 전자전달계가 존재하기 때문에 외부스트레스를 받게되면 과량의 ROS를 생성하기 가장 쉬운 곳이다. 엽록체의 산화스트레스는 식물의 생산성에 크게 영향을 미치며, 생태계 보전뿐 아니라 식량생산에도 큰 영향을 줄 수 있다.

엽록체는 산화스트레스를 극복하기 위한 항산화기구가 잘 발달되어 있다. 특히 ascorbate (AsA)는 수십 몰 농도로 엽록체에 존재하며, 다른 생명체에서 발견되지 않은 FeSOD도 존재한다. 엽록체의 AsA는 ROS를 직접 제거하거나 AsA peroxidase (APX)의 기질로 사용되어 유해한 과산화수소를 제거하는 데 이용하고 있다. Figure 1은 엽록체의 항산화 기구인 water-water cycle을 나타낸 것이다 (Asada 1999). Mehler 반응(Mehler 1951)에 의해 광화학계 I(photosystem I, PS I)에서 분자상의 산소가 환원되어 $\cdot O_2^-$ (SAR)이 생성되고, 이것이 틸라코이드막에 존재하는 CuZnSOD에 의해 H_2O_2 로 빠르게 변한다. 생성된 H_2O_2 는 틸라코이드막에 결합되어 있는

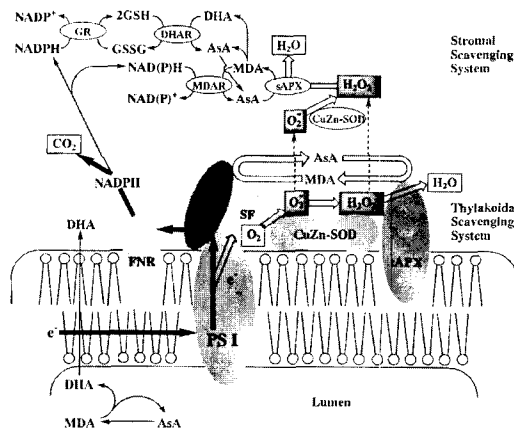


Figure 1. The water-water cycle and microcompartmentalization of the participating enzymes in chloroplasts (Asada 1999). The detail explanation are described in the text.

APX (tAPX)에 의해 제거되며, 틸라코이드막에서 유리된 SAR과 H_2O_2 는 스트로마에서 제거된다 (Nakano and Asada 1981; Smirnoff and Pallanca 1996; Orvar and Ellis 1997). H_2O_2 제거과정에서 스트로마에 있는 APX (sAPX)에 의해 생성된 monodehydroascorbate radical (MDA)은 ferredoxin (Fd) 또는 stroma에 있는 monodehydroascorbate reductase (MDHAR)에 의해 AsA로 빠르게 환원된다. Dehydroascorbate (DHA)는 생리적인 면에서 pH에 불안정하여 GSH를 전자공여체로 이용하는 DHA reductase (DHAR)에 의해 AsA로 환원된다 (Deutsch and Santhosh-Kumar 1996). SOD, APX, AsA, MDAR, 및 DHAR은 비광합성 조직 내에서도 존재하여 엽록체에서와 같이 ROS를 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Allen et al. 1997). 따라서 엽록체의 항산화기구를 대사공학적으로 조절하는 것은 식물의 생산성을 유지, 향상시키는 데 매우 중요한 것으로 간주된다.

2.2. 식물배양세포의 항산화기구

식물세포배양기술은 재분화 기술을 이용한 유용한 형질전환 식물체 (GMO) 개발, 조직배양에 의한 유용식물의 대량번식, 세포배양에 의한 유용물질의 대량생산 등 식물생명공학제품 개발에 가장 중요한 기반기술 (platform technology)에 해당된다. 대부분의 배양세포는 외부로부터 탄소원을 공급받아 성장하는 종속영양생장 (heterotrophic growth)을 하며 식물체가 자라는 재배환경에 비하면 높은 스트레스 특히 산화스트레스 조건에서 배양되고 있을 것으로 생각된다. 그러나 배양세포가 지닌 배양 스트레스에 대한 생화학적인 구체적인 연구는 거의 없다.

연구팀은 배양세포가 높은 산화스트레스에서 배양되고 있을 것임에 착안하여 다양한 식물종에서 유도한 100여 종의 배양세포를 대상으로 SOD, POD, CAT 등의 항산화효소 활성과 AsA, glutathione 등의 저분자 항산화활성을 조사하였다. 그

결과, 식물배양세포의 평균 SOD 활성은 식물체에 비하여 수백배 높았으며, POD 활성도 매우 높았으나 (Kim et al. 1994; You et al. 1996) CAT 활성은 낮았다 (Jang et al. 1997). 특히 SOD와 POD의 고생산 세포주로 카사바 (*Manihot esculenta*)와 고구마 (*Ipomoea batatas*) 배양세포를 선발하였으며, 이들 세포주를 이용하여 항산화효소 유전자의 분리, 기능연구 및 생명공학제품 개발에 활용하고 있다 (Huh et al. 1997; Lee et al. 1999). 한편 배양세포의 AsA 함량은 식물체에 비해 매우 낮았으며 glutathione의 함량은 식물체와 비슷하였다 (Ahn et al. 1998; Lee et al. 2000). 따라서, 배양세포는 높은 산화스트레스 조건에서 배양되고 이를 극복하기 위하여 식물체보다 매우 높은 항산화효소를 합성하고 있음을 확인할 수 있었다. AsA 함량이 낮은 식물배양세포는 AsA의 생합성연구에 적합한 것을 확인할 수 있었다 (Ahn et al. 1999). 결론적으로 식물배양세포는 유용 항산화효소의 대량생산 및 항산화기구 해석에 좋은 소재임이 시사되었다.

3. 산화스트레스 유도성 POD promoter

3.1. 식물 POD

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)는 과산화수소 존재에서 다양한 종류의 기질을 산화시키는 작용 ($RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$)을 하는 효소로서 반응이 민감하며 발색반응을 나타내기 때문에 각종 임상시험용 시약, 화학분석용 시약, 유기화합물의 산화반응 등에 사용되는 상업적으로 중요한 효소이다 (Krell 1991). 식물체에서 POD는 일반적으로 바이러스, 미생물, 곰팡이의 감염에 의한 생물학적 스트레스와 고농도 염, 상처 등의 비생물학적 스트레스에 반응해서 그 활성이 증가된다 (van Huystee 1987). POD는 heme을 가지고 있는 당단백질로 많은 isoenzyme 형태로 식물체 내에 존재하는데, 식물의 종류, 식물의 성장단계, 식물의 부위, 성장환경 등에 따라 isoenzyme 패턴이 크게 달라진다. POD는 등전점 (isoelectric point) 값에 따라 산성, 중성, 염기성으로 나눌 수 있다 (Intaprak et al. 1994). 그러나 각 isoenzyme의 생리적 기능에 관해서는 현재까지 잘 알려져 있지 않다. 담배, 고구마 등 여러 식물체로부터 POD cDNA가 분리되었으며 일부만이 형질전환 식물체 개발에 이용되었을 뿐이다.

3.2. 스트레스 유도성 POD 유전자의 분리

연구팀은 POD 고생산 고구마 배양세포에서 4개의 POD cDNA (산성의 *swpa1*, *swpa2*, *swpa3*와 중성의 *swpn1*)를 분리하여 발현특성을 조사한 결과, 분리한 유전자는 배양세포에서 강하게 발현하였고, 정상적인 고구마 식물체에서는 거의 발현되지 않았으나, 상처, 저온, 오존 등 외부스트레스를 받았을 때

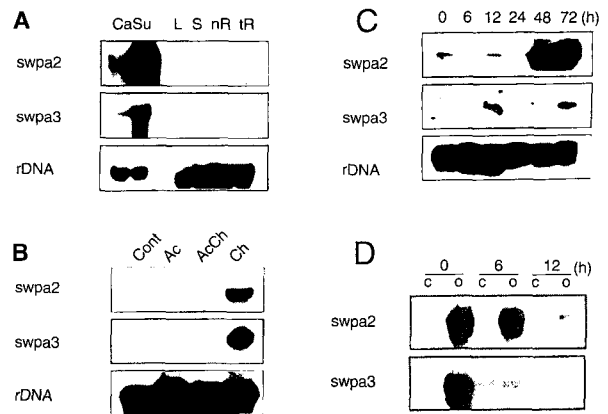


Figure 2. Expression of two anionic peroxidase cDNAs isolated from suspension cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas*), *swpa2* and *swpa3*, in cultured cells and various tissues of sweet potato plants (A), and expression patterns of two genes in sweet potato leaves under various stress conditions such as chilling (B), wounding (C) and ozone (D).

강하게 유도되었다 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999) (Figure 2). 그 중 *swpa1* 및 *swpn1*을 도입한 형질전환 담배식물체는 ROS를 발생하여 제초활성을 나타내는 methyl viologen (MV, paraquat)에 대한 내성특성을 조사한 결과, *swpa1* 식물체만이 MV에 대한 증가된 내성을 나타내어 개개 POD의 기능이 다름이 시사되었다 (Huh et al. 1998; Yun et al. 1998, 2000). 특히 고구마 배양세포에서 가장 많이 생산되는 A2 isoenzyme을 코드하는 *swpa2* 유전자는 식물체 조직에서는 전혀 발현되지 않았고 스트레스에 의해 가장 강하게 유도되었다 (Kim et al. 1999). 배양세포에 강하게 발현하며, 정상적인 식물체에는 발현하지 않지만 산화스트레스에서 식물체에서 강하게 유도되는 *swpa2* cDNA를 probe로 사용하여 genomic clone (SWPA2)를 분리하였다 (Kim et al. 2002).

최근 전체 유전체 염기서열이 결정된 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 POD 유전자가 64개가 존재하는 것으로 추정되었다 (The Arabidopsis Genomic Initiative 2000). 따라서, 고구마를 포함한 식물체는 수십 개의 POD 유전자가 존재할 것이 강하게 시사되었으나, 아직 각각 POD 유전자의 생리적인 기능은 거의 모르는 실정이다. 연구팀에서는 스트레스 및 성장과 분화라는 관점에서 각각의 POD 유전자의 기능을 규명하기 위하여 고구마에서 전체 POD 유전자를 분리하는 연구가 진행중이다.

3.3. POD promoter의 특성 규명

고구마 배양세포에서 가장 강하게 합성되고 각종 스트레스에 의해 발현이 유도되는 A2 isoenzyme을 코드하는 *swpa2* 유전자의 genomic DNA (SWPA2)를 분리하여, promoter의 특성을 생물정보학으로 조사한 결과, SWPA2 promoter 영역에는 동물세포에서 산화스트레스와 관련된 수종의 cis-element가

존재함이 확인되었다 (Kim et al. 2002). *SWPA2* promoter로부터 5개의 deletion mutant를 제작하고 GUS 유전자에 연결하여 담배 BY-2 세포를 이용한 transient assay 결과, 1314 bp deletion promoter는 CaMV 35S promoter의 활성화에 비해 약 30 배 높은 활성을 나타내었다 (Figure 3). 반면 다른 deletion mutant는 CaMV 35S promoter와 비슷한 활성을 나타내었다. 968 bp와 1314 bp 사이에는 positive cis-element가, 1314 bp와 1824 bp 사이에는 negative cis-element가 각각 존재할 것으로 생각되며 현재 이에 대한 자세한 연구가 진행중이다.

SWPA2 promoter는 형질전환 담배식물체에서 외래단백질 (GUS)이 과산화수소, 상처, 자외선 등에 의해 강하게 유도되어, 스트레스 내성 식물 개발에 유용하게 활용될 수 있음이 시사되었다 (Figure 4). 또한 형질전환 담배식물체에서 유도한 형질전환 배양세포에서 특히 강하게 발현됨이 확인되었다. 1824 bp promoter는 배양시기에 관계없이 CaMV 35S promoter에 비해 3~4배 높은 활성을 나타내었으며, 1314 bp promoter는 대수증식기 후반부터 높은 GUS 활성을 나타내어 CaMV 35S promoter에 비해 7~8배 높았다 (Kim 2000). 고구마 배양세포의 성장후기에서의 높은 *swpa2* 유전자의 발현과 일치하였다(Kim et al. 1999). 따라서 *SWPA2* promoter는 각종 의료용 단백질을 포함하여 고부가가치 유용물질을 생산하는 산업용 식물세포주 개발에 활용이 기대된다. 현재 스트레스 관점에서 *SWPA2* promoter의 특성을 규명중이며, *SWPA2* promoter는 환경스트레스 내성식물 및 형질전환 식물배양세포에서 유용물질 생산 등에 이용될 수 있을 것으로 기대되며 이에 대한 관련 실험들이 진행중이다.

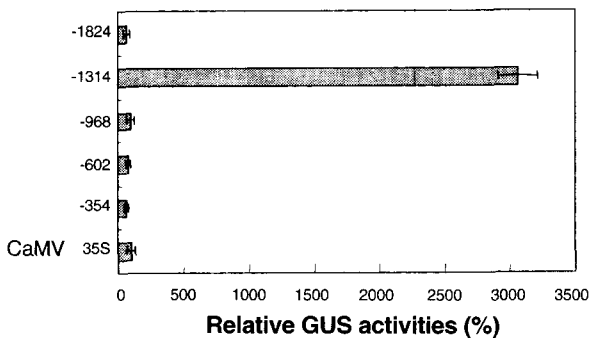


Figure 3. Functional analysis of *SWPA2* promoter deletion mutants in tobacco (BY-2) protoplasts. Deletion mutants defined as number of base pairs from the site of translation. GUS activity is expressed relative to that supported by CaMV 35S promoter, which was 5176 ± 96 pmol/min/mg protein. Data are means \pm SE of three replicates.

4. 엽록체 항산화기구 대사조절에 의한 스트레스내성 식물

4.1. SOD와 APX 유전자를 엽록체에 도입한 스트레스 내성 식물체

현재까지 항산화효소를 도입한 식물체가 개발되어 MV 등 산화스트레스를 유발하는 환경스트레스에 대한 내성특성이 보고되고 있으나, 아직까지 실용적인 식물개발에는 이르지 못하고 있다 (Kwon et al. 2001b). SOD와 APX를 엽록체에 동시에 과발현시키는 식물체는 환경스트레스로부터 식물체를 보호하는 데 이상적인 방법으로 생각되어 연구팀은 SOD와

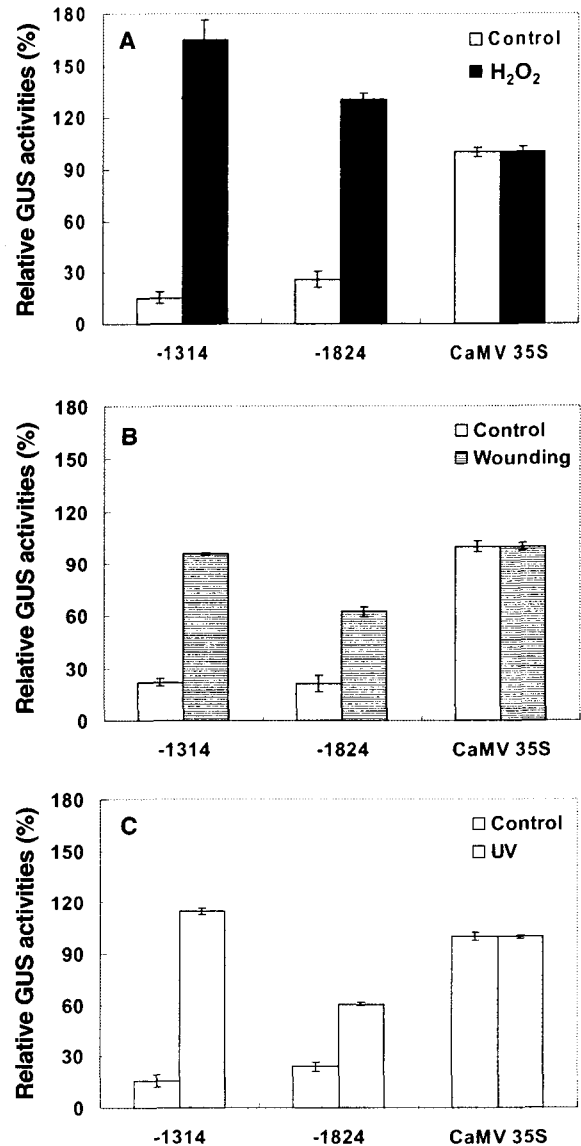


Figure 4. Activation of GUS activity mediated by *SWPA2* deletion mutants in transgenic tobacco plants cued by distinctive environmental stresses. (A) GUS activity at 48 hr after 1 mM hydrogen peroxide treatment, (B) GUS activity at 48 hr post mechanical wounding, and (C) GUS activity at 24 hr following UV treatment. Data are means \pm SE of three replicates.

APX를 동시에 엽록체에 도입된 형질전환식물체를 개발하여 대표적 산화스트레스인 MV에 대한 내성을 조사하였다 (Kwon et al. 2002b).

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)에 SOD와 APX를 단독 또는 복수로 도입한 7종의 형질전환체 (T2 세대)를 개발하여 스트레스 내성특성을 비형질전환식물체 (NT식물체, 또는 Xanthi)와 비교하였다. 형질전환식물체는 완두에서 분리한 SOD와 APX를 CaMV 35S 프로모터를 사용하여 엽록체에 target시킨 것으로 1) CuZnSOD를 도입한 형질전환체 (CuZn 식물체, Sen Gupta et al. 1993a, 1993b), 2) MnSOD를 도입한 형질전환식물체 (Mn식물체, Schake 1995), 3) APX를 도입한 식물체 (APX식물체, Webb and Allen 1995), 4) CuZn식물체에 APX를 도입한 식물체 (CA식물체, Kwon et al. 2002b), 5) APX 식물체에 MnSOD를 도입한 식물체(AM식물체, Kwon et al. 2002b), 6) CA식물체를 모본으로 하여 AM식물체와 교잡한 형질전환식물체 (CMA식물체, Kwon et al. 2002b), 7) AM식물체를 모본으로 하여 CA식물체와 교잡한 형질전환식물체 (AMC식물체, Kwon et al. 2002b)의 7종이다.

형질전환식물체의 잎절편체 (leaf disc)와 식물체를 사용하여 MV에 대한 내성을 조사한 결과 SOD와 APX를 엽록체에 동시에 발현시킨 식물체가 MV에 강한 내성을 나타내었다. AMC식물체와 CMA식물체는 2 μ M MV 처리 후 24시간에 NT식물체 (Xanthi)에 비해 각각 82%와 47%의 세포막손상의 보호효과를 나타내었다. 세 종류의 항산화효소가 도입된 CMA식물체와 AMC식물체가 가장 MV에 대한 보호효과가 좋았으며, 두 종류의 항산화효소가 도입된 CA식물체와 AM식물체도 높은 보호효과를 나타내었다 (Kwon et al. 2002b).

형질전환 유식물체에 25 μ M MV를 처리하였을 때 NT식물체는 30%의 가시적인 잎의 피해를 나타내었으나, CA식물체, AM식물체, CMA식물체, AMC식물체는 1~3%의 피해를 나타내었다 (Figure 5). 50 μ M MV를 처리하였을 때 NT식물체는 62%의 피해를 나타내었으며 CuZn식물체와 Mn식물체는 비슷한 피해를 나타내었고, APX식물체는 40%의 피해를 보인 반면, SOD와 APX를 동시에 발현된 식물체에서는 5~12%의 피해를 나타내었다. 이상으로서 SOD와 APX를 동시에 엽록체에 발현시킨 식물체의 잎은 MV에 의한 산화스트레스로부터 빠르게 회복되는 것을 알 수 있었다. 또한 SOD와 APX를 동시에 엽록체에 과발현시킨 식물체는 증금속, 저온, hypoxia, 염류 및 건조 스트레스에 대해 내성을 나타내었다 (Jeong 2001).

현재 산화스트레스 유도성 SWPA2 promoter에 SOD와 APX를 결합한 발현벡터를 제작하여 주요 작물에 형질전환을 시도하고 있어, 복합스트레스에 잘 견디는 작물이 기대된다.

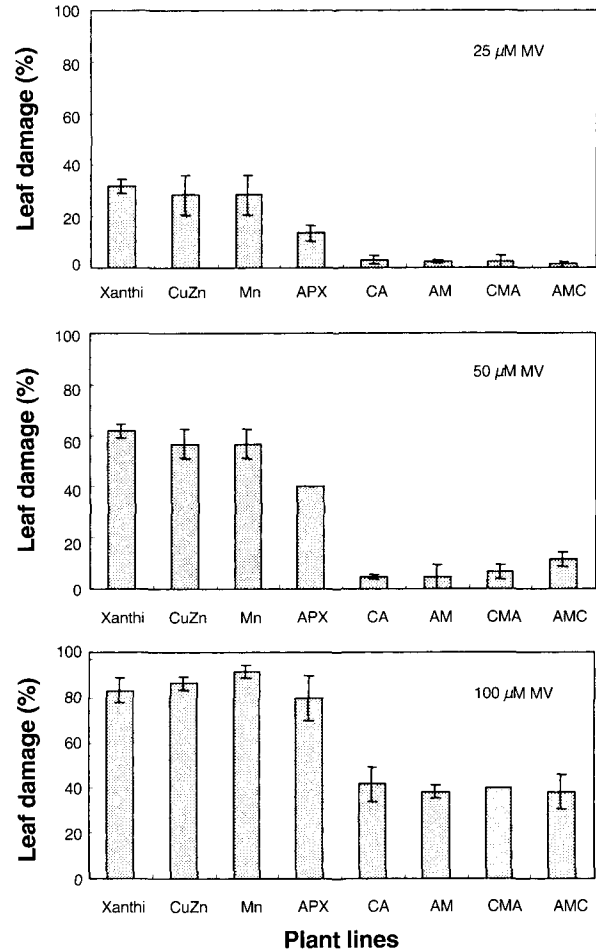


Figure 5. Quantitative estimate of visible damage that appeared on leaves of non-transgenic (Xanthi) and transgenic plants expressing SOD or/and APX in chloroplasts 3 d after spraying MV. Transgenic plant lines that expressed combinations of three transgenes were used. CuZnSOD=chloroplastic CuZn SOD, Mn =chloroplast-targeted MnSOD, APX=chloroplast-targeted cytosolic APX, CA=CuZnSOD-expressing plants retransformed with APX, AM=APX-expressing plants retransformed with chloroplast-targeted MnSOD, CMA and AMC=offspring from reciprocal crosses between CA plants and AM plants that express Cu/Zn SOD, chloroplast targeted Mn SOD and chloroplast-targeted APX. Data are means \pm SE of three replicates.

4.2. 인체 DHAR 유전자를 엽록체에 도입한 스트레스내성 식물체

Dehydroascorbate reductase (DHAR, EC 1.8.5.1)는 전자공여체로 glutathione (GSH)를 이용하여 산화형 ascorbate인 dehydroascorbate (DHA)를 활성형인 환원형 AsA로 변환시키는 효소이다. AsA는 생체내에서 여러 가지 기능이 있지만 항산화제로서 직접 이용되거나 APX의 기질로서 이용되어 활성 산소종을 제거하는데 중요하게 관여한다. 최근 오존, UV 등에 감수성을 보이는 애기장대 변이종이 정상식물에 비해 AsA 함량이 현저히 낮으며, AsA의 생합성에 유전적인 결함이 있는 것이 보고되었다 (Conklin et al. 1996, 1997). 따라서, AsA가 환

경스트레스에 의해 과다하게 생성되는 ROS를 제거하는 항산화제로서 환경내성인자로 중요성이 확인되면서 AsA 생합성 및 대사에 관한 활발한 연구가 진행되고 있다 (Wheeler et al. 1998). 연구팀은 황금 (*Scutellaria baicalensis*) 배양세포를 사용하여 AsA 생합성에 관한 연구를 수행하여, 배양세포는 AsA 생합성 및 대사연구에 중요한 소재임을 제시한 바 있다 (Ahn et al. 1999).

최근 연구팀은 인체에서 분리한 DHAR 유전자를 엽록체에 도입시킨 담배식물체를 개발하여, 인체 DHAR 유전자가 정상적으로 식물체에 발현되었으며 (Kwon et al. 2001a), MV, 저온, NaCl 등 여러 스트레스에 대한 내성을 나타내는 것을 확인하였다 (Kwon et al. 2002a). 따라서 엽록체의 항산화기구를 조절하기 위한 효율적인 식물체를 개발하기 위해서는 SWPA2 promoter와 같은 스트레스 유도성 promoter을 사용하고 SOD, APX, DHAR 등 항산화효소 유전자를 복합으로 도입할 필요가 있음이 제시되어 관련실험이 현재 진행중이다.

5. SOD 고함유 오이 개발

5.1. SOD

Superoxide dismutase (SOD, EC1.15.1.1)는 산소를 소비하는 생물에 존재하며 산소분자가 환원 ($2O_2 + 2e^- \rightarrow 2 \cdot O_2^-$)되어 생기는 $\cdot O_2^-$ (SAR)을 제거하는 효소이다 (McCord and Fridovich 1969). SOD 작용에 의해 생성된 H_2O_2 는 POD 또는 CAT에 의해 독성이 없는 물로 변환된다. SAR과 H_2O_2 는 철 존재 하에서 가장 독성이 높은 활성산소종인 $\cdot OH$ 을 생성한다 (Harber and Wess 1934). 따라서 SOD는 SAR의 제거와 함께 $\cdot OH$ 의 생성을 예방하는 생체방어기능을 지닌 중요한 항산화효소이다. SOD는 함유하고 있는 metal cofactor에 따라 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD의 3종이 있으며 CuZnSOD는 세포질 및 엽록체에, MnSOD는 미토콘드리아에, FeSOD는 엽록체에 존재한다. SOD가 지닌 효소학적 특성을 이용하여 류마티스 관절염 치료 등 각종 퇴행성 질병 치료제 또는 노화방지 화장품의 효소로 개발되고 있다 (Foyer and Mullineaux 1994). 최근에는 자외선에 피해를 입은 피부에 SOD를 바르면 SOD가 피부의 표피속으로 침투되어 손상된 피부가 회복 (보호)된다는 보고도 있다 (Filipe et al. 1997).

현재까지 SOD 등 항산화효소를 도입한 형질전환 식물체가 개발되어 체초제 (MV 등), 오존, 저온 등 산화스트레스를 유발하는 환경스트레스에 대한 내성 특이성이 보고되고 있으나 (Allen 1995; McKersie et al. 1993, 1996; Perl et al. 1993; Sen Gupta et al. 1993a,b; Van Camp et al. 1994) 아직까지 실용적인 식물체 개발에는 이르지 못하고 있다 (Kwon et al. 2001b). 특히 vaccine 유전자를 바나나 등에 도입하여 먹는 백신 (edible vaccine)과 같이 SOD를 식용 가능한 식물조직에 과량 발현하

는 식물생체반응기 (plant bioreactor) 시스템을 개발하고자 시도된 예는 없다 (Goddijin and Pen 1995; Mason and Arntzen 1995).

5.2. SOD 발현벡터 제작 및 형질전환

카사바 배양세포에서 분리한 cytosolic CuZnSOD (*mSOD1*) (Lee et al. 1999)을 오이 과실에서 발현시키기 위하여 오이의 과실우세발현 프로모터인 ascorbate oxidase promoter (ASOp) (Yoshida et al. 1994)를 이용하여 ASOp::mSOD1/pGPTV-Bar 형질전환 벡터를 제작하였다. 기관발생 및 체세포배발생에 의한 오이의 재분화는 연구팀에 의해 확립되었다 (Kim et al. 1998, 2000). 해동백다다기 오이종자를 광발아시킨 후 발아 5 일된 유식물체의 자엽절편체를 형질전환에 사용하였다. ASOp::mSOD1/pGPTV-Bar를 가진 *Agrobacteria*를 자엽절편체와 공동배양하여 최종적으로 형질전환체를 얻었다 (Lee et al. 2002).

형질전환 오이식물체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern 분석을 실시한 결과 2개체는 1 copy씩, 1개체는 2 copy가 도입되었음을 알 수 있었다. 이때 사용한 probe는 카사바 *mSOD1* cDNA의 3'-UTR 부위 (특히 유전자 부위)를 PCR로 합성 (260 bp)하여 이용하였다. SOD 형질전환 오이식물체에서 *mSOD1* 유전자는 열매에서 강하게 발현하였으나 잎에서는 거의 발현되지 않거나 약하게 발현하였다. 이것은 사용한 ASO 프로모터가 오이의 열매에서 강하게 발현하지만 (Yoshida et al. 1994) 잎에서는 아주 약하게 발현하는 프로모터의 특성에 의한 결과이다 (Lee et al. 2002).

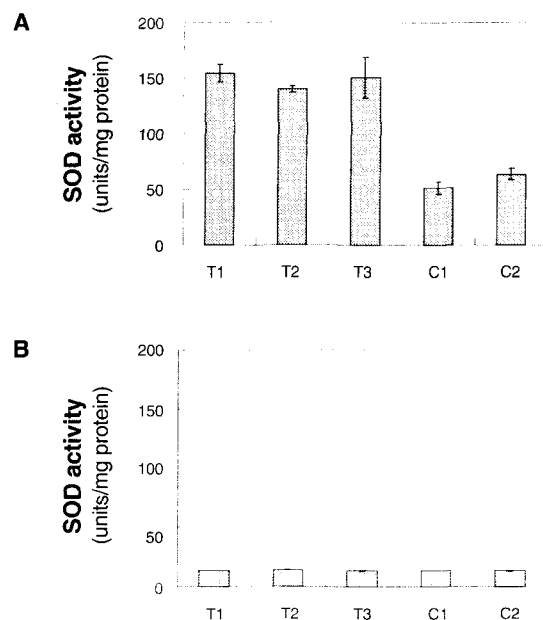


Figure 6. SOD specific activity in fruits (A) and leaves (B) of transgenic (T1, T2, and T3) and non-transgenic (C1 and C2) cucumber plants. Data are means \pm SE of three replicates.

5.3. SOD 고함유 오이

형질전환 오이 열매의 SOD 비활성도 (units/mg protein)는 140~160 정도로 비형질전환 오이열매 (60 units/protein)에 비해 약 2.5배 높았다 (Figure 6) (Lee et al. 2002). 형질전환 식물체의 열매에서 전체 SOD 활성도 비형질전환 오이열매보다 3배 이상 높게 나타났다. 하지만 잎의 SOD 활성은 형질전환에 관계없이 일정하게 유지되었다. 형질전환 오이의 열매의 SOD isoenzyme 패턴 (활성)을 native gel 방법으로 조사하여, 정상식물에서는 관찰되지 않은 새로이 발현되는 CuZnSOD isoenzyme 밴드를 확인하였다 (Lee et al. 2002).

오이는 형질전환이 어려운 식물이며 아직까지 SOD와 같이 유용소재를 도입한 형질전환 오이는 보고된 바 없다. 과실에 SOD를 고함유하는 오이는 피부노화방지를 위한 화장품 소재 등으로 활용이 기대되며, 현재 실용화를 위한 연구를 추진중에 있다 (Filipe et al. 1997).

적 요

각종 환경스트레스에 의해 생체 내에서 과량으로 생성되는 독성의 활성산소종 (ROS)은 산화스트레스를 유발시켜 식물의 질병, 노화 및 세포사멸을 촉진시킨다. 연구팀은 21세기 당면한 지구규모의 환경, 식량 및 보건문제 해결에 기여할 수 있는 기반기술 (platform technology)를 개발하기 위하여 식물세포의 항산화기구 규명, 산화스트레스 유도성 항산화효소 유전자 개발, 스트레스 내성식물 개발에 관한 연구를 수행하고 있다. 여기에서는 항산화효소 유전자를 이용한 산업용식물체 개발에 관한 연구팀의 최근 연구결과를 중심으로 소개하였다. SOD와 APX 유전자를 엽록체에 동시에 발현시킨 담배 식물체는 MV, 건조 등 여러 스트레스에 대한 내성을 나타내어, 복합 스트레스내성 농작물개발에 활용이 기대된다. 인체 DHAR 유전자를 엽록체에 도입시킨 담배식물체는 정상적으로 DHAR 유전자를 발현시켰으며, MV 등 여러 스트레스에 대한 내성을 나타내었다. 피부 노화방지 등에 관여하여 ROS를 제거하는 SOD를 과실에 과발현시킨 형질전환오이를 성공적으로 개발하여, SOD 오이는 기능성화장품의 용도로 제품개발이 기대된다. 또한 고구마에서 산화스트레스에 특이적으로 발현하는 POD (SWPA2) promoter를 개발하였다. SWPA2 promoter는 스트레스내성 및 의약품 단백질 등 고부가가치 생리활성물질을 생산할 수 있는 산업용 형질전환 식물체 및 배양세포주 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

사사-본 연구는 작물유전체기능연구사업단 (CGM0300111), 생명공학실용화사업, 농림기술개발사업의 지원을 받아 수행되었다. 형질전환오이 식물체의 순화 및 포장실험을 담당한 충남농업기술원 원예과 연구팀에 감사한다.

인용문헌

Ahn YO, Choi YH, Kwon SY, Lee HS, Kim SW, Park IH, Kwak SS (1998) Free radical scavenging activity and ascorbate content in various plant cell lines. *Korean J Plant Tiss Cult* **25**:289-293

Ahn YO, Kwon SY, Lee HS, Park IH, Kwak SS (1999) Biosynthesis and metabolism of vitamin C in suspension cultures of *Scutellaria baicalensis*. *J Biochem Mol Biol* **32**:451-455

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* **107**:1049-1054

Allen RD, Webb RP, Schake SL (1997) Use of transgenic plants to study antioxidants defenses. *Free Rad Biol Med* **23**:473-479

Aischer RG, Hess JL (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, pp. 1-174

The Arabidopsis Genomic Initiative (2000) Analysis of the genomic sequences of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**:601-639

Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D (1994) Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **13**:199-218

Conklin PL, Pallaanca JE, Last RL, Smirnov N (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient arabidopsis mutant vtc1. *Plant Physiol* **115**:1277-1285

Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad USA* **93**:9970-9974

Deutsch JC, Santhosh-Kumar CR (1996) Dihydroascorbic acid undergoes hydrolysis on solubilization which can be reversed with mercaptoethanol. *J Chromatog* **724**:271-278

Filipe P, Emerit I, Vassy J, Rigaut JP, Martin E, Freitas J, Fernandes A (1997) Epidermal localization and protective effects of topically applied superoxide dismutase. *Exp Dermatol* **6**:116-121

Foyer CH, Mullineaux PM (1994) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, FL

Goddijn OJM, Pen J (1995) Plants as bioreactors. *TIBTECH* **13**:379-387

Haber F, Weiss J (1934). The catalytic decomposition of hydrogen by iron salts. *Proc R Soc Lond A* **147**:332-351

Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning and characterization of anionic and neutral peroxidase cDNAs from sweet potato suspension-cultured cells and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Gen* **255**:382-391

Huh GH, Yun BW, Lee HS, Jo JK, Kwak SS (1998) Overexpression of sweet potato peroxidase in transgenic tobacco plants.

- Phytochemistry **47**:695-700
- Intapruk C, Yamamoto K, Fujiyama K, Takano M, Shinmyo A** (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana* and their organ-specific expression. *J Ferment Bioeng* **3**:166-172
- Inze D, Van Montagu M** (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* **6**:153-158
- Jang MS, Huh GH, Kim SW, Park IH, Liu JR, Kwak SS** (1997) Comparison of catalase and other antioxidant enzyme activities in various plant cell lines. *Kor J Plant Tiss Cult* **23**:157-160
- Jeong YJ** (2001) Characterization of environmental stress-tolerant in transgenic tobacco plants expressing both SOD and APX in the chloroplasts. MS Thesis, Chungnam National Uni, Taejeon, Korea
- Kim KY** (2000) Isolation and characterization of stress-inducible peroxidase genes from sweet potato (*Ipomoea batatas*). Ph.D. thesis. Chungnam National University. Taejeon. Korea
- Kim JW, Oh SY, Lee HS, Kwak, SS** (1998) Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Korean J Plant Tis Cul* **25**:125-129
- Kim JW, Han SK, Kwon SY, Lee HS, Lim YP, Liu JR, Kwak SS** (2000) High frequency shoot induction and plant regeneration from cotyledonary hypocotyls explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *J Plant Physiol* **157**:136-139
- Kim KY, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Hur Y, Kwak SS** (1999) Molecular characterization of two anionic peroxidase cDNAs isolated from suspension cultures of sweet potato. *Mol Gen Gen* **261**:941-947
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur YK, Bang JW, Kwak SS** (2002) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. (submitted to *Plant Mol Biol*)
- Kim SK, Kwak SS, Jung GH, Min SR, Park IH, Liu JR** (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem J* **27**:132-137
- Krell HW** (1991) Peroxidase: an important enzyme for diagnostic test kits. In : Lobarzewski J, Greppin H, Pene C, Gasper T, (eds), *Molecular and Physiology Aspects of Plant Peroxidase*, Univ Geneva, pp. 469-478
- Kwon SY, Ahn YO, Lee HS, Kwak SS** (2001a) Biochemical characterization of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Bichem Mol Biol* **34**:316-321
- Kwon SY, Lee HS, Kwak SS** (2001b) Development of environmental stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Plant Pathol J* **17**:88-93
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YB, Kwak SS** (2002a) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. (submitted to *FEBS Letters*)
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS** (2002b) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* (in press)
- Lee HS, Kim KY, You SH, Kwon SY, Kwak SS** (1999) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Gen Gen* **262**:807-814
- Lee HS, Kwon EJ, Jeong YJ, Kwon SY, Lee EM, Jo MH, Kim HS, Woo IS, Kwak SS** (2002) Transgenic cucumber fruits that produce high level of an anti-aging superoxide dismutase. (submitted to *Molecular Breeding*)
- Lee JE, Ahn YO, Kwon SY, Lee HS, Kim SW, Park IH, Kwak SS** (2000) Glutathione contents in various plant cell lines. *Kor J Plant Tiss Cult* **27**:57-61
- Mason HS, Arntzed CJ** (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH* **13**:388-392
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J Inorg Biochem* **244**:6049-6055
- McKersie BD, Chen Y, De Beus M, Bowley SR, Bowler C** (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **103**:1155-1163
- McKersie BD, Bowley SR, Harjanto E, Leprince O** (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol* **111**:1177-1181
- Mehler AH** (1951) Studies on reaction of illuminated chloroplasts I. Mechanisms of the reaction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys* **33**:65-67
- Nakano Y, Asada K** (1981) Hydrogen peroxidase is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**:867-880
- Orvar BL, Ellis BE** (1997) Transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for cytosolic ascorbate peroxidase show increased susceptibility to ozone injury. *Plant J* **11**:1297-1305
- Perl A, Perl-Treves R, Galili S, Aviv D, Shalgi E, Malkin S, Galun E** (1993) Enhanced oxidative-stress defence in transgenic potato expression tomato Cu, Zn superoxide dismutase. *Theor Appl Genet* **85**:568-576
- Schake SA** (1995) Analysis of pea chloroplastic MnSOD over-expressed in tobacco. MS thesis, Texas Tech Uni, Lubbock, TX USA
- Sen Gupta A, Heinen J, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD** (1993a) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:1629-1633
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD** (1993b) Over-expression of superoxide dismutases protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* **103**:1067-1073

- Smirnoff N, Pallanca JE** (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soci Trans* **24**:472-478
- Van Camp W, Willekens H, Bowler C, Van Montagu M, Inze D, Reupold-Popp P, Sandermann H, Langebartels C** (1994) Elevated levels of superoxide dismutase protect transgenic plants against ozone damage. *Bio/Technology* **12**:165-168
- Van Huystee RB** (1987) Some molecular aspects of plant peroxidase: Biosynthetic studies. *Annu Rev Plant Physiol* **38**:205-219
- Webb RP, Allen RD** (1995) Overexpression of pea cytosolic ascorbate peroxidase in *Nicotiana tabacum* confers protection against the effects of paraquat. *Plant Physiol Suppl* **108**:64
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**:365-369
- Yoshida K, Ito T, Nozawa H, Ohkawa J, Shinmyo A** (1994) Sequence requirement of 5'-upstream region of the ascorbate oxidase gene for organ-specific expression in cucumber. *Ann New York Acad Sci* **721**:245-247
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS** (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* **22**:103-106
- Yun BW, Huh GH, Kwon SY, Lee HS, Jo JK, Kwak SS** (1998) Antioxidant enzymes in *Nicotiana* cells containing an *Ipomoea* peroxidase gene. *Phytochemistry* **48**:1287-1290
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwak SS** (2000) Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *J Plant Physiol* **156**:504-509

(접수일자 2002년 4월 24일)