

엽록체 항산화기구 대사조절에 의한 환경스트레스 내성 식물

권석윤¹, 이영표¹, 임 순², 이행순², 곽상수^{1*}

한국생명공학연구원 ¹환경생명공학연구소, ²식물세포공학연구소

Transgenic Plants with Enhanced Tolerance to Environmental Stress by Metabolic Engineering of Antioxidative Mechanism in Chloroplasts

Suk-Yoon Kwon¹, Young-Pyo Lee¹, Soon Lim², Haeng-Soon Lee², Sang-Soo Kwak^{1*}

¹Laboratory of Environmental Biotechnology and ²Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Oun-dong 52, Yuseong, Daejeon 305-806, Korea

ABSTRACT Injury caused by reactive oxygen species (ROS), known as oxidative stress, is one of the major damaging factors in plants exposed to environmental stress. Chloroplasts are specially sensitive to damage by ROS because electrons that escape from the photosynthetic electron transfer system are able to react with relatively high concentration of O₂ in chloroplasts. To cope with oxidative stress, plants have evolved an efficient ROS-scavenging enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), and low molecular weight antioxidants including ascorbate, glutathione and phenolic compounds. To maintain the productivity of plants under the stress condition, it is possible to fortify the antioxidative mechanisms in the chloroplasts by manipulating the antioxidation genes. A powerful gene expression system with an appropriate promoter is key requisite for excellent stress-tolerant plants. We developed a strong oxidative stress-inducible peroxidase (*SWPA2*) promoter from cultured cells of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) as an industrial platform technology to develop transgenic plants with enhanced tolerance to environmental stress. Recently, in order to develop transgenic sweetpotato (cv. Yulmi) and potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Atlantic and Superior) plants with enhanced tolerance to multiple stress, the genes of both CuZnSOD and APX were expressed in chloroplasts under the control of an *SWPA2* promoter (referred to SSA plants). As expected, SSA sweetpotato and potato plants showed enhanced tolerance to methyl viologen-mediated oxidative stress. In addition, SSA plants showed enhanced tolerance to multiple stresses such as temperature stress, drought and sulphur dioxide. Our results strongly suggested that the rational manipulation of antioxidative mechanism in chloroplasts will be applicable to the development of all plant species with enhanced tolerance to multiple environmental stresses to contribute in solving the global food and environmental problems in the 21st century.

Key words: Antioxidant, chloroplast, oxidative stress, reactive oxygen species, transgenic plants

서 론

식물은 태양에너지를 이용하여 온실가스의 주요 원인인 이산화탄소를 고정하고 인간 생활에 필수체인 산소와 식량

뿐만 아니라 각종 의약품과 산업용소재를 생산하는 지구상에 가장 효율적인 공장 (plant, factory)이다. 그러나 지금 식물공장이 지구온난화, 오존층의 파괴, 산성비, 삼림파괴, 사막화 등 지구규모의 환경문제에 의해 위기에 처해 있다. 따라서 이러한 위기에 처한 식물생태계를 보전하는 일은 우리 인류가 해결하여야 할 최우선의 과제이다.

*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608
E-mail: sskwak@kribb.re.kr

급속한 인구증가와 산업화에 따른 석탄, 석유 등의 화석 에너지 (fuel energy)의 소비량은 비약적으로 증가하고 있다. 산업혁명 이후 특히 1950년대 이후 화석에너지의 급속한 사용 증가는 대기중 이산화탄소 농도의 상승을 초래하였고, 이것이 지구온난화 등 지구환경문제를 일으킨 중요한 원인이 되고 있다 (Figure 1). 이러한 추세라면 21세기 초기에는 인류생존을 크게 위협할 것이라고 UNEP 등은 설득력 있게 예측하고 있다 (UNEP 2002).

따라서 환경스트레스에 대한 식물의 적응능력을 이해하고, 환경스트레스 조건에서도 식물의 생산성을 유지, 향상시키는 일은 매우 중요하다. 여기에서는 각종 환경스트레스를 받았을 때 생체에서 과다하게 발생하는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)에 의해 생체가 받는 산화스트레스 (oxidative stress)와 이를 극복하는 식물의 항산화기구 (antioxidative mechanism)에 대한 개론과 저자 연구팀이 개발한 산업적 가치가 높은 기반기술 (industrial platform technology)로 평가되는 산화스트레스 유도성 *SWPA2* promoter를 이용하여 엽록체 항산화기구 대사조절에 의한 복합스트레스 내성 농작물 개발에 대하여 기술한다.

활성산소에 의한 산화스트레스와 항산화물질

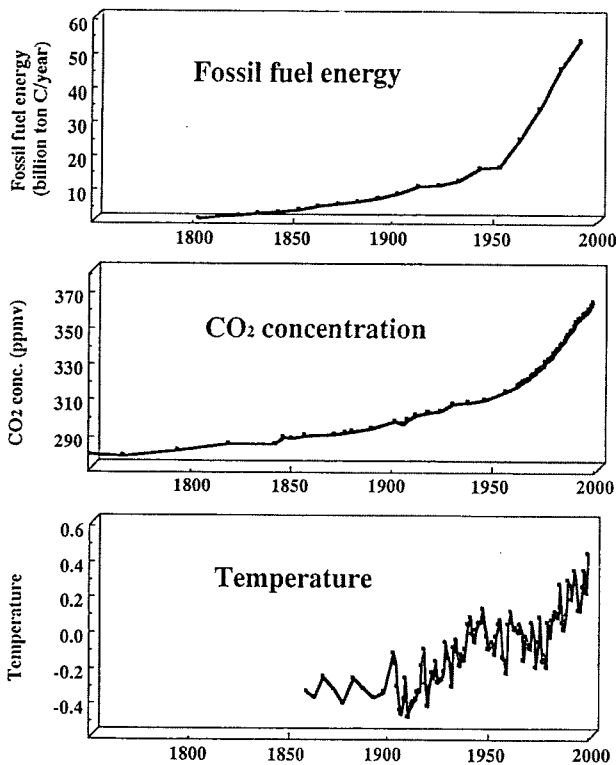


Figure 1. Dramatic increase of carbon dioxide at the atmosphere and global warming by the excess use of fossil fuel energy from the Industrial Revolution.

활성산소에 의한 산화스트레스

식물을 포함한 호기성 생물체가 각종 환경스트레스를 받게 되면 생체내 산소 (O₂)는 전자 (electron)와 반응하여 superoxide anion radical (SAR, ·O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (·OH) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (ROS)으로 변한다(Alscher and Hess 1993). ROS는 생체의 정상적인 대사과정에서도 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 발생시키며 심할 경우 세포사멸을 초래한다 (Alscher and Hess 1993; Inze and Van Montagu 1995) (Figure 2). 인체 노화와 질병의 대부분이 ROS가 관여하고 있고 건강을 유지하기 위하여 활성산소를 제거하는 항산화물질을 다량으로 함유하고 있는 식품이 각광을 받고 있으며, 식물의 경우도 ROS가 세포의 질병, 노화 및 세포사멸에 중요하게 관여하고 있음이 밝혀지고 있다.

항산화물질

생체는 ROS에 의한 산화스트레스로부터 자신을 보호하기 위하여 일련의 항산화기구를 구축하면서 새로운 환경에 적응하여 왔다. 특히 식물은 토양에 고착생활을 하기 때문에 병충해와 같은 생물학적 스트레스 (biotic stress) 뿐만 아니라 대기오염물질, 건조, 온도변화 등의 비생물학적 스트레스 (abiotic stress)를 받을 때도 다른 생물종과 달리 안전한 곳으로 직접 이동할 수 없다. 따라서 식물은 각종 환

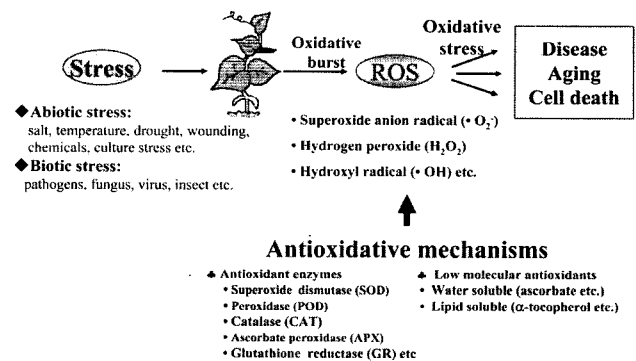


Figure 2. Plant antioxidative mechanism in response to various environmental stresses including biotic and abiotic stresses. Excess oxidative stress by high level of reactive oxygen species (ROS) produced in the cells under various stress conditions leads to disease, aging and cell death. Plants have evolved the well-equipped antioxidative mechanisms to cope with oxidative stress with high levels of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and peroxidase (POD), and low molecular weight antioxidants such as ascorbate and tocopherol.

경스트레스를 받았을 때 외부 스트레스에 대해 적극적으로 대응하기 위하여 환경적응능력이 다른 생물체보다 높아 다른 생물에 비해 많은 종류의 항산화물질 (antioxidant)을 고농도로 생산하고 있음이 밝혀지고 있다 (Alsher and Hess 1993).

식물이 생산하는 주요 항산화물질로는 superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2), glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) 등의 고분자 항산화효소(antioxidant enzyme)(Bowler et al. 1994)와 ascorbate (ascorbic acid, AsA, vitamin C), glutathione, α -tocopherol, β -carotene 등의 높은 환원력을 갖는 저분자 항산화물질 (low molecular weight antioxidant)이 있다 (McCord and Fridovich 1969; Alsher and Hess 1993; Smirnoff and Pallanca 1996).

대표적인 항산화효소인 SOD는 산소를 소비하는 모든 생물종에 존재하며 산소분자로부터 한 개의 전자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical를 제거시키는 작용을 하는 효소 ($2 \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로서 생체 내에서 ROS에 대해 일차적으로 방어작용에 관여하는 중요한 활성산소 소거제이다. SOD는 함유하고 있는 금속의 종류에 따라 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD의 3종이 있으며, CuZnSOD는 세포질과 엽록체에, MnSOD는 미토콘드리아에 존재하며 FeSOD는 일부 식물 엽록체에만 보고 되고 있다 (Bowler et al. 1994). SOD는 노화방지 화장품의 소재 뿐 아니라 항염증작용이 있어 류마티즈 관절염 등 각종 퇴행성 질병 치료제로서 개발되고 있는 상업적으로 중요한 효소이다 (Bannister et al. 1987; Oyanagui 1989; Filipe et al. 1997; Lee et al. 2003). 이밖에도 SOD는 스트레스내성 형질전환 식물체 개발에 활용되고 있다 (Kwon et al. 2002).

대표적인 저분자 항산화물질인 ascorbate (AsA)는 인간에게 중요한 각종 생리작용을 지닌 vitamin C로서 대부분의 공급을 식물에 의존하고 있다. 대부분의 식물체에는 AsA가 특히 엽록체에 고농도 (10-50 mM)로 존재하고 있다. 식물에서 AsA의 역할은 ROS를 제거하는 항산화활성 뿐 아니라 α -tocopherol의 환원상태 유지, 틸라코이드막에서 zeaxanthine 생합성 등 다양한 생리작용을 갖는다. 최근 오존, UV등 환경스트레스에 감수성을 나타내는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)가 일반식물에 비해 AsA 함량이 현저히 낮은 변이종으로 보고 되어, AsA가 환경스트레스에 의해 과다하게 생성되는 ROS를 제거하는 생체방어인자로서 중요성이 확인되어 AsA의 생합성과 대사에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Conklin et al. 1996, 1997; Wheeler et al. 1998). AsA의 생합성 및 대사과정을 분자유종방법으로 조절하면 스트레스내성 식물 뿐 아니라 AsA 고함유 기능성 채소 등을 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

각종 스트레스에 의해 과다하게 생성되는 ROS를 제거하

거나 예방하는 기능을 지닌 항산화물질은 기능성 건강식품과 의약품의 소재로 많이 이용되고 있다. 약용식물을 포함한 각종 식물유래 생약은 오래 전부터 경험적으로 질병의 예방 및 치료에 널리 이용되고 있으나, 아직 약효성분이 명확히 밝혀진 경우는 드물다. 최근 약용식물에는 인체에 유해한 ROS를 제거하는 플라보노이드 (flavonoid), 페놀계 화합물 등 많은 종류의 항산화물질이 다량으로 함유되어 있음이 밝혀지고 있다. 녹차의 카테킨 (catechin), 토마토의 리코펜 (lycopene) 등도 대표적인 항산화물질이다. 또한 수천년 동안 우리 선조들이 사용하여 온 옷칠의 뛰어난 내구성도 항산화활성에 기인하는 것이 필자의 연구팀에 의해 규명된 바 있다. 옷나무 (*Rhus vernicifera*) 수액의 50% 이상을 차지하는 성분인 우루시올 (urushiol)계 화합물은 강한 항산화활성 뿐 아니라 높은 항암 활성과 항미생물 활성을 지니고 있다 (Kim et al. 1997a, 1997b; Hong et al. 1999).

상용되고 있는 기능성 식품과 의약품에는 많은 종류의 항산화물질이 포함되어 있다. 또한 항산화물질의 대사공학 (metabolic engineering) 연구를 통하여 환경스트레스를 극복할 수 있는 재해내성 농작물 개발에 활용되고 있다 (Perl et al. 1993; McKersie et al. 1993, 1996; Van Camp et al. 1994; Allen 1995; Yun et al. 2000; Kwon et al. 2001; Wang et al. 2005).

엽록체의 항산화기구

식물의 항산화기구는 엽록체를 비롯한 각종 세포 소기관 별로 발달되어 있다. 엽록체 (chloroplast)는 태양에너지를 이용하여 이산화소를 고정하여 인간의 생존에 필요한 산소, 식량 뿐 아니라 각종 의약품과 산업소재를 생산하는 지구 상에서 가장 이상적이고 효율적인 공장의 핵심이다. 엽록체는 높은 농도의 산소와 광합성 전자전달계 (photosynthetic electron transport system)가 존재하기 때문에 외부스트레스를 받게 되면 과량의 ROS를 생성하기 가장 쉬운 곳이다. 엽록체의 산화스트레스는 식물의 생산성에 크게 영향을 미치어 생태계 보전 뿐 아니라 식량생산에도 큰 영향을 줄 수 있다.

엽록체는 산화스트레스를 극복하기 위한 항산화기구가 잘 발달되어 있다. 특히 ascorbate (AsA)는 고농도 (10 - 50 mM)로 엽록체에 존재하며, 다른 생명체에서 발견되지 않은 FeSOD도 존재한다 (Crowell and Amasino 1991; Bowler et al. 1994). 엽록체의 AsA는 ROS를 직접 제거하거나 AsA peroxidase (APX)의 기질로 사용되어 유해한 과산화수소를 제거하는데 이용하고 있다. Figure 3은 엽록체의 항산화기구인 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)

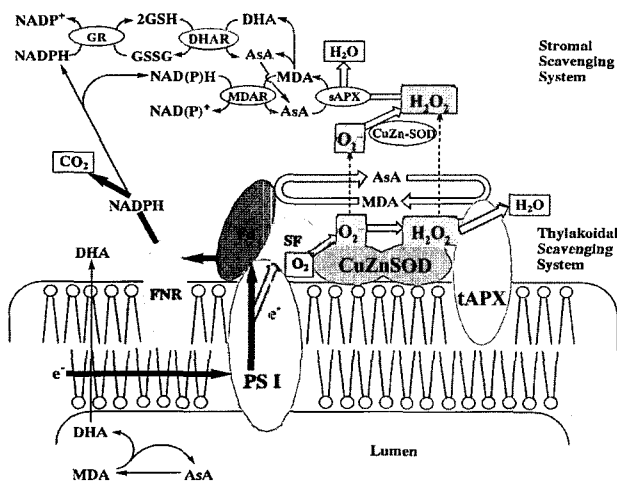


Figure 3. The antioxidative mechanism in chloroplasts (Asada 1999). The detail explanation are described in the text.

이 생성되고, 이것이 틸라코이드 막 (thylakoid membrane)에 존재하는 CuZnSOD에 의해 H₂O₂로 빠르게 변한다. 생성된 H₂O₂는 틸라코이드 막에 결합되어 있는 APX (tAPX)에 의해 제거되며, 틸라코이드 막에서 유리된 SAR과 H₂O₂는 스트로마 (stroma)에서 제거된다 (Nakano and Asada 1981; Smirnoff and Pallanca 1996; Orvar and Ellis 1997). H₂O₂ 제거과정에서 스트로마에 있는 APX (sAPX)에 의해 생성된 monodehydroascorbate radical은 ferredoxin (Fd) 또는 스트로마에 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, MDHAR 및 DHAR은 비광합성 조직내에서도 존재하여 엽록체에서와 같이 ROS를 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Allen et al. 1997). 따라서 엽록체의 항산화기구를 대사공학적으로 조절하는 것은 식물의 생산성을 유지, 향상시키는데 매우 중요한 것으로 간주된다.

항산화효소 유전자를 도입한 형질전환 식물체

현재까지 항산화효소를 도입한 식물체가 1990년부터 개발되어 파라콧 (paraquat, methyl viologen, MV) 등 산화스트레스를 유발하는 환경스트레스에 대한 내성이 보고 되었으나, 아직까지 실용적인 식물체 개발에는 이르지 못하고 있다. MV는 ROS를 생성하여 식물체를 고사시키는 비선택성 제초제 (non-selective herbicide)로 사용되고 있는 대표적인 ROS 생성촉진물질이다 (Babbs et al. 1989). Table 1은 항산화효소 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 연구사례를 정리한 것이다.

항산화효소를 과발현시킨 형질전환 식물체는 SOD, APX, GR 등 한 종류의 유전자를 도입한 경우가 대부분이다. Aono 등 (1995)은 세포질에 GR과 CuZnSOD를 동시에 발현시킨 형질전환체 담배의 산화스트레스에 강한 특성을 보고한 바 있다. 식물 세포에서 산화스트레스를 가장 받기 쉬운 엽록체를 보호하기 위한 연구는 의외로 부족한 실정이다. 엽록체의 항산화기구 (Figure 3)에서 알 수 있듯이 CuZnSOD와 APX를 엽록체에 동시에 과발현하는 방법은 환경스트레스로부터 식물체를 보호하는데 바람직한 것으로 생각된다. 저자의 연구팀은 CuZnSOD와 APX를 동시에 엽록체에 도입된 형질전환 담배식물체를 개발하여 대표적 산화스트레스 유도물질인 MV 등 여러 가지 환경스트레스에 강한 내성이 있음을 확인하였다 (Jeong 2001; Kwon et al. 2002; Kim et al. 2003b).

또한 최근 인체에서 분리한 dehydroascorbate reductase (DHAR)를 엽록체에 도입한 형질전환 담배식물체도 MV, 과산화수소, 저온, NaCl 등 여러 스트레스에 대한 내성을 나타내는 것을 확인하였다 (Kwon et al. 2001, 2003). 인체 DHAR 유전자를 도입한 담배식물체는 정상식물에 비하여 DHAR 활성이 약 1.4배 높았으며 AsA의 함량이 약 1.5배 증가하였다. DHAR 식물체는 증가된 AsA 함량 증가로 인하여 스트레스에 대한 내성이 증가된 것으로 해석된다. DHAR는 전자공여체로 glutathione (GSH)를 이용하여 산화형 ascorbate (DHA)를 활성형인 환원형 ascorbate (ascorbic acid, AsA)로 변환시키는 효소이다.

따라서 엽록체의 항산화기구를 조절하기 위한 효율적인 식물체를 개발하기 위해서는 SWPA2 promoter (Kim et al. 2003a)와 같은 스트레스 유도성 promoter을 사용하고 SOD, APX, DHAR 등 항산화효소 유전자를 복합으로 도입할 필요가 있음이 제시되었다. 연구팀에서는 최근 엽록체에 CuZnSOD, APX와 DHAR를 동시에 과발현하는 CAD담배식물체를 개발한 결과, CA식물체보다 산화스트레스에 강한 내성이 있음을 확인하였다 (Lee et al. 2004).

산화스트레스 유도성 고구마 SWPA2 promoter

산화스트레스를 효율적으로 경감시키기 위한 형질전환 식물체 개발을 위해서는 산화스트레스 유도성 promoter의 확보와 이를 이용한 효율적인 유전자 발현시스템 확립이 요구된다. 저자의 연구팀에서는 고구마 배양세포에서 산화스트레스 유도성 POD (SWPA2) promoter를 개발하여 환경스트레스 내성 식물체 개발에 활용하고 있다. 여기서 간단하게 SWPA2 promoter의 개발과정과 특성을 소개한다.

Peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)는 과산화수소 존재 하에서 다양한 종류의 기질을 산화시키는 작용을 하는 효소 (RH₂ + H₂O₂ → R + 2H₂O)로서 반응이 민감하며 발색반응을 나타내기 때문에 각종 임상시험용 시약, 화학분석용

Table 1. Expression of antioxidant genes in transgenic plant

Gene construct	Host plant	Reported phenotype	Reference
SOD			
Chloroplastic	Tobacco	No protection from MV or ozone	Tepperman and Dunsmuir (1990)
CuZnSOD	Tobacco	Reduced MV damage and photoinhibition	Sen Gupta et al. (1993a, 1993b)
	Potato	Reduced MV damage	Perl et al. (1993)
MnSOD	Tobacco	Reduced MV damage and no protection from photoinhibition	Slooten et al. (1995)
	Alfalfa	Reduced acifluorfen, freezing, and water-deficit damage	McKersie et al. (1996, 1997)
FeSOD	Alfalfa	Modified regulation of photosynthesis at low CO ₂	McKersie et al. (2000)
	Maize	Enhanced tolerance to MV	Van Breusegem et al. (1999)
Mitochondrial	Tobacco	Reduced MV damage in the dark	Bowler et al. (1991)
MnSOD	Alfalfa	Reduced freezing and water-deficit damage	McKersie et al. (1996)
Cytosolic			
CuZnSOD	Potato	Reduced MV damage	Perl et al. (1993)
APX			
Cytosolic	Tobacco	Reduced MV damage and photoinhibition	Allen (1997)
Chloroplastic	Tobacco	Reduced MV damage and photoinhibition	Allen (1997)
SOD and APX	Tobacco	Reduced MV damage	Kwon et al. (2002)
DHAR	Tobacco	Reduced MV damage and NaCl damage	Kwon et al. (2003)
POD	Tobacco	Reduced MV damage	Yun et al. (2000)
GR			
<i>E. coli</i>	Tobacco	Reduced MV and SO ₂ damage but not O ₃	Aono et al. (1993)
Chloroplastic	Poplar	Reduced photoinhibition	Foyer et al. (1995)
Pea GR	Tobacco	Reduced O ₃ damage, variable results with MV	Broadbent et al. (1995)
GST/GPX	Tobacco	No tolerance to MV, tolerant to salt and chilling	Roax et al. (1997, 2000)
Ferritin	Tobacco	Tolrant to MV and pathogens	Deak et al. (1999)

시약, 유기화합물의 산화반응 등에 사용되는 상업적으로 중요한 효소이다 (Krell 1991). 식물체에서 POD는 일반적으로 바이러스, 미생물, 곰팡이의 감염에 의한 생물학적 스트레스 (biotic stress)와 고농도 염, 상처 등의 비생물학적 스트레스 (abiotic stress)에 반응해서 그 활성이 증가된다 (Van Huystee 1987).

저자의 연구팀은 POD 고생산 고구마 배양세포에서 10개의 POD cDNA (산성의 *swpa1-swpa6*, 염기성의 *swpb1-swpb3*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 강하게 유도되었다 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999; Park et al. 2003). 특히 고구마 배양세포에서 가장 많이 생산되는 A2 동위효소를 코딩하는 *swpa2* 유전자는 식물체 조직에서는 전혀 발현되지 않았고 스트레스에 의해 가장 강하게 유도되었다 (Kim et al. 1999, 2004). 배양세포에 강하게 발현하며, 정

상적인 식물체에는 발현하지 않지만 산화스트레스에서 식물체에서 강하게 유도되는 *swpa2* cDNA를 probe로 사용하여 genomic clone (*SWPA2*)를 분리하여, promoter의 특성을 생물정보학 (bioinformatics)으로 조사한 결과, *SWPA2* promoter 영역에는 동물세포에서 산화스트레스와 관련된 수종의 cis-element가 존재함이 확인되었다 (Kim et al. 2003a). *SWPA2* promoter를 5개의 절단변이체 (deletion mutant)를 제작하여 β-glucuronidase (GUS)단백질에 연결하여 담배 BY-2 세포를 이용한 일시적 활성 (transient assay)을 조사하여 CaMV 35S promoter의 것과 비교한 결과, 1314 bp deletion promoter는 CaMV 35S promoter에 비해 약 30배 높은 활성을 나타내었다.

SWPA2 promoter는 형질전환 담배식물체에서 외래단백질 (GUS)의 발현이 과산화수소, 상처, 자외선 등에 의해 강하게 유도되어, 스트레스 내성 식물 개발에 유용하게 활용될 수 있음이 제시되었으며, 현재 이를 이용하여 복합스트레스에 강한 형질전환 감자, 고구마 등을 개발하고 있다.

복합 환경스트레스 내성 작물

재해내성 형질전환 감자

엽록체의 항산화기구 (Figure 3)에서 알 수 있듯이 CuZn-SOD와 APX를 엽록체에 동시에 과발현하는 방법은 산화스트레스를 유발하는 환경스트레스로부터 식물체를 보호하는데 이상적인 것으로 생각된다. 저자의 연구팀은 산화스트레스에 강하게 유도되는 *SWPA2* promoter 조절 하에 엽록체에 CuZnSOD와 APX를 모두 발현토록 SSA 벡터를 제작하여 세계적으로 식용 감자로 많이 재배되고 있는 수미 (Superior) 품종과 가공용 감자로 많이 재배되는 대서 (Atlantic)를 사용하여 형질전환 감자를 개발하였다 (Tang et al. 2004a). 형질전환 감자 (이하 SSA감자)는 MV에 의해 유도되는 산화스트레스와 고온스트레스에 강한 내성이 있음이 확인되었다 (Figure 4) (Tang 2005). 특히 감자는 고온에 의한 생리장애로 내부갈변 및 중심공동 현상이 심각한데, SSA감자는 42°C 고온에 내성이 인정되어 농업적 실용성이 기대된다.

또한 산화스트레스 *SWPA2* promoter를 이용하여 각종 항

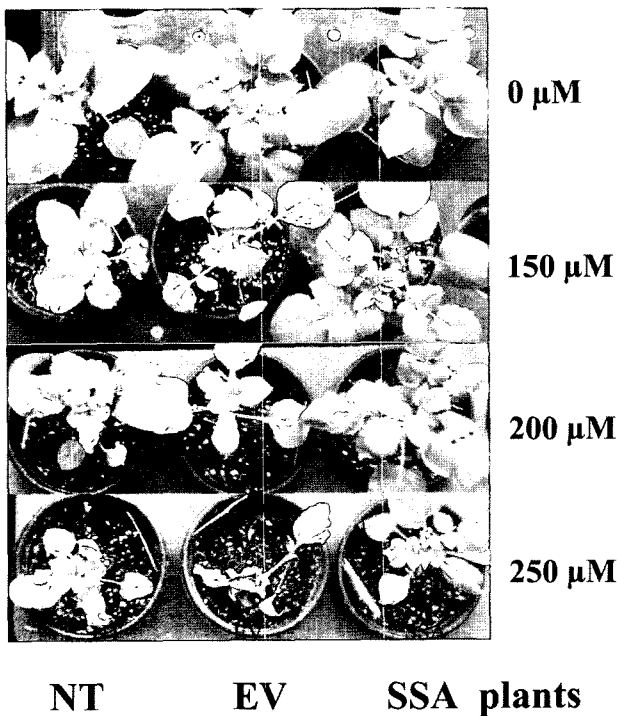


Figure 4. Enhanced tolerance of SSA transgenic potato (cv. Atlantic) plants expressing both CuZnSOD and APX in chloroplasts under the control of *SWPA2* promoter to the oxidative stress after spraying with 0, 150, 200 and 250 100 μM methyl viologen (MV). Photograph are taken 5 days after MV treatment. NT and EV indicate non-transgenic and CAMBIA vector-transformed plants, respectively.

산화효소 유전자를 과발현시켜 복합스트레스 내성을 나타내는 nucleoside diphosphate kinase 2 (NDPK2)를 세포질에 과발현시킨 감자 등이 강한 산화스트레스 내성을 가지는 것도 확인하였다 (Moon et al. 2003; Tang et al. 2004b; Tang 2005). 현재 SSA작물에 NDPK2 등을 도입하는 다중 유전자를 도입하는 복합스트레스 내성 농작물을 개발하고 있어 연구결과가 기대된다.

재해내성 형질전환 고구마

SSA 벡터를 사용하여 우리나라에서 많이 재배되고 있는 울미 (Yulmi) 품종을 형질전환시켰다 (이하 SSA고구마). SSA고구마는 MV에 의해 유도되는 산화스트레스와 저온스트레스에 강한 내성이 있음이 확인되었다 (Lim et al. 2004, 2005). 특히 고구마는 열대성 작물로 저온에 감수성을 나타내는데 SSA고구마는 저온스트레스에 내성을 나타내었다. SSA고구마는 대표적인 대기오염물질인 아황산가스(SO₂)에 강한 내성을 나타내었다 (Figure 5).

고구마는 척박한 토양에서도 재배가 용이하고 식물체의 모든 부위를 이용할 수 있을 뿐 아니라 지하부에 유용소재를 생산할 수 있고 온대지방에서는 꽃이 피지 않는 등 특징이 있어, 형질전환시스템이 확립되면 산업적 가치가 높은 품종을 개발할 수 있다. 따라서 SSA고구마는 환경스트레스가 문제되는 지역에 재배가 기대될 뿐 아니라 가축 백신단백질 등 유용소재를 생산하는 산업용 형질전환고구마 개발에 이용이 기대된다.

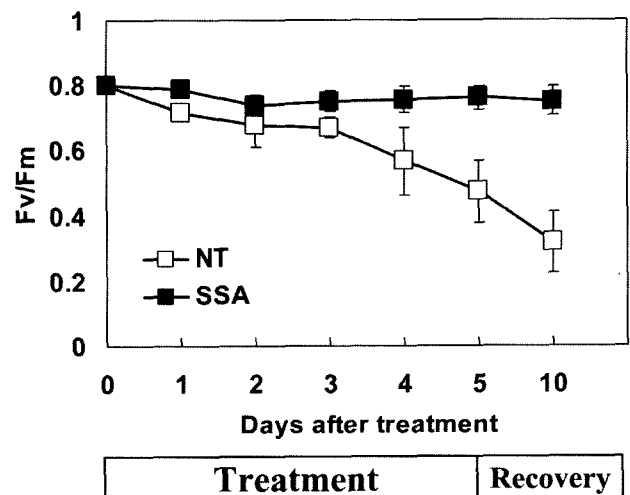


Figure 5. Enhanced tolerance of SSA transgenic sweetpotato (cv. Yulmi) plants expressing both CuZnSOD and APX in chloroplasts under the control of *SWPA2* promoter to 500 ppb SO₂ treatment (8 hr per day) for 5 days. Photosynthetic efficiency of the 3rd leaf from the top was measured by chlorophyll fluorescence as the F_v/F_m ratio. NT indicates non-transgenic plants. Data are means ±SE of three replicates.

결론과 전망

식물은 환경변화에 적응하여 생존하기 위하여 잘 발달된 항산화기구를 구축하여 진화하여 왔다고 생각된다. 그러나 최근 급격한 환경변화에 적응하기에는 식물체가 가지고 있는 항산화기구만으로는 높은 산화스트레스를 극복하기 어려울 것이다. 지금 이 순간에도 환경악화로 인하여 식물종이 감소하고 있어 생태계를 위협하고 있으며 농작물의 경우는 생산성에 큰 영향을 미치고 있다. 따라서 환경스트레스 조건에서 항산화물질을 과량으로 발현시켜 산화스트레스를 극복하는 일은 매우 중요하게 대두되고 있다.

이러한 맥락에서 산화스트레스 *SWPA2* promoter를 이용하여 엽록체 항산화기구를 효과적으로 조절하여 개발된 SSA감자와 SSA고구마는 복합스트레스에 강한 내성을 지니고 있음이 확인되어, 항산화기구의 대사조절연구는 21세기 우리 인류가 당면한 환경문제 더 나아가서는 식량문제 등을 해결하는데 기여할 것으로 기대된다. 아직 식물의 항산화능력에 대한 이해는 인체에 비해 매우 부족한 실정이므로 환경스트레스에 대한 적응능력 즉 식물의 생존차원에서 식물의 항산화능력을 분자수준에서 상세하게 연구하면 식물의 진면목의 이해 뿐 아니라 우리 인류가 당면한 환경문제, 식량문제, 보건문제, 에너지문제 해결에 크게 기여할 수 있으리라 확신하며 이 분야에 많은 연구를 기대한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업, 과학기술부 국공공동연구사업 및 경상대 환경생명과학국가핵심연구센터 지원으로 수행되었다.

인용문헌

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
 Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, pp 1-174
 Aono M, Kubo A, Saji H, Tanaka K, Kondo N (1993) Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol* 34: 129-136
 Aono M, Saji H, Sakamoto A, Tanaka K, Kondo N, Tanaka K (1995) Paraquat tolerance of transgenic *Nicotiana tabacum* with enhanced activities of glutathione reductase and

superoxide dismutase. *Plant Cell Physiol* 36: 1687-1691
 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
 Babbs CF, Pham JA, Coolbaugh RC (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* 90: 1267-1270
 Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev in Biochem* 22: 111-180
 Bowler C, Slight L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10: 1723-1732
 Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inze D (1994) Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* 13: 199-218
 Broadbent P, Creissen GP, Kular B, Wellburn AR, Mullineaux P (1995) Oxidative stress reponse in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J* 8: 247-255
 Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnoff 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
 Crowell DN, Amasino RM (1991) Nucleotide sequence of an iron superoxide dismutase complementary DNA from soybean. *Plant Physiol* 96: 1393-1394
 Deutsch JC, Santhosh-Kumar CR (1996) Dihydroascorbic acid undergoes hydrolysis on solubilization which can be reversed with mercaptoethanol. *J Chromatogr* 724: 271-278
 Deak M, Horvath GV, Davletova S, Torok K, Sass L, Vass I, Barna B, Kiraly Z, Dudits D (1999) Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative stress damage and pathogens. *Nature Biotech* 17: 192-196
 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, Souriau N, Perret S, Lelandais M, Kunert KJ, Pruvost C, Jouanin L (1995) Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photo-inhibition in poplar trees. *Plant Physiol* 109: 1047-1057
 Hong DH, Han SB, Lee CW, Park SH, Jeon YJ, Kim MJ, Kwak SS, Kim HM (1999) Cytotoxicity of urushiols isolated from sap of Korean lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes). *Arch Pharm Res* 22: 638-641
 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
- Inze D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Curr Opin Biotechnol* 6: 153-158
- Jeong YJ (2001) Characterization of environmental stress-tolerance in transgenic tobacco plants expressing both SOD and APX in the chloroplasts. MS Thesis, Chungnam National University, Daejeon
- 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 (2003a) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweet potato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838
- Kim MJ, Choi YH, Kim WG, Kwak SS (1997a) Antioxidative activity of urushiol components from the sap of lacquer tree (*Rhus vernicifera* STOKES). *Kor J Plant Resour* 10: 227-230
- Kim MJ, Kim CJ, Kwak SS (1997b) Antifungal activity of urushiol components from the sap of lacquer tree (*Rhus vernicifera* STOKES). *Kor J Plant Resour* 10: 231-234
- Kim YH, Kwon SY, Bang JW, Kwak SS (2003b) Photosynthetic efficiency in transgenic tobacco plants expressing both CuZnSOD and APX in chloroplasts against oxidative stress caused by highlight and chilling. *Kor J Plant Biotechnol* 30: 399-403
- Kim YH, Ryu SH, Kim KY, Kwon SY, Bang JW, Kwak SS (2004) Induction of a sweetpotato anion peroxidase *swpa2* gene expression by stress-related chemicals and *Pectobacterium chrysanthemi*. *Kor J Plant Biotechnol* 31: 83-88
- 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 (2001) Biochemical characterization of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Biochem Mol Biol* 34: 316-321
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YB, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160: 347-353
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25: 873-882
- Lee HS, Kwon EJ, Jeong YJ, Kwon SY, Lee EM, Jo MH, Kim HS, Woo IS, Kwak SS (2003) Transgenic cucumber fruits that produce high level of an anti-aging superoxide dismutase. *Mol Breeding* 11: 213-220
- Lee YP, Kwon SY, Bang JW, Kwak SS (2004) Characterization of transgenic tobacco plants expression of CuZnSOD, APX and DHAR in chloroplasts. *Proceeding of Vision for Practical Use of Biotechnology*. October 22-23, 2004. The 2004 Annual Conference of the Korean Society of Plant Biotechnology. Dong-A University. pp 99
- Lim S, Lee HS, Kwon SY, Kwak SS (2004) Development of transgenic sweetpotato plants with enhanced tolerance to environmental stress. *Proceedings of the International Workshop on Production, Utilization and Development of Sweetpotato*. September 6-10, 2004. Mokpo Experiment Station, NICS/RDA. pp 31-39.
- Lim S, Yang KS, Kim YH, Kwon SY, Han SH, Lee JC, Paek KY, Lee HS, Kwak SS (2005) Transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas* Lam.) plants with enhanced tolerance to SO₂. *Proceeding of Plant Biotechnology and Human Welfare*. April 22-23, 2005. The 2005 Annual Conference of the Korean Society of Plant Biotechnology. Samsung Training Center, Daejeon. pp 79
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte. *J Inorg Biochem* 244: 6049-6055
- 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
- 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, Murnaghan J, Bowley SR (1997) Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. *Acta Physiol Plant* 19: 485-495
- McKersie BD, Murnaghan J, Jones KS, Bowley SR (2000) Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiol* 122: 1427-1437
- 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
- Moon HJ, Lee BY, Choi GT, Shin DJ, Theertha Prasad D, Lee OS, Kwak SS, Kim DH, Nam JS, Bahk JD, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ (2003) Nucleoside diphosphate kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinases to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 358-363
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide 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
- Oyanagui Y (1989) SOD and Active Oxygen Modulators: pharmacology and clinical trials. Nihon-Igakukan, Tokyo, pp 1-859
- Park SY, Ryu SH, Kwon SY, Lee HS, Kim JG, Kwak SS (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNAs derived from sweetpotato cell cultures in response to stress. *Mol Genet Genomics* 269: 542-552
- 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
- Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD (1997) Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedling during stress. *Nature Biotech* 15: 988- 991
- Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD (2000) Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 41: 1229-1234
- 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) Overexpression of superoxide dismutases protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* 103: 1067-1073
- Slooten L, Capiou K, Van Montagu M, Sybesma C, Inze D (1995) Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol* 107: 737-750
- Smirnoff N, Pallanca JE (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soci Trans* 24: 472-478
- Tang L (2005) Development and characterization of transgenic potato plants with enhanced tolerance to environmental stress. Ph.D thesis, Chungnam National University, Daejeon
- Tang L, Kwon SY, Kwak SS, Sung CK, Lee HS (2004a) Selection of transgenic potato plants expressing both CuZnSOD and APX in chloroplasts with enhanced tolerance to oxidative stress. *Kor J Plant Biotechnol* 31: 109-113
- Tang L, Kwon SY, Yun DJ, Kwak SS, Lee HS (2004b) Selection of transgenic potato plants expressing NDP kinase 2 gene with enhanced tolerance to oxidative stress. *Kor J Plant Biotechnol* 31: 191-195
- Tepperman JM, Dunsmuir P (1990) Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol Biol* 14: 501-511
- (INEP (2002) Global Environment Outlook 3. Earthscan, pp 1-446
- Van Breusegem F, Slooten L, Stassart JM, Moens T, Botterman J, Van Montagu M, Inze D (1999) Overexpression of *Arabidopsis thaliana* FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize. *Plant Cell Physiol* 40: 515-523
- 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
- Wang FZ, Wang QB, Kwon SY, Kwak SS, Su WA (2005) Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutases. *J Plant Physiol* 162: 465-472
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369
- 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 2005년 9월 8일, 수리일자 2005년 9월 22일)