

가지과식물에서 Capsidiol 생합성에 관여하는 Cytochrome P450 유전자의 발현과 효소활성

권순태*, Paul Hasegawa¹

안동대학교 생명자원과학부, ¹퍼듀대학교 원예학과

Enzyme Activity and Gene Expression of Cytochrome P450 Involved in Capsidiol Biosynthesis in *Solanaceae* Plants

Soon-Tae Kwon* and Paul Hasegawa¹

Dept. of Biological Resources, Andong Nat'l Univ., Kyungpook 760-749, Korea

¹Dept. of Horticulture, Purdue University, IN47907-2010, USA

Abstract - Enzyme activity and expression of cytochrome P450 gene involved in the pathway of capsidiol biosynthesis were compared in five different solanaceae plants such as red pepper, green pepper, tobacco, potato and egg plant. Base on genomic DNA and/or RT-PCR results, four solanaceae plants such as red pepper, green pepper, tobacco and egg plant possess P450 gene in the genome and specifically expressed by elicitor treatment. However, potato was appeared to have neither P450 nor cyclase gene in the genome. P450 genes did not show any expression in the plants under normal condition, but showed highly specific expression under elicitation condition in various organs and tissue such as leaf, root, stem and culture cells.

Key words - Solanaceae plant, Cytochrome P450, Cyclase, Capsidiol

서 언

Cytochrome P450(P450)은 세포 소기관의 microsome 부위에 존재하는 단백질로 세포에서 일어나는 다양한 종류의 산화 반응을 촉매하는 효소이다(Hoshino *et al.*, 1995). P450군에 속한 효소들은 대사과정 중에 생체방어와 관련된 이차대사물질이나 phytoalexin의 생합성에 결정적인 역할을 하며 제초제나 약품의 해독작용에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Hoshino *et al.*, 1995; Donaldson and Luster, 1991). 식물에서는 벼, 고추, 완두, 담배, 알팔파, 해바라기 등에서 P450 유전자가 밝혀졌는데, 이에 속하는 효소/유전자군의 상당한 종류가 식물이 병에 걸리거나 생물·비생물적 스트레스와 같은 불량한 환경조건 하에서만 특이적으로 발현되는 특성을 가진 것으로 알려져 있다(Kata *et al.*, 1995; Donaldson and Luster, 1991; Kwon and Chappell, 1998). 따라서 식물의 P450이나 이차대사물 생산에 관한 연구는 식물의 환경반응이나 병해, 제초제 저항성 및 유용

물질의 생산에 관한 기작을 분자수준에서 해명하고, 더 나아가 관련된 유전자를 조작하거나 조절함으로써 식물에 새로운 기능을 부여하려는 시도로 이루어지고 있다(Chappell, 1998; Lee, 2007; Doo, 2007).

가지과 식물인 담배나 고추 세포에 역병(*Phytophthora*) 균이 감염되거나 인위적으로 elicitor를 처리하면 세포내에서 일상적으로 일어나는 terpenoid 생합성 경로에 결정적인 변화가 유발되면서 식물은 생체방어물질인 capsidiol을 새롭게 생합성하는 것으로 알려져 있다(Fig. 1). 즉 정상세포는 대사중간산물인 farnesyl diphosphate (FPP, C₁₅)를 이용하여 squalene을 거쳐 궁극적으로 sterol화합물을 생합성하나, 병균의 감염이나 elicitor를 처리한 세포는 FPP를 이용하여 새로운 phytoalexine인 capsidiol을 생산하게 된다(Chappell, 1995; Chappell and Nable, 1987; Facchini and Chappell, 1992).

본 연구는 고추나 담배에서 역병에 대한 방어역할을 하는 것으로 알려진 물질인 capsidiol의 생합성을 촉매하는 P450계 효소인 5-*epi*-aristolochene hydroxylase 유전자가 고추, 피망, 담배, 감자 및 가지 등 여러 종류의 가지과 식물에서 발현되는

*교신저자(E-mail) : skwon@andong.ac.kr

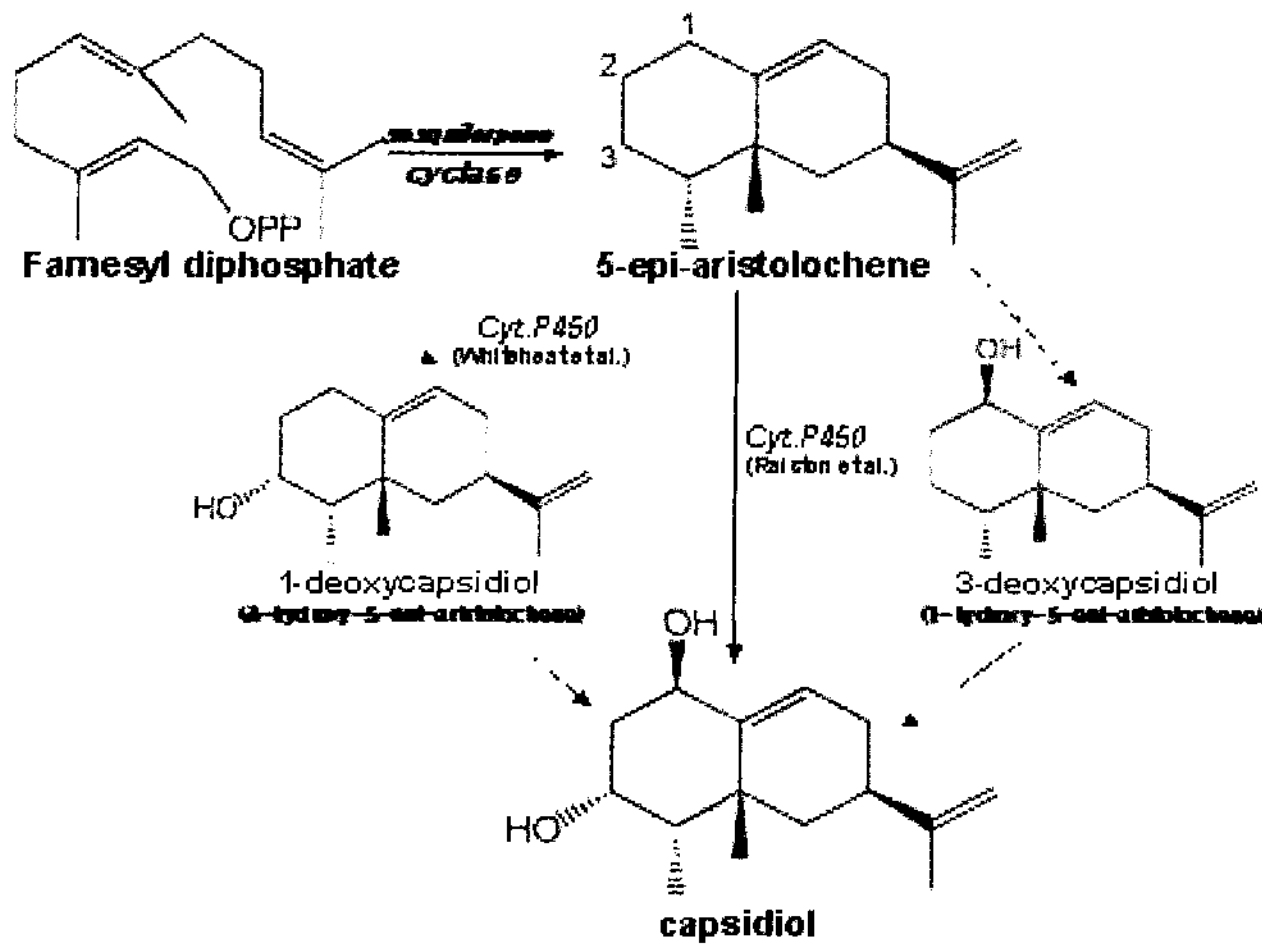


Fig. 1. Proposed pathways for the biosynthesis of capsidiol in elicitor-treated cells. 5-*epi*-Aristolochene is synthesized from FPP by the action of sesquiterpene cyclase, and is subsequently hydroxylated at C1 and C3 to form capsidiol.

양상과 genome 상의 존재여부를 비교하여 가지과 식물에서 capsidiol의 생합성에 관한 분자생물학적인 기작을 이해하기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

식물재료 및 유전자

본 실험에 사용된 식물체(품종)는 가지과 식물인 고추(수비초), 피망(로얄), 담배(캔터키), 감자(남작), 가지(진혹)를 사용하였다. 식물세포는 한국생명공학연구원 유전자원센터와 퍼듀대학교 원예학과로부터 분양받아 사용하였다.

유전자는 두 종류가 사용되었다. 첫 번째는 FPP를 5-*epi*-aristolochene(5-EAS)로 촉매하는 효소를 코딩하는 유전자인 cyclase이며, 두 번째는 5-EAS를 다시 최종산물인 capsidiol로 촉매하는 효소인 5-*epi*-aristolochene hydroxylase(5-EAH)를 코딩하는 유전자(P450)이다(Fig. 1). Cyclase는 Chappell (1995)에 의해 담배로부터 크로닝된 것을 분양받아 사용하였고, P450유전자는 Kwon 등(2003)에 의해서 크로닝된 것을 사용하였다.

Capsidiol의 분석 및 효소활성

식물체와 배양세포의 배지를 클로르포름으로 2회 추출하고 상운의 질소하에서 완전 건조시켜 다시 클로르포름으로 녹여내어 acetone-cyclohexane(1:1)용액에서 TLC를 실시하였다. 정량분석을 위해 [³H]-FPP를 cyclase효소와 반응시켜 [³H]-5-*epi*-aristolochene을 *in vitro* 합성하였으며, 생성된 capsidiol의 양은 TLC 후 발색하여 해당부위를 회수하여 동위원소량을

측정하였다(Kwon and Chappell, 1998).

배양세포의 P450효소 활성은 배양액 일정량의 [³H]-5-EAS를 직접 주입하여, [³H]-5-EAS가 최종산물인 [³H]-capsidiol로 전이하는 양을 측정하였다. 위의 P450효소 활성을 측정하기 위해 잎조직에서 마이크로솜 부위만을 회수하여 조효소로 사용하였다. 효소의 활성은 기질인 [³H]-5-EAS와 식물에서 추출한 조효소를 반응시켜 생성된 [³H]-capsidiol의 양을 측정하였다(Kwon and Chappell, 1998).

유전자의 발현분석

유전자의 발현은 Northern과 RT-PCR방법으로 분석하였다. Northern분석은 각 식물체로부터 추출한 총 RNA를 1.0% 아가로스에 전기영동하고 이를 필터에 옮긴 후 미리 준비한 P450유전자를 probe로 hybridization을 실시하였다(Kwon *et al.*, 2003). RT-PCR은 식물체로부터 추출한 총 RNA로 cDNA를 작성하고 P450 유전자의 개시암호부위와 종결암호 부위로 각각 20염기의 primer를 제작한 후 PCR을 실시하였다. 합성된 PCR 산물을 전기영동하여 발현정도를 조사하였다.

결과 및 고찰

식물체별 capsidiol 함량

식물체에 elicitor를 처리한 후 다섯 종류의 가지과 식물의 잎, 줄기, 뿌리 및 배양세포에서 생합성된 capsidiol의 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 고추, 피망 및 담배에서는 잎, 줄기 또는 배양세포에서 capsidiol의 생합성이 이루어 졌으나, 감자와 가지에서는 배양세포 뿐 만 아니라 식물의 어느 기관에서도 capsidiol이 검출되지 않았다. 뿌리에는 모든 식물체에서 capsidiol이 검출되지 않았고, 배양세포는 고추, 피망 및 담배 모두 세포를 배양한 배양액에서만 capsidiol이 검출되었다.

식물 부위별로는 줄기보다 잎에서 capsidiol의 함량이 많았다. 고추는 잎과 줄기에서 각각 30.8 및 4.7 μ g/g의 capsidiol이 검출되었고, 배양세포의 배양액에서도 29.7 μ g \cdot mL⁻¹이 검출되었다. 담배는 잎과 줄기에서 각각 40.8 및 6.8 μ g/g, 배양세포에서 38.1 μ g \cdot mL⁻¹로 고추보다 함량이 약간 높았으나 식물체 부위별로 보면 고추와 비슷한 경향이였다. 피망은 잎과 배양세포에서는 capsidiol의 생합성이 이루어 졌으나, 줄기와 뿌리에서는 나타나지 않았다.

역병균에 강한 저항성을 나타내는 것으로 알려진 capsidiol은 정상적으로 성장하고 있는 가지과 식물에서는 전혀 생합성되지 않고 병원균이나 elicitor의 처리에 의해서만 생합성되는 phytoalexin으로 알려져 있으며, 담배나 고추에서는 이미 생합성을 촉매하는 유전자가 밝혀진 상태이다(Chappell, 1995;

Table 1. Production of capsidiol in various tissues and cultured cells of *solanaceae* plants treated with cellulase as elicitor¹⁾

Plant tissues	Concentration of capsidiol ²⁾				
	Red pepper	Green pepper	Tobacco	Potato	Egg plant
Leaf	30.8	21.4	40.8	-	- ³⁾
Stem	4.7	-	6.8	-	-
Root	-	-	-	-	-
Culture cell	29.7	21.8	38.1	-	-

¹⁾Treatment methods: leaves and stems were infiltrated $0.05\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ cellulase with micro syringe, roots were soaked in the solution, and culture cells were directly added cellulase to the medium at final concentration of $0.05\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ medium. ²⁾Concentration of capsidiol is $\mu\text{g/g}$ fresh weight for leaf, stem and root, measured at 60 hours after elicitation, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ medium for culture cell at 24 hours after elicitation. ³⁾- means not detected.

Facchini and Chappell, 1992). 한편 동일한 가지과 식물인 감자와 가지에서는 capsidiol의 생합성이 전혀 감지되지 않아 이들 식물의 효소활성과 유전자 발현을 조사해 보기로 하였다.

P450효소의 활성

Capsidiol의 생합성과정을 보면 FPP가 cyclase의 촉매에 의해 5-EAS이 되고 이 물질에 수산기가 첨가되면 최종산물인 capsidiol이 만들어 진다(Fig. 1). 이 과정에 관여하는 효소가 P450계 효소군으로 분류된 5-EAH이다.

Fig. 2는 다섯 종류의 가지과 식물을 셀룰라제로 elicitation 한 후 시간별로 5-EAH의 활성을 조사한 결과이다. 앞의 실험에서 elicitor를 처리하여도 전혀 capsidiol이 검출되지 않았던 (Table 1) 감자와 가지에서는 5-EAH의 효소활성이 측정되지 않았고, 고추, 담배 및 피망에서는 elicitor를 처리한 후 시간이 경과함에 따라 48~60시간 까지 효소활성이 계속 증가하는 것으로 나타났다. 전체적으로 보아 앞에서 5-EAH 효소 활성은 담배에서 가장 높게 나타났으며, 그 다음이 고추와 피망 순이었다. 담배의 경우 elicitor를 처리한 후 24시간째에 최대 활성의 64%까지 도달하였으나, 고추와 피망은 24시간째에 각각 22% 및 6%밖에 도달하지 않아 식물체별로 elicitor에 대한 효소활성의 촉진시간이 다르게 나타남을 알 수 있었다. 대체적으로 elicitor를 처리한 후 48~60시간에는 효소활성이 최대에 도달하고 그 이후에는 감소하는 것으로 나타났다.

Fig. 3은 배양세포에 elicitor를 처리한 후 경과한 시간별 5-EAH의 활성을 측정된 결과이다. 배양세포에서도 감자와 가지에서는 5-EAH의 활성이 측정되지 않았다. 앞에서 조사한 효소활성과 마찬가지로 배양세포에서도 elicitor를 처리하지 않은 세포는 5-EAH의 활성이 전혀 나타나지 않았고, elicitor를 처리한 후 일정한 시간이 경과한 후부터 효소활성이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 식물체별로 최고활성의 정도는 앞에서 측정된 것과 같이 담배, 고추 및 피망 순이었다. 배양세포에서는 5-EAH의 활성이 24~36 시간에 최고 활성에 도달하여, 약 48~60 시간 후에 최고에 도달하는 앞에서 보다는 elicitor의 처리에 빠르게 반응하는 것을 알 수 있었다. 한편 각각의 식물세포에

서 5-EAH의 활성이 최고에 도달한 후에는 효소활성이 급격히 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 이는 5-EAH의 촉매에 의해서 최종적으로 생합성된 capsidiol이 배지내로 누출되어 축적되면서 배양세포에 강한 독성을 발휘하여 궁극적으로 식물세포도 자체 독성에 의해 사멸하는 것으로 판단된다.

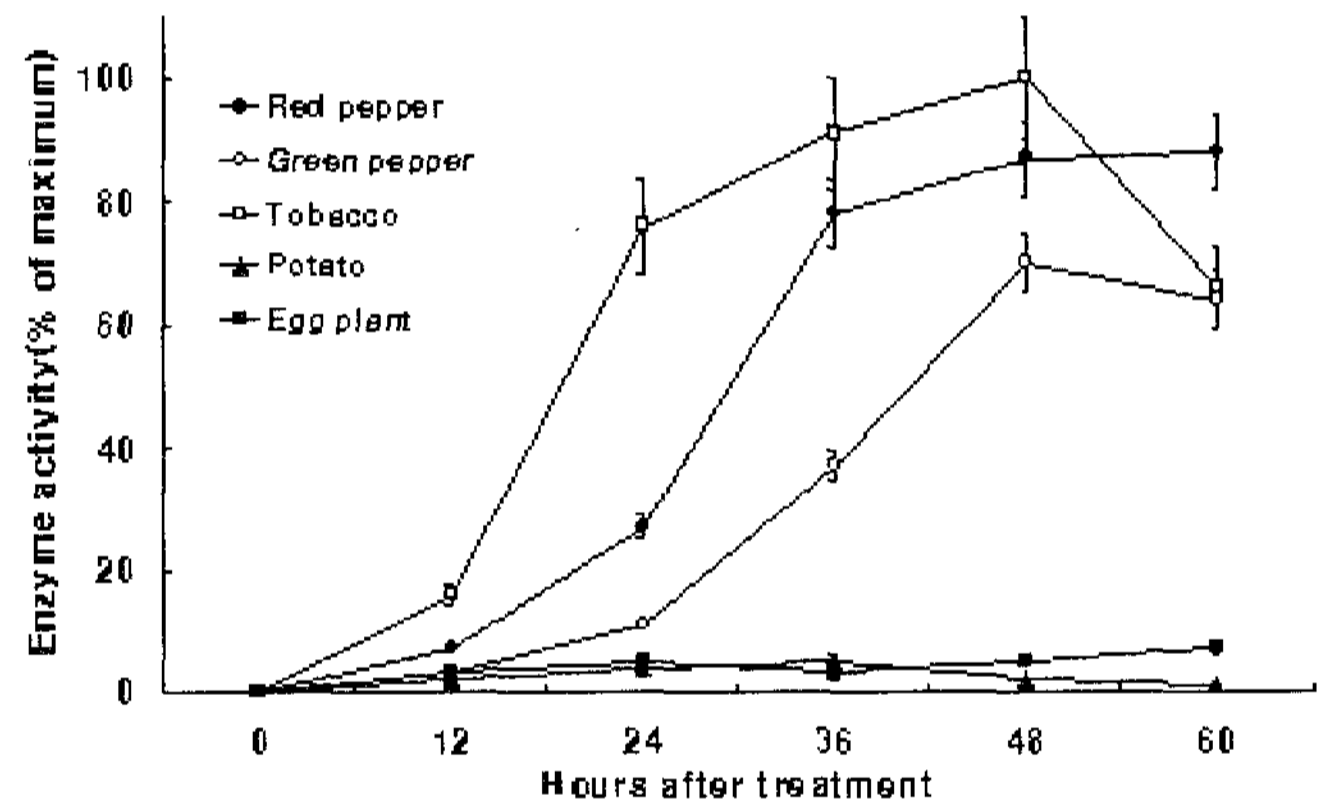


Fig. 2. Time course changes in the enzyme activity of CytP450, 5-epi-aristolochene hydroxylase, in the leaves of various *Solanaceae* plants during elicitation with cellulase $0.05\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

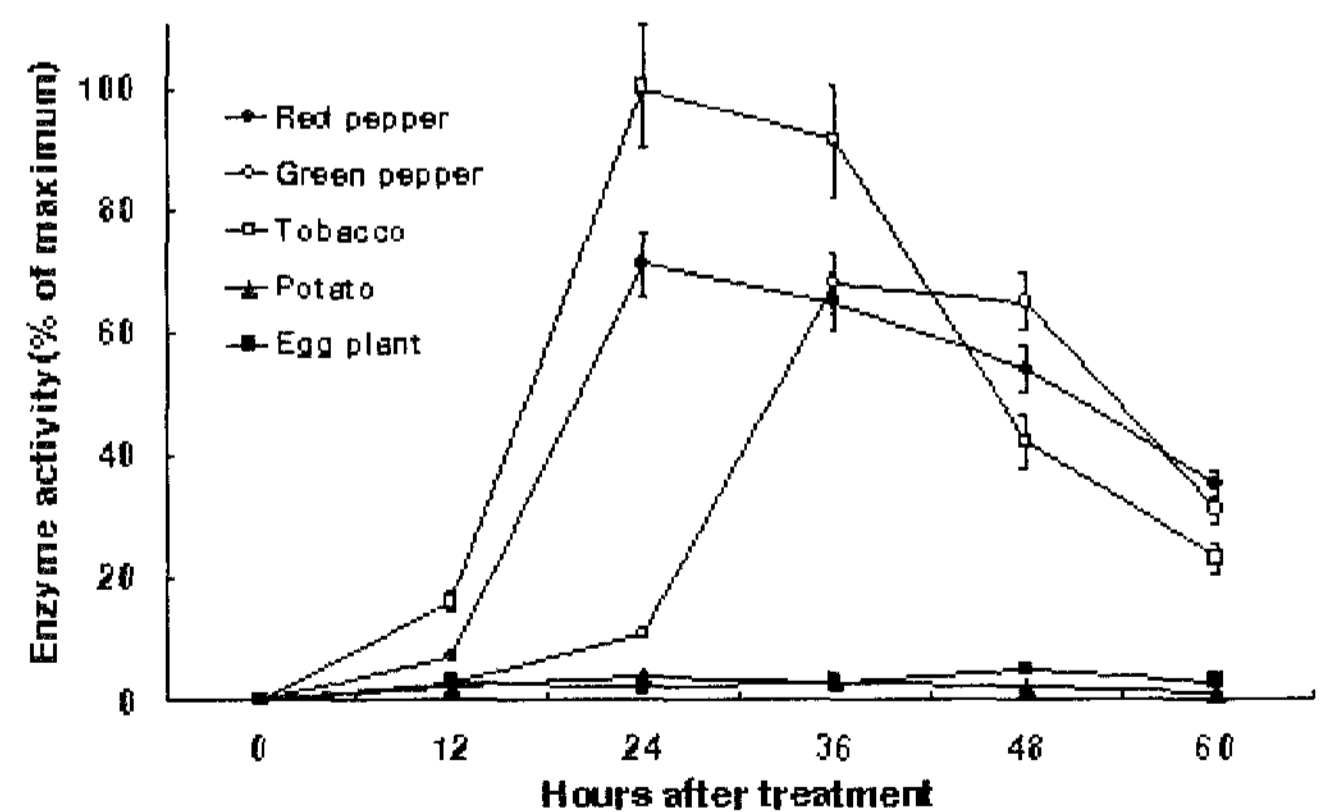


Fig. 3. Time course changes in the enzyme activity of CytP450, 5-epi-aristolochene hydroxylase, in the cultured cell of various *Solanaceae* plants during elicitation with cellulase $0.05\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Chappell(1995)은 elicitor를 처리한 담배의 배양세포에서

capsidiol의 함량을 측정하였는데, 배양세포자체에는 capsidiol이 거의 검출되지 않고 세포를 배양한 배양액에서만 검출된다고 보고 하였다. 한편 capsidiol은 식물이 특정한 환경조건에 놓이게 되면 세포내에서 생합성된 후 빠른 시간에 세포의 외부로 방출되어 독성을 발휘한다고 하였다. 본 실험에서 5-EAH의 활성이 최고에 도달한 후 급격히 활성이 감소하는 것은 배지에 축적된 capsidiol의 독성으로 식물세포가 심한 손상을 받아서 일어난 결과로 판단된다.

P450 유전자의 확인 및 발현

고추, 피망, 담배, 감자 및 가지의 게놈상에 5-*epi*-aristolochene hydroxylase(5-EAH) 역할을 하는 P450과 그 전 단계를 촉매 하는 효소인 cyclase 유전자가 존재하는지를 알아보기 위해 이들의 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였고, P450과 cyclase 유전자의 발현을 알아보기 위하여 mRNA를 이용한 RT-PCR을 실시하였다(Fig. 4). 고추, 피망, 담배 및 가지에서는 게놈상에 P450과 cyclase 유전자가 확인되었고, RT-PCR에 의한 유전자 발현도 명확히 확인되었다. 그러나 감자에서는 게놈 DNA상에 이들 두 유전자 모두가 확인되지 않았고, RT-PCR에 의한 유전자의 발현도 나타나지 않았다. 이 실험의 결과로 감자세포에는 5-EAH를 코딩하는 유전자인 P450유전자와 cyclase 유전자가 존재 하지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 앞의 실험에서 감자에서는 세포가 elicitation된 상태에서도 capsidiol이 전혀 검출되지 않았고(Table 1), P450효소의 활성이 나타나지 않았던 것(Fig. 2, 3)과 일치 하였다.

한편 가지에서는 게놈 DNA상에 cyclase와 P450 유전자가 존재하는 것은 확인되었으나, RT-PCT 결과를 보면 cyclase의 발현이 전혀 나타나지 않았다. 이는 가지세포에 존재하는 cyclase가 발현하는데 다른 가지과 식물과 다른 조건이 요구되는 것으로 판단된다.

Fig. 5는 P450유전자의 잎, 줄기, 뿌리 및 캘러스 등 식물체 기관별 발현 양상을 나타낸 것이다. 잎에서의 발현은 감자를 제외한 모든 식물체가 무처리에서는 유전자의 발현이 되지 않았고 elicitor를 처리한 시간이 경과할수록 강하게 나타났다. 줄기에서는 잎에서와 비슷한 경향이나 감자와 가지 세포에서는 elicitor처리한 경우에도 발현되지 않았다. 뿌리에서는 담배에서 P450의 발현이 비특이적 발현을 보이는 것을 제외하곤 다른 식물에서는 전혀 발현이 나타나지 않았다. 배양세포인 캘러스에서는 elicitor를 처리한 시간별로 뚜렷한 발현 양상을 보였다.

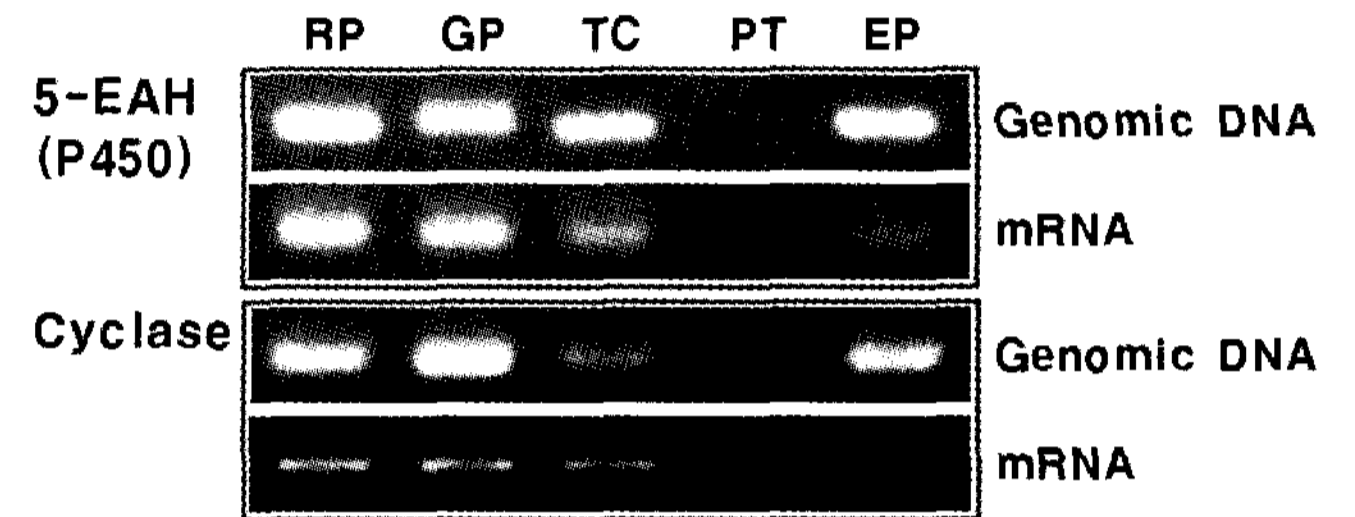


Fig. 4. Genomic DNA and mRNA of 5-*epi*-aristolochene hydroxylase (5-EAH) and cyclase involved in capsidiol biosynthesis in red pepper(RP), green pepper(GP), tobacco(TC), potato(PT), and egg plant(EP). Genomic DNA were identified by PCR and mRNA were by RT-PCR using primers of internal sequence.

이상의 결과를 종합하면 고추, 피망 및 담배세포는 capsidiol의 생합성에 관련된 두개의 유전자인 cyclase와 P450 유전자가 세포내에 뚜렷이 존재하고, elicitor의 처리에 의하여 유전자의 발현과 효소의 촉매가 개시되어 최종 phytoalexin인 capsidiol의 생합성을 유도하는 것을 알 수 있었다. 한편 가지는 두개의 유전자가 게놈상에 뚜렷이 존재하지만 P450의 발현은 타 식물체에 비하여 낮은 편이며, cyclase 유전자의 발현은 나타나지 않았다. 감자 게놈에는 본 실험에 probe로 사용된 P450 및

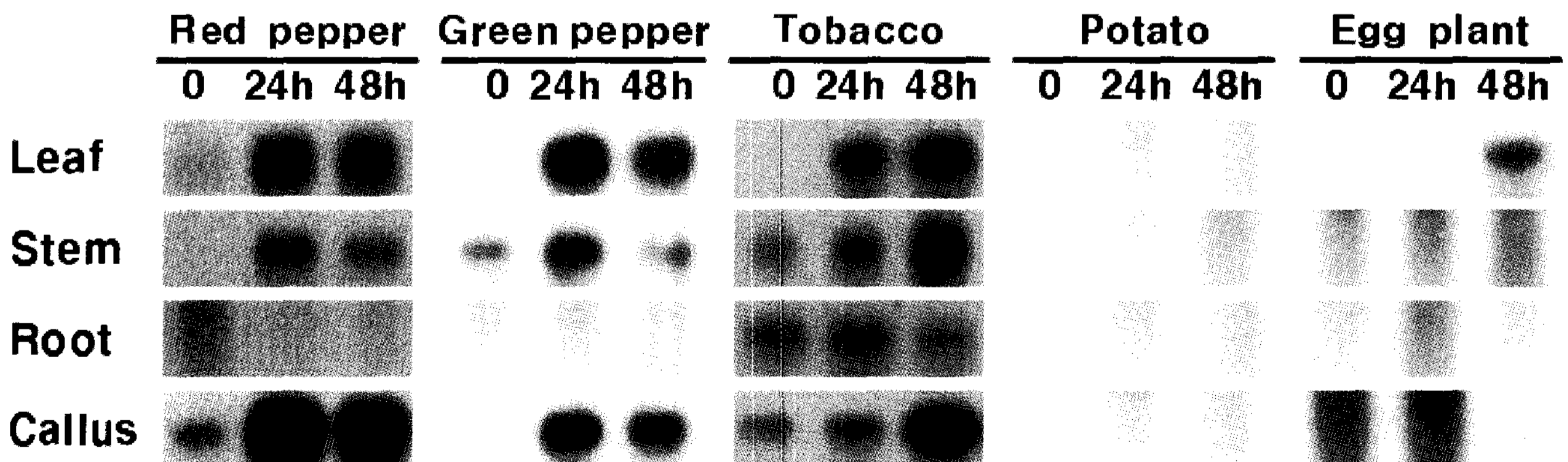


Fig. 5. Expression of CytP450, 5-*epi*-aristolochene hydroxylase, in the different organs and callus of *Solanaceae* plants.

cyclase 유전자가 존재하지 않은 것으로 나타났다.

이상의 결과는 가지과 식물에서 주로 역병균에 의해서 생성되는 capsidiol의 생합성 기작을 연구하는데 중요한 자료로 이용될 것이며, 이들 식물의 환경 저항성과 관련하여 계속적인 연구가 진행 중이다.

사 사

이 연구는 안동대학교 연구비 지원(2006)에 의해서 수행되었습니다.

적 요

다섯 종류의 가지과 식물을 대상으로 elicitor에 의해 생합성되는 capsidiol의 함량을 측정하고 생합성에 관련된 P450 효소의 활성과 관련 유전자 발현을 조사하였다. 고추, 피망 및 담배는 capsidiol의 생합성에 관련된 두개의 유전자인 cyclase와 P450 유전자가 세포내에 존재하였고, elicitor의 처리에 의하여 유전자의 발현이 유도되고 효소의 촉매가 이루어 졌다. 가지세포에는 두개의 유전자가 게놈상에 존재하지만 P450 유전자는 발현되나, cyclase 유전자의 발현은 나타나지 않았다. 감자에는 capsidiol의 생합성에 관련된 P450 및 cyclase 유전자 모두가 존재하지 않은 것으로 나타났다. 본 실험에 사용된 P450과 cyclase 유전자는 식물이 정상상태에 있을 때는 전혀 발현되지 않으나 elicitor에 의해 특이적으로 유도 되는 특징을 보였고, 식물체 조직이나 기관별로 다양한 발현 양상을 보였다.

인용문헌

Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.*

Biol. 46: 521-47.

Chappell, J. and R. Nable. 1987. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* 85: 469-473.

Donaldson, R.P. and D.G. Luster. 1991. Multiple forms of plant cytochrome P-450. *Plant Physiol.* 96: 669-674.

Doo, H.S. 2007. Trans-resveratrol content of peanut seeds depends on varieties and processing method. *Kor. J. Plant Res.* 20: 553-557.

Lee, E. 2007. Anti-inflammatory effects of *Scutellariae radix*. *Kor. J. Plant Res.* 20: 548-552.

Facchini, P.J. and J. Chappell. 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 11088-11092.

Hoshino, T., T. Yamaura, H. Imaishi, M. Chida, Y. Yoshizawa, K. Higashi, H. Ohkawa and J. Mizutani. 1995. 5-*epi*-Aristolochene 3-hydroxylase from green pepper. *Phytochemistry* 38: 609-613.

Kato, H., O. Kodama and T. Akatsuka. 1995. Characterization of an inducible P450 hydroxylase involved in the rice diterpene phytoalexin biosynthetic pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 707-712.

Kwon, S. and J. Chappell. 1998. Elicitor-inducible 5-*epi*-aristolochene hydroxylase in suspension cultures of tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) *Kor. J. Plant Tis. Cult. (in Korean)* 25: 141-146.

Kwon, S., J. Kim, D. Jung, J. Jeong, J. Hwang and S. Oh. 2003. Cloning of cytochrome P450 gene involved in the pathway of capsidiol biosynthesis in red pepper cells. *Kor. J. of Life Sci.* 23: 879-888.

Schuler, M.A. 1996. Plant cytochrome P450 monooxygenases. *Critical Rev. Plant Sci.* 15: 235-284.

(접수일 2007. 12. 27 ; 수락일 2008. 3. 25)