

ACC oxidase 발현 억제 식물체에서 폴리아민 생합성 증가에 의한 스트레스 저항성 증강

위수진 · 박기영

Enhanced tolerance through increasing polyamine contents in transgenic tobacco plants with antisense expression of ACC oxidase gene

Soo Jin Wi · Ky Young Park

Received: 14 March 2011 / Accepted: 19 March 2011
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Antisense construct of cDNA for senescence-related ACC oxidase (CAO) cDNA isolated from carnation flowers were introduced into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation. The decreasing expression of *NtACO* and the reduction of ethylene production were observed in these transgenic lines. In contrast, the *SAMDC* transcripts and spermidine content were increased. The findings that higher content of spermidine in the ethylene suppressed transgenic plants compared with wild-type should be directly resulted in the enhancement of *SAMDC* activity followed by the increased accumulation of *SAMDC* transcript. To investigate the pathogenic response in these transgenic plants, wild-type and transgenic plants were inoculated with *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae*. Transgenic plants suppressing ethylene production showed the increased resistance against fungal pathogen, comparing with wild-type plant. PR-protein genes expression in *CAO-AS-2* and *CAO-AS-4* were also higher at the normal growth condition and pathogenic response than in wild-type plants. The results of higher spermidine content and *SAMDC* activity in transgenic plants, *CAO-AS-2* and *CAO-AS-4*, support the possibility that an increase in spermidine content might induce the higher transcripts of PR-protein genes. This results agreed with the phenomena that spermidine promoted the expression of *PR1a* and a *SAMDC* inhibitor, *MGBG*, decreased the

expression of *PR1a* in leaf discs. These results suggest that the resistance against fungal pathogen in transgenic tobacco impaired in ethylene production might be caused by increasing in polyamine, especially spermidine, biosynthesis.

서론

에틸렌은 기체 형태의 식물 호르몬으로서 삼중 반응을 비롯하여 과일의 성숙, 잎과 꽃의 노화, 종자의 발아, 탈리, 기관의 형태적인 반응 등 다양한 생리적 과정에 관여하고 있다 (Chen et al. 2005). 고등식물의 모든 조직은 에틸렌을 생성할 수 있지만, 보통 그 생성량은 매우 낮은 수준으로 유지된다. 그러나, 에틸렌 생성은 식물의 발생과 분화 단계상의 여러 요인 및 다양한 환경 요인에 의해 증가된다 (Bleecker 2000). 종자의 발아, 식물의 노화, 그리고 과일의 성숙 등 식물의 생장과정 뿐만 아니라 식물이 상처를 받거나 병원균의 공격을 받았을 때, 그리고 산소의 부족, 가뭄, 냉해 등 다양한 스트레스에 의해서도 에틸렌 합성이 유도된다. 따라서 에틸렌은 과일 성숙 호르몬 또는 스트레스 호르몬이라고 불린다 (Chung et al. 2008). 에틸렌 생합성의 전구물질로 *S*-adenosylmethionine (SAM) 과 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)가 있는데, SAM은 에틸렌 생합성의 첫 단계로 볼 수 있는 ACC synthase (ACS)에 의해 ACC로 전환되며 두 번째 단계인 ACC oxidase (ACO)에 의해 최종적으로 에틸렌이 합성된다. 에틸렌 합성의 rate-limiting step은 ACS에 의해 SAM이 ACC로 전환되는 단계가 중요하며 ACO의 과정도 식물이 처한 환경적 스트레스 상황에 따라 주요한 단계로 작용하는 경우도 많이 보고되고 있다 (Tassoni et al. 2006).

S. J. Wi · K. Y. Park (✉)
순천대학교 생명산업과학대학 생물학과
Department of Biology, Suncheon National University,
Suncheon, Chonnam 540-742, Korea)
e-mail: plpm@suncheon.ac.kr

SAM은 ACS에 의하여 에틸렌의 중간산물인 ACC로 전환되지만 동시에 폴리아민 합성을 위한 amino propyl group을 제공하는 역할을 하므로 에틸렌과 폴리아민은 중간산물이 동일하지만 생리적 작용이 서로 상반된다. 실제 식물체 내에서 SAM의 작용은 매우 다양하여 세포내 SAM의 함량은 결정적 단계가 아니지만, SAM이라는 공통의 전구체로부터 폴리아민으로의 합성 정도와 에틸렌의 합성 정도는 서로 경쟁적 관계에 있는 것으로 여겨진다 (Wi and Park 2002).

폴리아민은 분자량이 비교적 적은 다가 양이온으로서 diamine인 putrescine, triamine인 spermidine, tetraamine인 spermine으로 식물, 동물, 미생물 등 모든 생물의 세포 내에서 존재하는 물질로서 물질대사가 활발하게 일어나고 성장 속도가 빠른 시기에 생합성 정도가 높다. 그러나 노화가 시작되면서 생합성량은 상대적으로 줄어들어 폴리아민과 같은 전구물질인 SAM으로부터 생합성되는 에틸렌이 세포 내 함량이 급격하게 증가하게 된다 (Kaur-Sawhney et al. 2003). 이러한 결과는 토마토 열매 발달에서도 나타나는데 과일의 성숙에 따라 에틸렌 발생이 증가하고 폴리아민 함량은 감소하였다 (Tassoni et al. 2006). 특히, spermidine과 spermine 합성의 주요 효소인 SAM decarboxylase (SAMDC)는 세포내 단백질 중에서 그 양이 무척 적은 편이며 단백질의 반감기가 상당히 짧은 편이다. 따라서 SAMDC는 여러 생리적인 자극이나 환경적인 자극에 의해서 민감하게 조절되며 폴리아민 생합성의 rate-limiting step으로 알려져 있다 (Hu et al. 2005). 식물체에서 SAMDC의 활성은 성장상태에 따라 변하고 감자 괴경의 출아, 당근세포의 배 발생, 꽃의 발달 시 폴리아민 함량을 조절하는 과정 등에서 중요한 역할을 한다 (Kim et al. 2004). Chick-pea 종자에 SAMDC 활성의 억제제인 methylglyoxal-bis guanylhydrazone (MGBG)나 cyclohexylamine을 처리하면 ACS와 ACO 활성이 증가하여 에틸렌 발생이 급격히 증가한다는 보고 (Gallardo et al. 1995)가 있었는데 이것은 두 물질의 생합성이 서로 경쟁관계에 있음을 보여준다. 담배 배양세포에 ACS의 억제물질인 aminooxyacetic acid (AOA)를 처리하면 ACC와 에틸렌의 생성이 감소한 반면 특히 spermidine의 생성량이 크게 증가하였다 (Pandey et al. 2000). 또한 카네이션 (*Dianthus caryophyllus* L. cs. White sim)에서 분리한 SAMDC 유전자인 CSDC9의 promoter에는 salicylic acid, auxin, 생물적 그리고 비생물적 스트레스에 반응하는 elements (TGACG)와 에틸렌에 반응하는 element (ATTTCAAA) 등 다양한 potential motif 들이 포함되어 있었다 (Kim et al. 2004). 이러한 결과는 에틸렌과 폴리아민의 합성 사이에 상호 조절관계가 있음을 시사해 준다.

폴리아민에 의한 항노화 기능의 연구를 살펴보면 귀리 잎을 절단하여 암소에 두었다가 폴리아민을 처리하면 엽록소, RNase, 그리고 protease 활성이 억제되어 노화가 지연되었다 (Tassoni et al. 2006). 또한 폴리아민은 비생물학

적 스트레스에 대한 반응에 관련되어 있으며 특히, K^+ 결핍, 삼투압 스트레스, 건조, 그리고 염분 스트레스 등에 대해 폴리아민 함량이 몇 배 증가하여 작용한다 (Bouchereau et al. 1999). 그리고 SAMDC 유전자를 과다발현시킨 담배 식물체에 다양한 비생물적 스트레스를 처리했을 때 저항성이 증가하였을 뿐만 아니라 항산화효소 유전자들의 발현이 크게 증가하였고 (Wi et al. 2006), 생물학적 스트레스인 병원균 감염에 대해서도 반응하여 폴리아민 함량이 변하였다 (Walters 2000). 따라서 본 연구에서는 에틸렌 생합성 효소인 ACO 유전자를 antisense 방향으로 도입하여 에틸렌의 생성이 저하된 형질전환 담배 식물체를 이용하여 스트레스 저항성을 조사하였으며 이 과정에서 일어나는 작용기작으로서 폴리아민 생합성과의 경쟁관계를 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 스트레스 처리 조건

담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin 38) 식물체와 카네이션 꽃에서 분리된 ACO cDNA (CAO)가 antisense 방향으로 도입된 형질전환 식물체 (CAO-AS-2, CAO-AS-3, CAO-AS-4)를 실험재료로 사용하였다. 형질전환을 위한 식물 발현벡터인 pBI121에 BamHI과 HindIII를 처리하여 절단하고, 그 위치에 1.25 kbp의 ACO cDNA (pSR120, GenBank Accession No. M62380)를 삽입하여 재조합 DNA를 제작하였다 (Wi and Park 2002). Antisense CAO 유전자는 35S promoter의 지배하에 발현되며, 선발 marker 유전자로는 kanamycin 저항성 유전자 (NPT II)를 포함하고 있다. 식물체는 광량 $100 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16시간 광조건과 8시간 암조건, 그리고 온도는 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 설정된 배양실에서 재배하였다. T2 종자는 70% ethanol에서 5분간 침지한 후 5% sodium hypochloride에 5분 동안 처리하였으며, 멸균수로 5~6회 세척하였다. 살균된 종자는 kanamycin (100 $\mu\text{g/mL}$)이 첨가된 1/2 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종하여 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 growth chamber에서 2~3주 동안 키운 후 토양에 옮겨 실험에 사용하였다. H_2O_2 처리는 20 mM의 H_2O_2 가 포함된 20 mM의 H^+ 2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid (MES) buffer (pH 6.1)에 잎 절편으로 처리하였고 생물적 스트레스 처리에는 배양병에서 4주간 성장한 식물 조직을 병원균 감염에 사용하였고, 4주 동안 배양한 담배 역병균인 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*를 사용하였다.

Total RNA 분리, Northern blot 분석, semiquantitative RT-PCR

Total RNA 분리 및 Northern blot 분석은 Wi 와 Park (2002)

의 방법을 이용하였고 분리된 total RNA는 Northern blot 분석과 RT-PCR 분석에 사용하였다. Pathogenesis-related (PR) protein 유전자들의 발현분석은 담배의 PR1a (GenBank Accession No. X06361), PR4b (GenBank Accession No. X60282), OLP (GenBank Accession No. X95308), SAR8.2 (GenBank Accession No. M97361)이고 ACO 유전자의 발현 분석은 담배의 ACO (GenBank Accession No. AB012857)이며 각각의 cDNA의 절편을 ^{32}P 로 labelling하여 probe로 사용하였다. RT-PCR은 total RNA의 1 μg 을 reverse transcriptase (High Fidelity RNA PCR Kit, Takara Bio Inc.)를 사용하여 first strand cDNA를 합성한 후 이 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 이때 사용한 유전자의 특이적인 primer로서 담배 actin (*Tactin*)은 5'-ATTGTCCTGGATTCTGGTGATGGTGTT-3'과 5'-AGCCAAAATAGAACCTCCAATCCAAAC-3'이고 담배 SAMDC (*TSAMDC*)는 5'-GATTCTTATGTCCTCTCCGAGTCG-3'과 5'-AGCATAGCTAAAGCCATCTTCCGG-3'이다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 60°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 과정을 20 cycles로 하였으며 1% (w/v) agarose gel 상에서 증폭된 밴드를 확인하였다.

In vivo ACC oxidase 활성 및 에틸렌 생성량 측정

ACC oxidase 활성을 측정하기 위해 1 mM ACC 용액에 야생형과 형질전환 식물체의 잎 전체 혹은 잎 절편을 20 mL 용기에 넣어 밀봉하여 1시간 동안 에틸렌을 포집하였다. 그런 후 1 mL 용 주사기를 이용하여 기체를 채취하여 gas chromatography (Hewlett Packard 5890 Series II, Flame Ionization Detector, Alumina Column 250°C, USA)로 측정하였으며 조직의 생중량과 용기의 부피를 이용하여 에틸렌 생성량을 계산하였고 $\text{nL g}^{-1} \text{h}^{-1}$ 로 나타내었다.

SAMDC 효소 활성 측정

SAMDC 효소 활성은 Wi 와 Park (2002)의 방법을 기초로 하여 실험을 수행하였다. 0.2 g의 잎조직을 SAMDC extraction buffer [25 mM Tris-Cl(pH 7.6), 1 mM EDTA, 15 mM β -mercaptoethanol]로 추출하여 얻은 상정액을 효소원으로 사용하였다. 기질로는 4.7 kBq *S*-adenosyl-L-carboxyl- ^{14}C -methionine ($2.14 \text{ TBq mol}^{-1}$)을 첨가하여 반응시켰으며 liquid scintillation counter (Hewlett Packard, USA)를 이용하여 방사능을 측정하였다. SAMDC 효소 활성의 단위는 1 nmole $^{14}\text{CO}_2 \text{ h}^{-1}$ 을 1 unit로 하였다.

폴리아민 함량 분석

폴리아민 함량은 Wi 와 Park (2002)의 방법으로 수행하였

다. 스트레스를 처리하거나 처리하지 않은 조직에서 얻은 추출물을 24시간 동안 dansylation 시킨 후 benzene으로 그 유도체를 추출하여 thin layer chromatography에서 분리한 후 spectrofluorophotometer (RF-1501; Shimadzu, Japan, excitation 350 nm, emission 495 nm)를 이용하여 형광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Antisense CAO가 도입된 형질전환 담배 식물체의 에틸렌 생합성 억제 확인

카네이션의 Antisense CAO가 heterologous하게 도입된 형질전환 담배 식물체에서 endogenous한 담배 ACO 유전자 (*NtACO*) 발현 변화를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 수행하였다. CAO-AS-3에서는 야생형보다 *NtACO* 발현 양이 다소 증가하였으나 CAO-AS-2와 CAO-AS-4에서는 현저하게 감소하였다 (Fig. 1A). 이러한 결과는 antisense CAO 도입에 의하여 CAO-AS-2와 CAO-AS-4에서는 endogenous *NtACO* 발현이 억제되었음을 의미한다. 또한 형질전환

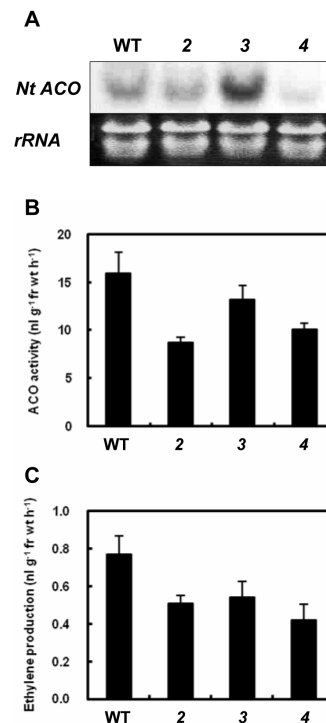


Fig. 1 Endogenous *NtACO* transcripts (A), ACO activity (B), and ethylene production (C) in wild-type and transgenic tobacco plants. (A) The transcripts were detected by Northern blot hybridization with probe of tobacco cDNA (*NtACO*). Each lane was loaded with 20 μg of total RNA. Ethidium bromide staining tested equal loading. WT, wild type; 2, *CAO-AS-2*; 3, *CAO-AS-3*; 4, *CAO-AS-4*

식물체에서의 *NtACO* mRNA의 발현 감소는 ACO 활성에도 영향을 주었는데 *CAO-AS-2*는 야생형 식물체보다 약 45%, *CAO-AS-4*는 약 36% 감소하였으나 *CAO-AS-3*은 낮은 감소비율을 나타냈다 (Fig. 1B). 특히, antisense *CAO* 형질 전환 식물체 중에서 *CAO-AS-4*는 에틸렌 생성량이 야생형에 비해 약 46%가 감소되었다 (Fig. 1C). 이러한 결과를 통해 antisense *CAO*가 ACO 효소 합성을 감소시켜 에틸렌 생합성의 감소를 유도한 것을 확인하였고, 이들 형질 전환 식물체를 이용하여 향후 실험을 수행하였다.

폴리아민과 에틸렌 생합성의 경쟁 관계 확인

폴리아민 생합성 효소인 *SAMDC*의 mRNA level이 야생형 식물체보다 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서 높게 발현되었으며 *SAMDC* 효소 활성 또한 야생형 식물체가 0.15 nmol mg⁻¹ h⁻¹ 인데 비해 각각 2.4배 그리고 2배가 증가하였다 (Fig. 2A). Antisense *ACO* 유전자 도입으로 *NtACO* transcript 양의 억제가 일어나지 않았던 *CAO-AS-3*에서는 *SAMDC* 효소 활성은 1.6배 정도 증가하였지만 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서는 *SAMDC*의 발현양이 2배 이상 크게 증가하였다 (Fig. 2B). 따라서 SAM에서 에틸렌으로 전환되는 과정이 억제됨에 따라 SAM에서 폴리아민으로 전환되는 합

성과정이 증가하여 SAM에 대한 에틸렌과 폴리아민 생합성 사이에서는 경쟁적 관계가 존재하는 것으로 여겨졌다.

또한 폴리아민 함량을 측정한 결과 *CAO* 발현억제 형질 전환 식물체 중에서 특히, spermidine 함량의 경우 야생형 식물체가 11.9 nmol g⁻¹ FW 인데 비해 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서는 각각 2.2배 그리고 2.1배로 증가하였고 *CAO-AS-3*에서도 1.6배 증가하였다. Putrescine 함량은 야생형 식물체에 비해 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서는 약 23~27% 감소하였지만, *CAO-AS-3*은 유사하게 나타났다. 이는 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서 putrescine으로부터 spermidine로의 전환이 증가함으로써 상대적으로 putrescine의 함량이 약간 감소하였던 것으로 여겨진다. 그러나 spermidine의 함량이 증가한 것에 비해 spermine 함량은 야생형 식물체와 형질 전환 식물체 사이에서 큰 변화가 없었다 (Fig. 2C). *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서 spermidine 함량 증가와 *NtACO* 발현 및 에틸렌 생합성의 감소가 서로 역상관계에 있는 것으로 나타났으며, 이러한 결과를 통해 에틸렌의 생합성 억제가 폴리아민 생합성 pathway의 변화를 유도하여 spermidine의 생합성을 증가시키는 것으로 보여지며, 이는 공통의 전구물질인 SAM에 대한 경쟁적 관계가 존재함으로 여겨진다 (Pandey et al. 2000). 또한 이 외에도 에틸렌 생합성 억제가 폴리아민 생합성에 영향을 초래하였다면 에틸렌이 직접적으로 폴리아민 생합성에 관여하는 효소의 활성이나 유전자 발현을 억제할 가능성도 배제할 수 없다.

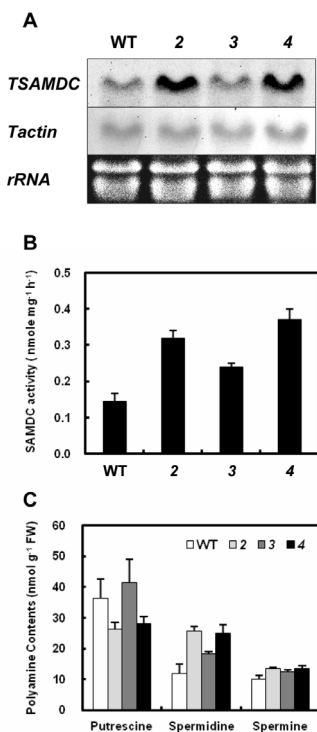


Fig. 2 Expression of endogenous *SAMDC* gene (A), its activity (B), and free polyamine contents (C) in the leaves of T2 transgenic progeny and wild-type plants. The 10th leaves of each plant were harvested and analyzed. WT, wild type; 2, *CAO-AS-2*; 3, *CAO-AS-3*; 4, *CAO-AS-4*

형질전환식물체에서 산화적 스트레스에 의한 *PR1a* 발현 증가

에틸렌은 다른 식물생장조절물질의 합성이나 신호 전달 과정에 관여하고 있을 뿐만 아니라 병원균 감염 등의 스트레스 반응에서 일어나는 괴사 발달에도 관여하고 있다 (O'Donnell et al. 2001). 특히, hypersensitive response (HR)의 특징 중 하나는 감염 부위에 있는 식물 세포들의 세포 사멸이 빠르게 진행되는 것으로 이 과정에서 활성산소군 (reactive oxygen species, ROS)의 생성이 수반된다. Hydrogen peroxide (H₂O₂)를 비롯하여 superoxide, hydroxyl radicals 등의 ROS는 스트레스에 대한 방어반응에 공통적으로 작용하는 요소로서 식물에서 저항 반응을 유도하는데 필요한 신호 일 뿐만 아니라 ROS의 독성은 세포의 사멸을 초래하는 물질로도 작용한다 (Moeder et al. 2002). 특히 매우 높은 농도의 H₂O₂ (150 ~ 1000 mM)에 의해서도 유도되었다 (Summermatter et al. 1995)는 보고가 있다. 따라서 병원균 감염시 HR 반응이 일어나면서 식물의 병저항성이 유도되는 과정에서 발현이 증가하는 *PR1a* 유전자의 변화가 산화적 스트레스가 주어진 식물체에서 어떻게 일어나는지를 우선 조사하였다. 산화적 스트레스는 20 mM H₂O₂를 사용하여 유도하였고 야생형 담배 식물체의 잎 절편에서는 산화적 스트레스가 처리된 이후 30분부터 발현이

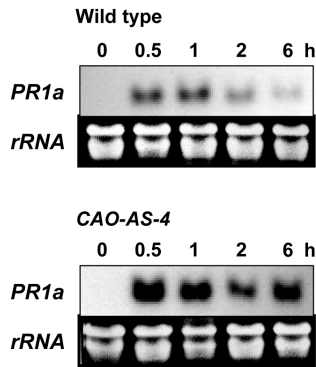


Fig. 3 Effect of H_2O_2 on PR1a expression in wild-type and transgenic tobaccos (*CAO-AS-4*) leaves. Total RNA was extracted at the times indicated from leaf discs treated with 20 mM H_2O_2 for 0.5, 1, 2, and 6 h, and subjected to Northern blot analysis with the tobacco *PR1a* probe. Ethidium bromide staining was included to verify equal RNA loading

증가하기 시작하여 1시간에 최대의 발현양을 나타내었다.

한편 *CAO-AS-4*의 잎 절편에 20 mM H_2O_2 를 처리한 경우 30분부터 *PR1a*의 발현이 최대치로 유도되었다가 이후 2시간에는 크게 감소하였지만 6시간이 지난 후에는 또 다시 높은 양의 transcript가 유도되었다 (Fig. 3). 특히 야생형 식물체보다 *CAO-AS-4*에서 *PR1a*의 발현이 처리하는 시간동안 내내 더 높게 증가하였다. PR (pathogenesis-related) 단백질의 유전자는 TMV에 감염되었을 때 spermine에 의해 그 발현이 증가하였다는 보고가 있는 것으로 보아 (Yamakawa et al. 1998), *CAO-AS-4*에서 폴리아민 특히 spermidine의 양이 2배 이상 증가함으로써 *PR1a*의 유전자 발현이 크게 증가한 것으로 여겨진다. 특히 *PR1a* 유전자의 발현이 산화적 스트레스 처리 후 30분과 6시간에 걸쳐 두 차례 증가되는 양상을 나타내는 것은 산화적 스트레스 처리 후 biphasic 양상을 나타낸다는 기존의 우리의 연구 결과와도 일치하였다 (Wi et al. 2010).

따라서 일반적으로 폴리아민은 다가 양이온이므로 ROS에 의한 세포손상을 억제하여 노화 등을 지연시킨다는 기존의 연구보고로 볼 때 (Lee and Park 1991) *CAO-AS-4*에서 세포 내 폴리아민이 증가하여, 에틸렌이 억제됨으로써 산화적 스트레스에 대해 *PR1a*의 유전자의 발현이 증가한 것으로 여겨진다.

형질전환 식물체에서 담배 역병균에 대한 저항성 및 PR 단백질 발현 증가

폴리아민의 함량 증가와 에틸렌 생성이 담배 역병균 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)에 대한 저항성과 어떤 관계가 있는지를 알아보고자 형질전환식물체에 병원균을 감염시켜 야생형 식물체와의 차이를 조사하였다. 병원균에 감염된지 3일째에는 병의 징후가 거의 나타나지 않았

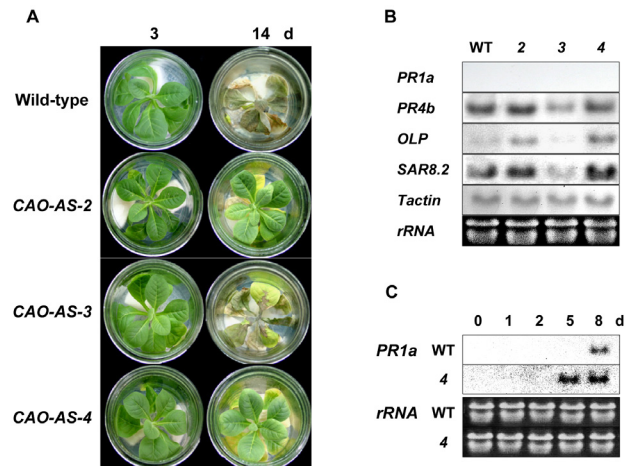


Fig. 4 Phenotype and expression PR protein genes in wild-type and antisense transgenic plants with *CAO* cDNA. (A) Phenotype after inoculation pathogen, (B) Northern blots for *PR-4b*, *OLP*, and *SAR8.2* mRNA levels in *CAO-AS-2*, -3, -4, (C) Determination of *PR1a* mRNA levels during fungal growth in wild-type plant and *CAO-AS-4*. At 3 and 14 days after inoculation, plants were examined for disease symptoms. Disease responses to the virulent fungal pathogen, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. WT, wild type; 2, *CAO-AS-2*; 3, *CAO-AS-3*; 4, *CAO-AS-4*

지만 14일째에 야생형 식물체에서는 줄기에서부터 색깔이 갈변되어 병원균이 급속도로 퍼져 식물체가 결국 고사하였으나 에틸렌 합성이 현저하게 억제된 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서는 상당히 건강한 상태를 보였다. 그리고 에틸렌 합성이 다소 억제되었던 *CAO-AS-3*은 야생형 식물체보다 병징이 다소 약하기는 하였지만 상당히 심하게 발달된 병징을 나타냈다 (Fig. 4A). 이는 에틸렌 생합성 정도가 감소하면서 폴리아민의 생합성이 증가한 형질전환 식물체에서 병원균 감염 징후가 감소되는 것으로 이는 에틸렌이 단독으로 병원균에 의한 괴사 발달을 억제하였을 가능성도 있으며 (O'Donnell et al. 2001), 또 다른 한편으로는 에틸렌의 생성 감소가 일으킨 폴리아민 생성량 증가로 인하여 감염 징후가 약화된 것으로도 생각할 수 있다.

다음으로는 병원균의 감염에 의한 저항성 유도과정에 발현이 증가하는 것으로 알려진 PR 단백질의 유전자 (Edreva 2005) 중 basal 단계에서 *PR4b*, *OLP*, 그리고 *SAR8.2*의 transcript 발현양의 변화를 *CAO-AS-2*, *CAO-AS-4*과 야생형 식물체에서 조사하였다. 형질전환 식물체에서는 야생형 식물체보다 chitinase type인 *PR4b*와 systemic acquired resistance와 관련 있는 *SAR8.2*의 transcript의 양이 크게 증가하였으며 osmotic stress에 대한 반응에서 크게 유도되는 *OLP* (osmotin-like protein)의 유전자 발현은 *CAO-AS-4*에서만 증가하였다 (Fig. 4B). 그리고 담배 역병균 감염에 의해 유도되는 *PR1a*의 발현은 *CAO-AS-4*에서 감염 후 5일부터 증가하기 시작하여 8일까지 높은 수준을 나타내었으나 야생

형 식물체에서는 감염 후 8일에 적은 양의 *PR1a*의 mRNA가 유도되었는데 그 발현양은 형질전환식물체에 비해 현저하게 낮았다 (Fig. 4C).

따라서 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4*에서 나타나는 병원균에 대한 저항성은 에틸렌 합성이 감소되면서 동시에 폴리아민이 증가함으로써 PR 유전자의 발현이 증가하고 이로 인한 단백질 유도 증가로 인해 나타난 현상으로 여겨진다. 일반적으로 병원균이 감염되면 에틸렌의 생성이 증가하고 그 결과 PR 단백질이 유도되는 과정이 알려져 있지만 (Diaz et al. 2002), *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4* 식물체에서는 에틸렌 생성이 감소되었으므로 PR 단백질의 발현이 낮아질 것으로 예상되었지만 오히려 PR 단백질의 유전자 발현이 증가함으로써 예상과는 다른 현상이 나타났다. 이러한 현상이 나타난 이유로는 첫째로는 *CAO-AS-2*와 *CAO-AS-4* 식물체에서 병저항성이 유도될 때 생합성이 증가하는 물질인 폴리아민 특히 spermidine의 양이 증가한 과정이 작용한 것으로 여겨진다. 이는 병원균 감염 이후 PR 단백질이 유도될 때 특히 spermidine 함량이 증가한 Yamakawa 등 (1998)의 연구에서도 유사한 효과를 볼 수 있었다. 그러나 한편으로는 에틸렌이 과다하게 증가하면 ROS의 생성이 과다하게 증가하여 오히려 세포내 redox state의 변화로 PR 단백질의 발현이 억제될 가능성도 예상해 볼 수 있다. 실제 세포내 redox state는 어느 수준의 threshold 수준이 존재하는데 이 보다 낮은 상태에서는 ROS가 저항성을 유도하는데 사용되지만 (Dat et al. 2003), 오히려 높은 산화적 수준에서는 단백질의 3차 구조에서 분자간 혹은 분자내 이황화다리의 변화를 일으켜 PR 단백질 등의 발현 수준을 저하시켰을 가능성도 배제할 수 없을 것이다.

폴리아민에 의한 *PR1a* 발현 증가

Antisense *CAO* 형질전환 식물체에서의 에틸렌 합성 억제 효과는 폴리아민 중에서도 spermidine 합성과정과 밀접하게 연결되어 있을 가능성을 알아보려고 추가 실험을 수행하였다. 특히, 식물체가 방어하는 과정에서 2차 신호전달물질로 작용하는 H₂O₂가 (Orozco-Cardenas et al. 2001) spermidine과 spermine 합성의 주요 효소인 SAMDC의 활성에 영향을 줄 가능성 있다고 보고하였다. 본 연구에서 에틸렌 합성이 억제된 antisense *CAO* 형질전환 식물체들은 SAMDC 효소 활성이 증가하였고 폴리아민 중에서도 특히 spermidine 함량이 증가하였고 (Fig. 2), H₂O₂에 의해 *PR1a* 발현이 유도되었다 (Fig. 3). 이 과정에 폴리아민이 관여할 가능성을 확인하기 위하여 H₂O₂를 처리한 후 SAMDC 효소 활성을 조사하였다. 20 mM H₂O₂를 처리한 직후 2 ~ 3시간까지 SAMDC 효소활성이 현저하게 증가하여 최대치를 이루다가 이후 점차 감소하였다 (Fig. 5A).

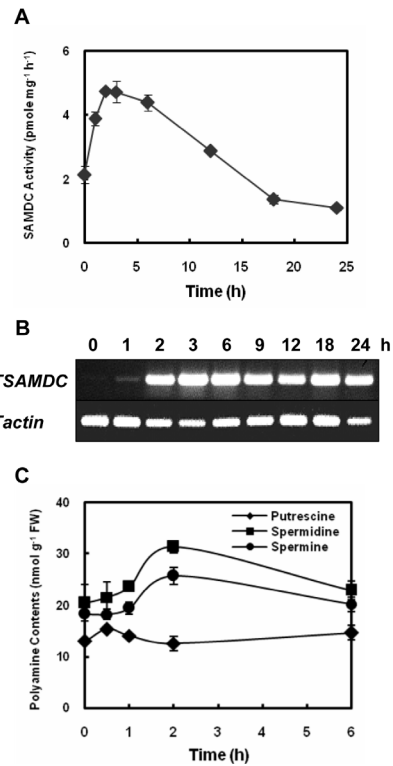


Fig. 5 Change of SAMDC activity and gene expression after the treatment with H₂O₂ in wild-type tobacco plants. (A) Change in levels of SAMDC activity, (B) Change in levels of SAMDC mRNA, (C) Free polyamine contents after oxidative stress. Tobacco leaf discs were treated for 0.5, 1, 2, and 6 h with 20 mM H₂O₂. The tenth leaf of each 7-week-old tobacco plant was harvested for RNA extraction

SAMDC 유전자 발현 또한 H₂O₂ 처리 후 높게 증가하여 6시간 이후에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5B). 또한 이 과정에서 일어나는 폴리아민의 세포내 함량은 putrescine은 H₂O₂ 처리에 대해 큰 변화가 없는 반면 spermidine과 spermine은 처리 직후 점점 증가하여 2시간에 높은 값을 보였으며, 6시간에는 거의 basal 수준으로 낮아졌으며, 특히 spermidine 함량이 spermine보다 더 높게 나타났다 (Fig. 5C).

SAMDC의 억제제인 MGBG를 H₂O₂와 함께 처리한 경우 H₂O₂ 처리구보다 *PR1a* 발현이 크게 억제되었는데 이는 MGBG에 의한 SAMDC 활성의 감소가 spermidine 함량을 저하시켜서 H₂O₂ 의한 *PR1a* 발현을 억제하였기 때문인 것으로 생각된다 (Fig. 6). 따라서 폴리아민이 free radical scavenger (Kaur-Sawhney et al. 2003)로 작용하거나 혹은 다른 어떤 기작으로 PR 단백질의 발현을 증가시켜 병원균 (Yamakawa et al. 1998)이나 스트레스 (Velikova et al. 2000)에 대한 감염 정도를 완화시켜 다양한 저항성을 유도하는 것으로 생각된다. SAMDC 유전자를 과다 발현시킨 *Sl6-S-4*는 다양한 비생물학적 스트레스에 대하여 야생형 식물체보다 더 높은 저항성을 보인다는 것을 이미 보

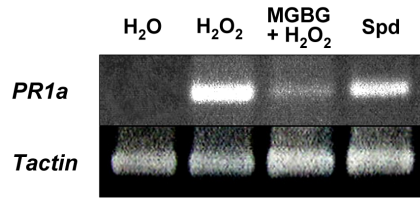


Fig. 6 Effects of spermidine on the expression of *PR1a* in wild-type plants. Leaf discs were for 24 h with various compounds, followed by H_2O_2 (20 mM), MGBG (SAMDC inhibitor, 1 mM), and spd (spermidine, 150 μ M)

고한 바 있다 (Wi et al. 2006). 따라서 식물체에서 생물적 스트레스나 비생물적 스트레스가 처리되었을 때 폴리아민은 에틸렌과의 상호작용 혹은 단독으로 PR 단백질의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스나 병원균 감염 등에 대해 높은 저항성을 유도하는 기작이 존재할 것으로 예상된다.

적 요

에틸렌 생합성 효소인 ACC oxidase 유전자인 *CAO* cDNA가 antisense 방향으로 도입된 형질전환 담배 식물체는 endogenous한 *NACO*의 발현 및 에틸렌 생합성이 모두 억제되었다. 또한 폴리아민 생합성 효소인 SAMDC의 유전자 발현 및 효소 활성이 증가하였고 spermidine 함량이 증가하였다. 이러한 결과는 에틸렌 생합성의 감소로 인하여 세포 내 폴리아민 함량의 변화가 유도되는 경쟁적 관계로 spermidine이 증가하였고 이것은 SAMDC의 발현 및 활성 증가를 유도하였다고 여겨진다. 또한 이들 형질전환 식물체는 담배 역병균에 대한 저항 효과 뿐만 아니라 PR 단백질의 유전자들의 발현양이 증가하였는데 이는 에틸렌 감소에 유도되는 폴리아민 중에서도 spermidine의 증가가 PR 단백질의 유전자들의 발현을 촉진시키고 그 결과 병원균 감염에 대한 저항성을 유도하는 기작이 작동한 것으로 여겨진다. Spermidine을 합성하는데 중요하게 작용하는 SAMDC의 활성을 억제하는 MGBG를 처리한 경우에는 *PR1a* 발현이 억제된 경우에서 이 기작의 가능성을 확인하였다. 결론적으로 병원균 감염에 대한 과정에서 spermidine의 생합성이 증가하게 되면 PR 단백질 등 스트레스 저항성 관련 단백질들이 유도되어 스트레스 저항성을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 중견연구지원사업 (R01-2007-000-11791-0)의 지원을 받아 수행하였다.

인용문헌

- Bleecker (2000) A gaseous signal molecule in plants *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:1-18
- Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 140:103-125
- Chen YF, Etheridge N, Schaller GE (2005) Ethylene signal transduction. *Ann Bot* 95:901-915
- Chung KM, Igari K, Uchida N, Tasaka M (2008) New perspectives on plant defense responses through modulation of Developmental Pathways. *Mol Cells* 26:107-112
- Dat JF, Pellinen R, Beekman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F (2003) Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant J* 33:621-632
- Diaz J, ten Have A, van Kan JA (2002) The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 129:1341-1351
- Edreva A (2005) Pathogenesis-related proteins: Research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol* 31:105-124
- Gallardo M, Muñoz de Ruedaa P, Matillab A, Sánchez-Calle IM (1995) Alterations of the ethylene pathway in germinating thermoinhibited chick-pea seeds caused by the inhibition of polyamine biosynthesis. *Plant Science* 104:169-175
- Hu WW, Gong H, Pua EC (2005) Molecular cloning and characterization of *S*-adenosylmethionine decarboxylase genes from mustard (*Brassica juncea*). *Physiol Plant* 124:25-40
- Kaur-Sawhney R, Tiburcio AF, Atabella T, Galston AW (2003) Polyamines in plants: an overview. *J Cell Mol Biol* 2:1-12
- Kim YJ, Lee SH, Park KY (2004) A leader intron and 115-bp promoter region necessary for expression of the carnation *S*-adenosylmethionine decarboxylase gene in the pollen of transgenic tobacco. *FEBS Lett* 578:229-235
- Lee SH, Park KY (1991) Compensatory aspects of the biosynthesis of spermidine in tobacco cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol* 32:523-531
- Moeder W, Barry CS, Tauriainen AA, Betz C, Tuomainen J, Utriainen M, Grierson D, Sandermann H, Langebartels C, Kangasjarvi J (2002) Ethylene synthesis regulated by biphasic induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes is required for hydrogen peroxide accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol* 130:1918-1926
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- O'Donnell PJ, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ (2001) Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J* 25:315-323
- Orozco-Cardenas ML, Narvaez-Vasquez J, Rhan CA (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13:179-191

- Pandey S, Ranade SA, Nagar PK, Kumar N (2000) Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J Bio sci* 25:291-299
- Summermatter K, Sticher L, Matrix JP (1995) Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* 108:1379-1385
- Tassoni A, Watkins CB, Davies PJ (2006) Inhibition of the ethylene response by 1-MCP in tomato suggests that polyamines are not involved in delaying ripening, but may moderate the rate of ripening or over-ripening *J Exp Bot* 57:3313-3325
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 151: 59-66
- Walters DR (2000) Polyamines in plant-microbe interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* 57:137-146
- Wi SJ, Park KY (2002) Antisense Expression of Carnation cDNA Encoding ACC Synthase or ACC Oxidase Enhances Polyamine Content and Abiotic Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Plants. *Mol Cells* 13:209-220
- Wi SJ, Kim WT, Park KY (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine carboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Rep* 25:1111-1121
- Wi SJ, Jang SJ, Park KY (2010) Inhibition of biphasic ethylene production enhances tolerance to abiotic stress by reducing the accumulation of reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum*. *Mol Cells* 30:37-49
- Yamakawa H, Kamada H, Satoh, M, Ohashi Y (1998) Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 118:1213-1222