

황 함유 필수아미노산이 증대된 기능성 형질전환 감자 개발 현황

구영민 · 김태원 · 이민경 · 이신우

Development of transgenic potato with high content of sulphur-containing essential amino acids

Young-Min Goo · Tae-Won Kim · Min-Kyung Lee · Shin-Woo Lee

Received: 26 March 2013 / Accepted: 28 March 2013
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Potato is the 4th important crop along with rice, wheat and maize. It contains high quality of starch with relatively high content of vitamin C and protein. However, there is a nutritionally limiting factor due to a low level of sulphur-containing essential amino acid including methionine and cysteine. Recently, recombinant DNA technology and metabolic engineering with genes involved in the bio-synthetic pathway have been applied to enhance the level of these essential amino acids. In this report, it has been discussed about the current status and bottleneck on the development of transgenic potato containing high level of sulphur-containing essential amino acids.

서론

감자 괴경의 건물중에는 약 3 - 6%의 단백질이 축적되어 있으며 수확 후에도 수 개월 동안 안정하게 저장되어 있다(Pots et al. 1999; Shewry 2003). 이들 단백질은 protein body라는 특정 장소에 집적되는 특수기작을 갖고 있으므로 유전자재조합기술을 이용하여 제약업을 포함한 다양한 산업적으로 유용한 단백질을 생산하기 위한 연구가

활발하게 진행되었다. 감자의 괴경에 존재하는 대부분의 수용성단백질은 알부민과 글로불린이며, patatin이라고 명명된 11S globulin 단백질이 주된 저장단백질로 0.5 - 1.0 M의 NaCl용액에 잘 용해되는 것이다(Snyder and Desborough. 1980). Patatin 단백질은 총 수용성단백질의 40%를 차지하며 분자량은 약 45,000 KDa이다(Pavia et al. 1983). 그러나 메티오닌 또는 시스테인과 같은 황을 함유하는 필수아미노산의 함량이 낮아 영양학적으로 가치가 떨어진다는 것이 단점이다(Kapoor et al. 1975; Liedl et al. 1987).

따라서 최근에는 유전자 재조합기술 또는 대사공학 기술을 이용하여 필수아미노산의 함량이 증대된 감자를 개발하기 위한 연구가 많이 시도되었다. Tu 등(1998)이 처음으로 Brazil nut에서 분리한 2S albumin을 암호하고 있는 유전자를 감자에 도입한 결과 잎에서는 총 단백질의 0.2% 수준까지 2S albumin 단백질이 집적된 것으로 보고하였으나 괴경에서는 그 보다 훨씬 낮은 수준으로 집적되었다고 하였다. 그러나 이 연구결과를 바탕으로 다양한 종류의 종자 저장단백질을 암호하는 유전자가 분리 확보되었으며, 또한 파타틴을 암호하는 유전자로부터 괴경 특이 프로모터를 사용하여 상당한 수준까지 이들 황 함유 아미노산을 괴경에 성공적으로 축적시킬 수 있었다.

뿐만 아니라, 메티오닌과 시스테인의 생합성 경로와 각 단계별로 관여하는 효소들이 정체되고 이들을 암호하는 유전자들이 클로닝되면서 생합성 경로의 조절 메커니즘이 밝혀지면서, 최근에는 다양한 대사공학기술이 응용되면서 이들 황 함유 아미노산의 함량이 현저하게 증대된 형질전환 감자계통이 개발되었다(Zeh et al. 2001). 그러나 특정 아미노산의 함량이 증대되면서 나타나는 예기치 않은 다른 영향 즉 식물체가 정상적으로 발육을 하지 못하거나 잎의 구조가 비정상적인 것 등의 다양한 부작용들이 나타나 아직까지 더 많은 연구가 필요하다.

Y.-M. Goo
산청한방약초연구소
(Sancheong Oriental Medicinal Herb Institute, Sancheong, Korea)

T.-W. Kim · M.-K. Lee · S.-W. Lee (✉)
경남과학기술대학교 생명자원과학대학 농학 · 한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources,
College of Life Science and Natural Resources, Gyeongnam
National University of Science & Technology, JinJu, 660-758,
Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

저장단백질의 과 발현을 통한 황 함유 필수아미노산의 증대

식물의 종자에 존재하는 저장단백질 중 특히 황을 함유하는 필수아미노산인 메티오닌의 함량이 높은 단백질은 옥수수(*Zea mays* L.)의 β -zein, Brazil nut(*Bertholletia excelsa* H.B.K.)의 BNA(BN2S), 당비름(*Amaranthus hypochondriacus* L.)의 AmA1, 들깨(*Perilla frutescens* L.)에서 분리한 PrLeg 등이 알려져 있다(Table 1). Zein 단백질은 옥수수로부터 분리한 것으로 분자량이 10 KDa와 15 KDa 인 두 종류가 확인되었으며 이들은 각각 22.5와 11.3 mol%의 methionine 을 그리고 cysteine은 각각 3.9와 4.4 mol%를 함유하고 있는 것으로 확인되었다. Brazil nut에서 분리한 BNA 단백질은 18.8 mol%의 methionine 그리고 7.9 mol%의 cysteine 을 함유하고 있는 것으로 조사되어 이들 단백질을 암호하는 유전자를 분리하여 감자에 도입하여 황 함유 아미노산의 함량을 높이기 위한 연구결과가 1990년대까지 많이 보고되었다(Tu et al. 1998; Chakraborty et al. 2000). 최근에는 당비름에서 분리한 AmA1 유전자를 분석한 결과 methionine과 cysteine은 각각 2.3과 1.6 mol%로 그리고 들깨에서 분리한 PrLeg 단백질을 암호하는 cDNA를 분석한 결과 각각 4.24와 1.6 mol%의 methionine과 cysteine을 함유하는 것으로 조사되어 일반적으로 콩이나 벼, 감자에서 보다는 높게 나타났다(Table 1).

이들 종자 저장단백질을 암호하는 유전자를 감자에 도입하기 위한 연구결과는 Tu 등(1998)에 의하여 최초로 발표되었다. Brazil nut에서 분리한 BNA를 암호하는 유전자를 이용하여 2개에서 7개까지의 methionine을 추가로 암호하도록 디자인한 mutants들을 사용하여 CaMV-35S promoter 와 NOS terminator에 의하여 발현이 조절되도록 만든 재

조합운반체를 감자에 도입하였다. 그 결과 BN2S 단백질이 앞에서는 총 단백질의 0.01에서 0.2%까지 축적되는 것을 확인하였으나 괴경의 경우에는 잎보다 4배 이하로 낮은 결과를 얻어 감자의 괴경에 특이적으로 작동하는 프로모터의 확보, 특정 저장조직에 집적되도록 유도하기 위한 transit peptide의 사용 등이 필요하다고 지적하였다 (Table 2).

따라서 Chakraborty 등(2000)은 괴경특이 프로모터인 granule-bound starch synthase(GBSS) 프로모터와 전신발현용인 CaMV-35S 프로모터를 사용하여 당비름에서 분리한 알부민 저장단백질에 속하는 AmA1을 암호하는 유전자를 감자에 형질전환 결과 괴경에서 대조구인 형질전환 모본 식물체와 비교하여 메티오닌과 시스테인의 함량이 각각 4 - 8배 까지 증가된 것을 확인하였다. 특히 감자에서 발현된 AmA1 단백질은 세포질뿐만 아니라 괴경의 액포에 집적되어 있음을 확인하였다. 이러한 연구결과는 메티오닌 또는 시스테인의 함량이 그 다지 높지 않은 저장단백질(실제로는 BN2S 또는 β -zein과 비교하여 현저하게 낮음, Table 1 참조)을 작물의 저장조직에 발현 시킨 경우에도 성공적으로 메티오닌과 시스테인의 함량을 증가시킬 수 있다는 사실을 증명하였다. 뿐만 아니라 AmA1 단백질은 영양학적으로 World Health Organization (WHO)에서 추천하는 최적 수준의 필수아미노산을 함유하고 있을 뿐만 아니라 인체에 어떠한 알러지를 유발할 인자를 포함하고 있지 않은 것으로 확인되어 Brazil nut에서 분리한 BN2S 보다 안전한 것으로 알려져 있다(Raina and Datta 1992). 특히 본 연구에서 얻은 주목할 만한 연구결과는 괴경특이 프로모터를 사용한 형질전환체의 괴경에서 AmA1 단백질의 함량이 5 - 10배 이상 증가하였으

Table 1 Seed storage proteins that have been used for the enhancement of methionine content in potato

Protein	Origin	Met. content (mol %)	Cys. content (mol %)	Ref.
β -Zein (15 KDa)	Maize (<i>Zea mays</i> L.)	11.3	4.4	Kirihare et al. 1988
β -Zein (10 KDa)	Maize (<i>Zea mays</i> L.)	22.5	4.9	Pederson et al. 1986
BNA or BN2S	Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K.)	18.8	7.9	Sun et al. 1987 Altenbach et al. 1987
AmA1	Amaranth (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.)	2.3	1.6	Raina and Datta. 1992
PrLeg	Perilla (<i>Perilla frutescens</i>)	4.24	1.06	Jin et al. 2000

Table 2 Summary of transgenic potato generated through the over-expression of genes encoding methionine-rich storage proteins

Genes	Promoter	Targeted organ	Met. content	Ref.
BN2S	CaMV-35S	Constitutive	Leaf tissue : 0.01 to 0.2 % of total protein Tuber tissue : 2 to 4-fold lower than those of leaf tissue	Tu et al. 1998
AmA1	GBSS	Tuber	4 to 8-fold increase in Lys. Met. Cys. Tyr	Chakraborty et al. 2000
	CaMV-35S	Constitutive	2.5 to 4-fold increase in Lys. Met. Cys. Tyr	

며, 메티오닌과 시스테인 뿐만 아니라 다른 모든 필수아미노산의 함량도 동시에 증가하였다는 사실이다. 또한 형질전환 모본으로 사용한 A16 감자 계통에 내재하고 있는 다른 단백질의 아미노산 조성은 큰 차이를 보이지 않았으므로 내재하는 다른 단백질들의 필수아미노산을 사용하여 AmA1 단백질을 생합성하는데 이용되지 않았다는 사실이다. 특히 이들 형질전환 개체들은 포장에서 재배한 결과 괴경의 수량(전체 괴경의 생체 중량뿐만 아니라 괴경의 개수)이 3.0 - 3.5배 이상 증가하였다. 이러한 결과는 2년간에 걸친 연속적인 반복시험에서 8 개체의 형질전환 계통에 대하여 조사한 결과이다(Chakraborty et al. 2000). 본 저자들은 이와 유사하게 들깨에서 분리한 PrLeg 단백질을 암호하는 cDNA를 괴경 특이 프로모터인 patatin 프로모터와 전신발현 프로모터인 CaMV-35S에 부착시킨 후 한국에서 육성한 감자 품종인 조원에 도입한 결과 최대 4배까지 메티오닌의 함량이 증가하였음을 확인하였으며 현재 이들 형질전환 감자에 대한 구체적인 분석을 수행하고 있다(미발표 데이터)(Table 2).

황 함유 필수 아미노산의 생합성 경로

황 함유 필수 아미노산 즉 메티오닌과 시스테인의 생합성 경로는 threonine, lysine, isoleucine과 함께 aspartate 계열의 분지경로를 통하여 합성되며, 이들 아미노산들은 서로 연관되어 feedback 제어기작으로 조절되는 통합적 시스템으로 구성되어 있다(Bryan 1980). 식물 조직에서는 aspartate에서 homoserine을 거쳐 O-phospho-homoserine(OHPS)이 합성되는데 OHPS는 threonine과 methionine의 생합성을 위한 분지경로의 중간화합물로서 threonine synthase(TS)와 cystathionine gamma-synthase(CgS) 효소 모두에게 공통으로 기질로 작용한다. 즉 OHPS는 TS에 의하여 threonine으로 직접 전환되는 경로와 CgS에 의하여 cysteine의 융합반응에 의하여 cystathionine으로 전환되고, 이어서 homocysteine, 그리고 methionine으로 전환된다. 이때 cysteine은 serine의 β -위치에 환원형 황 분자가 삽입됨으로서 합성된다. 여기에 관여하는 효소는 serine acetyl transferase(SAT)로서 serine을 O-acetylserine으로 전환시키고 O-acetylserine(thiol)lyase(OAS-TL)가 관여하여 cysteine을 합성한다. 식물에 존재하는 대부분의 황을 함유하는 생체분자들은 직·간접적으로 cysteine으로부터 합성된다, 따라서 cysteine의 합성반응은 식물체내의 유기화합물에 황을 동화시키는 과정에 가장 중요한 단계이다. SAT와 OAS-TL는 색소체, 미토콘드리아, 세포질에 모두 존재하는 것으로 확인 되었으며, 식물과 미생물에서는 이들 두 효소가 복합체를 형성하여 serine에서 cysteine까지의 합성반응이 효율적으로 진행되도록 하는 것으로 확인되었다(Bogdanova and Hell 1997). 식물에서는 SAT의 활성이 OAS-TL보다 현저하게 낮다는 것

이 특징이다(Ruffet et al. 1994).

메티오닌은 cysteine에서 출발하여 3 가지의 연속반응 즉 cystathionine gamma-synthase(CgS), cystathionine beta-lyase(CbL), 그리고 세포질에 존재하는 methionine synthase(MS) 효소에 의한 촉매반응을 통하여 합성된다. 이들 중 20%는 식물체에 내재하는 단백질의 합성에 이용되는 반면에 80%는 동 합성경로의 최종산물인 SAM으로 전환된다(Nikiforova et al. 2002). Methionine의 생합성은 OPHS를 동시에 기질로 사용하는 CgS와 TS효소의 경쟁에 의하여 조절된다(Zhe et al. 2001). MS는 세포질에 존재하면서 N5-methyltetrahydrofolate를 methyl기의 공여 물질로 사용하여 homocysteine을 methionine으로 전환시킨다. 이 효소의 기능은 한편으로는 메티오닌의 생합성에 관여하지만 다른 한편으로 보면 methylation 반응 후 S-adenosylhomocysteine으로부터 SAM을 생산하는 반응을 촉매하는 기능을 동시에 수행한다. MS 유전자는 copy 수가 적으며 화기조직에서 높은 발현을 보인 반면에, 잎과 뿌리조직에서는 기본 수준이며 줄기와 괴경조직에서는 보다 낮은 발현패턴을 보였다. 뿐만 아니라 MS는 빛과 sucrose 또는 유사화합물의 처리에 의하여 발현이 유도되는 것을 확인하였다(Nikiforova et al. 2002). 또한 MS는 전사 후 조절기작이 관여하는 것으로 밝혀졌다. 메티오닌은 SAM으로 쉽게 전환되는데 SAM은 신호전달물질, 메틸그룹의 공여자, 호르몬의 생합성 전구물질, 호르몬과 유사한 화합물(예, 폴리아민) 등의 다양한 기능을 갖는다. SAM을 합성하는 효소는 SAM synthase(SAMS)로 이는 가뭄조건에 의하여 발현양이 증대된다는 것을 확인하였다.

이미 언급한 바와 같이 threonine synthase(TS)는 메티오닌의 생합성으로 유도되는 분지 경로에 관여하는 CgS와 공통의 기질인 OPHS에 대하여 경합관계에 있으면서 동시에 식물의 TS는 메티오닌으로부터 합성된 SAM에 의하여 활성화된다. 트레오닌과 메티오닌은 단백질의 합성에 이용되거나 아니면 isoleucine과 SAM의 생합성 전구물질로 각각 이용된다. 감자를 대상으로 조사한 결과 TS는 화기, 잎과 뿌리조직에서는 많이 발현되나 줄기와 괴경에는 거의 미미한 수준인 것으로 나타났다(Casazza et al. 2000). 그러나 채취한 잎을 대상으로 sucrose, OHPS, 인, 트레오닌, glutamine, asparagine 등을 공급하였을 경우 전혀 TS의 전사수준에 영향을 미치지 않았던 것으로 조사되었다.

생합성 관련 유전자의 과 발현에 의한 황 함유 필수아미노산의 증대

황 함유 필수아미노산의 축적을 위하여 이들 아미노산의 생합성 경로에 관여하는 효소를 암호하는 유전자가 과 발현된 형질전환체의 개발이 가장 보편적으로 이용되는 전략이다. 지금까지의 보고서를 종합하여 보면 생합성 경

로의 순서대로 serine에서 OAS를 합성하는 단계에 관여하는 SAT, homoserine에서 OPHS를 합성하는 단계의 homoserine kinase(HSK), cysteine에서 cystathionine의 생합성단계에 관여하는 CgS 그리고 cystathionine에서 homocysteine의 생합성단계에 관여하는 CbL을 암호하는 유전자를 각각 식물체 또는 미생물에서 분리하여 감자에 도입하여 전신발현 또는 엽록체에 과 발현이 되도록 하였다(Table 3). Harms 등(2000)은 serine acetyltransferase를 암호하는 유전자(*cys E*)를 박테리아에서 분리하여 엽록체에 집적시키기 위하여 애기장대에서 분리한 *rbcS* 유전자의 5'-신호전달인자를 부착시켜 CaMV-35S 프로모터에 의하여 과발현 되도록 디자인한 운반체를 감자에 도입하는데 성공하였다. 형질전환 식물체를 분석한 결과 *cys E* mRNA가 축적되었으며 비형질전환체에 비하여 20배 이상의 SAT 효소활성을 나타내었다. 또한 잎에서는 cysteine과 glutathionine의 함량이 2배 이상 증가한 것을 확인하였다. 그러나 괴경에서는 이들의 함량이 변화가 없었다고 하였다. 뿐만 아니라 황의 동화작용과정에 있어서 첫 단계에 관여하는 *OAS-TL*의 전사 수준 및 효소활성 수준에는 전혀 변화를 주지 않았다. 이는 이미 시금치에서 분리한 *OAS-TL* 유전자가 과발현된 담배에서 얻은 결과와 일치하였다(Saito et al. 1994). 이러한 결과는 OAS와 sulfide가 cysteine의 합성에 제한요소로 작용한다는 사실을 뒷받침하여 준다. 그러나 최근에 Stiller 등(2007)의 연구보고에 의하면 Harms 등(2000)이 사용한 것과 동일한 *cys E* gene 발현 카셋트를 사용하여 상업화된 감자 품종인 White Lady에 도입한 경우 잎조직 뿐만 아니라 괴경에서도 1.5배까지 cysteine의 함량이 증가한 것으로 보고하였다. 유일한 차이점은 형질전환에 사용한 품종과 GM감자의 실용화를 위한 안전성평가에 대비하여 항생제 선별마커 유전자를 제거하였다는 사실이다. 따라서 품종에 따른 결과라고 볼 수 있으나 재배조건 등 다양한 원인이 존재할 수 있으므로 보다 정밀한 실험을 수행하여야 할 것이다.

OAS-TL에 의하여 OAS 화합물에 황을 도입하여 cysteine으로 만든 다음 cysteine은 CgS에 의하여 cystathionine으로

변화시킨다. 따라서 애기장대와 감자에서 분리한 CgS 유전자를 감자에서 과 발현 시키는 전략으로 methionine의 함량을 높이고자 하는 연구가 시도되었다. Kreft 등(2003)은 감자에서 분리한 CgS 유전자를 CaMV-35S 프로모터를 이용하여 감자에서 과 발현시킨 결과 동 유전자의 전사 수준과 효소활성은 2.7배 까지 증가된 것을 확인 하였으나 메티오닌의 함량은 아무런 변화가 없었다. 그러나 Di 등(2003)은 애기장대에서 분리한 CgS 유전자를 Russet Burbank potato 품종에 도입한 결과 메티오닌의 함량이 6 배까지 증가되는 상반된 결과를 발표하였다. 특히 동 형질전환체에서 수확한 괴경에서 methional의 함량이 2.4에서 4.4배까지 증가하였으며 이는 괴경내의 유리 아미노산인 메티오닌의 함량과 일치하였다고 하였다. Methional은 괴경의 풍미에 주요한 영향을 주는 화합물로서 메티오닌의 분해 산물이다. 이러한 상반된 연구결과를 보면 식물별로 CgS의 작용기작이 차이가 있음을 알 수 있다. 이는 애기장대에서 분리한 CgS 유전자를 담배에 과 발현시킨 경우 메티오닌의 함량이 40배까지 증가된 결과에서도 짐작할 수 있다(Gakiere et al. 2002; Hacham et al. 2002; Kim et al. 2002). Di 등(2003)은 이러한 차이점을 gene silencing 효과 때문이라고 설명하였다. 즉 감자에서 분리한 CgS 유전자를 감자에 다시 도입하여 과 발현시킬 경우에 흔히 관찰되는 gene silencing 효과의 결과로 Kreft 등(2003) 등은 메티오닌의 집적을 조사할 수 가 없었을 것이라고 추측하였다. 이러한 상반된 연구결과 들을 종합하여 보면 식물에 따른 모든 CgS 유전자군을 분리하여 각각의 작용 메커니즘의 차이를 분석하여야 정확한 원인을 알 수 있을 것으로 보인다(Table 3).

다음으로 cystathionine으로부터 homocysteine을 합성하는 *CbL* 유전자를 과 발현시킨 경우에도 감자의 잎이나 괴경 조직의 메티오닌 함량에 큰 변화를 보이지 않았다(Maimann et al. 2000). 그러나 비 형질전환체인 대조구에 비하여 CbL 효소의 활성은 2.5배나 높게 나타났다. 따라서 CbL 효소의 기질인 cystathionine의 공급이 부족하여 나타나는 현상이라고 가정하였다. 이러한 가정을 뒷받침

Table 3 Summary of transgenic potatoes created by overexpression of genes involved in the biosynthetic pathway of sulphur-containing amino acids

Genes	Origin	Promoter	Targeted organ	Met. content	Ref.
<i>StCgS</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV-35S	Constitutive	No change in Met. evel	Kreft et al. 2003
<i>StCbL</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV-35S	Constitutive	No change in Met. level	Maimann et al. 2001
<i>AtCgS</i>	<i>Arabidopsis</i>	CaMV-35S	Constitutive	6-fold increase in Met.	Di et al. 2003
<i>Cys E (SAT)</i>	<i>E. coli</i>	CaMV-35S	Chloroplast	2.0-fold increase of cys. and glutathione in leaf tissues but no change in tuber	Harms et al. 2000
<i>Cys E (SAT)</i>	<i>E. coli</i>	CaMV-35S	Chloroplast	1.5-fold increase in Cys.	Stiller et al. 2007
<i>thr B</i>	<i>E. coli</i>	CaMV-35S	Chloroplast	No effect in Met. content	Rinder et al. 2008

하는 증거로서 식물체로부터 떼어낸 잎의 엽병을 통하여 cystathionine을 공급하여 주었을 때 잎에서 다량의 메티오닌이 축적됨을 확인하였기 때문이라고 하였다. 또한 *CbL*의 과발현은 메티오닌 생합성에 관여하는 다른 유전자들의 발현에 전혀 영향을 미치지 않았다. 따라서 *CbL*은 메티오닌 생합성 경로에 있어서 탄소의 흐름에 크게 영향을 미치지 않으며 기질의 공급부족에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 보여진다.

최근에 Rinder 등(2008)은 박테리아에서 분리한 homoserine kinase을 암호하는 유전자(*EcHSK*)를 엽록체 또는 세포질에 과 발현시킨 경우, 비 형질전환체인 대조구에 비하여 11배나 증가된 HSK효소활성을 확인하였으나 메티오닌이나 트레오닌의 함량에는 큰 변화가 없었다고 보고하였다. 하지만 cystathionine과 homocysteine의 함량은 증가한 것으로 조사되어 실제로 메티오닌의 생합성 대사과정에 필요한 탄소의 유입은 촉진시킨 것으로 보인다고 하였다. 이와 함께 감자식물체에 내재하는 *HSK*, *TS*, *CbL*, *MS*의 전사수준은 감소시킨 것으로 확인되었다. 그리고 모든 형질전환체에서 *CgS*의 발현수준에는 큰 변화가 없었으나 *SAMS*의 발현 수준은 크게 증가한 것으로 조사되었다(Table 3). 이러한 결과를 종합하여 보면 *HSK*유전자를 엽록체에 과 발현시킨 경우 메티오닌이나 트레오닌의 생합성 대사과정에 크게 영향을 미치지 않았으나 세포질에 과 발현시킨 경우에는 오히려 억제하는 효과를 나타낸다고 볼 수 있으며 따라서 이러한 결과를 바탕으로 세포질에 존재하는 OPHS에 의하여 aspartate 계열의 아미노산 생합성대사 과정에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는 신호전달에 관한 모델을 제시하였다.

발현제어기술과 특정 종사단백질의 과 발현의 동시 도입에 의한 황 함유 아미노산의 함량 증대

메티오닌 또는 시스테인의 생합성과 관련된 효소를 암호하는 유전자의 역방향을 도입시키는 antisense inhibition기술을 통하여 이들 황 함유 아미노산의 함량을 증대시키기 위한 연구가 시도되었다. 획기적인 결과는 Zeh 등(2001)에 의하여 보고되었으며, 감자의 *TS* 유전자를 CaMV-35S

프로모터를 이용하여 antisense로 도입한 형질전환 감자를 분석한 결과 TS효소활성이 6% 감소한 계통의 잎에서 메티오닌의 함량이 비형질전환체인 대조구에 비하여 239배 까지 증가하였으며 트레오닌의 함량은 45%로 감소하였다. 반면에 동 형질전환체의 괴경을 분석한 결과 메티오닌은 30배가 증가하였으며 트레오닌의 함량에는 변화가 없었다고 하였다(Table 4). 이들 식물체의 잎에서 다른 aspartate 계열의 아미노산 수준을 조사한 결과 대부분의 아미노산 즉, Lys, Ile, Ala, Val 그리고 Glu는 대조구와 비교하여 큰 변화를 보이지 않았다. 그러나 homoserine은 175배, homocysteine은 46배까지 증가하였는데 이들은 메티오닌의 직접적인 전구물질로 비 형질전환체인 대조구에서는 거의 검출이 되지 않는 수준으로 존재하였다. 이러한 잎에서의 결과는 괴경에서도 유사하게 조사되어 Ile의 수준만 증가한 것으로 조사되었으나 다른 아미노산 즉 Lys, Val, Ala, Glu 등은 큰 변화를 보이지 않았다. 잎과 비교하여 가장 큰 차이점은 threonine의 함량은 큰 변화가 없었으나 메티오닌의 함량이 30배까지 증가하였다는 사실이다. 한편 Shaul과 Galili(1992)는 feedback-insensitive aspartate kinase(AKs)를 담배에 발현시킨 결과 threonine의 함량이 2 - 9배 까지 증가하였으며 Lys, Ile이 약간 증가하였으나 메티오닌의 함량에는 변화가 없었다고 하였다. 그러나 애기장대에 feedback-insensitive AKs를 발현시킨 경우에 메티오닌의 함량이 2배까지 증가하였다고 하였다(Heremans and Jacobs. 1995). 이러한 연구결과는 감자, 담배 등 가지과 식물은 애기장대와는 다른 조절기작을 갖고 있을 것이라고 예측된다(Table 4).

보다 흥미로운 사실은 메티오닌의 생합성과정에 중간 화합물인 homo-serine, homo-cysteine의 함량도 함께 증가하였으나 이들의 합성과정에 관여하는 효소인 *CgS*, *CbL*, *MS*를 암호하는 유전자의 전사량과 효소들의 활성에는 큰 변화가 없고 일정한 수준을 유지하고 있었었다는 것이다. 이러한 사실은 *CgS*와 *CbL*을 각각 antisense로 그 발현 수준을 저해시킨 형질전환체에서 얻은 결과와 일치하였다. Kreft 등(2003)은 감자에서 분리한 *CgS* 유전자를 정방향 또는 역방향으로 도입하여 얻은 형질전환체를 선발하여 조사한 결과 *CgS*는 메티오닌 생합성대사과정에 아

Table 4 Summary of transgenic potatoes created by suppression of specific genes involved in the metabolic pathway of sulphur-containing amino acids or by combination of metabolic engineering and overexpression of genes encoding high-methionine seed storage protein

Strategies	Genes	Origin	Promoter	Targeted organ	Met. content	Ref.
Antisense inhibition	<i>TS</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV-35S	Constitutive	Leaf : 239-fold Tuber : 30-fold	Zeh et al. 2001
	<i>StCgS</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV-35S	Constitutive	No change in Met. level	Kreft et al. 2003
	<i>StCbL</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	CaMV-35S	Constitutive	Reduced Met.	Maimann et al. 2000
Co-trans -formation	<i>AtCgS (CgS90)</i>	<i>Arabidopsis</i>	CaMV-35S	Chloroplast	2-to 6-fold increase in the free Met.	Dancs et al. 2008
	<i>β-zein</i>	<i>Maize</i>	CaMV-35S	Constitutive		

무런 영향을 주지 않았다고 하였다. 게다가 CgS는 메티오닌에 의하여 feedback inhibition도 받지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 CgS는 감자 식물체내에서 아주 평형에 가까운 상태를 유지하며 대사과정에서 조절역할은 하지 않는 것으로 결론을 지었다. 또한 Maimann 등(2000)은 *CbL* 유전자를 감자에서 분리한 다음 역방향으로 도입하여 *CbL* 효소의 활성 수준이 50%까지 억제효과를 나타내는 형질전환체를 선발하여 메티오닌의 수준은 감소하였으며, cystathionine, homoserine, cysteine 등의 함량은 현저하게 증가한 것으로 조사되었다. 특이하게도 homocysteine의 함량까지 증가된 것으로 조사되었으나 이러한 화합물의 생합성단계에 관여하는 효소들을 암호하는 유전자의 전사수준과 효소활성은 전혀 변하지 않고 일정한 수준을 유지하였다고 하였다(Table 4). 이러한 연구결과들을 종합하여 보면 이들 중간 단계의 효소들 즉 CgS, MS, HSK 등의 활성이 충분하지 않거나 기질 친화성 등의 차이로 인하여 중간단계의 화합물들이 축적되며 효소활성은 일정한 수준으로 유지되도록 하는 것으로 추측된다고 하였다. 그러나 이러한 결과는 애기장대와 *L. paucicostata*를 대상으로 조사한 결과(Thompson et al. 1982; Inaba et al. 1994; Ravanel et al. 1998; Chiba et al. 1999)와는 상반되는 것으로 역시 감자를 포함한 가지과 식물은 서로 다른 조절기작을 갖고 있을 것으로 추측하였다.

대사공학기술을 이용하여 *TS*의 발현을 억제시키거나 *CgS*, *CbL*, *MS* 등을 과 발현시켜 cysteine 또는 methionine 등의 황 함유 아미노산을 고농도로 축적시키고자 하는 시도가 일부 성공을 하였으나 식물체의 생장이 저해되거나 표현형적으로 기형이 출현하거나 괴경의 수확량이 현저하게 감소하는 결과를 초래하였다(Zeh et al. 2001). 또한 애기장대를 이용하여 *CgS*의 과발현을 유도한 경우 8 - 20배의 메티오닌 함량이 증가한 것을 확인하였으나 단지 어린 유묘조직, 화기조직 등에서만 축적되었으며 성숙된 잎에서는 축적되지 않았다(Kim et al. 2002). 또한 *CgS* 유전자가 과발현된 감자의 괴경에서 일부는 6배까지 메티오닌의 함량이 증가하였다고 하였으나(Di et al. 2003), 또 다른 연구에서는 2.7배까지 효소활성이 증가된 것은 확인하였으나 메티오닌의 함량은 증가하지 않는 등(Kreft et al. 2003) 연구결과가 일관되지 않은 것이 문제이다. 또 다른 예로서 *CbL* 유전자의 발현을 억제한 감자의 경우 cystathionine, homoserine, cysteine의 함량은 증가하였으나 메티오닌의 함량이 감소되었으며 Lys, Asp, Thr의 함량은 변하지 않았다. 문제는 메티오닌의 함량이 감소되면서 식물체가 가시가 많아지며, 괴경이 작고, 밝은 녹색 잎의 크기가 작은 표현형을 나타내었다. 이러한 발육장애현상은 외부에서 메티오닌을 공급한 경우에 회복되는 것으로 조사되었다(Maimann et al. 2000). 또한 세포질에 존재하는 과량의 유리아미노산은 식품의 가공과정

나 요리과정에서 파괴되거나 소실 될 가능성이 높아 영양학적으로 품질이 떨어질 수도 있다.

따라서 Dancs 등(2008)은 *CgS* 유전자를 과 발현시키면서 동시에 메티오닌의 함량이 높은 종자저장단백질을 암호하는 유전자도 동시에 과 발현시킴으로서 세포질에 축적된 과량의 유리 메티오닌을 종자저장단백질에 삽입되도록 하는 기술을 시도하였다. 이때 사용한 *CgS* 유전자는 애기장대에서 분리한 것으로 N-terminal의 90개 염기가 삭제된 새로운 type의 유전자(*CgS*_{Δ90})인데 이는 N-terminal 부분에 *CgS* 효소의 활성을 조절하는 영역을 포함하기 때문에 이 부분을 제거한 *CgS* 유전자를 식물체에 도입하여 과발현 시킨 경우, 메티오닌의 축적 효과가 뛰어나 정상 유전자를 도입한 것보다 메티오닌의 함량이 현저하게 높았음을 확인하였다(Hacham et al. 2006). *CgS*_{Δ90} 유전자와 15-kD β -zein 유전자를 감자에 동시에 도입하여 조사한 결과 유리메티오닌과 zein을 함유하는 단백질의 함량이 괴경에서 현저하게(2 - 6배) 증가된 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, Ile, serine의 함량도 동시에 증가하였다(Table 4). 그러나 거의 모든 형질전환체가 생육이 현저하게 저하되었으며, 잎의 구조가 변형되었으며, 괴경의 수확량이 40 - 60%까지 감소하는 비정상적인 표현형을 나타내었다. 특히 괴경의 색깔도 안토시아닌의 감소로 변형된 것으로 조사되었고, phenylpropanoid pathway의 첫 단계에 관여하는 가장 중요한 효소 중의 하나인 phenylalanine ammonia-lyase(PAL) 유전자의 전사수준이 현저하게 감소되었음을 확인하였다.

적 요

감자는 벼, 보리, 밀과 함께 세계 4 대 식량작물에 속하며 고품질의 전분과 함께 비타민 C 함량이 높고 단백질의 함량도 높다. 그러나 메티오닌과 시스테인 등의 황 함유 아미노산과 함께 필수아미노산이 부족하여 영양학적으로 가치가 다소 낮다는 것이 단점이다. 따라서 최근에는 유전자재조합 기술 및 대사공학기술을 이용하여 이들 필수아미노산의 함량을 증대시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 논문에서는 황 함유 필수 아미노산의 함량을 증가시키기 위한 연구현황 및 문제점 등을 조사하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업 GM작물 실용화사업단(PJ008097)과 2012년도 경남과학기술대학교 기성회연구비의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Altenbach SB, Pearson KW, Leung FW, Sun SSM (1987) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a Brazil nut protein exceptionally rich in methionine. *Plant Mol Biol* 13:513–522
- Bogdanova N, Hell R (1997) Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 11: 251–262
- Bryan JK (1980) Synthesis of the aspartate family and branched-chain amino acids. In: Mifflin BJ (ed) *The biochemistry of plants*, vol 5. Academic Press, New York, pp 403–452
- Casazza AP, Basner A, Höfgen R, Hesse H (2000) Expression of threonine synthase from *Solanum tuberosum* L. is not metabolically regulated by photosynthesis-related signals or by nitrogenous compounds. *Plant Sci* 157:43–50
- Chakraborty S, Chakraborty N, Datta A (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3724–3729
- Chiba Y, Ishikawa M, Kijima F, Tyson RH, Kim J, Yamamoto A, Mambara E, Leustek T, Wallsgrave RM, Naito S (1999) Evidence for autoregulation of cystathionine-synthase mRNA stability in *Arabidopsis*. *Sci* 286:1371–1374
- Dancs G, Mihály Kondrák M, Bánfalvi Z (2008) The effects of enhanced methionine synthesis on amino acid and anthocyanin content of potato tubers. *BMC Plant Biol* 8:65–75
- Di R, Kim J, Martin MN, Leustek T, Jho J, Ho C-T, E. Tumer N (2003) Enhancement of the primary flavor compound methional in potato by increasing the level of soluble methionine. *J Agric Food Chem* 51:5695–57025
- Gakiere B, Denis L, Droux M, Job D (2002) Over-expression of cystathionine-synthase in *Arabidopsis thaliana* leads to increased levels of methionine and S-methylmethionine. *Plant Physiol Biochem* 40:119–126
- Hacham Y, Avraham T, Amir R (2002) The N-terminal region of *Arabidopsis* cystathionine-synthase plays an important role in methionine metabolism. *Plant Physiol* 128:454–462
- Hacham Y, Schuster G, Amir R (2006) An *in vivo* internal deletion in the N-terminus region of *Arabidopsis* cystathionine γ -synthase results in CGS expression that is insensitive to methionine. *Plant J* 45:955–967
- Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Höfgen R, Hesse H (2000) Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant J* 22:335–343
- Heremans B, Jacobs M (1995) Threonine accumulation in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. with an altered aspartate kinase. *J Plant Physiol* 146:249–257
- Inaba K, Fujiwara T, Chino M, Komeda Y, Naito S (1994) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant, *mtol*, that overaccumulates soluble methionine. *Plant Physiol* 104:881–887
- Jin UH, Jin BR, Lee JW, Cho YS, Kwon OC, Kim YK, Chung CH (2000) Characterization of a methionine-rich storage protein cDNA from perilla (*Perilla frutescens*) seeds. *Aust. J. Plant Physiol* 27:701–707
- Kapoor A, Desborough SL, Li PH (1975) Potato tuber proteins and their nutritional quality. *Potato Res* 18:469–478
- Kim J, Lee M, Chalam R, Martin MN, Leustek T, Boerjan W (2002) Constitutive overexpression of cystathionine-synthase in *Arabidopsis* leads to accumulation of soluble methionine and S-methylmethionine. *Plant Physiol* 128: 95–107
- Kirihara JA, Hunsperger JP, Mahoney WC, Messing JW (1988) Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize *Mol. Gen. Genet.* 211:477–484
- Kreft O, Hoefgen R, Hesse H (2003) Functional analysis of cystathionine-synthase in genetically engineered potato plants. *Plant Physiol* 131:1843–1854
- Liedl BE, Kosier T, Desborough SL (1987) HPLC isolation and nutritional value of a major tuber protein. *Amer. Potato J* 64:545–557.
- Maimann S, Wagner C, Kreft O, Zeh M, Willmitzer L, Höfgen R, Hesse H (2000) Transgenic potato plants reveal the indispensable role of cystathionine β -lyase in plant growth and development. *Plant J.* 23:747–758
- Maimann S, Hoefgen R, Hesse H (2001) Enhanced cystathionine β -lyase activity in transgenic potato plants does not force metabolite flow towards methionine. *Planta* 214:163–170
- Nikiforova V, Kempa S, Zeh M, Maimann S, Kreft O, Casazza AP, Riedel K, Tauberger E, Hoefgen R, Hesse H (2002) Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino Acids* 22:259–278
- Pavia E, Lister RM, Park WD (1983) Induction and accumulation of major tuber proteins of potato stems and petioles. *Plant Physiol.* 71:161–168
- Pedersen K, Agros P, Naravana SVL, Larkins B (1986) Sequence analysis and characterization of a maize gene encoding a high-sulfur zein protein of Mr 15,000. *J Biol Chem* 261: 6279–6284
- Pots AM, Grotenhuis ET, Gruppen H, Voragen AGJ, de Kruijff KG (1999) Thermal aggregation of patatin studied *in situ*. *J Agric Food Chem* 47:4600–4605
- Raina A, Datta A (1992) Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11774–11778
- Ravanel S, Gakiere B, Job D, Douce R (1998) The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:7805–7812
- Rinder J, Casazza AP, Hoefgen R, Hesse H (2008) Regulation of aspartate-derived amino acid homeostasis in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) by expression of *E. coli* homoserine kinase. *Amino Acids* 34:213–222
- Ruffet M-L, Droux M, Douce R (1994) Purification and kinetic properties of serine acetyltransferase free of O-acetylserine (thiol)lyase from spinach chloroplasts. *Plant Physiol* 104: 597–604
- Saito K, Kurosawa M, Tatsuguchi K, Tagaki Y, Murakoshi I (1994) Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase

- (O-acetylserine (thiol)-lyase, *Plant Physiol* 106:887-895
- Shaul O, Galili G (1992) Threonine overproduction in transgenic tobacco plants expressing a mutant desensitized aspartate kinase of *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 100:1157-1163
- Shewry PR (2003) Tuber storage proteins. *Ann Bot* 91:755-769
- Snyder JC, Desborough SL (1980) Total protein and protein fractions in tubers of Group Anigena and Phureja-Tuberosum hybrids. *Qual Plant Foods Hum Nutr* 30:123-134
- Stiller I, Dancs G, Hesse H, Hoefgen R, Bánfalvi Z (2007) Improving the nutritive value of tubers: Elevation of cysteine and glutathione contents in the potato cultivar White Lady by marker-free transformation. *J Biotechnol* 128:335-343
- Sun SSM, Altenbach SB, Leung FW (1987) Properties, biosynthesis and processing of a sulfur-rich protein in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Eur J Biochem* 159:597-604
- Thompson GA, Datko AH, Mudd SH (1982) Methionine biosynthesis in *Lemna*: studies on the regulation of cystathionine gamma-synthase, O-phosphohomoserine sulfhydrylase, and O-acetyl sulfhydrylase. *Plant Physiol* 69:1077-1083
- Tu HM, Godfrey LW, Sun SSM (1998) Expression of the Brazil nut methionine-rich protein and mutants with increased methionine in transgenic potato. *Plant Mol Biol* 37:829-838
- Zeh M, Casazza AP, Kreft O, Roessner U, Bieberich K, Willmitzer L, Hoefgen R, Hesse H (2001) Antisense inhibition of threonine synthase leads to high methionine content in transgenic potato plants. *Plant Physiol* 127:792-802