

식물배양세포를 이용한 항산화연구

김기연, 이정은, 안영옥, 권석윤, 이행순, 곽상수

생명공학연구소 식물세포공학연구실

전화(042)860-4432, 팩스(042)860-4608, e-mail: sskwak@mail.kribb.re.kr

Abstract: To understand the antioxidative mechanism in plant cell cultures, we investigated the levels of antioxidant enzymes and low molecular antioxidants in 100 cell lines derived from different plant species. SOD and POD activities in plant cell lines were significantly higher than intact plants. The cell lines from sweet potato (*Ipomoea batatas*) and cassava (*Manihot esculenta*) showed the highest POD and SOD activities, respectively, suggesting that the cell cultures of sweet potato and cassava are good biomaterials for the mass production and molecular study of antioxidant enzymes. The average ascorbate content in plant cell lines was several hundred times lower than intact plants, whereas the glutathione content was 2-3 times higher than plants. Interestingly, the ratio of reduced and oxidized ascorbate and glutathione was different from plant species. In conclusion, the results strongly suggest that plant cell cultures are good biomaterials for the study of antioxidative mechanism and the production of useful components including antioxidants.

서론

식물을 포함한 대부분의 생물은 외부로부터 환경스트레스를 받으면 생체내 생명의 필수원소인 산소(O₂)는 독성의 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 변한다. 이들 ROS는 강한 반응성을 가지고 있어 세포막 분해, 단백질과 DNA 합성저해, 엽록체 파괴 등에 관여하며 심할 경우는 생명을 잃게 한다. 생체는 이와 같은 ROS에 의한 산화적인 스트레스로부터 자신을 보호하기 위하여 항산화기구(antioxidative mechanism)를 구축하면서 새로운 환경에 적응하여 왔다. 생체내에서 ROS를 제거하는 물질로는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbate, glutathione, tocopherol 등의 다양한 종류의 저분자 항산화물질이 있다^{1,2)}. 한편 식물조직세포 배양기술은 형질전환 식물체 개발, 유용 식물체의 번식, 유용물질의 생산 등 식물생명공학분야의 핵심기술이다. 그러나 배양세포가 지닌 배양특성에 대한 구체적인 연구는 대단히 미흡한 실정이다. 식물 배양세포는 식물체가 자라는 환경보다 높은 산화적인 스트레스를 포함한 배양스트레스에서 성장하기 때문에 배양세포는 항산화물질의 생산 및 항산화기구 해석에 대단히 중요한 소재가 될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 맥락에서 발표자의 연구팀은 다양한 식물종에서 유도된 100종의 배양세포주를 대상으로 항산화효소 활성 및 저분자항산화물질을 분석하고, 항산화물질의 생산과 유용 유전자의 분리 및 이용에 관한 연구를 수행하고 있다.

재료 및 방법

식물 배양세포주는 생명공학연구소 식물세포공학연구실과 유전자원센터에서 관리, 배양하고 있는 켈러스세포주 약 100종을 대상으로 항산화활성을 분석하였다. 켈러스를 4주 간격으로 계대배양하여 25℃에서 암배양하였다. 계대배양시의 세포를 수확하여 활성을 조사하였다. SOD 활성은 xanthine oxidase와 cytochrome c을 이용한 McCord와 Fridovich의 방법³⁾에 따라 측정하였다. POD 활성은 pyrogallol을 기질로 사용한 Sigma사의 방법⁴⁾에 따라 측정하였다. CAT 활성은 기질인 과산화수소의 감소량을 측정하는 방법⁵⁾을 사용하였다. 저분자 항산화활성은 DPPH 자유라디칼 포착활성⁶⁾으로 조사하였다. Ascorbate 함량은 Graham과 Annette의 방법⁷⁾에 따라 HPLC를 사용하여 분석하였다. Glutathione 함량은 glutathione reductase와 4-vinylpyridine을 이용한 Griffith의 방법⁸⁾에 따라 분석하였다. 고구마와 카사바 배양세포에서 각각 POD cDNA와 SOD cDNA의 분리 및 유전자의 발현실험은 저자들의 보문^{9, 11)}에 자세히 기술되어 있다.

결과 및 고찰

1) 배양세포의 POD 활성과 고구마 배양세포의 POD 특성 규명: 100종의 식물배양세포주에서 POD 활성(units/mg protein)이 10 이하인 세포주가 90종이었으며, 고구마(*Ipomoea batatas*) 신초의 정단분열조직으로부터 유도한 세포주가 229로 가장 높았다⁴⁾. 고구마 세포주를 small cell-aggregate method로 모세포주(3,500 units/g cell dry wt) 보다 POD 활성이 높고 세포생장이 양호한 세포주 SP-47을 선발하여 현탁배양하였을 때 SP-47은 모세포주보다 flask당 POD 활성이 약 1.5배 높았다. SP-47 배양세포로부터 산성의 POD isoenzyme 3개 (A1, A2, A3)를 분리하여 효소학적 특성을 규명한 결과, A2 isoenzyme이 배양세포 전체 단백질의 약 7.5%를 차지하는 우점종인 것이 확인되었다¹²⁾. SP-47 세포주를 현탁배양시 대수증식후기에 스트레스관련 화합물인 abscisic acid와 ethephon을 첨가하였을 때 세포생장에 영향을 주지 않고 POD 활성을 현저하게 향상시킬 수 있었다¹³⁾. 고구마 배양세포는 지금까지 보고된 어떤 식물체와 배양세포보다 POD를 고생산하는 것으로 추정된다.

발표자 연구팀은 POD 고생산 고구마 배양세포(SP-47 세포주)에서 4개의 POD cDNA (산성의 swpa1, swpa2, swpa3와 중성의 swpn1)를 분리하여 발현특성을 조사한 결과, 분리한 유전자는 배양세포에서 강하게 발현하였고, 정상적인 고구마 식물체에서는 거의 발현되지 않았으나, 상처(wounding), 저온, 오존 등 외부스트레스를 받았을 때 강하게 유도되었다^{9, 10)}. 특히 A2 isoenzyme을 코딩하는 swpa2 유전자는 식물체 조직에서는 전혀 발현되지 않았고 스트레스에 의해 가장 강하게 유도되었다. 최근 A2 isoenzyme을 코딩하는 유전자 (SWPA2)를 분리한 결과, 이 유전자의 promoter는 스트레스에 의해 유도되는 특징 (stress-inducible promoter)을 갖고 있음이 확인되었다. 현재 스트레스 관점에서 SWPA2 promoter의 특성을 규명중이며, SWPA2 promoter는 환경스트레스 내성식물 및 형질전환 식물배양세포에서 약리활성단백질 생산 등에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

2) 토마토와 카사바 배양세포의 SOD 활성: 다양한 유도조건에서 확립된 97종의 세포주를 대상으로 SOD 활성을 조사한 결과, 단위세포 무게당 활성(units/g fresh wt)과 비활성도

(units/mg protein)는 토마토(*Lycopersicon esculentum*)와 카사바(*Manihot esculenta*) 세포주에서 각각 1,580와 2,659로 가장 높았다¹⁴⁾. 토마토 현탁배양에서는 세포밖으로 분비되는 extracellular SOD 활성이 전체 활성의 약 75%를 차지하였다¹⁵⁾. 카사바 배양세포에서 1개의 CuZnSOD cDNA를 분리하여 다양한 스트레스조건에서 발현특성이 조사되었고¹¹⁾, 현재 분리한 SOD 유전자는 환경내성식물 개발 및 약용 오이 개발에 이용되고 있다.

3) 배양세포의 CAT 활성: 97종의 배양세포주를 대상으로 CAT 활성을 조사한 결과, 비활성도(units/mg protein)가 10인 세포주가 5종이었으며 썩의다리(*Thalictrum aquilegifolium*) 세포주에서 65로 가장 높았다. 단위세포무게당 활성(units/g cell fresh wt)이 20 이상인 세포주가 10종이었으며 무(*Raphanus sativus*) 세포주에서 172로 가장 높았다¹⁶⁾. 식물배양세포의 CAT 활성은 식물체에 비해 현저히 낮은 값을 나타내었다.

4) 배양세포의 DPPH 자유라디칼 포착활성 및 ascorbate 함량: 64종의 배양세포를 대상으로 DPPH 자유라디칼 포착활성을 조사한 결과 다양한 활성을 나타내었으며, 덩굴장미(*Rosa multiflora*), 황금(*Scutellaria baicalensis*), 쇠무릅(*Achranthes japonica*)의 ascorbate 함량($\mu\text{g/g}$ cell fresh wt)은 각각 48.5, 30.3, 16.8이었다¹⁷⁾. 식물배양세포의 ascorbate 함량은 식물체에 비해 약 1/100로 매우 낮았다. 황금 현탁배양에서 다른 ascorbate 함량은 세포생장에 비례하여 증가하였다가 성장후기에 급속히 감소하였다. 황금 현탁배양에서 여러 전구물질을 처리하여 ascorbate의 함량변화를 조사한 결과, L-galactose, L-galactono-1,4-lactone 등이 ascorbate 생합성에 효과적인 전구물질임이 확인되어, 식물배양세포는 ascorbate 생합성 및 대사연구에 적합한 소재임이 확인되었다¹⁸⁾. 홍미릅계도 카사바와 덩굴장미는 환원형인 ascorbate 함량이, 고구마와 황금은 산화형인 dehydroascorbate (DHA) 함량이 식물체와 배양세포에 관계없이 모든 성장시기에서 높았다.

5) 배양세포의 glutathione 함량: 24종의 식물세포주를 대상으로 환원형(GSH)와 산화형(GSSG)의 glutathione 함량을 조사하였다. 배양세포 전체 glutathione 함량($\mu\text{g/g}$ cell fresh wt)은 98 ± 20 와 26 ± 10 을 나타내었다. 배양세포의 전체 glutathione 중에서 평균 환원형 GSH는 약 73%를 차지하였다¹⁹⁾. 식물배양세포의 glutathione 함량은 식물체에 비하여 약 2-3배 높았다. 고구마와 황금은 환원형인 GSH 함량이, 카사바와 덩굴장미는 산화형인 GSSG 함량이 식물체와 배양세포에 관계없이 모든 성장시기에 높았다. 배양세포 종류에 따라 현탁배양에 따른 glutathione 함량은 약간의 차이를 나타내었지만, 세포생장 단계와 관계없이 거의 비슷한 함량을 나타내었다.

요 약

식물배양세포의 항산화기구 이해를 위하여 다양한 식물종에서 유도된 100종의 배양세포주를 대상으로 항산화효소 활성 및 저분자항산화물질을 분석하였다. 배양세포의 SOD와 POD 활성은 식물체에 비해 매우 높았으며, 특히 고구마와 카사바 배양세포는 각각 POD와 SOD 활성이 가장 높아, 항산화효소의 생산 및 항산화기구 해석에 좋은 소재임이 시사되었다. 배양

세포의 평균 ascorbate 함량은 식물체에 비해 1/100 수준으로 낮았으며, glutathione 함량은 배양세포가 식물체보다 약 2-3배 높았다. 흥미롭게도 ascorbate와 glutathione의 환원형과 산화형의 비율은 식물종에 따라 큰 차이가 있음이 밝혀졌다. 결론적으로 식물배양세포는 높은 산화적인 스트레스에서 배양되는 것이 생화학적으로 확인되어 항산화물질 생산 및 항산화기구 연구에 좋은 소재임이 시사되었다.

참고문헌

1. Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, FL
2. Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
3. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055
4. Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem J* 27:132-137
5. Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121-126
6. Xiong Q, Kadoka S, Tadota T, Namba T (1996) Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol Pharm Bull* 19:1580-1585
7. Graham WD, Annette D (1992) Determination of ascorbic and dehydroascorbic acid in potatoes (*Solanum tuberosum*) and strawberries using ion exclusion chromatography. *J Chromatogr* 594:187-194
8. Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207-212
9. Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Genet* 255:382-391
10. Kim KY, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Hur Y, Kwak SS (1999) Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Mol Gen Genet* 261:941-947
11. Lee HS, Kim KY, You SH, Kwon SY, Kwak SS (1999) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Gen Genet* 262:807-814
12. Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR (1995) Acidic peroxidase from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry* 39:981-984
13. Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR (1996) Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry* 43:565-568
14. You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS (1996) Selection and isozyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Kor J Plant Tiss Cult* 23:103-106
15. You SH, Huh GH, Kwon SY, Lee HS, Ban JW, Kwak SS (1997) Superoxide dismutase activity in suspension cultured cells of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Kor J Plant Tiss Cult* 24:57-61
16. Jang MS, Huh GH, Kim SW, Park IH, Liu JR, Kwak SS (1997) Comparison of catalase and other antioxidant enzyme activities in various plant cell lines. *Kor J Plant Tiss Cult* 23:157-160
17. Ahn YO, Choi YH, Kwon SY, Lee HS, Kim SW, Park IH, Kwak SS (1998) Free radical scavenging activity and ascorbate content in various plant cell lines. *Kor J Plant Tiss Cult* 25:289-293
18. Ahn YO, Kwon SY, Lee HS, Park IH, Kwak SS (1999) Biosynthesis and Metabolism of Vitamin C in suspension culture of *Scutellaria baicalensis*. *J Biochem Mol Biol* 32:451-455
19. Lee JE, Ahn YO, Kwon SY, Lee HS, Kim SW, Park IH, Kwak SS (2000) Glutathione contents in various plant cell lines. *Kor J Plant Tiss Cult* 27:(in press)