

고구마 배양세포에서 Peroxiredoxin cDNA의 분리 및 발현특성

박수영^{1,2}, 류선화¹, 권석윤¹, 김종국², 박상수^{1*}

¹한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ²경북대학교 미생물학과

Molecular Cloning and Characterization of a Peroxiredoxin cDNA from Cell Cultures of Sweetpotato

Soo-Young Park^{1,2}, Sun-Hwa Ryu¹, Suk-Yoon Kwon¹, Jong-Guk Kim², Sang-Soo Kwak^{1*}

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

²Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

ABSTRACT Peroxiredoxins (Prx) are a large family of peroxidases that reduce alkyl hydroperoxides and hydrogen peroxide. A cDNA clone (referred to as *swPrx1*) encoding a putative Prx was isolated from a sweetpotato cDNA library constructed from suspension-cultured cells, and its expression was investigated in terms of stress. The *swPrx1* contained an open reading frame (ORF) encoding mature protein of 193 amino acids with calculated molecular mass of 20.8 kDa. The predicted amino acid sequence of *swPrx1* has two conserved cysteines that are essential residues for the reduction of peroxides. It showed high amino acid sequence homology to Prx II F of *Arabidopsis* (77%) and putative Prx of rice (72%). RNA gel-blot analysis showed that *swPrx1* gene was expressed dominantly in leaves among intact tissues, and also highly detected in suspension-cultured cells. Interestingly, the level of *swPrx1* transcripts was almost the same regardless of the growth stage in suspension cultures. Furthermore, the transcription level of *swPrx1* gene was not significantly changed in response to various stress treatments such as wounding, extreme temperature and stress-related chemicals by RT-PCR analyses.

Key words: Cultured cells, environmental stress, *Ipomoea batatas*, peroxidase, peroxiredoxin

서 론

토양에 고착 생활하는 식물은 다양한 방어 메커니즘을 가짐으로써 외부환경변화에 대한 스트레스에 대응한다. 특히 환경스트레스 조건에서는 세포 내에 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등의 다양한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 이들은 세포 내에서 산화스트레스 (oxidative stress)를 유발한다 (Asada 1992). 과다한 ROS에 의한 세포의 산화스트레스는 질병에 걸리기 쉽게 되거나 세

포노화를 촉진하고 심할 경우는 세포사멸을 초래한다. 이러한 산화스트레스에 대응하기 위해 호기성 생물은 superoxide dismutase, catalase, peroxidase 등과 같은 항산화효소와 ascorbic acid 및 α -tocopherol 등의 저분자 항산화물질로 이루어진 항산화기구를 보유하고 있다 (Allen et al. 1997; Rao et al. 1997).

Peroxiredoxin (Prx)은 세균, 효모 및 동물 그리고 최근에는 식물에 이르기까지 모든 생물에서 발견되는 peroxidase의 한 종류로서, 세포에 유해한 과산화수소 (hydrogen peroxide), alkyl hydroperoxide 및 peroxinitrite 등을 기질로 사용하여 무독화시키는 기능을 하며, cofactor로서 금속이나 보결족을 가지지 않는 점에서 다른 peroxidase와 구별된다. Prx는 진화적으로 매우 보존된 motif에 하나 혹은 두 개의 특징적인 cysteine 잔기를 가지고 있으며, 이 들은 다시 네 개의 그룹으로 구분할 수

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

있다 (Dietz et al. 2002; Horling et al. 2002, 2003). 첫 번째 그룹은 1-Cys peroxidase (1-Cys Prx)으로 식물체에서 종자 휴면과 관련되어 있으며, 핵으로 이동하여 기능하는 것으로 알려져 있다 (Lee et al. 2000; Stacy et al. 1996). 2-Cys peroxidase (2-Cys Prx)은 2개의 cysteine 잔기를 가지는 그룹으로, 엽록체로 이동되어 산화스트레스로부터 광합성기구를 보호하는 기능을 한다 (Baier et al. 1997; Baier et al. 1999; Cheong et al. 1999). 세 번째 그룹은 type II peroxidase으로 효모, 배추, 애기장대 및 포플러 등에서 분리되었으며, 세포질, 엽록체 및 미토콘드리아로 이동되어 기능할 것으로 여겨진다. 네 번째 그룹은 Prx Q로 대장균의 bacterioferritin comigrating protein과 N-말단 아미노산 서열이 유사하다고 알려진 그룹이다 (Dietz et al., 2002).

식물 배양세포는 높은 산화스트레스 조건에서 배양되고 있다고 여겨져 식물 항산화기구의 연구 및 항산화물질의 생산에 좋은 재료로 간주된다. 저자들은 고구마 배양세포를 이용하여 guaiacol-type peroxidase (POD) 생산체계를 확립한 바 있으며 (Kwak et al. 1995), 이로부터 10종의 POD cDNA를 분리하여 그 발현특성을 보고한 바 있다 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999; Park et al. 2003). 특히 다양한 산화스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되는 *SWPA2* 프로모터를 개발하여 (Kim et al. 2003) 복합스트레스 내성 식물체 및 약리활성단백질 생산을 위한 산업용 세포주 개발에 이용하고 있다 (Choi et al. 2003). 본 연구에서는 고구마 배양세포로부터 다량의 퍼옥시다제 유전자를 분리하는 과정에서 얻어진 Prx 유전자 (*swPrxI*)의 분자특성과 스트레스에 대한 발현특성을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

본 연구에서 사용된 고구마 배양세포 (*Ipomoea batatas* L. Lam. cv. White Star)는 POD 고생산 세포주이다 (Kim et al. 1994; Kwak et al. 1995). 현탁배양세포는 14일 주기로 1 mg/L 2,4-D와 30 g/L sucrose가 함유된 LS (Linsmaier and Skoog 1965) 배지 50 mL이 들어 있는 300 mL Erlenmeyer flask에 세포생중량 1 g을 접종하여 100 rpm의 25°C 암상태에서 배양하였다. 실험에 사용된 현탁배양세포는 계대 후 0.5, 5, 11, 14, 20 일에 배양세포를 수확하여 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 고구마 식물체는 온실에서 1개월 자란 개체로 위에서 세 번째 잎을 스트레스 처리에 사용하였다. 미성숙 잎 (immature leaf)은 위로부터 첫 번째나 두 번째 잎으로 엽신이 완전히 퍼지지 않은 상태의 것으로 사용하였고, 성숙한 잎 (mature leaf)은 여섯 번째나 일곱 번째 잎으로 완전히 성숙하고 노화가 일어나지 않은 것을 사용하였다. 저온 및 고온처리에는 고체 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배

지에서 이식 후 한 달간 자란 식물체를 사용하였는데, 식물체의 계대는 1달 간격으로 2~3장의 잎을 포함하는 apical shoot을 자른 후 새로운 배지에 이식하는 방법으로 행하였고, 온실 및 기내 배양은 모두 25°C, 16/8시간 명기/암기 주기로 이루어졌다. 1개월 자란 기내 식물체의 크기는 12 cm 가량 되며 평균 8~10 개의 잎을 가진다.

POD probe 및 cDNA library 제작

보고된 POD 대사활성부위의 아미노산 서열 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999)로부터 2종류의 primer (5-CACTTCCAC GACTGCTTCGT-3, 5-ACGAAGCAGTCGTGGAAGTG-3)을 제작하고, cDNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 아래와 같은 조건으로 30 cycle로 수행하였고 (94°C 1분, 53°C 1분, 72°C 1분), 450~1,000 bp 길이의 5종의 PCR반응물을 pGEM-T easy vectors (Promega, WI, USA)에 클로닝하였다. 각 클론의 염기서열을 확인한 결과, 모두 보고되어 있는 POD 염기서열의 일부임을 확인하였고 이후 cDNA library의 스크리닝을 위한 probe로 사용하였다 (Park et al. 2003).

cDNA library는 배양 후 20일 된 현탁배양세포로부터 total RNA를 분리하고, 이로부터 poly(A)+RNA를 얻어 ZAP-cDNA synthesis kit (Startagene, CA, USA) 및 Uni-Zap XR vector 를 이용하여 제작하였다. 위의 probe를 이용하여 3차에 걸친 스크리닝 후, 공급자의 매뉴얼에 따라 positive clone을 phagemid 형태로 분리하고 염기서열을 결정하였다.

Southern 및 northern 분석

고구마의 genomic DNA는 Dellaporta 등 (1983)의 방법으로 callus로부터 추출하여 *EcoRI*, *HindII*, *HindIII* (Roche, Mannheim, Germany) 3종의 제한효소로 처리한 후, 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동하고 Zeta-probe GT membrane (Bio-Rad, CA, USA)에 blotting 하였다. Blot은 Prx cDNA의 3-untranslational region (UTR) 부분에 특이적인 ³²P-labeled probe와 hybridization 하였다. Hybridization은 65°C 하에 0.5 M sodium phosphate (pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA 조건으로 수행하였다. Northern 분석을 위한 RNA는 식물체로부터 LiCl법 (Naqvi et al. 1998)으로 추출하여 사용하였으며, 70°C에서 15분간 열처리로 변성 후 50% formamide, 2.2 M formaldehyde를 포함하는 용액에서 전기영동하고 Zeta-probe GT membrane에 blotting 시켰다. Hybridization 조건은 Southern 조건과 같다.

스트레스 처리

상처 및 화학적 처리를 위한 식물체는 온실에서 한 달간 자란 개체를 이용하였다. 상처는 위에서 세 번째 식물체 잎을 needle puncher로 눌러 처리하였고 (Huh et al. 1997), methyl

viologen (MV, paraquat)은 0.125% Triton-X 100 용액에 50 μ M 농도로 녹여 전체 식물체에 분사하여 처리하였다 (Kwon et al. 2002). H₂O₂ (440 mM), NaCl (100 mM), abscisic acid (ABA, 100 μ M), salicylic acid (SA, 100 μ M), methyl jasmonate (MeJA, 100 μ M) 처리는, 위로부터 세 번째의 잎을 채취하여 각각의 처리 용액 30 mL을 담은 50 mL Falcon tube에 25°C에 48시간 동안 처리하였다. H₂O₂와 NaCl 처리에 대한 대조구로는 멸균수를 사용하였고, ABA, SA 및 MeJA 처리에는 0.1% DMSO 용액을 대조구로 사용하였다. 저온 및 고온처리에는 MS 기본배지에서 한 달간 자란 기내 배양식물체를 이용하였는데, 기내 생육 조건에서 나타나는 Prx 유전자의 발현을 조사하기 위함이었다. 저온처리는 4°C에서 48시간 동안, 고온처리는 37°C에서 12시간 동안 노출하였고 처리종료 후 바로 액체질소에 얼려 -70°C에 보관하였다.

병원균 처리

병원균 처리에 사용된 세균은 *Pectobacterium chrysanthemi* (KCTC 2569)로, 고구마 줄기 및 뿌리에 무름병을 유발시키는 것으로 알려져 있다 (Clark and Moyer 1988). 9장의 직경 18 mm인 고구마 잎 절편에 1.3 × 10⁴ cell/mL이 되도록 멸균 증류수로 희석한 배양액을 접종한 후, 총 RNA를 분리하여 northern 분석에 사용하였다.

RT-PCR 분석

본 연구에서는 고구마 *swPrxI* 유전자의 mRNA 발현을 보기 위해 RT-PCR kit (Gibco BRL, Eggenstein, Germany)을 사용하였다. 2 μ g의 RNA를 역전사시켜 cDNA를 합성 후, *swPrxI*에 특이적인 primer를 이용하여 유전자의 3'-UTR 부분을 증폭하는 과정은 모두 공급자 매뉴얼에 따라 수행하였다. 시료 mRNA량을 보정하기 위한 내부 대조구로서는 actin을 사용하였다. PCR 반응은 총 0.2 μ L의 반응액 (약 20~40 ng RNA) 내에, 역전사된 mRNA와 1.5 μ L의 5 mM MgCl₂, 5 μ L의 10X PCR-buffer, 1 μ L의 10 mM dNTP mix, 1 μ L의 sense 및 anti-sense primer (각 10 pmole), 1 μ L의 Taq DNA polymerase (1 U/ μ L), 그리고 증류수를 포함하였다. PCR 증폭은 94°C, 5분을 개시로, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 25 cycle 조건으로 하였고, 결과 반응물 (20 μ L)은 1~1.5% agarose 상에서 전기영동으로 확인하였다.

PCR을 위한 *swPrxI* 유전자 특이적인 primer는 3'-UTR 부분 내에서 디자인하였고, sense primer (5'-TTAATAATGAACTTTTGCTA-3) 및 antisense primer (5'-ACTAGCTAATGTTTTCTTCA-3)를 이용한 PCR에서 *swPrxI* 3'-UTR 내의 180 nucleotide (nt) 길이의 산물을 생성하였다.

DNA 및 단백질 서열분석

결정된 염기서열을 Blast 분석하고 (<http://www.pdrc.re.kr>), 다중 염기배열의 비교는 Clustal X와 Genedoc 프로그램을 이용하여 수행하였다. 단백질의 등전점 (pI), 분자량, signal peptide 등의 추측을 위해, ExPasy (<http://www.expasy.org/tools/>)와 PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)를 사용하였다.

결과 및 고찰

swPrxI 유전자의 분리

고구마의 현탁배양세포로부터 제작된 cDNA library를 5개 probe로 스크리닝한 결과, library로부터 1 kb가 넘는 positive clones을 218개 확보하였다. 각 positive clone들에 대한 염기서열에 대한 blast 검색 결과, 그 중에서 20개는 POD 유전자와 높은 상동성을 나타냈고, 1개는 ascorbate peroxidase (APX), 그리고 1개는 Prx 유전자를 코드하는 것으로 나타났다 (Park et al. 2003). 분리된 Prx cDNA는 *swPrxI*로 명명하고 본 연구에서는 *swPrxI* 유전자에 대해서만 기술하였다.

swPrxI cDNA는 866 bp 길이로, 193개 아미노산으로 번역되는 ORF를 가지고 있으며 분자량은 20.8 kDa, pI 값은 8.7으로 추정되었다. *swPrxI*는 81번과 106번 아미노산 잔기에 진화적으로 보존된 cysteine을 가지고 있었다 (Figure 1). 유추한 아미노산 서열을 NCBI에서 제공하는 Blastx 프로그램을 이용하여 등록된 단백질의 아미노산 서열과 상동성 비교를 한 결과 (Altschul et al. 1990), 식물체의 type II Prx 및 박테리아에서 유래한 Prx와 상동성 그룹을 형성하였다 (Figure 2). 그 중 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 Prx II F (At3g06050)와는 77% (유사도 86%), 벼 (*Oryza sativa*)의 Prx (BAA88530)와는 72% (유사도 81%), *Brucella melitensis*의 Prx (gi 17987739)와는 45% (유사도 59%), *Agrobacterium tumefaciens*의 Prx (NP 531479)와는 43% (유사도 58%)의 상동성을 나타내었다 (Figure 2). 애기장대의 Prx II F 및 벼의 Prx와 동일하게 *swPrxI* 단백질은 미토콘드리아로 targeting될 것으로 예상되는 signal sequence (35번 아미노산 잔기)를 가지고 있어 미토콘드리아에서 과산화물의 무독화를 담당할 것으로 여겨진다.

swPrxI 유전자의 Southern 분석

고구마 게놈상에 *swPrxI* 유전자의 copy 수를 확인하기 위해, *swPrxI*의 3'-UTR에 위치하는 특이적인 염기배열을 probe로 사용하여 Southern 분석을 수행하였다 (Figure 3). 배양세포로부터 분리한 genomic DNA를 EcoRI, HindIII, HindII로 처리하고, 혼성화반응 및 washing은 high stringency 조건으로 수행하였다. Autoradiography 결과, 각 제한효소 lane별로 3개 및 2

개의 hybridizing band가 확인되어, 고구마 *swPrxI* 유전자가 고구마 genome에 하나 이상 존재한다는 것을 나타내었다. 하지만 각기 진화기가 다른 band들이 *swPrxI*의 multigene family를 나타내는 것인지 아니면 고구마 게놈 상에 *swPrxI*와 매우 밀접하게 연관된 다른 단백질의 존재를 나타내는 것인지는 좀 더 깊은 연구를 통해서 밝혀질 수 있을 것이다. 배추의

CPrxII 유전자 역시 배추 게놈에 multigene family로 존재하고 있음이 보고되었다. (Choi et al. 1999).

조직 및 발달기간 동인의 *swPrxI* 유전자의 발현

고구마 식물체 잎 (leaf, L), 줄기 (stem, S), 뿌리 (non-storage root, R), 저장뿌리 (storage root, SR)와 현탁배양세포 (suspension cells, Su)에서의 *swPrxI* 유전자의 발현을 northern 분석을 통해 확인하였다 (Figure 4A). *swPrxI* 유전자는 식물체 조직 중 잎에서 가장 강하게 발현하였고 뿌리조직에는 약하게 발현하였으나 줄기에서는 거의 발현되지 않았다 (Figure 4A). 애기상태의 type II Prx는 녹색조직에서 발현되며, *swPrxI*과 상동성이 높은 Prx II F는 뿌리에서도 발현이 확인되었다 (Holling et al. 2002, 2003). 그러나 20일간 현탁배양된 세포에서는 잎에서의 수준과 유사한 정도의 발현량을 확인할 수 있었는데 이는 같은 고구마 현탁배양세포에서 분리된 guaiacol-type POD 나 APX가 현탁배양세포에서 매우 강한 발현을 보이는 것과 대조적이었다 (Park et al. 2003).

swPrxI 유전자가 식물체의 발달과정에 관여하는지의 여부를 조사하기 위해 미성숙 잎과 성숙한 잎에서의 발현양상을 RT-PCR 분석으로 확인하였다. 미성숙 잎 (immature leaf, IL)은 엽신이 완전히 퍼지지 않은 상태의 잎을 사용하였고, 성숙한 잎 (mature leaf, ML)은 완전히 자란 잎을 취하였다. Figure 4B에서 보이는 것처럼, 미성숙 잎에서보다는 성숙한 잎에서 *swPrxI* 유전자의 mRNA가 좀더 많이 발현하고 있음을 알 수 있었고, 또한 미성숙 잎 단계에서도 상당한 발현을 이미 보



Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of Prx cDNA, *swPrxI*, from sweetpotato. The conserved cysteine residues are indicated by letters within black box and putative polyadenylation signal (AATAAT) is typed in italics. The sequences of gene-specific primer sets for RT-PCR were marked by arrows. The nucleotide sequence of *swPrxI* has been submitted to the GeneBank database under accession number AY206408.

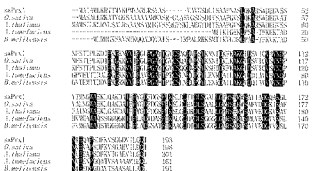


Figure 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of *swPrxI* with those of Prx genes from other plants. The conserved residues are indicated by closed box. Sequence data were obtained from GeneBank listed and aligned using ClustalX and GeneDoc. (Genebank accession numbers of peroxidases are as follows; A13G06050 for *Arabidopsis*, BAA88530 for rice, gil7987739 for *Brucella*, NP_531479 for *Agrobacterium*).

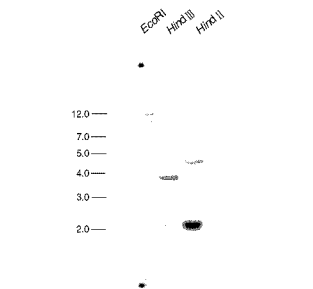


Figure 3. Genomic Southern analysis of *swPrxI* gene from sweetpotato. Equal amounts (10 µg) of DNA were digested with the restriction enzymes *EcoRI*, *HindIII* and *HindII*, fractionated by electrophoresis, transferred onto a Zeta-probe GT membrane and probed with ³²P-labeled gene-specific DNA fragments.

고 있는 것으로 보아서 이 *swPrx1* 유전자는 잎의 발달 단계 초기부터 성숙에 이르기까지 전 단계에서 발현하고 있음을 나타내었다.

보통 기내 배양되는 세포는 물리적인 스트레스 및 영양분의 고갈 등에 기인한 강한 산화스트레스에 놓여지게 되고 이때 배양세포는 superoxide dismutase, peroxidase 등의 항산화효소 유전자의 발현이 강하게 유도된다 (Kwak et al. 1995; Huh et al. 1997). 하지만 현탁배양 기간 동안 *swPrx1* mRNA는 배양 초기에서 말기까지 거의 변화 없는 항상적 발현을 나타내었다 (Figure 4C). 이는 보통의 peroxidase 그룹이 배양초기에서 말기로 갈수록 그 발현이 비약적으로 유도되는 것 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999)과는 대조적인 흥미로운 결과이다.

스트레스 처리에 대한 *swPrx1* 유전자의 발현

상처, 저온, 고온, 그리고 스트레스 관련 화학물질 등을 사용하여 여러 가지 조건의 스트레스에 대한 *swPrx1*의 발현양상을 RT-PCR을 통해 조사하였다. 실험계는 세 그룹으로 나누어서, 상처와 MV처리를 위해서는 온실에서 자란 식물체를 사용하였고 (Figure 5A), 저온 및 고온처리에는 기내에서 자란 식

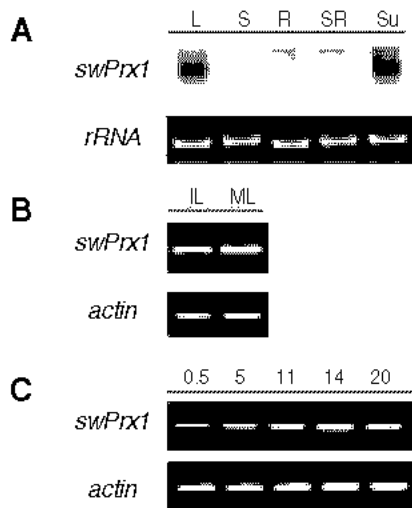


Figure 4. Expression patterns of *swPrx1* gene in various intact tissues and cultured cells of sweetpotato by northern analysis and RT-PCR. (A) Transcription levels of *swPrx1* in leaves (L), stems (S), non-storage roots (R), storage roots (SR) and suspension-cultured cells (Su). 20 μ g total RNA were electrophoresed in each lane, transferred onto Zeta-probe GT membrane and probed with 32 P-labeled gene-specific DNA fragments. (B) mRNA transcription levels in immature leaves (IL) and mature leaves (ML). The first or second from the top, un-expanded leaves were sampled as immature leaves, and fully expanded, maximum sized leaves as mature leaves. (C) Changes in the transcript levels of *swPrx1* in suspension cultures of sweetpotato during cell growth. RNA was extracted 0.5, 5, 11, 14 and 20 days after subculture (DAS). Reverse transcription of 1-2 μ g total RNA was carried out and conventional PCR amplification reactions were followed using gene-specific primers. Actin was used as a control for equal loading. Reaction products (20 μ L) were analyzed by gel electrophoresis.

물체 (Figure 5B), H_2O_2 , NaCl, ABA, SA 그리고 MeJA 처리를 위해서는 식물체의 잎줄기 부분을 절단하여 시험액에 담겨서 수행하였다 (Figure 5C).

상처에 따른 잎에서의 *swPrx1*의 발현은 처리 후 0, 12, 40, 72시간대로 조사되었다. 상처는 외부로부터 병원체가 감염 시, 식물체 내로 진입하는데 유용한 통로가 되므로 병원체 침입에 대한 일차적인 지표가 된다고 알려져 있다. *swPrx1*는 상처 처리에 따라 아주 미약하게 발현이 증가하는 것을 보였고, 이는 제초제인 MV 처리에서도 유사하게 나타났으며, MV 처리에서는 처리 후 48시간에 약하지만 가장 많이 유도되는 것을 확인할 수 있었다. 활성산소종을 발생시키는 MV에 대한 *swPrx1* 유전자의 발현이 민감하게 나타나지 않은 것은, *Riccia fluitans*에서 MV 처리시에 2-CP (2 Cysteine Prx) 유전자의 발현이 아주 미약하게 증가한 결과 (Horling et al. 2001)와 동일한 것으로 이는, 세균에서 homologue인 2-CP AhpC가 H_2O_2 나 butyl hydroperoxide에 대해 매우 강하고 민감한 반응을 보인

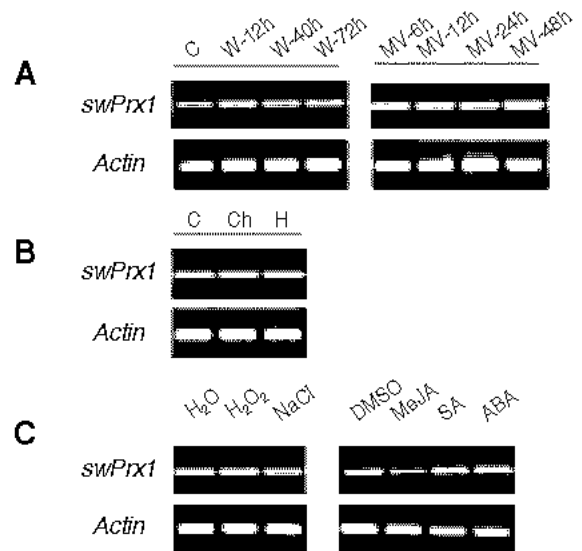


Figure 5. RT-PCR analysis of *swPrx1* transcript in response to various stresses. A, Effects of wounding (W) and methyl viologen (MV) treatments on the transcription level of *swPrx1* gene in leaves of sweetpotato plants. The third leaves from the top were wounded by pressing with a needle puncher for wounding treatment, whereas a 50 μ M MV in 0.125% Triton-X 100 solution was sprayed onto whole plants for MV treatment. RNA was extracted from leaves 0, 12, 40 and 72 h after wounding treatment, whereas RNA was extracted from leaves 0, 6, 12, 24 and 48 h after MV treatment; B, Induction of *swPrx1* gene in leaves of *in vitro* cultured plants subjected to chilling (Ch) and heating (H) stress. Plants were exposed at 4°C for 48 h and 37°C for 12 h for chilling and heating stress treatments, respectively. Control plants (C) were culture at 25°C; C, Expression of *swPrx1* gene in detached leaves with petioles of sweetpotato plants were exposed to various stress-related chemicals. Excised leaves with petioles were incubated in the presence of H_2O_2 (440 mM), NaCl (100 mM), ABA (100 μ M), MeJA (100 μ M) for 48 h. Distilled water (H_2O) for H_2O_2 and NaCl treatment and 0.1% DMSO (DMSO) for ABA and MeJA treatment were treated as a control. Reverse transcription of 1-2 μ g total RNA was carried out and conventional PCR amplification reactions were followed using gene-specific primers. Actin was used as a control for equal loading.

것 (Morgan et al. 1985)과는 대조적으로 흥미로운 결과이다.

기내 배양된 식물체를 4°C와 37°C 처리시에 *swPrxI* mRNA의 발현을 조사한 결과, 이 유전자는 저온이나 고온처리에 대해 발현이 영향을 받지 않는 것으로 나타났다 (Figure 5B). 온실에서 자란 대조구 잎 (Figure 5A의 대조구 C)에 비해서 고체배지에서 자란 기내배양 식물체의 잎 (Figure 5B의 대조구 C)에서 *swPrxI* 유전자가 좀 더 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 비록 그 영향이 크지는 않더라도 기내 환경에 대해 *swPrxI* 유전자가 약하게 발현이 증가함을 나타내는 것이다. 그러나 저온이나 고온과 같은 온도 스트레스는 역시 체내에서 활성산소종을 유발시키는 요인임에도 불구하고 *swPrxI*은 이에 대해 발현이 거의 증가됨을 보이지 않았다 (Murata et al. 1992).

식물체로부터 잎자루 부분에서 잘라 나온 잎을 대상으로 여러 가지 화학물질을 처리하여 본 결과, H₂O₂ (440 mM)나 NaCl (100 mM), ABA (100 μM), SA (100 μM), MeJA (100 μM) 등에 대해 *swPrxI* 유전자는 전혀 발현에 증가를 보이지 않았다 (Figure 5C). 이들 물질들은 식물체내에서 직접 혹은 간접적으로 여러 종류의 항산화효소를 발현유도시키는 것으로 보고되어져 있는데 이들 물질 처리에 대한 *swPrxI* 유전자의 발현양상은 위의 다른 스트레스 처리 결과들과 마찬가지로, 이 유전자가 환경적인 스트레스 요인에 대해 민감하게 반응하지 않는다는 것을 보여주는 것이다. *swPrxI*과 마찬가지로 미토콘드리아로 이동되는 signal peptide를 가진 애기장대의 Prx II F 유전자도 50 mM의 NaCl 처리 및 high light 처리에 의해 발현 변화가 나타나지 않았는데 (Horling et al. 2002, 2003), 이는 이들의 발현이 외부적인 산화스트레스에 의해 변화되지 않음을 나타낸다.

병원균 처리에 대한 *swPrxI* 유전자의 발현

여러 가지 비생물적 환경요인뿐만 아니라, 식물체는 환경으로부터 다양한 병원균과 감염균에 대해 노출되어 있고 이러한 생물적 요인 또한 식물체 내에서 산화적인 스트레스를 유발시킨다. 이에 대해 식물은 다양한 종류의 항산화효소를 이용하여 병원균의 감염에 저항하는데 본 연구에서는 고구마에 무름병을 유발하는 병원균 *P. chrysanthemi*를 이용하여 *swPrxI* 유전자의 발현양상을 조사하였다. 고구마 잎 절편에 세균 배양액을 접종하고, 처리 후 20시간에서의 *swPrxI* 유전자 발현 분석을 위해 northern 분석을 행하였는데, 병원균 처리 시도 이 유전자는 다른 비생물적 요인에 대한 반응과 마찬가지로 발현량의 변화가 거의 관찰되지 않았다 (결과 미제시).

계놈 정보가 확인된 *Arabidopsis*의 경우 계놈 내에 모두 10개의 Prx 유전자가 확인되었으며, 이 중 8개의 유전자가 발현되는 것으로 확인되었다 (Dietz et al. 2002; Horling et al. 2002, 2003). 식물체의 환경스트레스에 대한 적응과정에서 이들의 역할에 대한 연구가 진행되고 있으나, 각 Prx 유전자의 생체

내 기능에 대한 연구는 개개 유전자의 과발현 또는 knock-out mutant를 제작하고 이 형질전환식물체를 대상으로 수행하여야 할 것이다.

본 연구에서 고구마 배양세포에서 처음으로 Prx 유전자를 분리하여 유전자 발현분석을 수행 한 결과, 분리한 *swPrxI* 유전자는 식물체와 배양세포에서 발현되었으나 외부스트레스에 의해 발현이 거의 영향을 받지 않는 것으로 미루어 보고된 애기장대의 Prx II F와 가장 유사한 특징을 나타내었음을 알 수 있었다. *swPrxI* 유전자가 생체내 산화스트레스에 대해 직접적으로 관여하는 것인지 다른 기능을 가지는지에 대해서는 자세한 연구가 요구된다.

적 요

Peroxiredoxin (Prx)은 알킬 과산화물 및 과산화수소를 환원시키는 퍼옥시다제의 한 그룹으로 모든 생물체 내에서 sulfhydryl 잔기로부터 peroxide로 전자를 전달하는 역할을 수행한다. 본 연구에서는 고구마 현탁배양세포에서 제작한 cDNA library로부터 Prx를 코딩하는 cDNA를 분리하여 *swPrxI*로 명명하고 스트레스 관점에서 발현 특성을 조사하였다. *swPrxI* cDNA는 193개 아미노산 잔기로 번역되는 ORF를 가지며, 단백질의 분자량은 20.8 kDa로 추정되었다. *swPrxI* cDNA로부터 유추한 아미노산 배열 분석결과, 이 유전자가 peroxide 환원에 필수적이며 진화적으로 보존된 두 개의 cysteine 잔기를 가지고 있었다. *swPrxI* cDNA가 코딩하는 아미노산 서열은 *Arabidopsis*의 Prx II F 및 벼의 Prx와 각각 77%, 72%의 상동성을 보였다. Northern 분석을 통해 *swPrxI* 유전자는 식물체 조직 중 잎에서만 발현되었고 현탁배양세포에서도 역시 발현되는 것을 확인하였다. 흥미롭게도 *swPrxI* 유전자는 현탁세포 배양시기에 관계없이 발현은 거의 일정하였다. 그리고 RT-PCR 분석결과, 잎 조직을 대상으로 상처, 온도변화, 스트레스 관련 화합물 처리에 의해 *swPrxI* 유전자의 발현은 거의 변화하지 않았다. 따라서 *swPrxI* 유전자는 선행의 몇몇 연구보고 결과처럼 산화스트레스에 대한 방어 메커니즘에 직접 관여하기보다는 생체 내에서 다른 기능을 가질 것으로 생각되나, 추후 자세한 연구가 요구된다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업 (CGM0300111)과 전남대학교 농업식물스트레스연구센터의 연구비 지원의 결과이다.

인용문헌

Allen RD, Webb RP, Schake SL (1997) Use of transgenic plants to

- study antioxidants defenses. *Free Rad Biol Med* 23: 473-479
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxidase-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235-241
- Baier M, Dietz KJ (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS 1 is a nuclear encoded chloroplast protein. Its expressional regulation, phylogenetic origin and implications for its specific physiological functions in plants. *Plant J* 12: 179-190
- Baier M, Dietz KJ (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis: evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 119: 1407-1414
- Choi YO, Cheong NE, Lee KO, Jung BG, Hong CH, Jeong JH, Chi YH, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of chinese cabbage and its comparison to 2Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant. *Biochem Biophys Res Commun* 258: 768-771
- Cheong NE, Choi YO, Lee KO, Kim WY, Jung BG, Chi YH, Jeong JS, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2-Cys peroxiredoxin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol* 40: 825-834
- Choi SM, Lee OS, Kwon SY, Kwak SS, Yu DY, Lee HS (2003) High expression of a human lactoferrin in transgenic tobacco cell cultures. *Biotech Lett* 25: 213-218
- Clark CA, Moyer JW (1988) Compendium of sweet potato diseases. APS Press, St Paul pp 74
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) Maize DNA minipreps. *Maize Genet Coop Newslett* 57: 26-29
- Dietz KJ, Horling F, Konig J, Baier M (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot* 53: 1321-1329.
- Horling F, Baier M, Dietz, KJ (2001) Redox-regulation of expression of peroxide-detoxifying chloroplast 2-Cysteine peroxiredoxin in liverwort *Riccia fluitans*. *Planta* 214: 304-313
- Horling F, Konig J, Dietz KJ (2002) Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiol Biochem* 40: 491-499
- Horling F, Lamkemeyer P, Konig J, Finkemeier I, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ (2003) Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 317-325
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidase from suspension-cultured cells of sweetpotato and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Genet* 255: 382-391
- 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 sweetpotato. *Mol Gen Genet* 261: 941-947
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Kwak SS (2003) 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 SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *J Biochem Mol Biol* 27: 132-137
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR (1995) Acidic peroxidases from suspension-cultures of sweetpotato. *Phytochemistry* 39: 961-984
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerance 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 KO, Jang HH, Jung BG, Chi YH, Lee JY, Choi YO, Lee JR, Lim CO, Cho MJ, Lee SY (2000) Rice 1Cys-peroxiredoxin overexpressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. *FEBS Lett* 486: 103-106
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18: 100-127
- Morgan RW, Christman MF, Jacobson FS, Storz G, Ames BN (1985) Hydrogen peroxide induced proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat-shock and other stress proteins. *Proc Natl Acad Sci* 83: 375-379
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Murata N, Ishizaki N, Hayashi H, Tasaka Y, Nishida I (1992) Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* 356: 710-713
- Naqvi SM, Park KS, Yi SY, Lee HW, Bok SH, Choi DI (1998) A glycine-rich RNA-binding protein gene is differentially expressed during acute hypersensitive response following tobacco mosaic virus infection in tobacco. *Plant Mol Biol* 37: 571-576
- 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 Gen Genomics* (in press)
- Rao MV, Paliyath G, Ommrod DP, Murr DP, Watkins CB (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂ metabolizing enzymes. *Plant Physiol* 115: 137-149
- Stacy RAP, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen RB (1996) A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Mol Biol* 31: 1205-1216