

〈총설〉

딸기 항산화효소 Ascorbate Peroxidase의 기능과 특성

김 인 중

제주도 제주시 제주대학로 66 제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부

ABSTRACT

Ascorbate peroxidase (APX) is a hydrogen peroxide-scavenging enzyme by use of ascorbate (vitamin C) as a electron donor. Hydrogen peroxide is a reactive oxygen species (ROS). Plant APX protects the chloroplast, glyoxysome, peroxisome and cytosol against ROS attacks including hydrogen peroxide, and plays important roles in the signal transduction of internal or external stress into cell. This study indicated that APX relates with the aging and fruit ripening in strawberry, an economic crop. Generally, the cultivated strawberry cultivar is a octoploidy containing eight set of genome, which leads the difficulties on the genetic analysis. Strawberry APX (ApxSC) is composed of several copies in the genome resulted from polyploid. The gene was dominantly expressed in the fruit compared to other tissues and was differentially expressed according to the ripening in the transcription level. The isolated genomic DNA is composed of 10 exons and 9 introns. The promoter region contained TATA and CAAT boxes, whcih is generally observed in other gene promoters. Several putative cis-elements such as ethylene-responsive element, heat shock element, and repetitive region were observed. These elements might be involved in the regulation of the expression of

APX gene and affect on the removing the toxic peroxide such as hydrogen peroxide according to the fruit ripening

딸기현황

딸기의 국내생산량은 세계 7위(18만톤, 2000년)를 차지할 정도로 경제적으로 매우 중요한 과채류로서, 과일 중에서 비타민C 함량이 가장 높은 특징을 나타낸다. 즉, 100g 당 80mg 정도의 비타민 C를 함유하고 있어서 사과보다 10배, 귤보다는 1.5배 정도 함량이 많다. 우리나라의 경우 거의 모든 딸기가 하우스 재배를 통해 생산되지만, 예외적으로 제주도의 경우에는 대부분 노지재배 형태로 생산되고 있는 특이성을 가지고 있다. 몇 년 전만 하더라도 제주도의 경우 딸기 생산이 극히 미미하였으나, 단위면적당 평균소득이 다른 작물에 비해 높아 재배면적이 증가추세에 있다. 최근에는 따스한 기후로 인해 겨울철 난방비가 타시도에 비해 적게 들어, 하우스를 이용한 겨울과 초봄에 걸친 딸기 생산이 급격히 증가하고 있다. 또한 제주도농업기술센터를 중심으로 조촉성재배 기술이 개발되어 11월 하순부터 딸기수확이 가능해져 새로운 소득작물로 대두되고 있다.

현재 재배되고 있는 딸기(*Fragaria* × *ananassa* Duch.)의 품종은 대부분 일본에서 도입한 품종으로서, 로얄티지급 등으로 인해 국내육성 품종의 개발이 무엇보다 요구되는 시점에 와있고, 충남딸기시험장에 의해 '매향'이라는 품종이 육성되어

* Corresponding author : Kim In Joong Faculty of Biotechnology College of Applied Life Sciences Cheju National University 66 Jejudaeakno, Jeju, 690-756, Korea.

농가에 보급 중에 있다. 이 품종은 도치노미네/아키히메를 교배하여 얻은 품종이며, 2001년도에 품종등록되었다. 그리고 1970년대에 들어서 분자생물학과 생화학 기술의 발달로 인해 외래 유전자 도입에 의한 생명공학기법으로 특정형질을 개량한 품종을 개발하고자 하는 연구도 활발히 진행되고 있으며, 몇몇의 가지적 성과도 보고되고 있다. 이러한 생명공학기법을 이용한 품종을 개발하기 위해서는 무엇보다 특정형질에 관여하는 유용유전자의 확보와 이들을 발현시키기 위한 효율이 높은 프로모터의 개발, 형질전환기술의 확보 등이 선행되어야 한다.

딸기의 과육(fruit)은 형태 및 발생학적으로 씨가 있는 수과(achene)과 대부분의 부피를 차지하는 화탁(receptacle)으로 이루어져 있으며, 발생학적으로 보았을 때, 수과부위가 과일이며, 화탁으로부터 발생한 과식부위는 과일이 아니다. 그러나 실제로는 과일(fruit)이 아닐지라도 보통 과육 과일(fleshy fruit)이라고 불리우며, 일어나는 생리적 현상도 비슷하다고 알려져 있다. 이와 같은 딸기의 과육은 다른 조식과는 다른 특이적인 형태의 변화와 특징적인 숙성(ripening)이라는 생리적 변화를 겪는다.

유해활성산소 (Reactive Oxygen Species)

과일의 성숙에 관여하는 유전자 중 독성을 나타내는 유해활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)로부터 식물세포를 보호하는 항산화효소를 암호화하는 유전자가 알려져 있으며, 딸기의 경우에도 Ascorbate peroxidase(APX)가 보고되었다. 과산화수소와 같은 ROS는 생물이 산소를 생명활동에 필수적으로 사용함으로써 생기는 부산물로서, 식물세포의 경우 엽록체와 미토콘드리아에서의 전자전달, 산화-환원반응에 관여하는 효소에 의해 생성된다 (Fryer et al., 2002). 생성된 ROS는 식물세포의 물질대사, 성장, 발달 등에 관여하는 중요한 대사산물로서, 이들의 생성은 강한 빛과 건조, 중금속, 극한온도, 자외선 조사, 오존 등의 공기오염물질, 물리적·생리적 스트레스, 병원균

감염 등에 대한 노출에 의해 유도된다. 따라서 ROS는 대부분의 스트레스 반응에 관여하고, 매우 반응성이 커서 과도하게 축적될 경우 효소의 불활성화, 세포막의 손상 등이 유도된다. 따라서 ROS의 생산과 분해는 정상 세포내에서 균형이 이루어지도록 매우 엄격하게 조절된다(Figure 1). 생성된 ROS로부터 식물세포를 보호하기 위한 여러 기작이 존재한다. 글로타티온, ascorbate(비타민 C), 토코페롤 등과 같은 비효소성 항산화물질의 합성이 증가되거나 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione reductase(GR), ascorbate peroxidase, 다양한 peroxidase, catalase 등의 항산화효소가 증가한다 (Zimmermann et al., 2005). APX는 과산화수소에 의한 ascorbate(비타민 C)의 산화를 촉매하는 효소로서, 두 분자의 monodehydroascorbate(MDA) 자유기를 형성하는 역할을 담당하고 있다. APX는 식물세포 내에서 다양한 형태로 존재하며, 엽록체 스트로마의 틸라코이드에 결합되어 있는 종류, 스트로마에 존재하는 종류, 세포질의 용해되어 있는 상태로 존재하는 것, 세포질막에 결합되어 있는 종

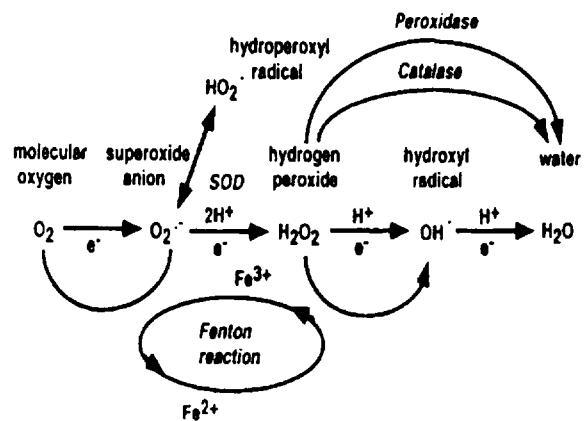


Figure 1. Interconversion of ROS derived from molecular oxygen. Superoxide anion and hydrogen peroxide is less toxic than hydroxyl radical and hydroperoxyl radical. Although the hydrogen peroxide and superoxide anion radical is toxic to cell, major toxicity of these molecules is resulted from the production of hydroxyl radical and hydroperoxyl radical. Various antioxidave enzymes contribute to the ROS production and scavenging(Allen, 1997).

류 등의 다양한 isoform이 알려져 있다. 이들 isoform은 분자량, 기질특이성, 적정 pH, 안정성 등의 다양한 면에서 특성이 다르다(Shigeoka., 2002).

식물 APX 유전자

cDNA 수준에서 완두콩, 애기장대, 시금치, 콩, 호박, 고추, 보리, 밀, 질경이, 감자, 알파파, 솔잎국화(ice plant), 쌀, 토마토 등의 다양한 식물체로부터 세포질성 및 엽록체성, 퍼옥시좀성 APX 유전자가 분리되었고(Pereira et al., 2005; Teixeira et al., 2006), 계놈 구조는 완두콩, 애기장대, 딸기 등에서 보고되었다(GenBank accessible).

APX 발현을 강화한 형질전환식물체

앞서 설명한 바와 같이 식물체내 APX 활성은 ROS 형성을 증가시키는 여러 가지 환경요인에 의해 영향을 받는다고 알려져 있다. 즉 기체성의 오염물질, 극한의 온도, 병원균 감염, 노화, 과일성숙 등에 의해 그 활성이 증가된다. 담배를 이용하여 세포질성 또는 엽록체성 APX의 발현을 증가시킨 결과 효소 활성이 각각 3배와 16배가 증가되었다(Allen et al., 1997). 이러한 활성 증가는 화학물질에 의한 산화스트레스와 광산화 스트레스에 저항성을 부여하였고, 이것은 세포질과 엽록체내의 과산화수소 제거가 증가된 결과로 일어난 것으로 해석되었다. 그 외에도 superoxide dismutase의 유전자를 발현시킨 담배식물체에서 APX의 발현이 유도되는 현상도 발견되었다(Van camp et al., 1996)

딸기 APX 유전자(ApxSC)의 분리

APX의 딸기 과일 내 생리적 기능을 분자수준에서 분석하기 위해 먼저 딸기 과일로부터 제작한 cDNA library를 이용하여 APX를 암호화하는 유전자(cDNA)를 분리한 결과, 250개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하였다(GenBank accession No. AF039953). cDNA의 구조는 전형

적인 cDNA에서 관찰되는 것처럼 5'-UTR과 3'-UTR의 존재가 관찰되었다(Kim and Chung, 1998a). 분리된 cDNA에서는 APX가 엽록체로 운반되는데 필요한 transit peptide가 관찰되지 않아 분리된 cDNA는 세포질 isoform의 APX를 함유하고 있다고 결론지었다. 이들 cDNA는 담배에서 분리된 APX와 88%, 고추와는 88%의 상동성을 나타내었고(Table 1), APX의 효소활성에 중요하게 작용하는 3개의 아미노산(His, Asp, Trp)이 보존되어 있는 것을 확인하였다.

Table 1. Homology search of nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of ApxSC to those of other plant cytosolic APX(Kim, 1998).

Species	Nucleotide	Amino acid
<i>Pisum sativum</i>	626/760(82%)	218/250(87%)
<i>Glycine max</i>	622/758(82%)	218/250(87%)
<i>Nicotiana tabacum</i>	612/757(80%)	222/250(88%)
<i>Zea mays</i>	595/755(78%)	216/250(86%)

딸기 ApxSC 유전자의 발현

전사(RNA) 수준에서 조직별 ApxSC 유전자의 발현을 분석한 결과 잎, 엽병, 뿌리, 종자 등에 비해 과일에서 5배정도 강하게 발현하고 있음을 확

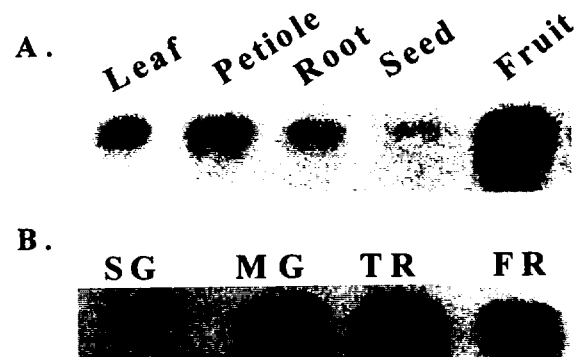


Figure 2. Northern analysis of ApxSC gene from four different tissues of strawberry at turning (1/2 red) stage (A) and at four stages in the process of fruit development (B).

인하였다. 과일 다음으로는 엽병에서 강하게 발현되었다(Figure 2A). 또한 과일의 성숙단계별로 발현양상을 조사한 결과 가장 어린 상태(small green stage)에서는 발현이 미약하나, 과일이 발달하면서 색깔전환기(turning to red stage)까지 발현이 급격하게 증가한 후, 마지막 수확시기에 약간 감소하는 것을 확인하였다(Figure 2B) (Kim and Chung, 1998a). 이러한 결과는 ApxSC 유전자의 발현이 과일의 성숙 및 발달과 밀접한 연관성이 있음을 제시해 주었다.

는 달리 5'-UTR(비암호화부위)에 첫 번째 엑손이 존재한다. 이러한 UTR내 엑손을 가지고 있는 유전자들의 경우 공통적으로 그 발현이 강하게 일어난다는 특징을 가지고 있다. 따라서 이러한 개념의 구조 자체가 유전자의 발현을 활성화시키는데 관여하고 있음을 제시해 준다. 프로모터 부위를 알기 위해 전사개시부위를 실험을 통해 결정해보니 개시 정도가 다른 3개의 개시부위가 있음을 확인하였다. 이중 5' 방향에서 세 번째에 있는 'A'에서의 전사개시가 가장 강하였다.

ApxSC 게놈 DNA 분리 및 분석

딸기 잎 게놈 DNA library로부터 ApxSC 유전자의 게놈 DNA를 분리한 결과 7.7 kbp 크기의 DNA를 분리하였고, 이는 ApxSC 유전자와 5'-upstream, 3'-downstream 부위를 함유하고 있었다(GenBank accession No. AF158653 and AF158654). ApxSC 게놈 DNA의 구성은 완두콩(Pea)의 ApxI와 애기장대(Arabidopsis)의 APX1a의 구조와 비슷한 10개의 엑손과 9개의 인트론으로 구성되어 있었다(Figure 3) (Kim and Chung, 1998b). 애기장대 게놈에서 분리된 APX1b의 경우에는 다른 식물의 10개 엑손 중 첫 번째 엑손과 두 번째 엑손이 연결되어 인트론이 다른 식물 APX 게놈 구조보다 하나 적었고, 그 발현이 아직까지 확인되지 않았다. 다른 유전자의 프로모터와

ApxSC 프로모터 분석

전사개시부위가 결정된 후, 상단 부위(upstream)를 promoter로 분리하여 이들의 기능과 조절 기작에 대한 정보를 얻을 수 있었다(Table 2). 몇 개의 예상되는 전자조절부위가 관찰되었다. 우선 TATA 상자와 CAAT 상자가 -34와 -104 사이에 위치하였고, 식물호르몬인 에틸렌에 의해 반응을 나타내는 조절부위(ethylene response element, ERE)가 발견되었다. 그리고 특징적으로 열충격에 의해 발현을 유도하는데 관여하는 열충격조절부위(heat shock element, HSE)와 발현을 활성화시키는 enhancer 부위가 있음을 관찰하였다. 그리고 -850과 -350 사이의 염기조성은 많은 열충격 유전자에서 발견되는 A+T 함량이 평균 70% 이상 되는 비정상적으로 높은 것을 확인하였다. 이러한 비정상적인 염기분포는 DNA 이중나선을 쉽게 풀도록 만들어 뉴클레오솜의 형성을 억제하여 전사인자의 접근을 허락하여 전사를 활성화시킬 것으로 추론된다(Kim and Chung, 1998b).

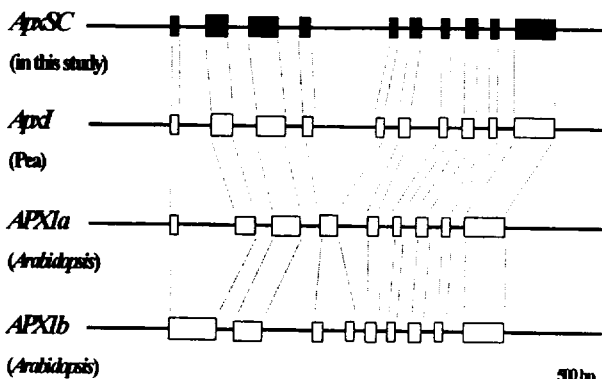


Figure 3. Genomic structure of strawberry ApxSC and other plant APX including pea ApxI and Arabidopsis APX1a and APX1b.

ApxSC 유전자의 딸기 게놈 내 존재양상

딸기 게놈 DNA를 이용한 혼성화 실험은 특정 제한효소로 처리한 DNA 시료마다 4~6개의 밴드를 관찰하였다(Kim and Chung, 1998b). 재배 딸기 품종은 북아메리카 동부지역 원산의 *Fragaria virginiana*

와 남아메리카 칠레 원산의 *Fragaria chiloensis* 가 18세기 무렵 유럽에서 교잡된 것으로 8배체 (Octoploid)임이 알려졌다. 따라서 4-6개의 혼성화 밴드는 이러한 다배체 특성으로 유도된 것으로 해석되었다. 이러한 것은 다양한 염기서열을 가지고 있는 ApxSC 계통 DNA를 분리하여 분석함으로써 확인할 수 있었다(Kim et al., 2001).

딸기 과일 성숙에 따른 퍼옥시드 (Peroxide) 형성

과일 성숙단계를 5단계로 나누어 퍼옥시드의 함량을 측정 한 결과, 세 번째 단계인 MG(mature green) 단계까지 감소하다가 전환기(turning to red, TR 단계)에서 절정(Peak)을 이루다가 그 이후에는 감소하는 것을 보여주었다(Figure 4). 이러한 양상은 초기단계를 제외하고는 ApxSC 유전자의 발현양상과 유사한 것을 알 수 있었다. 즉 TR 단계에서 절정을 나타내었다.

딸기 ApxSC의 생리적 기능

딸기 과일의 전환기(TR 단계)에서는 색소체가 파괴되고, 엽록소(Chlorophyll)과 카로티노이드(Carotenoid) 생성이 감소된다. 엽록소와 카로티노이드는 항산화물질로서, 이들 함량이 감소됨에 따

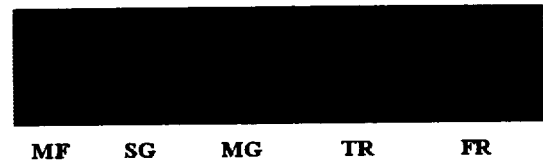
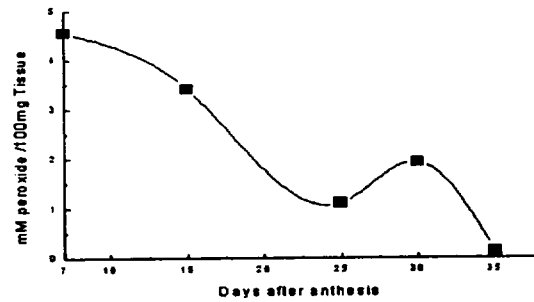


Figure 4. Peroxide concentration during fruit ripening of strawberry. Hydroperoxides form a specific complex with titanium which can be measured by colorimetry. The absorbancy was read at 415 nm.

라 세포는 유해활성산소의 축적에 의해 산화스트레스(Oxidative stress)를 받는다. 게다가 엽록체를 포함한 색소체의 파괴는 세포질로의 퍼옥시드가 방출된다. 따라서 ApxSC의 축적은 이렇게 형성된 퍼옥시드에 의해 유도되어, 이들의 제거에 관여할 것으로 생각된다. 딸기 과일 발달 초기의 퍼옥시드 축적은 높은 호흡률에 기인하는 것으로 추정되며, 이 시기의 유해활성산소로부터의 세포 보호는 엽록소 등의 항산화물질 생성, 카탈라아제, ApxSC가 아닌 다른 peroxidase에 의해 이루어지고 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Comparison of Genomic Structures Among ApxSC, ApxI, APX 1a and APX 1b.

Differences	APXSC	ApxI	APX 1a	APX 1b
Plant species	Strawberry	Pea	Arabidopsis	Arabidopsis
Expression	Yes	Yes	Yes	No
Intron in 5'-UTR	Yes	Yes	Yes	No
Exon-Intron	10-9	10-9	9-8 (4+5)*	9-8 (1+2)*
CCAAT box (position)	Yes (-104)	Yes (-147)	Yes (-236)	Yes (-236)
Heat-shock elements	Yes	Yes	Yes	Yes
High A+T region	Yes	Yes	Yes	?

* : The exon-intron structure is different from that of ApxSC. That is, 4+5 indicates that the fourth and fifth exon in ApxSC are ligated to one exon in APX 1a.

고 찰

딸기는 다른 과일과 마찬가지로 성숙단계를 거치면서 색소의 축적, 연화과정의 유도, 색소체의 파괴, 페옥시드의 축적 등이 유도된다. 이러한 양상은 과일세포 입장에서 볼 때 많은 산화스트레스를 유발한다. 이러한 스트레스에 대처하는 기작의 하나로써 ApxSC의 유전자의 발현을 유도하였을 것으로 보인다. APX의 기질인 과산화수소는 과일의 성숙과 노화에 영향을 미치며, 에틸렌의 생합성을 촉진하고, 이는 다시 페옥시드의 함량을 증가시킨다. 이를 통해 세포가 받는 산화스트레스를 최소화시키는 방어 기작으로서 APX가 발현된 것으로 결론내릴 수 있었다. 그러나 딸기 과일의 성숙과정의 진행을 APX의 발현에 의해 되돌이킬 수 없으며, APX는 과일 내 종자의 성숙을 유도하고, 숙주동물을 유인하는데 필요한 이차대사산물을 형성하는 시간을 제공해주고 있을 가능성이 있다. 이와 같이 분리된 딸기의 APX는 산화스트레스에 저항성을 부여하기 위한 유전자 원으로서 이용이 가능하고, 과육에서의 우세한 발현 특성을 이용한 프로모터 개발 등에 이용될 수 있다. 현재 이에 대한 연구가 진행 중이다.

인 용 문 헌

- Allen, R.D., R.P. Webb, and S.A. Schake. 1997. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free radical biology & medicine* 23(3):473-479.
- Fryer, M.J., K. Oxborough, P.M. Mullineaux, N.R. Baker. 2002. Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1249-1254.
- Kim, I.J., W.I. Chung. 1998a. Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit. *Plant Science* 133: 69-77.
- Kim, I.J., W.I. Chung. 1998b. Isolation of genomic DNA containing a cytosolic ascorbate peroxidase gene (ApxSC) from the strawberry (*Fragaria×ananassa*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62(7): 1358-1363.
- Kim, I.J., B.H. Lee, J. Jo., and W.I. Chung. 2001. Sequence variability of nine cytosolic ascorbate peroxidases in polyploid strawberry. *DNA Sequence* 11(6): 475-484.
- Kim, I.J. (1998) Isolation of cytosolic ascorbate peroxidase gene and its expression in strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.). Ph.D thesis.
- Pereira, C.S., D. Soares da Costa, J. Teixeira, and S. Pereira. 2005. Organ-specific distribution and subcellular localisation of ascorbate peroxidase isoenzymes in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. 226(3-4): 223-230.
- Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, and K. Yoshimura. 2002 Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53(372):1305-1319.
- Teixeira, F.K., L. Menezes-Benavente, V.C. Galvao, R. Margis, and M. Margis-Pinheiro. 2006. Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta* (online first published)
- Van Camp, W., K. Capiou, M. Van Montagu, D. Inze, and L. Sliotoen. 1996. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* 112(4):1703-1714.
- Smirnoff, N. 2000. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3(3):229-235.
- Zimmermann P, U. Zentgraf. 2005. The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10(3):515-34
- Panchuk II, U. Zentgraf, and dnfVolkov. 2005. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. 222(5):926-932.