

고추(*Capsicum annuum* L.) 배양세포의 Elicitor 유도성 Phytoalexin 생성

권순태* · 오세명

안동대학교 생명자원과학부

Elicitor-Inducible Phytoalexin from Cell Suspension Cultures of Pepper(*Capsicum annuum* L.)

Soon-Tae Kwon* and Sei-Myoung Oh

School of Bioresource Sciences, Andong National University, Kyungpook 760-749, Korea

Abstract

Extracellular capsidiol, sesquiterpenoid phytoalexin, in the medium of pepper (*Capsicum annuum* L.) suspension cells was not identified from control cells, but highly accumulated in the elicitor-induced cells within 6 hours after the addition of 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cellulase. Capsidiol production in elicitor-induced cells was markedly suppressed by cytochrome P450 inhibitors, such as ancymidol and ketoconazole demonstrating that biosynthesis of capsidiol is catalyzed by at least on hydroxylation enzyme in the biochemical pathway. Based on protein electrophoresis, two bands, 23.0 kDa and 27.5 kDa, were identified as newly synthesized polypeptides in the elicitor-induced suspension cells, suggesting that pepper cells which were subjected to elicitor treatment activate specific gene(s) for capsidiol biosynthesis in cultured cells.

Key words – Capsidiol, Cytochrome P450, Sesquiterpenoid

서 론

식물세포는 병원균의 감염이나 병원균에서 유래한 elicitor에 의해 phytoalexins을 생성하며, 이들 물질은 여러 종류의 환경조건으로부터 자신을 보호하기 위한 방어 기작에 관여할 뿐만 아니라 이차대사산물로써 인간에게 의약품이나 농약의 원료로 사용되기도 한다[1-5,13]. Phytoalexin은 식물의 종에 따라 다양한 종류가 생성되는데 담배, 고추 및 감자 등과 같은 가지과 식물의 terpenoid계

화합물을 비롯하여 두과나 화본과 식물에서도 많은 종류가 알려져 있다[1-3,12,16].

고추는 역병균(*Phytophthora capsici*)의 침입이나 elicitor에 의해 capsidiol을 자체방어물질로 생성하며 역병에 대한 저항성의 정도는 감염된 고추가 생성하는 이 물질의 활성에 의해서 좌우되는 것으로 알려져 있다[8,12,16]. Capsidiol은 고추뿐만 아니라 같은 가지과 식물인 담배에서도 동일한 기작에 의해 생성되며, 이 물질과 관련된 담배의 역병 저항성 유전자가 이미 밝혀졌다[2,14,15]. 즉 식

* Corresponding author

물에 *Phytophthora*속의 균이 감염되거나 elicitor를 처리하면 정상 세포가 farnesyl diphosphate(FPP, C₁₅)를 이용하여 squalene(C₃₀)을 생합성하는 경로는 차단되고, FPP에서 capsidiol(C₁₅)이라는 sesquiterpene화합물을 합성하는 방향으로 대사경로가 바뀌는 것으로 알려져 있다[14,15](Fig. 1). Stoessl 등[12]은 병원균에 감염된 고추의 과육에서 capsidiol이 생합성된다는 것을 확인하였으며, Hoshino 등 [8]은 elicitor를 처리한 세포의 microsomal 부위에서 capsidiol생성에 관여하는 5-epi-aristolochene(5-EAS) hydroxylase의 활성을 검정한 바 있다.

본 실험은 고추의 배양세포에 가지과 식물의 병원성 elicitor로 알려진 cellulase를 처리하여 항균성 phytoalexin인 capsidiol의 생성에 미치는 영향을 조사함으로써 고추의 배양세포를 이용하여 phytoalexin의 생합성 경로에 관련된 효소와 유전자를 탐색하기 위한 기초 자료를 얻기 위해 수행되었다.

재료 및 방법

세포배양 및 Elicitor처리

실험에 사용된 고추 품종은 경상북도 영양지역의 재래 품종인 수비초(*Capsicum annuum* L. cv. *Soobicho*)였다. 고추세포의 현탁배양은 먼저 무균 배양한 잎 조직으로부터 MS 기본염류[11]에 2,4-D 1+BA 0.01 mg/ℓ 와 30g/ℓ sucrose를 첨가한 배지에서 캘러스를 유도하여 2,4-D 1+BA

0.01 mg/ℓ, 30g/ℓ sucrose 및 0.1% casein hydrolysate를 함유한 액체배지에 매 7일 간격으로 5회 이상 계대배양을 실시하였다. 세포의 증식속도가 매주 약 2배 정도로 자라는 활력이 좋은 세포를 실험에 사용하였다. Elicitor로는 cellulase(Onozuka R10) 0.05 μg/ml을 계대배양 후 3일째 되는 배양세포에 처리하였다. 일정시간 동안 elicitor를 처리한 후 배양액을 여과하여 세포와 배양액을 분리하였다.

Phytoalexin의 추출 및 분석

고추의 phytoalexin인 capsidiol의 추출은 Kwon과 Chappell[9]의 방법에 따라 실시하였다. 먼저 elicitor를 12시간 동안 처리한 배양세포를 여과하여 세포와 배양액을 분리한다. 세포로부터 capsidiol의 추출은 배양세포 20g을 멸균수로 3회 세척한 후 70% EtOH에 24시간 추출하여 회전농축장치로 35℃에서 EtOH를 제거하고 수용액을 3배의 CH₂Cl₂로 3회 추출하고, 다시 35℃에서 농축하여 완전히 건조시켰다. 배양액으로부터 capsidiol추출은 여과된 배양액을 직접 CH₂Cl₂로 3회 추출하였다. 농축된 시료는 CH₂Cl₂로 다시 용해시켜 acetone : cyclohexane (1 : 1)용매로 TLC (thin layer chromatography)를 실시하였다. 완전히 전개된 TLC판을 5분간 상온 건조 후 분무액[3.5% (w/v) vanillin + 0.625% (v/v) H₂SO₄ in MeOH]으로 발색하여 capsidiol을 확인하였다[9]. Capsidiol 함량비교는 TLC판에 나타난 capsidiol 부분의 spot 크기와 발색정도를 처리간에 비교하였다. 한편 농축액을 Whitehead 등[17, 18]의 방법에 따라 gas chromatography를 실시하여 분리패턴을 비교하였다.

단백질 전기영동

Elicitor에 의해서 유도된 세포의 단백질 패턴 변화를 조사하기 위하여 elicitor처리 일정시간 후에 세포로부터 단백질을 추출하였다. 단백질의 추출 및 전기영동은 Laemmli [10]의 방법에 따라 12.5% SDS-PAGE를 실시하였다.

결과 및 고찰

Elicitor처리에 의한 phytoalexin 생성

배양세포에 elicitor인 cellulase를 처리하여 6시간 및 12시간 후에 세포 및 배양액 추출물의 TLC를 한 결과는

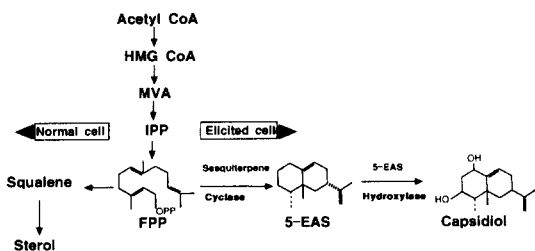


Fig. 1. A model summarizing the response of plant cells to fungal elicitors with respect to terpenoid metabolism, and proposed reaction catalyzed by sesquiterpene cyclase and 5-EAS hydroxylase leading to the formation of capsidiol (Adapted from reference 13 and 14).

Fig. 2와 같다. Fig. 2. A는 TLC를 실시한 후 자외선 조사에 의해 발색된 패턴을 나타내며, B는 동일한 TLC판을 capsidiol 발색시약[3.5% (w/v) vanillin+0.625%(v/v) H₂SO₄ in MeOH]으로 분무하여 나타난 결과이다. 세포 추출물의 TLC결과는 무처리 세포와 elicitor에 유도된 세포 간에 아무런 차이가 없었으나, 배양액 추출물은 Rf 0.35부위에 무처리에는 전혀 나타나지 spot가 나타난 것을 알 수 있었다. 이 물질은 Kwon과 Chappell[9]이 elicitor에 유도된 담배 배양세포의 배양액에서 동정된 capsidiol의 Rf값과 동일하였다. Capsidiol은 가지과 식물의 주요한 항균 phytoalexin으로 이 물질은 주로 병원균이나 elicitor에 의해 생합성이 유도되며, 생성된 capsidiol은 짧은 시간 내에 세포 밖으로 방출되어 항균작용을 나타냄으로써 식물은 자체방어능력을 갖는 것으로 알려져 있다[2,5,13].

본 실험에서 capsidiol은 배양세포의 추출물에서는 나타나지 않으나 그 세포를 배양한 배양액 추출물에서만 검출되는 것으로 보아 이 물질은 elicitor에 의해 세포에서 생합성된 후 외부로 방출된다는 것을 확인할 수 있었다. 담배의 배양세포의 경우 capsidiol생합성 유도를 위한 callulase 농도는 0.3-0.5 μg/ml 범위로 알려져 있으나[2,14,15] 고추 배양세포의 경우는 담배와 동일한 범위의 농도에서는 capsidiol의 생합성을 확인할 수 없었고 그 보다 더 낮은 농도인 0.05 μg/ml에서 유도되는 것으로 나타났다. 고추에서 최초로 capsidiol의 생합성이 알려진 것은 Stoessl 등[12]의 보고로서 고추 과육에 여러 종류의 병원성 균을 감

염시켜 capsidiol이 생합성되는 것을 확인하였다. Hoshino 등[8]은 elicitor를 처리한 고추세포의 microsomal부위에서 5-epi-aristolochene(5-EAS) hydroxylase 효소를 정제하여 이 효소가 capsidiol 생합성 과정의 전 단계 물질인 5-EAS의 3번 탄소를 특이적으로 hydroxylation시키는 대사 경로를 확인한 바 있다.

지금까지 가지과 식물에서 알려진 capsidiol의 생합성 경로는 크게 2가지 효소의 작용을 받는 것으로 알려져 있다. 첫째 효소는 FPP(C₁₅)가 5-EAS(C₁₅)로 cycle화하는데 관여하는 sesquiterpene cyclase이고, 그 다음 효소는 생성된 5-EAS의 1번과 3번 탄소 위치에 -OH기의 첨가를 촉매하는 5-EAS hydroxylase이다[3, 13](Fig. 1). 최종 산물인 capsidiol의 생합성에 관여하는 두 가지 효소는 정상적인 세포에서는 전혀 생합성 되지 않으며, 그 중 두 번째 효소인 5-EAS hydroxylase는 cytochrome P450 계열의 효소로 알려져 있다[6, 8].

Fig. 3은 무처리와 elicitor를 처리한 세포의 배양액 추출물의 gas chromatogram상에 retention time(RT)별로 분리된 peak를 나타내었다. Elicitor의 처리에 의해서 가장 현저한 변화를 보인 것은 C-peak(RT, 24.03±0.03 분)로 무처리 세포의 배양액에서 보다 12시간 동안 elicitor를 처리한 세포의 배양액에서 약 5.7배(peak 면적기준)의 증가를 보였으며 A(RT, 19.98분), D(RT, 26.80±0.02 분) 및 E(RT 29.80±0.02 분) peak도 각각 2.3배, 1.4배 및 2.4배의 증가를 보였다. Elicitor를 48시간 동안 장시간 처리한 배양액 추출물의 C-peak는 12시간 처리한 세포배양액보다 약 48%의 감소를 보였다. B(RT, 22.30 분) peak는 무처리 세포나 elicitor를 12시간 처리한 세포의 배양액에서는 전혀 나타나지 않으나 48시간 처리한 배양액에서만 검출되었다. Elicitor를 48시간동안 장시간 처리한 세포의 배양액은 황색으로 갈변하며, 배지에 축적된 phytoalexin의 독성에 의해 세포의 활력이 현저히 떨어지는 것으로 관찰되었다. 따라서 48시간 처리에 의해서 검출된 B-peak는 elicitor에 의해서 유도된 세포가 특이적으로 생합성한 물질이라기보다 배지 내 축적된 물질이 시간이 경과하면서 변성되거나 분해되는 과정중의 물질일 것으로 추정된다. C와 E-peak는 12시간 처리한 것보다 48시간 처리한 세포의 배양액에서 약 30%가 감소하였으나 A 및 D-peak는 48시간 처리에서 오히려 증가하는 것으로 나타났다. 본 실험에서는

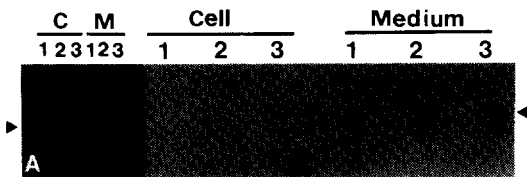


Fig. 2. Thin layer chromatogram of cell(C) and medium (M) extracts showing extracellular accumulation of capsidiol in the medium of elicitor-induced suspension cells.

Visualized by UV illumination(A) and color reagent for capsidiol(B). Positions corresponding to capsidiol on TLC are marked with arrow head. Lane 1, control, 2 and 3, treated with cellulase 0.05 μg/ml for 6 and 12 hours, respectively.

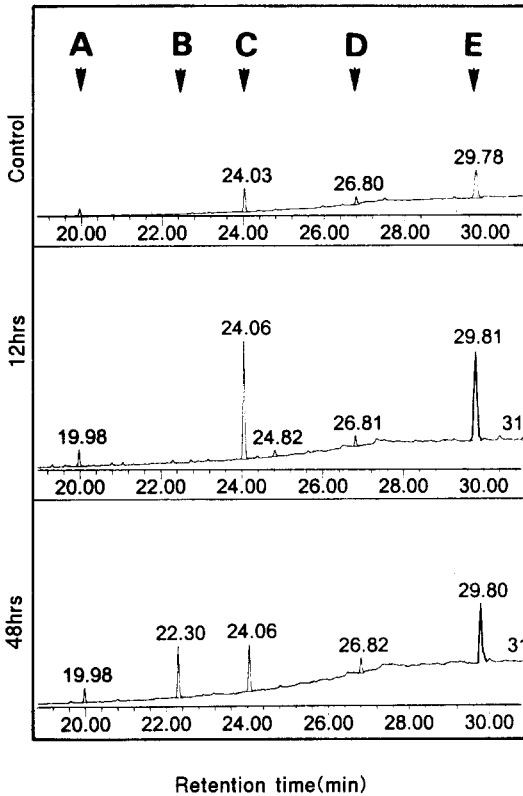


Fig. 3. Gas chromatogram of medium-extracts from control(upper), and treated with cellulase 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 12 hours(middle) and 48 hours(lower) according to retention time.

chromatogram상에 나타난 개개의 peak들이 어떠한 화학 구조를 가지고 있는지는 동정할 수 없었다.

Ancymidol과 ketoconazole의 억제효과

가지과 식물에서 capsidiol의 생합성 과정을 촉매하는 두 가지 효소 중 5-EAS hydroxylase는 cytochrome P450 계 효소로 알려져 있는데 5-EAS의 1번과 3번 위치의 탄소에 -OH기가 첨가되면서 최종산물인 capsidiol이 합성된다 (Fig. 1). Ancymidol과 ketoconazole은 cytochrome P450계 효소를 특이적으로 억제하는 물질로써[6], 담배 등에서는 elicitor에 의해 유도된 세포의 capsidiol 생합성을 강하게 억제하는 것으로 보고되었다[9]. 본 실험에서는 이들 물질

이 고추 배양세포의 capsidiol 생합성에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 4는 elicitor인 cellulase를 단독으로 처리한 경우와 cellulase와 ancymidol 또는 ketoconazole을 함께 처리한 세포의 배양액으로부터 capsidiol을 추출하여 TLC한 결과이다. Ancymidol과 ketoconazole은 cellulase에 의해서 유도된 세포의 capsidiol 생합성을 현저히 억제하는 것으로 나타났는데 ancymidol보다 ketoconazole의 억제정도가 강한 것으로 나타났다. 이들 물질이 고추 배양세포에서 capsidiol의 합성을 억제하는 이유는 elicitor에 의해서 유도된 배양세포가 capsidiol을 합성하는 과정에서 cytochrome P450계 효소인 5-EAS hydroxylase의 작용을 특이적으로 억제한 결과로 추정된다.

본 실험에서 동정된 고추 배양세포의 phytoalexin인 capsidiol은 elicitor의 처리에 의해 생합성된 후 배지의부로 방출되는 점과 cytochrome P450 효소계의 특이적 억제제인 ancymidol과 ketoconazole에 의해 현저한 억제를 받는 점에서 담배 배양세포에서 동정된[9] capsidiol과 동일한 특징을 보였다.

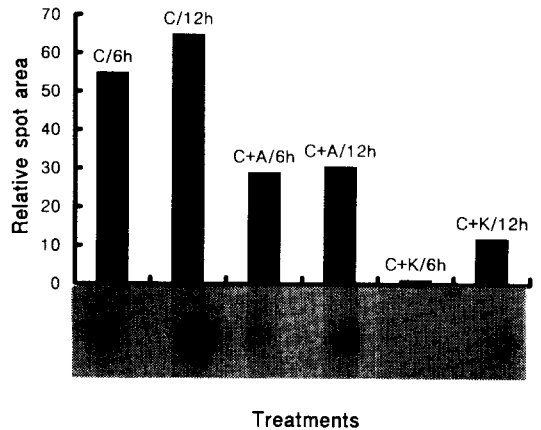


Fig. 4. Effect of ancymidol and ketoconazole on the accumulation of extracellular capsidiol in elicitor-treated pepper suspension cultures visualized by color reagent after TLC(lower picture) and relative spot area corresponding to capsidiol(upper graph). Treated with cellulase 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ only(C), and treated with cellulase 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and ancymidol (C+A) or ketoconazole (C+K) at 50 μM for 6 and 12 hours.

단백질 패턴의 변화

Fig. 5는 elicitor을 처리한 고추의 잎과 배양세포의 단백질 전기영동 패턴을 나타낸 것이다. 잎의 경우는 Guedes 등[7]의 방법에 따라 cellulase 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 잎에 1 μl 씩 1cm 간격으로 주입하여 24시간 및 72시간 후에, 배양세포의 경우는 동일한 농도로 처리하여 6시간 및 12시간 후에 단백질을 추출하였다.

Elicitor를 처리한 잎에서는 밴드간에 약간의 농도 차가 있으나 새로운 밴드의 출현과 같은 현저한 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 배양세포의 경우 12시간동안 elicitor를 처리한 세포에서 a 단백질(42.5kDa)이 현저히 증가하였으며, b(27.5kDa)와 c(23.0kDa) 단백질이 새로 나타났다(Fig. 5). Elicitor의 처리에 의해 배양세포내 단백질 패턴이 변하거나 새로운 단백질 또는 polypeptide가 생성되는 것은 고추의 배양세포가 phytoalexin을 생산하기 위한 특이성 유전자를 활성화시켜 관련효소를 생성하는 것을 의미한다. 이미 elicitor에 의해 유도된 담배 배양세포에서 FPP \rightarrow 5-EAS \rightarrow capsidiol의 일련의 대사경로 중 첫 번째 과정(FPP \rightarrow 5-EAS)을 촉매하는 sesquiterpene cyclase와 두 번째 과정(5-EAS \rightarrow capsidiol)을 촉매하는 5-EAS hydroxylase가 정제되거나 활성을 검정한 바 있고, 클로닝된 cDNA는 정상세포에서는 전혀 전사되지 않고 병원균이나 elicitor에

의해서만 작동되는 것으로 밝혀졌다[3,4,9,13]. 고추에서도 병원균 혹은 elicitor를 처리한 과육에서 capsidiol의 생성을 확인한 바 있다[8,12,16]. 담배와 고추는 같은 가지과에 속하는 식물로서 배양세포가 elicitor 유도성 capsidiol을 생합성하는 기작은 동일할 것으로 추정된다. 단백질 전기영동 결과 elicitor를 처리한 세포에서 새로운 단백질이 생합성 되는 것은 고추 배양세포 내에 elicitor 유도성 유전자가 존재함을 시사하고 있다.

본 실험은 고추 배양세포에 elicitor를 처리하여 세포가 특이적으로 생합성하는 항균성 phytoalexin인 capsidiol의 생합성을 유도함으로써 고추세포의 capsidiol 생합성 경로를 이해하며 관련된 유전자를 탐색하기 위한 기초 자료를 얻기 위한 시도였다. 고추의 배양세포가 생합성하여 세포 배양액으로 방출하는 capsidiol의 존재를 확인하였으며 새로운 유전자의 활성화를 시사하는 단백질 패턴의 변화를 구명하였다. 현재 고추 배양세포로부터 capsidiol의 생합성과 관련된 유전자의 클로닝이 진행 중이다.

요 약

고추(*Capsicum annuum* L.) 배양세포에 elicitor인 cellulase를 처리하여 약 6시간 후부터 sesquiterpene계 phytoalexin인 capsidiol이 배양배지에 축적되는 것을 확인하였다. 이 물질은 cytochrome P450계 효소의 억제물질로 알려진 ancyamidol과 ketoconazole에 의해 생합성이 현저히 억제되어 capsidiol의 생합성 과정에 hydroxylation 효소가 관여함을 시사하였다. 단백질 전기영동결과 elicitor를 처리한 세포에서 42.5kDa 단백질의 함량이 무처리 세포에 비해 현저히 증가하였고, 23.0kDa 및 27.5kDa 단백질이 elicitor에 의해 유도된 세포에만 특이적으로 생성되었다.

참 고 문 헌

1. Bailey, J. A., Burden, R. S. and Vincent, G. G. 1975. Capsidiol: an antifungal compound produced in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glauca* following infection with tobacco necrosis virus. *Phytochemistry* **14**, 597.
2. Brindle, P. A., Kuhn, P. J. and Threlfall, D. R. 1988. Biosynthesis and metabolism of sesquiterpenoid phy-

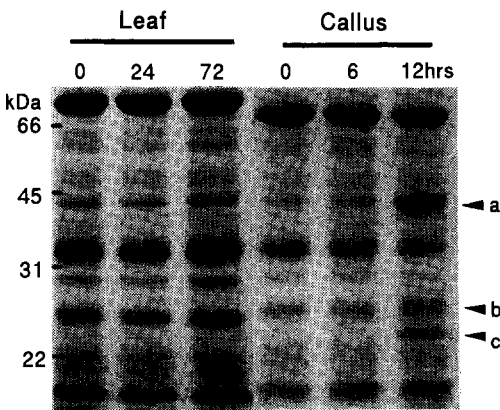


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of proteins extracted from leaf and suspension callus treated with cellulase 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Interesting protein bands are marked with arrow head.

- toalexins and triterpenoids in potato cell suspension cultures. *Phytochemistry* **27**, 133-150.
3. Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* **46**, 521-47.
 4. Chappell, J. and Nable, R. 1987. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* **85**, 469-473.
 5. Chappell, J., Nable, R., Fleming, P., Andersen, R. A. and Burton, H. R. 1987. Accumulation of capsidiol in tobacco cell cultures treated with fungal elicitor. *Phytochemistry* **26**, 2259-2260.
 6. Donaldson, R. P. and Luster, D. G. 1991. Multiple forms of plant cytochrome P-450. *Plant Physiol.* **96**, 669-674.
 7. Guedes, M. E. M., Kuc, J., Hammerschmidt, R. and Bostock, R. 1982. Accumulation of six sesquiterpenoid phytoalexins in tobacco leaves infiltrated with *Pseudomonas lachrymans*. *Phytochemistry* **21**, 2987-2988.
 8. Hoshino, T., Yamaura, T., Imaishi, H., Chida, M., Yoshizawa, Y., Higashi, K., Ohkawa, H. and Mizutani, J. 1995. 5-epi-Aristolochene 3-hydroxylase from green pepper. *Phytochemistry* **38**, 609-613.
 9. Kwon, S. T. and Chappell, J. 1998. Elicitor-inducible 5-epi-aristolochene hydroxylase in suspension cultures of tobacco(*Nicotiana tabacum* L.). *Kor. J. Plant Tissue Culture* **25(3)**, 141-146.
 10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 11. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* **15**, 473-479.
 12. Stoessl, A., Stothers, J. B. and Ward, E. W. B. 1976. Sesquiterpenoid stress compound of Solanaceae. *Phytochemistry* **15**, 855-872.
 13. Threlfall, D. R. and Whitehead, I. M. 1988. Coordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **27**, 2567-2580.
 14. Vögeli, U. and Chappell, J. 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* **88**, 1291-1296.
 15. Vögeli, U. and Chappell, J. 1990. Regulation of a sesquiterpene cyclase in cellulase-treated tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **94**, 1860-1866.
 16. Watson, D. G. and Brook, C. W. 1984. Formation of capsidiol in *Capsicum annuum* fruit in respond to non-specific elicitors. *Physiol. Plant Pathol.* **7**, 265-276.
 17. Whitehead, I. M., Ewing, D. F., Threlfall, D. R., Cane, D. E. and Prabhakaran, P. C. 1990. Synthesis of (+)-5-epi-aristolochene and (+)-1-deoxycapsidiol from capsidiol. *Phytochemistry* **29**, 479-482.
 18. Whitehead, I. M., Threlfall, D. R. and Ewing, D. F. 1989. 5-epi-aristolochene is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol. *Phytochemistry* **28**, 775-779.