



고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 의 프로테오믹 분석

남 명 희

한국기초과학지원연구원

인삼의 효능 및 유효성분에 관한 수많은 문헌 및 연구사례가 보고 되어 있음에도 불구하고 인삼의 주성분인 ginsenosides의 합성경로나 그와 관련된 유전인자에 대하여서는 거의 밝혀져 있지 않다. 인삼의 생리적 특성규명 및 ginsenosides의 생합성 경로를 밝히기 위한 한 방법으로써 프로테오믹 분석이 시도되었다. 본지에서는 고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 대상으로 이루어진 최근의 프로테오믹 분석 및 이차 대사산물의 생산과 연관된 유전인자를 찾기 위하여 이루어진 인삼의 기능유전체 분석을 소개하고자 한다.

I. 서론

인삼은 아시아 지역에서 수천년 동안 사용되어 온 의약품으로서, 중추신경계, 심혈관계, 내분비계, 면역계 등 다양한 부위에서 작용을 하며, 항산화 효과와 항스트레스 효과도 지니고 있다 (1, 2).

인삼이 의약품으로 사용되기 위해서는 최소한 3년 이상의 성장기간이 필요하다. 이러한 오랫동안의 재배기간으로 인하여 인삼의 생산성은 외부환경의 영향을 많이 받게 된다. 예를 들면 인삼은 강한 빛에의 노출로부터 보호하기 위하여 일복을 덮어주어야 하며, 연작을 할 수 없는 등 재배에

많은 어려움이 있다. 곰팡이에 의하여 유발되는 뿌리썩음병, 적변 등의 질병 또한 인삼재배의 심각한 장애요인이다. 이러한 외부요인은 인삼의 품질 및 생산성에 영향을 준다. 이러한 이유로 환경요인에 대하여 보다 강한 저항성을 갖는 인삼의 생산을 목적으로 외부환경에 대한 인삼의 생리적인 변화를 밝히려는 연구가 이루어지고 있다 (3-6).

인삼은 주근 및 결뿌리 등과 같이 부위에 따라서, 그리고 미국삼 (*Panax quinquefolius*), 일본삼 (*Panax japonicus*), 고려인삼 (*Panax ginseng*) 등과 같이 종에 따라서 그 약효가 다르다고 여겨지

고 있다. 그러므로, 상업적인 필요에 의하여, 인삼의 진위를 판별하는 방법의 개발 또한 인삼연구의 한 관심분야가 되고 있다. HPLC와 질량분석기를 이용하는 분석 (7), 프로테옴 분석법 (8), 그리고 PCR-restriction fragment length Polymorphism (9-13) 등을 통하여 관련 연구가 진행되고 있다.

인삼의 주요성분인 ginsenosides는 현재까지 31종류가 밝혀져 있으며 새로운 종류의 ginsenosides가 계속 더 발견되고 있다 (14, 15). Ginsenosides의 분포는 종에 따라 다르며, 각 ginsenosides는 각기 다른 약효를 가지고 있으며, 한 ginsenoside가 동일 조직에서 여러 효과를 보이기도 한다 (1, 16, 17). 현재까지 ginsenosides의 효능에 관한 많은 연구가 보고 되고 있는 반면에 ginsenosides의 생합성 경로나 그와 연관된 유전인자에 관련하여서는 거의 알려진 바가 없다. 이를 밝히기 위하여 고려인삼의 EST 서열분석을 비롯한 다양한 분석법이 적용되고 있다 (14).

이차원전기영동 및 질량분석기의 발달과 더불어 생명과학 연구에 있어서 프로테옴 분석의 비중이 점차 증가하고 있다. 프로테옴 분석을 통하여 수백 개의 단백질을 빠른 속도로 규명할 수 있고, 단백질의 발현수준의 변화, 수식화, 작용하는 세포 내 소기관의 위치 확인 등이 가능하다. 프로테옴 분석은 각각의 세포의 성질규명, 유전적 다양성 규명, 계통분석, 돌연변이체의 성격규명, 유용단백질의 선별, 외부 환경요인에 의하여 유도되는 세포의 반응 연구 등 다양한 분야에 적용되고 있다 (18, 19).

본문에서는 프로테옴 분석을 고려인삼 연구에 적용함에 있어서 대두되는 몇 가지 문제점과 이를 극복하는 방법에 대하여 살펴보고, 고려인삼에서 수행된 프로테옴 연구와 유전체 연구, 그리고 인삼의 이차 대사산물에 관한 최근의 연구를 소개하고자 한다.

II. 본론

1. 인삼유전체 연구

고려인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 에 대한 유전체 연구는 과학기술부가 추진하는 21세기 프론티어연구개발 사업의 일환으로 2000년에 발족된 자생식물이용기술사업단에 의하여 처음 시작되었다. 자생식물이용기술사업단은 한반도에 존재하는 고유식물자원의 체계적인 이용과 관리를 증가시켜 세계적으로 독창적이고 경쟁력 있는 식물유래의 각종 고부가가치 생명공학 제품을 창출하고자 함을 목표로 두고 있다. 인삼은 ginsenosides 등과 같은 이차 대사산물의 이용가치로 인하여 한국의 가장 중요한 식물자원 중의 하나로 선정이 되었다. 고려인삼에 대한 유전체 정보가 매우 적은 상태에서, Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library 구축 및 expressed sequence tag (EST)의 분석이 진행되었다.

1.1 BAC-end sequencing Project

고려인삼에서 전체 게놈의 3.34배에 달하는 BAC library가 구축되었다 (20). 구축된 BAC library는 106,368개의 clone에 달하며, 각 clone의 평균 길이는 약 98.6 kb 이다. 이 가운데 2,167개의 clone으로부터 2,492개의 BAC-end 염기서열을 분석하였다. 분석한 평균 길이는 400 bp로 분석된 전체 서열은 약 0.99 Mbp이다. BLAST와 motive 분석을 통하여 BAC-end sequence의 기능을 분석한 결과 전체의 약 10.2%가 단백질을 전사할 수 있는 유전자일 것으로 추정되었다. 단백질 전사 부위 서열을 NR, EST database 및 TAIR의 단백질 database와 비교한 결과 254개의 단백질 전사 부위가 확인되었다. 이중 167개의 유전자는 다른 생명체에서 알려진 유전자와 상동성을 보였고, 이

들의 기능을 분류하여 애기장대풀과 비교한 결과 인삼에는 대사, 세포주기, DNA processing, 환경과의 상호작용 조절, 발생 그리고 세포 구성 관련 단백질이 애기장대풀에 비하여 적은 것으로 나타났다. 반면 에너지, 단백질 합성, 조효소 요구, 세포내 소기관으로의 이동 관련 단백질은 더 많은 것으로 나타났다.

고려인삼의 EST database (<http://plant.pdrc.re.kr/genepool/PG/ginseng.html>)와 비교하여 서로 상동성이 있는 254개의 ESTs 서열을 확인하였다. 이 가운데 96개의 단백질 전사부위만이 고도의 상동성 ($e\text{-value} \leq 10^{-4}$)을 보였다. EST database를 이용하여 BAC-end 서열에서 ginsenosides 및 의약적 중요성을 지닌 물질의 합성과 연관된 유전자와 상동성을 갖는 부위를 찾기 위한 분석을 수행하고 있다.

1.2 EST sequencing project

주근, 곁뿌리, 발생과정의 종자, 모상근 등 여덟 가지 서로 다른 조직으로부터 cDNA library가 구축되었고, 이로부터 EST 서열분석이 시행되었다. 현재 약 26,000 개의 ESTs가 분석되어 그 정보가 제공되고 있다 (<http://plant.pdrc.re.kr:7777/index.html>). 단일 EST 서열의 59% 만이 기존의 GeneBank database에 있는 서열과 높은 상동성을 보였다.

EST 서열은 관련 유전자를 분리하는데 사용되어 질 수 있다. 즉, BLASTX 결과의 키워드 검색 및 인삼 ESTs의 도메인 검색을 통하여 유용 유전 인자를 검출할 수 있다. 이러한 방법으로 4개의 oxidosqualene cyclase, 9개의 P450s, 12개의 glycosyltransferase 등 ginsenosides 생합성에 관련된 유전자가 확인되었다 (14).

2. 인삼 프로테옴 분석

2.1 인삼의 프로테옴 분석의 도전과제

2.1.1 이차원전기영동을 위한 시료의 준비

수백 개의 단백질을 빠른 속도로 규명하고 특정 생리적 현상과 관련된 단백질의 발현 및 조절 기작에 대한 정보를 얻는 수단으로써 프로테옴분석은 최근 괄목할 만한 기술적 발전을 이루고 있다. 그러나 프로테옴 분석을 식물에 적용하기 위하여서는 몇 가지 장애를 극복해야 한다. 식물에 다량으로 존재하는 리그닌, 폴리페놀, 탄닌, 알칼로이드 등의 간섭으로 인하여 깨끗한 이차원전기영동 이미지를 얻는 것이 쉽지 않다. 따라서 이러한 간섭물질들을 제거함이 필요하다. 이차원 전기영동을 위한 식물의 단백질 추출은, 액체질소 존재 하에서 막자사발에 갈거나, 추출액을 사용하여 추출하는 두가지 방법을 주로 사용하는데, 인삼 뿌리에서 위의 두가지 방법을 서로 비교한 결과 액체질소에서 곱게 간 후 0.3% SDS, 200 mM DTT가 든 완충용액에 녹이는 방법이 더 효과적이었다. 얻어진 단백질은 trichloroacetic acid (TCA)로 단백질을 침전시키는 방법으로 간섭물질을 제거하였다. 핵산을 제거하기 위한 DNase, RNase의 처리 및 단백질 분해를 방지하기 위한 단백질 분해효소 억제제의 첨가는 인삼 프로테옴의 이차원전기영동 이미지에 별다른 영향을 주지 않았다 (21).

2.1.2 Databases

질량분석기를 이용한 단백질의 규명은 질량분석기에서 얻어진 값을 database의 유전정보와 비교하여 가장 일치하는 유전자를 찾아내는 것으로써, 고속 프로테옴 분석을 수행하기 위하여서는 유전자의 서열정보 database의 구축이 필수적이다. 고려인삼의 경우 유전자의 서열분석이 거의 이루어지지 않은 시점에서 프로테옴 분석이 시작됨으로

Table 1a. The number of high score hits obtained from each DB search and the number of sequences that are consistent with the DNS results, using 176 MS/MS spectra [25]

Database	DB search method	Results of database search		Results of sequence alignment	
		No. of hits with score (A)	Hit ratio (A/176 ^a)	No. of peptides similar to DNS (B)	Consistency with DNS (B/A)
Ginseng EST	MASCOT	105	60%	96	91%
	SEQUEST	112	64%	94	84%
Green plant Protein	MASCOT	50	28%	50	100%
	SEQUEST	84	48%	55	65%

a) 176 is the total number of the MS/MS spectra sample set

Table 1b. Summary of peptide sequences found more than once among the four different combinations between Ginseng EST DB or NCBI nr protein DB and MASCOT or SEQUEST search programs

Database	DB search method	Results of database search		Results of sequence alignment	
		No. of high score hits found more than once among the other methods (C)	Hit ratio (C/176 ^a)	No. of peptides similar to DNS among the (C) sequences(D)	Consistency with DNS (D/C)
Ginseng EST	MASCOT	104	59%	96	92%
	SEQUEST	110	63%	94	85%
Green plant Protein	MASCOT	50	28%	50	100%
	SEQUEST	76	43%	55	72%

a) 176 is the total number of the MS/MS spectra sample

인하여 database의 부재로 인한 한계를 안고 있었다. 이의 대안으로써 *Oryza sativa*, *Pinus pinaster*, *Zea mays* (18) 등, 이미 구축된 타 식물의 database를 사용할 수 있다. 이 경우 공통적으로

가지고 있는 비슷한 단백질의 경우는 규명이 가능하나, 인삼 특유의 단백질을 규명하기엔 어려움이 있다. 인삼 특유의 단백질을 규명하기 위하여서는 인삼의 유전자와 비교하는 것이 가장 바람직하다.

인삼의 경우 자생식물이용기술사업단의 지원으로 바이오피아 (<http://www.biopia.com/>; 경기도, 대한민국)와 유진텍 (<http://eugentech.com/>; 대전, 대한민국) 에서 각각 16,500 개, 11,600 개의 EST 서열이 분석되었다. 몇몇 EST 서열은 기존에 알려진 단백질 서열과 매우 유사하였으나 많은 경우에 있어서 알려진 다른 서열과의 유사성이 없는 것으로 확인되었다 (14). 따라서 분석된 EST 서열에는 인삼의 이차대사산물 합성 관련 유전자 및 인삼 고유의 유전자 정보에 관한 귀중한 자료를 포함하고 있을 것이다 (22). 다른 식물종에서 EST 서열정보를 이용하여 단백질을 규명한 예 (23, 24) 에 따라 인삼에서도 EST 서열을 이용하여 단백질을 규명하였다. 인삼의 EST 서열을 이용할 경우 인삼고유의 단백질을 확인할 수 있을 가능성이 증가하는 장점이 있다.

EST 서열을 database로 사용할 경우 몇 가지 문제점이 있다. 첫째는 모든 유전자가 mRNA로 발현되는 것이 아니므로 많은 유전자 정보가 누락되어 있으며, 둘째로 EST 서열의 오류 비율이 유전자 서열에 비하여 높을 수 있다는 점 등이 그 예이다. 또한 MALDI-TOF MS fingerprinting 만으로 단백질을 확인하기에는 EST 서열이 짧아 단백질의 coverage가 충분하지 않을 수 있다는 점도 문제이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 MALDI-TOF MS fingerprinting과 더불어 ESI-Q-TOF 질량분석기로 얻은 MS/MS spectra를 인삼의 EST 서열 database에 적용하여 유전자를 찾아내는 방법을 시도하였다 (Table 1). 이 경우 NCBI nr 단백질 database를 사용할 때에 비하여 단백질의 규명 비율이 증가하였다. 단백질의 규명 비율은 사용한 database의 종류뿐만 아니라 database search 프로그램의 종류에 따라 다르다. Database search 결과 확인된 peptide 서열을 de

novo sequencing하여 단백질의 정확도를 확인한 결과 여러 database를 여러 프로그램으로 search 할 경우 그 정확도가 더 증가하였다 (25). 이와 같이 보다 많은 정보를 줄 수 있는 분석방법을 적용하고, 결과의 검증과정을 늘림으로써 유전체 정보가 없는 단점을 극복할 수 있었다. 이러한 분석에는 인삼뿐만 아니라 유전체 분석이 이루어지지 않은 여타의 자생식물의 분석에 있어서도 똑같이 적용될 수 있을 것이다.

2.1.3 분석을 위한 인삼조직의 선택

인삼은 서로 다른 종, 부위, 나이에 따라 그 약효가 다르다고 알려져 있다 (8, 26). 이는 인삼의 생리적 특성 및 주요 활성물질의 구성이 나이와 종, 부위에 따라 다름을 위미한다. 따라서 인삼 분석 시 어떤 부위, 나이의 것을 선택하는가는 결과의 일관성 및 인삼 특이 유전자의 탐색에 있어서 매우 중요한 요소가 된다. 인삼의 유전자 또는 프로테오믹스 분석의 목적이 인삼 고유의 생리활성 물질의 합성과 연관된 유전자 또는 단백질을 찾는 것이 목적일 경우 인삼모상근은 좋은 재료가 될 수 있다. 모상근은 식물에 *A. rhizogenes*의 Ri-plasmid T-DNA를 삽입하여 형질전환을 유도한 조직으로, 성장률이 빠르고 유전적 안정성이 높으며, 외부 처리 호르몬 없이도 성장이 가능하다 (27-29). 인삼의 경우도 위의 방법으로 모상근이 유도되어 확립되었다 (30-33). 형질전환된 인삼모상근은 성장이 빠를 뿐만 아니라 사포닌의 합성 수준이 높다. 인삼 모상근 라인을 이용할 경우 성장조건을 최적화하기가 보다 쉬워지며 (34, 35), 세포의 조절과정에 영향을 줌으로써 ginsenoside의 합성을 변화시키는 생물학적 및 비생물학적 elicitor의 처리가 용이하므로 이들의 합성 및 분해 관련 단백질의 연구에 많은 이점이 있다.

Table 2. Summary of protein analysis of Panax Ginseng C. A. Meyer proteome [37]

Steps	Protein No
2-DE analysis (pH 3-10, 4-7, 4.5-5)	~300
MADLI-TOF Mass spectrometer (peptide mapping)	159
Function-identified proteins	17(4)*
Function-unidentified proteins	142
ESI-Q TOF Mass spectrometer (amino acid sequencing)	102
Function-identified proteins	87
Function-unidentified proteins	15
Total function-identified proteins	91

* Of the 17 proteins identified by peptide mapping, 13 proteins were included in the 87 proteins identified by amino acid sequencing and only 4 proteins were not included.

2.2 고려인삼의 프로테옴 분석

2.2.1 인삼근과 인삼 모상근의 프로테옴 분석

고려인삼의 프로테옴분석을 위한 첫 단계로써 전체 단백질을 이차원전기영동으로 분리하여 단백질의 표준지도를 만들고자 하였다. 표준지도 제작은 다음과 같은 장점으로 인하여 조직배양한 인삼 모상근을 사용하였다. (1) 인삼을 조직배양할 경우 3주 이내에 2배 성장을 하는 등 시료의 준비가 쉽다. (2) 인삼 단백질의 규명에 사용한 EST database의 대부분이 모상근 (strain KGSR-8)을 대상으로 이루어진 것으로 이 정보를 단백질 규명에 바로 사용할 수 있다. (3) 모상근의 경우 이차원전기영동상에서 재배 인삼에 비하여 단백질 spot 수가 더 많이 나타난다. (4) 모상근은 이차대사산물, 특히 ginsenosides를 대량생산하기에 적합하다. 따라서 인삼 모상근에서 인삼의 대사를 이해함은 이차대사산물의 대량 생산으로 연결될 수 있다.

인삼모상근에서 추출한 단백질을 pH 범위 3-10인 이차원전기영동으로 분리하여 silver stain 한 경우 약 280개의 단백질이 확인되었다 (36). 이 가운데 159개의 단백질이 규명되었으며, 이중 91개의 단백질의 기능이 확인되었다(Table 2). 기능이 확인된 단백질 중 20 % 이상이 에너지 대사 와 스

트레스 반응에 연관된 단백질이었다.

이차원전기영동상에서 비록 90여개의 단백질이 모상근과 재배인삼에서 공통적으로 나타나긴 하였으나, 재배인삼의 경우 단백질의 분포가 모상근과는 다른 양상으로 나타났다 (Fig. 1). 이러한 결과는 재배환경이 다를 경우 발현되는 단백질도 달라질 수 있음을 의미한다. 재배 인삼근의 경우 28, 26, 21, 20 kDa 단백질이 특히 많이 관찰되었다. 이들 단백질 각각은 이차원전기영동 젤 상에서 서로 다른 pI 값을 갖는 isoform으로 존재하였다 (37). 28 kDa 단백질은 이미 분리되어 GMP (ginseng major protein)로 명명되어 보고된 바 있으나 당시엔 그 기능은 확인되지 않았다 (38). 본 연구팀의 분석을 통하여 위의 네 종류의 단백질은 28 kDa 단백질에서 공통적으로 유래하였으며, 식물의 RNase 또는 RNase like protein과 상동성이 매우 높음을 확인하였다. 그러나 순수분리한 GMP에서 RNase 활성이 나타나지 않았다. GMP의 발현은 계절에 따라 크게 변화하는 양상으로 나타난 점은 본 연구에서 확인된 RNase like protein의 기능이 저장단백질일 가능성을 시사한다. 세포내에서 이들 단백질의 분포 및 다수의 isotype이 존재하는 이유에 관하여서는 더 많은 연구가 필요하다.

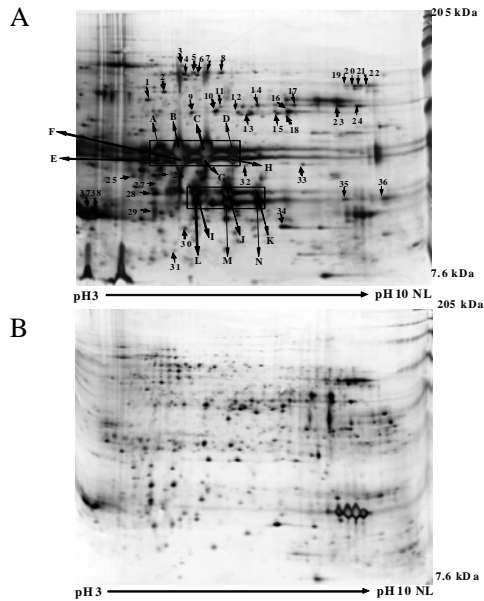


Fig 1. 2-DE of wild main root (A) and cultured hairy root (B) of *P. ginseng*. Commonly induced and identified proteins from the wild main root and the hairy root are indicated by arrows and numbered. Ginseng major proteins (GMPs) are boxed and alphabetized [37].

2.2.2 강한 빛에 의한 인삼 잎의 프로테옴 변화

인삼은 음식식물로서 성장에 적당한 광조건은 일반 태양광의 5~20% 수준이다 (39). 인삼이 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-2}$ 이상이 빛에 노출될 경우 광합성의 감소, 광호흡 증가, 백화 등 광저해 현상이 나타난다. 따라서 인삼의 생산성과 조도는 매우 밀접한 관련을 가지고 있다. 저광량에 적응되어 서식하는 인삼의 생리적 기작을 이해하기 위하여 비교 프로테옴 분석을 시도하였다 (40). 인삼이 강광에 노출될 경우 몇몇 단백질의 양이 급격히 변화하였다 (Fig. 2). 이 가운데 cytosolic ascorbate peroxidase (cytosolic APX)가 강광에 의하여 빠른 속도로 증가하였다. 이러한 결과는 강광을 조

사한 애기장대풀에서 cytosolic APX mRNA 수준이 급격히 증가한다 (41)는 보고와 일치한다. 이외에도 cytosolic small heat shock protein (smHSP) 역시 빠른 속도 (30분 이내)로 증가하였다. Cytosolic APX와 smHSP의 빠른 증가는 강광에 의하여 유발될 수 있는 세포의 손상으로부터 세포를 보호하는 작용을 할 것으로 추정된다. 빛에 의한 엽록체 막 단백질의 손상이 관찰되었다. 빛에 보다 적응된 인삼인 미국삼 (*P. quinquefolius*) 과 보다 민감한 종인 고려인삼 (*Panax ginseng*)에서 빛에 의하여 변화되는 프로테옴의 변화를 분석할 경우 인삼의 빛에 대한 생리적 기작의 규명 및 적응에 대한 보다 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

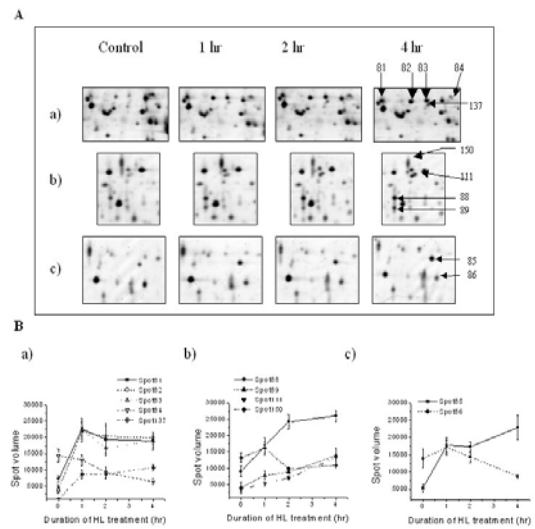


Fig 2. HL-induced changes of protein spots. Intact plants were exposed to HL (1700 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-2}$) for 0, 1, 2, or 4 hours. After HL treatment, proteins were extracted from leaves and separated by 2-DE (A). The spot volume is plotted in (B) [40].

2.2.3 프로테옴 분석의 적용

인삼의 경우 종과 부위에 따라 가격에 많은 차이를 보인다. 따라서 인삼 종 및 부위를 구분하는 일은 인삼의 상품화 및 거래에 있어서 중요하다. 특히 가공한 상태로 유통되는 경우 진품여부 및 인삼 부위를 판별하기가 쉽지 않아 이를 위한 방법의 개발이 필요하다. Lum 등 (8)은 서로 다른 인삼종류 및 부위에서 각각 이차원전기영동을 수행할 경우 이차원전기영동 지도상에서 충분히 구분이 가능할 만큼의 뚜렷한 차이를 보임을 제시함으로써 프로테옴 분석이 서로 다른 인삼종 (미국삼, 고려인삼, 인삼 배양근) 및 서로 다른 부분 (주근, 곁뿌리 등)의 구분에 적용될 수 있음을 제시하였다.

EST 서열 database와 MS/MS spectra를 비교하여 인삼 고유의 단백질을 규명한 방법은 단백질의 규명 비율이 10% 이하인 mass fingerprinting 방법에 비하여 단백질의 규명비율도 높으며 (80% 이상) 보다 정확한 결과를 얻도록 하였다. 따라서 인삼의 프로테옴 분석에 적용한 방법은 인삼뿐만 아니라 유전정보가 해독이 되지 않은 다른 식물의 프로테옴 분석에도 똑같이 적용이 가능하다.

다양한 환경적 변화에 대한 식물의 반응 연구에 프로테옴 분석을 적용한 몇가지 예가 보고되어 있다. Chang 등 (42)은 옥수수의 뿌리 끝에 공급되는 산소의 양을 줄인 경우와 무산소 상태라는 두 경우에서 각각 유도되는 단백질의 변화를 비교한 결과, 저산소 처리에 의하여 유도되는 단백질 중 많은 경우가 무산소 환경에 대한 적응과 연관이 되어 있음을 주장하였다.

인삼은 약효를 보이기까지 긴 시간의 성장기간이 필요하므로 인삼의 생산성은 다양한 환경요소에 영향을 받는다. 온도, 빛, 병해 등 다양한 환경에 반응하는 인삼의 생리를 연구하는데 있어서도 프로테옴 연구는 좋은 수단이 될 수 있다.

4년근과 1년근 인삼에서 mRNA를 분리하여

subtractive hybridization을 수행하거나 (43) 인삼의 EST 서열분석 (14) 등과 같이 ginsenosides의 합성과 연관된 유전인자를 찾아내기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. 위의 방법들과 더불어 인삼의 프로테옴 분석은 관련 유전인자를 찾아내기 위한 효과적인 방법이 될 것이다.

3. 인삼의 이차 대사산물 분석을 위한 기능 유전체 분석

인삼의 이차대사산물인 사포닌의 합성과 연관된 유전인자를 찾기 위하여 기능유전체 연구가 진행되고 있다. 특정 ginsenosides를 특히 많이 만들어내는 인삼 모상근을 선별하기 위하여 DNA microarray와 metabolic profiling 연구가 진행되었다. 동시에 몇몇 연구실에서는 유전자 조작을 통하여 고려인삼의 형질전환체를 만들고자 하는 시도를 하고 있다.

3.1 DNA microarray

인삼 4년근의 cDNA library로부터 유도한 1,500개의 EST clone을 만들고 이를 PCR로 증폭하여 glass slide에 심었다. 이를 이용하여 각 그룹의 모상근의 cDNA microarray를 수행하여 인삼 모상근에서 특이적으로 발현되는 유전인자 250여개를 분석하였다 (44). 모상근의 형태와 ginsenosides의 합성 사이의 상관관계가 있는지를 알아보기 위하여 모상근을 형태에 따라 다섯 그룹으로 나누어 각 그룹간의 ginsenosides의 생산을 비교하였다. 분석한 250개의 유전자 가운데, 분류가 되지 않은 14개의 유전자를 포함한, 63개의 유전인자가 ginsenosides를 많이 생산하는 모상근 line에서 다르게 발현되었다. 이 가운데 29%와 17%는 대사와 스트레스 반응에 연관된 유전인자였다. 이들 중 대부분은 리보솜 단백질과 연관된 것으로서 단백질의 합성 및 targeting에 관련한 유전인자이다.

이들의 합성은 결가지가 적은 모상근에서는 발현이 감소되었다. 이러한 현상은 단백질 합성기구의 활성을 조절함으로써 대사활동을 조절한 결과일 것으로 추정된다.

3.2 Metabolic profiling

대부분의 모상근 line에서 특정한 표현형을 보이지 않는 경우가 대부분이다. 이러한 경우 대사산물 분석을 통하여 mutant의 특성을 규명할 수 있으며 이는 곧 유전자의 기능 규명이 가능하게 하는 것이다. 많은 종류의 배양 조직 line에서 metabolite profiling을 하기 위해서는 초고속 분석 시스템을 갖추는 것이 필수적이다. GC/MS를 이용하여 151 종류의 애기장대풀 돌연변이체의 metabolite profiling을 수행하여 각 돌연변이체로부터 326종류의 화합물이 확인되었다 (45). 미정제 조직추출물로부터 대사체를 분석하기 위하여 GC/MS 뿐만 아니라 FTIR, ¹H-NMR, 또는 ESI MS 분석을 적용할 수 있다 (46).

3.3 형질전환 식물

DNA microarray, 프로테옴분석, metabolite profiling 등을 통한 유전자의 기능분석이 이루어지면, 이들 유전자의 조작을 통하여 인삼의 생산성 혹은 질을 향상시킬 수 있을 것이다. 여러 연구실에서 인삼의 형질전환을 시도하고 있는데, 그 대표적인 예가 *Agrobacterium*을 이용한 모상근의 생산이다 (47-49). 인삼 모상근을 이용하여 형질전환 인삼을 유도할 수 있음이 보고되었다 (50). 또한 GUS 유전자를 인삼에 도입한 인삼의 형질전환이 보고된 바 있으며 (51, 52), phosphinothricin acetyl transferase 유전자를 도입함으로써 제초제 저항성 인삼을 생산하기도 하였다 (53). 인삼 형질전환체를 토양에 옮겨 심을 경우, 특히 뿌리와 잎

사이 부분에서 심각하게 발생하는 곰팡이 감염으로 인하여 대부분이 토양에서 생존하지 못하는 문제가 발생한다. 인삼 형질전환체를 토양에 옮겨심기 전에 멸균한 perlite에서 적응시킴으로써 생존율이 증가함이 보고되는 등 형질 전환 인삼의 생산을 위한 연구가 수행되고 있다.

III. 결론

인삼의 약효를 보이는 인삼의 주성분은 다양한 ginsenosides로 구성된 인삼 사포닌이라고 알려져 있으나, ginsenosides의 합성 경로 및 관련 유전자에 대한 것은 거의 알려져 있지 않다 (54-56).

프로테옴 분석, EST 서열분석, BAC-end sequencing 등 인삼 유효성분의 합성경로 혹은 관련 유전자를 밝혀내기 위한 다양한 시도가 이루어지고 있다. EST 서열정보를 활용함으로써 인삼프로테옴 분석 속도 및 정확성이 급격히 증가한다던가, 메타볼롬 분석을 통하여 유전자의 기능에 대한 단서를 얻게 되는 등, 각각의 결과를 통합된 정보로써 공유하고 활용함으로써 시너지효과를 얻을 수 있다.

* 본 연구는 과학기술부에서 주관하는 21세기 프론티어 연구개발 사업인 자생식물이용기술사업단의 지원 (PF003101-03, PF003101-02) 으로 이루어졌다.

IV. 참고문헌

1. A.S. Attele, J. A.Wu and C.-S. Yuan, *Biochemical Pharmacology* 58 (1999) 1685.
2. C.N. Gillis, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 1.
3. J.-A. Miskell, G. Parmenter, *Planta* 215 (2002), 969
4. H. Liu, B. Zhao, J. Song, G. Zhang, J. Fu, W. Liu, *Zhong Yao Cai* 23 (2000) 187.
5. T.S. Wang, *Zhong Yao Tong Bao* 12 (1987) 15.

6. S.-K. Cheon, T.-S. Lee, J.-H. Yoon, S.S. Lee, *J. Ginseng Res.* 27 (2003) 202.
7. T.W.D. Chen, P.P.H. But, S.W. Cheng, M. Y.Kwok, F.W. Lau, H.X. Xu, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1281.
8. J. H. Lum, K.L. Fung, P.Y. Cheung, M.S. Wong, C.H. Lee, F.S. Kwok, M.C. Leung, P.K. Hui, S.C. Lo, *Proteomics* 2 (2002) 1123.
9. C.C. Hon, Y.C. Chow, F.Y. Zeng, F.C.C. Leung, *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (2003) 41.
10. H. Fushimi, K. Komatsu, M. Isobe, T. Namba, *Biol. Pharm. Bull.* 20 (1997) 765.
11. F. Ngan, P. Shaw, P.P.H. But, J. Wang, *Phytochemistry* 50 (1999) 787.
12. D.C. Yang, M.S. Kim, *J. Ginseng Res.* 27 (2003) 146.
13. S.Y. Park, C.S. Shin, E.M. Shin, J.S. Jo, Y.P. Lim, *Acta Horticulturæ* 339 (1996) 177.
14. J.D. Jung, H.W. Park, Y. Hahn, C.G. Hur, D.S. In, H.J. Chung, J.R. Liu, D.W. Choi, *Plant Cell Rep.* 22 (2003) 224.
15. M. Yoshikawa, T. Murakami, K. Yashiro, J. Yamahara, H. Matsuda, R. Sadoh, O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 46 (1998) 647.
16. D. Tsang, H.W. Yeung, W.W. Tso, H. Peck, *Planta Med.* 3 (1985) 221.
17. I. Saiki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1985) 725.
18. H. Thiellement, N. Bahrman, C. Damerval, C. Plomion, M. Rossignol, V. Santoni, D. de Vienne, M. Zivy, *Electrophoresis* 20 (1999) 2013.
19. K. Marques, B. Sarazin, L. Chane-Favre, M. Zivy, H. Thiellement, *Proteomics* 1 (2001) 1457.
20. C.P. Hong, S.J. Lee, J.Y. Park, P. Plaha, Y.S. Park, Y.K. Lee, J.E. Choi, K.Y. Kim, J.H. Lee, J. Lee, H. Jin, S.R. Choi, Y.P. Lim, *Mol. Gen. Genomics* 271 (2004) 709.
21. S.I. Kim, S.J. Kim, M.H. Nam, J.B. Seo, S. Kim, K.H. Kwon, Y.H. Kim, J.S. Choi, J.S. Yoo, D.C. Yang, K.T. Choi, Y.M. Park, *Korean J. Plant Tissue Culture* 28 (2001) 347.
22. J. Ohlrogge, C. Benning, *Curr. Opin. Plant Biol.* 3 (2000) 224.
23. L. Porubleva, K.V. Velden, S. Kothari, D.J. Oliver, P.R. Chitnis, *Electrophoresis* 22 (2001) 1724.
24. C. Finnie, S. Melchior, P. Roepstorff, B. Svensson, *Plant Physiol.* 129 (2002) 1308.
25. K.H. Kwon, M. Kim, J. Y. Kim, K.W. Kim, S.I. Kim, Y. M. Park, J.S. Yoo, *Proteomics* 3 (2003) 2305.
26. T.K. Yun, Y.-S. Lee, Y. H. Lee, S.I. Kim, H.Y. Yun, *J. Korean Med. Sci.* 16 (2001) S6.
27. A. Giri, M.L. Naresu, *Biotech. Adv.* 8 (2000) 1.
28. S.U. Park, P.J. Facchini, *J. Exp. Bot.* 51 (2000) 1005.
29. J.V. Shanks, J. Morgan, *Curr. Opin. Biotech.* 10 (1999) 151.
30. T. Yoshikawa, T. Furuya, *Plant Cell Rep.* 6 (1987) 449.
31. S. Inomata, M. Yokoyama, Y. Gozu, T. Shimizu, M. Yanagi, *Plant Cell Rep.* 12 (1993) 681.
32. V.P. Bulgakov, M.V. Khodakovskaya, N.V.

- Lebetskaya, C.K. Chernoded, Y.N. Zhuravlev, *Phytochemistry* 49 (1999) 1929.
33. K.S Ko, H. Noguchi, Y.Ebizuka, U. Sankawa, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 245.
34. J. Palazon, A. Mallo, R. Eibl, C. Lettenbauer, R.M. Cusido, M.T. Pinol, *Planta Med.* 69 (2003) 344.
35. G.T. Jeong, D.H. Park, B. Hwang, J.C. Woo, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 105 (2003) 493.
36. S.I. Kim, J. Y. Kim, E. A. Kim, K.H. Kwon, K.W. Kim, K. Cho, J. H. Lee, M. H. Nam, D.C. Yang, J. S. Yoo, Y.M. Park, *Proteomics* 3 (2003) 2379.
37. S.I. Kim, S.M. Kweon, E.A. Kim, J.Y. Kim, S. Kim, J.S. Yoo, Y.M. Park, *J. of Plant Physiology* 161 (2004) 837.
38. J.Y. Yoon, H.H. Byung, S.W. Jeung, Y.H. Lim, K.H. Kim, *Comp. Biochem. Phys. B* (2002) 551.
39. K. Xu, Z. Cao, W. Zhang, L. Xiu, *Sci. Agric. Sin.* 23 (1990) 69.
40. M.H. Nam, E.J. Heo, J.Y. Kim, S.I. Kim, K.H. Kwon, J.B. Seo, O. Kwon, J.S. Yoo, Y.M. Park, *Proteomics* 3 (2003) 2351.
41. S. Karpinski, C. Escobar, B. Karpinska, G. Creissen, P.M. Mullineaux, *Plant Cell* 9 (1997) 627.
42. W.W. Chang, L. Huang, M. Shen, C. Webster, A.L. Burlingame, J.K. Roberts, *Plant Physiol.* 122 (2000) 295.
43. Z.-Y. Luo, Q.-H. Lu, S.-P.-Liu, X.-H. Chen, J.-Q. Uo, L.-J.-Tan, W.-X.-Hu, *Acta Biochemica et Biophysica Ximica* 35 (2003) 554.
44. H.J. Chung, I.S. Cho, J.H. Kim, D.S. In, C.K. Hur, J.S. Song, S.S. Woo, D.W. Choi, J.R. Liu, *J. Plant Biol.* 46 (2003) 187.
45. O. Fiehn, J. Kopka, P. Drmann, T. Altmann, R. N. Trethewey, L. Willmitzer, *Nature Biotechnol.* 18 (2000) 1157.
46. R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W.B. Dunn, G.G. Harrigan, D.B. Kell, *Trends Biotechnol.* 22 (2004) 245.
47. T. Yoshikawa, T. Furuya, *Plant Cell Rep.* 6 (1987) 449.
48. S. Inomata, M. Yokoyama, Y. Gozu, T. Shimizu, M. Yanagi, *Plant Cell Rep.* 12 (1993) 681.
49. V.P. Bulgakov, M.V. Khodakovskaya, N.V. Lebetskaya, G.K. Chernoded, Y.N. Zhuravlev, *Phytochemistry* 49 (1999) 1929.
50. D.C. Yang, Y.E. Choi, *Plant Cell Rep.* 19 (2000) 491.
51. H.S. Lee, S.W. Kim, K.W. Lee, T. Eriksson, J.R. Liu, *Plant Cell Rep.* 14 (1995) 545.
52. Y.E. Choi, D.C. Yang, T. Kusano, H. Sano, *Plant Cell. Rep.* 20 (2001) 616.
53. Y.E. Choi, J.H. Jeong, J.K. In, D.C. Yang, *Plant Cell Rep.* 21 (2003) 563.
54. M. Karikura, T. Miyase, H. Tanizawa, T. Taniyama, Y. Takino, *Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991) 400.
55. M. Karikura, T. Miyase, H. Tanizawa, T. Taniyama, Y. Takino, *Chem. Pharm. Bull.* 39 (1991) 2357.
56. Y. Nagai, T. Anda, O. Tanaka, S. Shibata, *Chem. Pharm. Bull.* 20 (1972) 1212.