

Agro-infiltration을 이용한 토마토 β -carotene hydroxylase 유전자(*ChyB*) 과발현 및 담배식물체의 항산화 효과 증진

최윤정¹ · 윤경영² · 윤해근¹ · 서상곤¹ · 문용선^{1*}

¹영남대학교 원예생명과학과, ²영남대학교 식품영양학과

Enhanced Antioxidant Effect by over Expression of Tomato β -carotene Hydroxylase Gene (*ChyB*) Using *Agrobacterium*-infiltration in Tobacco Plant

Yoon-Jeong Choi¹, Kyung Young Yoon², Hae Keun Yun¹, Sang Gon Suh¹, and Yong-Sun Moon^{1*}

¹Department of Horticulture and Life Science, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

²Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract. Several reports indicated that astaxanthin and zeaxanthin have more active anticancer activity than pro-vitamin A carotenes. β -carotene hydroxylase is a key enzyme to synthesize zeaxanthin and astaxanthin in carotenoids biosynthesis pathway. We isolated the *ChyB* gene encoding β -carotene hydroxylase from tomato leaves. The *ChyB* gene (1.5Kbp) fragment was cloned into the binary vector and designated to pIG121-*ChyB*-tom. *Agrobacterium*-mediated infiltration was used for transient assay in *Nicotiana benthamiana*. Leaf samples were collected 0, 1, 2, 3 days after infiltration (DAI). RT-PCR result showed that the expression of β -carotene hydroxylase transcripts was not detected in control (0DAI), but its expression was detected after 1 DPI and increased later on. When the activity of β -carotene hydroxylase was measured, the 1,1-diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity (27%) at 2 DAI was significantly higher than that (21%) at 0 DAI. These results indicated that anti-oxidant activity dramatically increased at 2 DAI in tobacco leaves was due to over expression of tomato β -carotene hydroxylase. These results can be the foundation to develop tomato cultivars with high oxy-carotenoids content using the *ChyB* gene transformation.

Additional key words: anticancer effect, functional food, 'Momotaro' tomato

서 언

Carotenoids는 자연계에 존재하는 노랑, 오렌지, 분홍의 색소로서 동식물체에 널리 분포하는 가장 풍부한 색소이다 (Armstrong, 1994; Fraser and Bramley, 2004; Zhu et al., 2009). Carotenoids는 녹색식물, 곰팡이, 효모, 버섯 및 세균 등이 생산하는 황색, 적색 또는 자색의 polyene계 색소로서 현재 약 600여종이 밝혀져 있다(Bramley, 2002; Straub, 1987). 주로 식물의 색소 성분으로 존재하며, 당근, 고구마, 브로콜리, 시금치, 케일과 같은 짙은 녹색 채소와 토마토 열매 등에 많이 포함되어 있다.

또한 기능성 식품의 소재로 각광받고 있는 carotenoids는 생물체에서 중요한 생리적 역할을 수행하며(Armstrong and

Hearst, 1996), 동물이나 인체 내에서 외부자극에 의한 세포 보호 효과, 잠재적인 항암 효과와 질병에 대한 보호효과를 나타내고 있다. 특히 carotenoids가 사람에게 건강과 영양적 측면에서 중요한 역할을 하지만, 사람을 비롯한 척추동물은 carotenoids를 생합성 할 수 없기 때문에 식품의 형태로 섭취하여야 한다(Misawa et al., 1990; Quilliot et al., 2011). 식품을 통해 섭취된 carotenoids는 세포의 구성물질인 단백질, 지질, 핵산 등에 산화적 장해를 일으켜 세포 손상을 유발하여 세포와 조직의 산화적 손상 및 다양한 노화관련 질병을 일으키는 것으로 알려진 활성산소종(reactive oxygen species)의 반응을 억제하는 것으로 보고되어 있고(Cerutti, 1985; Chew et al., 1996; Gerster, 1992), 생물체에서 superoxide dismutase(SOD), tocopherol과 함께 생체방어에 큰 역할을

*Corresponding author: hangulmys@ynu.ac.kr

※ Received 15 March 2011; Accepted 22 April 2011. 본 연구는 2008년 영남대학교 학술연구조성비(208-A-235-136)에 의해 수행되었음.

담당하고 있다(Canfield et al., 1992).

Carotenoids의 일종인 lycopene과 β -carotene은 식물체내에서 geranylgeranyl phyrophosphate(GGPP)로부터 phytoene synthase, phytoene desaturase 및 ζ -carotene desaturase 등의 다양한 효소활성에 의해 합성되며, 토마토의 β -carotene과 lycopene은 뛰어난 항산화력을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Guiliano et al., 1993; Guo et al., 2009; Pecker et al., 1996). 한편 β -carotene과 lycopene에서 유래한 zeaxanthin 및 astaxanthin 항산화 효과가 더 매우 우수한 것으로 보고되어 있다. 식물체는 phytoene에서 lycopene을 경유하는 수종의 carotenoids 생합성하며 1990년대 이후 생합성에 관여하는 효소 유전자들을 구명하여 분자구조학적 해석이 진행되고 있다(Cunningham and Gan, 1998). 또한, β -carotene과 lycopene으로부터 zeaxanthin 및 astaxanthin의 합성에는 β -carotene hydroxylase(ChyB)가 관여하는 것으로 밝혀져 있다.

따라서 본 연구에서는 재배종 토마토에서 β -carotene hydroxylase 유전자 *ChyB*를 분리하고, polymerase chain reaction (PCR) 방법으로 증폭한 후 형질발현 vector를 구축하였다. 담배식물체에 일시적 형질전환하여 *ChyB* 전사체 발현 정도를 RT-PCR을 이용해 비교 분석하였으며, 항산화실험을 통해 최종산물인 oxy-carotenoids의 발현량을 예측할 수 있었다. 이런 결과를 토대로 원예작물에 외래 유용 유전자를 도입하여 항산화 효과가 우수한 zeaxanthin 및 astaxanthin 등의 함유량을 증진시킨 새로운 기능성 토마토 및 다양한 원예작물의 신품종 개발의 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험에서 식물재료로 일본 다카이 종묘의 완숙 토마토 (*Lycopersicon esculentum* M. cv. 'Momotaro')를 이용하여 β -carotene hydroxylase 를 합성하는 *ChyB* 유전자를 분리하였고, 토마토 *ChyB* 유전자의 일시적 형질발현 실험을 위해 담배(*Nicotiana benthamiana* L.) 종자를 영남대학교 생명공학부 식물분자유종연구실에서 분양 받아 온실(주간 28°C, 야간 23°C)에서 재배하였다.

토마토 *ChyB* 유전자 분리 및 형질발현용 vector 구축

National Center for Biotechnology Information(NCBI) 사이트에서 토마토 *ChyB* DNA sequence(Accession No. y14810)를 찾고 토마토 *ChyB* 유전자 특이적 프라이머 FChyB(5'-AAGAAAGCCGAGATTGGCGGTTTG-3')와 RChyB(5'-CCGAAAGTAAGGCACGTTGGCAAT-3')를 이용해 PCR

한 후 1.5 Kbp *ChyB*유전자 단편을 획득하였다. QIAquick Gel Extraction kit(QIAGEN, German)를 이용하여 아가로즈 겔에서 분리하고 pGEM-T Easy vector system1(Promega, USA)에 클로닝하고 pT-ChyB로 명명하였다. Binary vector에 클로닝하기 위하여 먼저 pBluescript SK+에 서브클로닝하고 pBlue-ChyB로 명명하였다. Sub-cloning 확인을 마친 토마토 *ChyB* 유전자를 binary vector인 35S 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 프로모터를 가진 pIG121Hm에 클로닝하고 pIG121-ChyB-tom로 명명하고 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 열충격법으로 형질전환하여 transient assay에 이용하였다. 모든 재조합 vector들은 콜로니 PCR 확인 및 DNA sequencing하여 확인하였다.

Genomic DNA 와 plasmid DNA 추출 및 정제

토마토 식물체의 어린 잎을 액체질소로 곱게 마쇄하여 공급자 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, USA) 매뉴얼에 따라 gDNA를 추출하고, Wizard Plus SV Miniprep kit(Promega, USA)를 사용하여 pIG121-ChyB-tom pDNA를 분리하였다. 분리한 plasmid DNA는 UV spectrophotometer(S-3100, Scinco, Korea)로 정량 후 -20°C에서 보관하였다.

Agro-infiltration을 이용한 담배 일시적 형질전환

Agrobacterium-mediated infiltration 방법으로 담배로 일시적 형질전환을 했다(Eskelin et al., 2010; Moon and Hefferon, 2007). pIG121-ChyB-tom을 포함한 형질전환된 *Agrobacterium*을 kanamycin 50 μ g·mL⁻¹이 포함된 LB액체배지 seed culture 후 50mL 액체배지에 옮긴 후 28°C, 24시간 배양하였다. 100mM MES, 200 μ M acetosyringone/DMSO를 넣어 OD값(600nm)이 0.5가 되면 주사기를 이용하여 잎의 뒷면에 *Agro*-infiltration 하였다. 실험직전 잎을 채취하여 대조구로 0 days after infiltration(DAI), 감염 후 1, 2, 3 DAI로 각각 샘플링 한 후 total RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다.

Total RNA 추출 및 RT-PCR

Agro-infiltration 하기 전의 담배 잎을 0DAI로, 감염 후 1, 2, 3일째 잎을 채취하여 액체질소로 곱게 마쇄 한 후 RNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, German)을 이용하여 total RNA를 추출 하고 UV spectrophotometer로 정량 하였다. RT-PCR 용 cDNA 합성은 SuperScriptTMIII first strand synthesis system (Invitrogen, USA)을 이용하여 총 반응용액 20 μ L(1 μ g total RNA, 2.5 μ M oligo dT-프라이머, 0.5mM dNTP mix, 1X RT buffer, 5 μ M DTT, 40units RNaseOUT, 200units SuperScriptIII reverse transcriptase)를 가지고 역전사 반응을 수행하였다.

cDNA 합성을 위한 PCR 반응조건은 65°C, 5분; 4°C, 2분; 25°C, 5분; 50°C, 50분; 70°C, 15분 후 4°C에서 holding 순으로 실행하였다. cDNA 2μL(1/10 volume)을 template로 하여 ChyB 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 25 cycles(94°C, 2분 denaturation; 55°C, 1분 annealing; 72°C, 1분 extension)의 PCR을 하였다. Actin 전사체를 internal control로 이용하여 ChyB transcript 발현 정도를 비교 분석하였다.

항산화 활성실험

Agro-infiltration이 담배 잎의 항산화 효능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Chen et al.(2005)의 방법에 따라 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)에 대한 담배 잎 추출물의 전자공여능을 측정하였다. 항산화 효능을 위한 시료는 감염 0DAI, 2DAI, 3DAI의 각 잎을 채취하여 액체질소로 곱게 마쇄한 후 methanol로 추출하여 사용하였다. 즉, 시료 1.3g에 70% methanol 5mL을 첨가하여 60°C, 200rpm에서 3시간 동안 교반하여 추출한 다음, 이 추출액을 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상등액을 petri-dish에 옮겨 clean bench에서 휘발·농축 시켰다. 건조된 추출액에 멸균수 5mL를 첨가하여 일정한 농도의 현탁액을 만들었으며, 희석한 현탁액 1mL에 0.2mM의 DPPH용액 0.5mL를 첨가하여 혼합하고 30분 뒤에 UV spectrophotometer를 사용해서 517nm에서

흡광도를 측정하여 다음의 공식에 의해 DPPH 라디칼 소거능을 환산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = (1 - \text{시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도}) \times 100$$

또한 Agro-infiltration 하기 전의 담배 잎(0DAI)을 대조구로 하였으며, 대조구와 처리구의 유의성을 검증하기 위하여 Student's T-test를 실시하였다.

결과 및 고찰

Agro-infiltration 방법에 의해 형질전환된 담배의 β-carotene hydroxylase 전사체 발현 증가

항산화 효과가 우수한 lycopene 성분이 많이 포함되어 있고 식미가 우수한 완숙토마토 재배종 'Momotaro'에서 1.5Kbp β-carotene hydroxylase 유전자 ChyB를 PCR을 이용해 분리하였다. 이것은 cDNA를 주형으로 사용하였을 때 637bp 산물을 예상한 것과 다르게 gDNA를 사용하였기 때문에 intron(860bp)에 의해 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 2, and 4A). PCR 후 A-tailing된 ChyB 유전자 단편을 pGEM-T Easy vector에 클로닝한 후 NotI 제한효소로 자른 후 pBluescript SK+ vector에 sub-cloning하였다. pBlue-ChyB와 pIG121Hm을 XbaI과 SacI 두 가지 제한효소로 GUS 유전자를 제거한 나머지 pIG121Hm에 ligation 하였다. 모든 콜로니는 PCR로 확인하였다. 형질발현 vector 구축을 위한 모식도를 Fig. 3에 나타냈다. Agrobacterium-mediated infiltration 방법으로 담배로 일시적 형질전환을 하였다. 담배 잎은 수분공급을 충분히 하여 기공이 열린 상태에서 준비된 Agrobacterium cell을 100mM MES와 200μM acetosyringone/DMSO과 섞어서 잎 뒷면에 주사기를 이용하여 infiltration 하였다. 실험 후, 3일 동안 잎을 샘플링하여 액체질소로 급동결 후 -80°C에 보관 하고, total RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 pIG12-ChyB-tom vector를 도입 후 과발현으로 인한 토마토 ChyB 전사체 형질발현 정도를 확인하였다. ChyB 유전자 특이적 프라이머를 이용한 RT-PCR 결과, 주형이 cDNA이므로 intron 부분은 제외되고 exon 부분만 포함되어 있어 프라이머를 고안할 때 기대 되었던 637bp에서 유전자 특이적 밴드를 확인할 수 있었다. 그리고 actin 전사체를 internal control로 하여 도입 유전자의 전사체량을 비교하였다(Fig. 4B). 무처리구(0DAI) 담배 잎에서는 β-carotene hydroxylase 전사체 발현이 확인되지 않았지만, 일시적 형질전환 후 1DAI부터 증가하여 2DAI 최대 전사량을 보이고 3DAI부터 그 발현량이 감소하는 경향을 확인하였다(Fig. 4A). 이 결과를 통해 β-carotene

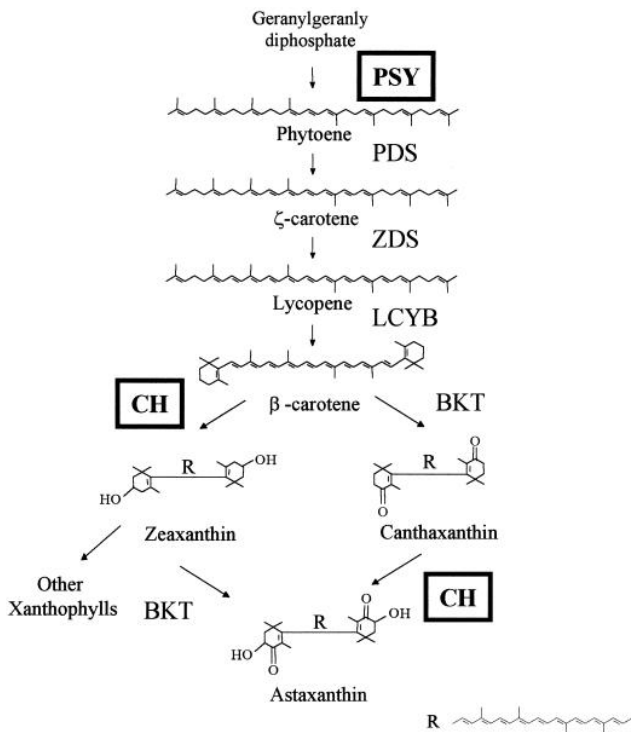


Fig. 1. Simplified scheme of carotenoids biosynthesis pathway. CH: β-carotene hydroxylase, PSY: phytoene synthase (Steinbrener, J. and H. Linden, Plant physiology, 125:810-817).

```

1  atggcggccg  gaatttcagc  ctccgctagt  tcccgaacca  ttcgcctccg  tcataaccgg
61  ttctcagtc  caaatccgc  ctcaaccgcc  ccgcccgttc  tgttctctc  tccgtaact
121  cgcaattttg  gcgcaatttt  gctgtctaga gaagaagccga gattggcggg ttgtttgtg
181  ctggagaatg  agaaattgaa  tagtactatc  gaaagtgaga  gtgaagtaat  agaggatcgg
241  atacaagtag  agattaatga  ggagaagagt  ttagctgcca  gttggctggc  ggagaaattg
301  gcgaggaaga  aatcgagag  gtttacttat  cttgtggcag  ctgtgatgtc  tagtttgggg
361  attacttcta  tggcgatttt  ggcggtttat  tacagatttt  catggcaaat  ggagggtgga
421  gaagtgcctt  ttctgaaat  gttagctaca  ttcactctct  cgtttggcgc  tgccgtagga
481  atggagtact  gggcgagatg  ggctcataga  gcactatggc  atgcttcttt  atggcacatg
541  cacgagtcgc  accatagacc  aagagaagga  cttttgaga  tgaacgacgt  ttccgcata
601  acaaatgctg  ttccagctat  aggtcttctt  tcctacgggt  tcttcataa  agggatcgtc
661  cctggcctct  gtttcggcgc  tggattgggg  atcacagtat  ttgggatggc  ttacatgttc
721  gttcacgatg gactggttca  taagagattt  cccgtagggc  ctattgcaa cgtccttac
781  tttcgggaggg  tagctgcagc  acatcagctt  catcactcgg  acaaatttga  tgggttccca
841  tttcgggcttgt  ttctaggacc  taaggaattg  gaagaagtag  gaggacttga  agagttagaa
901  aaggaagtca  accgaaggat  taaaatttct  aagggattat  tatgatcaaa  agatacgtct
961  gataataata  aaatgcgatt  gtatttaggc  tgtagattat  tattgggaaa  aagatagaaa
1021  gatataata  tgaatataat  ataaaatgca  acaagcttcc  tatggagaag  nccitttctt
1081  ttttgtncc  tgtacgtaa  aggtgaacaa  ttgatgtcc  tagtacttgt  tgacaaacca
1141  gaagaacgat  aattcaaac  aaa

```

Fig. 2. Nucleotide sequences of ChyB cDNA and gene specific primer from tomatoes. ChyB gene is encoding β -carotene hydroxylase (NCBI gene accession No. y14810). Full sequences of 1163 bp tomato β -carotene hydroxylase cDNA fragment was shown. Lined box is 24 mer forward primer and dotted box for 24 mer reverse primer.

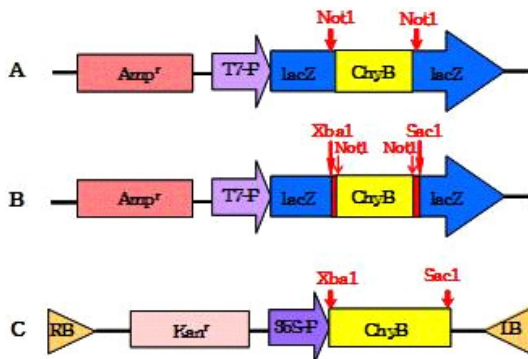


Fig. 3. Scheme of expression vector constructions. A) pT-ChyB vector, ChyB gene fragment was cloned into pGEM-T Easy vector; B) ChyB was inserted with NotI for Sub-cloning as pBlue-ChyB vector; C) pIG121-ChyB-tom binary vector driven by 35S CaMV promoter for plant transformation. Amp^r, ampicillin resistant gene; Kan^r, kanamycin resistant gene; T7-P, T7 promoter; 35S-P, 35S promoter; RB, right border; LB, left border.

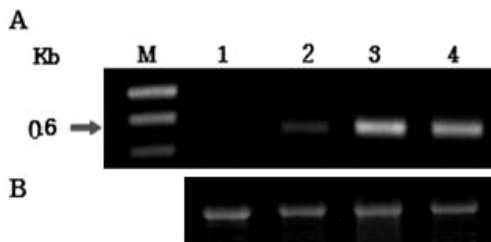


Fig. 4. Increased expression of tomato ChyB transcripts after *Agro*-infiltration in *N. benthamiana* leaves by RT-PCR. A) One μ g of total RNA was used to make cDNA by RT-PCR and 1/10 volume of cDNA was separated on a 1% agarose gel; B) Actin was used as internal control; M, 1 Kbp DNA marker; 1, 0DAI; 2, 1DAI; 3, 2DAI; 4, 3DAI.

hydroxylase 발현이 매우 낮은 담배 잎에 외래 *ChyB* 유전자를 형질전환시켰을 때 담배 잎에서도 β -carotene hydroxylase 전사체 발현량이 급증하는 것을 확인하였다.

β -carotene hydroxylase 과발현으로 인한 담배 잎에서의 항산화 효능 증가

DPPH는 보라색의 안정한 유리 라디칼로 전자나 수소원자에 의해 전자가 짝이 되어 비 라디칼이 되면 특유한 색이 사라지게 된다. 이 원리를 이용하여 항산화제나 환원제와 같은 수소공여를 하는 물질의 수소 혹은 전자공여능을 측정하며, 다양한 시료의 항산화 효능 측정에 이용되는 대표적인 방법이다(Kim and Suh, 2005). RT-PCR 결과를 확인한 후, 담배 잎에 *Agro*-infiltration 감염 후 0, 2 그리고 3DAI 잎을 채취하여 메탄올에 추출 후 시료를 10배 희석한 것을 DPPH의 전자공여능을 통해 항산화 활성을 측정할 결과는 Fig. 5와 같다. 대조구(0DAI)의 경우 21%의 DPPH radical 소거활성을 나타내었으며, 감염 2일 후에는 27%의 DPPH의 radical 소거 활성을 보여 처리구에서 항산화 활성이 증가된 것을 확인하였다. 0DAI, 2DAI, 3DAI의 결과를 Student's paired T-test한 결과 P value는 0.0001이었고 SED(standard error of difference)가 0.067로 통계학적으로 매우 유의한 것으로 판정되었다. Moon and Hefferon(2007)는 *Agrobacterium*-infiltration을 이용하여 야생형 *Arabidopsis*(cv. Columbia) 잎에 일시적 형질전환(transient assay)한 결과 접종1일 후

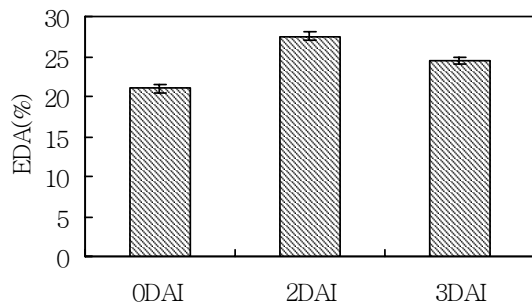


Fig. 5. Comparison of anti-oxidant effect using DPPH after transient Agro-infiltration with pIG121-ChyB-tom in *N. benthamiana*. 1, 0DAI; 2, 1DAI; 3, 2DAI; 4, 3DAI, 0DAI was used as control. Vertical bars show the mean \pm SD (n = 3).

최고의 β -galactronidase(GUS) 활성을 보인 후 접종 3일째 그 활성이 급격히 감소하는 것을 보고했다. 또한 Northern blot analysis를 통해 RNA 전사체 발현량을 조사한 결과 접종 1일 후 증가한 전사체가 접종 3일 후 급감한다는 것을 보고하였다(Moon and Hefferon, 2007). Eskelin et al.(2010)의 최근 연구결과에서도 외래 유전자의 도입으로 인한 숙주 식물에서의 전사체 증가는 최종 산물인 단백질 과발현과 양의 상관관계가 있음을 알 수 있었다(Eskelin et al., 2010). 이런 결과들을 통해 *ChyB* 유전자의 RNA 전사량이 2DAI에 최대치를 이루고 최종산물인 oxy-carotenoids 인zeaxanthin 및 astaxanthin 함량이 2DAI에 증가하여 2DAI DPPH radical 소거활성 값이 대조구에 비해 약 3배 증가한 것으로 예측할 수 있다. 일반적으로 산화적 스트레스는 암과 노화를 비롯하여 인체 내 여러 가지 질병을 유발한다. 항산화력을 가지는 물질은 유리 라디칼을 제거하고 세포막의 손상 및 지질과산화 등을 저해함으로써 산화적 스트레스에 의해 유발되는 여러 가지 질병을 예방할 수 있다. 특히, β -carotene, lycopene, lutein을 비롯한 carotenoids는 유리 라디칼을 제거하고 활성 산소종에 의한 손상을 줄이는 강력한 항산화제 임이 여러 보고에서 확인되었다(Fu et al., 2011; Liu et al., 2008; Prasad et al., 2011; Zanfini et al., 2010). 이와 같이 carotenoids가 풍부한 과일이나 채소의 섭취가 항암효과를 가지며, 심혈관 질환 및 퇴행성 질병의 예방 효과가 있음이 보고되어(Nishino et al., 2009; Rao and Agarwal, 1999), 국내외적으로 옥수수나 밀과 같은 곡류의 배에서 부족한 carotenoids 함량을 높이는 연구가 활발하다. 특히, 최근에는 옥수수 등에서 직접 관련 유전자들을 찾아 발현을 촉진하는 연구 등이 수행되고 있다(Li et al., 2010; Zhu et al., 2007). 그러나 아직 옥수수와 밀과 같은 곡류에서 carotenoids 생합성에 관련하는 효소 유전자들을 발굴하고 종자에서의 그 기능을 확인하는 것이 쉽지 않은 상태이다. 이런 문제점을 극복하기 위한 또 다른 방법으로 외래 carotenoids 생합성 유전자들을 형질전환

하여 과발현시키거나 고함량 carotenoids 품종을 선발하는 등(Aluru et al., 2008; Harjes et al., 2008)의 방법을 이용하고 있다. 본 연구에서는 토마토에서 분리된 oxy-carotenoids 유전자를 다른 숙주식물인 담배 잎에 형질전환 하여 과발현을 유도함으로써 carotenoids 함량을 증가시키고 이에 따라 항산화 효과가 증가됨을 확인하였다. 따라서 이러한 연구 결과는 외래유전자의 과발현을 통한 기능성 원예작물 및 곡류 생산에 적용 가능할 것으로 기대된다.

초 록

β -carotene hydroxylase는 carotenoids의 생합성 경로에서 astaxanthin 및 zeaxanthin 합성에 관여하는 주요 효소이다. Astaxanthin과 zeaxanthin은 비타민 A 전구체보다 항암효과가 더 높다고 보고되고 있다. 따라서 β -carotene hydroxylase 유전자(*ChyB*)를 토마토 잎에서 분리하고 binary 벡터에 클로닝 한 후 pIG121-ChyB-tom으로 명명하였다. 토마토 *ChyB* 유전자를 *Agrobacterium*-mediated infiltration 방법을 이용하여 생육 8주 된 담배 잎에 일시적 형질전환을 하였다. 감염 0, 1, 2, 3일 후 RT-PCR 한 결과 담배에서는 거의 발현되지 않았던 β -carotene hydroxylase 전사체가 감염 1일 후부터 증가하여 2일 후 최대 전사량을 보이고 3일 후부터 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과를 바탕으로 감염 후 0, 2, 3일째 담배 잎을 채취하여 항산화 효능을 측정 한 결과, 감염 2일 후 1,1-diphenyl-picryl hydrazyl(DPPH) radical 소거 활성이 대조구에 비해 약 30% 증가하는 것을 확인하였다. 이 연구결과를 통해 외래 유용 유전자를 원예작물에 형질전환하여 항산화 및 항암효과가 우수한 zeaxanthin 및 astaxanthin 등 oxy-carotenoids의 함유량을 증진시킨 새로운 기능성 토마토 및 다양한 원예작물의 신품종 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

추가 주요어 : 항산화 효과, 기능성식품, ‘모모타로’ 토마토

인용문헌

- Aluru, M., Y. Xu, R. Guo, Z. Wang, S. Li, W. White, K. Wang, and S. Rodermeil. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J. Exp. Bot.* 59:3551-3562
- Armstrong, G.A. 1994. Ecubacteria show their true colors: Genetic of carotenoids pigmen biosynthesis from microbe to plants. *J. Bacteriol.* 176:4795-4802.
- Armstrong, G.A. and J.E. Hearst. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoids pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237.
- Bramley, P.M. 2002. Regulation of carotenoid formation during

- tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53:2107-2113.
- Canfield, L.M., J.W. Forage, and J.G. Valenzuela. 1992. Carotenoids as cellular antioxidants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200:260-265.
- Cerutti, P.A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227:375-381.
- Chen, Y.C., Y. Sugiyama, N. Abe, R. Kuruto-Niwa, R. Nozawa, and A. Hirota. 2005. DPPH radical-scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69:999-1006.
- Chew, B.P., M.W. Wong, and T.S. Wong. 1996. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. *Anticancer Res.* 16:3689-3694.
- Cunningham, F.X. Jr. and H.E. Gan. 1998. Genes and enzymes of carotenoids biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 49:557-583.
- Eskelin, K., T. Suntio, S. Hyvärinen, A. Harfren, and K. Mäkinen. 2010. *Renilla* luciferase-based quantitation of potato virus A infection initiated with *Agrobacterium* infiltration of *N. benthamiana* leaves. *J. Vir. Meth.* 164:101-110.
- Fraser, P.D. and P.M. Bramley. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 19:1053-1068.
- Fu, H., B. Xie, S. Ma, X. Zhu, G. Fan, and S. Pan. 2011. Evaluation of antioxidant activities of principal carotenoids available in water spinach (*Ipomoea aquatic*). *J. Food Comp. Anal.* 24: 288-297.
- Gerster, H. 1992. Anticarcinogenic effect of common carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 63:93-121.
- Guiliano, G., G.E. Bartley, and P.A. Scolnik. 1993. Regulation of carotenoids biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5:379-387.
- Guo, X., L. Yang, H. Hu, and L. Yang. 2009. Cloning and expression analysis of carotenogenic genes during ripening of autumn olive fruit (*Elaeagnus umbellate*). *J. Agri. Food Chem.* 57:5334-5339.
- Harjes, C.E., T.R. Rocheford, L. Bai, T.P. Brutnell, C.B. Kandianis, S.G. Sowinski, A.E. Stapleton, R. Vallabhaneni, M. Williams, E.T. Wurtzel, J. Yan, and E.S. Buckler. 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319:330-333.
- Kim, C.J. and H.J. Suh. 2005. Antioxidant activities of Rhubarb extracts containing phenolic compounds. *Korean J. Food Culture* 22:77-85.
- Li, Q. G. Farre, S. Naqvi, J. Breitenbach, G. Sanahuja, C. Bai, G. Sandmann, T. Capell, P. Christou, and C. Zhu. 2010. Cloning and functional characterization of the maize carotenoid isomerase and β -carotene hydroxylase genes and their regulation during endosperm maturation. *Transgenic Res.* 19:1053-1068.
- Liu, D., J. Shi, A.C. Ibarra, Y. Kakuda, and S.J. Xue. 2008. The scavenging capacity and synergetic effects lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Sci. Technol.* 41:1344-1349.
- Misawa, N., M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura, and K. Harashima. 1990. Elucidation of the *Erwiniauredovora* carotenoids biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:6704-6712.
- Moon, Y.S. and K.L. Hefferon. 2007. Amplification of genome-integrated BeYDV replicon by transient expression. *Elec. J. Biotech.* 10:1-11.
- Nishino, H., M. Murakoshi, H. Tokuda, and Y. Satomi. 2009. Cancer prevention by carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 483:165-168.
- Pecker, I., R. Gabbay, F.X. Jr. Cunningham, and J. Hirschberg. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Mol. Biol.* 30:807-819.
- Prasad, K.N., L.Y. Chew, H.E. Khoo, B. Yang, A. Azlan, and A. Ismail. 2011. Carotenoids and antioxidant capacities from *Canarium odontophyllum* Miq. *Fruit Food Chem.* 124:1549-1555.
- Quilliot, D., A. Forbes, F. Dubois, J.L. Gueant, and O. Ziegler. 2011. Carotenoid deficiency in chronic pancreatitis effect of an increase in tomato consumption. *Eur. J. Clin. Nutr.* 65: 262-268.
- Rao, A.V. and S. Agarwal. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic disease: A review. *Nutr. Res.* 19:305-323.
- Straub, O. 1987. List of carotenoids. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Zanfini, A., G. Corbini, C.L. Rosa, and E. Dreassi. 2010. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT-Food Sci. Technol.* 43:67-72.
- Zhu, C., S. Naqvi, S. Gomez-Galera, A.M. Pelacho, T. Capell, and P. Christou. 2007. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends. Plant Sci.* 12:548-556.
- Zhu, C., S. Naqvi, T. Capell, and P. Christou. 2009. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 483:182-190.