

최 종  
연구보고서

SOD 유전자 형질전환을 통한

토마토의 가뭄저항성 향상

Generation of stress-resistant Tomato plant by  
transforming SOD and CAT gene

연 구 기 관

성균관 대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “SOD 유전자 형질전환을 통한 토마토의 가뭄저항성 향상” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 1 월 일

주관연구기관명 : 성균관대학교

총괄연구책임자 : 이 우 성

연 구 원 : 이 병 두

연 구 원 : 강 봉 구

## 요 약 문

### I. 제 목

SOD 유전자 형질전환을 통한 토마토의 가뭄저항성 향상

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

농작물의 생산성증대는 현재 우리나라 농업의 열악한 환경 속에서 증가되어가는 외국의 수입농산물에 대처할수 있는 가장 중요한 일이다. 농작물은 냉해, 가뭄과 같은 악조건에서 많은 stress를 받고 그 생산성은 현저히 감소하게 된다. 이러한 stress에 저항성을 가진다는 것은 농작물의 생산을 현격하게 증가시킬수가 있다는 것을 의미한다. 따라서 본 과제는 식물의 stress 저항성의 증가를 통해 농작물의 생산성을 증가하는데 그 목적이 있다고 하겠다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 Pea의 Cu/Zn SOD와 Cotton의 Catalase를 토마토에 형질전환시켜 엽록체에서 과발현을 유도함으로써 oxidative stress시 저항성이 증가된 토마토를 개발하는데 그 목적이 있다. 이에 Agrobacterium을 통해 토마토를 형질전환하였고, 형질전환 토마토의 oxidative stress에서의 저항성을 측정하였다.

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

연구의 결과 SOD와 Catalase가 형질전환된 토마토는 엽록체에서 과발현을 하였고, 또한 oxidative stress에 저항성이 증가하는 것을 확인할 수가 있었다. 이러한 점에 착안을 하여 다른 작물에서의 형질전환을 유도하여 그 효과를 확인하는 작업이 수행되어야 한다고 생각되어진다.

## SUMMARY

(영문요약문)

When plant is exposed to various stress condition, ROS is produced which damages the plant. Hence we attempted to generate transgenic plants which can overcome the ROS. SOD(superoxide dismutase) and CAT(catalase) genes were used to transform tomato plants. The chloroplast of the transformed plants showed increased enzymatic activity of SOD and CAT. Also we checked these transformed plants for resistance to oxidative stress, by treating the plant with Methyl viologen(MV). The treated plants were found to better adapting to oxidative stress than control plant.

## CONTENTS

(영문목차)

1. Introduction	5
2. Recent devolpment	11
3. Results	14
4. Discussion	33
5. Further study	34
6. Reference	35

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	5
제 2 장	국내외 기술개발 현황	11
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	14
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	33
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	34
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	34
제 7 장	참고문헌	35

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

본 과제는 유해산소 superoxide를 제거하는 항산화효소 superoxide dismutase (SOD) 유전자를 토마토에 형질전환하여 water stress에의 저항성 증가를 통하여 토마토의 생산성을 향상시켜 보고자 하는 것이다. 식물은 일반적으로 가뭄, 고광, 저온, 공해, 감염 등의 외부 자극에 의하여 유해산소가 많이 발생되고 있으며 이것들에 의하여 세포막, 단백질, 핵산 등의 세포물질이 손상되고 있다. 이런 손상에 의하여 식물의 조직은 노화 및 파괴가 이루어지게 된다. 작물이 접하는 대부분의 환경자극은 유해산소를 발생하게 하고 광범위하게 식물의 기능 및 구조를 파괴한다. 항산화 기능이 증가되어 이런 환경자극에 저항하는 작물을 개발하여 보고자 하는 연구는 오랫동안 진행되어 왔다. 즉 SOD, catalase, ascorbate peroxidase 등의 항산화효소 유전자를 이용한 환경저항성을 늘리고자 하는 연구가 주된 연구내용이었고 많은 경우 긍정적인 연구 결과를 보여주고 있다. 본 연구과제는 완두의 SOD를 토마토의 엽록체로 이동시키고, 완두의 SOD와 면화의 Catalase를 동시에 엽록체로 이동시켜 과발현시킴으로써 oxidative stress시 저항성이 증가된 토마토를 개발하고자 한다.

그간의 본 연구실에서 이루어진 유해산소에 의한 세포막 분해에 관한 생화학적 연구에 의하면 세포막을 파괴하는 효소 및 peroxidation 등은 유해산소에 의하여 조절되고 있음이 규명되었다. 유해산소의 제거를 통하여 노화 및 손상이 특히 민감한 토마토를 이용한 형질전환 연구를 시도하여 보고자 한다. 이 과제는 기술적 파급효과가 크다고 판단되며 특히 본 과제의 연구내용은 기타 작물의 다른 환경적 자극에의 저항성 증가에 도입될 수 있을 것으로 예상된다.

### 2. 경제·산업적 측면

현재 우리 나라는 날로 작물의 수입 의존도가 높아 가고 있다. 좁아지고 있는 농업 용지와 영농 이탈 현상의 증가 등으로 인하여 농업 생산성 또한 매우 열악한 상태이다. 따라서 단위 면적 당의 농작물의 생산성 증가는 우리 나라 농업에서 구체적으로 해결해야 될 방안 중에 하나이다. 본 연구 과제는 이와 같은 연구 목적 하에 이루어지게 되며 새롭게 시도되는 연구 방법 및 내용이 도입된다.

농작물은 항상 다양한 환경의 변화 속에서 성장하게 된다. 따라서 열악한 환경 조건하에선 항상 피해를 입게 되며 생산성의 저하를 가져와 우리 나라에서는 작물의 종류에 따라 냉해, 가뭄 등의 재해가 자주 발생하고 있다. 이런 재해는 정도의 차이에 따라 거의 매년 일어나고 있는 것으로서 실로 막대한 경제적 손실을 유발시키고 있다. 이와 같은 종류의 재해에 좀 더 저항하는 작물의 개발은 경제, 산업적 측면에 매우 중요한 의미를 갖고 있다. 독성을 가진 산화물은 다른 종의 생물에서와 마찬가지로 식물에서 매우 광범위하게 발생하고 있다. 특히 가뭄 등의 열악한 조건에서는 이것이 급격하게 증가되고 있는 것이 매우 잘 연구되어 있다. 본 과제는 이런 산화물을 제거하는 유전자의 도입에 의하여 여러 환경 조건에 저항할 수 있는 작물을 개발하고자 하는 것이다. 따라서 본 과제는 실험 목적 및 이론적 배경이 명백한 연구 과제으로써 기술된 우리 나라의 농작물의 생산성 증가라는 중요한 연구 노력에 기여하고자 하는 것으로 연구의 필요성이 강조되고 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

우리 나라의 농업에 관한 인식은 지난 20여년에 걸쳐 급격한 변화를 가져왔다. 즉 경제적 발전으로 인한 농업 인구의 감소가 심하게 이루어져 왔으며 상대적으로 국가 산업에서 농업이 차지하는 비율은 감소 일로에 있었다. 또한 대부분의 국내 소비 농작물이 수입에 의존하는 형태를 띠게 되었다. 농작물의 생산성은 감소 일로에 있으며 대외 의존도가 높아져 국가적인 위기감이 태동하고 있는 상태이다. 즉 국내의 충분한 농작물 생산량이 없으며 외국의 작황 및 정책에 전적으로 우리의 식생활을 의존해야 하는 것이다.

이런 사회의 여건 속에 농업에 관한 연구가 확대되어 가고 있는 것은 다행한 것이다. 연구의 주된 방향 중의 일부는 한정된 경작지 내에서 고부가가치의 작물을 높은 생산성으로 재배하는 것이다. 본 과제는 모든 작물이 민감한 영향을 받는 한발, 저온, 가뭄 등 다양한 환경조건에 저항성이 증가된 작물을 개발하는 것으로 매우 중요한 연구 필요성을 갖고 있다. 이런 연구의 성사 여부는 실로 막대한 파급효과를 불러일으킬 것이다. 한국인 대표적인 원예작물의 하나인 토마토의 생산성을 증가시키고자 하는 본 연구는 연구의 필요성이 강조되고 있으며 타 작물에의 기술이식의 가능성이 높다고 판단된다.

## 제 2 절 연구개발 목표와 내용

### 1. 최종 목표

본 연구의 최종 목표는 “가뭄 (water stress)에의 저항성이 증가된 토마토의 개발”이다. 엽록체에 SOD 와 catalase 유전자를 동시에 형질전환하는 방법을 통하여 토마토의 환경저항성을 증대시켜 토마토의 생산성을 증가시키고자 하는 것이 연구의 주요 목표이다. 엽록체에의 형질전환 (SOD 와 catalase)을 통하여 고광 (high light), 가뭄 등의 환경 자극에의 저항성과 광합성 효율을 증가시키고자 한다.

### 2. 연구 개발의 내용

연구 개발의 내용은 요약과 세부 연구 내용 수행 순으로 다음과 같이 서술된다.

#### 가. 연구 배경

식물은 가뭄 스트레스 하에서는 여러 종의 산화물질 ( $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$  등)을 만들어내고 있다. 특히 이 중에서  $O_2^-$  (superoxide)와  $H_2O_2$  (hydrogen peroxide)와 반응하여 생기는  $OH^\cdot$

(hydroxyl radical)는 세포내의 핵산, 지질, 단백질 등 거의 모든 물질과 반응하여 세포기능을 저하시키고 있다. 다른 생물과 마찬가지로 식물은 이런 산화물질을 제거하는 몇 가지의 기작이 있다. 이중 많이 연구되고 있고 본 과제에서 이용되는 것이 산화 물질을 제거하는 항산화 효소이다. 항산화효소는 대표적으로  $O_2^-$ 를 제거하는 superoxide dismutase (SOD)와  $H_2O_2$ 를 제거하는 catalase를 꼽을 수 있다. SOD는 세포내에 여러 곳에 존재하며 각 부위에서 생성되는 산화물질을 제거하고 있다. SOD는 촉매 반응시 사용되는 금속성 이온의 종류에 따라 MnSOD, FeSOD, Cu/Zn SOD로 분류되고 있다. MnSOD는 주로 미토콘드리아에 존재하며 반응산물인  $H_2O_2$ 에 feedback inhibition이 되지 않는다.

Cu/Zn SOD는 세포질 또는 엽록체에 존재하며  $H_2O_2$ 에 의해 feedback inhibition이 되고 있다. SOD에 의하여 생긴  $H_2O_2$ 는 catalase 또는 peroxidase 등에 의하여 제거되고 있다.  $O_2^-$ 와  $H_2O_2$ 가 효과적으로 제거되어야 가장 위험한 산화물인 OH가 생성되지 않는다. 즉 hydroxy radical이 생기지 않도록 하는 조건이 식물의 정상적인 성장을 보이는데 중요한 요인이 되고 있다.

과거 10여년에 걸쳐 이와 같은 산화물들을 효과적으로 제거할 수 있는 작물의 개발에 많은 노력이 기울어져 왔다. 즉 여러 식물에서 cloning된 SOD 유전자를 담배 등의 작물에 형질전환시켜 여러 다른 환경 조건 (강한 빛, 저온, 감염 등)에서의 저항성을 증가시키는 연구가 진행되어 왔다. 일 예로 Pea의 Mn SOD를 담배에 형질전환하여 광합성을 저해하는 환경 조건에서의 저항성 증가가 관찰되었다. 다른 연구자의 결과에 의하면 Cu/Zn SOD가 형질전환된 담배에서 대량으로 존재하게 되어도 저항성의 증가가 관찰되지 않았다. 즉 SOD 유전자만을 이용한 형질 전환 실험의 결과는 일정하지 않았다. 주된 이유는 SOD에 의하여 superoxide가 부분적으로 제거되어도 SOD에 의하여 생긴  $H_2O_2$ 와 잔류된 superoxide와 반응하여 hydroxy radical을 생성시킬 수 있기 때문인 것으로 여겨진다. 따라서 SOD의 반응산물인  $H_2O_2$ 를 계속해서 제거할 수 있게 되면 저항성이 뚜렷이 증가될 가능성이 제시되어 왔으며 본 과제에서는 이런 기능을 catalase가 담당하도록 하게 된다. 즉  $O_2^-$ 와  $H_2O_2$ 를 동시에 효과적으로 제거시켜 저항성을 극대화 하고자 하는 것이 본 과제의 직접적인 연구목적이다.

감염, 고광, 가뭄 (즉 수분의 결핍)은 농작물이 항상 접하고 있는 매우 흔하고도 피해 효과

가 매우 큰 환경 조건이다. 이런 환경자극 하에서는 식물은 다양한 생리적 적응 현상을 나타내게 된다. 이중 가뭄의 조건이 되면 식물체내의 수분을 잃지 않으려고 기공을 닫게 된다. 따라서 CO<sub>2</sub>의 흡수가 저해되고 CO<sub>2</sub>고정과정도 방해받게 된다. 즉 명반응의 산물인 NADPH가 엽록체내에 늘어나게 되어 빛으로부터 시작된 광합성의 전자전달이 정상적으로 진행되지 않고 주위의 O<sub>2</sub>에 결합하게 되어 superoxide를 생성하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 일련의 생리현상을 거쳐 식물은 수분이 결핍되면 엽록체에서 superoxide가 생성되게 되어 광합성을 저하시키고 결국 식물의 성장이 방해받게 된다.

#### 나. 연구 개발의 내용

본 과제에의 연구 개발의 내용은 연구수행순으로 다음과 같이 요약된다.

- (1) Pea의 Cu/Zn SOD 유전자가 형질전환될 작물의 엽록체에 대규모로 존재하도록 (overexpression) vector의 제작
- (2) 토마토에의 형질 전환
- (3) 토마토의 stress 저항성 분석

각 연구 개발 내용별 간략한 설명은 다음과 같다.

- (1) Cu/Zn SOD를 이용한 vector의 제작. Pea의 미토콘드리아에 존재하는 Cu/Zn SOD의 유전자는 엽록체에 지향될 수 있도록 “Transit peptide”를 유전자 재조합을 통하여 Cu/Zn SOD 유전자의 N-말단 부위에 접속되었다. 또한 이와 같이 변형된 Cu/Zn SOD유전자는 <sup>35</sup>S promoter의 지배를 받도록 하여 강력한 표현정도를 나타내도록 하였다. 결과적으로 이렇게 제작된 vector를 이용한 형질전환은 이미 성공적으로 수행될 수 있음이 증명되었다 (형질전환된 담배의 엽록체에서 대규모로 발현). 이 연구 결과는 “연구의 필요성”항에 서술되어 있다. Catalase 유전자가 Cu/Zn SOD와 동시에 같은 세포내에서 발현되도록 하여 활성화 산소를 효과적으로 제거하고자 한다. 면화에서 얻어진 catalase 유전자는 재조합 방법을 거쳐 형질 전환된 식물의 엽록체 또는 세포질에 존재하도록 vector를 제작하게 된다. 물론 엽록체에 catalase가 위치하도록 하는 것이 연구 목적에 부합되지만 실패할 경우를 대비 세포질에 존재하는 vector도 제작된다. Catalase는 원래 peroxisome에 존재하는 isozyme의 유전자인데 N-말단에 엽록체 지향 “Transit peptide”를 접속시켜 엽록체에 표현되도록 한다. 또한

peroxisome 저항성 아미노산 서열을 제거하여 세포질에 향하도록 vector가 제작된다. 가뭄 또는 paraquat에 의하여 엽록체에서 생성된  $H_2O_2$ 가 엽록체 내으로 또한 세포질로 확산된 후에 각각의 형질 전환 catalase에 의하여 제거되도록 한다.

## (2) 토마토에의 형질 전환

곡식류가 주종을 이루는 단자엽 식물은 형질전환이 매우 어려우므로 본 5년에 걸친 과제의 대상에선 제외된다. 많은 원예작물은 쌍자엽 식물이고 *Agrobacterium tumefaciens*를 통한 형질전환이 비교적 용이하다. 본 과제에서는 현재까지 타 연구자들에 의해 형질전환 실험이 되었던 것 중에서 토마토가 연구 대상이 된다. 더욱이 본 작물은 비교적 실험실 수준의 재배가 가능하고 국내의 중요한 경제식물에 해당되므로 합리적인 선택이라 판단된다. 형질전환 되어질 토마토의 종류는 다음과 같다.

### 1) 엽록체에의 SOD

### 2) 엽록체에의 SOD와 catalase의 동시발현

## (3) 토마토 조직의 oxidative stress에 대한 저항성 분석

SOD와 catalase가 동시에 형질전환이 된 원예작물을 이용하여 대조군과 비교하여 oxidative stress에의 저항성이 분석된다. MV에 대한 저항성의 측정을 위해 ion-leakage를 측정하여 형질전환된 토마토가 oxidative stress에 대한 저항성이 향상 되었는지를 측정한다.

## (4) 경제성 확인 및 기술 이전

본 연구의 형질 전환 작물이 경제적 가치를 지니고 기술이전이 될 수 있기까지는 몇 가지 확인 실험이 되어야 한다. 첫째는 비록 과제에서 원하는 환경 저항성이 증가되더라도 다른 형질 (예, 토마토의 질)들의 부정적인 변화가 없는 것이 확인되어야 한다. 이와 몇 가지 제반 연구가 추가되어 본 연구결과가 경제적인 부가가치를 제공할 수 있다는 것이 확인되면 다음엔 기술을 어떻게 어디서 이전할 수 있는지 등의 고려가 뒤따르게 될 것이다. 좀 더 많은 농작물에의 형질전환이 고려될 수 있는 등의 파급 효과를 간직하고 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

식물의 성장과 엽록체의 정상적인 기능은 매우 밀접한 관계에 있다. 따라서 엽록체의 기능(특히 광합성)에 관한 연구는 광범위하게 진행되어 왔고, 특히 환경조건의 변화에 따른 광합성 효율의 민감한 변화는 매우 잘 연구되어 있다. 지난 10 여년에 걸쳐 엽록체의 여러 중요물질(DNA, 단백질, 막지질 등)이 오존, radiation, 저온을 동반하는 빛, 강한 빛, 가뭄, 기타 공해 등 거의 식물이 접할 수 있는 모든 환경에서 유해산소를 통하여 손상되고 있는 것이 알려져 왔다. 즉 이런 환경에서 광합성 효율이 감소되는 이유 중 주된 것이 유해산소 때문인 것이 알려졌다. 따라서 유해산소를 제거할 수 있는 효소(SOD 등)를 과 발현시켜 광합성을 보호하고자하는 연구가 비교적 많이 진행되어 왔다. 국내의 이 분야에 관한 연구는 비교적 미흡하였으며, 적어도 뚜렷한 연구업적은 아직 없는 것으로 여겨진다.

최근의 SOD 유전자가 엽록체에서 과발현하는 형질전환 식물을 개발하여 식물이 stress를 받았을 때 형성되는 oxygen radical들을 효과적으로 제거함으로써 내성을 높이도록 하는 연구가 이루어져 왔다. 엽록체에 Mn SOD를 과발현시킨 tobacco 식물이 oxygen radicals에 대해서 강한 내성을 나타내었다(Chris B. and Dirk I.). Dirk Inze 그룹은 엽록체 안에 Mn SOD를 과발현 시킴으로써 transgenic tobacco가 oxidative stress에 내성이 향상되었음을 보고 하였다(Luit S. and Dirk I.). 또한 alfalfa에서 Mn SOD를 엽록체에서 과발현시켰을 때 winter chilling에 저항성이 증가되는 것이 관찰되었다(Bryan D. and Kim S. J.). 또 완두콩의 chloroplastic Cu/Zn SOD를 과발현 시킨 형질전환된 tobacco가 강한 빛과 저온에 의한 oxidative stress에 대해 내성이 증가한다는 것이 보고 되어졌다(A. S. Gupta, J. L. Heinen and A. S. Holyday). 한편 SOD를 과발현시켜 SOD 활성을 증가시키더라도 SOD의 작용에 의해 발생한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 효과적으로 제거하지 못하면 더 이상 stress에 대한 저항성을 나타내지 않거나 오히려 SOD의 증거에 따라 식물의 피해가 심해진다는 결과도 보고 되었다. 그 이유는 Cu/Zn SOD의 경우 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 feedback control에 의해서 방해받아 superoxide를 효과적으로 제거하지 못하고 결과적으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 superoxide의 반응을 유도하여 hydroxyl radical

을 많이 형성하여 오히려 SOD가 과발현되어 세포물질에의 피해를 증가시키기 때문일 것으로 추측하고 있다. 또한 Fenton reaction이라는 이론에 따라 과생산된  $H_2O_2$ 가  $Fe^{2+}$ 와 반응하여 hydroxyl radical이 생성될 수 있다. 따라서 hydroxyl radical형성의 전구물질인  $H_2O_2$ 를 제거하여 hydroxyl radical의 생성을 막을수 있는 system은 ROS에의 방어기작에서 매우 중요한 역할을 할것으로 여겨진다. 즉 SOD만이 과발현되는 경우보다  $H_2O_2$ 가함께 제거되는 system이 구축이 된다면 더욱 효과적인 system이 되어 질것이라고 생각된다.

본 연구실은 지난 3-4 년에 걸쳐 식물의 고사와 환경 저항에 관계하는 유해산소의 생화학적 작용과 신호전달체계에 관한 연구를 진행하여 왔다. 유해산소 superoxide가 원형질막의 인지질 분해 효소를 활성화시켜 세포막을 분해시키는 현상을 분석하여 왔다. 또한 세포막이 파괴되는 환경자극을 받게되면 원형질막의 NADPH Oxidase가 활성화되고 이때 생성된 유해산소 superoxide에 의하여 세포고사 단계가 개시되는 과정을 연구하여 왔다. 최근에는 고풍, 제초제 (paraquat), 가뭄등의 환경자극에서 엽록체의 세포막과 핵산이 분해되어 가는 과정이 교육부 유전공학 연구비의 지원하에 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이런 연구과정에서 제기되는 다음의 연구방향은 유해산소의 발생을 조절하여 세포물질의 파괴를 지연시켜 노화과정을 조절하여 보자는 것이다. 이런 연구 영역에는 국내의 몇몇 타 연구자들도 참여하고 있으며 특히 SOD 단백질의 섭취를 통한 건강 증진 등의 연구가 진행되고 있다. 토마토를 이용하여 노화를 지연시켜 토마토 수확후의 저장성을 향상시키고 환경자극에 저항성 증가를 통한 토마토의 생산성을 증가시키려는 본 연구는 비교적 구분되는 연구내용이라 판단된다. 특히 SOD를 세포질과 엽록체에 분리 또는 동시에 발현시키는 연구내용은 아직 세계적으로 연구결과가 보고되지 않은 독특한 연구내용이라 여겨진다.

## 제 2 절. 앞으로의 전망

유해산소 제거를 통한 작물의 환경자극에의 저항에 관한 연구는 그간 범세계적으로 활발하게 연구가 진행되어온 연구분야이다. 다른 종류의 유전자를 이용하여 제작된 형질전환 작물

에 비교하여 비교적 양호한 저항성 증가를 보여온 분야이다. 이는 유해산소가 환경자극에 의한 작물에의 손상에 상위단계에 위치하여 광범위한 세포물질 및 기능에 손상을 주는 매우 원인적인 것이라는 것을 나타내고 있다. 따라서 이런 유해산소의 효과적인 제거를 통하여 작물의 환경적응성과 이에 따른 생산성의 증가를 향상시킬 수 있는 가능성이 높다고 예상된다. 본 과제에서 주안점으로 여기는 세포질과 엽록체에 구분되어 형질전환 되는 SOD 과발현은 새로운 시도로서 유해산소의 제거를 극대화 할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 SOD의 생성물인 hydrogen peroxide를 효과적으로 제거하여 (catalase 유전자 형질전환을 통하여) 더한층 유해산소의 제거를 높이고자 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 형질전환된 토마토 생산

#### 1. Vector의 제작

완두콩에 유전자인 Cu/Zn SOD(chloroplast)를 Dr. R. Trelease(University of Arizona)으로부터 제공받았으며 pBKS-vector에 삽입된 유전자를 pRTL2 vector로 옮겨주었다. 특히 catalase 유전자는 엽록체를 지향하는 transit peptide(chl T.P)을 삽입하기 위해서 site-direct mutagenesis 방법을 이용하여 sequence을 바꿔 Sal I site을 도입시키고 제한 효소를 이용하여 transit peptide로 삽입시켰다. 그리하여 pAL200, pAL210을 만들었다.(Fig 1-A,B)

각각의 vector는 처음에 site-direct mutagenesis 방법에 의해서 만들어진 유전자는 pRTL2 vector에 삽입시키면서 강력한 발현을 시켰다. pRTL2 vector 안에 Cauliflower mosaic virus 35s promoter의 강력히 조절 받게 하였다. 35s terminator sequence, TEV(tobacco etch virus)의 untranslated sequence가 포함되어 있다. TEV은 translation 효율을 높이기 위해 삽입되어진 것이다. 이렇게 만들어진 각각의 vector를 Pst I site를 잘라 Agrobacterium-mediated transformation vector인 pCGN 1578의 Pst I site에 cloning하여 최종적으로 pAL200, pAL210 construct를 만들었다. pCGN 1578 상에 존재하는 NPT II gene 200 $\mu$ g/ml의 kanamycin이 함유된 배지에서 형질 전환된 식물체를 분리할 수 있게 되었다.

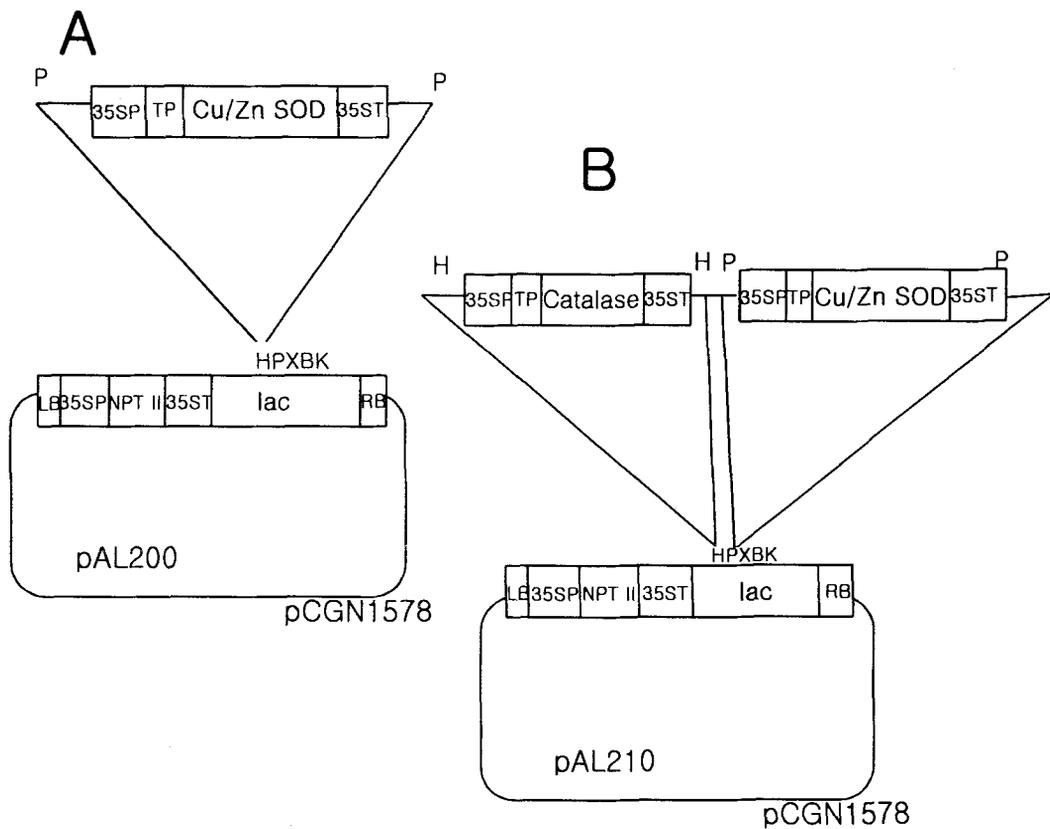


Fig. 1. Construction of the transformation vector(pAL200, pAL210). The completed chimeric gene cassette was excised with *Pst* I (Cu/Zn SOD)/ *Hind* III (catalase) and ligated into the *Pst* I or *Hind* III site of the binary shuttle vector pCGN 1578.

LB, left border; 35SP, Cauliflower mosaic virus 35s promoter sequence; NPT II, neomycin phosphotransferase coding sequence; TP, chloroplast transit peptide; 35ST, Cauliflower mosaic virus 35s terminator; RB, right border; H, *Hind* III; P, *Pst* I; X, *Xab* I; B, *Bam*H I; K, *Kpn* I.

## 2. 형질전환된 식물 생산

종자를 키워서 자엽이 형성되는 과정에서는 거의 모든 seed가 발아하였고 Agrobacterium으로 infection 시킨 것을 selection 배지에서 shoot 형성은 거의 20%에 자엽에서만 shoot을 형성하였다. magenta box으로 옮기고 어느 정도 shoot가 형성된 것을 Rooting 배지로 옮기고 Root 형성을 지켜본 결과 20% 어린식물 중에서 10%만이 Root을 형성하였고, pseudo-transformant 식물들은 Root이 형성되는 것을 볼 수가 없었다. Root이 형성된 식물을 바로 과채류 상토흙에 옮겨 심은 토마토는 잘 성장하지 못하였고, autocleave된 질석에서 성장한 토마토는 흙으로 옮겨주었을 때 더 잘 성장한 것을 볼 수가 있었다. pAL200은 15개, pAL210은 11개가 만들어졌다. 형질전환 토마토 중 pAL200-7, pAL210-12종자를 수확하여 kanamycin이 들어가 있는 배지에서 형질전환된 T1 식물을 생산하였고 우리는 이 식물 중 pAL200-7.2와 pAL210-12.1 사용하여 실험하였다.

## 제 2 절 형질전환된 식물 분리

### 1. PCR

MRC사에서 판매하는 DNAzol ES로 WT, pAL200, pAL210에 각각에 식물을 genomic DNA을 분리하였고, Eco RI 제한효소로 digestion된 DNA 100ng을 이용하여 PCR을 수행하였다. predenaturation 95°C에서 5분, denaturation 95°C에서 1분, annealing 52°C 2분, elongation 72°C 1분, termination 72°C 1분 하였고 총 30회를 수행하였다. positive control로 pCGN 1578에 삽입된 pAL200, pAL210을 사용하였고, 각각 PCR product로 415bp, 865bp gene을 각각 pAL200-7과8, pAL210-4,10,12,16에서 확인하였다(Fig 2). 그리하여 형질전환된 식물을 분리할 수 있게 되었다.

### 2. SOD 확인

PCR에서 확인된 pAL200-7.2, pAL210-12.1을 homogenation buffer(50mM KPO<sub>4</sub> pH7.8 ; 0.1mM EDTA ; 0.1% Triton X-100 ; 1% PVP)에서 extraction하고 crude enzyme extract을 bio-red로 정량하고 각각 40μg protein을 nondenaturing polyacrylamide gel에서 전기영동한 것을 negative staining 방법으로 확인한 결과 pAL200-7.2와 pAL210-12.1은 완두콩 엽록체 Cu/Zn SOD 상에 bnad와 동일한 곳에서 토마토 엽록체 Cu/Zn SOD 상에서 WT과 비교되는 band를 볼 수가 있었다(Fig 3).

### 3. Catalase 확인

PCR에서 확인된 pAL210-12.1인 경우 SOD 뿐만아니라 동시에 catalase가 과발현 되므로 pAL210-12.1을 homogenation buffer(50mM KPO<sub>4</sub> pH7.0 ; 0.1mM EDTA ; 0.1% Triton X-100 ; 1% PVP)에서 protein을 분리하고 또한 WT과 pAL200-7.2도 분리하여 동일양 40μg을 nongenaturing polyacrylamide gel에서 전기영동시키고, Catalase specific staining 방법으

로 확인을 하였다.

그 결과 토마토에 강한 2 band중 밑에 있는 band가 cotton에 SU2라고 생각이 되며 gel 상에서도 WT, pAL200-7.2보다 pAL210-12.1이 밑에 있는 band가 강하게 보이고 있다(Fig 3).

#### 4. Chloroplast내에서 SOD, catalase 확인

pAL200-7.2, pAL210-12.1은 SOD와 catalase가 각각 chloroplast 내로 이동할 수 있는 transit peptide가 삽입되어 있으므로 각각의 식물을 Yamada등 modification된 방법을 사용하여 분리해내고 동일양의 protein을 nondenaturing polyacryamide gel로 실험하여 SOD, catalase specific staining 방법을 사용하여 확인하였다. 그 결과 SOD는 WT에서는 아주 약하게 band가 나타났지만 pAL200-7.2와 pAL210-12.1에서는 WT보다 진한 band를 확인할 수 있었다. 그리고 catalase는 pAL210-12.1에서만 band를 볼 수가 있었다. 그러므로 형질전환된 토마토는 각각 WT보다 강하게 발현하고 있음을 확인할 수가 있었다(Fig 4-A,B).

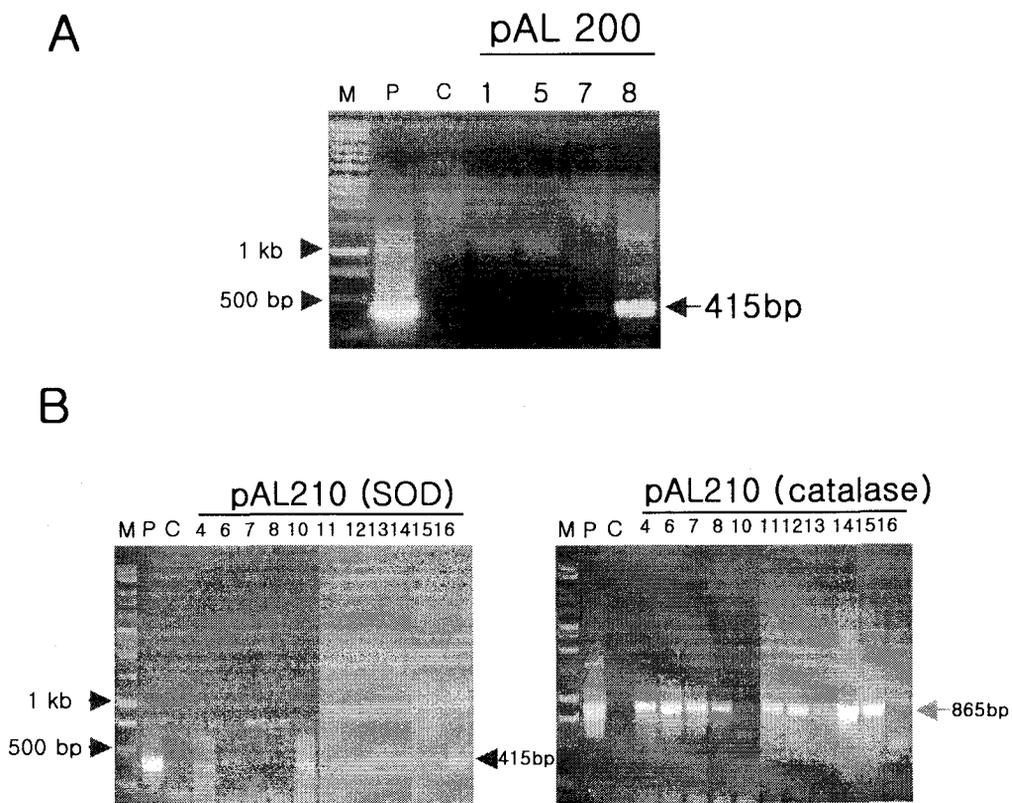


Fig. 2 Detection of integrated pAL200(Cu/Zn SOD), pAL210(Cu/Zn SOD/catalase) constructs in transgenic tomato plant by PCR. pAL200 and pAL210 using primers specific for the chloroplast transit peptide sequence and an internal sequence of the Cu/Zn SOD or catalase DNA.

M; 1kb DNA ladder, P; pCGN1578, C; nontransformed tomato plant. Numbers represent identifications of each transgenic tomato plants.

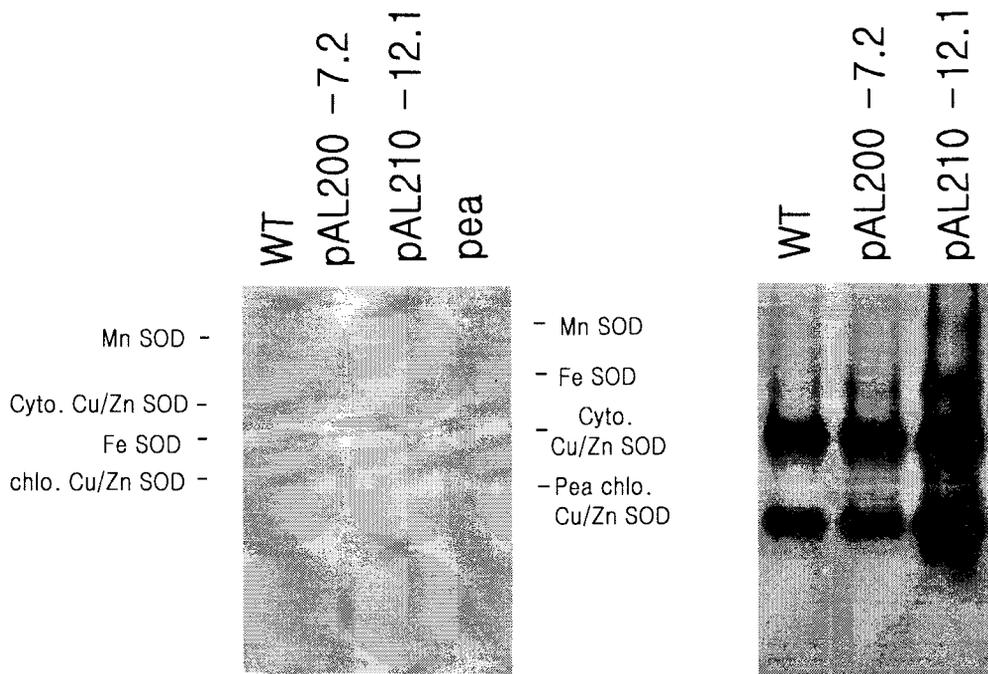


Figure. 3. Native gel analysis of SOD and catalase in whole cells.

- A: SOD. 40  $\mu\text{g}$  of total protein from leaf extract from transgenic tomato plants (pAL200, 210). Untransformed tomato plants and pea plants were electrophoresed in nondenaturing polyacrylamide SOD activity gels. Tomato and pea SOD isoforms are indicated at left/right, respectively.
- B: Catalase. 40  $\mu\text{g}$  of total protein from wild and transgenic plant were electrophoresed in the catalase activity gel. pAL210-12.1 was much of overexpressing than WT, pAL200-7.2 in catalase of cotton.

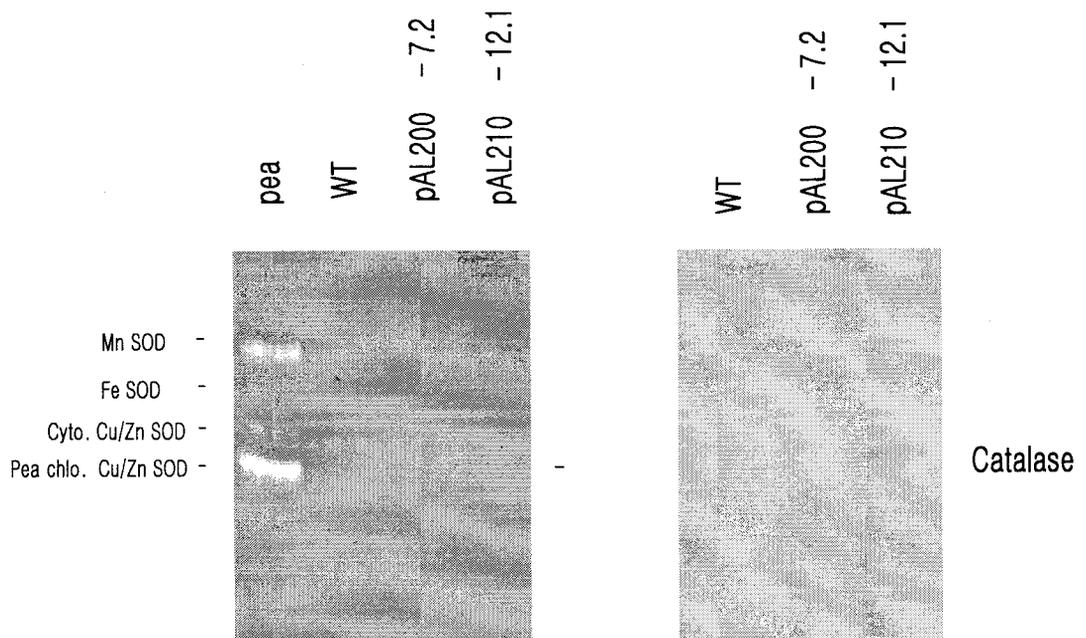


Figure. 4. Native gels analysis of SOD and catalase in the isolated chloroplast.

A: SOD.

B: Catalase.

### 제 3 절 protein assay

#### 1. SOD total activity 측정

WT, pAL200-7.2, pAL210-12.1에 있을 따서 homogenation buffer(50mM KPO<sub>4</sub> pH7.8 ; 0.1mM EDTA ; 0.1% Triton X-100 ; 1% PVP)에서 protein을 얻었고, 1분당 A<sub>550</sub> value를 0.035정도 증가시킬 수 있는 양의 xanthine oxidase를 첨가하여 cytochrome C의 기본적인 환원속도를 정한다. SOD의 1unit은 기본적으로 cytochrome C의 환원속도를 50% 감소시키는 enzyme의 양을 의미하게된다. 측정 결과 40 $\mu$ g에서 WT은 3.91unit/mg, pAL200-7.2은 10.79unit/mg, pAL210은 7.6unit/mg이 측정되었다. 따라서 pAL200-7.2은 WT 보다 2.7배에 activity를 보였고 pAL210-12.1은 1.9배에 activity를 보이고 있다. 형질전환된 토마토는 WT 보다 많은 양에 SOD가 발현하고 있음을 알 수가 있다(Fig 5-A).

#### 2. catalase total activity 측정

WT, pAL200-7.2, pAL210-12.1을 homogenation buffer(50mM KPO<sub>4</sub> pH7.0 ; 0.1mM EDTA ; 0.1% Triton X-100 ; 1% PVP)로 protein을 얻었고, 이 방법에서의 이용방법은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 reduction되어 지는 것은 이용하는 것으로  $\Delta A_{240}$ 가 min동안 1변화시키는 enzyme activity을 1unit이라고 정의하고 측정하였다. 측정 결과 40 $\mu$ g에서 WT은 0.31unit/mg, pAL200-7.2은 0.34unit/mg, pAL210-12.1은 1.15unit/mg이 측정되었다. 따라서 catalase가 과발현되지 않은 WT, pAL200-7.2은 activity가 거의 동일하고, 반면 catalase가 과발현된 pAL210-12.1은 activity가 증가한 것을 알 수가 있다. pAL210-12.1은 WT과 pAL200-7.2에 비해서 3.5배에 activity을 보이고 있다(Fig 5-B).

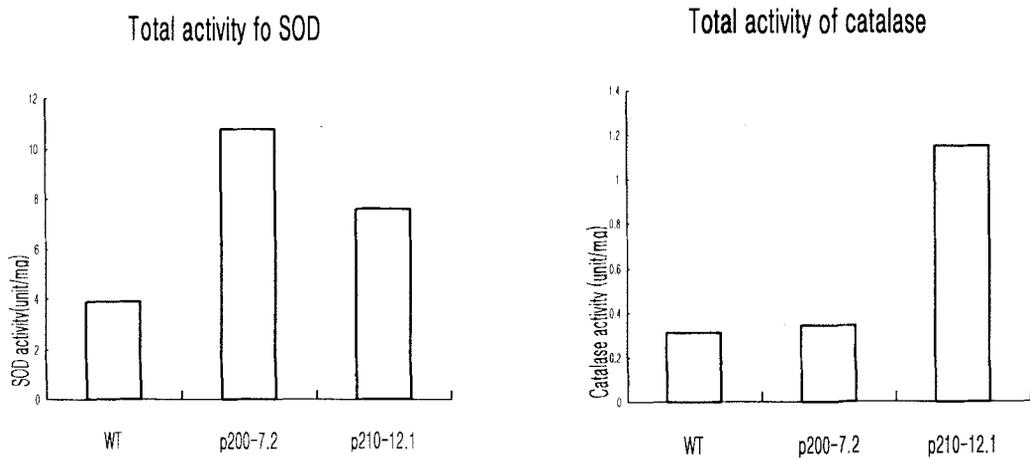


Figure. 5. Activity of SOD and catalase in whole cell extracts.

A: SOD.

B: Catalase.

## 제 4 절 형질전환 토마토의 MV stress 저항성 측정

### 1. MV stress

비슷한 발생단계의 잎을 이용하여 leaf discs로 만들고 실험한 결과 WT은 농도가 적은 20  $\mu$ M에서부터 외형적인 변화가 보이고 있다. 또한 50, 100, 500, 1000  $\mu$ M에서 점차적으로 강한 damage를 받은 것을 확인하였다(Fig. 6-A). 하지만 pAL200-7.2는 20, 50, 100  $\mu$ M에서 색깔의 변화가 일어나지만 WT보다 덜 damage 받고 있음을 Fig. 6-A에서 볼 수가 있었다. 그러나 500, 1000  $\mu$ M MV에서는 leaf discs가 많은 damage를 보이고 있었다. 하지만 pAL210-12.1은 MV농도를 점차적으로 증가해도 leaf discs의 외형적으로 변화하지 않는 것을 알 수 있었고, 500, 1000  $\mu$ M MV에서는 WT과 pAL200-7.2는 같이 외형적 변화를 보이고 있다(Fig. 6-A). 또한 Fenton reaction 이론을 이용한 결과 WT은 20  $\mu$ M MV에서부터 leaf discs damage를 확인할 수가 있었다. 뿐만 아니라 50, 100, 500, 1000  $\mu$ M MV 상에서 점차적으로 leaf discs가 크게 손상되는 것을 볼 수가 있었다. pAL200-7.2은 WT과 같이 증가된 MV농도에서 leaf discs의 변화를 보이고 있다. 하지만 적은 농도인 20  $\mu$ M MV 경우에는 WT과는 달리 약한 damage를 받았음을 볼 수가 있었고, 50  $\mu$ M MV에서부터 WT과 같이 녹색 빛깔을 잃어가고 있는 것을 확인할 수가 있었다(Fig. 7-A). 그러나 pAL210-12.1은 20, 50, 100, 500  $\mu$ M MV에서 까지 일정한 외형적인 변화를 보이고 있고, 강한 농도인 1000  $\mu$ M MV에서부터 WT과 pAL200-7.2와 같이 leaf discs가 강한 damage를 받고 있는 것을 확인할 수가 있었다.

### 2. Cell leakage analysis

Conductivity 측정 결과는 WT과 transgenic 토마토의 외형적인 변화와는 다른 결과를 보이고 있었다. 먼저 WT은 모든 MV 농도 상에서 80%이상 ion leakage를 측정하였고, 하지만 20, 50, 100  $\mu$ M MV에서 leaf discs가 크게 손상 받지 않은 pAL200-7.2인 경우 WT과 약간의 conductivity 밖에 나지 않는 것을 Fig. 9-B에서 볼 수가 있었다. pAL210-12.1은 20, 50, 100  $\mu$ M MV 농도의 경우 WT과 pAL200-7.2 보다 전해질 유출이 약 20%정도가 감소하

였고, 500, 1000  $\mu$ M MV에서는 약 10%정도가 감소한 것을 볼 수가 있었다(Fig. 6-B). Fenton reaction을 이용하여 인위적으로  $\text{OH}^-$  형성을 시켜 catalase 효과를 확인하기 위해서 pAL210-12.1과 pAL200-7.2를 비교하였더니 다음과 같은 결과를 보았다. WT과 pAL200-7.2는 모든 경우에서 electrolyte leakage가 79%이상을 보이고 있었다. pAL210-12.1인 경우 20, 50, 100  $\mu$ M MV에서 일정한 수준에 electrolyte leakage를 보이고 있었고, 500, 1000  $\mu$ M MV에서는 증가된 electrolyte leakage를 확인 할 수 있었다(Fig. 7-B).

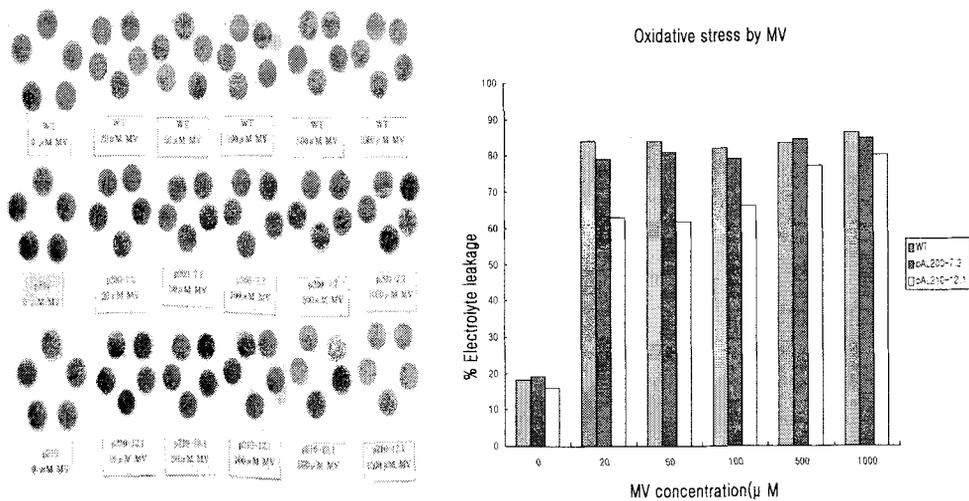


Figure. 6. Damages in the leaf discs stressed by MV.

A: Visible damages in leaf discs of transgenic tomato plants expressing either pea chl. Cu/Zn SOD(pAL200-7.2) or pea chl. Cu/Zn SOD/cotton catalase(pAL210-12.1) and wild type tomato plants after treatment of MV(0, 20, 50, 100, 500, 1000  $\mu$  M). Similar results were similar in duplicate experiments.

B: Ion leakage. The electrical conductivity of the MV solution was determined and compared with the total conductivity of solution following tissue destruction.

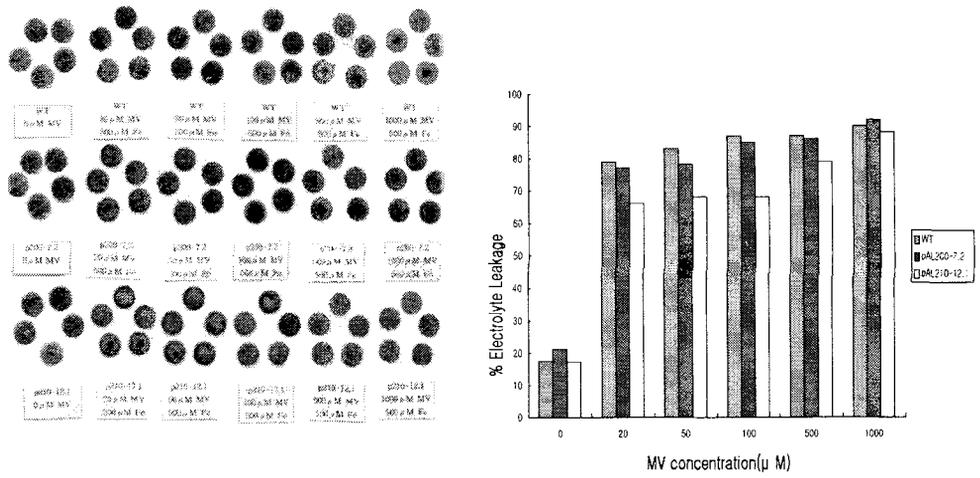


Figure. 7. Damages observed in leaf discs in the presence of Fe<sup>2+</sup> in addition to MV (Production of hydroxyl radicals is favored in the presence of Fe<sup>2+</sup>).

- A: Visible damages. 500 μM Fe<sup>2+</sup> treats the same MV concentration as in Fig. 6. Similar results were similar in duplicate experiments.
- B: Ion leakage.

## 제 5 절 Tobacco suspension cell로의 Mn SOD의 형질전환

### 1. Mn SOD 형질전환 Tobacco suspension cell 생산의 목적

그 동안 진행되어 왔던 완두콩의 유전자인 Cu/Zn SOD(chloroplast)와 면화의 catalase 유전자를 동시에 형질전환시킨 토마토의 연구를 통해 본 연구실은 2년간 스트레스에 저항성을 갖는다는 사실을 증명하였다. 그러나 이러한 연구에 있어서 Cu/Zn SOD가 hydrogenperoxide에 강한 inhibition을 받는 것이 문제점이었다. 이러한 hydrogenperoxide의 강한 inhibition으로 인해 형질전환된 토마토에서의 실험에 있어서 많은 어려움이 있었다. 특히 형질전환 되어진 개체에서 SOD의 형질의 비교에 있어서 저항성을 판단하기에 어려움이 있었다. 따라서 이러한 inhibitor가 없는 MnSOD의 형질전환체가 필요한 실정에 이르렀다.

### 2. Mn SOD 유전자 변형

Cu/Zn SOD는 hydrogenperoxide에 강한 inhibition을 받는다는 문제점을 가지고 있다 따라서 본 실험실은 MnSOD를 이용한 형질전환체를 제작하여 이러한 문제를 해결하려 하였다. 특히 본 실험실에서 개발되고 있는 새로운 방법의 형질전환법을 사용하여 단시간내의 형질전환을 유도하려 했다. 현재 본실험실에서 개발중인 방법은 in planta transformation으로서 이 방법을 이용하여 tobacco suspension cell에 MnSOD를 과발현시켜 수행중인 실험의 폭을 넓히고자 한다. 따라서 Figure 8.과 같은 vector를 제작하였다.

재료로 쓴 유전자는 완두의 Mn SOD를 이용하였다. 이 protein은 원래 mitochondria form으로 그 유전자를 변형해야만 했다. 즉, mitochondrial Mn SOD의 mitochondria targeting transit peptide를 제거하여 Mn SOD유전자만을 얻어야 했고, 또한 chloroplast를 targeting하는 transit peptide를 붙여주어야만 했다. 따라서 완두의 Cu/Zn SOD 유전자에 존재하는 엽록체를 targeting하는 transit peptide와 mitochondria를 targeting하는 transitpeptide가 제거된 Mn SOD를 융합해야만 했다. 그래서 site-directed mutagenesis를 이용하여 각각의 transit peptide 근처에 Sal I site를 도입하였다. 그리고 제한효소 EcoR I/Sal I을 처리하여 Mn SOD

유전자에서 mitochondria를 target하는 transit peptide를 제거하고, chloroplast를 target하는 transit peptide를 삽입하였다. 최종적으로 chloroplast를 target하는 transit peptide를 갖는 Mn SOD가 만들어 졌다.(Figure 8.)

### 3. 형질전환된 tobacco suspension cell의 생산

새로운 형질전환 식물체의 유도과정에서 기존의 방법인 Agrobacterium을 이용한 방법은 많은 시간을 필요로 한다. 따라서 본 연구에서는 현재 본 실험실에서 개발중에 있는 in plant transformation 방법을 사용하여 형질전환체를 생산하였다. 이 방법은 Agrobacterium을 이용하지 않고 단지 vector 상태의 DNA를 이용하여 직접적으로 유전자를 도입시키는 방법이다. 따라서 이 방법을 이용하여 제작되어진 Mn SOD를 Tobacco suspension cell에 처리하였다. 형질전환에 사용된 유전자는 p100(Mn SOD) vector와 p200(Cu/Zn SOD) vector를 사용하였다. 처리후 Kanamysine으로 selection한 후에 다음의 실험을 수행하였다.

### 4. 형질전환의 확인

#### 가. PCR Analysis

Selection이 되어진 Tobacco suspension cell을 이용하여 genomic DNA를 isolation 한 후에 Mn SOD와 Cu/Zn SOD의 specific primer를 이용하여 PCR을 통해 유전자의 도입을 확인하였다. MRC사에서 판매하는 DNAzol ES로 WT, pAL100, pAL200 각각의 genomic DNA를 분리하였고, Eco RI 제한효소로 digestion된 DNA 100ng을 이용하여 PCR을 수행하였다. predenaturation 95°C에서 5분, denaturation 95°C에서 1분, annealing 52°C 2분, elongation 72°C 1분, termination 72°C 1분 하였고 총 30회를 수행하였다. Positive control로 각 vector인 pAL200, pAL210을 사용하였다. 그 결과 Figure 9.와 같은 결과를 확인할 수가 있었다.

Figure에서 보는 것과 같이 각각의 suspension cell에 Mn SOD와 Cu/Zn SOD가 포함되어

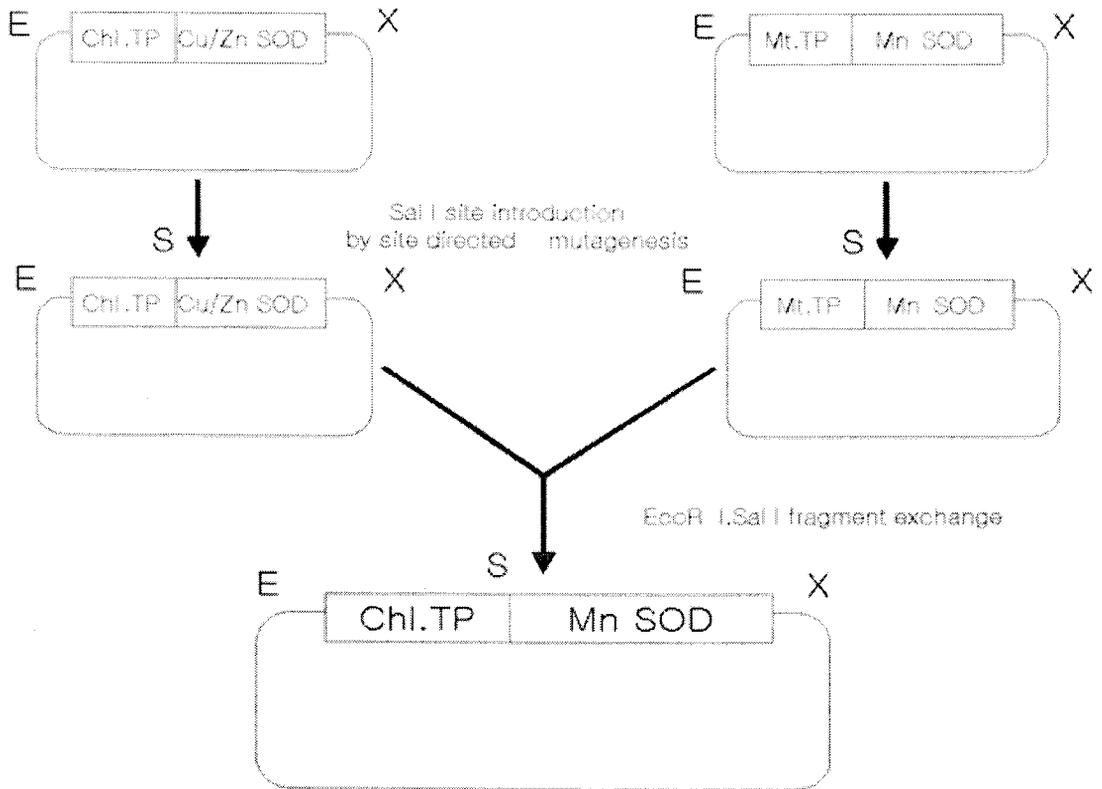


Fig. 8. Modification of Mn SOD gene ; Sal I site was introduced near the transit peptide sequence of Mn SOD and Cu.Zn SOD by site directed mutagenesis and the sequence of transit peptide were exchanged to produce chloroplast targeting Mn SOD.

E, EcoR I; S, Sal I; X, Xba I; Chl.TP, Chloroplast transit peptide; Mt. TP, Mitochondria transit peptide.

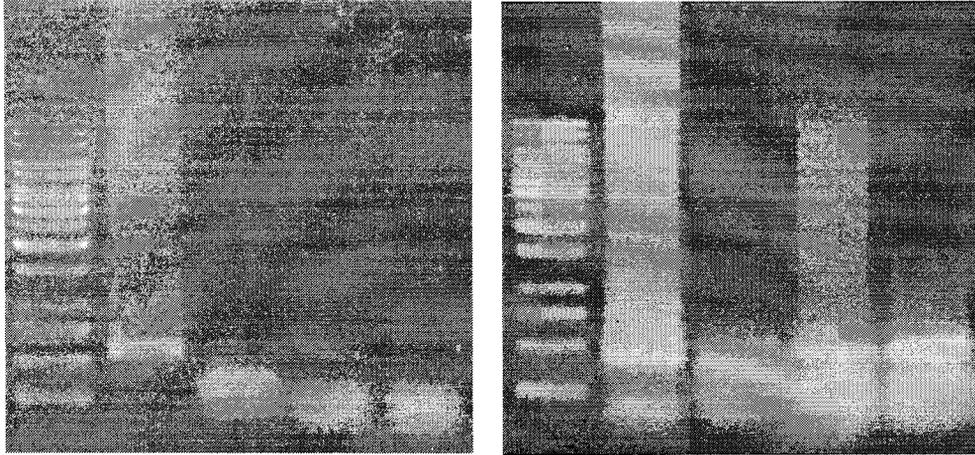


Figure 9. Detection of pAL100(Mn SOD), pAL200(Cu/Zn SOD) constructs in Tobacco suspension cell by PCR.

A : PCR analysis of Mn SOD

B : PCR analysis of Cu/Zn SOD

있는 것을 확인할 수가 있다. Figure 9.의 A를 보면 660bp의 Mn SOD의 band를 확인할 수가 있다. WT에서는 약한 band가 확인되는 반면에 in plant transformation의 방법을 사용한 suspension cell에서는 Mn SOD의 band가 강하게 나타나는 것을 확인할 수가 있다. 또한 Figure 9.의 B에서도 동일한 결과를 확인할 수가 있다. p200을 형질전환시킨 suspension cell에서 WT보다 강한 415 bp의 Cu/Zn SOD의 band를 확인할 수가 있었다.

## 5. 진행중인 실험

현재 형질전환 되어진 Tobacco suspension cell을 이용한 생리학적인 변화를 측정중에 있다. PCR과 RT-PCR을 통해 확인되어진 cell을 이용하여 SOD의 expression을 확인하고 있으며 regeneration을 통한 plant로의 유도도 계획중에 있다. 또한 본 실험실에서 개발중인 in plant transformation 방법을 이용하여 다양한 작물을 실험할 계획이며 항산화 효소의 형질전환과 과발현을 통해 식물의 stress에 저항력이 향상되는 지를 확인할 계획이다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

당 과제는 토마토에 oxidative stress에 저항성을 증가시키는 항산화 효소인 SOD와 Catalase를 형질전환시켜서 산화물질에 대한 저항성을 높이고 최종적으로 가뭄에 저항성이 있는 작물을 개발하는 데 그 목적이 있다. 이러한 목적에 따라 본 실험실은 토마토의 어린 자엽에 Agrobacterium을 이용하여 형질전환을 수행하였다. 이를 위해 각 효소를 cloning한 vector를 제작하였고 그 vector를 Agrobacterium에 형질전환 하였으며, 또한 형질전환 되어진 Agrobacterium을 이용하여 토마토를 형질전환하였다. Tissue culture를 통해 얻어진 regeneration된 토마토에서 형질전환된 토마토를 얻기 위해 PCR analysis를 통해 확인을 하였다. 이렇게 얻어진 형질전환된 토마토 p200과 p210을 이용하여 실험을 수행하였다.

먼저 SOD와 Catalase의 activity를 알아보기 위해 spectrometry assay와 native PAGE를 이용하여 SOD와 Catalase의 활성도를 측정하였다. 또한 엽록체만을 isolation하여 그안에서의 활성도도 측정을 하였다. 그 결과 형질전환된 토마토에서 WT보다 강한 발현을 하는 것을 확인할 수가 있었다. Oxidative stress의 조건을 주기 위해 제조제의 일종인 MV를 처리하고 빛을 주어 superoxide의 형성을 유도한 뒤 WT과 형질전환된 토마토와의 비교실험을 실시하였다. 그 결과 형질전환된 토마토가 WT의 토마토보다 더욱 증가된 저항성을 갖는다는 것을 확인하였다. 이러한 실험결과로 우리는 SDO와 Catalase가 과발현되어진 토마토가 oxidative stress에 증가된 저항성을 갖는다는 것을 알 수가 있었다. 이러한 결과로 인해 우리는 항산화효소의 과발현을 통해 stress에 저항성을 증가시킬수 있다고 생각할 수가 있다. 또한 실험의 범위를 조금 넓혀서 Mn SOD를 tobacco의 suspension cell에 형질전환 시켜서 그 결과를 알아보려고 하였다. 형질전환을 위해 최근 본 실험실에서 개발중인 in planta transformation method를 이용하여 실험을 실시하였다. 그 결과 단 시간안에 형질전환 되어진 tobacco suspension cell을 제작할 수가 있게 되었다. 현재 tobacco suspension cell을 이용한 생리학적 반응을 실험하고 있다. 이 결과가 긍정적으로 나올 경우 우리는 이러한 연구의 폭을 넓혀 광범위한 작물 종에서의 저항성 증가를 위한 실험을 계속해 나갈 것이다. 현재 개발중인 형질전환 방법을 토대로 Agrobacterium을 사용할수 없는 작물의 형질전환도 모색할 수가 있을것으로 판단된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제 의 연구결과 SOD와 Catalase의 과발현 결과 oxidative stress에 대해 저항성이 증가된 토마토를 확인할 수가 있었다. 따라서 토마토 뿐만아닌 다른 작물에 있어서 이러한 항산화효소의 과발현을 통한 환경 스트레스에 대한 저항력이 증가된 작물을 개발할수 있을것이라 판단이 된다. 현재 tobacco suspension cell에 대한 연구가 진행중에 있으며 미나리와 감자와 같이 형질전환 후 regeneration이 용이한 식물을 이용하여 항산화 효소의 과발현을 준비하고 있는 실정이다. 현재의 이러한 system이 다른 식물에서도 성공적으로 이루어질 경우 국내에서 재배되어지는 작물에 있어서 그 생산성에 증가를 유도할수 있다고 판단되어진다. 또한 본 실험실에서 개발되어지고 있는 새로운 형질전환 방법을 이용하여 Agrobacterium을 이용할수 없는 고추나 여러 단자엽 식물에 대한 형질전환을 유도할 수 있을 것이라 판단되어진다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis

Andrea Polle, Plant Physiol(2001) 126 : 445-462

- Iron-Superoxide Dismutase Expression in Transgenic Alfalfa Increases Winter Survival without a Detectable Increase in Photosynthetic Oxidative Stress Tolerance

Bryan D. McKersie etc. Plant Physiol(2000) 122 : 1427-1438

- Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and prospects for Transformation of Other Species.

Andrew F. Bent. Plant Physiol(2000) 122 : 1427-1438

- Female Reproductive Tissue Are the Primary Target of Agrobacterium-Mediated Transformation by the Arabidopsis Floral-Dip Method.

Christine D., Steven J. C., and Andrew F.B. Plant Physiol(2000) 122 : 1427-1438

- Vacuum infiltration of Petunia hybrida pollen with Agrobacterium tumefaciens to achieve plant transformation

D. Tjokrokusumo etc. Plant Cell Reports(2000) 19 : 792-797

- Virus-induced gene silencing in tomato

Yule Liu, Michael Schiff, S. P. Dinesh-Kumar.

The Plant Journal(2002) 31(6) 777-786

## 제 7 장    참고문헌

1. A. S. Gupta, J. L. Heinen, A. S. Holyday, J. J. Burke and R. D. Allen (1993)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1629-1633
2. Badway JA and Karnovsky ML (1980) Ann. Biochem.49: 695-726
3. Binet MN, Osman M, and Jagendorf AT (1993) Planr Physiol. 103: 673-674
4. Bryan D., Kim S. Jones (1999) Plant Physiol 119: 839-847
5. Buonauro R, Della Torre G, Montalbini P (1987)  
Physiol Mol Plant Pathol 31: 173-184
6. Carlioz, A. and Touati, D.. (1986) EMBO J 5: 623-630
7. Cemple B and Harrison L (1994) Annu. Rev. Biochem. 63: 915-948
8. Chris Bowler, Dirk Inze (1991) EMBO J 10: 1723-1732
9. Cline K, Andrews J, Mersey B, Newcomb EH, and Keegstra K (1981)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3595-3599
10. Elory-Stein, O., Bernstein, Y. and Groner, Y. (1986) EMBO J 5: 615-622
11. Fucci L, Oliver CN, Coon MJ, Stadtman ER (1983)  
Proc Natl Acad Sci USA 80: 1521-1525
12. Gruber, M. Y., Glick, B. R. and Thompson, J. E. (1990) PNAS 87: 2608-2612

13. Harles B., Irwin F. (1971) *Analytical Biochemistry* 44: 276-287
14. Hilde willekens, Wim Van Camp (1997) *EMBO J* 16: 4806-4816
15. I. Fridovich (1978) *Science* 201: 875-880
16. Ingrid E, Frederic G, and Joao F (1996)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12799-12804
17. Inze D and Van Montagu M (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6: 153-158
18. Jimenez A, Hernandez JA, del Rio LA, Sevilla F (1997a)  
*Plant Physiol* 114: 275-284
19. J. M. Tepperman and P. Dunsmuir (1990) *Plant Molecular Biology* 14: 501-511
20. John P. Phillips et al. (1989) *PNAS* 86: 2761-2765
21. Kaminaka H, Morita S, Yohoi H, Masumura T, Tanaka H (1997)  
*Plant Cell Physiol* 38: 65-69
22. Kendall EJ, McKersie BD(1989) *Physiol Plant* 76: 86-94
23. Klapheck S., Zimmer I, Cosse H (1990) *Plant Physiol* 108: 2113-2120
24. Koch E, Slusarenko AJ (1990) *Plant Cell* 2: 437-445
25. Kvietys PE, Inauren W, Bacon BR, and Crisham MB (1989)  
*Am. J. Physiol.* 257: 1640-H1646

26. Luit slooten, Dirk Inze (1995) *Plant Physiol* 107: 737-750
27. Malone M (1993) *J Exp Bot* 44: 1663-1669
28. Mark J. poznansky et al. (1993) *JBC* 268: 416-420
29. McKersie BD, Chen Y, de Beus M, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D' Halluin Botterman J (1993) *Plant Physiol* 103: 1155-1163
30. Montalbini P, Buonauro R (1986) *Plant Sci Lett* 47: 135-143
31. Parl Amstad et al. (1991) *Biochemistry* 30: 9305-9313
32. Perl-Treves R, Galun E (1991) *Plant Mol Biol* 17: 745-760
33. Sander M, Lowenhaupt K, Lane WS, and Rich A (1991) *Nucleic Acid. Res.* 19: 1154
34. Sakamoto A, Nosaka Y, Tanaka K (1993) *Plant Physiol* 103: 1477-1478
35. Saporito SM, Smith-White BJ, and Cunningham RP (1988) *J. Bacteriol.* 170: 4542-4547
36. Senaratna T, Mackay CE, McKersie BD, Fletcher RA (1988) *J Plant Physiol* 133: 56-61
37. Slater TF (1984) *Biochem. J.* 222: 1-15
38. Thelen MF and Northcote DH (1989) *Planta* 179: 181-195

39. Tsang EWT, Bowler C, Herouart D, Van Camp W, Villarroel R, Genetello C  
Van Montagu M, Inze D (1991) *Plant Cell* 3: 783-792
40. Ueda N and Shah SV (1992) *J. Clin. Invest* 90: 2593-2597
41. Ueda N, Walker PD, Hsu SM, and Shah SV (1995)  
*Proc Natl. Acad. Sci. USA* 92:7202-7206
42. Veleminsky J, Svachulova J, and Satava J (1980) *Nucleic Acids Research*  
8: 1373-1381
43. Wise RR and Naylor AW (1987) *Plant Physiol* 83: 272-277
44. Wise RR, Naylor AW (1987) *Plant Physiol* 83: 278-282
45. W. Ni, R. B. Turley and R. N. Trelease (1990)  
*Biochimica et Biophysica Acta* 1049: 219-222
46. Zhu D, Scandalios JG (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9310-9314