慶北大農學誌(Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ.) 17(1999. 12) 15~20.

엽록체 Small Heat Shock Protein의 도입에 따른 형질전환 식물체의 광합성 활성 및 고온내성의 증가

이병현 · 조진기

경북대학교 농과대학 동물공학과

Introduction of Chloroplast Small Heat Shock Protein Increases Photosynthesis and Thermotolerance in Transgenic Plants

Byung-Hyun LEE · Jin-Ki JO

Dept. of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University

Abstract

To investigate the function of the chloroplast small heat shock protein (small HSP), transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L., cv. SR1) that show constitutive expression of the chloroplast small HSP were generated. Effects of constitutive expression of the introduced gene on thermotolerance were first probed with the chlorophyll fluorescence. After a 5-min incubation of leaf discs at high temperatures, an increase in the Fo level and a decrease in the Fv level, indications of separation of LHCII from PSII and inactivation of electron transport reactions in PSII, were mitigated by constitutive expression of the small HSP. When tobacco plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ for 45 min and subsequently incubated at 25℃, leaf color of nontransformants was gradually became white and all plantlets finally were died. Under conditions in which all nontransformants were dying, more than 80% of the transformants remained green and survived. These results suggest that the chloroplast small HSP plays an important role in protecting photosynthetic machinery during heat stress.

Key words : heat stress, photosynthesis, thermotolerance, transgenic plant

서 론

진핵생물 내에서 합성되는 heat shock protein (HSP)는 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어지는데, 주로 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30 kDa의 저분자량 HSP (small HSP)로 분류된다 (Lindquist and Craig, 1988). 이들 중 식물에 있어서 가장 많이 발현되는 것

이 small HSP들이며 분자량 20 kDa 내외의 HSP20 super family를 형성한다 (Vierling, 1991; Waters et al., 1996).

식물의 small HSP의 하나인 엽록체에 존재하는 small HSP는 아직 그 기능에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않으나 (Waters, 1995), 고온 스트레스 하에서 세포내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone으로서 기능하는 것이 밝혀져 있다 (Lee et al., 1995; Lindquist and Craig, 1988; Parsell and Lindquist, 1993; Waters et al., 1996). 또한 특정한 HSP들의 세포내 축적과 식물의 고온내성 획득 사이에 상관관계가 있음이 보고되고 있다 (Chou et al., 1989; Lee et al., 1995; Park et al., 1996; Banzet et al., 1998). 이러한 결과들은 엽록체 small HSP가 식물의 고온내성 획득에 있어서 중요한 기능을 담당하고 있음을 나타낸다.

본 연구에서는 엽록체에 존재하는 small HSP의 기능을 밝히기 위하여 이 단백질을 항상적으로 발현하는 형질전환 식물을 제작한 후, 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 형질전환 식물체의 작성

담배 (*Nicotiana tabacum* L., cv. SR1)의 cDNA library로부터 분리한 엽록체 small HSP cDNA (Lee et al., 1998)를 식물 발현vector인 pBI121 (Clontech, CA)에 도입한 후, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환 시켰다. Leaf disc를 이용한 형질전환은 Miyao-Tokutomi 등 (1998)의 방법으로 하였다.

2. Southern 및 northern blot 분석

형질전환 식물에 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여 Lee 등 (1998)의 방법에 준하여 Southern blot 분석으로 확인하였으며, 도입된 유전자가 항상적으로 발현하는지를 northern blot 분석으로 확인하였다. Hybridization을 위한 probe로는 분리한 full-length의 cDNA를 32P로 labeling하여 사용하였다 (Lee et al., 1998).

3. 단백질 추출 및 immunoblot 분석

식물체의 잎을 액체질소로 마쇄한 다음, 추출 buffer (Lee et al., 1999)로 추출하여 단백질을 회수하였다. 단백질은 12% SDS-전기영동으로 분리한 후, nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher & Schell, Germany)에 blotting하여 immunoblot 분석을 하였다.

4. Chlorophyll 형광 측정 및 고온내성 검정

식물체의 잎으로부터 직경 22 mm의 leaf disc를 조제하여, 온도가 조절되는 aluminum block 위에 놓은 후, 암상태에서 PAM101을 이용하여 chlorophyll 형광을 측정하였다 (Miyao-Tokutomi et al., 1998).

고온처리에 대한 내성조사는 MS 배지 (Murashige and Skoog, 1962)에서 무균적으로 2주간 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 25℃의 생장상에 배양하였다.

결과 및 고찰

식물의 고온 스트레스에 따른 광합성 활성의 변화를 조사하기 위하여, 온도의 증가에 따른 chlorophyll 형광의 Fo 및 Fv 값의 변화를 측정하였다. 일반적으로 식물에 있어서 고온처리는 chlorophyll 형광의 Fo 값을 증가시키며 Fv 값을

감소시키는데, 이들은 각각 광화학계 II (PSII)로부터 light harvesting complex (LHC) II의 분리에 의한 것과 PSII의 전자전달반응의 불활성화에 의한 것으로 알려져 있다 (Asada, 1994). Fig. 1에 나타낸 바와 같이 비형질전환 식물체의 경우, 40℃ 이상의 온도에서는 5분간의 고온처리에 의해 Fv 값이 감소하였으며, Fo 값은 급격히 증가하였다 (Fig. 1). 따라서 비형질전환 식물의 광합성기구는 40℃ 이상의 온도에서 불활성화되기 시작함을 알수 있었다. 한편 비형질전환 식물체의 leaf disc를 5분간 고온처리한 후, 다시 25℃에서 5분간 배양한 후 형광을 측정하였을 때는 Fv 및 Fo의 증감이 완화되었다. 이러한 결과는 PSII로부터 분리되었던 LHCII가 회복되었음을 의미한다.

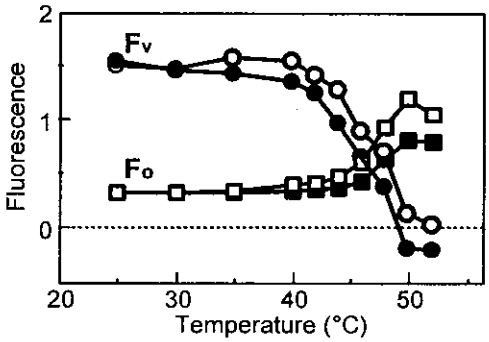

Fig. 1. Changes in the Fo and Fv levels of chlorophyll fluorescence after heat treatment of leaf discs from nontransformants.
Leaf discs were placed on a temeperature-controlled aluminum block and incubated at designated temperatures in the darkness. After 5-min incubation, the chlorophyll fluorescence was measured using a modulation fluorometer, PAM101. □: Fo of 5-min incubation at designated temperature. ■: Fo of 5-min incubation at 25 ℃ after heat treatment. ○: Fv of 5-min incubation at designated temperature. ●: Fv of 5-min incubation at 25 ℃ after heat treatment.

한편 엽록체 small HSP가 이러한 고온 스트레스에 의한 광화학계의 불활성화를 완화시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 small HSP를 항상적으로 발현하는 형질전환 식물체를 작성하였다 (Fig. 2A). 이들 서로다른 발현량을 나타내는 형질전환 식물체의 고온 스트레스 하에서의 Fo의 변화를 조사하였다 (Fig 2B). 그 결과 엽록체 small HSP의 발현이 거의 없는 형질전환 식물체 8, 26 등은 비형질전환 식물체와 비슷한 수준으로 Fo가 증가하였으나, 전체적으로 small HSP의 발현량이 높을수록 Fo의 증가율이 감소하였다. 이러한 결과는 항상적으로 발현된 small HSP가 고온 스트레스에 따른 PSII로부터의 LHCII의 분리를 감소시킨 결과임을 나타낸다.

한편 고온 스트레스 하에서 Fo의 증가율이 가장 낮았던 형질전환 식물체 3, 20에 대하여

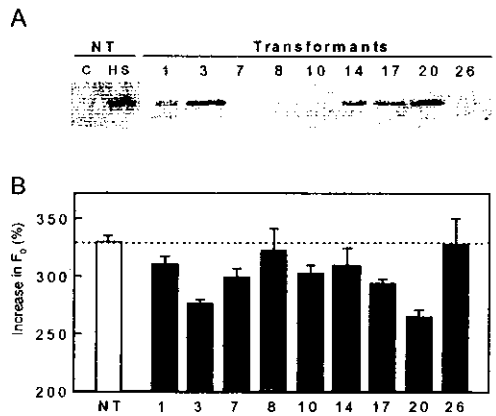

Fig. 2. Comparison of increase in Fo levels of chlorophyll fluorescence after heat treatment.
A. Immunoblot analysis. Total proteins were extracted from leaves of nontransformants (NT) and transformants, and subjected to immunoblotting. C and HS denotes leaves subjected to 25℃ and 42℃ for 4 h, respectively.
B. Percent increase of Fo after 5-min incubation at 48℃.

광합성효율을 나타내는 Fv/Fm 및 광양자수율을 나타내는 1/Fo-1/Fm 치를 각각 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과 광합성이 완전히 없어지는 온도인 52℃에서의 활성의 1/2이 되는 온도가 비형질전환 식물체보다 약 2℃ 정도 증가하였다 (Fig. 3C). 이러한 결과는 고온 스트레스 하에서의 Fo의 증가율의 감소 및 Fv의 감소율의 감소에 따른 결과임을 알 수 있었다 (Fig. 3A,B). 따라서 엽록체 small HSP는 고온 스트레스 하에서 광화학계를 안정화시키고, LHCII의 분리를 억제함으로써 광합성기구를 보호하는 것으로 생각된다.

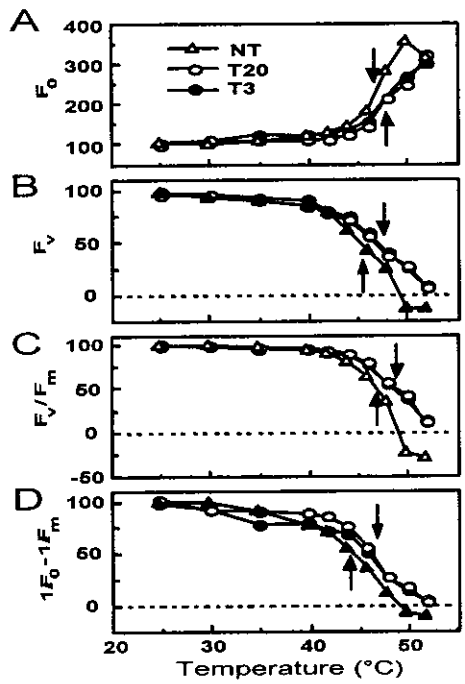

Fig. 3. Changes of photosynthetic parameters. Fo (A), Fv (B), Fv/Fm (C) and 1/Fo-1/Fm (D) of chlorophyll fluorescence after 5-min heat treatment at designated temperatures. Arrows represent temperatures at which the level of Fo was doubled (A) or the levels of Fv (B), Fv/Fm (C) and 1/Fo-1/Fm (D) were reduced to half of control samples.

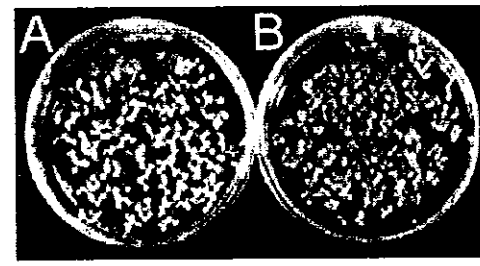

Fig. 4. Increased thermotolerance of transformants. Plantlets grown in Petri dishes were incubated at 52℃ in darkness for 45 min and subsequently incubated at normal growth condition. A. Nontransformants. B. Transformants.

고온 스트레스 하에서의 엽록체 small HSP의 광합성기구에 대한 보호작용이 식물체 전체의 고온 스트레스에 대한 내성을 증가시키는지 여부를 식물체 수준에서 조사하였다 (Fig. 4). 비형질전환 식물체를 기내에서 무균적으로 생장시킨 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 암조건 또는 광조건에서 각각 배양한 결과, 암조건에서는 식물체가 생존하였으나, 광조건에서는 1주일 이내에 전부 고사하였다 (자료 미제시, see Fig. 4A). 이러한 결과는 고온 스트레스에 따른 식물체의 손상 원인이 높은 온도 그 자체뿐만 아니라, 고온과 더불어 광조건에 의해 유도되는 광산화적 스트레스에 의한 것임을 나타낸다. 한편 형질전환 식물체의 경우 동일한 조건으로 처리했을 때, 유식물체의 약 80%가 광조건 하에서도 생존하였다. 이러한 결과는 항상적으로 발현된 엽록체 small HSP가 고온 스트레스 하에서 광화학계를 보호함으로서 고온 및 광산화적 스트레스에 대한 내성을 증가시킨 때문으로 추측된다. 또한 엽록체 small HSP 유전자가 고온처리뿐만 아니라, 산화적 스트레스에 의해서도 발현이 유도된다는 Lee 등 (1999)의 결과와 일치하는 결과이다. 따라서 엽록체 small HSP는 식물체 내에서 광합성기구를 고온

스트레스 또는 광산화적 스트레스로부터 보호하는 기능을 담당할 것으로 추정된다.

적 요

엽록체 small HSP의 기능을 조사하기 위하여 항상적으로 발현하는 형질전환 식물체를 작성하였다. 고온 스트레스 하에서의 형질전환 식물체의 고온내성을 chlorophyll 형광으로 측정하였다. Leaf disc를 고온조건에서 5분간 처리한 후, 광화학계 II의 불활성화를 나타내는 Fo 값의 증가 또는 Fv 값의 감소치를 조사하였다. 형질전환 식물체는 고온 스트레스 하에서의 이들 값의 증감율이 현격히 감소하였다. 또한 유식물체를 52℃에서 45분간 처리한 후, 25℃에서 계속적으로 배양하였을 때, 비형질전환 식물체는 전부 고사하였으나, 형질전환 식물체의 약 80%는 생존하였다. 이러한 결과는 엽록체 small HSP가 고온 스트레스 하에서 광합성기구를 보호하는데 있어서 중요한 기능을 담당하고 있음을 나타낸다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 경북대학교 Post-Doc. 연수지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Asada, K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C. H., Millineux, P. M. (eds), Cause of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 77-104.
2. Banzet, N., C. Richaud, Y. Deveaux, M. Kazumaier, J. Gagnon, C. Triantaphylides. 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. Plant J. 13: 519-527.
3. Chou, M., Y. Chen, C. Lin. 1989. Thermotolerance. of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. Plant Physiol. 89: 617-621
4. Lee, B. -H., Y. Tanaka, T. Iwasaki, N. Yamamoto, T. Kayano, M. Miyao. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. Plant Mol. Biol. 37: 1035-1043.
5. Lee, B. -H., S. -H. Won, H. -S. Lee, M. Miyao, W. I. Jung, I. J. Kim, J. Jo. 1999. Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. Gene 241: in press.
6. Lindquist, S., E. A. Craig. 1988. The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet. 22: 631-677.
7. Lee, G. J., N. Pokala, E. Vierling. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. J. Biol. Chem. 270: 10432-10438.
8. Miyao-Tokutomi, M., B. H. Lee, N. Mizusawa, N. Yamamoto. 1998. Active oxygen and photoinhibition of photosystem II. In: G, Garab (ed). Photosynthesis: Mechanisms and effects, Kluwer Academic Publishers; Vol. III, pp. 2097-2102.
9. Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revise medium for rapid growth and bio assays with

tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 472-497.

10. Park, S., R. Shivaji, J. V. Krans, D. S. Luthe. 1996. Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of Agrostis palustris Huds. Plant Physiol. 111: 515-524.
11. Parsell, D. A., S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. Annu. Rev. Genet. 27: 437-496.
12. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol. 42: 579-620.
13. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. Genetics 141: 785-795.
14. Waters, E. R., G. J. Lee, E. Vierling. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. J. Exp. Bot. 47: 325-338.