

## 저 분자량 Heat Shock Protein의 항상적 발현에 의한 형질전환 식물체의 고온내성 증가

이병현\*

경북대학교 농과대학 동물자원학과

### Constitutive Expression of Small Heat Shock Protein Increases Thermotolerance in Transgenic Plant

LEE, Byung-Hyun

Department of Animal Science, College of Agriculture, Kyungpook National University,  
Taegu, 702-701, Korea

**ABSTRACT** To investigate the function of chloroplast small HSP, transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) that constitutively overexpress the chloroplast small HSP (NtHSP21) from *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 were generated. Five homozygous lines of transformants showing different constitutive expression levels of the NtHSP21 were selected. To determine whether constitutive overexpression of NtHSP21 protein affects thermotolerance, wild-type and transformants were grown in Petri dishes, heat-stressed at 52°C for 45 min, and then incubated in normal growth condition. When heat-stressed wild-type plantlets were incubated at 25°C, leaf color gradually became white and all the plantlets finally died within a week. As for the transformants, however, more than 70% of them remained green and survived under the conditions in which all the wild-type plants were dying. It was also found that the levels of NtHSP21 were correlated with the degree of thermotolerance. These results suggest that the NtHSP21 protein in transformants is responsible for the increase in thermotolerance.

**Key words:** Chloroplast, small HSP, transgenic tobacco

#### 서 론

생물체에 있어서 고온내성 또는 치사될 수 있는 고온환경 내에서 생존할 수 있는 능력은 heat shock protein (HSP) 이라 불리는 단백질이 세포 내에서 유도됨으로써 주어진다 (Lindquist and Craig 1988). 진핵생물 내에서 합성되는 주요 HSP는 그 단백질의 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어 지는데, 주로 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15~30 kDa의 저 분자량 HSP (small HSP)로 분류된다 (Lindquist and Craig 1988). 이들 중 식물에 있어서 가장 많

이 발현되는 것이 small HSP들이며 분자량 20 kDa내외의 HSP20 super family를 형성한다 (Vierling 1991; Waters et al. 1996).

식물의 small HSP들은 핵에 코딩되어 있으며, 그들 단백질이 존재하는 부위에 따라 cytosol, chloroplast, endoplasmic reticulum (ER) 및 mitochondrium에 존재하는 형태로 나누어진다 (Waters et al. 1996). 포유동물과 효모의 small HSP에서 알려진 바와 같이 식물의 small HSP들도 그 단백질의 C-말단에 약 100개의 아미노산으로 구성되는 consensus I 및 II라 불리는 상동성이 높은 보존영역을 가지고있다 (Vierling 1991; Waters 1995; Waters et al. 1996).

한편, 엽록체에 존재하는 small HSP는 세포질에서 precursor 단백질로 합성된 후 최종적으로 엽록체로 수송되어 기능한다 (Vierling et al. 1988). 이 단백질의 특징으로는 다

\*Corresponding author. Tel 053-950-5756  
E-mail hyun@kyungpook.ac.kr

른 small HSP가 공통으로 가지는 consensus I, II외에 N-말단 쪽에 consensus III라 불리는 Met 잔기가 많은 또 하나의 보존영역을 가진다 (Chen and Vierling 1991). 그러나 이 단백질의 기능에 대해서는 확실히 밝혀져 있지 않다. 최근의 연구에 의하면 small HSP는 heat stress 하에서 분자량 200~800 kDa의 복합체를 형성하여 세포 내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 분자 샤페론으로서 기능 하는 것이 밝혀져 있다 (Lindquist and Craig 1988; Parsell and Lindquist 1993; Lee et al. 1995; Waters et al. 1996). 또한 특정한 HSP들의 세포 내 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 small HSP가 식물의 고온내성 획득에 있어서 중요한 기능을 담당하고 있음을 의미한다.

따라서 본 연구에서는 엽록체에 존재하는 small HSP의 발현효과를 밝히고자 이 단백질을 항상적으로 발현하는 형질전환 식물을 작성하여 상온에서 축적된 small HSP가 식물체에 고온내성을 부여할 수 있는지를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

재료식물로 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)를 사용하였으며, 25°C, 16 시간, 350  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  광 조건에서 성장시켰다.

### 발현 vector 구축 및 식물의 형질전환

Small HSP 유전자 (NtHSP21)는 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1)로부터 분리한 full-length cDNA를 사용하였다 (Lee et al. 1998). NtHSP21 cDNA의 EcoRV (5')-SacI (3') 단편을 pBI121 vector (Clontech, CA)의 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter 하류의 SmaI (5') SacI (3') 부위에 도입하여 발현 vector를 구축하였다 (Figure 1). 구축된 발현 vector인 pBIHSP21를 *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404에 도입하여 leaf disc 형질전환법 (Horsch et al. 1985)으로 담배 (*N. tabacum* cv. Samsun)에 도입하였다. 재분화된 식물체 ( $T_1$ )는 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 kanamycin이 함유된 MS (Murashige and Skoog 1962) 배지에서 선발한 후 자가수정을 통하여 종자 ( $T_2$ )를 채종하였다.  $T_2$  종자를 150  $\mu\text{g/ml}$ 의 kanamycin이 함유된 MS배지에 무균 파종하여 kanamycin 내성개체를 선발하여 성장시켜 종자 ( $T_3$ )를 채종하였다.  $T_3$  종자를 다시 선발배지에 파종하여 전 개체가 kanamycin 내성을 가지는지의 여부로 순계여부를 판별하였다. 최종적으로 5종류의 순계를 확립하여 실험

에 사용하였다.

### RNA 분리 및 northern분석

Total RNA는 guanidine thiocyanate 법 (McGookin 1984)으로 분리하였다. Total RNA (5  $\mu\text{g}$ )를 0.6 M formaldehyde를 함유한 1% agarose gel로 전기영동 후, nylon membrane (Biodyne A, Pall BioSupport, NY)에 transfer하여  $^{32}\text{P}$ 로 labeling한 NtHSP21 cDNA로 hybridization하였다. Hybridization은 50% formamide가 포함된 hybridization buffer에서 42°C, 16시간 동안 실시하였다. Membrane은 0.2  $\times\text{SSC}$ 와 0.1% SDS로 65°C에서 1시간 washing후 X-ray film 또는 imaging plate에 노출시켜 image analyzer (BAS2000, Fuji Film, Tokyo)로 분석하였다.

### 대장균에서의 NtHSP21 단백질 발현 정제 및 항체유도

대장균에서 NtHSP21 단백질을 발현시키기 위하여 cDNA의 염기서열 중 mature protein 부분을 PCR로 증폭시킨 후 발현벡터인 pET28b (Novagen, Madison, WI)에 cloning하여 대장균 BL21 (DE3)에 도입하였다. 발현된 단백질은  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography로 정제하고, preparative SDS-PAGE 후, electroelution법으로 회수하였다. 이 정제된 NtHSP21 단백질을 토끼 (New Zealand White)에 주사하여 항체를 유도하였다 (Sambrook et al. 1989).

### 식물체의 단백질 추출 및 Immunoblot 분석

식물체의 잎으로부터 단백질의 분리는 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EDTA, 5% (w/v) PVP, 300 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM PMSF 및 10% glycerol을 포함한 50 mM HEPES (pH7.5) buffer로 추출하여 16,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 단백질은 12% SDS-PAGE 후 nitrocellulose membrane (Protran, Schleicher & Schuell, Germany)에 transfer하여 immunoblot 분석하였다. 1차항체는 1:2000으로 희석하여 사용하였고 goat anti-rabbit alkaline phosphatase system (Promega, Madison, WI)으로 발색시켰다.

### Genomic DNA의 Southern 및 PCR 분석

Genomic DNA는 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 법으로 분리하였다 (Murray and Thompson 1980). 15  $\mu\text{g}$ 의 genomic DNA를 EcoRI으로 절단한 후, 0.7% agarose gel로 전기영동하여 nylon membrane (Biodyne B, Pall BioSupport, NY)에 alkaline transfer 법으로 transfer하였다.

T-DNA vector, pBIHSP21의 식물체의 genome에로의 도입 여부를 확인하기 위하여 PCR법을 사용하였다 (see Figure 2). PCR primer로는 CaMV 35S promoter의 3'-portion의 sequence인 oligonucleotides P-1 (5'-CCCACCCACGA GGAGCATC-3') 및 NtHSP21 cDNA의 coding region의 sequence인 P-2 (5'-CTCAACATTATCTGGGAG-3')를 각각 사용하였다 (Lee et al. 1998). 증폭된 산물은 1.0% agarose gel 전기영동으로 분석하였다.

Heat Stress 처리 및 고온내성의 검정

Heat stress 처리는 wild-type 식물의 잎을 42°C의 shaking water bath에서 2시간 동안 200  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광 조건에서 실시하였고 대조구도 같은 조건으로 25°C에서 처리하였다. 고온내성의 검정은 Petri dish에 무균파종 후 10일간 성장시킨 유 식물체를 52°C의 growth chamber에서 45분간 처리한 후 25°C에서 20일간 성장시킨 후 생존율을 계산하였다.

결과 및 고찰

형질전환식물체의 획득

엽록체 small HSP의 full-length cDNA (Lee et al. 1998)를 발현 vector인 pBI121 (Clontech, CA)의 *Sma*I 및 *Sac*I 절단부위에 도입하여 발현 vector pBIHSP21을 작성하였다 (Figure 1A). 작성한 pBIHSP21 vector를 *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하고 plasmid DNA를 조제하여 vector의 구조를 제한효소로 확인한 후 (Figure 1B), 담배의 leaf disc에 형질전환 시켰다. Kanamycin이 함유된 재분화 배지와 rooting 배지에서 배양하여 총 35개의 1차 형질전환 식물체 ( $T_1$ )를 얻은 후, 반복된 파종과 자가수분 및 northern분석을 통하여 상온에서의 NtHSP21 발현량이 서로 다른 5종류의 순계 ( $T_3$ )를 확립하였다.

T-DNA vector로 도입된 NtHSP21 유전자의 형질전환식물의 genome에로의 도입 여부를 확인하기 위해 PCR법을 사용하였다. 그 이유는 담배 자체가 이미 가지고 있는 endogenous NtHSP21 유전자와 구별하기 위하여 35S promoter의 염기배열을 기초로 한 primer를 사용하여 PCR로 확인하였다. PCR 반응은 figure 2에서 나타낸 바와 같이 oligonucleotides P-1 과 P-2를 각각 forward 및 reverse primer로 사용하였다. 이들 primer를 사용했을 경우 형질전환식물의 genomic DNA로부터 예상크기 0.8 kb의 증폭산물이 기대된다. Figure 2에서 나타낸 바와 같이, wild-type의 경우 증폭산물이 관찰되지 않았으나 모든 형질전환 식물체의 genomic DNA로부터 0.8 kb의 DNA 단편이 증폭되었다 (Figure 2). 또한 T-DNA vector pBIHSP21로부터 NtHSP21

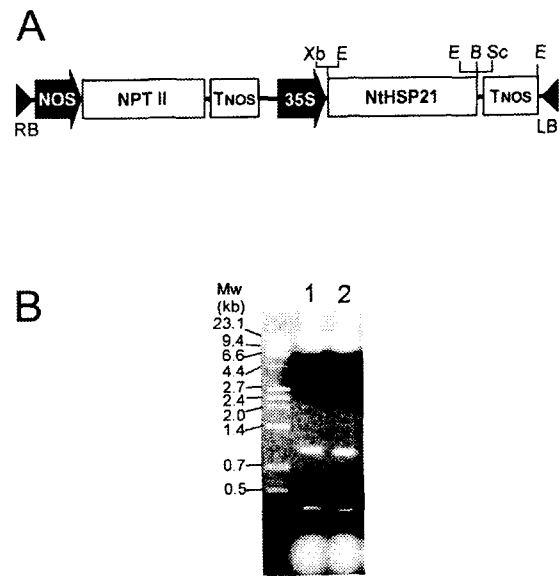


Figure 1. (A) Schematic diagram of the expression vector, pBIHSP21, used for the transformation of tobacco. The full-length cDNA of the chloroplast small HSP was placed under the control of the CaMV 35S promoter. Restriction sites of *Xba*I (Xb), *Eco*RI (E), *Bam*HI (B), and *Sac*I (Sc) were shown; (B) Restriction enzyme analysis of the construct, pBIHSP21. Plasmid DNA was digested by *Eco*RI (lane 1), or *Eco*RI and *Bam*HI (lane 2), and analyzed by 0.8% agarose gel.

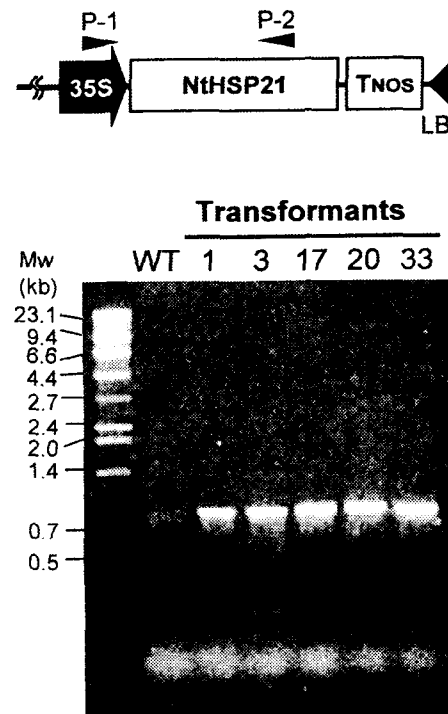


Figure 2. PCR analysis of the homozygous transgenic lines selected. Integration of the T-DNA into tobacco genome was verified by PCR. Genomic DNAs from wild-type (WT) and transformants were used as templates, and the oligonucleotides P-1 and P-2 were used as primers. Arrowheads represent the positions and orientations of primers used for PCR. Numbers indicate independent transgenic lines.

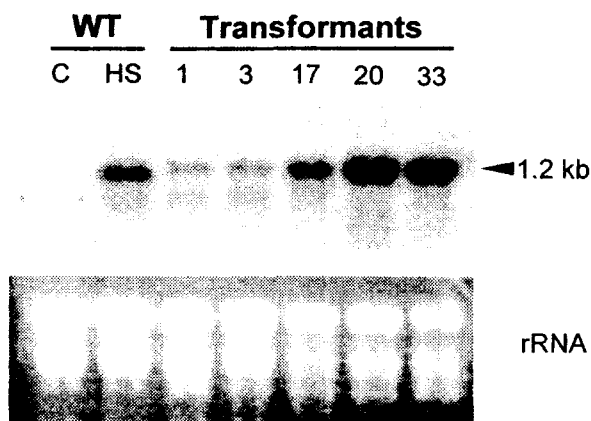
cDNA 만을 절단해 내는 제한효소인 *EcoRI*로 절단한 genomic DNA를 사용하여 Southern blot 분석한 결과 endogenous NtHSP21 유전자의 hybridization band에 더불어 도입된 cDNA의 크기인 1.1 kb의 단편의 존재를 확인할 수 있었다 (결과 미제시). 이러한 결과는 T-DNA vector, pBIHSP21가 성공적으로 형질전환 식물체의 genome에 도입되었을 뿐만 아니라 반복적인 자가수정에도 불구하고 후대에 전달되었음을 나타낸다.

**형질전환 식물체에서의 NtHSP21의 항상적 발현**

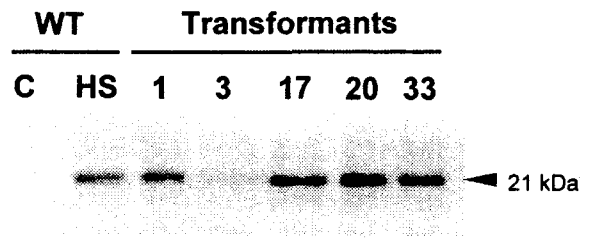
도입된 유전자, NtHSP21의 상온 (25°C)에서의 발현을 먼저 northern blot 분석으로 확인하였다. Figure 3에서 나타낸 바와 같이, wild-type 식물체의 경우 25°C의 온도에서는 NtHSP21 transcript가 전혀 관찰되지 않았으나 42°C, 2시간의 고온처리에서는 transcript가 축적되었다. 한편 형질전환 식물체의 경우 고온처리를 하지 않은 25°C에서도 상당한 양의 transcript가 모든 형질전환 식물체에서 축적되었다. 형질전환 식물체 1과 3의 경우는 42°C, 2시간 고온처리 한 wild-type보다 낮은 발현정도를, 형질전환 식물체 7의 경우 거의 같은 수준의 발현정도를, 형질전환 식물체 20과 33은 2배 이상의 발현정도를 나타내었다.

한편 형질전환 식물체에서 상온에서 발현된 NtHSP21 transcript가 실제로 단백질로 번역되어 기능하는지 여부를 조사하기 위하여 이들로부터 추출한 total protein을 이용하여 immunoblot 분석으로 조사하였다 (Figure 4). 대조구로는 42°C에서 6시간 처리한 wild-type 식물체를 사용하였다.

Wild-type 식물체의 경우 상온에서 보이지 않던 NtHSP21 단백질 band가 42°C에서 6시간의 고온처리에 의해 분자량



**Figure 3.** Expression of the chloroplast small HSP gene. Wild-type (WT) tobacco leaves were exposed to 42°C for 2 h. Total RNA was extracted from the leaves of the control (C) and the heat-stressed wild-type plant (HS), and those from unstressed transformants. Total RNA was fractionated by electrophoresis and probed with NtHSP21 cDNA.



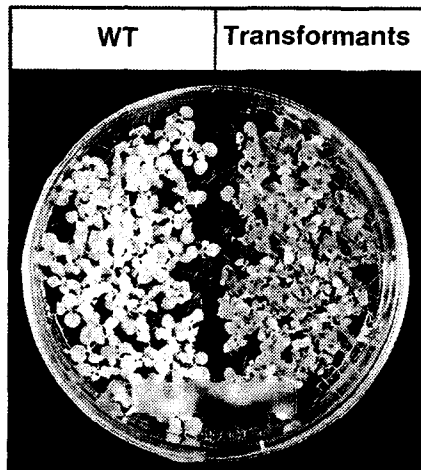
**Figure 4.** Accumulation of the chloroplast small HSP in wild-type and transformants. Total proteins were extracted from both homozygous transformants and heat-treated (42°C, 6 h) wild-type (WT) plants. After SDS-PAGE, proteins were transferred to nitrocellulose membrane and was analyzed by immunoblotting. Each lane contains 30 µg of protein.

약 21 kDa의 band가 관찰되었다. 이 결과는 다른 식물로부터 보고된 엽록체 small HSP의 크기와 일치하였다 (Nieto-Sotelo et al. 1990; Chen and Vierling 1991). 또한 지금까지 보고된 *in vitro* translation 및 엽록체에서의 transport 실험결과 precursor인 24-26 kDa 단백질이 엽록체에서의 transport 후에는 20-22 kDa 크기의 mature protein으로 processing된다는 보고와 일치한다 (Nieto-Sotelo et al. 1990; Chen and Vierling 1991; Vierling 1991).

한편 형질전환 식물체의 경우 상온에서도 이와 동일한 분자량의 21 kDa band가 관찰되었으며 NtHSP21 cDNA에 코딩된 240개의 아미노산으로부터 추정되는 26 kDa (Lee et al. 1998)의 band는 관찰되지 않았다. 이것은 상온에서 발현된 transcript가 small HSP 단백질로 정상적으로 번역되었을 뿐만 아니라, 엽록체로 transport되어 mature protein으로 processing 되었음을 나타낸다. 그러나 NtHSP21 단백질의 축적량은 transcript의 발현량과 반드시 일치하지는 않았다. 형질전환 식물에서의 이러한 현상은 이미 보고되어 그 이유로 genome 내의 외래유전자의 삽입 부위에 따른 발현량의 차이 또는 RNA의 안정성의 차이에 기인하는 것으로 알려져 있다 (Osteryoung et al. 1994).

**형질전환식물체의 고온내성 증가**

항상적으로 발현된 NtHSP21 단백질이 실제로 식물체의 고온내성에 관여하는지 여부를 조사하기 위하여 형질전환 식물체의 고온내성을 조사하였다. 고온내성도는 10일간 기내에서 생장시킨 wild-type과 형질전환 유식물체를 치사온도인 52°C에서 45분간 처리한 후, 25°C에서의 생장지속여부로 판단하였다. Wild-type 식물의 경우 고온처리한 식물체는 모든 식물이 점점 탈색되어 약 1주일 내에 전부 고사하였다 (Figure 5). 이와는 대조적으로 형질전환 식물체의 경우 약 70%가 녹색을 유지한 채 생존하여 계속적으로 정상적인 생장을 보였다. 이러한 현상은 상온에서 발현된 NtHSP21 단백질의 축적



**Figure 5.** Thermotolerance of wild-type (WT) and transformants. Plantlets grown for 10 days at 25°C on MS medium were subjected for 45 min to 52°C, and then subsequently incubated under normal growth conditions. Photographs were taken 20 days after heat treatment.

량에 따라 내성정도도 비례하여 증가하였다. 따라서 이러한 결과는 상온에서 발현된 NtHSP21 단백질이 고온 stress 하에서 정상적으로 기능함을 의미한다. 지금까지의 연구에 의하면 엽록체 small HSP는 엽록체의 stroma에서 thylakoid membrane에 약하게 결합된 상태로 존재하는 것으로 알려져 있다 (Glaczinski and Klopsteck, 1988). 또한 이 단백질은 고온 stress 하에서 전자전달계의 구성성분을 보호할 가능성이 *in vitro* 실험을 통하여 보고된 바 있다 (Downs and Heckathorn 1998; Heckathorn et al. 1998). 뿐만 아니라 엽록체 small HSP가 고온 이외에도 강광 조건하에서도 유도된다는 보고도 있다 (Schuster et al. 1988). 이러한 연구결과들과 본 실험의 결과로부터 추측해 볼 때, 엽록체 small HSP는 고온 stress 하에서 고온 그 자체에 대한 단백질들의 보호기능 뿐만 아니라 고온과 빛의 공존에 의해 생길 수 있는 oxidative stress에 의한 손상을 막아주는 기능도 수행할 것으로 판단된다.

## 적 요

고등식물에 있어서 엽록체에 존재하는 저 분자량 HSP의 기능을 밝히기 위하여 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1)로부터 분리한 cDNA (NtHSP21)를 도입한 형질전환 담배 식물체를 재생하였다. 상온에서의 발현량이 서로 다른 5개의 순계 형질전환 식물체를 선발하였다. 상온에서 발현된 엽록체 small HSP가 식물의 고온내성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기내에서 생장시킨 유식물을 52°C에서 45분간 열처리한 후 생장온도에서의 변화를 조사하였다. 그 결과 wild-type 식물의 경우 1주일 이내에 모두 고사하였으나 형

질전환 식물체의 약 70%는 생존하였다. 또한 이러한 고온내성은 상온에서 발현된 단백질의 양에 비례하여 증감하였다. 따라서 엽록체에 존재하는 small HSP가 식물의 고온내성 획득에 있어서 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazumaier M, Gagnon J, Triantaphylides C (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
- Chen Q, Vierling E (1991) Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein. *Mol Gen Genet* 226:425-431
- Chou M, Chen Y, Lin C (1989) Thermotolerance of isolated mitochondria associated with heat shock proteins. *Plant Physiol* 89:617-621
- Downs CA, Heckathorn SA (1998) The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett* 430:246-250
- Glaczinski H, Klopsteck K (1988) Temperature-dependent binding to the thylakoid membranes of nuclear-coded chloroplast heat-shock proteins. *Eur J Biochem* 173:579-583
- Heckathorn SA, Downs CA, Sharkey TD, Cleman JS (1998) The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol* 116:439-444
- Horsch RB, Fry JE, Hofman NL, Eichholz D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231
- Lee BH, Tanaka Y, Iwasaki T, Yamamoto N, Kayano T, Miyao M (1998) Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. *Plant Mol Biol* 37:1035-1043
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E (1995) Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem* 270:10432-10438
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 22:631-677
- McGookin R (1984) RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp113-116
- Murashige T, Skoog F (1962) A revise medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497
- Murray MG, Tompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8:4321-4325
- Nieto-Sotelo J, Vierling E, David Ho T-H (1990) Cloning, sequence analysis, expression of a cDNA encoding a plastid-localized heat

- shock protein in maize. *Plant Physiol* **93**:1321-1328
- Osteryoung KW, Pipes B, Wehmeyer N, Vierling E** (1994) Studies of a chloroplast-localized small heat shock protein in *Arabidopsis*. In: Cherry JH (ed), NATO ASI series, Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. Vol H86, Springer-Verlag, Berlin, pp 97-112
- Park S, Shivaji R, Krans JV, Luthe DS** (1996) Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol* **111**:515-524
- Parsell DA, Lindquist S** (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Ann Rev Genet* **27**:437-496
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Schuster G, Even D, Kloppstech K, Ohad I** (1988) Evidence for protection by heat-shock proteins against photoinhibition during heat shock. *EMBO J* **7**:1-6
- Vierling E** (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**:579-620
- Vierling E, Nagao RT, DeRocher AE, Harris LM** (1988) A heat shock protein localized to chloroplasts is a member of an eukaryotic superfamily of heat shock proteins. *EMBO J* **7**:575-581
- Waters ER** (1995) The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* **141**:785-795
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E** (1996) Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot* **47**:325-338

(접수일자 1999년 10월 9일)