

CuZnSOD와 APX를 엽록체에 발현시킨 담배식물체의 Highlight와 Chilling 스트레스에 대한 광합성 효율

김윤희^{1,2}, 권석윤¹, 방재욱², 박상수^{1*}

¹한국생명공학연구원 환경생명공학연구소, ²충남대학교 생물학과

Photosynthetic Efficiency in Transgenic Tobacco Plants Expressing both CuZnSOD and APX in Chloroplasts against Oxidative Stress Caused by Highlight and Chilling

Yun-Hee Kim^{1,2}, Suk-Yoon Kwon¹, Jae-Wook Bang², Sang-Soo Kwak^{1*}

¹Laboratory of Environmental Biotechnology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

²Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

ABSTRACT In order to understand the protection effects of antioxidant enzymes against oxidative stress caused by various environmental stresses, transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) plants expressing both copper/zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) and ascorbate peroxidase (APX) in chloroplasts (referred to as CA plants) were subjected to highlight ($1,100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$) and chilling at 4°C. The protection effects of CA plants using leaf discs were compared with those of transgenic plants expressing either CuZnSOD or APX in chloroplasts (SOD plants or APX plants, respectively) and non-transgenic (NT) plants. CA plants showed about 15% protection in the photosynthetic efficiency (Fv/Fm) of photosystem II relative to NT plants 1 hr after treatment of both highlight and chilling, whereas they showed about 23% protection in the redox state of P700 in photosystem I at 3 hr after treatment. SOD plants or APX plants showed an intermediate protection effect between CA plants and NT plants. These results demonstrated that the coexpression of CuZnSOD and APX in chloroplasts importantly involves in the protection effects against oxidative stress caused by various environmental stresses.

Key words: Antioxidant enzyme, chilling, highlight, oxidative stress, photosynthetic efficiency (Fv/Fm)

서 론

산소는 식물체를 포함한 호기성 생명체의 생명유지에 가장 필요한 성분이다. 그러나 생체내의 산소는 정상적인 대사과정과 스트레스 조건에서 전자와 반응하여 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) 등의 반응성이 높은 일련의 활성산소종 (reactive oxygen

species, ROS)으로 변한다. ROS는 강한 산화력을 가지고 있어 지질 과산화, 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성저해, 광합성 억제, 엽록소 파괴, 노화 촉진 등 생체내에서 생리적 장애를 주며 심할 경우 세포사멸을 초래한다 (Halliwell and Gutteridge 1989; Alscher and Hess 1993; Inze and Van Montagu 1995). 특히 각종 환경 스트레스를 받으면 생체내에 ROS가 과다하게 생성되어 식물의 생장에 치명적인 영향을 주는데, 이와 같이 각종 스트레스를 받아 과다하게 생성된 ROS에 의해 생체가 받는 스트레스를 산화스트레스 (oxidative stress)라 한다 (Bowler et al. 1992).

*Corresponding author Tel 042-860-4432 Fax 042-860-4608
E-mail sskwak@kribb.re.kr

식물체를 포함한 생물체는 대사과정 중 필연적으로 발생하는 ROS에 의한 산화스트레스로부터 자신을 보호하기 위해 일련의 항산화기구 (antioxidative mechanism)를 구축하는 진화과정을 거치면서 현재까지 새로운 환경에 적응하여 왔다. 식물체에서 항산화기구를 구성하는 물질로서는 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase 등의 항산화효소와 ascorbic acid (ascorbate, AsA), α -tocopherol, glutathione 등의 저분자 항산화물질이 있다 (Allen et al. 1997; Asada 1999). 식물체는 다양한 환경스트레스를 받았을 때, 다른 생물종과 달리 안전한 곳으로 직접 이동할 수 없는 대신, 외부 스트레스에 대한 환경적응 능력이 다른 생명체보다 높을 것으로 생각되며 실제로 식물에는 다른 생물에 비해 많은 종류의 항산화물질이 다량으로 존재한다 (Alsher and Hess 1993). 특히 엽록체는 광합성과정에서 생성되는 고농도의 산소가 스트레스 조건에서 전자전달계에서 유리되는 전자와 반응하여 각종 ROS를 형성 할 수 있는 가능성이 매우 높은 세포기관이다 (Tsang et al. 1991). 따라서 외부스트레스에 의해 산화스트레스를 받기 쉬운 엽록체의 항산화기구를 효율적으로 조절할 수 있으면 각종 환경스트레스에 강한 식물체개발이 가능할 것으로 여겨진다.

저자들은 항산화기구 제어를 통한 다양한 환경스트레스에 대한 내성식물체 개발에 관한 연구를 수행하고 있다. 고구마 산성POD (*swpa1*) 단백질을 발현하는 담배식물체가 대표적 산화스트레스원인 methyl viologen (MV, paraquat)에 대해 내성을 나타내었고 (Yun et al. 2000), 인체 dehydroascorbate reductase (DHAR)을 발현하는 담배식물체가 증가된 AsA 함량으로 MV, 과산화수소, 저온, NaCl에 내성을 나타내었다 (Kwon et al. 2001, 2003). 또한 CuZnSOD와 ascorbate peroxidase (APX)를 동시에 엽록체에 과발현시킨 식물체가 SOD 또는 APX가 단독으로 도입한 식물체에 비해 MV에 대한 강한 내성을 나타내었음을 확인한 바 있다 (Kwon et al. 2002).

본 연구에서는 SOD와 APX를 동시에 엽록체에 과발현시킨 식물체 (Kwon et al. 2002)를 대상으로 광합성기구인 광계2 (photosystem II, PS II)와 광계1 (photosystem I, PS I)에서 전자전달계의 심각한 이상을 초래하는 대표적인 스트레스인 강한 빛 (highlight)과 4°C chilling 조건에서의 광합성 효율을 조사하여 SOD와 APX의 동시발현 식물체의 스트레스내성 효과를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 스트레스 처리

실험에 사용한 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)는 비형질전환식물체 (non-transgenic plant, NT식물체), CuZnSOD을 엽록체에 도입한 SOD식물체 (Sen Gupta et al. 1993), APX을

엽록체에 도입한 APX식물체 (Allen et al. 1997), 그리고 CuZnSOD와 APX를 동시에 엽록체에 도입한 CA식물체 (Kwon et al. 2002)를 사용하였다. 이들 형질전환식물체는 CaMV 35S promoter을 이용하여 제작된 것이다. 담배 종자는 MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에서 발아시켰는데, SOD식물체와 APX식물체는 kanamycin (150 mg/L)이 함유된 배지를 사용하였고 CA식물체는 kanamycin (150 mg/L)과 bialaphos (2 mg/L)가 함유된 배지를 사용하였다. 발아 후 2주 된 식물체를 pot에 옮겨 25°C 항온기에서 16시간 광 (약 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$), 8시간 암주기에서 2개월 키운 후 실험재료로 사용하였다.

스트레스처리는 위에서 3번째의 잎에서 잎절편 (leaf disc, 0.79 cm^2)을 취하여 사용하였다. 무처리는 leaf disc를 평균 증류수에 띄우고 25°C 보통 광조건 (약 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)에서 처리한 것이고, 스트레스처리는 강한 빛 (highlight, 1,100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)의 단독처리와 highlight와 4°C chilling의 복합처리로 하였다. 스트레스 처리 후 시간별로 광합성 효율을 조사하였다. 광원으로는 할로겐 램프 (MH250WB, Mia Co., Korea)를 이용하였고, 램프에서 나오는 열의 흡수를 위해서 잎절편과 램프 사이에 물이 3 cm 두께로 채워져 있는 수조를 사용하였다.

광계2의 엽록소형광 측정

잎절편의 엽록소형광 측정은 PAM-101 엽록소형광 측정기 (Heinz Walz, Effeltrich, Germany)를 사용하였다 (Schreiber et al. 1986). 잎절편에 스트레스를 처리하고 30분간 암적용 시킨 후 형광을 조사하였다. 초기형광 (Fo, initial fluorescence) 측정 후, Walz PAM-103 Trigger Control Unit에 의해 조절되는 Schott lamp (KL 1500, Schott Glaswerke, Mainz, Germany)로 공급한 포화광 (800 ms, 2800 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)에 의한 형광 (Fm, maximum fluorescence)을 측정하여 Fv (maximum variable fluorescence, $Fv = Fm - Fo$)를 구하고, 광계2의 광합성 효율 (Fv/Fm)을 조사하였다 (Jeong et al. 2002). 5개체의 식물체로부터 준비한 5개의 잎절편에서 광합성 효율을 조사하고 이들의 평균값을 구하여 사용하였다.

광계1의 P700 redox state 측정

P700의 redox state는 P700DW emitter-detector와 PAM Data Acquisition System (PDA100)이 부착된 PAM-101 modulated fluorometer를 이용하여 조사하였다. Far-red light (FR; $\lambda_{\text{max}} = 751 \text{ nm}$, 10 W m^{-2} , Schott filter)는 102-FR light source로 공급하였다. P700의 redox state는 far-red light에 의한 810 nm 부근의 흡광도 변화 (reference는 860 nm)를 조사하여 측정하였다. 잎절편에 highlight와 4°C chilling 복합처리 후 30분 동안 PDA-100을 이용하여 신호를 기록하였다. 백색광 존재 하

에서 FR 처리에 의한 최대 흡광도변화 (ΔA_{max})를 조사한 후, 백색광을 끄고 난 후의 흡광도변화 (ΔA_s)를 조사하였다. Data의 분석은 Microcal Origin Version 6.0 software package를 사용하였으며 (Microcal Software, Northampton, Mass, USA), 광계1의 전자전달계의 손상정도는 $(\Delta A_{max} - \Delta A_s) / \Delta A_{max}$ 를 통해 총산화 가능한 P700에 대한 환원형 P700의 비로 나타내었으며, 이는 환원형 P700의 상대적인 양을 나타내게 되어 광계1의 quantum efficiency로 사용하였다. 무처리에 있어서의 광합성 효율에 대한 각 처리시간에서의 광합성 효율을 상대적인 값으로 나타내었으며, 광계2의 조사에서의 동일한 수의 샘플을 이용하였다.

결과 및 고찰

Highlight 처리에서 광계2의 광합성 효율 및 광계1의 손상정도 조사

실온 (25°C)에서 강한 빛 (highlight, $1,100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에 30분간 leaf disc를 노출시킨 후, NT식물체 및 3종의 형질전환식물체에서 광계2의 광합성 효율 (Fv/Fm)을 조사하였다 (Figure 1A). Highlight처리에 의해 NT식물체와 모든 형질전환체에서 광계2의 광합성 효율이 크게 감소하였다. NT식물체는 무처리에 비해 약 56% 감소하였으며 SOD식물체와 APX식물체는 각각 약 54%와 51%의 광합성 효율의 억제를 보여, NT식물체, SOD식물체 및 APX식물체에서 highlight에 의한 광계2의 광합성 효율 감소는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 CA식물체는 highlight처리에 의한 광계2의 광합성 효율은 무처리에 비해 34% 감소하여, CuZnSOD 또는 APX가 단독으로 과발현된 형질전환식물체 보다 highlight 조건에서 더 효율적으로 광합성의 체계를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다. CA식물체의 경우, MV처리 후 광계2의 광합성 효율이 NT식물체 및 CuZnSOD 또는 APX 단독 발현 식물체보다 높게 유지되었다 (Kwon et al. 2002).

광계1의 효율은 위의 광계2의 실험과 동일한 조건 (25°C highlight)에서 leaf disc를 1시간 노출시킨 후 조사하였다 (Figure 1B). Highlight에 노출된 지 1시간 경과후 NT식물체는 광계1의 효율이 무처리에 비해 약 26% 감소하였고, SOD식물체와 APX식물체에서는 각각 약 23%와 21%의 광합성 효율의 억제를 보여 NT식물체보다 약간의 보호효과를 나타내었다. 그러나 CA식물체의 경우 highlight처리에 의한 광계1의 효율이 대조군에 비해 13%만이 감소하여, CA식물체는 CuZnSOD 또는 APX가 단독으로 과발현된 형질전환 식물체 보다 광계1의 효율이 highlight에 의한 스트레스 조건에서도 효과적으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 CuZnSOD와 APX가 동시에 발현되는 CA식물체는 광계2 및 광계1이 highlight에서 효과적으로 보호되고 있음을 확인할

수 있었다.

Highlight와 4°C chilling의 동시처리에 의한 광합성기구의 영향

저온스트레스는 식물의 생산성 저하 및 많은 지리학적인 종(種)분포의 차이를 가져오는 주요 요인이다 (Ort 2001; Allen and Ort 2001). Highlight처리에 의해 공급된 과잉의 광자들은 저온스트레스에 의해 영향을 받은 비정상적인 광합성 전자전달계에서 원활하게 수송되지 않는다 (Ivanov et al. 1998). Highlight ($1,100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)와 4°C chilling의 복합처리에서 NT식물체와 3종의 형질전환식물체의 광계2의 광합성 효율 (Figure 2) 및 광계1의 효율 (Figure 3)을 조사하였다.

광계2의 광합성 효율은 20분 간격으로 120분 동안 조사하였는데, 시간경과에 따른 광합성 효율은 NT식물체와 형질전환식물체 모두에서 유사한 경향으로 감소하였으며 처리 후 2시간에는 무처리에 비해 약 10% 수준만 유지하였다 (Figure 2). 복합처리 20분 후 NT식물체는 무처리에 비해 광합성 효

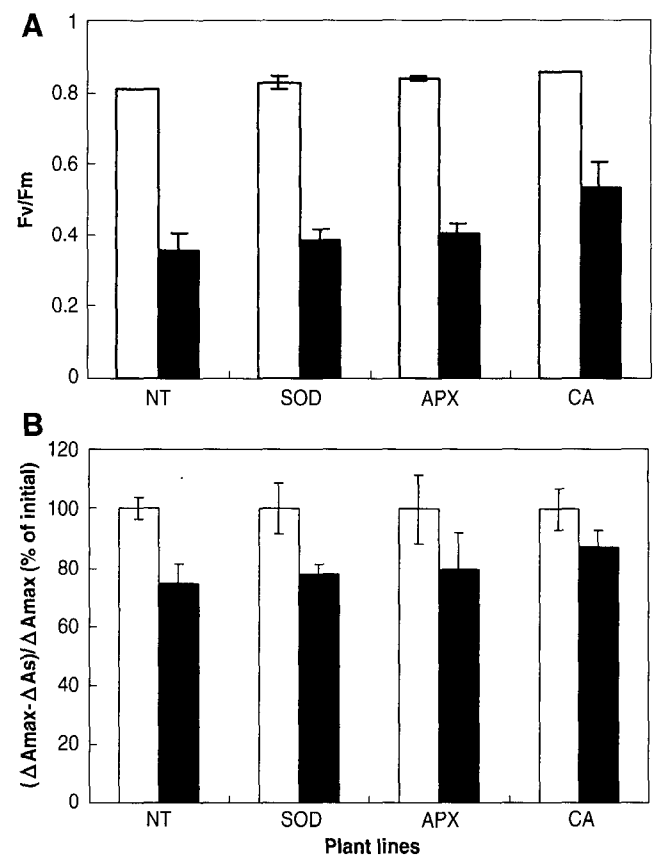


Figure 1. Photosynthetic efficiency in non-transgenic (NT) and transgenic plants expressing CuZnSOD and/or APX following highlight-mediated oxidative stress. Photosynthetic efficiency was measured by chlorophyll fluorescence as the Fv/Fm ratio in leaf discs of NT and transgenic plants treated with highlight ($1,100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for 30 min (A). *In vitro* measurements of the redox state of P700 in leaf discs of NT and transgenic plants treated with highlight regimes for 1 hr (B). □, untreated; ■, highlight treated. Data are means \pm SE of five independent measurements using five plants.

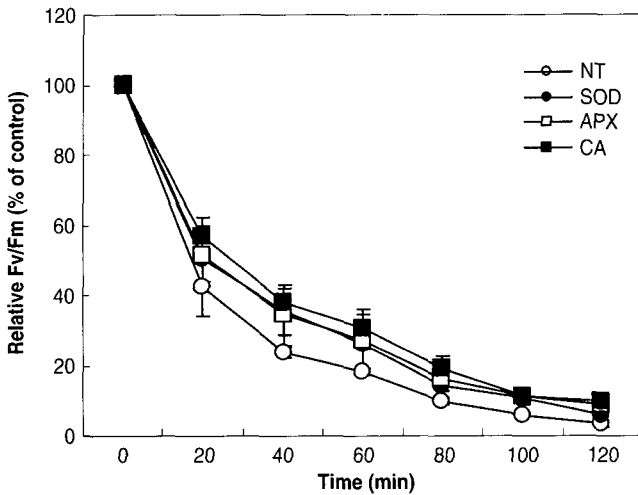


Figure 2. Photosynthetic efficiency in NT and transgenic plants expressing CuZnSOD and/or APX following both highlight (1,100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and 4°C chilling treatment. Photosynthetic efficiency was measured by chlorophyll fluorescence as the relative percentage Fv/Fm in leaf discs of NT and transgenic plants treated with highlight and 4°C chilling for 2 hr. Data are means \pm SE of five independent measurements using five plants.

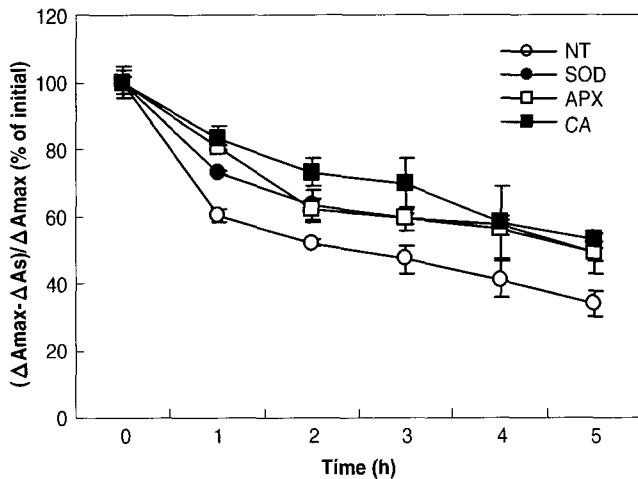


Figure 3. *In vitro* measurements of the redox state of P700 in leaf discs of NT and transgenic plants expressing CuZnSOD and/or APX following both highlight (1,100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and chilling treatment. The redox state of P700 of in leaf discs of NT and transgenic plants treated with highlight-chilling were measured for 5 hr. Data are means \pm SE of five independent measurements using five plants.

율이 약 58%의 감소하였으며 SOD식물체와 APX식물체는 각각 광합성 효율이 약 50%와 49%의 억제되었다. CA식물체의 경우도 대조구에 비해 광합성 효율이 highlight와 chilling의 복합처리에 의해 약 43%의 억제되는 것으로 나타나, NT식물체, SOD식물체 및 APX식물체보다 광합성 효율이 높게 유지되고 있었다.

광계1의 효율은 highlight와 chilling의 복합처리 후 1시간 간격으로 5시간 동안 조사하였다 (Figure 3). 광계1의 전자전달계에서 저온에 의한 전자수송의 제한에 따른 산화스트레스

에 대한 반응이 다소 흥미롭게 나타났다. 복합처리 1시간 후 광계1의 효율은 NT식물체는 무처리에 비해 약 40% 감소하였으나, SOD식물체와 APX식물체는 각각 약 28%와 20%의 감소하였다. Highlight에 의한 단독처리보다 highlight와 chilling의 복합처리에 APX식물체가 SOD식물체보다 광합성 효율을 높게 유지하고 있음을 나타낸다. 저온스트레스 조건에서 과도한 빛에 노출된 잎에서 H₂O₂ 함량이 급격하게 일시적으로 증가하는데 (Kornyejev et al. 2003), APX식물체는 NT식물체 및 SOD식물체보다 효과적으로 H₂O₂를 제거하여 광합성 효율이 높게 유지되었다고 추정된다. 또한 CA식물체의 경우, 동일조건에서 무처리에 비해 17%의 감소만이 관찰되어 highlight와 chilling의 복합처리에 의해 초래되는 산화스트레스에 대한 SOD와 APX의 동시발현의 상승효과를 확인 할 수 있었다. 스트레스 처리 1시간 이후에는 SOD식물체, APX 식물체 및 CA식물체는 모두 NT식물체보다 더 높은 효율을 유지하였다. 이상의 결과는 highlight와 chilling의 복합처리에 의해 유도된 산화스트레스에 대한 CuZnSOD와 APX의 동시발현이 상승효과를 나타내는 것이다. Highlight와 chilling에 의해 발생된 ROS는 발생 위치에서 SOD와 APX에 의해 소거되어 CA식물체의 경우 스트레스 조건에서도 광합성 효율을 높게 유지하였다고 여겨진다.

본 실험에 사용된 형질전환식물체의 제작에 사용된 프로모터는 스트레스와 무관하게 항상적으로 발현하는 CaMV 35S 프로모터이다. 보다 효과적인 스트레스 내성 식물체를 개발하기 위하여 스트레스에 의해 특이적으로 발현이 유도되는 프로모터의 사용이 요구된다. 저자들은 다양한 산화스트레스에 의해 발현이 강하게 유도되는 SWPA2 프로모터 (Kim et al. 2003)를 이용하여 CuZnSOD와 APX가 엽록체에 동시에 발현되는 형질전환 식물체를 개발하고 있다. 나아가 CA식물체에 APX의 기질인 AsA을 효과적으로 공급하기 위하여 산화형 DHA를 활성형인 환원형 AsA으로의 변환을 시키는 DHAR 유전자를 추가로 도입하는 식물체를 개발하고 있다.

적 요

환경스트레스에 대한 항산화효소의 보호효과를 이해하고 효과적인 스트레스내성 식물체를 개발하기 위하여 CuZnSOD와 APX를 엽록체에 발현시킨 형질전환식물체 (CA식물체)에 강한 빛 (highlight, 1,100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$)과 4°C chilling을 처리하였다. CA식물체 잎절편에서의 보호효과를 CuZnSOD을 도입한 SOD식물체, APX을 도입된 APX식물체 및 비형질전환식물체 (NT식물체)의 것과 비교하였다. CA 식물체의 광계2에서의 광합성 효율 (Fv/Fm)은 highlight와 4°C chilling 복합처리 1시간째에서 NT식물체에 비해 약 15%의 보호효과를 나타내었고, 광계1에서의 P700 redox state는 처리 후 3시간째에 약 23%의 보호효과를 나타내었다. SOD식물체와 APX식물체의

복합처리에 대한 보호효과는 CA식물체와 NT식물체의 중간 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 엽록체에서 CuZnSOD와 APX의 동시발현이 highlight와 chilling에 의한 산화스트레스를 극복하는 데 매우 중요하게 기여함을 직접적으로 제시하는 것이다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 작물유전체기능연구사업과 농촌진흥청 바이오그린 21사업의 연구비지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Allen DJ, Ort DR (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends Plant Sci* 6: 36-42
- Allen RD, Webb RP, Schake SL (1997) Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Rad Biol Med* 23: 473-479
- Alsher RG, Hess JL (1993) Antioxidant in higher plants. CRC Press, Boca Raton, FL
- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De RR, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D (1992) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10: 1723-1732
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford
- Inze D, Van Montagu M (1995) Oxidative stress in plants. *Cur Opin Biotechnol* 6: 153-158
- Ivanov AG, Morgan RM, Gray GR, Velitchkova MY, Huner NPA (1998) Temperature/light dependent development of selective resistance to photoinhibition of photosystem I. *FEBS Lett* 430: 288-292
- Jeong SW, Choi SM, Lee DS, Ahn SN, Hur Y, Chow WS, Park YI (2002) Differential susceptibility of photosynthesis to light-chilling stress in rice (*Oryza sativa* L.) depends on the capacity for photochemical dissipation of light. *Mol Cells* 13: 419-428
- Kim KY, Kwon SY, Lee HS, Hur Y, Bang JW, Kwak SS (2003) A novel oxidative stress-inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells. *Plant Mol Biol* 51: 831-838
- Komyeyev D, Logan BA, Allen RD, Holaday AS (2003) Effect of chloroplastic overexpression of ascorbate peroxidase on photosynthesis and photoprotection in cotton leaves subjected to low temperature photoinhibition. *Plant Sci* 165: 1033-1041
- Kwon SY, Ahn YO, Lee HS, Kwak S.S (2001) Biochemical characterization of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Biochem Mol Biol* 34: 316-321
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YM, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160: 347-353
- Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerance of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25: 873-882
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ort DR (2001) When there is too much light. *Plant Physiol* 125: 29-32
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* 10: 51-62
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* 103: 1067-1073
- Tsang EW, Bowler C, Herouart D, Vancamp W, Villarroel R, Genetello C, Van Montagu M, Inze D (1991) Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SW, Jo JK, Kim JS, Cho KY, Kwak SS (2000) Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *J Plant Physiol* 156: 504-509

(접수일자 2003년 10월 1일, 수리일자 2003년 10월 13일)