

들깨 γ -TMT형질전환 담배의 색소성분 변화 및 염 스트레스 내성 증가

우희종^{1,3}, 성좌경¹, 김정봉¹, 김니영¹, 이시명¹, 신공식¹, 임선형¹, 서석철¹, 김경환², 조용구^{3*}
¹농촌진흥청 국립농업과학원, ²농촌진흥청 감사담당관실, ³충북대학교 식물자원학과

Transgenic tobacco with γ -TMT of perilla showed increased salt resistance and altered pigment synthesis

Hee-Jong Woo^{1,3}, Jwa-Kyung Sung¹, Jung-Bong Kim¹, Na-Young Kim¹, Si-Myung Lee¹, Kong-Sik Shin¹, Sun-Hyung Lim¹, Seok Cheol Suh¹, Kyung-Hwan Kim², and Yong-Gu Cho^{3*}

¹National Academy of Agricultural Science,

²Audit and Inspection Officer, Rural Development Administration (RDA), Suwon 441-707, Korea

³Department of Crop Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT Tocopherols are essential lipophilic antioxidant in human cells, while little is known about its function in plant tissues. To study the impact of composition and content of tocopherols on stress tolerance, tobacco (*Nicotiana tabacum*) was transformed with a construct containing a cDNA insert encoding γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT/VTE4) from perilla under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. The transgenic tobacco was confirmed by PCR and RT-PCR. The total content and composition of tocopherols in the transgenic lines were similar with wild type controls. However, chlorophyll-a and carotenoid content in the transgenic lines were increased by up to 45% ($P < 0.01$) and 39% ($P < 0.02$), respectively. Also, the over-expression of γ -TMT increased the salt stress tolerance in tobacco plants. These results demonstrate that over-expression of γ -TMT gene in tocopherol bio-synthetic pathway can increase salt stress tolerance and contents of chlorophyll-a and carotenoid in transgenic tobacco plants.

서 론

자연환경에서 식물체는 병원체, 과도한 온도, 한발, 염과 같은 생물 및 비생물학적 스트레스에 노출되게 된다. 스트레스 환경하에서 생체 내 산소분자로부터 만들어진 활성산소종 (reactive oxygen species (ROS)) 은 식물체의 잎에 축적되어 단백질, 지방성분 등의 세포구성성분을 산화시켜 생체 내 생리장애 발생 및 심할 경우 세포 사멸을 가져오게 할 수 있다. 일반적으로 식물체들은 산화스트레스로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD)

등의 효소에 의한 해독과 ascorbate, tocopherol, carotenoid 등의 항산화물질에 의한 해독의 두 가지 방어 기작을 가지고 있다 (Dat et al. 2000; Alischer and Heath 2002).

토코페롤 (tocopherol)과 토코트리엔올 (tocotrienol) 이라고 알려져 있는 vitamin E는 수용성 지질 항산화물질로 광합성 세균과 식물 등에서 만들어지며, 토코페롤은 분자의 aromatic ring에 치환되는 메틸기의 위치와 수에 따라 α -, β -, γ -, δ -토코페롤의 4가지 isoform으로 분류된다 (Hirschberg 1999). 토코페롤과 토코트리엔올 생합성의 첫 단계는 homogentisate phytyltransferase (HPT/VTE2)와 homogentisate geranylgeranyl transferase 효소에 의해 이루어지며, homogentisic acid (HGA) 에 phytyl diphosphate (PDP) 또는 geranylgeranyl diphosphate 가 프레닐화 (prenylation)되어 2-methy-6-phytyl-benzoquinol

*Corresponding author Tel 043-261-2514 Fax 043-273-2242
E-mail: ygcho@cbnu.ac.kr

(2M6PBQ) 또는 2-methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol (2M6GGBQ) 이 생성되게 된다 (Valentin and Qi 2005). 이 두 화합물 2M6PBQ, 2M6GGBQ는 다음 단계에서 tocopherol cyclase (TC/VTE1)와 γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT/VTE4)의 활성과 기질특이성에 따라 여러 isoform의 토코페롤과 토코 트리에놀로 생합성된다 (DellaPenna and Last 2006; DellaPenna and Pogson 2006; Savidge et al. 2002). 식물체에서 토코페롤 성분/함량은 종 (species) 및 조직 (tissues)에 따라 다른데, 일반적으로 α -토코페롤은 잎에 γ -토코페롤은 종자에 풍부하며 β -, δ - 형태의 토코페롤은 대부분의 식물체내에 많이 존재하지 않는다 (Grusak and DellaPenna 1999).

토코페롤은 잎의 엽록체에 존재하며 (Soll et al. 1985), 기내 (*in vitro*) 실험에서 토코페롤의 redox-activated quinone ring이 활성산소종 (ROS)에 영향을 주기 때문에 (Fryer 1992) 토코페롤은 산화적 분해로부터 membrane의 지질 성분을 보호하는 중요인자로 인식되고 있다. 특히 α -토코페롤은 모든 형태의 토코페롤 중 가장 높은 vitamin E 활성을 나타내었고 (Kamal-Eldin and Appelqvist 1996), 기내의 리포솜 (liposome)에서 지방산 산화를 억제하는 가장 높은 항산화물질로 알려져 있다 (Fukuzawa et al. 1982). 그러나 4가지 다른 토코페롤 isoform이 식물체에서 산화적 스트레스작용에 대해 어떤 차이를 보이는지는 명확하지 않다. 애기장대에서 γ -TMT결핍 돌연변이 vte4-1은 생화학적 분석에서 여러 스트레스 환경에서 정상 식물체에 비교하여 구별될 정도의 차이가 발견되지 않은 반면 (Bergmuller et al. 2003), dsRNAi 기술을 이용하여 γ -TMT 유전자의 전사 후 과정 (post-transcription)을 차단한 담배에서는 정상 담배에 비교하여 salt에 대한 저항성이 감소되고 sorbitol-매개로 인한 삼투압에 대한 저항성이 향상되었다는 결과가 보고되었다 (Abbasi et al. 2007).

본 연구에서는 식물체에서 산화스트레스에 대한 γ -TMT의 역할을 알아보기로 들개에서 분리한 γ -TMT 유전자가 항시발현 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter에 의해 과발현되는 담배 형질전환체를 제조하여 γ -TMT가 토코페롤 생합성과정에 관여하는 다른 유전자들의 발현, 색소성분의 변화, 염류저항성에 미치는 영향을 조사코자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 성장조건

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi)를 식물재료로 사용하

였다. 담배종자는 70% (v/v) 에탄올에서 2분간 표면살균한 다음, 2.5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서 10분간 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 살균된 종자는 2% (v/v) sucrose가 포함된 1/2 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 파종하고, 파종 후 4주 기내배양된 담배식물체의 엽 절편체를 실험재료로 사용하였다. 유전자 도입 및 발현이 확인된 형질전환체 종자는 1/2 MS 기본배지에 파종하였다. 파종된 종자는 26°C 16L/8D 광주기에서 2주간 배양 후 0, 100, 200, 300, 400mM의 NaCl 및 sorbitol이 각각 포함된 1/2 MS배지에 옮겨 치상하거나 이후의 색소 및 토코페롤 함량 분석실험을 위한 온실재배를 위해 토양으로 이식하였다.

유전자

들개로부터 분리한 γ -TMT 유전자 (Kim et al. 2002)를 형질전환 벡터제조를 위해 사용하였다. γ -TMT 유전자는 nopaline synthase terminator (nos-T)와 함께 식물형질전환 벡터인 pBI121의 변형벡터인 pHF 벡터내로 도입하여 CaMV 35S promoter에 의한 γ -TMT 유전자의 발현을 유도하도록 하였다. 구축된 식물발현용 운반체인 pHFT는 freeze-thaw 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 도입하였다.

형질전환

벡터 pHFT로 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101을 YEP (hygromycin)액체배지에 접종하여 48시간 동안 진탕 배양하였다. *Agrobacterium* 배양액에 담배 엽절편체를 20분간 감염시킨 다음, 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 20 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에서 2일간 공동배양하였다. 형질전환된 재분화 식물체를 얻기 위하여 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 300 mg/L carbenicillin, 10 mg hygromycin, 20 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에서 배양한 다음, 3주마다 계대배양 하였다. 재분화된 신훈초는 300 mg/L carbenicillin, 10 mg hygromycin, sucrose 20 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 발근된 개체는 순화 후 화분으로 이식하여 온실에서 생육시켰다.

형질전환체 검정

형질전환체에서 형질전환유전자의 도입을 확인하기 위하여 PCR 방법이 이용되었다. Genomic DNA 추출은 형질전환

체의 잎조직 1 g을 cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 방법으로 추출하였다 (Jones and Walker 1963), PCR 분석을 위한 반응액은 i-star taq PCR pre-mix (Intronbio, 한국)를 사용하였고, CaMV 35S 프로모터와 γ -TMT 유전자 부위의 염기서열을 이용하여 제작한 primer (forward primer 5'-GGACCTAACAGAACTCGCCGTAAGAC-3'/ reverse primer 5'-CCACCCGGTGGTGCAGATACCT-3')와 하이그로마이신 저항성 유전자 내의 염기서열을 이용한 primer (forward primer 5'-CCGTCACCAAGCTCTGATAGAGTTG-3'/ reverse primer 5'-CTGATCGAAAAGTTTCGACACGCTCT-3')를 사용하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation 시킨 후 94°C 1분, 60°C 1분, 72°C 1분으로 30회 반응시킨 후 72°C에서 10분간 extension하였다.

도입된 γ -TMT 유전자의 발현확인에는 RT-PCR 방법을 사용하였다. 형질전환체 및 대조구로부터의 total RNA는 액체 질소를 이용하여 식물조직을 완전히 분쇄한 후 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 추출하였다. 추출된 total RNA 1 μ g은 SuperScriptTMII Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 γ -TMT의 염기서열 일부를 이용하여 제작한 프라이머 (forward primer 5'-AGGTATCTGCACCACCGGTGGC-3'/ reverse primer 5'-GATAGGTCCTGTGGCACCATGTAACGAT-3')를 이용하여 94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분을 1회 반응주기로 하여 28주기 동안 증폭하였다. 최종 PCR 산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동으로 분리하여 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

토코페롤 합성 유전자의 발현분석을 위한 RT-PCR

담배 HPT, TC 유전자의 cDNA 클로닝은 이미 보고된 감자 (*Solanum tuberosum*) TC 유전자 (accession no. AY536918)와 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) HPT 유전자 (accession no. AF324344)의 염기서열을 이용하였다. 담배에서 클로닝된 유전자의 염기서열 분석을 통해서 TC (forward primer 5'-ATGTACTCTGTAGAGAATCCTGCATTTCCCAAG-3'/ reverse primer 5'-TCCTGCTGTAGACTTCTGCTTTGAGTTAACGT-3') 유전자와 HPT (forward primer 5'-GCAACAGGTGAGCTCCACTGAAAGCTTAG-3'/ reverse primer 5'-TACGTGGAACAGCATTAGGATCCCTCTCA-3') 유전자에 대한 primer를 합성하였다. 합성된 primer를 이용하여 형질전환체 및 대조구에서 추출된 total RNA 1 μ g을 모형으로 하여 제조한 cDNA를

94°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분을 1회 반응주기로 하여 25주기 동안 증폭하였다. 증폭된 DNA의 정량화를 위한 internal standard는 actin (forward primer 5'-CTATTCTCCGCTTTGGACTTGGCA-3'/ reverse primer 5'-AGGACCTCAGGACAACG GAAACG-3') 유전자를 이용하였다.

토코페롤 추출 및 분석

토코페롤 추출은 Panfili 등 (2003)의 방법에 따라, 대조체와 형질전환체 식물체의 잎을 막자사발을 이용하여 분쇄 후 건조 중량 0.5 g의 시료에 internal standard (α -tocopherol acetate, 50 ppm)와 추출용매 100 ml (Methanol: Ethylacetate: Ether= 1: 1: 1)을 넣어 혼합한 후 1시간동안 초음파 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman, No.4)로 여과한 후 농축하여 50 ml ethyl acetate로 녹여 삼각 flask에 옮겨 담은 후 1.5 ml Potassium hydroxide 포화용액을 넣어서 16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 분액여두에 옮겨서 동량의 증류수로 용매 분획한 상등액 (ethyl acetate)을 모았다. 같은 방법으로 3회 추출한 ethyl acetate용액에 sodium sulfate anhydrous를 넣어 수분을 제거한 후 여과지로 여과하였으며, 여액은 회전농축기로 농축 후 2 ml MeOH (1% BHT; Butylated Hydroxy Toluene)에 완전히 녹여 Polyfluortetraethylene (PTFE) syringe filter로 제 여과한 후 HPLC 분석을 실시하였다. 정량분석에 사용된 HPLC는 Shimadzu (Japan)사 제품으로 두개의 펌프 (LC-10ADvp)와 SPD-M10 Avp PDA (photodiode array) detector에 Class-vp software를 사용하였고 파장은 290 nm에서, 컬럼은 COSMOSIL packed column (4.60 x 150 mm, 5 μ m)이며 injection volume은 40 μ l, 유속은 2 mL/min이었다.

클로로필과 카르테노이드 정량

파종 후 5주 후 대조구와 형질전환체의 완전 전개된 상위 2, 3엽면체를 Lichtenthaler (1987)의 방법에 따라 80% (v/v) acetone을 이용하여 추출한 후 663, 647, 470 nm에서의 흡광도 값을 측정하여 정량화 하였다.

결과 및 고찰

γ -TMT 형질전환체의 분자생물학적 분석

배양 후 shooting 및 rooting과정에서 선발된 담배 형질전환체는 대조체와 비교하여 형태적인 차이는 발견되지 않았

다. 재분화된 식물체의 genome에 γ -TMT 유전자가 도입되었는가를 확인하기 위하여, PCR 분석을 실시하였다. 형질전환 식물체로부터 분리한 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭을 실시한 결과, Figure 1에 나타난 바와 같이 CaMV 35S 프로모터 부위와 γ -TMT 유전자에 대한 primer 조합에서 예상크기와 일치하는 0.4 kb의 PCR 증폭산물을 얻었으며 증폭산물의 염기서열 분석 (결과 미제시)을 통해서 형질전환된 유전자임을 확인하였다. 형질전환 담배에서 도입된 γ -TMT 유전자가 발현하고 있는지의 여부를 확인하기 위해 RT-PCR 분석을 실시한 바 (Figure 2), 대조구 개체에서는 보이지 않는 예상크기의 형질전환된 들개 γ -TMT에 대한 RT-PCR 산물이 모든 형질전환체에서 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 한편, 대조구 담배의 total RNA에서 γ -TMT에 대한 RT-PCR 산물이 증폭되지 않은 것은 담배 내에 존재하는 γ -TMT 유

전자 서열이 형질전환 되어진 들개 γ -TMT의 염기서열과 상동성이 낮거나 발현량이 많지 않기 때문인 것으로 추정된다.

토코페롤 함량 분석 및 다른 토코페롤 합성 유전자의 발현 분석

토코페롤 함량 및 농도의 분석을 위해 유전자의 도입이 확인된 두 종류의 형질전환체 및 대조 식물체 잎으로 HPLC 분석을 실시하였다. 형질전환체 및 대조 식물체의 토코페롤 함량과 성분은 거의 유사하였으며, α -토코페롤 이외의 다른 형태의 토코페롤은 거의 검출되어지지 않았다 (Figure 3). 담배의 경우 잎조직 뿐 아니라 종자에서도 토코페롤은 대부분 (>95%) α -토코페롤 형태로 존재하는 것으로 보고된 바 있으며 (Abbasi et al. 2007), γ -TMT 효소는 토코페롤 합성단계의 최종단계에 관여하여 gamma-type의 토코페롤을 alpha type으로 전환하는 역할을 수행하게 된다. 따라서, 형질전환 담배의 α -토코페롤 함유량이 대조 식물과 유사한 점은 담배 내 γ -토코페롤 함유량이 매우 낮아 α -토코페롤로 변환되지 못했기 때문인 것으로 생각된다. 또한, γ -TMT 형질전환 식물체내에서 과발현된 γ -TMT효소가 상위 단계의 토코페롤 합성과정에 관여하는 HPT, TC 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하고자, 대조구와 형질전환체를 이용하여 RT-PCR 분석을 실시하였다. 그 결과, 대조 식물체와 비교해서 형질전환체의 토코페롤 합성 관여 유전자인 HPT, TC의 발현량은 큰 변화를 보이지 않았다 (Figure 2).

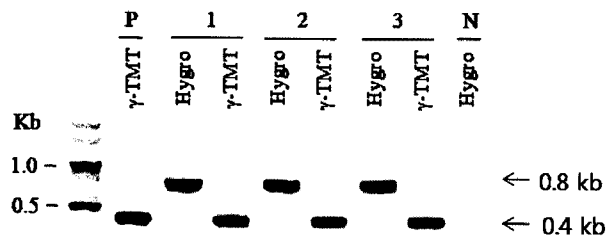


Figure 1. PCR analysis of genomic DNA prepared from transgenic plants. Line numbers and amplified gene used for each PCR reaction are indicated on the top of each lane. M, molecular marker. P, positive control (plasmid); 1-3, transgenic plant lines; N, negative control (wild type tobacco plant); Hygro, hygromycine resistance gene.

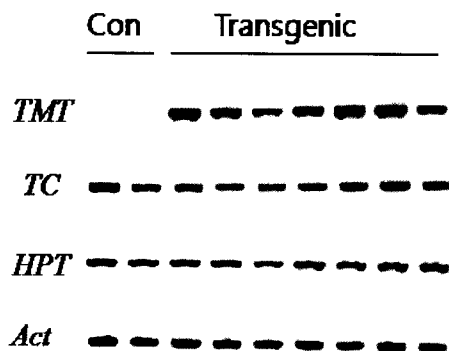


Figure 2. RT-PCR analysis of TMT and tocopherol biosynthetic genes (TC, tocopherol cyclase HPT, homogentistic acid phytyltransferase) in leaves of control and transgenic tobacco plants. Tobacco actin rRNA was used control to monitor template amounts. Con, wild type tobacco plants; transgenic, γ -TMT transgenic tobacco plants.

색소 분석

토코페롤 합성의 전구물질로 사용되는 phytyldiphosphate (phytyl-DP)는 다른 중요한 항산화물질로 알려져 있는 카로테노이드와 클로로필의 생합성 대사 전구물질로도 사용된다 (Rise et al. 1989; Shintani 2006). 담배 식물체내의 γ -TMT 발현이 클로로필 및 카로테노이드 합성에 영향을 주는지를 알아보기로 T1 형질전환 식물체내 농도를 측정하였다. 분석 결과 γ -TMT 형질전환체에서 클로로필-b 함유량은 대조 식물체와 거의 비슷했지만, 클로로필-a는 대조 식물체와 비교하여 형질전환담배 No. 2 line에서는 45% ($P < 0.01$) 함량이 증가하였고 (Figure 4A), 카로테노이드 함량은 39% ($P < 0.02$) 증가하였다 (Figure 4B). 이러한 색소의 변화현상은 γ -TMT RNAi 실험에서도 관찰되어졌는데 (Abbasi et al. 2007), γ -TMT 효소의 발현량 증가로 phytyl-DP의 생성이 증가되었

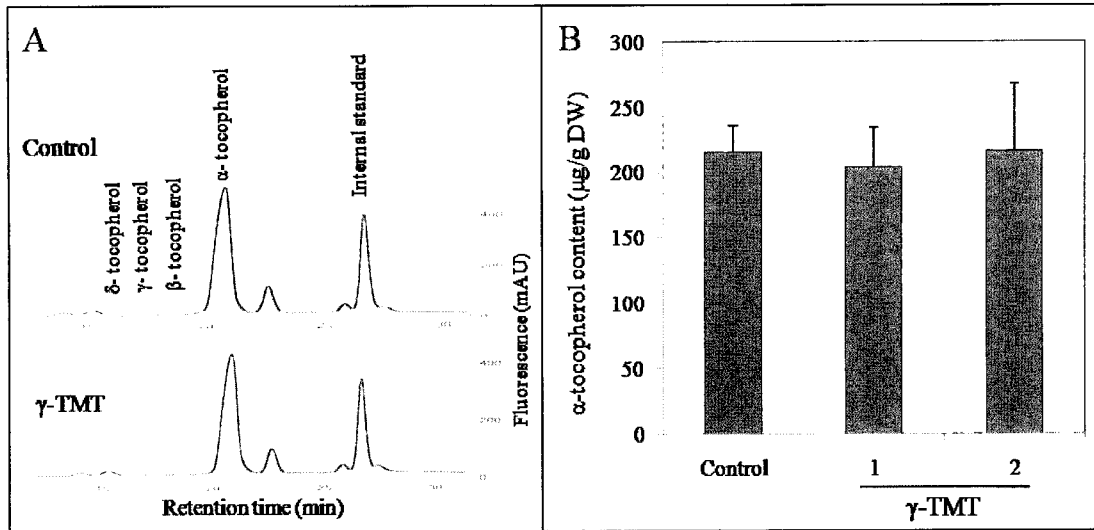


Figure 3. HPLC chromatograms (A) of tocopherols and α -tocopherol content (B) in wild-type and γ -TMT transgenic tobacco leaves. A, HPLC chromatograms obtained for the extracts prepared from the leaf of wild-type and γ -TMT transgenic tobacco. B, α -tocopherol content was measured by HPLC chromatograms results and α -tocopherol acetate was used as internal standard for normalization of α -tocopherol concentration. α -tocopherol content data shown are means from three replicate samples and error bars indicate standard deviations. DW; dry weight, Control, wild type tobacco plants; γ -TMT, transgenic plants.

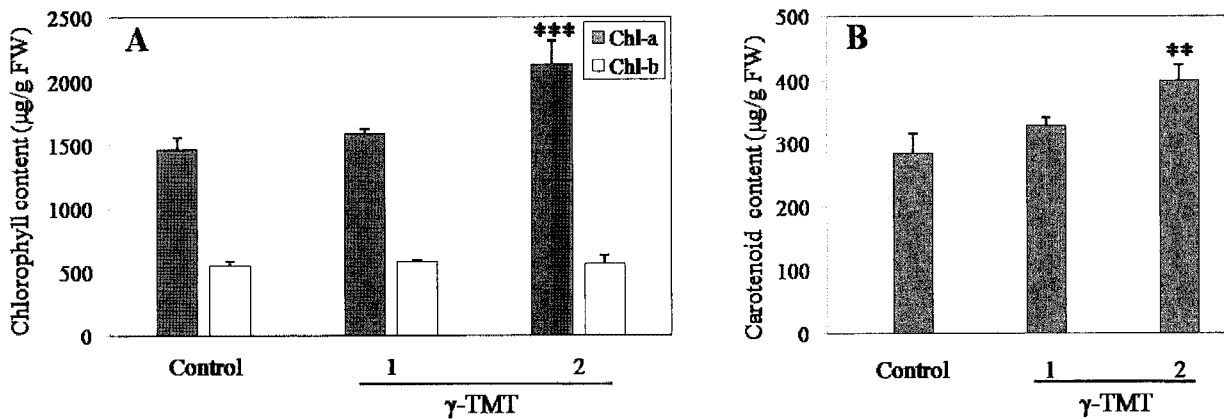


Figure 4. Chlorophyll and carotenoid contents in wild-type and γ -TMT transgenic tobacco leaves. A, Chlorophyll contents (chlorophyll a, gray bars; chlorophyll b, white bars); B, Total carotenoid contents. Chlorophyll and carotenoid were determined spectrophotometrically. The data shown are means from five replicate samples and error bars indicate standard deviations. **, $P < 0.05$; and ***, $P < 0.01$.

지만 토코페롤 합성의 첫단계 효소인 HPT 효소의 제한된 활성으로 인하여 토코페롤 합성이 증가되지 않았고 남은 phytyl-DP가 카로테노이드와 클로로필 생합성과정에서 이용되었기 때문인 것으로 생각된다.

형질전환 식물체의 염 스트레스 저항성

최근에 토코페롤 생합성 관련 유전자를 이용한 형질전환 식물체에서 건조나 염과 같은 산화 스트레스 저항성 변화에 대한 연구가 보고되었다 (Liu et al. 2008; Abbasi et al. 2007).

γ -TMT 발현 담배를 이용하여 염에 대한 저항성 정도를 알아보기 위하여 종자파종 후 2주된 형질전환체 및 대조 식물체를 각기 다른 농도의 NaCl 이 함유된 1/2 MS 배지에 치상하여 4주간 배양 후 형태적인 특징을 관찰하였다 (Figure 5). 형질전환 식물체의 생육정도는 대조 식물체와 비교하여 100mM NaCl 배지에서는 거의 비슷했지만, 200mM 이상에서는 잎의 크기나 생육이 증가하는 것으로 나타났으며, 400mM 이상의 NaCl 배지에서는 두 종류의 식물체 모두 생육하지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Abbasi 등(2007)이 γ -TMT RNAi 방법을 사용하여 담배 내 α -토코페롤 합성이 감

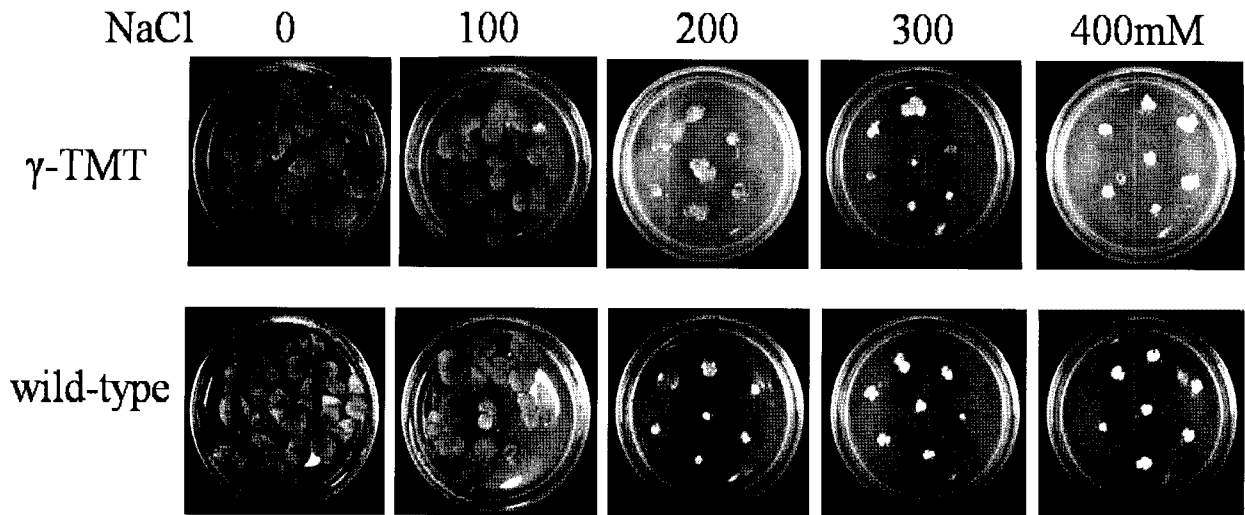


Figure 5. Salt-induced stress in γ -TMT transgenic and wild-type tobacco plants. Tobacco seedlings were subjected to MS medium containing different amounts of NaCl.

소되었을 때 염 저항성이 감소하였다는 보고와 일치하지만, 식물체내 토코페롤 성분의 변화 없이 염 저항성이 나타났다는 점은 α -토코페롤이 염 저항성에 관여한다는 기존의 보고와는 다른 매우 흥미로운 결과이다. 이러한 염 저항성의 증가는 카로테노이드와 같은 다른 산화스트레스에 관련된 항산화성물질의 증가와 연관된 것으로 추정되며, 염 저항성에 α -토코페롤이 필수적이지는 않은 것으로 보인다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 경상연구비(05-5-11-22-2) 및 농림기술개발사업(code # 306005-04-2-HD110)의 지원에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

- Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll LM (2007) Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol* 143: 1720-1738
- Alscher RGEN, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53: 1331-1341
- Bergmuller E, Porfirova S, Dormann P (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol* 52: 1181-1190
- Dat JVS, Vranova E, Van Montagu M, Inze D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57: 779-795
- DellaPenna D, Last RL (2006) Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis. *Physiol. Plantarum* 126: 356-368
- DellaPenna D, Pogson BJ (2006) Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu. Rev. Plant Biol* 57: 711-738
- Fryer MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E (α -tocopherol) *Plant Cell Environ* 15: 381-392
- Fukuzawa K, Tokumura A, Ouchi S, Tsukatani H (1982) Antioxidant activities of tocopherols on Fe^{2+} -ascorbate induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids* 17: 511-513
- Grusak MA, DellaPenna D (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 133-161
- Hirschberg J (1999) Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Curr. Opin. Biotech* 10: 186-191
- Jones AS, Walker RT (1963) Isolation and analysis of the deoxyribonucleic acid of *mycoplasma mycoides* var. *capri*. *Nature* 198: 588-589
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701
- Kim KH, Hwang SK, Kim DH, Lee JY, Kim YH, Hwang YS (2002) Molecular cloning and characterization of γ -tocopherol methyltransferase cDNA from *Perilla frutescens*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol* 45: 203-206
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth Enzymol* 148: 350-382

- Liu X, Hua X, Guo J, Qi D, Wang L, Liu Z, Jin Z, Chen S, Liu G (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Lett* 30: 1275-1280
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Panfili G, Fratianni A, Irano M (2003) Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *J Agric Food Chem* 51: 3940-3944
- Savidge B, Weiss JD, Wong YH, Lassner MW, Mitsky TA, et al. (2002) Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 321-332
- Rise M, Cojocaru M, Gottlieb HE, Goldschmidt EE (1989) Accumulation of α -tocopherol in senescing organs as related to chlorophyll degradation. *Plant Physiol* 89: 1028-1030
- Shintani DK (2006) Engineering plants for increased nutrition and antioxidant content through the manipulation of the vitamin E pathway. *Genet. Eng* 27: 231-242
- Soll J, Schultz G, Joyard J, Douce R, Block MA (1985) Localization and synthesis of prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys* 238: 290-299
- Valentin HE, Qi Q (2005) Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 436-444

(접수일자 2008년 11월 11일, 수리일자 2008년 11월 27일)