

## 돌연변이 식물 및 형질전환된 효모에서 phytochelatin synthase 발현이 살균제 tolclofos-methyl 분해에 미치는 영향

윤하임 · 김장억 · 신재호 · 김정희<sup>1)</sup> · 이상만\*

경북대학교 응용생명과학부, <sup>1)</sup>생물학과  
(2009년 11월 11일 접수, 2009년 12월 4일 수리)

### Effect of Phytochelatin Synthase Expression on Degradation of Fungicide Tolclofos-methyl in Mutant Plant and Transformed yeast

Haim Yoon, Jang-Eok Kim, Jae-Ho Shin, Jeong Hoe Kim, and Sangman Lee<sup>\*</sup> (School of Biosciences, Department of Biology<sup>1)</sup>, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

**ABSTRACT:** Phytochelatin (PCs) are small-sized peptides synthesized by PC synthase (PCS) using glutathione (GSH) as a substrate, and they play an important role in the detoxification of toxic heavy metals in plants, fission yeast, and other living organisms. Recently, it has been suggested that PCS is also involved in degradation of some xenobiotics including monobromobimane. PCS cleaves the Gly residue from GSH-xenobiotics conjugates resulting in  $\gamma$ -Glu-Cys-xenobiotics, and this is to degraded further. Therefore, our research is focus on whether PCS is also involved in degradation of tolclofos-methyl, an important pesticide which has been used in ginseng cultivated areas. Heterologous expression of *Arabidopsis* PCS confers tolerance to tolclofos-methyl in yeast. Furthermore, PCS-deficient *Cad1-3 Arabidopsis* mutant showed high sensitivity to tolclofos-methyl compared with wild-type plants. These results imply that PCS is involved in degradation of tolclofos-methyl as other xenobiotics.

**Key Words:** Ginseng, glutathione, pesticide, phytochelatin synthase, xenobiotics

### 서 론

Phytochelatin(PC)은 크기가 작은 펩타이드로서 식물과 효모의 중금속 해독 기전에서 중추적인 역할을 한다<sup>1)</sup>. PC는 PC synthase(PCS)가 글루타티온(GSH)을 기질로 사용하여 세포질에서 생성되고 중금속과 강하게 결합하여 복합체가 되면 이는 액포막에 존재하는 단백질에 의해서 액포 안으로 이동된다. 이는 결과적으로 세포질에 독성이 강한 중금속을 액포 안에 가두어 독성이 나타나지 않게 하는 것이다<sup>2,3)</sup>.

GSH는 세 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 xenobiotics를 분해하는데 중요한 역할을 수행한다<sup>4)</sup>. 세포 안으로 들어온 xenobiotics는 GSH-S-transferase (GST)에 의해서 GSH와 복합체(GSH-xenobiotics)를 형성하게 된다<sup>5)</sup>.

이러한 복합체는 액포막에 존재하는 ABC-type transporter에 의해서 안으로 이동되어 분해되는 과정을 거치는 것이 일반적인 과정이다<sup>6)</sup>. GSH-xenobiotics의 분해는 식물에서 글라이신(Gly)이 그리고 동물에서는  $\gamma$ -글루타민( $\gamma$ -Glu)가 복합체에서 떨어져 나오는 것으로 시작되는데 이는 각각 PCS와  $\gamma$ -glutamyl-transferase( $\gamma$ -GT)에 의해서 수행된다<sup>5,7)</sup> (Fig. 2).

Tolclofos-methyl은 감자, 사탕무, 상추에 발생하는 토양 유래 병원균을 제어하는데 효과적인 살균제이다. 상추 잎에 살포한 tolclofos-methyl은 7일 후에도 반 정도는 분해가 일어나지 않았으며 나머지는 P-O-aryl 연결이 끊어지고 메틸기에 산화가 일어나서 malonylglucose와 glucose conjugates로 분해 된다<sup>8)</sup>.

본 연구는 우리나라의 인삼재배토양에서 잔류기간이 길어 문제가 되고 있는 tolclofos-methyl이 PCS에 의해 분해가 가능한지를 시험한 결과를 보고한다.

\*연락처:

Tel: +82-53-950-7345 Fax: +82-53-953-7233

E-mail: sangman@knu.ac.kr

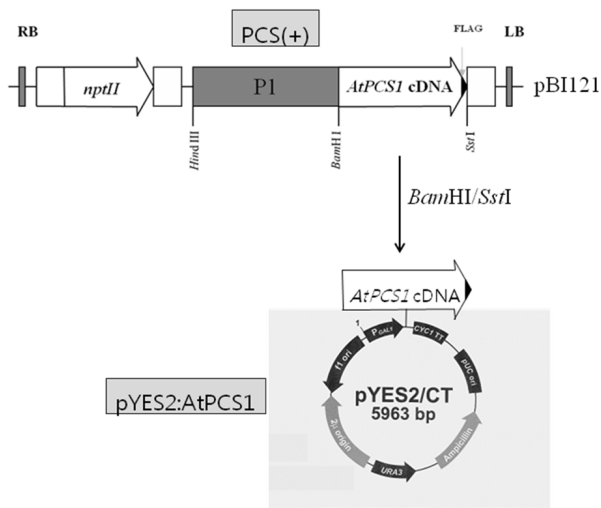


Fig. 1. Yeast expression-construct. The 2.0 kb *AtPCS1* promoter (P1) is fused to a C-terminal FLAG-tagged *AtPCS1* cDNA resulted in PCS(+). The *AtPCS1* cDNA is subcloned into *Bam*HI/*Sst*I sites of pYES2 resulted in pYES2:*AtPCS1*. Arrows indicate the direction of transcription. RB, right border; LB, left border; *nptII*, neomycin transferase gene II; FLAG, amino acid sequence of DYKDDDDK.

## 재료 및 방법

### 효모 형질전환 및 생육조건

실험에 사용된 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 INVsc1 (*his3*Δ1/*his3*Δ1 *leu2*/*leu2* *trp1-289*/*trp1-289* *ura3-52*/*ura3-52*) (Invitrogen, Carlsbad, CA)로서 lithium acetate 방법<sup>9)</sup>으로 형질전환 시켰다. 형질전환 된 효모는 yeast nitrogen base, yeast synthetic drop-out medium supplement without uracil, 그리고 2% galactose를 포함하는 배지에서 배양하였다. 효모의 tolclofos-methyl에 대한 민감성을 구명하기 위해서 다양한 농도의 tolclofos-methyl이 포함된 액체 배지에서 온도 30°C가 유지되는 배양기에서 20시간 배양한 후 600 nm에서 OD 값을 측정하여 효모의 밀도를 계산하였다.

### DNA 조작

DNA 조작은 대장균(*Escherichia coli*)인 DH5a를 이용하였으며 애기장대의 PCS 유전자(*Arabidopsis thaliana* PC synthase, *AtPCS1*)는 PCS(+) vector<sup>10)</sup>에 존재하는 것을 pYES2 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA)의 *Bam*HI/*Sst*I 자리에 넣어 pYES2:*AtPCS1*를 만들었고 이를 효모형질전환에 사용하였다(Fig. 1).

### 식물재료 및 성장조건

애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. Columbia)의 야생형(wild-type)과 PCS 유전자에 돌연변이가 일어나 기능이 상

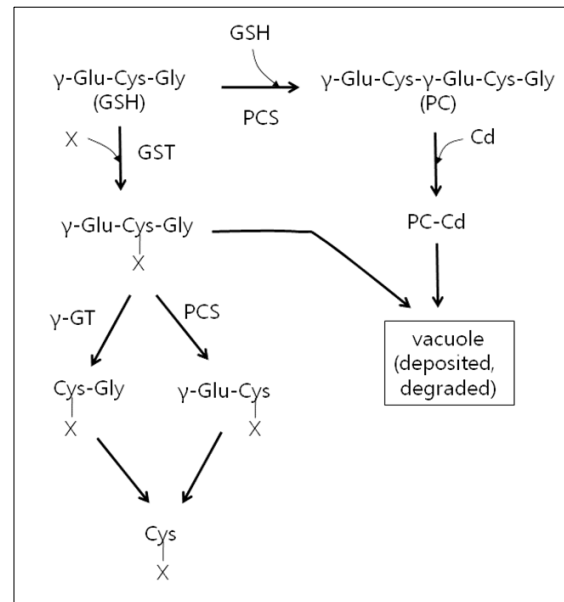


Fig. 2. Schematic representation of phytochelatin synthase (PCS) functions in detoxification of heavy metals and xenobiotics. GSH, glutathione; PC, phytochelatin; X, xenobiotics; GST, GSH-S-transferase;  $\gamma$ -GT,  $\gamma$ -glutamyl-transferase.

실된 돌연변이체(mutant) *Cad 1-3*의 씨를 반 농도의 Murashige & Skoog 염, 2% (w/v) sucrose (pH 5.8)를 포함하는 100 × 100 × 15 mm square plates의 고체 배지에서 7일간 배양하였으며 배양 조건은 23°C에서 18시간 빛을 쬐었다.

## 결과 및 고찰

PCS(Phytochelatin synthase)가 우리나라의 인삼재배 경작지에서 잔류농약 문제가 되는 tolclofos-methyl의 분해에 관여 하는지를 알아보기 위해서 애기장대 유래 PCS가 발현되는 효모를 0, 100, 200, 300, 400  $\mu$ g/mL 농도의 tolclofos-methyl이 존재하는 액체 배지에서 성장하게 하여 살균제에 대한 해독성 차이를 조사한 결과 tolclofos-methyl의 농도가 같을 때 애기장대의 PCS를 발현하는 효모(pYES2:*AtPCS1*)가 발현하지 않은 효모(pYES2)에 비해서 살균제인 tolclofos-methyl에 저항성이 현저하게 큰 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 세포 내로 흡수된 tolclofos-methyl이 세포 내에 존재하는 GSH와 복합체를 형성하고 이는 PCS에 의해서 분해되기 때문이라고 추정할 수 있다. 이는 PCS가 GSH-xenobiotics 분해에 관여한다는 기존의 알려진 보고와 일치하는 결과이다<sup>7)</sup>.

PCS가 tolclofos-methyl 분해에 관여하여 저항성이 증가 되었다면 정 반대로 PCS 기능이 상실된 애기장대 돌연변이체 *Cad1-3*는 tolclofos-methyl에 대하여 민감할 것이라는 가정하에 다음 실험을 하였다. 야생형인 애기장대와 *Cad 1-3*의 씨를 tolclofos-methyl이 포함 된 배지에서 7일 동안 배

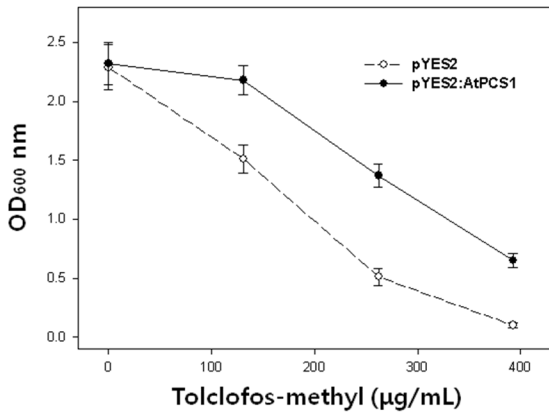


Fig. 3. Sensitivity to tolclofos-methyl in *S. cerevisiae* cells expressing *AtPCS1* under the control of galactose inducible promoter. Yeast cells containing either pYES2: *AtPCS1* (dark circle) or empty vector pYES2 (white circle) were grown in media containing various concentrations of tolclofos-methyl with 2% galactose for 20 h at 30°C. Afterward, cell density was measured spectrophotometrically at 600 nm. Values are means ± SE of three replicates.

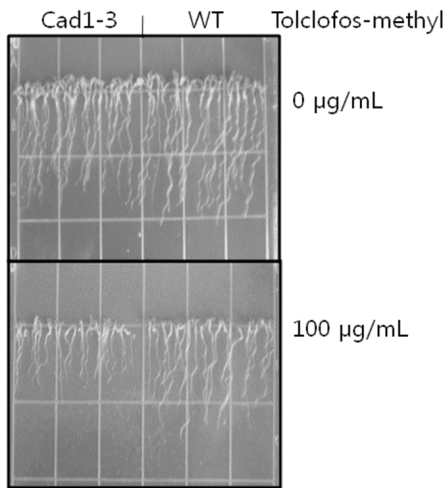


Fig. 4. Comparison of sensitivity to tolclofos-methyl in wild-type (WT) and *AtPCS1* knock-out mutant, *Cad1-3*. Seeds of each WT and *Cad1-3* were germinated and grown for 7 days on MS agar medium containing either 0 or 100 µg/mL tolclofos-methyl.

양한 후 성장 정도를 비교하였는데 PCS가 제대로 기능을 하지 못하는 *Cad1-3* 돌연변이체는 야생형에 비해서 tolclofos-methyl에 훨씬 더 민감한 것으로 나타났다(Fig. 4). 이는 돌연변이체가 tolclofos-methyl 분해에 관여하는 PCS의 부재로 인해서 나타났다고 추정할 수 있다. 기존에 알려진 보고와 일치하게 PCS 부재의 식물이 GSH-xenobiotic 분해하는 능력이 감소한다는 것이다<sup>7)</sup>.

본 연구 결과는 PCS가 tolclofos-methyl 분해에 관여한다는 단서를 제공하고 있으며 앞으로 PCS가 tolclofos-methyl

분해를 어느 정도 효과적으로 수행하는지를 분석해야 될 것이고 또한 PCS를 식물에 과잉 발현시켜서 식물을 이용한 살균제 tolclofos-methyl 분해를 촉진시키는 연구가 수행되어야 할 것이다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: 200802A 01033084)의 지원에 의해 이루어진 것이며 이에 감사 드립니다.

### 참고문헌

1. Rauser, W. E. (1990) Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61-86.
2. Cobbett, C. S. (2000) Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Cur. Opin. Plant Biol.* 3, 211-216.
3. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E. L., and Zenk, M. H. (1989) Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
4. Meister, A. (1995) Glutathione metabolism, *Methods Enzymol.* 251, 3-7.
5. Beck, A., Lendzian, K., Oven, M., Christmann, A., and Grill, E. (2003) Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates, *Phytochemistry* 62, 423-431.
6. Grzam, A., Pierre, T., Clemense, S., Hell, R., and Meyer, A. J. (2006) Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatin synthase, *FEBS Lett.* 580, 6384-6390.
7. Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lendzian, K., and Grill, E. (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates, *Plant J.* 49, 740-749.
8. Keiko, I-S., Takuo, F., Toshiyuki, K., and Takimoto, Y. (2004) Metabolism of tolclofos-methyl in lettuce (*Lactuca sativa*), *J. Pestic. Sci.* 29, 322-327.
9. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) In *Molecular Cloning: A Laboratory manual*, (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, U.S.A.
10. Lee, S. and Kang, B. S. (2005) Phytochelatin is not a primary factor in determining copper tolerance. *J. Plant Biol.* 48, 32-38.