

Dehydroascorbate reductase 과발현 형질전환 감자 식물체의 단백질체 분석

한은희 · 구영민 · 김윤희 · 이신우

Proteomic analysis of dehydroascorbate reductase transgenic potato plants

Eun-Heui Han · Young-Min Goo · Yun-Hee Kim · Shin-Woo Lee

Received: 11 May 2016 / Revised: 13 June 2016 / Accepted: 14 June 2016
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Ascorbic acid (AsA) is a strong antioxidant/reducing agent that can be converted to dehydroascorbate (DHA) by oxidation in plants. DHA, a very short-lived chemical, is recycled to AsA by dehydroascorbate reductase (DHAR). Previously, DHAR cDNA was isolated from the hairy roots of the sesame plant, and DHAR-overexpressing transgenic potato plants were generated under the control of the CaMV35S promoter (CaMV35S::DHAR). An increase in transgene expression and ascorbate levels were observed in the transgenic plants. In the present study, proteomic analysis revealed that transgenic plants not only accumulated DHAR in their cells, but also induced several other antioxidant enzyme-related proteins during plant growth. These results suggest that DHAR is important for stress tolerance via induction of antioxidant proteins, and could improve stress tolerance in transgenic potato plants.

Keywords Potato, Dehydroascorbate reductase, Proteomics, Antioxidant enzyme, Ascorbate

E.-H. Han · S.-W. Lee (✉)
국립경남과학기술대학교 생명과학대학 농학·한약자원학부
(Department of Agronomy & Medicinal Plant Resources,
Gyeongnam National University of Science & Technology,
Jinju, Korea)
e-mail: shinwlee@gntech.ac.kr

Y.-M. Goo
경남한방약초연구원
(Gyeongnam Oriental Medicinal Herb Institute, Sancheong,
Gyeongnam-do, 666-831, Korea)

Y.-H. Kim (✉)
국립경상대학교 사범대학 생물교육과 (농업생명과학연구원)
(Department of Biology Education, College of Education, IALS,
Gyeongsang National University, Jinju, Korea)
e-mail: cefle@gnu.ac.kr

서론

급격한 산업화와 인구증가는 지구적인 규모의 환경재앙을 초래하고 있다. 산업혁명 이후 인류의 석탄, 석유 등 화석에너지의 과도한 사용은 대기 중 이산화탄소 등 온실가스 농도를 상상을 초월하는 속도로 증가시켜 지구온난화 등 환경문제를 초래하고 있다. 환경문제는 현재 전 세계적인 생물다양성 변화, 사막화 확산을 초래할 뿐 아니라 농업생산성에도 영향을 주어 세계적인 식량문제를 유발하고 있으며, 이를 극복하기 위한 조건불리지역에 적합한 재해내성 식량작물의 개발이 매우 시급한 시점이라 할 수 있다.

식물이 과도한 환경스트레스 조건에 노출되게 되면 체내 산소가 superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^\cdot) 등의 반응성이 높은 독성의 활성산소종 (reactive species, ROS)으로 변하게 된다. 다양한 환경스트레스에 의해 유발되는 활성산소종의 과다발생은 식물의 생산성을 감소시키는 주요 요인이 되고 있다. 이러한 과도한 활성산소종에 의해 유발되는 산화스트레스는 식물의 대표적 방어기구인 superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbic acid (AsA)와 glutathione (GSH)과 같은 저분자 항산화물질 등에 의해 효율적으로 제거된다 (Noctor and Foyer 1998; Asada 1999).

Dehydroascorbate reductase (DHAR)는 전자공여체로서 GSH를 이용하여 산화형 AsA인 dehydroascorbate (DHA)를 활성형인 환원형 AsA로 변환시키는 재활용 기작 과정에서 가장 핵심적인 역할을 하는 효소이다. 즉 DHA가 AsA로 환원되는 것은 활성산소종을 무독성화 하는데 필수적인 과정이며, DHAR은 이러한 환원형 AsA의 함량을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하는 효소이다(Kwon et al. 2001;

Shigeoka et al. 2002). 실제로 DHAR이 과발현된 형질전환 담배에서 환원형 AsA의 양이 증가하였고, 이로 인해 다양한 환경 스트레스에 대한 저항성 증가가 보고된 바 있다(Kwon et al. 2001; 2003). DHAR에 의해 조절 받는 대표적인 저분자 항산화물질인 AsA는 인간에게 중요한 각종 생리작용을 지닌 vitamin C로서 대부분의 공급을 식물에게 의존하고 있다. 식물의 체내에서 AsA는 활성산소종을 제거하는 항산화 활성뿐만 아니라, 엽록체의 틸라코이드 막에서의 zeaxanthine 생합성, vitamin E (alpha-tocopherol)의 환원 상태 유지 등의 다양한 생리활성 기능을 갖고 있다 (Conklin et al. 1996; 1997; Wheeler et al. 1998). 특히, AsA는 환경스트레스에 의해 유발되는 산화스트레스 동안 과도한 활성산소종의 제거를 수행하는 생체 방어물질로서 기능이 확인되어 다양한 연구가 진행된 바 있다(Conklin et al. 1996; Kwon et al. 2003). 그러므로, DHAR을 이용한 AsA의 생합성과 대사과정을 분자유종 방법으로 조절하면 스트레스 내성 및 AsA를 고함유한 유용물질 고함유 기능성 작물 개발에 활용 가능할 것으로 사료되어 많은 연구가 수행되어 왔다.

본 연구팀은 선행연구의 결과로서, 참깨의 모상근에서 분리한 DHAR 유전자를 이용하여 항시 발현하는 CaMV 35S 프로모터의 조절하에 과발현 시킨 형질전환 감자를 개발하였다(Goo et al. 2007). 형질전환 감자 식물체들은 비형질전환체 보다 증가된 DHAR 활성과 AsA 함량을 보인 바 있다. 본 연구에서는 단백질체 분석을 통해서 형질전환 감자 식물체에서 DHAR 과발현에 의해 조절되는 단백질들을 조사하였다.

재료 및 방법

식물재료

Dehydroascorbate reductase (DHAR) 과발현 형질전환 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. Jowon)는 참깨 모상근에서 분리된 DHAR 유전자(Chun et al. 2006; 2007)를 항시적으로 발현되는 CaMV35S 프로모터의 조절하에 위치하도록 제작한 재조합운반체(Fig. 1)를 이용하여 아그로박테리움 감

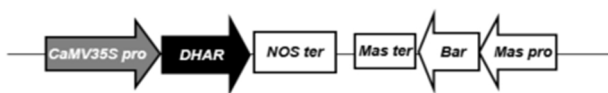


Fig. 1 Schematic representation of the expression vector used to create DHAR transgenic potato plants. CaMV 35S pro, cauliflower mosaic 35S promoter; DHAR, sesame dehydroascorbate reductase; NOS ter, nopaline synthase terminator; Mas pro, mannopine synthase promoter; Bar, phosphinothricin acetyltransferase coded by the bar gene; Mas ter, mannopine synthase terminator

염법으로 만든 식물체이다 (Goo et al. 2008). 동 식물체를 MS(Murashige and Skoog 1962) 배지에 sucrose 3%를 첨가하여 16시간의 광 조건에서 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ 의 형광 및 25°C 의 배양실 조건에서 배양 하여 유지하였다

단백질 추출 및 정량분석

단백질 추출 및 단백질체 분석은 경상대학교 공동실험실에 의뢰하여 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 기내 조건에서 약 1달 및 6개월간 배양한 감자 식물체의 잎 1 g의 시료조직을 채취하여 액체질소로 완전히 파쇄한 후 10 mL의 단백질 추출 buffer [0.5M Tris-HCl, pH 8.3, 2% NP-40, 20 mM MgCl_2 , 4% β -mercaptoethanol] (NP-40 buffer)를 첨가하여 균질화한 후 12,000 rpm으로 15분 동안 원심 분리 하여 상층액을 분리하였다(Kim et al. 2001). 추출된 수용성 단백질은 15%의 PEG (poly ethylene glycol)에 의한 분획화를 통해 상층액 분획을 acetone으로 침전시켜 회수한 후, 1차원 전기영동 buffer인 rehydration buffer에 용해시켰다(Lee et al. 2007). 단백질의 정량분석은 Lowry 방법을 이용하여 결정하였다(Lowry et al. 1951).

이차원전기영동(2-DE) 및 이미지 분석

Acetone으로 침전시켜 회수한 단백질을 reswelling buffer (8 M urea, 1% CHAPS, 0.5% IPG buffer pH 4-7, 20 mM DTT, BPB)에 용해시킨 후, IPG strip pH 5~8에 12시간동안 rehydration 시키면서 loading한 다음, IPGphor를 이용하여 47500 Vh로 등전점 전기영동을 실시하였다. 일차원 전기영동이 끝난 IPG strip은 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, and a trace of bromophenol blue)에서 평형시킨 후 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 이차원 전기영동이 끝난 gel의 silver 염색과 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통해 확인된 특이적인 단백질들은 gel에서 잘라내어 MALDI-TOF MS를 이용한 단백질 동정에 사용하였다(Blum et al. 1987; Neuhoft et al. 1988). 염색이 끝난 gel은 GS-800 densitometer scanner (Bio-Rad)로 scan한 뒤 전용 이미지 분석 프로그램인 PDQuest (Bio-Rad, Ver. 7.2)를 이용하여 비교 분석 하였다.

단백질 동정

형질전환체와 비형질전환체의 앞에서 차별적인 발현을 보인 단백질 spot들은 잘라내어 전처리 과정 후 trypsin으로 in-gel digestion하여 절단된 peptide를 추출하였다(Lee et al. 2007). 단백질 동정은 MALDI-TOF MS 방식인 VoyagerTM-DE STR을 사용해 분석하였고, Standard solution에 사용된 peptide는 Sigma에서 구입한 Bradykinin, Neurotensin을 이용하였

다. Database 검색은 Protein prospector (<http://prospector.ucsf.edu>)를 이용하였으며, 단백질 동정을 위한 아미노산 서열들의 데이터베이스는 NCBI 및 UniProt을 이용하였다.

결과 및 고찰

생육 시기에 따른 형질전환 식물체 잎의 단백질체 비교

기내에서 생산한 신선한 소 괴경(micro-tuber)을 MS배지에서 재배하여 얻은 신선한 싹초와 이를 6개월 기내에서 보존한(평균 1개월 주기로 계대배양) 형질전환 식물체와 대조구로 형질전환 하지 않은 식물체의 잎으로부터 단백질을 추출하였다. IEF의 pH 3~10 범위에서 예비로 단백질을 분석하였을 때에 주로 pH 5~8 범위에서 많은 단백질이 탐색되었기에, 해상도를 높이기 위해 pH 5~8 범위에서의 단백질체를 분리하여 약 500여종의 단백질을 관찰 하였다(Fig. 2). DHAR 형질전환 식물체의 싹초와 6개월 된 잎에서 다양한 단백질들의 변화를 확인할 수 있었

다. 형질전환 식물체의 싹초에서는 16종의 단백질의 발현 증가가 확인되었다. 이 들 중 이미지 분석을 통해 2배 이상의 차이를 보이는 단백질로는 Spot 6 (pI 5.86, Mw 20.7 KDa), spot 14, 15, 16 (pI 6.17, Mw 23.7 KDa), spot 17 (pI 8.07, Mw 33.8 KDa), spot 24 (pI 7.68, Mw 44.5 KDa)들이 관찰되었다(Fig. 2A). 또한 6개월 생육한 형질전환 식물체의 잎에서는 spot 6, 14, 15, 16이 싹초 시기와 마찬가지로 2배 이상의 발현 증가를 보였다(Fig. 2B).

동정된 단백질의 기능 분석

파종 후 한 달 생육한 식물체의 싹초와 6개월 키운 식물체의 잎에서 모두 2배 이상의 높은 발현 수준을 보인 단백질들은 DHAR 단백질들(spot 14, 15, 16) 과 phosphinothricin N-acetyltransferase (PAT) (spot 6)이다(Fig. 3 and Table 1). 형질전환 감자에서 증가된 3종의 DHAR 단백질들은 감자의 단백질 서열보다 도입된 참깨의 DHAR 단백질과 높은 상동성을 보였다. 그러므로, 형질전환 감자에서 감자 내부의 DHAR 단백질은 영향을 받지 않은 것으로 보인

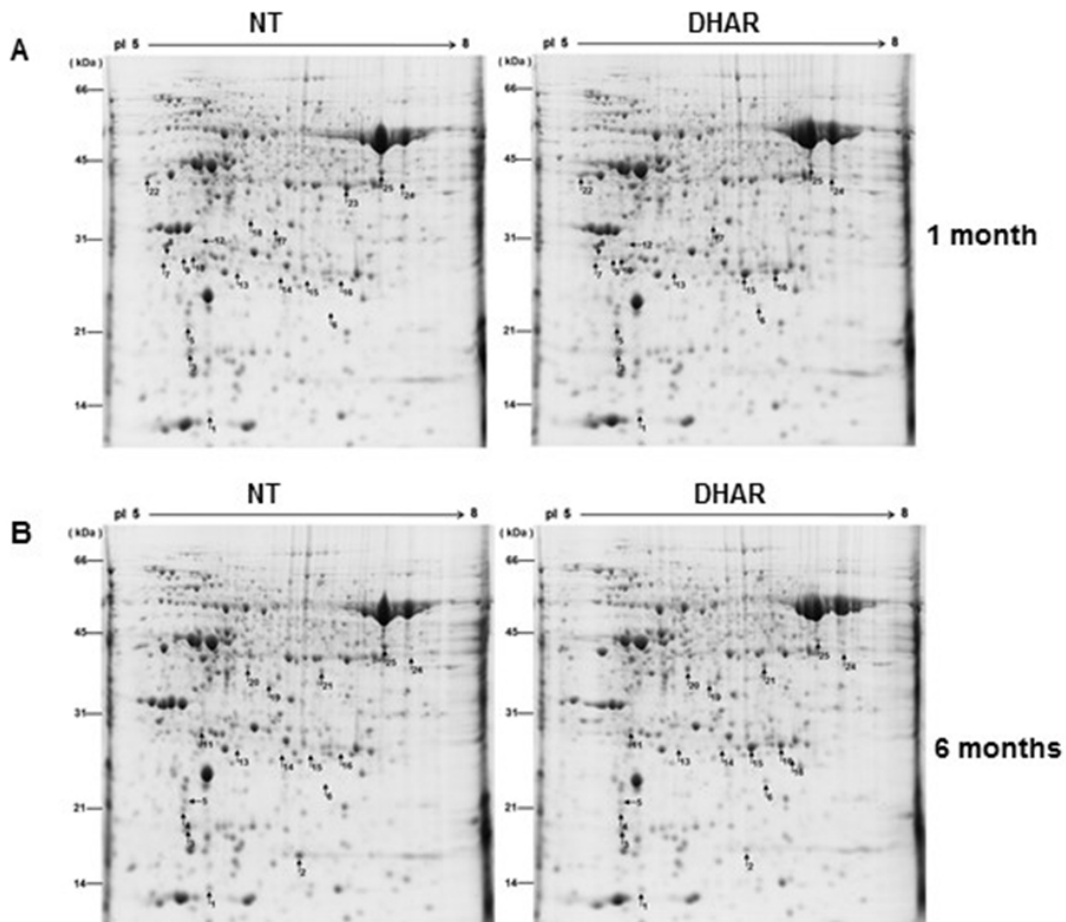


Fig. 2 Representative 2-DE images of total proteins extracted from non-transgenic (NT) and DHAR transgenic (DHAR) potato plants after cultivation for one month (A) and 6 months (B). The spot numbers indicate proteins that were increased or uniquely expressed in either NT or transgenic plants

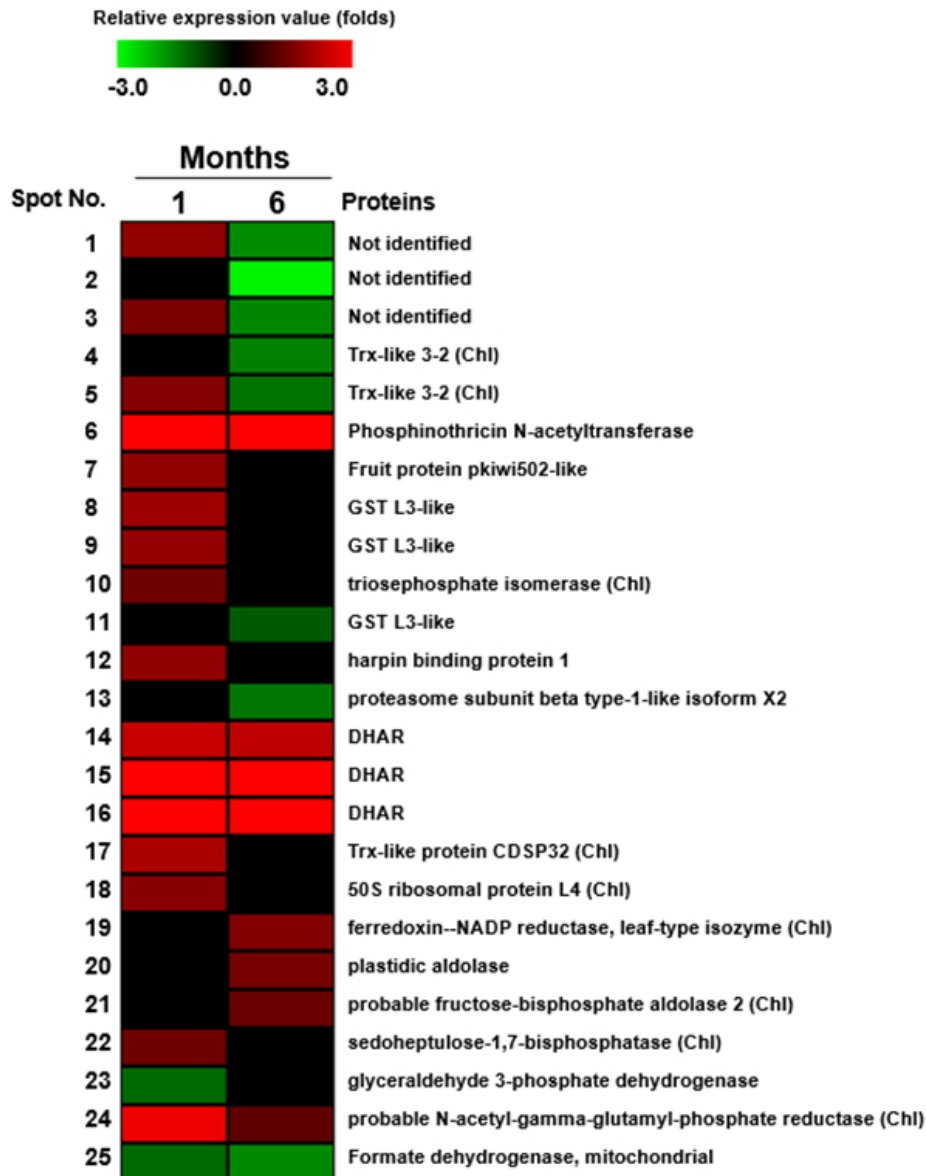


Fig. 3 Comparison of relative expression levels of identified proteins in the leaves of transgenic potato plants as compared with NT plants. The heat map, constructed using MULTIEXPERIMENT VIEWER VERSION 4.9 (MEV4.9), displays normalized translational levels of each protein in each sample

다. PAT는 *Streptomyces hygroscopicus* 유래의 단백질로 발현 시 제초제 글루포시네이트(glufosinate ammonium)에 내성을 나타내는 유전자이다(Wohlleben et al. 1988; Droge et al. 1992). 그러므로, DHAR 발현벡터에 포함되어 있는 형질전환체의 항생제/제초제 선발 마커로서 기능을 수행하기 위해 발현된 것으로 볼 수 있다.

형질전환 식물체의 신초 시기에 특이적으로 발현이 증가되었던 단백질들은 활성산소 제거와 관련된 항산화 방어기능을 수행하는 단백질들인 thioredoxin-like 3-2, chloroplastic-like (spot 4, 5), glutathione S-transferase L3-like (spot 8, 9, 11), thioredoxin-like protein CDSP32, chloroplastic-like (spot 17)이다(Fig. 3 and Table 1). 일반적으로 단백질의 thiol

(-SH)기는 효소, 전사인자, 막단백질을 포함한 많은 고분자구조의 기능에 필수적인 역할을 하며, -SH 기의 산화는 세포내의 산화제에 의해 발생된다(Wheeler et al. 2004). Thioredoxin (TRX)는 peroxiredoxin, methionine sulfoxide reductase, glutathione reductase 등의 항산화 방어기작에 관여하는 다양한 효소들에게 전자 공여체로서 기능함으로써 세포내 산화환원준위를 광범위하게 조절하는 기능을 가진 단백질이다(Gelhaye et al. 2005). Thiol 기를 갖는 대표적인 단백질인 TRX와 glutaredoxin (GRX)은 열에 안정한 작은 산화환원효소로서 진화적으로 안정하여 세포내의 산화환원의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 수행한다. TRX와 GRX는 또한 세포내에서 단백질의 접힘현상의 조절, 산화

Table 1 Identification of proteins showing differential expression in the DHAR transgenic potato plants

No	Protein	Organism	ID (NCBI/UniProt)	MW/pI	Score	PM	Peptide hit	SC (%)
1	Not indentified							
2	Not indentified							
3	Not indentified							
4	Thioredoxin-like 3-2, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006361675	21808/6.51	19	3	-	18
5	Thioredoxin-like 3-2, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006361675	21808/6.51	19	3	-	27
6	Phosphinothricin N-acetyltransferase	<i>Gossypiumhirsutum</i>	F4ZNF8	20709/5.86	123	11	1	68
7	Fruit protein pkiwi502-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006344204	32673/6.71	119	13	1	57
8	Glutathione S-transferase L3-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006339054	27251/5.16	75	9	-	43
9	Glutathione S-transferase L3-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006339054	27251/5.16	88	10	-	49
10	triosephosphate isomerase, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006359648	35046/6.89	180	15	2	53
11	Glutathione S-transferase L3-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006339054	27251/5.16	103	9	2	40
12	harpin binding protein 1	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006354466	30301/8.31	104	10	2	48
13	proteasome subunit beta type-1-like isoform X2	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006340659	24944/5.94	168	17	1	69
14	Dehydroascorbate reductase	<i>Sesamumindicum</i>	A0S5Z5	23731/6.17	92	8	1	54
15	Dehydroascorbate reductase	<i>Sesamumindicum</i>	A0S5Z5	23731/6.17	517	13	6	80
16	Dehydroascorbate reductase	<i>Sesamumindicum</i>	A0S5Z5	23731/6.17	406	13	4	83
17	thioredoxin-like protein CDSF32, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006342085	33822/8.07	59	12	-	30
18	50S ribosomal protein L4, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006348359	31852/6.88	78	13	-	41
19	ferredoxin--NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006340740	40717/8.37	115	21	-	47
20	plastidic aldolase	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006361998	43159/6.38	129	13	2	33
21	probable fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006340703	42948/8.14	133	16	2	40
22	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006355654	43145/6.07	96	14	-	35
23	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>Solanum tuberosum</i>	AAM92008	36795/6.34	228	14	2	43
24	probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase, chloroplastic-like	<i>Solanum tuberosum</i>	XP_006346471	44496/7.68	47	8	-	32
25	Formate dehydrogenase, mitochondrial	<i>Solanum tuberosum</i>	Q07511	42297/6.64	110	13	2	39

PM, number of peptides matched

SC, sequence coverage assessed by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF MS

적으로 손상된 단백질의 수선, 그리고 특히 DHAR 단백질의 대사와 관련된 기능인 DHA의 환원에도 연관되는 것으로 보고되고 있다(Meyer et al. 2008). 산화된 disulphide 형태의 TRX은 NADPH와 TRX reductase에 의해 직접 환원되며, GRX는 NADPH에 의해 주어진 전자를 사용하여 glutathione (GSH)에 의해 환원된다(Gelhaye et al. 2005). 특히 대표적인 활성산소인 H₂O₂는 특별한 cysteine 잔기에 직접 산화되어 H₂O₂와 같은 산화제가 매우 특수한 조절에

관여하고 cysteine을 경유한 redox 신호전달에 역할을 한다(Toledano et al. 2004). 식물의 glutathione S-transferase (GST)는 multigene families로 암호화 되어있는 다양한 종류의 GST isozymes을 가지고 있다. 그러나 이들 각각의 기능에 대해서는 아직까지 많이 밝혀져 있지 않다. 지금까지의 보고에 따르면 다양한 종류의 GST가 다양한 종류의 환경스트레스에 의해 유발되는 산화스트레스 조건에서 발현이 조절되는 것으로 보고되어 있다(Dixon et al. 1998).

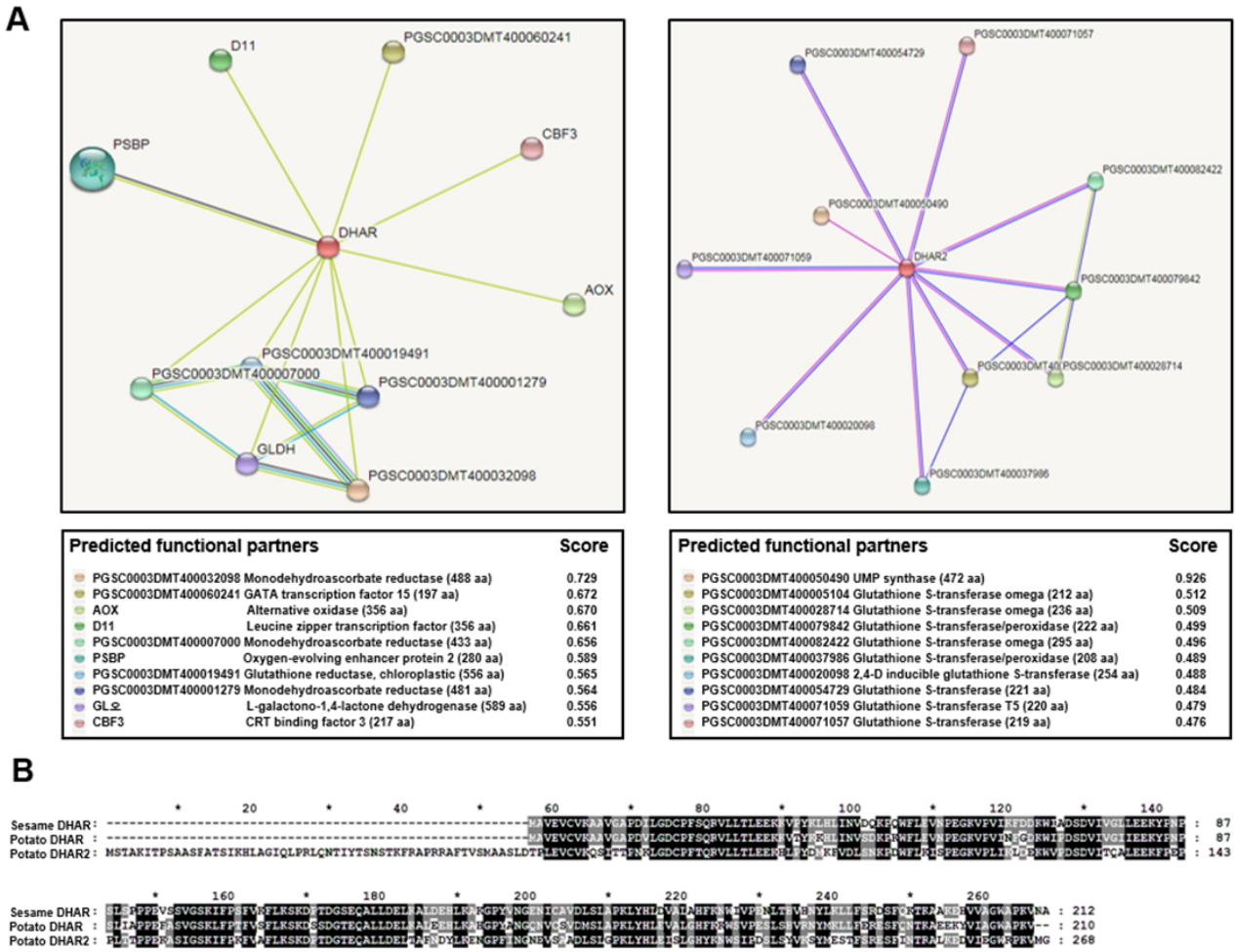


Fig. 4 Analysis of prediction of protein interactions (A) and amino acid sequence alignments (B) using two potato DHARs (DHAR, DQ191638; DHAR2, NM_001288124.1) and a sesame DHAR (DQ287974). The protein interaction data, assessed using STRING VERSION 10.0, displays the interaction levels for each protein. Sequence identities were determined using the NCBI BLAST search tool, and multiple sequence alignments were performed using the Clustal X and GeneDoc programs

유전체 분석이 완료된 애기장대에는 5종의 DHAR 유전자가 보고 되어있다(Mittler et al. 2004). 실제로 애기장대에서 DHAR들의 단백질-단백질 상호작용을 조사해보면 ascorbate 생합성과 관련된 monodehydroascorbate reductase (MDHAR) 과 본 연구결과와 일치하는 다양한 항산화 관련 단백질 들인 GST, GPX, APX 등이 DHAR과 상호작용함을 단백질 상호작용 예측 프로그램인 STRING (<http://string-db.org/>) 을 통해서 확인할 수 있다(데이터 미제시). 감자에서는 2 종류의 DHAR 단백질이 보고되어 있으며, 감자의 DHAR (DQ191638)은 MDHAR, 엽록체의 GR 및 저온관련 전사인자인 CBF (CRT binding factor)와 상호작용함을 예측할 수 있으며, DHAR2 (NM_001288124.1)는 9종의 다양한 GST 단백질과 상호작용함을 확인할 수 있다(Fig. 4A). 본 연구에 사용된 외래 유전자인 참깨에서 분리된 DHAR 단백질의 아미노산 서열을 이용해 보고된 감자 단백질들간의 상호작용을 조사해 보면, 감자의 DHAR (DQ191638)과 79%

의 아미노산의 유사도를 보이며, DHAR2 (NM_001288124.1) 과는 60%의 유사도를 보이기 때문에, DHAR (DQ191638) 과 유사하게 MDHAR, GR, CBF 등과의 상호작용을 추측할 수 있다(Fig. 4B). 그러므로, DHAR 형질전환 감자에서 활성산소 및 DHA의 대사를 조절하는 단백질들의 발현 증가는 매우 흥미로운 결과이며, 앞으로 단백질 상호작용을 통해 보다 명확한 방어 기작을 조사하는 것이 필요하다고 할 수 있다.

형질전환 식물체의 6개월 된 잎에서는 엽록체의 광합성 대사와 관련된 ferredoxin-NADP reductase, leaf-type isozyme, chloroplastic-like (spot 19), plastidic aldolase (spot 20), probable fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic-like (spot 21) 단백질들의 발현이 특이적으로 증가하였다(Fig. 3 and Table 1). Ferredoxin-NADP reductase는 광합성의 에너지 대사 과정에서 광계 1 단백질의 NADP를 NADPH로 환원 시키며, 에너지를 저장하는 기능을 수행 한다(Green et al. 1991).

엽록체의 Fructose-bis-phosphate aldolase는 CO₂ 동화 과정을 조절하는 효소로서 캘빈 회로에서 광합성으로 합성된 탄소가 전분과 설탕으로 생합성 하는 흐름을 조절하는 중요한 역할을 수행 한다(Stitt et al. 1987).

이상의 결과로부터 항산화효소인 DHAR 유전자가 도입된 형질전환 감자 식물체는 도입된 외래 유전자의 발현 수준이 단백질 수준에서 안정적으로 증가함을 확인 하였다. 또한 식물의 생육시기에 따라 초기 생육시에는 DHA 및 H₂O₂ 대사에 관련된 항산화 단백질들의 발현이 비형질 전환체와 비교하여 증가하였으며, 6개월 간의 생육시기를 거친 잎에서는 광합성 대사를 통한 탄소대사와 관련된 단백질들의 발현이 비형질전환체 보다 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 연구에 사용한 DHAR 유전자를 과발현 시킨 형질전환 감자는 최근 들어 심각하게 나빠지고 있는 환경조건에 대비하여 식물의 초기 생장 및 후기 생육이 비형질전환체 보다 높게 나타나는 높은 바이오매스 및 환경 적응력을 갖는 감자 품종의 개발을 기대할 수 있는 좋은 소재가 될 것으로 기대되는 바이다.

사 사

이 논문은 2015년도 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 연구되었음

적 요

아스코르빈산(ascorbic acid, AsA)는 강력한 항산화 물질 및 환원제로서 식물에서 산화형 AsA인 dehydroascorbate (DHA)를 활성형인 환원형 AsA로 변환시키는 효소인 dehydroascorbate reductase (DHAR)에 의해 생성된다. 선행 연구의 결과로서, 본 연구팀은 참깨의 모상근에서 분리한 DHAR 유전자를 이용하여 항시 발현하는 CaMV 35S 프로모터와 괴경 특이적으로 발현하는 patatin 프로모터의 조절하에 과발현 시킨 형질전환 감자를 개발하였다. 형질전환 감자 식물체들은 비형질전환체 보다 증가된 DHAR 활성과 AsA 함량을 보인 바 있다. 본 연구에서는 단백질체 분석을 통해서 형질전환 감자 식물체에서 DHAR 과발현에 의해 조절되는 단백질들을 조사하였다. 단백질체 분석의 결과로서, 형질전환 감자에서 도입된 DHAR 단백질과 다양한 항산화 관련 단백질들이 식물 생장시기 동안 증가 하였다. 본 연구의 결과로서, 도입된 유전자인 DHAR이 항산화 단백질들의 발현 증가를 통해 형질전환 식물체의 스트레스 내성 기작을 향상 시킬 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:601-639
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99
- Chun JA, Seo JY, Han MO, Lee JW, Yi YB, Park GY, Lee SW, Bae SC, Cho KJ, Chung CH (2006) Comparative expression and characterization of dehydroascorbate reductase cDNA from transformed sesame hairy roots using real-time RT-PCR. *J Plant Biol* 49:507-512
- Chun JA, Lee WH, Han MO, Lee JW, Yi YB, Goo YM, Lee SW, Bae SC, Cho KJ, Chung CH (2007) Molecular and biochemical characterizations of dehydroascorbate reductase from sesame (*Sesamum indicum* L.) hairy root cultures. *J Agric Food Chem* 55:6067-6073
- Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnov N (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient arabidopsis mutant vtc1. *Plant Physiol* 115:1277-1285
- Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbate-deficient arabidopsis mutant. *Proc Natl Acad USA* 93:9970-9974
- Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1998) Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1:258-266
- Droge W, Broer I, Puhler A (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187:142-151
- Gelhay E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. *Cell Mol Life Sci* 62:24-35
- Goo YM, Chun HJ, Kim TW, Lee CH, Ahn MJ, Bae SC, Cho KJ, Chun JA, Chung CH, Lee SW (2008) Expressional characterization of dehydroascorbate reductase cDNA in transgenic potato plants. *J Plant Biol* 51:35-41
- Green LS, Yee BC, Buchanan BB, Kamide K, Sanada Y, Wada K (1991) Ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase from photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of tomato. *Plant Physiol* 96:1207-1213
- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY (2001) Two-dimensional electrophoresis analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22: 2103-2109
- Kwon SY, Ahn YO, Lee HS, Kwak SS (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 YB, Kwak SS (2003) Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol* 160:347-353
- Lee DG, Ahsan N, Lee SH, Kang KY, Bahk JD, Lee IJ, Lee BH (2007) A proteomic approach in analyzing heat-responsive

- proteins in rice leaves. *Proteomics* 7:3369-3383
- Lowry OH, Rosebrough JN, Farr AI, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta* 1783: 589-600
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem FV (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trend Plant Sci* 9: 490-498
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-97
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels include isoelectric focusing gels with clear background at nonogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249-279
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyakawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J Exp Bot* 53:1305-1319
- Stitt M, Gerhardt R, Wilke I, Hddt HW (1987) The contribution of fructose 2,6-bisphosphate to the regulation of sucrose synthesis during photosynthesis. *Physiol Plant* 69:377-386
- Toledano MB, Delaunay A, Monceau L, Tacnet F (2004) Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem Sci* 29:351-357
- Wheeler GL, Grant CM (2004) Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Plant* 120:12-20
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393:365-369
- Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Punier A (1988) Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70:25-37