

광독립영양세포를 이용한 광합성 제어에 관한 연구

곽 상 수

한국과학기술연구원 유전공학센터

서론

식물세포 배양기술은 식물세포 공학 뿐아니라 식물유전자공학의 근간기술로서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 또 이러한 기술을 통해 배양되는 식물세포는 식물이 가지고있는 생산기능을 생화학적, 분자생물학적인 연구 및 식물육종과 유용물질생산 연구의 재료로서도 매우 중요하다. 그러나 식물세포 배양시에 생육에 필수불가결한 탄소원인 당을 외부로 부터 배지에 첨가하여야 하므로 식물대사의 가장 중요한 염록체의 분화가 억제되어 염록체가 가지고 있는 광합성 기능에 대한 해석이 어려워 광합성 기능개발의 목적으로 식물배양세포를 이용한 예는 거의 없다. 최근 배양세포집단이 나타내는 변이를 이용하여 세포선발을 통해 탄소원인 당뿐만 아니라 호르몬이 전혀 포함되지 않는 배양조건에서도 광독립영양적으로 생육하는 배양세포를 여러 연구그룹에 의해 선발되고 확립되어왔다. 이러한 광독립영양세포(photoautotrophic cultured cells: PA세포)는 구조적, 기능적인 면에서 엽육세포와 똑같다고 할 수 없지만 매우 발달한 염록체를 가지고 있어 제어된 환경하에서 광합성 기능에 관한 해석을 가능하게 하였다(Nishida et al., 1980; Sato et al., 1988a,b; Taketa et al., 1989).

식물의 광합성 전자전달계(photosynthetic electron transport: PET)는 기존 제초제의 과반수가 이 부위에 작용하고 있을 뿐아니라 식물생리학상으로도 흥미깊은 연구영역이다. 최근 이 분야의 연구의 진전은 현저하며 특히 광합성계 II (photosystem II)에 대해서는 분자생물학적 접근에 의해 전자전달계를 구성하고있는 단백질의 기능과 구조가 검토될 수 있는 단계에까지 도달하고있다. 예를 들면 DCMU와 atrazine 등의 기존 제초제는 Figure 1에서 나타내는 QA와 QB 양부위 사이에 존재하는 32 KD 단백질(D-1 단백질, QB 단백질으로도 불리움)에 작용하는 것이 증명되어 있으며 이 단백질의 구성아미노산 배열도 이미 해명되어있다(Zurawski et al., 1982; Hirschberg and McIntosh, 1983; Goloubinoff et al., 1984; Kleier et al., 1987). 또한 atrazine 등에 대한 내성변이주의

연구로부터 32 KD 단백질의 일부 아미노산이 유전적인 변화로 억제 감수성의 영향을 받는다는 것이 밝혀져 있다(Hirschberg et al., 1984; Erickson et al., 1985; Trebst, 1986). 이상의 근거로부터 32 KD 단백질에 대해 특이적으로 억제효과를 나타내는 새로운 화합물을 개발하는 것은 제초제 등의 실용적인 면뿐만 아니라 식물생리학적인 측면에서도 대단히 의미가 있는 것으로 생각되어진다.

이와 관련하여 PET 억제형 제초제를 포함한 각종 식물생장 조절제의 검색은 주로 제1차적으로 포장실험을 통해 이루어지고 있어 많은 비용과 시간을 필요로 하는 등 어려움이 많다. 뿐만아니라 포장에서의 실험평가로는 식물의 고사 정도 이외에 생화학적인 데이터를 얻기가 어렵다 하겠다. 의학분야의 억제개발은 일차적으로 *in vitro*에서 수행하고 있는 것과는 대조적이라 하겠다. PET 억제제의 검정에는 추출한 thylakoid 막을 사용하여 Hill반응 억제활성으로 새로운 화합물에 대한 분자설계(molecular design)가 가능하겠으나 식물체를 사용한 실험결과와는 상관성이 일반적으로 낮기 때문에 실용적인 검정시스템으로는 신뢰성이 낮다(Yoshida et al., 1990). 이러한 관점에서 볼때 *in vitro*와 *in vivo*의 장점을 동시에 이용할수 있을 것으로 생각되어 지는 배양세포 특히 PA세포를 사용하여 각종 억제에 대한 반응을 조사하여 제초제 작용 검색시스템으로서의 유용성에 대해 검토 하였으며 아울러 광합성 억제형 제초제 저항성 세포주의 선발 및 이 분야에 대한 분자생물학적인 최근의 연구를 소개하고자 한다(Kwak et al., 1989; Sato et al., 1988a, 1990).

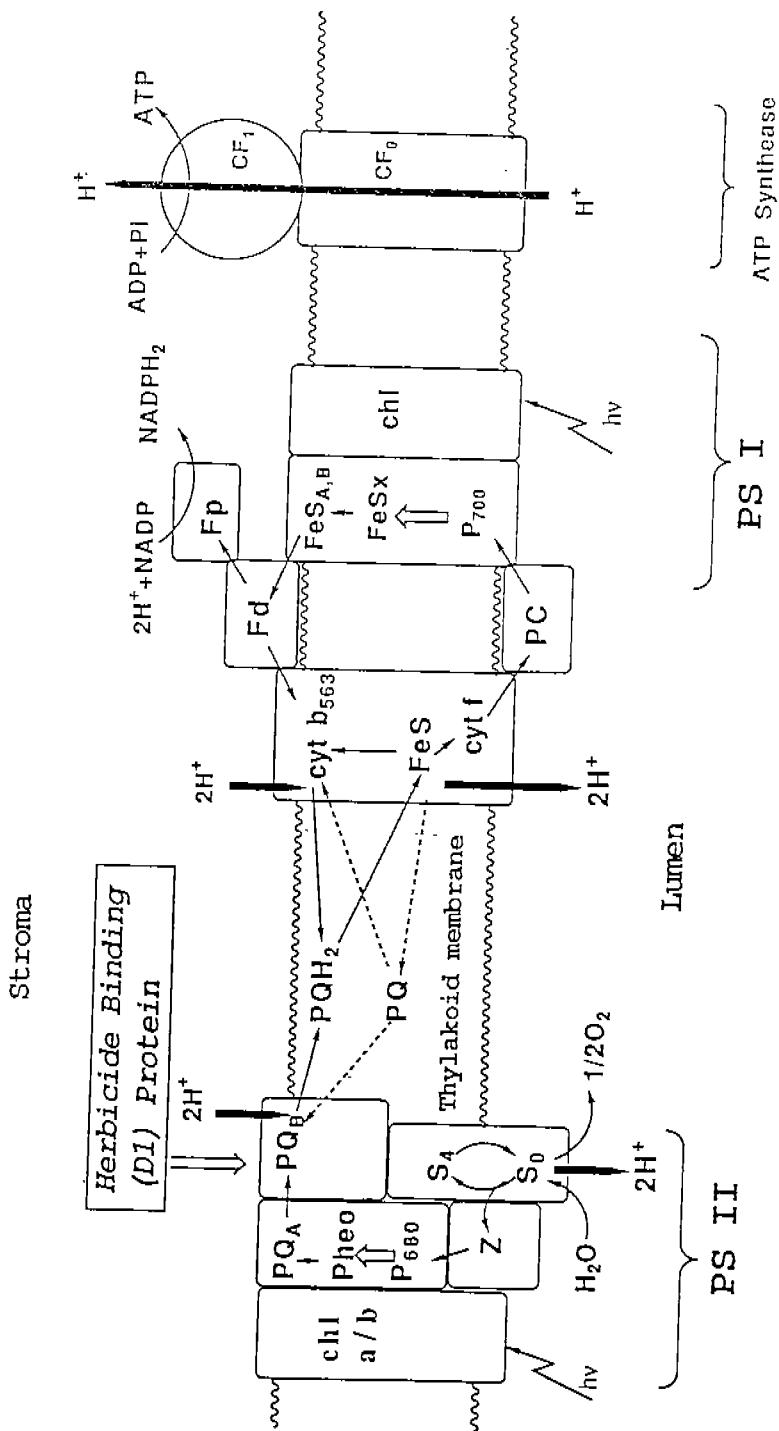


Fig. 1. Photosynthetic electron transport (PET) system.

본 론

1. 광독립영양세포주의 확립

일반적으로 식물세포 배양시에 당을 배지중에 첨가하여 암조건하에서 배양하는 경우가 많다. 이러한 백색의 종속영양세포(heterotrophic cells: H세포)를 광조건하에서 당농도를 감소시킨 배지에서 배양해도 녹색화하지 않는 세포가 많다. 따라서 식물체와 같이 광합성만으로도 생육하는 세포를 얻기 위해서는 배양조건을 적정화하는 것과 세포선발을 통해 엽록체분화를 하는 세포주를 확립할 필요가 있다. 그러나 세포선발을 행하거나 배양조건을 여러 가지로 변경하여도 전혀 녹색화 하지않는 세포도 많다. 이와같이 탈분화에 의한 엽록체분화 억제가 유전적인 변이에 의한 것이 아니라고 하는 것은 백색의 세포로부터도 녹색이고 광합성만에 의해 생육하는 세포가 출현하는 것과 녹색의 식물체가 재분화하는 것 등으로 알 수있다. 그러나 밀, 보리의 약배양으로부터 재분화한 알비노식물체(albino type)에서는 엽록체 유전자의 결손이 일어난 것으로 보고되고 있어 유전적변이가 엽록체의 기능분화를 억제하고 있지 않다고는 단정할 수 없을 것 같다.

현시점에서 모든 식물로부터 PA세포를 확립하는 조건은 없으며 지금까지 광독립영양적으로 배양이 가능하다고 보고된 것은 *Amaranthus cruentus*(Chunhe et al., 1988), *Asparagus officinalis*(Peel, 1982), *Chenopodium rubrum*(Husemann and Barz, 1977), *Cytisus scoparius*(Yamada and Sato, 1978), *Datura innoxia*(Chunhe et al., 1988), *Digitalis purpurea*(Hagimori et al., 1984), *Glycine max*(Horn et al., 1983), *Gossypium hirsutum*(Blair et al., 1988), *Hyoscyamus niger*(Yasuda et al., 1980), *Marchantia polymorpha*(Ohta et al., 1977), *Nicotiana tabacum*(Yamada and Sato, 1978), *Spinachia oleracea*(Dalton, 1980), *Solanum tuberosum*(La Rosa et al., 1984) 등과 같은 식물이다. 벼를 포함한 화곡류에 있어서는 조직분화의 초기단계를 제외하고는

배양세포의 녹색화는 곤란하다. 단자엽식물로 부터 PA세포가 얻어진 아스파라가스는 단자엽으로서도 예외라고 생각되어지는 경우라 할 수 있겠다(Peel, 1982). 벼와 대두의 융합세포를 배양하여 출현하는 녹색 배양세포의 엽록체는 대두의 엽록체인 것으로 보고되어 있다. 배양세포에서는 화곡류 엽록체의 분화가 강하게 억제되는 기구가 작용하고 있다고 여겨진다. 배지조건도 중요한 인자이며 또한 장기간 배양한 백색세포는 광조건에서 배양해도 거의가 녹화하지 않는 경우가 많다.

따라서 PA세포의 확립에는 어떤 방법에 의하든 선발이 필요하다. 육안선발로도 용이하지만 광합성능력이 낮은 세포만을 배제할 수는 없다. 광독립영양세포주확립을 위한 방법은 크게 두가지로 나눌 수 있다. 제1의 방법은 먼저 캘러스를 유도한 후 엽록체가 잘 분화되어 있다고 생각되는 녹색이 짙은 캘러스를 선발하여 광독립영양조건에서 선발하는 방법이다. 제2의 방법은 식물엽 절편을 광독립영양배양 조건에서 배양하여 직접 광독립영양세포를 선발하는 방법이다. PA세포의 배양은 액체, 한천배양의 어느 조건에서도 광독립영양배양을 행할 수 있다. 광독립영양배양 조건에서 필요한 것은 충분한 광조도(8,000~10,000 lux)와 CO₂ 부화(1~5%)이다. 경우에 따라서는 산소분압을 낮추는 것도 필요하다. 상세한 PA세포의 유도, 선발 및 배양에 대해서는 보고되어 있는 문헌들을 참고하면 좋겠다(Yamada and Sato, 1983; Husemann, 1984; Sato, 1986).

2. 광독립영양세포(PA세포)를 이용한 PET 억제제의 검색

식물배양세포는 미생물과 같이 스크리닝이 가능한 시스템이지만 일반적으로 발달한 엽록체를 가지고 있지 않기 때문에 광합성 기능을 억제하는 검색시스템으로는 이용될 수 없다. 이 점에 있어서 PA세포는 광합성 기능개발에 좋은 실험재료라고 생각할 수 있겠다.

1) 작용메카니즘이 다른 각종 제초제에 대한 PA세포의 반응

Sato등(1987)은 기존의 작용메카니즘이 다른 각종 제초제를 사용하여 담배(*N. tabacum*)의 광독립영양세포(PA세포), 광혼용영양세포(photomixotrophic

cells: PM세포), 종속영양세포(H세포) 및 유식물에 미치는 영향을 조사하였던 결과, Table 1 에서와 같이 각 배양세포별로 각 제초제에 대한 반응성이 다르다는 것을 나타내었다. 그리고 지금까지 배양세포에서는 저해효과의 검토가 어려웠던 광합성 억제형(Atrazine, Diuron, Propanil) 또는 광관여형 제초제(Paraquat, Nitrofen)도 PA세포 또는 PM세포를 이용하면 제초작용을 검색할 수 있다는 가능성을 시사하였다. 또한 PA세포, PM세포와 H세포의 감수성(pI_{50})의 비를 계산하므로써 각 약제의 작용메카니즘을 어느 정도 추측할 수 있을 것이다. 즉 광합성 억제형 또는 광관여형 제초제의 경우는 H세포의 I_{50} /PA세포의 I_{50} 는 60~10,000으로 높은 수치를 나타내었는데 비해 광을 필요로 하지 않는 제초제는 1~5 정도의 낮은 수치를 나타내었다. 특히 PA세포가 제초제의 반 이상을 접하는 광합성 억제형 제초제에 대해 높은 반응성을 나타낸 것은 제초제의 검색뿐만아니라 제초제 저항성 세포주의 선발 및 제초제 이외의 식물생장 조절물질의 검색시스템, 나아가서는 광합성 기능의 분석재료로서 유용할 것으로 생각된다.

Table 1. Effects of herbicides on the growth of photoautotrophically(PA), photomixotrophically (PM), and heterotrophically (H) cultured cells and seedlings (S) of tobacco.

Herbicide	$I_{50}^* (\mu M)$				$I_{50}(H) / I_{50}(PA)$
	PA	PM	H	S	
Atrazine	0.1	0.5	100	0.1	1000
Diuron	0.02	1.0	200	0.03	10000
Propanil	0.1	20	100	1.0	1000
Paraquat	0.07	2.0	20	0.4	300
Nitrofen	0.5	0.5	30	1.0	60
Diphenami	200	300	200	300<	1
Dinoseb	0.2	2.0	0.6	0.3	3
2,4-D	2.0	10	10	5.0	5
Glyphosat	200	500	700	50	3.5
NaClO ₃	600***	6***	9***	3***	0.15
DTP	3.0	40	20	10	6.7
Bialaphos	0.2	0.5	0.6	1.0	3

* I_{50} : The concentration in which half of the growth of cells were inhibited by the addition of herbicides tested.

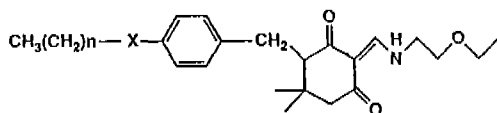
*** mM

2) PA세포를 이용한 신속하고도 간편한 약제 검정시스템의 개발

Kwak등(1989)은 새로이 합성한 cyclohexanedione 유도체인 수십 종의 신형 광합성전자전달(PET) 억제제를 가지고 담배의 PM, PA세포 및 우산이끼 (*Marchantia polymorpha*)의 PA세포에 대한 반응을 조사하여 신속, 간편하면서 전 식물체의 활성을 반영하는 검정시스템을 개발하였다(Kwak et al., 1989; Sato et al., 1990). 이들 화합물들은 기존의 보고된 방법에 의해 일본 이화학 연구소의 Yoshida박사 그룹에 의해 합성되었다(Asami et al., 1986, 1988). 또한 실험에 사용된 PA세포들은 일본 경도대학의 Yamada교수 그룹에 의해 선발된 것으로 그들과 공동연구로 실험을 수행하였다. 담배의 배양세포는 LS기본배지에 두배의 비타민과 NAA 10 μ M, Kinetin 1 μ M을 첨가한 액체배지에서, 우산이끼의 배양세포는 M51과 B5의 수정 기본배지에 casamino acid(1 g/L), glutamine (0.3 g/L), 2,4-D (1 ppm)을 첨가한 액체배지에서 배양했다. PA세포는 당 무첨가배지를 사용하여 1~2%로 부하된 CO₂ 농도에서, PM세포는 sucrose 3%을 첨가한 대기조건에서 5,000 lux 조명하에 100 rpm으로 진탕하였다. 담배의 PA, PM세포는 각 농도의 각종 화합물을 포함한 배지에 배양세포를 일정량 치상한 후 2주일 후의 chlorophyll 함량을 측정하여 억제활성을 구하였으며 우산이끼 PA세포에 대해서는 산소전극법을 사용하여 각 화합물의 활성을 측정하였다. 각 화합물의 녹색배양세포에 대한 활성은 Hill반응, cress seedling 실험, pot 실험을 하여 비교하였다. 화합물의 PET 저해활성은 DCIP을 지표로 한 Hill반응으로 측정하였다. Cress seedling 실험은 균일하게 발아한 cress에 각 농도의 화합물을 첨가하여 1주일후에 잎에 대한 저해작용을, pot 실험은 8종의 문제잡초에 대해 경엽 처리(50g/a)로서 저해작용을 조사하였다.

Table 2는 cyclohexanedione 유도체의 lipophilic part의 alkyl기의 길이에 대한 효과를 나타낸 것으로 모든화합물(1~12)에서 강한 PET저해(Hill반응 저해)를 보였는데 활성의 최대치는 6~8개의 methyl기였다. 그러나 PA세포, cress seedling 및 전 식물체에 대한 활성은 methyl기가 6개 이상 부터는 활성이 현저하게 낮아졌다. Alkyl기의 증가는 화합물의 억제부위인 thylakoid 막까지의 화합물의 침투를 방해하는 것으로 사료된다. 한편 PM세포에 대해서는

Table 2. Effects of cyclohexane derivatives(compound 1-12) on Hill reaction, the growth of PM and PA cultured cells, seedlings and whole plants.



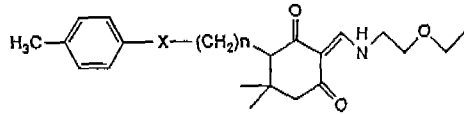
Compounds	X	n	Tobacco			Liverwort	Cress	Pet test (% ^b)
			Hill reaction (pI ₅₀ ^a)	PM cells (pI ₅₀)	PA cells (pI ₅₀)	PA cells (pI ₅₀)	seedlings (pI ₅₀)	
1		2	6.7	6.0	4.7	5.1	4.1	40
2		4	7.8	5.3	4.2	4.8	3.6	20
3		6	8.4	5.3	4.5	3.7	4.3	5
4		8	8.2	5.1	4.0	<3	3.7	5
5		10	7.3	5.4	<4	<3	<3	5
6		12	6.3	5.7	<4	<3	<3	8
7	O	1	6.0	5.4	4.7	4.9	4.5	51
8	OO	3	7.1	5.6	4.8	5.1	4.7	33
9	OO	5	7.7	5.3	4.4	4.8	3.9	15
10	OO	7	8.1	5.0	4.0	<3	3.3	0
11	OO	9	7.9	5.0	<4	<3	<3	0
12	O	11	7.2	5.6	<4	<3	<3	0
DCMU			7.3	6.5	6.4	6.4	5.2	100

^apI₅₀ indicates negative logarithms of log mole concentration required for 50% inhibition.

^b100 means complete inhibition at the level of 50g ai/a.

alkyl기의 증가와 관계없이 거의 비슷한 활성을 보였다. Table 3의 경우는 모든 화합물(13~24)에서 강한 PET 억제활성 뿐아니라 전 식물체에 대해서도 비교적 높은 제초활성을 나타내었다. Alkyl기의 증가에 대한 각 검정시스템의 변화는 앞의 결과(Table 2)와 비슷한 경향을 보였으며 적절한 분자크기의 lipophilic part를 가진 화합물(14, 15, 19~21)에서 PA세포 및 전 식물체에 대해 강한 활성을 보였다. Table 4에서는 벤젠환의 구조치환의 효과를 본 것으로 메타치환체인 화합물 26을 제외한 모든 화합물에서 PA세포와 전 식물체에서 높은 살초효과를 나타내었다. 여기에서는 PA세포에 대한 활성은 Hill반응과 전 식물체의 활성과 좋은 상관을 보였다. 조사한 cyclohexanedione 유도체 중에서 화합물 14,

Table 3. Effects of cyclohexane derivatives (compounds 13-24) on Hill reaction, the growth of PM and PA cultured cells, seedlings and whole plants.

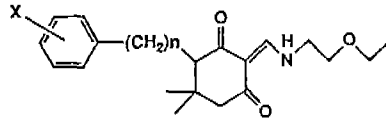


Compounds	X	n	Hill reaction (pl_{50}^a)	Tobacco		Liverwort	Cress	Pot test (% ^b)
				PM cells (pl_{50})	PA cells (pl_{50})	PA cells (pl_{50})	seedlings (pl_{50})	
13		2	6.2	5.3	4.5	5.2	3.7	73
14		3	7.8	6.3	5.4	6.1	4.8	90
15		4	7.2	5.4	4.9	5.0	4.4	88
16		5	7.6	5.2	4.0	4.8	4.0	84
17		7	7.9	5.3	4.1	3.5	3.5	83
18		9	7.4	5.3	<4	<3	<3	43
19	○	2	7.1	6.0	4.9	5.7	4.3	96
20	○	3	7.1	6.5	6.1	5.7	4.4	95
21	○	4	7.3	6.2	5.7	5.3	4.1	93
22	○	6	7.8	6.0	4.6	4.6	3.8	70
23	○	8	7.7	5.8	4.4	<3	3.2	45
24	○	10	7.3	6.0	<4	<3	<3	33

19~21과 29~31 들은 대표적인 PET 억제제인 DCMU와 거의 같은 활성을 보여 새로운 PET 억제형 약제로서의 가능성을 시사하였다.

측정한 cyclohexanedione 유도체에 대한 PA세포의 pl_{50} 는 전 식물체를 사용한 *in vivo* 활성의 결과와 높은 상관관계($r = 0.75$)를 보여, 새로운 PET 억제제의 검색을 위해 PA세포는 좋은 재료가 될수있음을 나타내었다. 본 실험에서 PET 억제제의 검정재료로서 담배와 우산이끼의 PA세포를 사용하였다. 담배 PA세포의 경우는 약제처리 2주후 세포의 성장량(chlorophyll)을 측정하는 것으로 비교적 실험계가 단순하나 결과를 얻기에는 시간을 요하는 단점이 있다. 한편 우산이끼의 PA세포는 담배 PA세포에 비해 생장이 빠를 뿐아니라 세포가 균일하고 chlorophyll 함량이 높아 산소전극(oxygen electrode)을 사용하여 PET 억제활성을 신속하게 측정할 수 있었다(Kwak et al., 1989). 우산이끼의 PA세포를 사용

Table 4. Effects of cyclohexane derivatives (compounds 25-32) on Hill reaction, the growth of PM and PA cultured cells, seedlings and whole plants.



Compounds	X	n	Hill reaction (pI ₅₀ ^a)	Tobacco		Liverwort PA cells (pI ₅₀)	Cress seedlings (pI ₅₀)	Pot test (% ^b)
				PM cells (pI ₅₀)	PA cells (pI ₅₀)			
25	H	1	5.2	5.2	4.5	4.6	4.1	38
26	2-CH ₃	1	4.7	5.2	<4	4.1	3.9	0
27	3-CH ₃	1	5.2	5.3	4.6	4.6	4.0	68
28	4-CH ₃	1	6.0	5.6	4.7	5.0	3.8	74
29	4-Cl	1	6.7	6.2	5.7	5.4	3.9	94
30	3,4-Cl ₂	1	7.3	6.8	5.9	5.4	4.4	98
31	4-Br	1	6.9	6.4	5.3	5.5	4.0	99
32	H	2	5.8	5.6	5.7	4.9	3.5	80

한 산소전극에 의한 결과와 담배 PA세포의 성장저해에 의한 결과는 높은 상관관계($r = 0.81$)를 보여 고등식물인 담배와 하등식물인 우산이끼의 세포막에 대한 약제침투성의 성질은 유사함을 나타내었다(Sato et al., 1990). 이상의 결과로서 광합성 능력이 높고 균일한 현탁세포인 우산이끼를 이용함으로써 제초활성을 반영하는 신속하고도 간편한 약제검정법을 개발할 수 있었다.

3. 녹색배양세포로부터 atrazine 저항성 세포주의 선발과 특성

이상의 결과는 PA세포가 시험관내에서 광합성 억제형 제초제에 대한 저항성 세포주를 선발하는데 적합한 세포인 것을 시사하는 것이다. 경도대학의 Sato 등은 처음에는 PA세포를 사용하여 약제의 저항성 세포주 선발을 하였지만 약제에 대한 감수성이 높은 탓인지 저항성 세포주를 얻을 수 없었다. 한편, PA세포 다음으로 광합성 억제형 제초제에 대해 감수성이 높았던 광혼용영양세포(PM세

포)를 사용하였을 때 atrazine 저항성의 세포를 선발할 수 있었다. 즉 atrazine 100 μM 을 포함한 배지에서 10개월간 녹색세포를 인위적으로 선발하여 배양을 되풀이한 결과 비교적 균일한 녹색을 나타내는 세포를 얻었다(Sato et al., 1988). 선발된 세포는 당 무첨가배지(atrazine 농도, 1 μM)에서 배양하여도 견전한 녹색을 계속 나타내어 atrazine 저항성 세포주로 간주하였다. 이 세포의 atrazine 저항성은 추출한 엽록체를 사용한 Hill반응 저해실험으로도 확인된 것으로 선발한 세포에 있어서 저항성의 증가는 이 세포에 있어서 atrazine의 흡수 저하와 해독에 의한 요인이 아니고 atrazine의 표적단백질인 D-1 단백질의 변화에 의한 저항성 부여라는 것이 시사되었다.

D-1 단백질은 엽록체 유전자(*psbA*)에 코드되어 있으며 그 중 264번째의 아미노산 serine이 glycine으로 변화되어 atrazine 저항성을 나타낸다는 것은 약제의 연용사용으로 인해 자연발생된 수종의 atrazine 저항성 잡초의 연구로부터 잘 알려져 있다. 그래서 새로이 획득된 저항성 세포에 있어서 저항성의 메커니즘을 밝히기 위한 목적으로 *psbA* 유전자의 염기배열을 결정하였다. 그 결과 Figure 2에서와 같이 저항성 세포주에서는 *psbA* 유전자의 791번째의 염기 guanine(G)가 cytosine(C)으로 변화되어 있어 264번째의 아미노산 serine이 threonine으로 변화된 것임이 밝혀졌다(Shigematsu et al., 1989a). 이 변화는 sequence한 12개의 클론 전부에서 인정되어 저항성 세포주에서는 엽록체 유전자의 거의 100%가 threonine으로 변화된 것으로 여겨진다. 약 1년간의 비교적 단시간을 통해 변이된 하나의 유전자가 세포집단 전체에 확산되기 위해서는 급격한 유전자의 증폭이 필요하다고 생각되어진다.

한편 serine으로 부터 threonine으로의 치환은 지금까지 발견되지 않은 변화이다. 지금까지 atrazine계로 대표되는 triazine계 제초제의 D-1 단백질의 결합은 광합성세균의 광합성반응중심의 X선 해석으로부터 종래의 변이(Gly264 변이)에서는 264번째 serine의 수산기가 없어짐으로써 atrazine이 D-1 단백질에 결합할 수 없게 되어 저항성을 나타낸다고 설명되어져 왔다(Trebst, 1987). 한편 이번에 녹색배양세포로부터 선발된 Thr264변이에서는 수산기는 264번째 아미노산에 남아있어 지금까지의 설명으로서는 해석할 수 없는 것이었다. 또한 선발

된 Thr264변이는 종래의 atrazine 저항성 세포에는 없는 새로운 기능을 가지고 있다. 즉, 종래의 atrazine 저항성 세포(Gly264)에서는 diuron(DCMU)로 대표되는 phenylurea계 광합성 억제제에 대해서는 거의 저항성을 나타내지 않았는데 비해 Thr264변이를 나타내는 열록체에서는 diuron에 대해서도 비교적 강한 저항성(40배)을 나타내었다. 한편 신형 PET 억제제인 cyclohexanedione 유도체를 사용하여 선발한 Thr264변이체에 대한 반응을 조사하였던 바, atrazine과 DCMU의 중간적인 반응을 보여 사용한 신형 PET 억제제는 atrazine과 DCMU의 작용메카니즘과 유사함을 시사하였다(Kwak et al., 1990). 이러한 결과는 264번째의 serine이 제조제의 결합부위로서 매우 중요한 것을 나타냄과 동시에 종래 제작되어온 serine의 수산기의 제거 이외에도 264번째 아미노산 잔기부근의 입체적인 구조변화에 의해서도 저항성을 부여하는 것을 시사하는 것이다(Shigematsu et al., 1989b). 같은 264번째의 serine의 변이이면서 glycine과 threonine의 치환으로 서로 다른 기능을 나타내는 광화학계 II의 반응중심 단백질 D-1의 기능을 연구하는데 있어서 종래에 인위적으로 확립이 어려웠던 열록체변이주를 선발할 수 있었던 것은 광합성 기능을 *in vitro*에서 연구할 수 있는 가능성을 나타낸 것으로 기대되어진다.

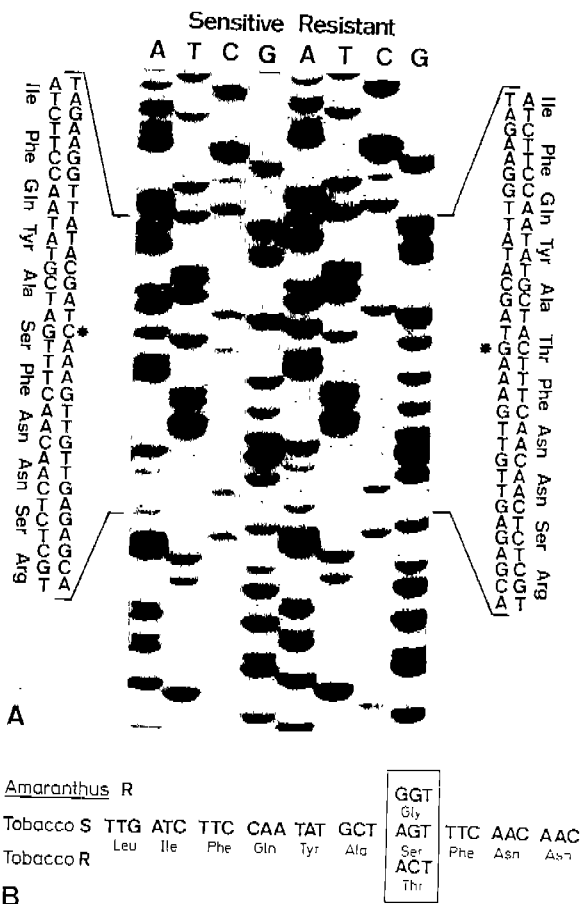


Fig. 2. A. Nucleotide sequencing gels for portions of the *psbA* gene. A mutated residue is indicated by an asterisk.
 B. Nucleotide and derived amino acid sequence from that the part of the chloroplast *psbA* gene of atrazine-resistant(R) and sensitive(S) tobacco cells in which a sequence difference occurred. The sequence for the atrazine-resistant *Amaranthus hybridus* plant is shown as *Amaranthus R*.

결 론

최근 급격한 속도로 진보를 계속하고 있는 세포공학, 유전자공학에 의한 식물의 육종은 큰 변화를 나타내고 있어 지금까지 불가능했던 방향성있는 육종이 현재 가능하게되고 있는 경우가 많다. 그러나 세포공학, 유전자공학의 분야에 있어서 엽록체의 기능을 조작하려는 연구는 미개척 분야로서 남아있다고 하겠다. 이것은 엽록체가 독자의 유전자를 가진 반자립적 세포내 기관인 것과 동시에 그 기능 발현이 배양세포에서 억제되어 세포수준에서의 선발이 어려웠기 때문이라 여겨진다.

이러한 관점에서 본 논문에서 논의한 광합성만으로 생육하는 광독립영양세포는 엽록체의 기능개발에 좋은 재료라고 생각되어진다. 특히 우산이끼로부터 선발한 광합성 능력이 높고 균일한 PA세포의 경우는 산소전극으로 화합물의 활성을 직접 측정할 수 있어 *in vivo*의 활성을 반영하는 새로운 광합성 억제형 약제의 개발을 위한 신속하고도 간편한 검정시스템으로서 유용한 재료로 이용될 수 있을 것이다. 담배의 녹색배양세포로부터 triazine계와 phenylurea계 제초제에 교차저항성을 나타낸 새로운 Thr264 변이체는 같은 D-1 단백질중의 264번째 serine의 변이이면서도 기존의 Gly264 변이체와 다른 기능을 나타내어 광화학계 II의 반응중심 단백질인 D-1 단백질의 기능해석에 새로운 실마리가 되어 급후 얻어진 변이주는 이상적인 약제의 개발과 작물의 육종에 새롭게 응용될 것으로 기대되어진다.

참고 문헌

- Asami, T., N. Takahashi and S. Yoshida. 1986. Conjugated enamino compounds, a new molecular probe for the mechanism of photosynthetic electron transport. *Z. Naturforsch.* 41c:751-757.
- Asami, T., H. Koike, Y. Inoue, N. Takahashi and S. Yoshida. 1988. Structure-activity relationships and physiological aspects of new photosynthetic electron transport inhibitors, 3-alkylaminoalkyliden-2H-pyran-2,4(3H)-diones(APs). *Z. Naturforsch.* 43c:857-861.
- Blair, L. C., C. J. Chastain and J. K. Widholm. 1988. Initiation and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) photoautotrophic cell suspension culture. *Plant Cell Reports.* 7:266-269.
- Chunhe, Xu., L. C. Blair, S. M. D. Rogers, Govindjee and J. M. Widholm. 1988. Characteristics of five new photoautotrophic suspension cultures including two *Amaranthus* species and a cotton strain growing on ambient CO₂ levels. *Plant Physiology.* 88:1297-1302.
- Dalton, C. C. 1980. Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: Photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *J. of Experimental Botany.* 31:791-804.
- Erickson, J. M., M. Rahire, J. D. Rochaix and L. Mets. 1985. Herbicide resistance and cross-resistance: changes at three distinct sites in the herbicide binding protein. *Science.* 228:204-207.
- Goloubinoff, P., M. Edelman and R. B. Hallick. 1984. Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: psbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucleic Acid Res.* 12:9489-9496.

- Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Mikami. 1984. Photoautotrophic culture of undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. *Plant and Cell Physiology*. 25:1099-1102.
- Horn, M. E., J. H. Sherrard and J. M. Widholm. 1983. Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. I. Establishment of photoautotrophic cultures. *Plant Physiol*. 72:426-429.
- Hirschberg, J. and L. MacIntosh. 1983. Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science*. 222:1346-1349.
- Hirschberg, J., A. Bleecker, D. J. Kyle, L. MacIntosh and C. J. Arntzen. 1984. The molecular basis of triazine herbicide resistance in higher-plant chloroplasts. *Z Naturforsch*. 39c:412-420.
- Husemann, W. and W. Barz. 1977. Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physio. Plant*. 40:77-81.
- Husemann, W. 1984. Photoautotrophic cell cultures. In "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants," Vol. 1. (ed. by I. K. Vasil), p.182-198. Academic Press, Inc.
- Kleier, D. A., T. A. Andrea, J. K. J. Hegedus, G. M. Gardner and B. Cohen. 1987. The topology of the 32 kDa herbicide binding protein of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch*. 42c:733-738.
- Kwak, S. S., K. Ichinose, M. Kishida, S. Yoshida, N. Takahashi, F. Sato and Y. Yamada. 1989. A simple and rapid screening method for herbicidal photosynthetic electron transport inhibitors using liverwort photosynthetic cultured cells. Proceedings II of the 12th Asian-Pacific weed science society conference. pp. 581-586.

- Kwak, S. S., K. Ichinose, N. Takahashi, S. Yoshida, H. Koike and Y. Inoue. 1990. Modes of binding of new PS II inhibitors by analyses of herbicide-resistant mutants and thermoluminescence. *Z. Naturforschung*. (in press).
- La Rosa, P. C., P. M. Hasegawa and R. A. Bressan. 1984. Photoautotrophic potato cells: Transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiol. Plant.* 61:279-286.
- Nishida, K., F. Sato and Y. Yamada. 1980. Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant and Cell Physiology.* 21:47-55.
- Ohta, Y., K. Katoh and K. Miyake. 1977. Establishment and growth characteristics of a cell suspension culture of *Marchantia polymorpha* L. with high chlorophyll content. *Planta.* 136:229-232.
- Peel, E. 1982. Photoautotrophic growth of suspension cultures of *Asparagus officinalis* L. cells in turbidostats. *Plant Science Letters.* 24:147-155.
- Sato, F. 1986. Photoautotrophism in cultured plant cells. 植物組織培養(일본). 3(2):63-70.
- Sato, F., S. Takeda and Y. Yamada. 1987. A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. *Plant Cell Reports.* 6:401-404.
- Sato, F., Y. Shigematsu and Y. Yamada. 1988a. Selection of an atrazine-resistant tobacco cell line having a mutant psbA gene. *Mol. Gen. Genet.* 214:358-360.

- Sato, F., N. Koizumi and Y. Yamada. 1988b. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase of photo-mixotrophically cultured green tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 29:329-337.
- Sato, F., Y. Yamada, S. S. Kwak, K. Ichinose, M. Kishida, N. Takahashi and S. Yoshida. 1990. Responses of photoautotrophic cultured cells to various photosynthetic inhibitors. *Z. Naturforschung.* (in press).
- Shigematsu, Y., F. Sato and Y. Yamada. 1989a. The mechanism of herbicide resistance in tobacco cells with a new mutation in the QB protein. *Plant Physiology.* 89:986-992.
- Shigematsu, Y., F. Sato and Y. Yamada. 1989b. A binding model for phenylurea herbicides based on analysis of a Thr264 mutation in the D-1 protein of tobacco. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 35:33-41.
- Taketa, S., F. Sato and Y. Yamada. 1989. Photosynthetic characteristics of photoautotrophically cultured cells of tobacco. *Plant Cell Physiol.* 30:885-891.
- Trebst, A. 1986. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane. *Z. Naturforsch.* 41c:240-245.
- Trebst, A. 1987. The three dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction center polypeptides of photosystem II. *Z. Naturforsch.* 42c:742-750.
- Yamada, Y. and F. Sato. 1978. The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant and Cell Physiology.* 19(4):691-699.
- Yamada, Y. and F. Sato. 1983. Selection for photoautotrophic cells. In "Handbook of Plant Cell Culture," Vol. 1. (ed. by Evans, D. E., et al.), p. 489-500, Macmillan Publishing Co., New York.

- Yasuda, T., T. Hashimoto, F. Sato and Y. Yamada. 1980. An efficient method of selecting photoautotrophic cells from cultured heterogeneous cells. *Plant and Cell Physiology*. 21:929-932.
- Yoshida, S., S. S. Kwak and N. Takahashi. 1990. Biorational approaches in herbicide screenings for economic weed control. Proceedings of the 12th acian-pacific weed science society conference, Vol 3. (in press).
- Zurawski, G., H. J. Bohnert, P. R. Whitfeld and W. Bottomley. 1982. Nucleotide sequence of the gene for the Mr 32,000 thylakoid membrane protein from *Spinacia oleracea* and *Nicotiana debneyi* predicts a totally conserved primary translation product of Mr 38,950. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79:7699-7703.