

## Superoxide의 세포내 축적과 벼냉해의 발현

김종평·현 일·정 진

서울대학교 농과대학 농화학과  
(1987년 10월 27일 수리)

### Postchilling Accumulation of Superoxide in Cells and Chilling Injury in Rice Plant

Jong-Pyung Kim, Il Hyun and Jin Jung

Department of Agricultural Chemistry Seoul National University, Suwon, Korea

#### Abstract

The  $O_2^-$  level of the extract from young rice leaves, which was cold treated for 2 days and then placed at room temperature for a period of time significantly higher than that from tissues untreated.  $O_2^-$  level in leaves was practically unchanged during cold treatment for 48 hours. But it started to increase to arrive at maximum in 8 hours, once the plants were placed under room temperature. The abnormal production of  $O_2^-$  in mitochondria during postchilling process was interpreted as a biochemical consequence of accumulation of glycolysis product(s) in cytosol and/or NADH in mitochondrial matrix due to disruption of catabolic balance at low temperature. Mitochondria isolated from the chilling injured tissue was found to have lost considerably their respiratory activity. This fact may imply the involvement of intramitochondrial accumulation of  $O_2^-$  in the inactivation of electron transport chain system. The observation that mitochondria in the presence of the  $O_2^-$ -producing enzymatic system (Xanthine/Xanthine oxidase) lost their respiratory activity supports this inference. It was also found in this work that Superoxide dismutase (SOD) is a substrate inducible enzyme, and that SOD is a possible protective agent in plant cell against chilling injury.

#### 서 론

본연구실에서는 벼품종별 저온민감도와 미토콘드리아막의 상전이온도간에 성립되는 밀접한 상관관계를 확인한 바 있다.<sup>1,2,3,4)</sup> 그런데 미토콘드리아막이 그 생화학적 활성에 異常이 일어나는 고체교질상(solid gel phase)의 상태에 있다고 해서 그 자체가 곧 냉해발현의 직접적인 요인이 아니라 추정할만한 현상이 관찰되었다.<sup>5)</sup> 즉 유묘기의 벼를 미토콘드리아막의 상전이온도 이하의 저온(~5°C)에 일주일이상 두어도 외관상의 냉해증상이

나타나지 않았으나 2일간 저온처리한 유묘를 상온으로 환원시키면 하루이내에 전형적인 냉해증상이 발현되었다. 아울러 저온처리된 유묘를 상온에 환원시킬때 어두운 곳에 두는 것보다는 밝은 곳에 두는 것이(그리고 밝을 수록) 냉해발현을 촉진시킨다는 사실도 함께 관찰하였다.

이러한 관찰사실로부터 유추할 수 있는 것은 냉해기작의 초기과정으로서의 미토콘드리아막의 상전이는 냉해발현의 近因의 요인이 아니라 세포구성물질들에 심한 파괴적 반응을 일으키는 어떤 화학적 인자를 유도하는 遠因의 요인이며, 이 화학적 인자는 고체교질상을 얼마동안 경험하였던 막

이 액체결정상(liquid crystal phase)으로 환원된 다음에 유도되고, 미토콘드리아막이 고체고결상으로 있을때 그 화학적 인자가 후에 상온에서 유도될수 있는 세포내적 생화학적 상황이 갖추어진다는 가정이다.

따라서 저자들이 추구하려는 것은 병해발현의 직접적 原因이 되는 화학적 인자가 무엇인가, 그리고 그것이 유 될 수 있었던 세포내적 상황이 어떤 것이며, 그 유도기작은 어떤 것인가 하는 의문에 대답을 찾으려는 것이다. 본연구는 이러한 작업의 첫번째 단계로서 상기한 화학적 인자를 규명하기 위해 수행되었다.

**재료 및 방법**

**시료 및 시약**

내병성이 약한 품종인 '태백벼'를 20~28°C의 상온하에서 3열기까지 실내재배하여 그 유묘를 시료로 사용하였다. 무기 및 유기시약은 EP 내지 GR grade의 Hawana, Wako, Junsei, 및 Katayama 사들의 제품이었고 생화학적 시약과 재료는 Sigma사 제품이였다. 이들은 정제없이 사용하였다. 다만 cytochrome C만은 K-ferricyanide로 산화시켜 Sephadex G-25 column으로 분리한 다음 냉동건조시켜 사용하였다.

**방 법**

조직추출액중 Superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 분석 유묘의 상부조직을 절취하여 gr당 차가운 5mM KCN 10ml을 첨가하여 grinding하고 cheese cloth로 짜낸 다음 원심분리(22,000g×5분)하여 그 상등액을 즉시 O<sub>2</sub>분석에 사용하였다. KCN의 첨가는 superoxide dismutase(SOD)를 불활성화하기 위해서 였다.<sup>6,7)</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 분석은 NBT(nitroblue tetrazolium) 또는 ferricytochrome C를 사용하여<sup>8)</sup> NBT+2O<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>→NBTH<sub>2</sub>+2O<sub>2</sub>반응 또는 Cyt. C (Fe<sup>+++</sup>)+O<sub>2</sub><sup>-</sup>→Cyt. C (Fe<sup>++</sup>)+O<sub>2</sub>반응에 수반되는 530nm에서의 흡수도(NBTH<sub>2</sub>의 경우) 또는 550nm에서의 흡수도(Cyt. C(Fe<sup>++</sup>))의 증가를 이용하였다. 반응제의 조성과 혼합순서는 0.1mM NBT(또는 0.05mM ferricyt. C) 0.5ml, 조직추출액 0.3ml(이단계에서 vortex mixing), 및 증류수 1.2ml이다.

조직추출액중 SOD의 활성측정 유묘의 상부조직을 앞에서와 같이 grinding하고 짜낸 다음 원심분리(18,000g×15분)하여 추출액을 얻었다. (물론

KCN은 첨가하지 않았다) 이 조직추출액 0.1ml에 NBT(0.4mM) 0.5ml, 증류수 1.4ml 및 전기분해 방법으로 만든<sup>9)</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup>용액(0.03mM) 30μl을 첨가(vortex mixing)한 다음 NBT환원량을 530nm에서 측정하고, 다시 상기 반응제의 조성에서 조직추출액 대신에 grinding medium(50mM K-PO<sub>4</sub>, 0.1mM Na-EDTA, pH 7.8)을 0.1ml첨가한 혼합용액의 NBT환원량을 측정하여, 두 측정치의 차이로부터 추출액중 SOD의 활성(상대적 활성)을 구하였다. 이 방법론적 근거는 SOD에 의한 2O<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>→<sup>SOD</sup>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+O<sub>2</sub>의 반응때문에 NBT+2O<sub>2</sub><sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>→NBTH<sub>2</sub>+2O<sub>2</sub>의 반응에 소요되는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 소모되므로 SOD의 활성이 클수록 그 만큼 NBT환원량이 줄어 진다는 데에 있다.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>에 의한 미토콘드리아 호흡활성의 비가역적 저해의 확인 Xanthine/Xanthine oxidase를 사용하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup>가 발생되는 용액조건<sup>10)</sup>하에 submitochondrial particies (SMP)를 분산시켜 일정시간 방치한 다음 SMP의 호흡활성을 측정하였다. 즉 SMP 분산액(4.5mg protein/ml) 5ml에 Xanthine oxidase (0.8 unit/mg protein/ml) 100μl를 가하고 SMP분산매질(0.2M mannitol, 10mM KCl, 5mM Mg Cl<sub>2</sub>, 10mM K-PO<sub>4</sub>, pH 7.2)에 녹인 0.5mM xanthine을 2ml~6ml을 첨가한 후 10mM K-PO<sub>4</sub> buffer (pH 7.8)로 최종부피 11ml로 맞추었다. 이것을 25°C에서 3시간 세워둔 다음 이중 2ml을 취해서 20mM NADH 0.1ml과 섞은 후 SMP의 호흡활성을 측정하였다.

벼유묘로부터 SMP의 분리 및 호흡활성 측정의 과정은 전보<sup>11,10)</sup>와 같다.

SMP의 호흡중에 발생하는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 분석 SMP분산액(4.5mg protein/ml) 2ml에 NADH(1.3mM~26mM) 0.1ml과 0.4mM NBT 0.5ml을 첨가하고 공기와 접촉한 채 두시간동안 방치한 다음 NBT환원량을 역시 530nm 흡수도 증가로서 측정하였다.

**결과 및 고찰**

다음과 같은 몇가지 이유에서 저자들은 병해발현의 직접적인 原因이 되는 화학적인자의 강력한 후보로서 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 세포내축적을 상정하였다. 첫째, O<sub>2</sub><sup>-</sup>는 미토콘드리아 전자전달계에서 side reaction의 산물로서 생성된다. 그런데 세포대사가 동적평형을 잃게되면 정상적인 전자전달반응(호흡)인 main reaction과 실질적으로 경쟁상태

에 놓일수 있다. 둘째,  $O_2^-$ 는 식물체내에서 광역학적 작용(photodynamic action)의 한 과정을 통해 빛에 의해 유도되는 물질이다.<sup>11)</sup> 저온처리된 유묘가 상온에서 냉해증상을 나타낼 때 광의 존재가 그 증상의 발현을 촉진시켰다는 사실은 광에 의해 유도된  $O_2^-$ 가 세포대사의 균형과파괴에 의해 생성되었으리라고 추정되는  $O_2^-$ 에 첨가되어 그 전체적인 수준을 더욱 상승시켰을 가능성이 높다. 셋째,  $O_2^-$ 는 강한 환원력을 보유함과 동시에 산화제이기도 하며 아울러 radical이기 때문에 radical이 始發하는 반응(radical initiated reaction)을 일으킬 수 있어서 세포구성물질들에 대해 강한 파괴력을 갖고 있다.<sup>12, 13, 14)</sup>

저온처리에 따른  $O_2^-$  축적기작의 가정적 제안 미토콘드리아와 세포질을 중심으로 한 탄수화물대사과정의 모델을 보면서(Fig. 1)  $O_2^-$  생성의 가능성 있는 기작을 검토하기로 한다.

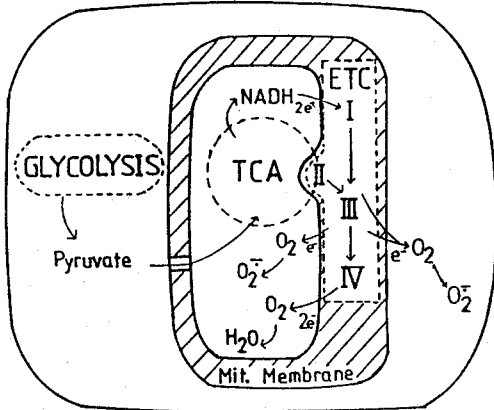


Fig. 1. Schematic diagram of  $O_2^-$  production in electron transport system of mitochondria

미토콘드리아의 호흡계는 염록체의 광합성계와 함께  $O_2^-$  생성의 주된 장소로 알려져 있다.<sup>15, 16, 17)</sup>

세포질에서 일어나는 해당반응의 산물(pyruvate)은 막을 투과하여 미토콘드리아내부로 들어가 TCA cycle의 연료가 된다. 이때 succinate 및 NADH의 형태로 수집된 전자(약 80%는 NADH의 형태)는 전자전달계(complexes I → III → IV 및 II → III → IV)를 거쳐 최종적으로 산소에 전달되어 물이 생성되는 4전자반응에 참여한다( $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$ ). 그러나 이 main reaction과 더불어 일부의 전자는 몇개의 지점에서, 즉 complex I (NADH dehydrogenase), complex II(succinate dehydrogenase) 및 complex III(UQ-Cyt. C reductase)에 1전자반

응의 side reaction에 참여하여  $O_2^-$ 를 생성하게 된다( $O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^-$ )<sup>15, 17)</sup>

세포대사가 정상적인 작동상태에 있을 때에는 해당반응, TCA cycle, 및 전자전달반응(호흡)이 동적평형을 이루고 있어서 부반응에 의한  $O_2^-$  생성은 상대적으로 미미할 것이며 따라서  $O_2^-$ 의 세포내 수준은 생체방어시스템(이를테면  $\alpha$ -tocopherol과 같은 antioxidant나 SOD와 같은 antioxygenic enzyme)이 대처할 수 있는 정도에 머무를 것이다.

그러나 미토콘드리아 막이 고체교질상으로 바뀌면 대사의 균형이 파괴될수 있는 몇가지 일들이 일어날 수 있다. 먼저 막의 물질투과기능에 이상이 생겨 해당반응의 산물이 세포질속에 축적되는 것을 생각해 볼 수 있다. 다음은 막의 물질투과능력에 변화가 없었다고 하더라도 막결합효소인 succinate dehydrogenase(SDH)의 활성이 상전이에 의해 저해받기 때문에<sup>11)</sup> 결과적으로 TCA cycle이 저해받으므로써 해당반응의 산물이 미토콘드리아내에도 축적될 수도 있다. 또 다른 가능성은 SDH에 의해 일어나는 succinate → fumarate의 반응이 TCA cycle의 속도결정단계(rate limiting step)가 아니라면 SDH의 저해가 TCA의 효율저하의 원인이 되지 않을 수도 있으므로 NADH는 정상적으로 생성될 것이다. 그러나 전자전달계(호흡계)가 이미 저해를 받았으므로<sup>2, 3, 4)</sup> NADH가 제대로 소모되지 못하고 미토콘드리아내에 축적되어 있을지도 모른다.

다시 저온하에 있던 세포를 상온으로 환원시키면, 막의 투과기능이 정상으로 회복되고(막기능의 이상이 일어났다고 볼때), TCA cycle이 회복되고(SDH의 반응이 속도결정단계라고 가정할 때), 전자전달계의 활성이 회복될 것이다. 그러면 세포질내지 미토콘드리아 matrix에 축적되어 있던 다량의 전자공여기질(pyruvate 또는 NADH)로부터 전자전달계가 단위시간당 정상적 경로를 통해서(main reaction을 통해서) 처리할 수 있는 수준이상의 전자가 밀려들게 될 것이다(호흡을 통해 일어나는 전자전달반응 속도는 적정수준이상의 기질농도와는 무관하게 일정한 것으로 알려져 있다<sup>18)</sup>). 이때 전자전달계는 상당한 양의 전자를 side reaction을 통해 소모시킬 것이며, 따라서 이때 생성된 다량의  $O_2^-$ 는 미토콘드리아막 내외로 퍼져나가게 될 것이다.

가정의 입증을 위한 자료의 수집

상기한 바와 같이 제안한 가정을 입증하기 위해

서는 여러가지 조합으로 온도처리된 식물체내에  $O_2^-$ 수준이 어떻게 변하는지 알아내야 하고, 과잉공급된전자공여기질에 의해 미토콘드리아에서  $O_2^-$ 생성이 증가되는지 조사하여야 되며, 저온처리중의 식물체내에 해당반응생성물 또는 NADH가 축적되는지 확인하여야 할 것이다. 본 보고서는 현시점에서 수집된 입증자료를 정리한 것이다.

자료의 수집에 있어서 가장 먼저 해결해야 할 것은 식물체내  $O_2^-$  수준을 검정할 수 있는 방법을 찾는 일이다. 일단은 식물체로부터 추출해내어야 할 터인데 불안정한 radical인  $O_2^-$ 를 정량적으로 추출할 수 있겠는가 하는 점 때문이다. free ion상태의  $O_2^-$ 는  $H^+$  존재하에서 쉽게 dismutation을 일으켜 ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) 소멸되기 때문이다. 그러나 유기염 형태의  $O_2^-$ 는 어느정도 안정성이 있으므로 세포내에서 어떤 미지의 유기양이온과 염형태로 존재하고 있을 가능성이 있고, 만약 그렇다면 조직추출액 중에도 측정 가능한 농도의  $O_2^-$ 가 존재할 지도 모른다. 물론 추출과정에  $O_2^-$ 의 생성과 소멸의 평형이 깨지므로 측정되는  $O_2^-$ 의 양은 세포내에서의 절대량 그 자체는 아닐 것이나, 최소한 그에 비례하는 상대적인 양일수는 있다. 추출도중에  $O_2^-$ 의 소멸을 최소화하기 위하여  $4^\circ C$ 이하의 저온에서 가능한 한 짧은 시간(7분)에 끝마쳤다. 추출시 무엇보다도 중요한 일은 SOD에 의한  $O_2^-$ 의 dismutation을 막아주는 일이었다. 따라서 조직의 grinding 과정에 SOD에 대한 inhibitor로 알려진 KCN을 첨가함으로써 이를 어느정도 막았다. Fig. 2는  $O_2^-$ 추출시 KCN을 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우에 추출액에 의한 ferricyt. C의 환원 정도에 현저한 차이가 있음을 적절히 보여준다.

KCN을 첨가하는 경우에도 추출후 저온에서 20분이 경과되면 ferricyt. C의 환원량이 반으로 줄었고 2시간 후에는 완전히 환원력을 상실하였다. NBT도 ferricyt. C와 유사한 환원반응을 보였으며 KCN이 첨가된 추출액이 NBT에 대해 시간의 경과에 따라 환원력을 잃는 양상은 ferricyt. C를 사용할 때와 같았다.

조직추출액이 ferricyt. C 및 NBT를 빠르게 환원시킨다는 점, SOD를 불활성화 시키지 않는 조건에서는 환원력이 없다는 점, 추출액중 환원력이 원인이 되는 물질이 상당히 불안정하다는 점 등은 이미 알려진  $O_2^-$ (또는 그 염)의 성질과 대단히 유사한 것으로 미루어보아, 전술한 바와 같은 몇가지 주의 사항을 지키며 얻은 조직추출액에는 측정

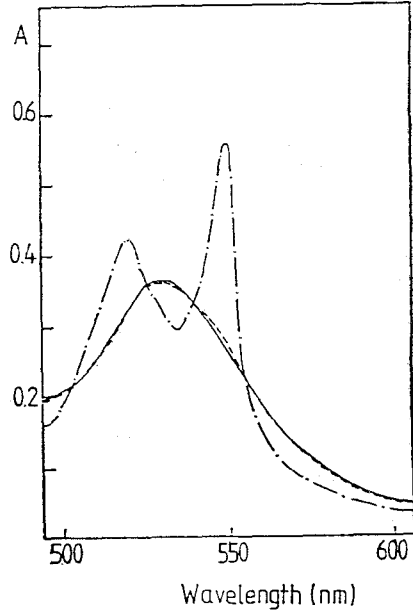


Fig. 2. Absorption spectra of cyt. c reduced by the fresh extracts of rice leaves in the presence(---) and in the absence(---) of KCN. Absorptionspectrum of oxidized form of cyt. c(—) is presented as a reference.

가능한 농도의  $O_2^-$ 가 함유되어 있다고 결론지었다.

세포내에서 해당반응이 활발하게 진행되고 있는 상태에서는 그렇지 않은 경우에 비해 전자전달계에 호흡기질이 보다 높은 수준으로 공급될 것이다 따라서  $O_2^-$ 의 생성수준도 상대적으로 높아질 것이다(이것은  $O_2^-$  축적기작에 대한 기본가정이 옳다는 전제하에서 성립되는 논리이다). 이것을 확인하기 위하여 배유로부터 양분공급을 원활하게 받고 있어서 해당반응이 활발하게 일어나고 있을 9일묘와 배유가 거의 소진되어 해당반응이 매우 빈약하게 일어나고 있을 20묘를 대상으로 조직추출액중의 상대적인  $O_2^-$ 수준을 비교하였다. 아울러 9일묘와 20일묘를 48시간 동안 저온( $5^\circ C$ ) 처리한 후 상온으로 환원시키고 16시간이 지난 다음에 역시  $O_2^-$ 수준을 비교하였다(Fig. 3). 기대하였던 대로 정상 상태에서도 9일묘가 20묘보다  $O_2^-$ 수준을 높게 보였을 뿐 아니라 저온처리후 상온으로 환원된 후에도 그 증가폭이 훨씬(3배이상) 컸다.

해당반응이 활발하게 일어나는 유묘가 저온에 놓여 있을때 해당반응의 산물이나 혹은 NADH가 세포내에 보다 높은 수준으로 축적되게 될 것이고 이것이 세포가 상온으로 환원된 다음에  $O_2^-$ 생성을

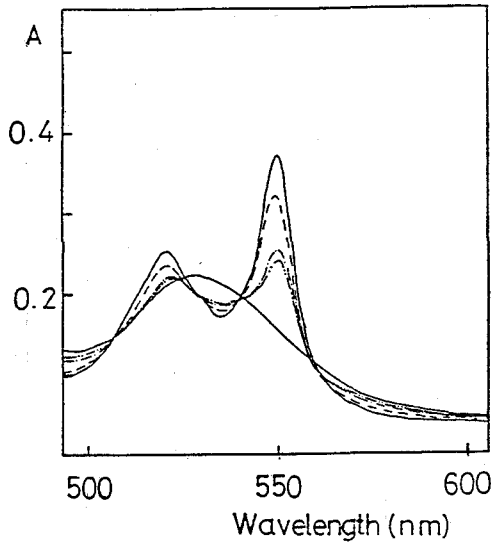


Fig. 3. Absorption spectra of cyt. c reduced by the extracts of rice leaves grown for 9 days and 20 days.

- : Rice grown for 9 days followed by cold treatment for 48 hours and room temperature treatment for 16 hrs.
- - - : Rice grown for 9 days without subsequent cold treatment.
- · - · : Rice grown for 20 days followed by cold treatment for 48 hours, and room temperature treatment for 16 hrs.
- · · · : Rice grown for 20 days without subsequent cold treatment.

보다 촉진시킨 요인이 되었다는 가정을 뒷받침할 만한 결과라 할 수 있다.

호흡기질의 과잉공급이 미토콘드리아에서  $O_2^-$  생성을 촉진시킨다는 가정을 입증하기 위하여 SMP 분산액에 NADH를 첨가하고 NBT를 사용하여  $O_2^-$  생성수준을 조사하였다. Fig. 4는 첨가한 NADH 농도의 증가에 따라 생성된  $O_2^-$ 의 양이 계속적으로 (두개의 반응 phase를 보이면서) 증가하는 것을 보여준다.

이 결과는 정상적인 호흡반응을 통해 소모할 수 있는 농도이상으로 공급된 기질은 그 전자의 상당한 비율을  $O_2^-$  생성반응에 허비함으로써 결과적으로 세포내  $O_2^-$  수준을 높게 된다는 것을 입증하는 셈이다.

저온처리후 상온으로 환원시키고 경시적으로 조직내  $O_2^-$ 의 상대적 수준의 변화와 냉해발현의 진전을 관찰하였다. 저온처리 직전의  $O_2^-$  수준을 기준으

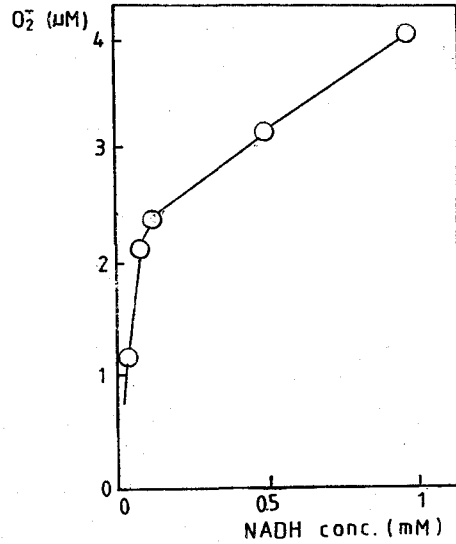


Fig. 4. Concentration of  $O_2^-$  produced in SMP suspension as a function of the NADH concentration.

로 할때 48시간 동안의 저온처리 직후에도  $O_2^-$  수준의 증가로 별로 크지 않았다. 그러나 시간의 경과에 따라 그 수준은 급격히 높아져서 약 8시간 후에는 최고치에 달하였다. 그리고 10시간 뒤에는 다시 급격히 하락하였다. 이와 같은 Fig. 5의 결과는  $O_2^-$ 의 세포내 축적은 저온처리중이 아니라 상당한 시간동안 저온처리 받은 식물이 상온으로 환원된 후에 일어나는 post-chilling process라는

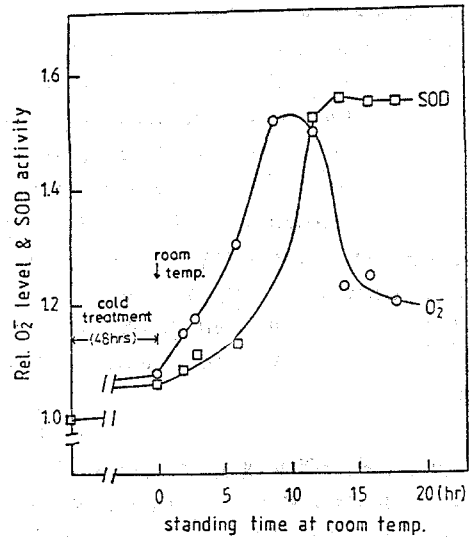


Fig. 5. Changes of the  $O_2^-$  level and the SOD activity as postchilling processes occurred in tissue. Plants are cold-treated for 48 hours at  $5^\circ C$  under dark.

가정의 설정이 정당한 것이었음을 입증하는 자료가 될 것이다.

육안관찰에 의한 외관상의 냉해발현은  $O_2^-$ 수준이 최고치에 머무는 시간보다 2시간쯤 뒤에 나타나기 시작하였다. 이는  $O_2^-$ 에 의한 세포구성물질의 화학적파괴가 생화학적 활성의 저해로, 그리고 그것이 다시 세포생리적 기능의 파괴로 연계되어 외형적 증상으로 나타나는데 그 정도의 시간은 걸렸을 것이라 판단된다. 냉해발현의 정도와 조직내  $O_2^-$ 수준과는正的 상관관계가 성립되는 것으로 보이며 이에 관해서는 정량적인 실험결과를 수집중에 있다.

최고치에 달했던  $O_2^-$ 수준이 10시간 후에 급격히 하락된 현상은 SOD의 유도에 의한  $O_2^-$ 의 enzymatic dismutation의 결과로 해석되었다. Fig. 5가 보여주는 바와 같이  $O_2^-$ 측정과 동일한 시료로 동시에 실시한 SOD활성측정의 결과는, SOD의 활성이  $O_2^-$ 수준이 증가하기 시작한 후 약 3시간의 lag time을 보이다가 급격히 증가하기 시작하였고 약 14시간 후(상온으로 환원시킨 다음)에 최고치에 도달하였다. 이 시점에서  $O_2^-$ 는 급격히 감소되었다.

SOD가  $O_2^-$ 에 의해 유도되는 효소라는 사실<sup>19)</sup>과 SOD의 활성이 최대치에 달할때  $O_2^-$ 수준이 급격히 떨어졌다는 Fig. 5의 관찰사실은 본 연구에서 시도한  $O_2^-$ 분석(상대적 수준측정)방법이 합리적임을 다시 입증한 셈이다.

Fig. 5의 결과는 또다른 측면에서 중요한 의미를 내포한다.  $O_2^-$ 가 냉해발현의 직접적인 화학적 인자라고 볼때 SOD의 체내유도는 냉해에 대한 생체방어기작의 일환인 것으로 해석된다는 점이다. 현재 본연구실에서 수집한 실험자료에 의하면 이러한 해석은 매우 긍정적으로 보인다.

본연구의 주안점은 냉해와 관련하여 미토콘드리아막에서 생성된  $O_2^-$ 의 세포내축적과 그에 의한 세포의 피해에 있었다. 따라서  $O_2^-$ 에 의한 피해를 확인해 보는 작업은 당연히 필요한 일이다.  $O_2^-$ 의 생성처가 내막에 결합되어 있는 호흡계이므로 피해의 일차적 대상은 바로 호흡계일 것이다. 이를 확인하기 위하여  $O_2^-$ 가 발생되는 용액중 (xanthine/xanthine oxidase system)에 분산된 SMP의 호흡활성의 저해를 조사하였다. Fig. 6의 결과가 제시하듯이  $O_2^-$ 농도가 증가되는 조건일수록(즉 xanthine의 농도가 커질수록) 호흡활성저해가 심하였으며 그 저해는 비가역적임을 xanthine을 투석해버린 뒤에도 호흡활성이 회복되지 않았다는 사실로서 확인하였다.

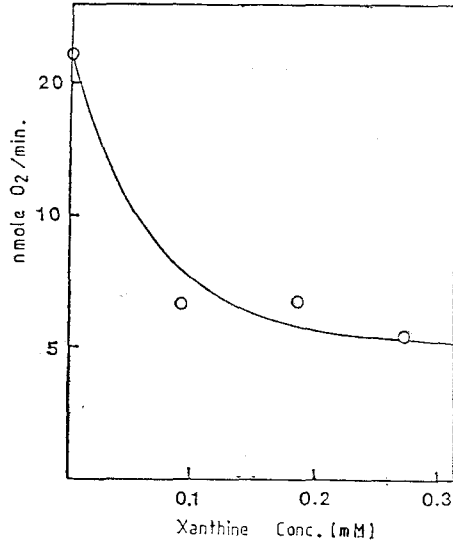


Fig. 6. Dependence of the respiratory activities of SMP on the enzymatically produced  $O_2^-$  level in SMP suspension. The relative level of  $O_2^-$  is expressed as Xanthine/Xanthine oxidase system.

한편, 냉해를 입은 유묘조직의 호흡활성은 실제로 저해되었다는 사실도 확인하였다. 48시간 저온 처리후 10시간 상온에 방치시킨 유묘의 호흡활성은 냉해받지 않은 유묘의 호흡활성의 절반정도의 수준에 불과하였다(Fig. 7).

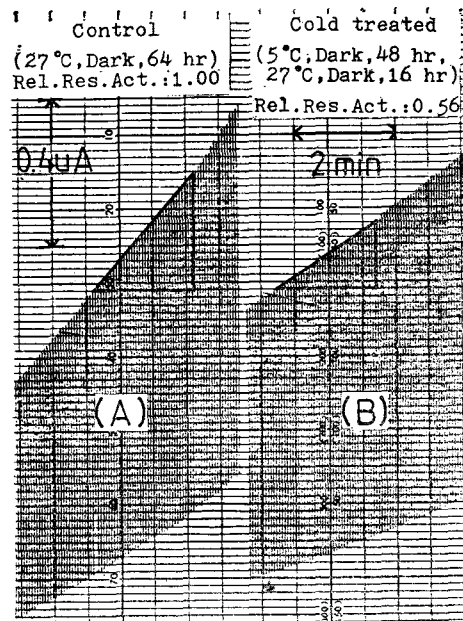


Fig. 7. Polarographic traces of oxygen consumption by mitochondria prepared from healthy(A) and chilling injured(B) rice leaves.

초 록

본연구의 근간이 되는 기본적 가정은, (1) 식물 냉해기작에서 2차과정은 반응성이 강한  $O_2^-$ 의 체내 축적이다. (2)  $O_2^-$ 는 식물체가 低温처리를 받고 있는 도중이 아니라 常溫으로 환원된 뒤에 축적되기 시작한다. (3)  $O_2^-$ 의 축적은 미토콘드리아 막의 상전이(가)기인 細胞代謝(glycolysis→TCA cycle→respiratory electron transport)의 균형회파에 기인한다.

이와 같은 가정을 뒷받침할 수 있는 중요한 연구 결과는 다음과 같다. 먼저  $O_2^-$ 의 相對的 水準을 측정하는 방법을 확립하였다. 저온처리를 받은 벼 유묘는 처리하지 않은 유묘보다 그 조직 추출액중의  $O_2^-$ 수준이 높게 나타났다. 48시간의 저온처리중에는  $O_2^-$ 의 축적이 거의 일어나지 않았으나, 常溫으로 환원시킨 후 축적되기 시작하여 약 8시간후에 최고치에 도달하였다. Model system을 이용한 연구 결과, 호흡기질을 공급했을 때 미토콘드리아 membrane(SMP)에서  $O_2^-$ 의 생성이 증가하였다. 효소적으로 발생시킨  $O_2^-$ 가 존재하는 조건하에서 미토콘드리아막의 전자전달 활성이 저해를 받았다.  $O_2^-$ 의 축적이 최고치에 도달한 후 급격히 감소되는 사실이 관찰되었으며, 이는 Superoxide dismutase (SOD)에 의한  $O_2^-$ 의 dismutation 결과로 해석되었다.

참 고 문 헌

1. 정진, 박상규 : 서울대학교 농학연구, 9(1), 별책, 75(1984)
2. 정진, 이상기, 인만진 : 서울대학교 농학연구,

- 10(1-1), 51(1985)
3. 정진, 김세호 : 서울대학교 농학연구, 11(1-1), 13(1986)
4. 정진·김희정 : 한국농화학회지, 30(4), (1987)
5. 현일 : 서울대학교 석사학위논문(1986)
6. K. Asada M. Takahashi, and M. Nagata: Agr. Biol. Chem., 38(2), 471 (1974)
7. Y. Kono, M. Takahashi, and K. Asada: Plant Cell Physiol., 20(7), 1229(1979)
8. C. Auclair, M. Torres, and J. Haikim: FEBS Letters, 89(1), 26(1978)
9. J.M. McCord, I. Fridovich: J. Biol. Chem., 244 6049(1969)
10. 정진, 박상규, 김세호, 이상기 : 한국농화학회지, 28(4), 271(1985)
11. J. D. Spikes: "The Science of Photobiology" (Smith, K.D. ed.) Plenum Press, N.Y.(1977)
12. E.F. Elstner: Ann. Rev. Plant Physiol.: 33, 73(1982)
13. I. Fridovich: Science, 201(8), 875(1978)
14. Y.A. Vladimirov, V.I. Olenov, T.B.Suslova, and Z.P. Cheremisina: Adven. Lipid Res., 17, 173(1980)
15. I.M. Moller, J.M. Palmer: Physiol. Planta., 54, 267(1982)
16. E. Cadenas, A. Boveris, I. Ragan, and A.O. M. Stoppani: Arch. Biochem. Biophys., 180, 248(1977)
17. L. Packer: Meth. Enz., 105, 59(1984)
18. A. Boveris, E. Cadenas, and A.O.M. Stoppani: Biochem. J., 156, 435(1976)
19. I. Fridovich: Science, 201(8), 875(1978)