

薔薇 및 밀 培養細胞의 生體異物質 代謝에서 Cytochrome p450의 役割

李 寅 鐵*

大田大學校 理科學 生物學科

장미(*Rosa* sp. cv. Paul's Scarlet)와 밀(*Triticum aestivum* L.)의 조직 배양체에서 polychlorinated biphenyl(PCB)의 대사를 조사하였다. 조사된 PCB는 2개에서 6개까지의 치환 염소를 보유한 19종류였다. PCB를 투여하여 96시간 동안 배양시킨 결과 장미에서는 9종, 밀에서는 5종류가 30% 이상의 대사율을 나타내었다. 대사율이 높은 PCB들은 모두 2번 위치에 치환 염소를 갖는다는 공통점이 있으며, 대사율이 낮은 PCB일수록 평면적 구조를 갖는 것으로 나타났다. 한편 밀의 배양세포는 *para*- 위치에 치환 염소를 갖는 PCB에 대한 대사 활성이 전혀 없었다. 두 종의 배양 세포 모두에서 phenobarbital을 처리한 경우 non-*p*-chlorinated biphenyl의 대사율만이 증가하였으며, *para*-chlorinated biphenyl의 대사 활성은 phenobarbital 처리에 영향을 받지 않았다. 또한 phenobarbital의 처리에 의하여 cinnamate-4-hydroxylase의 활성이 140% 이상 증가하였다. 이상의 결과는 식물체에서의 PCB 대사가 그 구조에 의해 결정될 수 있으며, 특히 *para*- 위치의 치환 염소를 보유한 종류와 그렇지 않은 종류는 별개의 cytochrome p450의 동위 효소에 의하여 대사될 수 있음을 보여주고 있다.

주요어: 생체이물질 대사, cytochrome p450, 장미, 밀, 배양세포

동물체에서의 cytochrome p450에 관한 연구는 약물대사 등 생체이물질(xenobiotics) 대사에 관련되어 매우 활발하게 진행되어 온 반면, 식물체에서는 주로 flavonoid나 phenolic compound 등 2차 대사물질이나 phytoalexin 합성에 관련되어 수행되어 왔다(Butt and Lamb, 1981). 그러나 식물체는 살충제나 제초제 등의 다양한 생체이물질의 최종적 수용자이므로 식물내에서의 생체이물질 대사와 cytochrome p450에 관한 연구도 동물체에서의 그것 못지 않게 중요한 의미를 갖고 있음에도 불구하고 이 분야에 대한 연구는 거의 이루어지고 있지 않았다. 최근에 몇몇 종류의 생체이물질이 식물체에 의해서 대사될 수 있으며, 이러한 생체이물질 대사에 cytochrome p450이 관련되어 있음을 보여주는 연구 결과들이 발표되고 있다(Harms and Langebartels, 1986; Fonne-Pfister *et al.*, 1988; Lee and Fletcher, 1990; Mougin *et al.*, 1990; Zimmerlin and Durst, 1990, 1992; Christopher, *et al.*, 1991; Zimmerlin and Durst, 1992). 또한 Plewa 등(1988)과 Wagner 등(1990)은 식물체에 의하여 promutagen인 2-aminofluorene이 mutagen으로 전환될 수 있음을 보고하여 식물체에 의한 생체이물질의 대사에 관한 연구가 환경적인 측면에서도 중요한 의미를 갖게 되었다. 식물체내에서 진행되는 생체이물질 대사에 관여하는

효소를 밝히는 것은 그 생체이물질의 대사 경로나 생성물의 성질을 규명하는 열쇠가 된다. Sandermann(1988)은 Benzo(α)pyrene이 *in vitro*에서 cytochrome p450이나 peroxidase에 의해 모두 대사될 수 있으나 그 결과로 생성되는 물질이 매우 상이하다는 결과를 보고한 바 있다. 생체내에서는 cytochrome p450 뿐만 아니라 peroxidase나 laccase와 같은 산화 효소들이 생체이물질 대사에 관여할 수 있으나, 어떤 생체이물질이 각각 cytochrome p450이나 peroxidase에 의하여 대사되는지는 거의 알려진 바 없다. 다만 Hammel 등(1986)은 이온화 경향이 낮고 친지질성 화합물일수록 peroxidase에 의하여 대사되기 어렵다고 보고한 바가 있다. 또한 식물의 종에 따라서 동일한 생체이물질에 대하여 그 대사 활성이 다른 것으로 여겨진다. 단자엽 식물은 쌍자엽 식물에 비하여 benzo(α)pyrene의 uptake 능력과 대사 활성이 높으며(Harms and Langebartels, 1986) 2,4-D와 Chlorosulfuron의 대사도 단자엽 식물에서 빨리 진행된다는 보고들이(Harms and Langebartels, 1986; Christopher *et al.*, 1991) 나온 바 있다. 이는 이들 식물체에서 생체이물질 대사에 관련하는 효소 활성의 차이에서 기인될 수도 있지만, 앞에서 언급한 바 반응을 촉매하는 효소 자체가 다를 수도 있다는 가능성을 배제하지 못하고 있다.

Polychlorinated biphenyl(PCB)는 그 구조적인 안정성과, 낮은 이온화 경향, 그리고 잠재적인 독성으로 인하여 생체에

*교신저자: Fax (042) 284-0109

서의 대사 여부와 그 대사 경로가 관심의 대상이 되어온 생체이물질 중의 하나이다. 고등 동물 세포에서 PCB의 대사는 cytochrome p450에 의하여 촉매된다는 보고가 다수 나온 바 있다(Kaminsky *et al.*, 1981; Borlakoglu *et al.*, 1990). 그러나 cytochrome p450은 많은 동위효소를 가지며, 또한 촉매하는 반응이 매우 다양하기 때문에 정확한 PCB의 대사 기작을 밝히는 데 많은 어려움이 있다. 식물체도 PCB의 분해 능력이 있음을 제시하는 연구 결과들이 계속 나오고 있으나(Fletcher *et al.*, 1987; Lee and Fletcher, 1990) 그 대사 기작에 관하여서는 아직 보고된 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 조직 배양된 식물체를 이용하여 *in vivo* system에서의 PCB 대사에 대한 cytochrome p450의 관련성을 밝혀, 식물체에서의 생체이물질 대사 기작을 이해하는 데 도움을 주고자 한다.

재료 및 방법

식물 재료

본 실험의 재료로는 장미(*Rosa* sp. cv. Paul's Scarlet)와 밀(*Triticum aestivum* L.)의 조직 배양체를 액체 배양하여 사용하였다. 장미와 밀의 조직 배양체는 미국 Oklahoma 대학교 식물학과에서 유도되어 수년간 배양되어 온 것으로 본 실험실에서 분양 받아, 장미 배양체의 경우에는 MPR media(Nesius *et al.*, 1972)에, 밀의 경우에는 2 mg/L의 2,4-D만을 함유하는 B5 액체 배지를 사용하여 진탕 배양하였다. 배양 조건은 암상태, 25°C였으며 14일 간격으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 본 실험에서 조직 배양체를 사용한 이유는 난분해성 물질인 PCB를 처리하여 장시간 배양하는 동안에 미생물의 오염을 피할 수 있고, 식물체에서의 cytochrome p450의 활성이 광, 연령, 상처 등 성장 조건에 의하여 변화할 수 있는데(Benveneste *et al.*, 1977, 1978; Hendry *et al.*, 1981; Kuhl *et al.*, 1987) 조직 배양체에서는 이러한 성장 조건의 조절이 비교적 용이하기 때문이다.

Polychlorinated biphenyl의 대사 측정

액체 배양 세포들의 PCB 대사 측정은 Lee와 Fletcher(1992)의 방법을 변형하여 시행하였다. 12 mL의 Leighton Culture Tube에 액체 배양된 세포 0.5 g과 배지 2 mL를 넣고 19종의 PCB congener를 각 5 µM의 최종 농도가 되게 투여하여 서서히 진탕하면서 96시간 동안 배양하였다. 배양세포의 PCB 대사를 비교하기 위한 dead control은 PCB를 투여하기 전에 미리 perchloric acid를 처리하여 10분간 방치하여 준비하였다. 배양이 끝난 후 소량의 세포를 취하여 미생물 오염의 확인을

위해 nutrient agar에 접종하였다. 각 배양구는 perchloric acid를 처리하여 반응을 정지시킨 후 8 mL의 Hexane-Triton ×100(1% v/v)를 넣어 대사되지 않고 남은 잔류 PCB를 추출하였다. Hexane 용액에 의하여 추출된 PCB는 gas chromatography(Shimadzu Model GC-14B, ECD Type)로 분석하였다. 단, 밀 배양체의 경우 액체 배양을 하여도 작은 덩어리의 상태를 유지하기 때문에 잔류 PCB의 회수율을 높이기 위하여 6 M의 염산을 처리하여 5시간 acid hydrolysis를 한 후 PCB를 추출하였다.

PCB 대사에 대한 cytochrome p450의 유도 물질의 영향 측정

Cytochrome p450의 유도 물질의 처리는 7일 성장시킨 액체 배양 세포에 실시하였다. Cytochrome p450계의 유도 물질로 알려져 있는 phenobarbital(PB)과 3-methylcholanthrene(3-MC)을 각각 4 mM과 1 mM의 최종 농도가 되게 처리한 후 48시간 동안 preincubation하였다(Reichhart *et al.*, 1980). 배양이 완료된 후 상기 방법으로 PCB 대사율을 측정하여 각 물질이 PCB 대사에 미치는 영향을 조사하였다.

Microsomal fraction의 분리 및 효소 활성 측정

각 유도 물질 처리에 의한 효소 활성의 변화를 측정하기 위하여 microsomal fraction을 분리하였다. Microsomal fraction의 분리는 Benveneste 등(1982)의 방법을 응용하였다. Cytochrome p450의 유도 물질을 처리하여 48시간 배양한 장미와 밀의 액체 배양 세포를 각각 100 g씩 50 mM tricine(pH 7.5), 2 mM MgSO₄, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol로 조성된 마쇄액 500 mL와 함께 마쇄하여 10,000 g에서 15분간 원심 분리하여 상정액을 얻었다. 이를 다시 100,000 g로 1시간 원심 분리하여 얻은 침전물을 MgSO₄를 첨가하지 않은 소량의 마쇄액에 녹여 microsomal enzyme의 활성 측정에 사용하였다. Cytochrome p450계의 효소 활성은 Oba와 Conn(1988)의 방법에 따라 cinnamate 4-hydroxylase의 활성과, Greenlee와 Poland(1978)의 방법에 의하여 7-ethoxycoumarin O-deethylase의 활성을 측정하여 조사하였다. 단백질의 정량은 Bradford(1976)의 방법으로 시행하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용한 PCB들은 dichlorobiphenyl에서 hexachlorobiphenyl까지 가급적 염소 치환의 위치가 다양하고 gas chromatography 상에서 retention time이 중첩되지 않는 19

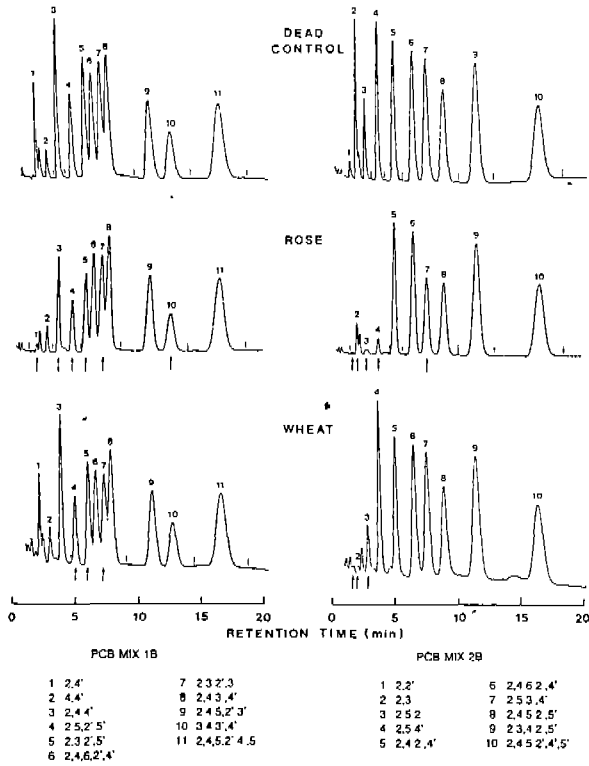


Fig. 1. Comparison of PCB congeners which were metabolized by rose and wheat cultured cells. PCB were provided to the 9-day old cells and incubated for 96 h. Arrows mark congeners metabolized by >10%.

종이었다. 14일의 간적으로 계대 배양한 장미와 밀의 액체 배양체를 계대 배양 후 5일(초기 지수 생장기), 9일(늦은 지수 생장기), 그리고 14일(정지기)로 구분하여 PCB 대사 활성을 조사한 결과 9일째의 배양세포에서 활성이 가장 높았다(자료 제시하지 않음). 그러므로 계대 배양 후 9일간 생장시킨 장미의 배양체에 19종의 PCB를 투여하여 96시간 배양한 결과 11종이 10% 이상 대사되는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이들 중에서 2,2'-di-, 2,4'-di-, 2,3-di-, 2,5,2'-tri-, 2,5,4'-tri-chlorobiphenyl 등 5종의 PCB는 80% 이상의 대사율을 보였으며 2,4,4'-tri-, 2,5,2',5'-tetra-, 2,3,2',5'-tetra-, 2,5,3',4'-tetra-chlorobiphenyl 등 4종은 30-40%의 대사율을, 그리고 2,3,2',3'-tetra-, 3,4,3',4'-tetra-chlorobiphenyl 등 2종은 10-20%의 대사율을 나타내었다(Table 1). PCB는 친지질성이 강하기 때문에, 생체에 투여한 후 즉시 생체막에 강하게 결합한다(Groeger and Fletcher, 1988). 그러므로 생체에서 대사가 일어나더라도 PCB의 대사 산물 혹은 투여한 parent compound의 회수가 어려우며 그 회수율은 치환 염소의 수효가 증가할수록 감소한다(Bedard *et al.*, 1986). 이러한 이유 때문에 생체내에서의 PCB 대사율을 정확하게 측정하는 데 많은 문제점이 있었다. 본 연구실에서는 Hexane-triton ×100의

Table 1. Comparison of PCB congeners which appeared to be metabolized by rose and wheat cultures. Values were percent metabolized

PCB congeners	Rose	Wheat
2,4'	90 ^a	—
4,4'	— ^b	—
2,2'	100	100
2,3	80	93
2,4,4'	37	—
2,5,2'	90	61
2,5,4'	90	—
2,5,2',5'	35	27
2,3,2',5'	30	16
2,3,2',3'	11	28
2,5,3',4'	36	—
3,4,3',4'	17	—

^aValues are based on triplicated cultures, ^bSignifies that none of the congener was metabolized.

혼합액을 사용함으로써 parent PCB의 회수율을 높일 수 있었고, 이는 본 실험에서 사용한 PCB 중에서 회수율이 가장 낮은 종류인 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl의 회수율이 대조구에 대하여 90% 이상인 점에서 확인할 수 있었다(자료 제시하지 않음). 일반적으로 난분해성 화합물들은 물에 대한 용해도가 낮아 세포내로 쉽게 uptake되지 못하며 이러한 성질 때문에 생체에서 분해가 느리게 진행되는 것으로 인식되어 왔다. PCB의 경우에도 치환된 염소의 수효와 물에 대한 용해도는 반비례하며(Erickson, 1986) 생체내에서 higher chlorinated biphenyl들의 대사율이 낮은 이유는 그 낮은 용해도에 기인하는 것으로 알려져 있다(Furukawa *et al.*, 1978; Groeger and Fletcher, 1988). 본 실험에서도 di-와 tri-chlorobiphenyl의 대사율이 다른 tetra- 혹은 penta-chlorobiphenyl에 비하여 높게 나타나 앞의 결과들과 유사함을 보여주고 있다. 그러나 장미의 배양체에서 80% 이상의 높은 대사율을 보이는 PCB들은 2,4'-di-, 2,2'-di-, 2,3-di-, 2,5,2'-tri-, 2,5,4'-tri-chlorobiphenyl 등으로 이들은 최소한 한 쪽 ring의 2번 위치에(*ortho*-position) 치환 염소를 보유하고 있다는 구조적 공통점이 있었다. 또한 동일한 수의 염소를 갖고 있더라도 양쪽 ring에서의 염소 치환 위치가 동일하지 않는 구조를 보유한 PCB들이 일반적으로 높은 대사율을 나타내고 있었다. 이는 식물체 내에서의 PCB 대사는 물에 대한 용해도 뿐만 아니라 그 구조적인 특징에 의하여서도 결정될 수 있음을 보여주고 있다. 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,4,4'-trichlorobiphenyl의 대사를 비교하여 보면 이러한 점이 더욱 확실해진다. 4,4'-diCB의 용해도는 3.58×10^{-7} M, $\log K_{ow}$ 는 5.28이며, 2,4,4'-triCB는 각각 3.28×10^{-7} M, 5.74이다(Erickson, 1986). 그러나 이러한 용해도와 무관하게 2,4,4'-triCB의 대사

율은 약 37%인 데 반해 4,4'-diCB는 거의 대사되지 않는 것으로 나타났다. 4,4'-diCB는 조사된 PCB 중에서 가장 평면적(coplanar)인 구조를 가지고 있으며, 2번 위치에 치환 염소가 있는 경우에는 non-coplanar한 구조를 갖게 된다. 동물 세포에서의 PCB 대사를 연구한 Kaminsky 등(1981)의 보고에 의하면 동물 세포에서도 *ortho*- 위치에 염소가 치환되었는가의 여부에 의하여 PCB congener들의 대사 양상이 서로 다르다고 하여 본 실험의 결과와 유사함을 보여주었다.

단자엽 식물인 밀의 조직 배양체에서 PCB의 대사를 조사한 결과는 매우 특이한 양상을 보여주었다(Fig. 1, Table 1). 밀의 배양체에서는 장미 세포에서 30% 이상의 대사율을 나타낸 PCB congener 중에서 2,2'-di-, 2,3-di-, 2,5,2'-tri-, 2,5,2'5'-tetra-, 2,3,2'5'-tetra-chlorobiphenyl이 역시 30% 이상의 대사율을 나타내었다. 그러나 2,4,4'-tri-, 2,5,3'4'-tetra-와 같이 장미 세포에서 비교적 낮은 대사율을 보였던 PCB는 물론 90% 이상 대사가 되었던 2,4'-di-와 2,5,4'-tri-chlorobiphenyl 조차도 전혀 대사되지 않았다. 장미 세포에서는 분해가 되나 밀의 세포에서는 전혀 대사되지 않는 PCB congener들은 모두 4번 위치에 염소가 치환된 *para*-chlorinated biphenyl이라는 공통점을 가지고 있다. 밀의 배양 세포에서 *para*-chlorinated biphenyl들이 대사되지 않는 것은 밀 배양 세포의 PCB 대사 활성이 장미의 그것에 비하여 낮은 것에 기인할 가능성도 있다. 그러나 밀 세포에서의 2,2'-di-, 2,3-di-, 2,5,2'-tri-, 2,5,2'5'-tetra-chlorobiphenyl 등의 대사율을 장미에 비교하여 보면 거의 차이가 나지 않고 있다. 이러한 사실은 상기의 결과가 밀 세포가 장미 세포에 비하여 전반적인 PCB 대사율이 낮은 것에 기인하는 것이 아니라 밀의 배양 세포에서 PCB 대사는 구조에 의하여 결정되고 있음을 보여주고 있다. 밀의 PCB 대사율이 장미의 그것과 차이가 없는데 반하여 *para*-chlorinated biphenyl가 전혀 분해되지 않는다는 것은, *para*- 위치에 치환 염소를 갖고 있는 PCB와 그렇지 않은 PCB는 서로 다른 cytochrome p450의 동위 효소 혹은 다른 종류의 효소에 의하여 대사가 일어날 수 있음을 의미한다. 식물 세포에서는 cytochrome p450으로 대표되는 mixed function oxygenase(MFO)와 peroxidase 등이 생체이 물질 대사에 관여할 수 있다(Hammel *et al.*, 1986; Fonne-Pfister *et al.*, 1988; Mougín *et al.*, 1990; Plewa *et al.*, 1991). 그러나 선행된 실험들이 보여주는 바 PCB의 구조적인 특징 때문에 식물체에서의 PCB 대사는 MFO에 의하여 촉매될 가능성이 높다(Hammel *et al.*, 1986; Lee and Fletcher, 1992). 식물체에서는 정확하게 알려져 있지 않지만 동물 세포에 있어서 cytochrome p450은 가장 다양한 동위 효소를 갖는 효소 중의 하나이며 각 동위 효소가 다양한 유도 물질의 처리에 의하여 유도된다는 많은 실험적 결과들이 보고되고 있다(Botelho *et al.*, 1979; Ryan *et al.*, 1979; Huang *et al.*, 1981). 그러므로

Table 2. Influence of PB and 3-MC on PCB metabolism in cultured rose and wheat cells. Four mM PB or 1 mM 3-MC was provided to the 7-day old cultures and incubated for 48 h

PCB congeners	Rose			Wheat		
	Control	PB	3-MC	Control	PB	3-MC
2,4'	90 ^a	97	94	—	—	—
4,4'	— ^b	—	—	—	—	—
2,2'	100	100	100	100	100	100
2,3	80	100	86	93	98	96
2,4,4'	37	61	29	—	—	—
2,5,2'	90	92	93	61	85	57
2,5,4'	90	96	78	—	—	—
2,5,2'5'	35	52	28	27	22	28
2,3,2'5'	30	51	24	16	26	22
2,4,2'4'	—	—	—	—	—	—
2,3,2'3'	11	34	10	28	63	34
2,4,3'4'	—	—	—	—	—	—
2,5,3'4'	36	32	12	—	—	—
3,4,3'4'	17	18	—	—	—	—
2,4,6,2'4'	—	—	—	—	—	—
2,4,5,2'5'	—	—	—	—	—	—
2,4,5,2'3'	—	—	—	—	—	—
2,3,4,2'5'	—	—	—	—	—	—
2,4,5,2'4'5'	—	—	—	—	—	—

^aValues were based on triplicated cultures, ^bSignifies that none of the congener was metabolized.

상기의 연구 결과들에 미루어 식물 세포내에서도 다양한 PCB congener들의 대사가 그 구조에 따라 각기 다른 cytochrome p450의 동위 효소에 의하여 일어날 수 있음을 보여주고 있다. 이는 동물 세포에서도 Di-*o*-chloro-substitute biphenyl은 PB를 처리하여 유도된 cytochrome p450의 동위 효소들에 의해 주로 분해되고 non-*o*-chloro-substitute biphenyl의 대사는 β -naphthoflavone에 유도된 동위효소에 의해 진행된다는 연구 결과(Kaminsky *et al.*, 1981)에서도 그 단서를 찾을 수 있다. 장미 세포와 밀 세포에서의 PCB 대사를 비교하여 보면 식물 세포에는 *para*- 위치에 염소가 치환된 PCB와 그렇지 않은 PCB가 서로 다른 cytochrome p450의 동위 효소군에 의하여 대사될 수 있음을 강력하게 시사해준다.

Cytochrome p450의 각 동위 효소의 유도 물질로 알려진 PB와 3-methylcholanthrene(3-MC) 처리하여 PCB 대사를 측정된 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 장미 세포에 PB를 처리한 경우에 2,3-di-, 2,5,2'5'-tetra-, 2,3,2'5'-tetra-, 2,3,2'3'-tetra-chlorobiphenyl 등의 대사율이 대조군에 비하여 20%에서 100% 이상까지 증가하였다. 그러나 *para*-chlorinated biphenyl의 대사율은 2,4,4'-tri-를 제외하고는 PB 처리에 거의 영향을 받지 않았다. 밀의 경우에 있어서도 PB의 처리에 의하여 2,5,2'-trich-

Table 3. Effects of PB and 3-MC on microsomal cinnamate 4-hydroxylase and 7-ethoxycoumarin deethylase activities

Treatment	Ca4H		ECDE	
	(nmol <i>p</i> -coumarate formed · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹)		(nmol 7-OH coumarine formed · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	
	Rose	Wheat	Rose	Wheat
Control	23.5	10.8	8.4	5.5
PB (4 mM)	51.9	15.3	8.7	4.8
3-MC (1 mM)	26.6	11.9	12.1	6.9

lorobiphenyl과 2,3,2'3'-tetrachlorobiphenyl의 대사율이 현저하게 증가하였으나, 3-MC에 의한 PCB 대사의 변화는 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과에서 두 종의 배양세포 모두에서 PB의 처리에 의하여 몇몇 PCB congener들만이 선택적으로 대사율이 증가함을 알 수 있다. PB와 3-MC는 동물 세포에서 각각 cytochrome p450의 동위 효소들인 p450b와 통상 p448로 불리우는 p450c의 유도 물질로 알려져 있다. 식물에서, 3-MC의 작용은 거의 연구된 바 없으나, PB의 처리에 의하여 Jerusalem artichoke의 tuber나 tulip bulb에서 cytochrome p450의 합성이 유도되며 특히 NADPH-cytochrome p450 reductase(E.C.1.6.2.4)와 cinnamate 4-hydroxylase(E.C.1.14.13.11)의 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다(Reichhart *et al.*, 1980; Higashi, 1988). 본 실험에서 장미와 밀의 배양체에 PB와 3-MC를 처리하여 cinnamate-4-hydroxylase와 7-ethoxycoumarin deethylase 활성 변화를 측정된 결과 PB의 처리에 의하여 cinnamate-4-hydroxylase의 활성이 장미의 경우에는 약 220%, 밀의 경우에는 140% 정도 증가한 반면 7-ethoxycoumarin deethylase의 활성은 각각 44%와 25% 정도가 증가하는 것으로 나타났다(Table 3). 이는 조직 배양된 식물세포에서도 PB가 cinnamate-4-hydroxylase의 효과적인 유도 물질임을 보여주는 결과이다. 그러나 3-MC의 경우에는 양쪽 모두에서 cinnamate-4-hydroxylase에는 거의 영향이 없었고 장미의 경우에만 30% 정도의 7-ethoxycoumarin deethylase의 활성 증가를 보였다. 식물체에 monuron과 dichlobenil 등의 제초제를 처리하면 cytochrome p450의 함량이 증가하며 동시에 cinnamate-4-hydroxylase의 활성 증가가 같이 일어난다고 하여 생체이물질 대사에 있어서 cinnamate 4-hydroxylase의 관련성이 제시된 바 있다(Reichhart *et al.*, 1980). 그러나 Zimmerlin과 Durst(1992)는 순수 분리된 microsomal fraction에서 일어나는 Diclofop(2-(4-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy)propanoate)의 대사는 NIH shift를 통하여 ring의 4번 위치의 염소가 3번이나 5번으로 이동하여 4-hydroxy-diclofop을 생성하는 형식으로 진행되는데, 이 반응은 cin-

amic acid를 포함하여 *in vivo*에서 cytochrome p450의 기질로 생각되는 어떤 물질에 의해서도 억제되지 않으며 다만 lauric acid에 의하여 경쟁적 억제를 받는다고 하였다. 이는 Diclofop aryl hydroxylation과 lauric hydroxylation이 cinnamate-4-hydroxylase가 아닌 다른 cytochrome p450의 동위 효소에 의하여 촉매될 수 있음을 보여주는 결과이다. 그러므로 Diclofop의 ring 구조와 동일한 *p*-chlorinated biphenyl들의 대사율이 PB에 의하여 거의 영향을 받지 않으며 다른 구조를 갖는 PCB의 대사율만 선택적으로 증가된다는 것은 상기의 연구 결과와 매우 유사하며 다음과 같이 해석될 수 있다. 즉, *para*- 위치에 염소를 갖지 않는 PCB의 대사는 PB에 의하여 유도되는 동위 효소에 의하여 촉매되며, *p*-chlorinated biphenyl의 경우에는 이와는 다른 cytochrome p450의 동위 효소에 의하여 그 대사가 진행된다는 것이다. 그러므로 밀의 배양체에서 *p*-chlorinated biphenyl의 대사가 전혀 일어나지 않는다는 것은 이 동위 효소가 결핍된 결과로 이해된다. 이 동위 효소의 결핍이 유전자 자체가 결핍되어 나타난 결과인지 혹은 유전자 발현 조절의 상이함에서 유래한 것인지는 알 수 없으나 이 문제는 앞으로의 연구를 통하여 규명될 수 있을 것이다.

사 사

이 논문은 1992년도 교육부 지원 한국학술진흥재단 자유공모 (지방대 육성)과제 학술 연구조성비에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

Bedard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M. L. Haberl and C. Johnson. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 761-768.

Benveniste, I., J-P. Salaun and F. Durst. 1977. Wounding-induced cinnamin acid hydroxylase in Jerusalem artichoke tuber. *Phytochemistry* 16: 69-73.

Benveniste, I., J-P. Salaun and F. Durst. 1978. Phytochrome-mediated regulation of a monooxygenase hydroxylating cinnamic acid in etiolated pea seedlings. *Phytochemistry* 17: 359-363.

Benveniste, I., J-P. Salaun, A. Simon, D. Reichhart and F. Durst. 1982. Cytochrome p450-dependent ω-hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea seedlings. *Plant Physiol.* 70: 122-126.

Borlakoglu, J.T., M.G.B. Drew, J.P.G. Wikins and R.R. Dils. 1990. Effect of molecular substitution patterns on the cytochrome p450-dependent metabolism of 2,2',3,5,5'- and 2,2',3,4,4',6-hexachlorobiphenyl by rat liver microsomal monooxygenases. *Biochim. Biophys. Acta* 1036: 167-175.

- Botelho, L.H., D.E. Ryan and W. Levin.** 1979. Amino acid composition and partial amino acid sequences of three highly purified forms of liver microsomal cytochrome p450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, or 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* **254**: 5635-5640.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Butt, V.S. and C.J. Lamb.** 1981. Oxygenase and metabolism of plant products. In, *The Biochemistry of Plants*. P.K. Stumpf and E.E. Conn (eds.). Academic Press, New York. pp. 627-665.
- Christopher, J.T., S.B. Powles, D.R. Liljegren and J.A.M. Holtum.** 1991. Cross-resistance to herbicides in annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiol.* **95**: 1036-1043.
- Erickson, M.D.** 1986. Physical, chemical, commercial, environmental and biological properties. In, *Analytical Chemistry of PCB*. Butterworth, Boston. pp. 5-51.
- Fletcher, J., A. Groeger, J. McCrady and J. McFarlane.** 1987. Polychlorobiphenyl (PCB) metabolism by plant cells. *Biotechnol. Letters* **9**: 817-820.
- Fonne-Pfister, R., A. Simon, J-P. Salaun and F. Durst.** 1988. Xenobiotic metabolism in higher plants. Involvement of microsomal cytochrome p450 in aminopyrene N-demethylation. *Plant Science* **55**: 9-20.
- Furukawa, K., N. Tonomura and A. Kamibayashi.** 1978. Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 223-227.
- Greenlee, W. and A. Poland.** 1978. An improved assay of 7-ethoxycoumarine o-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetra-chlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **205**: 596-605.
- Groeger, A.G. and J.S. Fletcher.** 1988. The influence of increasing chlorine content on the accumulation and metabolism of polychlorinated biphenyls (PCB) by Paul's Scarlet rose cells. *Plant Cell Rep.* **7**: 329-332.
- Hammel, K.E., B. Kalyanaraman and T.K. Kirk.** 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaeta chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* **261**: 16948-16952.
- Harms, H. and C. Langebartels.** 1986. Standardized plant cell suspension test system for an ecotoxicologic evaluation of the metabolic fate of xenobiotics. *Plant Science* **45**: 157-165.
- Hendry, G.A., J.D. Houghton and O.T. Jones.** 1981. Light-dependent cytochrome p450 changes in mung beans (*Phaseolus aureus*). *Biochem. J.* **196**: 825-829.
- Higashi, K.** 1988. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. *Mutation Res.* **197**: 273-288.
- Huang, M-T., E.F. Johnson, U. Muller-Eberhard, D.R. Koop, M.J. Coon and A.H. Conney.** 1981. Specificity in the activation and inhibition by flavonoids of benzo(a)pyrene hydroxylation by cytochrome p450 isozymes from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **256**: 10897-10901.
- Kaminsky, L.S., M.W. Kennedy, S.M. Adams and F.P. Guengerich.** 1981. Metabolism of dichlorobiphenyls by highly purified isoenzymes of rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* **20**: 7379-7384.
- Kuhnl, T., U. Koch, W. Heller and E. Wellmann.** 1987. Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-o-(4-coumaroyl)-D-quinic acid/shikimate 3'-hydroxylase from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **258**: 226-232.
- Lee, I. and J.S. Fletcher.** 1990. Metabolism of polychlorinated biphenyl (PCB) by plant tissue cultures. In, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk (eds.). Kluwer, Dordrecht. pp. 656-660.
- Lee, I. and J.S. Fletcher.** 1992. Involvement of mixed function oxidase systems in polychlorinated biphenyl metabolism by plant cells. *Plant Cell Rep.* **11**: 97-100.
- Mougin, C., F. Cabanne, M-C. Canivenc and R. Scalla.** 1990. Hydroxylation and N-demethylation of chlorotoluron by wheat microsomal enzymes. *Plant Science* **66**: 195-203.
- Nesius, K.K., L.E. Uchytel and J.S. Fletcher.** 1972. Minimal organic medium for suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta* **106**: 173-176.
- Oba, K. and E.E. Conn.** 1988. Induction of cinnamic acid 4-hydroxylase in developing maize seedlings. *Phytochemistry* **27**: 2447-2450.
- Plewa, M.J., D.L. Weaver, L.C. Blair and J.M. Gentile.** 1988. Activation of 2-aminofluorene by cultured plant cells. *Science* **219**: 1427-1429.
- Plewa, M.J., S.R. Smith and E.D. Wagner.** 1991. Diethylthiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Res.* **247**: 57-64.
- Reichhart, D., J-P. Salaun, I. Benveniste and F. Durst.** 1980. Time course of induction of cytochrome p450, NADPH-cytochrome c reductase, and cinnamic acid hydroxylase by phenobarbital, ethanol, herbicide, and manganese in higher plant microsome. *Plant Physiol.* **66**: 600-604.
- Ryan, D.E., P.E. Thomas, D. Korzeniowski and W. Levin.** 1979. Separation and characterization of highly purified forms of liver microsomal cytochrome p450 from rats treated with polychlorinated biphenyls, phenobarbital, and 3-methylcholanthrene. *J. Biol. Chem.* **254**: 1365-1374.
- Sandermann, H.** 1988. Mutagenic activation of xenobiotics by plant enzymes. *Mutation Res.* **197**: 183-194.
- Wagner, E.D., M.M. Verdier and M.J. Plewa.** 1990. The biochemical mechanism of the plant activation of promutagenic aromatic amines. *Environ. Mol. Mutagen.* **15**: 236-244.

Zimmerlin, A. and F. Durst. 1990. Xenobiotic metabolism in plants: Aryl hydroxylation of Diclofop by a cytochrome p450 enzyme from wheat. *Phytochemistry* **29**: 1729-1732.

the herbicide diclofop by a wheat cytochrome p450 monooxygenase. *Plant Physiol.* **100**: 874-881.

(1994. 3. 10 接受)

Zimmerlin, A. and F. Durst. 1992. Aryl hydroxylation of

Role of Cytochrome p450 in Xenobiotic Metabolism of Cultured Rose and Wheat Cells

Lee, In-Cheol*

Department of Biology, Taejon University, Taejon 300-716, Korea

ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls (PCBs) were provided to the liquid cultured cells of rose (*Rosa* sp. cv. Paul's Scarlet) and wheat (*Triticum aestivum* L.) to investigate the xenobiotic metabolism in plant. After 96 h incubation, 9 individual PCB congeners were found to be metabolized more than 30% by rose cells, while 5 congeners by wheat cells. Metabolic rate of PCBs was increased with the decrease of chlorine content, but coplanar chlorine substitution was not favorable to be metabolized by both cultures. Interestingly, wheat cells had no metabolic activity on *para*-chlorinated biphenyls. Provision of 4 mM phenobarbital enhanced the degradation of non-*para*-chlorinated biphenyls and it coincided with the significant increase of cinnamate-4-hydroxylase activity. Metabolism of *para*-chlorinated biphenyls, however, was not affected by the phenobarbital treatment. These results indicate that metabolism of non-*para*-chlorine substituted PCBs and *para*-chlorinated PCBs are catalyzed by the different cytochrome p450 isozymes, respectively.

Key words: xenobiotic metabolism, cytochrome p450, rose, wheat, cultured cells

*Corresponding author: Fax +82-42-284-0109