雜草草誌 14(1) : 56~61 KJWS 14(1) : 56~61

Alachlor 處理後 귀리 根端에 存在하는 同位過酸化酵素 精製 및 酵素의 生理的 特性

권성환* · 한광수** · 김재철*

Purification and Pysiological Characterization of Isoperoxidase from Oat Root Treated with Alachlor.

Kwon, S.W.*, K.S. Han**, and J.C. Kim*

ABSTRACT

The cationic isoperoxidases were isolated from oat root tips which had been grown in treatment with 1×10^{-4} M alachlor and purified about 30-fold by treatment with ethylalchol and ion exchange chromatography on DEAE-celluose and CM-sephadex medium. The oat root was found to contain three isoperoxidase. The major activity peak (B) represented 65% of the total isoperoxidase activity. After purification, the major peak of isoperoxidase was purified about 37-fold from the oat root. Analysis of the major peroxidase peak (column fraction 58-78) by SDS revealed a single band which corresponed to a molecular mass of 42.5 kD. *In vitro*, isoperoxidase activies were inhibited by IAA. Isoperoxidase (50 unit) significantly inhibited 70.2% of cell division in oat root and 54.2% of cell elongation in oat coleoptile as compared with control.

Key words : isoperoxidase, isoperoxidase activity, oat root, alachlor

緖 論

過酸化 酵素는 H_2O_2를 分解하는 酵素로서 植物體가 stress를 받으면 過酸化 酵素 活性이 增加되며[1,5], 나아가서 細胞가 lignin化 되어 植物의 老化를 촉진한다고 알려져 있다[2,3,9]. 過酸化 酵素는 植物生長 호르몬인 IAA를 植物體 內에서 이동하는 동안 酸化시킬 수 있는 것으로 報告된 바 있다[4]. 또한 過酸化 酵素는 horse-radish를 제외한 다른 植物體에서는 2개 이상의 同位 過酸化 酵素가 存在하는 것으로 알려져 있으며, horse-radish에서 精製된 過酸化 酵素는 醫學 診斷用으로 많이 사용되고 있다[9]. 過酸化 酵素는 植物體에 따라서 多樣하게 존재하고 있으며, 權과 金[7]은 alachlor 處理時 過酸化 酵素 活性이 현저하게 增加된다고 하였다.

따라서 本 實驗에서는 過酸化 酵素 活性을 증가시키기 위하여 귀리 根端에 alachlor를 處理한 後 酵素를 精製하였으며, 精製된 過酸化 酵素의 몇가지 特性과 이것이 細胞分裂과 細胞伸長에 미치는 影響을 調査하였다.

* 全北大學校 農科大學 農化學科(College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea)

** 全州 又石大學校 農學科(Dept. of Agronomy, Chonju Woosok Univ., Samye 565-800, Korea)

〈1993.11.20 접수〉

材料 및 方法

1. 過酸化 酵素 精製

가. 酵素準備

귀리를 消毒하여 petri-dish에 播種한 後, 22±2℃에서 36時間 發芽시킨 다음, 苗를 1×10^{-4} M alachlor에 18時間 培養하였다. 培養된 귀리의 根端 組織을 3.5g 잘라 모아서, 20mM sodium acetate buffer, pH 5.0을 加하여 4℃에서 磨碎하였다. 磨碎된 組織을 10,000xg로 20分間 遠心分離하여, 上澄液만을 모아, 3倍의 ethyl-alcohol (100%)을 混合한 後, 다시 遠心分離하여, 蛋白質을 沈澱시켰다. 沈澱 物質은 20mM ammonium acetate, pH 5.0에 溶解시킨 後, dialysis tube에 넣어 하룻동안 透析하였다. 透析後 完全 溶解된 溶液을 酵素源으로 使用하여, column chromatography를 實施하였다[1].

나. Column chromatography

陰이온 교환수지인 DEAE-celluose를 통과 시킨 酵素液을 陽이온 교환수지에서 精製하였다. 充塡液(CM-sephadex medium)을 酸과 알칼리에 各各 30分씩 activation시킨 後, 蒸溜水로 pH 6.5까지 washing한 다음, 20mM ammonium acetate, pH 5.0으로 equilibrium하였다. Column은 10(h)×2(r)cm에 activation된 CM-sephadex를 充塡하여 使用하였으며, gradient는 20mM ammonium acetate buffer, pH 5.0에 0.5M NaCl을 넣어서 實施하였다. Fraction당 3ml씩 모아서, 各各 280nm에서 蛋白質을 測定하였고, 過酸化 酵素 活性은 發色反應을 利用하여 測定하였다[7].

다. 蛋白質 定量

Lowry[4]方法에 의해서 實施하였다. 2% Na_2CO_3와 0.1N NaOH가 들어 있는 50ml溶液에 0.5% $CuSO_4 5H_2O$와 1% sodium potassium tatrate의 溶液 1ml를 添加한 後, 이것을 各各의 test tube에 1ml씩 取한 다음, 적당한 濃度로 稀釋된 試料 200μl를 넣어, 室溫에서 10分間 放置한 後, Folin 試藥 100μl를 加하여, 30分間 反應시켜서, 750nm의 吸光度로 測定하였다. 이때 standard는 bovine serum albumin을 利用하여 定量하였다.

라. SDS-PAGE에 의한 過酸化 酵素의 分子量 測定

精製된 試料를 冷凍 乾燥機로 완전 濃縮하여 sample buffer와 混合한 後, 電氣永動하였다[1].

2. 過酸化 酵素가 細胞分裂및 細胞伸長에 미치는 影響

가. IAA 處理時 過酸化 酵素 活性 測定

精製된 過酸化 酵素와 濃度別 IAA를 混合하여 20℃에서 1時間 동안 反應시킨 後 變化되는 酵素活性을 測定하였다. Peroxide를 substract로 하여, 全體反應液 1ml[1.8mM benzidine & 0.9mM H_2O_2, pH 6.0+0.01ml(酵素液+IAA)]를 2分間 反應시킨 後, 610nm의 吸光度를 unit로 하여, 活性을 求하였다[7].

나. 過酸化 酵素가 細胞分裂에 미치는 影響

36시간 동안 잘 發芽된 귀리를 選拔하여, 精製된 過酸化 酵素를 20mM ammonium acetate, pH 5.0에 透析後, IAA 濃度를 50μM되게 混合하여, petri-dish에서 22±2℃로 18時間동안 培養하였다. 無處理區는 column chromatography에서 使用한 buffer와 同一한 濃度로 處理하였으며, IAA 處理區는 50μM로 하고, 過酸化 酵素處理區는 (IAA+50unit peroxidase, 50unit peroxidase, 25unit proxidase/9ml buffer)로 稀釋하여, 細胞分裂을 Kim과 Bendixen[6]의 方法으로 調査하였다.

다. 過酸化 酵素가 細胞伸長에 미치는 影響

精製된 過酸化 酵素를 photassium phosphate-citrate, pH 5.0에 透析後, 귀리의 초엽에 處理하였다. Buffer 10ml안에 酵素活性이 50unit, 50unit+50μM IAA 및 50μM IAA 處理區로 하여, 暗狀態에서 초엽을 5mm씩 30個 잘라서, 6cm의 petri-dish에 넣고, 호일로 封하였다. 그 後 20℃에서 24時間 shaking하여 測定하였다[6].

結果 및 考察

過酸化 酵素 精製 : 보다 많은 過酸化 酵素源를 얻기 위해서, 귀리의 뿌리에 alachlor 1×10^{-4} M을 18時間 處理하여 培養하였다[7]. 培養된 귀리 根端組織을 20mM sodium acetate, pH 5.0에

Table 1. Purification of isoperoxidase from oat roots treated with alachlor. Protein was determined by the Lowry method[8].

Step	Total activity (unit)	Total protein (mg)		Specific activity	Purification fold	Yield (%)
Root tips (3.5g/70ml)	2,056	158.9		12.9	1	100
EtoH/AAt(35ml)	1,938	30.8		62.9	4.9	94.3
DEAE celluose	1,590	10.6		150.0	11.5	77.3
CM-sephadex						
A peak(41-57)	368.6	0.93				
B peak(58-78)	814.0	1.71	3.3	387.6	30.4	61.5
C peak(83-96)	82.4	0.68				

磨碎한 後, 冷却 遠心分離한 結果, 上澄液의 蛋白質量은 158.9mg이고, 全體 過酸化 酵素 活性은 2,056unit이었다(Table 1). 上澄液을 ethanol로 蛋白質을 沈澱시켜서, 20mM ammonium acetate, pH 5.0의 35ml에 溶解된 溶液의 酵素活性은 1,938unit로 酵素의 損失은 5.6%였다. 그러나 蛋白質量은 30.8mg으로, 거의 5倍나 줄었다. 이때 本 buffer에 溶解되지 않고, 沈澱된 蛋白質이 있었으나, 이는 過酸化 酵素 활성을 가지고 있지 않았다. 따라서 沈澱物質을 使用하지 않음으로써, 全體 酵素源의 蛋白質量은 減少되었다. Column chromatography는 本酵素가 强한

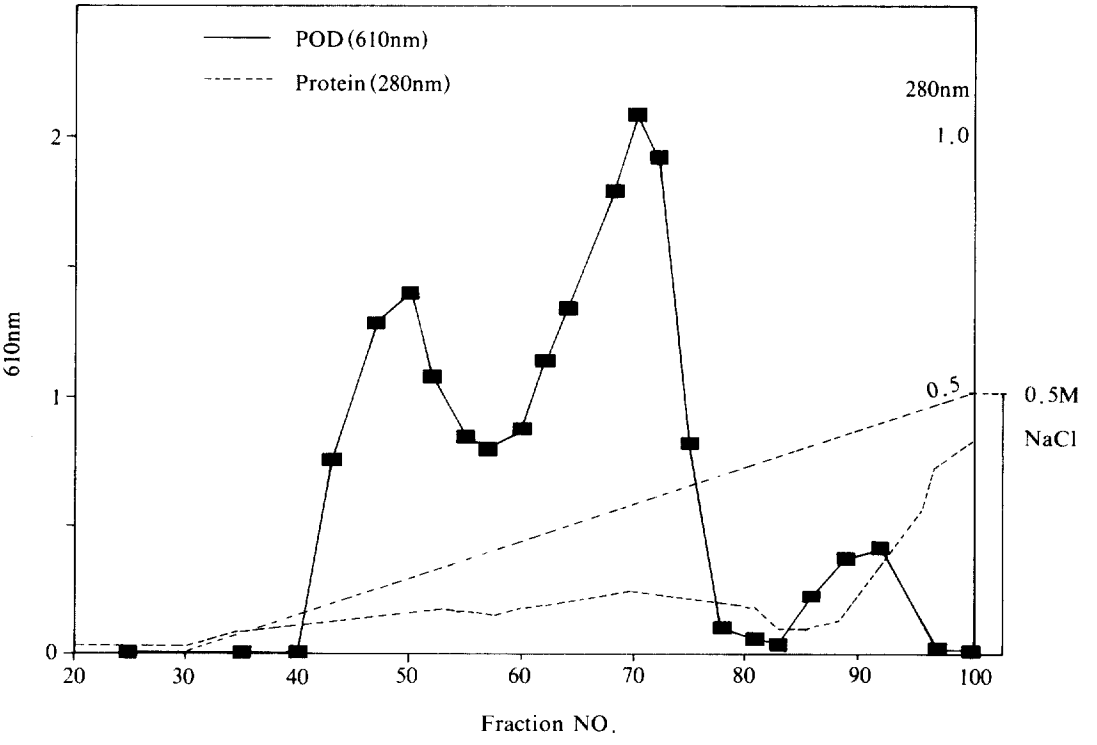

Fig. 1. Purification of isoperoxidase from oat root tips treated with alachlor. Peroxidase elution profile on CM-sephadex anion exchange medium. The column was eluted with 20mM ammonium acetate buffer(pH 5.0) at 0 to 0.5 M NaCl in the same buffer. Fractions were assayed for protein (280 nm) and peroxidase activity(610 nm).

陽이온을 띠고 있기 때문에 먼저 陰이온 교환수지인 DEAE-celluose을 이용하여 陽이온 蛋白質을 용출시킨 結果, 精製率은 11.6倍였다. 그 다음 陽이온 交換樹脂인 CM-sephadex를 利用하였으며, 0.5M NaCl로 gradient를 주어, 陽이온인 過酸化 酵素를 용출하였다. 그 結果, 過酸化 酵素는 80mM NaCl에서 부터 용출되기 始作하여, 380mM까지 용출되었으며, 이 濃度內에서 2個의 同位 過酸化 酵素 peak가 나타났다(Fig. 1). 高濃度인 400mM NaCl에서 480mM 사이에서도 弱한 하나의 同位 過酸化 酵素 peak가 나타났다. 3개의 同位 過酸化 酵素 peak中 A peak(fraction No.41-57)는 全體酵素 活性의 29.2%, B(fraction No.58-78)는 64.3%, 그리고 C(fraction No.83-96)는 6.5%로서, 전체 精製率은 30.4배로 나타났다(Table 1). *In-vitro* 狀態에서 精製된 同位 過酸化 酵素와 IAA를 濃度別로 1時間 反應시킨 後 酵素活性을 調査한 結果, 50μM IAA 處理는 5.6%, 100μM IAA는 18%, 200μM IAA는 26%가 抑制되는 현상을 보였다(Fig. 3).

SDS-PAGE에 의한 過酸化 酵素 分子量 測定: Column chromatography에서 얻은 3개의 同位 過酸化 酵素中 major peak(B: fraction No. 58-78)만을 모아서 濃縮한 後 sample buffer에 溶解시켜 SDS-PAGE에 의해 展開시켰다. 그 結果 귀리 根端에 存在하는 主된 過酸化 酵素(B fraction)의 分子量은 약 42,500으로 나타났다(Fig. 2).

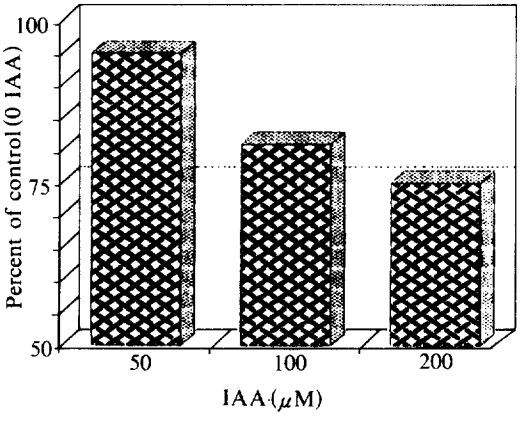

Fig. 3. Isoperoxidase activity was inhibited by IAA. Isoperoxidase were purified from oat root tips which had been grown in treatment with 1×10^{-4} M alachlor.

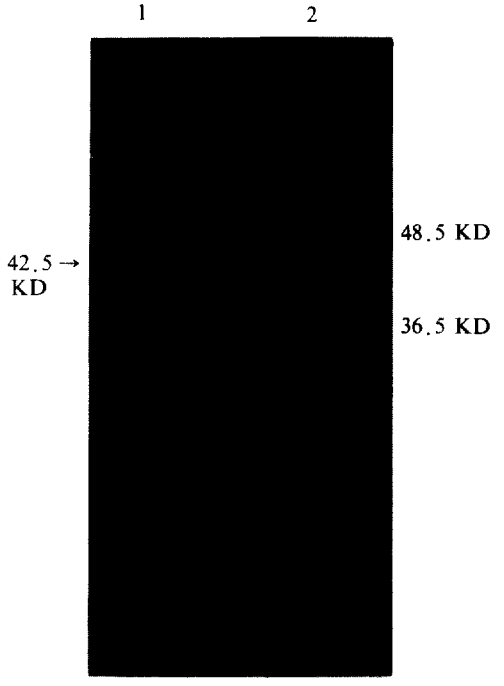

Fig. 2. Commassie blue stained SDS-gel of polypeptide of purified peroxidase(major peak). Lane 1: Peroxidase was showed mol wt of 42,500 in oat root tips. Lane 2 shows protein makers of the following mol wt.

Table 2. The effect of isoperoxidase on cell division from oat root tips after 18hr.

Treatment	Mitotic cell (1,000 cell)	% of control
50μM IAA	125.2±4.8	132.9
Control	94.2±5.7	100
Peroxidase (50unit/9ml)	28.8±2.1	29.8
Peroxidase (25unit/9ml)	42.6±4.2	44.7
Peroxidase (50unit)+50μM IAA	35.8±2.4	38.0

Each value represents the mean ± standard error of six root tip squashes each consisting of the 1,000 cells.

同位 過酸化 酵素가 귀리의 細胞分裂에 미치는 影響：細胞의 伸長을 促進하는 것으로 알려진 IAA와 植物의 成熟分化時 增加되는 過酸化 酵素가 細胞 分裂에 미치는 影響을 調査하기 위하여, column chromatography에서 精製된 同位 過酸化 酵素와 IAA를 混合하여, 9cm의 petri-dish에 귀리를 培養하였다. 그 結果, IAA 處理區의 分裂 細胞數는 無處理區에 比하여 32.9%가 增加되었지만, IAA와 過酸化 酵素(50unit)의 混合 處理區에서는 62%의 抑制를 보였으며, 同位 過酸化 酵素를 單獨 處理할 때는 無處理區에 比하여 약 70%의 細胞分裂이 抑制되었다(Table 2). 또한 過酸化 酵素 單獨 處理에 비하여 50μM IAA와 混用 處理할 때는 細胞 分裂數가 8.2% 增加되는 현상을 보였다. 50unit의 同位 過酸化 酵素를 18時間 동안 處理時, Fig. 4(B)에서 보는 바와 같이 細胞壁이 부서진 狀態로 나타났는데, 이는 分裂組織에서 IAA가 酸化되면서 內容物이 유출된 것으로 思料된다. 또한 이러한 現象은 alachlor를 處理할 때와 細胞形狀이 비슷하게 나타났다[7]. Ferrer 等[4]은 高等植物의 過酸化 酵素는 細胞나 細胞壁에 있는 IAA 濃度를 調節함으로써, 細胞의 모양이나 細胞의 形態的 變化를 가져 온다고 하였다. 따라서 귀리의 細胞分裂 抑制 및 細胞膜의 破壞는 過酸化 酵素에 의하여 IAA가 酸化되기 때문에 外生 IAA 및 內生 IAA을 酸化시킴으로써, 分裂이 抑制되고, 細胞의 破壞等과 같은 形態的 變化가 일어난 것으로 思料된다.

同位 過酸化 酵素가 귀리의 細胞伸長에 미치는 影響：精製된 同位 過酸化 酵素를 50unit 處理時, 細胞伸長은 無處理區에 比하여, 54.2%의 抑制 現象을 보인 反面, 50μM IAA와 混合하여 處理할 때는 48%로, IAA에 의하여 6.2% 더 細胞伸長이 增加되었다. 50μM IAA 單獨 處理時에는 無處理區보다 75.8% 伸長이 增加되었으며, 50μM IAA와 過酸化 酵素(50unit)를 混合하여 處理할 때는 IAA 單獨 處理區보다 70.6% 더 伸長이 減少되는 現象을 보였다. 이러한 現象은 細胞分裂 抑制에서와 같이 過酸化 酵素는 IAA의 活性을 顯著하게 抑制시킴으로써 나타난 結果로 思料된다.

摘　要

귀리의 根端 組織에 alachlor 1×10^{-4} M 處理

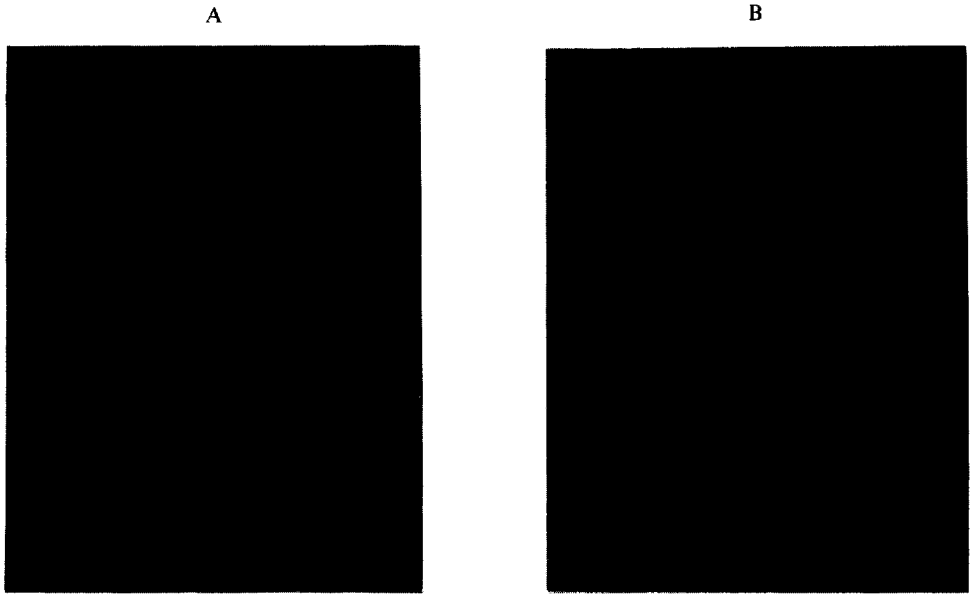

Fig. 4. Oat root cells were distoryed by treatment A : 20mM ammonium acetate buffer, pH 5.0 with isoperoxidase. B : 50unit isoperoxidase in 20mM ammo- nium acetate buffer, pH 5.0

Table 3. The effect of isoperoxidase on cell elongation from oat coleoptiles after 24hr.

Treatment	Coleoptile length (mm)	% of control
50μM IAA	2.11±0.09	175.8
Control	1.20±0.05	100
Peroxidase (50unit/10ml)	0.55±0.03	45.8
Peroxidase (50unit) + 50μM IAA	0.62±0.55	52.0

Each value represents the mean±standard error.

後 陽이온의 過酸化 酵素를 抽出하여 에탄올과 이온 교환 수지인 DEAE-celluose 및 CM-sephadex를 이용하여 精製한 結果, 약 30배의 精製率을 얻었으며, 3개의 陽이온을 띤 同位 酵素가 存在하였다. 귀리 根端에 存在하는 主된 過酸化 酵素(B fraction)는 最終 精製後 全體 同位 過酸化 酵素中 65%를 차지하였으며, 37배로 精製되었다. SDS-PAGE를 이용하여 B부분을 展開한 結果, 單一 band를 얻었으며, 이때 分子量은 약 42,500으로 推算되었다. 기내에서 同位 過酸化 酵素의 活性은 IAA에 의하여 減少되었다. 50unit 同位 過酸化 酵素를 귀리에 處理時 無處理區에 비하여 根端의 細胞分裂은 70.2%, 초엽의 細胞伸長은 54.2% 抑制되는 현상을 보였다.

引 用 文 獻

1. Abeles, F.B., L.J. Dunn, P. Morgens, A. Callahan, R.E. Dinterman, and J. Schmidt. 1988. Induction of 33-kD and 60-kD peroxidase during ethylene induced senescence of Cucumbe cotyledons. Plant Physiol. 87 : 609-615.
2. Abeles, F.B. and C.L. Biles. 1991. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiol. 95 : 269-273.
3. Canal, M.J., R.S. Thames, and B. Fernandez. 1988. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in Cyperus esculentus leaves following glyphosate applications. Physiol. Planta. 74 : 125-130.
4. Ferrer, M.A., M.A. Pedreno, R. Munoz, and A. Ros Barcelo. 1991. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indole-3yl-acetic acid. J. Plant Growth Regul. 10 : 139-146.
5. Kar, M. and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphe-noloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57 : 315-319.
6. Kim, J.C. and L.E. Bendixen. 1987. Effects of haloxyfop and CGA-82725 on cell cycle and cell division of oat (Avena sativa) root tips. Weed Sci. 35 : 769-774.
7. Kwon, S.W. and Kim, J.C. 1990. A study of mode of action of alachlor : . Effect of alachlor on peroxidase synthesis in oat (Avena sativa L.). Kor. J. Weed Sci. 9 (3) : 245-249.
8. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin reagent. J. Biochem. 193 : 265-275.
9. Maehly, A.C. 1977. Plant peroxidase. Method in Enzymeology 2(143) : 801-813.
10. Mellon, J.E. 1991. Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. Plant Physiol. 95 : 14-20.