

老衰中인 밀 앞에서 Ascorbate-Glutathione 회로 關聯 酵素의 發達에 대한 Benzyladenine의 效果

陳 昌 德*

江原大學校 自然科學大學 生物學科

본 연구는 H₂O₂ 축적이 수반되는 잎의 노쇠현상과 관련하여 세포질내 ascorbate-glutathione 회로의 역할 가능성과 이때 benzyladenine(BA)의 효과를 밝히기 위하여 노쇠중인 밀 앞에서 시토졸 ascorbate peroxidase(APX) isozyme 분리 및 발달양상과 ascorbate-glutathione 회로 구성효소들의 활성도 변화를 조사하였다. 성숙한 밀 제1엽 절편을 4일간 암배양하는 동안 증가된 엽록소 분해 및 H₂O₂ 축적으로 규정되는 잎의 노쇠발달중 대조구 앞에서는 시토졸 APX 활성도의 유의성 있는 증가가 관찰되지 않았으며 dehydroascorbate reductase(DHAR)의 활성도는 급격히 감소되었고, glutathione reductase(GR) 활성도는 완만하게 증가하였다. 그러나 BA로 처리된 앞에서는 시토졸 APX 활성도가 현저하게 증가하였으며 DHAR 활성도의 감소가 지연되어 나타났고 GR 활성도의 증가는 대조구에 비해 증진되었으며 내재성 ascorbate 함량의 감소율과 H₂O₂ 축적이 억제되었다. 3개의 시토졸 APX isozyme이 native-PAGE법에 의해 노쇠중인 밀 앞에서 발견되었으며 그 중 2개 isozyme은 높은 활성도를 보였다. 시토졸 APX isozyme의 발달양상의 경우 4일간의 암배양 동안 대조구 앞에서는 단지 2개의 isozyme band("a"와 "b")가 거의 같은 활성도를 지닌 채 출현하였으나 BA로 처리된 앞에서는 추가로 1개의 약한 isozyme band("c")가 더 나타났으며 "b" isozyme의 활성도가 약간 촉진되었다. 그러나 "a" isozyme 활성도는 대조구 앞에 비해 암배양시간 경과에 따라 현저하게 발달하였다. 대조구 일과 비교시 BA로 처리된 앞에서 시토졸 APX isozyme의 발달 및 APX, DHAR, GR의 전체 활성도가 함께 증진되어 그 결과 H₂O₂ 제거능력이 증대된 본 실험의 결과는 ascorbate-glutathione 회로가 밀 잎의 노쇠과정에 중요하게 작용하고 있음을 제시하였다.

주요어: 노쇠, 밀 잎, ascorbate-glutathione 회로, benzyladenine, ascorbate peroxidase

잎의 노쇠는 일반적인 세포과괴를 초래하는 산화반응을 포함하고 있어 노쇠과정의 진행속도는 H₂O₂ 및 산소라디칼 등과 같은 활성형 산소 분자들에 대한 조직세포의 항산화계 기능 수행과 관련되며 이 항산화계능은 호르몬에 의해 조절받고 있음이 알려졌다(Whistler, 1986; Pastori and Trippi, 1993). 항산화계 기능 수행과 관련하여 ascorbate-의존성 H₂O₂ 제거 대사회로인 ascorbate-glutathione 회로가 광합성에 의해 H₂O₂가 발생하는 엽록체에서 지배적으로 연구되어 활성형 산소 분자들에 의한 산화적 파괴반응으로부터 엽록체 구성성분의 방어 메카니즘으로서 그 역할의 중요성이 보고되었다(Nakano and Asada, 1981; Jablonski and Anderson, 1982; Salin, 1988). Ascorbate-glutathione 회로내 중요 효소인 ascorbate peroxidase(APX)에는 엽록체 APX와 시토졸 APX의 두 종류가 존재하는 것으로 알려졌는데(Chen and Asada, 1989; Mittler and Zilinskas, 1991; Koshiba, 1993) 이들의 효소학적 성질은 서로 달라 엽록체 APX는 전자공여체로서 ascorbate에 매우 선택

적이며 ascorbate 부재시는 매우 불안정하여 곧 불활성화되거나 대조적으로 시토졸 APX는 ascorbate 부재시에도 높은 안정성을 보이고 넓은 최적 pH 범위와 다른 전자공여체도 이용할 수 있는 능력을 지니며 엽록체 APX와의 면역학적 성질도 다르다. 현재 엽록체 APX는 광화학반응에 의해 생성된 H₂O₂를 제거하는 역할이 알려져 있으나 상대적으로 시토졸 APX의 생리적 역할을 명확하지 않은 상태이다(Koshiba, 1993). 시토졸 APX 연구와 관련하여 Klapheck 등(1990)은 엽록체가 없는 암발아중인 피마자 배유조직에서 시토졸 APX, dehydroascorbate reductase 및 glutathione reductase의 활성도 검출 및 변화양상을 측정함으로써 처음으로 비광합성 조직인 배유에서도 ascorbate-glutathione 회로가 존재하여 지방산의 β-산화시 발생하는 H₂O₂ 제거에 관여할 가능성을 보고하였으며, Dalton 등(1993)도 콩과 식물의 뿌리에서 질소고정시 발생하는 H₂O₂에 대한 방어메카니즘으로 ascorbate-glutathione 회로의 역할을 제안하였다. 그러나 이들 보고는 전체 시토졸 APX 활성도를 보이게 하는 각 특정 isozyme들의 구별 및 그들의 활성도 발달 양상과 역할을 규명하지 못하였다. 그러나 최근

*교신저자: Fax (0361) 51-3990
© 한국식물학회 [서울] 1995

Mittler와 Zilinskas(1993)는 시토크롬 APX 검출을 위한 새로운 native-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis) 방법을 개발하여 완두, 토마토 등의 잎에서 수종의 시토크롬 APX isozyme 존재를 발표하였다.

그러므로, 본 연구에서는 H_2O_2 축적으로 산화반응이 수반되는 잎의 노쇠 현상과 관련하여 세포질내 ascorbate-glutathione 회로의 역할 가능성과 이때 시토크롬계 합성호르몬인 benzyladenine의 효과를 밝히기 위해 노쇠중인 잎에서 시토크롬 APX isozyme 분리 및 발달양상과 ascorbate-glutathione 회로 관련 효소들의 활성도를 조사 분석하였다.

재료 및 방법

재료 식물

균일하게 선별된 밀(*Triticum aestivum* L. cv Chokwang) 종자를 1% sodium hypochlorite 용액에 10분간 담구어 소독하였다. 살균된 종자를 세척한 후 여과지 3장이 놓여진 투명한 폴리프로필렌 용기(11.5×11.5×10 cm)에 20 mL의 증류수를 가하고 64개씩 파종한 다음 $25 \pm 1^\circ C$ 의 온도 조건과 $20 W \cdot m^{-2}$ 의 연속광 조건하의 환경배양기내에서 6일간 발아 성장시켰다. 6일 후 제 1엽의 양끝 기저부와 정단부를 제외한 6 cm 길이의 잎 절편을 잘라내어 $10^{-5} M$ benzyladenine(BA)이 포함되어 있는 10 mM Na-borate 완충액(pH 6.0)과 BA가 포함되지 않은 10 mM Na-borate 완충액(pH 6.0)으로 구성된 각 배지(15 mL)에 각각 10개씩 띄우고 동일 조건의 배양기내에서 다시 4일간 암배양하면서 인위적으로 노쇠를 유도시켰다.

엽록소 함량 및 H_2O_2 함량의 측정

잎의 엽록소 함량은 10개의 잎 절편을 80% 아세톤(0.1% $CaCO_3$ 포함) 6 mL와 0.3 g의 석영사를 이용하여 마쇄한 후 원심분리(1000 g, 10분)하여 얻은 상정액을 Arnon(1949)의 방법에 따라 측정하였다. 잎 조직내 H_2O_2 함량은 Bernt와 Bergmeyer(1974)의 방법을 기초로 측정하였다. 10개의 잎 절편을 0.1 M Na-phosphate 완충액(pH 6.8) 4 mL와 석영사 0.3 g을 이용하여 마쇄한 후 원심분리(30,000 g, 20분)하여 상정액을 얻었다. 이 상정액중 0.5 mL를 취하여 peroxidic 시약(83 mM phosphate, 0.005% dianisidine, 40 μg peroxidase/mL 포함) 2.5 mL와 혼합한 후 $30^\circ C$ 에서 10분간 반응시킨 후 1 N perchloric acid 0.5 mL를 가하고 원심분리(1000 g, 10분)하여 얻은 상정액 3 mL의 흡광도를 436 nm에서 구하였다. 이때의 흡광도를 H_2O_2 표준곡선과 대조하여 잎 조직내의 H_2O_2 함량을 구하였다.

Ascorbate 함량의 측정

밀 잎에서의 ascorbate의 추출은 Kelly와 Latzko(1985)의 방법을 이용하였으며, 함량측정은 AOAC(1984)의 방법에 따라 2,6-dichloroindophenol에 대한 적정법으로 정량하였다. 즉, 10개의 잎 절편을 2% HPO_4 (2 mM EDTA 포함) 5 mL와 석영사를 이용하여 마쇄한 후 원심분리(4000 g, 10분)하여 ascorbate가 포함된 상정액을 얻어 indophenol로 적정하여 ascorbate 함량을 산출하였다.

효소용액의 추출 및 활성도 측정

APX(Ascorbate peroxidase)의 효소용액은 10개의 잎 절편을 70 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0) 4 mL와 0.3 g의 석영사를 함께 넣고 마쇄한 후 원심분리(20,000 g, 20분)하여 얻은 상정액으로 준비하였다. APX 활성도는 Asada(1984)의 방법에 따라 ascorbate가 산화될 때 290 nm에서의 흡광도 감소(흡광계수 = $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)로부터 분광학적으로 측정되었다. 이때 효소 반응은 50 mM K-phosphate 완충액(pH 7.0), 0.5 mM ascorbate, 0.1 mM H_2O_2 및 0.2 mL의 효소 용액이 포함된 2 mL의 반응액에서 진행되었다. DHAR(Dehydroascorbate reductase)의 효소용액은 10개의 잎 절편을 70 mM K-phosphate 완충액(pH 8.0) 4 mL와 0.3 g의 석영사를 함께 넣고 마쇄한 후 원심분리(20,000 g, 20분)하여 얻은 상정액에서 준비하였다. DHAR 활성도는 Asada(1984)의 방법에 따라 ascorbate의 생성에 기인되는 256 nm에서의 흡광도 증가로부터 측정되었다(흡광계수 = $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 효소 반응은 50 mM K-phosphate 완충액(pH 6.5), 0.5 mM dehydroascorbate, 5 mM GSH, 0.1 mM EDTA 및 0.2 mL의 효소 용액이 포함된 2 mL의 반응액에서 진행되었다. GR(Glutathione Reductase)의 효소 용액은 Pastori와 Trippi(1993)의 방법을 기초로 하여 10개의 잎 절편을 50 mM Tris-HCl 완충액(0.1 mM EDTA, 0.08 g/mL PVPP 포함, pH 7.6) 4 mL와 0.3 g의 석영사를 이용하여 마쇄한 후 원심분리(22,000 g, 20분)하여 얻은 상정액에서 준비하였다. GR 활성도는 Schaedle과 Bassham(1977)의 방법에 따라 반응액내의 NADPH의 산화(340 nm의 흡광도 감소)로부터 측정되었다. 이때 효소반응은 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.6), 0.15 mM NADPH, 0.5 mM GSSG, 3 mM $MgCl_2$ 및 0.3 mL의 효소용액이 포함된 2 mL의 반응액에서 진행되었다.

APX isozyme의 전기영동 분석

APX isozyme의 전기영동 분석은 Mittler와 Zilinskas(1993)

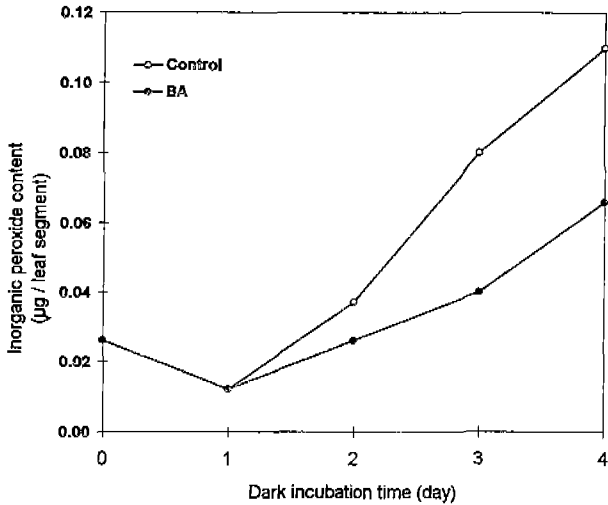


Fig. 2. Changes in inorganic peroxide levels in senescing wheat leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 µM BA.

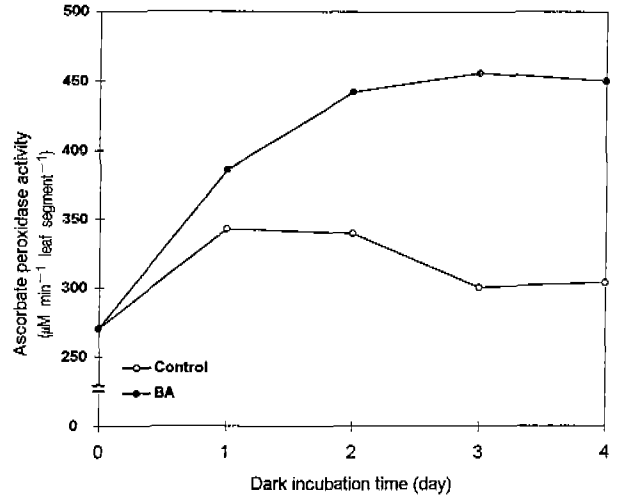


Fig. 3. The time course of the total activity of cytosolic ascorbate peroxidase in senescing leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 µM BA.

tathione 회로가 세포질내에서도 존재하여 작동할 가능성이 있는지를 조사하였다.

시토졸 ascorbate peroxidase 활성도 변화

엽록체 APX는 시토졸 APX와 달리 효소학적 성질이 매우 불안정하여 단지 온전한(intact) 상태로 순수 분리된 엽록체 시료에서만 효소 활성도가 검출될 뿐 잎 조직을 마쇄하여 직접 원심분리한 후 얻은 상등액(세포질 분획)에서는 곧 불활성화되어 검출되지 않는다(Mittler and Zilinskas, 1993). 그러므로 시토졸 APX 활성도는 엽록체 APX 활성도로부터 쉽게 구별될 수 있다. 본 연구에서는 H₂O₂ 축적 현상이 일어나는 밀 잎의 노쇠 발달 과정에서 시토졸 APX의 역할 수행을 규명하기 위해 노쇠 진전에 따른 시토졸 APX의 활성도 변화를 조사하였으며 동시에 시토졸 APX의 전체 활성도 값을 나타내게 하는 각 특정 시토졸 APX isozyme을 추출 분리하여 그들 isozyme의 발달양상을 분석하였다(Figs. 3 and 4). Fig. 3에서 보는 바와 같이 APX 활성도의 변화 양상은 암배양 시작시 가장 낮았으며, 암배양이 진행되면서 암배양 초기에 BA로 처리된 잎과 대조구 잎 모두에서 증가되는 경향성을 보였다. 그러나 대조구 잎에서는 암배양 1일 동안 약간 증가하였을 뿐 그 후 서서히 활성도가 감소되었다. 이에 반해 BA 처리구 잎에서는 암배양 2일까지 대조구에 비해 현저한 활성도 증가를 나타내어 암배양 후기인 3-4일째에도 높은 활성도를 유지하고 있었다. 이와 같은 APX 활성도 발달경향은 대조구 잎의 경우 노쇠 초기에

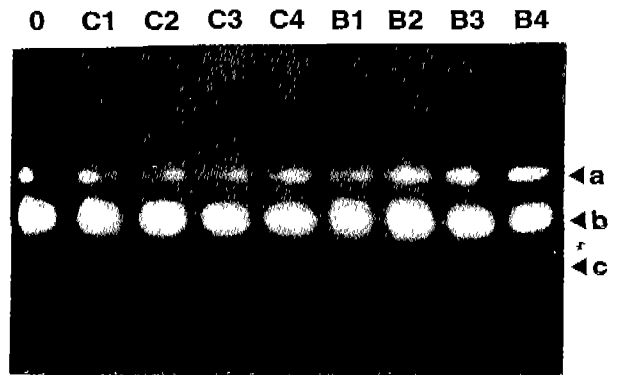


Fig. 4. Detection of cytosolic APX isozyme activities by the native-electrophoretic gel assay in soluble protein extracts from senescing wheat leaves treated with (B) or without (C) 10 µM benzyladenine. Numbers in each lane indicate the days of dark incubation period. All lanes contained 100 µg of soluble leaf protein extract.

H₂O₂ 축적에 대한 잎의 저항성을 의미하나 끝이어서 H₂O₂ 함량 수준의 조절에 관한 대사기능이 저하되는 것으로 생각된다. 그러나 BA로 처리된 잎에서는 암배양 4일째에도 H₂O₂ 대사 조절 기능이 활발하여 H₂O₂ 축적에 대한 높은 저항성을 보이는 것으로 생각된다. Ascorbate peroxidase는 특히, 같은 H₂O₂ 제거 효소인 catalase에 비해 H₂O₂에 대한 친화력이 매우 높아 낮은 농도의 H₂O₂에 대해서도 H₂O₂ 제거능력이 크며 또한 H₂O₂는 막투과성이 커서 그 주발생 장소인 엽록체, peroxisome 및 미토콘드리아에서 쉽게 세포질로 확산되어 나올 수 있는 반면에 catalase는 peroxisome내에만 국한되어 위치하고 있다

의 방법을 기초로 다음과 같이 실시하였다. 먼저 APX isozyme의 추출 및 전기영동을 수행하기 위해서 APX isozyme은 40개의 밀 잎 절편(생체량 2.5g)을 100 mM Na-phosphate 완충액(5 mM ascorbate, 1 mM EDTA 포함, pH 7.0) 3 mL와 석영사 0.3 g을 이용하여 마쇄한 후 원심분리(27,000 g, 30분) 하여 추출하였으며 이때 얻어진 APX isozyme 시료는 전기영동에 사용될 때까지 -80°C에 보관하였다. 시료내 단백질 농도는 BSA를 표준으로 사용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 측정되었다. APX isozyme 시료의 전기영동은 SDS를 제외시킨 것과 tank buffer가 2 mM ascorbate를 포함한 점을 제외하고 본질적으로 Laemmli(1970) 방법에 따라 nondenaturing, nonreducing 조건하에 실시하였다. APX isozyme의 전기영동적 분리는 10% polyacrylamide gel을 사용하여 일정전류(10-15 mA/gel) 및 4°C 조건하에서 2시간 동안 수행되었다. 이때 한 well당 loading 시료량은 100 µg 효소 단백질이 포함된 30 µL 부피로 하였다. APX isozyme 활성도 검출을 위해서는 gel상에서 분리된 isozyme band들은 50 mM Na-phosphate 완충액(2 mM ascorbate 포함, pH 7.0)내에서 30분간 평형화시키고(즉 10분마다 새로운 완충액으로 교환), 다시 50 mM Na-phosphate 완충액(4 mM ascorbate, 2 mM H₂O₂, pH 7.0)에서 20분간 배양한 후, 그리고 1분간 50 mM Na-phosphate 완충액(pH 7.0)으로 washing하고 계속하여 50 mM Na-phosphate 완충액(28 mM TEMED, 2.45 mM NBT 포함, pH 7.8)에 흔들어 침착시키면 청자색 배경의 gel상에서 무색의 band가 관찰될 때까지 약 10분간 반응을 시킨 후 증류수로 gel을 세척하여 반응을 중지시켰다.

결과 및 고찰

암배양 앞에서의 엽록소와 H₂O₂ 함량의 변화

잎의 노쇠과정은 엽록소와 단백질 함량의 현저한 감소현상과 H₂O₂의 축적으로 특징지어지며(Brennan and Frenkel, 1977; Kar and Feierabend, 1984; Hashimoto *et al.*, 1989; Pastori and Trippi, 1993), 엽록소 분해는 H₂O₂ 함량 수준과 더불어 노쇠 진행 정도를 나타내는 중요한 지표가 된다. H₂O₂는 안정된 산소라디칼 형태로서 여러 세포대사 과정중에 생성되며 즉시 제거되지 않으면 생물학적 독성을 일으키게 될 정도로 축적되는데(Salin, 1988; Mittler and Zilinskas, 1991), H₂O₂는 그것의 강력한 산화력으로 인하여 엽록체 효소의 불활성화와 세포 구성물질을 직접 산화시켜 파괴하거나 세포막 지질의 과산화반응을 통해 세포막이 파괴되며 결국 총체적인 세포의 손상을 일으킨다(Dhindsa *et al.*, 1981; Leshem, 1981; Whistler, 1986; Pastori and Trippi, 1993). H₂O₂ 및 산소라디칼 등과

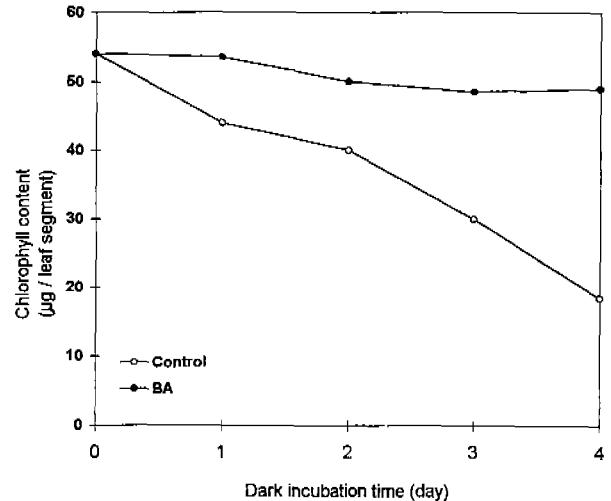


Fig. 1. Changes of Chl content in senescing wheat leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 µM BA.

같은 활성형 산소 분자들은 노쇠과정의 결과가 아니라 오히려 노쇠과정을 유발시키는 원인으로 간주되어 노쇠가 진행되는 속도는 이들 활성형 산소 분자들의 함량 수준을 조정함으로써 조절될 수 있으며 그런 조절은 조직세포의 항산화계 기능수행과 호르몬에 의해 조절받을 수 있음이 보고되었다(Whistler, 1986; Pastori and Trippi, 1993). 이와 관련하여 본 실험은 성숙한 밀 제 1엽 절편을 시토키닌계 합성호르몬인 10⁻⁵ M benzyladenine(BA)이 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에서 4일간 암배양하는 동안 엽록소 함량 변화와 노쇠과정 유발물질인 H₂O₂ 함량 변화를 측정하였다(Figs. 1 and 2). Fig. 1에서 엽록소 함량은 암배양 시간의 경과에 따라 계속 감소하였으며 Fig. 2에서는 H₂O₂ 함량이 1일째에는 약간 감소하다가 2일째부터는 점점 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 대조구와 BA 처리구로 나누어 살펴보면 엽록소 함량은 BA로 처리된 잎에서 그 분해가 거의 일어나지 않아 암배양 후 4일까지도 엽록소 함량이 조금 감소하였을 뿐 계속 높은 수준을 유지하였으나 BA로 처리되지 않았던 잎 조직에서는 현저하게 감소하였다. 이 결과는 BA 처리시 노쇠중인 벼 잎에서 엽록소 소실이 억제된다는 결과(Reddy *et al.*, 1985)와 함께 엽록소 분해 억제에 대한 BA의 강력한 효과를 보여주는 것이다. 또한 Fig. 2에 의하면 H₂O₂ 함량 수준의 증가가 대조구에 비해 BA 처리구에서 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 이것은 BA에 의한 밀 잎의 노쇠지연과 관련하여 BA의 역할이 세포내 항산화계 대사와 관련될 수 있음을 보여주는 것이라 하겠다. 이처럼 BA에 의한 H₂O₂ 함량 증가가 지연되는 현상을 알아 보기 위해 엽록체내의 H₂O₂ 제거 대사 회로인 ascorbate-glu-

(Klapheck *et al.*, 1990). 그러므로 엽록체와 세포질 모두에 존재하는 APX는 H₂O₂ 제거에 있어 매우 효율적인 효소가 될 수 있다.

시토졸 APX isozyme의 분리 및 발달 양상

암배양중인 밀 잎에서 시토졸 APX 전체 활성도 변화와 관련하여 시토졸 APX isozyme의 분리 및 발달양상을 조사하였다. 일반적으로 잎 조직에서 추출된 효소용액내의 전체 APX 활성도는 여러 종류의 비교적 안정한 APX isozyme을 포함하고 있을 것으로 생각되고 있다(Mittler and Zilinskas, 1993). 최근, 실제로 Mittler와 Zilinskas(1993)는 시토졸 APX 검출을 위한 새로운 native-PAGE 방법을 개발하여 완두, 토마토 등의 잎에 존재하는 수종의 안정한 시토졸 APX isozyme을 분리하였다. 그러므로 본 실험에서는 산화스트레스(H₂O₂ 축적)를 받는 잎의 노쇠현상과 관련하여 시토졸 APX 활성도 반응을 분석하기 위해 Mittler와 Zilinskas(1993)의 방법을 이용하여 시토졸 APX isozyme을 추출, 검색하였다(Fig. 4). Fig. 4에서 보는 바와 같이, 대조구 잎에서는 4일간의 암배양 동안 2개의 isozyme("a", "b")이 출현하였으며 이들 isozyme의 활성도 변화에 있어 암배양 1일째 "b" isozyme이 약간 발달되었으나 그 후 변화가 없었으며, BA로 처리된 잎에서는 미약한 "c" isozyme을 포함하여 3개가 출현하였다. 이때 "a" isozyme은 대조구 잎에 비해 암배양 시간의 경과에 따라 그 활성도가 현저히 발달하였으며 "b" isozyme도 암배양 2일째까지 점차 발달하고 있음을 보여주고 있다. 특히 모든 처리구에서 동량의 효소(단백질량 기준)를 loading한 점을 고려할 때 대조구에 비해 BA 처리구에서의 높은 활성도는 APX 효소의 *de novo* 합성보다는 기존의 APX 효소의 활성화에 기인될 가능성을 예상할 수 있으나 이 현상은 추후 계속 실험에서 시토졸 APX의 항체를 이용하여 면역화학적으로 규명되어야 한다. 이처럼 BA 처리구에서 isozyme의 활성도와 출현종류의 증가는 세포질 APX가 잎의 노쇠과정에 관련되며 더욱이 "a" isozyme은 노쇠과정에서 축적되는 H₂O₂의 제거에 보다 큰 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

Dehydroascorbate reductase 활성도 변화

APX가 전자공여체로서 ascorbate를 이용하여 H₂O₂를 물로 환원시키는 과정에서 ascorbate는 dehydroascorbate로 산화된다. 이때 DHAR 효소는 glutathione을 이용하여 dehydroascorbate를 다시 ascorbate로 재생시키는 반응을 촉매함으로써 ascorbate-glutathione 회로내에서 APX와 기능적으로 연관된다. 이와 같은 ascorbate 재생시스템의 존재가 대부분 광합성에

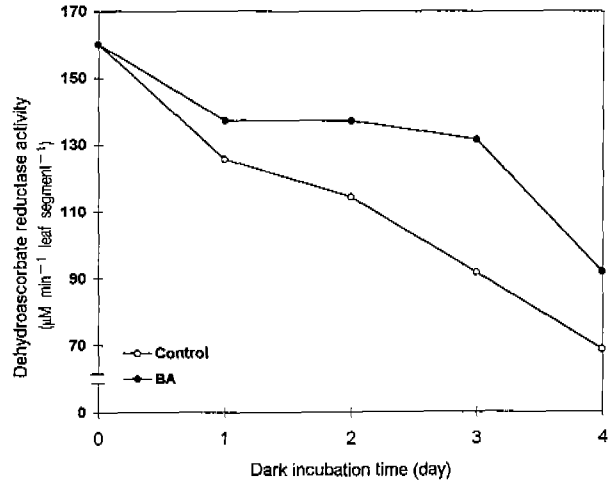


Fig. 5. The time course of dehydroascorbate reductase activity in senescing leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 µM BA.

의해 H₂O₂ 발생이 일어나는 엽록체에서 광범위하게 연구되어 왔지만(Anderson and Jablonski, 1981; Nakano and Asada, 1981; Salin, 1988) 최근 세포질에도 존재할 가능성이 보고되고 있다(Klapheck *et al.*, 1990; Dalton *et al.*, 1993; Sgheri *et al.*, 1994). 그러므로 암배양중인 밀 잎의 세포질에서 노쇠발달에 따른 DHAR 활성도의 변화를 조사하였으며 그 결과는 Fig. 5와 같았다.

Fig. 5에서와 같이 DHAR 활성도의 변화양상은 대조구 잎과 BA 처리구 잎 모두에서 암 배양 4일 동안 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 이때 대조구 잎에서는 급속한 활성도 감소를 보이고 있었으나 BA로 처리된 잎에서는 암배양 3일째까지 DHAR 활성도의 감소가 크게 억제되어 대조구 잎에 비해 높은 수준의 활성도를 유지하고 있었다. 이와 같은 DHAR 활성도 변화에 관련하여 동시에 세포내 ascorbate 함량변화를 분석하였다(Fig. 6). 그 결과 암배양 시간의 경과에 따라 대조구 잎과 BA 처리구 잎에서 모두 ascorbate 함량이 감소되고 있었으나 BA 처리로 노쇠가 지연되고 있는 잎에서는 대조구 잎에 비해 높은 수준의 ascorbate 함량을 유지하고 있었다. 이처럼 BA 처리시 ascorbate 함량이 높은 이유는 상대적으로 높은 DHAR 활성도에 의해 재생되는 ascorbate와 관련지어 볼 수 있으며 이것은 노쇠중인 밀 잎의 세포질내에서도 엽록체와 마찬가지로 ascorbate 재생시스템이 효율적으로 작용하고 있음을 의미하는 것으로 생각된다. Sgheri 등(1994)도 이끼류 식물에서 건조스트레스로 인하여 발생된 H₂O₂를 포함한 활성화 산소들을 제거하는 과정에서 내부 방어 메커니즘으로서 세포질 ascorbate-glutathione 회로가 효과적으로 관여하며 이때 dehydroascorbate는 DHAR에 의해 ascorbate로

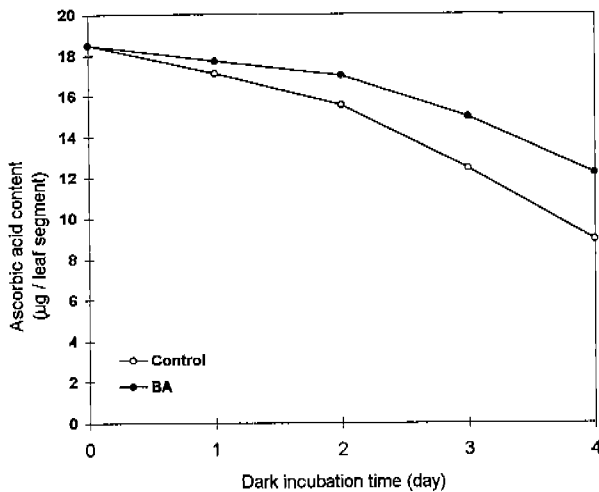


Fig. 6. Changes in ascorbate levels in senescing wheat leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 μ M BA.

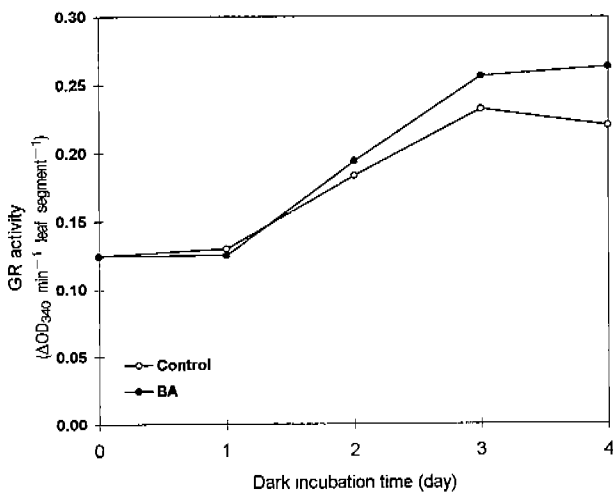


Fig. 7. The time course of glutathione reductase activity in senescing leaves during 4 days dark incubation in the presence (●) or absence (○) of 10 μ M BA.

환원될 수 있음을 최근에 보고한 바 있다.

Glutathione reductase 활성도 변화

GR은 reducing cofactor로서 NADPH를 이용하여 산화된 glutathione(GSSG)을 환원형 glutathione(GSH)으로 전환시키는 반응을 촉매함으로써 세포내 높은 GSH/GSSG 비율을 유지시키게 되며 이로 인하여 세포내 여러 대사의 조절에 중요 역할을 수행하고 있음이 보고되었다(Schaedle and Bassham, 1977; Tang and Webb, 1994). 이 효소는 동시에 dehydroascor-

bate로부터 ascorbate를 재생시키는 DHAR 효소의 촉매반응에 요구되는 glutathione을 제공하여 줌으로서 APX, DHAR과 함께 ascorbate-glutathione 회로를 구성하고 있다(Nakano and Asada, 1981; Jablonski and Anderson, 1982; Salin, 1988). 그러므로 밀 잎의 노쇠과정중 APX, DHAR 활성도 변화와 함께 GR 활성도의 변화를 조사하였으며 그 결과 Fig. 7에서와 같이 GR 활성도의 변화양상은 대조구 잎과 BA 처리구 잎 모두에서 암배양 시간의 경과에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 대조구 잎에서는 노쇠 진전과 함께 완만한 활성도 증가를 보이다가 4일째에는 감소되기 시작하였으나 BA로 처리된 잎에서는 암배양 4일째까지도 GR 활성도가 계속 증가되어 대조구에 비해 상대적으로 높은 수준을 보여주었다.

이처럼 시토키닌계 합성호르몬인 BA는 시토크 APX isozyme의 발달 유도과 함께 APX, DHAR 및 GR의 전체 활성도를 증진시키면서 조직세포내 H_2O_2 축적을 지연시키고 있는데 이 결과는 노쇠중에 있는 밀 잎의 세포질에서도 H_2O_2 제거와 관련하여 APX가 DHAR 및 GR과 기능적으로 연결되어 그 역할을 수행하며 동시에 BA에 의해 조절받을 수 있음을 의미하는 것으로 생각된다. Ascorbate-glutathione 회로가 엽록체에서 광합성의 결과 H_2O_2 축적에 기인되는 산화 스트레스에 대한 방어 역할을 수행한다는 것이 잘 알려져 왔지만(Nakano and Asada, 1981; Jablonski and Anderson, 1982) 최근, 급격한 H_2O_2 turnover가 발생하는 환경인 암발아 중인 피마자 배유와 콩과식물의 뿌리혹 세포 및 건조 스트레스를 받는 이끼식물의 세포내에서도 H_2O_2 를 제거하는 데 관련함이 밝혀져(Klapheck *et al.*, 1990; Dalton *et al.*, 1993; Tang and Webb, 1994; Sgheri *et al.*, 1994) 이 회로는 엽록체는 물론 세포질에도 존재할 수 있음이 제안되고 있다. 결론적으로 본 실험의 결과와 이들 보고들로부터 H_2O_2 축적으로 인한 노쇠중인 밀 잎에서도 세포질내에 H_2O_2 제거 역할 수행과 관련하여 ascorbate-glutathione 회로가 중요하게 작용하고 있으며 이때 그 회로의 활성은 BA에 의해 증진되는 것으로 생각되었다.

인 용 문 헌

- Arnon, D.L. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-5.
- Asada, K. 1984. Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* **105**: 422-429.
- Association of Official Analytical Chemists. 1984. Official Methods of Analysis. 14th Ed., Arlington, VA, pp. 844-854.
- Bernt, E. and H.U. Bergmeyer. 1974. Inorganic peroxides.

- In Methods of Enzymatic Analysis*. H.U. Bergmeyer (ed.). Vol. 4, Acad. Press, New York, pp. 2246-2248.
- Brennan, T. and C. Frankel.** 1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiol.* **59**: 411-416.
- Chen, G.X. and K. Asada.** 1989. Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiol.* **30**: 987-998.
- Dalton, D.A., L. Langeberg and N.C. Treneman.** 1993. Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiol. Plant.* **87**: 365-370.
- Dhindsa, R.S., P.L. Plumb-Dhindsa and D.M. Reid.** 1982. Leaf senescence and lipid peroxidation: Effects of some phytohormone and scavengers of free radicals and singlet oxygen. *Physiol. Plant.* **56**: 453-457.
- Hashimoto, H., Kura-Hotta and S. Katoh.** 1989. Changes in protein content and in the structure and numbers of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **30**: 707-715.
- Jablonski, P.P. and J.W. Andersen.** 1981. Light-dependent reduction of dehydroascorbate by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **67**: 1239-1244.
- Jablonski, P.P. and J.W. Anderson.** 1982. Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by ruptured pea chloroplasts. *Plant Physiol.* **69**: 1407-1413.
- Kar, M. and J. Feierabend.** 1984. Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta.* **160**: 385-391.
- Kelly, G.J. and E. Lutzko.** 1980. Prospect of specific enzymatic assays for ascorbic acid (Vitamin C). *J. Agric. Food Chem.* **28**: 1320-1321.
- Klapheck, S., I. Jimmer and H. Cosse.** 1990. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* **31**: 1005-1013.
- Koshihara, T.** 1993. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). *Plant Cell Physiol.* **34**: 713-721.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leshem, Y.Y.** 1981. Oxy free radicals and plant senescence. *What's New in Plant Physiol.* **12**: 1-4.
- Lowry, H., N.J. Rosenbrough, A.J. Farr and R.J. Randall.** 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mittler, R. and B.A. Zilinskas.** 1991. Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiol.* **97**: 962-968.
- Mittler, R. and B.A. Zilinskas.** 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* **212**: 540-546.
- Nakano, Y. and K. Asada.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **22**: 867-880.
- Pastori, G.M. and V.S. Trippi.** 1993. Antioxidative protection in a drought-resistant maize strain during leaf senescence. *Physiol. Plant.* **97**: 227-231.
- Reddy, K.P., S.M. Subnani, P.A. Khan and K.B. Kumar.** 1985. Effect of light and benzyladenine on dark-treated growing rice (*Oryza sativa*) leaves II. Changes in peroxidase activity. *Plant Cell Physiol.* **26**: 987-994.
- Salin, M.L.** 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* **72**: 681-689.
- Schaedle, M. and J.A. Bassham.** 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.* **59**: 1011-1012.
- Sgherri, C.L.M., B. Loggini, S. Puliga and F. Navari-Izzo.** 1994. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: Changes in response to desiccation and rehydration. *Phytochemistry* **35**: 561-565.
- Tang, X. and M.A. Webb.** 1994. Soybean root nodule cDNA encoding glutathione reductase. *Plant Physiol.* **104**: 1081-1082.
- Whistler, J.M.** 1986. Oxidative processes in biological systems and their role in plant senescence. *In Processes and Control of Plant Senescence*. A.H. Halevy and C. Frenkel (eds.). Vol. 8, Elsevier Publishing, New York, pp. 84-99.

(1995. 1. 15 接受)

Effect of Benzyladenine on Development of Enzymes Related to
Ascorbate-Glutathione Pathway in Senescing Wheat Leaves

Jin, Chang-Duck*

Department of Biology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The present study performed the isolation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) isozymes and analyzed the pattern of their activity development and also investigated the change in some other enzyme activities related to the ascorbate-glutathione pathway from the senescing wheat leaves. The aim of this work is to examine the possibility that in the cytoplasm of wheat leaves the ascorbate-glutathione pathway plays a significant role in relation to leaf senescence involving an H₂O₂ accumulation and then to show the effect of benzyladenine (BA) on that pathway. During the leaf senescence characterized by increases in Chl breakdown and H₂O₂ accumulation under the 4-day dark incubation of matured leaf segments; i) no significant increase of total cytosolic APX was observed, ii) a dehydroascorbate reductase (DHAR) activity was decreased rapidly, iii) a slight increase of glutathione reductase (GR) activity occurred. In the BA-treated leaves; however, i) the total activity of APX increased conspicuously, ii) the decrease of DHAR activity was relatively inhibited, iii) the GR activity increase was more enhanced, and iv) the decrease of ascorbate content and the increase of H₂O₂ content were retarded as compared with those of control leaves. Three isozymes of cytosolic APX were found by using a native-electrophoretic gel in senescing wheat leaves and two of them occurred with major activity. In the developmental patterns of cytosolic APX isozymes, only two isozyme bands ("a" and "b") appeared with almost constant activity through 4 days of incubation in the control leaves, while one additional weak isozyme band ("c") and a little increase of "b" isozyme activity were detected in the BA-treated leaves. Especially, the development of "a" isozyme activity increased remarkably compared with that of control leaves. The increased capacity for peroxide scavenging due to the enhanced activity of all 3 enzymes (APX, DHAR, GR) participating in the ascorbate-glutathione pathway in BA-treated leaves suggested that this pathway might play a significant role in the processes related to the wheat leaf senescence.

Keywords: senescence, wheat leaves, ascorbate-glutathione pathway, benzyladenine, ascorbate peroxidase

*Corresponding author: Fax +82-361-51-3990