

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill) 현탁배양세포에서 Superoxide Dismutase 활성

유순희^{1,2} · 허경혜¹ · 권석윤¹ · 이행순¹ · 방재욱² · 박상수*¹

¹한국과학기술연구원 생명공학연구소 식물생화학 Research Unit, ²충남대학교 생물학과

Superoxide Dismutase Activity in Suspension Cultured Cells of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill)

YOU, Soon-Hee^{1,2} · HUH, Gyung-Hye¹ · KWON, Suk-Yoon¹ · LEE, Heang-Soon¹ · BANG, Jae-Wook² · KWAK, Sang-Soo*¹

¹Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon, 305-606: and

²Department of Biology, Chungnam National University, Taejeon, 305-764. *Corresponding author.

We investigated changes in the superoxide dismutase (SOD) activity and SOD isoenzyme pattern in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*), which were compared with those of intact tomato plants. Two grams (fr wt) of cells subcultured at 15-day intervals were inoculated into 50 mL MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 30 g/L sucrose in a 300 mL flask and maintained at 25°C in the dark (100 rpm). The cell growth reached a maximum at 20 days after subculture (DAS), followed by a rapid decrease with further cultures. The cell colour changed from white to black from 23 DAS. The intracellular SOD activity (units/g cell dry wt) was significantly increased from 23 DAS and reached a maximum at 28 DAS (52,400 units), followed by a decrease with further cultures, whereas the extracellular SOD activity showed a maximum at 25 DAS (27,800 units/50 mL medium). The total SOD activity per flask showed a maximum at 25 DAS (35,700 units), in which the extracellular SOD activity occupied about 75%. The tomato cultured cells had four SOD isoenzymes and their patterns were well correlated with SOD activity without a qualitative change during the cell cultures. The intact tomato plants had an additional CuZnSOD isoenzyme, showing the different isoenzyme patterns from cultured cells.

Key words: cultured cells, extracellular SOD, intracellular SOD, isoenzyme

식물을 포함한 대부분의 호기성 생물은 병충해와 같은 생물학적 스트레스 뿐만 아니라 다양한 종류의 환경스트레스를 받으면, 생체내에서 생명의 필수원소인 산소(O₂)가 superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH \cdot) 등 반응성이 높은 독성의 활성산소종(active oxygen species)으로 변한다. 이들은 강한 산화력을 가지고 있어 세포막분해, 광합성억제, 단백질분해, DNA합성억제 등 생체내에서 심각한 생리적인 장애를 유발하며, 심한 경우 식물을 죽게 한다(Alscher and Hess, 1993; Scandalios, 1993). 생체는 이러한 활성산소종으로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 항산화효소와 ascorbate, α -tocopherol, glutathione 등의 저분자 항산화물질을 생산한다(Alscher and Hess, 1993). 식물을 포함한 대부분의 생물은

환경스트레스를 포함한 다양한 스트레스 조건에서 이들 항산화물질의 양이 증가한다. 생체내의 천연 항산화물질은 유용물질로서 부가가치가 높을 뿐 아니라 환경스트레스에 대한 방어기구에도 중요하게 관여한다. 최근 오존을 비롯한 환경스트레스에 내성을 갖는 식물체를 개발하기 위하여 SOD를 포함한 항산화효소의 유전자조작에 의한 형질전환 식물체 개발이 이루어지고 있다(Allen, 1995; Bowler et al, 1992).

SOD (EC 1.15.1.1)는 조직장해를 일으키는 superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$)을 분해하면서 살균성물질인 H₂O₂를 생성하여 조직을 보호하기 때문에 관절염, 화상 등의 치료효과가 인정되어 SOD의 약품개발이 활발히 진행되고 있으며 노화방지 등 화장품의 첨가제로 사용되고 있다(Oyanagui, 1989). 상업적으로 공급되는 대부분의 SOD는 동물과 미생물 유래

의 것이다. 저자들은 식물배양세포가 높은 산화적인 스트레스상태에서 배양될 것이라는 점에 착안하여 100 여종의 식물배양세포주를 대상으로 POD, SOD, CAT 활성을 조사하여, 지금까지 보고된 어떤 배양세포주보다 높은 POD와 SOD 고생산세포주를 선발할 수 있었다(Kim et al., 1994; You et al., 1996; Jang et al., 1996). POD 고생산세포주로 선발한 고구마(*Ipomoea batatas*) 세포주는 높은 POD 활성을 보여 현재 상업적인 대량생산과 POD의 생리적기능에 관한 연구가 진행중에 있다(Kim et al., 1994; Kwak et al., 1995, 1996; Huh et al., 1997). 따라서 본 논문에서는 배양세포주로부터 SOD를 효율적으로 생산하는 시스템의 확립과 배양세포가 지닌 항산화기구를 이해하기 위하여 SOD 고생산세포주로 선발된 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 세포주(You et al., 1996)를 이용하여 현탁배양에 따른 SOD의 활성변화와 isoenzyme pattern을 조사하고 토마토 식물체의 것과 비교하였다.

재료 및 방법

식물배양세포주 및 식물재료

토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Seokwang) 배양세포는 SOD 고생산 세포주로 선발된 토마토 캘러스(You et al., 1996)를 현탁배양하여 사용하였다. 세포생증량 2 g을 1 mg/L 2,4-D를 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체배지 50 mL과 함께 300 mL flask에서 25°C 암상태로 현탁배양(100 rpm)하였다. 세포의 계대배양은 15일 간격으로 하였다. 계대배양 후 3-5일 간격으로 세포를 수거한 후 감압여과하여 세포생증량을 측정하고 이를 60°C에서 24시간 건조시킨 후 건조증량을 측정하였다. 효소활성은 계대배양 후 3일에서 5일 간격으로 수거된 배양세포와 배지를 대상으로 측정하였다. 토마토 식물체는 온실에서 재배한 것으로 20 cm 자란 것을 사용하였다.

조효소액 추출

식물배양세포 또는 토마토 식물체의 생증량 0.4 g을 10% glycerol이 함유된 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH 7.8) 1 mL과 함께 얼음위의 유발에서 마쇄한 후, 8,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다.

SOD 활성측정

SOD 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라

xanthine, xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 효소측정을 위한 반응액[10 mM xanthine 2.5 mL, 10 mM cytochrome c 0.5 mL, 0.1 mM EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8) 47 mL의 혼합액]은 매번 조제하여 사용하였다. 반응액중 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 반응액을 만든 후 sodium dithionite로 매회 보정하였다. 상기 반응액 1 mL과 효소액(10 μ L 전후)을 큐벳에 넣은 후, 10⁻⁴ M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액(pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10 μ L를 첨가하여 효소반응을 시작하였다. 효소활성의 1단위(unit)는 25°C에서 2분간 반응하여 550 nm에서 흡광도변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다. 효소활성에 미치는 KCN과 H₂O₂의 영향은 최종농도가 각각 2 mM과 4 mM이 되도록 효소반응액에 첨가하여 조사하였다(Kanematsu and Asada, 1994).

SOD Isoenzyme 패턴분석

SOD의 native gel 전기영동은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 배양세포의 생장시기별 분석에서는 단백질농도가 동일량이 되도록 조효소액을 조정하여, 13% polyacrylamide gel에서 단백질을 215 V에서 1시간 전개시켰다. 배양세포와 식물체 부위별 isoenzyme 패턴을 비교한 실험에서는 조효소액을 9.8% polyacrylamide gel을 사용하여 80 V에서 5시간 전개시켰다. SOD의 검출은 gel을 염색액(50 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 0.2% TEMED, 0.026 mM riboflavin, 0.25 mM nitro blue tetrazolium의 혼합액)에 30분간 넣고 암상태에서 진탕한 후 빛을 조사하면서 10분간 반응시켰다.

결과 및 고찰

세포생장과 SOD 활성

단위세포 무게당 SOD활성(unit/g dry cell wt)은 계대배양 후 23일까지는 약 10,000 unit를 유지하다가 배양 후 23일부터 급격히 증가하여 28일째에 최고활성(52,400 unit)을 나타낸 후, 계속 배양함에 따라 급격히 감소하였다(Figure 1). Extracellular SOD활성은 배양 후 25일에 최고치(27,800 unit/50 mL medium)를 나타낸 후 감소하였다. Flask 전체의 SOD활성은 배양 후 25일에 최대치(35,700 unit)를 나타내었으며 이중 extracellular SOD활성이 전체활성의 약 75%를 차지하였다(Figure 2). 세포내 SOD (intracellular SOD) 활성은 배양 후 28일 전후를 제외하고 extracellular SOD 활성보다 낮았다. 한편 SOD의 비활성도(unit/mg protein)의 경우, 배양시기에 따라 약간의 차이는 있었지만 세포내에서는 150

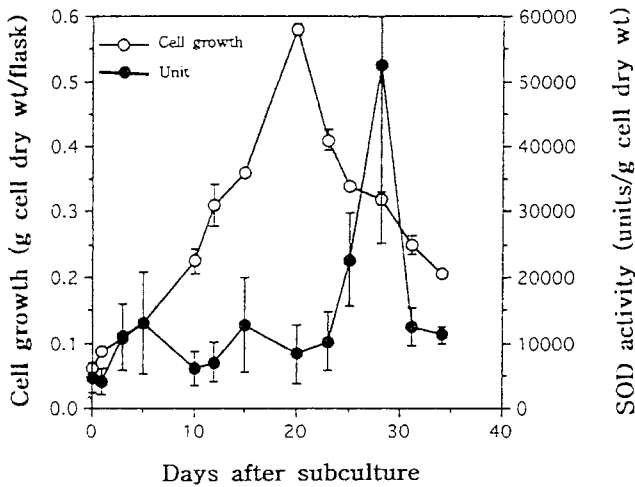


Figure 1. Changes in SOD activity during cell suspension cultures of tomato in MS medium containing 1 mg/L 2,4-D and 30 g/L sucrose. Results are means (\pm SE) of three replicates.

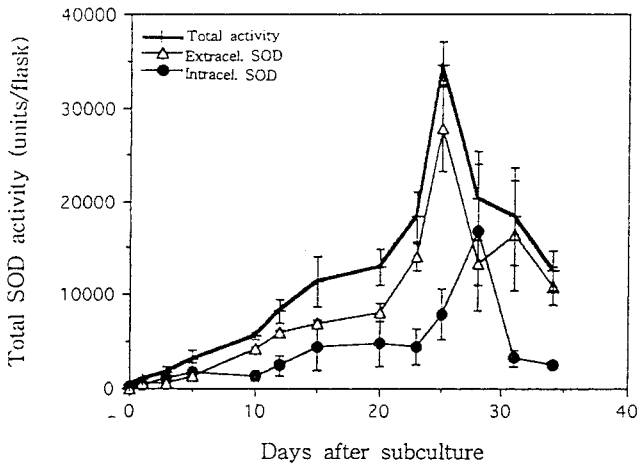


Figure 2. Time course of total SOD, intracellular SOD and extracellular SOD activities during cell suspension cultures of tomato. Results are means (\pm SE) of three replicates.

정도로 낮았는데 비해 세포밖으로 분비되는 것은 5,000 정도로 매우 높았다(결과 미제시). 따라서 토마토 배양세포로부터 분비되는 SOD는 대량생산을 위한 분리공정에 유리할 것으로 생각된다.

실험에 사용한 토마토세포는 배양 후 23일부터 흰색의 세포가 검게 변하였다. 배양 23일 이후의 단위세포 무게당 SOD 활성(unit/g dry cell wt)이 약 10,000에서 배양 28일에 52,000으로 크게 증가한 후, 배양 31일에는 약 10,000으로 떨어졌다. 세포가 검게되는 시기와 일치하여 세포생장이 크게 감소하면서 SOD활성이 크게 증가된 것은 세포를 검게하는 화학물질이 세포의 성장을 억제하며, 이에 따른 배양스트레스를 극복하기 위하여 세포내 SOD활성이 증가되는 것으로

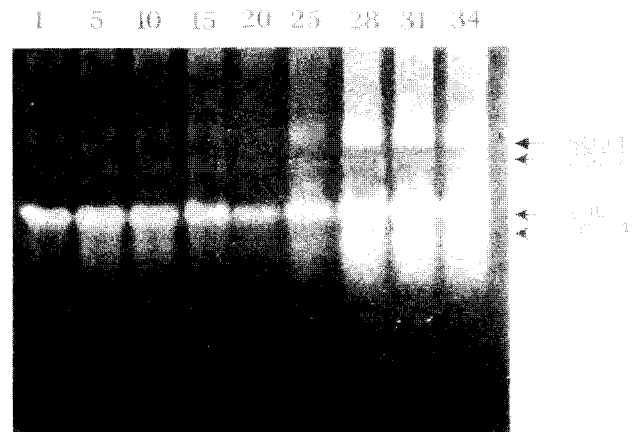


Figure 3. Isoenzyme patterns of intracellular SOD in suspension cultured cells of tomato. The number of each lane represents days after subculture. SOD activity was detected by negative staining solution using NBT after electrophoresis, in which 50 μ g protein was loaded to each lane.

사료된다. 한편 extracellular SOD 활성(unit/flask)은 계대배양 20일에 7,500에서 25일에 27,800로 크게 증가한 후, 다시 28일까지 약 15,000으로 감소하였다. 토마토 배양세포를 검게하는 물질은 항산화기구에 중요하게 관여 될 것으로 간주되며, 활성물질을 화학적으로 자세하게 구명할 필요가 있다. 토마토 배양세포는 배양스트레스를 연구하는데 좋은 소재일 뿐 아니라 SOD의 대량생산에도 활용될 것으로 기대된다. Choi 등(1995)은 방아풀(*Isodon japonicus*)의 캘러스가 성장하면서 갑자기 세포가 검게 변함을 보고하였고, 이의 원인물질은 polyphenolic 물질로 추정하고 있다.

배양시기에 따른 SOD 동위효소 패턴변화

배양시기별 SOD isoenzyme 패턴을 분석한 결과, 배양세포의 경우 모두 4개의 isoenzyme이 존재하는데 배양시기에 따른 새로운 isoenzyme의 생성과 소멸은 없었다(Figure 3). 세포생장에 따른 SOD isoenzyme의 강약은 SOD 활성과 같은 변화를 보였다. 편의상 전기영동에서 적게 이동한 isoenzyme 순으로 SOD1에서 SOD4(5)로 명명한다. SOD1은 배양 후 20일까지는 약한 밴드를 보였으나 세포가 검게되는 배양 후 23일부터 강하게 발현되었다. SOD2는 배양 후 3일째에 증가를 보이다가 배양 후 20일째까지 점차적으로 감소하였으며 25일째부터 다시 증가하였다. SOD3는 isoenzyme중에서 배양시기에 관계없이 가장 강하게 발현하였으며, SOD4는 배양 후 20일째까지는 매우 약하다가 배양 후 25일째부터 증가하여 배양 후 34일째까지 계속적인 증가를 보였다. 배지에서는 SOD3과 SOD4가 배양시기 전체에 걸쳐서 강하게 발현하였다(결과 미제시). 배양세포가 검게되면서 강하게 발현되는 SOD1은 세포를 검게하게 하는 phenolic

Table 1. Comparison of SOD activities of various tissues of tomato plant and *in vitro* cultured cells.

Materials	SOD activity (units/g dry wt)	Specific activity (units/mg protein)
Cultures (28 DAS)		
Cells	52,400	175
Media	—	5,053
Original tomato plant		
Leaf	351	17
Stem	300	56
Root	2,796	952

coumpounds로 추정되는 물질에 의해 유도되는 항스트레스성 isoenzyme일 가능성이 높다.

식물체의 SOD활성 및 동위효소 패턴분석

토마토 식물체에서 SOD 비활성도(units/mg protein)는 뿌리에서 가장 강한 활성(952 unit)을 보였으며 줄기, 잎의 순으로 높았다(Table 1). 식물체에서는 모두 5개의 동위효소가 존재하였는데(Figure 4), SOD5는 배양세포에서는 거의 발견되지 않는 식물체 특이적인 것으로 여겨진다. SOD isoenzyme은 H₂O₂와 CN⁻이온에 의한 저해활성에 의해 CuZnSOD, MnSOD, FeSOD으로 구분된다. 즉 CuZnSOD은 H₂O₂와 CN⁻이온에 의해 모두 저해를 받고, FeSOD는 H₂O₂에 의해서만 저해를 받지만 CN⁻이온에 의해서는 저해를 받지 않는다. MnSOD는 어느쪽에 의해서도 저해를 받지 않는다(Kanematsu and Asada, 1994; Rabinowitch et al., 1983; Furusawa et al., 1984). 4 mM H₂O₂와 2 mM KCN에 의한 활성저해 실험으로 토마토의 SOD1은 MnSOD로, SOD2와 SOD4는 FeSOD로, 그리고 SOD3와 SOD5는 Cu/Zn SOD인 것으로 추정되었다(결과 미제시). 토마토 식물체의 SOD isoenzyme의 패턴은 보고된 문헌과 일치하였다(Perl-Treves and Galun, 1991). 흥미로운 것은 FeSOD는 식물체의 엽록체에만 존재하는 것으로 알려져 있으나, 토마토 배양세포에서도 검출되어 배양세포의 FeSOD에 대한 정확한 특성구명이 이루어져야 하겠다. 토마토 식물체이므로부터 CuZnSOD와 FeSOD가 분리되어 특성이 구명된 바 있다(Perl-Treves and Galun, 1991; Kwiatowski and Kaniuga, 1984; Kwiatowski et al., 1985). 그러나 높은 산화적인 스트레스에서 배양되고 있는 것으로 여겨지는 토마토 배양세포를 대상으로 SOD에 관한 연구는 보고된 바 없어, 배양세포내의 SOD와 배지로 분리되는 SOD의 특성을 구명하여, 식물체의 것과 비교하면 배양세포의 항산화기구를 특징지을 수 있을 것으로 기대된다.

세포생장 후기에 세포가 검게 되면서 특히 extracellular SOD 활성이 증가하여 전체활성의 약 75%를 차지하였다.

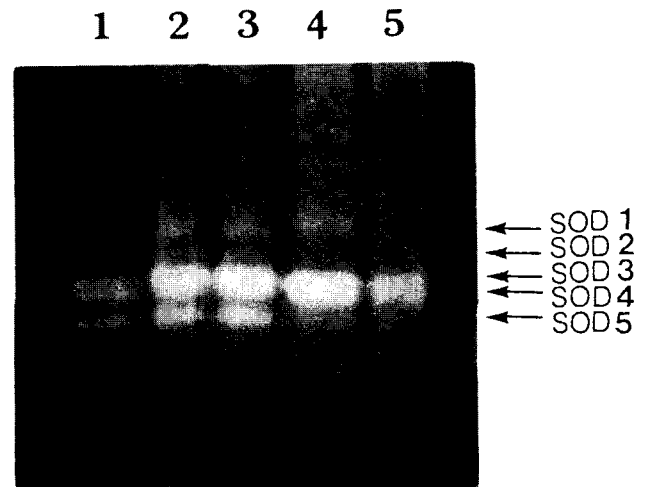


Figure 4. Comparison of SOD isoenzyme patterns of various tissues of intact tomato plants and *in vitro* cultured cells. 25 μ g protein was loaded to each lane. Lane 1: leaf extract of tomato plant, Lane 2: stem extract of tomato plant, Lane 3: root extract of tomato plant, Lane 4: extract from tomato suspension cultured cells, and Lane 5: extract from medium of tomato suspension cultures.

앞으로 세포내 SOD와 세포밖으로 분리되는 SOD를 정제하여 효소학적 특성을 분석할 예정이며, 세포생장에 따른 SOD 이외의 다른 항산화효소 활성의 변화를 밝히는 것도 배양세포가 지닌 배양특성을 이해하는데 중요한 것이라 생각된다. 특히 SOD는 다양한 물리/화학적 스트레스조건에서 활성이 증가되어 항산화기구에 관여함이 잘 알려져 있고, 최근에는 활성산소를 발생하여 세포활성을 갖는 파라콕, 오존, 저온 등 환경스트레스에 대한 내성기구 해석과 저항성식물 개발을 위해 SOD를 도입한 형질전환 식물체가 개발되고 있다(Allen, 1995; Bowler et al., 1992; Sen Gupta et al., 1993). SOD 고생산 토마토 배양세포에 다양한 물리/화학적 스트레스를 부여하고 이에 대한 SOD isoenzyme의 변화를 조사하여 배양세포의 항산화기구를 이해하며 나아가 스트레스관련 유전인자를 탐색하고자 한다. 따라서, 토마토 배양세포는 SOD 대량생산과 아울러 식물세포의 항산화기구를 이해하는 목적으로도 활용될 수 있으리라 기대된다.

적 요

Superoxide dismutase (SOD) 고생산세포주로 선발된 토마토(*Lycopersicon esculentum*) 배양세포를 사용하여 현탁배양에 따른 SOD 활성과 isoenzyme의 변화를 조사하고 토마토 식물체의 것과 비교하였다. 현탁배양은 세포생중량 2 g을 1 mg/L 24-D, 30 g/L sucrose를 함유한 MS 배지 50 mL과 함께 300 mL flask에서 25°C 암상태로 배양(100 rpm)하였다. 세포생장은 계대배양후 20일에 최고점에 도달한 후, 급격히

감소하며 배양 후 23일부터 세포가 검게 변하였다. 세포 단위 무게당 SOD활성(unit/g dry cell wt)은 배양 후 23일부터 증가하여 28일째에 최고활성(52,400 unit)을 나타낸 후 급격히 감소하였다. 세포 밖으로 분비되는 extracellular SOD활성은 배양 후 25일에 최고치(27,800 unit/50 mL medium)를 나타낸 후 감소하였다. Flask 전체의 SOD활성은 배양 후 25일에 최대치(35,700 unit)를 나타내었으며 extracellular SOD활성이 약 75%를 차지하였다. 토마토 배양세포에는 4개의 SOD isoenzyme이 존재하며, isoenzyme의 패턴변화는 세포생장에 따른 효소활성의 변화와 일치하였다. 토마토 식물체는 배양세포에 없는 CuZnSOD가 존재하며 배양세포와 식물체 조직사이에는 서로 다른 isoenzyme 패턴이 존재함을 알 수 있었다.

사사-본 연구는 국책 생명공학기술개발사업(NB0280)과 농림수산 기술개발사업(AG190M)의 연구결과이다. 원고의 세심한 논평과 수정을 해준 유장렬박사에게 감사한다.

인 용 문 헌

- Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107: 1049-1054
- Alscher RG, Hess JL (1993) Antioxidants in Higher Plants. CRC Press, Boca Raton, pp 1-174
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44: 276-287
- Bowler C (1994) Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13: 199-218
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 43: 83-116
- Bradford MM (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
- Choi KS, Lee JG, Lee HY (1995) Formation of phenolic compounds from the callus of bangah (*Isodon japonicus* Hara). *Biosci Biotech Biochem* 59: 1780-1781
- Furusawa I, Tanaka K, Thanutong P, Mizuguchi A, Yazaki M, Asada K (1984) Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant Cell Physiol* 25: 1247-1254
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS (1997) Molecular cloning and characterization of anionic and neutral peroxidase cDNAs from sweet potato suspension-cultured cells and their differential expression in response to stress. *Molecular and General Genetics* (in press)
- Jang MS, Huh GH, Kim SW, Park IH, Liu JR, Kwak SS (1996) Comparison of catalase and other antioxidant enzyme activities in various plant cell lines. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 157-160
- Kanematsu S, Asada K (1994) Superoxide dismutase. In T Fukui, K Soda, eds, *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis*, Kodansha, Tokyo, pp 191-210
- Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean J Bioch* 27: 132-137
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR (1995) Acidic peroxidase from suspension cultures of sweet potato. *Phytochemistry* 39: 981-984
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR (1996) Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in suspension cultures of sweet potato. *Phytochemistry* 43: 565-568
- Kwiatowski J, Kaniuga Z (1984) Isolation and characterization of cytosolic and chloroplastic isozymes of Cu, Zn superoxide dismutase from tomato leaves and their relationships to other Cu, Zn superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 874: 99-115
- Kwiatowski J, Safianowska A, Kaniuga Z (1985) Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves *Lycopersicon esculentum*. *Eur J Biochem* 146: 459-466
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (Hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Oyanagui Y (1989) SOD and Active Oxygen Modulators: pharmacology and clinical trials. *Nihon-Igakukan*, Tokyo, pp 1-859
- Perl-Treves R, Galun E (1991) The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology* 17: 745-760
- Rabinowitch HD, Clare DA, Crapo JD, Fridovich I (1983) Positive correlation between superoxide dismutase and resistance to paraquat toxicity in the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Arch Biochem Biophys* 225: 640-648
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol* 101: 7-12
- Sen Gupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* 103: 1067-1073
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 103-106

(1997년 1월 20일)