

무우 유식물의 자엽과 뿌리에서 Cadmium 이온과 Polyamine 처리에 의한 아미노산 변화의 분석

조봉희 · 박선영

수원대학교 자연과학대학 생명과학부
(1997. 10. 8 접수)

Analysis of the Change of Amino Acids by Cadmium and Polyamine-Treatment in Spring Radish Young Cotyledons and Roots

Bong-Heuy Cho and Sun Young Park

Division of Life Science, the University of Suwon, Suwon 455-741, Korea
(Received October 8, 1997)

요 약: 봄무우 유식물의 자엽과 뿌리에 Cd^{2+} 이온을 처리하여 생체내에 아미노산의 변화를 조사하였다. 자엽에서는 Cd^{2+} 이온의 처리로 Asp는 감소하나 Ala, Phe, Typ, Ilu, Val, Lys과 Arg의 농도가 더 증가되었다. 자엽에다 Cd^{2+} 이온과 polyamine(PA)를 동시에 처리하면, Lys과 Arg의 농도가 급속히 감소하였으나, 다만 Pro의 농도는 증가되었다. 뿌리에다 Cd^{2+} 이온을 처리하면 알칼리성 아미노산인 His, Lys, Arg의 농도가 증가되었다. 그러나 Cd^{2+} 이온과 PA를 동시에 처리하면, Lys과 Arg의 농도는 감소되었고, 다만 Pro의 농도는 증가되었다. 이 결과는 Pro는 PA에 의해 stress에 대하여 유도되었고, 다른 아미노산 농도의 변화는 생체내에서 stress에 대항하는 대사와 관련이 있을 것으로 보여진다.

Abstract: The change of amino acids was analysed with cotyledons and roots of young spring radish by the treatment of Cd^{2+} ion and Cd^{2+} ion plus PA. The concentration of Asp was decreased by the treatment of Cd^{2+} ion, but Ala, Phe, Val, Ile, Typ, Lys and Arg was increased in the cotyledons. The concentration of Lys and Arg was decreased by the treatment of Cd^{2+} ion plus PA at the same time. The concentration of basic amino acids, His, Lys and Arg was increased by the treatment of Cd^{2+} ion, and decreased by the treatment of Cd^{2+} ion and Cd^{2+} ion plus PA in the roots. Only the concentration of Pro was increased by the treatment of Cd^{2+} ion plus PA. This results showed that Pro was induced against stress of PA, and assumed that the change of other amino acids concentration may be relation to the metabolism against stress.

Key word: amino acids, cadmium, polyamine, cotyledon, root

1. 서 론

Polyamine(PA)은 식물, 동물 및 미생물에 존재하여, 생리적으로 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁻² PA는 식물에서는 생장, 발생, 분화 등에 관여하고, 노화를 억제시키는 생장조절물질에 역할을 담당한다.²⁻⁵

식물에서 PA 생합성은 arginine decarboxylase

(ADC)에 의해서 arginine으로부터 합성되는 경우와 ornithine decarboxylase(ODC)에 의해서 ornithine 으로부터 합성되는 두 가지 경로가 있다.^{1,6} 이 두 경로를 거쳐서 합성된 putrescine(PUT)은 S-adenosyl-methionine decarboxylase(SAMDC)에 의하여 spermidine(SPDD)으로 전환된 후 spermine(SPM)으로 전환된다.⁶

PA는 생체내에서 stress와 밀접한 관련을 가지며,

stress에 대하여 합성되기도 한다.⁶ 생체내에서 potassium(칼륨) 이온의 부족은 PUT의 축적을 초래하고,⁷ 그의 다른 여러 종류에 stress 요인에 의하여 PA이 생체내에서 합성되어 축적된다.⁸ PA은 저온에 저항력을 지닌 식물에서 발견되고,⁹ 식물의 외부에다 처리시킨 PA은 저온과 염분에 대한 저항력을 증가시켰다.⁹⁻¹⁰

만약 식물이 cadmium같은 중금속에 의해 stress을 받으면, 세포내에 proline을 축적시켜서 중금속으로 인해 유발된 세포내에 갑작스러운 수분의 고갈을 막아서 stress에 대항하는 것으로 보고되었다.¹¹ 그러나 무우에서는 중금속으로 인하여 유도되는 세포내에 proline의 축적은 없었으므로,¹² 중금속 stress에 대항하는 식물에 반응도 다양함을 보여주고 있다.

토양에서는 대부분 중금속들이 무기화합물 또는 유기화합물과 결합되거나, Fe, Mn, Al 등의 수산화물로 존재한다.^{13,14} Pb, Cd는 식물에 수송된 후 강한 독성을 줄 뿐만 아니라, 먹이연쇄로 다른 생물체로 이동되기 때문에 중요한 연구대상이 된다.¹⁵ 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 Cd²⁺ 이온이 생체내로 이동된 후 Cd²⁺ 이온에 의한 생리 및 생화학적인 연구는 거의 없는 상태다. 따라서 본 연구에서는 봄무우의 어린 자엽과 뿌리에 중금속인 cadmium을 처리하였을 때 생체내에 변화하는 아미노산의 분석과 중금속과 PA을 동시에 처리하였을 때 PA이 중금속에 의하여 발생하는 피해에 대하여 생체내에 자유 아미노산에 어떤 변화를 유발시키는지 분석하였다.

2. 실험방법

2.1. 기기 및 시약

분석에 사용한 기기는 cold microcentrifuge(VS-1500, CF, Vision Scientific Co, Ltd.), cold lab chamber(KMC-12021, Vision Scientific Co., Ltd.), 아미노산 자동분석기(Biotronik, LC-5001, Germany)을 사용하였다. 분석에 관한 모든 시약은 Sigma Co.(U.S.A)를 사용하였다.

2.2. 실험재료 및 배양조건

실험재료로 사용한 장춘 대형 봄무우 씨(F1 Spring White)는 서울 종로에서 구입하였다. 종자에 붙어 있는 불순물을 제거시키기 위해 무우 종자를 2%

NaOCl에서 10분간 소독한 후 흐르는 물에서 하루밤 씻었다. 소독된 종자는 비커에 스폰지를 이중으로 깔고 그 위에 여과지를 깔 후 소독된 종자를 여과지 위에 놓아 물을 빨아 들일 수 있게 하였고, 심은 후 20°C 암소에서 3일간 발아시켰다. 물은 매일 일정량을 규칙적으로 주었고, 습기를 일정하게 유지시켜 주어 발아조건을 균일하게 하였다.

2.3. 중금속과 polyamine의 처리

3일간 암소에서 발아된 어린 싹은 endosperm(배젖)을 제거한 후 자엽을 분리시켰다. 자엽은 1g씩 무게를 단 후 1 ppm Cd²⁺ 이온, 또는 1 ppm Cd²⁺ 이온 plus 1 mM PA를 동시에 처리하였다. 처리된 자엽은 20°C, 암소에서 24시간 동안 200 rpm에서 흔들면서 배양하였다. 처리가 끝난 자엽은 ice cold한 증류수로 잘 씻은 후 즉시 액체질소에 처리하여 아미노산 분석에 사용하였다.

2.4. 아미노산의 분석

즉시 액체 질소에 담가 얼게 한 1g의 시료를 분쇄하였다. 10 mM 인산완충액(pH 6.0) 1 mL를 넣고 4°C에서 계속 분쇄하였다. 분쇄된 시료는 12,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 침전물을 제거하였다. 침전물에 다시 1 mL의 동일 완충액을 넣고, 위의 과정을 반복하여 두 상등액을 합하였다. 상등액에 1 mL에 5% sulfosalicylic acid를 넣고 얼음 위에서 10분간 단백질을 침전시킨 후 침전된 단백질을 제거시켰다. 모아진 상등액에 위에 과정을 반복하여 남아 있는 단백질을 완전히 제거시켰다. 자유 아미노산을 분석하기 위하여 상등액 0.5 mL을 분석할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 자엽에서 중금속과 PA 처리에 의해 유도된 아미노산에 분석

무우의 자엽에다 Cd²⁺ 이온을 처리하면, 자엽은 stress를 받게 되고, 이 stress에 대하여 생체내에는 생리 및 생화학적인 변화가 일어나게 된다. 봄무우에서는 다른 연구 결과와는 다르게¹¹ Cd²⁺ 이온 처리에 의하여 아미노산인 proline이 축적되지 않아서,¹² 환경오염에 대한 척도로 사용될 수 없었다. 무우의 어린

Table 1. The change of free amino acids in cotyledons of *Raphanus raphanistrodes* under the treatment of Cd²⁺ ion and polyamine. The cotyledons were incubated at 20°C for 24 hr in the presence of 1 ppm Cd²⁺ ion and Cd²⁺ ion plus 1 mM polyamine

Material	Control 0 hr	Cd ²⁺ ion for 24 hr ($\mu\text{g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$)	Cd ²⁺ ion + PA for 24 hr
Aspartate & asparagine	310	30	210
Serine	856	750	860
Glutamate & glutamine	220	235	225
Proline	330	335	480
Glycine	30	35	20
Alanine	35	100	50
Cysteine	10	0	0
Valine	135	180	176
Methionine	10	15	8
Isoleucine	90	135	126
Leucine	140	185	160
Tyrosine	215	235	207
Tryptophane	56	148	110
Phenylalanine	70	125	120
Histidine	390	365	360
Lysine	550	1100	456
Arginine	315	405	285
Total	3756	4378	3853

Amino acids analysators are not distinguished from aspartate/asparagine, glutamate/glutamine, and threonine/serine.

자엽에서 Cd²⁺ 이온 처리로 어떤 종류의 아미노산들의 농도가 변화되는지를 분석하였다(Table 1). Cd²⁺ 이온의 처리로 생체내에는 산성 아미노산인 Asp가 감소되었고, 반면 Ala, Phe, Tyr, Ile, Val, Lys과 Arg 등의 농도는 현저하게 증가되었다. 특히 Lys과 Arg는 생체내에서 PA이 합성되는 선구물질로써⁸ 중금속 stress에 대하여 생체내에 축적되는 것으로 추정된다. 반면 Cd²⁺ 이온과 PA을 동시에 처리하면, Lys과 Arg의 농도가 감소되는 것을 보여주고 있다(Table 1). 이 결과는 외부 배지에도 처리한 PA이 세포내로 수송된 후 축적되어서,¹² Cd²⁺ 이온 stress에 대하여 저항력을 높여주기 때문일 것이고, 다른 하나는 Cd²⁺ 이온 처리로 인해 일부의 단백질들이 분해되거나 또는 새로 합성되었기 때문이다.^{3,16} PA처리로 인해 생체내에는 proline의 농도가 현저히 증가되어서 PA이 중금속에 대항하는 저항력의 증가와 관련되는

Table 2. The change of free amino acids in root of *Raphanus raphanistrodes* under the treatment of Cd²⁺ ion and Cd²⁺ ion plus polyamine. The roots were incubated at 20°C for 24 hr in the presence of 1ppm Cd²⁺ ion and 1 ppm Cd²⁺ ion plus 1 mM polyamine

Material	Control 0 hr	Cd ²⁺ ion for 24 hr ($\mu\text{g} \cdot \text{g fresh weight}^{-1}$)	Cd ²⁺ ion + PA for 24 hr
Aspartate & asparagine	35	5	4
Serine	335	0	370
Glutamate & glutamine	125	25	79
Proline	50	15	65
Glycine	50	15	50
Alanine	65	25	46
Cysteine	0	0	0
Valine	25	20	23
Methionine	0	0	0
Isoleucine	20	15	18
Leucine	15	15	21
Tyrosine	0	20	15
Phenylalanine	5	5	5
Histidine	20	75	27
Lysine	35	90	37
Arginine	0	80	15
Total	780	529	811

Amino acid analysators are not distinguished from aspartate/asparagine, glutamate/glutamine and threonine/serine.

것처럼 나타나고 있다.

3.2. 뿌리에서 Cd²⁺ ion와 Cd²⁺ ion plus polyamine 처리에 의한 아미노산의 변화

뿌리에는 자유 아미노산이 자엽에 비해 매우 낮게 분포되어 있다(Table 2). 뿌리에다 Cd²⁺ 이온을 처리하면, 뿌리세포는 중금속에 매우 예민하게 반응하고, 단백질의 분해가 급속히 촉진되었다.^{3,16}

그러나 대조구와 비교해서 Cd²⁺ 이온의 처리로 증가된 아미노산은 His, Lys과 Arg 등인 알칼리성 아미노산 등이다. 그러나 이들 아미노산은 중금속과 PA을 동시에 처리하였을 때 다시 급속도로 감소되었다. 총 아미노산의 변화를 보면 PA를 중금속과 동시에 처리하였을 때 높았다. 생체내에 Lys과 Arg의 증감은 아마도 대사작용과 깊은 관련이 있을 것으로 추정된다. 즉 생체내에서는 중금속의 피해로 Arg, Lys이 급속도로 합성되거나 또는 일부의 단백질들이 분해되어,^{3,16}

stress에 대항하기 위한 새로운 단백질들이 합성된다.³ Cd²⁺ ion stress로 인해 뿌리에서 Arg, Lys 농도의 증가는 급작스런 stress에 대항하여 증가되고, 외부배지에 PA를 첨가하면 PA는 생체내로 수송되어¹² 생체내에 Arg, Lys의 농도가 감소되는 것으로 나타나고 있다. 뿌리에서도 자엽의 결과와 마찬가지로 Cd²⁺ 이온과 PA를 동시에 처리하면, proline이 생체내에 증가되었다. Proline는 Cd²⁺ 이온만 처리할 때는 유도되지 않았고,¹² Cd²⁺ 이온과 PA를 동시에 처리할 때만 유도되었다. 이 결과는 PA이 세포내에 축적되어 중금속에 의해 받은 stress에 대항하여 proline을 세포내에 축적시켜서 수분의 고갈을 막아 주는 역할을¹⁰ 할 것으로 본다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학연구소 학술연구비 지원(BSRI-96-4417)에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. P. T. Evans and R. L. Malmberg, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 235(1989).
2. A. W. Galston, *Bioscience*, **38**, 382(1983).
3. B. C. Jarvis, P. R. Shannon, and S. Yasmin, *Plant Cell Physiol.*, **24**, 677(1983).
4. T. A. Smith, *Plant Growth Substances*, Academic Press, New York, 463(1982).
5. R. Kaur-Sawhney, L. M. Shih, H. E. Flores and A. W. Galston, *Plant Physiol.*, **69**, 405(1982).
6. T. A. Smith, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **36**, 117(1985).
7. R. Pistoeci, F. Keller, N. Bagni, and P. C. Matile, *Plant Physiol.*, **87**, 514(1988).
8. A. W. Galston, *The Physiology of Polyamine*, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, FC, 99(1989).
9. D. D. Songstad, D. R. Dunca and J. M. Widholm, *J. Exp. Bot.*, **41**, 289(1990).
10. R. Krishnamurthy and K. A. Baghwat, *Plant Physiol.*, **92**, 500(1989).
11. A. Saradhi and L. D. Daradhi, *J. Plant Physiol.*, **138**, 554(1991).
12. S. Y. Park, M. Y. Park and B. H. Cho, *Analytical Science Technology*, **9**, 134(1996).
13. W. H. Allaway, *Adv. Agron.*, **20**, 235(1968).
14. W. L. Lindsay, *Soil Sci.*, **56**, 41(1972).
15. B. L. Vallee and D. D. Ulmer, *Biochem.*, **41**, 91(1972).
16. S. Y. Park, *Dissertation*, 66-67(1996).