

다양한 제초제에 대한 담배 Photomixotrophic 배양세포의 반응

권혜경^{1,2} · 권석윤¹ · 이행순¹ · 윤의수² · 김진석³ · 조광연³ · 박상수^{1*}

¹생명공학연구소 식물생화학 Research Unit, ²공주대학교 생물학과, ³한국화학연구소 농약스크리닝팀

Responses of Tobacco Photomixotrophic Cultured Cells to Various Herbicides

KWON, Hye-Kyoung^{1,2} · KWON, Suk-Yoon¹ · LEE, Haeng-Soon¹ · YOON, Eui-Soo² · KIM, Jin-Seog³ ·
CHO, Kwang-Yun³ · KWAK, Sang-Soo^{1*}

¹Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
P.O.Box 115, Yusong, Taejon 305-600

²Department of Biology, Kongju National University, Kongju 314-701

³Agrochemicals Screening Team, Korea Research Institute of Chemical Technology,
P.O.Box 107, Yusong, Taejon 305-600

ABSTRACT To establish an efficient screening system for new herbicides using plant cultured cells, responses of tobacco photomixotrophic cultured (PM) cells to various herbicides with different modes of action were surveyed by measuring the cell growth and ion conductivity in medium. The cells were cultured in Murashige and Skoog (MS) medium containing 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin and 30 g/L sucrose at 25°C in the light (100 rpm). Chemicals were treated to suspension cultures of tobacco PM cells at the time of subculture. The cell growth and ion conductivity in the medium were investigated on 12 days after chemical treatment. The ion conductivity assay gave well correlated results to the cell growth inhibition data. The responses of tobacco PM cells were dependent on the modes of action of chemicals tested. Atrazine, an inhibitor of photosynthetic electron transport (PET), strongly inhibited both the cell membrane and cell growth (IC₅₀, about 1 μM). Butachlor (an inhibitor of cell division), glufosinate (an inhibitor of amino acid biosynthesis), and fluridone (an inhibitor of carotenoid biosynthesis) showed a dose-dependent inhibition. However, Quinclorac, a herbicide with an auxin activity, did not affect the cell growth and ion leakage. These results suggested that tobacco PM cells is suitable materials for the simple screening of new herbicides such as PET, amino acid biosynthesis, cell division inhibitors by measuring the cell growth and ion conductivity.

Key words: Cell growth, ion conductivity, PET inhibitor, screening system

서 론

제초제 개발을 위한 약제의 1차 효능평가는 온실에서 어린

식물체를 대상으로 하여 식물체의 생장억제를 조사하는 것으로 대부분 이루어지고 있다. 이 방법은 식물체에 대한 직접적인 제초효과와 선택성 등을 평가할 수 있는 장점이 있으나, 효능평가 초기단계에서 많은 양의 약제가 필요할 뿐만 아니라 비교적 많은 면적, 시간과 비용이 요구된다. 한편 의약품의 개발은 인체 세포주를 대상으로 *in vitro*에서 약제의 활성(세포독성)을 조사한 후, 활성이 있는 화합물을 대상으로 실험동

*Corresponding author. Tel 042-860-4432
E-mail sskwak@mail.kribb.re.kr

물을 사용하여 *in vivo* 활성을 조사하여 활성이 우수한 후보 물질을 사용하여 임상실험을 실시하는 것이 일반적이다 (Skehan et al. 1990). 따라서 제초제의 효능평가도 의약품 개발처럼 *in vitro*에서 활성평가를 일차적으로 실시한 후, 활성이 있는 화합물을 대상으로 식물체를 사용한 2차 실험을 하는 것이 합리적이라 생각된다 (Yoshida et al. 1989). 식물에서 분리한 무세포계 (cell-free system)를 이용한 제초제의 일차검정이 수행되기도 하였으나 식물체의 결과와 상관성이 없거나 낮아 실용적인 방법으로 이용되지 못할 가능성이 있다. 광합성 전자전달계 (photosynthetic electron transport, PET)를 억제하는 합성화합물의 경우, 틸라코이드막을 이용한 Hill 반응에서는 높은 활성을 지닌 화합물이라도 잡초에 대한 제초활성이 거의 없는 경우가 많다 (Asami et al. 1987; Sato et al. 1991).

식물배양세포기술은 형질전환 식물체의 개발, 유용식물의 번식, 유용물질의 생산 등 식물생명공학분야의 핵심기술이다. 식물배양세포는 비교적 균일한 세포집단이며, 투여한 물질의 흡수가 용이하고 배양환경을 자유롭게 정확하게 제어할 수 있는 점과 적은 시료와 비용으로 약제의 효능을 측정할 수 있다. 그러나 대부분의 식물배양세포는 엽록체의 분화가 거의 발달되지 않아 외부로부터 공급되는 탄소원에 의존하여 자라는 특징이 있다. 현재 사용되고 있는 제초제의 과반수 이상이 PET 저해제를 포함하여 엽록체에 작용하고 있어, 식물배양세포를 이용하여 제초제의 활성을 검색하기 위해서는 엽록체가 분화된 녹색배양세포를 사용할 필요가 있다 (Dalton 1980; Nishida et al. 1980; Sato et al. 1987). 녹색배양세포를 이용하여 배양세포의 성장과 산소전극계를 이용한 산소발생을 측정하여 제초활성을 조사할 수 있음이 보고된 바 있으나 실용적으로 이용되지 않고 있다 (Sato et al. 1991). 따라서, 보다 간편하면서 재현성 있는 *in vitro*계 제초제 검정방법의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 녹색배양세포를 이용한 새로운 제초제 검정법을 개발하기 위하여 담배 광혼용배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM 세포) 현탁배양에 작용기작이 다른 5종의 제초제를 처리하여 세포생장과 배지의 이온전도도 (ion conductivity)에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물배양세포

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. BY 4) 광혼용배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM 세포)는 생명공학연구소 유전자원센터 (PC10273)에서 보존중인 것을 사용하였다. 세포 생중량 0.7 g를 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin과 30 g/L sucrose를 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 액체배지 20 mL과 함께 100 mL flask에서 배양하여 25°C 광조

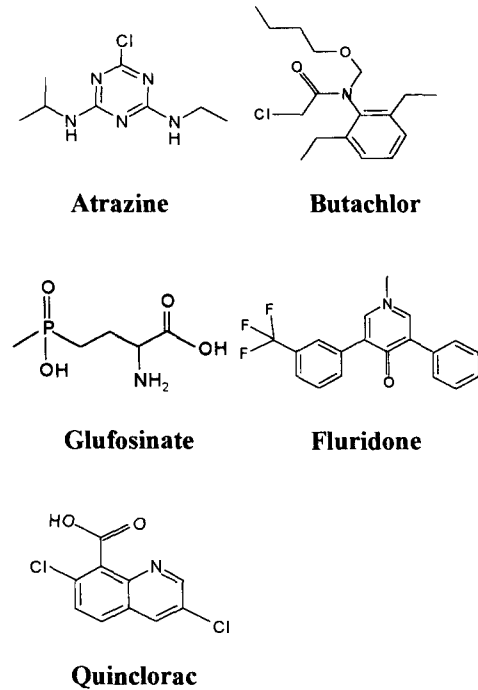


Figure 1. Chemical structures of herbicides with different modes of action.

건 (약 $15 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)에서 현탁배양하였다 (100 rpm). 세포의 계대배양은 15일 간격으로 하였다.

화합물의 처리

실험에 사용한 화합물 (Figure 1)은 광합성 전자전달계를 저해하는 atrazine, 세포분열을 저해하는 butachlor, 아미노산 생합성을 저해하는 glufosinate, carotenoid 생합성을 저해하는 fluridone 그리고 호르몬 (오옥신) 작용을 교란시켜 제초작용을 나타내는 quinclorac의 5종을 사용하였다. 화합물의 처리는 계대배양시에 농도별 (0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM)로 첨가하였다.

세포생장 및 이온 전도도 측정

계대배양 후 12일째의 세포를 수거한 후 감압여과하여 세포생중량을 측정하였다. 무처리에 대해 50%의 세포생장을 억제하는 농도 (IC_{50})를 구하여 각 화합물의 활성을 비교하였다. 배지의 이온 전도도 (ion conductivity)는 세포를 수거하여 얻어진 여과액을 대상으로 Orion사 전도도계 (Model 162)를 사용하여 측정하였다. 세포생장이 100% 억제된 플라스크 배지의 이온 전도도값에 대해 50%의 이온 전도도값을 나타내는 각 화합물의 농도를 IC_{50} 으로 하였다.

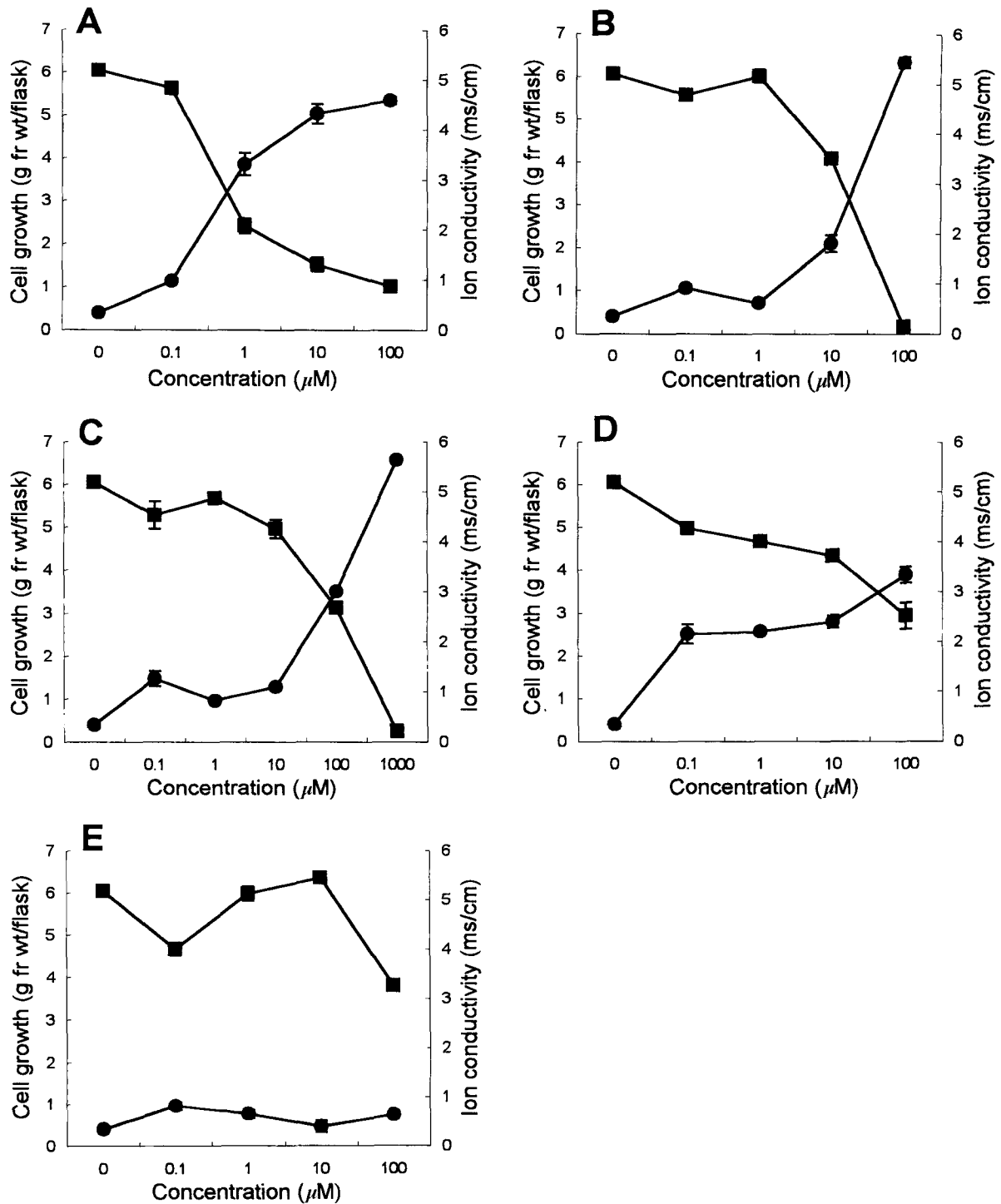


Figure 2. Effects of various herbicides with different modes of action on the cell growth and ion leakage in suspension cultures of tobacco photomixotrophic cultured cells. (A): atrazine, an inhibitor of photosynthetic electron transport; (B): butachlor, an inhibitor of cell division; (C): glufosinate, a glutamine synthase inhibitor; (D): fluridone, an inhibitor of carotenoid biosynthesis; (E): quinclorac, a herbicide with an auxin activity. - ■ - : cell growth (g fr wt/flask); - ● - : ion conductivity. Data are means \pm S.E. of three replications.

결과 및 고찰

세포생장에 미치는 영향

작용기작이 서로 다른 5종의 화합물을 담배 (*Nicotiana*

tabacum cv. BY4) 광혼용배양세포 (photomixotrophic cultured cells, PM 세포) 현탁배양에 처리하여 처리후 12일에 세포생장에 미치는 영향을 조사한 결과, 각 화합물은 작용기작을 반영하는 다양한 활성을 나타내었다 (Figure 2). 광합성전자전달계 (PET) 저해제인 atrazine (Figure 2A)이 사용

한 화합물 중에서 가장 낮은 농도에서 세포생장을 억제하였으며 (IC_{50} : 약 $1 \mu M$), 세포분열 저해제인 butachlor (Figure 2B)가 다음으로 활성이 높았다 (IC_{50} : 약 $10 \mu M$). 아미노산 생합성저해제인 glufosinate (Figure 2C)와 carotenoid 생합성저해제인 fluridone (Figure 2D)은 약 $100 \mu M$ 에서 IC_{50} 을 나타내었다. 그러나 호르몬 교란형저해제인 quinclorac (Figure 2E)은 세포생장에 거의 영향을 미치지 못하였다.

Atrazine은 엽록체 thylakoid막에 존재하는 D1단백질의 Qb 위치에 결합되어 PET를 저해함으로써 제초활성을 나타내는 화합물 (Fuerst and Norman 1991; Trebst 1987)로, 담배 PM세포에 높은 활성을 나타낸 것은 실험에 사용한 담배 PM세포가 엽록체가 잘 분화되어 식물체에 대한 저해활성을 잘 반영하는 것으로 사료된다. 실험에 사용한 담배 PM세포의 엽록체 함량은 성장단계에 따라 약간의 차이는 있지만 세포 건조중량 (g)당 5~10 mg이었다 (결과 미제시). 식물세포의 유사분열과정에 직접 작용하여 제초활성을 나타내는 butachlor가 비교적 높은 활성을 나타낸 것은 배양세포의 높은 세포분열특성을 반영하는 것으로 사료된다 (Ashton and Crafts 1981). Glufosinate는 glutamic acid에서 glutamine의 생성을 촉매하는 glutamine synthase (GS)를 비가역적으로 저해하여 유리암모니아를 축적하여 생체막상의 정상적인 생리기능을 저해하고 궁극적으로는 광합성능력을 감소시키는 경엽처리형 제초제 (Leason et al. 1982)로 많이 사용되고 있다. 식물 배양세포에서도 glufosinate는 GS의 저해활성을 잘 나타내고 있음을 알 수 있다. Carotenoids는 광합성조직에서 보편적으로 존재하는 색소이며 fluridone은 carotenoid 생합성과정상의 phytoene에서 ζ -carotene로의 탈수소반응을 촉매하는 phytoene desaturase를 저해한다. Carotenoids가 감소되면 광합성계의 항산화기능이 떨어지며 이로 인해 빛에 의해 여기된 엽록소가 파괴됨과 동시에 활성산소가 발생되면서 막과산화작용이 일어나 결국 백화 (bleaching)를 일으킨다 (Sandmann et al. 1992). 본 실험에서도 fluridone은 담배 녹색세포에 대해 백화현상을 일으키고 세포생장도 억제하는 것이 확인되었다. 이는 공시된 배양세포가 정상식물에서처럼 활발한 carotenoid 생합성과정을 가지고 있음을 의미한다. 오옥신 작용을 지닌다고 알려진 quinclorac (Grossmann 1998)은 세포생장에 거의 영향을 주지 않았는데, 배양세포 내의 내생 오옥신의 농도와 배지에 첨가하는 오옥신 (2,4-D)의 함량 등의 관점에서 자세하게 조사될 필요가 있다.

이온 전도도 값에 미치는 영향

각 제초제를 담배 PM세포에 처리한 후 세포막의 손상을 나타내는 배지의 이온 전도도 값을 측정된 결과, 화합물에 따라 다양한 반응을 보였으며 세포생장의 결과와 높은 상관성을 나타내었다 (Figure 2). PET 저해제인 atrazine이 사용한 화합물 중에서 가장 낮은 농도에서 세포생장을 억제하였으며

(IC_{50} : 약 $1 \mu M$), 세포분열 저해제가 다음으로 활성이 높았다 (IC_{50} : 약 $10 \mu M$). 아미노산 생합성저해제인 glufosinate와 carotenoid 생합성저해제인 fluridone은 약 $100 \mu M$ 에서 IC_{50} 을 나타내었다. 그러나 호르몬 교란형저해제인 quinclorac은 이온전도도 저해에 거의 영향을 미치지 못하였다. 본 실험의 결과에서 세포생장 저해곡선과 배지의 이온 전도도 곡선이 서로 만나는 점이 화합물의 IC_{50} 값에 해당되는 것임을 알 수 있다 (Figure 2). 따라서 배지의 이온 전도도 측정은 간편하면서 재현성이 좋은 신규 제초제의 탐색방법으로 유용할 것으로 시사된다. 현탁배양 증기에 약제를 처리하여 세포생장과 이온 전도도 값에 미치는 영향을 조사하였으나 계대배양시에 처리하는 것보다 약제의 감수성이 낮았으며 측정의 불편함이 있어 (결과 미제시), 약제처리 시기는 계대배양시에 첨가하는 것이 좋았다. 본 실험에서와 같이 계대배양시에 약제를 처리하였을 경우, 약효가 빠른 atrazine과 fluridone은 배양 후 6~8일 전후하여 외관상으로 효능을 평가할 수 있으나 (결과 미제시), 배양 후 12일 경에 조사하면 모든 약제의 효능을 평가할 수 있었다. 특히 이온 전도도 값의 측정에서는 12일 이전에도 효능을 쉽게 정량화할 수 있었다. 급후 다양한 합성화합물을 본 연구에서 확립한 *in vitro* 제초제 효능평가 시스템에 적용할 필요가 있다.

적 요

식물배양세포를 이용하여 효율적인 제초제 검정시스템을 확립하기 위하여 다른 작용기작을 가진 몇가지 제초제를 사용하여 담배 PM세포에 대한 반응성을 세포생장과 배지의 이온전도도를 측정하여 조사하였다. 담배 PM세포는 0.7 mg/L 2,4-D, 0.3 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose를 함유한 MS배지에서 $25^{\circ}C$, 광조건에서 현탁배양 (100 rpm)하였다. 계대배양시 약제를 처리한 후 12일째의 세포생장과 배지의 이온전도도를 측정된 결과, 이온전도도 측정결과는 세포생장의 것과 높은 상관관계를 나타내었다. 담배 PM세포에 대한 각 화합물의 반응성은 약제의 작용기작을 반영하면서 다양하였다. PET 저해화합물인 atrazine은 담배 PM세포에 가장 강한 활성을 나타내었다 (IC_{50} , $1 \mu M$). GS 저해제인 glufosinate, 세포분열저해제인 butachlor, carotenoid 생합성저해제인 fluridone은 농도에 비례하여 저해활성을 나타내었다. 그러나 오옥신활성을 지닌다고 알려진 quinclorac은 억제활성을 나타내지 않았다. 따라서 배지의 이온 전도도 측정은 간편하면서 재현성이 좋은 신규 제초제의 탐색방법으로 유용할 것으로 시사된다.

사사: 본 연구는 과학기술부 선도기술개발과제 (HS2323)의 연구결과이다.

인용문헌

- Ashton FM, Crafts AS** (1981) *Mode of Action of Herbicides*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York
- Asami T, Takahashi N, Yoshida S** (1987) Synthesis of conjugated enamino compounds inhibiting photosynthetic electron transport. *Agric Biol Chem* **51**:205-210
- Dalton CC** (1980) The biotechnology of green-cell cultures. *Biochem Soc Trans* **8**:475-477
- Fuerst EP, Norman MA** (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci* **39**:458-464
- Grossmann K** (1998) Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Sci.* **46**:707-716
- Leason M, Cunliffe D, Parkin J, Lea PJ, Mifflin BJ** (1982) Inhibition of pea leaf glutamine synthase by methionine sulfoximine, phosphinothricine and other glutamate analogues. *Phytochemistry* **26**:855-857
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nishida K, Sato F, Yamada Y** (1980) Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol* **21**:47-55
- Sandmann G, Kowalczykschroder S, Taylor HM, Boger P** (1992) Quantitative structure activity relationship of fluridone derivatives with phytoene desaturase. *Pestic Biochem Physiol* **42**:1-6
- Sato F, Takeda S, Yamada Y** (1987) A comparison of effects of several herbicides on photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic cultured tobacco cells and seedlings. *Plant Cell Rep* **6**:401-404
- Sato F, Yamada Y, Kwak SS, Ichinose K, Kishida M, Takahashi N, Yoshida S** (1991) Photoautotrophic cultured plant cells: A novel system to survey new photosynthetic electron transport inhibitors. *Z Naturforsch* **26c**:563-568
- Skehan P, Storeng R, Scudiero DA, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR** (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**:1107
- Trebst A** (1987) The three-dimensional structure of the herbicide binding niche on the reaction centre polypeptides of photosystem II. *Z Naturforsch* **42c**:742-750
- Yoshida S, Kwak SS, Takahashi N** (1989) Biorational approaches in herbicide screenings for economic weed control. *Proceedings of the 12th Conference of the Asian-Pacific Weed Science Society*. Seoul. pp81-87

(접수일자 1999년 5월 27일)