

Paraquat 스트레스를 받는 무 (*Raphanus sativus* L) 유식물에서 H₂O₂ 분해 효소에 대한 폴리아민의 효과

진창덕

강원대학교 자연과학대학 생명과학부

Effects of polyamines on hydrogen peroxide-scavenging enzymes in radish seedling plants under paraquat stress

Chang-Duck Jin

Division of Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract Application of exogenous polyamines (PAs) reduced the paraquat (PQ)-induced cotyledon injuries in radish seedling plants with 1 mM spermidine (Spd) being the most effective protectant. PQ injury symptoms in the cotyledons, e.g., large accumulation of H₂O₂, and losses of fresh weight, chlorophyll, and proteins, were significantly alleviated. Likewise, analysis of H₂O₂-scavenging enzymes such as catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) showed that pretreatment with Spd among PAs remarkably increased total CAT activity and strongly retarded PQ-induced rapid decline in total GPX activity. In a native gel assay, one CAT isozyme (CAT1) and two GPX isozymes (GPX1 and a newly synthesized GPX isozyme) proved to be more responsible for PQ tolerance, as manifested by the strong increases in their activities by Spd pretreatment. Based on these results, we can suggest that PAs (especially 1 mM Spd) may function as antioxidant protectors by invoking CAT and GPX enzymes which control the endogenous H₂O₂ level in radish cotyledons exposed to PQ.

서 론

식물이 비생물적(abiotic) 산화스트레스를 받고 있는 동안 세포 내 폴리아민 (polyamine) 함량이 급속히 변한다는 보고가 제안되었다 (Kurepa et al. 1998; Ye et al. 1997). 특히, putrescine 함량과 그 생합성 반응은 식물이 삼투스트레스 (Aziz and Larher, 1996), 오존 (Langebartels et al. 1991), 자외선-B (Kramer et al. 1991) 및 제초제 atrazine (Zheleva et al., 1994) 등 다양한 환경스트레스에 노출되었을 때 크게 증가한다고 보고되었다. 또한, 식물에 직접 폴리아민 처리 시 오존에 의해 유도된 담배 잎의 necrosis 현상이 감소하였으며 (Bors et al. 1989), 콩 잎에서 제초제 atrazine의 산화적 독성 효과의 감소 (Zheleva et al. 1994)와 해바라기 잎 절편 조직에서 중금속 독성이 완화 되는 결과 (Groppa et al. 2001)가 알려졌다. 그러나 이처럼 폴리아민에 대한 여러 연구에도 불구하고 현재까지 산화스트레스에 대한 식물의 방어 반응에서 폴리아민의 정확한 작용 기작

(action mode)은 불분명한 상태로 남아있다. 즉, 식물 스트레스 환경 하에서 폴리아민이 그 자신의 양이온적 성질로 인한 세포막 구조의 안정화 유지를 통해 스트레스 방어에 기여할 수 있다는 이론 (Besford et al., 1993)과 강력한 산화제인 활성산소 (activated oxygen species)의 직접적인 scavenger로서의 역할 (Drolet et al. 1986; Bors et al. 1989), 그리고 간접적으로 catalase, peroxidase, superoxide dismutase 와 같은 항산화 효소 (antioxidative enzymes)의 활성도 조절을 통한 활성산소의 제거 역할 (Velikova et al. 2000; Kim and Jin, 2006) 등이 제시되고 있다. 중요 활성산소 분자 중에서 비교적 안정된 형태로 오래 세포 내에 존재하며 세포에 산화적 손상을 초래하는 H₂O₂에 대해 catalase는 H₂O₂의 주 생성 장소인 peroxisome과 mitochondria에서 일차적인 H₂O₂ 분해효소로 작용하며 (Tsafaris and Sandalios 1981; Anderson et al. 1995), 세포질 및 세포벽에 존재하는 guaiacol peroxidase도 H₂O₂의 제거에 주된 역할을 하는 항산화 효소로 알려져 있다 (Asada 1992; Gaspar et al. 1985). 식물계에서 항산화 효소 들은 그들 고유의 여러 동위효소 (isozyme)를 지니고 있으며 (Edward et al. 1994; Anderson et al. 1995; Prasad 1997). 이 들 동위효소 들은 산화스트레스에 대해 제각기 다른 감수성을

*Corresponding author Tel 033-250-8528 Fax 033-251-3990

E-mail: cdjin@kangwon.ac.kr

보이며 또한 서로 다른 조직에서는 차등적으로 발현된다(Donahue et al. 1997; Martinez et al. 2001). Anderson 등(1995)은 저온 스트레스에 노출된 옥수수 종배축에서 이 식물 조직이 저온에 순화하는 동안 미토콘드리아에서 catalase의 특정 동위효소의 활성도 증가가 유도되어 세포 내 H₂O₂ 함량 증가를 억제한다는 보고를 하였다. Donahue 등(1997)은 제초제 paraquat (PQ)를 완두 잎에 단기간 처리 시 잎의 나이 및 품종에 따라 glutathione reductase, ascorbate peroxidase와 같은 항산화 효소의 총활성도 및 그들의 동위효소 반응이 차등적으로 발현됨을 관찰하여 식물이 다양한 산화스트레스에 대한 내성을 발휘하는데 있어 이들 항산화 효소의 특정 동위효소가 중요한 역할을 할 가능성을 제시하였다. 한편, 산화스트레스에 의해 유도된 항산화 효소의 총 효소활성도 (total enzyme activity) 값 변화는 새로운 동위효소의 생성 등을 포함한 효소단백질 합성의 변화 또는 효소 자체의 구조 변화에 따른 활성화 상태의 변화에 의해 좌우 될 수 있음이 제안되었다 (Edward et al. 1994; Rao et al. 1995). 그러므로 스트레스 내성 발현에 대한 이들 항산화 효소의 기여도를 정확히 평가하기 위해 식물이 스트레스를 받거나 스트레스에 대한 순화 반응을 보이고 있는 동안 총 효소 활성도 값 변화와 더불어 특정 동위효소의 변화 양상을 규명할 필요가 있다.

본 연구에서는 산화스트레스에 대한 식물의 방어 반응에서 폴리리아민의 생리, 생화학적 역할을 규명하고자 하였다. 이를 위해 세포 내 산소 분자를 환원하여 superoxide 라디칼과 H₂O₂ 분자를 만들어 냄으로써 세포에 산화적 손상을 발생시켜 산화스트레스 유도 인자로 잘 알려진 제초제 PQ (Martinez et al. 2001)로 처리된 무 (*Raphanus sativus* L.) 유식물 자엽에서 PQ에 의해 유도된 산화적 손상과 H₂O₂ 분해 효소로 작용하는 catalase와 guaiacol peroxidase의 총 활성도 변화 및 이들 동위효소 조성의 생화학적 변화에 대한 여러 종류의 폴리리아민 (putrescine, spermidine, spermine) 효과를 조사하였고 이들 폴리리아민의 종류에 따른 방어 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

재료식물의 생육조건

크기, 모양, 색깔이 균일한 무 (*Raphanus sativus* L. cv. Taewang) 종자를 선별하여 1% sodium hypochlorite 용액에 15분간 표면 살균 시킨 후 증류수로 충분히 세척하였다. Ball 상토 No. 1 (홍농종묘)을 1/3 가량 담은 투명한 플라스틱 용기 (11.5 × 11.5 × 7.5 cm)에 증류수 120 mL를 가해 충분히 적신 후 이 용기 1개당 25개씩의 살균된 종자를 파종하고 투명한 wrap을 씌웠다. 이 발아용기를 75% 상대습도, 24/20°C (낮/밤)의 온도 및 8,000 lux 빛 세기로 16 h / 8 h (낮/밤)의 광주기 조건을 갖는 growth chamber내에 넣고 발아, 생육시켰다. 파종 후 2일째 wrap을 벗기고 3일째에 30 mL 증류수를 추가로 공급하였다.

Polyamine (PA) 전처리 및 paraquat (PQ) 처리

파종 후 4 일된 무 유식물을 각 그룹 별로 나누어 이들 유식물의 자엽에 0.1% Tween 20이 포함된 10⁻⁵M에서 10⁻³M 농도 범위의 putrescine (Put), spermidine (Spd) 및 spermine (Spm) 용액을 각각 spray (1 mL/ plant) 한 후 12 시간 배양하였다. 12 시간 각각의 PA로 전처리된 자엽에 다시 50 μM PQ (0.1% Tween 20 포함) 용액을 동일한 방법으로 spray한 후 24 시간 추가 배양하였다. 대조구 자엽은 0.1% Tween 20 용액으로만, PQ 단독 처리구 자엽은 50 μM PQ (0.1% Tween 20 포함) 용액만을 처리 후 배양하였다.

자엽의 생리, 생화학적 변인 측정

PQ 처리 24 시간 후 무 유식물에서 하배축과 뿌리를 제거한 후, 자엽을 취하여 생체량 변화를 측정하였다. 자엽의 엽록소 정량은 5쌍의 자엽을 냉각된 mortar와 pestle을 이용해서 80% acetone (0.1% w/v, CaCO₃ 포함)으로 추출 후, 원심분리 (1,000g, 10 min)하여 얻은 상등액의 흡광도 A₆₄₅와 A₆₆₃ 값을 이용하여 Arnon (1949)의 방정식으로 산출하였다. 단백질 정량은 10 쌍의 자엽을 냉각된 mortar와 pestle을 이용해서 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5, 1% PVPP 포함)로 마쇄 후 이 마쇄물을 4°C에서 원심분리 (20,000g, 20 min)하여 단백질 추출액을 얻었다. 이 추출액 0.1 mL에 증류수 0.9 mL를 섞어 1 mL로 만든 후 동부피의 15% TCA를 가하고 1 시간 냉장 보관 후 재원심분리 (1,000g, 10 min)하여 얻은 단백질 침전물을 0.1 N NaOH 용액으로 녹인 후 Lowry (1951)의 방법으로 정량하였다.

H₂O₂ 함량 측정

자엽의 H₂O₂ 함량은 Bernt and Bergmeyer (1974)의 효소적 방법을 기초로 하여 측정하였다. 자엽 10 쌍을 냉각된 mortar와 pestle을 이용해서 2.5 mL의 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)와 0.3 g의 sea sand를 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (20,000g, 20 min)하여 상등액을 얻었다. 이 중 0.5 mL를 취해 여기에 2.5 mL의 peroxidase 시약 (0.12 M sodium phosphate, 0.005% o-dianisidine, 40 μg peroxidase/mL 포함)을 혼합한 후 30°C에서 10 분간 반응시켰다. 반응 후 1 N perchloric acid 0.5 mL를 첨가하여 원심분리 (1,000g, 10 min)한 후 얻은 상등액의 흡광도를 436 nm에서 측정하였다. 이때의 흡광도 값을 H₂O₂ 표준곡선과 대조하여 자엽 내 H₂O₂의 함량을 정량하였다.

Catalase (CAT)와 Guaiacol peroxidase (GPX) 추출 및 총활성도 측정

CAT와 GPX 효소는 자엽 10 쌍을 냉각된 mortar와 pestle 내에 4 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 2 mM Na₂-EDTA, 1% PVPP 포함) 및 0.3 g의 sea sand와 함께 넣고 마쇄

한 후 4°C에서 원심분리 (20,000g, 20 min)하여 얻은 상등액을 효소 원료로 사용하였다. CAT 총활성도는 Chance와 Maehly (1955)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 효소 활성도는 H₂O₂ 기질의 분해에 기인되는 240 nm의 흡광도 ($\epsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 감소 값을 측정하여 산출하였다. 이 때의 효소 반응은 2.85 mL의 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.05 mL의 1.75% H₂O₂ 및 0.1 mL의 효소 추출액이 포함된 3 mL의 반응액 내에서 진행시켰다. GPX 활성도는 Polle 등 (1994)의 방법을 기초로 하여 측정하였다. 효소 활성도는 반응액 내에서 guaiacol 기질이 tetraguaiacol로 산화될 때 470 nm에서의 흡광도 ($\epsilon_{470} = 25.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 증가 값을 측정하여 산출하였다. 이 때 효소 반응은 2.85 mL의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5, 16 mM guaiacol 포함), 0.05 mL의 0.35% H₂O₂ 및 0.1 mL의 효소 추출액이 포함된 3 mL의 반응액 내에서 진행시켰다.

CAT와 GPX isozyme의 native-PAGE 분리 및 Activity staining

CAT isozyme 분석을 위한 시료는 자엽 20 쌍을 냉각된 mortar와 pestle 내에 2.5 mL의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0, 1 mM Na₂-EDTA, 5 mM ascorbate, 1% PVPP, 10 mM DTT 포함) 및 0.3 g의 sea sand와 함께 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (20,000g, 20 min)하여 얻은 상등액을 사용하였다. GPX isozyme 분석을 위한 시료는 자엽 20 쌍을 냉각된 mortar와 pestle 내에 3 mL의 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0, 1 mM Na₂-EDTA, 5 mM ascorbate, 1% PVPP 포함) 및 0.3 g의 sea sand와 함께 넣고 마쇄한 후 4°C에서 원심분리 (20,000g, 20 min)하여 얻은 상등액을 사용하였다. CAT isozyme 분리는 Kuncce와 Trelease (1986)방법을 기초로 하여 수행하였다. 7% polyacrylamide gel 및 4% stacking gel을 이용하여 4°C 온도 조건과 일정전압 (stacking gel: 50V, seperating gel: 100V) 하에서 8시간 동안 Native-PAGE를 실시하였다. 이때 loading 시료는 35 μ L 부피 내에 동량의 자엽단백질 (40 μ g)이 포함되도록 하였다. 전기영동 후 gel을 증류수로 10분간 2회 세척한 후 3.27 mM H₂O₂ 용액에 25분간 진탕 배양 후 다시 증류수로 짧게 세척하고, 1% (w/v) ferric chloride-potassium ferricyanide (III) 용액 내에서 CAT isozyme band가 출현할 때 까지 약 10분간 activity staining하였다 (Woodbury et. al. 1971). GPX isozyme 분리를 위해 10% polyacrylamide gel 및 4% stacking gel을 이용하여 4°C 온도 및 일정 전압 (stacking gel: 50V, seperating gel: 100V)하에서 7시간 동안 Native-PAGE를 실시하였다. 이때 loading 시료는 80 μ L 부피 내에 동량의 자엽단백질 (200 μ g)이 포함되도록 하였다. 전기영동 후 GPX isozyme 활성도 검출은 Rao 등 (1996)의 방법을 사용하였다. 즉, 전기영동 후 gel을 50 mM sodium acetate buffer (pH 4.5, 2 mM benzidine 포함)에 10 분 동안 배양 한 후 다시 이 용액에 30% H₂O₂ 용액 30 μ L을 첨가하고 20 분간 진탕 배양시켰다. 이 후 gel을 증류수로 짧게 세척하여 효소 반응을 중지시키고 사진 촬영을 하였다.

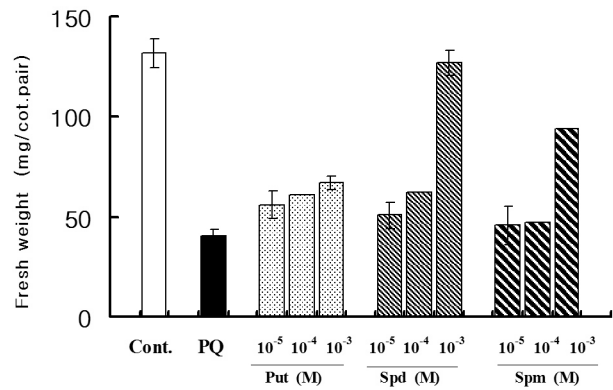


Figure 1. Protection of radish cotyledons from PQ toxicity by exogenous PAs. 4-day-old plants were pretreated for 12 h with the indicated concentrations of different PAs (Put = putrescine, Spd = spermidine, Spm = spermine) in 0.1% Tween 20 solution as cotyledon sprays before being exposed for 1 day to 50 μ M PQ in 0.1% Tween 20. Symbols mean as follows: Cont., plants sprayed with 0.1% Tween 20 alone; PQ, plants sprayed with only 50 μ M PQ in 0.1% Tween 20. Data are means \pm SE from three independent experiments

결 과

무 자엽에서 PQ 독성 방어에 대한 각 종류별 PA의 처리 농도 효과

PQ의 산화적 독성에 대한 여러 폴리아민의 생리 효과를 조사하기 위해 먼저 각 종류별 PA의 처리 농도 결정 실험을 수행하였는데, PQ 처리 24 시간 후 자엽의 생체량 변화를 조사한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

모든 PA 처리구에서 PQ 단독처리구보다 생체량 감소가 억제되는 PQ 독성 방어 효과가 나타났으며 이 때 또한 PA 처리농도 및 종류에 따라 그 효과가 다르게 나타났다 (Fig. 1). 이 결과에 따르면 모든 PA 처리구에서 10⁻⁴ M 농도까지는 PQ 독성에 대한 방어 효과가 약하게 나타났으나 10⁻³ M 농도에서는 Put 처리구를 제외하고 높게 나타났다. 특히 Spd 처리구에서는 생체량이 거의 대조구 (0.1% Tween 20 단독처리구) 수준까지 회복되었다. 가장 방어 효과가 현저한 10⁻³ M 농도에서 PA 종류별로 그 효과를 비교하여 볼 때, Spd, Spm, 및 Put순으로 방어 효과가 나타났다. 따라서 이 후의 실험에서는 PQ 독성에 대한 방어 효과가 가장 높은 10⁻³ M (1 mM) 농도를 모든 PA 처리 농도로 사용하였다.

PQ에 노출된 무 자엽에서 PA의 생리 생화학적 효과

50 μ M PQ로 처리된 무 유식물에서 최초로 나타나는 가시적인 PQ 작용의 결과는 자엽의 시들 현상이었다. 그러므로 PQ 손상의 지표로서 PQ 처리 24시간 후 자엽의 생체량 변화를 먼저 분석하여 Fig. 2(A)에 나타내었다. PQ 단독 처리구에서는 24 시간 경과 후, 생체량이 급속히 감소하여 0.1% Tween 20 대조구의 약 30% 수준

을 보였다. 그러나 PQ에 의해 유도된 급격한 생체량 감소가 모든 PA 전처리구에서 억제되었다. 특히 PQ 처리 24 시간 후, 1 mM Spd 처리구에서 생체량 감소가 가장 크게 억제되어 대조구의 80% 수준까지 회복되었고 다음으로 1 mM Spm 처리구이었으며 1 mM Put 처리구에서 생체량 감소 억제 효과가 가장 적게 나타났다. 자엽에서 또 다른 PQ 손상으로 자엽 조직에 검은 반점이 나타나는 괴사 (necrosis) 현상이 출현해서 엽록소 함량 변화를 추적 조사하였다 (Fig. 2B). PQ 단독 처리구에서는 처리 24 시간 후에 비록 생체량 감소 (Fig. 2A) 경우처럼 급격하지는 않았지만 엽록소 함량이

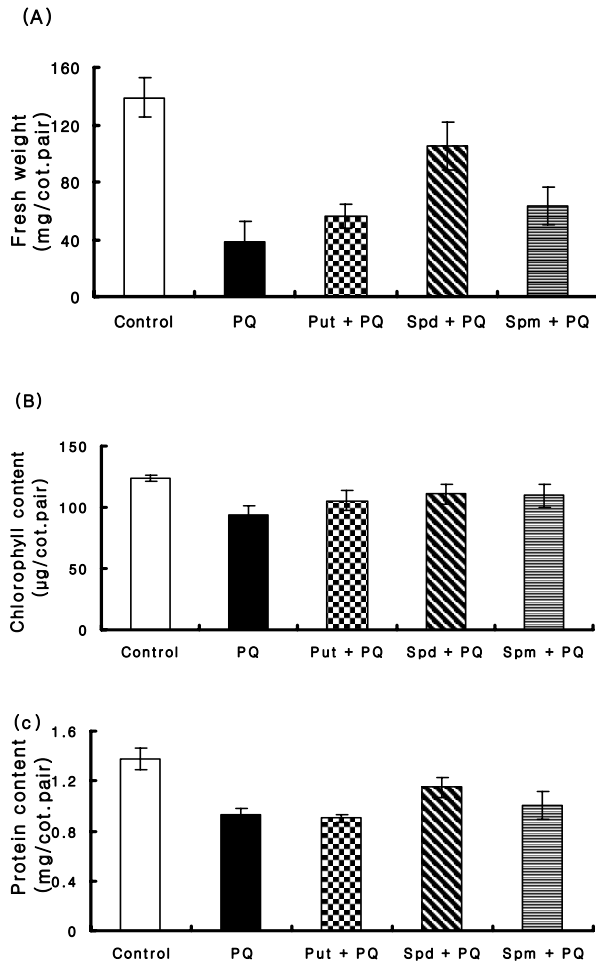


Figure 2. Effects of PA pretreatments on PQ-induced cotyledon-injury symptoms (A, fresh weight; B, chlorophyll content; C, protein content). 4-day-old radish seedlings were pretreated with different 1 mM PAs as described in Figure 1. Data are means ± SE from three independent experiments. Symbols mean as follows: Control., cotyledons treated with 0.1% Tween 20 alone; PQ, cotyledons treated with 50 µM PQ alone; Put+PQ, cotyledons pretreated with 1 mM putrescine before 50 µM PQ application; Spd+PQ, cotyledons pretreated with 1 mM spermidine before 50 µM PQ application; Spm+PQ, cotyledons pretreated with 1 mM spermine before 50 µM PQ application

대조구에 비해 약 24% 감소하였다. 그러나 모든 PA 전처리로 PQ에 의한 엽록소 함량 감소가 억제되었으며 또한 PA 처리구 사이의 감소 억제 효과 경향은 생체량의 경우처럼 큰 차이를 보이지는 않았지만 그 중에서 Spd 처리구가 엽록소 감소를 보다 더 효과적으로 지연시켰다. 엽록소 함량 변화와 함께 잎의 산화적 손상을 나타내는 또 다른 생화학적 지표인 단백질 함량 변화도 조사하였다 (Fig. 2C). 24 시간 PQ 단독 처리구에서 단백질 함량 역시 현저히 감소되어 대조구의 67% 수준을 나타내었다. 그러나 Spd 처리구에서 단백질 함량 감소가 가장 크게 억제되어 대조구의 83% 수준으로 회복되었고 다음으로 Spm 처리구 순으로 단백질 함량이 지연되었다.

자엽 내 H₂O₂ 함량 변화에 대한 PQ와 PA의 효과

세포 내 비정상적인 H₂O₂ 대사에 따른 H₂O₂의 축적은 세포에 치명적인 결과를 초래하는데, 자엽 내 H₂O₂ 함량 변화에 대한 PQ와 PA의 효과는 Figure 3에 나타난 바와 같다. 24 시간 동안 PQ 단독 처리된 자엽에서는 처리되지 않은 대조구 자엽(0.163 µg/cot. pair)에 비해 2.6 배 많은 H₂O₂ 함량(0.422 µg/cot. pair)을 보였으나 PA로 전처리 후 PQ에 노출시켰을 때 모든 PA 전처리구에서 H₂O₂의 함량이 다시 감소되었다. 이 때 H₂O₂ 축적에 대한 PA의 억제 효과는 Spd 전처리구에서 가장 높아 거의 대조구와 유사한 수준 정도로 낮았으며, 비록 Spd의 억제 효과보다는 적었지만 Put 처리구와 Spm 처리구에서도 의미 있게 H₂O₂ 축적을 억제하여 PQ 단독 처리구보다 낮은 수준의 H₂O₂ 함량을 보였다.

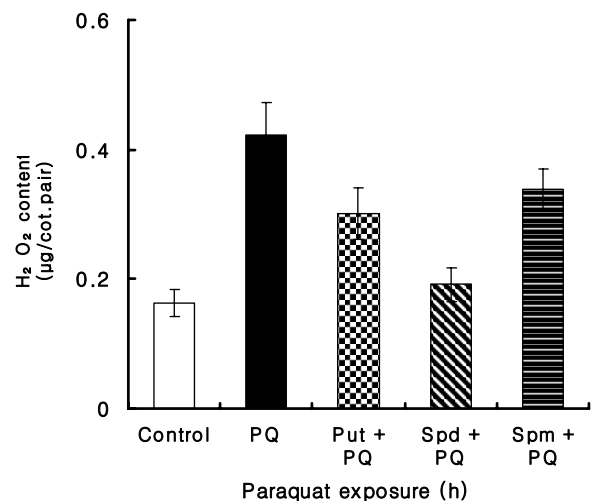


Figure 3. Effects of PA pretreatments on H₂O₂ content in radish cotyledons exposed to 50µM PQ, as described in Figure 2. Data are means ± SE from three independent experiments. Symbols are the same as those in Figure 2

CAT와 GPX 총활성도 변화에 대한 PQ와 PA의 효과

PA 전처리 후 PQ에 노출된 자엽에서 PQ 손상의 완화 현상 (생체량 감소 지연 및 엽록소와 단백질 함량의 소실 억제)과 자엽 내 H₂O₂ 축적이 억제되는 결과와 관련하여 CAT와 GPX 활성도 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. PQ에 노출된 무 유식물 자엽에서 PA 전처리에 따른 CAT 활성도 변화를 24시간 동안 조사한 결과, PQ 단독처리구는 PQ를 처리하지 않은 대조구와 비교 시 12 시간까지는 별다른 차이가 없었으나 24 시간째에 약 14%의 활성도 감소가 나타났다(Fig. 4). 그러나 PQ 처리에 의해 감소된 CAT 활성도가 PA 중에서 특히 Spd 전처리로 다시 회복되어 24 시간째에는 대조구보다도 높게 나타났다. 반면에 Put 와 Spm 처리에 의한 CAT

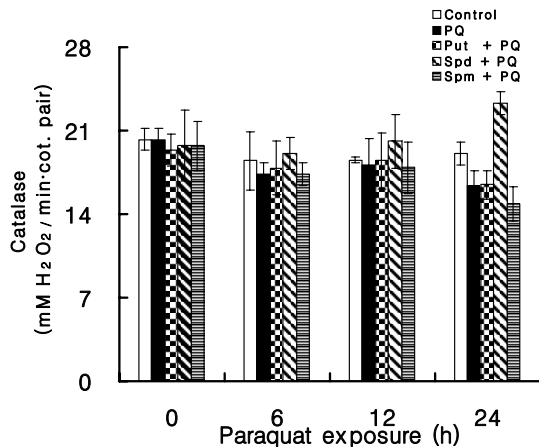


Figure 4. Effects of PA pretreatments on changes in the total activities of catalase in radish cotyledons exposed to 50 μ M PQ, as described in Figure 2. Data are means \pm SE from three independent experiments. Symbols are the same as those in Figure 2

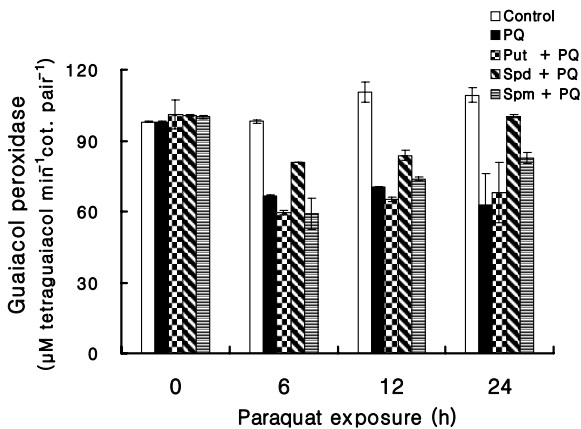


Figure 5. Effects of PA pretreatments on changes in the total activities of guaiacol peroxidase in radish cotyledons exposed to 50 μ M PQ, as described in Figure 2. Data are means \pm SE from three independent experiments. Symbols are the same as those in Figure 2

활성도 회복 효과는 보이지 않았다. 또 한편, CAT 활성도 측정 경우와 마찬가지로 4일 된 자엽에 12 시간 PA 전처리 후 PQ를 처리하여 GPX 활성도 변화를 24 시간 동안 조사하였다(Fig. 5). 그 결과 PQ를 처리하지 않은 대조구 자엽에서는 GPX 활성도가 약간 증가하는 경향을 보이긴 하나 24 시간 동안 거의 비슷한 수준이었으며 반면에 PQ 단독처리구 자엽에서는 PQ 처리 6 시간째부터 현저히 감소하여 24시간 때까지 계속 낮은 활성도(대조구의 55% 수준)를 보였다. 그러나 PQ에 의해 감소된 GPX 활성도는 PA 전처리에 의해서 다시 회복되었으며 특히 Spd 전처리에 의한 회복 효과는 PQ에 노출된 6 시간째부터 나타나서 24 시간째에는 대조구의 90% 이상의 수준으로 크게 회복되었다. Spm 전처리구에서도 Spd 전처리구보다는 적었지만 PQ에 의한 활성도 감소를 의미 있게 회복시켰다. 반면에 Put 전처리구에서 회복 효과가 가장 작게 나타났다.

PQ와 PA에 의해 유도된 CAT 및 GPX 동위 효소의 발현 변화

PQ 스트레스를 받고 있는 자엽에서 PA 전처리에 의한 CAT 및 GPX 총활성도 변화가 그 들 동위효소 조성의 변화와 관련되어 있는 가를 알아보기 위해 native-gel 전기영동과 activity staining 분석을 수행한 결과는 Figure 6과 같다. 12 시간 PA 전처리 후 24 시간 PQ에 노출된 자엽과 아무런 처리를 받지 않은 대조구 자엽에서 CAT 동위효소 조성의 변화에 대한 결과에 의하면(Figure 6), 대조구 자엽을 포함한 모든 처리구 자엽에서 2개의 CAT 동위효소 (CAT1와 CAT2, 전기영동거리의 증가 순서 기준) 밴드가 분리되었다. CAT1 경우, 이 밴드의 activity staining 강도가 대조구에 비해 PQ 단독처리구에서 뚜렷이 감소되었다. 그러나 PA 전처리구 (12 시간 PA 전처리 후 24 시간 PQ에 노출된 자엽)중에서 Put와 Spm 전처리구를 제외한 Spd 전처리구에서만 다시 대조구 수준이상으로 회복되었다. 반면에 CAT2 밴드의 경우, 모든 처리구에서 비슷한 activity staining 강도를 보여 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 24 시간 동안 PQ 노출에 의해 감소된 CAT 총활성도가 PA 중에서 특히 Spd 전처리에 의해 증가되었을 때 (Fig. 4), 그 것은 Spd에 의한 CAT1 밴드의 활성 회복에 기인되었음을 보여주는 것이다.

GPX 동위효소 조성의 변화를 분석한 결과 (Fig. 7)에서는 대조구 자엽에서 3개의 동위효소 (GPX1, GPX2 및 GPX3) 밴드가 분리되었다. 이중에서 대조구의 GPX1 밴드의 activity staining 강도가 PQ 단독 처리구에서 완전히 사라졌으나 다시 Spd 전처리구에서 의미 있게 회복되었다. 한편, 대조구에서는 매우 약했던 GPX3 밴드의 staining 강도는 PQ 단독처리구를 포함한 모든 PA 처리구에서 비슷한 값을 보였다. 또한, GPX2 밴드의 staining 강도는 대조구를 포함한 모든 처리구에서 별다른 차이를 나타내지 않았다. 그러나 한가지 흥미로운 사실은 모든 PA 전처리구에서 대조구에는 없었던 새로운 GPX 동위효소 밴드 한개(◀ 표시)가 출현하였으며 이 밴드의 activity staining 강도 역시 Spd 처리구에서 가장 컸으며 그 다음으로 Spm, Put 처리구 순으로 나타났다. 이들 결과는, 24시간 PQ에 노출된 자엽에서 특히 Spd 전처리에 의한 GPX 총활성도 회

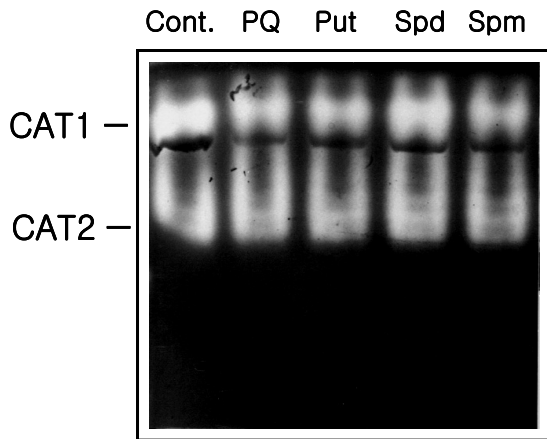


Figure 6. Native PAGE gels stained for catalase isozymes in radish cotyledons. Lane Cont., cotyledons treated with 0.1% Tween 20 alone; Lane PQ, cotyledons treated with 50 μ M PQ alone; Lane Put, cotyledons pretreated with 1 mM putrescine before 50 μ M PQ application; Lane Spd, cotyledons pretreated with 1 mM spermidine before 50 μ M PQ application; Lane Spm, cotyledons pretreated with 1 mM spermine before 50 μ M PQ application

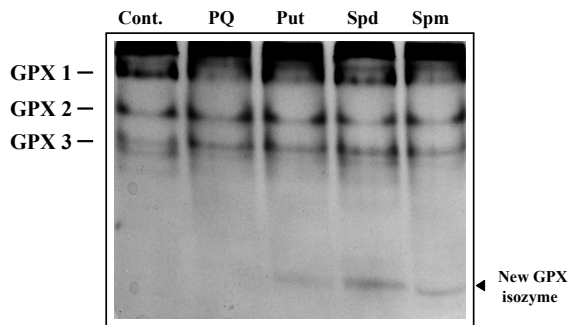


Figure 7. Native PAGE gels stained for guaiacol peroxidase isozymes in radish cotyledons. Lane Cont., cotyledons treated with 0.1% Tween 20 alone; Lane PQ, cotyledons treated with 50 μ M PQ alone; Lane Put, cotyledons pretreated with 1 mM putrescine before 50 μ M PQ application; Lane Spd, cotyledons pretreated with 1 mM spermidine before 50 μ M PQ application; Lane Spm, cotyledons pretreated with 1 mM spermine before 50 μ M PQ application. Note that the GPX1 isozyme band in the control completely disappeared in 50 μ M PQ alone treatment, but it showed some recovery in its staining intensity in Lane Spd. Also, a new isozyme (the arrow head “◀”) appeared in PA pretreatments showing its maximum activity in Lane Spd

복이 새로 생성된 GPX 동위효소와 더불어 GPX1 동위효소의 발현 증가에 기인하고 있음을 나타내는 것이다.

고 찰

무 유식물의 자엽에 산화스트레스를 유도하기 위해 50 μ M 농도의 PQ를 24 시간 이상 처리한 결과 심각한 자엽 손상이 일어났다. 그러므로 생리적으로 의미있는 조건하에서 식물의 반응을 평

가하기 위해 자엽의 최대 PQ 노출 시간을 24 시간으로 결정하였다.

본 실험에서 PQ 처리로 인한 자엽의 현저한 시들 현상과 생체량 감소 (Fig. 2A) 그리고 뚜렷한 엽록소 및 단백질 함량의 소실이 일어났다(Fig. 2B and C). 또한 많은 H_2O_2 의 축적 현상도 나타났는데(Fig. 3) 이들 결과는 자엽에서 명백히 PQ 스트레스에 기인한 산화적 손상을 입증하는 것이다. 동시에 방어 효과의 크기는 비록 다르지만 이들 PQ 손상이 1 mM PA 전처리로 완화됨 (즉, 1 mM Spd가 가장 높고, 다음으로 1 mM Spm, 1 mM Put 순서)을 보였다 (Fig. 2A-C, 3). Zheleva 등(1994)도 완두 식물에서 제초제 atrazine에 의한 생물량 감소 및 엽록소 소실 현상이 PA 전처리로 반전된 결과를 입증하였는데, 이 때 Put 보다는 Spd 와 Spm에서 높은 방어 효과를 얻어 본 실험과 유사한 결과를 제시한 바 있다. 또한, PQ 독성에 대한 PA의 방어 효과가 애기장대의 발아과정과 성장에서도 보고되었다 (Kurepa et al. 1998). 한편, 여러 연구에도 불구하고 식물의 스트레스 내성 발현과 관련하여 PA의 정확한 역할 및 PA 종류에 따른 차등적인 방어 효과의 발현에 대한 이해는 아직은 명백하지 않은 상태이다. 현재까지의 연구들은 다음의 가능성에 관심을 두어왔다. 즉, 첫째 PA가 직접 또는 간접적으로 산소 라디칼 제거자 (oxygen radical scavenger)로서의 기능을 한다는 설 (Drolet et al. 1986; Bors et al. 1989; Velikova et al. 2000)이고, 둘째 PA가 자신의 양이온적 성질로 인하여 음전하를 띤 세포막과 상호작용을 함으로서 식물스트레스 조건하에서도 막 구조의 안정화에 기여하게 되어 식물이 스트레스 내성을 갖는다는 것이다 (Besford et al. 1993; Borrel et al. 1997). 일반적으로, 다양한 산화스트레스에 대한 식물의 저항성 발현은 스트레스에 의해 축적되는 superoxide 라디칼, H_2O_2 등과 같은 활성산소 라디칼을 제거할 수 있는 능력과 관련이 있다고 제안되어 왔다. 그러므로, 무 자엽에서 PQ 스트레스에 대한 PA의 방어 효과를 PA의 항산화 성질과 관련하여 조사하였다. Figure 3의 결과에 의하면 24 시간 PQ에 노출된 자엽에서 H_2O_2 의 축적이 PA 전처리로 (특히 Spd 전처리)로 크게 억제되었는데, 이 H_2O_2 는 매우 산화력이 강한 singlet 산소 분자와 hydroxyl 라디칼의 형성을 초래하며 이들은 세포 지질분자의 과산화 (lipid peroxidation) 반응을 유도한다는 점에서 볼 때 본 연구 결과는 명백히 PA가 PQ 스트레스를 받고 있는 무 자엽에서 효과적인 항산화제로서의 역할을 수행 할 수 있음을 보여주는 것이다. PA의 항산화능과 관련하여 Velikova 등(2000)은 PA가 세포 내 항산화효소로 구성된 세포 항산화 대사 능력을 증진시킴으로서 스트레스에 대한 내성을 증진시킨다고 제안한 바 있다. 식물 세포 내 항산화계를 구성하는 주요 항산화 효소로 CAT, GPX, ascorbate peroxidase, glutathione reductase 및 SOD 등이 알려져 있다. 이 중에서 H_2O_2 제거에 직접 관련된 효소로서 CAT는 H_2O_2 의 주 생성 장소인 peroxisome과 미토콘드리아에서 일차적인 H_2O_2 의 분해효소로 작용한다 (Tsaftaris and Scandalios 1981; Anderson et al. 1995). 이와같은 CAT는 H_2O_2 의 제거를 통해 세포 내에서 다양한 활성산소 분자 종의 형성을 초기에 억제함으로써 산소라디칼 대사에 중요한 내재적 조절 기능을 갖는다. 또한, 세포질과 세포벽에 존재하면서 H_2O_2 를 기질로 이용하는 전형적인

식물 peroxidase인 GPX도 CAT 보다는 H₂O₂ 분해 속도가 느리지만 고등식물에서 H₂O₂의 제거에 주된 역할을 한다 (Asada 1992; Gaspar et al. 1985). 그러므로 본 실험에서 PQ에 노출된 무 자엽에서 PA에 의해 유도된 H₂O₂ 축적 억제 현상(Fig. 3)과 관련하여 CAT와 GPX의 총활성도 변화에 미치는 PA의 효과를 먼저 조사하였다. Fig. 4에서 보듯이, PQ 처리에 의해 감소된 CAT 활성도가 PA 중에서 특히 Spd 전처리로 다시 회복되어 24 시간째에는 대조구보다도 높게 나타났다. 반면에 Put 와 Spm 처리에 의한 CAT 활성도 회복 효과는 보이지 않았다. GPX의 경우에도 PQ 단독처리구 자엽에서는 PQ 처리 6 시간째부터 현저히 감소하여 24 시간 때까지 계속 낮은 활성도(대조구의 55% 수준)를 보였으나, PA 전처리에 의해서 다시 회복되었으며 특히 Spd 전처리에 의한 회복 효과는 PQ에 노출된 6 시간째부터 나타나서 24 시간째에는 대조구의 90% 이상의 수준으로 크게 회복되었다(Fig. 5). 또한, Spm 전처리구에서도 Spd 전처리구보다는 적었지만 의미 있게 회복시켰다. Put 전처리구에서는 회복 효과가 가장 작게 나타났다. 따라서 무 자엽에서 PQ 손상에 대한 PA의 종류별 방어 효과 크기는 이들 PA에 의한 CAT와 GPX 활성도 회복에 의존하고 있음을 알 수 있었다.

식물계에서 대부분의 항산화 효소 들은 그 들 고유의 여러 동위효소(isozyme)를 지니고 있다 (Edward et al. 1994; Anderson et al. 1995; Prasad 1997). 이 들 동위효소 들은 산화스트레스에 대해 제각기 다른 감수성을 보이며 또한 서로 다른 조직에서는 차등적으로 발현된다는 보고 (Donahue et al. 1997; Martinez et al. 2001)가 있다. Donahue 등 (1997)은 제초제 PQ를 완두 잎에 단기간 처리 시 잎의 나이 및 품종에 따라 ascorbate peroxidase 및 glutathione reductase의 총활성도 및 그 들의 동위효소 반응이 차등적으로 발현됨을 관찰하여 식물이 스트레스에 대한 내성을 발휘하는데 있어 이 들 항산화 효소의 특정 동위효소가 중요한 역할을 할 가능성을 제시하였다. 따라서 무 자엽에서 PQ 스트레스에 대한 PA의 방어 효과를 이해하기 위해 CAT 및 GPX 총활성도 변화와 함께 이들 효소의 동위효소 발현 양상을 분석하였다. 본 실험 식물인 무 자엽에서는 2개의 CAT 동위효소 밴드가 분리되었다(Fig. 6). Figure 6의 결과에서처럼, CAT1 밴드의 activity staining 강도가 24 시간 PQ 단독처리구에서 대조구에 비해 현저하게 감소되었다. 그러나 Put와 Spm 전처리구를 제외한 Spd 전처리구에서 다시 대조구 수준이상으로 회복되었다. 반면에 CAT2 밴드의 경우, 모든 처리구에서 비슷한 activity staining 강도를 보여 별 차이가 없었다. 이러한 결과는 무 자엽에서 PQ 스트레스에 의해 감소된 CAT 총활성도가 Spd 전처리에 의해 회복되는 과정(Fig. 4)에서 CAT1 동위효소의 강한 발현이 주도적인 역할을 담당하는 것으로 볼 수 있다. Anderson 등 (1995)은 저온 스트레스에 노출된 옥수수 증배축에서 이 식물 조직이 저온에 순화하는 동안 미토콘드리아 catalase의 특정 동위효소의 활성도 증가가 유도되어 세포 내 H₂O₂ 함량 증가를 억제한다는 보고를 하였다. 그러나 Chandlee 등(1983)은 제초제 aminotriazole에 대한 내성 발현 연구에서 미토콘드리아 내의 CAT 동위효소(CAT3) 보다 peroxisome 내의 동위효소(CAT1, CAT2)가 더 주도

적인 역할을 한다고 보고한 바 있어, 스트레스 방어반응에서 polyamine(PA)의 정확한 역할을 규명하기 위한 추후 연구에서는 본 실험에서 분리된 CAT1, CAT2 동위효소의 세포내 localization 및 효소적 특성에 대한 추가적인 조사가 요구된다.

폐놀 일종인 guaiacol의 산화대사에서 H₂O₂를 무독성의 물로 환원하여 제거하는 GPX도 식물 종에 따라 여러 개의 동위효소가 존재하는 것이 알려졌다(Rao et al. 1995; Rao et al. 1996). 본 실험에서는 3개의 동위효소(GPX1, GPX2 및 GPX3) 밴드가 분리되었는데(Fig. 7), 대조구에 있던 GPX1 밴드가 PQ 단독 처리구에서 완전히 사라졌으나 PA 전처리구 가운데 Spd 전처리구에서 다시 뚜렷이 회복되었다. 더욱 흥미로운 사실은 대조구에는 없었던 새로운 GPX 동위효소 밴드 한 개(◀ 표시)가 모든 PA 전처리구에서 출현하였으며 이 밴드의 activity staining 강도 역시 Spd 처리구에서 가장 컸으며 그다음으로 Spm, Put 처리구 순으로 나타났다. 이들 결과는 24시간 PQ에 노출된 자엽에서 Spd 전처리에 의한 GPX 총활성도 회복이 새로 생성된 GPX 동위효소와 더불어 GPX1 동위효소의 활성도 증가에 밀접한 관련이 있음을 의미하는 것이다. Rao 등 (1996)도 flavonoid 결핍 돌연변이 애기장대를 UV-B에 노출시켰을 때 새로운 GPX 동위효소가 합성되는 것을 입증한 바 있다.

결론적으로, 무 자엽에서 PA 전처리는 PQ에 의해 유도되는 산화적 손상에 대한 내성을 의미 있게 증진시켰으며 이 때 PA 중에서 Spd의 내성 증진 효과가 가장 높았다. 그리고 PQ에 노출된 자엽에서 Spd가 가장 효율적으로 CAT와 GPX의 활성도 회복을 유도하였으며 그로인한 H₂O₂의 축적 억제를 통해서 PQ 독성에 대한 방어 효과를 보이는 것으로 생각되었다. Spd에 의한 이들 CAT와 GPX 총활성도 증가에는 각각 CAT1 그리고 GPX1 및 새로 합성된 GPX 동위효소가 주도적인 기여를 하고 있음을 알 수 있었다.

적 요

무(*Raphanus sativus L.*) 유식물의 자엽에 polyamines(PAs) 중 특히 1 mM spermidine(Spd) 전처리 시 paraquat(PQ)에 의해 유도되는 자엽의 산화적 손상이 경감되었다. 즉, 자엽의 생체량, 엽록소, 단백질 함량의 소실과 자엽 내 H₂O₂의 과다축적과 같은 현상이 현저히 완화되었다. 이와 관련하여 H₂O₂ 분해 효소인 catalase(CAT)와 guaiacol peroxidase(GPX)의 총활성도 변화를 조사하였으며 그 결과, PQ에 노출된 자엽에서 PA 중 1 mM Spd 전처리에 의하여 CAT 활성도가 크게 증가하였고 또한 PQ에 의한 급속한 GPX 활성도 감소 역시 현저히 억제되어 거의 대조구 수준을 보였다. CAT와 GPX 동위효소 구성에 대한 native gel 분석 결과, PQ에 노출된 자엽에서 1 mM Spd 전처리 시 CAT 동위효소 1개(CAT1)와 GPX 동위효소 1개(GPX1)의 활성도가 현저히 증가하였으며 또한 새로운 GPX 동위효소 1개가 생성된 것을 확인하여 이 들 동위효소가 PQ 내성 발현에 보다 큰 기여를 하고 있음을 알 수 있었다. 위 결과들로부터, PAs 중 특히 Spd가 PQ에 노출된 무 자엽에서 내재성 H₂O₂ 함량 수준을 조절하는 CAT와 GPX 효소의 발현 유도를

통해 항산화 보호제로서의 역할을 수행하는 것으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 2007학년도 강원대학교 학술연구조성비로 지원받아 수행하였음.

인용문헌

- Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol* 109:1247-1257
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 24:1-5
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase: A hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85:235-241
- Aziz A, Larher F (1996) Changes in polyamine titers associated with the proline response and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stress. *Plant Sci* 112:175-186
- Bernt E, Bergmeyer HU (1974) Inorganic peroxides, In HU Bergmeyer, ed, *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol 4. Academic Press, pp 2246-2248
- Besford RT, Richardson CM, Campos JL, Tiburcio AF (1993) Effects of polyamines on stabilization of molecular complexes in thylakoid membranes of osmotically-stressed oat leaves. *Planta* 189:201-206
- Borrell A, Carbonell L, Farras R, Puig-Parellada P, Tiburcio AF (1997) Polyamines inhibit lipid peroxidation in senescing oat leaves. *Physiol Plant* 99:385-390
- Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann H Jr (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochem* 28:1589-1595
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymol* 2:764-775
- Chandlee JM, Tsaftaris AS, Scandalios JG (1983) Purification and partial characterization of three genetically defined catalase of maize. *Plant Sci Lett* 29:117-131
- Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG (1997) Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves. *Plant Physiol* 113:249-257
- Drolet G, Dumbroff EB, Legg RL, Thompson JE (1986) Radical scavenging properties of polyamines. *Phytochem* 25:365-371
- Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM (1994) Synthesis and properties of glutathione reductase is stressed peas. *Planta* 192:137-143
- Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H (1985) A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* 64:418-423
- Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2001) Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Sci* 161:481-488
- Kim H-S, Jin C-D (2006) Polyamines as antioxidant protectors against paraquat damage in radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. *J Plant Biol* 49:237-246
- Kramer GF, Norman HA, Krizek DT, Mirecki RM (1991) Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipid in cucumber. *Phytochem* 30:2101-2108
- Kunze CM, Trelaese RN (1986) Heterogeneity of catalase in naturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol* 81:1134-1139
- Kurepa J, Smalle J, van Montagu M, Inzé D (1998) Polyamines and paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 39:987-992
- Langebartels C, Kerner K, Leonardi S, Schraudner M, Trost M, Heller W, Sandermann H Jr (1991) Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiol* 95:882-889
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Martinez CA, Loureiro ME, Oliva MA, Maestri M (2001) Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum curtilobum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Sci* 160: 505-515
- Polle A, Otter T, Seifert F (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol* 106:53-60
- Prasad TK (1997) Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol* 114: 1369-1376
- Rao MV, Hale BA, Ormrod DP (1995) Amelioration of ozone-induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide. *Plant Physiol* 109:421-432
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996) Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 110:125-136
- Tsaftaris AS, Scandalios JG (1981) Genetic and biochemical characterization of a Cat2 catalase null mutant of *Zea mays*. *Mol Gen Genet* 181:158-168
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 151:59-66
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301-305
- Ye B, Müller HH, Zhang J, Gressel J (1997) Constitutively elevated levels of putrescine and putrescine-generating enzymes correlated with oxidant stress resistances in *Coryza bonariensis* and wheat. *Plant Physiol* 115:1443-1451
- Zheleva D, Tsonev T, Sergiev I, Karanov E (1994) Protective effect of exogenous polyamines against atrazine in pea plants. *J Plant Growth Regul* 13:203-211

(접수일자 2009년 4월 24일, 수리일자 2009년 5월 8일)