

L-6 Transgenic Tobacco Plant의 항산화효소들에 대한 오존의 영향

Effects of Ozone on Antioxidant Enzymes of Transgenic Tobacco Plants

¹⁾김동준, 이 웅상, ²⁾곽상수, 윤 병욱

¹⁾병시대학교 생명과학과, ²⁾생명과학연구소

1. Introduction

자동차의 급격한 증가로 인해 자동차의 배기가스로부터 배출된 NO₂가 자외선에 의해 산소(O₂)와 결합하여 오존(O₃)이 만들어지게 되는데, 이 오존은 식물체에 상당한 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 즉, 오존은 식물에 따라 다양한 민감도를 나타내고 있지만, 일반적으로 광합성률을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Grimes *et al.*, 1983).

일반적으로 생물체는 매우 다양한 형태의 외적인 스트레스를 받고 있으며, 또한 이 스트레스에 의해 식물체는 정상적인 성장 발달이 저해될 뿐만 아니라 식물체에 유해한 작용들을 주게 되는 것이다. 이러한 유해작용에 의해 superoxide radical(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂), hydroxyl radical(OH·)과 같은 활성산소종의 생성을 초래하게 된다. 또한, 오존은 식물체에 직접적인 피해를 줄 뿐만 아니라, 오존이 기공을 통해 식물체 내로 들어가서 O₂, H₂O₂, OH·로 전환되어서 식물체에 영향을 주게 되는 것이다. 이들 활성산소종들은 생체 내에 많은 유해한 작용을 끼치기 때문에, 이들 유해 작용들에 대항하는 방어작용을 하는 많은 항산화효소들을 발현하게 되어, 이러한 활성산소종들을 제거하게 되는 방어기작을 발휘하게 될 것이다.

항산화효소들에는 superoxide dismutase(SOD), peroxidase(POD), catalase(CAT), ascorbate peroxidase(APX), glutathione reductase(GR) 등이 있다. 특히, 1차적인 방어기작에는 superoxide dismutase(SOD)가 주로 관여하게 되는데, SOD는 superoxide radical(O₂⁻)을 분해시켜서 hydrogen peroxide(H₂O₂)를 생성하게 한다. 그리고, peroxidase(POD)와 catalase(CAT)는 hydrogen peroxide(H₂O₂)을 분해시켜서 물(H₂O)과 산소(O₂)로 됴므로, 활성산소종의 유해작용을 완전히 제거해 주게 되는 것이다. 그런데, peroxidase(POD)는 hydrogen peroxide(H₂O₂) 외에 다른 기질을 필요로 하는 반면에, catalase(CAT)는 오직 hydrogen peroxide(H₂O₂)만을 기질로 이용하게 되는 것이다.

SOD는 여러 개의 isoenzyme들이 있다. 즉, Mn SOD, Cu/Zn SOD, Fe SOD가 있는 것이다. Mn SOD는 미토콘드리아에 위치해 있으며, Cu/Zn SOD는 세포질과 엽록체에 위치해 있으며, Fe SOD는 엽록체에 위치해 있다. 그리고, 식물체에는 Mn SOD, Cu/Zn SOD를 갖고 있다. 그리고, POD와 CAT도 여러 개의 isoenzyme들이 있을 것으로 예상되지만, SOD처럼 정확히 어떤 종류들이 있는지는 밝혀져 있지 않다.

식물체들은 어떤 스트레스를 줄 때 생성되는 활성산소종들을 얼마나 효과적으로 제거할 수 있는가에 따라 내성이 결정된다고 생각된다. 따라서, 이 논문에서는 tobacco plant에 각 항산화효소들의 유전자들을 주입시킨 transgenic plant에 오존을 처리하여 항산화효소의 변화를 조사함으로써 오존에 대한 내성과 항산화효소와의 관계를 규명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 식물재료

본 연구에 사용된 담배(*Nicotiana tabacum*, cv. *Xanthi*)는 형질전환되지 않은 wild type의 control line과 완두(*Pisum sativum* L.)의 chl.Mn-SOD와 chl.Cu/Zn-SOD cDNA로 형질전환된 두 line의 종

작을 생명공학연구소에서 제공받아 사용하였다. 종자는 MS 배지에서 약 10 일간 무관광아시켰으며 2종의 transgenic line 종자는 Kanamycine selection medium(150mg/l)에서 광아시켜 형질전환체만을 선발하였다. 선발된 식물을 105-hole plate로 옮겨 심고, 2주 간 성장시키고 난 후, 직경 10cm의 plastic pot으로 이식하여 1주일 간 성장시킨 것을 식물재료로 사용하였다.

나. 오존 혼풍

직경 3m, 높이 2.4m의 open-top chamber를 이용하였다. charcoal-filtered air를 혼풍시켜서 대기 내에 존재하는 오염물질을 제거하였다. 이 안에 직경 0.9m, 높이 1m의 2개의 open-top chamber를 설치하였다. 한 chamber에는 0.2ppm의 오존을 혼풍시켰으며, 다른 chamber에는 혼풍을 하지 않은 상태로 놔두었다.

다. sampling 및 단백질 추출

3일 간 오존처리된 식물체와 오존처리되지 않은 식물체의 위에서부터 3번째 잎을 sampling하여 부채를 재고 호일에 싸서 액체질소에 얼려 보관하였다.

막자사발을 이용하여 sample들을 갈아둔 후 미리 액체질소에 얼려둔 용기에 옮겨 담았다. 0.1M KPi buffer solution(pH7.0) 2ml : plant extract 1g의 비율로 넣은 후, 15000rpm에서 10분 간 원심분리를 한다. 그리고 나서, 상등액만을 취하여 새로운 용기에 옮겨 놓는다.

라. 단백질량 정량

단백질은 Bradford(1976)의 dye-binding method에 따라서 분석되었다. sample의 흡광도는 595nm에서 측정되었으며 식물 추출물들의 단백질 농도는 BSA(bovine serum albumin)의 standard curve로부터 산정되었다.

마. SOD activity assay

SOD activity assay는 McCord와 Fridovich(1969)의 xanthin oxidase-cytochrome c의 방법으로 측정하였다. 기준적인 cocktail mixture 50ml에는 0.2mM KPi buffer(→EDTA(pH7.8)가 있는 것) 47ml, 1mM xanthine 2.5ml, 1mM cytochrome c 0.5ml을 넣고 잘 섞어서 만든 후, cytochrome c의 양을 조절한다. xanthine oxidase의 용량은 550nm(→cytochrome c의 환원)에서 0.025 ± 0.002 A/min의 기준이 되도록 조절하였다. SOD activity assay는 550nm에서 2분 30초 후에 산정되어 나오며, 그 값이 0.0125에 맞겠끔 sample의 양을 조절할 수 있다.

바. Electrophoresis

Loading을 하고 나서, gel들은 Bio-Rad vertical slab gel을 이용하여 10°C에서 40mA의 일정한 전류로 3-4h 동안 running되었다. gel들에 있어서 SOD의 banding pattern들은 nitroblue tetrazolium(NBT) activity staining 방법(Beauchamp & Fridovich, 1971)을 이용하여 시각화되었다.

3. 결과 및 고찰

가. 식물형태에 미치는 영향

오존처리 1일 후에는 가시적 피해가 없었으나 2일 쯤부터 심하게 탈색되기 시작하여 3일 후에는 생장이 불가능하여 담배 잎의 생체량이 급격히 감소하였다. 그러나 오존처리에 의한 생체량 감소율에 있어서는 line간에 상당한 유의적 차이를 보였는데 오존을 처리하지 않은 Control line은 오존을 처리한 것에 비해서 약 28%였으며 이에 비해 Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD transgenic line은 오존 스트레스에 대해 각각 46%, 34%로서 성장감소가 다소 둔화됨을 알 수 있었다. 결국 Mn-SOD line의 경우는 오존

스트레스에 대해서 강한 저항성을 갖고 있는 transgenic plant로 생각된다. 오존에 의하여 발생된 과도한 활성산소종은 조직세포내의 광합성 전자전달계를 교란시켜 조직의 파괴를 초래하는 것으로 생각되며 이 과정에서 항산화효소의 overexpression이 활성산소종을 scavenging할 때 효과적으로 작용하였으며 Cu/Zn-SOD 보다는 Mn SOD가 더 효율적이라고 생각된다.

Table 1. 0.2ppm O₃을 처리한 tobacco plant의 잎의 생체량 변화(g fresh weight)

line	0ppm	0.2ppm
Control	0.98 ± 0.06	0.27 ± 0.02
Mn SOD	0.77 ± 0.16	0.36 ± 0.08
Cu/Zn SOD	1.15 ± 0.15	0.40 ± 0.05

* ±는 SD (n = 3)

나. 단백질 합성에 미치는 영향

오존에 의해 발생된 활성산소종은 단백질 및 그 합성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 oxidative damage를 확인하기 위하여 carbonyl group의 함량을 측정하는 방법이 이용되고 있으나 (Levine et al., 1990), 본 실험에서는 단백질 함량의 변화를 조사하였다. 오존을 처리하지 않은 대조구의 단백질 함량을 100으로 보았을 때 오존처리구의 비율을 나타낸 것이다(Table 2). Control line에 비하여 Mn과 Cu/ZnSOD line의 단백질 함량이 2-2.5배 더 많음을 알 수 있다. 이러한 결과로 control line에 비하여 transgenic line들이 오존 스트레스에 대하여 damage를 덜 입는다고 볼 수 있으며 이는 형질전환된 항산화효소의 효과에 기인하는 것으로 사료된다.

Table 2. 0.2ppm O₃의 처리에 따른 tobacco plant의 단백질 함량(mg protein/g FW)의 변화

line	0ppm	0.2ppm
Control	3.720 ± 0.3	0.770 ± 0.07
Mn SOD	3.090 ± 0.3	1.120 ± 0.04
Cu/Zn SOD	2.780 ± 0.1	1.47 ± 0.2

* ±는 SD (n = 3)

다. SOD활성에 미치는 영향

오존처리하지 않은 것에 비하여 오존처리구는 세 line 모두에서 SOD활성의 급격한 증가를 나타내었으며 그 중 control line이 7배로 가장 높은 증가율을 보였다. Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD line도 각각 5배, 3배 증가하여 오존 스트레스에 SOD가 밀접하게 작용함을 알 수 있다(Table 3).

Table 3. 0.2ppm O₃의 처리에 따른 tobacco plant의 SOD activity*(Units/g FW)의 변화

line	0ppm	0.2ppm
Control	30.3 ± 3.7	210 ± 20
Mn SOD	53.5 ± 4.0	260 ± 30
Cu/Zn SOD	30.7 ± 3.3	93.21 ± 22

* SOD activity는 specific activity.

** ±는 SD (n = 3)

한편 오존처리하지 않은 것에 있어서의 SOD활성은 control line에 비하여 Mn-SOD line이 약 2배, Cu/Zn-SOD는 거의 같은 활성도를 보였다. 이를 SOD 활성염색으로 분석해 본 결과 SOD isozyme은 모두 3종으로 나타났으며 control line은 제 1 Cu/Zn-SOD 하나였으며 Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD line은 제 1 Cu/Zn-SOD band를 포함하여 각각 2개 씩으로 나타났다. 그러나 오존을 처리하였을 경우 제 1 Cu/Zn-band는 모든 line에서 진하게 나타났다. 또한 Cu/Zn-SOD line의 경우는 insert된 제 2 Cu/Zn-SOD band가 사라졌다. 그러나, Mn-SOD line의 경우에는 Mn-SOD band는 더욱 활성화되었다. 결국, 오존에 의한 활성산소종을 제거하는데는 Mn-SOD와 제 1 Cu/Zn-SOD isozyme이 효율적으로 작용하며 반면에 제 2 Cu/Zn-SOD(inserted)는 활성산소종에 의해 쉽게 불활성화되는 것으로 생각된다.

이와 같은 결과는 Arabidopsis속을 재료로 한 연구에서도 보고 되었는데(Rao et al., 1996), 하루에 8시간 씩 0.2ppm의 농도로 8일 간 처리하였을 때 처리 1일 제부터 SOD활성이 서서히 증가하여 8일째에는 약 2배의 활성증가를 나타내었으며 이 중 대부분의 활성증가가 Cu/Zn-SOD에 의한 것으로 보고하였다. 또한 오존처리되지 않은 것에서 존재했던 4개의 Cu/Zn-SOD isozyme 중 하나의 isozyme이 오존처리에 의해 없어진 것으로 보고하였다.

라. POD 활성에 미치는 영향

POD는 필수기질인 H₂O₂ 이외에 여러 가지 co-substrate를 사용하는데 본 실험에서는 pyrogallol을 이용하여 활성측정을 하였다. 특히 POD는 식물의 성장과 분화과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Gaspar et al., 1991), 따라서 isozyme도 multiple molecular form으로 종류가 많다. Xanthi 담배에서는 오존처리 되지 않은 것에서 control의 경우 2개의 isozyme이 있는데 비해 Mn-SOD와 Cu/Zn-SOD line에는 4개의 isozyme이 존재하였다. 이것은 overexpression된 SOD의 작용에 의하여 생성된 H₂O₂를 POD가 scavenging 하기 위해서는 새로운 isozyme의 POD가 필요했을 것이라는 사실에 주목할 만하다. 오존 처리시에는 SOD와 마찬가지로 활성이 2-3배 증가하였으며 Mn-SOD line이 가장 큰 활성의 증가를 보였다(Table 4). 활성 염색 분석에서도 모든 isozyme이 진하게 염색되었다.

Table 4. 0.2ppm O₃의 처리에 따른 tobacco plant의 POD activity*(Units/g FW)의 변화

	0ppm	0.2ppm
Control	3.17 ± **0.1	6.62 ± 1.2
Cu/Zn SOD	4.69 ± 0.2	12.4 ± 2.0
Mn SOD	3.51 ± 0.1	8.91 ± 0.7

* POD activity는 specific activity.

** ±는 SD (n = 3)