잎의 노화와 퍼옥시좀의 산소 라디칼 대사
(Leaf Senescence and the Metabolism of Oxygen Radicals in Peroxisomes)

陳昌德

강원대학교 생명과학부

緖論

잎의 노화는 잎 세포 구조의 일반적인 분해 및 그 분해산물이 식물체내 다른 기관으로의 이동(mobilization)을 포함하는 유전적으로 조절된 산화과정 (oxidative process) 이다. 잎의 노화현상은 주로 광합성 활동의 정지, 세포 소기관 구조의 분해, 엽록소와 단백질과 같은 세포 구성물질의 소실 및 지질 분자의 과산화와 세포막 파괴의 극적인 증가 등에 의해 특징지어진다(Buchanan-Wollaston, 1997). 특히 지질 분자의 과산화 반응과 세포막 파괴는 노화과정 동안 식물조직에서 발생되는 활성형 산소 분자종(activated oxygen species : AOS)의 증가에 주로 기인된다(Thompson 등, 1987).

고등식물에서 엽록체 틸라코이드 막을 포함한 식물세포막은 노화과정 진행 시 요구되는 에너지를 제공하기 위하여 분해되어 대사 될 수 있는 지질 분자들의 훌륭한 저장소 역할을 한다(Buchanan-Wollaston, 1997). 전체 틸라코이드 막 지질의 40-50%를 점유하는 galactolipid는 글루코네오제네시스 (gluconeogenesis) 반응을 통해 당으로 전환되는데 이것은 노화과정동안 호흡에 필요한 에너지원으로 이용되거나 혹은 식물체 내에서 그 밖의 다른 물질을 구성하는데 있어 기본재료로 이용된다 (Landolt와 Matile, 1990 ; Smart, 1994). 이러한 분해과정이 부분적으로 노화가 진전된 잎의 퍼옥시좀(leaf peroxisome)내에서 일어나는 것으로 제안되었다. 이 제안은 잎 퍼옥시좀이 마치 지방 함유 종자 (oil seed) 내의 글리옥시좀 (glyoxysome) 처럼 지방산의 β-산화반응과 그리고 malate synthase (MS) 및 isocitrate lyase (ICL)와 같은 glyoxylate 회로 구성효소를 포함한다는 사실로 입증되고 있다 (Landolt와 Matile, 1990). 또한 MS와 ICL의 발달이 노화중인 잎에서 증가된 유전자 발현의 결과로서 증진된다는 보고도 발표되었다 (Pistelli 등, 1996).

한편, 활성형 산소 라디칼 (oxygen radicals)을 포함하는 세포 반응은 식물 노화과정의 기본적 특징이 되며 이 반응은 세포의 죽음을 초래하는 산화적 퇴행과정을 촉진하는 것으로 알려지고 있다(Thompson 등, 1987). 현재까지 연구에 의하면, 활성형 산소 분자들은 식물의 노화에 있어서 산화적 손상의 제일차적인 유도자가 되며 이것들에는 superoxide 라디칼 ($O_2^{\cdot}$), hydroxyl 라디칼($^{\cdot}OH$), H_2O_2, Singlet oxygen 등이 포함되고 있는데 이들 산소 라디칼 중에서 특히 superoxide 라디칼은 DNA등 생체 고분자들을 신속하게 공격하여 회복될 수 없을 정도의 대사기능 저해를 일으켜 세포의 죽음을 이끄는 강력한 산화제 (산소독성) 가 된다.

그러나 식물은 세포 내 존재하는 효소적 그리고 비효소적 항산화 방어계 (antioxidative defense system)를 가지고 있다. Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), peroxidase(POD)와 ascorbate-glutathione 회로 구성효소들이 중요한 항산화 효소의 예가 된다. 비효소적 항산화제(nonenzymatic antioxidants)로서는 ascorbate (비타민 C), glutathione, α-tocopherol (비타민 E), β-카로틴 및 프라보노이드 등이 있는데 이것들은 주로 엽록체에 분포하며 또한 미토콘드리아와 퍼옥시좀에도 존재함이 최근 알려지고 있다. 정상적인 대사 환경하에서 식물의 항산화 방어계는 활성산소 라디칼에 대한 충분한 보호를 식물에 제공해 주지만 산소 라디칼의 생성이 항산화 방어능을 초과하게

되면 (예를들어 식물노화의 경우) 이때에 산화스트레스가 나타나게 된다.

그러므로 본 소고에서는 잎의 노화과정을 활성산소 관점에서 본 잎퍼옥시좀의 기능과 관련지어 고찰해 보고자 한다.

本論

1. 퍼옥시좀의 異種性 (peroxisomal heterogeneity)과 superoxide 라디칼 생성

퍼옥시좀은 단일막 (single membrane) 계에 의하여 세포 내 주변 세포질과 경계되어져 보편적으로 존재하는 식물 세포 소기관으로서 독점적으로 catalase와 H_2O_2생성-flavin oxidase등을 포함하고 있다 (Huang 등, 1983). 이 세포 소기관은 1960년대 초에 최초로 분리 동정되어 그 생화학적 특성이 규명되었다 (del Rio 등, 1992). 처음에는 퍼옥시좀이 단지 퍼옥시좀의 호흡경로 상에서 발생된 독성의 H_2O_2를 자신이 간직하고 있는 catalase를 이용하여 분해 제거시키는 역할만을 수행하는 것으로 알려졌으나, 최근에는 거의 모든 진핵세포에서 퍼옥시좀이 필수적인 세포기능을 수행하고 있음이 명백해졌다 (Huang 등, 1983 ; van den Bosch등, 1992). 즉 퍼옥시좀은 본질적으로 산화형 대사과정을 담당하고 있으며 또한 여러 다른 대사를 수행할 능력을 가지고 있는 것이다.

분화된 퍼옥시좀의 한 형태로서 글리옥시좀은 주로 지방 함유 종자내의 저장조직에서 흔히 볼 수 있는데 여기에는 지방산의 β-산화와 종자내 저장 지질을 당으로 전환시키는 glyoxylate 회로 구성효소들을 포함하고 있어 종자발아와 어린 식물의 초기생장에 크게 관여한다 (Huang 등, 1983). 잎 퍼옥시좀은 광합성을 수행하는 조직 내에 존재하여 광호흡 (photorespiration) 반응을 담당하는 전형적인 퍼옥시좀이다. 여기에 분포하는 특징적 효소로는 catalase 이외에 RuBP의 분해산물인 glycolate를 산화시키는 glycolate oxidase와 hydroxy pyruvate reductase가 있다. 또 다른 분화된 퍼옥시좀으로서 일부 열대 콩과식물의 뿌리마디 (root-nodule) 세포 내에 분포하는 root-nodule 퍼옥시좀이 있으며, 이 세포 소기관에서는 식물체내 중요한 이동형 질소 화합물의 한 종류인 allantoin의 합성이 일어난다 (Huang 등, 1983). 이러한 여러 형태의 퍼옥시좀내에서 H_2O_2의 생성에 관련된 주된 대사반응들로서는 광호흡 과정의 일부인 glycolate의 산화반응, 지방산의 β-산화, flavin oxidase들에 의한 효소반응 및 superoxide 라디칼의 변형반응 등이 보고 되고 있다 (del Rio 등, 1992, 1996).

퍼옥시좀은 미토콘드리아와 엽록체처럼 자신의 일상적인 대사활동 수행 결과로서 superoxide 라디칼을 만들어 낸

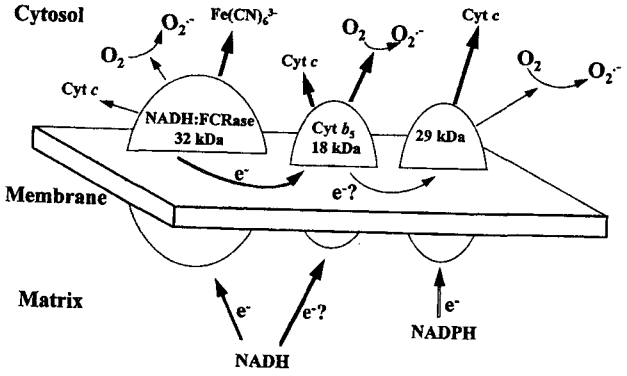

Fig.1. Model illustrating the NAD(P)H-dependent production of superoxide radical($O^{\cdot-}$) by peroxisomal membranes from pea leaves.

다. 완두 잎의 퍼옥시좀에서는 적어도 두군데의 superoxide 라디칼의 생성 장소가 알려져 있다. 그 중 한 장소는 퍼옥시좀 기질 (matrix) 부위로서 이곳에 있는 xanthine oxidase가 superoxide 라디칼의 생성원으로 확인되었으며 또 다른 발생장소는 퍼옥시좀막 내에 존재한다 (del Rio 등, 1992). 잎 퍼옥시좀 막에 의한 superoxide의 생성에는 적은 규모의 전자 전달계가 관련되어 있는 것으로 보여지고 있다. 즉, 최근에 완두 잎퍼옥시좀에서 내재성 퍼옥시좀막 단백질이 SDS-PAGE에 의하여 분리되었는데 그 중 3개의 막단백질 (18, 29, 32 kD) 의 특성이 각각 32 kD의 flavo 단백질인 NADH:ferricyanide reductase 와 18 kD의 cytochrome b_5 (cyt b_5)및 29 kD의 NADPH:cytochrome C reductase 단백질로서 규명되었다 (Fang 등, 1987). 이들 막단백질 성분들이 NADH로부터 cyt b_5에 이르는 하나의 작은 전자 전달계를 이루어 퍼옥시좀 내 superoxide 라디칼 생성에 관련된 것으로 입증되었다 (Lopez-Huertas 등, 1996, 1997). 이 모델에 의하면 NADH:ferricyanide reductase, cyt b_5 및 cytochrome C가 활성화되어 산소분자를 superoxide 라디칼로 환원시키는데 즉, NADH:ferricyanide reductase는 퍼옥시좀 기질내의 NADH로부터 cyt b_5 쪽으로 일어나는 전자전달의 한 담당자가 되며 다시 cyt b_5는 자신이 받은 전자를 cyt C에 넘겨 주는데 이 과정에서 발생된 superoxide가 퍼옥시좀 막에서 생성되는 대부분의 superoxide 생성원이 된다. 한편, 29 kD의 퍼옥시좀 막단백질은 NADPH:cytochrome C reductase 활성을 가져 역시 superoxide 라디칼 생성에 관여하나 앞에서 언급한 NADH:ferricyanide reductase 활성보다는 작게 나타난다 (Fig. 1).

이와 같은 superoxide 라디칼의 생성은 퍼옥시좀의 대사과정에서 재사용 되어지는 NAD^+를 만들기 위하여 퍼옥시좀의 전자전달 사슬에 의한 NADH 재산화시 일어나는 피할 수 없는 결과로 보인다. 정상적인 대사 상황하에서 퍼옥시좀막에 의해 생성된 superoxide 라디칼은 세포에 위협적이지 못한데 그 이유는 세포가 superoxide 라디칼로부터 충분히 보호되기 때문이다. 그러나 식물이 스트레스를 받고 있는 동안에는 퍼옥시좀 막에서 생성된 superoxide 라디칼이 세포질 쪽으로 많은 방출이 일어나게 되어 세포는 심각한 상황을 맞게 된다.

2. 잎 노화 중 산소라디칼 대사와 관련된 퍼옥시좀 효소의 변화

성숙한 잎을 떼어낸 후 암소에서 배양하면서 인위적으로 잎의 노화를 유도하였을 때 노화중인 잎에서 분리된 퍼옥시좀 내의 효소 계에서는 극적인 변화가 나타난다 (Fig. 2.). 광호흡 반응의 두가지 지표효소인 glycolate oxidase

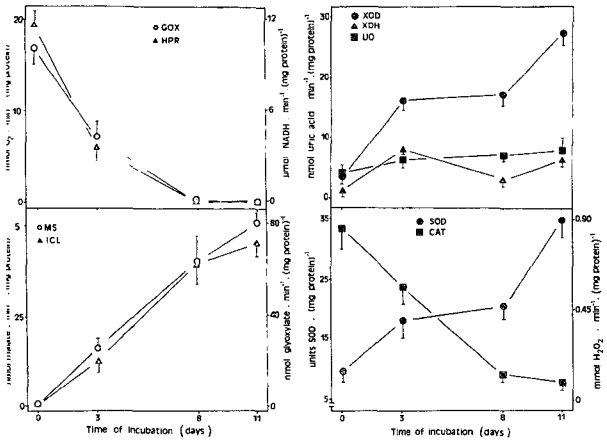

Fig.2. Specific activities of enzymes of activated-oxygen metabolism, glyoxylate cycle and photorespiration in peroxisomes purified from pea leaves induced to senesce by dark incubation. XOD: xanthine oxidase, XDH:xanthine dehydrogenase, UO:urate oxidase, SOD:superoxide dismutase, CAT:catalase, GOX:glycollate oxidase, HPR:hydroxy pyruvate reductase, MS:malate synthase, ICL:isocitrate lyase.

(GOX) 와 hydroxy pyruvate reductase (HPR) 활성도가 현저히 감소되며 노화가 크게 진전되었을 때는 거의 이들 효소활성이 검출되지 않는다. 그러나 glyoxylate 회로 효소인 MS와 ICL 활성도는 젊은 잎에서는 검출되지 않으나 노화가 진행되면서 극적으로 증가한다 (Pastori 와 del Rio, 1994). 또한 퓨린 (purine) 분해 대사에 관련된 두가지 효소인 xanthine oxidase (XOD) 와 urate oxidase (UO) 활성도 역시 증가한다. 이렇게 증가된 XOD 와 UO 활성은 각각 xanthine 과 uric acid를 산화 시키는 과정에서 분자상의 산소를 환원시켜서 결국 퍼옥시좀내 superoxide 라디칼과 H_2O_2 축적을 초래하게 되는데 이들 두 효소활성도의 증가는 노화 중에 RNA 분해로부터 기인되는 퓨린 염기 분해에 있어서 퍼옥시좀의 적극적인 역할을 의미하는 것이 된다 (Pastori 와 del Rio, 1994). 퍼옥시좀에서는 활성형 산소 라디칼 대사와 관련된 또 다른 중요 효소의 변화로서 금속 효소 계열인 Mn-SOD (Mn-superoxide dismutase)활성도가 잎의 노화와 더불어 급속히 증가한다. 이 같은 사실은 퍼옥시좀이 superoxide 라디칼 축적과 H_2O_2의 생성이라는 문제에 직면해 있음을 의미하는 것이 된다. 실제 식물 퍼옥시좀에서의 SOD 존재는 적어도 7 종의 식물에서 보고 되었으며 이들 중 4 종의 식물에서 SOD 존재가 immunoelectron microscopy에 의하여 확인되었다. 한편, H_2O_2 분해에 결정적인 역할을 맡고 있는 catalase 활성도는 오히려 노화가 진행됨에 따라 그 활성이 거의 다 소실된다 (Fig. 2.). 산소 라디칼 대사와 관련된 이와 같은 효소계의 변화는 자연적으로 노화된 잎 (natural senescing leaf) 에서도 동일한 경향을 나타내고 있다 (Pastori 와 del Rio, 1997). 이처럼 퍼옥시좀 내의 H_2O_2 농도와 퍼옥시좀 막에서의 NADH 의존성 superoxide 라디칼 생성은 지질의 과산화반응 속도와 더불어 노화중인 잎의 퍼옥시좀에서 크게 증가되므로 노화현상은 궁극적으로 막에서 생성된

superoxide 라디칼을 세포내 시토졸로 크게 방출시키게 되며 또한 퍼옥시좀 밖으로 쉽게 확산될 수 있는 H_2O_2의 과잉생산과 연결된다 (Table 1). 이 결과 금속이온에 의해 촉매 되는 H_2O_2와 superoxide 라디칼의 결합반응으로 강력한 산화제인 hydroxyl 라디칼 (·OH)이 만들어지면서 세포내 다양한 산화스트레스 상황을 유발하게 되는 것이다 (Halliwell 와 Gutteridge, 1989). 또한 잎의 노화동안 퍼옥시좀 내의 대사과정의 변화를 일으키는 세포 신호 (cell signal) 물질로서의 관점에서 볼 때 이들 superoxide 라디칼이나 H_2O_2와 같은 활성산소 라디칼 들은 세포 신호전

Table I. Lipid peroxidation, superoxide production, and H_2O_2 concentration in peroxisomes of naturally senescent pea leaves

MDA and H_2O_2 concentrations were determined in intact leaf peroxisomes purified from 15-and 50-d-old plants. The NADH-dependent generation of $O2^{\cdot -}$ radicals was esitmated in peroxisomal membranes. Each value is the mean of six(MDA and H_2O_2) and three($O2^{\cdot -}$) different experiments ± se.

Age	Lipid Peroxidation	Superoxide Production	H_2O_2 Content
d	*nmol MDA mg-1 protein*	*nmol O2·-min-1mg-1 protein*	*nmol H2O2mg-1 protein*
15	0.78 ± 0.1	4.6 ± 1.1	1.9 ± 0.2
50	· 2.53 ± 0.3	9.8 ± 3.5	3.2 ± 0.4

달 경로상에서 특별한 화학적 신호 전령자로서의 역할을 수행하는 것 같다 (Prasad 등, 1994; del Rio등, 1996). 잎 퍼옥시좀에 관한 최근의 연구결과와 노화현상이 산화과정을 내포하고 있다는 점을 고려하여 볼 때 잎의 노화동안 생성되는 superoxide 라디칼이나 H_2O_2는 특수한 유전자의 발현을 이끌어 내는 신호전달 과정에서 어떤 역할을 할 수 있을 것으로 제안되고 있다.

3. Ascorbate-glutathione 회로와 노화

Ascorbate-glutathione 대사 회로는 H_2O_2가 생성되는 곳이지만 H_2O_2 주분해 효소인 catalase가 존재하지 않는 세

포 내 특정장소에서 H_2O_2를 제거하는 데 효과적인 수단이 된다 (Klapheck 등, 1990). 이 대사회로는 4개의 항산화 효소에 의해 조절되는 일련의 반응에서 항산화 저분자 물질인 ascorbate와 glutathione을 이용하는데 이 회로의 세포 내 분포가 엽록체, 시토졸, 미토콘드리아 등에서 보고 되고 있다 (Foyer 와 Mullinneaux, 1994; Jimenez 등, 1997a). 완두 잎에서 분리된 퍼옥시좀과 미토콘드리아에서 이 회로 구성 4개 효소 모두의 존재가 최근 알려졌다 (Jimenez 등, 1997a). 즉, 이 4가지 효소는 ascorbate peroxidase (APX), monodehydroascorbate reductase (MDHAR), dehydroascorbate reductase (DHAR) 과 glutathione reductase (GR) 이다. 또한 ascorbate와 glutathione이 각각 그들의 산화형태인 dehydroascorbate(DHA) 및 GSSG와 함께 존재한다는 사실도 HPLC분석에 의해 입증되었다 (Jimenez 등, 1997a). 현재 잎 퍼옥시좀내 ascorbate-glutathione 회로의 역할에 대한 모델이 Fig.3 과 같이 제

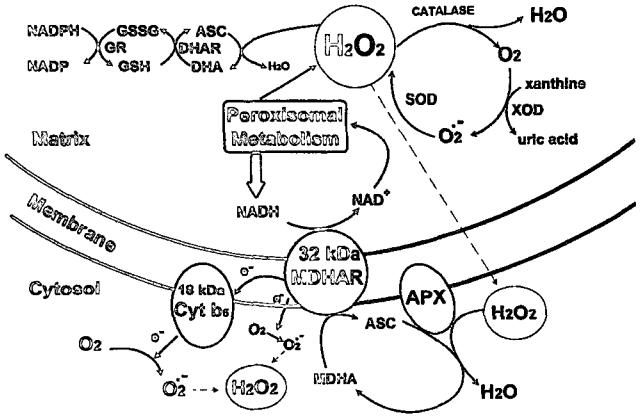

Fig.3. Model proposed for the function of the ascorbate-glutathione cycle in leaf peroxisomes. ASC:ascorbate, DHA:dehydroascorbate, APX:ascorbate peroxidase, MDHAR:monodehydroascorbate reductase, DHAR:dehydroascorbate reductase, GR:glutathione reductase.

안되고 있다. DHAR과 GR은 퍼옥시좀 기질 (matrix) 부위에서 발견되며 반면에 APX는 퍼옥시좀 막의 바깥쪽 면에 결합되어 있다. 이들 결과는 호박과 면화 식물의 퍼옥시좀 막에 존재하는 APX 동위효소의 최초 발견 사실과 일치하는 것이다 (Bunkelmann 와 Trelease, 1996). APX와 더불어 MDHAR 역시 퍼옥시좀막에 위치한다. 막을 관통해서 존재하는 MDHAR이 퍼옥시좀의 기질 쪽에 있는 NADH를 산화 시킬 수 있으며 이 때 NADH의 산화결과 전자를 막의 시토졸 쪽에 면해있는 수용체 분자인 monodehydroascorbate로 운반하여 준다 (Luster와 Donaldson, 1987; Bowditch 와 Donaldson, 1990). 이 과정에서 산소분자는 전자 수용체로 작용하며 그 결과 superoxide 라디칼이 생성된다(Lopez-Huertas 등, 1996). 그러나, 잎 퍼옥시좀 막에서의 APX와 MDHAR의 존재는 퍼옥시좀 대사에서 이들 효소의 상보적인 이중기능을 의미하고 있다. 즉, 그 첫째 기능은 퍼옥시좀 자신의 대사를 유지 하기 위해 일정한 NAD^+의 공급이 요구되는데 바로 이것을 위한 내재성 NADH의 재 산화에 관여한다. 두 번째 기능은 막에 존재하는 이들 효소가 퍼옥시좀에서 시토졸로 확산되어 나오는 H_2O_2의 독성을 방어한다는 것이다. H_2O_2는 쉽게 퍼옥시좀 막을 통과하여 시토졸로 확산되어 나올 수 있으며 이때 막에 존재하는 APX가 누출되어 나오는 H_2O_2를 무독성의 물로 대사 시켜 제거하게 된다. 동시에 퍼옥시좀 막의 NADH-의존성 전자 전달계에서 발생되는 superoxide 라디칼에 의해 만들어지는 H_2O_2도 역시 이 APX에 의하여 제거된다 (del Rio 등, 1992,1996 ; Lopez-Huertas 등, 1996, 1997). 이와 같은 퍼옥시좀 막에서의 H_2O_2 제거는 정상적인 식물의 대사과정 동안에 또는 어떤 특정한 스트레스를 식물이 받고

있는 동안 -이 경우에 퍼옥시좀에서 생성된 H_2O_2 함량 수준이 실제적으로 증가될 수 있음- 에 시토졸 내의 H_2O_2 축적을 억제 할 수 있게 된다 (del Rio 등, 1996).

실제로 애기장대 유식물에 catalase 특이 억제제로서 알려진 제초제 화합물인 aminotriazole을 식물에 비치명적인 농도로 처리하였을 때 애기장대 잎에서 catalase 활성도가 현저하게 억제되는데 이때 APX와 GR의 총 효소 활성도가 크게 증진되면서 (Fig.4) 동시에 H_2O_2의 축적이 초래되지 않는 결과 (Fig.5) 가 발표되었다. 이때 APX와 GR의 총활성도 변화와 관련하여 그들의 동위효소 발달을 분석한 결과, 특정 동위효소가 이들 총효소 활성도 증가를 주도적

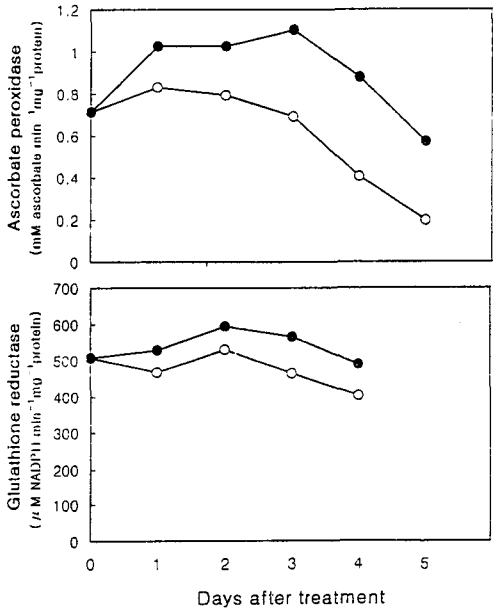

Fig.4. Developmental changes of the activities of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in growing leaves of A. *thaliana* in the presence(●) or absence(○) of 0.1mM aminotriazole.

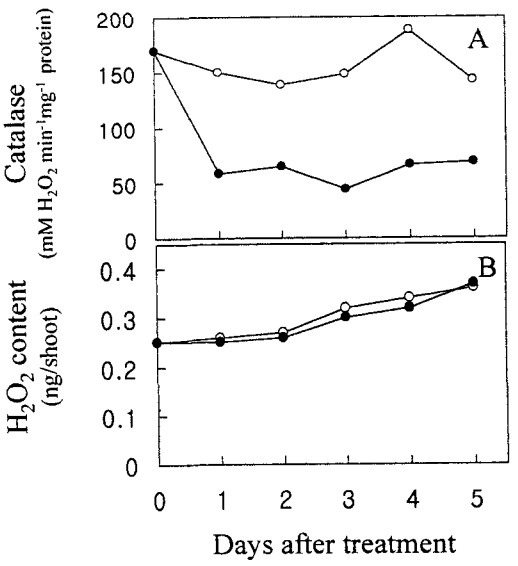

Fig.5. The developmental changes of catalase activity and hydrogen peroxide content in growing leaves of A. *thaliana* in the presence(●) or absence(○) of 0.1mM aminotriazole.

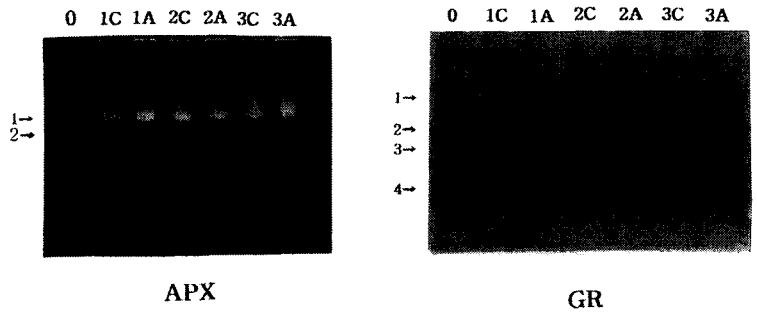

Fig.6. Native gels stained for ascorbate peroxidase(APX) and glutathione reductase(GR) in growing A. *thaliana* leaves treated with (A) or without(C) 0.1mM aminotriazole for 3-days.

으로 이끌고 있음을 확인 할 수 있다 (Fig.6). 퍼옥시좀의 ascorbate-glutathione 회로도 역시 잎의 노화에 의해 영향을 받는다. 암 처리에 의해 노화가 유도된 잎에서 퍼옥시좀의 APX와 MDHAR활성도가 현저히 감소하나 DHAR 활성도는 눈에 띄게 증진된다. 반대로 GR활성도는 노화에 크게 영향을 받지 않는다 (Jimenez 등, 1997b). 퍼옥시좀 내 ascorbate 함량은 잎의 노화시 약간 증가하나 총 glutathione함량은 약 20배 증가한다. 이것은 노화동안에 산화형인 GSSG가 크게 늘어났기 때문인데 그 결과 퍼옥시좀에서 GSSG/GSH함량 비율이 43 배로 증가한다 (Jimenez 등, 1997b).

이런 결과는 노화가 진행되고 catalase 활성이 사라질 때 퍼옥시좀에서 H_2O_2를 제거하기 위해 ascorbate-glutathiione 회로가 중요하게 작용한다는 것을 의미하는 것으로 해석될 수 있는 것이다.

4. 잎의 노화에 의한 퍼옥시좀-글리옥시좀의 변환

노화중인 잎에서 잎 퍼옥시좀이 글리옥시좀으로의 역 변환 (reverse transition)을 한다는 최근의 여러 보고가 있다. 실제로 노화된 잎의 퍼옥시좀내에 글리옥시좀의 지표효소인 MS와 ICL의 존재가 여러 식물 종에서 관찰되었다 (Landolt 와 Matile, 1990 ; Nishimura 등, 1993 ; Pistelli 등, 1996). Fig. 7 과 Fig. 8 은 각각 percoll 밀도구배 원심분리법에 의해 15일된 완두의 어린 잎 과 암 배양에 의해 노화가 유도된 30일 된 잎에서 순수 분리된 퍼옥시좀과 미토콘드리아 분획물(fraction)들이다. Fig.7 의 어린 잎 추출액내의 17번과 19번 사이의 분획물에서는 미토콘드리아의 지표효소인 fumarase 활성도가 전혀 검출이 안되는 점으로 보아 미토콘드리아에 의한 오염이 전혀 없는 퍼옥시좀 분획 peak로서 1.091 g cm^{-3}의 비중을 나타내면서 이 퍼옥시좀 그룹에서는 글리옥시좀 효소인 MS와 ICL 활성도가 검출이 안되고 있다. 그러나 30일 된 노화된 잎 추출물에서 percoll 밀도구배 원심분리법의 분석결과, 17번과 21번 분

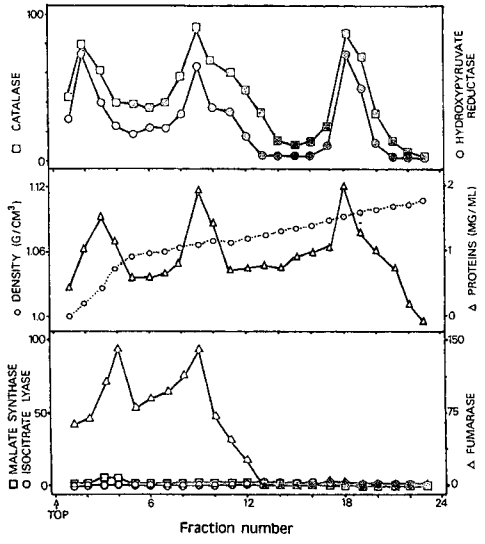

Fig.7. Purification of peroxisomes and mitochondria from young(15-d-old) pea leaves. Cell organelles were purified from 15-d-old pea leaves by Percoll density gradient centrifugation.

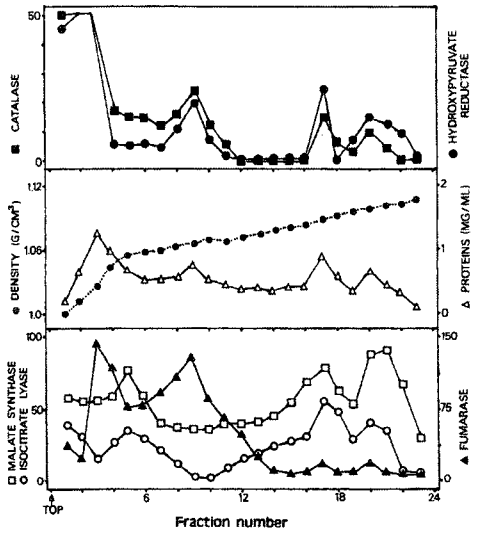

Fig.8. Purification of peroxisomes and mitochondria from 30-d-old leaves induced to senesce by dark incubation. Cell organelles were purified by Percoll density gradient Centrifugation.

획 에서 두 개의 퍼옥시좀 피크가 뚜렷이 관찰되었는데 흥미롭게도 이 두 퍼옥시좀 분획 집단에서 MS와 ICL 효소 활성이 높게 나타나고 있었다. 이 결과는 잎의 노화가 잎 퍼옥시좀이 글리옥시좀으로 변환되는 역 변환현상과 관련되어 있다는 주장을 지지해 주는 것이다. 한편, 어린 잎과 노화된 완두 잎에서 얻어진 퍼옥시좀 분획물의 순수분리도와 형태를 분석하기 위한 전자현미경 관찰 연구에 의하면 노화된 잎에서 얻어진 두 퍼옥시좀 분획 집단 (Fig.8 의 17번 분획과 21번 분획) 사이에 명백한 형태적 차이점이 발견된다. 즉, 17번 분획물내의 퍼옥시좀은 어린 대조구 잎의 퍼옥시좀 (Fig. 9A) 과 비교시 퍼옥시좀 기질이 갖는 전자밀도(electron density)는 적으나 전형적인 퍼옥시좀 크기를 보여준다 (Fig. 9B). 대조적으로 21번 분획물내의 퍼옥시좀은 크기가 작고 높은 전자밀도를 나타내고 있다 (Fig. 9C).

Fig.9. Electron Micrographs of purified peroxisomes from young(15-d-old) and senescent(30-d-old) pea leaves. A:peroxisomes from young leaves(×47,500), B:peroxisomes from dark-induced senescent leaves(fraction 17 in Fig.8)(×50,000), C:peroxisomes from dark-induced senescent leaves(fraction 19-22 in Fig.8)(×50,000).

이처럼 잎의 노화는 새로운 퍼옥시좀 집단의 출현을 유도하는데 이것은 아마도 잎의 노화의 마지막 단계에서 나타나는 일반적인 퇴행과정의 결과로 생각되고 있다. 동물에서는 여러 경우의 퍼옥시좀 이종성이 여러 스트레스 및 화합물 처리의 결과를 나타난다는 보고가 이미 발표된 바 있다.

또한, 퍼옥시좀의 SOD 활성도를 native-PAGE법으로 분석한 결과에 의하면, 잎의 노화에 따른 매우 커다란 변화가 일어나고 있음을 알 수 있다 (Fig. 10). 즉, 원래부터 잎 퍼옥시좀에 존재하는 Mn-SOD의 활성도가 잎의 노화현상 진행과 함께 현저히 증가하는데 그와 동시에 2개의 새로운 CuZn-SOD동위효소 활성이 나타난다. 이때 새로이 유도된 CuZn-SOD 효소 중의 하나가 글리옥시좀의 CuZn-SOD에 대한 항체에 의하여 인식되는데 이 사실은 잎의 노화가 잎 퍼옥시좀을 글리옥시좀으로 변환시킨다는 가설을 더욱 뒷받침하는 것이 된다.

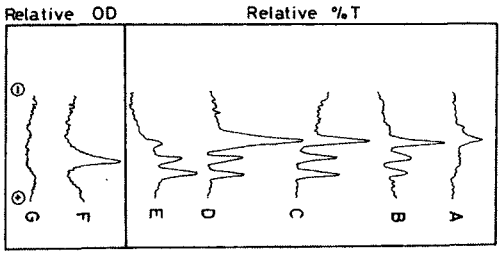

Fig.10. Isozyme pattern of SOD and western bolt analysis of peroxisomes from senescent pea leaves. Gel A to E were stained for SOD activity and then scanned with a densitometer. A:young leaf peroxisomes(15-d-old), B:naturally senescent leaf peroxisomes, C:dark-induced senescent leaf peroxisomes(15-d-old), D:dark-induced senescent leaf peroxisome(30-d-old, fraction 17 in Fig.8), E:fraction 19-22 in Fig.8, F,G:peroxisomes from dark-induced senescent leaves(fractions 19-22 of Fig.8) and naturally senescent leaves were incubated with a polyclonal antibody against glyoxysomal CuZn-SOD. Then, relative absorbance was recorded by densitometry.

이처럼 잎의 노화에 의한 퍼옥시좀-글리옥시좀의 변환은 결국 지방산의 β-산화와 glyoxylate 회로 활성화의 증진과 연관되어 틸라코이드 지질을 당으로 전환시키는 수단이 될 수 있으며 그 결과 만들어진 당은 어린 잎이나 저장기관 세포의 호흡을 위해서 또는 세포 구성재료로 재 이용되어진다.

結論

노화는 잎 퍼옥시좀 집단의 양과 질뿐만 아니라 퍼옥시좀 내의 산화형대사 (oxidative metabolism), SOD 동위효소 그리고 ascorbate-glutathione 회로에서 중요한 변화를 유발한다. 노화에 의해 유도된 퍼옥시좀의 활성 산소 대사의 변화는 주로 catalase 활성도의 감소, superoxide라디칼과 H_2O_2의 과잉생산으로 특징지어진다. 이들 산소 라디칼의 축적은 부분적으로 퍼옥시좀내의 ascorbate-glutathione 회로의 의하여 억제될 수 있다. superoxide 라디칼은 생리적 조건하에서 짧은 반감기를 갖고 있어 곧바로 H2O2와 산소로 변형되기 때문에 노화의 최종 결과는 잎 퍼옥시좀 내의 상대적으로 더 안정한 대사산물인 H_2O_2의 축적을 야기하며 이 H_2O_2는 시토졸로 확산되어 나오게 된다. 이것이 퍼옥시좀 뿐만 아니라 미토콘드리아, 핵, 엽록체등 다른 세포 소기관에 대해서도 심각한 상황을 일으키는데 그 까닭은 superoxide 라디칼과 H_2O_2가 금속 촉매에 의해 보다 강력한 산화력을 지닌 hydroxyl 라디칼 (·OH)을 형성할 수 있기 때문이다.

그러므로 퍼옥시좀은 특징적인 산화반응을 포함하는 잎의 노화에서 활성산소에 의해 매개되는 역할을 갖고 있는 것 같이 보인다. 한편, 퍼옥시좀에서 시토졸로 노화에 의해 유도되는 H2O2 누출은 특수한 유전자 발현을 이끄는 세포 내 신호전달 경로에서 second messenger로서 역할을 하는 것 같다, 이 경우 퍼옥시좀은 활성산소 시그날의 생성원으로서 잎 노화에 관련된 유전자의 조절에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보인다.

인용 문헌

Bowditch, MY., and RP Donaldson. 1990. Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiol* 94 : 531-537

Buchaman-Wollaston, V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp Bot* 48 : 181-199

Bunkelmann, JR and RN Trelease. 1996. Ascorbate peroxidase. A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol* 110 : 589-598

del Rio, LA., JM Palma, LM Sandalio, FJ Corpas, GM Pastori, P. Bueno and E Lopez-Huertas. 1996. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochem Soc* Trans 24 : 434-438

del Rio, LA., JM Palma, LM Sandalio, FJ Corpas. 1992. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biol Med* 13 : 557-580

Fang, TK., RP Donaldson and EL Vigil. 1987. Electron transport in purified glyoxysomal membranes from castor bean endosperm. *Planta* 172 : 1-13

Foyer, CH., and PM Mullineaux. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. *CRC Press*, Boca Raton, FL

Halliwell, B. and JMC Gutteridge. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd Ed. *Oxford Univ. Press*, Oxford, UK

Huang, AHC., RN Trelease and TS Moore. 1983. Plant peroxisomes. *Academic Press*., New York, NY

Jimenez, A., JA Hernandez, LA del Rio and F Sevilla. 1997a. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 114 : 275-284

Jimenez, A., JA Hernandez, LA del Rio and F Sevilla. 1997b. Ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves : Changes induced by leaf senescence. *Phyton* 37 : 101-108

Klapheck, S., I Zimmer and H Cosse. 1990. Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of Ricinus communis by ascorbate peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 31 : 1005-1013.

Landolt, R., and P Matile. 1990. Glyoxysome-like microbodies in senescent spinach leaves. *Plant Sci* 72 : 159-163

Lopez-Huertas, E., LM Sandalio, M Gomez and LA del Rio. 1997. Superoxide radical generation in peroxisomal membranes : evidence for the participation of the 18-kDa integral membrane polypeptide. *Free Radical Res* 26 : 497-506

Luster, DG and RP Donaldson. 1987. Orientation of electron transport activities in the membrane of intact glyoxysomes isolated from castor bean endosperm. *Plant Physiol* 85 : 796-800

Nishimura, M., Y Takeuchi, L De Bellis and I Hara-Nishimura. 1993. Leaf peroxisomes are directly transformed to glyoxysomes during senescence of pumpkin cotyledons. *Protoplasma* 175 : 131-137

Pastori, GM., and LA del Rio. 1994. An activated-oxygen-mediated role for peroxisomes in the mechanism of senescence of pea leaves. *Planta* 193 : 385-391.

Pastori, GM., and LA del Rio. 1997. Natural senescence of pea leaves : an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. *Plant Physiol* 113 : 411-418

Pistelli, L., B Nieri, SM Smith, A Alpi and L De Bellis. 1996. Glyoxylate cycle enzyme activities are induced in senescent pumpkin fruits. *Plant Sci* 119 : 23-29

Prasad, TK., MD Anderson, BA Martin and CR Stewart. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in marze seedings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6 ; 65-74

Smart C. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phyto.* 126 : 419-448

Thompson, JE., RL Ledge and RF Barber. 1987. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol.* 105 : 317-344

van den Bosch, H., RB Schutgens, RJ Wanders and JM Tager. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Annu Rev Biochem* 61 : 157-197