

식물 미토콘드리아에 대한 Superoxide 독성의 생화학적 측면

정 진 · 인만진

서울대학교 농과대학 농화학과

Biochemical Aspect of Superoxide Toxicity to Plant Mitochondria

Jin Jung and Man-Jin In

Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

Biochemical consequence of the accumulation in cells of superoxide (O_2^-) which was proposed to be probably a common chemical factor in the secondary process of the mechanism of chilling injury as well as in the visible light photodamage in cells of higher plants, has been investigated in the present work. Especially focused was the destructive effect of O_2^- on the biochemical activity of mitochondria, as informations which support the suggestion that mitochondrial inner membrane is the major site of O_2^- production have been collected. Mitochondria and submitochondrial particles (SMP) were prepared from soybean hypocotyls for this case study. When SMP were treated with the electrolytically produced O_2^- , they suffered not only inhibition of the membrane-bound enzymes as demonstrated by cytochrome *c* oxidase, but also lipid peroxidation of membrane as proved by malondialdehyde production. Malate dehydrogenase present in the protein extract from mitochondrial matrix was also inhibited by the O_2^- treatment. These results exhibited the chaotic effect of the overproduction and accumulation of O_2^- in cells under a certain abnormal circumstance such as environmental stress on the physiological function of mitochondria; disruption of the cellular metabolic pathways and the structural integrity of membrane.

서 론

고등식물의 저온스트레스 및 광피해에 있어서 공히 superoxide radical(O_2^-)의 세포내 과잉생성이 피해발현의 기작에 깊이 관련되어 있을 뿐만 아니라 미토콘드리아 내막이 그 주된 생성처임을 시사하는 실험결과들을 수집하여 그 일부를 이미 보고한 바 있다.^{1,2)} 즉 mitochondrial membrane의 상전이 온도 보다 낮은 한 저온에 일정기간 방치한 식물체를 다시 상온으로 환원시키면 조직 내에 높은

수준의 O_2^- 축적이 일어나는 것을 관찰하였고, 이는 저온에서 (mitochondrial membrane이 고체교질상의 상태에 있을 때) 나타나는 세포 분해대사 (glycolysis→TCA cycle→respiration)의 동적평형 파괴에 기인한다고 해석되었다.¹⁾ 한편 가시광선에 노출된 미토콘드리아막에서도 대사과정과는 무관하게 O_2^- 의 생성이 확인되었으며, 이는 가시광선을 흡수하는 막결합단백질에 의한 photodynamic sensitization의 결과라고 제안되었다.²⁾

미토콘드리아의 내막에서 과잉 생성되는 O_2^- 가 세포구성물질에 미칠 수 있는 화학적 피해는 우선적으로 미토콘드리아의 생화학적 활성저해로 나타날 것이다. 그리고 그 가능한 저해로서는 미토콘

1988년 10월 9일 수리

Corresponding Author: J. Jung.

드리아 효소계에 대한 저해와 막의 과산화를 상정할수 있다. 따라서 본 연구에서는 호흡전자전달계 및 TCA cycle에 참여하는 효소들을 각각 하나씩 선택하여 O₂에 의한 비가역적 저해를 조사하고, 나아가 미토콘드리아 내막에서 일어나는 과산화를 확인하려는 것이다.

재료 및 방법

시료 및 시약

상온의 암소에서 재배한 대두의 유경(hypocotyl) 조직을 시료로 사용하였다. 시약은 Merck, Kanto, Wako, 및 Sigma사 제품들의 EP 내지 GR grade로서 정제없이 사용하였다(생화학적 시약들은 대부분 sigma사 제품이었다). 다만 산화형과 환원형이 섞여있는 cytochrome C만은 K-ferricyanide로 산화시켜 sephadex G-25로 분리한 다음 동결건조시켜 사용하였다.

방법

① superoxide의 제조 및 농도 측정

N,N-dimethyl formamide (DMF)에 tetrabutyl ammonium bromide(TBAB)를 녹인 용액 (0.1M)에 산소를 bubbling시키면서 전기분해 (25V, 4mA)를 실시하여 tetrabutyl ammonium superoxide 염 형태의 O₂를 생산하였다.³⁾ 전기분해의 진행은 음극에서 진행되는 O₂생성반응(O₂+e→O₂⁻)과 짝지어 양극에서 일어나는 Br₂ 생성반응(Br⁻-e→ $\frac{1}{2}$ Br₂)에 따라 출현되는 진한 갈색으로 확인하였다. O₂⁻의 농도는 nitroblue tetrazolium(NBT)을 사용하여 측정하였다.¹⁴⁾ 준비된 superoxide용액은 밀봉하여 -10°C에 보관하였으며, 사용직전에 항상 그 농도를 다시 측정하였다.

② 미토콘드리아의 준비 및 단백질 추출

대두 hypocotyls로부터 differential centrifugation 방법에 준하여^{5,6)} 미토콘드리아를 추출하였으며 그 과정은 전보²⁾와 동일하다.

준비된 미토콘드리아 pellet를 suspension medium(0.2M mannitol, 10mM K-phosphate, 5mM MgCl₂, 10mM KCl, pH7.2)에 분산시킨 다음 여기에 3 volume의 extraction medium(0.1M K-phosphate, 10mM glutathione, 1mM ADP, 0.01% BSA, 및 pH7.2)을 가하여 ice bath중에서 30분간 방치한 다음 20,000g에서 20분간 원심분리하여 상액을 취하였다.⁷⁾ 상액에 포함되어 있는 membrane

vesicles를 sepharose 4B column을 이용하여 제거하고 단백질분획만을 수거하였다. 용출액은 상기한 extraction buffer이며 용출속도는 0.25ml/min (1.6×25cm column)이었다.

malate dehydrogenase (MDH)의 효소활성은 OAA+NADH+H⁺ \xrightarrow{MDH} malate+NAD⁺ 반응의 행에 따른 340nm 흡광도 감소를 기록(Cary 118 spectrophotometer 이용)하여 측정하였다.⁷⁾

③ SMP의 준비 및 그 cytochrome C oxidase활성의 측정

suspension medium에 분산시킨 미토콘드리아를 0°C에서 초음파처리(MSE-soniprep 150 ultradisintegrator를 이용하여 20KHz에서 20초간 3회)한 후 원심분리(1.2kg, 20분)하고 상등액을 sepharose 4B column에 통과시켜 void volume에서 membrane vesicles(또는 crude SMP)를 얻었다.¹⁵⁾ 용출액은 suspension medium이다. SMP 분산액(또는 O₂로 처리된 SMP 분산액) 2.6ml를 cuvette에 넣고 항온(20°C)를 유지시킨 다음 환원형 cyt. C(20 μM, 100μl)를 첨가하고 즉시 550nm에서 광흡수도(A₁)를 측정하였다. 일정한 시간(3~10분)이 경과한 후에 약 50mg의 고체 K-ferricyanide를 첨가하여 cyt.C를 완전산화시킨 다음 그때의 광흡수도(A₂)를 측정하였다. 반응진행에 따른 A₁-A₂⁰를 경시적으로 계산하여 도식하고 그 기울기로부터 cytochrome C oxidase의 상대적 효소활성을 결정하였다.^{9,10)}

④ 단백질 및 SMP에 대한 O₂⁻의 처리

미토콘드리아로부터 준비된 단백질추출액(단백질농도 0.5mg/ml) 및 SMP 분산액(단백질함량 0.65mg/ml) 각 2ml에 O₂⁻용액(TBAB에 녹아 있는 tetrabutyl ammonium superoxide) 0.6ml를 0.2ml씩 3회에 걸쳐 1시간 간격으로 첨가, vortex mixing하였다. 이때 O₂⁻의 명목상 최종농도가 0~1.5mM 범위가 되도록 O₂⁻용액을 미리 계산된 양의 TBAB로 희석시켰다. 여기서 '명목상 최종농도'라 함은 수용액중에서 O₂⁻의 dismutation이 빠르게 진행되어 소멸되기 때문에 반응계의 한 성분으로서의 O₂⁻의 실제농도는 첨가된 농도보다는 현저히 낮을 뿐만 아니라 또한 정확하게 알 수 없다는 사실에 근거하여 편의상 채택한 개념이다. 그러나 절대농도는 아니지만 상대적인 농도로서의 개념은 내포할 것이다.

⑤ membrane peroxidation의 조사

SMP와 liposome의 지방산성분 과산화를 각각

조사하였다. soybean lecithine 150mg을 chloroform 40ml에 녹여 감압농축하고 질소가스로 건조시켰다. 여기에 buffer(50mM K-phosphate, 0.1M KCl, 및 pH 7.8) 100 μ l를 가하여 vortex mixing 하고 초음파처리(23KHz, 5분)한 다음 Sepharose 4B column으로 정제하여 liposome을 얻었다.

membrane vesicles 분산액(SMP 및 liposome 분산액) 3ml에 0.6ml superoxide용액을 0.2ml씩 3회에 걸쳐서 1시간 간격으로 분할하여 처리하였으며, O_2^- 의 명목상 최종농도는 0~4.5mM이었다. 지방산성분 과산화의 검정은 malondialdehyde-2-thiobarbituric acid (MDA-TBA) adduct의 생성을 532nm 광흡수도로 조사하는 기존의 방법¹³⁾에 준하였다.

결과 및 고찰

① mitochondrial membrane의 과산화

지방산(또는 lipid의 지방산성분)의 과산화는 그 초기과정에서 지방산 radical의 생성반응이 존재할 때는 바닥상태의 분자산소가 이차적으로 관여하여 일어나지만, 그렇지 않은 경우에는 반응성이 강한 산소 화학종들(active oxygens), 이를테면 singlet oxygen(1O_2), superoxide(O_2^-), hydroxyl radical ($HO\cdot$), 및 과산화수소 등의 참여에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ liposome을 superoxide로 처리하였을 때 과산화가 일어나는 것은 MDA-TBA adduct의 전형적인 532nm 흡수대로서 확인되었다(Fig. 1). 그러나 450nm에 또 다른 큰흡수대가 나타난 것은 MDA-TBA adduct의 분광학적 성질과는 상이한 점이다. 지방산 과산화반응의 최종생성물인 MDA 뿐만 아니라 여러가지 aldehyde기를 함유한 유기물들, 이를테면 monoenal, furfural, sugar 등도 TBA와 adduct를 형성하여 450nm 흡수대를 보인다는 사실¹³⁾에 입각하여 Fig. 1의 450nm 흡수대는 superoxide 용액의 용매로 쓰인 DMF가 TBA와 반응하여 adduct를 이루었을 것이라고 추정되었다. DMF만을 사용하여 실시한 공실험을 통해서 이러한 추정은 옳다는 것을 알았다(Fig. 1-B).

SMP는 liposome과는 달리 O_2^- 처리 이전에도 이미 상당한 수준의 과산화가 진행되고 있었음이 관찰되었다(Fig. 2). 호흡중인 미토콘드리아의 내막에서는 정상상태에서도 대사과정의 부산물로서 다소간의 O_2^- 가 생성되고 있다는 사실^{14,14)}로 미루

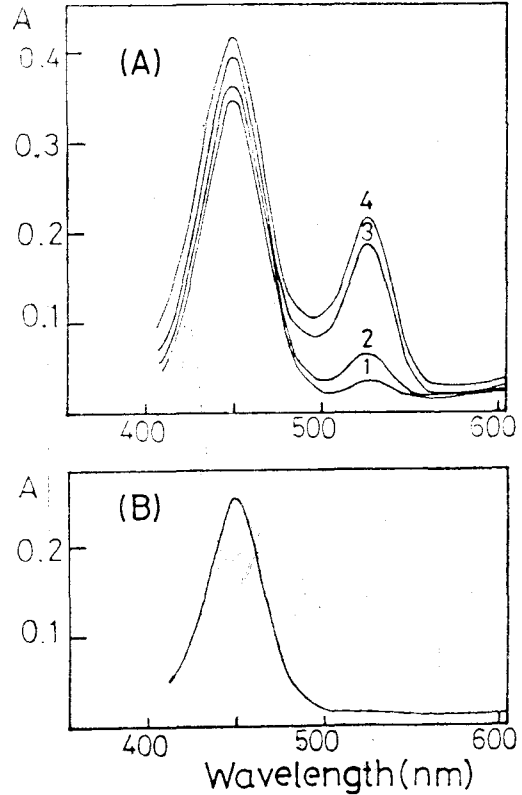


Fig. 1. Absorption spectra of the pigments prepared by adding thiobarbituric acid to soybean lecithine vesicles which were previously treated with tetrabutyl ammonium superoxide./ N,N-dimethyl formamide(A) and N,N-dimethyl formamide only(B) followed by hot acid treatment respectively. Formal concentration of superoxide in the reaction systems of (A) are 0.00mM (1), 0.30 mM(2), 0.77mM(3), and 1.54mM(4)

어보아 이것은 자연스러운 일일지도 모른다. 더욱 주목할만한 점은 O_2^- 처리에 의한 과산화 정도는 SMP의 경우가 liposome에서 보다는 현저히 낮았다는 점이다. liposome 제조의 재료로 쓴 soybean lecithine과 SMP의 인지질의 지방산 조성이 상호 다를 수 있기 때문에 과산화반응에 대한 susceptibility 역시 다를 수 있어서 그와 같은 결과가 나타났는지도 모른다. 그러나 SMP를 soybean tissue로부터 분리하였다는 점을 고려하여 지방산조성에 있어서 두 시료간에 현저한 차이가 없었을 것이라고 가정한다면 SMP의 과산화 정도가 liposome에 비하여 상당히 낮았다는 사실은 다음과 같은 두가지 측면에서 그 이유를 찾을 수도 있다. 즉, 하나

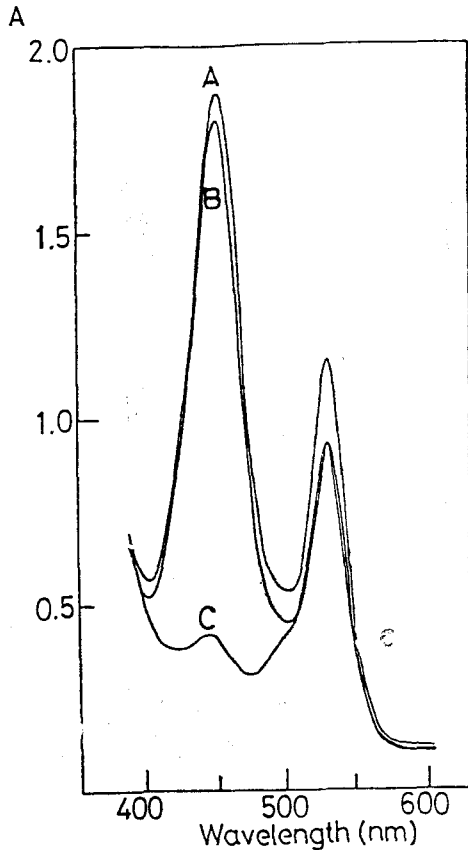


Fig. 2. Absorption spectra of the colored pigments prepared by adding TBA to submitochondrial particles from soybean hypocotyl which were previously treated with tetrabutylammonium superoxide/N,N-dimethyl formamide(A) and N,N-dimethyl formamide only(B) followed by not acid treatment respectively. The third spectrum(C) was from the pigment obtained by adding TBA to the hot acid treated SMP preparation in the absence of superoxide and N,N-dimethyl formimide

는 mitochondrial membrane에 결합되어 있는 내생 항산화제(이들테면 tocopherol과 같은 물질)에 의한 O_2^- 의 제거이며, 다른 하나는 막에 결합되어 있는 단백질들에 의한 O_2^- 의 소모이다.

membrane의 과산화는 막자체의 손상¹⁶⁾(심한 경우에 팽창 내지 분열) 뿐만 아니라 과산화반응 중에 생기는 각종 radicals (lipid radicals, peroxide radicals 등)에 의한 이차적 피해도 무시할 수 없을 것이며, lipid-protein adduct, protein scission, protein-protein cross links 등의 형성이 보고된바 있다.^{17,18)}

② 미토콘드리아 대사 체계의 손상

식물 미토콘드리아에서 일어나는 대표적인 대사 체계로는 TCA cycle과 호흡사슬계를 들수 있다. 따라서 TCA cycle에 참여하는 효소들중에서는 malate dehydrogenase(MDH)를, 그리고 호흡사슬계를 이루는 효소들 중에서는 사슬계의 마지막 효소인 cytochrome C oxidase를 각각 선택하여 O_2^- 에 의한 비가역적 저해를 조사하였다. MDH가 수용액환경(matrix 내)에 존재하는 효소임에 반해 cytochrome c oxidase는 막에 결합되어 있는 효소라는 점에서 환경차이에 따른 O_2^- 처리 효과의 차이를 볼 수도 있을지 모른다는 가정도 MDH와 cytochrome C oxidase를 선택한 동기가 되었다.

$oxaloacetate + NADH + H^+ \xrightarrow{MDH} malate + NAD^+$ 의 반응에서 $[oxaloacetate]_0 \gg [NADH]_0$ 및 $[NADH] \gg K_m$ 의 조건이 만족되면 반응속도식은 $[NADH]$ 에 대하여 0 차반응으로 나타내어질 것이다. 따라서 시간에 따른 $[NADH]$ 의 감소(340nm 흡광도 감소)는 직선으로 도시되며 그 기울기는 효소활성의 상대적인 값으로 전용될 수 있다. 본 연구에서 설정한 실험조건이 적절하였다는 것은 $[NADH]$ 에 대하여 0 차반응으로 나타난 NADH 산화반응으로부터 확인되었다(Fig. 3). 한편 O_2^- 로 처리된 MDH의 활성(k_{obs})을 구하고, 무처리구의 활성과 대비

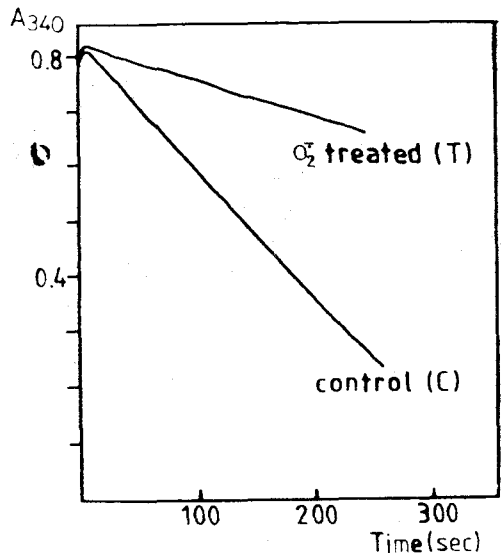


Fig. 3. Spectrophotometric traces of NADH oxidation in the presence of oxaloacetic acid by the O_2^- (0.84mM)-treated malate dehydrogenase (T), compared to that of the untreated enzyme (C)

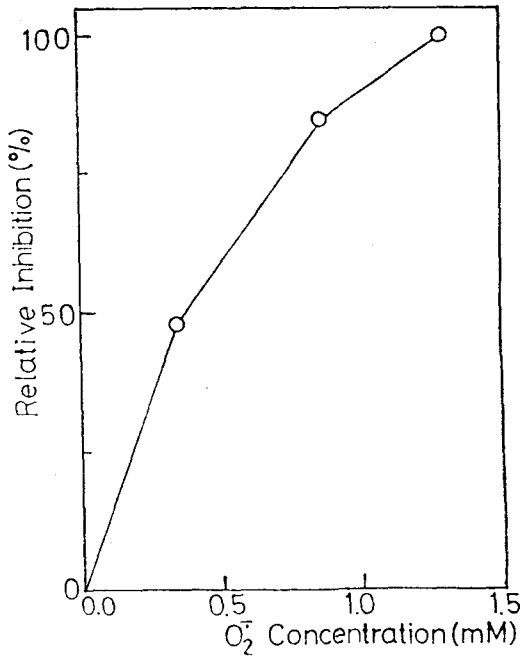


Fig. 4. Relative inhibition of malate dehydrogenase as function of the formal concentration of O_2^- added to the enzyme solution

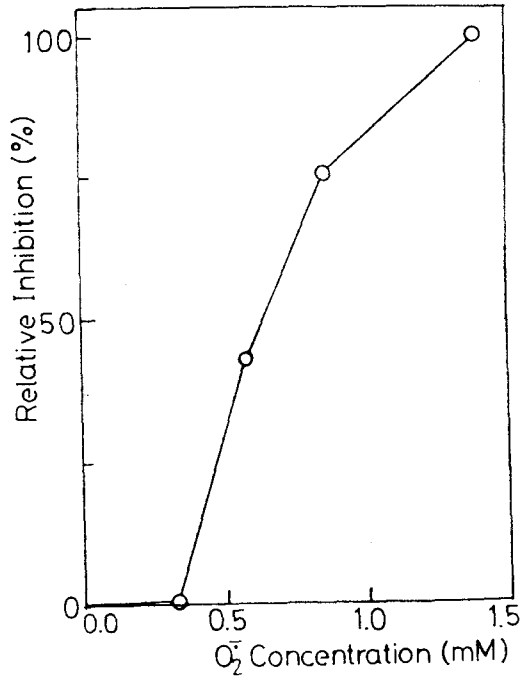


Fig. 5. Kinetics of ferrocytochrome c oxidation by cytochrome C oxidase of the O_2^- (0.84mM)-treated SMP(T), compared to that of the untreated SMP(C). Inserts are the spectrophotometric traces of ferrocytochrome C oxidation by the O_2^- -treated and control respectively

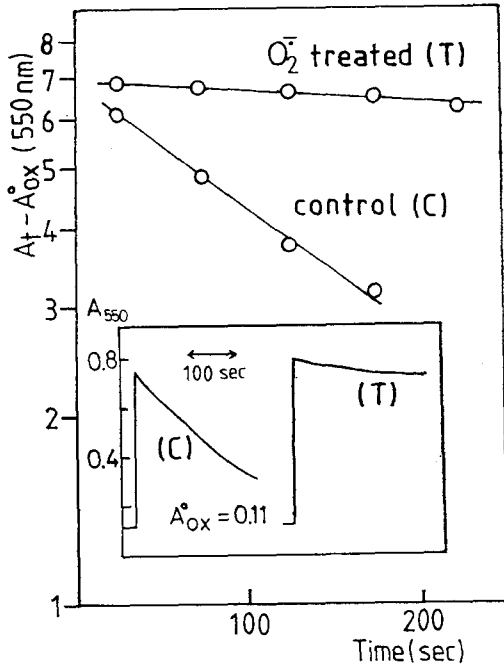


Fig. 6. Relative inhibition of cytochrome C oxidase of SMP as a function of the formal concentration of O_2^- added to SMP suspension

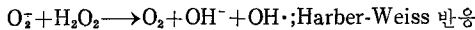
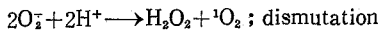
하여 계산된 상대적 효소불활성도를 처리한 O_2^- 의 명목상 최종농도의 함수로 도시한 결과 1.4mM의 O_2^- 에서 완전 불활성화됨을 알수 있었다(Fig. 4).

cyt. C(Fe^{+2})의 산화에 따른 550nm흡수도 변화를 $A_t - A_{ox}^0$ 로 환산하여 반응시간에 대하여 도시하면, 역시 본연구에서 설정된 실험조건하에서는 MDH 경우와 마찬가지로 0 차 반응으로 나타났다(Fig. 5). 그리고 O_2^- 처리농도에 따른 불활성화 역시 MDH에서와 유사한 양상을 보였으며 1.3mM에서 효소활성은 완전히 상실되었다(Fig. 6). 수용액 상태에 있는 MDH가 O_2^- 치리에 의해 불활성화 되는 것은 표면 아미노산 잔기의 화학적 변화(산화 또는 환원)에 기인한 전반적인 chemical modification의 결과라고 해석할 수도 있겠으나, membrane에 결합된 상태의 cytochrome C oxidase가 O_2^- 에 의해 쉽게(MDH에 비해 어느 정도는 보다 효율적으로) 불활성화 된다는 사실은 O_2^- 치리의 효과가 효소단백질의 전반적인 chemical modification에 기인했다기 보다는 효소활성중심의 국

부적인(그리고 효소활성에 훨씬 치명적인) chemical modification의 결과라고 해석하는 것이 보다 합리적이다. 더우기 앞에서도 언급한 바 있듯이 O_2^- 처리농도가 명목상으로는 mM범위이지만 실제로 효소 불활성화반응에 참여하는 O_2^- 의 농도는 dismutation 반응과의 경쟁 때문에 그보다는 훨씬 낮은 μM 범위의 농도일지도 모른다. 이러한 관점에서 볼때 상기 두 효소들이 보여주었던 효율적인 효소불활성화는 효소 활성중심의 화학적 파괴에서 그 주원인을 찾게될 가능성이 높아진다.

상당히 낮은 것으로 추정되는 농도의 O_2^- 존재 하에서 MDH 및 cytochrome C oxidase가 심하게 불활성화되었다는 관찰 사실은 미토콘드리아 대사계에 대해 O_2^- 가 강한 독성을 나타냄을 시사한다. 따라서 NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase, ubiquinone-cyt. C reductase 등 그들에게 주어진 주기능(호흡사슬에서 electron carrier로서의 기능) 이외에 O_2^- 에 1 전자전달반응을 일으켜 O_2^- 를 생성하는 효소들이^{14,15)} 존재하는 상황에서 미토콘드리아 대사계가 정상적으로 기능하기 위해서는 당연히 적절한 방어시스템을 갖어야 할 것이다. 방어시스템의 대표적 예는 물론 superoxide dismutase(SOD)이다. 그러나 환경스트레스와 같은 외적 요인에 의해서 방어시스템이 대처할 수 있는 수준 이상의 O_2^- 가 생성 축적될 때 미토콘드리아 대사계가 입게될 피해는 불가피하리라고 판단된다.

O_2^- 에 의한 피해가 O_2^- 자체의 반응성에 의한 것인지 혹은 다음과 같은 두가지 반응에 의해 생성되는 또다른 active oxygens에 기인하는지는 아직 알 수 없다.



O^- 에 비하여 수명은 비록 짧지만 반응성은 더욱 큰 singlet oxygen(1O_2)과 hydroxyl radical ($OH\cdot$)이 실질적으로 membrane 과산화물 일으킨다고 추정되는 실험보고^{19,20,21)}들로 미루어보아 효소의 불활성화에도 1O_2 및 $OH\cdot$ 가 보다 직접적인 화학적 요인일 수 있다. 이에 대한 연구는 현재진행중이며 차후 그 결과를 보고할 것이다.

초 록

soybean hypocotyl에서 분리한 미토콘드리아로부터 submitochondrial particles와 matrix 단백질 추출액을 준비하고 전기분해법으로 제조한 superoxide를 처리하여 malate dehydrogenase 및 cytochrome C oxidase의 불활성화와 mitochondrial membrane의 과산화를 각각 조사하였다. 막에 결합되어 있는 cytochrome C oxidase나 수용액상태의 malate dehydrogenase는 모두 O_2^- 에 대해 매우 민감하게 불활성화되었다. 즉 dismutation 반응이 빠르게 진행되어 실질적으로 효소의 불활성화에 기여하게 될 농도는 대단히 낮은 것으로 추정되는 O_2^- 의 명목상 처리농도 1.4mM 전후에서 두 효소는 그 활성을 완전히 상실하였다. 한편 malondialdehyde의 생성을 지표로 하여 측정된 membrane 과산화는 인지질로서만 이루어진 liposome의 경우 보다는 다소 낮은 수준이었으나 무시할 수는 없는 정도였다. mitochondrial membrane의 과산화가 상대적으로 억제된 것은 막에 결합되어 있는 항산화제 및 단백질들에 의한 O_2^- 소거효과에 기인하였으리라 해석된다. 식물 미토콘드리아의 대표적인 대사과정인 TCA cycle과 호흡전자전달반응의 성분 효소들인 malate dehydrogenase와 cytochrome C oxidase가 불활성화되었고 membrane이 과산화되었다는 사실은, 식물의 냉해와 광피해 발현기작에서 공히 공통적인 화학적 인자로 인정되는 O_2^- 의 과잉생성 및 축적이 그것의 주 생성처인 미토콘드리아의 생화학적 기능과 구조에 미칠수 있는 파괴적 효과를 적절히 지시하는 것이다.

사 의

본 연구는 華農장학회의 연구장려금에 의해 이루어진 것입니다. 華農 조백현 박사님과 장학회에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 김종평, 현일, 정진 : 한국농화학회지, 30(4): 346(1987)
2. 김경현, 김종평, 정진 : 한국환경농학회지, 6(2) : 94(1987)
3. McCord, J.M. and Eridovich, I.: J. Biol. Chem. 244 : 6049(1969)
4. Auclair, C., Torres, M. and Haikim, J.: FEBS Letters, 89(1) : 26(1978)
5. Ikuma, H.: Plant Physiol., 45 : 773(1970)
6. Singer, T.P., Oestreichet, G. and Hong, P.: Plant Physiol., 52 : 616(1973)

7. Bowan, E.J., Kluma, H. and Stein, H.J.: *Plant Physiol.*, 58 : 426(1976)
8. Lee, C.: *Meth. Enz.*, 55 : 105(1979)
9. Yonetani, T. and Ray, G.S.: *J. Biol. Chem.*, 240 : 3392(1965)
10. 정진, 김세호 : 서울대 농학연구, 11(1-1) : 13 (1986)
11. Buege, J.A. and Aust, S.D.: *Meth. Enz.*, 52 : 302(1978)
12. Imai, Y.: *Vitamins(Jpn)*, 53(12) : 533(1979)
13. 이정원 : 서울대학교 박사학위논문 (1985)
14. Moller, L.M., Palmer, J.M.: *Physiol. Planta*, 54 : 267(1982)
15. Packer, L.: *Meth. Enz.*, 105 : 59(1984)
16. Hunter, F.E. Jr., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.E., Weinstein, J. and Scott, A.: *J. Biol. Chem.*, 238(2) : 828(1963)
17. Gardner, H.W.: *J. Agri, Food Chem.*, 27(2) : 220(1979)
18. Roubai, W.T., and Tappel, A.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 113 : 150(1966)
19. Pederson, T.C. and Aust, S.D.: *Biochem. Biophys. Rese. Commun.*, 52(3) : 1071(1973)
20. Kellogg, E.W. III and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, 252(19) : 6721(1977)
21. Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P.L. and Reid, D.M.: *Physiol. Plant.*, 56 : 453(1982)