

백색 완두유묘의 IAA분해효소계에 미치는 저온의 영향

박 노 동·신 용 광·김 광 식·박 창 규*

전남대학교 농화학과, *서울대학교 농화학과

초록: 저온에서 완두유묘 줄기의 유리 IAA 수준과 그 전구체인 트립토판 수준이 저하하므로, IAA수준의 조절 메커니즘을 규명하기 위하여 IAA분해효소계에 미치는 저온의 영향을 조사하였다. 25°C에서 키운 백색 완두유묘를 5°C의 저온으로 옮기면 IAA oxidase와 peroxidase의 수준은 증가하였으며 catalase의 수준은 저하되었고 과산화수소는 축적되어, 전체적으로 IAA분해계가 저온에서 강화되었다. 저온에 놓였던 유묘를 상온으로 옮기면 IAA 분해계는 다시 대조구 수준으로 회복하였다 (1990년 1월 19일 접수, 1990년 5월 22일 수리).

어떤 종류의 고등식물은 0~20°C의 온도에 대해 대단히 민감하게 반응하여 이 범위의 특정온도 이하에 놓이면 저온장애를 받는다¹⁾. 그동안 저온장애의 기작을 세포막 성질의 변화, 효소활성의 변화, 독성물질의 축적 등의 관점에서 규명코자하는 연구가 많이 이루어져 왔다. 저온장애를 받은 식물조직의 효소계는 교란상태에 있으며, 세포내에 알콜, 알데히드, 과산화수소 등의 유독한 대사물질이 축적되거나 대사 필수물질이 결핍될 수 있다²⁾.

과산화수소는 peroxidase, catalase, IAA oxidase 등과 함께 식물 오옥신인 IAA(indole-3-acetic acid)의 산화적 분해계를 형성한다³⁾. 이는 겨울밀과⁴⁾ 오이 유묘에서⁵⁾ 저온처리시에 축적되며, IAA와 어떤 형태의 복합체를 형성하여 가용 IAA 수준을 조절할 가능성도 지적된 바 있다⁶⁾. 한편, 식물세포내의 유리 IAA 수준의 조절에 중요한 역할을 하는 IAA oxidase는 저온에서 그 활성이 증가한다⁵⁻⁷⁾.

본인 등은 암실재배한 완두유묘의 IAA수준과 그 전구체인 트립토판의 수준이 저온에서 감소한다는 결과를 보고한 바 있다⁸⁾. 본 연구에서는 저온에서 어떠한 메커니즘으로 IAA 수준이 하향조절되는지를 규명하기 위하여 과산화수소의 함량과 IAA 분해계를 이루는 몇가지 효소의 활성 변화를 조사하였다. 이 연구의 요약은 보고된 바 있다⁹⁾.

재료 및 방법

완두의 재배와 처리

완두유묘를 전보⁸⁾에서와 같이 25°C의 항온기에서 6일간 재배하고 그 중 일부를 5°C의 항온기에 옮겼다. 3일간 저온처리한 유묘의 일부를 다시 25°C의 항온기로 옮겼다.

IAA분해에 관여하는 몇가지 효소의 활성 측정

1) 조효소액의 조제

미리 차게 한 막자사발에 완두 유묘 줄기 2g을 취하고 50mM 인산 완충용액(pH 6.0) 10ml를 가하여 미세한 다음 여과하고, 이를 20,000 g로 20분간 원심 분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

2) IAA oxidase활성

조효소액 1.0ml에 IAA용액(44 μ g/ml in 10 μ M, 2,4-dichlorophenol) 9.0ml를 가하고 압실의 수조에서 1시간 동안 반응시키고, Darbyshire의 방법에 준하여^{6,10)} Salkowski시약으로 잔여 IAA함량을 구하였다.

3) Peroxidase 활성

10mM이 되도록 guaiacol을 녹인 50mM 인산완충액(pH 6.0) 3.0ml에 조효소액 0.1ml를 가하고 흔들어서 470nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 잰 다음 shutter를 닫고 10mM H₂O₂ 10ml를 가하고 15초와 30초 후에 각각 흡광도를 측정하였다. 15초와 30초 사이의 흡광도 변화(ΔA)로부터 분해된 H₂O₂의 양을 다음과 같이 계산하였다¹¹⁾.

$$\mu \text{ mol H}_2\text{O}_2 \text{ degraded/g fresh weight/min} = \frac{4 \times 1,000}{26.6} \times \Delta A \times 0.62$$

4) Catalase활성

5mM H₂O₂ 1ml와 증류수 2ml를 혼합하고 조효소액 0.5ml를 넣어 5분간 20°C에서 반응 시킨 다음 TiCl₄시약(20% TiCl₄ in conc. HCl, v/v)을 가하였다. 여기에 1ml의 진한 암모니아수를 가하여 H₂O₂-Ti 복합체(complex)를 형성시키고, 이를 1,500 g로 10분간 원심분리하여 침전물을 분리하였다. 침전물을 acetone으로 수회 세척한 다음 2N H₂SO₄ 10ml에 용해시켜서 파장 415nm에서 흡광도를 측정하고 기지농도의 H₂O₂로 작성한 표준곡선에 의하여 잔여의 H₂O₂함량을 구하였다²⁾.

H₂O₂의 함량 측정

막자사발에 시료 2g 과 냉 아세톤 10ml를 넣고 잘아서 여과한 다음 1,500 g로 10분간 원심분리하였다. 상등액 5ml에 TiCl₄ 시약 0.5ml를 가하여 혼합한 다음 catalase활성 측정시와 동일한 과정으로 H₂O₂함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

완두의 생장에 미치는 저온의 영향

Fig. 1은 완두유묘의 생장곡선을 나타낸 것으로 저온에 놓인 식물체는 거의 생장이 정지하였으나 이를 다시 상온으로 옮기면 저온처리를 받지 아니한 묘와 같은 생장속도를 곧 회복하였다. 저온처리는 뿌리의 생장도 억제하여 대조구에 비하여 주근의 길이가 짧고 잔뿌리의 수가 적었다. 지하부 생장의 억제는 작업부와 줄기에서의 IAA의 생합성 감소와 뿌리로의 그 수송억제에 기인된 것일 수 있다¹³⁾.

IAA분해 효소계의 수준에 미치는 저온의 영향

1) IAA oxidase의 수준

전보에⁸⁾ 보고한대로 완두유묘 줄기의 IAA 수준은 저온에서 뚜렷이 감소하였기에, 그 원인이 일부 IAA의 효소적 분해계의 변화에서 기인하는 것인지를 알아보고자 하였다.

완두 유묘중의 IAA oxidase활성은 Fig. 2A에 보인 바와 같이 저온처리시에 뚜렷이 증가하였으며 저온처리묘를 상온으로 옮겼을 때 하룻만에 대조구의 수

준으로 떨어져 그 반응이 온도에 대하여 가역적임을 보여주었다. 이러한 결과는 저온처리한 겨울밀⁹⁾ 오이 유묘⁵⁾, 국화에서⁷⁾ IAA oxidase의 활성이 증가하였다는 보고와 일치하는 것이다. IAA oxidase활성의 증가에 병행하여 endogenous IAA의 함량이 점차적으로 감소하였다는 보고도¹⁴⁾있다. 그러므로 저온에서 완두 유묘중 endogenous IAA 수준의 감소에는 유도된 IAA oxidase활성의 기여가 있었던 것으로 보인다. 이것은 IAA oxidase 활성과 IAA수준 사이에 이미 지적되어온 역비례관계를¹⁵⁾ 정량적으로 확인한 셈이 된다. 일반적으로 IAA oxidase활성은 노화된 조직에 높으며 IAA 함량이 많은 어린 조직에서는 낮다³⁾.

조효소액의 단백질 함량은 평균 2.34mg/ml이었으며, 그 RZ value는¹⁶⁾ 평균 0.14였다.

2) Peroxidase의 수준

식물의 생장과 생육, 특히 발아와 관련된 대사활동에 관재있는¹⁷⁾ peroxidase의 경우, Fig. 2B에 나타난 바와 같이 IAA oxidase수준의 변화와 유사하게 저온처리시 그 활성이 증가하였고 이를 상온으로 옮기면 이틀만에 대조구의 수준으로 떨어졌다.

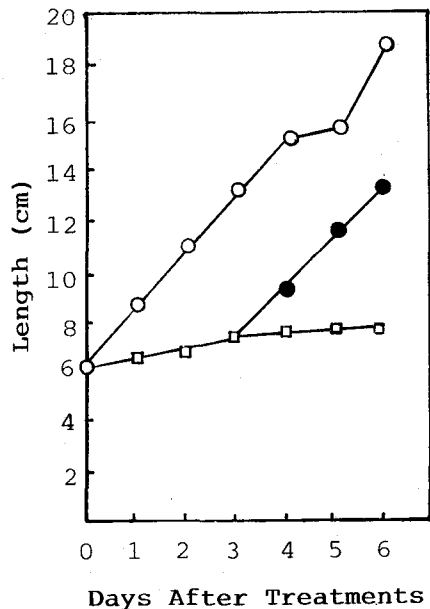


Fig. 1. Effects of low temperature on the growth of pea shoots.

□—□ : Chilling, ●—● : Rewarming and
○—○ : Control.

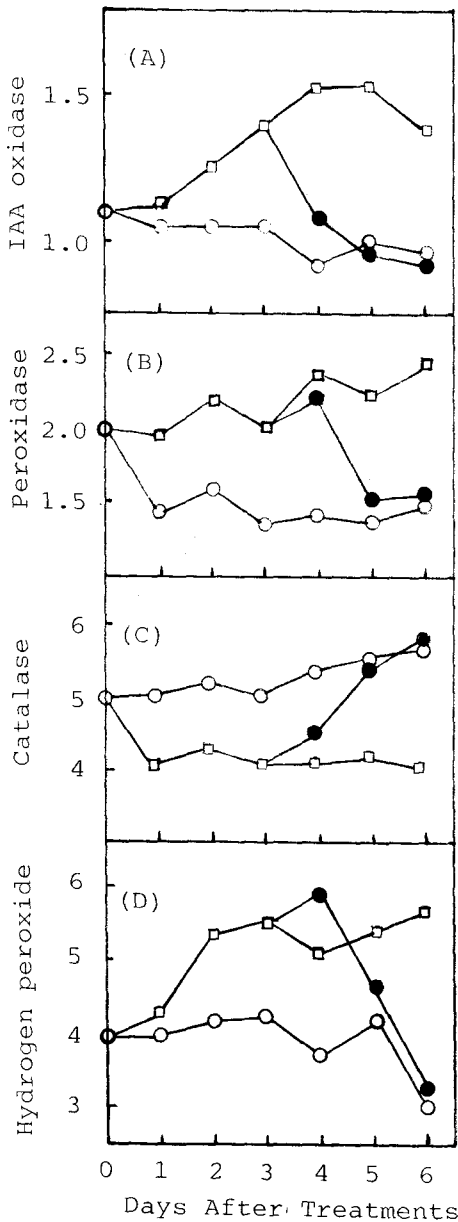


Fig. 2. Effects of chilling on (A) IAA oxidase (mg IAA degraded/g FW/hr), (B) Peroxidase (μ mol H_2O_2 degraded/g FW/min), (C) Catalase (μ mol H_2O_2 degraded/g FW/min) activities and (D) Hydrogen peroxide content (μ mol/g FW) in etiolated pea shoots.

이것은 오이 유묘에서 저온처리시 peroxidase활성의 별다른 변화를 볼 수 없었다는 보고와는⁵⁾ 상이하다. 그러나 IAA oxidase와 peroxidase의 작용이 동일

단백질에 의해서 매개된 양면활성일 것이라는 지적을^{7,18)} 고려하면 IAA oxidase 활성이 증가할 때 peroxidase의 활동도 증가할 것으로 예상되며 본 결과는 이를 뒷받침하고 있다.

Peroxidase는 pI 3.5~9.5사이의, 양이온형과 음이온형의 당단백질로 근래 auxin receptor 단백질로¹⁹⁾ 지목받고 있다. 음이온형의 peroxidase는 주로 IAA를 분해하는 것으로 보고있다²⁰⁾. pH 5.8에서 starch gel electrophoresis하여 그 isozyme을 조사하였더니 양이온형이 8개의 띠로 분리되고 높은 효소활성을 보인데 비하여 음이온형은 단 하나의 띠로 분리되었고 그 활성은 낮았다(박, 미발표 자료).

3) Catalase의 수준

Catalase는 저온에서 상기 두 효소와 서로 다른 온도반응을 보였다(Fig. 2C). 즉, 그 활성은 대조구에서 비교적 일정하게 유지된데 비하여 저온처리묘에서는 24시간 내에 뚜렷이 감소하였으며 이를 상온으로 옮겼을 때 이틀만에 대조구 수준으로 회복하였다. 이는 저온처리한 오이 유묘에서 catalase활성이 감소하였다는 결과와⁵⁾ 동일한 경향이다.

저온에서 H_2O_2 수준의 변화

완두유묘 중의 H_2O_2 함량은 Fig. 2D에 보인 바와 같이 저온에서 증가하였으며 유묘를 상온으로 옮겼을 때 이틀만에 대조구의 수준으로 낮아졌다. 이 결과는 저온 처리한 오이 유묘에서 H_2O_2 함량이 증가하였다는 보고와⁵⁾ 같은 경향이다.

H_2O_2 의 축적은 catalase활성의 저하와 직접적인 상관 관계가 있었다. 즉 저온 처리한 유묘에서 catalase 활성이 낮아질 때(Fig. 2C) H_2O_2 함량은 증가하였으며, 이를 상온으로 옮겨 catalase수준이 대조구 수준으로 높아질 때 H_2O_2 함량은 대조구 수준으로 낮아졌다. 일반적으로 catalase존재하에서는 H_2O_2 가 축적되지 않는다.

Galston 등³⁾이 제시한 완두의 IAA 분해계는 flavoprotein, 산소, H_2O_2 그리고 효소 peroxidase와 catalase로 구성되어 있다. 과산화수소와 peroxidase는 IAA의 산화적 분해를 촉진하고, catalase는 H_2O_2 를 분해시켜 IAA의 산화를 억제한다.

이미 검토한 바와 같이 저온처리시에 IAA oxidase와 peroxidase 수준은 증가하였고 catalase수준은 이와 대조적으로 감소하였다. 또한 세포 내의 H_2O_2 는 저온 처리시에 축적되었다. 이상의 결과를 Galston 등³⁾의 IAA oxidase system과 연관지어 볼 때, 완두유묘는

저온에서 IAA의 분해를 촉진시키는 방향으로 효소계를 유도하여 IAA수준을 하향조절한다는 관점에 도달하게 된다.

참고 문헌

1. Lyons, J.M. and Breidenbach, R.W. : In "Stress Physiology in Crop Plants", Mussell, H. and Staples, R.C.(ed.), pp. 179~196, John Wiley & Sons, New York (1979)
2. Lyons, J.M. : Ann. Rev. Plant Physiol., 24 : 445 (1973)
3. Galston, A.W. and Dalberg, L.A : J. Exp. Bot., 41 : 373 (1954)
4. Bolduc, R.J., Cherry, J.H. and Blair, B.O. : Plant Physiol., 45 : 461 (1970)
5. Omran, R.G. : Plant Physiol., 65 : 407 (1980)
6. Park, R.D., Suh, Y.T. and Shin, Y.K. : J. Kor. Agric. Chem. Soc., 26 : 132 (1983)
7. Tompsett, P.B. and Schwabe, W.W. : Ann. Bot., 38 : 269 (1974)
8. 박노동, 안승희, 김광식, 박창규 : 한국농화학회지, 33 : 68 (1990)
9. Park, R.D., Kim, K.S., Suh, Y.T. and Park, C.K. : Plant Physiol., 86(S) : 150 (1988)
10. Darbyshire, B. : Plant Physiol., 47 : 65 (1971)
11. Chance, B. and Mahley, A.C., : In "Methods in Enzymology", Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(ed.), Vol. 2, pp. 764~775, Academic Press, New York (1955)
12. Brennam, T. and Frenkel, C. : Plant Physiol., 59 : 411 (1977)
13. Martin, H.V. and Elliot, M.C. : Plant Physiol., 74 : 971 (1984)
14. Davies, P.J. : Physiol. Plant., 27 : 262(1972)
15. Galston, A.W., Bonner, J. and Baker, R.S. : Arch. Biochem. Biophys., 42 : 456 (1953)
16. Mahley, A.C. : In "Methods in Enzymology", Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.(ed.), Vol. 2, 801~813, Academic Press, New York (1955)
17. Gosling, P.G. and Ross, J.D. : Phytochemistry, 20 : 31 (1981)
18. Feides, M.A., Deal, C.L. and Tyson, H. : Phytochemistry, 21 : 1875 (1982)
19. McLellan, K.M. and Robinson, D.S. : Phytochemistry, 22 : 645 (1983)
20. Mader, M. and Amberg-Fisher, V. : Plant Physiol., 70 : 1128 (1982)

Effects of low temperature on the IAA degradation system in etiolated pea (*Pisum sativum* L. var. *Sparkle*) seedlings

Ro-Dong Park, Yong-Kwang Shin, Kwang-Sik Kim, Chang-Kyu Park*(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, *Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea)

Abstract : Previous work has shown that the levels of free and total IAA and tryptophan decrease on exposing etiolated pea (*Pisum sativum* L. var. *Sparkle*) seedlings grown at 25°C to 5°C for 3 days, suggesting that low temperature down-regulates the level of endogenous IAA, in part, by reducing tryptophan biosynthesis. To understand, in this study, the effect of low temperature on the regulation of IAA degradation system in etiolated pea seedlings, enzyme levels of IAA degradation system and hydrogen peroxide content were analyzed during and after chilling(5°C) 6-day-old pea seedlings grown at 25°C. The levels of IAA oxidase and peroxidase increased during chilling and gradually restored to the level of control on termination of chilling. Catalase levels decreased upon chilling and increased to the level of control on termination of chilling. H₂O₂ was accumulated during chilling up to the level of 5.5 μmol/g fresh weight while at 25°C maintained a relatively constant H₂O₂ level of 4 μmol/g FW. All together, it appears that low temperature, in part, by increasing enzyme levels of IAA degradation system and accumulating H₂O₂, down-regulates endogenous level of IAA in etiolated pea shoots.