

식물의 냉해에 대한 생체방어기구로서 항산소성 효소의 유도 : (II) Mn²⁺이온에 의한 세포내 SOD의 활성화와 벼 유묘의 내냉성 향상

한창균·김종평·정진
서울대학교 농과대학 농화학과

초록: 벼 유묘에 의한 Mn²⁺(Mn-SOD의 cofactor)의 흡수는 유묘조직중 SOD 활성을 증가시키고 아울러 유묘의 냉해저항성을 현저히 향상시키는 결과를 보였으며, SOD 활성 증가정도와 냉해저항성 향상정도간에는 정의 상관관계가 있었다. 이에 반하여, Fe-SOD와 Cu/Zn-SOD의 cofactor들인 Fe³⁺, Cu²⁺, 및 Zn²⁺의 흡수는 조직내 SOD 활성이나 식물의 냉해저항성에 어떤 유의성 있는 영향도 미치지 않았다. 이러한 결과들이 시사하는 바는 아마도 superoxide에 의해 유도되고 Mn²⁺의 존재에 의해 활성화된 Mn-SOD가 (최소한 벼의 경우에는) 저온 스트레스에 대항하는 생체 방어 시스템의 중요한 구성분일 것이라는 점이다. 어느정도의 냉해억제효과가 있다고 인정된 Abscisic acid의 처리도 벼 유묘조직의 SOD 활성을 증가시켰다. 이 관찰결과도 식물의 냉해 유발상황하에서 세포내 SOD가 담당하는 중요한 생체방어 역할을 부각시키는 또 하나의 정보를 제공한 것이다.

Superoxide dismutase(SOD)는 superoxide(O₂⁻)의 불균등화 반응(2O₂⁻+2H⁺→H₂O₂+O₂)을 일으키는 효소로서 catalase 및 glutathione peroxidase 등과 함께 세포의 산소독성을 방지하는 소위 항산소성 효소(antioxygenic enzymes)군의 일원이다. SOD는 생물계에 광범위하게 분포되어 있으며 진핵세포에는 주로 두 종류의 SOD, 즉 Mn을 cofactor로 함유하고 있는 Mn-SOD와 Cu와 Zn을 함유하는 Cu/Zn-SOD가 있고^{1,2)} 일부 식물세포에는 Fe을 함유한 Fe-SOD도 존재하는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 동일한 효소반응을 촉진한다는 사실을 제외하면 상호간 생화학적 유사성이 별로 없는 SOD들 중에서 Mn-SOD는 거의 전부가 미토콘드리아의 matrix에 존재하며^{1,2,4)} Cu/Zn-SOD는 주로 cytosol에 존재하나^{1,5)} 식물체에서는 엽록체에도 존재하는 것으로 알려져 있다.^{6,7)}

SOD가 식물의 저온 스트레스와 관련하여 특히 관심을 끌었던 것은 그것이 냉해에 대한 생체 방어기구의 구성요소일 수 있다는 가능성⁸⁾을 보이면서 부터이다. 일정한 기간동안 저온처리된 벼 유묘를 상온으로 옮기면 벼조직내의 O₂⁻ 수준이 현저히 상승하며 뒤이어 SOD 활성이 팔복할만큼 증가한다는 관찰에 근거하여 O₂⁻의 과잉발생 및 이로부터 이차적으로 생성되는 다른

활성산소종들의 생성이 냉해발현의 직접적인 화학적 인자이며 SOD를 위시한 항산소성 효소의 활성화를 식물이 저온 스트레스에 대응하여 취하는 생체방어 수단의 일환이라고 본 연구실에서 제안한 바 있고^{8,9)}, 나아가 외부로부터 뿌리를 통해 공급한 O₂가 뿌리 조직내 SOD 및 catalase를 활성화시킨다는 관찰사실은 이들 항산소성 효소가 식물체내에서 기질 유도성임을 시사한다고 해석하였다⁹⁾.

이와같은 기존의 연구에 바탕하여, 본 연구는 체내 SOD를 활성화(또는 유도)할 수 있는 화학적인 방법, 바꾸어 말하면 식물체에 적절한 화합물을 시비함으로써 저온에 노출되기 이전에 일단 세포내 SOD를 충분히 활성화시키거나 혹은 저온 노출후 상온하 조건에서 O₂⁻의 과잉발생에 대응하여 SOD의 활성화가 가능한 빠르게 그리고 보다 큰 정도로 일어나게 하여 냉해발현에 직결되는 과잉생성된 O₂⁻의 수준을 효율적으로 저하시키는 방법을 탐색하기 위한 목적으로 수행되었다.

본 연구에서 얻은 결과들에 의하면, 여러가지 SOD의 금속 cofactor들중의 하나인 Mn²⁺의 처리는 벼조직내에(특히 저온처리후 상온으로 환원된 조직에서) 현저한 SOD의 활성화를 유도하였고, 나아가

Key words : Superoxide dismutase activation, low temperature stress, chilling-resistant, metal cofactor, defense system

Corresponding author : J. Jung

벼 유묘에 대한 팔목할만한 냉해억제효과를 보였으며, 그것은 아마도 O₂에 유도된 Mn-SOD의 apoenzyme이고 수준의 Mn²⁺과 결합하여 활성화된 Mn-SOD를 보다 효율적으로 생성하므로써 나타난 결과일 수 있다는 제안을 가능케 하였다.

재료 및 방법

시료, 시약 및 기기

공시 작물은 국립 종자 보급소에서 구입한 벼(품종: 원풍)이며 3일간 침지시킨 벼 종자를 3겹의 휴지 또는 논흙을 깐 tray에 파종하여 15-20일간 재배하였다. 실험에는 유묘의 지상부 조직을 이용하였다. 시약은 Sigma(St. Louis, MO), Wako(Osaka, Japan) 및 Fluka(Buchs, Switzerland)사 제품들(EP 내지 GR grade)로서 특별히 정제하지 않았으며, 효소 및 단백질들은 모두 Sigma사 제품이었다. 흡수 스펙트럼과 흡광도는 Varian(Palo Alto, CA)의 UV-Vis spectrophotometer model Cary 118을 이용하여 측정하였다.

방법

식물의 온도처리, 벼 유묘 조직중 O₂수준측정 및 조직 추출액의 SOD 활성 측정과정은 전보⁹⁾에서와 동일하다. 금속염의 처리를 위해서 벼 유묘가 자라는 tray의 물을 따라낸 다음 일정한 농도의 염(FeCl₃, ZnCl₂, CuCl₂, MnCl₂, MnSO₄ 및 MnHPO₄)의 수용액을 유묘의 뿌리가 완전히 잠길때까지 채워 주었다. Absci-

sic acid(ABA) 처리를 위해서는 0.1mM 수용액을 염면살포하였다.(이때 상당한 양의 용액은 tray에 고이게 되어 뿌리를 통한 흡수가 동시에 일어났을 것으로 판단된다.) 토양중의 Mn은 NH₄H₂PO₄로 추출하여 persulfate를 사용하는 비색법¹⁰⁾에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

SOD는 금속이온을 함유하는 metalloenzyme이라는 점과 Escherichia coli에서 Mn²⁺처리에 의해 Mn-SOD의 활성화가 일어났다는 보고^{11,12)}에 착안하여, 고등식물의 경우에도 SOD의 cofactor가 될 수 있는 여러가지 금속이온(Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ 및 Fe⁺³)의 처리가 조직내 SOD의 활성을 증가시킬지도 모른다고 가정하고 이를 먼저 확인하고자 하였다. 각각 10mM의 CuCl₂, ZnCl₂, MnCl₂ 및 FeCl₃를 ~25°C하에서 벼 유묘가 자라는 tray에 가하고 12시간후에 유묘지상부 조직을 일부 채취하였고, 유묘를 5°C 암소에 옮기고 48시간 세운 후 상온으로 다시 옮김과 동시에 일부의 유묘조직을 채취하였으며, 상온환원 후 20시간후에 다시 유묘의 지상부조직을 채취하였다. 이렇게 채취된 조직중 SOD 활성을 측정할 결과는 Fig. 1에 보여준 바와 같다. 금속염을 처리하지 않은 대조구에 비하여 MnCl₂ 처리구에서 팔목할만한 체내 SOD 활성화 효과가 관찰되었는데 반해 다른 금속염들의 처리구에서는 유의성있는 효과가 보이지 않았다.

이와같은 screening 과정을 통해 확인된 MnCl₂의

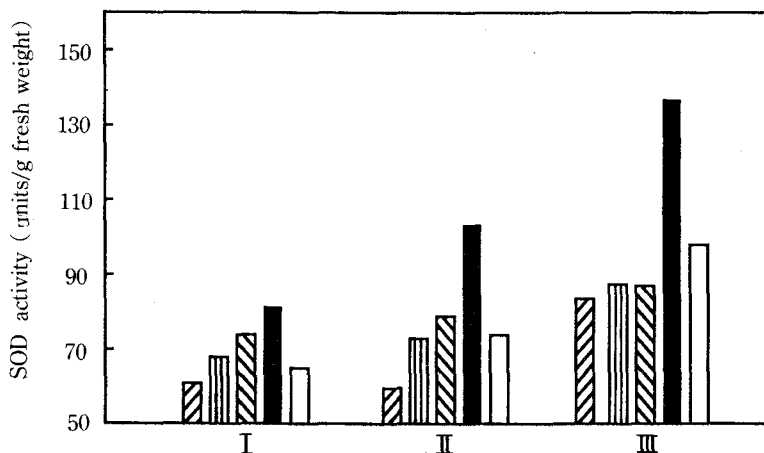


Fig. 1. Effects of various transition metal salts uptaken by rice seedlings on SOD activity in leaf tissues.

I : 12 hrs at room temperature (~25°C) after application of the salts

II : 48 hrs at 5°C after I

III : 20 hrs at room temperature after II

▨ FeCl₃, ■ ZnCl₂, ▩ CuCl₂, ■ MnCl₂, □ control

용액의 SOD 활성화 효과를 보다 구체적으로 조사하기 위하여 여러가지 농도(0.1mM, 1mM 및 10mM)의 MnCl₂용액을 저온처리 24시간전에 tray에 가한 다음 온온도처리(저온처리 및 상온처리)기간에 걸쳐 경시적으로 지상부 조직내 SOD 활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 2에 정리하였다. 비록 일차함수적 관계는 아닐지라도 MnCl₂의 농도가 증가함에 따라 SOD의 활성화 정도도 증가하였으며 10mM 처리구에서는 무처리구에 비해 처리후 24시간에 65% 정도의 SOD 활성증가를 보였으며 이 증가율은 저온처리후 상온하에 옮긴 다음에도 거의 그대로 유지되었다. MnCl₂ 용액의 효과가 거의 전적으로 Mn⁺²이온의 효과인지를

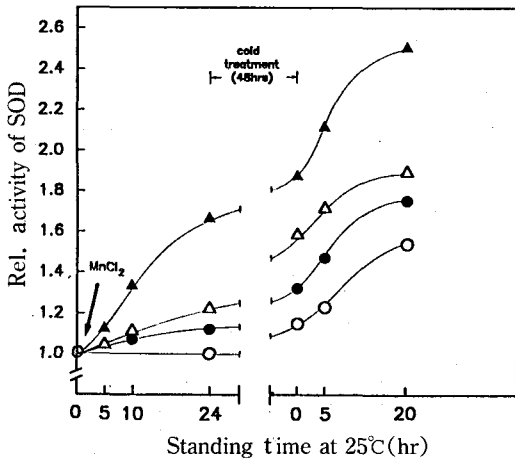


Fig. 2. Time courses of activity change of SOD in leaf tissues of rice seedlings during whole period of the stress-inducing temperature treatment.

MnCl₂ at various concentrations(0.1mM : ●-, 1mM : △-, 10mM : ▲-, and control : ○-) was applied to the plants 24 hrs prior to cold treatment.

알아보기 위해 MnCl₂ 이외의 MnHPO₄와 MnSO₄의 수용액을 처리한 결과, 시용한 모든 염의 동일한 Mn 농도에서는 그 효과의 정도가 실질적으로 동일한 것으로 나타나(데이터 제시는 생략함), SOD 활성화에 대한 Mn염의 효과는 Mn⁺² 이온에 의한 것이라는 결론을 얻었다. 이 결과는 Mn-SOD가 주로 미토콘드리아에 존재한다는 사실^{12,4)}로 미루어 보아, 냉해기작상 스트레스 유발상황하에서 O₂의 주생성처가 미토콘드리아라는 우리의 제안^{8,9)}을 뒷받침하고 있다.

토양중에는 식물이 흡수할 수 있는 Mn⁺²이온이 어느정도 존재하기 때문에 토양에서 정상적으로 자란 식물체는 Mn⁺²이 첨가되지 않은 수경재배조건에서 자란 식물체에 비하여 상대적으로 높은 SOD활성이 유지되고 있으리라 상정된다. 이를 확인하기 위하여 Mn 함량이 730ppm으로 측정된 토양중에서 벼 유묘를

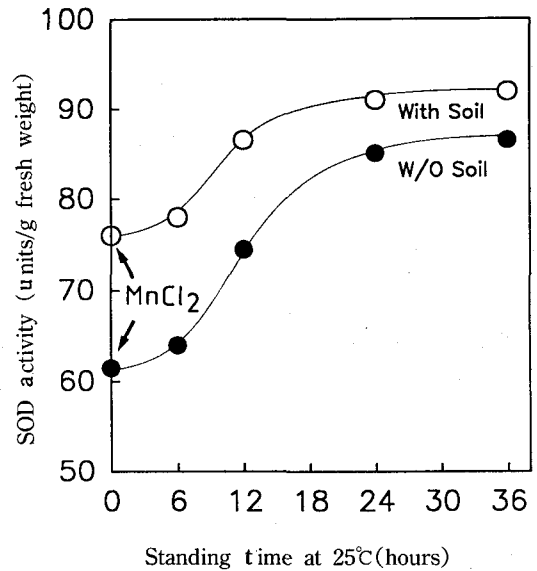


Fig. 3. Dependence of SOD activity in leaf tissues of rice seedlings on the culture media(without(w/o) soil : ●- and soil : ○-), and change caused by 1mM MnCl₂ application in the activity as function of standing time at 25°C.

재배하고 지상부 조직중 SOD 활성을 측정하여 수경재배구의 그것과 비교하였으며, 아울러 MnCl₂ 용액(1mM)을 처리한 다음 SOD 활성의 경시적 변화를 조사하였다. 그 결과는 Fig. 3에 보여주는 바와같이 토양에서 자란 벼 유묘는 수경재배된 벼 유묘보다 약 25-30% 정도 높은 활성을 갖고 있었다. Mn염의 첨가는 양자의 경우에서 공히 냉해유발상황하에서 SOD 활성화를 유도하였으나 특히 토양중에서 자란 유묘에 비하여 수경재배된 유묘에서 효소활성화가 상대적으로 크게 나타났다. 이 사실은 Mn⁺²이 Mn-SOD 활성화에 있어서 필수적 요소임을 다시 시사한다고 하겠다. 아울러, Fig. 3의 결과로부터 Mn⁺² 처리후 24시간정도 경과할때 조직내 SOD활성이 거의 최대치에 이르는 사실도 확인할 수 있었다.

Mn⁺²에 의한 SOD의 활성화는 체내 O₂ 수준을 감소시키는 결과로 이어질 것이며, 이러한 가능성은 Fig. 4에 보여준 데이터로써 입증되었다. 저온처리 후 상온으로 옮긴 유묘에서 Mn⁺² 처리구와 대조구의 체내 O₂ 발생량 또는 발생속도 자체는 상호 유사할 것으로 짐작되나 SOD 활성의 차이에 따른 O₂ 소거속도는 분명히 서로 상당한 차이가 있을 것이므로, SOD 활성화가 크게 일어난 Mn⁺² 처리구의 O₂ 수준이 대조구에 비해 낮게(약 50% 감소) 나타난 것은 당연한

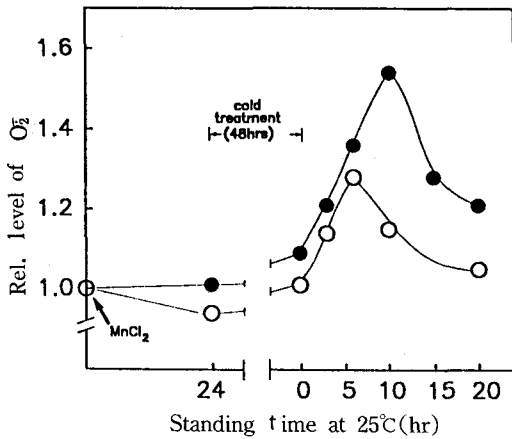


Fig. 4. Time courses of change in the O_2^- level of leaf tissues of soil-cultured rice seedlings.

- : 10mM $MnCl_2$ was applied to the plants 24 hrs prior to cold treatment
- : control ($MnCl_2$ was not applied)

결과이다. 나아가, 저온처리후 상온하에서 O_2^- 수준이 최고치에 이른 다음 감소하기 시작하는 시간도 대조구의 경우 10시간 정도인데 반해 10mM $MnCl_2$ 처리구에서 그것이 6시간으로 짧아진 것도 같은 논리로서

설명되어진다.

저온에 상당기간 노출되었던 식물이 상온하에 놓이게 될때 나타나는 O_2^- 의 과잉생성이 냉해의 직접적, 화학적 인자라면^{8,9)}, Mn^{+2} 처리에 의해 체내 SOD 활성화가 일어난 식물은 상당한 냉해저항성을 보유할 것으로 기대되었다. 이를 확인하기 위해 토양에서 재배중인 벼 유묘에 저온처리 24시간전에 $MnCl_2$ 수용액을 가하고 5°C 암소에서 48시간 세워둔 다음 상온(~25°C)으로 옮겨 30시간후에 외관상 나타나는 냉해발현의 정도를 육안비교하였던 바, Mn^{+2} 무처리구에서는 의문의 여지가 없는 전형적 냉해증상이 표출되었음에 반해 Mn^{+2} 처리구에서 처리농도의 증가에 따라 (비록 육안관찰에 기인한 정량성의 문제를 감안하더라도) 냉해증상의 발현정도가 분명히 감소하였다. Fig. 5에는 사진촬영을 통해서도 거의 완벽한 냉해억제 효과가 드러나는 10mM Mn^{+2} 처리구와 무처리 대조구의 냉해증상을 대비하여 보여주었다. 대조구에서 잎조직의 황화현상으로 나타나기 시작한 증상은 그 이후에도 치유되지 못하고 결국 유묘자체의 고사로 이어졌음에 반해, Mn^{+2} 처리구의 유묘에서는 촬영시점 이후에도 냉해를 인정할만한 가시적 증상이 전혀 발현되지 않았다. 이 결과는 적절한 chemical의 사용에 의한 체내 SOD 활성화를 통해서 식물체에 강력한 내냉성(냉해저항성)을 부여할 수 있음을 시사한다고

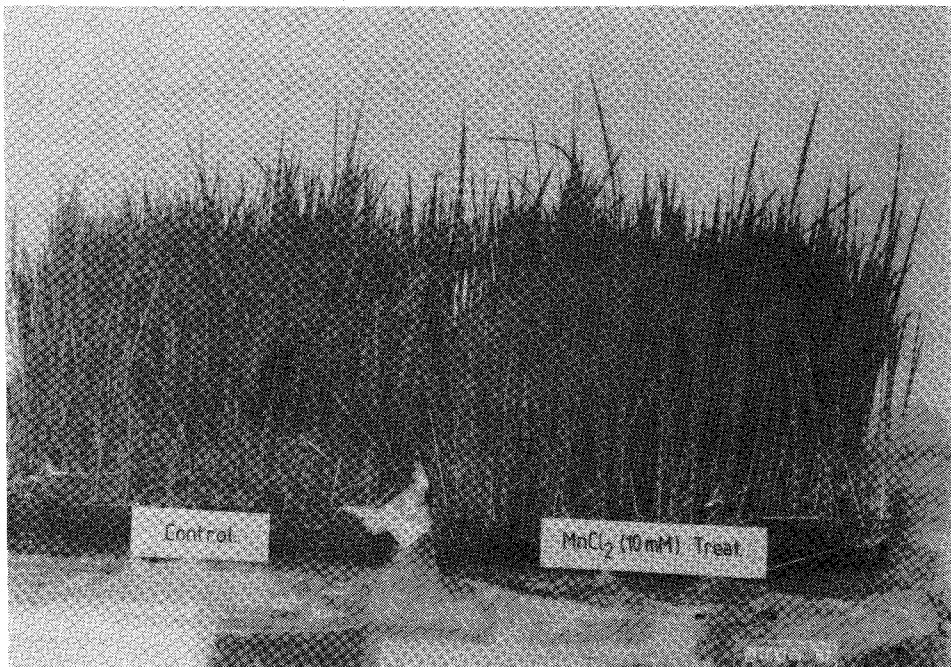


Fig. 5. Protection of rice seedlings from chilling injury by the application of $MnCl_2$ to the plants.

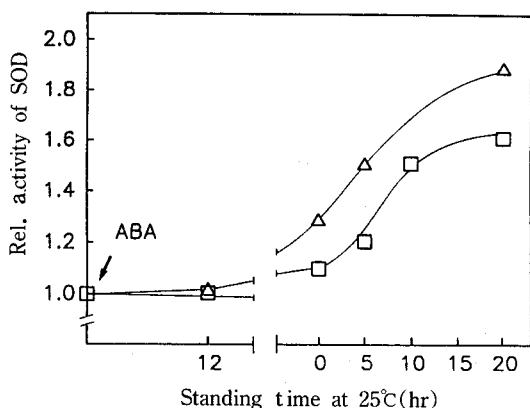


Fig. 6. Time courses of activity change of SOD in leaf tissues during the exposure of rice seedlings of the stress-inducing temperature treatment.

-△- : 0.1mM ABA was applied. -□- : control(ABA was not applied)

하겠다.

생장중인 식물의 생리활성 변화를 유도하기 위한 화학적 방법으로서 자주 시도되는 일은 식물생장조절제를 이용하는 것이다. ABA는 몇가지 식물에 대해서 냉해저항성을 향상시키는 효과를 갖는다고 알려져 있다^{13,14}). 이 ABA의 효과가 SOD의 활성화를 통해 나타나는지도 모른다는 가정하에 0.1mM의 ABA를 유묘에 살포하고 전온도처리구간에 걸쳐 경시적으로 유묘 지상부조직중 SOD 활성을 조사하였고 그 결과를 Fig. 6에 정리하였다. 무처리 대조구와 비교할 때 SOD

활성변화의 시간곡선은 Mn^{+2} 처리구의 결과(Fig. 2 및 3)와 유사한 양상을 보였으며 정량적으로 0.1mM Mn^{+2} 처리구(tray에 첨가)의 결과와 거의 일치하였다. 실제로 ABA 처리구 역시 저온처리(5°C 48시간)후 상온하에 옮겼을 때 비록 사진촬영으로 기록하기에는 어려움이 있었으나 냉해증상의 발현정도가 감소하는 것을 육안 관찰할 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 식물조직내에 흡수되어 SOD를 활성화시킬수 있는 chemical이라면 어느정도는 식물에 대해 냉해억제효과를 보일수 있으리라는 기대를 가능케 하였다.

연구의 다음단계로서 우리가 추구하고자 하는 바는 흡수된 Mn^{+2} 에 의해 활성화된 SOD가 미토콘드리아에 존재하는 Mn-SOD인가, 그리고 SOD의 활성화는 어떤 기작을 거쳐 일어나는가, 하는 의문에 대하여 해답을 얻는 일이다. 이에 대한 연구는 현재 수행중에 있으나 지금까지 수집된 연구결과에 근거하여 잠정적으로 얻은 결론은 활성화된 SOD는 Mn-SOD이며 O_2^- 에 의해 유도된 Mn-SOD의 apoenzyme이 세포내에 흡수된 고농도의 Mn^{+2} 과 결합하여 활성을 갖는 Mn-SOD를 보다 효율적으로 생성($Mn^{+2} + apoenzyme \rightarrow Mn-SOD$) 한다는 점이다. 이에 대해서는 다음 제3보를 통해서 보고하고자 한다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 '88년도 대학발전기금 대우 학술연구비의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. B. L. Geller and D. R. Winge : J. Biol. Chem., 257 : 8945(1982)
2. R. A. Weisiger and I. Fridovich : J. Biol. Chem., 248 : 3582(1973)
3. C. N. Giannopolitis and S. K. Ries : Plant Physiol., 59 : 305(1977)
4. I. Fridovich : Science, 201 : 875(1978)
5. J. M. McCord, J. A. Boyle, E. D. Day, Jr., L. G. Rizzolo, and M. L. Salin : In 'Proceedings of the first EMBO Workshop on Superoxide and Superoxide Dismutases' (A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich, eds.), Academic Press, N. Y., 129(1978)
6. C. Jackson, J. Dench, A. L. Moore, B. Halliwell, C. H. Foyer, and D. O. Hall : Eur. J. Biochem., 91 : 339(1978)
7. J. A. Baum and J. G. Scandalios : Differentiation, 13 : 133(1979)
8. 김종평, 현일, 정진 : 한국농화학회지, 30(4) : 364 (1987)
9. 김종평, 한창균, 정진 : 한국농화학회지, 34(2) : 162 (1991)
10. Association of Official Analytical Chemists(13th edition)
11. S. Y. R. Pugh, J. L. Diguseppi, and I. Fridovich : J. Bacteriol., 160 : 137(1984)
12. S. Y. R. Pugh, J. L. Diguseppi, and I. Fridovich : J. Bacteriol., 162 : 196(1985)
13. A. Rikin, A. Blumenfeld, and A. E. Richmond : Bot. Gaz., 137 : 307(1976)
14. M. N. Christiansen : Hort Science, 14 : 583(1979)

Induction of antioxygenic enzymes as defense systems in plant cells against low temperature stress : (II) Mn^{+2} -induced SOD activation and enhancement of cold tolerance in rice seedlings.

Chang-Kyun Hahn, Jong-Pyung Kim and Jin Jung (Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : The uptake of Mn^{+2} , a metal cofactor Mn-SOD, by rice seedlings resulted in not only a substantial increase in SOD activity in leaf tissues of the plants, but also a significant enhancement of their cold tolerance : the relative extent of the cold tolerance appeared to accord with relative level of the SOD activity. In contrast, Fe^{+3} , Cu^{+2} and Zn^{+2} , which are the cofactors of Fe-SOD and Cu/Zn-SOD, were found to be ineffective for increasing the SOD activity as well as for improving the chilling-resistant capacity of the plants. The results suggest that Mn-SOD, which is most likely induced by its substrate(superoxide) and activated by the presence of Mn^{+2} at high level, is the enzyme acting as an active component of the defense system against low temperature stress in rice plants. In addition, the application of abscisic acid which has been know to protect to some extent certain plants from chilling injury brought about an increase in SOD activity in rice tissues, providing another affirmative information for the crucial role of SOD under the circumstance of cold stress in plants.