

토마토의 성장과정에 따른 카탈리아제 (Catalase) 활성에 관한 연구

朴特苑* · 金德心

상명여자대학교 자연과학대학 화학과
(1993. 10. 4 접수)

Studies on the Catalase Activities of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a Function of Age

Sie Won Park* and Duk Shim Kim

Department of Chemistry, Sangmyung Women's University, Seoul 110-743, Korea
(Received October 4, 1993)

요 약. 토마토(*Lycopersicon esculentum*)를 과종하여 1년간 성장시키면서 성장기간에 따른 잎과 뿌리의 catalase 활성 변화를 측정하였다. 뿌리에 있어서의 catalase 활성은 잎의 경우에 비해 전반적으로 매우 미약하였다. 반면에 잎의 catalase 활성은 매우 현저한 변화 양상을 나타냈는데 주로 peroxisomal 분획에 존재하였고 특히 발아 후 2주 이내의 발아초기에 76 $\mu\text{mol/ml/min}$ 의 최고 활성을 기점으로 하여 급격히 감소했다가 성장기 4~5개월에 즈음하여 상당히 증가된 활성을 보였으며 11~12개월째 노화기에 가장 저조한 활성을 보였다. 이와 같이 성장시기에 따라서 변화하는 catalase 활성에 영향을 미치는 인자로서 첫째 발아기에는 glyoxylate cycle과 β -oxidation이 일어나는 glyoxisomal 반응 그리고 둘째 발아기 이후에는 광합성 반응이 각각 해당시기에 H_2O_2 를 발생시키는 반응으로 작용할 것으로 간주된다. 이 외에도 NADPH는 불활성화된 catalase(compound II)를 다시 활성화시켜 해로운 기질인 H_2O_2 로부터 catalase 보호제로서의 역할을 함으로써 토마토의 성장기간 전체에 걸쳐 작용하는 것으로 나타났다.

ABSTRACT. Catalase activities were assayed on the leaves and roots of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of age for 1 year after germination. The enzyme activities of root tissue demonstrated to be insignificant through all stages of development. On the other hand, the catalase activities of leaf peroxisomal fractions showed remarkable changes with peak value of 76 $\mu\text{mol/ml/min}$ at germination stage within 2 weeks growth, 7.2 $\mu\text{mol/ml/min}$ at adult stage around 4~5 months growth and very small activities at aged period around 11~12 months growth. It is suggested that there may be two factors concerning such catalase activities in relation with age, firstly the glyoxisomal reactions including glyoxylate cycle and β -oxidation at germination stage and secondly photosynthesis hereafter seemed to affect age dependent changes of catalase activity by producing coincident amount of H_2O_2 . In addition, NADPH coenzyme was found to have ability to restore catalytic activity of inactivated catalase (compound II) at all stages of development except old age, indicating NADPH would play a role as catalase protector against deleterious substrate, H_2O_2 .

서 론

식물을 포함한 생물체의 대사반응 중에서 hydrogen peroxide(H_2O_2), superoxide(O_2^-), hydroxy radical($\text{OH}\cdot$) 등과 같은 활성산소(active oxygen) 일명

유해산소(deleterious oxygen)가 발생한다^{1,2}. 이 물질들은 세포에 매우 해로운 물질로 식물에서는 한 발에 대한 피해³, SO_2 와 같은 공해물질에 의한 반응⁴, 상처를 입었을 때의 내부반응⁵, 감염성질병에 의한

손상⁶, 냉해시의 피해작용⁷ 등의 원인물질로서 세포와 조직의 구조적, 기능적 손상을 야기시킨다. 동물에서도 노화의 기전으로서 암, 염증, 백내장, 동맥경화, 당뇨병 등 퇴행성 질병과 관련되어 논의되고 있고 기타 각종 질환의 원인으로서는 큰 관심의 대상이 되고 있다⁸.

식물에서 H₂O₂의 발생을 살펴보면 광합성(photosynthesis)의 두 계열의 반응 중 광합성계 I(photosystem I)과 광합성계 II(photosystem II)에 의해서 이루어지는 명반응에서 광자의 자극을 받아 강력한 환원체인 ferredoxin 및 plastoquinone 등에 의해 전자가 이동하여 수소주체인 NADPH를 합성하고 물(H₂O)로부터는 O₂가 발생되는데 이 과정에서 전자를 비롯한 여러 종류의 환원제에 의해 분자상의 산소가 환원되어 H₂O₂가 발생되고 있다⁹. 두번째 계열인 암반응에서는 fructose가 합성됨으로써 광합성(photosynthesis)이 마무리지어지는데 식물에서 거꾸로 이 유기물을 O₂로 산화하여 H₂O와 CO₂로 분해하는 광호흡(photorespiration) 반응도 일어나고 있다. 광호흡 반응의 의미는 아직 규명되지 않고 있으나 이 일련의 반응이 peroxisome, chloroplast, mitochondria의 세 소기관에 걸쳐서 일어나고 있으며 최소한 두 단계에서 H₂O₂가 발생되고 있다는 점이 특징인데^{10,11}, 일반적으로 광합성이 추진됨에 따라 광호흡 반응도 활발해지고 따라서 발생되어지는 H₂O₂의 양도 증가할 것으로 알려져 있다.

그런데 생체내에서 이와 같이 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소들이 있는데 이들로서는 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase, glutathione reductase 등이 알려져 있으며 이 중에서 catalase (H₂O₂:H₂O₂ oxidoreductase EC 1.11.16)는 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다.

한편 catalase가 생체내에서 자체기질인 H₂O₂에 의해 손상을 받지 않고 온전성을 유지할 수 있는 기전에 대해 많은 연구자들이 관심을 기울여 왔으나 밝혀진 바는 별로 없으며 다만 Kirkman^{12,13}에 의하여 catalase-band NADPH가 발견됨으로써 NADPH의 catalase 보호기능이 시사되었다.

본 연구에서는 식물체의 노화에 대한 연구의 일환으로 1년생 초본인 토마토(*Lycopersicon esculen-*

tum)를 1년간 성장시키면서 잎과 뿌리의 catalase 활성을 측정함으로써 H₂O₂ 발생 작용과 성장과정의 관계를 검색하였으며, 이에 영향을 미칠 수 있다고 간주되는 광합성의 지표로서 chlorophyll a와 b 및 catalase 활성과 NADPH와의 관계를 실험하였다.

실 험

시약 및 기기. Potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic, potassium hydroxide, calcium chloride, 30% hydrogen peroxide는 analytical grade 제품을 사용하였으며 ethyl alcohol은 James Burrough사의 제품을 사용하였다. Onozuka 4S Cellulase는 Yakult Biochemical Co., 그리고 Rohament P는 Rohm GmbH Chemische Fabrik의 제품을 구입하였고 bovine serum albumin과 sorbitol은 Sigma Co.의 제품이었다. Glucose oxidase, glucose, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase는 Sigma사의 제품이었다. 사용기기는 Beckman사의 High speed centrifuge J2-21과 Milton Roy사의 UV/Visible spectrophotometer이었다.

식물재료. 토마토(*Lycopersicon esculentum*)는 서울 종묘 주식회사(서울)의 종자를 사용하였다. 이 종자를 15±2°C, 12 hrs/day의 조명으로 조절된 배양실에서 일정 용기에 파종하여 1년간 성장시키면서 필요한 시기의 식물체를 시료로 취하였다.

효소액 조제. 성장기간에 따른 토마토 식물체의 시료를 10~100분 정도 취하여 깨끗이 세척하고 물기를 닦아냈다. 이들은 줄기를 제외한 뿌리와 잎의 두 분으로 나누어 무게를 달고 그 무게의 10배 용액인 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)를 가했다. 이하 모든 조작은 효소의 변성을 방지하기 위하여 4°C로 유지하면서 시행했다. 이 혼합물을 얼음조 중에서 polytron homogenizer를 사용하여 3초씩 5회 균질화시켰다. 이 균질액은 800 g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 postnuclear 분획으로 사용하였으며 이 postnuclear 분획으로부터 peroxisomal catalase를 조제하기 위해서는 기본적으로 Schmitt의 방법⁴을 적용하였는데, 이 방법 중 순수 peroxisome 분리를 위한 percoll gradient 최종단계는 생략하고 대부분 peroxisome으로 이루어진 peroxisome 분획을 조제

하였고 이 분획의 catalase 활성의 계산은 원래 유래한 postnuclear 분획의 용량에 준하였다.

Catalase 활성분석. Catalase 활성분석은 Havar의 방법¹⁵에 의하여 시행하였다. 반응액 3 ml은 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 1.0 ml, 12.5 mM H₂O₂ 0.8 ml, 효소액으로 이루어져 있다. Catalase 활성은 240 nm에서 흡광도의 감소로 측정되며 1 unit는 1분당 1 μmol의 H₂O₂를 분해시키는 catalase의 양으로 정하는데 이 계산은 Beers의 방법에 의하여¹⁶.

Chlorophyll 정량. 토마토 식물의 잎으로부터의 chlorophyll의 추출은 Hardy의 방법¹⁷에 의하여 시행하였는데, 기본적인 조작은 다음과 같다. 토마토 종자를 파종 후 발아시켜 생장기간에 따라 10~100 분을 채취하여 물로 세척하였다. 그들의 잎을 0.2 g 취한 다음 잘게 잘라 96% ethanol을 15 ml 첨가하여 polytron homogenizer로 5초씩 5회 균질화시키면 균질액에 chlorophyll이 용출되어 나왔다.

두 차례에 걸쳐 추출한 25 ml의 96% ethanol chlorophyll 용액에 대해 665 nm와 648 nm에서 흡광도를 측정하여 chlorophyll a와 b의 정량계산을 하였다¹⁸.

불활성 Catalase에 대한 NADPH의 영향. 토마토 잎의 peroxisome에서 유래한 catalase의 성상에 대해 NADPH의 영향을 살펴보기 위하여 이 효소 용액을 불활성화시키기 위한 H₂O₂를 처리 조작은 다음과 같다. H. N. Kirkman¹³의 방법에 준하였는데 3 ml의 반응액에는 10~100 μl의 peroxisomal catalase 용액, 0.01 M phosphate buffer pH 6.5, glucose oxidase(3.4 nM)와 glucose(2 mM)을 첨가하여 H₂O₂의 발생이 1 μmol/ml/min이 되도록 하여 37°C에서 90분간 반응시켜서 catalase를 불활성화시켰다. 한편 NADPH의 catalase 보호작용을 검색하기 위하여 위와 같이 H₂O₂ 처리를 하기 위한 반응액에 NADPH(2 mM)를 첨가하여 역시 37°C에서 90분간 반응시켰다. 이렇게 처리한 효소반응액은 360~460 nm 사이의 흡광도를 기록하여 비교하였으며 특히 405 nm의 흡광도를 기초로 하여 계산을 시행하였다.

결과 및 고찰

성장기간에 따른 Catalase 활성 변화

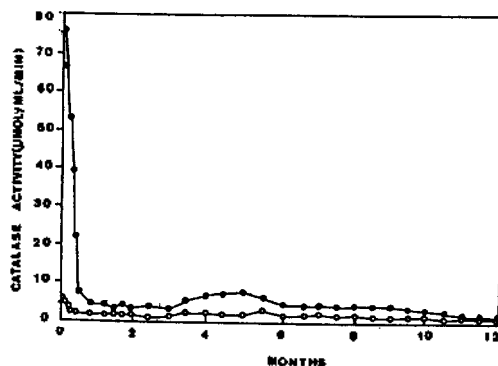


Fig. 1. Age-dependent changes of catalase activities in the postnuclear fractions of leaves (●-●) and roots (○-○). Reaction mixture (3 ml) was composed of 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 1.0 ml, 12.5 mM H₂O₂ 0.8 ml and appropriate enzyme solution. Catalase activities was assayed as the decrease of absorption at 240 nm.

잎과 뿌리의 postnuclear 분획의 catalase 활성. 파괴되지 않은 세포와 핵을 제외한 세포내용물이 그대로 함유된 이 분획의 catalase 활성은 1년에 걸친 토마토의 성장기간에 따라 Fig. 1에 제시한 바와 같은 변화양상을 나타내었다. 전기간에 걸쳐 뿌리에 비해 잎에서 효소활성이 월등히 높았으며 이 결과로부터 뿌리에서의 catalase 효소는 생리적으로 잎에 비해 큰 의미가 없는 반면 잎에서의 catalase 효소는 잎의 독자적 기능과 밀접히 관련이 있을 수 있을 것으로 판단되었다. 잎에서의 효소활성의 변화 그래프 중에서 가장 특징적인 부분은 종자가 발아되어 지상에 어린 싹을 띄운 발아 후 1주일 이내의 초기에 나타낸 매우 높은 효소활성이었다. 이 중 가장 최고값인 76 μmol/ml/min의 활성은 차후 성장기간 중 최고값인 5개월째의 7 μmol/ml/min에 비해 10여배에 달하는 수치로서 이 효소가 토마토의 발아현상과 긴밀한 관계가 될 수 있음을 시사하고 있다.

일반적으로 알려진 바에 의하면 식물에서의 catalase는 peroxisome에만 유일하게 존재하며 인접해 있는 chloroplast와 mitochondria로부터 광합성, 광호흡, 산화적 인산화 반응 중에 필수적으로 파생되는 H₂O₂를 신속히 인수받아 분해하여 무독한 H₂O로 바꾸므로써 세포기능이 손상받지 않고 원활히 이루어지도록 작용하는 것으로 알려져 있다^{10,11}.

따라서 이 postnuclear 분획에서 나타난 catalase 효소활성은 분획 중에 포함된 peroxisome의 catalase에 의한 것으로 간주된다.

한편 식물의 발아기간 중 매우 독특한 특징으로서 세포내에는 peroxisome 대신 glyoxisome이 존재하며 이 glyoxisome이 peroxisome의 기능인 catalase 작용 뿐만 아니라 발아에 필요한 에너지와 대사기질을 진요하게 공급하는 것으로 알려져 있다¹⁹. 그러므로 식물체의 발아에는 glyoxisome이 결정적으로 중요하며 Fig. 1의 그래프에서 제시된 발아 후 초기의 예외적으로 높은 catalase 활성 역시 glyoxisome에 의한 것으로 간주된다. 발아가 완성되어 광합성에 의해 식물체가 정상적으로 일상을 영위하게 되면 이 glyoxisome은 차츰 peroxisome으로 전환되는 것으로 밝혀지고 있으며 따라서 peroxisome이 존재하지 않은 발아시기의 이 높은 catalase 활성은 이 시기에 매우 왕성한 glyoxisome의 H₂O₂ 분해능력으로 판단된다. 이 glyoxisome에 의해 수행되는 주요한 반응으로서는 β -oxidation과 glyoxylate cycle에 의해 에너지 및 FADH₂ 대사기질을 공급하는데 이들 과정 중에 H₂O₂ 생성이 이루어지며^{19,20} 발아시기에 catalase 활성이 예외적으로 높다는 사실은 이들 반응에서 발생하는 H₂O₂의 양이 상당하는 것으로 시사하고 있다.

잎과 뿌리의 peroxisome 분획의 catalase 활성.
Fig. 1에 제시된 catalase 활성은 세포내의 glyoxisome과 peroxisome으로부터 유래하리라는 것은 기존의 밝혀진 사실^{11,21}들로부터 충분히 예측할 수 있었으나 그 확인을 위하여 glyoxisome을 포함하는 peroxisome 분획을 해당시기별로 제조하여서 catalase 활성을 측정하고 그 결과를 Fig. 2에 제시하였다.

Fig. 2에 표시된 catalase 활성은 Fig. 1의 것과 성장기간에 따라 변화되는 양상이 매우 유사할 뿐 아니라 그 값 역시 크게 다르지 않은 결과를 보이고 있다. 즉 발아초기의 월등히 높은 효소활성(62 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$)은 발아 후 약 2주 정도에 벌써 매우 저조하게 감소되었을 뿐 아니라 그 후 약 1년여에 걸친 성장기간에서도 크게 변화되지는 않았으나 성장시기가 약 5개월 즈음되면 약 6 $\mu\text{mol}/\text{ml}/\text{min}$ 의 비교적 높은 활성치를 나타내는데 이 값은 최저값을 나타내는 성장기 1~3개월 그리고 10~12월의 수

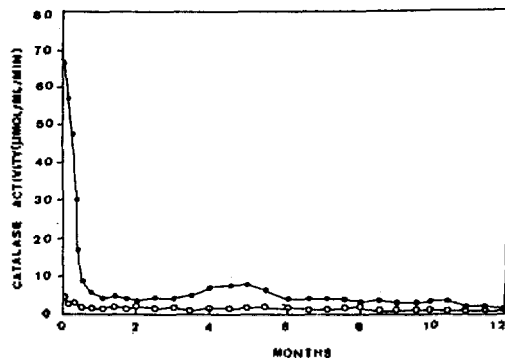


Fig. 2. Age-dependent changes of catalase activities in the peroxisomal fractions of leaves (●-●) and roots (○-○). Reaction mixture and assay method were the same as in Fig. 1.

치의 약 2배에 달하였다.

5개월째의 비교적 높은 값은 이 시기가 이 식물의 왕성한 성장기간일 뿐 아니라 꽃을 피우고 열매를 맺는 중요한 생리현상이 이루어지는 시기이므로 전반적인 대사활성이 함진되며 그에 따라 파생되는 H₂O₂의 양도 많아져서 그에 상응하여 이 효소활성도 증가할 수도 있다는 가능성을 고려할 수 있다. 반면 성장시기 10~12개월 사이의 대사기능이 전반적으로 퇴화하는 노화기간에는 catalase 활성이 대단히 위축하여 매우 저조한 양상을 나타내었다. 이상의 Fig. 1과 2의 결과로부터 토마토의 잎에서 발현되는 catalase 활성은 세포내의 발아초기에는 glyoxisome 그리고 그 이후에는 peroxisome에서 식물의 생리인 발아나 개화 또는 노화와 유관하여 현저하게 변화하는 것으로 보인다.

이상의 결과에 대한 보완 실험으로서 nonperoxisome 분획에서의 catalase 활성을 각각 peroxisome 분획에 상응하는 성장시기에 측정하여 Fig. 3에 표시하였다. 표시된 바와 같이 nonperoxisome 분획의 catalase 활성은 어느 시기에서도 거의 측정되지 않았으며 Fig. 1~3의 결과를 종합해 보면 토마토 잎의 catalase 활성은 전적으로 잎의 peroxisome에서 그리고 발아시기에는 glyoxisome에서 나타나는 것으로 결론지을 수 있을 것으로 판단된다.

성장기간에 따른 Chlorophyll a, b의 농도

Fig. 1과 2의 결과에 의하면 catalase 효소활성은 거의 잎에서만 뚜렷하게 나타나며 변화양상도 잎에

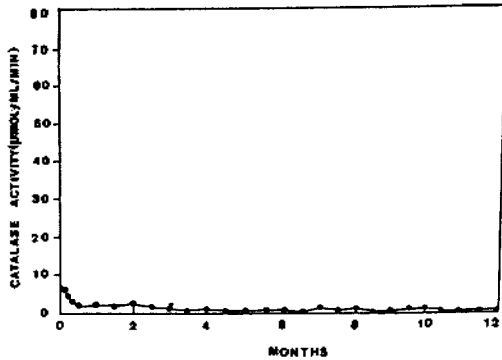


Fig. 3. Time course of the catalase activities in the nonperoxisomal fractions of leaves (●-●) and roots (○-○). Reaction mixture and assay method were the same as in Fig. 1.

서 특징적으로 표현되었다. 그러므로 catalase의 활성이 잎의 고유한 대사반응과 관계되어 있을 가능성이 제시될 수 있으며 잎의 고유한 기능이라면 우선적으로 광합성(photosynthesis)을 생각할 수 있다. 본 실험에서는 잎에서의 catalase 활성변화가 광합성과 유관한지의 여부를 파악하기 위하여 성장시기 별로 잎의 chlorophyll a와 b의 농도를 측정하여 보았다. 그 결과가 Fig. 4에 표시되어 있는데 그 변화양상의 특징으로서 첫 번째 종자의 발아 즈음의 시기에는 chlorophyll a와 b의 농도가 catalase 활성양상과는 달리 별로 높지 않았으며 대신 3~5개월 사이의 성장기간에 이르러서 1~2개월에 나타난 수치의 약 2배에 달하는 chlorophyll a와 b의 값이 측정되었다.

이와 같이 토마토의 잎에 있어서의 chlorophyll a와 b는 모두 4~5개월 사이에 평균기간의 약 두 배에 달하는 높은 값을 나타내었는데 이 사실은 이 시기에 광합성이 가장 왕성하다는 것을 반영한다고 볼 수 있다. 이 Fig. 4의 결과와 Fig. 1 및 2의 결과를 서로 비교하여 보면 발아시기인 최초 2주 이내의 그래프의 양상만 다를 뿐 그 나머지 대부분의 기간을 포함한 전기간 중에는 공통으로 발아 후 4~5개월 사이에 최고값을 나타내는 넓은 peak를 보이고 있다. 따라서 토마토는 발아 후 최초 2주간을 제외하고 나머지 약 1년에 걸친 성장기간 중의 catalase 활성은 광합성에 비례하는 변화양상을 나타내고 있으므로 이 기간 중의 catalase 활성은 대부분 광합성에 의해

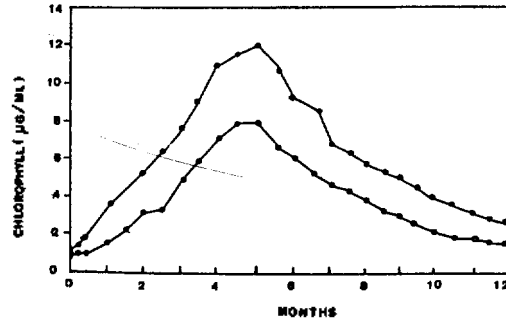


Fig. 4. The concentrations of chlorophyll a and b in the chloroplast fractions of leaves as a function of age. The extraction and assay of chlorophyll a (●-●) and b (○-○) were based on the method by S. I. Hardy²⁵ and J. F. Winterman¹⁸, respectively.

파생되는 H_2O_2 의 처리를 위하여 catalase 효소가 유발되는 것으로 간주할 수 있을 것 같다.

한편 토마토는 발아 후 최초 1~2일간은 육안으로 보기에 잎의 푸른 엽록소의 색이 거의 보이지 않았으며, 실제 Fig. 4에서 보듯이 chlorophyll a와 b의 양이 매우 낮은데도 불구하고 Fig. 1과 2의 결과에서는 그 어느 시기보다도 월등한 catalase 활성의 최고값을 나타내고 있다. 그런데 식물생리의 가장 중요한 한 과정인 종자로부터 새로운 환경에 적응하는 식물체의 탄생을 위한 발아과정(germination)에서 일어나는 핵심적인 반응은 glyoxisome에 의해서 수행되는 반응들로서 에너지 공급을 위한 지방산의 β -oxidation과 대사기질공급을 위한 glyoxylate cycle을 들 수 있는데 β -oxidation 반응에서는 과생되는 $FADH_2$ 의 산화단계에서 H_2O_2 가 발생되고 glyoxylate cycle에서도 $FADH_2$ 가 생성되므로 그 역시 H_2O_2 가 발생되고 있음이 밝혀져 있다^{16,21,22}. 따라서 이 발아시기는 일반 성장기와 달리 광합성 대신 glyoxisome에 의한 이 반응들이 주대사반응들이며 이 반응들의 여러단계에서 H_2O_2 의 발생이 이루어지고 있으므로 그에 따라서 catalase 활성이 크게 유발된 것으로 볼 수 있을 것 같다.

H_2O_2 를 중심으로 살펴보면 발아시기에는 glyoxisome의 여러 반응들에 의해서 상당량 발생하며 그 무독화를 위한 처리도 glyoxisome 자체의 H_2O_2 분해효소인 catalase에 의해 이루어지는 바, 일반 성장기에는 chloroplast에서 수행되는 광합성계의

반응들로부터 H₂O₂가 대부분 생성되는데, 이 H₂O₂는 일단 인접해 있는 peroxisome¹⁰으로 전이된 다음이 peroxisome의 catalase에 의해 무독화 처리되는 것으로 판단하여도 큰 무리가 없을 것으로 생각된다. 다시 말하면 이상의 Fig. 1~4에 걸친 실험을 통하여 잠정적으로 결론지을 수 있는 것은 토마토가 발아하는 기간인 발아 직후 수일간에는 glyoxisome에 의한 β-oxidation과 glyoxylate cycle이 주 대사반응이며 이때 생성된 다량의 H₂O₂는 glyoxisome의 catalase 효소에 의해 무독화 처리되고, 그 이후 1년여 대부분의 생존기간 중에는 광합성(photosynthesis)이 주 대사반응이며 이 광합성은 4~6개월 사이에 특히 왕성하고 노화에 해당하는 10~12월 사이에 매우 위축되는 반응으로 이 반응에 의해 발생하는 H₂O₂는 peroxisome의 catalase에 의해서 처리되는 것으로 판단된다.

성장시기에 따른 Catalase 활성에 대한 NADPH의 영향

Catalase(H₂O₂ : H₂O₂ Oxidoreductase, EC 1.11.16)는 역사적으로 흥미있는 효소로서 기본적인 구조는 각각 1개씩의 heme IX를 지닌 tetramer이다. 이 효소에 대하여 그 동안 논의가 되어 왔던 사항은 어떻게 이 효소가 자체 기질이며 산화력이 강한 H₂O₂에 대해서 안전할 수 있는가 하는 점이었다^{11,23}. 이 catalase의 작용은 Fig. 5에 제시했듯이 Fe³⁺인 활성형 ferricatalase가 H₂O₂를 H₂O로 분해시킨 다음 자신은 일단 compound(I)(Fe^v)로 전환되고 나아가

불활성인 화합물 compound II(Fe^{iv})로 전환되어 최종적으로 활성형인 ferricatalase(Feⁱⁱⁱ)로 재생되어 사용되는 경로가 현재까지 알려진 바였다²⁴. 관건은 compound I→compound II→ferricatalase로 이어지는 단계에 작용이 가능한 AH의 종류와 작용기전인데 그 동안 좀처럼 해명되지 않다가 H. N. Kirkman¹³에 의해서 catalase-bound NADPH complex가 분리 확인됨으로써 NADPH가 생체내에서 compound II의 활성화 작용을 하는 것이 밝혀지기 시작하였다.

본 실험에서는 토마토의 glyoxisome과 peroxisome의 catalase의 보호제가 NADPH일 것인가 하는 문제와 성장기간의 진행과 보호제와의 관계에 대한 규명을 시도하여 보았다.

일차적으로 Table 1에 토마토의 성장기간 1년을 단위로 하여 생리적 의미가 있는 발아(germination), 성숙기(adult), 노화기(aged)의 시료로서 발아

Table 1. Coenzyme requirement of inactivated catalase for recovery of activity

Catalase (Age)	Coenzymes	Recovery of catalase activity (%)
Germinated (3 days)	NADH	2.4
	NADPH	76.5
	FMNH ₂	7.2
	FADH ₂	4.0
Adult (4 months)	NADH	0.2
	NADPH	89.8
	FMNH ₂	5.3
	FADH ₂	4.7
Aged (11 months)	NADH	1.9
	NADPH	20.3
	FMNH ₂	7.5
	FADH ₂	6.9

The reaction mixture (3 ml) was composed of catalase solution (10, 100, 200 μl prepared from 3 days, 4 months, 11 months old tomato leaves, respectively), 0.01 M phosphate buffer (A). Inactivated catalase activity was assayed in a reaction mixture as above with H₂O₂ generated at a rate of 1 μmol/ml/min by glucose oxidase and glucose (B). Recovery of catalase activity was assayed in a reaction mixture as in B but with the presence of NADPH (2 μmol) (C). All reaction mixture were incubated at 37°C for 90 min. and the absorbances at 405 nm were recorded. Calculation for the recovery of catalase activity was based on the formular (C-B/A-B)×100(%).

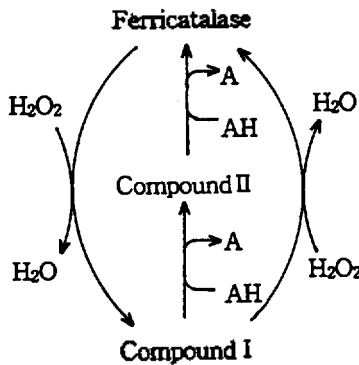


Fig. 5. Traditional scheme for the function of catalase. Ferricatalase, compound I, and compound II have formal oxidation states of Fe(III), Fe(V), and Fe(IV). Compound II is an inactive form of catalase.

후 3일째, 4개월째, 11개월째의 잎의 glyoxisome과 peroxisome catalase에 대한 oxidoreduction coenzymes류의 보호 효과 실험의 결과를 제시하였다.

산화환원 조효소 중에서 세 종류의 생장시기에서 모두 NADPH가 예외적으로 불활성화된 compound II로부터 catalase 활성을 회복시키는 효과가 가장 높았고 나머지 coenzyme류는 거의 모두가 미약하거나 전혀 회복시키지 못함을 알 수 있었으며 이로써 토마토 잎의 catalase는 human erythrocytes¹³에서와 마찬가지로 보호제로서 NADPH를 요구하는 효소인 것을 알 수 있었다.

그런데 노화기의 경우에 NADPH의 효과가 발아기(76.5%)나 성숙기(89.8%)에 비해 20.3%로 훨씬 미흡하였으므로 발아기, 성장기, 노화기의 대표적인 세 그룹의 성장과정에 따른 glyoxisome 및 peroxisome catalase 시료에 대하여 NADPH의 활성 회복 효과를 absorption spectra를 통하여 더 자세히 검색하였다. 기본적으로 ferricatalase는 405 nm에서 maximum peak를 보이는데 이 catalase 시료를 H₂O₂에 90분간

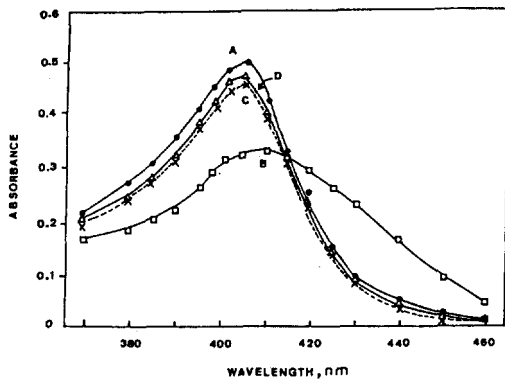


Fig. 6. Absorption spectra of catalase prepared from 3 days old leaves. All incubations and measurements of spectra were 10 μ l catalase solution, 0.01 M phosphate buffer, pH 6.5 at 37°C, ● (A), before exposure to H₂O₂. □ (B), after exposure for 90 min to H₂O₂ generated at a rate of 1 μ mol/ml/min by the presence of glucose oxidase and glucose (2 mM). × (C), as with B but with the presence of NADPH, 2 μ mol. △ (D) as with B but with the presence of an NADPH generating system formed by the addition to the reaction mixture of glucose-6-phosphate dehydrogenase (5 μ g), glucose-6-phosphate (0.2 μ mol), and NADP⁺, 2 μ mol.

노출시키면 ferricatalase가 불활성인 compound II로 전환함에 따라 405 nm에서의 흡수는 감소하고 대신 420~440 nm에서 특이한 흡수 증가가 일어난다. 한편 H₂O₂가 존재하는 반응액에 NADPH regeneration system으로서 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 glucose-6-phosphate 또는 직접 NADPH를 첨가하면 ferricatalase의 흡수 spectrum curve가 회복도에 따라 재생된다¹³. Fig. 6에 표시한 결과에 의하면 발아 후 3일째의 어린 새싹의 glyoxisome catalase는 H₂O₂에 90분간 노출시켰을 때 서서히 그러나 현저하게 불활성화되어 curve B를 나타내었다. 이어서 NADPH를 첨가한 반응액의 curve C는 원래 활성형이었던 curve A와 거의 유사한 흡수곡선을 나타냄으로서 NADPH에 의해 불활성화된 compound II가 다시 ferricatalase로 재생된 것을 시사하고 있다.

다음으로 성숙기에 해당되는 4개월째의 토마토 잎의 catalase에 대해 동일한 실험을 시행했을 때 Fig. 7의 결과가 얻어졌는데 그래프의 전체적인 모양은 발아기의 peroxisome의 것과 비슷하며 다만 NADPH에 의한 회복 정도에 약간의 차이가 날 뿐이었다. 그러나 노화기 시료의 결과인 Fig. 8에서는 curve C가 curve B와 비슷한 모양으로서 이 노화기 시료에서는 ferricatalase H₂O₂에 의해 일단 compound II로 전환된 다음 NADPH에 의해 용이하게 활성형으로 재생되기 어려움을 시사하고 있다.

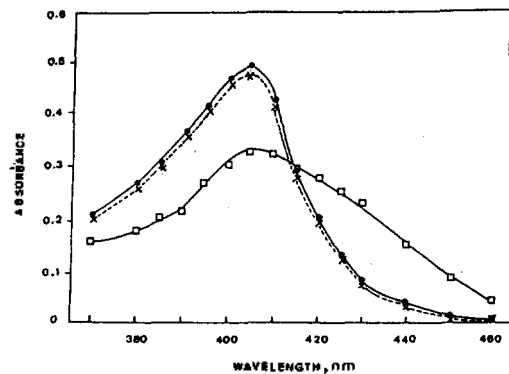


Fig. 7. Absorption spectra of catalase prepared from 4 months old leaves. All incubations and measurements of spectra are the same as in Fig. 6 except 100 μ l catalase solution.

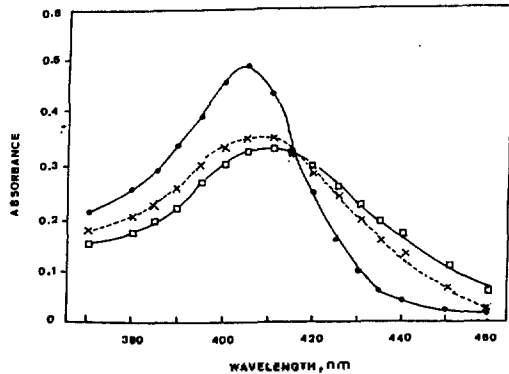


Fig. 8. Absorption spectra of catalase from 11 months old leaves. All incubations and measurements of spectra are the same as in Fig. 6 except 200 μ l catalase solution.

본 연구에서 수행한 실험결과를 Fig. 1에서 8가지 모두 종합하여 보면 토마토는 발아기, 성숙기, 노화기를 거치는 전 성장과정을 통하여 발아기에서 중요한 발아(germination)를 위하여 catalase 활성이 특히 높고, 개화나 과수를 위시하여 대사 종류가 다양하고 왕성한 성숙기(adult)에는 광합성에 준하여 catalase 활성이 비례적으로 변화하며 전반적으로 NADPH에 의한 ferricatalase의 재생도 우수하게 이루어지는데 반하여 노화기(aged)에는 광합성도 저조하고 NADPH에 의한 ferricatalase의 회복도 미약하였다. 다시 말하면 H_2O_2 는 토마토의 전생애를 통하여 발아, 성장 및 노화와 긴밀한 관계를 가지며 대부분의 성장기간 중에는 NADPH의 보호작용에 힘입어 활성형 catalase가 원활히 공급됨으로서 H_2O 로 용이하게 무독화되는데 반하여 노화기에는 NADPH의 보호작용이 매우 약하여 그 결과 활성형 catalase의 재생이 부진하게 되고 따라서 유해한 H_2O_2 의 피해를 입을 수도 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 1991년도 학술진흥재단의 기초연구소 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사함을 표합니다.

인 용 문 헌

1. I. Fridovich, *Adv. Enzymol. Relat. Areas, Mol. Biol.*, **58**, 62 (1986).

2. H. M. Hassan, "Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease", Raven Press, New York, U.S.A., 1984.
 3. R. S. Dhindsa and W. Matowe, *J. Exp. Bot.*, **32**, 79 (1982).
 4. R. A. Bressan, L. Cureax, Le, L. G. Wilson, and P. Filner, *Plant Physiol.*, **61**, 172 (1975).
 5. M. L. Salin and S. M. Bridges, *Plant Physiol.*, **67**, 143 (1981).
 6. S. Kato, *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, **43**, 587 (1977).
 7. R. G. Omran, *Plant Physiol.*, **65**, 407 (1980).
 8. C. C. Richardson, J. N. Abelson, and P. D. Boyer, *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 105 (1989).
 9. A. H. Huang and R. N. Trelease, "Plant Peroxisomes", pp. 72~84, Academic Press, New York, U.S.A., 1983.
 10. S. E. Frederick and E. H. Newcomb, *J. Cell. Biol.*, **43**, 350 (1969).
 11. C. C. Chang and A. H. C. Huang, *Plant Physiol.*, **67**, 1003 (1981).
 12. H. N. Kirkman and G. F. Gaetani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 4343 (1984).
 13. H. N. Kirkman, S. Galianos, and G. F. Gaetani, *J. Biol. Chem.*, **262**(2), 660 (1987).
 14. M. R. Schmitt and G. E. Edwards, *Plant Physiol.*, **70**, 1213 (1982).
 15. E. A. Havir and N. A. Mchale, *Plant Physiol.*, **84**, 450 (1987).
 16. R. E. Beers and W. Sizer Irwin, *J. Biol. Chem.*, **231**, 133 (1954).
 17. R. G. Jansen and J. A. Bassham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1095 (1966).
 18. J. F. Winterman and A. Mots, De, *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 448 (1965).
 19. N. E. Tolbert, *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 133 (1981).
 20. E. H. Newcomb and S. E. Ferederick, *J. Cell. Biol.*, **43**, 343 (1969).
 21. R. Eising and B. Gerhardt, *Plant Physiol.*, **84**, 225 (1987).
 22. E. P. Palmiano and B. O. Juliamo, *Plant Physiol.*, **52**, 274 (1973).
 23. P. J. Nichols, *J. Biol. Chem.*, **241**(3), 721 (1963).
 24. G. K. Schonbaum, *J. Biol. Chem.*, **256**(1), 1173 (1976).
 25. S. I. Hardy, P. A. Castelfranco, and C. A. Reibz, *Plant Physiol.*, **46**, 705 (1870).