

엽록체내 Protoporphyrin IX(PPIX) 생합성계에서
S-23142의 작용기구

김태준* · 김진석* · 조광연* · 吉田茂男**

Action Mechanism of S-23142 on the PPIX Biosynthesis System of *Spinacia oleracea* L. Chloroplast

Kim, T.J.* , J.S. Kim* , K.Y. Cho* and S. Yoshida**

ABSTRACT

The effects of S-23142{N-(4-chloro-2-fluoro-5-propargyloxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydrophthalimide}, on protoporphyrin IX (PPIX) biosynthesis in *Spinacia oleracea* L. leaf *in vivo* and *in vitro* condition were investigated by reversed-phase HPLC with fluorescence detector. The stroma and the membrane fraction of spinach chloroplast were isolated by osmotic regulation. The conversion of δ -aminolevulinic acid (ALA) to PPIX occurred more in the stroma than in the membrane fraction. It suggested that the enzymes that catalyse PPIX biosynthesis from ALA were localized in the stroma. Also, the synthesized PPIX content from ALA was completely inhibited by 10^{-8} M of S-23142 or 10^{-7} M of acifluorfen in the stroma but not in the membrane fractions. Therefore, these results suggested that the target site of S-23142 and acifluorfen may exist in the stroma fraction of spinach chloroplast.

Key words : Mode of action, S-23142, acifluorfen, protoporphyrin IX (PPIX), δ -aminolevulinic acid (ALA), intact chloroplast, stroma and membrane fraction.

서 언

제초제의 경엽처리시 세포막의 신속한 파괴를 유지시키며 작용발현에 광을 요구하는 대표적인 제초제로는 diphenylethers (DPEs) 계열의 acifluorfen과 oxyfluorfen 등이 있다.

이들은 식물체내의 엽록소 생합성계에 영향을 미쳐 protoporphyrin IX (PPIX)을 축적시키며, 축적된 PPIX은 광에 의하여 강력한 photosensit-

izer로 변하여 주변의 생체막을 파괴시킴으로써 제초작용을 발휘한다. 즉, 엽록소 생합성과정중 protoporphyrinogen IX (PPO)을 PPIX으로 산화시키는데 관여하는 효소인 protoporphyrinogen oxidase의 활성이 제초제에 의하여 억제되어 PPO는 축적되면서 이후의 중간대사물질 특히 heme함량이 감소된다. 감소된 heme은 feedback regulation에 의하여 δ -aminolevulinic acid (ALA)의 생합성을 촉진시키기 때문에 PPO는 더욱 증가되며 이들은 정상적인 대사과정으로 유

* 한국화학연구소 (Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), P.O.Box 9, Daedeogdan-ji, Daejeon 305-606, Korea)

** 理化學研究所 (The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Hirosawa 2-1, Wako-shi, Saitama 351-01, Japan)

<1993. 12. 27 접수>

입되지 못한 채 엽록체로부터 세포질내로 유출되고 이후 자동산화(autooxidation)과정을 거쳐 비정상적인 PPIX축적이 가속화 되는 것으로 알려져 있다^{3,6,7,8)}. Sato 등¹¹⁾은 축적된 PPIX이 63kD의 세포막 단백질과 결합된 형태로 존재하며 이들이 광에 의하여 제초작용이 발현된다고 설명하였다.

그러나 이러한 PPIX의 축적현상은 *in vivo*계에서는 확인되었으나 intact chloroplast 또는 etio-chloroplast를 이용한 *in vitro*계에서는 PPIX의 축적보다는 오히려 감소되는 결과가 보고¹³⁾되어 이에 대한 구체적인 검토가 요구되고 있다. 한편, 식물체내에서 ALA를 기질로 하는 PPIX의 생합성 부위에 관한 연구도 많은 논란의 대상이 되고 있는데 Smith와 Rebeiz 등¹²⁾은 ALA로부터 PPIX의 전환에 관여하는 효소가 엽록체의 stroma분획에 존재한다고 하였고 Nasri 등⁹⁾은 stroma와 membrane분획에 공존하나 stroma분획이 더 많은 부분을 차지한다고 하였으나, Jacobs 등²⁾은 membrane분획이라고 설명하였으며 최근에 Lee 등^{4,5)}은 membrane에 느슨한 형태로 결합되어 존재한다는 등의 다양한 이론들이 제기되고 있다. 따라서 이들 제초제가 엽록체의 어느 부위에서 1차 작용점을 지니며 그후 구체적으로 어떠한 기작을 통해 PPIX이 축적 또는 감소되는가에 대해서는 아직 상세히 밝혀지지는 않고 있다.

본 실험은 PPIX의 생합성이 엽록체의 stroma와 membrane분획중 어디에서 주로 일어나는가를 알아보고 DPEs와 다른 구조를 지니면서 광요구형 제초제로 알려진 S-23142의 작용점 및 작용부위를 검토하고자 시금치잎을 대상으로 *in vivo*와 *in vitro*에서의 PPIX생합성계에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 엽록체 및 stroma와 membrane분획의 분리
시금치에서 구입한 시금치를 실온, 암조건에서 24시간 순화시킨 다음 중류를 제거하여 시료로 사용하였다. 생체중 30g의 시료를 10mM Hepes 완충액 (pH 7.7, 0.5M sucrose, 1.0M MgCl₂, 1.0mM EDTA, 20mM TES, 5mM cystein, 0.2%

BSA함유) 60mL로 균질화시켜 4겹의 cheese-cloth로 거르고 7000g, 4°C에서 1분간 원심분리한 다음 침전물을 소량의 Hepes완충용액으로 확산, 용해시켰다. 이를 2,000g, 4°C에서 1분간 원심분리하고 상등액을 3,000g, 4°C에서 2분간 원심분리한 다음 그 침전물을 완충액 2mL로 용해시켜 intact chloroplast 조효소액으로 사용하였다. 엽록체내의 stroma와 membrane분획은 생체중 20g의 시료를 50mM Na₂HPO₄완충액 (pH 6.5, 0.33M glucose, 50mM KH₂PO₄, 5mM MgCl₂, 11mM NaCl, 7.5mM isoascorbic acid 함유) 100mL로 균질화시켜 30초간 원심분리 (2,500g, 4°C)한 다음 침전물을 50mM Hepes완충액 (pH 8.0, 0.33M sorbitol, 2mM EDTA, 1mM MgCl₂, 0.5M DTT, 0.2% BSA함유) 50mL로 확산, 용해하여 intact chloroplast를 분리하고 이를 13배 희석된 50mM Hepes완충액 5mL로 용해시킨 다음 15초간 원심분리 (9,000g, 4°C)하여 침전물인 membrane분획과 상등액인 stroma분획을 얻었다. 분획된 stroma는 ultra-filter (M.W=10,000)를 이용하여 1시간 원심분리 (8,000g, 4°C)시켜 농축시킨 다음 30분간 초원심분리 (80,000g, 4°C)하여 그 상등액을 순수한 stroma분획으로 사용하였다.

2. Protoporphyrin IX(PPIX)의 분석(*in vivo* 및 *in vitro*)

추출, 분리된 intact chloroplast, stroma 및 membrane분획을 조효소액으로 하여 적당량의 Hepes완충액으로 희석시킨 다음 반응에 사용하였다. 희석된 membrane분획의 chlorophyll함량은 11-20μg/mL이었고 stroma분획의 protein함량은 6.4-9.5mg/mL이었으며 반응시 각각을 0.1mL씩 이용하였다. 반응용액은 10mM Hepes 완충액 (pH 7.7, 0.5mM sucrose, 4mM δ-aminolevulinic acid, 1mM MgCl₂, 20mM TES, 4mM glutathion, 0.6mM NAD, 0.2% BSA함유)이었고, S-23142 및 acifluorfen을 농도별로 혼합한 반응액 1mL에 조효소액 0.1mL을 넣고 20°C, 암조건의 수조에서 약 2시간 동안 반응시켰다. 반응후, 반응액 0.5mL에 methanol 1.5mL을 가하여 (75% methanol) 반응을 정지시

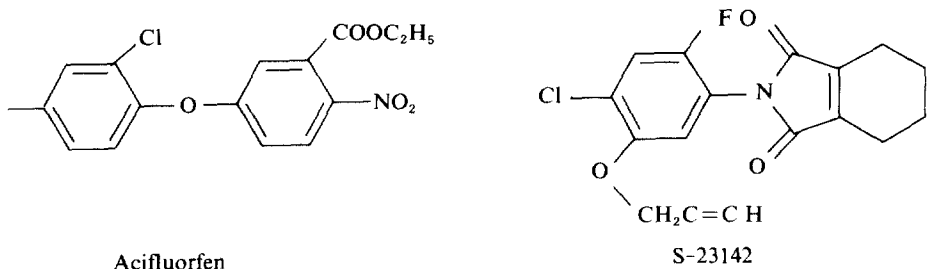


Fig. 1. Structure of acifluorfen and S-23142

키고 HPLC용 주사기로 여과시킨 다음 PPIX함량을 HPLC 분석하였다. 분석조건은 C₈ column (Senshu pak, C₈-2251-N 6×250mm, No. 100641)과 형광검출기 (excitation-410nm, emission-630nm)을 이용하였고 유속은 1mL/min, 이동상은 10mM CH₃COONH₄ (pH 6.0, 80% methanol)이었다. *In vivo* 실험은 직경 9cm 샤프에 제조제가 농도별로 함유된 반응액을 적당량 첨가하고 직경 0.5cm로 잘라낸 시금치잎 절편을

0.7g씩 치상하여 온실조건에서 약 5시간 동안 배양한 다음 PPIX함량을 분석하였다. 반응액에 엽록소 생합성의 기질이 되는 ALA의 첨가 유·무에 따른 PPIX의 생합성량도 함께 비교하였다. 실험에 사용된 S-23142와 acifluorfen의 구조는 그림 1과 같다.

A. *In vivo*

; Intact plant

B. *In vitro*

; Intact chloroplast

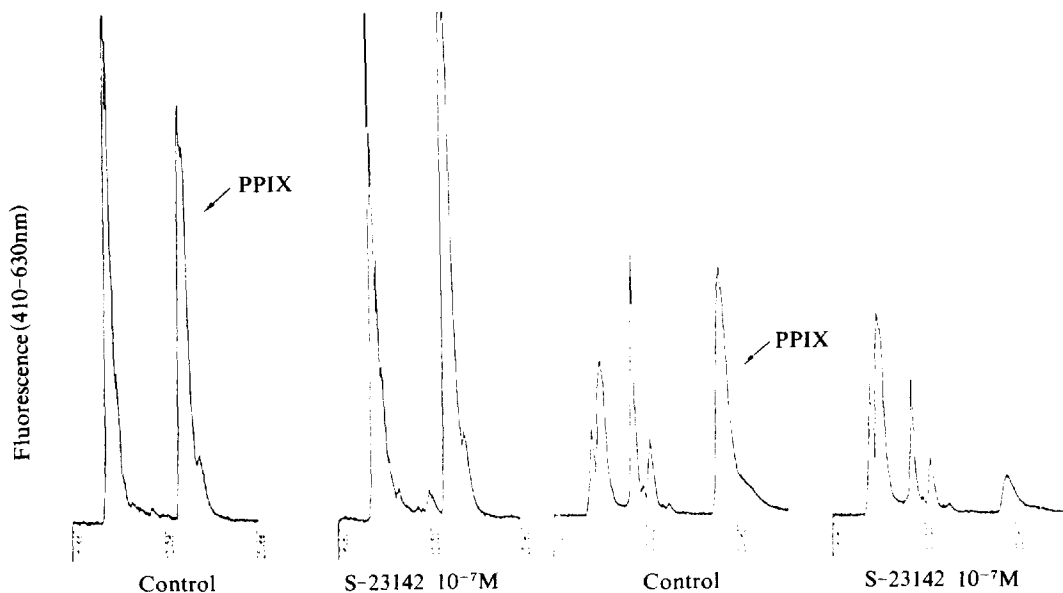


Fig. 2. HPLC profiles of protoporphyrine IX (PPIX) synthesized by *in vivo* and *in vitro* condition. PPIX from the reaction mixture was separated by reversed phase HPLC as described in Materials & Method : detection was by fluorescence (excitation ; 410nm, emission ; 630nm). This experiment conducted by several times was shown similar results.

결과 및 고찰

S-23142를 식물체에 처리하면 acifluorfen처리
의 경우와 동일하게 경엽이 고사하는 증상을 나
타낸다. Acifluorfen은 PPIX을 축적시켜 체초작
용이 발현되는 것으로 보고^{3,6,7,8)}되어 있으므로 S
-23142가 acifluorfen과 같은 작용을 하는지를 알
아보기 위하여 *in vivo* (intact plant)와 *in vitro*
(intact chloroplast)조건에서 PPIX의 생합성에
미치는 영향을 조사하였다(그림 2). 그 결과 *In*
*in vivo*실험에서 광요구형 체초제들의 일반적인 특
징인 PPIX의 축적현상이 S-23142의 처리에 의해
관찰되었으나 *in vitro*실험에서는 *in vivo*에서의

Table 1. Effects of S-23142 and acifluorfen on the
biosynthesis of protoporphyrin IX in
intact leaf (*in vivo*) and intact chloroplast
(*in vitro*) of spinach.

Treatment	<i>In vivo</i> ^{a)}		<i>In vitro</i>	
	Intact plant	Intact chloroplast	Intact plant	Intact chloroplast
Co. I ^{b)} (-ALA)	0.0 (0) ^{c)}	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Co. II (+ALA)	101.8 (100)	51.6 (100)	51.6 (100)	51.6 (100)
S-23142	10 ⁻⁷ M	142.2 (140)	8.3 (16)	8.3 (16)
Acifluorfen	10 ⁻⁷ M	—	46.0 (89)	46.0 (89)
	10 ⁻⁶ M	253.3 (249)	—	—

^{a)} Details about assay condition were written in
Materials and Methods.

^{b)} Assays were conducted by reaction mixture with
and without δ -aminolevulinic acid which is one
of the substrates of chlorophyll biosynthesis path-
way (with ; Co. I, without ; Co. II).

^{c)} Denote % of control at each assay condition.

Table 2. Synthesized PPIX contents by S-23142 and acifluorfen treatment *in vitro* with the each part of
spinach chloroplast.

Treatment (M)	Assay parts (<i>in vitro</i>) ^{a)}		
	Membrane	Stroma	Intact Chl.
Co (+ALA)	5.5 (100) ^{b)}	128.3 (100)	129.8 (100)
S-23142	10 ⁻⁷	0.0 (0)	66.1 (52)
	10 ⁻⁸	2.9 (53)	-
	10 ⁻⁹	4.8 (87)	-
Acifluorfen	10 ⁻⁶	0.0 (0)	-
	10 ⁻⁷	2.4 (44)	-
	10 ⁻⁸	4.5 (82)	-

^{a)} Detailed in Materials and Methods.

^{b)} Denote % of control at each part of chloroplast.

결과와 상반되는 즉, S-23142의 처리에 의하여
PPIX의 생합성량이 감소되는 것으로 나타나
Witkowski 등¹³⁾의 보고내용과 일치하였다. 이때
PPIX의 생합성은 반응용액에 엽록소 생합성의
전구물질인 ALA가 공급된 경우에서만 이루어져
본실험에서 분석, 정량된 PPIX은 모두 반응용액
에 첨가된 기질 ALA에 의한 전량의 반응산물임
을 알 수 있었다(표 1). 시험약제 처리에 의한
PPIX 생합성량은 *in vivo*에서 대조구보다 약
40% 증가한 반면 *in vitro*에서는 80% 정도의 역
제를 나타내 PPIX 생합성량의 변화정도는 *in*
*in vivo*보다 *in vitro*에서 민감한 반응을 나타내었다.
따라서 이들 두 체초제는 PPIX의 생합성에 동일
하게 작용하는 것으로 보이며, S-23142의 작용점
은 acifluorfen과 같이 protoporphyrinogen
oxidase (PPO)일 것으로 추정된다.

*In vitro*에서 체초제처리에 의한 PPIX 생합성
량의 감소현상이 엽록체내의 어느 부위에서 이루
어지는가를 구체적으로 알아보기 위하여 엽록체
내의 stroma와 membrane을 분리, 분획하고(재
료 및 방법 참조) 각각을 대상으로 acifluorfen과
S-23142를 농도별로 처리, 반응시킨 후 PPIX의
생합성량을 분석하였다(표 2). 반응용액에 ALA가
첨가된 대조구에서 PPIX의 생합성량이 mem-
brane분획에서는 매우 저조했던 반면, stroma분
획에서 많았고 S-23142 및 acifluorfen처리에 의
한 PPIX 생합성량의 감소현상도 membrane분획
보다는 intact chloroplast 및 stroma분획에서 현
저하였다. 따라서, 식물체에서 ALA를 기질로

Table 3. Effect of S-23142 on synthesized PPIX content in each part of stroma isolated by ultracentrifugation.

Treatment	Assay parts ^{a)}	
	Supernatant	Pellet
Co. I ^{b)} (-ALA)	0	0
Co. II (+ALA)	23.6 (100) ^{c)}	5.6 (100)
S-23142 10 ⁻⁷ M	8.3 (35)	0.5 (9)

^{a)} See Materials and Methods.

^{b)} Assays were conducted by reaction mixture with and without δ -aminolevulinic acid which is the main substrate of chlorophyll biosynthesis (with ; Co. I, without ; Co. II).

^{c)} Denote % of control at each assay part.

하여 PPIX의 생합성에 영향을 미치는 S-23142와 acifluorfen의 작용부위는 엽록체내의 stroma분획에 존재할 것이라 생각되었다.

S-23142 및 acifluorfen의 작용부위가 stroma 분획일 것이라고 제시된 표 2의 결과가 과연 순수하게 분획된 stroma에서도 재현되는지를 확인하고자 1차 분획된 stroma내에 존재할 가능성이 있는 membrane particles와 membrane에 부유상태로 존재하는 lysosome 등의 제거를 위해 초원심분리(4°C, 80,000g)한 다음, 보다 순수한 상

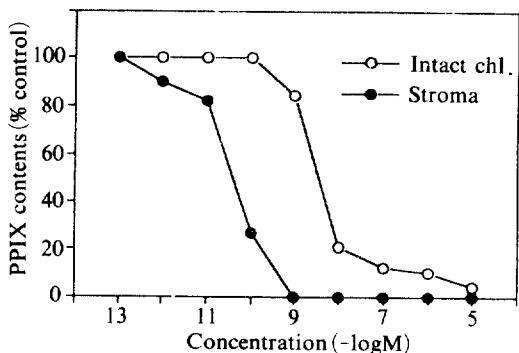


Fig. 3. Comparisons on the inhibition of conversion to PPIX from ALA by various concentration S-23142 treatments in the stroma and the intact chloroplast of spinach leaf. Synthesized PPIX contents after reaction in the ALA medium were separated by reversed-phase HPLC attached fluorescence detector as described in Materials and Methods. This experiment conducted several times was shown similar result.

태의 stroma(상징액)와 침전물을 대상으로 ALA에 의한 PPIX의 생합성 정도를 비교한 결과는 표 3과 같다. 대부분의 PPIX은 초원심분리된 stroma분획에서 생합성되고 있었고 이는 모두 반응액에 첨가된 ALA에 의한 반응산물이었다. 초원심 분리된 침전물 부분에서도 소량의 PPIX이 분석되었는데 이는 초원심분리중 혼합된 소량의 stroma분획때문일 것이라 생각된다. 초원심분리된 stroma분획에 10⁻⁷M 농도의 S-23142를 처리한 경우 PPIX의 생합성이 현저히 감소되었으나 침전물에 처리한 경우에는 감소경향이 약하였다. 따라서 S-23142의 작용점이 엽록체내의 stroma 분획에서 이루어 진다는 표 2의 결과를 재확인할 수 있었고, 엽록소 생합성과정중 광요구형 제조체들의 공통적인 작용점이 되는 PPIX의 생합성은 ALA를 기질로 한 *in vitro* 실험의 경우 엽록체내의 순수한 stroma에서 이루어 진다는 결과를 얻었다.

위의 사실을 바탕으로, 보다 효율적인 PPIX의 *in vitro* 실험을 구축하기 위하여 시급치임으로부터 분리된 intact한 상태의 chloroplast와 초원심분리 이전상태의 stroma분획을 대상으로 S-23142가 PPIX 생합성에 미치는 영향을 비교하여 본 결과는 그림 3과 같다. S-23142처리에 의하여 intact chloroplast와 stroma분획 공히 PPIX의 생합성량은 감소하였으나 그 감소된 정도는 stroma분획의 경우가 intact chloroplast보다 약 100배 정도의 민감한 반응을 나타내었다. 따라서 식물체내에서 PPIX생합성에 관련된 화합물들의 *in vitro* 실험에는 stroma분획을 이용하는 것이 유리할 것으로 생각되었고, 이용할 stroma분획은 초원심분리 이전상태의 분획으로도 가능하다는 결과를 얻었다.

제조제 S-23142는 실제 제조활성면에서 acifluorfen보다 강하다. 이러한 경향이 *in vitro* 실험에서도 확인이 된다면 이들은 서로 동일한 작용점을 지니는 것으로 추정할 수 있을 것이다. 따라서 *in vitro* 계의 실험에서도 S-23142가 acifluorfen보다 강한 활성을 나타내는지를 확인하기 위하여 이들의 처리에 의한 PPIX 생합성 억제 정도를 비교하여 보았다(그림 4). PPIX의 생합성이 완전히 억제되는 농도는 acifluorfen의 경우

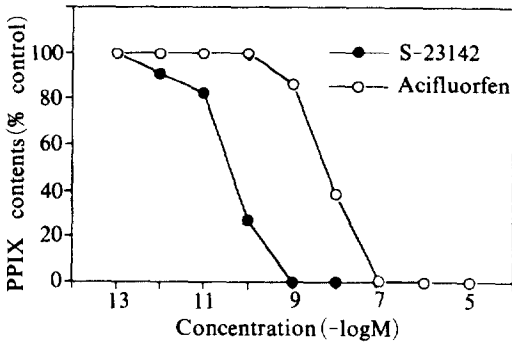


Fig. 4. Dose-inhibition curve of PPIX biosynthesis derived from ALA in various concentration treatments of acifluorfen and S-23142 in the stroma fraction. Stroma from intact chloroplast of spinach leaf was separated by osmotic regulation; See Materials and Methods. This experiment conducted several times was shown similar result.

약 10^{-7} M인 반면 S-23142의 경우에는 약 10^{-9} M로써 S-23142가 100배 정도 강한 반응을 나타내었고 이는 두 제초제의 활성정도의 차이와 같은 경향을 보여 S-23142 및 acifluorfen의 작용점은 동일하다는 표 2의 결과를 더욱 지지해 주었다.

이상의 실험으로, ALA를 기질로 하여 PPIX 생합성에 관련된 화합물들의 *in vitro* 실험을 위해서는 초원심분리 이전의 stroma분획이 가장 효율적이었고, S-23142와 acifluorfen은 동일하게 PPIX의 생합성을 억제하였으며 stroma분획에서 그 억제정도가 강하게 일어나 작용부위는 엽록체 내의 stroma일 것으로 생각되었다. 특히 엽록소 생합성과정중 ALA를 기질로 하는 PPIX의 생합성계가 stroma에 존재한다는 본실험의 결과는 Smith와 Rebeiz 등¹²⁾의 설명과 일치하였으나 Jacobs 등²⁾이 언급한 바와 같이 다른 의견들도 제기되어 있으므로, 이에 대한 구체적인 검토가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

In vitro 조건에서 protoporphyrin IX (PPIX) 생합성에 미치는 제초제 S-23142와 acifluorfen의 영향을 알아보고자 시금치잎에서 엽록체내의 stroma와 membrane을 분리, 분획하고 형광검출

기가 장착된 역상HPLC를 이용하여 생합성된 PPIX 함량을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. PPIX의 생합성이 이루어지는 부위는 엽록체 내의 stroma분획이었고 이는 모두 ALA (δ -aminolevulinic acid)에 의한 반응산물이었다.
2. PPIX의 생합성에 관련된 *in vitro* 실험은 stroma분획을 이용하는 것이 가장 효율적이었다.
3. *In vitro* 계에서 S-23142와 acifluorfen은 동일하게 PPIX의 생합성을 억제하였으며, 그 작용부위는 엽록체내의 stroma일 것으로 판단되었다.

인 용 문 헌

1. Derrick, P.M., A.H. Cobb and K.E. Pallett. 1988. Ultrastructural effects of the diphenylether herbicide acifluorfen and the experimental herbicide M & B 39297. *Pestic. Biochem. Physiol.* 32 : 153-163.
2. Jacobs, J.M., N.J. Jacobs. 1984. Protoporphyrinogen oxidation, an enzymatic step in heme and chlorophyll synthesis: partial characterization of the reaction in plant organelles and comparison with mammalian and bacterial system. *Arch. Biochem. Biophys.* 229 : 312-319.
3. Kouji, H., T. Masuda and S. Matsunaka. 1989. Action mechanism of diphenylether herbicide: stimulation of δ -aminolevulinic acid-synthesizing system activities. *Pestic. Biochem. Physiol.* 33 : 230-238.
4. Lee, H.J., M.D. Ball, and C.A. Rebeiz. 1991. Intraplastidic localization of the enzymes that convert δ -aminolevulinic acid to protoporphyrin IX in etiolated cucumber cotyledons. *Plant Physiol.* 96 : 910-915.
5. Lee, H.J., M.D. Ball, R. Parham, and C.A. Rebeiz. 1992. Chloroplast Biogenesis 65. Enzymic conversion of protoporphyrin IX to Mg-protoporphyrin IX in a subplas-

- tidic membrane fraction of cucumber etiochloroplasts. *Plant Physiol.* 99 : 1134-1140.
6. Matringe, M., D. Clair and R. Scalla. 1990. Effects of peroxidizing herbicides on protoporphyrin IX levels in nonchlorophyllous soybean cell culture. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36 : 300-307.
 7. Matringe, M. and R. Scalla. 1988. Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in nonchlorophyllous soybean cell : accumulation of tetrapyrroles. *Plant Physiol.* 86 : 619-622.
 8. Mayasich, J.M., U.B. Nandihali, R.A. Liebl and C. A. Rebeiz. 1990. The primary mode of action of acifluorfen-Na in intact seedlings is not via tetrapyrrole accumulation during the first dark period following treatment. *Pestic. Biochem. Physiol.* 36 : 259-268.
 9. Nasri, F., C. Huault, A.P. Balange. 1988. δ -Aminolevulinatase activity in thylacoid-related structures of etiochloroplasts from radish cotyledons. *Phytochemistry* 27 : 1289-1295.
 10. Sato, R., E. Nagao, H. Oshino, K. Kamoshita and M. Furuya. 1987. Wavelength effect on the action of a N-phenylamide S-23142 and diphenylether acifluorfen-ethyl in cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 85 : 146-1150.
 11. Sato, R., H. Oshino, H. Koike, Y. Inoue, S. Yoshida and N. Takahashi. 1991. Specific binding of protoporphyrin IX to a membrane-bound 63 kilodalton polypeptide in cucumber cotyledons treated with diphenyl ether-type herbicides. *Plant Physiol.* 96 : 432-437.
 12. Smith, B.B., C. A. Rebeiz. 1979. Chloroplast Biogenesis XXIV. Intrachloroplastidic localization of the biosynthesis and accumulation of protoporphyrin IX, magnesium protoporphyrin monoester and longer wavelength metalloporphyrins during greening. *Plant Physiol.* 63 : 227-231.
 13. Witkowski, D. A. and B. P. Halling. 1989. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen-methyl. *Plant Physiol.* 90 : 1239-1242.