

際草劑 藥害輕減物質 探索과 作用機構 糾明

II. Glutathione 含量과 Glutathione S-transferase 活性 變化에 대한 N-(4-chlorophenyl) maleimide, 植物生長調節物質 및 Alkylating Agents의 效果

全載哲* · 馬祥堉**

Investigation of Herbicide Safeners and their Mode of Safening Action II. Effect of N-(4-chlorophenyl) maleimide, Plant Growth Regulators, and Alkylating Agents on Glutathione Content and Glutathione S-transferase Activity

Jae-Chul Chun* and Sang-Yong Ma**

Abstract

The effect of N-(4-chlorophenyl) maleimide(CPMI), plant growth regulators, and alkylating agents on glutathione(GSH) content and glutathione S-transferase(GST) activity was examined with 3-day-old etiolated sorghum(*Sorghum bicolor* [L.] Moench) seedlings. The GSH content and GST activity of untreated seedlings were higher in shoots than that in roots. Response of GST activity in coleoptile was significantly greater than in other tissues of sorghum seedling. In CPMI-treated seedlings, GSH content was not significantly different from that in untreated seedlings. CPMI treatment resulted in 2.3-fold increase in GST activity measured with metolachlor as substrate in the coleoptile region. In contrast, change in GST activity measured with metolachlor as substrate in the coleoptile region. In contrast, change in GST activity measured with 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene did not occur. The increase of GST activity was caused by induction of a GST isozyme, which is substrate-specific to metolachlor. Subsequently, two hypotheses related to metolachlor detoxification were evaluated on the basis of regulation of plant growth regulators and substrate induction of GST activity. In coleoptile, GST activity measured with metolachlor was increased to 2.1-and 3.4-fold by both 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid(2, 4-D) and metolachlor treated at the germination stage of sorghum, respectively. Treatments of 2,4-D and metolachlor also induced isozymes exhibiting the activity toward metolachlor. One of the isozymes was co-eluted with that induced by CPMI. These results indicated that increase in GST activity by CPMI may be partially related to auxin regulation and substrate induction.

Key words : N-(4-chlorophenyl) maleimide, Plant growth regulator, Alkylating agent, Glutathione, Glutathione S-transferase

* 全北大學校 農化學科(Dept. of Agricultural Chemistry, Jeonbuk National University, Jeonju 561-756)

** 又石大學校 生命資源學科(Dept. of Life Resources, Woosuk University, Wanju 560-800)

○본 논문은 1993 韓國學術振興財團 學術研究造成費 支援에 의하여 遂行된 研究의 一部임.

序 言

일반적으로 除草劑의 選擇性이란 除草劑의 絶對的 特性에 근거하기 보다는 植物體間 相對的인 反應性的 差異로 부터 나타나기 때문에 環境條件 등에 따라서는 反應이 減少가 나타나게 되고, 이에 따라 作物에서 藥害가 유발되기도 한다. 특히 chloroacetanilide系 除草劑의 경우에는 低溫多濕의 環境 條件이나 高溫度 處理時에 禾本科 作物에 대한 藥害 誘發의 可能性이 報告되고 있다^{1,2)}. 이러한 배경에서 미국 등지에서는 chloroacetanilide系 除草劑의 安全使用을 위하여 藥害輕減劑 (herbicide safener)로 불리는 特定 化合物의 利用에 관한 研究들이 활발히 이루어져 왔다^{3,4,5)}. Cyometrinil, flurazole, naphthalic anhydride 및 oxabtrinil과 같은 藥害輕減劑들은 化學構造上으로 매우 다양한 部類의 化合物들로서, 주로 作物의 種子에 處理되어 直後의 어린 식물체내에서 chloroacetanilide系 除草劑와 glutathione (GSH)의 conjugation 의한 不活性化 反應을 촉진함으로써 作物의 정상적인 生肉을 가능케 한다^{6,7)}.

除草劑의 不活性化는 酵素⁸⁾ 또는 非酵素的인 反應⁹⁾을 통하여 나타나며, 酵素的인 反應의 경우에는 glutathione S-transferase(GST)가 不活性化 反應을 觸媒하는 것으로 알려져 있다^{10,11,12)}. 특히 이들 藥害輕減劑가 처리된 植物體에 있어서 chloroacetanilide系 除草劑에 대한 藥害輕減效果의 發現과 除草劑 不活性化 酵素인 GST의 活性 增大 사이에는 高度의 相關도가 인정되었으며¹³⁾. 이로부터 최근의 藥害輕減劑의 作用특성에 관한 研究들은 GST의 活性 增大를 生化學的 機作을 밝히는데 초점이 주어지고 있다. 지금까지 알려진 主要 機作으로서는 作物의 種子에 처리된 藥害輕減劑가 作物의 發芽 段階에서 GST의 合成을 결정하는 遺傳子들을 活性化 함으로써 除草劑의 不活性化 反應을 촉진시킨다는 假說이 제시되었으며¹²⁾, 이후의 연구에서 藥害輕減劑에 의한 GST의 活性 增大가 特定 除草劑에 대하여 特異的으로 反應하는 새로운 GST isozymes의 發現에 起因함이 확인되었다^{10,11,14)}. 그러나 이러한 GST isozymes의 發現이 전반적인 GST發現 遺傳子의 活性化에

의한 것인지 또는 새로운 GST isozyme의 전사단계에만 特異的으로 作用하는지의 여부는 아직 알려져 있지 않다.

최근에는 藥害輕減劑에 의한 GST 活性 增大를 이해하기 위한 關聯 機作으로서 植物 生長調節物質과 除草劑 類似物質의 役割이 보고되었다^{15,16)}. 담배에서 얻어진 auxin 調節 cDNA인 *par B*는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 存在下에서 GST 活性를 갖는 分子量 23,965의 蛋白質을 發現함이 확인됨으로써 植物體中에서 일어나는 chloroacetanilide系 除草劑의 不活性化 反應에 대한 植物 生長調節物質의 役割 可能性이 提示되었다¹⁵⁾. 또한 chloroacetanilide系 除草劑와 化學的 特性이 유사한 化合物의 前處理를 통하여 이 除草劑의 代謝를 觸媒하는 GST의 活性 增大가 나타날 수 있는데^{10,17)}, 한 예로서 atrazine이 수년간 반복처리된 地域에서 발생한 抵抗性 雜草種에서는 GST의 活性 增大를 통하여 感受性種에 비하여 atrazine의 不活性化가 촉진됨이 報告된 바 있다⁸⁾.

앞서 著者 등은 藥害輕減劑로서 이용이 유망한 N-(4-chlorophenyl) maleimide(CPMI)를 數種의 作物種子에 처리하고 作物의 初期生長 變化를 조사한 結果報告에서 수수에 있어서 除草劑 metolachlor에 대한 CPMI의 藥害輕減效果가 除草劑의 吸收 阻害에 기인하지 않으며, 植物體內로 吸收된 metolachlor의 대부분이 GSH와 conjugation에 의한 代謝를 통하여 신속한 除草劑의 不活性化에 의하여 나타난다고 報告하였다¹⁸⁾. 이러한 結果를 토대로 본 研究에서는 CPMI의 藥害輕減機構를 이해하기 위한 生化學的 指標로서 metolachlor 不活性化 反應을 觸媒하는 GST의 活性과 反應基質인 GSH의 含量 變化를 조사하고 GST isozyme의 發現 樣相을 檢定하였다. 또한 GST의 活性 變化를 가져오는 關聯 機作에 관한 實驗的 證據를 얻을 目的으로 metolachlor 不活性化와 植物 生長調節物質(2, 4-D, ethylene, abscisic acid)과 alkylating agents(metolachlor, 2-iodoacetamide, 2-bromo-N-phenylacetamide)의 處理에 의한 GSH 含量, GST 活性 및 isozyme의 發現을 연관지어 調査하였다.

材料 및 方法

化合物處理 및 生育條件. CPMI는 全 등¹⁸⁾이 행한 方法에 準하여 순수 種子(品種, DK41Y)에 1.25g/kg 水準으로 피복처리하였다. 플라스틱 포트에 無菌 vermiculite를 채우고 피복처리 및 無處理 種子를 3cm 深度로 파종한 다음, 포트의 下端部로부터 충분한 水分을 공급하였다. 植物 生長調節物質과 alkylating agents는 播種 直後에 최초로 공급되는 물을 통하여 處理하였다. 水分 維持 및 光遮斷을 위하여 포트의 윗부분을 aluminium foil로 덮고 30℃와 相對濕度 80%의 暗 條件 栽培床에서 3일간 생육시킨 幼植物體를 채취하여 사용하였다. 또한 處理方法을 달리하여 植物 生長調節物質과 alkylating agents의 效果를 비교하기 위하여 上記와 동일한 方法으로 생육시킨 無處理 種子의 幼植物體를 채취하여 植物 生長調節物質과 alkylating agents가 포함되어 있는 培養液(10mM HEPES(pH 7.5), 0.1mM CaCl₂, 0.5mM KCl) 내에서 24時間 동안 培養하였다. 培養床의 條件은 幼植物體의 生育條件과 동일하며, 培養期間 동안 외부로부터 培養 液에 空氣를 계속 주입하였다. 포트 및 培養液에 처리된 植物 生長調節物質은 5μM, 2, 4-D, 100μM ethephon(ethrel®, Union Carbide, Inc.) 및 10 μM abscisic acid(ABA)를 使用하였으며, alkylating agents는 metolachlor, 2-iodoacetamide 및 2-bromo-N-phenylacetamide를 모두 100μM 水準으로 사용하였다. 처리가 완료된 植物 試料는 實驗目的에 따라 韌葉部, 中莖部, 分裂組織部 및 幼根部로 신속히 分離하여 液體窒素에 보관하였으며, 採取後 2日 이내에 使用하였다.

GSH 含量 측정. 채취한 試料로부터 抽出液을 준비하기 위하여 5% trichloroacetic acid(TCA, w/v)와 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 포함한 250mM potassium phosphate 緩衝液(pH 6.5)를 窒素 가스를 이용하여 脫氣한 다음, 液體窒素로 냉각시킨 유발에 담고 채취한 試料를 緩衝液內에서 2분간 마쇄 하였다. 또한 실험 과정중의 回收率을 확인하기 위하여 抽出液에 內標準物質로서 5nmol GSH를 가한 試料에 대하여서도 동일한 條件으로 實驗을 진행하였다. 마쇄한

試料를 2,000g에서 2.5분간 遠心分離하고, 상등액을 취하여 10,000g에서 15분간 다시 遠心分離하였다. 상등액은 GSH 含量 測定을 위하여 液體窒素內에서 보관하고 抽出後 2日 이내에 사용하였다. 試料中의 GSH 含量 調査는 Lamoureux 등⁹⁾이 사용한 方法을 一部 變形하여 實施하였다. 100mM potassium phosphate(pH 6.8) 緩衝液에 10mM EDTA, 1mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB) 및 GSH가 포함되어 있는 反應液을 준비하고 여기에 1 unit GST를 가함으로써 反應을 測定하고, GST가 포함된 溶液의 反應係數와 GST가 포함되지 않은 溶液의 反應係數의 差異로부터 GSH含量을 決定하였다. 反應液중 포함되어 있는 GSH 濃度를 0, 20, 40, 60, 80, 100nmol 水準으로 첨가하여 각각의 吸光度를 測定하고, 1차 회귀식에 의하여 反應係數를 補正하였다. 이와같은 方法에 의하여 抽出 段階에서 內標準 GSH를 첨가한 試料로부터 測定된 GSH의 回收率은 87% 이었다.

GST 活性 檢定. CPMI, 植物 生長調節物質 및 alkylating agents의 處理에 따르는 GST 活性의 變化를 調査하기 위하여 Dean 등¹⁰⁾과 Gronwald 등¹³⁾의 方法에 따라 조효소액의 抽出 및 GST 活性 檢定을 實施하였다. 채취한 試料를 液體窒素로 냉각시킨 유발을 利用하여 1mM EDTA, 0.5mM 2-mercaptoethanol 및 5% polyvinyl polypyrrolidone(PVPP, w/v)이 포함된 200mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)內에서 마쇄하였다. 마쇄한 試料를 각각 2점의 cheesecloth와 miracloth를 利用하여 濾過하고, 여액을 20,000g에서 15분간 遠心分離하였다. 遠心分離後 상등액을 취하고, 이들 GST 活性 檢定을 위한 조효소액으로 使用하였다. 酵素의 活性검정은 일반적인 GST의 基質로서 사용되는 CDNB와 不活性化 對象 除草劑인 metolachlor를 基質로하여 實施하였다. 먼저 CDNB를 基質로 하는 GST 活性(GST[CDNB])의 檢定은 1mM GSH, 1mM CDNB 및 조효소액이 포함되어 있는 100mM potassium phosphate 緩衝液(pH 7.5)에서 實施하였으며, 反應液의 總量은 1ml로 하였다. 반응은 反應液에 조효소액을 가한 直後에 開始되었으며, 340nm에서 反應 初期 2 分間의 吸光度 變化와 물 吸

光係數($9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)에 의하여 反應速度를 산출하였다. GST의 活性은 조효소액을 포함한 反應液에서의 反應速度와 조효소액을 포함하지 않은 反應液에서의 反應速度의 差異에 의하여 決定하였다. Metolachlor를 基質로 하는 GST 活性(GST[metolachlor]) 檢定은 10mM , GSH, $5\mu\text{M}$ [^{14}C]metolachlor (specific activity, $21.5\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) 및 조효소액이 포함된 100mM potassium phosphate 緩衝液(pH 7.5)에서 實施하였으며, 反應液의 總量은 $500\mu\text{l}$ 로 하였다. 反應은 反應液에 [^{14}C]metolachlor를 가한 直後에 開始되어 실온에서 1時間 동안 進行시켰으며, 反應液에 $750\mu\text{l}$ 의 dichloromethane을 가함으로써 終了시켰다. 反應液과 dichloromethane이 포함된 容器를 2分間 진탕 정치한 후, GSH-metolachlor conjugate가 포함되어 있는 上層部 물層의 放射能을 liquid scintillation spectrometry를 利用하여 測定하였으며, 이 反應에서 형성된 GSH-metolachlor conjugation에 의한 代謝物質은 全 등¹⁸⁾의 方法에 따라 TLC 上에서 確認되었다. CDNB의 경우와 마찬가지로 조효소액을 포함한 反應液에서의 反應速度와 조효소액을 포함하지 않은 反應液에서의 反應速度의 GST의 活性을 決定하였다.

GST isozymes 檢定. GST isozymes의 活性 檢定은 Anderson 등⁹⁾과 Dean 등¹⁰⁾이 행한 方法에 준하여 實施하였다. 먼저 上記와 같이 抽出한 조효소액을 다시 $100,000\text{g}$ 에서 60分間 遠心分離한 다음, 상등액을 Sephadex G-25 column(PD-10 column, Pharmacia)에 충전하고 20mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8)을 利用하여 通過시켰다. 여액을 다시 $45\mu\text{m}$ filter로 濾過한 다음, 50ml superloop를 통하여 FPLC-anion exchange(Mono Q) column에 충전하였다. 蛋白質의 溶出은 20mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.8) 中の NaCl의 濃度 變化($0\sim 0.5\text{M}$)로 實施하였는데, 이때의 溶出速度는 0.5ml min^{-1} 으로 하였다. 0.5ml 의 單位로 모든 溶出液을 分離 포집하고, 앞서 서술한 方法에 따라 GST[metolachlor] 및 GST[CDNB] 活性을 檢定하였다. GST 活性을 나타내는 大部分의 蛋白質은 NaCl의 濃度 0.2M 以內에서 거의 모두 遊離되었다.

結果 및 考察

CPMI의 效果. 著者 등¹⁸⁾은 앞서 CPMI 處理에 의하여 GSH와의 conjugation을 통한 metolachlor 代謝反應이 促進됨을 보고하였는 바, 이러한 除草劑 不活性化 反應의 生化學的 機構를 目的으로 먼저 CPMI 處理後 暗條件에서 3日間 生育시킨 수수에 존재하는 metolachlor 不活性化 反應의 基質인 GSH의 含量 變化를 調査하였다.

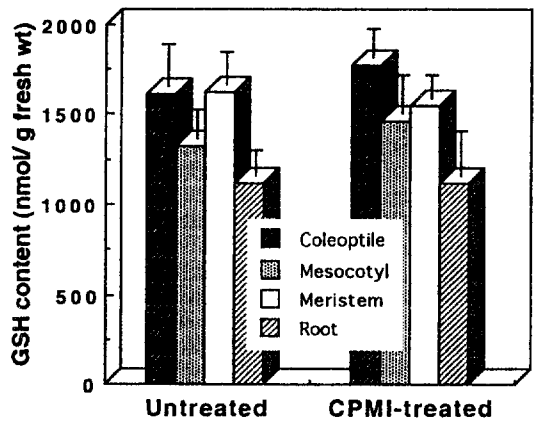


Fig 1. Effect of CPMI on glutathione content in 3-day-old etiolated sorghum seedlings. Values represent the mean ± standard error.

無處理 수수의 각 部位別 GSH의 分布는 전반적으로 地上部 抽出物에서 幼根部에 비하여 높게 나타났으며, 특히 韌葉部에서 幼根部에 비하여 높은 GSH 含量 분포를 보였다(그림 1). 中莖部와 分裂組織部에서는 幼根部와 거의 비슷한 水準의 GSH 含量을 나타내었다. 이러한 각 植物 組織別 GSH의 分布는 CPMI에 의하여 增大 또는 減少되지 않았으며, 無處理의 경우와 매우 유사한 樣相의 GSH 分布를 보였다. 이러한 結果는 CPMI에 의한 GSH-metolachlor conjugation 反應의 促進이 反應 基質의 含量 增大에 의해서라기 보다는 觸媒酵素의 活性 變化에 關하여므로써 나타남을 示唆하고 있다. 이와 유사한 結果로서 Gronwald 등¹³⁾은 oxabenil,

dichlorimid, naphthalic anhydride 및 flurazole과 같은 藥害輕減劑를 대상으로 metolachlor 不活性化 機作을 상호 비교한 研究報告에서 이들 藥害輕減劑의 처리에 의하여 GSH 含量 增加가 있음을 지적하고 이들 藥害輕減劑의 活性 발현이 不活性化 反應의 基質 變化를 통하여 나타난다고 報告하였다. Atrazine 抵抗性 雜草種에서도 GSH와의 conjugation에 의한 atrazine의 不活性化가 感受性 種에 비하여 增大되었으며¹⁹⁾, 이러한 atrazine 代謝의 促進이 GSH 含量의 變化 보다는 GST 活性 增大에 기인함이 또한 報告된 바 있다⁸⁾. 이러한 結果를 기초로 하여 上記와 동일한 條件의 수수를 對象으로 metolachlor 不活性化 反應의 觸媒酵素인 GST의 活性 變化를 調査하였다.

Table 1. Effect of CPMI on GST activity in coleoptiles, mesocotyls, meristems, and roots of 3-day-old etiolated sorghum seedlings.

Treatment	Sorghum tissue	GST activity ^{a)}	
		CDNB	Metolachlor
Untreated	Coleoptile	7.86a	4.29b
	Mesocotyl	1.96b	2.87d
	Meristem	2.27b	3.59c
	Root	2.05b	2.62d
CPMI-treated	Coeoptile	8.18a	10.05a
	Mesocotyl	2.02b	3.72c
	Meristem	2.39b	4.53b
	Root	2.11b	3.51c

a) GST activities were determined with both $\mu\text{mol GSH-CDNB g}^{-1}$ fresh wt min^{-1} and $\text{nmol GSH-metolachlor g}^{-1}$ fresh wt h^{-1} ; means followed by the same letter within columns are not significantly different at 5% level according to the LSD.

無處理 수수의 경우에 GST[CDNB] 活性은 韌葉部에서 대부분의 酵素 活性이 나타났으며, 中莖, 分裂組織部 및 幼根部間에는 뚜렷한 活性의 差異를 보이지 않았다(표1). GST[metolachlor] 活性에 있어서도 다른 組織에 비하여 韌葉部에서 가장 높은 活性을 보였다.

이러한 GST[CDNB] 活性의 分布는 CPMI를 처리한 수수의 경우에도 유사한 傾向이었으나, GST[metolachlor] 活性에 있어서는 無處理에 비하여 전반적인 活性의 增大가 인정되었다. 특히 韌葉部에서는 CPMI 處理에 의하여 GST[metolachlor] 活性이 無處理에 비하여 약 2.3배 增大되었으며, 이는 CPMI에 의한 藥害輕減作用의 발현이 주로 幼根物體의 地上部에서 發現됨을 보고한 全 등¹⁸⁾의 結果와도 一致하는 傾向이었다. Vigor 등²⁾은 藥害輕減劑의 處理에 따르는 metolachlor 不活性化의 促進이 이 除草劑에 대하여 特異적으로 作用하는 GST에 의하여 나타난다고 報告하였다. 최근의 보고^{10,11,14)}에서는 特定 除草劑에 대하여 基質 特異성을 가는 GST isozyme이 藥害輕減劑의 處理에 의하여 發現되며, 本 實驗 結果에서도 CPMI 處理에 의한 metolachlor 不活性化 反應의 促進이 GST[metolachlor] 活性 增大에 起因하는 것으로 判斷되었기 때문에 GST 活性 變化가 가장 민감하게 나타난 韌葉部를 對象으로 이 結果를 確認하고자 하였다.

無處理 및 CPMI가 처리된 수수의 韌葉部에서 抽出한 초효소액을 직접 FPLC-anion exchange(Mono Q) column에 通過시켜 얻어진 각 여액층에 존재하는 GST 活性을 調査하였다. 無處理의 경우에 GST[CDNB] 活性을 보이는 하나의 피크(1)와 GST[metolachlor] 活性을 나타내는 2개의 피크(2, 3)가 각기 다른 NaCl의 濃度 範圍에서 나타났다(그림 2). CPMI 處理의 경우에는 기본적으로 無處理과 유사한 GST 發現 樣相이 나타남과 동시에, GST[metolachlor] 活性을 갖는 또 하나의 다른 피크(4)가 나타났다. 이 새로운 附加의 GST [metolachlor] 活性은 CDNB에 대하여서는 전혀 活性을 나타내지 않기 때문에 metolachlor에 대하여 特異적으로 作用하는 GST isozyme이 CPMI 處理에 의하여 誘導됨을 示唆하는 結果로서, 이에 의한 GST[metolachlor]의 活性 增大를 통하여 metolachlor의 不活性化 反應이 促進되는 것으로 判斷된다. 기존의 藥害輕減劑의 活性 機構에 관한 연구에서도 植物種 및 藥害輕減劑의 種類에 따라 다양한 樣相으로 GST isozyme이 發現됨을 보고한 바 있으며^{8,10,11,14)}, 또한 이들은 低溫의 分析條件 및 蛋

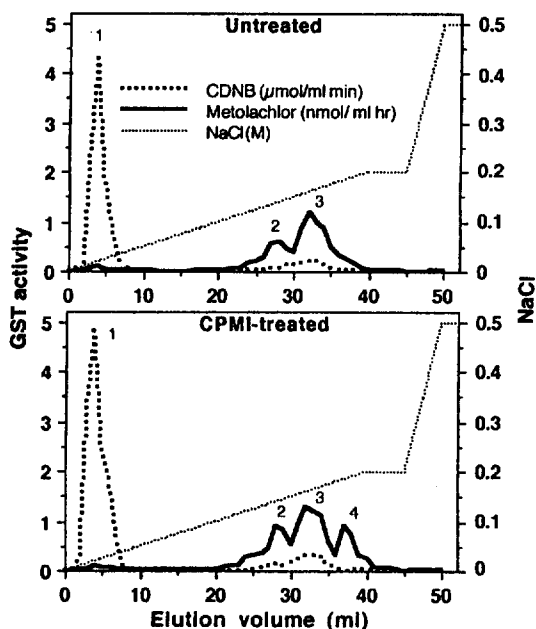


Fig 2. EPLC-anion exchange(Mono Q) chromatograph of GST activity in coleoptiles excised from untreated and CPMI-treated sorghum seedling.

Protein was eluted from the column with a gradient of NaCl. Each fraction was assayed for GST activity using CDNB and metolachlor as substrates.

白質 分解抑制劑 등을 이용한 부수적인 實驗을 통하여 새로운 GST 活性의 發現이 蛋白質 分解物質 등에 의한 結果가 아닌 GST isozyme에 의한 것임을 確認하였다. 無處理 條件에서 나타나는 기본적인 GST 活性은 植物 種에 따라서 매우 상이한 樣相을 보이며, 특히 Dean 등¹⁰⁾은 種子 保管中에 처리되는 殺蟲殺菌劑에 의해서도 일부 誘導될 수 있음을 指摘하였다. 지금까지 보고한 대부분의 研究에서는 藥害輕減劑 處理에 의한 GST의 活性 增大가 酵素에 대한 직접적인 活性化에 기인하지 않으며^{13,20)}, 새로운 GST 蛋白質의 合成 促進으로부터 나타난다고 報告하고 있다. Wiegand 등²¹⁾은 flurazole을 처리한 옥수수에서 GST I-發現 mRNA의 水準이 약 4배 증가함을 報告하였다. 그러나 이러한 GST-發現

mRNA의 增加가 전사단계의 전반적인 活性化에 의한 것인지 단순히 mRNA의 半減期가 연장됨으로써 나타나는지 여부는 아직 밝혀져 있지 않다.

植物 生長調節物質 및 alkylating agent의 효과. 最近의 報告¹⁵⁾에 의하면, 담배 原形質體로부터 얻어진 auxin 調節 cDNA인 *par B*가 2, 4-D 존재하에서 216개의 아미노산으로 구성된 分子量 23,965의 蛋白質을 나타냄으로써 GST의 活性 增大를 유발한다고 하였다. 또한 *par B* cDNA의 塩基序列이 GST의 塩基序列과 일치하는 것으로 나타나 auxin에 의한 GST의 活性 增大를 확인해 주고 있다. 또다른 報告¹⁶⁾에서는 特定 除草劑 CDAA의 前處理에 의하여 이 除草劑의 不活性化에 관여하는 GST의 活性이 增大되었으며¹⁷⁾, atrazine이 오랜기간동안 사용된 地域에 발생한 抵抗性 雜草種에서도 atrazine에 대하여 特異性을 갖는 GST의 活性 增大가 나타났다⁸⁾. 이러한 研究結果들로부터 植物體 내에서 일어나는 metolachlor의 不活性化 反應에 대한 植物 生長調節物質의 役割과 metolachlor와 구조적으로 유사한 alkylating agent 등이 GST의 活性 增大를 유발할 가능성이 提示되었다. 이러한 假說을 토대로 metolachlor 不活性化 酵素인 GST의 活性 變化를 가져오는 關聯機作, 즉 plant hormone regulation 및 substrate induction에 根據하여 CPMI의 경우와 동일한 條件에서 수수의 韌葉部를 對象으로 GST[metolachlor]의 活性 變化를 調査하였다.

植物 生長調節物質과 alkylating agent에 의한 GSH 含量의 變化는 認定되지 않았다(표 2). GST[metolachlor]의 活性은 2,4-D과 metolachlor 處理時에 각각 2.1배, 3.4배씩 增加하였으나, ethylene과 ABA 및 metolachlor와 다른 構造의 alkylating agent인 2-iodoacetamide와 2-bromo-N-phenylacetamide에 있어서는 酵素의 活性을 抑制 또는 影響을 주지 않는 것으로 나타났다. 또한 GST [CDNB] 活性의 變化는 모든 處理에서 나타나지 않았다 (자료 제시 생략). 이 結果는 동시에 metolachlor의 前處理를 통하여 GST의 活性이 增加됨을 實驗적으로 立證해 주고 있다. 또한 GST[metolachlor] 活性은 植物 生長調節物質의 種類에 따라 特異적으로 發現되며, 化

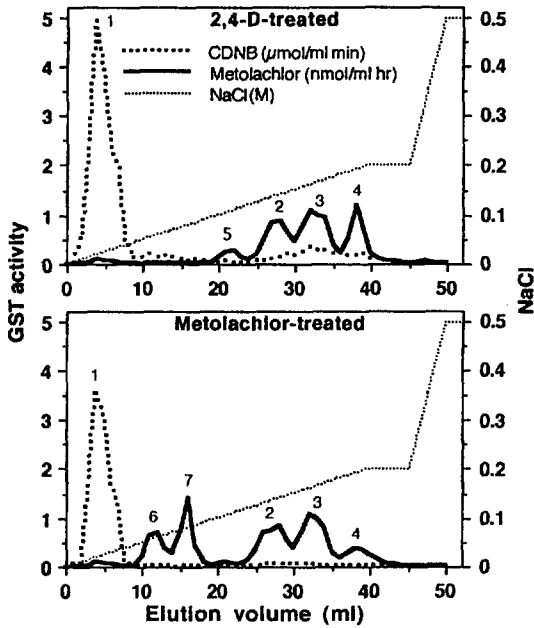


Fig 3. EPLC-anion exchange(Mono Q) chromatograph of GST activity in coleoptiles excised from 2, 4-D-and metolachlor-treated sorghum seedlings. Protein was eluted from the column with a gradient of NaCl. Each fraction was assayed for GST activity using CDNB and metolachlor as substrates.

합물들의 alkylation 活性的 差異에 따라서 GST 活性 變化에도 差異가 있는 것으로 나타났다.

2,4-D에 의한 GST[metolachlor] 活性 變化는 CPMI 處理의 경우와 동일한 NaCl 濃度 範圍에서 3개의 주요 活性피크(2, 3, 4)와 하나의 작은 피크(5)를 나타내는 樣相이었다(그림 3). 除草劑 metolachlor의 경우에는 이들 3개의 피크 이외에 2개의 높은 活性피크(6, 7)가 나타났다. 이는 植物生長調節物質과 對象 除草劑 自體에 의해서도 metolachlor에 特異性을 갖는 GST isozymes이 發現됨을 시사하는 結果이며, 또한 수수에 있어서 CPMI에 의한 GST[metolachlor]의 活性 增大가 auxin regulation 또는 substrate induction에 部分的으로 關聯되어 있음을 示唆하고 있다. 따라서 이후의 藥害輕

減劑의 開發에 있어서는 對象 除草劑의 類似 和合物 및 auxin 活性을 갖는 化合物들에 대한 우선적인 藥害輕減 活性的 調査가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 이 結果로부터 植物體內에서 CPMI가 GST 遺傳子의 活性化에 직접적으로 關與하거나 또는 蛋白質 合成課程중의 전사 단계등에 대하여 特異적으로 作用할 것으로 推定 된다. 한편, 추후에 CPMI에 의한 GST[metolachlor] 活性증대와 植物 生長調節物質이 어떠한 生化學的 機 作으로 關聯되어 있는지에 대한 研究가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 2. Effect of plant hormones and alkylating agents on glutathione content and glutathione S-transferase activity in coleoptiles of 3-day-old etiolated sorghum seedlings.

Treatment	GSH content (nmol g ⁻¹ fr wt)	GST activity ^{a)} (nmol GSH-metolachlor mg ⁻¹ fr wt h ⁻¹)
Untreated	1855a	4.07c
Plant hormones		
Auxin(2,4-D)	1419a	8.53b
Ethylene(Ethephone)	1831a	4.05c
Abscisic acid	1712a	4.22c
Alkylating agents		
Metolachlor	1871a	13.71a
2-Iodoacetamide	1595a	2.84a
2-Br-N-phenylacetamide	1720a	3.71c

a) Means followed by the same letter within a column are not significantly different at 5% level according to the LSD.

要 約

暗 條件에서 3日間 生育시킨 수수에 있어서 CPMI, 植物 生長調節物質 및 alkylating agent에 의한 GSH 含量 및 GST 活性的 變化를 調査하였다. 無處理 수수의 地 上部 抽出物에서 GST의 活性和 GSH의 含量이 根部에 비하여 높게 나타났다. CPMI로 處理한 수수에서 나타난

GSH의 分布 樣相은 전반적으로 無處理와 差異를 보이지 않았으나, 韌葉部에서 GST[metolachlor]의 活性이 無處理에 비하여 약 2.3배 증대되었다. 이러한 GST 活性의 增大는 metolachlor에 特異적으로 작용하는 GST isozyme의 發現에 기인하는 것으로 나타났다. 이어서 metolachlor 不活性化 酵素인 GST의 活性 變化를 가져오는 關聯機作, 즉 plant hormone regulation 및 substrate induction에 根據한 一連의 實驗을 實施하였다. GST [metolachlor]의 活性은 2,4-D 處理時에 약 2.1배 增加하였으나, ethylene과 ABA에 의한 變化는 나타나지 않았다. 또한 metolachlor는 이 除草劑에 特異성을 갖는 GST isozymes의 發現을 통하여 3.4배의 GST 活性 增加를 가져온 반면에, 기타 alkylating agent로 使用된 2-iodoacetamide와 2-bromo-N-phenylacetamide에 있어서는 GST의 活性을 抑制 또는 影響을 주지 않는 것으로 나타났다. 이상의 結果로 부터 수수에 있어서 CPMI에 의한 GST[metolachlor] 活性의 增大가 auxin regulation 또는 substrate induction에 部分的으로 關聯되어 있는 것으로 나타났다.

參考文獻

1. Ketchersid, M.L., Norton, K., and Merkle, M. G.(1981), Influence of soil moisture on the safening effect of CGA-43089 in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). Weed Sci. 29 : 281-287.
2. Vigor, P. R., Eberlein, C.V., and Fuerst, E.P. (1991). Influence of available soil water content, temperature, and CGA-154281 on metolachlor injury to corn. Weed Sci. 39 : 227-231.
3. Devlin, D. L., Moshier, L. J., Russ, O. G., and Stahlman, P.W.(1983). Antidotes reduce injury to grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.) from acetanilide herbicides. Weed Sci. 31 : 790-295.
4. Spontanski, R. F. and Burnside, O.C.(1973). Reducing herbicide injury to sorghum with crop protectants. Weed Sci. 21 : 531-536.
5. Winkle, M. E., Leavitt, R. C., and Burnside, O.C. (1980). Acetanilide-antidote combinations for weed control in corn(*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*). Weed Sci. 28 : 699-704.
6. Fuerst, E. P. and Gronwald, J.W.(1986). Introduction of metolachlor in sorghum(*Sorghum bicolor*) shoots by CGA-92194 and other antidotes. Weed Sci. 34 : 354-361.
7. Hatzios, K. K.(1984). Herbicide antidote : Development, chemistry, and mode of action. Adv. Agron. 36 : 265-316.
8. Anderson, M.P. and Gronwald, J.W.(1991). Atrazine resistance in a velvetleaf(*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced glutathione S-transferase activity. Plant Physiol. 96 : 104-109.
9. Lamoureux, G. L. and Rusness, D. G.(1986). Tridiphane[2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2, 2,2-trichloro-ethyl) oxirane] an atrazine synergist : Enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. Pestic. Biochem. Physiol. 26 : 323-342.
10. Dean, J. V., Gronwald, J. W., and Eberlein, C. V. (1990). Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. Plant Physiol. 92 : 467-473.
11. Dean, J. V., Gronwald, J. W., and Anderson, M.P. (1991). Glutathione S-transferase activity in nontreated and CGA-154281-treated maize shoots. N. Naturforsch. 46 : 850-855.
12. Gronwald, J.W.(1989). Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. In : Crop safeners for herbicides(K. K. Hatzios and R. E. Hoagland, ed). pp. 103-128. Academic Press.
13. Gronwald, J.W., Fuerst, E.P., Eberlein, C. V., and Egli, M. A.(1987). Effect of herbicide antidotes on glutathione content and glutathione S-transfe-

- rase activity of sorghum shoots.
Pestic. Biochem. Physiol. 29 : 66-76.
14. Mozer, T. J., Tiemeier, D. C., and Jaworski, E. G.(1983). Purification and characterization of corn glutathione S-transferase. Biochemistry. 22 : 1068-1072.
 15. Takahashi, Y. and Nagata, T.(1992). par B : An auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. Prpc. Natl. Acad. Sci. USA. 89 : 56-59.
 16. Stephenson, G. R., Ali, A., and Ashton, F. M. (1983). Influence of herbicides and antidotes on glutathione levels of maize seedlings. In : pesticide chemistry ; human welfare and the environment(J. Miyamoto and P.C. Kearny, ed). Vol.3. pp.219~224. Pergamon.
 17. Ezra, G., Rusness, D.G., Lamoureux, G.L., and Stephenson, G.R.(1985). The effect of CDAA(N, N-diallyl-2-chloroacetamide) pretreatments on subsequent CDAA injury to corn(*Zea mays* L.) Pestic. Biochem. Physiol. 23 : 108-115.
 18. Chun, J. C. and Ma, S.Y.(1994). Investigation of herbicide safeners and its mode of safening action. I. Effect of N-(4-chlorophenyl) maleimide on metolachlor absorption and metabolism. Korean J. Environ. Agric. 13(3) : 271-278.
 19. Gronwald, J. W., Anderson, R. N. and Yee, C. (1989). Atrazine resistance in a velvetleaf(*Abutilon theophrasti*) biotype due to enhanced atrazine detoxification. Pestic. Biochem. Physiol. 34 : 149-163.
 20. Lay, M. M. and Casida, J. E.(1976). Dichloroacetamide antidotes enhance thiocarbamate sulfoxide detoxification by elevating corn root glutathione content and glutathione S-transferase activity. Pestic. Biochem. Physiol. 6 : 442-456.
 21. Wiegand, R.C., Shah, D. M., Mozer, T.J., Harding, E.I., Diaz-Collier, J., Saunders, C., Jaworski, E. G., and Tiemeier, D.C.(1986). Messenger RNA encoding a glutathione S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. Plant Mol. Biol. 7 : 235-243.