

미나리의 중금속 흡수량 측정 및 중금속 결합단백질의 동정

박영일 · 김희근 · 김유영¹ · 김인수*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과, ¹생화학과

초록 : 중요한 환경문제로 대두되고 있는 중금속 오염의 대처 방안으로 식물을 이용한 경제적인 정화 방법을 모색하고자 미나리의 중금속 흡수능력을 검정하고 카드뮴 결합단백질을 동정하였다. 미나리의 중금속 흡수능력은 미나리를 카드뮴 (Cd^{2+}), 크롬 (Cr^{3+}) 및 납 (Pb^{2+})의 농도를 달리한 배양액에서 재배한 후 미나리에 잔류하는 중금속을 정량함으로써 측정되었다. 중금속의 처리 기간은 3일과 7일로 하였고, 생장 저해가 일어나는 농도까지 처리하였다. 카드뮴은 16.68 ppm, 크롬은 20 ppm까지 지속적으로 잔류량이 증가하였고 그 농도 이상에서는 생장 저해가 일어나면서 잔류량의 증가율이 둔화되었다. 식물체 부위별 카드뮴과 크롬의 잔류량은 뿌리에서 월등하게 높게 나타났고 줄기와 잎의 순으로 낮아졌다. 납의 경우는 카드뮴과 크롬에 비하여 잔류량이 가장 높은 뿌리에서 4배 정도 잔류량이 높게 나타났다. 20 ppm의 중금속 용액에서 7일간 재배한 미나리 뿌리에는 건조중량 1g에 대하여, 카드뮴이 6.1 mg, 크롬은 5.2 mg 그리고 납은 23.6 mg이 잔류하고 있었다. 이것은 잔류하고 있는 중금속 중에서 카드뮴은 80%, 크롬은 92% 그리고 납은 96% 이상이 미나리 뿌리에 잔류하고 있는 것이다. 20 ppm 카드뮴이 함유된 배양액에서 7일간 자란 미나리 뿌리 추출액을 Sephadex G-50과 DEAE-Cellulose 크로마토그래피를 수행하여, polyacrylamide gel 전기영동 상으로 단일 단백질 분리대의 중금속 결합단백질을 정제하였다. 이 단백질의 분자량은 gel filtration 상에서 약 5,000 Da이었고 아미노산의 조성을 보면 산성 아미노산이 27.3%, cystein이 9.9%로서 중금속 결합단백질의 특성을 가지고 있었다. 그러나 그 아미노산 조성은 지금까지 알려진 phytochelatin과는 다른 새로운 중금속 결합단백질로 나타났다.(1996년 8월 29일 접수, 1996년 10월 7일 수리)

서 론

중금속은 식물에서 효소의 보조인자로 사용되는 등 필수 원소로 사용되기도 하지만,¹⁾ 세포내에 일정한 농도 이상으로 존재하게 되면 식물의 생리대사를 저해한다. 카드뮴, 수은, 납, 구리와 같은 중금속 이온들은 뿌리를 통하여 식물에 흡수되고 줄기나 잎으로 이동하여, 효소나 구조 단백질에 결합함으로써 식물의 물질대사를 방해한다.²⁾ 그러므로, 식물은 이들 중금속의 흡수를 저해하거나, 흡수된 중금속을 세포 소기관에 격리 저장하거나, 중금속 결합물질에 결합시켜^{3,4)} 세포내의 중금속의 농도를 일정한 수준 이하로 유지하게 하는 기능을 가지고 있다.

이러한 기능 중 가장 대표적인 것은 중금속 결합단백질을 생합성하여 유리 중금속의 농도를 낮추는 것이다. 식물에서 가장 대표적인 중금속 결합단백질은 phytochelatin으로 카드뮴과 같은 중금속들에 의하여 합성이 유도되며, 이들 중금속과 높은 친화력을 가지고 결합한다.^{5,6)} 이것은 중금속의 대사와 축적 및 해독 작용에 관여하는 것으로 알려져 있는데, (γ -Glu-Cys) $_n$ -X의 일반적인 분자구조를 가지고 있고 Cys의 함량이 높은 것이 특징이다. n과 X는 phytochelatin이 분리되는 종에 따라 다르게 나타나는데,^{6,7)} 일반적으로 n은 2~8의 변이를 가지고 있으며, X는 Glu, Gly, Ala, Ser 등이 있는데 한개의 개체내에 여러가지가 존재하기도 하고, 생육조건에 따라서 변하기도 한다.⁸⁾ 또한 중금

속과 결합된 형태로 다른곳으로 이동, 저장되기도 한다.⁹⁾ Phytochelatin들은 고등식물과 조류 (algae)에 널리 분포되어 있으며, X (구성 아미노산)를 기준으로 6가지의 계열로 분류하기도 한다.¹⁰⁾ 중금속 결합단백질 중에서도 카드뮴 결합단백질이 가장 많이 연구되어 있는데, 이것은 Cd^{2+} 가 가장 효과적으로 이들 결합단백질의 합성을 유도하기 때문이다. 현재에도 새로운 종류의 중금속 결합단백질을 찾기 위한 노력이 계속되고 있고 이들 중금속 결합단백질의 분리뿐만 아니라 생리적인 기능, 식물체내 중금속의 격리 저장 등 식물의 방어 기작등도 밝혀지고 있다.¹⁰⁾ 이러한 연구 결과는 식물을 이용하여 중금속 오염지를 정화하거나, 이러한 목적에 효과적인 식물체를 육종하는데 이용되고 있다.¹¹⁾

미나리 (*Oenanthe stolonifera* DC.)는 습지나 물가에서 자라며 영양번식을 하는 다년초로서 생활 폐수가 유입되는 곳에서도 생육에 저해를 받지 않고 잘 자라므로, 중금속을 흡수·제거하는 기능이 있을 것으로 생각되고 있다. 실제로 미나리를 사인 인화 폐액으로부터 은을 회수하는데 이용한 바도 있으며,¹²⁾ 소규모 생활폐수의 정화시설에 사용하였다는 보고도 있었지만,¹³⁾ 미나리의 중금속 흡수에 대한 연구가 체계적으로 수행된 적은 없었다. 따라서 본 연구에서는 미나리의 중금속 흡수능력을 체계적으로 검정하고, 또한 미나리에서 중금속 결합물질을 분리 동정하여 그 특성을 규명하고자 하였다.

찾는말 : 미나리(*Oenanthe stolonifera* DC.), Phytochelatin, 중금속, 카드뮴, 크롬, 납
*연락처

재료 및 방법

시료 준비

미나리 (*Oenanthe stolonifera* DC.) 시료는 서울대학교 농업생명과학대 (경기도 수원시 소재)에서 계통 분류중인 보성 지방종을 사용하였다.¹⁴⁾ 미나리 재배지에서 자연 상태로 건강하게 자란 미나리 마디를 2 cm 크기로 잘라 질석이 담긴 묘판에 심고 25~28°C에서 형광등을 이용하여 16시간 명상태와 8시간 암상태의 주기로 재배하였다. 6~8주간 재배하여 길이가 14~18 cm인 개체를 선별하여 노화되거나 미숙한 잎을 제거하고 건전한 잎그루를 두개만 남겨 실험 재료로 사용하였다.

중금속 처리

재배한 미나리를 중금속 처리하기 전에 수경재배 배양액 (1 mM Ca(NO₃)₂, 6 mM KNO₃, 1 mM NH₄H₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄; pH 7)에서 3일간 키워,¹⁴⁾ 미나리가 토양재배 환경에서 수경재배 환경에 적응할 수 있게 하였다. 용기는 중금속의 흡착을 방지하기 위해 지름 9 cm, 깊이 12 cm의 경질 유리로 된 원통 용기를 사용하였다. 지름 10 cm의 스티로폼에 지름 1 cm 구멍을 뚫고 그 구멍에 스폰지를 사용하여 미나리를 고정시켰다. 이것을 스티로폼과 배양액이 직접 접촉되지 않도록 배양용기 위에 걸쳐 두고, 위에서와 같은 조건에서 재배하였다.

이와 같이 전처리된 미나리 시료를 다른 배양용기에 넣고 카드뮴 (Cd²⁺), 크롬 (Cr³⁺) 및 납 (Pb²⁺)의 농도와 처리 기간을 달리하여 같은 조건에서 배양하였다. 카드뮴과 크롬의 경우는 미나리의 생장 지해가 눈으로 관찰되는 농도인 33 ppm과 39 ppm까지 처리하였다. 납의 경우는 50 ppm까지 처리했고 배양액에서 NH₄H₂PO₄를 제외시켰다. 중금속 처리기간은 3일 또는 7일로 하였고 매일 배양액을 신선한 것으로 바꾸어 주었다.

시료 분석

중금속 처리가 끝난 미나리를 흐르는 수돗물에 3분간 세척하고 4°C의 5 mM CaCl₂로 30분 간격으로 3회 세척하여 표면에 흡착된 중금속을 제거하였다. 이 시료를 뿌리, 줄기 및 잎으로 나누어 105°C 건조기에서 24시간 건조시켰다. 이것 중 100 mg을 50 ml 삼각 플라스크에 옮겨 65% HNO₃과 70% HClO₄를 각각 2.5 ml씩 가한 뒤 300°C에서 15분간 끓여 유기물을 분해하였다. 이 가수분해액을 탈이온화된 증류수를 사용하여 10 ml로 만든 뒤 Toyo 5C 여과지로 여과하여 유도결합 플라즈마 분광기 [ICP: Inductively Coupled Plasma Emission Spectrophotometer, JY 38 plus (France) model, Wave=214.438]로 시료 내의 중금속 함량을 측정하였다.

카드뮴 결합단백질의 추출 및 크로마토그래피

20 ppm Cd²⁺가 들어있는 배양액에서 7일간 자란 미나리의 뿌리를 채취하여 위와 같이 세척하였다. 뿌리 10 g에 추

출 완충액 [50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM β-mercaptoethanol] 10 ml를 넣어 4°C에서 추출하여 15,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 2겹의 miracloth로 여과하였다. 이 여과액을 Tris 완충용액 [20 mM Tris (pH 7.5), 10 mM KCl, 2 mM β-mercaptoethanol]으로 평형시킨 Sephadex G-50 칼럼 (2×95 cm)을 사용하여 젤여과 크로마토그래피를 수행했다. 이들 분획의 250 nm 흡광도와 카드뮴 함량을 동시에 측정하여 카드뮴 결합단백질을 동정하였다. 카드뮴 결합단백질이 있는 분획을 모아서 DEAE-Cellulose 칼럼 (1.8×3 cm)으로 이온 교환 크로마토그래피를 수행했다. 칼럼 부피의 10배의 Tris 완충용액을 사용하여 세척하여 준 뒤 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M 및 1 M NaCl이 포함된 Tris 완충액으로 단계별 용출을 하였고, 여기서 나온 분획들을 250 nm 흡광도와 카드뮴 함량을 동시에 측정했다.

Polyacrylamide gel 전기영동 (PAGE)

크로마토그래피의 각 분획은 비변성 polyacrylamide gel 전기영동¹⁵⁾을 수행하고 분리된 단백질의 카드뮴 함량을 측정하여 gel 상에서 카드뮴 결합단백질을 동정하였다. 즉 8% polyacrylamide gel을 사용하여 10 mA에서 3시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 0.042% Coomassie brilliant blue 용액으로 단백질 염색을 한 후에 1 cm 간격으로 절단하였다. 이 gel 조각에 65% HNO₃을 1 ml 넣고 30분간 중탕하여 가수분해하였다. 이 용액에 탈이온화된 증류수를 넣어 10 ml로 만든 뒤 Toyo 5C 여과지로 여과한 후 앞에서 언급한 바와 같이 유도결합 플라즈마 분광기로 카드뮴의 함량을 측정하였다.

아미노산 조성 분석

전기영동상에서 단일 단백질 분리대를 나타내는 DEAE-cellulose 크로마토그래피의 0.1 M NaCl 분획의 아미노산 조성을 분석하였다. Tris 완충용액을 탈이온화된 물로 치환한 시료에 6 N HCl을 넣고 110°C에서 24시간 가수분해한 후에 Waters HPLC system (510 HPLC pump, 717 automatic pump, 996 photodiode array detector and Millennium 2010 chromatography manager)을 사용해서 Pico-Tag 방법으로 분석하였다 (기초과학 지원 연구소에 분석 의뢰).

결과 및 고찰

식물체 부위별 중금속의 잔류량

CdCl₂의 농도를 0~33.27 ppm까지 8 단계로 증가시킨 배양액에서 3일과 7일간 재배한 미나리의 카드뮴 함량을 분석하였다. 배양기간에 관계없이 배양액의 Cd²⁺ 농도가 16.68 ppm까지는 처리농도에 비례하여 미나리의 카드뮴 잔류량이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 증가 속도가 둔화되었다 (Fig. 1-A). 7일간 처리한 미나리의 카드뮴 함량은 3일간 처리하였을 때 비하여 흡수량은 평균적으로 약 1.5배 증가하였

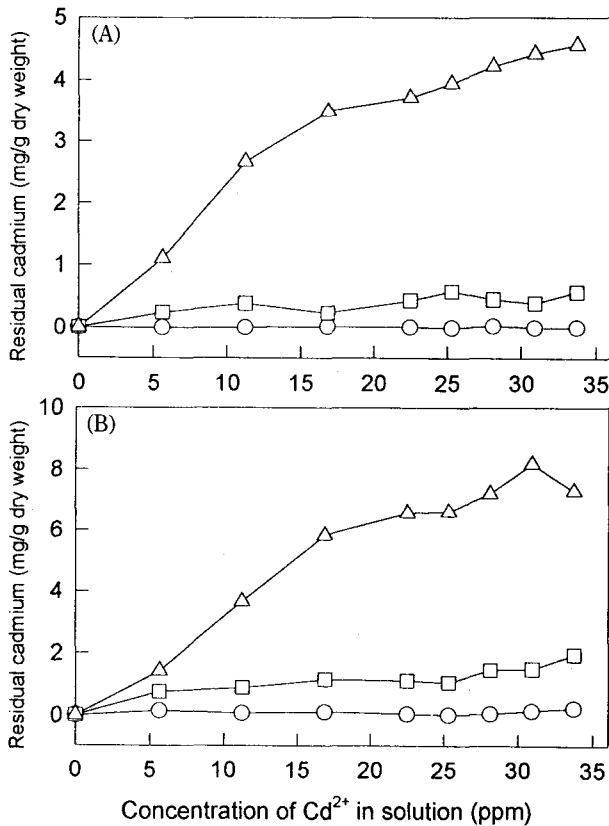


Fig. 1. Residual cadmium in roots (Δ - Δ), stems (\square - \square) and leaves (\circ - \circ) of water dropworts grown at different concentrations of Cd^{2+} for 3 days (A) and 7 days (B). Water dropworts grown on a nutrient solution [1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6 mM KNO_3 , 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 mM MgSO_4 , pH 7.0] for 3 days were transferred to the same nutrient solution containing different concentrations of Cd^{2+} and incubated at 25–27°C for 3 or 7 days before harvest.

다 (Fig. 1-B). 이러한 결과는 미나리가 3일이 지난 후에도 상당량의 카드뮴을 계속하여 흡수할 수 있음을 나타낸다. 또한 3일과 7일의 흡수량을 살펴보았을 때 저농도인 5.62 ppm에서는 건조 중량 1 g당 각각 1.11 mg과 1.44 mg, 흡수율이 감소되기 시작하는 농도인 16.68 ppm에서는 각각 3.7 mg과 6.5 mg 그리고 흡수율이 둔화된 농도인 28.1 ppm에서는 4.23 mg과 7.21 mg을 흡수하였다. 이 결과에 근거하여 카드뮴의 흡수속도를 환산하면 3일간의 경우는 1 mg/day이었고, 3일 이후 4일간의 경우는 0.51 mg/day이었다. 이것으로 보아 처리기간이 길어질수록 시간당 흡수속도는 감소됨을 알 수 있었다. 미나리 각 부위별 카드뮴 잔류량을 살펴보면 80% 이상의 카드뮴이 뿌리에 잔류하고 있었고 줄기와 잎에 각각 16%, 4%씩 잔류하고 있었다. 이 결과는 흡수된 카드뮴이 일차적으로 뿌리에서 저장되어 줄기와 잎으로 이동되는 것을 막는 것으로 보인다. 한편 7일간 Cd^{2+} 을 처리한 경우에는 줄기와 잎에서 카드뮴 함량이 증가하고 있는 것으로 보아서 뿌리에서 장기간 저장되면 일부가 줄기와 잎으로 이동하는 것으로 보인다. 이것으로 보아 미나리 뿌리에 카드뮴을 저장하는 기구가 있음을 알 수 있었다.

카드뮴을 처리할 때와 같은 방법으로 CrCl_3 이 든 배양액

Table 1. Residual chromium in roots, stems and leave of water dropworts grown at different concentrations of Cr^{3+} for 3 and 7 days. Samples were treated as described in Fig. 1 except incubation with Cr^{3+} .

Cr^{3+} (ppm)	day		3 days			7 days		
	organ		(mg Cr^{3+} /g D.W. ¹⁾)			(mg Cr^{3+} /g D.W.)		
			leaf	stem	root	leaf	stem	root
0			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5.2			0.02	0.15	1.17	0.00	0.19	3.05
10.4			0.01	0.29	3.12	0.00	0.29	4.36
15.6			0.00	0.34	3.77	0.01	0.50	6.19
20.8			0.04	0.47	5.25	0.04	0.37	7.35
26.0			0.01	0.65	5.33	0.00	0.47	7.96
31.8			0.05	0.68	6.23	0.05	0.34	8.65
36.4			0.03	0.59	7.60	0.10	0.48	7.15
39.0			0.02	0.69	8.50	0.10	0.40	6.44

¹⁾dry weight

에서 미나리를 3일간, 7일간 키운 뒤 미나리 부위별 크롬의 잔류량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 카드뮴의 경우와 유사하게 7일간 Cr^{3+} 를 처리한 시료의 흡수량은 20 ppm까지 급격하게 증가하였고 그 이상의 농도에서 39 ppm까지는 완만하게 증가하거나 감소하였다. 5 ppm 부근에서는 7일간 배양한 미나리 뿌리의 경우 3일에 비하여 3배 이상 증가하는 것으로 보아서 5 ppm 정도의 농도에서는 흡수기작이 활성화되는데 시간이 필요한 것으로 보인다. 또한 농도가 15 ppm까지는 시간이 경과함에 따라서 흡수가 계속 증가하였다. 20 ppm 이상의 Cr^{3+} 이 가해졌을 때 3일과 7일 사이의 흡수량이 크게 증가하지 않는 것으로 보아서 처리한 Cr^{3+} 의 농도가 높아지면 크롬의 흡수가 매우 빠른 것을 보여준다. 3일간 배양한 경우에는 39 ppm까지 흡수량이 계속 증가하였으나 7일의 경우에는 32 ppm까지는 흡수량이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 뿌리의 흡수량이 감소하고 그 대신 줄기와 잎에서 잔류량이 증가함과 동시에 미나리의 생장 저해가 나타났다. 이것은 카드뮴의 경우와 같이 뿌리에 저장된 크롬이 일정한 시간이 지나면 생장 저해가 일어나고 동시에 중금속이 이동하는 것으로 보인다. 식물체 부위별 크롬의 잔류량은 뿌리에 92% 정도가 잔류했고 줄기와 잎에 각각 7%, 1% 정도가 잔류하고 있었다.

또한 미나리를 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 의 농도를 달리한 배양액에서 7일간 재배하여 미나리의 각 부위별 납의 잔류량을 정량한 결과는 Table 2와 같다. 배양액의 Pb^{2+} 농도가 4 ppm 이상에서 Pb^{2+} 의 흡수가 급격하게 증가하기 시작하여 50 ppm까지 농도에 비례하여 증가하였다. 이것은 카드뮴이나 크롬에 비해 5배 이상 흡수량이 증가한 것이다. 미나리에 잔류하는 납의 96% 이상이 뿌리에 잔류하고 있었고 줄기와 잎에 각각 3.6%, 0.4%가 잔류하고 있어 납도 대부분이 뿌리에 잔류하고 있는 것으로 나타났다. 같은 조건하에서 납이 카드뮴이나 크롬에 비해 훨씬 많이 흡수되었고 또한 뿌리에 잔류하고 있는 비율도 상대적으로 높았다. 따라서 미나리에 납을 저장하는 특별한 수단이 뿌리조직에 있는 것으로 나타났다. 본 실험에서는 미나리 뿌리에서 납 결합단백질을

Table 2. Residual lead in roots, stems and leaves of water dropworts grown at different concentrations of Pb²⁺ for 7 days. Samples were treated as described in Fig. 1 except incubation with Pb²⁺.

Pb ²⁺ (ppm)	organ	leaf	stem	root
		(mg Pb ²⁺ /g D.W. ¹⁾)	(mg Pb ²⁺ /g D.W.)	(mg Pb ²⁺ /g D.W.)
0.0		0.00	0.00	0.00
0.5		0.00	0.00	0.12
1.0		0.00	0.01	0.16
2.0		0.00	0.02	0.39
4.0		0.00	0.11	5.47
10.0		0.00	0.67	14.60
20.0		0.00	0.80	23.60
30.0		0.00	0.93	32.60
50.0		0.01	1.12	40.80

¹⁾dry weight

동정할 수는 없었다.

미나리의 중금속 흡수율을 다른 식물체들과 비교해 보았을 때 주어진 조건의 차이를 감안하더라도 훨씬 높은 농도임을 알 수 있다. 정병연 등은,¹⁶⁾ Cd²⁺과 Pb²⁺이 오염된 토양(상주 다덕광산)에서 자라고 있는 참억새 (*Miscanthus sinensis*)와 등심초 (*Juncus alatus*)의 중금속 잔류량을 보고하였다. 카드뮴의 경우에 6.44 ppm이 오염된 토양에서 참억새에는 4.44 ppm, 등심초에는 8.64 ppm이 잔류하고 있었고 납의 경우는 오염지의 잔류량이 4619 ppm일때 각각 15.8 ppm, 19.4 ppm이 잔류하고 있었다. 이에 비해 미나리는 5.6 ppm Cd²⁺ 용액에서 7일간 배양할 때 뿌리에 1440 ppm의 카드뮴이 잔류하고 있었고, 납의 경우 4 ppm이 든 배양액에서 7일간 배양하였을 때 4570 ppm이 뿌리에 잔류하고 있었다. 이와같이 큰 차이를 보이는 가장 큰 이유는 대부분의 중금속이 잔류하고 있는 미나리의 뿌리 부분의 카드뮴과 납의 잔류량을 참억새와 등심초의 전체 식물체내의 중금속 잔류량을 비교하는 데 있다. 그리고 또 다른 큰 차이는 미나리의 경우는 한가지 중금속을 첨가한 수경재배 배양액에서 재배하여 한 종류에 대한 중금속의 흡수량이나, 참억새와 등심초의 경우는 토양재배 상태에서 여러 중금속이 함께 흡수되었다는 것이다. 이러한 차이를 고려하더라도 미나리의 중금속 흡수량은 다른 식물체에 비하여 월등하게 높은 것이었다. 카드뮴의 경우 참억새와 등심초에 비해 미나리 뿌리가 150~300배의 높은 중금속 흡수량을 나타냈고, 납의 경우에는 1/1000 처리농도에서 200배 이상의 높은 잔류량을 보이고 있다. 이는 미나리가 Pb²⁺에 대한 특별한 흡수기작을 가지고 있음을 의미한다.

식물의 각 부위별 중금속 흡수량을 옥수수(*Zea mays* L., Hybrid PAG SX-111)와 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. John Baer)를 재료로 하여 조사한 결과 일반적으로 식물에서는 뿌리에 중금속 잔류량이 높은 것으로 나타나고 있다.¹⁷⁾ 0.67 ppm Cd²⁺ 용액에서 7일간 배양할 경우에 옥수수 뿌리에는 53 ppm의 카드뮴이 잔류하였고, 0.34 ppm Cd²⁺ 용액에서 7일간 재배한 토마토 뿌리에는 92.88 ppm의 카드뮴이 잔류하고 있었다.¹⁷⁾ 이것은 식물체에 흡수된 카드뮴 중에서 옥수수 뿌리에는 47%, 토마토 뿌리에는

72%가 잔류하고 있음을 의미한다. 미나리의 뿌리에는 약 85%의 카드뮴이 잔류하고 있어서 뿌리의 잔류량이 다른 식물체보다 높은 것으로 보인다. 또한 배양시간의 변화에 따른 카드뮴의 이동을 조사한 결과, 옥수수 뿌리의 카드뮴 잔류량이 3일째의 70%에서 7일째는 45%로 감소되었다.¹⁷⁾ 이에 비하여 미나리 뿌리의 Cd²⁺ 잔류 비율은 배양시간이 경과하여도 약 80%로 큰 변화를 보이지 않았다. 또한 30 ppm Cd²⁺이 들어있는 배양액에서 7일간 키운 뒤 Cd²⁺이 없는 배양액에서 14일간 키운 미나리의 카드뮴의 함량을 식물체 부위별로 측정된 결과 이 기간동안에 뿌리에서 줄기나 잎으로 카드뮴이 이동하지 않았다. 그리고 식물체의 같은 부위에서도 상층부보다 뿌리에 가까운 하층부 쪽이 중금속의 잔류량이 높았다. Cd²⁺이 포함된 배양용액에서 7일간 재배한 후 Cd²⁺이 없는 배양액에서 14일간 재배하여도 미나리 각 부위별 카드뮴의 잔류량이 변화하지 않는 것으로 보아 미나리의 축적된 카드뮴은 밖으로 배출되지 않는 것으로 보인다. 이상의 결과는 미나리가 다른 식물체들에 비하여 중금속을 제거하는 데 매우 효율적인 식물로 나타나고 있으며, 특히 Pb²⁺의 제거에 아주 효과적인 식물체임을 알 수 있었다.

카드뮴 결합단백질의 분리

20 ppm Cd²⁺이 들어있는 배양액에서 7일간 재배한 미나리 뿌리를 Tris완충액으로 추출하여 Sephadex G-50 칼럼에 크로마토그래피 한 결과는 Fig. 2와 같다. 뿌리의 추출액은 3개의 분리대로 분리되었으며, 각 분획의 카드뮴 함량을 정량한 결과 중간 분리대 (Kav=0.652)가 250 nm의 흡광도는 상대적으로 낮았지만 약 85%의 카드뮴이 이곳에서 유출되었다. 대조구로써 Cd²⁺을 넣지 않은 배양액에서 키운 미나리의 뿌리 추출액에 Cd²⁺의 최종 농도가 50 ppm이 되게 혼합한 뒤, 4°C에서 10시간 방치한 후 Sephadex G-50 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과 Cd²⁺을 넣고 배양한 시료에서 있었던 중간 분리대는 나타나지 않았고 뿌리추출물과 혼합하였던 대부분의 Cd²⁺은 마지막 분리대에서 유리 Cd²⁺로 유출되었다.

Sephadex G-50 크로마토그래피의 분획 중 카드뮴을 결합하고 있는 분획 (fraction no. 40-53)을 모아 DEAE-cellulose 크로마토그래피를 수행한 결과는 Fig. 3과 같다. 카드뮴 결합단백질은 0.1~0.4 M NaCl의 모든 용출액에서 나타나고 있지만 0.1 M NaCl 용출액에서 60% 이상의 Cd²⁺이 용출되었고 염농도가 증가할수록 카드뮴이 감소되었다. DEAE-cellulose 크로마토그래피의 각 분획을 8% 비변성 polyacrylamide gel로 전기영동한 결과 0.1, 0.2, 0.3 그리고 0.4 M NaCl 분획에서 다 같이 전기영동상의 bromophenol blue와 같은 위치에서 단일 단백질 분리대로 나타났다. 이 단백질 분리대의 카드뮴 함량을 측정하여 본 결과, 0.1 M NaCl 분획의 경우 전기영동 gel에 넣은 카드뮴의 95% 이상인 0.134 ppm의 카드뮴이 단백질 분리대와 결합하고 있었다 (Fig. 4). 한편 Cd²⁺과 전기영동 완충액의 혼합액을 전기영동하였을 때는 gel에서 카드뮴을 검출할 수 없었다.

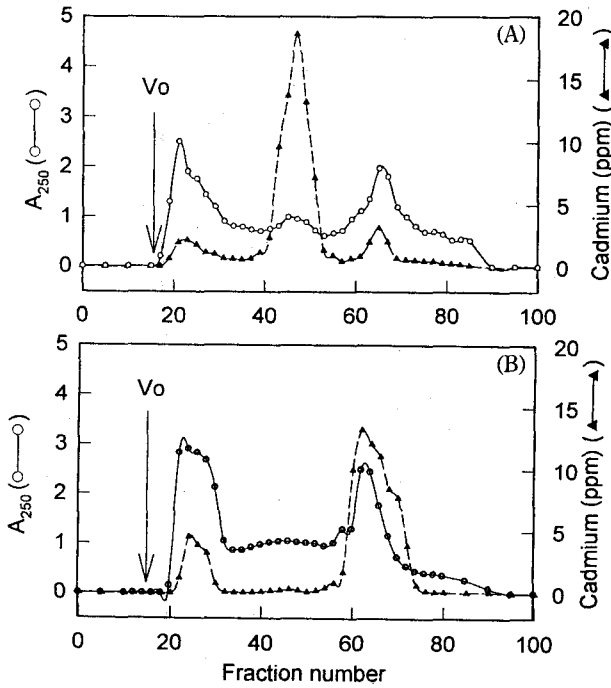


Fig. 2. Elution profiles of Sephadex G-50 gel filtration for the root extracts of water dropworts that were grown for 7 days in the presence (A) or the absence (B) of 20 ppm Cd^{2+} . The extract of sample grown in the absence of Cd^{2+} was mixed with Cd^{2+} to a final concentration of 50 ppm before gel filtration. The column size was 2.5×85 cm and 16 ml of the extracts were applied. Flow rate was 15 ml/h and fraction volume of 5.4 ml was collected.

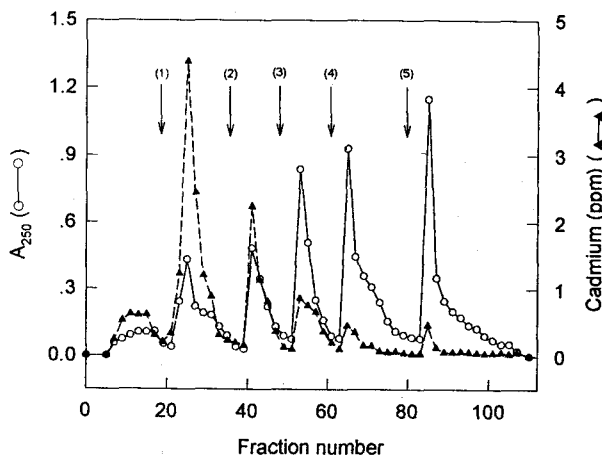


Fig. 3. Elution profile of DEAE-cellulose column chromatography of the Sephadex G-50 active fractions (fraction no. 40~55 in Fig. 2). The column (1.8×3 cm) was equilibrated with a Tris buffer (20 mM Tris, 10 mM KCl, 2 mM β -mercaptoethanol, pH 7.5) and eluted with the same buffer containing 0.1 M (1), 0.2 M (2), 0.3 M (3), 0.4 M (4) and 1 M (5) NaCl. Flow rate was 25 ml/h and fraction volume of 1 ml was collected.

Sephadex G-50 gel filtration을 수행하였을 때 카드뮴 결합 단백질은 $K_{av}=0.65$ 에서 유출되었고 이를 기준으로 하여 분자량을 측정된 결과 약 5,000 Da이었다. 그러나 SDS gel 전기영동으로 분자량을 측정된 결과는 3,700 Da 이하로 나타났었는데 이는 분자의 아미노산 조성 성분중 음전하를

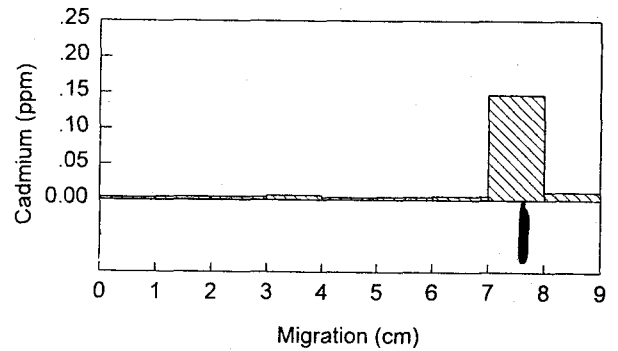


Fig. 4. Identification of cadmium binding protein on a polyacrylamide gel. The active fraction of DEAE-cellulose column containing 0.2 ppm Cd^{2+} was electrophoresed on a 8% polyacrylamide gel. The gel was dissected into 1 cm long and assayed for cadmium content.

띠고 있는 Asp와 Glu의 비율이 약 30%를 차지함으로써 단백질의 이동도가 크게 되어 상대적으로 분자량이 작게 나타나는 것으로 보인다. Phytochelatin의 경우 고분자 복합체와 저분자 복합체로 나누어 지는데,¹⁰⁾ gel filtration 상에서의 분자량은 이온강도에 따라서 3,600~8,000으로 다양하게 나타나고 있는 것으로 보아서, 미나리의 카드뮴 결합 단백질도 이와 유사한 분자량을 가지는 것으로 보인다.

미나리 뿌리는 납을 다량으로 함유하고 있으나 납과 결합하는 물질을 동정할 수 없었다. 즉 40 ppm Pb^{2+} 에 노출된 시료를 Cd^{2+} 을 처리한 시료에서와 같은 방법을 써서 Sephadex G-50으로 분리하였을 때 납과 결합하는 단백질 분획은 동정되지 않았고 그 대신 유리 납이 유출되는 칼럼 끝 부분의 용출액에서 납이 유출되었다. 이 납을 포함하고 있는 분획을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분리를 시도했으나 대부분의 납이 칼럼에 결합하지 않은 분획에서 관찰되었다. 칼럼에 결합하지 않은 분획을 Tris완충액에 투석 한계가 3,000인 투석용 튜브를 사용하여 투석하면 납을 제거할 수 있는 것으로 보아 납은 특정 물질과 결합한 형태가 아닌 유리형태로 존재하는 것으로 나타났다. 95% 이상의 납이 잔류하고 있고 다른 조직으로 이동도 되지 않는 미나리 뿌리에서 납 결합단백질을 동정할 수 없었다는 것은 미나리의 납 해독작용이 카드뮴 해독작용과는 다른 기작에 의하여 이루어질 것으로 생각된다.

DEAE-cellulose 크로마토그래피의 분획 중에서 카드뮴을 가장 많이 결합하고 있는 0.1 M NaCl 유출액은 전기영동 상에서 단일 단백질 분리대로 나타남으로, 이것의 아미노산 조성을 분석하였다 (Table 3). 이것은 다른 고등 식물에서 분리된 중금속 결합단백질로 알려진 phytochelatin의 아미노산 조성²³⁾과 다르게 나타났다. Table 3에서 보듯이 양배추 잎의 phytochelatin은 Glu-Gln이 27%, Cys이 20% 그리고 Gly은 10%로 구성되어 있다. 이와 같이 Glu-Gln과 Cys의 함량이 높은 것은 phytochelatin의 (-Glu-Cys)_n-X의 구성에서 나타나는 아미노산 구성의 특성이다. 본 연구에서 분리된 카드뮴 결합단백질은 산성 아미노산인 Asp-Asn이 16.6%, Glu-Gln은 10.7%를 차지하고 있어서 이들 아미노산의 합이 phytochelatin의 산성 아미노산인 Glu-Gln의 함

Table 3. A comparison of amino acid composition of cadmium binding protein from water dropwort root with those of the cadmium binding protein from cabbage leaf and the copper binding protein from agrostis root. (residue % of each amino acid)

Amino acid residue	Sample Dropwort Root	Cabbage Leaf ¹⁾	Agrostis Root ¹⁾
Lys	9.9	2.3	3.3
His	2.2	5.3	0.8
Arg	0.5	1.5	1.6
Asp-Asn	16.6	4.4	10.0
Thr	5.5	1.9	2.9
Ser	8.3	2.3	8.2
Glu-Gln	10.7	27.4	19.0
Pro	11.0	14.0	5.8
Gly	6.4	9.6	12.0
Ala	3.7	2.3	6.0
Cys	9.9	20.0	18.0
Val	3.3	2.6	4.2
Met	0	1.5	0.7
Ile	2.6	1.6	1.5
Leu	5.7	1.9	3.6
Tyr	0	0.8	0.6
Phe	3.5	0.7	1.5
Trp	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.

¹⁾Reference 17) ²⁾Not determind

량과 유사하지만 Cys의 함량은 phytochelatin의 절반에 불과하였다. 한편 다른 중금속 결합단백질에 비하여 Thr 및 Ser의 함량은 약 3배가 높았고 Lys의 함량은 2배 정도가 높은 특징을 가지고 있었다. 이러한 아미노산 조성의 결과와 카드뮴과 납에 대한 서로 다른 결합 특성으로 보아서 미나리 뿌리에서 동정된 카드뮴 결합단백질은 지금까지 알려진 중금속 결합단백질과는 성질이 다른 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 '95 대산 농촌 문화재단 연구비 지원으로 수행된 연구 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Thornalley, P. J. and M. Vasak (1985) Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress: Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem. Biophys. Acta.* **827**, 36-44.
2. Jarvis, S. C., L. H.P. Joser and M. D. Hopper (1976) Cd uptake from solution by plants and its transport from

- roots to shoots. *Plant Soil* **44**, 179-191.
3. Mitra, R. S., R. H. Gray, B. Chin and I. A. Bernstein (1975) Molecular mechanism of accommodation in *E. coli* to toxic levels of Cd²⁺. *J. Bacteriol.* **121**, 1180-1188.
4. Tomsett, A. B. and D. A. Thurman (1988) Molecular biology of metal tolerances in plants. *Plant Cell Environ.* **11**, 383-394.
5. Grill, E., E-L. Winnacker and M. H. Zenk (1987) Phytochelatin, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 439-443.
6. Stettens, J. C., D. F. Hunt and B. G. Williams (1986) Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (γ -glutamyl-cysteinyl)n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* **261**, 13879-13882.
7. Grill, E., E. L Winnacker and M. H. Zenk (1985) Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* **230**, 674-676.
8. Meuwly, P., P. A. Thibault, L. Schwan and W. E. Rauser (1995) 3 families of thiolpeptides are induced by cadmium in Maize. *Plant J.* **7**, 397-400.
9. Ortiz, D. F., T. Ruscitti, K. F. Mccue and D. W. Ow (1995) Transport of metal-binding peptides by Hmt1, a fission yeast ABS-Type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 4721-4728.
10. Rauser, W. E. (1995) Phytochelatin and related peptides. *Plant Physiol.* **109**, 1141-1149.
11. Anne, S. M. (1995) Plants proving their worth in Toxic metal cleanup. *Science* **269**, 302-303.
12. Dai Quanyin, Yuangao Chen, Wanping Thou, Yaoji Gao, Heng Zang and Yu Pi (1992) Studies on the purification of silver-containing waste water and the reclamation of silver by *Eichhornia crassipes*. *Chin. Sci. Bull.* **37**, 1028-1032.
13. 須藤隆一 (1993) 업종별 소규모 배수처리에 대한 기술-생활 배수 처리시설. *첨단환경기술* **12**, 93-97.
14. 안우범, 이병일 (1991) 미나리의 수경재배체계 개발에 관한 기초연구. 배양액중의 다량요소 조성. *한국 원예학회지* **32**, 425-433.
15. Hames B. D. and D. Rickwood (1990) In 'Gel electrophoresis of protein' Hames, B. D. 2nd Ed., Chap 1, Oxford university press, Oxford, England.
16. 정병연, 이항교, 박하주, 이정자, 정상번, 김영봉 (1990) 잡초를 이용한 중금속 오염지 환경개선. *경상북도 보건 환경 연구소 연보.* **3**, 185-192.
17. Rauser, W. E. (1986) The amount of cadmium associated with Cd-binding protein in roots of *Agrostis Gigantea*, maize and tomato. *Plant Science.* **43**, 85-91.

Uptake of Heavy Metal Ions by Water Dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC.) and Identification of Its Heavy Metal-Binding Protein

Young-Il Park, Hee-Guen Kim, Yoo-Young Kim¹ and In-Soo Kim* (*Department of Genetic Engineering, ¹Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea*)

Abstract : Uptake of heavy metal ions by water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC.) and its cadmium-binding protein were studied to probe for good method to remove heavy metal contaminants from environments. The plant was cultured in the culture medium (pH 7.0) containing the various concentrations of Cd²⁺, Cr³⁺ or Pb²⁺ for 3 and 7 days. The residual heavy metals deposited in roots linearly increased as the metal ions concentration increased up to 17 ppm for Cd²⁺, 20 ppm for Cr³⁺ and 50 ppm for Pb²⁺. Above these concentrations, the plant growth was inhibited and the uptake rates of the metal ions decreased. The heavy metals absorbed by the plant were mostly deposited in roots. In particular, the residual concentration of lead in roots was about four times higher than those of cadmium and chromium. When cultured in the medium containing 20 ppm of each metal ion, 80% of cadmium, 90% of chromium and 96% of lead were deposited in roots out of the total residual metal ions in the plant. These values correspond to 6.1 mg of cadmium, 5.2 mg of chromium and 23.6 mg of lead per one gram of roots tissue on a dry weight basis. A cadmium-binding protein was partially purified by extraction, gel filtration and DEAE-Cellulose chromatography from water dropworts that was grown in the medium containing 20 ppm Cd²⁺. The purified protein was a single band on SDS- and non-denaturing- polyacrylamide gel electrophoresis. Its molecular mass was estimated to be *ca.* 5,000 dalton by gel filtration. Analysis of amino acid composition of the protein indicated that it had a typical amino acid composition of heavy metal-binding protein in that it contained 27% of acidic amino acids and 9.9% of cysteine. However, it is likely that the protein is a new plant metal-binding protein, since its amino acid composition is somewhat different from those of phytochelatins that have been known so far.

*Corresponding author