

봄무우 유식물에서 카드뮴 운반체와 Proline 농도 변화의 분석

박선영* · 박면용* · 조봉희†
수원대학교 자연과학대학 생물학과
*전국대학교 이과대학 화학과
(1996. 2. 15. 접수)

Analysis of the Transport System of Cadmium and the Change of Proline Content in Spring Radish Young Plant

Sun Young Park*, Myon-Yong Park*, Bong-Heuy Cho†
*Department of Biology, University of Suwon, Suwon 455-743, Korea
Department of Chemistry, University of Kon-Kuk, Seoul 133-701
(Received Feb. 15, 1996)

요약 : 봄무우 유식물에서 Cd^{2+} 은 자엽, 줄기와 뿌리에서 그의 독특한 운반자를 통해서 세포 내로 수송되었다. Cd^{2+} 의 수송은 대사 방해물질인 DNP에 의해 방해되었다. Cd^{2+} 의 운반자에 대한 K_m 값은 자엽은 0.77ppm, 줄기는 1.72ppm, 뿌리는 0.33ppm이고, V_{max} 는 자엽에서 $400\text{ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$, 줄기에서는 $313\text{ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$, 뿌리에서는 $606\text{ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ 이다. 봄무우 유식물에서 Cd^{2+} 은 세포내에 proline의 축적을 유도시키지 못했다. 그러므로 세포내에 proline의 축적을 환경오염의 척도로 사용할 수 없다.

Abstract : Cadmium was transported through the special carrier system into the cells of cotyledons, hypocotyls, and roots spring radish young plants. The transport of cadmium was inhibited by metabolic inhibitor, like DNP. The K_m values for cadmium were 0.7 ppm for cotyledons, 1.72 ppm for hypocotyls, and 0.3 ppm for roots, and V_{max} for cadmium was $40\text{ ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ for cotyledons, $313\text{ ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ for hypocotyls, and $606\text{ ppm} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ for roots. Cadmium cannot prove to be inducer for proline accumulation. Therefore, proline accumulation cannot be used as a marker to test the level of heavy metal pollution.

Key words : proline, cadmium, spring radish

1. 서론

환경오염에 대한 심각성이 커짐에 따라 식물체가 중금속에 의하여 받는 피해와 식물체내에서 변화하는 여러 반응에 관한 연구는 증가되는 추세에 있다. 천연토

양과 농토에 오염되어 있는 중금속의 독성 정도는 채광, 금속용해과정, 제조공정, 농업적, 그리고 쓰레기처리기술에 따라 좌우된다.¹

물에 용해된 중금속은 뿌리를 통해서 쉽게 흡수된 후 식물의 다른 기관으로 운반되어 식물생장을 방해하

거나 감소시키는 원인이 된다.² 즉 이 방해는 일반적인 생체내의 대사과 발생과정, 그리고 다양한 광합성작용을 담당하는 필수적인 많은 효소들을 방해^{3,4}하는 원인이 되고, 식물에 있는 여러 펩티드와 결합하는 화학반응을 방해한다⁴는 보고가 있었다.

중금속에 대한 식물체의 다양한 변화에 대한 지금까지의 결과를 Steffens⁵은 최근 논문에서 재정리하여 중금속 오염에 대한 심각성을 인식시켜 주었다. 이러한 중금속 자극에 대한 효과와 영향에 관한 논문들이 많으나, 생체내에서 일어나는 많은 현상들을 확실하게 이해할 수 없고, 중금속들의 작용기전에 관하여 잘 이해되지 못하고 있다.

중금속 중 Cd²⁺은 현재까지의 연구 중에서 관심의 초점이 되고 있는 가장 독성이 강한 원소이다. Cd²⁺의 식물독성 효과는 영양적인 면에서 주로 초점이 되었고, 아울러 효소 활성면에서도 많은 관심이 되어졌다.^{6,7} Cd²⁺은 기공의 개폐운동, 물의 수송, 세포벽의 탄성도 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{8,9,10} 생물체가 Cd²⁺에 의하여 입는 여러 가지 피해와 역할에 관한 보고는 있으나²⁻⁵ Cd²⁺이 어떤 경로를 통해서 생체내로 수송되는지, 또 어떤 농도의 범위로 수송되는지 그리고 얼마만큼 세포내에 축적되는지에 관한 연구가 없다. 따라서 본 연구에서는 Cd²⁺이 생체내로 어떤 경로를 통해서 수송되고, 또 Cd²⁺이 수송되는 기작(mechanism)을 알고자 하였다.

식물체가 가뭄, 염분, 온도의 자극을 받으면, 자유 아미노산의 변화 중 proline이 세포내에 갑자기 증가되었고¹¹, 이 증가를 중금속에 관한 환경오염의 척도로 사용하였다.¹³ 따라서 본 연구에서도 봄무우를 사용하여 Cd²⁺이 오염될 경우 중금속에 관한 오염 정도를 나타내는 기준으로 proline을 사용할 수 있는지를 알고자 하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

Cd의 농도 분석은 ICP(GBC Integra, XMP), proline의 분석은 UV-spectrometer(Hitachi, U-2000, Japan)을 사용하였다.

시약 중 cadmium의 원자흡수 표준용액, Standard A Rd(1000 ppm), Mallinckrodt, U.S.A., 그외 이 실험

에 사용된 모든 시약들은 Sigma사제, U.S.A.를 사용하였다.

Acid ninhydrin 시약의 제조는 1.25g ninhydrin을 30ml 빙초산과 20ml 6M 인산에 녹인 것을 사용하였으며, 이 제조된 시약은 4℃에서 보관할 때, 24시간 동안 안정하였다.

2.2. 실험재료

실험 재료는 Seoul Seed Co., Ltd에서 구입한 F1 Spring White Radish(Jin Ju Dae Pyung Moo, No. Vr-Tv-14)를 사용하였다.

2.3. 발아조건

여러 불순물을 제거하기 위해 봄무우를 2% NaOCl에서 10분간 소독한 후 흐르는 물에서 하룻동안 씻었다. 소독된 씨는 25℃ 암소에서 3일간 발아시켰다(암소에서 발아시키는 이유는 엽록소를 제거시키기 위함이다). 물은 매일 동량을 규칙적으로 주었고, 습기를 일정하게 유지시켜 발아조건을 균일하게 하였다.

2.4. Cadmium의 처리

3일간 암소에서 자란 봄무우에 0.1ppm, 1ppm, 10ppm의 Cd²⁺용액에다 0.1g의 신선한 자엽, 줄기 및 뿌리 등을 실험에 따라 주어진 시간 동안(각 처리시간은 실험에 따라 차이남) 담가 25℃ 진탕배양기에서 주어진 시간만큼 처리한 후 꺼내서 얼음물로 씻은 후 분석을 위한 시료로 사용하였다. 이 때 배양기의 습도와 다른 조건들은 발아 조건과 동일하다.

2.5. Cadmium의 농도 분석

Cd²⁺을 처리한 시료 자엽, 줄기, 뿌리를 각각 0.1g씩 취해 60℃에서 30분간 오븐 건조시킨 후(시료들은 어리므로 이 시간 안에 완전히 건조되었다), 진한 황산으로 wet-ashed시킨 후 Wattman No. 2 여과지로 거른 후, ICP로 분석하였다.

2.6. Proline 추출과 측정

자엽, 줄기와 뿌리의 각 시료 0.1g을 3% 액체 sulfosalicylic acid 3ml를 가하여 4℃ 막자사발에서 분쇄한 후 Wattman No. 2 여과지로 거른다. 거른 용액에 1ml/acid-ninhydrin과 1ml/ glacial acid를 넣어 반응시킨

후 100℃에서 1시간 증탕한다. 증탕 후 ice bath에서 반응을 멈춘 후 2ml toluene을 넣어 강하게 저어 준다. 상등액을 취한 후 toluene을 blank로 사용하여 520nm에서 proline의 농도를 측정한다.

2.7. K_m 과 V_{max} 의 측정

K_m 과 V_{max} 는 Ca^{2+} 의 농도를 0.1ppm~10ppm 사이의 범위에서 측정하였다. 세포내로 수송된 Cd^{2+} 의 농도의 분석은 2.5와 같다. 각 농도별로 측정하여 g fresh weight로 환산된 결과를 이용하여 double-reciprocal-plot에 의해서 K_m 값과 V_{max} 를 얻었다.

3. 결과 및 논의

3.1. Cadmium의 수송

Cd^{2+} 은 생물체내로 Cd^{2+} 수송된 후 생물체내의 강한 독성으로 작용할 것으로 기대한다. 그러므로 Cd^{2+} 이 어떤 경로를 통해서 얼마나 빠르게 생체내로 수송되는지를 알고자 하였다(Fig. 1). 자엽에서는 30분까지는 아주 빠른 속도로 수송되었고, 시간의 경과에 따라서 점점 포화상태에 도달하며, Cd^{2+} 의 수송은 24시간까지도 계속 수송됨을 보였다. 자엽에서 수송되는 Cd^{2+} 은 외부 환경에 주어진 농도에 의존되었다(Fig. 2). 0.1ppm의 외부 농도에서는, Cd^{2+} 의 수송은 10분 경과 후 포화상태에 도달되었고, 1ppm과 10ppm에서

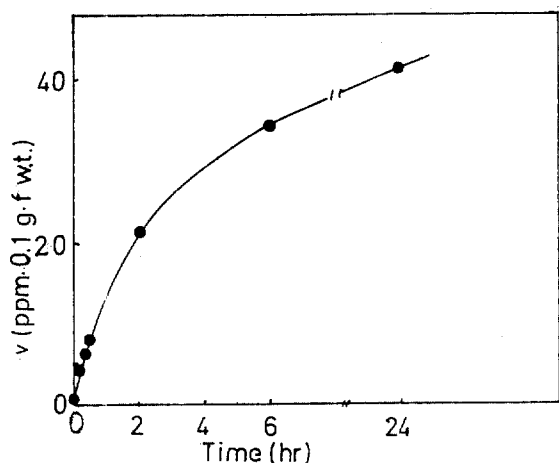


Fig. 1. The cadmium uptake of cotyledons of spring radish according to the time at 1 ppm cadmium concentration.

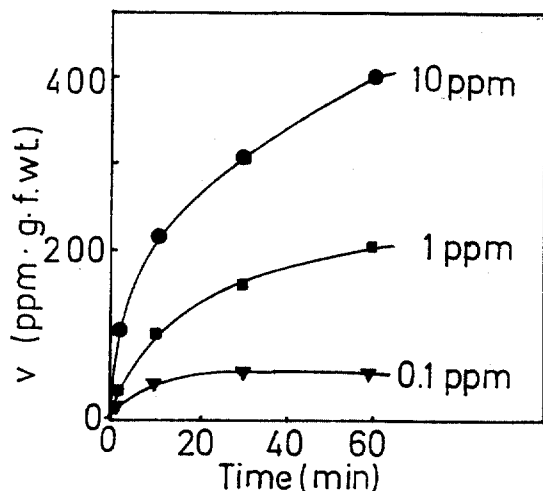


Fig. 2. The cadmium uptake of cotyledons of spring radish according to the time at various cadmium concentration.

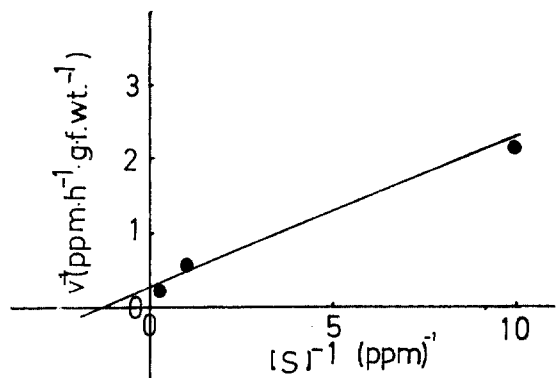


Fig. 3. The kinetic of the cadmium uptake of cotyledons of spring radish at various cadmium concentration.

는 서서히 포화상태에 도달하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 보아 Cd^{2+} 의 수송은 세포막에 Cd^{2+} 에 대한 독특한 운반자가 있음을 암시해 준다. 실제로 자엽에서 세포내로 수송되는 Cd^{2+} 는 세포막의 독특한 운반자를 통해서 수송된다(Fig. 3). Cd^{2+} 은 운반자에 대해서 높은 친화도를 가진다. Cd^{2+} 운반자에 대한 정확한 보고가 아직 없으므로 비교할 수는 없지만, 이처럼 Cd^{2+} 가 빠른 속도로 세포내로 수송되는 것은 Cd^{2+} 에 대한 생리 및 생화학적인 분석의 필요성과 함께 환경 보호 차원에서 중요한 의미를 가진다.

식물은 뿌리로부터 이온들을 물과 함께 흡수하여²

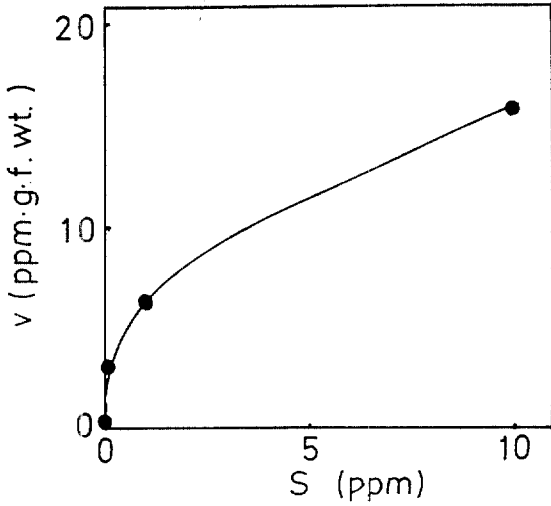


Fig. 4. The cadmium uptake of roots of spring radish according to various cadmium concentration at constant time.

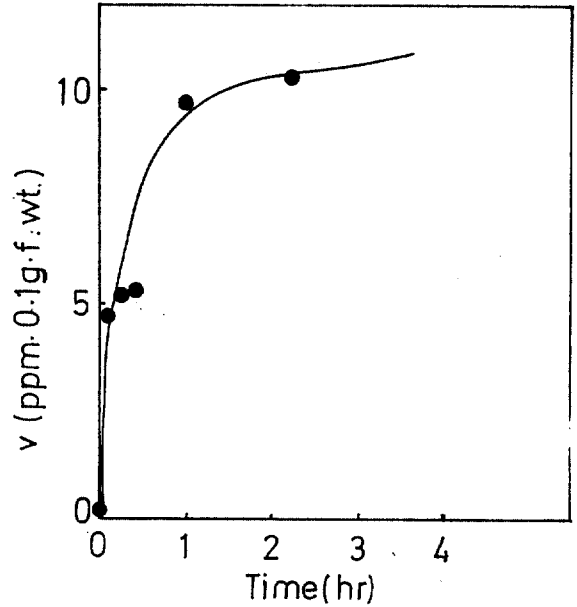


Fig. 6. The cadmium uptake of hypocotyls of spring radish according to the time at 1 ppm cadmium concentration.

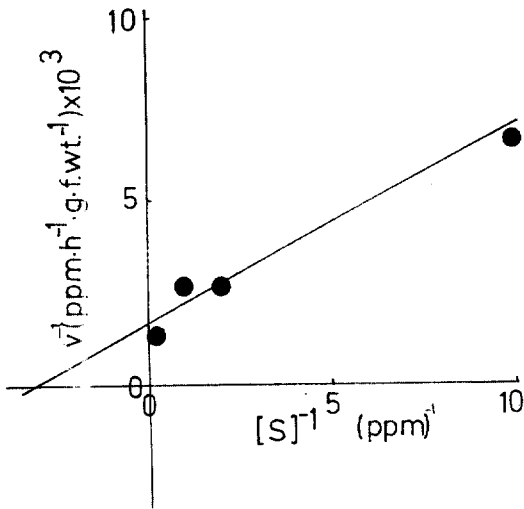


Fig. 5. The kinetic of the cadmium uptake of roots of spring radish at various cadmium concentration.

식물의 중요 부분으로 물관을 통해 분배시킨 후 세포 내에 축적시킨다는 것은 이미 알고 있는 사실이다. 그러나 Cd²⁺의 수송속도와 운반자의 존재 여부에 대한 논의가 없으므로 Cd²⁺가 뿌리를 통해서 수송되는 속도를 측정하였다(Fig. 4). 자연에서처럼 농도에 따라서 수송되는 속도가 다름을 보여 주어 뿌리에서도 고유한 Cd²⁺의 운반자를 조사하였다(Fig. 5). 뿌리는 고

Table 1. K_m-and V_{max} values of cotyledons, hypocotyls, and roots of spring radish.

content	K _m (ppm)	V _{max} (ppm·h ⁻¹ ·g·fresh weight ⁻¹)
cotyledon	0.8	400
hypocotyl	1.72	213
root	0.3	606

유한 운반자를 가지고 있고, 자연보다는 Cd²⁺에 대한 친화도가 높다.

줄기에서는 Cd²⁺의 수송은 시간에 따른 포화상태를 나타내고(Fig. 6), 독특한 운반자를 통해서 세포내로 수송되었다.

자연, 줄기, 뿌리 중 운반자에 대해서 Cd²⁺의 가장 친화도가 높은 운반자는 뿌리로, K_m값이 0.7ppm이고, 최대 속도는 600ppm·h⁻¹·g·fresh weight⁻¹로 가장 높았다(Table 1). 그러므로 식물이 중금속 등의 예민한 부분인 뿌리로부터 수송된 중금속은 빠른 속도로 다른 기관에 전달된다는 사실을 보여 주어서 다른 연구자의 설명³을 입증해 준다.

3.2. 대사 방해물질의 영향

자엽, 줄기, 뿌리에서 수송되는 Cd²⁺이 대사작용과 연결되는지를 알아보기 위해 대사 방해물질인 2,4-dinitrophenol(DNP)로 처리하여 Cd²⁺의 수송을 보았다(Table 2). 자엽에서는 Cd²⁺의 수송이 DNP에 의해서 대조구에 비해 80%가 방해당하였고, 줄기에서는 약 76%. 뿌리에서는 약 70%가 방해당하였다. 이 결과는 생체내로 수송되는 Cd²⁺는 대사작용과 밀접하게 연결되어 있음을 암시해 주며, 아미노산의 능동수송에서도¹² 유사한 결과를 보여 주어 이 부분에 대한 연구는 계속 진행 중이다.

Table 2. Effect of metabolic inhibitor, DNP on the uptake of cadmium of spring radish. The concentration of cadmium was 1 mM.

conten	2,4-dinitrophenol-concentration		
	0 mM	10 mM	100 mM
cotyledon	(% inhibition of control)		
hypocotyl	100	85	-
root	100	65	76
	100	24	72

3.3. Proline의 변화

Cd²⁺은 세포내의 proline을 축적시키는 강한 유도자로서 작용하였다.¹³ Lead, zinc, cobalt 등의 다른 어떤 중금속보다도 더 강하게 Cd²⁺는 proline을 세포내로

Table 3. The change of proline content in the cells during the cadmium uptake of spring radish.

time (min)	cotyledon	hypocotyl (µg / g fresh weight)	root
0	4.8	3.7	0.3
10	4.6	3.0	2.8
20	4.8	3.5	2.5
30	4.5	3.2	2.9
160	4.8	4.0	3.1
120	4.7	3.9	2.1

축적시키므로 중금속 오염에 대한 척도로 사용된다는 보고가 있다.¹³ 봄무우에서 Cd²⁺ 처리 동안 자유 proline의 농도는 거의 증가되지 않았다(Table 3). 이 결과는 밀 등에서 연구된 결과와는 매우 다름을 알 수 있다. 따라서 봄무우 유식물에서 중금속 오염에 대한 척도로 proline을 사용할 수 없고, Cd²⁺의 수송을 측정하여 환경오염의 척도로 삼는 것이 더 정확할 것 같다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. A. B. Ohlsson, and T. Bergland, *J. Plant Physiol.*, **135**, 505(1989).
2. A. M. Pahlsson, *Water, Air and Soil Pollut.* **47**, 2870(1989).
3. F. V. Assche, and H. Crisjsters, *Plant Cell Environ.* **13**, 195(1990).
4. H. Crisjsters, and F. V. Assche, *Photosynth. Res.* **7**, 31(1985).
5. J. C. Steffens, *J. Plant Physiol.* **41**, 54(1990).
6. W. R. Walker, J. E. Miller, and J. J. Hassett, *Soil Sci.* **124**, 145(1977).
7. B. L. Vallee, and D. D. Ulmer, *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 91(1972).
8. F. A. Bazzaz, G. L. Rolfe, and R. W. Carlson, *Physiol. Plant*, **32**, 373(1974).
9. T. Bazzynski, L. Wajda, M. Krol, D. Wolinska, Z. Krupa, and A. Tukenforf, *Physiol. Plant*, **48**, 365(1980).
10. R. J. Lamoreaux, W. R. Chaney, and *J. Environ. Qual.* **6**, 201(1977).
11. E. A. Mofteh, and B. E. Michel, *Plant Physiol.* **83**, 238(1987).
12. B. H. Cho, and E. Komor, *J. Plant Physiol.*, **118**, 127(1985).
13. A. Saradhi, and I. D. Saradhi, *J. Plant Physiol.* **138**, 554(1991).