

장미(*Rosa sp.*) 현탁배양세포에서 숙주 특이성이 낮은 Elicitor에 의해 유도되는 Anionic Peroxidase의 특성

신미선 · 양은진 · 이인철*
대전대학교 이과대학 생물학과

Characterization of Anionic Peroxidase Induced by Low Host-Specific Elicitor in Suspension Cultures of Rose (*Rosa sp.*)

SHIN, Mi-Sun · YANG, Eun-Jin · LEE, In Cheol*

Department of Biology, Taejon University, Taejon, 300-716, Korea. *Corresponding author

Whereas cationic extracellular peroxidases (PODs) were observed in the suspension cultures of rose (*Rosa sp. L. cv Pual's scarlet*) grown under normal conditions, new anionic isozymes were induced within 24 hr by the treatment of low host-specific elicitor (10 mg glucan/L media) prepared from yeast cell wall. Prominent anionic (pI 6.1) and cationic POD (pI 8.4) were purified and characterized to understand the physiological role of the enzymes. Both enzymes were purified (ca. 200 fold) by the ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration chromatography. The K_m values of the purified anionic POD for ferulic acid and H_2O_2 were 4.64 mM and 0.72 mM, whereas those of the cationic POD were 1.38 mM and 0.48 mM, respectively. The activity of the anionic POD as NADH oxidase was twice higher than that of cationic POD. The NADH oxidation in the anionic POD fraction was inhibited by 60% on the addition of 0.1 mM coniferyl alcohol, while that in the cationic fraction was inhibited by 15%.

Key words: NADH oxidation

Elicitor에 대한 식물의 반응은 매우 복잡하고 다양하나 활성산소의 증가 (Keppler et al., 1989; Sutherland, 1991), 세포벽 조성의 변화(Lange et al., 1995), phytoalexin 축적 (Dixon, 1986) 등이 그 주요한 반응으로 알려져 있다. 세포벽의 조성 변화나 phytoalexin의 축적 등은 elicitor에 대한 long-term effect이고, 활성산소의 증가현상은 초기에 진행되는 반응의 대표적인 예이다. 일반적으로 숙주 특이성이 높은 병원체에서 유래하는 elicitor일수록 그 식물에 대하여 강력한 병원성을 나타내며 이때 식물에서 일어나는 반응은 특이한 양상을 보인다고 알려져 있다(Lamb et al., 1989). 그러나 이와는 대조적으로 숙주에 대한 특이성이 매우 낮으며 병원성이 없는 elicitor도 식물세포에서 특정한 반응을 유도할 수 있다는 증거들이 제시되어 왔는데 그 대표적인 예가 chitosan이나 효모의 세포벽에서 추출된 성분들이다. 이 elicitor들은 식물에 대하여 non-pathogenic함에도 불구하고 콩과 식물에서 glyceollin의 축적을 유도하거나(Hahn and Albersheim, 1978), slash pine에서 세포벽의 변화를 유도하는

등(Lesney, 1990) 그 작용이 숙주 특이성이 높은 elicitor의 long term effect와 유사함을 보여주고 있다. 또한 몇몇 식물에 있어서 숙주특이성이 낮은 elicitor에 의하여 peroxidase (POD)의 활성이 증가하며, 특히 apoplasmic POD의 활성 증가가 일어난다는 보고들이 제시된바 있다(Lesney, 1990; Kerby and Somerville, 1992). Apoplasmic POD의 기능에 대하여서는 현재까지도 논란의 여지가 있으나 cell wall의 lignification에 관여한다는 의견이 지배적이다(Mader and Amberg-Fisher, 1982; Mader and Fussl, 1982). 그러므로 low-specific elicitor에 의해 유도되는 apoplasmic POD의 활성의 증가는 cell wall의 lignification에 관련된 것으로 이해되어 왔다. 그러나 다른 연구 결과들은 숙주 특이성이 높은 elicitor 뿐만 아니라 non-pathogenic elicitor 역시 식물 배양세포에서 초기 반응으로서 활성산소의 증가가 일어남을 보여 준 바 있다(Anderson et al., 1991; Schwacke and Hager, 1992). 이 결과는 POD의 기능이 lignin의 합성에만 국한되지 않는 것을 보여 주는 것이다. 더욱이 숙주 특이성이 낮은 elicitor에

의하여서도 활성산소가 증가한다는 것은 활성산소가 단순히 pathogen에 대한 antipathogenic agent로서의 역할뿐만 아니라 elicitor에 대한 식물 반응에 있어서 일반적인 신호전달 물질로서의 기능이 있을 가능성을 보여 주고 있다(Allan and Fluhr, 1997). 식물세포에서 활성산소의 생성은 POD에 의하여 NADH의 산화 반응을 통해서 진행될 수 있으나 (Elstner and Heupel, 1976; Mader and Amberg-Fisher, 1982) NADH의 산화 반응을 촉매하는 POD의 성질이나 생리적 기능에 대하여서는 거의 알려진 바 없다. Mader와 Amberg-Fisher (1982)는 배양된 담배세포에서 NADH oxidation을 촉매하는 POD를 정제하여 이 POD가 lignification에 관여하는 POD와 효소학적인 성질이 다른 것으로 보고한 바 있으나, 이 NADH-dependent POD가 elicitor에 의하여 유도된다는 직접적인 증거가 제시된 바는 없다. 대부분의 식물은 매우 많은 수의 POD의 isozyme을 보유하여 그 total activity가 매우 높을 뿐만 아니라, 대부분의 POD가 H₂O₂를 기질로 하는 monophenol 혹은 polyphenol oxidase의 활성을 갖기 때문에, elicitor에 의한 NADH oxidase의 유도 기작을 연구하는데 어려움을 주고 있다. 본 연구자들은 숙주 특이성이 낮은 elicitor에 대한 식물의 반응 양상에 대한 연구를 수행하던 중, 장미 배양세포가 비교적 단순한 POD isozyme을 보유하며, 더욱이 elicitor가 투여된 장미 배양세포의 배지에서 기존의 apoplasmic POD와 구분되는 새로운 isozyme이 유도됨을 발견하였다. 그러므로 본 연구에서는 이 새로운 elicitor에 의해 유도되는 POD가 기존의 POD와 별개의 생리적 기능을 수행할 수 있을 것이라 기대하고 이 효소를 분리하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

연구 재료

실험에서 사용한 장미(*Rosa sp. L. cv Paul's scarlet*)의 배양세포는 미국 Oklahoma 대학교 식물학과에서 유도된 것으로 1 mg/L NAA와 0.1 mg/L kinetin 이 함유된 MPR 배지 (Nesius et al., 1972)에서 유지하였다. 이 배양세포를 동일한 조성의 액체 배지 80 mL를 넣은 250 mL flask에 생체중량 0.5 g 정도 접종한 후 14일 간격으로 계대 배양하면서 약 5일 정도 자란 배양세포를 실험 재료로 사용하였다. 배양은 25°C, 암 상태에서 진탕 배양(120 rpm) 하였다.

Elicitor의 추출 및 투여

숙주 특이성이 낮은 elicitor는 Sigma사에서 구입한 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 ethanol 침전법으로 세포벽의 성분을 추출한 후(Schmacher et al., 1987; Hahn and

Albersheim, 1978), Dubois 등(1956)의 방법으로 total glucan을 정량하여 그 역가를 측정하였다. 계대 배양 후 5일된 현탁 배양세포를 무균 상태에서 stainless steel sieve (70 μ m)로 여과하여 세포와 배지를 분리하여 모았다. 배지는 10 mg glucan/L의 농도로 elicitor를 녹인 후 150 mL씩 500 mL flask에 넣어 세포 15 g을 재 접종한 경우를 실험구로 하고, elicitor를 처리하지 않고 단순히 배지와 세포를 재 접종한 것을 대조구로 하였다. 이를 상기 성장 조건에서 24시간 진탕한 후 배지를 수거하여 POD 분리에 사용하였다.

Peroxidase의 활성 측정 및 isozyme 분석

POD의 활성 측정은 40 mM Na-phosphate buffer (pH 5.0), 10 mM guaiacol과 효소액 0.1 mL를 혼합하여 30°C에서 5분간 preincubation한 후 10 mM H₂O₂를 첨가하여 이 반응액의 흡광도 변화를 436 nm (Beckman DU 68)에서 측정하였다. 이때 extinction coefficient는 25.5 mM⁻¹cm⁻¹으로 계산하였다(Rodgers et al., 1993). Elicitor를 투여하여 24시간 배양시킨 실험구와 elicitor를 투여하지 않고 단순히 재 접종한 대조구, 그리고 정상적으로 성장하는 배양구의 배지를 수거한 후 25% ammonium sulfate를 처리하여 18,000g로 20분간 원심분리하고 그 상등액을 다시 90% ammonium sulfate 포화용액으로 만들어 같은 조건으로 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 소량의 5 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)에 용해하여 동일한 완충용액에 24시간 투석시켜 등전점 전기영동의 시료로 하였다. 전기영동은 Stegeman과 Park (1979)의 방법을 변형하여 3% ampholine (pH 3-10)을 함유하는 6% acrylamide gel을 사용하였다. 양극용액으로는 0.01 M H₃PO₄, 음극용액으로는 0.02 M NaOH를 사용하여 150 V에서 1시간, 400 V에서 4시간 전기영동한 후 POD를 기질 특이적으로 염색하였다. Specific staining은 1% guaiacol, 0.2% H₂O₂를 함유하는 50 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0)에 gel을 담가 30°C에서 10-15분간 서서히 진탕하여 발색시켰다. 또한 시료를 loading 하지 않은 채 전기영동을 한 gel을 1 cm 간격으로 절단하여 1 mL의 50 mM KCl에 24시간 담가 놓은 후 pH를 측정하여 gel의 pH gradient 형성을 조사하였다.

Extracellular peroxidase의 purification

대조구의 extracellular POD 중에서 prominent한 cationic POD (pI 8.4)의 분리는 90% ammonium sulfate 농축을 통해 얻은 단백질을 증류수에 12시간 정도 투석한 후 Carboxydomeyl-Sepharose LP chromatography (2.5 x 10 cm)로 실시하였다. Equilibrium buffer는 0.02 M Na-acetate buffer (pH 5.0)로 하였으며 용출은 0.02 M-0.8 M Na-acetate buffer (pH 5.0)의 linear gradient로 수행하였다. 각

fraction의 volume은 3 mL로 하였으며, POD의 활성이 가장 높은 fraction을 모아 Amicon Centriconplus 10을 이용하여 농축한 후, gel filtration chromatography의 시료로 하였다. Gel filtration chromatography는 Sephadex G-75 (1.5 x 100 cm)를 사용하였으며 0.2 M NaCl을 함유하는 50 mM Tris buffer (pH 7.5)로 용출하였다. 용출 속도는 12 mL/hr이었고 fraction volume은 약 3 mL이었다. POD의 활성이 가장 높은 부위를 취하여 다시 한 번 농축하여 사용하였다. Elicitor를 투여한 배양구의 배지를 등전점 전기영동한 결과 새롭게 발견한 anionic isozyme (pI 6.1)을 분리하기 위하여 배지를 ammonium sulfate 처리에 의해 농축을 한 후 Econo Q-LP (Bio-rad, BioLogic) anionic exchange chromatography의 시료로 하였다. 시료를 loading한 후 10 mM Tris buffer (pH 7.5)로 충분히 세척하여 cationic isozyme의 affinity를 감소시킨 후, 0.05 M NaCl을 함유하는 25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)로 용출하였으며 각 fraction volume은 3 mL였다. NaCl gradient 상에서 용출된 분획 중에서 POD의 활성이 최대인 분획을 모아 상기의 방법으로 농축한 후 gel filtration의 시료로 하였다. Gel filtration은 대조구의 cationic POD를 분리할 때와 동일한 조건으로 시행하였다.

효소의 특성 결정

Gel filtration chromatography의 의한 분자량 결정은 표준 단백질의 elution volume/void volume (V_e/V_o) 계수와 분자량의 log 값에 대하여 표준 직선을 얻은 후 분리된 두 종류의 POD의 V_e/V_o 를 계산하여 분자량을 구하였다. POD의 분자량은 SDS-polyacrylamide 전기영동 상에서 다시 확인되었으며, cross-contamination의 가능성도 조사되었다. 부분 정제된 두 종류 POD의 각종 기질에 대한 kinetic은 caffeic acid, ferulic acid, guaiacol, 그리고 H_2O_2 에 대하여 실시하였다. 각 기질의 농도를 다르게 포함하는 50 mM Na-acetate buffer (pH 5.0)와 50 μ L의 효소액을 혼합하여 30°C에서 5분간 preincubation한 후 10 mM H_2O_2 를 첨가하여 총 1 mL가 되게 한 후 ferulic acid는 310 nm에서($\epsilon=16 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), caffeic acid는 315 nm에서($\epsilon=13.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) 측정하였고 (Rodgers et al., 1993), guaiacol은 436 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. H_2O_2 의 경우에는 10 mM guaiacol을 oxygen acceptor로 하여 흡광도 변화를 측정하였다. 측정된 결과는 least squares method에 따라 Lineweaver-Burk plot에 linear fitting한 후 K_m 과 V_{max} 를 계산하였다.

분리된 효소의 NADH 산화 활성은 Mader와 Amberg-Fisher의 방법(1982)을 응용하여 측정 하였다. 0.2 mM NADH, 20 mM $MnCl_2$, 2.0 mM dichlorophenol을 포함하는 50 mM Na-Acetate buffer (pH 5.0)에 효소액을 넣어 (총 부피 1 mL) 반응을 시작시킨 후 Spectrophotometer 340 nm에서 10분간의 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 흡광 계

수는 $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 으로 하여 산화되는 NADH의 양을 계산하였다. Coniferyl alcohol에 의한 POD의 NADH 산화 반응 억제제는 상기 조성의 반응액에 0.1 mM coniferyl alcohol을 첨가한 후 효소액을 넣어 역시 10분간 흡광도의 변화를 측정하여 계산하였다.

단백질의 정량

효소의 각 분리 단계에서 단백질의 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(1951), 혹은 Bradford (1976)의 방법을 이용하여 측정하였다

결과 및 고찰

Elicitor에 의한 peroxidase isozyme의 변화

액체 배양된 장미세포의 성장기에 따른 POD의 활성 변화는 어떤 기질을 사용하였는가에 따라 다양한 양상으로 나타난다(Kwon and Lee, 1996). 가장 일반적으로 사용되는 POD의 기질인 guaiacol을 사용하여 측정할 경우 guaiacol oxidase로서 POD의 활성은 계대 배양 후 4일 부터 증가하기 시작하여 9일 정도에서 최대 활성이 나타남을 관찰한 바 있다. 그러므로 본 실험에서는 POD의 활성이 증가하기 시작하는 계대 배양 후 5일 경과한 배양세포를 실험 재료로 사용하였다. 정상적인 성장 조건하에서 5일 현탁배양된 장미 세포의 배지를 ammonium sulfate로 농축하여 isoelectricfocusing과 specific staining으로 extracellular POD의 isozyme pattern을 조사한 결과 cationic POD (pI 8.4)가 주요 동위 효소로 관찰되었다(Figure 1). Extracellular POD의 isozyme pattern은 배양된 식물의 종에 따라 매우 다양하나, 많은 경우에 있어서 다수의 isozyme을 갖는다는 보고들에 비교하여 보면 장미 배양세포는 단순한 isozyme pattern을

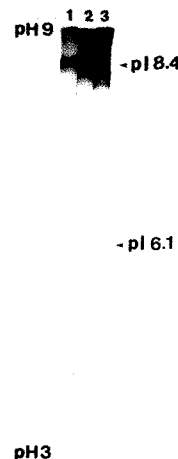


Figure 1. Isozymes of extracellular peroxidases in suspension cultures of rose with or without elicitor treatment. Each tube was loaded with same volume of total protein solution prepared from 1 L media by ammonium sulfate precipitation. After isoelectrofocusing electrophoresis, gels were stained with 1% guaiacol and 0.2% hydrogen peroxide. Lane 1, control media from normal culture; Lane 2, media from cultures incubated without elicitor; Lane 3, media from cultures incubated with elicitor.

보여주고 있다. 이는 본 실험에서 사용한 장미 배양세포의 POD isozyme 구성이 다른 식물에 비교해 비교적 단순하기 때문에 얻어진 결과일 수도 있으나, 접종 후 성장 초기의 세포를 사용하였기 때문에 아직 다양한 isozyme의 발현이 일어나지 않은 것에도 기인할 수 있다. 대조구로서 배양세포를 elicitor를 처리하지 않은 배지에 단순 재 조합하여 24 시간 배양한 경우 cationic POD의 활성이 매우 높아지는 것으로 관찰되었다. 이 결과는 정상 상태보다 배지에 대한 세포밀도가 매우 높은 상태로 재 접종하였기 때문에 방출되는 extracellular POD의 농도가 높은 것에 기인할 수 있다. 그러나 isozyme pattern은 변화가 없는 것으로 나타났다. 반면에 elicitor를 투여한 경우에는 cationic POD의 활성도 매우 증가하였으나 또한 pI 6.1와 5.2의 anionic POD의 band가 새롭게 관찰되었으며 특히 pI 6.1의 isozyme이 현저하게 뚜렷한 band로 나타났다. 다양한 POD isozyme의 기능에 대하여서는 아직도 자세하게 밝혀진 바 없다. 그러나 peanut이나 담배 등에서 세포벽 형성에 관여하여 cell elongation을 조절하는 POD가 cationic한 성질을 갖는 반면에(Zheng and VanHuystee, 1991), pathogen에 대한 방어 기작의 일부를 담당하는 POD는 anionic하다는 보고들에(Perrey et al., 1989; Zheng and VanHuystee, 1992) 미루어 보면, 장미세포에서 elicitor의 투여에 의해 유도된 anionic isozyme의 기능이 cationic POD와 상이할 가능성이 매우 높다고 판단된다.

Peroxidase의 분리

Elicitor-induced anionic POD와 대조군인 cationic POD의 효소학적 특성의 차이를 알아보기 위해 prominent band로 표현되고 있는 pI 8.4와 pI 6.1 POD의 분리를 시도하였다. Cationic POD는 대조군에서 얻은 배지를 ammonium sulfate로 농축하여 CM-sepharose LP chromatography를 수행한 결과 두 개의 POD 활성 peak를 얻을 수 있었다(자료 제시하지 않음). 그 중에서도 NaCl 농도 0.6 M에서 POD의 활성이 가장 높은 fraction을 얻었으며, 이 fraction을 모아 농축한 후 Sephadex G75 gel filtration의 시료로 하였다. Gel filtration chromatography를 통하여 84-93 mL 분획에서 단일

Table 1. Purification of cationic extracellular peroxidase from suspension cultures of rose. Peroxidase activity was measured with 10 mM guaiacol and 10 mM H₂O₂.

Fraction	Total protein (μg)	Total activity (mmol/min)	Specific activity (mmol/min/mg protein)	Recovery (%)	Fold
Crude media	40,330	76.2	1.9	100.0	1.0
Ammonium sulfate	11,276	49.7	4.4	65.2	2.3
CM-sepharose	921	8.3	90.2	10.5	47.5
SephadexG75	46	1.8	391.3	2.4	205.9

Table 2. Purification of anionic extracellular peroxidase from suspension cultures of rose treated with elicitor. Activity was measured with 10 mM guaiacol and 10 mM H₂O₂.

Fraction	Total protein (μg)	Total activity (mmol/min)	Specific activity (mmol/min/mg protein)	Recovery (%)	Fold
Crude media	94,180	224.3	2.4	100.0	1.0
Ammonium sulfate	20,376	118.9	5.8	53.0	2.4
CM-sepharose	57.0	7.6	133.3	3.4	55.5
SephadexG75	2.9	1.3	448.2	0.6	187.6

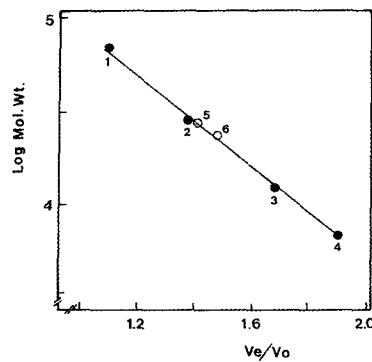


Figure 2. Estimation of molecular weight of peroxidase isozymes by Sephadex G75 gel filtration chromatography. 1, bovine serum albumin (66,000); 2, carbonic anhydrase (29,000); 3, cytochrome C (12,400); 4, aprotinin (6,500); 5, cationic peroxidase (pI 8.4); 6, anionic peroxidase (pI 6.1).

한 POD의 peak를 얻을 수 있었다. 전 과정을 통하여 pI 8.4 POD의 최종 회수율은 2.4%였고 purification fold는 205배 정도였다(Table 1). pI 6.1의 POD를 정제하기 위하여 elicitor를 처리한 배양구의 배지를 ammonium sulfate로 농축하여 Econo Q-LP system의 시료로 하였다. Anion exchange chromatography 상에서 POD 활성은 void volume에서 매우 높았으며 근접한 분획에서 두 개의 POD peak를 얻었다(자료 제시하지 않음). 이 중에서 앞쪽의 major peak의 분획을 모아 농축한 후 역시 Sephadex G75 gel filtration의 시료로 하였으며, 99-102 mL의 분획에서 단일한 POD의 peak를 얻었다. Anionic POD의 전체 분리 과정에서 회수율은 0.6%였고 purification fold는 185배 정도였다. pI 6.1 POD의 회수율이 낮은 이유는 등전점전기영동 상에서 확인한 바 이 isozyme의 활성이 상당히 낮은 반면에, 매우 높은 활성의 cationic POD가 다량 존재하기 때문이라 생각되었다. 그러나 purification fold는 두 효소 모두 비슷한 값으로 측정되므로 분리과정에서의 손실은 커다란 차이가 없다고 판단되었다(Table 2). 본 실험에서 분리된 두 POD의 분자량은 gel filtration 상에서는 pI 8.4가 약 28 kD, pI 6.1은 약 22 kD로 측정되었다(Figure 2). 또한 SDS-PAGE상에서도 각각 29 kD와 23 kD 정도의 단일 band로 관찰되었다(Figure 3). 선행된 실험에서 보리나 담배에서 분리된 extracellular POD도 30-40 kD의 monomer라는 보고(Narita et al., 1995; Kerby and Somerville, 1992)로 미루어 보면 본 실험의 결과에서

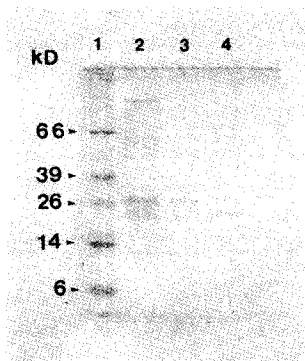


Figure 3. SDS-polyacrylamide gel of peroxidase-containing fractions eluted from sephadex G75 gel filtration. Gel was stained by silver staining method. Lane 1, molecular weight marker; Lane 2, total proteins in media; Lane 3, cationic peroxidase; Lane 4, anionic peroxidase.

얻어진 pI 8.4 POD는 상당히 유사한 분자량을 갖고 있다. 그러나 anionic isozyme은 이보다 약간 작은 분자량을 갖는 것으로 조사되었다.

기질에 대한 반응성

분리된 두 POD isozyme의 몇 가지 기질에 대한 반응성을 측정 한 결과 10 mM H₂O₂를 oxidant로 하여 guaiacol, ferulic acid, caffeic acid 농도에 대한 반응 속도는 두 효소 모두에서 전형적인 Michaelis-Menten 형태로 관찰되었다(자료 제시하지 않음). Lineweaver-Burk plot에 의하여 각 기질에 대한 Km과 Vmax를 측정 한 결과, guaiacol은 pI 8.4의 경우 Km이 7.4 mM, Vmax는 11.3 μ mol/min이었고 pI 6.1 isozyme은 Km 8.6 mM, Vmax 9.2 μ mol/min로 나타나 두 효소간에 커다란 차이가 없었다. 그러나 ferulic acid의 경우에는 두 효소 사이에 상당한 차이점을 보였는데 pI 8.4는 Km이 1.4 mM, Vmax가 16.7 μ mol/min인 반면에 pI 6.1의 경우에는 Km 4.8, Vmax 9.1로 계산되었다. 식물 배양세포의 초기 성장기에 있어 세포 내 혹은 apoplasmic ferulic acid의 농도에 대하여서는 보고된 바 없다. 그러나 본 실험에서 측정된 결과만을 고려하면 pI 8.4 POD는 주요한 monolignol인 coniferyl alcohol의 전구물질인 ferulic acid의 산화반응을 촉매할 수 있음을 보여주며, pI 6.1은 이러한 반응에 관여도가 상대적으로 낮음을 보여주는 결과이다. 그러나 두 효소 모두에서 또 다른 lignin 합성의 전구 물질인 caffeic acid에 대한 반응성이 ferulic acid에 비해서는 매우 낮은 것으로 나타났는데, 이 결과는 caffeic acid가 monolignol 합성의 전구 물질로만 기여할 뿐 POD에 의한 직접적인 산화 반응을 받지는 않음을 의미한다. 한편 guaiacol을 reductant 로 하여 H₂O₂의 농도에 대한 반응 속도의 변화는 두 효소 사이에서 의미있는 차이를 보이고 있어, pI 8.4 isozyme의 Km은 0.48 mM, Vmax는 47.8 μ mol/min인 반면에 pI 6.1의 경우에는 각각 0.72 mM, 20.6 μ mol/min으로 나타났다(Table 3). 이는 두 효소 중에서 pI 8.4 isozyme의 H₂O₂에 대한 affinity가 2배 정도 높음을 보여준다. 반면에 두 종류의 POD에서 측정되는 NADH oxidase로서의 활성은 Table 4에 나타낸 바와 같이 매우 상이한 결과를 보여 주고 있다. Cationic POD의 경

Table 3. Kinetic parameters of purified anionic and cationic peroxidases to several substrates.

Substrate	Cationic peroxidase		Anionic peroxidase	
	Vmax (μ mol/min)	Km (mM)	Vmax (μ mol/min)	Km (mM)
Caffeic acid	4.0	13.7	1.6	17.1
Ferulic acid	16.7	1.4	9.1	4.8
Guaiacol	11.3	7.4	9.2	8.6
H ₂ O ₂	47.8	0.5	20.6	0.7

Table 4. Effect of 0.1 mM coniferyl alcohol on NADH oxidation catalyzed by cationic and anionic peroxidases.

Fraction	NADH oxidation(μ mol/min/mg protein)		% of inhibition
	-coniferyl	+coniferyl	
Cationic peroxidase	3.2	2.7	16
Anionic peroxidase	7.6	3.3	57

우 NADH 산화 활성은 3.2 μ mol/min/mg protein 정도로 조사된 반면에 elicitor에 의해 유도된 anionic POD의 경우에는 7.6 μ mol/min/mg protein으로 나타나 2배 이상 높은 활성을 보여주고 있었다. POD에 의한 NADH 산화 반응은 natural monolignol인 coniferyl alcohol에 의하여 경쟁적인 억제를 받는 것으로 알려져 있다(Mader and fussl, 1982). 본 실험에서 anionic POD는 0.1 mM coniferyl alcohol의 첨가에 의해 NADH 산화 활성이 약 60% 정도 억제되는 반면에 cationic isozyme은 약 15% 정도 감소되었다. 이러한 결과는 cationic POD가 H₂O₂의 분해를 통한 phenolic compound의 산화를 촉매하는 반면에, elicitor에 의해 유도되는 anionic POD는 NADH 산화를 통한 H₂O₂의 생성에 관여할 수 있음을 보여 주고 있다.

Elicitor에 대한 식물의 초기 반응에서 신속한 H₂O₂의 생성이 일어난다는 결과는 이미 몇몇 식물에서 보고된 바 있고, 그 역할도 신호전달과정에 기여한다는 의견이 제시된 바도 있으나(Allan and Fluhr, 1997) 이런 연구 결과들은 대부분 숙주 특이성이 높은 elicitor에서 얻어진 것이다(Keppler et al., 1989; Sutherland, 1991). 그러므로 본 실험의 결과는 숙주 특이성이 낮은 elicitor에 대하여서도 식물의 apoplasm에서 H₂O₂의 생성이 초기과정에 진행된다는 가정을 가능하게 하지만 이 문제는 앞으로의 중요한 연구 과제가 될 것이다.

적 요

장미(*Rosa sp. cv Paul's Scarlet*) 현탁 배양체의 배지에서 정상적인 성장 조건하에서 cationic peroxidase (POD)만 관찰되었으나, 효모 세포벽으로부터 추출한 숙주 특이성이 낮은 elicitor를 10 mg glucan/L의 농도로 투여하여 24시간 정도 배양하였을 때 기존의 POD와 뚜렷하게 구분되는

anionic POD가 유도됨을 관찰하였다. Elicitor에 의해 유도되는 prominent한 anionic POD (pI 6.1)와 대조구로서 pI 8.4의 cationic isozyme을 분리한 후 효소학적 성질을 비교하였다. Ammonium sulfate 농축, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography를 통하여 약 200배로 농축된 두 효소를 분리하였으며, 이 두 효소의 몇몇 기질에 대한 kinetic parameter들은 매우 의미있는 차이를 보여 주었다. 그 중에서 ferulic acid에 대한 Km은 anionic POD의 경우 4.64 mM, cationic POD는 1.38 mM로 측정되었으며, H₂O₂에 대한 Km은 각각 anionic POD가 0.72 mM, cationic isozyme이 0.48 mM로 나타났다. 특히 NADH 산화 반응의 활성은 anionic POD가 cationic POD에 비하여 약 2배 높은 것으로 측정되었다. 0.1 mM coniferyl alcohol의 첨가에 의한 NADH 산화 반응의 억제에는 anionic POD fraction에서 약 60% 정도 일어난 반면에 cationic POD fraction에서는 약 15% 정도 일어났다.

사사 - 본 논문은 1996년도 학술진흥재단의 공모과제연구비에 의하여 연구되었음.

인용문헌

- Anderson AJ, Rogers K, Tepper CS, Blee K, Cardon J (1991) Timing of molecular events following elicitor treatment of plant cells. *Physiol Mol Plant Pathol* 38:1-13
- Allan AC, Fluhr R (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9:1559-1572
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-259
- Dixon RA (1986) The phytoalexin response: Elicitation, signalling and control of host gene expression. *Biol Rev* 61:239-291
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Elstner EF, Heupel A (1976) Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130:175-180
- Hahn MG, Albersheim P (1978) Host-pathogen interactions. *Plant Physiol* 62:107-111
- Keppler LD, Baker CJ, Atkinson MM (1989) Active oxygen production during a bacteria induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* 79:974-978
- Kerby K, Somerville SC (1992) Purification of an infected-related extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol* 100:392-402
- Kwon MJ, Lee I (1996) Changes of activity and substrate preference of peroxidase in liquid cultured rose cells during growth periods. *Natural Science* 7:29-37
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA (1989) Signals and transduction mechanism for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56:215-224
- Lange BM, Lapierre C, Sandermann H (1995) Elicitor-induced spruce stress lignin. *Plant Physiol* 108:1277-1287
- Lesney MS (1990) Effect of elicitor on extracellular peroxidase activity in suspension cultured slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.) *Plant Cell Tissue Organ Culture* 20:173-175
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
- Mader M, Amberg-Fisher V (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. *Plant Physiol* 70:1128-1131
- Mader M, Fussl R (1982) Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. *Plant Physiol* 70:1132-1134
- Narita H, Asaka Y, Ikura K, Matsumoto S, Sasaki R (1995) Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells. *Eur J Biochem* 228:855-862
- Nesius KK, Uchytel LE, Fletcher JS (1972) Minimal organic medium for suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Planta* 106:173-176
- Perry R, Hauser MT, Wink M (1989) Cellular and subcellular localization of peroxidase isozymes in plants and cell suspension cultures from *Lupinus polyphyllus*. *Z Naturforsch* 44c:931-936
- Rodgers MW, Zimmerlin A, Reichhart DW, Bolwell GD (1993) Microsomal associated heme proteins from french bean: Characterization of the cytochrome p450 cinnamate-4-hydroxylase and two peroxidases. *Arch Biochem Biophys* 304:74-80
- Schumacher HM, Gundlach H, Fieder E, Zenk MH (1987) Elicitation of benzo phenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. *Plant Cell Reports* 6:410-413
- Schwacke R, Hager A (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca²⁺ and protein-kinase activity. *Planta* 187:136-141
- Stegeman H, Park WM (1979) Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-technique in slabs. *Acker Dflanzen* 148:446-454
- Sutherland MW (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:79-93
- Zheng X, VanHuystee RB (1991) Oxidation of tyrosine by peroxidase isozymes derived from peanut culture medium and by isolated cell walls. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 25:35-43
- Zheng X, VanHuystee RB (1992) Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Sci* 81:47-56