

## 섬오갈피나무에서 SOD Isoenzyme의 식별 및 특성규명

오순자, 박영철<sup>1)</sup>, 김응식<sup>2)</sup>, 고석찬  
제주대학교 생물학과, <sup>1)</sup>제주도 농업기술원, <sup>2)</sup>서남대학교 생물학과

### Identification and Characterization of SOD Isoenzymes in *Acanthopanax koreanum* Plants

Soon Ja Oh, Young Chul Park<sup>1)</sup>, Eung Sik Kim<sup>2)</sup> and Suck Chan Koh

Department of Biology, Cheju National University, Cheju 690-756

<sup>1)</sup>Cheju Agricultural Research and Extension Services, Cheju 690-170

<sup>2)</sup>Department of Biology, Seonam University, Namwon 590-711, Korea

#### ABSTRACT

The isoenzyme patterns and activities of superoxide dismutase(SOD) were investigated from leaves of Araliaceae plants. Of the eight isoenzymes, two isoenzymes(SOD 4 and SOD 6) were prevalent to leaves of Araliaceae plants. The patterns of these two isoenzymes were most various in the leaves of *Acanthopanax senticosus* for. *inermis*, while their activity was highest in the leaves of *A. koreanum*. These two isoenzymes were respectively identified as Fe-SOD and CuZn-SOD, based on selective inhibition with KCN or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The SOD isoenzyme patterns did not differed among stem barks, root barks and leaves of *A. koreanum*. However, the activities of Fe-SOD and CuZn-SOD were higher in the root bark and in leaves, respectively. Both of Fe-SOD and CuZn-SOD were stable for 1 hr at 30 - 40 °C, while unstable above 50 °C.

**Key words:** Araliaceae, *Acanthopanax koreanum*, CuZn-SOD, Fe-SOD, Thermal stability.

#### 서론

대부분의 생물은 여러 가지 환경스트레스 하에 있게 되며, 이 때에 생체내의 산소가 superoxide anion radical( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxy radical( $\cdot OH$ ) 등 반응성이 높은 활성산소로 변한다. 이들 활성산소는 세포 내의 지질, 단백질 및 핵산을 공격하여 산화적 손상을 유발하며 심한 경우에는 질

병과 노화를 촉진하여 생체를 사멸시킨다(Scandalios, 1993). 하지만, 생물체는 이러한 활성산소에 대하여 superoxide dismutase(SOD), peroxidase, catalase 등의 활성산소 제거효소와 tocopherol, ascorbic acid, methionine 등의 저분자 항산화물질을 만들어 자신을 보호한다(Alscher and Hess, 1993).

특히, 식물은 환경스트레스를 받았을 때 동물과는 달리 쉽게 도피할 수 없어, 스트레스에 대한 적응 능력이 다른 생명체보다 높을 것으로 여겨지고 있

Corresponding author: 고석찬, 우.690-756, 제주시 아라1동 1번지, 제주대학교 생물학과

다. 최근 환경 스트레스에 내성을 지닌 형질전환 식물체의 개발을 위하여 활성산소 제거효소가 사용되고 있으며, 그 응용가능성이 높아지고 있다(Allen, 1995). 그 중, SOD는  $\cdot O_2$ 을  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 로 전이시키는 반응을 촉매하고  $\cdot OH$ 의 발생을 저해하는 대표적인 활성산소 제거효소이다(McCord and Fridovich, 1969). 이러한 연유로, SOD는 화장품, 식품 및 의약품의 첨가제로 사용되고 있으며, 더욱이 항염증작용이 있어 관절염, 류마티스 등 각종 퇴행성 질병의 치료제로 개발되고 있는 상업적으로도 중요한 효소이다(Bannister *et al.*, 1987).

한편, 오갈피나무속(*Acanthopanax*) 식물은 그 근피가 인삼에 떨어지지 않은 약리작용을 가지고 있어 관절염, 동맥경화, 근육마비, 요통, 성신경 쇠약, 각기, 타박상 등에 약효가 있는 것으로 알려지고 있다(이 등, 1989). 더욱이 섬오갈피나무는 SOD 활성이 높고 활성산소를 발생시키는 제초제인 paraquat를 처리했을 때 그 활성이 더욱 높아져서 산화적 스트레스에 대한 저항성이 높을 것으로 판단되고 있다(오 등, 1999). 그리고, 섬오갈피나무(*A. koreanum*)는 한국 특산식물이므로(이, 1985) 자원적 가치가 높을 뿐 아니라, 다른 종에 비하여 증식이 수월하여(안과 최, 1992) 대량 생산이 용이하다.

이에 본 연구에서는 SOD의 산업적 이용을 위한 기초자료를 마련하고자 두릅나무과 식물 잎의 SOD isoenzyme 패턴과 활성을 조사하고 섬오갈피나무의 뿌리, 줄기, 잎 등의 조직 특이적인 발현양상을 비교하였으며, SOD isoenzyme의 저해 특성과 열에 대한 안정성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험재료들은 제주도에 자생하는 두릅나무과 식물을 사용하였다. 즉, 두릅나무과 식물의 종별 SOD 패턴을 분석하기 위하여 낙엽성 식물로 섬오갈피나무(*Acanthopanax koreanum*), 두릅나무(*Aralia elata*)와 음나무(*Kalopanax pictus*)를, 상록성 식물로는 황칠나무(*Dendropanax morbifera*), 팔손이(*Fatsia*

*japonica*)와 송악(*Hedera rhombea*)의 잎을 사용하였다. 오갈피속 식물의 SOD 패턴 분석에는 섬오갈피나무(*A. koreanum*), 오갈피나무(*A. sessiliflours*), 민가시오갈피나무(*A. senticosus* for. *inermis*)의 잎을 사용하였으며, 기관별 SOD활성의 조사에는 섬오갈피나무의 근피, 수피, 잎을 채취하여 사용하였다.

### 조효소액의 제조

식물체의 성숙한 잎, 근피, 수피 부분을 생중량 5.0g 씩 취하여 20mM Tris-HCl 완충액(pH7.8; 0.1mM EDTA 함유) 10ml와 함께 얼음 위의 유발에서 마쇄한 후, 4℃ 하에서 8,000g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

### 전기영동

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 native gel 하에서 실시하였다. 즉, 7.5% polyacrylamide running gel과 3% polyacrylamide stacking gel로 구성된 vertical slab gel에 40 $\mu$ l의 시료를 loading하여 stacking gel에서는 50V, running gel에서는 100V 하에서 전개시켰다. 전기영동 시료는 효소액을 동량의 시료용 완충용액(125 mM Tris-HCl, pH6.8; 0.005% bromophenol blue, 40% glycerol)과 혼합하여 사용하였다.

### SOD의 검출 및 특성분석

SOD의 검출은 Beauchamp와 Fridovich(1971)의 riboflavin/nitro blue tetrazolium방법을 사용하여 실시하였다. 즉, 전기영동이 끝난 겔을 2.45 mM nitro blue tetrazolium 용액에 넣어 20분간 어두운 곳에 둔 후, 압상 상태에서 15분간 염색용액(36 mM potassium phosphate, pH 7.8; 28 mM TEMED, 28  $\mu$ M riboflavine)에 넣어 진탕하고, 빛을 조사하면서 5-10분간 반응시켜 나타나는 밴드를 조사하였다. SOD isoenzyme 특성은 전기영동이 끝난 겔을 3 mM  $H_2O_2$ 와 2 mM KCN 용액에 담가 30분간 진탕한 후 동일한 방법으로 SOD를 검출하여 조사하였다.

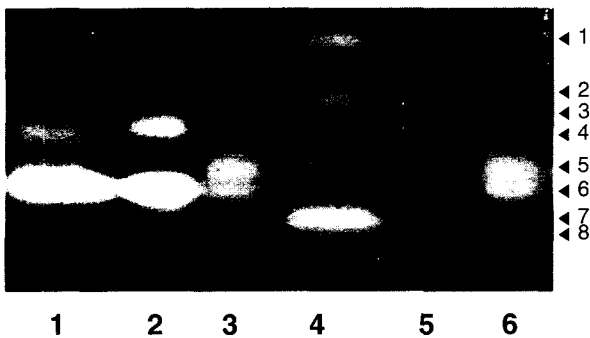
### SOD의 열안정성 조사

SOD의 열안정성은 조효소액을 30-70℃까지 다양한 온도에서 1시간과 3시간 동안 가온한 후에 native gel 전기영동을 실시하고 SOD를 검출하여 비교·조사하였다. 대조구는 4℃에서 보관중인 조효소액을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 두릅나무과 식물간의 SOD 패턴의 비교

우선, 여름철 자연조건 하에서 성장하고 있는 두릅나무과 식물 6종의 잎으로부터 SOD isoenzyme 패턴을 조사하였다(Fig. 1). 그 결과, 종에 따라 다르지만 전체적으로 8개의 밴드가 검출되었다. 이들 밴드들을 전기이동도에 따라 SOD 1에서 SOD 8로 명명하였을 때, 이들 중 2개의 isoenzyme(SOD 4와 SOD 6)은 효소활성, 즉 밴드의 강약에는 차이가 있지만, 상록성 식물과 낙엽성 식물에 관계없이 두릅나무과의 모든 식물에 공통적으로 나타났으며 섬오갈피나무와 두릅나무에서 활성이 특히 높았다. 나머지 6개의 isoenzyme의 분포는 식물 종에 따라 크게 차이가 있었다. 이와 같이 종에 따라 SOD isoenzyme 패턴과 활성이 다른 것은 스트레스에 대한 내성의 정도가



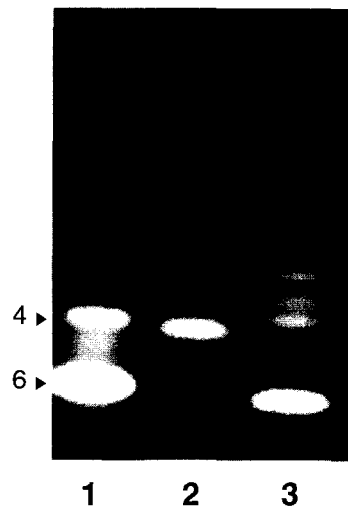
**Fig. 1.** Comparison of leaf SOD isoenzyme profiles among Araliaceae plants under natural field condition in summer.

1, *Acanthopanax koreanum*; 2, *Aralia elata*;  
3, *Kalopanax pictus*; 4, *Dendropanax morbiifera*;  
5, *Fatsia japonica*; 6, *Hedera rhombea*.

식물에 따라 다르며, SOD 4와 SOD 6이 공통적으로 존재하는 것으로 보아 두릅나무과 식물에 공통적인 내성기구가 존재함을 시사하고 있다. 그리고 다른 수종에 비하여 섬오갈피나무와 두릅나무에서 SOD 4와 SOD 6의 활성이 높게 나타나 이들 수종이 산화적 스트레스에 대한 내성이 더 강한 것으로 판단된다. 이는 활성산소를 발생하는 제초제인 paraquat를 섬오갈피나무 잎 disc에 처리했을 때 광합성 효율의 감소에 비하여 SOD 활성이 크게 높아진 것으로 알 수 있다(오 등, 1999).

#### 오갈피나무속 식물간의 SOD 패턴의 비교

Fig. 1에서 보는 바와 같이 두릅나무과 식물 중 섬오갈피나무와 두릅나무의 잎에서 SOD 활성이 높은 것으로 나타났다. 따라서, 다양한 생리작용을 가지고 있어 약용으로 많이 사용되고 있는 오갈피나무속 식물 중에서 섬오갈피나무, 오갈피나무, 그리고 민가시오갈피나무의 잎으로부터 SOD isoenzyme 패턴과 활성을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과, 섬오갈피나무에는 SOD 4와 SOD 6이 나타나는데, 오갈피나무는 SOD 4와 그 보다 전기이동도가 낮은 2개의 밴드



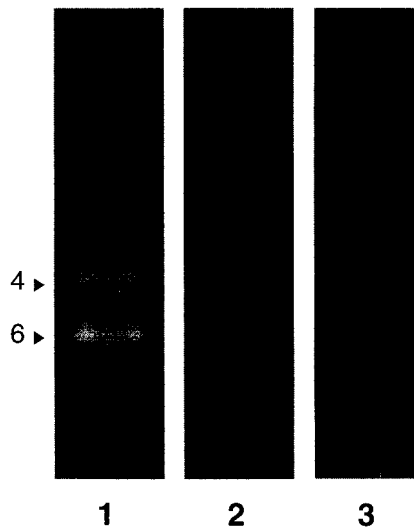
**Fig. 2.** Comparison of leaf SOD isoenzyme profiles among *Acanthopanax* plants under natural field condition in summer.

1, *Acanthopanax koreanum*; 2, *A. sessiliflours*;  
3, *A. senticosus* for. *inermis*.

를 나타내었으나 SOD 6은 나타나지 않았다. 그리고 민가시오갈피나무는 섬오갈피나무와 오갈피나무에서 나타나는 모든 밴드를 가지고 있어 총 4개의 밴드 패턴을 나타내었다. 하지만 SOD 4와 SOD 6의 활성은 전체적으로 섬오갈피나무에서 높았다. 따라서, 국내에 자생하는 오갈피나무속 식물 8종을 대상으로 세부적인 연구가 필요하지만 섬오갈피나무는 오갈피나무속 식물 중에서 SOD활성이 비교적 높을 것으로 보인다.

### 섬오갈피나무 SOD isoenzyme의 구별

SOD는 함유하고 있는 금속의 종류에 따라 CuZn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD의 3종류로 나누어지는데 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 구분할 수 있다(Fridovich, 1974). 또한, 이들 isoenzyme은 환경 스트레스에 따라 활성의 변화가 다른 것으로 보고되고 있다(Yu and Rengel, 1999). 따라서, Fig. 1의 두릅나무과 식물 전체에 공통적으로 존재하는 SOD 4와 SOD 6의 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 2 mM KCN에 의한 선택적 저해를 조사하고 그 isoenzyme의 종류를 밝혔다(Fig.

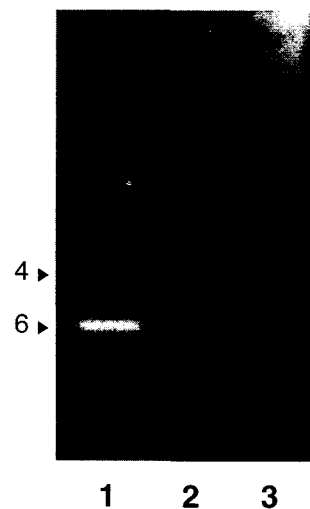


**Fig. 3.** The types of SOD isoenzymes in the leaves of *Acanthopanax koreanum*. The isoenzymes were identified by active staining after the gels were untreated(1) and preincubated with 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(2) or 2 mM KCN(3) for 30min.

3). 그 결과, SOD 4는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 민감하게 반응하지만 KCN의 영향을 받지 않았으며, SOD 6은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 KCN에 모두 민감하게 반응하였다. 이러한 결과는 CuZn-SOD는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 KCN에 의해 모두 저해를 받고, Fe-SOD는 KCN에 의해서는 저해를 받지 않고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서만 저해를 받는 것으로 미루어 보았을 때 (Asada *et al.*, 1975; Furusawa *et al.*, 1984), SOD 4는 Fe-SOD로, 그리고 SOD 6은 CuZn-SOD로 추정되었다. 하지만 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 KCN 어느 것에 의해서도 저해를 받지 않는 것으로 알려진 Mn-SOD는 검출되지 않았다.

### 섬오갈피나무의 조직별 SOD패턴과 활성의 변화

SOD는 다른 단백질과 같이 동일한 식물체에서도 조직에 따라 특이적인 isoenzyme 패턴을 보이며 활성도 다르다(Kanematsu and Asada, 1989). 따라서, 섬오갈피나무의 잎, 수피, 근피를 대상으로 SOD isoenzyme의 패턴과 활성을 비교하였다(Fig. 4). 그 결과, 잎, 수피, 근피에 공통적으로 2개의 밴드(SOD 4와 SOD 6), 즉 Fe-SOD와 CuZn-SOD가 검출되었으나, 밴드의 강약, 즉 각 isoenzyme의 활성은 차이가 있었다. 잎에서는 CuZn-SOD 활성이 높고 Fe-SOD 활성은 낮았으며, 근피에서는 CuZn-SOD보다 Fe-



**Fig. 4.** The isoenzymes of SOD in the leaves(1), stem bark(2) and root bark(3) of *Acanthopanax koreanum*.

SOD 활성이 상대적으로 높게 나타났다. 그리고, 수피에서는 CuZn-SOD 활성과 Fe-SOD 활성이 거의 비슷하게 나타났다. 하지만, 전체적으로 잎 조직에서 CuZn-SOD의 활성이 가장 높게 나타났다. 이는 CuZn-SOD가 세포질과 엽록체에 분포하는 것으로 미루어 보았을 때(Bowler *et al.*, 1992) 섬오갈피나무에서는 잎 조직의 엽록체에 CuZn-SOD가 많이 분포하기 때문인 것으로 판단된다. 같은 예로서 벼(*Oryza sativa*)에서 검출되는 CuZn-SOD I은 잎에 많이 존재하며 잎의 노화가 진행됨에 따라 증가하여 엽록체와 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다(Kanematsu and Asada, 1989). 또한, Fe-SOD는 일부 식물체의 엽록체에만 존재하는 것으로 보고되고 있는데(Bowler *et al.*, 1992), 본 Fe-SOD는 수피에서는 CuZn-SOD와 비슷한 활성을 나타내고 근피에서는 오히려 CuZn-SOD보다 높아 엽록체의 발달 단계와 관계가 있을 것으로 사료된다.

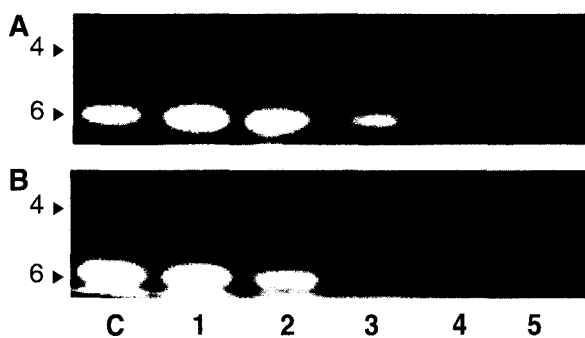
#### 섬오갈피나무 SOD isoenzyme의 열안정성

SOD의 산업적 이용을 위해서는 그 열안정성이 절대적으로 필요하다. 따라서, SOD 조효소액을 30-70℃ 하에서 1, 3시간 씩 가온하여 각 isoenzyme의 열안정성을 조사하였다(Fig. 5). 섬오갈피나무 잎의 조효소액을 온도별로 1시간 씩 처리하였을 때, CuZn-

SOD나 Fe-SOD 모두 30℃와 40℃에서는 높은 활성을 나타내어 대조구인 4℃와 차이가 없었다. 그러나, 50℃에서 크게 감소하였으며 그 이상의 온도에서는 더욱 감소하여 70℃에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다(Fig. 5A). 그리고 3시간 처리하였을 때에는 SOD 활성이 30℃에서는 대조구와 비슷한 활성을 나타내는데 반해 그 이상의 온도에서는 점차적으로 활성이 감소하였다(Fig. 5B). 즉, 40℃에서는 한 시간 동안 처리했을 때 CuZn-SOD와 Fe-SOD가 변화가 없었지만 3시간 가열시 모두 크게 저해되었으며, 50℃에서는 한 시간 처리했을 때 CuZn-SOD가 낮지만은 활성을 보였으나 3시간 가열시 완전히 저해되었다. 이러한 결과는 벼의 CuZn-SOD I과 II은 70℃에서 활성이 20-30% 감소하고 CuZn-SOD IV은 70℃에서 활성 감소가 관찰되지 않았던 것과 비교했을 때(Kanematsu and Asada, 1989) 열안정성이 대단히 낮은 것으로 나타났다. 하지만, horseradish와 사람에서 분리한 CuZn-SOD가 40℃에서 15분만에 활성이 상실되었던 것과 비교하였을 때(Eum *et al.*, 1998; Kim and Kang, 1997), 섬오갈피나무의 SOD isoenzyme은 열안정성이 높은 것으로 나타났다. 따라서, 본 SOD의 산업적 이용을 위해서는 열안정성에 대한 좀 더 많은 검토가 요구된다. 그리고, CuZn-SOD가 단량체로 존재할 때 이량체보다 열안정성이 높은 것으로 밝혀지고 있으므로(Kanematsu and Asada, 1989) 본 SOD의 subunit의 수와 구성에 대한 연구도 필요한 것으로 사료된다.

#### 적 요

두릅나무과 식물 6종의 잎으로부터 2개의 공통적인 superoxide dismutase(SOD) isoenzyme이 구분되었다. 이들 공통적인 isoenzyme(SOD 4와 SOD 6)의 패턴은 오갈피속 식물 중에서 민가시오갈피나무(*A. senticosus* for. *inermis*) 잎에서 가장 다양하였고, 그 활성은 섬오갈피나무(*A. koreanum*) 잎에서 가장 높았다. 그리고 SOD 4와 SOD 6은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 KCN에 의한 선택적 저해로부터 각각 Fe-SOD와 CuZn-SOD인 것으로 밝혀졌다. 또한, SOD isoenzyme의 패턴은 섬오



**Fig. 5.** Effect of temperature on the stability of CuZn-SOD and Fe-SOD isoenzymes in the leaves of *Acanthopanax koreanum*. The enzyme solution was incubated at 4℃(c), 30℃(1), 40℃(2), 50℃(3), 60℃(4), 70℃(5) for 1 hours(A) and 3 hours(B).

갈피나무의 성숙한 잎과 수피, 근피에서 차이가 없었으나 그 활성은 조직별로 차이가 나타났으며, Fe-SOD는 근피에서, CuZn-SOD는 잎에서 상대적으로 높게 나타났다. 그리고, CuZn-SOD나 Fe-SOD 모두 30-40℃에서 높은 활성을 나타내었으나 그 이상의 온도에서는 활성이 저해되었다.

## 사 사

본 연구는 1997년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(BSRI-97-4446)지원에 의한 연구 결과의 일부임.

## 인용문헌

- Allen, R.D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107:1049-1054.
- Alscher, R.G. and Hess, J.L. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton. pp.1-174.
- 안상득, 최은옥. 1992. 오갈피나무속 식물의 번식에 관한 연구 - 제1보 삼목시 생장조절물질이 발근에 미치는 영향. *고려인삼학회지* 16(2):138-145.
- Asada, K., Yoshikawa, K., Takahashi, M., Maeda, Y. and Enmanji, K. 1975. Superoxide dismutase from a blue-green alga, *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* 250:2801-2807.
- Bannister, J.V., Bannister, W.H. and Rotillio, G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22:111-180.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44:276-287.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Eum, W.S., Kwon, O.B. and Kang, J.H. 1998. Hydroxyl radical-generating function of horseradish CuZn-superoxide dismutase. *J. Biochem. Mol. Biol.* 31(5):492-497.
- Fridovich, I. 1974. Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* 41:35-97.
- Furusawa, I., Tanaka, K., Thanutong, P., Mizuguchi, A., Yazaki, M. and Asada, K. 1984. Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced superoxide dismutase activity. *Plant Cell Physiol.* 25:1247-1254.
- Kanematsu, S. and K. Asada. 1989. CuZn-Superoxide dismutases in rice: Occurrence of an active, monomeric enzyme and two types of isozyme in leaf and non-photosynthetic tissues. *Plant Cell Physiol.* 30(3):381-391.
- Kim, S.M. and Kang, J.H. 1997. Peroxidative activity of human CuZn-Superoxide dismutase. *Mol. Cells* 7(1):120-124.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 이상래, 윤의수, 이홍재, 이양수, 이종일. 1989. 한국에 자생하는 항암식물 개발에 관한 기초학적 연구. *동양자원식물학회지* 2(1):1-214.
- 이창복. 1985. 한라산의 특산 및 희귀식물, 한라산천연보호구역 학술조사보고서. 제주도. pp.215-242.
- McCord, J.M., and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.
- 오순자, 고정균, 김응식, 오문유, 고석찬. 1999. 두릅나무과 식물의 SOD활성과 광계II의 광화학적 효율에 미치는 온도 스트레스와 Paraquat의 영향. *한국환경생물학회지* 17(2):199-204.
- Scandalios, J.G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 101:7-12.
- Yu, Q. and Rengel, Z. 1999. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Plant Science* 142(1):1-11.

(접수일 1999. 5. 20)

(수리일 1999. 10. 20)