

벼 냉해의 초기 기작으로서 생체막과 세포질 사이의 대사 불균형

이근표 · 부용출 · 정진*

서울대학교 농생명공학부

초 록 : 식물의 저온 스트레스 및 방어체계에 대한 기작론적 연구의 일환으로서, 저온에서 보이는 벼 유묘의 성장력 상실과 생체막의 상전이 및 세포질 대사 변화 간의 상관관계를 조사하였다. 주변환경의 온도가 내려감에 따라 유묘의 성장속도는 점차 감소하여 약 13°C 이하에서는 생장이 실질적으로 정지하였다. 이 온도는 미토콘드리아 내막의 물리적 상전이 온도 및 기능적 상전이 온도와 일치하였다. 또한 해당과정의 중간생성물인 glucose 6-phosphate(G6P), fructose 6-phosphate(F6P)의 함량과 온도간의 상관곡선에서 보여주는 변곡점도 13°C 부근에서 나타났다. 이들 세포생리의 생화학적, 생물물리적 특성들의 불연속적 변화를 나타내는 온도들의 일치하는 저온하에서의 성장정지가 우선적으로 미토콘드리아막의 상전이에 기인하며, 이 상전이가 세포 대사의 불균형을 일으키는 주요인임을 시사한다. 저온처리된 벼를 다시 상온으로 옮겼을 때 축적된 G6P와 F6P 함량의 급격한 감소가 관찰되었다. 이는 상온환원시 TCA cycle을 거쳐 호흡전자전달에 필요한 전자공여체를 짧은 시간에 과다생성시키는 요인이 되어 결과적으로 세포의 산화적 스트레스를 일으키는 원인이 되는 것으로 해석하였다. (2000년 10월 5일 접수, 2000년 11월 2일 수리)

서 론

냉해는 식물체가 물의 빙점 보다 높은 어떤 저온에 노출되었을 때 나타나는 생리적인 장애이며, 저온에 대한 민감도는 식물체의 종류에 따라 차이가 있다.¹⁾ 벼는 아열대성 작물로서 일반적으로 10~17°C의 온도범위에서 냉해를 입는다.

본 연구실에서는 고등식물의 냉해 기작으로서 세포 생체막 특히 미토콘드리아막의 상전이 즉, 정상적인 기능을 유지하는데 필요한 액체결정상(liquid crystalline) 구조에서 경직된 고체교질상(solid gel)으로의 변화를 최초 과정으로하여, 세포 대사의 불균형과 superoxide radical(O₂⁻)의 과잉생성을 거쳐서 세포 및 조직의 손상에 이르는 일련의 과정을 제한한 바 있다.²⁻⁴⁾ 즉, 식물 세포가 냉해가 발생하는 낮은 온도에 노출되면 미토콘드리아막의 상전이가 일어나며, 이는 막에 결합된 호흡전자전달계 효소 활성을 저해한다. 그러나, 수용성 환경인 세포질에서 수행되는 대사 특히 해당과정에서는 상전이와 같은 급격한 변화가 없으므로 해당과정→TCA cycle→호흡전자전달에 이르는 세포대사에 불균형이 초래되며 이는 해당과정 대사 중간물질들의 축적으로 나타날 수 있다. 저온처리된 식물세포가 다시 상온에 놓이게 되면 과다하게 축적된 대사물이 정상으로 회복된 미토콘드리아막 내부에 들어가서 짧은 시간 내에 TCA cycle을 거쳐 전자공여체인 NADH와 succinate를 과잉생성하게 되고, 이때 전자공여체로부터 과량으로 공급되는 전자들 중 상당한 양은 호흡에 정상적으로 이용되는 대신 호흡계에서 일어나는 전자전달의 부반응을 거쳐 소모됨으로서 O₂⁻ 및 과산화수소와 같은 활성산소의 과잉생성을 초래할 것이다.

그러나 여러가지 정황적 증거에도 불구하고, 식물의 냉해발

현 온도 범위에서 미토콘드리아막 활성의 기능적 상전이가 일어난다는 점^{2,5)}과 저온처리된 식물을 상온으로 환원시키면 조직중에 O₂⁻의 과잉생성이 나타나고 이에 수반하여 항산화효소의 활성화가 일어난다는 사실^{3,4)}을 제외하면, 상기한 바와 같은 일련의 냉해기작을 입증할 만한 실험적 증거는 빈약하다. 따라서 저자들은 우선 미토콘드리아막의 기능적 상전이가 물리적 상전이에 기인하는가, 해당반응의 효소계에서는 활성의 상전이가 일어나지 않는가, 그렇다면 해당반응의 대사물이 당연히 저온에서 축적될 것인데,⁴⁾ 저온처리된 식물체를 상온으로 환원시키면 축적된 대사물은 빠르게 소진되는가 등의 의문을 제기하였다. 나아가 세포의 에너지대사에 관여하는 다른 중요한 생체막들인 티라코이드막과 원형질막은 냉해발현 온도구간에서 상전이를 일으키는 지 여부도 규명하여야 할 사항이다. 본 연구는 이러한 의문들에 대한 구체적인 해답을 얻기 위하여 수행되었으며, 여기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

유묘재배, 온도처리 및 성장력 측정

국립종자공급소에서 구입한 벼 종자(다산벼)를 암소에서 발아시킨 후, Hoagland 용액을 이들에 한번씩 교환하면서 수경재배하였다. submitochondrial particle(SMP), 원형질막의 분리 및 여러가지 효소의 활성 측정에는 27°C 암소에서 8일간 재배한 유묘의 잎을 사용하였다. 한편, 상기한 바와 같이 재배한 유묘를 4~24°C의 온도범위내의 여러온도(약 2°C 간격)에서 48시간 동안 암소에 노출시킨 후, 유묘의 성장력(유묘의 길이와 건물중량)의 변화를 측정하였다. 아울러 glucose 6-phosphate (G6P)와 fructose 6-phosphate(F6P)의 함량분석을 수행하였다. 티라코이드는 따로 27°C, 30 W/m²의 광조건하에서 8일간 재배한 벼의 잎으로부터 분리하였다.

찾는 말 : 벼, 냉해, 대사불균형, 막상전이

*연락처 : Tel : 82-31-290-2406; Fax : 82-31-293-8608

E-mail : jinjung@plaza.snu.ac.kr

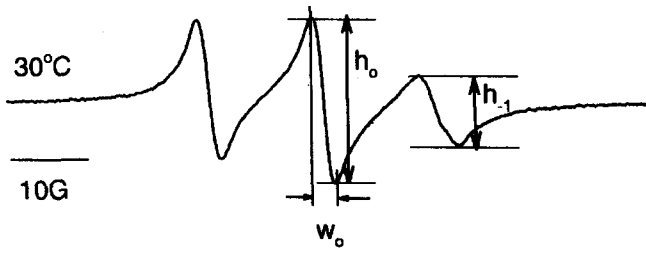


Fig. 1. Typical ESR Spectrum of 16NSM incorporated to the mitochondrial inner membrane.

생체막의 분리

SMP의 분리는 Ikuma에 의해 기술된 differential centrifugation 방법을 일부 보완하여 분리한 미토콘드리아를 초음파 처리하는 통상적인 방법을 따랐다.⁶⁾ 초음파처리는 Ultrasonic disintegrator(MSE, Soniprep 150)로 20 Hz에서 15초씩 4회 실시하였다. 티라코이드는 Leegood과 Malkin에 의해 기술된 방법을 일부 보완하여 분리하였다.^{7,8)} 원형질막의 분리는 Larsson 등에 의해 기술된 phase partitioning 방법에 준하였다.^{9,10)} 즉, differential centrifugation에 따라 분리한 microsomal membranes을 6.6%(w/w) dextran T-500과 6.6%(w/w) polyethylene-glycol 3350의 two-phase system에서 phase-partitioning하였다.¹¹⁾

전자스핀공명 (ESR) 실험

생체막의 상전이 온도는 Gaffney에 의해 기술된 ESR spin labeling 방법에 따라서 측정하였다.^{12,13)} spin label로서 16번 탄소에 nitroxide가 결합된 methyl stearate인 16NSM(2-(14-carbomethoxytetradecyl)-2-ethyl-4,4-dimethyl-3-oxazolidinyloxy)을 사용하였다. methanol에 녹인 2 mM 16NSM 10 μl를 시험관에 넣고 질소로 methanol을 증발시킨 다음 SMP, 티라코이드 또는 원형질막을 넣고 초음파처리함으로써 16NSM을 생체막에 삽입시킨 현탁액을 얻었다. 이 현탁액을 이용하여 0~40°C 범위의 여러온도(2°C 간격)에서 ESR spectra를 측정하였다(Fig. 1). spin label motion (τ_0)은 다음 식을 이용하여 구하였다.

$$\tau_0 = 6.5 \times 10^{-10} \times w_0 (h_0/h_1 - 1)^{1/2}$$

16NSM의 spectrum은 세 개의 line으로 나타나며, 식에서 w_0 와 h_0 는 mid line의 폭과 높이를, h_1 은 high field line의 높이를 각각 나타낸다. 이때 사용한 기기는 JEOL ESR spectrometer(TE200)이며, 측정파라미터는 다음과 같다. power, 1 mW; frequency, 9.18713 GHz; center field, 328.212 mT; modulation width, 0.2 mT; sweeping time, 2 min; sweeping width, 8 mT.

효소 활성 측정

유묘의 잎 조직 5 g을 grinding medium(50 mM Tris-Cl, 0.2 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7.5) 20 ml 중에서 마쇄하고, 20,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 phosphofructokinase(PFK)의 활성측정에 사용하였다. PFK의 활성은 Kruger와 Dennis에 의해 기술된 enzyme-coupled method를 이용하였으며,¹⁴⁾ 미토콘드리아 내막의 생리 활성은 cytochrome c

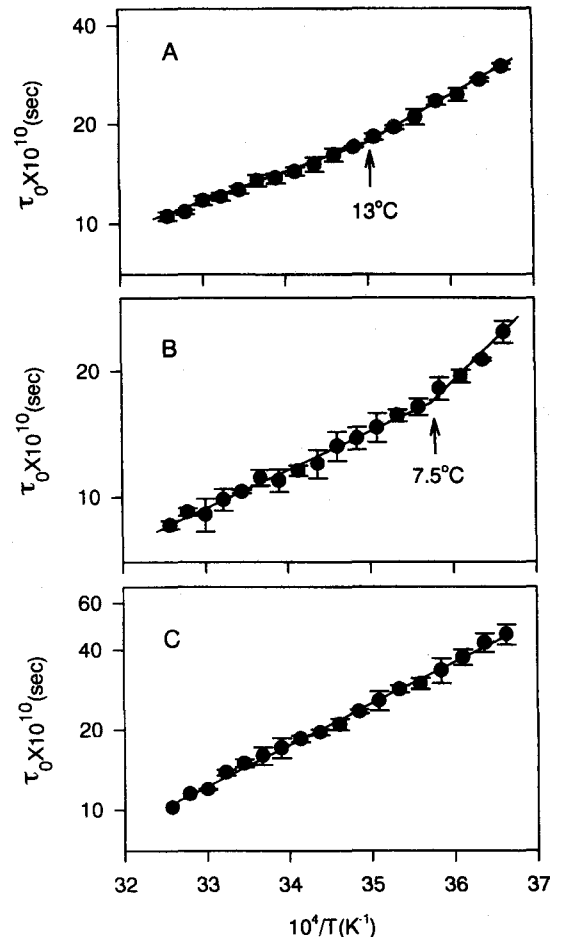


Fig. 2. Arrhenius plots for spin label motion (τ_0) of 16NSM incorporated in mitochondrial inner membranes (A), thylakoid membranes (B) and plasma membranes (C) from rice plants. The discontinuity in the slope indicates the occurrence of a change in physical phase of the membrane lipid. The results are expressed as mean \pm SD (n=3).

oxidase를 대상으로하여 Smith에 의해 기술된 방법에 준하여 측정하였으며,¹⁵⁾ 이를 위해서 내막이 노출된 SMP를 준비하여 사용하였다. 단백질의 함량은 Lowry등에 의해 기술된 방법을 따라 측정하였다.¹⁶⁾

G6P 및 F6P 함량 분석

채취 후 즉시 액체질소로 동결시킨 벼 잎 1g을 10% perchloric acid 10 ml 중에서 마쇄하여 20,000 g에서 10분간 원심분리한 다음 그 상정액을 5 N KOH로 중화하여 분석에 사용하였다. G6P와 F6P의 함량은 조직 추출액에 NADP와 G6P dehydrogenase 및 phosphoglucisomerase를 첨가할 때 일어나는 NADP의 총환원량으로부터 계산하였다.¹⁷⁾

결 과

생체막의 상전이 온도는 Fig. 1에 보여준 바와 같이 probe 물질인 16NSM의 ESR spectra를 이용하여 측정된 spin label motion(τ_0)의 온도의존성을 나타내는 Arrhenius plot들로부터 구

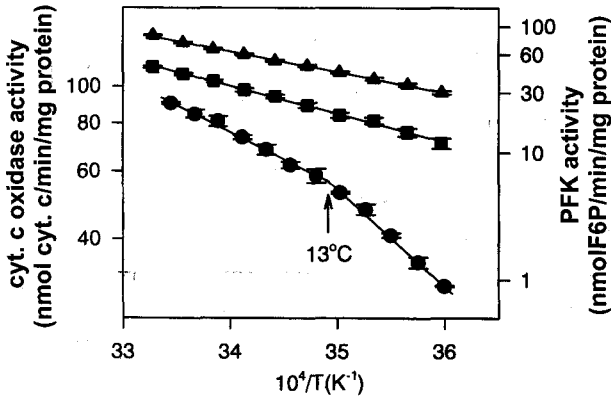


Fig. 3. Arrhenius plots for activities of cytochrome c oxidase (●), ATP-PFK (■) and PPI-PFK (▲) from etiolated rice plants. The results are expressed as mean ± SD (n=3).

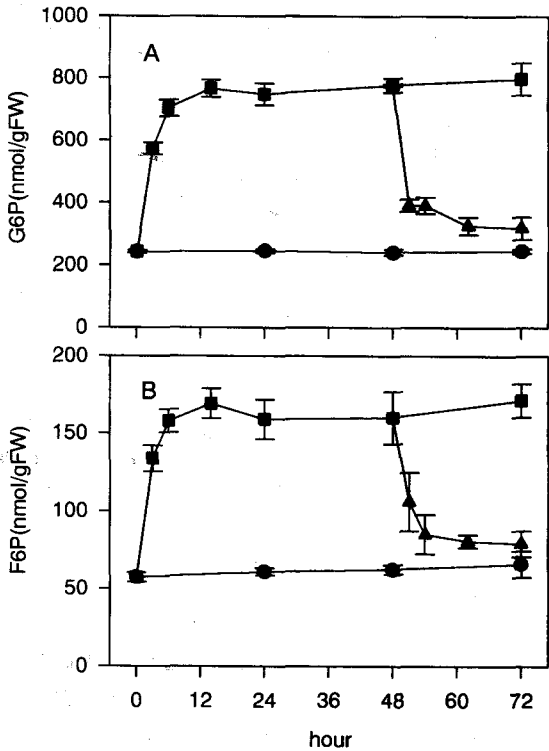


Fig. 4. Changes in the content of G6P (A) and F6P (B) in rice seedlings during low-temperature and rewarming treatment. The rice seedlings were kept at 4°C in the dark for 2 days and then transferred to 27°C. ●; control (27°C), ■; low-temperature treatment (27°C → 4°C), ▲; rewarming treatment (4°C → 27°C). The results are expressed as mean ± SD (n=3).

하였다. 각 plot 상의 불연속점으로 지시된 상전이 온도는 미토콘드리아 내막에서 13°C 그리고 티라코이드막에서 7.5°C로 각각 확인되었다. 이에 반하여 원형질막의 경우는 최소한 0°C 이상의 온도에서는 상전이를 보이지 않았다(Fig. 2).

미토콘드리아막에 결합되어 있는 호흡전자전달계의 속도결정 단계로 알려진 cytochrome c oxidase와 해당과정의 주 조절효소로서 세포질에 존재하는 PFK를 대상으로하여 그 활성에 대한 Arrhenius plot을 얻었다(Fig. 3). 이로부터 측정된 cytochrome c oxidase 활성의 상전이 온도는 미토콘드리아 막지질

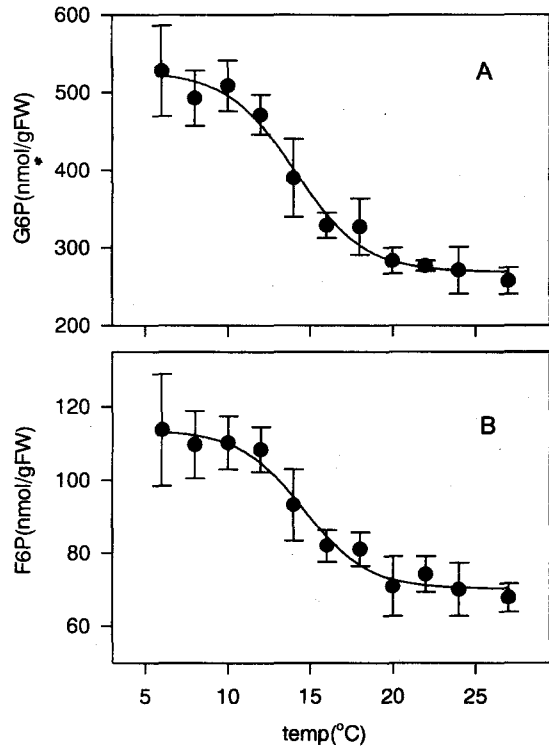


Fig. 5. Changes in the content of G6P (A) and F6P (B) in rice seedlings as functions of temperature. The seedlings were placed at various suboptimal temperatures for 2 days in the dark. The data were fitted to a sigmoidal curve using the software of SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc.). The results are expressed as mean ± SD (n=3).

의 물리적인 상전이 온도와 일치함을 알았다. 그러나 PFK의 경우에는 ATP-PFK나 PPI-PFK 공히 효소활성의 상전이를 보이지 않았다.

이상의 결과로부터, 벼 유묘(다산벼)가 13°C 이하의 온도에 놓이게 되면 상온하에서 그 세포내에 유지되던 해당과정-호흡과정 균형이 미토콘드리아막의 물리적, 기능적 상전이에 기인하여 깨지게 되며, 따라서 해당과정의 주조절효소인 PFK의 기질인 F6P가 축적되고 나아가 그 전단계 대사물질인 G6P 역시 축적될 수 있다. 이러한 추론적 가능성을 검토하기 위하여 유묘의 노출(2일간) 온도와 대사물 축적량과의 상관관계를 조사한 결과, 온도가 감소할수록 F6P와 G6P의 세포내 함량은 증가하였으며 온도-함량 곡선에서 그 변곡점이 12~15°C 범위내에서 나타났다(Fig. 4).

상온에서 재배한 유묘를 4°C에 노출시킨 다음 F6P와 G6P의 경시적 함량변화를 측정된 결과 약 6시간의 저온처리 동안에 그 함량은 3배 이상 가파르게 증가하였으며 그 이후로는 거의 일정한 수준을 유지하였다. 48시간 저온처리한 유묘를 다시 상온하에 옮겼을 때 이들 해당반응 대사물의 함량은 급격하게 감소하여 6시간 후에는 저온처리를 받지 않았던 대조구의 수준에 접근하였다(Fig. 5).

생장 최적온도(27°C)에서 재배한 유묘를 최적온도보다는 낮은 여러 온도에 48시간 동안 노출시킨 다음 노출 온도에 따른 성장력의 변화를 조사하였다. 성장력의 지표로 삼은 상부조직의 길이(shoot height)와 건물중(dry weight)은 공히 온도가 내

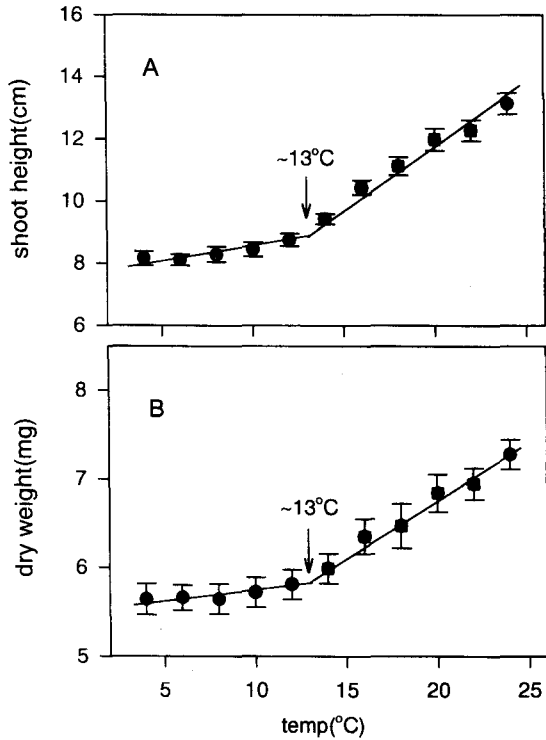


Fig. 6. Changes in shoot height (A) and dry weight (B) of rice seedlings as functions of temperature. The temperature treatment is the same as in Fig. 5. The results are expressed as mean \pm SD (n=15~20).

려갈수록 거의 직선적으로 감소하였으며 이러한 현상은 약 13°C 까지 지속되었다. 그러나 그 아래의 온도로 내려가면 감소율은 극히 미미하여 생장이 실질적으로 정지상태에 도달하였음을 알 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

생체막의 상전이는 일반적으로 물리적 환경변화에 민감한 분광학적 특성과 함께 막 내부로 쉽게 침투할 수 있는 화학물을 probe로 이용하여 조사할 수 있다. 본 연구에서 사용한 16NSM은 이러한 요건을 갖춘 물질로서 그것이 결합되어 있는 막의 유동성 변화는 그 ESR spectra의 특징적 파라미터에 반영된다.¹³⁾ 세포막의 상전이 온도는 여러 가지 요인에 의해 결정되지만 막의 주 구성물질인 극성지질의 지방산 조성이 가장 중요한 인자라는 것은 널리 인정된 사실이다.¹⁾ 즉 불포화도가 큰 지방산의 조성비가 높을수록 막의 상전이 온도는 낮아진다. 세포에는 여러 종류의 생체막이 존재하나 세포 에너지 대사는 특히 미토콘드리아 내막, 티라코이드막 및 원형질막의 생화학적 활성과 밀접한 관계가 있다. 서로 다른 생체막은 그 기능의 차이에 못지 않게, 그 화학적 조성의 차이도 크다. 그리고 이러한 화학적 조성의 차이는 상전이 온도의 차이로 나타날 수 있다. 실제로 벼 유묘의 원형질막은 최소한 4°C 이상의 온도에서는 상전이를 보이지 않았음에 반하여 미토콘드리아막은 냉해발현이 관찰되는 온도에서 상전이를 보였으며, 티라코이드막의 상전이는 이보다는 훨씬 낮은 온도에서 일어났다.

미토콘드리아 내막의 상전이 온도가 약 13°C로 측정되었고 이 온도를 분기점으로 하여 그 막의 대표적 생화학적 기능인 전자전달반응의 활성화에너지가 현저하게(cytochrome c oxidase를 지표로 하여 측정하였을 때 약 2배정도) 변화하였다는 관찰은 막의 물리적 상전이가 기능적 상전이에 직결됨을 의미한다. 세포대사의 주 에너지 형태인 ATP의 생합성이 전자전달반응과 짝지워져 있음을 고려할 때, 미토콘드리아 호흡활성이 갑작스럽게 떨어졌다는 사실(즉 호흡 활성화에너지가 불연속적으로 그리고 큰 폭으로 증가하였다는 사실)은 전반적으로 세포 에너지 대사가 정지 상태, 나아가서 식물생장이 실질적으로 정지상태에 도달하였음을 의미한다. 이러한 추론의 정당성은 유묘의 성장력과 온도와의 관계를 조사한 실험데이터에 의해 입증된 셈이다. 왜냐하면, 적절한 생장온도하에서 재배한 벼는 저온 처리시 온도가 내려갈수록 신장과 건물중의 증가속도가 직선적으로 감소하다가 미토콘드리아막의 상전이 온도인 13°C에 이르게 되면 거의 최소치에 접근하여 그 이하의 온도에서의 변화는 극히 미미하였기 때문이다.

수용액 상태인 세포질이 결빙되지 않는 한, 미토콘드리아 내막에서 볼 수 있었던 바와 같은 기능적 상전이를 세포질의 효소계에서 기대하기는 어려우며, 실제로 해당반응 주조효소인 PFK 활성의 Arrhenius plot 결과는 이를 뒷받침하였다. 따라서 상전이 온도 이하의 한 저온에 노출된 유묘 내에는 해당반응 대사 중간물질, 특히 주조효소의 기질들이 축적될 것이며 유묘를 다시 상온으로 환원시키면 다시 기능을 회복한 미토콘드리아막의 생화학적 활성에 의해 빠르게 소모되어 정상적 수준으로 되돌아갈 것으로 기대된다. 이러한 기대 역시 G6P와 F6P의 함량 분석결과와 일치하였다. 이상의 모든 결과들은 기능적 상전이가 일어나지 않는 세포질 대사와 상전이가 일어나는 미토콘드리아 대사간의 불균형이 냉해기작의 최종과정이라는 본 연구의 기본적 가정에 어느 정도 구체적인 근거를 마련한 것이라고 볼 수 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업(MAFF-SGRP, grant N. 295097-5) 연구비 지원에 의해 수행된 과제의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Lyons, J. M. (1973) Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**, 445-66.
2. Jung, J. and Kim, H.-J. (1987) Transition temperature of mitochondrial respiratory activity as an index for chilling susceptibility of varieties of rice plant. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **30**, 357-363.
3. Kim, J.-P., Hyun, I. and Jung, J. (1987) Postchilling accumulation of superoxide in cells and chilling injury in rice plant. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **30**, 364-370.
4. Kim, J.-P., Hahn, C.-K. and Jung, J. (1991) Induction of antioxygenic enzymes as defence systems in plant cells against low temperature stress: (1) accumulation of pyruvate in cells

- during cold treatment and activation of antioxygenic enzymes during post-chilling period. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **34**, 162-167.
5. Jung, J., Lee, S.-K., and In, M.-J. (1985) Biochemical study on mechanism of chilling injury of rice: III. the transition temperature of mitochondrial respiration activity and chilling injury. *Agricultural Research Seoul National University* **10**, 51-59.
 6. Ikuma, H. (1970) Necessary conditions for isolation of tightly coupled higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* **45**, 773-781.
 7. Leegood, R. C. and Malkin, R. (1986) In 'Photosynthesis: Energy Transduction,' Hipkins, M. F. and Baker N. R., Eds., pp.143-187, IRL Press, Oxford.
 8. Jung, J. and Kim, H. S. (1990) The chromophores as endogenous sensitizers involved in the photogeneration of singlet oxygen in spinach thylakoids. *Photochem. Photobiol.* **52**, 1003-1009.
 9. Larsson, C., Widell, S. and Kjellbom, P. (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.* **148**, 558-568.
 10. Laporte, K. and Rossignol, M. (1997) Auxin control of the sensitivity to auxin of the proton translocation catalyzed by the tobacco plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Growth Regul.* **21**, 19-25.
 11. Kim, Y.-S., Kim, D. and Jung, J. (1998) Isolation of a novel auxin receptor from soluble fractions of rice (*Oryza sativa* L.) shoots. *FEBS Letters* **438**, 241-244.
 12. Gaffney, B. J. (1974) Spin-label measurements in membranes. *Methods Enzymol.* **32**, 161-197.
 13. Raison, J. K., Chapman, E. A. and White, P. Y. (1977) Wheat mitochondria: oxidative activity and membrane lipid structure as a function of temperature. *Plant Physiol.* **59**, 623-627.
 14. Kruger, N. J. and Dennis, D. T. (1987) Molecular properties of pyrophosphate:fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tuber. *Arch. Biochem. Biophys.* **256**, 273-279.
 15. Smith, L. (1955) Spectrometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods Biochem. Anal.* **2**, 427-434.
 16. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 17. Sicher, R. C., Kremer, D. F. and Harris, W. G. (1986) Control of photosynthetic sucrose synthase in barley primary leaves. *Plant Physiol.* **82**, 15-18.

Metabolic Imbalance between Glycolysis and Mitochondrial Respiration Induced by Low Temperature in Rice Plants

Keun Pyo Lee, Yong Chool Boo and Jin Jung*(School of Agricultural Biochemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract: Correlations between mitochondrial respiration, glycolysis activity and overall growth activity of rice (*Oryza sativa*: cv. Dasan) seedlings during low temperature exposure were studied in order to provide insights into the underlying mechanism for the primary phase of chilling injury in plants. Among cellular membranes involved in energy metabolism, only the mitochondrial inner membrane showed not only physical phase transition at ca. 13°C, as monitored by ESR spin label, but also functional phase transition at the same temperature, as assessed by cytochrome c oxidase activity. The main regulatory enzyme of glycolysis, phosphofructokinase, *in situ* did not suffer phase transition of its activity at least in the 4-27°C range. Low temperature caused a significant accumulation of glucose 6-phosphate (G6P) and fructose 6-phosphate (F6P), which disappeared almost completely on rewarming of the seedlings. Temperature profiles of the steady state levels of G6P and F6P revealed the inflection point appearing at around phase transition temperature of the mitochondrial membrane. The results conform to our previous proposition on the mechanism for the early stage events of chilling injury that the accumulation of glycolytic metabolites in cells due to metabolic imbalance at low temperature gives rise to an excess supply of electrons during rewarming period, which, in turn, results in overproduction of active oxygen in mitochondria.

Key words: *Oryza sativa*, chilling injury, phase transition, metabolic imbalance

*Corresponding author