

바이오센서에 의한 뿌리 원형질막에서의 H⁺-ATPase의 활성측정

†천 병 수 · ¹정 갑 채 · ²유 종 수 · ³渡邊 悅生
†연세대학교 의과대학, ¹전남대학교 생물공학연구소, ²한국해양대학교 해양과학기술연구소, ³東京水産大學院
(접수 : 2001. 12. 28., 게재승인 : 2002. 2. 18.)

Expression of Plasma Membrane H⁺-ATPase in the Roots of Plants Under Low Temperature

Byeung Soo Cheun†, Gap Chae Chung¹, Jong Su Yoo², and Etsuo Watanabe³

†Yonsei University, College of Medicine, Medical Research Center, Shin Chon-dong 134 Seodaemun-Gu, Seoul, Korea

¹Division of Applied Plant Science, Institute of Biotechnology, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

²Research Institute of Marine Science and Technology, Korea Maritime University, Pusan 606-791, Korea

³Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minatoku, Tokyo 108 Japan

(Received : 2001. 12. 28., Accepted : 2002. 2. 18.)

The enzyme sensor for ATPase activity consisted of an immobilized membrane of two enzymes, purine nucleoside phosphorylase (NP) and xanthine oxidase (XOD), and oxygen electrode. The H⁺-transport rate of the plasma membranes increased by low root temperature. A cucumber and a pumpkin plasma membrane H⁺-ATPase activities measured by the proposed sensor system were in good agreement with the results obtained by a conventional UV spectrometer assay. One cycle of assay could be completed within 3 minutes.

Key Words : H⁺-ATPase, plasma membrane, stress, ATPase biosensor, spectrometer

서 론

상업 발달로 인한 자연 생태계 파괴, 지구 환경의 급격한 변화로 인해 식물 환경 스트레스가 식물의 성장요인에 악순환을 거듭하고 있는 현 시점에서 식물 스트레스 연구 분야는 아직도 제자리 걸음을 하고 있는 실정이다. 이러한 환경 변동에 식물체의 인지 및 적응 기작을 연구하는 분야로 생화학, 생리학, 유전학적 연구가 있으나 광범위한 연구로만 확대될 뿐 이렇다할 성과는 거두지 못하고 있다. 즉 식물체내에서의 종류별 스트레스에 의한 세포에서 유도되는 현상들을 유전자시대로 알려진 오늘날에 그저 분자레벨로만 감응 기작과 발현 변이 등을 해결하려는 일조일단의 연구에만 힘을 쏟고 있는 실정이다. 식물은 저온에 노출되면 외형적인 증상으로 위조(wilting)가 일어나고(1) 식물체가 저온의 영향으로 대사과정이 저하하는 것을 보상 하기 위하여 단백질의 합성이

이루어진다는 cold-shock protein이 drought stress에 의해 생성된다는 사실이 알려져 있다(2). 저온 식물체에서 진화 과정에서 받은 water stress의 형태로 나타난 것으로 해석된다. 즉 저온 스트레스에 의한 식물체의 수분흡수 장애는 토양 액과 세포 내 water potential gradient에 의해 이루어지며 원형질막에 의한 solute transport 저온 하에서 활성화 된다(2). 즉 ATPase의 움직임은 이미 식물의 생리대사에 영향력이 크다고 알려져 있다(3). ATPase활성으로 창출되는 세포내의 조절은 이온흡수, 호르몬의 생장조절에 이르기까지 발현 능력이 인정되었다(4). 특히 식물체의 원형질막 ATPase를 순수하게 분리 정제하면 이것이 프로톤 펌프(H⁺-ATPase)인 것으로 이미 확인이 되었다(5).

이러한 점을 감안해서 본 연구에서는 특히 환경변화와 저온 스트레스에 민감한 오이, 호박을 선택하여 저온 스트레스에 의한 기작 반응을 인지하는 이온 채널 들의 식물에 가해지는 수송능력의 변화에 따른 능동 운송과 스트레스 감응 능력에 따른 생리학적 규명으로 의미 있는 연구로 사료된다.

즉 급격한 환경 이변에 의한 저온성 폭우는 농작물에서도 큰 손해를 끼치고 있으며, 환경과 기상 이변에 따른 식물 내성 연구는 더욱 큰 의미를 부여할 것으로 사료된다. 이러한 수분 부족에 K⁺, Ca²⁺ 이온의 움직임만을 연구한 방법에서

†Corresponding Author : Yonsei University, College of Medicine, Medical Research Center, Shin Chon-dong 134 Seodaemun-Gu, Seoul, Korea

Tel : +82-2-361-8348 (8367)

E-mail : bscheun@yumc.yonsei.ac.kr

탈피하여 수분 극복을 위한 순간 H^+ -ATPase의 활성화에 중점을 두고 저온 처리에 의한 원형질막에서의 H^+ -ATPase의 이온 이동변화를 알아보았다. 지금까지는 생체막의 구조기능 변화는 물론 식물 저온 스트레스에 의한 세포내 물질 운송 기작에 의한 H^+ -ATPase의 메카니즘을 규명하기 위한 수단으로 원형질막 분리에 의한 활성도를 비교하는데 연구가 진행되었지만(1-5) 막대한 시간과, 고가기기, 복잡한 전처리과정을 통한 원형질막 분리측정에 종래법인 UV spectrometer법을 사용해왔는데 이 방법을 개선하고자 효소 고정화를 이용한 바이오 센서 system을 구축하여 전기 화학적 potential로 O_2 의 움직임을 전기신호로 감지하는 바이오 센서의 응용에 그 목적을 두었다. 또한 UV spectrometer법과(3) 저자 등이(6) 개발한 종합 ATPase 센서를 이용해서 전기 potential에 의한 stress 감응물질의 기작을 비교 측정하여 데이터 베이스화하는데 목적이 있으며, 효율적으로 자연환경 인지 저온 스트레스에 의한 단순 물리적 현상을 모식화, 수식화 하는데도 그 목적이 있다. 앞으로도 진속, 경제적, 시료의 전처리 간소화 등의 센서의 필연성을 도입하여 저온에 의한 수분 이동 변화를 H^+ -ATPase활성도로 충분히 측정 가능하리라 사료된다(6-7).

재료 및 방법

재료

재료로는 오이, 호박을 파종하여 재배한 것의 잎과 뿌리를 이용하였으며, 오이는 6°C, 호박은 10°C에서 1시간 동안 저온 처리한 것을 이용하였다.

측정방법

UV spectrometer법

저온 스트레스 감응 H^+ -ATPase의 막지질 조성 규명을 위해서 원형질막은 2-phase partitioning에 의한 분리법을 이용하였다. H^+ -ATPase의 활성측정으로는 25mM Mes-Tris (pH 6.5), 1.5 mM $MgSO_4$, 50 mM KCl, 1.5 mM Tris-ATP에 효소를 첨가한후 37°C, 30분간 배양하여 1% ammonium molybdate, 2 N H_2SO_4 에 의해 720 mM에서 UV spectrometer로 측정하였다(2).

바이오센서법

PVA막에 의한 효소 고정화법

PVA(poly vinyl alcohol)에 purine nucleoside phosphoryrase (NP)와 xanthine oxidase(XOD)를 1:1로 혼합하여 유리판 위에 부운 뒤 냉장고 내에서 서서히 굳힌다. 고정화 막은 실온에 보관하고 필요에 따라 1장씩 사용하였다.

산소 전극의 제작 및 측정장치

전극은 carbony전지식 침착형 산소 전극을 이용했다. 전극 선단부에 purine nucleoside phosphoryrase(NP)와 xanthine oxidase(XOD)를 PVA막에 고정화 시킨것을 전극에 부착시켜 ATPase 활성 측정용 센서를 구축하였다.

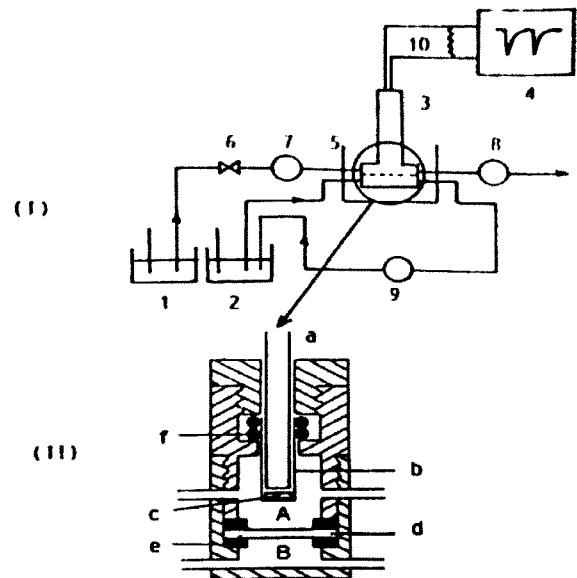


Figure 1. Schematic diagram of the enzyme sensor system for ATPase activity. (I) Sensor system 1. Buffer tank 2. Substrate tank 3. Oxygen electrode 4. Recorder 5. Thermostatically controlled bath 6. Injection port 7-9. Peristaltic pump 10. Resistance (II) Magnification of the flow cell a. Oxygen electrode b. Triacetyl cellulose filter c. Enzyme membrane d. Dialysis membrane filter e. Teflon rubber f. Rubber ring The interior of the flow cell is separated into A and B portions by the membrane.

센서 측정방법

본 연구에서는 페리스타 펌프(peristaltic pump)를 이용하여 0.01M Tris-HCl완충액(pH7.0)에 기질인 ATP와 inosine 첨가 시약을 혼합하고 Flow cell안으로 이동하여 센서의 출력치가 안정된 상태에서 미리 정제된 오이, 호박의 뿌리, 잎의 원형질막에서 추출한 H^+ -ATPase시료를 주입시켜 출력 전류 감소치로 부터 H^+ -ATPase 활성을 측정하였다.

센서 측정조건

효소 센서는 사용하는 용도에 따라 최적 조건에 미치는 영향이 크게 작용하므로 완충액의 pH, 온도, 유속, 기질의 농도 등에 민감하지만 기존의 조건으로 설정했다(6). 또한 본 실험에서 사용된 Flow cell은 2중막 셀을 이용했으며 막 확산 속도에 의해 확산 반응할 수 있게 두 유속을 달리하여 조절하였다. 완충액으로는 0.01 M Tris-HCl을 사용하고 pH 7.0, 온도 30°C, 이송 액 주입구 유속은 0.4 mL/min, 반응 조는 0.6 mL/min로 설정하고 ATP농도는 0.04 mg/ml, inosine농도는 0.2 mg/mL을 사용하였다. 이것을 Figure 1에 나타내었다(6).

H^+ -ATPase활성측정

ATP는 ATPase에 의해 ADP와 P_i 로 분해된다. Inosine은 purin nucleoside phosphorylase (NP)에 의해 P_i 가 분해 작용하여 Hypoxanthine으로 된다. 여기에서 Hypoxanthine은 xanthine oxidase (XOD)효소에 의해 분해되어 그 반응 발현에 O_2 를 필요로 하며 Uric acid로 된다. 이러한 효소 반응을 이용하여 H^+ -ATPase활성을 측정한다. 활성치는 센서에서는 검출선에 의하고 UV법은 P_i 분해 산출량으로 환산하였다.

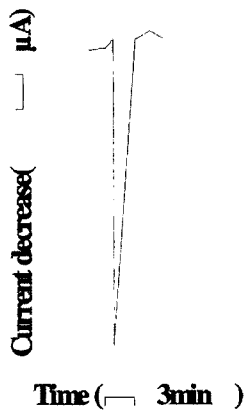


Figure 2. Current response curve for ATPase activity Conditions: pH7.0, Temp 30°C, Flow rate 0.4, 0.6 mL/min, ATP concn 0.04 mg/mL, Inosine concn, 0.2 mg/mL, Sample 50µL.

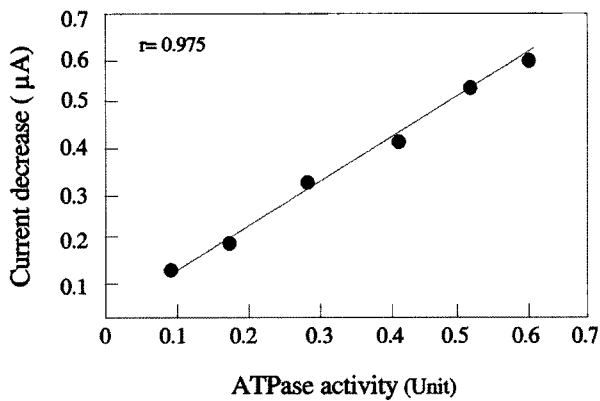


Figure 3. Calibration curve for determination of ATPase activity in the enzyme biosensor. Experimental conditions are the same as in the Figure 2.

결과 및 고찰

센서의 응답성

시료를 주입했을 때 센서 진단의 화학 작용에 의해 산소의 필요량으로 측정되며 전류 감소 치로 기록계에 기록되며 이 때 산소 소비량(Pi의 농도)이 ATPase 활성화에 해당한다. 이것을 Figure 2에 나타내었다.

H⁺-ATPase활성측정 (ATPase 검출선)

연구에 사용된 원형질막에서의 H⁺-ATPase활성 측정을 위해서 시판된 SIGMA 사의 ATPase 표준용액을 Unit별로 작성하여 ATPase센서 조건 하에서 검출선을 작성하였다. Figure 3에서 나타낸 것과 같이 r=0.975로 좋은 결과를 얻었으며 본 센서가 H⁺-ATPase 측정에 유용하게 사용 가능할 것으로 사료된다.

오이, 호박 원형질막에서 분리된 H⁺-ATPase의 UV spetrometer 법과 바이오 센서법과의 상관성

바이오 센서법과 종래법(UV법)을 이용해서 오이, 호박 원형질막에서 분리된 H⁺-ATPase의 활성치를 측정하였다. 그 결과 Figure 4에서 나타낸 것과 같이 오이, 호박에서 모두 조금의 측정 범위는 인정되나 센서법과 종래법에서 좋은 상관치

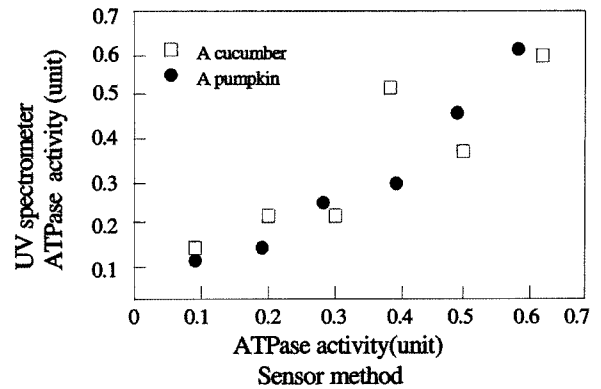


Figure 4. Correlation between ATPase activity determined by the sensor and the conventional methods. Experimental conditions are the same as in he Figure 2.

Table 1. The effect of different root temperatures on the activities of H⁺-ATPase in the plasma membrane of a cucumber and a pumpkin.

Temperature(°C)	H ⁺ -ATPase activity(unit)	
	A cucumber	A pumpkin
20°C	0.47	0.47
15°C	0.43	0.43
10°C	0.46	0.46
6°C	0.63	0.63

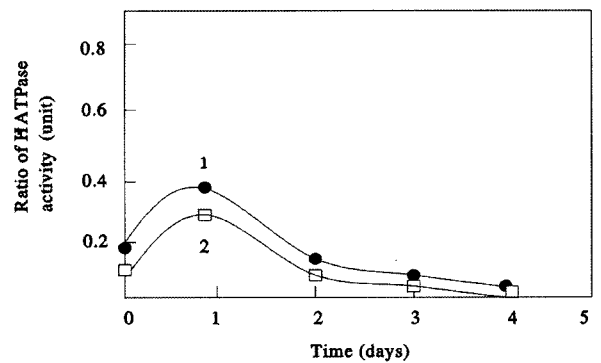


Figure 5. Effect of low leaf temperature days on the plasma membrane H⁺-ATPase activity pumpkin and cucumber 1. Pumpkin 2. Cucumber.

를 나타내었다. 이러한 결과로부터 센서의 유용성이 생리적으로까지 널리 쓰일 수 있는 가능성을 시사하였다.

식물 저온 스트레스에 의한 각 온도별 오이, 호박에서의 H⁺-ATPase활성치

Table 1과 Figure 5에서 보는 바와 같이 뿌리와 잎에서의 각 온도에 따른 H⁺-ATPase 활성치를 온도별로, 시간별로 측정된 결과, 오이에서는 20°C에서 10°C까지는 변화가 없었으나 6°C에서 1시간 저온 처리한 시료를 추출해 측정된 결과, 급격히 증가치를 나타내었다. 또한 호박에서는 20°C에서 15°C까지는 변화가 없었으나 10°C에서 1시간 저온 처리한 것은 급격히 증가치를 나타내었다. 호박의 경우 6°C까지 온도를 낮춰 시료를 추출해 측정된결과 급격히 감소함을 나타내었다. 이런 결과로부터 오이, 호박 모두 저온 한계치를 넘을 경우 H⁺-ATPase 활성치는 증가하지 않고 식물 전체 세포에

해를 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 저온 처리에 의한 H⁺-ATPase 활성치는 임계점을 경계로 활발했다가 세포의 생리적인 활성이 중지됨을 의미한다. 식물 저온에 의한 스트레스는 환경, 수분흡수 뿐만이 아니라 생리적으로 H⁺-ATPase 활성치에까지 큰 영향을 끼침을 알 수 있었다.

본 센서로 시료 한 개를 측정하는데 걸리는 시간은 3분이 소요되며 센서법과 종래법과의 측정결과 사이에 좋은 상관치를 나타내었다. 또한 본 논문에서 제시하지 않았지만 종래법에서의 전처리 과정을 거치지 않고도 잎과 뿌리를 직접 외젠액을 가지고서도 측정이 가능하였다. 이러한 결과는 많은 실험의 결과로 인한 프라스, 마이너스를 산출 해내면 센서만으로도 측정 가능하리라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 특히 환경변화에 민감한 오이, 호박을 선택하여 저온 스트레스에 의한 기작 반응을 인지하는 이온 채널들의 식물에 가해지는 수송능력의 변화에 따른 능동 운송과 스트레스 감응 능력에 따른 생리학적 규명을 위해 시료 처리가 복잡하고 장시간 소요되는 종래법에서 탈피하고자 바이오센서에 의한 신속, 간단, 경제적 측정법을 도입하였다. 시료 한 개를 측정하는데 걸리는 시간은 3분이 소요되며 센서법과 종래법과의 측정결과 사이에 좋은 상관치를 나타내었다.

감 사

본 연구는 전남대학교 생물공학연구소에서 수행되었으며 연구소 활성 지원과 한국학술진흥재단의 지원에 감사 드립니다. 또한 센서 시스템 구축에 물심양면 장비 설치에 도움

을 준 東京水産大學院 應用 微生物學科 大學院 學生 여러분에게도 심심한 감사를 포함합니다.

REFERENCES

1. Binzel, M. L. (1995), NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato, *Physiol. Plant*, **94**, 722-728.
2. Choi, K. J., G. C. Chung., S. J. Ahn (1995), Effect of root zone temperature on the mineral composition of xylem sap and plasma membrane K⁺-Mg²⁺-ATPase activity of grafted-cucumber and-figleaf gourd root systems, *Plant Cell Physiol.*, **36**, 639-643.
3. Pardo, J. M. and R. Serrane (1989), Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant. *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 8551-8562.
4. Sonesson, A. and S. Widell (1998), The association of actin and tubulin with plasma membranes: Charecterization using inside-out vesicles formed by Brij 58, *Physiol. Plant* **103**, 354-362.
5. Zhao, S., S. T. Colombo., E. Blumwald (1995), The induction of freezing tolerance in jack pine seeding: The role of root plasma membrane H⁺-ATPase and redox activities, *Physiol. Plant* **93**, 55-60.
6. Cheun, B. S., H. D. Endo., T. H. Hayashi., E. Watanabe (1996), Development of sensor for ATPase activity, *Fisheries Science* **62(6)**, 950-954.
7. Cheun, B. S., H. K. Kim., E. H. Lee., E. Watanabe (1996), Determination of K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ATPase activities in Fish Muscle protein by ATPase Biosensor, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **11(5)**, 518-523.
8. Cooper, A. J (1975), Crop production in recirculating nutrient solution, *Sci. Hortic.* **3**, 251-258.