

옥수수 (*Zea mays*) 뿌리에서 에탄올에 의한 알데히드 산화효소의 활성 증가

오영주 · 박웅준*

단국대학교 분자생물학과, BK21 RNA 전문인력 양성사업팀 & 단국대학교 나노센서바이오텍연구소

Received July 28, 2007 / Accepted August 14, 2007

Promotion of Aldehyde Oxidase Activities by Ethanol in Maize (*Zea mays*) Roots. Young Joo Oh and Woong June Park*. *Department of Molecular Biology, BK21 Graduate Program for RNA Biology, Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin 448-701, South Korea* - We observed that exogenously applied ethanol changed the activities of aldehyde oxidases (AO) in the primary roots of maize (*Zea mays*). The stimulatory effect of ethanol on the aldehyde oxidase activities was concentration dependent; the AO activities were slightly weaker with 0.2 - 0.4% ethanol and stronger with 0.8 - 1.0% ethanol than the level of control. The promotion of AO activities was not explained by the increased transcription of two AO genes in maize. In contrast, ethanol strongly increased the amount of AO proteins, indicating that ethanol enhanced AO activities by promoting the translation. Among three alcohols including ethanol, methanol and isopropanol, only ethanol promoted AO activities. These results suggested that enhancement of AO activities was specific to ethanol, whose level could be naturally increased when the plant roots drove fermentation to overcome low oxygen stresses.

Key words – Ethanol, aldehyde oxidase, root, maize (*Zea mays*)

서 론

알데히드 산화효소(aldehyde oxidase, EC 1.2.3.1)는 동식물계에 널리 분포하는 효소로서, 고리(ring)를 포함하는 다양한 알데히드 화합물들과 특정 산화환원 염색약, 옥심(oxime) 등을 산화시킨다[8,5]. 동물에서는 알데히드 산화효소가 소장, 간 등에서 발견되며, 여러 종류의 독성물질들을 산화시킬 수 있어 해독작용에 기여할 것으로 생각되기는 하지만 아직 동물에서 알데히드 산화효소의 기능이 총체적으로 밝혀지지는 않은 상태이다. 식물에서는 알데히드 산화효소가 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)[11], 옥수수(*Zea. mays*)[4,10] 등을 포함하는 여러 식물에서 발견되었으며, 그 기능은 주로 옥신과 압시스산(abscisic acid)의 생합성에 관여하는 것으로 제안되었다. 이제까지 애기장대를 재료로 알데히드 산화효소의 기능은 스트레스 호르몬인 압시스산의 생합성에 주안점을 두고 연구되어 왔다[11]. 스트레스 호르몬인 압시스산은 다양한 외부 자극들에 반응하여 합성되게 되므로[11] 그 생합성 효소인 알데히드 산화효소의 활성도 스트레스 자극에 의하여 촉진될 가능성이 있는데 아직은 자세히 연구되지 않았다. 옥수수에서는 AO1과 AO2 두 개의 알데히드 산화 효소 유전자가 클로닝되어 있으며[10], 그 기능은 아직 자세히 보고되지 않았다.

본 연구에서는 다양한 외부 자극 중 화학 물질들에 대한 알데히드 산화효소의 활성 변화를 시험하는 연구의 일부로

에탄올의 영향을 조사하였다. 에탄올은 식물학 실험실에서 식물체에 외부 물질을 처리하고자 할 때 비수용성인 물질들을 용해시키기 위하여 용매로 많이 사용하는 물질이다. 고농도의 화학물질을 처리하고자 할 때 에탄올에 대한 특정 물질의 용해도가 낮은 경우 처리 물질의 농도를 증가시키기 위하여 에탄올 농도도 따라서 증가되는 상황을 예측할 수 있다. 이 경우 원래 처리하고자 하였던 물질의 효과 외에 증가된 에탄올이 알데히드 산화효소의 활성에 어떠한 영향을 미칠 것인지는 아직 알려진 바가 없다. 인위적인 실험 상황을 제외하고 자연적으로 에탄올은 발효(fermentation)에 의하여 생성될 수 있으며 식물체의 뿌리는 산소가 부족하면 발효에 의하여 에너지를 확보하는 것으로 보고되었다[1,6]. 이 경우 생성된 에탄올에 의하여 뿌리 자체의 생리 반응들이 어떻게 변화할 것인지도 흥미로운 문제이다.

본 연구에서는 옥수수 뿌리에 에탄올을 농도별로 처리하여 알데히드 산화효소의 활성 변화를 관찰하고, 알데히드 산화효소의 유전자 발현 양상을 조사하였으며, 관찰된 효과가 일반적인 알코올에 대한 반응인지 에탄올에 특이적인 반응인지 구분하고 관찰된 결과들의 생리학적 의미들을 해석하고자 하였다.

재료 및 방법

실험을 위하여 옥수수 (*Zea mays* L. cv Golden Cross Bantam 70) 종자를 1 차 증류수에 24 시간 불린 후에 Hetz 등(1996)의 방법[3]을 적용하여 젖은 paper towel에 일렬로 배열하여 동심원으로 감아 세우고, 증류수 또는 처리하고자

*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3192, Fax : +82-31-8005-3191

E-mail : parkwj@dku.edu

하는 농도의 알코올이 포함된 용액 100 ml에 허부를 담가 28°C에서 3일간 생장시켰다. RNA 및 단백질 추출 재료로는 3일된 옥수수의 뿌리 끝 1 cm를 채취하여 액체질소 존재 하에 막자 사발을 이용하여 파쇄하였다.

RT-PCR 수행을 위해서 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea) 을 이용하여 total RNA를 추출하였다. 역전사는 2 µg의 RNA와 1 µg의 Oligo dT 를 넣어 total volume이 15 µl가 되도록 조절하고 70°C에서 5분 동안 incubation시킨 후 200 units의 M-MLV reverse transcriptase (Promega, USA)를 가하여 M-MLV 공급사가 제공한 표준 방법을 따라 수행하였다. AO1과 AO2에 특이적인 primer 들과 대조구로 옥수수 actin primer를 이용하여 Thermocycler (WhatmanBiometra®, Germany)를 이용하여 40 cycle (각 cycle은 94°C 30초, 57°C 30초, 72°C 30초로 구성)의 PCR을 수행하였다. 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

- AO 1 - Forward: GGAGAGTCTCGAAGCTAAGTCCAA
- Reverse: GCCCTCGATCTGGCCCAAGTCT
- AO2 - Forward: GGAGAATCTGGAGGCTAAAACCTGG
- Reverse: ACCTTCCACCTGCCCAAATCG
- Actin - Forward: GTGACAATGGCACTGGAATG
- Reverse: GGCCCATGCCGACCATGACA

단백질 추출, native-PAGE와 zymogram을 활용한 알데히드 산화효소의 활성 측정 그리고 Western 분석은 이전 보고와 동일하게 실시하였다[7].

결과 및 고찰

에탄올의 효과를 관찰하기 위하여 옥수수가 성장하는 3일간 에탄올을 0.2 - 1.0% 구간에서 처리하고 단백질을 추출하여 indole-3-carboxyaldehyde를 기질로 zymogram법에 의하여 알데히드 산화효소의 활성을 검출한 결과 농도 구간에 따라서 알데히드 산화효소의 활성 변화가 관찰되었다(Fig. 1). 뿌리에 처리된 에탄올의 농도가 0.4% 이하에서는 알데히드 산화효소의 활성이 대조구에 비하여 약간 낮았지만 에탄올의 농도가 0.8% 이상이 되면 대조구에 비하여 오히려 높았다(Fig. 1A). 동일한 조건에서 크산틴 탈수소효소의 활성에는 변화가 없었으므로 관찰된 변화는 일반적인 단백질 함량의 변화에 의한 것이 아니라 특정 농도의 에탄올에 대한 알데히드 산화효소 고유의 반응인 것으로 판단되었다. 에탄올에 의하여 증가된 알데히드 산화효소의 활성이 에탄올의 산화산물인 아세트알데히드를 제거하기 위한 것인지 확인하고자 아세트알데히드를 기질로 zymogram test를 실시하였으나 알데히드 산화효소는 아세트알데히드에 대하여 아무런 활성을 나타내지 않았다(Fig. 1B). 식물의 알데히드 산화효소는 아세트알데히드에 대하여 활성을 나타낸다는 논문이 있기는

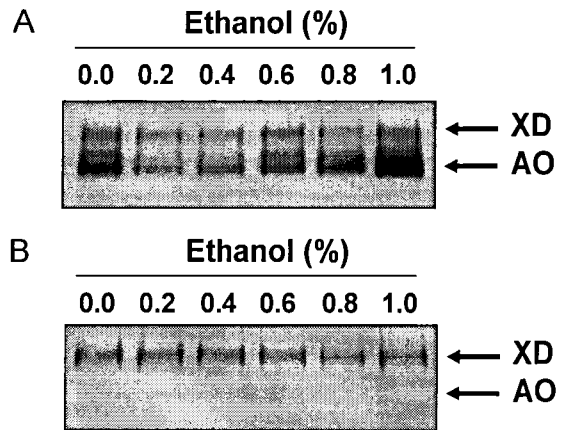


Fig. 1. Effects of ethanol treatment on the activities of aldehyde oxidases (AO) in the maize primary root. The activity bands were developed by zymogram method with 1 mM indole-3-carboxyaldehyde (A) or 1 mM acetaldehyde (B) as the substrates. As the control, xanthine dehydrogenase (XD) activities were examined with 1 mM hypoxanthine.

했었지만[9], 본 실험의 결과는 알데히드 산화효소가 일반적으로 고리 구조를 포함하는 알데히드 화합물에 활성을 나타내며 아세트알데히드 제거에는 활성을 나타내지 않는다는 동물에서의 실험 결과와 일치하는 것이었다[2].

에탄올에 의한 알데히드 산화효소의 활성 증가가 알데히드 산화효소 유전자의 전사(transcription) 증가에 기인한 것인지 확인하고자 농도별로 에탄올이 처리된 옥수수 뿌리에서 RNA를 추출하여 역전사시킨 후 각각 AO1과 AO2에 특이적인 primer 세트를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그러나 에탄올 처리에 의하여 변화하는 알데히드 산화효소의 활성과는 달리 AO1과 AO2의 mRNA 수준에는 뚜렷한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2).

에탄올에 의한 알데히드 산화효소의 활성 증가는 알데히드 산화효소 단백질의 함량 증가와 관계가 있었다. 알데히드 산화효소를 특이적으로 인식하는 항체(Cho et al., in preparation)를 이용한 Western 분석결과 처리된 에탄올의 농도

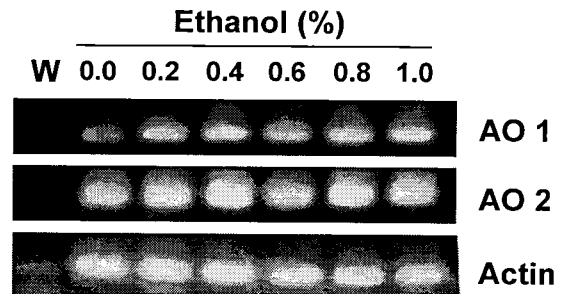


Fig. 2. RT-PCR analyses of the two aldehyde oxidase transcripts, AO1 and AO2, in the ethanol-treated primary root of maize.

증가에 따라서 알데히드 산화효소 단백질의 함량이 현저히 증가하였다(Fig. 3A). 이러한 알데히드 산화효소 단백질의 함량 증가는 에탄올에 의해서만 이루어질 뿐 메탄올이나 이소프로판올에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다(Fig. 3B). 이 결과들은 관찰된 알데히드 산화효소의 활성 증가가 알데히드 산화효소 단백질 함량 증가에 기인하며 옥수수 뿌리는 저산소 조건에서 정상적인 생리반응에 의하여 경험할 수 있는 에탄올에 대하여만 반응하고 약리적으로 처리된 메탄올이나 이소프로판올에 대하여는 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 에탄올에 의하여 알데히드 산화효소의 함량이 높아 지기는 하지만 Western 분석에 사용한 항체는 AO1과 AO2를 모두 인식하는 것으로서 AO1과 AO2 각각의 변화는 구분되지 않았다. Western 분석에 의한 알데히드 산화효소 단백질의 함량 조사 결과는 에탄올 농도 증가에 정비례하여 증가(Fig. 3A)하는 반면 zymogram에 의한 활성 조사는 에탄올 0.4% 이하에서는 감소하고 0.8% 이상에서 증가하는 양면성을 나타내었다(Fig. 1A). 알데히드 산화효소의 조절은 단백질 함량 조절 외에도 몰리브덴 조요소(cofactor)를 필요로 하는 다른 효소들과 마찬가지로 알데히드 산화효소의 활성형(active form)과 비활성형(inactive form) 사이의 비율 변화에 의해서도 이루어질 수 있는 것으로 제시되었다[5]. 그러므로, 저농도의 에탄올 존재 하에서 알데히드 산화효소의 함량이 증가하는 데에도 활성 증가가 나타나지 않는 이유가 저농도의 에탄올 존재 하에서는 전체 알데히드 산화효소 중 비활성형 효소의 비율이 높기 때문일 것으로 사료된다.

요 약

옥수수의 원뿌리(primary root)를 재료로 외부에서 처리한 에탄올이 알데히드 산화효소의 활성을 변화시키는 현상

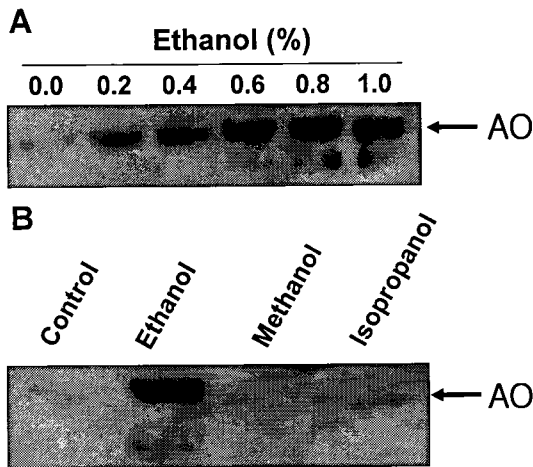


Fig. 3. Protein levels of aldehyde oxidases (AO) examined by western analyses. Effects of ethanol concentration gradient (A) and of 0.8% three different alcohols (B) were tested.

을 관찰하였다. 에탄올의 촉진 효과는 처리된 에탄올의 농도에 따라 다르게 나타나 알데히드 산화효소는 0.2-0.4% 에탄올 처리 구간에서 대조구에 비하여 낮은 활성을 나타내었으며 0.8-1.0% 에탄올 처리 구간에서는 대조구에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 에탄올에 의하여 알데히드 산화효소의 활성이 증가하는 조건에서도 두 개의 알데히드 산화효소 유전자 AO1과 AO2의 전사 수준에는 변화가 없었다. 그러나 에탄올 처리는 알데히드 산화효소의 단백질 함량을 현저히 증가시켰으며, 이는 에탄올이 알데히드 산화효소 활성을 증가시키는 조절작용이 번역(translation) 단계에서 이루어진다는 사실을 보여주었다. 에탄올, 메탄올 그리고 이소프로판올을 처리한 실험 결과 에탄올에 의해서만 알데히드 산화효소의 활성 증가가 유도되었다. 에탄올은 식물체의 뿌리가 저산소 조건에서 에너지 확보를 위하여 발효를 진행하는 경우 자연적으로 식물체내 농도가 증가하는 물질이다. 따라서 에탄올 처리시에 알데히드 산화효소의 활성이 증가하는 현상은 알코올에 대한 일반적인 반응이 아니라 식물체의 뿌리가 생리적으로 경험할 수 있는 에탄올에 대하여 특이적으로 나타내는 반응이라는 결론을 얻었다.

감사의 글

이 연구는 2005학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Boamfa, E. I., P. C. Ram, M. B. Jackson, J. Reuss and F. J. Harren. 2003. Dynamic aspects of alcoholic fermentation of rice seedlings in response to anaerobiosis and to complete submergence: relationship to submergence tolerance. *Ann. Bot.* **91**, 279-290.
2. David, J., C. Bocquet, J. van Herrewege, P. Fouillet and M. F. Arens. 1978. Alcohol metabolism in *Drosophila melanogaster*: uselessness of the most active aldehyde oxidase produced by the aldox locus. *Biochem. Genet.* **16**, 203-211.
3. Hetz, W., F. Hochholdinger, M. Schwall and G. Feix. 1996. Isolation and characterization of *rtcs*, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. *Plant J.* **10**, 845-857.
4. Koshiha, T., E. Saito, N. Ono, N. Yamamoto and M. Sato. 1996. Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* **110**, 781-789.
5. Mendel, R. R. and F. Bittner. 2006. Cell biology of molybdenum. *Biochimica. Biophysica. Acta.* **1763**, 621-635.
6. Mustroph, A. and G. Albrecht. 2007. Fermentation metabolism in roots of wheat seedlings after hypoxic pre-treatment in different anoxic incubation systems. *J. Plant Physiol.* **164**, 394-407.

7. Oh, Y. J., Y. J. Cho and W. J. Park. 2007. The effects of sodium tungstate on the aldehyde oxidase and the growth in the primary root of maize (*Zea mays*). *J. Life Sci.* **7**, (990-995).
8. Rajagopalan, K. V. and P. Handler. 1966. Aldehyde oxidase. *Methods Enzymol.* **9**, 364-368.
9. Rothe, G. M. 1974. Aldehyde oxidase isoenzymes (E.C. 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*). *J. Exp. Bot.* **15**, 494-499.
10. Sekimoto, H., M. Seo, N. Dohmae, K. Takio, Y. Kamiya and T. Koshiba. 1997. Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. *J. Biol. Chem.* **272**, 15280-15285.
11. Seo, M. and T. Koshiba. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 41-48.