

백화옥수수 잎절편을 이용한 안토시아닌 생합성 조절제 탐색용 신규 검정법 확립

김진석*, 이병희, 이정애, 오광훈, 조광연
한국화학연구원 생물기능연구팀

A Novel Bioassay System for Screening of Compounds Affecting Anthocyanin Biosynthesis Pathway in White Corn Leaf Segment

Jin-Seog Kim*, Byung-Hoi Lee, Jung-Ae Lee, Kwang-Hoon Oh, Kwang Yun Cho

Bio-function Research Team, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 305-600, Korea

ABSTRACT This study was carried out to establish a novel bioassay system for screening of compounds affecting aromatic amino acid or anthocyanin biosynthesis through investigating a degree of sucrose-induced anthocyanin formation in white corn leaf segment. Optimal conditions of various factors influencing on anthocyanin formation such as size of plant material, buffer conditions, light intensity and irradiated duration, incubation temp., etc were determined and standard procedure (suitable experimental condition) was set up as follows. The second leaf blade of white corn seedling induced by fluridone treatment were segmented into a size of 5×5 mm. The segments were floated on the solution of 1% sucrose in 1.0 mM MES buffer (pH 6.0~6.5) and incubated at 26°C for 2 days under the continuous light condition (70~100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Anthocyanin in the purpled tissues was extracted with methanol containing 1% HCl and the optical density of the clear supernatants was determined at 528 nm. Influences of some chemicals were tested using this system. Glyphosate, 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase inhibitor, showed most sensitive response with I_{50} value at 3.3 μM . Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) and parachloromercuribenzenesulfonic acid (PCMSB) had a relatively strong inhibition with I_{50} value at 7.1 μM and 10.2 μM , respectively. These results show that sucrose-induced anthocyanin formation in white corn leaf segment provide a very simple and rapid system for searching new compounds affecting aromatic amino acid or anthocyanin biosynthesis by screening at less than 10 μM .

Key words: Aromatic amino acid, bioassay system, glyphosate, sucrose-induced anthocyanin formation, white corn leaf segment

서 론

식물생리적으로 매우 중요한 여러 가지 대사물질 중에는 shikimic acid 생합성 과정을 거쳐서 만들어지는 것들이 있다 (Herrmann 1995). 대표적으로 vitamin K1, auxin, tocopherol, plastoquinone, ubiquinone, lignin, tannin, alkaloid, flavonoid 등이

이에 속하며 고정된 탄소의 20% 이상이 이 과정에 소모된다고 보고되고 있다 (Haslam 1993; Herrmann 1995). 따라서 shikimic acid를 포함한 aromatic amino acid 생합성 경로와 그 주변 과정을 작용점으로 하는 생리활성물질을 찾으려는 노력이 있어 왔으며 현재까지 상품화된 대표적인 화학물질로서는 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase를 저해하는 glyphosate를 들 수 있다 (Sammons et al. 1995).

한편 flavonoid계 화합물에 속하는 안토시아닌은 shikimic acid 생합성 과정을 통해서 만들어진 aromatic amino acid인 phenylalanine을 기질로 하여 chalcone synthase, chalcone iso-

*Corresponding author Tel 042-860-7026 Fax 042-861-4913
E-mail jskim@kriect.re.kr

merase 등 여러 가지 효소의 작용으로 생합성 된다. 이는 식물의 중요 색소중의 한가지로서 과실의 착색, 화색, 단풍 등의 원인 물질이 되며 (Timothy and Cornish 1995), 식물의 성장 및 분화를 비롯한 항산화, 콜레스테롤 저하, 시력개선, 혈관보호, 동맥경화 및 심장병 예방, 항체양, 항암, 항염증, 당뇨억제, 자외선 및 각종 환경 스트레스로부터의 보호 등 다양한 생리활성 기능을 가진다고 알려지고 있다 (Chalker-Scott 1999; Winkel-Shirley 2001; Forkmann and Martens 2001). 그동안 안토시아닌 대사과정을 조절하려는 노력들이 유전적 조절 분야에서 많이 시도되어 왔다 (Winkel-Shirley 2001; Forkmann and Martens 2001). 그런데 금후 다양한 종류의 이차대사성분을 유도하기 위한 방법으로서 aromatic amino acid 생합성 과정을 조절하거나 안토시아닌계 물질의 대량생산에 필요한 화학물질의 요구도가 증가될 것으로 예상되지만 이러한 기능의 화합물은 매우 제한되어 있다 (Martens et al. 2003). 현재 이용되고 있는 화합물로서는 실험실에서 주로 사용되고 있는 abscisic acid (Lee et al. 1997)를 들 수 있는데 이는 안토시아닌 축적을 효과적으로 유기시킨다.

새로운 생리활성물질을 찾으려면 검정해야 할 많은 화합물이 있어야 함은 물론 보다 좋은 검정방법이 구비되어야 한다. 지금까지 aromatic amino acid 및 안토시아닌 생합성과 관련한 생물검정법은 주로 효소활성 측정에 의존해 왔는데 (Siehl et al. 1996; Shuto et al. 1989; Forlani et al. 1996), 이는 생합성 단계에 관련된 여러 가지 효소의 추출, 각 효소의 검정법 확립, 대사물질의 분리·분석 등 비교적 복잡한 과정과 노력이 필요하기 때문에 검정해야 할 화합물 수가 많을 경우에는 먼저 간편한 검정법을 통해 일차 검정을 실시한 후, 효소활성측정법을 적용하여 관련 생리활성물질을 선별하는 것이 바람직할 것이다. 현재 이러한 목적에 부합될 수 있는 간이 검정법으로는 메밀 (buckwheat)을 가지고 검정하는 방법 (Amrhein and Roy 1993) 이외에 거의 개발된 것이 없다. 메밀을 이용한 검정법은 하배측에 축적되는 자색의 안토시아닌을 조사지표로 하여 육안 또는 가시광선 분광광도계로 색소축적 정도를 분석하여 검정하는 방법이나 재료구입의 용이성, 균일성, 반응성 및 작업 효율성 면에서 단점이 있다.

Park 등 (1998)은 엽록소를 소실시킨 옥수수 잎에 당을 공급하면 녹색조직에 비해 안토시아닌이 현저히 축적된다는 사실을 보고한 바 있으며, 본 연구는 이 사실을 이용하여 다량의 화합물로부터 aromatic amino acid 및 안토시아닌 생합성에 영향을 미치는 대사조절물질을 일차적으로 간편하고 빠르게 선별하는 방법을 확립하고자 제반실험을 수행하였다.

재료 및 방법

식물재료

Fluridone 용액에 침지한 옥수수 (*Zea mays* L.) 종자 (수원 19호 또는 칼옥 1호)를 포트에 파종하고 온실에 3일간 두어 발아시킨 것을 30°C 향온, 12시간 광주기 ($65 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)의 생육실에 4일간 생육시켰다. 특별한 경우를 제외한 모든 실험에서는 제2엽의 엽신을 취하여 중륙을 제거한 다음 약 5 mm 크기의 절편을 만들어 실험재료로 사용하였다.

잎 절편 크기 및 절취 부위의 영향

배양액에 치상할 잎 절편의 크기별 안토시아닌 축적 정도를 비교하기 위해서 제2엽신을 대상으로 중륙을 제거한 것과 제거하지 않은 것을 세로 길이가 각각 2, 4, 6, 8 mm 되도록 절단하여 얻은 절편을 1% sucrose 용액에 치상한 후, 28°C 연속 명조건 ($70 \sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 형광등)에 2일간 두어 색소를 발현시켰다. 잎의 생육단계별 안토시아닌 형성 능력을 알아보기 위해서는 백화옥수수 유묘를 육성하여 1엽 초기, 2엽 초기, 2엽 후기, 3엽 초기에 이르렀을 때 해당 엽신을 취하여 중륙을 제거한 다음 각각 5 mm 크기 잘라 얻어진 절편을 치상하여 비교하였으며, 한 잎의 부위별 안토시아닌 형성 능력을 알아보기 위해서는 중륙이 제거된 제2엽신의 상위, 중위, 하위 부분으로부터 취한 5 mm 크기의 절편을 가지고 실험하였다.

안토시아닌 생합성 유도 최적조건 조사

안토시아닌 형성 유도를 위해서는 기본적으로 다음과 같이 실시하였다. 즉 1% sucrose가 함유된 1.0 mM MES buffer (pH 6.0~6.5) 6 mL를 직경 5.5 cm의 petri-dish에 분주한 다음, 옥수수 잎 절편을 petri-dish당 0.15 g 치상하고 이를 25~28°C 향온의 명조건 ($90 \sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에 2일간 두었다.

적합한 안토시아닌 형성 유도조건을 찾기 위하여 여러 가지 항목의 실험을 아래와 같이 실시하였다. 당농도별/광도별/배양기간별 안토시아닌 축적 정도를 알아보기 위해서는 sucrose가 1%, 2%, 4% 함유된 배양액에 잎 절편을 치상한 다음 $21, 55, 110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속 명조건 (28°C)에 각각 5일간 두면서 축적된 안토시아닌 함량을 매일 조사하였다.

바람직한 buffer를 선별하기 위한 실험에서는 먼저 무기염의 potassium phosphate buffer와 비무기염의 MES buffer를 비교하였고, 그 후 MES buffer strength 차이 (1~10 mM)에 따른 효과를 조사하였다. Buffer 용액의 pH는 1.0 N NaOH를 사용하여 6.3~6.5로 조정하였다. 기타 조건은 기본 방법과 유사하였다.

Buffer 용액의 pH가 안토시아닌 형성 유도에 미치는 영향을

알아보기 위해서는 5 mM의 비무기염 buffer를 pH 4~8까지 조절하여 2% sucrose를 가한 다음 옥수수 잎 절편을 petri-dish 당 0.15 g 치상하고 이를 28°C 항온의 명조건 ($110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에 2일간 두어 안토시아닌 축적을 유도하였다.

배양시 온도의 영향을 보기 위해서는 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 항온 조건을 설정하여 2일 동안 안토시아닌 형성 정도를 비교하여 보았다. 기타 조건은 기본 방법에 준하여 실험하였다.

조사시기의 유연성 여부

조사시기 유연성을 확보하기 위한 방안으로서 안토시아닌이 축적된 자색 조직을 저온 (4°C) 암조건에 옮긴 후, 안토시아닌 함량 변화가 있는지를 알아보기 위해 5일까지 두면서 조사하였다.

몇 가지 화합물이 안토시아닌 형성 유도에 미치는 영향

상기 실험과정을 거쳐 설정한 기본 검정방법을 가지고 몇 가지 화합물이 안토시아닌 형성 유도에 미치는 영향을 알아보았다. 먼저 검정화합물의 용매로 많이 사용되는 ethanol, DMSO, acetone의 영향을 알아보기 위하여 배양액 내에 0~10% 범위의 용매 농도를 설정한 다음 실험하였다. 한편 제초제 또는 대사저해제로서 glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine), diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), tralkoxydim (2-[1-(ethoxymino)propyl]-3-hydroxy-5-mesityl-2-cyclohexen-1-one), metsulfuron-methyl {methyl 2-[3-(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)ureidosulfonyl]benzoate}, aminoethylphosphinate (AEP), parachloromercuribenzenesulfonic acid (PCMBs), dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)를 공시하여 이들이 안토시아닌 형성 유도에 미치는 영향을 조사하였다. 각 화합물은 물 또는 acetone에 녹여 희석하였으며 acetone의 최종농도는 1%였다. 각 화합물의 50% 저해농도는 Probit 분석을 통해 결정하였다.

안토시아닌 분석

실험이 종료된 petri-dish내의 절편을 건져내 물기를 제거한 후 이를 1% HCl이 함유된 methanol 10 mL에서 28,000 rpm의 속도로 30초 동안 균질화하고 (Polytron, Brinkmann) 27,200 g에서 20분간 원심분리 (J2-21M/E centrifuge, Beckmann) 하였다. 상등액을 취해서 흡광광도계 (DU65, Beckmann)를 이용하여 528 nm와 657 nm에서의 흡광도를 측정 후 다음과 같은 식 (anthocyanin value = $A_{528} - 0.25 \times A_{657}$)에 의해 안토시아닌 함량의 상대적인 수치를 표시하였다 (Mancinelli 1990).

결과 및 고찰

잎 절편 크기 및 절취 부위의 영향

안토시아닌이 잘 발현되는 식물 종들로서는 쇠비름, 명아주, 여뀌, 메밀, 수수, 옥수수, 들깨 등이 알려져 있다. 본 연구에서는 백화 옥수수를 이용하고자 하였다. 그 이유로서는 재료구입이 용이하고, 엽록소와 thylakoid membrane이 없는 백화조직 (Wrischer et al. 1998)을 사용해도 정상적으로 안토시아닌이 형성되어 액포에 축적될 것이며, 광합성색소가 없기 때문에 분석 시 엽록소 또는 카로티노이드에 의한 간섭효과를 배제할 수 있고, 정확한 원인은 모르나 녹화조직보다 백화조직에서의 안토시아닌 형성이 증가된다 (Park et al. 1998)는 장점이 있기 때문이다. 한편 안토시아닌 생합성은 당을 외부에서 공급하거나 스트레스 조건에서 잘 이루어지는 것으로 알려져 있는데 (Chalker-Scott 1999; Weiss 2000) 당을 공급하는 것이 작엽상 용이할 뿐만 아니라 광합성능력이 없는 백화조직의 수명을 연장시키는 데에도 기여를 하기 때문에 본 연구에서는 기본적으로 당 공급을 통해서 안토시아닌이 유도되도록 하였다.

먼저 배양액에 치상할 잎 절편의 크기별 안토시아닌 축적 정도를 비교해 보았다. 중륵이 제거되어 이등분 된 것과 제거하지 않은 것간에는 중륵을 제거하지 않고 8 mm 길이로 절단한 절편에서 가장 낮은 축적을 보였으나, 6 mm 이하로 세절된 시료에서는 두 처리간에 큰 차이가 인정되지 않았다 (Table 1). 그러나 절편 길이별로 비교해 보면 유의한 차이가 인정되었는 바, 절편 길이가 길수록 안토시아닌 축적 정도가 낮은 경향이였다. 이는 조직 내로의 당 흡수 정도와 밀접한 관련이 있는 것 같았으며 절편이 용액 표면에 잘 접촉되도록 적당한 크기로 잘라 치상하는 것이 중요하였다. 그런데 2 mm 크기에 서와 같이 너무 짧은 길이로 절편화할 경우 색소축적은 빠르나 세포파사가 동반되는 수가 있어 바람직하지 못하였다 (Table 1). 전반적으로 볼 때, 절편 크기는 3~5 mm가 적당할 것으로 판단되었다.

식물 생육단계에 따라 안토시아닌 형성 정도에 있어서 차

Table 1. Effect of size of white com leaf segment on the anthocyanin formation.

Length of segment (longitudinally, mm)	Anthocyanin ($A_{528}/0.15 \text{ g FW}/10 \text{ mL MeOH}$)	
	Whole leaf including main rib	Main rib-removed half leaf
2	1.889 ± 0.41^D	1.795 ± 0.46
4	0.928 ± 0.10	1.272 ± 0.05
6	0.899 ± 0.29	0.767 ± 0.07
8	0.318 ± 0.08	0.609 ± 0.27

^D Leaf segments were floated on the solution of 1% sucrose in 1 mM MES buffer and continuously irradiated with a light intensity of $70 \sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 26°C for 2 days. Data represent mean \pm SE of three replicates.

이가 있다 (Rengel and Kordan 1987). 옥수수 유묘의 어느 엽을 사용하는 것이 바람직한지를 알아보기 위하여 3엽까지 공시하여 조사해 본 결과, 제1엽 (가엽)에서 가장 많은 안토시아닌 함량을 나타내었고 제3엽이 가장 낮았으며 제2엽의 초기 또는 후기의 것은 제3엽의 것보다 약간 높은 경향이였다 (Figure 1A). 제1엽은 안토시아닌의 발현이 빠르고 시료를 일찍 취할 수 있다는 장점이 있으나 취할 수 있는 시료량이 상대적으로 적고, 제3엽은 재배기간이 길어지기 때문에 검정 소요기간이 길어지며 반응성이 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 제2엽을 사용하는 것이 바람직할 것으로 보였고, 제2엽 중에서도 초기의 것보다는 후기의 것이 약간 높은 경향이였으나 차이가 크지 않으므로 조직이 신선한 한 어느 시기에 취해도 무방할 것으로 판단되었다 (Figure 1A). 제2엽 엽신의 상·중·하부 조직간의 안토시아닌 축적 차이는 거의 없었고 (Figure 1B), 엽의 이면과 표면 중 어느 면이 용액에 닿도록 하는 것이 좋은지를 조사했으나 차이가 없었다(데이터 제시 생략).

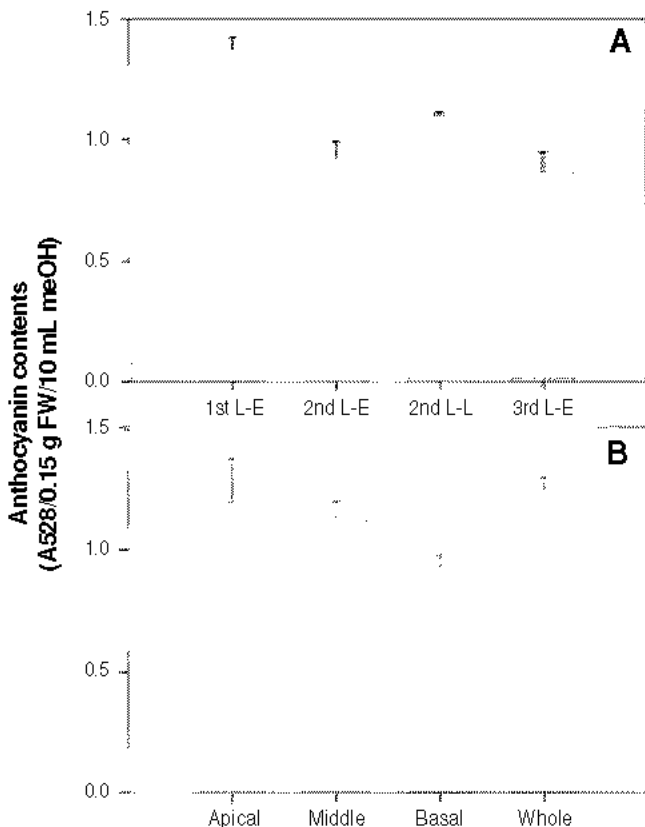


Figure 1. Anthocyanin formation in the leaf segments detached from different leaf sources of white corn seedling. In the experiment A, leaf segments were obtained from early stage of 1st leaf (1st L-E), early stage of 2nd leaf (2nd L-E), late stage of 2nd leaf (2nd L-L) and early stage of 3rd leaf (3rd L-E), respectively. Apical, middle, and basal part of the 2nd leaf blade detached at 3rd leaf stage of white corn seedling were used in the experiment B. The segments were floated on the solution of 1% sucrose in 1 mM MES buffer and incubated at 26°C for 2 days under the continuous light condition ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Vertical bars represent standard errors of three replicates.

안토시아닌 생합성 유도 최적조건 조사

당농도별/광도별/배양기간별 anthocyanin 축적 정도

당이 공급되면 안토시아닌이 증가되는데 이의 원인을 당 축적으로 인한 삼투압 차이 때문으로 해석하기도 하나 (Tholakalabavi et al. 1997), 그보다는 세포내에 sugar responsive domain이 있어 당이 직접 이에 영향을 미쳐 여러 가지 기능에 관련된 유전자를 활성화시킨다는 증거들이 제시되고 있다 (Smeekens and Rook 1997; Mita et al. 1997; Chalker-Scott 1999). 한편 안토시아닌 생합성에는 광이 필수적이다 (Kerckhoffs and Kendrick 1997; Chalker-Scott 1999).

본 연구에서는 대사작용 저해제 선발을 위한 검정체계 확립에 있어서 바람직한 당 농도, 광도, 배양기간 등을 설정하기 위하여 1%, 2%, 4%의 당 용액에 잎절편을 띄우고 세가지 광도의 명조건에 두어 배양기간별로 색소축적 정도를 조사하였다. 광도별도 안토시아닌 축적 차이를 볼 경우, 본 실험조건의 범위에서 전반적으로 광도가 높을수록 안토시아닌 축적 속도와 정도가 높은 경향이였다 (Figure 2). 당 농도별로 비교할 경우, 4% sucrose 처리가 치상 후 1일째에는 다른 처리구보다 색소 함량이 높지만 그 이후 3일째에는 2% sucrose 처리보다 오히려 낮았고 4일째 배양에는 가장 낮은 함량을 보였다. 특히 4% sucrose에서 $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이상의 광도에 배양할 경우 3일째 보다 4일째 배양에서 오히려 색소 함량이 낮아져 당의 고농도에 의한 부작용이 나타났다 (Figure 2). Sucrose 2% 미만의 처리에서는 대략적으로 치상 후 3일까지 직선적인 반응을 보이면서 증가되었다가 배양 3일 이후에는 색소축적이 미약하거나 거의 진전되지 않았다 (Figure 2). 백화조직의 경우 0.3% 이상에서 반응이 나타나고 3% 농도가 본 반응의 포화 농도이며 (데이터 미제시) 당 농도가 높으면 저해제에 대한 감수성이 떨어짐을 감안할 때 생물검정을 위해서는 1%의 당 함량이 적당하다고 여겨졌다 (Park et al. 1998; Kim et al. 2001). 광도의 경우에는 안토시아닌 축적 속도를 볼 때 $60 \sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이, 배양기간은 직선반응을 보이는 2일간 배양이 좋을 것으로 판단되었다.

Buffer의 영향

안토시아닌 형성을 유도하기 위해 당을 공급할 경우 고려해야 할 사항중의 하나는 buffer용액이 당 흡수 또는 안토시아닌 형성을 저해하지 않아야 한다는 것이다. 당은 단순히 확산을 통해서 수동적으로 식물체에 흡수될 수도 있지만 세포의 원형질막에 존재하는 proton-sucrose cotransporter를 통해서 능동적으로 흡수되기도 한다 (Riesmeier et al. 1993; Bush 1992). 당의 이동은 apoplastic movement와 symplastic movement라는 두 가지 경로를 통해 이루어지며, 각 경로에 대한 의존도는 식물 종에 따라 다른 것으로 보고되고 있다 (Turgeon and Beebe 1991). 따라서 buffer 종류, buffer strength, pH 등이 당의 흡수 및 이동에 영향을 미칠 수 있기 때문에 바람직한 buffer

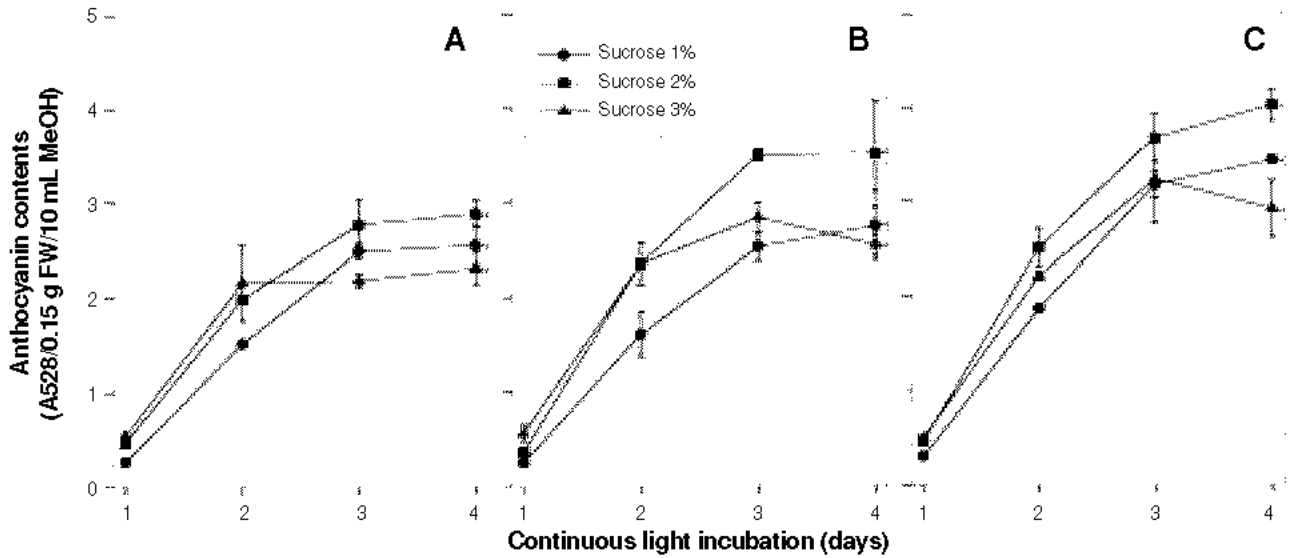


Figure 2. Effect of sucrose concentration, light intensity and incubation duration on the anthocyanin formation in white corn leaf segment. Leaf segments from the 2nd leaf blade of white corn seedling were floated on the sucrose solution in 1 mM MES buffer and incubated at 28°C for 4 days under the continuous light condition (A: 21 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, B: 55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, C: 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The each value represents mean \pm SD of three replicates.

조건 설정을 위한 실험이 필요하다.

무기염의 K-Pi buffer와 비무기염의 MES buffer간의 안토시아닌 형성 차이를 비교하여 보았다. K-Pi buffer는 1.0 mM에서부터 안토시아닌 형성이 억제되어 10 mM에서는 약 50% 감소되었으나 MES buffer의 경우는 10 mM에서 약 6% 정도만 감소되어 보다 넓은 범위의 ionic strength에서도 안토시아닌이 축적되는 경향이였다 (Table 2). MES buffer를 대상으로 2~10 mM까지 2 mM 농도 범위로 세분하여 재확인 실험을 한 결과, 8 mM까지는 1.0 mM에서와 차이가 전혀 없었고 10 mM에서 색소축적 속도가 약간 둔화되는 경향이였다(데이터 미제시).

Buffer 용액의 pH가 안토시아닌 형성 유도에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 5 mM의 비무기염 buffer를 pH 4~8까지 조절하여 2% sucrose 용액하에서 색소축적을 유도시켰다. 그

결과 pH4에서 가장 낮은 형성율을 보였고, pH 5~8간에는 비슷한 경향을 보였다 (Table 3). 이들의 결과를 볼 때, MES와 같은 비무기염의 buffer를 8 mM 이하로 조절하고 pH는 5~8이 유지되도록 사용하는 것이 바람직할 것으로 여겨졌다.

배양온도

배양시 온도의 영향을 보기 위해서는 1%의 당 용액 위에 잎절편을 띄우고 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 항온 조건을 설정하여 2일 동안 안토시아닌 형성 정도를 비교하여 보았다. 그 결과, 15°C에서는 거의 형성되지 않았으며 이후 30°C까지 직선적인 반응을 보이며 안토시아닌이 축적되었다 (Figure 3).

조사시기 및 방법

이상의 실험결과에서 보는 바와 같이 안토시아닌의 축적은

Table 2. Effect of buffer solution and its strength on the anthocyanin formation in white corn leaf segment.

Buffer (pH 6.5)	Strength (mM)	Anthocyanin (A528/0.15 g FW/10 mL MeOH)
MES	0.1	0.843 \pm 0.055 ^{D)}
	1.0	0.821 \pm 0.098
	10.0	0.793 \pm 0.044
	100.0	0.078 \pm 0.005
Potassium phosphate	0.1	0.835 \pm 0.059
	1.0	0.752 \pm 0.021
	10.0	0.385 \pm 0.055
	100.0	0.022 \pm 0.011

^{D)} Leaf segments were floated on the solution of 1% sucrose in each buffer and continuously irradiated with a light intensity of 70~80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 26°C for 2 days. Data represent mean \pm SE of three replicates.

Table 3. Effect of pH of buffer solution on the anthocyanin formation in white com leaf segment.

pH	Buffers	Anthocyanin (A528/0.15 g FW/10 mL MeOH)
4.0	5 mM MES	1.8546 \pm 0.054 ^{D)}
5.0	5 mM MES	2.4853 \pm 0.182
6.0	5 mM MES	2.7396 \pm 0.254
7.0	5 mM MOPS	2.7411 \pm 0.049
7.0	5 mM HEPES	3.0356 \pm 0.011
8.0	5 mM TRICNE	2.5680 \pm 0.060

^{D)} Leaf segments were floated on the solution of 2% sucrose in each buffer and continuously irradiated with a light intensity of 110 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 28°C for 2 days. Data represent mean \pm SE of three replicates.

온도, 광도, 배양시간 등에 정량적 반응을 나타낸다. 이는 대량의 화합물을 생물검정 할 때 데이터의 변이를 초래할 수 있는 성질이 될 수 있기 때문에 보다 유연성을 가지고 조사할 수 있는 방안이 강구되어야 할 것이다. 본 연구에서는 안토시아닌 유도가 종료된 시료를 저온 암조건에 두어 필요에 따라 분석하는 방법의 타당성을 검토해 보았다. 그 결과, Figure 4에서 보는 바와 같이 저온 암조건에 5일까지 보관하여도 초기의 안토시아닌 함량과 차이가 없었다.

몇 가지 화합물에 대한 반응

본 연구에서 새롭게 확립된 생물검정법은 특성상 shikimic acid 생합성을 포함한 aromatic amino acid 생합성 과정, aromatic amino acid 생합성 이후의 안토시아닌 생성과정, 당의 흡수과정 등과 관련된 화합물들에 대해 실제적으로 반응성을 나타

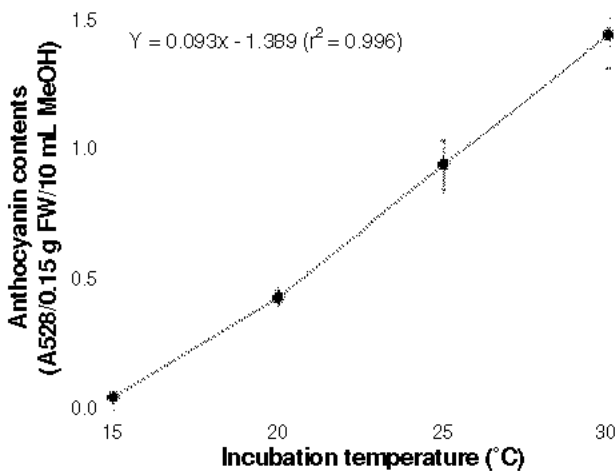


Figure 3. Effect of incubation temperature on the anthocyanin formation in white corn leaf segment. The segments were floated on the solution of 1% sucrose in 1 mM MES buffer and incubated at various temperatures for 2 days under the continuous light condition ($75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). The each value represents mean \pm SD of three replicates.

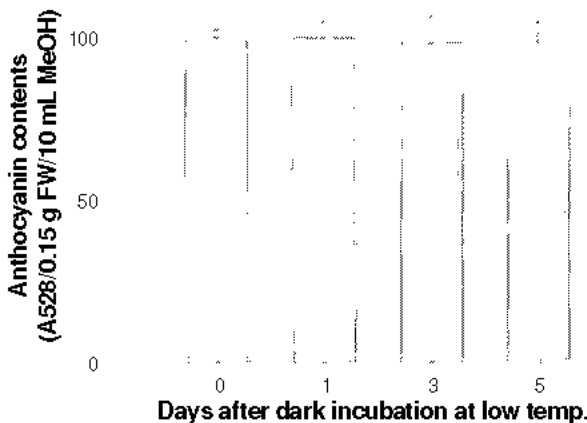


Figure 4. Change of anthocyanin contents dependent on the duration of dark and low temp. (4°C) incubation of the purpled leaf segments. Vertical bars represent standard deviations of three replicates.

낼 것으로 여겨진다.

먼저 화합물 용해에 필요한 용매의 사용 적정농도를 알기 위해서 가장 자주 사용되는 acetone, DMSO, ethanol이 안토시아닌 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 안토시아닌 축적에 현저히 영향을 미치지 않는 농도는 acetone 1.25% 이하, ethanol 1.0% 이하, DMSO 1.25% 미만이었다 (Figure 5).

표준 검정법을 통해 제초제를 비롯한 몇가지 화합물의 영향을 조사한 결과는 Table 4에서와 같다. Metsulfuron-methyl은 식물의 acetolactate synthase를 저해하는 제초제로서 일반 식물체에 처리될 경우 잎의 자색화가 유도된다 (Park et al. 1998). 그러나 백화옥수수 잎절편에 처리한 경우에는 생리적 농도에서 안토시아닌 축적에 전혀 영향을 미치지 않았다 (Table 4). 이는 녹색조직에 처리된 metsulfuron-methyl이 광합성을 통해서 만들어진 당의 sink로의 이동을 저해함으로써

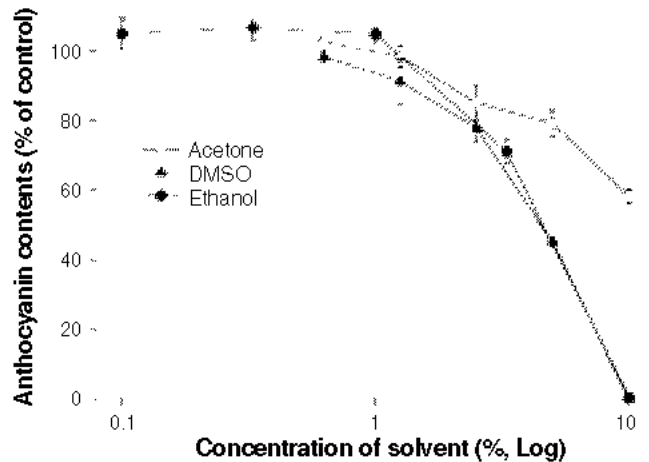


Figure 5. Effects of some solvents on the inhibition of anthocyanin formation in white corn leaf segments. Leaf segments were floated on the solution of 1% sucrose containing tested compound in 1 mM MES buffer and continuously irradiated with a light intensity of $90\sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 26°C for 2 days. The each value represents mean \pm SE of three replicates as a percentage of control.

Table 4. I_{50} values of some chemicals for inhibition of the anthocyanin formation in white corn leaf segments¹⁾.

Chemicals ²⁾	Conc. of 50% inhibition (I_{50} , μM)	95% limits	
		Min	Max
AEP	> 1,000		
DCCD	7.1	6.3	8.1
Diuron	80.3	53.9	138.9
Glyphosate	3.3	2.7	4.0
Metsulfuron-methyl	> 100		
PCMBS	10.2	8.0	12.8
Tralkoxydim	54.1	39.7	71.6

¹⁾ Leaf segments were floated on the solution of 1% sucrose containing inhibitors in 1 mM MES buffer and continuously irradiated with a light intensity of $70\sim 80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 26°C for 2 days. I_{50} values were obtained by Probit analysis.

²⁾ AEP, aminoethyl phosphonic acid; DCCD, dicyclohexylcarbodiimide; PCMBS, parachloromercuribenzenesulfonic acid.

(Hall and Devine 1993; Kim and Vanden Born 1996) 세포내에 당 축적을 유도하여 자색화를 초래시킨다는 제안 (Park et al. 1998)을 잘 대변해 준다. 광합성 전자전달과정에 1차 작용점을 가지는 diuron은 80.3 μM 에서 50% 저해 활성을 보였다. Tralkoxydim의 경우는 10 μM 이상부터 안토시아닌 축적을 감소시키기 시작하여 100 μM 에서는 70% 이상을 억제하였다 (Table 4). 이는 acetyl CoA carboxylase (ACCCase)를 일차작용점으로 하는 제조제로서 ACCCase 저해제들은 세포막의 membrane potential에 이상을 초래시킨다는 보고 (Shimabukuro and Hoffer 1992)로 보아 sucrose의 능동적 흡수를 저해시켜 안토시아닌 축적을 비교적 고농도에서 감소시킨 것으로 추측된다. 한편 glyphosate는 조사된 제조제 중에서 가장 낮은 농도에서 반응을 나타내어 3.3 μM 에서 50% 억제되는 경향이 있었다 (Table 4). 이는 메밀을 이용한 실험에서 (Amrhein and Roy 1993) 보다 ($I_{50} = 60 \mu\text{M}$) 약 17배 정도 반응성이 높은 결과이다. 백화잎 절편은 자체적으로 영양분을 충분히 가지고 있지 못하기 때문에 외부에서 공급된 당을 이용하여 안토시아닌 전구물질도 만드는 것으로 생각된다. 이러한 조건에서 glyphosate가 처리되면 EPSP synthase가 저해되고 (Steinrücken and Amrhein 1980) 이로 인해 안토시아닌 생성이 현저히 억제되는 것으로 추정된다. Aminoethyl phosphonic acid (AEP)는 식물체 내에서 acetylphosphinate로 변하여 pyruvate dehydrogenase를 저해한다고 알려져 있다 (Laber and Amrhein 1987). 메밀을 이용한 안토시아닌 축적실험에서는 50% 저해농도가 10 μM 이었다고 하였는데 (Amrhein and Roy 1993) 본 실험에서는 1 mM 까지 거의 영향이 없었다. 이는 본 방법이 shikimic acid pathway를 통해서 만들어지는 hydroxycinnamyl CoA 생합성 과정에 보다 특이성이 있음을 시사해 준다. PCMBMS는 thiol protein의 기능을 저해하며 특히 당의 apoplast 이동을 비교적 특이적으로 저해한다고 알려져 있다 (Bourquin et al. 1990). DCCD는 원형질막의 H^+ -ATPase의 활성을 억제시키는 화합물로서 (Hsu et al. 1992) H^+ -ATPase가 억제되면 sucrose cotransporter의 기능이 떨어져 당의 흡수가 억제될 것으로 예상된다. 본 실험조건에서 PCMBMS와 DCCD의 I_{50} 농도는 각각 10.2, 7.1 μM 이었다 (Table 4).

이상의 실험결과에 의하면 시험 화합물 중에서 10 μM 이하의 저농도에서 I_{50} 값을 가지는 것은 glyphosate, DCCD, PCMBMS 세가지였으며 그 중에서 glyphosate가 제일 반응성이 높았다. 따라서 본 방법을 이용하면 shikimic acid 생합성을 포함한 aromatic amino acid 생합성 저해 제조제, 안토시아닌 생합성 조절제, 당 흡수 또는 이동을 저해하는 화합물 등을 검정할 수 있고, 10 μM 을 기준농도로 설정하여 그 이하에서 활성을 가지는 화합물을 선별하면 생리적 효과가 큰 화합물을 개발할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 옥수수주변에서 쉽게 구할 수 있고, 백화옥수수 잎 절편을 만들어 당 용액에 치상하면 항상 안토시아닌을 형성시킬 수 있어 언제든지 실험할 수 있으며, 광합성 색소의 간섭이 없기 때문에 분석이

용이하고, 더욱이 목적에 따라 잎 절편을 몇 개만 이용할 수도 있어 miniaturation assay도 가능하므로 검정효율성도 높일 수 있을 것이다. 아울러 본 방법은 안토시아닌 생성에 관련된 제반 요인들의 생리실험에도 폭넓게 활용될 수 있을 것이다.

적 요

본 연구에서는 염록소가 소실된 백화옥수수 엽절편을 이용하여 안토시아닌 축적정도를 지표로 aromatic amino acid 생합성에 관련된 제조제 또는 안토시아닌 생합성 조절제를 보다 간편하고 신속하게 간이 검정하는 방법을 확립하고자 식물재료 취급, 배양용액 조성농도, 배양시의 온도 및 광조건, 조사시기 등을 검토하여 다음과 같은 표준 검정방법을 확립하였다. Fluridone을 이용하여 백화시킨 옥수수 제2엽의 엽신을 절편화 한 다음, sucrose가 1% 함유된 1.0 mM MES buffer (pH 6.0)를 기본 조성으로 하는 배양액과 기본 배양액으로 조제한 시험화합물 용액에 치상하고 이를 25°C 항온의 연속 명조건 ($70 \sim 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에 2일간 둔다. 자색화된 조직의 안토시아닌을 1% HCl이 함유된 methanol로 추출한 다음 528 nm에서의 흡광도를 측정한다. 표준 검정방법으로 몇 가지 화합물의 영향을 조사한 결과, 시험 화합물 중에서 glyphosate, DCCD, PCMBMS가 10 μM 이하의 저농도에서 I_{50} 값을 나타내었다. 따라서 본 방법을 이용하여 10 μM 을 기준농도로 실험하면 효과가 보다 우수한 생리활성물질을 손쉽게 탐색할 수 있을 것으로 판단된다.

인용문헌

- Amrhein N, Roy P (1993) The buckwheat assay for glyposate and other inhibitors of aromatic biosynthesis. In: Böger P, Sandmann G (eds), Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds, Lewis Publishers, Boca Raton, pp 109-114
- Bourquin S, Bonnemain J-L, Delrot S (1990) Inhibition of loading of ^{14}C assimilates by *p*-chloromercuribenzenesulfonic acid. Localization of the apoplastic pathway in *Vicia faba*. Plant Physiol 92: 97-102
- Bush DR (1992) The proton-sucrose symport. Photosynthesis Res 32: 155-165
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochem Photobiol 70: 1-9
- Forkmann G, Martens S (2001) Metabolic engineering and applications of flavonoids. Curr Opin Biotech 12: 155-160
- Forlani G, Lejczak B, Kafarski P (1996) N-pyridyl-aminomethylene-bisphosphonic acids inhibit the first enzyme in the shikimate pathway, 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase. Pestic Biochem Physiol 55: 180-188

- Hall LM, Devine MD (1993) Chlorosulfuron inhibition of phloem translocation in chlorosulfuron-resistant and -susceptible *Arabidopsis thaliana*. *Pestic Biochem Physiol* 45: 81-90
- Haslam E (1993) Shikimic acid: metabolism and metabolites. Wiley, Chichester, UK, 387 pp.
- Herrmann KM (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919
- Hsu AF, Rodenbach S, Tu SI (1992) Effects of dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) treatment on coupled activities of vanadate-sensitive ATPase from plasma membrane of maize roots. *Physiol Planta* 85: 17-22
- Kerckhoffs LHJ, Kendrick RE (1997) Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato. *J Plant Res* 110: 141-149
- Kim JS, Choi JS, Kim TJ, Hur Y, Cho KY (2001) Differential effects of herbicidal compounds on cytoplasmic leakages of green- and white- maize leaf segments. *J Photosci* 8: 61-66
- Kim S, Vanden Bom WH (1996) Chlorosulfuron decreases both assimilate export by source leaves and import by sink leaves in Canola (*Brassica napus* L.) seedlings. *Pestic Biochem Physiol* 56: 141-148
- Laber B, Amrhein N (1987) Metabolism of 1-aminoethylphosphinate generates acetylphosphinate, a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase. *Biochem J* 248: 351-358
- Lee KS, Lee JC, Hwang YS, Hur IB (1997) Effects of natural type (S)-(+)-abscisic acid on anthocyanin accumulation and maturity in 'Kyoho' grapes. *J Kor Soc Hort Sci* 38: 717-721
- Mancinelli AL (1990) Interaction between light quality and light quantity in the photoregulation of anthocyanin production. *Plant Physiol* 92: 1191-1195
- Martens S, Knott J, Seitz CA, Janvari L, Yu S-N, Forkmann G (2003) Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. *Biochem Eng J* 14: 227-235
- Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* 11: 841-851
- Park EY, Kim JS, Cho KY, Pyon JY (1998) Physiology of anthocyanin accumulation in corn leaves treated with metsulfuron-methyl. *Kor J Weed Sci* 18: 246-256
- Rengel Z, Kordan HA (1987) Age, fluence rate, and anthocyanin production in *Zea mays* seedlings. *Ann Bot* 59: 41-43
- Riesmeier JW, Himer B, Frommer WB (1993) Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell* 5: 1591-1598
- Sammons RD, Gruys KJ, Anderson KS, Johnson KA, Sikorski JA (1995) Re-evaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase: Identification of an EPSP synthase · EPSP · glyphosate ternary complex. *Biochemistry* 34: 6433-6440
- Shimabukuro RH, Hoffer BL (1992) Effect of diklofop on the membrane potentials of herbicide-resistant and -susceptible annual ryegrass root tips. *Plant Physiol* 96: 1415-1422
- Shuto A, Ohgai M, Eto M (1989) Screening of tryptophan synthase inhibitors as leads of herbicide candidates. *J Pesticide Sci* 14: 69-74
- Siehl DL, Subramanian MV, Walters EW, Blanding JH, Nideman T, Weinmann C (1996) Evaluating anthranilate synthase as a herbicide target. *Weed Sci* 45: 628-633
- Smeekens S, Rook F (1997) Sugar sensing and sugar-mediated signal transduction in plants. *Plant Physiol* 115: 7-13
- Steinrücken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid 3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94: 1207-1212
- Tholalakabavi A, Zwiazek JJ, Thorpe TA (1997) Osmotically-stressed poplar cell cultures: Anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *J Plant Physiol* 151(4): 489-496
- Timothy AH, Comish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083
- Turgeon R, Beebe DU (1991) The evidence for symplastic phloem loading. *Plant Physiol* 96: 349-354
- Weiss D (2000) Regulation of flower pigmentation and growth: Multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiol Planta* 110: 152-157
- Winkel-Shirley B (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* 126: 485-493
- Wrischer M, Ljubecic N, Salopek B (1998) The role of carotenoids in the structural and functional stability of thylakoids in plastids of dark-grown spruce seedlings. *J Plant Physiol* 153: 46-52