

담배와 무우 Peroxidase Isozyme들의
세포 생화학적 연구:
조직 특이성 발현과의 연관성

김승수
(연세대학교 이과대학 생화학과)

Studies on Peroxidase Isozymes of Tobacco and
Korean Radish: implication of Specific
Isoperoxidase in Shoot Formation

Kim, Soung Soo
(Dept. of Biochemistry, Yonsei University, Seoul)

Abstract

In an attempt to clarify the physiological functions of individual isoperoxidases, we have studied enzymatic and immunological properties as well as cellular distribution of isoperoxidases from tobacco callus and Korean radish.

The gene expression patterns of isoperoxidases in shoot and non-shoot-forming tobacco callus were also examined by rabbit reticulocyte lysate *in vitro* translation system. These results indicate that fraction of translatable poly(A)-isoperoxidase mRNA was increased considerably in shoots. At the present time, at least 6-7 isoperoxidases could be detected from the translation mixture of total cellular RNA, among which only one cell wall localized anodic isoperoxidase (named A3) mRNA was bimorphic mRNA. These data suggest the possible regulation of peroxidase activity during shoot formation by altering the polyadenylation state of mRNA.

In case of Korean radish seedlings, poly(A)-peroxidase mRNA were also increased depending upon aging.

서 론

Peroxidase(E.C.1.11.1.7)는 고등 식물에서 indol-3-acetic acid의 산화(1), 환원형 pyridine nucleotide의 산화(2), pyridoxal과 관련된 화합물의 산화(3), methional의 ethylene으로의 전환(4), phenolic compound의 산화 및 lignification 등(5) 여러가지 다양한 촉매 반응을 나타낸다. Peroxidase는 15종 이상의 plant에서 multiple form으로 존재함이 밝혀졌다. Horseradish등 고등 식물의 peroxidase isozyme은 물리화학적 성질 및 효소학적 특성들이 서로 다르며(6,7,8,9) 그 isoperoxidase pattern이 세포의 성장과 노화 그리고 호르몬(10) 등에 의하여 변할 뿐만 아니라 감염또는 상처에 의한 손상(11,12), 온도(13), 빛의 유무(14,15)에 따라서도 변한다는 사실이 보고되어 왔다. Peroxidase의 이와같은 효소학적 다양성과 더불어 단백질 수준에서 효소의 발현에 미치는 여러가지 조건들을 연구 종합하여 peroxidase가 식물의 성장과 분화에 관련된 효소라고 많은 학자들에 의해 주장되어 왔지만(10,16) 아직 각 peroxidase isozyme의 진정한 생리학적 기능은 확실히 밝혀지지 않고 있다. 1970년대 이후 이들 peroxidase isozyme들 간의 구조적 차이를 연구함으로써 이들 peroxidase들의 생합성 양상, 더 나아가서 이들 enzyme이 multiple form으로 존재해야 하는 중요성을 규명하려는 실험들이 진행되었다(17,18,19). 이들의 연구 결과에 의하면 peroxidase isozyme들은 구조적 차이를 기준으로 몇가지 group으로 나누어지며 따라서 이들은 group별로 서로 다른 structural gene에서 발현되었다는 것이다. 하지만 이들의 expression이 어떠한 mechanism에 의해 조절되는가 하는 문제는 아직 규명되지 않고 있다. 본고에서는 담배 callus와 한국산 무우를 중심으로 isoperoxidase들의 특성을 제시하고 성장과 노화 그리고

organ 발생시 어느 특정 isoperoxidase 또는 group의 발현 조절 양상에 관하여 고찰해 보고자 한다.

본 론

1. 담배와 한국산 무우 peroxidase isozyme들의 특성

Horseradish peroxidase의 경우 최고 20개까지의 isozyme이 확인되었으며 그중 7개의 isozyme의 특성이 규명되었고 tryptic peptide mapping의 결과 3가지 군으로 나누어졌다(6,20,21). Turnip peroxidase의 경우 4개의 isozyme 이 존재하며 이들 isozyme은 효소학적 특성에 따라 2개의 군으로, tryptic peptide mapping의 결과에 따라 3가지 군으로 나누어졌다(22,23). 1970년 이후 horseradish peroxidase에 대한 부분적인 amino acid sequence가 결정되기 시작 했으며 turnip peroxidase와 그 구조적 특성이 비교되기도 했다. 그 결과 horseradish peroxidase C와 turnip peroxidase P7은 1차구조가 50% 이상이나 같았으며 특히 4개의 disulfide bridge를 가지고 있는 점도 동일하였다 (24, 25,26). 그리고 peroxidase가 활성을 나타내는데 필수적이라고 생각되는 2개의 His-containing sequence가 잘 보존되어 있었다(24). Petunia peroxidase의 경우 3개의 isozyme이 확인되었으며 이 3개의 isozyme은 다른 chromosome위에 있는 서로 다른 structural gene인 PRXa, PRXb, PRXc로 부터 나온 것이라고 보고되었다(27).

본 실험실에서 배양하고 있는 담배 callus(*Nicotiana tabacum* L. var, Virginia 115) 또는 W-38 strain에는 7-10개의 isoperoxidase가 녹말 겔 전기영동에 의하여 분리되며, 4개의 cationic isoperoxidase(C1,C2,C3,C4)와 6개의 anionic isoperoxidase(Aa,A1,A2,Ae,A3,A4)가 Stafford 와 Galston(28)의 명명 방법에 따라

표기되고 있다. 여기에서 "C"와 "A"는 각각 cationic 및 anionic isoperoxidase를 지칭하며 이들 영문자 아래의 숫자는 cathode와 anode로 이동하는 전기이동도의 순서를 나타낸다. 담배 isoperoxidase중 C3, C4, A1, A2, A3, 그리고 A4등이 DEAE-cellulose 또는 CM-cellulose ion exchange chromatography와 gel filtration에 의하여 순수 정제되어 효소학적 특성 및 몇가지 물리화학적 특성들이 규명되었다(17,18,29,30,31,32).

지금까지 연구결과에 의하면 담배 isoperoxidase들은 모두 분자량이 다르다는 점이 특이하며 A1의 경우에는 49000 dalton의 dimer를 형성한다는 사실도 밝혀졌다. 이들 isoperoxidase중 C4, A3, 그리고 A4의 경우 당 단백질임이 확인되었지만 A1, A2 그리고 C3등이 당을 가지고 있지 않다는 점은(Table 1) horseradish peroxidase를 비롯한 다른 species로 부터의 peroxidase isozyme이 대부분 당 단백질이라는 주장과 상반되는 결과이다(33). 한편, tryptic peptide mapping 연구에 의하면 담배 isoperoxidase간에 많은 matching peptide가 발견되며 특히 C3와 C4 그리고 A1과 A2 사이에 homology가 큰것으로 나타났다. 이중 2-3개의 peptide는 모든 isoperoxidase에 존재하는 것으로 나타났다(18).

담배 isoperoxidase들의 이와같은 구조적 다양성은 이들 isozyme들의 유전자 발현 측면에서도 흥미로운 과제이지만 각 isozyme의 생리적 기능에 관하여도 많은 의문점을 제시하고 있다. 이러한 문제를 해결하여 보려는 시도로서 per oxidase isoenzyme들의 기질 특이성에 관한 연구가 활발히 진행되었으며(Table 2), Powell등은 A1, A2, C3, C4가 여러 phenol 화합물 중에서 ferulic acid를 잘 산화한다는 사실을 알아냈다(29). 그러나 isoperoxidase A3와 A4는 scopol etin을 기질로 잘 사용하며 이 기질에 대하여 단순한 Michaelis-Menten kinetics를 따르지 않고 sigmoidal saturation curve를 나타낸다는 점으로 미루어 보아 위에서 말한 A1, A2, C3, C4와는 생화학적 기능면에서 아주 다를것으로 추측된다(31). Ferulic acid와 scopoletin은

Table 1. Molecular weights of isoperoxidases from tobacco callus

Isoperoxidase	molecular weight		presence of carbohydrate
	SDS-PAGE	gel filtration	
* A ₁	49,000	103,000	No
* A ₂	89,000	90,000	No
A ₃	38,000	38,500	Yes
A ₄	43,000	43,000	Yes
* C ₃	68,000	67,000	No
* C ₄	44,000	46,000	Yes
** Cn	30,000	28,000	No
** Ac	80,000	80,000	Yes

* Data taken from Powell et al. (1975)

** Data taken from Kim et al. (1980)

담배에서 추출된 phenol 화합물이며 lignin-like 화합물로 incorporation되는 것으로 알려져 있다(5). 더우기 scopoletin은 식물의 성장조절인자로 작용한다는 보고도 있다(34). 이와 같은 사실들을 isoperoxidase의 기질 특이성 연구들과 연관시켜 보면 담배 callus에는 기능면으로 두 group의 isoperoxidase들이 존재한다는 사실을 알수있다. 구조적으로 보면 전기이동도와 peptide mapping 연구에 의하여 추측할 수 있듯이 slow migrating anionic isoperoxidases(A1,A2), far migrating anionic isoperoxidases(A3,A4), 그리고 cationic isoperoxidases (C3,C4)등으로 구분이 되지만 앞으로 다른 minor isoperoxidase들의 정제가 이루어지면 좀 더 구체적인 정보를 얻을 수 있을 것이다. Ouchterlony double immunodiffusion에 의하여 담배 isoperoxidase들의 면역학적 상관관계를 조사한 결과, isoperoxidase C3와 C4는

Table 2. Summary of Michaelis constants and pH optima for some phenolic compounds of isoperoxidases from tobacco callus

Substrate	Km (mM)				pH optima						
	A ₁ [*]	A ₂ [*]	A ₃	A ₄	A ₁ ^{**}	A ₂ [*]	A ₃	A ₄	C ₄ ^{**}	C _n ^{**}	
Guaiacol	5	5.8	5	5	4	13.3	6.0	6.0	7.0	6.0	6.5
H ₂ O ₂	-	-	1.78	1.67	-	-	-	6.0	7.0	-	-
scopoletin	NR	NR	0.18	0.13	0.53	NR	-	-	5.5	4.5	-
esculetin	-	-	0.24	0.4	0.45	1.25	-	-	8.0	7.5	7.5
ferulic acid	0.4	0.4	0.26	0.13	0.3	0.19	4.5	5.0	5.0	5.5	5.0
chlorogenic acid	-	-	0.35	0.56	-	1.10	-	-	6.0	5.5	5.0

* Data were supplied by Powell *et al.* (1975)

** Data were supplied by Kim *et al.* (1980)

NR: negligible result

Table 3. Immunological comparisons of isoperoxidase from *Nicotiana tabacum* L. var. Virginia 115 callus

Isoenzymes	C ₃	C ₄	A ₃	A ₄	A ₁	C ₁ +C ₂
C ₃	++	++	-	-		
C ₄	++	++	-	-		+
A ₃	-	-	++	-		
A ₄	-	-	-	++	+	
A ₁				+		
C ₁ + C ₂		+				

++ : immunological identity

+ : partial identity

- : no cross reactivity

면역학적으로 동일하였고 C1과 C2 혼합액은 C4와 부분적으로 동일한 것으로 나타났으나 A3와 A4는 C3 또는 C4에 대한 항체와 cross reactivity를 보이지 않았다. 한편 A4에 대한 항체는 부분 정제된 A1과 cross reactivity를 나타내 부분적으로 동일하였지만 A3 및 caAt ionic isoperoxidase들과는 반응을 하지 않았으며 A3에 대한 항체는 다른 어느 isoperoxidase들과도 반응을 하지 않는 것으로 보아 unique antigenic determinant를 가지고 있다고 볼 수 있다(Table 3). 이상의 결과들은 담배 isoperoxidase들이 기능 또는 구조적인 측면에서 몇 group으로 나누어지며 이들 group들이 세포분화 또는 조직발생시 특이하게 발현 되어 독특한 생리작용을 나타낼 가능성을 배제할 수 없다.

최근에 Lagrimini와 그의 동료들은 담배잎으로 부터 분리한 두 anionic per oxidase isozyme의 일부 아미노산 서열로 부터 oligonucleotide probe를 만들어 담배잎으로 부터

Table 4. Physico-chemical properties of isoperoxidases from Korean radish root

	molecular weight		presence of carbohydrate	pI
	SDS-PAGE	gel filtration		
C ₃	44,000	44,000	Yes	
A ₁	43,000	44,000	Yes	4.0
A ₂	43,000	43,700	Yes	4.0
A ₃	50,000	50,000	Yes	3.0

제조한 cDNA library의 screening에 이용하였으며, 이로부터 분자량이 32,311 dalton되는 anionic peroxidase의 아미노산 서열을 알아냈다 (35). 이 아미노산 서열을 horseradish peroxidase의 아미노산 서열과 비교해 보았을 때 각각 52%와 46%의 유사성을 나타냈다. 더우기 clone된 anionic iso peroxidase는 RNA blot분석에 의하여 주로 담배 줄기에서 발현되는 것으로 나타났으며 이 isozyme이 이 곳에서 lignification에 관여할 것으로 가정할 수 있다.

본 연구실에서는 한국산 무우(*Raphanus sativas* L.)에서도 앞에서 담배 cal lus를 사용하여 실험한 peroxidase에 관한 연구와 비슷한 연구들을 수행하고 있다. 한국산 무우의 뿌리 추출액을 pH 7.0에서 녹말 쥬 전기영동을 하면 6-7개의 isoperoxidase를 확인할 수 있으며 현재 세 개의 anionic isoperoxidase(A1,A2,A3)와 하나의 cationic isoperoxidase(C3)가 정제되어 일반적인 효소학적 특성이 규명되었다(Table 4). 이들 isoperoxidase들은 모두 glycosylation되어 있으며 SDS-PAGE와 gel filtration 방법에 의하여 결정된 분자량은 A1,A2,C3의 경우 44,000 정도의 monomer로 나타났으며 A3는 50,000 정도로 다른 무우 isoperoxidase들의 분자량보다 약간 크다. 또한 면역학적 방법으로 isAo peroxidase C3와 A2의 상관관계를 조사해 보았을 때 A2는

Table 5. Summary of Michaelis constants and pH optima for some phenolic compounds of isoperoxidases from Korean radish root

	optimum pH				Km (mM)			
	C ₃	A ₁	A ₂	A ₃	C ₃	A ₁	A ₂	A ₃
guaiacol	6.0	6.5	5.0	6.0	5.6	11	6.7	8
H ₂ O ₂	5.0	6.5	5.0	6.0	0.77	2.5	1.38	0.1
scopoletin	5.0	6.0	4.0	4.5	5.6	0.24	0.18	1.67
ferulic acid	4.5	5.0	3.5	3.5	7.7	0.1	0.67	0.63
o-dianisidine	5.0	4.5	4.5	5.0	1.2	0.6	0.63	0.6
caffeic acid		4.5	4.0	4.0		1.54	1.43	2.5

C3에 대한 항체와 반응하지 않았고 C3는 A2에 대한 항체에 반응하지 않았으므로 C3와 A2는 표면구조가 상당히 다를 것으로 생각된다(36). 여러 phenolic 화합물들을 사용한 기질 특이성 연구에서 isoperoxidase C3는 A1, A2, 그리고 A3와는 달리 scopoletin과 ferulic acid에 대하여 기질 친화도가 매우 약하므로 무우 cat ionic isoperoxidase와 anionic isoperoxidase들은 생리조건에서 서로 다른 기능을 가질 것으로 추측된다(Table 5).

2. 담배 isoperoxidase들의 세포내 분포

Peroxidase의 다양한 생물학적 활성을 설명하기 위하여 지난 십여년 동안 peroxidase isozyme의 효소학적 특성 규명과 더불어 세포내 분포를 알고자 하는 연구가 활발히 진행되었고, 현재 peroxidase의 활성이 주로 핵, 세포벽 및 액포에 존재한다는 증거가 제시되고 있다(37,38). 특히 핵에서 발견되는 per oxidase는 리보솜 단백질로서

작용할지도 모르며 histone과 같은 구조적 역할을 갖고 있을 가능성도 배제할 수 없다(37). 한편, 세포가 노화됨에 따라 세포벽 peroxidase들의 활성은 증가하며 이들 peroxidase들이 lignin합성을 하여 제 2 차 세포벽 형성에 관여하고, suberin 합성을 하여 상처에 대한 보호작용도 가진다는 보고가 있다(39). 본 연구에서는 담배 세포의 protoplast, 핵, 엽록체, 액포, 미토콘드리아, 퍼옥시솜, 글리옥시솜, 그리고 세포벽 들을 녹말 겔 전기 이동법과 면역형광법으로 확인하여 각 peroxidase의 생리적 기능을 좀더 자세히 알아 보고자 하였다.

Protoplast를 제조하여 녹말 겔 전기이동으로 확인한 결과 배지로 분비되는 peroxidase들은 이미 보고된 바와 같이 모두 anionic peroxidase들이다(40). 이들 anionic peroxidase들이 생성된 후 곧 세포 밖으로 분비되는지 또는 세포 내의 어느 소기관에 결합되어 있다가 나중에 분비되는지를 확인하기 위하여 protoplast를 제조하여 protoplast 추출액에 있는 peroxidase들을 녹말 겔 전기 이동에 의하여 조사하였다. 이 결과 전기이동도가 비교적 빠른 anionic iso peroxidase A2와 전기이동도가 아주 빠른 A3, A4가 protoplast 추출액에 존재하지 않고 세포벽으로 분비되었다(Fig.1). 따라서 이들 anionic isoper oxidase들이 세포벽에 존재하는 것으로 볼 수 있다.

핵, 엽록체, 액포등을 분리하여 isoperoxidase pattern을 조사한 결과 액포에만 모든 주요 cationic isoperoxidase들(C1, C2, C3, C4)이 존재하였다. 그러나 핵에는 전기이동도가 비교적 느린 C1, C2가 확인되는 반면 엽록체에는 전기이동도가 빠른 C3, C4등이 관찰되었다. 또한, 전기이동도가 아주 느린 an ionic isoperoxidase Aa, A1은 세포 밖으로 분비되는 isozyme들이지만 proto plast, 핵, 엽록체등에도 존재함을 알았다(Fig.1). 한편, mitochondria, peroxisome, glyoxysome등을 분리하여 isoperoxidase pattern을 조사하였을 때 mitochondria에는 주로 C1, C2, C3가 존재하였고 peroxisome과 glyoxysome에는 C1과 C2가 주로 분포되어 있었다. 이상의

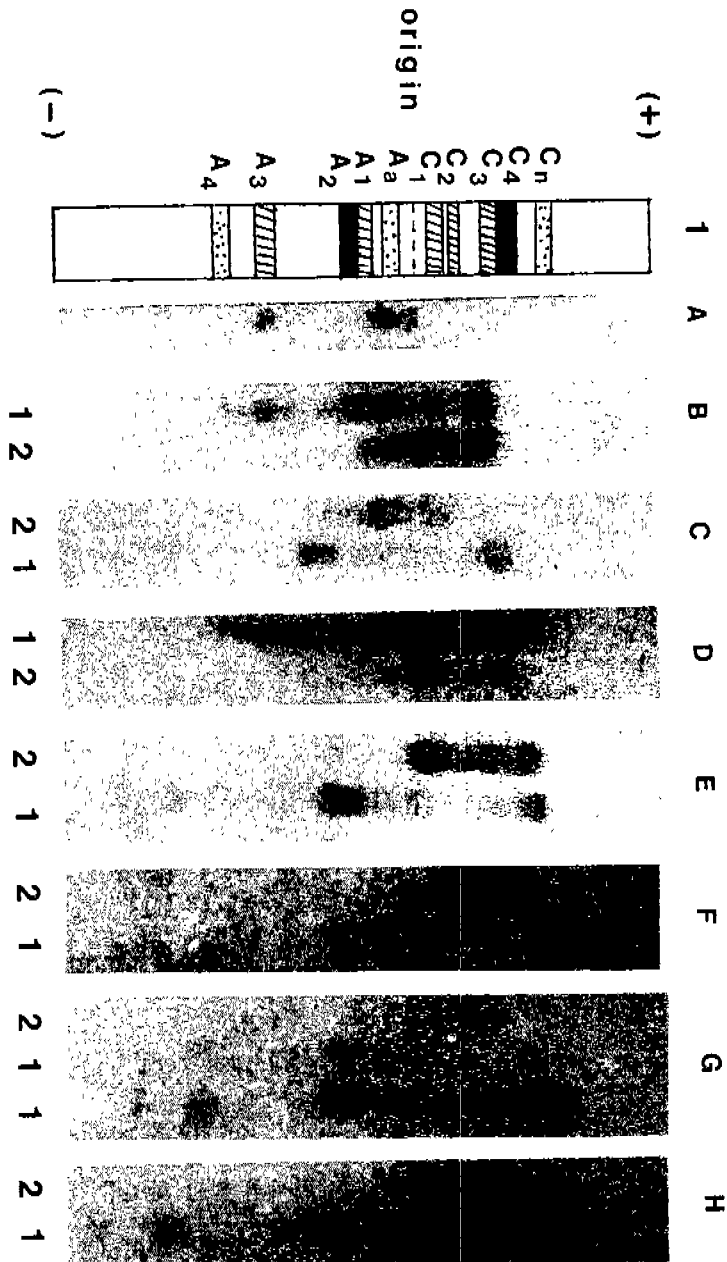


Fig. 1. Comparisons of isoperoxidase patterns between each purified organelle and tobacco callus cell.

1: Schematic representation of isoperoxidases from *Nicotiana tabacum* L. var. Virginia 115 callus. A: Secreted isoperoxidases. B: Lane 1, normal callus extract; lane 2, protoplast extract. C: Lane 1, normal callus extract; lane 2, nuclei extract. D: Lane 1, normal callus extract; lane 2, chloroplast extract. E: Lane 1, normal callus extract; lane 2, vacuole extract. F: Lane 1, normal callus extract; lane 2, mitochondria extract. G: Lane 1, normal callus extract; lane 2, mitochondria extract. H: Lane 1, normal callus extract; lane 2, glyoxysome extract.

결과들도 Table 6에 정리되었다.

Table 6. Localization of tobacco callus isoperoxidases

Protoplast and cellular organelles	Isoperoxidases									
	A _a	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
Protoplast	+	+				+	+	+	+	
nuclei	+	+				+	+	(+)*		
chloroplast	+	+				(+)*		+	+	
vacuole						+	+	+	+	
secreted isozymes (extracellular)	+	+	+	+	+					
mitochondria						+	+	+		
peroxisome						+	+	(+)*		
glyoxysome						+	+			

* Isoperoxidases present in very low amount

면역형광법으로 순수 정제한 isoperoxidase A3에 대한 토끼 항체를 제조하여 담배 callus의 얇은 절단면에 반응시킨 후, goat anti-rabbit IgG-fluorescein conjugate로 다시 반응시켜 형광 현미경으로 관찰해본 결과 밝은 초록색의 형광 물질들이 세포벽을 따라서 분포되어 있음을 알 수 있었다(41).

이와 같이 담배 callus내에 존재하는 isoperoxidase들의 분포가 확인됨에 따라 세포 소기관들의 기능과 연관시켜 각 isoperoxidase들의 독특한 생리적 기능을 유추하는 것이 가능하게 되었다.

3. 담배 peroxidase isozyme과 organogenesis

식물 조직배양에서 기관 발생이 일어날 때 auxin과 cytokinin의 상호작용에 의하여 형태발생이 조절된다는 사실은 Skoog과 Miller(42)의 실험에 의하여 오래전부터 알려져 온 사실이며, 담배 callus와 Nephrolepis 조직배양에서 shoot 형성을 촉진하는 kinetin의 농도는 정상농도보다 높은 10^{-5} M 이며 indole-3-acetic acid(IAA)는 오히려 정상농도보다 낮은 10^{-8} M 이라고 보고된 바 있다(42,43).

이와 같은 식물의 분화과정에는 특정 대사경로에 관여하는 효소들의 활성 및 isozyme pattern도 현저히 변하게 되는데, Callus 배양시 shoot이 형성되는 초기에는 glucose-6-phosphate dehydrogenase와 6-phosphogluconate dehydrogenase의 활성이 증가하며, glucose 산화도 매우 활발한 것으로 알려져 있다(44,45). 또한 shoot을 형성하는 callus에서는 peroxidase 활성도 증가하며 peroxidase 활성변화와 isozyme pattern변화는 lignification과 직접 관련이 있다고 보고되고 있다(46,47). 이상의 결과들은 shoot을 형성하는 세포에서 2차 세포벽의 합성을 위하여 lignin 합성이 증가하며 hexose mono phosphate shunt경로가 NADPH의 주된 공급원이기 때문으로 해석할 수 있다. 본 실험에서는 담배 callus를 배양할때 IAA와 kinetin이 peroxidase 활성과 isozyme pattern 변화에 미치는 영향을 조사하고 특정 호르몬의 농도에서 shoot이 형성될 때 어느 특정 isoperoxidase 또는 group이 가장 큰 영향을 받는가를 조사하였다.

담배 callus를 5×10^{-7} M kinetin/ 10^{-5} M IAA를 포함하는 정상 배지에서 배양했을 경우 성장율의 증가는 peroxidase의 활성감소와 그 시기가 일치하였다. 한편, 5×10^{-7} M kinetin/ 10^{-8} M IAA 배지에서 배양한 callus와 5×10^{-7} M kinetin/ 10^{-3} M IAA 배지에서 배양한 callus에서는 배양 12일부터 비활성도가 급격히 증가하여 정상 배지에서 배양한 callus의 peroxidase 비활성도보다 현저히 높다는

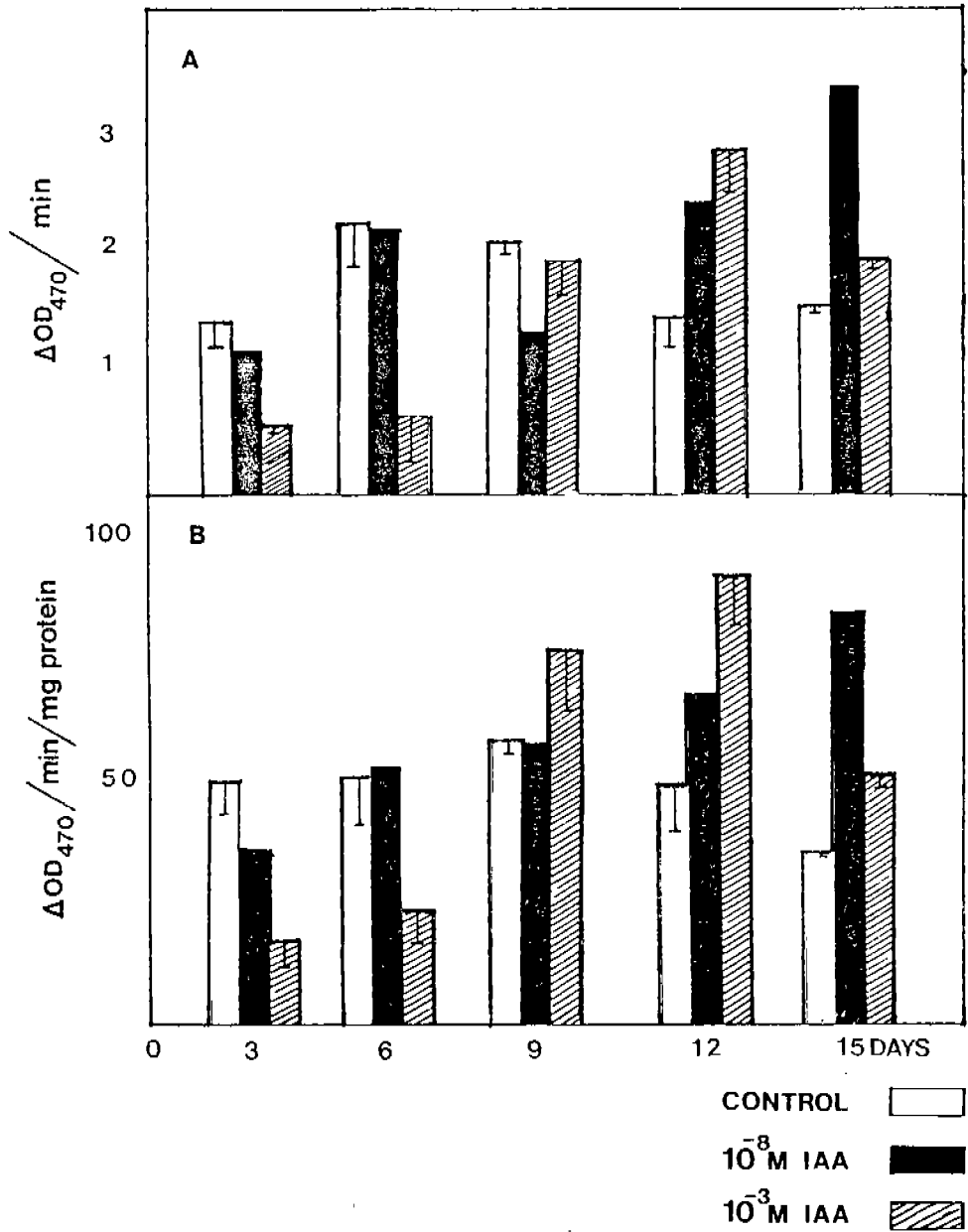


Fig. 2. Effects of IAA on tobacco callus peroxidase.

A: Effects of IAA on the activity of tobacco callus peroxidase. B: Specific activities of peroxidase in tobacco callus cultured on media containing various amount of IAA. Assays were run at 15 mM guaiacol and 5 mM H_2O_2 in 40 mM phosphate buffer (pH 6.5).

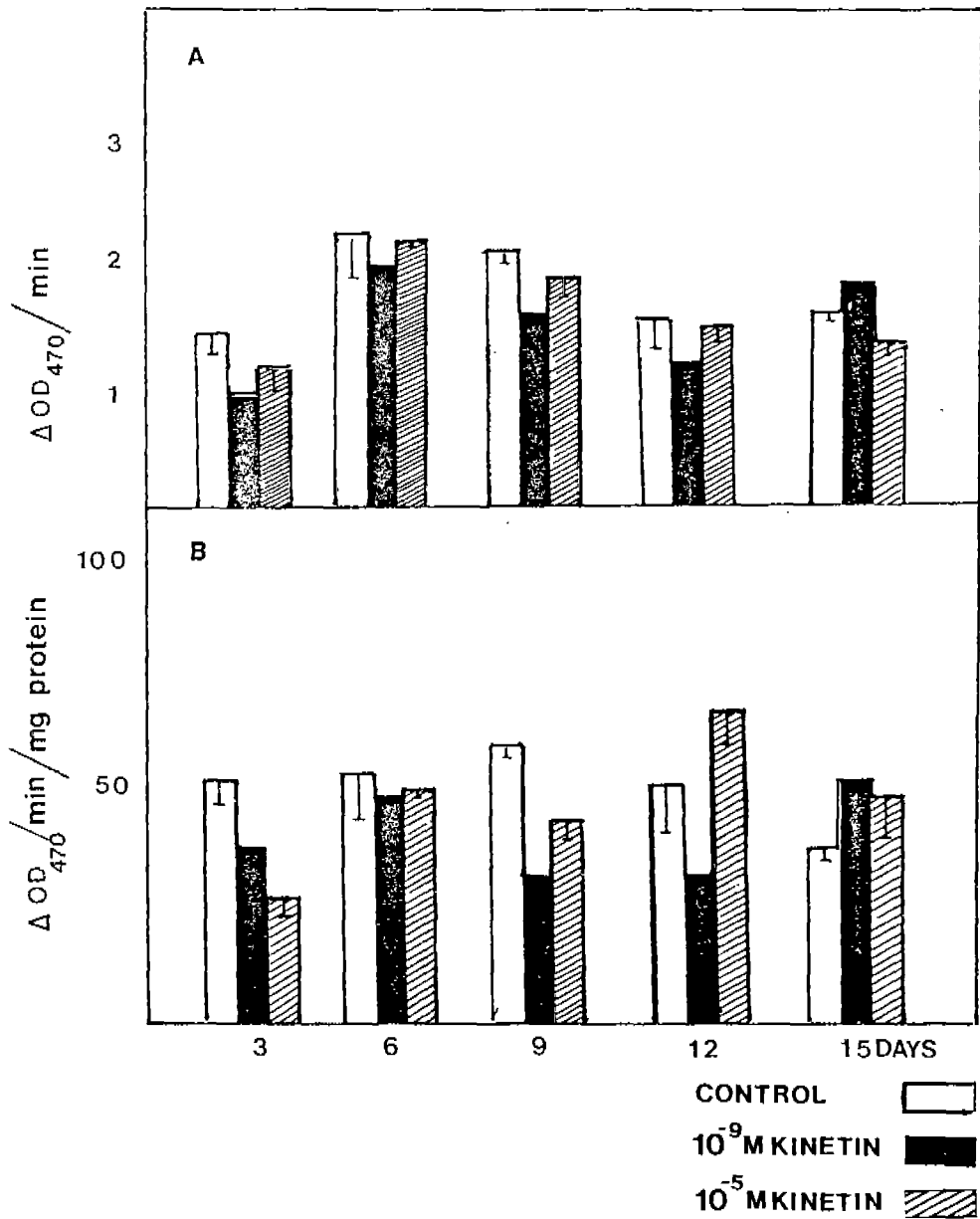


Fig. 3. Effects of kinetin on tobacco callus peroxidase. A: Effects of kinetin on the activity of tobacco callus peroxidase. B: Specific activities of peroxidase in tobacco callus cultured on media containing various amount of kinetin. Assays were run at 15 mM guaiacol and 5 mM H_2O_2 in 40 mM phosphate buffer (pH 6.5).

사실을 알 수 있었다(Fig.2). 한편, IAA 농도를 10^{-5} M로 유지하고 kinetin 농도를 10^{-9} M로 낮출경우 peroxidase 활성이 정상 배지에서 배양한 경우보다 배양 12일까지 낮았고 배양 15일에 있어서 약간 증가한 현상을 보였다. 그러나, kinetin 농도를 10^{-5} M로 높여서 배양했을 때에는 10^{-8} M IAA에서 배양한 callus와 마찬가지로 배양 12일 부터 정상 cal lus보다 높은 비활성도를 나타냈다(Fig.3).

담배 callus 배양시 5×10^{-7} M kinetin/ 10^{-8} M IAA 또는 10^{-5} M kinetin/ 10^{-5} M

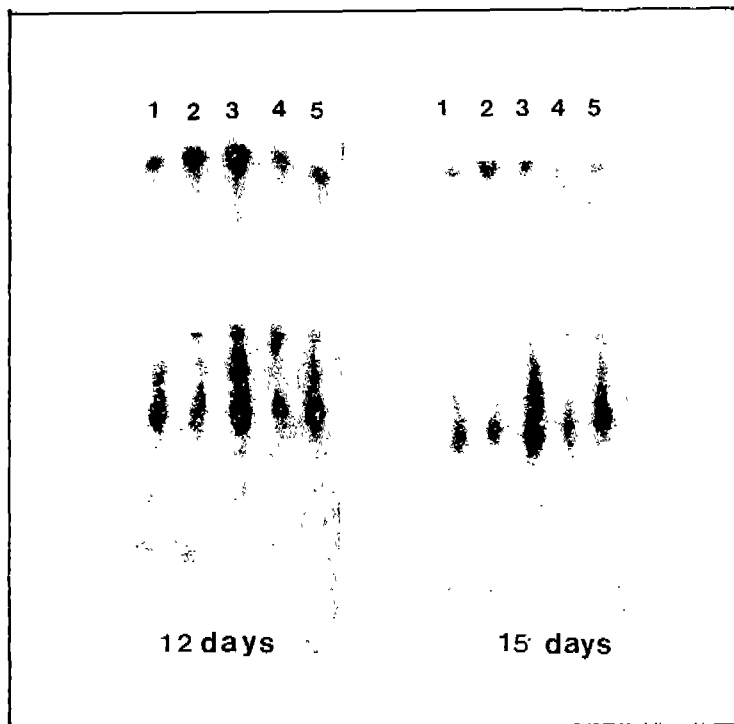


Fig. 4. Comparison of isoperoxidase patterns in tobacco callus. Changes of isoperoxidase patterns in tobacco callus cultured on media containing various amount of IAA and kinetin. Peroxidase bands were visualized by placing the gel in a solution of 100 mg 3-amino-9-ethylcarbazole in 10 ml of dimethylformamide, 185 ml of 50 mM acetate buffer (pH 5.0), 10 ml of 100 mM CaCl_2 and 0.2 ml of 30% H_2O_2 . Lane 1, 5×10^{-7} M kinetin + 10^{-5} M IAA; lane 2, 5×10^{-7} M kinetin + 10^{-8} M IAA; lane 3, 5×10^{-7} M kinetin + 10^{-3} M IAA; lane 4, 10^{-5} M IAA + 10^{-9} M kinetin; lane 5, 10^{-5} M IAA + 10^{-5} M kinetin.

IAA 배지에서 15일 정도 배양하였을 때 shoot 형성이 시작되었다. 앞에서 언급한 바와 같이 shoot 형성 시기의 peroxidase 활성은 위의 두 경우 모두 정상군(5×10^{-7} M kinetin/ 10^{-5} M IAA)보다 증가하였으며 10^{-8} M IAA 배지에서 배양한 callus에서는 10^{-5} M kinetin 배지에서 배양한 callus보다 약 두 배 가량 높은 peroxidase 활성도를 나타냈다. 위와 같은 다른 조건에서 형성된 shoot은 서로 형태학적 차이를 나타내어 10^{-8} M IAA 배지에서 형성된 shoot은 길이가 길고 수가 적었으며, 10^{-5} M kinetin

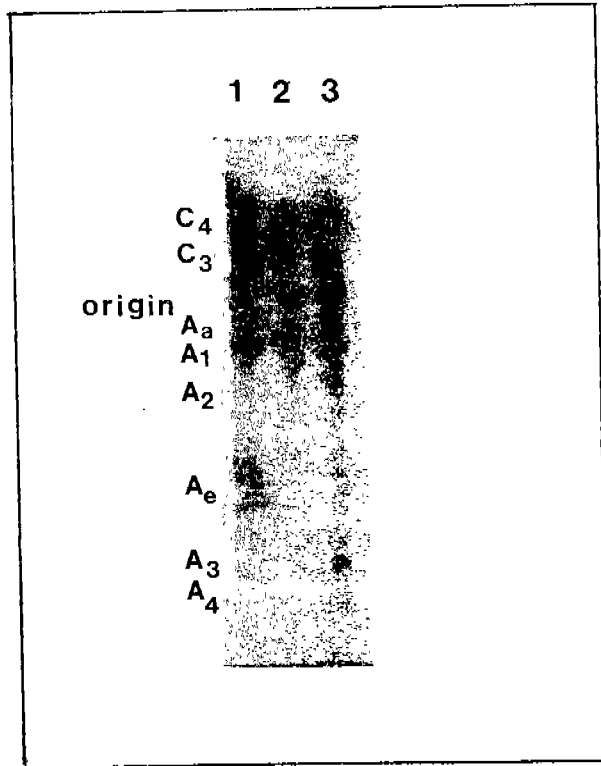


Fig. 5. Isoperoxidase patterns of shoot forming callus. Lane 1, non shoot forming callus; lane 2, shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 10^{-8} M IAA and 5×10^{-7} M kinetin; lane 3, shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 10^{-5} M IAA and 10^{-5} M kinetin. Peroxidase bands were visualized by placing the gel in a solution of 100 mg 3-amino-9-ethylcarbazole in 10 ml of dimethylformamide, 185 ml of 50 mM acetate buffer (pH 5.0), 10 ml of 100 mM CaCl_2 , 0.2 ml of 30% H_2O_2 .

배지에서 형성된 shoot은 짧고 수가 많았다. 또한 shoot 형성시(15일 배양) 10-8 M IAA callus에서 peroxi dase의 활성 증가는 cationic isoperoxidases(주로 C3와 C4)의 증가와 일치하였으며 10-5M kinetin 배지에서 배양한 callus에서는 anionic isoperoxi dases(주로 Aa,A1,A2)의 증가와 일치하였다(Fig.4). 위의 두 조건에서 4주간 배양하여 완전히 형성된 shoots의 추출액을 녹말 질 전기영동을 하였을 때도 앞에서와 비슷한 결과를 얻었는데 특이한 점은 10-5 M kinetin callus의 경우 anionic isoperoxidase A3가 특히 많은 양으로 유도 되었다는 점이다(Fig.5).

이와같은 사실로 보아 shoot 형성 과정에 있어서 전체 peroxidase의 활성보다는 특정 isoperoxidase의 활성이 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다.

4. 담배 Peroxidase isozyme들의 *in vitro* translation 연구

유전자 발현의 조절을 이해하기 위해서는 어느 특정 단백질의 mRNA의 검정이 선행되어야 하며 최근 식물 유전자 발현 연구에 있어서 *in vitro* translation 또는 hybridization 방법에 의하여 특정 mRNA species의 정성적, 정량적 변화를 측정하는 실험들이 많이 수행되고 있다. 이와 같은 연구들은 특정 단백질이 translation된 후 어떻게 가공(modification)되는지 알아내는 방법으로도 유용하다. Theologis등은 auxin으로 처리한 완두콩 epicotyl에서 특정 mRNA 들이 유도된다고 보고하였으며(48), Mohnen등은 담배조직을 auxin과 cyto kinin으로 처리하였을 때 mRNA level에서 B.....-1,3-glucanase 생성을 억제한다고 보고한 바 있다(49). 또한 대두 발아시 auxin으로 처리하면 두 group의 poly(A+)RNA sequence 들이 감소한다는 사실이 RNA/cDNA hybridization 방법에 의하여 확인된 바도 있으며(50), gibberellic acid로 처리하여 발아를 시킨 강낭콩에서 rRNA와 mRNA의 비가 변화한다는 보고도 있다(51). 본 연구실에서도 각 isoperoxidase 사이의 유전적

연관성을 알아보기 위하여 mRNA 를 분리하여 *in vitro* translation을 행하여 어떤 isoperoxidase가 발현되었는가를 조사하였으며, shoot이 형성된 세포와 shoot을 형성하지 않은 세포에서도 mRNA를 분리한 후 *in vitro* translation을 행하여 발현된 peroxidase의 활성을 비교하였다.

담배 callus에서 guanidinum thiocyanate 및 guanidine HCl 방법(52)을 이용하여 callus g 당 1-2 mg 의 순수도가 높은 total cellular RNA를 분리하였으며, oligo(dT)-cellulose column chromatography를 행한 결과 약 1-3% 의 poly(A⁺) RNA를 정제하였다. 이때 poly(A⁻)RNA는 15-20%의 회수율을 보였다 (53).

Rabbit reticulocyte lysate cell-free translation 시스템을 이용한 peroxidase mRNA의 translation을 위한 최적 조건은 2mM Mg²⁺, 80mM K⁺, 15uM hemin, 그리고 1ug의 poly(A⁺) RNA를 사용하였을 때 였으며, 어떤 peroxidase population에 있어서는 1mM Mg²⁺을 최적 조건으로 갖는 경우도 있었다(53).

6 M Urea agarose 전기영동에 의해 total cellular RNA를 분석해 본 결과 16S와 23S 부근에서 peroxidase mRNA를 확인할 수 있었다(53). 또한 anti iso peroxidase C3, A4 및 A3 antiserum을 이용한 immunoprecipitation에 의해 *in vitro* translation 산물을 조사해 본 결과 anti C3와 crossreactivity를 갖는 isoperoxidase C3, C4, C1/C2, anti A4와 crossreactivity를 갖는 isoperoxi dase A4,A1 및 anti A3와 crossreactivity를 갖는 isoperoxidase A3를 확인할 수 있었다(Table 7).

앞에서 말한 *in vitro* translation 조건에서 poly(A⁻) RNA의 특정 isoperoxi dase에 대한 translatable activity를 확인한 결과 isoperoxidase A3는 poly(A⁺) RNA 뿐만 아니라 poly(A⁻) RNA에서도 translation되었으나 isoperoxi dase A4(A1) 및 C3(C1/C2, C4)는 poly(A⁺) RNA에서만 translation되는 것으로 나타났다(Table 8).

Shoot 형성과정에서 translatable mRNAs의 변화를 알아보기 위하여 10-5M ki netin

Table 7. Molecular weights of immunoprecipitated and native isoperoxidase on SDS-PAGE. *In vitro* translation products were immunoprecipitated with anti-A₄, A₃ and C₃ isoperoxidase. Solubilized antigens were analyzed by SDS-PAGE

Identified peaks	Molecular weight	Native isoperoxidase	Molecular weight
B	48,000	A ₁	49,000
C	41,000	A ₄	44,000
F	72,000	C ₃	68,000
G	50,000	C ₁ /C ₂	50,000
H	41,000	C ₄	44,000
K	39,000	A ₃	38,000

Table 8. Immunoprecipitation of *in vitro* translation products with isoperoxidase A₃, A₄ and C₃ antiserum. *In vitro* translation was carried out with poly(A)⁺ and poly(A)⁻ RNA and immunoprecipitated with each antiserum

Immunoprecipitation with	RNA fraction	cpm of immunoprecipitated products
Anti A ₃ Ab	poly(A) ⁻	1,830
	poly(A) ⁺	4,265
Anti A ₄ Ab	poly(A) ⁻	-
	poly(A) ⁺	3,296
Anti C ₃ Ab	poly(A) ⁻	-
	poly(A) ⁺	5,489

Table 9. *In vitro* translation of total RNA, poly A⁺ RNA and poly A⁻ RNA of non shoot forming and shoot forming callus in a rabbit reticulocyte lysate system

	Total [³ H]-Leu incorporation (cpm x 10 ⁻³)	Amounts of RNA added	$\frac{\text{cpm} \times 10^{-3}}{\mu\text{g RNA}}$
No RNA	13.39	0.0	-
NSF total RNA	36.12	18.4	1.96
NSF poly A ⁺ RNA	41.82	4.0	10.46
NSF poly A ⁻ RNA	42.48	6.3	6.74
SF total RNA	33.87	21.6	1.57
SF poly A ⁺ RNA	34.28	4.1	8.36
SF poly A ⁻ RNA	26.53	4.0	6.63

NSF; Non shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 5 x 10⁻⁷M kinetin and 10⁻⁵M IAA.

SF ; Shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 10⁻⁵M kinetin and 10⁻⁵M IAA.

each reaction mixture contains 5 μ Ci of [³H]-Leu.

배지에서 4주 배양한 callus로부터 정제한 RNA를 *in vitro* translation 한 결과는 Table 9 와 같다. 즉 정상 배지에서 4 주 배양한 callus의 경우 ug RNA당 [3H]-Leu incorporation은 poly(A-) RNA를 사용했을 때 보다 poly(A+) RNA를 사용했을 때 약 1.6배 많았으나, shoot에서는 거의 같은 양의 방사능이 존재하였다. 이와 같은 결과는 translation된 peroxidase 활성을 측정하였을 때도 마찬가지여서, 10⁻⁵ M kinetin 배지에서 형성된 shoot에서는 poly(A+) RNA와 poly(A-) RNA ug당 거의 같은 양의 peroxidase가 합성되었으나 정상 배지 에서 배양한 callus에서는 poly(A-) RNA에 비해 poly(A+) RNA에서 약 두배 가량의 peroxidase가 합성되었다(Table 10).

Table 10. Peroxidase activities of *in vitro* translation mixture

	$\Delta OD_{470} / \text{min.}$	Activities	$OD_{470} / \text{min.}$ $\mu\text{g RNA}$
No RNA	0.06	0.00	-
NSF total RNA	0.15	0.09	1.25×10^{-3}
NSF poly A ⁺ RNA	0.32	0.26	21.14×10^{-3}
NSF poly A ⁻ RNA	0.19	0.13	10.84×10^{-3}
SF total RNA	0.08	0.02	0.11×10^{-3}
SF poly A ⁺ RNA	0.11	0.05	4.17×10^{-3}
SF poly A ⁻ RNA	0.09	0.03	4.48×10^{-3}

NSF ; Non shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 5×10^{-7} M kinetin and 10^{-5} M IAA.

SF ; Shoot forming callus cultured for 4 weeks on media containing 10^{-5} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

Assays were run at 15mM guaiacol and 5mM H₂O₂ in 40mM phosphate buffer (pH 6.5).

이와 같은 결과는 poly(A-) RNA에서도 translation되는 isoperoxidase A3가 기질인 scopoletin을 lignin으로 incorporation 시켜서 shoot 형성과정에서 중요한 역할을 갖는 것으로 사료되지만, shoot에서 어떤 scopoletin meta bolite(s)이 특이한 생리작용에 관여할지도 모르는 일이며 앞으로 이 문제는 좀 더 명확히 밝혀져야 할 과제이다.

5. 무우 peroxidase isozyme들의 조직특이성 발현

대부분의 고등식물에서 peroxidasse들의 pattern변화는 tissue specific하며

development에 따라 조절된다고 알려져 왔다(17). 한국산 무우 peroxidase isozyme들의 조직 특이성 발현에 대한 정보를 얻기 위하여 본 실험실에서는 파종한 후 3일 5일 및 7일째 되는 무우 seedling을 자엽(cotyledon), 하배축 (hypocotyl), 뿌리(root)등 기관별로 절취한 후 peroxidase의 활성 및 isoper oxidase의 pattern변화를

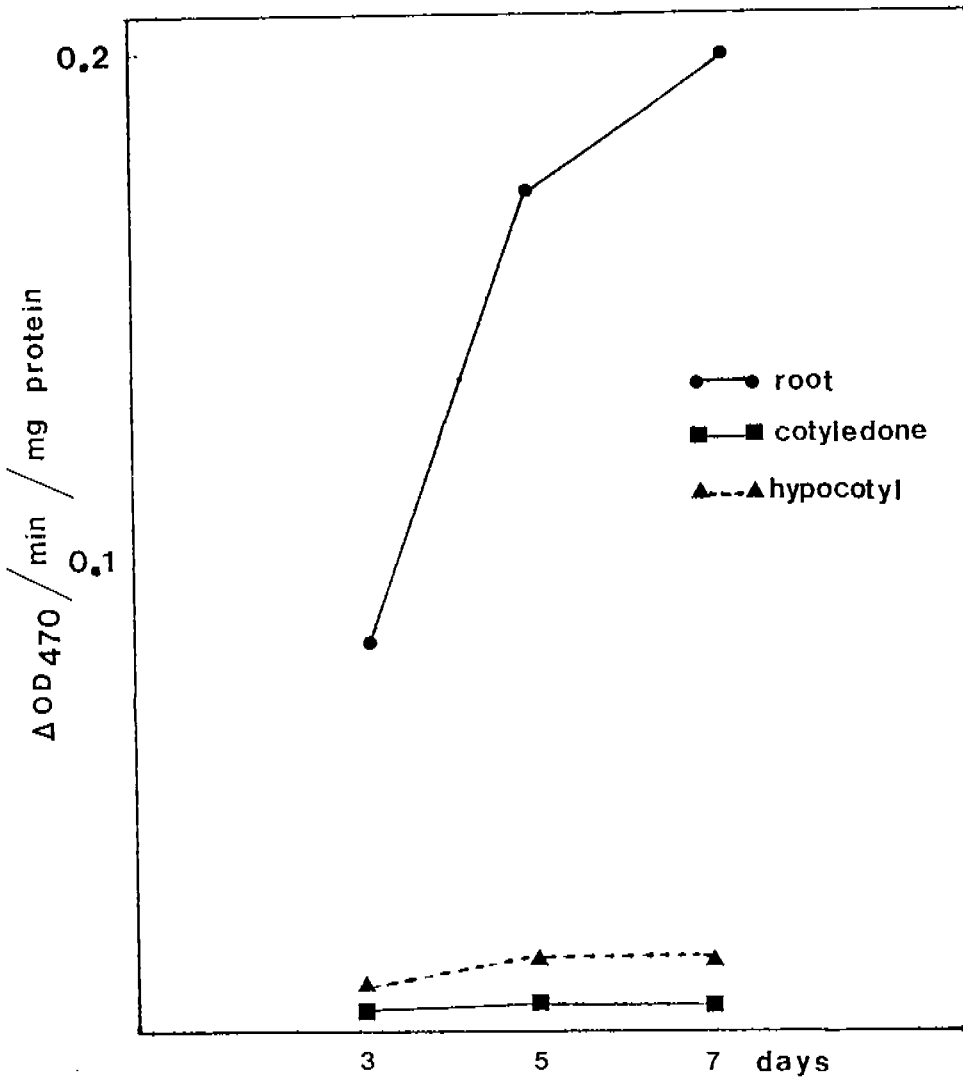


Fig. 6. Changes in specific activity of peroxidases from Korean radish seedling. Assays were run at 15 mM guaiacol and 5 mM H_2O_2 in 40 mM phosphate buffer (pH 6.5).

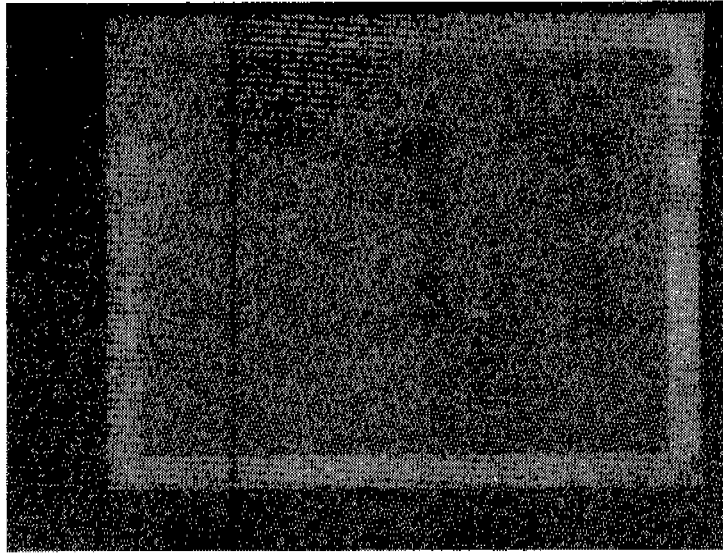


Fig. 7. Changes of isoperoxidase patterns in Korean radish seedling. Lane 1, seedling root; lane 2, hypocotyl; lane 3, cotyledon; lane 4, mature radish root. Peroxidase bands were visualized by placing the gel in a activity staining solution as Fig. 5.

조사해 보았다. Peroxidase의 비활성도는 뿌리의 경우 전 성장기간에 걸쳐서 하배축보다 10여 배가 높았고 자엽보다는 무려 30여 배가 높았다(Fig.6). 성장기간에 따른 기관별 isoperoxidase의 pattern 변화를 녹말 겔 전기영동 방법으로 살펴 본 결과는 Fig.7에서 볼 수 있다. 제 3일에는 자엽, 하배축, 뿌리 모두에서 성숙한 무우 뿌리에서 소량으로 존재하는 C2가 뚜렷이 나타났고 그 대신 성숙한 무우 뿌리에서 많은 양으로 존재하는 C3는 소량 존재하였다. 또한 이 시기에는 anodic isoperoxidase는 거의 발현되지 않았다. 제 5일에도 cathodic isoperoxidase의 경우 자엽, 하배축, 뿌리 모두에서 C2가 C3보다 major band로 염색되었고 C1은 거의 확인할 수 없었다. 이 시기의 자엽 기관에서는 anodic isoperoxidase인 A3가 발현되었고 하배축과 뿌리에서도 A2와 A3가 뚜렷이 존재하였다. 제 7일에는 자엽, 하배축, 뿌리 모두에서 C3도 C2와 거의 비슷한 강도로 발현되었고, 7일이후 부터는 성숙한 무우 뿌리에 존재하는

Table 11. Peroxidase activities of *in vitro* translation mixture from Korean radish hypocotyl and seedling root grown for 5 days in the dark. Translated peroxidase activity was the subtraction of endogenous peroxidase activity of lysate itself from total peroxidase activity

		Δ OD ₄₇₀ /min	translated peroxidase activities	peroxidase activities μ g RNA
endogenous peroxidase activities	No RNA	0.084	0.00	
	total RNA	0.108	0.024	0.024
total peroxidase activities	poly A ⁺ RNA	0.3	0.216	0.216
	poly A ⁻ RNA	0.144	0.06	0.06

Table 12. Peroxidase activities of *in vitro* translation mixture from Korean radish hypocotyl and seedling root grown for 7 days in the dark. Translated peroxidase activity was the subtraction of endogenous peroxidase activity of lysate itself from total peroxidase activity

		Δ OD ₄₇₀ /min	translated peroxidase activities	peroxidase activities μ g RNA
endogenous peroxidase activities	No RNA	0.025	0.00	
	total RNA	0.25	0.025	0.113
total peroxidase activities	poly A ⁺ RNA	0.2	0.175	0.135
	poly A ⁻ RNA	0.27	0.245	0.188

isoperoxidase들이 세 기관 모두에서 대부분 발현되었다. 이러한 성장시기 및 기관별 peroxidase isozyme들의 pattern 변화를 protein 합성 조절이라는 측면에서 mRNA의 정성적 정량적 변화와 연결시키기 위하여, 담배에서 수행하였던 방법에 따라 total RNA 및 poly(A+) RNA를 분리하여 *in vitro* translation을 하여 isoperoxidase들의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 암조건에서 5일간 키운 하배측과 뿌리로부터 분리한 total RNA와 poly(A+) RNA 및 poly(A-) RNA에 의한 [3H]-Leu incorporation 정도는 서로 비슷하였으나 peroxidase의 활성은 poly(A+)RNA를 사용한 경우가 poly(A-)RNA보다 약 3.5배 높았다. 이에 비해서 7일 동안 키운 하배측과 뿌리기관에서 분리한 RNA를 사용했을 때는 poly(A-)RNA에 의한 peroxidase활성이 poly(A+)RNA보다 약 1.4배 높았으며 방사능 유입량도 poly(A-)가 약간 높았다(Table 11,12). 이와 같은 결과는 5일째에 비하여 7일간 키운 무우 seedling에 존재하는 특정 isoperoxidase가 poly(A-)RNA에서 주로 발현된다는 것을 뜻하며, 무우 seedling의 development에 따라서 각각의 isozyme이 특이한 생리작용을 나타낼 뿐만 아니라 무우 isoperoxidase들은 adenylation 상태에 따른 유전자 발현의 조절을 받고 있을 가능성을 말해 준다.

결 론

Peroxidase isozyme들의 다양한 촉매반응과 multiple form으로 존재하는 이유를 설명하고 식물의 성장과 노화 그리고 기관 발생시 isoperoxidase들의 발현을 이해하기 위해 여러 각도로 실험이 진행되고 있다. 1960년대 후반과 1970년대에는 식물 peroxidase들이 multiple form으로 존재하는 사실을 설명하기 위하여

horseradish로부터 각 isoperoxidase들이 정제되기 시작하였고 효소학적 특성 및 촉매반응의 다양성이 밝혀지게 되었다. 그 후 여러 species 에서 연구된 바에 의하면 peroxidase isozyme들이 전기이동도, 일차구조, 면역학적 특성 및 기질 특이성에 있어서 몇 group으로 나누어질 수 있으며 세포내에서의 분포도 다르다는 증거가 제시되었다.

이와 더불어 식물 peroxidase의 isozyme pattern에 미치는 영향을 조사함으로써 주어진 조건에서 특정 isozyme의 pattern 변화를 생리적 기능과 연결시키고 궁극적으로 식물의 분화와 발생을 설명하여 보려는 연구가 많이 진행되었다. 이들 연구를 종합하면 peroxidase의 활성화에 영향을 주는 요소로는 식물의 genotype(예; dwarf genotypes), 온도, 빛의 유무, 손상등 주위환경, 그리고 auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene 같은 호르몬 등을 들 수 있다 (10). 여기에서 dwarf plants가 peroxidase 활성이 높은 이유는 peroxidase의 IAA oxidase 활성 때문으로 해석되며 peroxidase가 식물의 성장 조절인자라는 근거로 제시되고 있다. 또한 손상시 특정 anionic isoperoxidase가 증가하는 것은 이 anionic isoperoxidase가 세포벽 합성을 촉진하며 보호 역할을 하기 때문으로 여겨지며(39), 특정 호르몬 처리시 peroxidase pattern이 변하는 것은 peroxidase가 식물의 분화와 발생에 관여하고 있다는 간접적인 증거로 여러 학자들에 의하여 받아들여지고 있다(10).

본 실험실에서는 담배와 한국산 무우 isoperoxidase들의 효소학적 특성을 규명하고 면역학적 상관관계와 세포내 분포를 조사함으로써 각 isoperoxidase들의 생리학적 기능을 밝히는 기초정보를 제시하였다. 또한 isoperoxidase들의 발현 양상을 조사하기 위하여 mRNA를 분리하고 *in vitro* translation 산물에서 isoperoxidase들을 immunoprecipitation 방법에 의하여 확인하였다. 그 결과 담배의 경우 A1, A3, A4, C3, C4, 및 C1 and/or C2에 대한 mRNA가 세포내에 존재하며 이들 isoperoxidase가 서로 다른 유전자에서 발현될 가능성을 보여주었다.

일반적으로 eukaryote mRNA는 poly(A) tail을 갖고 있는것으로 알려져 있지만 histone mRNA의 경우 poly(A) tail을 갖고있지 않음이 보고된 후(54), Hela 세포(55)와 pea seedlings(56)등 에서도 poly(A-)mRNA가 존재한다는 사실이 보고되었다.

본 실험실에서의 연구결과에 의하면 담배 callus에 있어서 세포벽에 위치하는 isoperoxidase A3 만이 bimorphic mRNA를 갖는 것으로 나타났으며, 한국산 무우의 경우에도 poly(A-) RNA에서 translation되는 isoperoxidase가 있다는 사실이 밝혀졌다. 더우기 담배 callus가 shoot을 형성할 때 poly(A+)RNA / poly(A-)RNA가 변하여 poly(A+)RNA보다 poly(A-)RNA에서 더 많은 peroxidase가 합성되었으며, 무우의 경우에는 파종 후 seedlings이 노화가 됨에 따라 poly(A+)RNA보다 poly(A-)RNA에서 더 많은 peroxidase가 합성되었다.

Palatnik등에 의하면 transcriptional 및 translational control이 이미 존재하는 mRNA들의 adenylation 상태를 변화시킴으로써 coupling되어질 것이라고 주장하였다(57). 즉, Dictyostelium의 발생초기에는 앞서 vegetative growth 시기에 합성되어 있던 mRNA의 poly(A) track이 짧아지며(-30 nucleotides), 새로 합성되는 mRNA는 정상적인 poly(A) track(110-115 nucleotides)을 갖는다. 따라서 발생초기의 세포내에서는 이미 존재하는 mRNA의 경우 약 30%만이 polysome과 결합하는 반면, 새롭게 합성되는 mRNA는 90%이상 poly some과 결합하여 protein 합성이 조절된다고 보고하였다. 따라서 이러한 관점에서 본다면 shoot이 형성될 때 담배의 isoperoxidase들 활성이 mRNA들의 adenylation과 deadenylation에 의하여 조절될 수 있으며, 무우의 경우 seedlings이 노화가 될때도 peroxidase mRNA들의 adenylation 상태가 중요한 조절 역할을 할 것으로 사료된다. 즉 어느 특정 peroxidase mRNA의 poly(A) tail을 deadenylation시킬 경우 그 peroxidase isozyme의 translation 효율이 낮아지고 같은 transcription 조건에서 poly(A-)RNA에서도

translation되는 peroxidase의 활성은 높게 나타날 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Siegel, B.Z., and Galston, A.W. (1967) Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. *Science*, 157,1557-1559.
2. Akazawa, T., and Conn, E.E. (1958) The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase. *J.Biol.Chem.*, 234,403-415.
3. Hill, J.M. (1970) The oxidation of pyridoxal and related compounds by pea-seedling extracts or systems containing peroxidase. *Phytochemistry*, 9,725-734.
4. Yang, S.F. (1967) Biosynthesis of ethylene: ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. *Arch.Biochem.Biophys.*, 122,481-487.
5. Grisebach, H.(1981) Lignins.In.E.E.Conn,ed, *The Biochemistry of Plants*,vol.7. Academic press, New York, pp 451-478.
6. van Huystee, R.B., and Cairns, W.L. (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. *Phytochemistry*, ,1843-1847.
7. Shannon, L.M. (1968) Plant isozymes. in *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 19,187-210.
8. Welinder, K.G. (1985) Plant peroxidases: Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome C peroxidase. *Eur.J.Biochem.*, 151,497-450.
9. Shih, J.H.C., Shannon, L.M., Kay, E., and Lew, J.Y. (1971) Peroxidase isozymes from horseradish roots. IV.Structural relationships. *J.Biol.Chem.*, 246,4546-4551.
10. Galston, A.W., and Davies, P.J. (1970) Hormonal regulation in higher plants. *Science*, 163,1288-1296.
11. Lagrimini, L.M. and Rothstein, S.(1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.*, 84,438-442.
12. Bi ecka, H. and Miller, A. (1974) Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury indoleacetic acid and ethylene effects: *Plant physiol.*, 53, 569-574.
13. De Jong, D.W., Olson, A.C., Hawker, K.M., and Jansen, E.F. (1968) Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension. *Plant Physiol.*, 43,841-844.

14. Leu, S-L.K., Wender, S.H. and Smith, E.C. (1975) Effect of darkness on isoperoxidases in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 14, 2551-2554.
15. Kim, S.S., Wender, S.H. and Smith, E.C. (1980) Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 19, 165-168.
16. Kay, L.E. and Basile, D. (1987) Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant physiol.*, 84, 99-105.
17. Powell, B.L., Pickering, J.W., Wender, S.H., and Smith, E.C. (1975) Isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 14, 1715-1717.
18. Kim, S.S., Wender, S.H., and Smith, E.C. (1980) Comparisons of tryptic peptide maps of eight isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 19, 169-171.
19. van Huystee, R.B.(1987) Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 38, 205-219.
20. Shannon, L.M., Kay, E., and Lew, J.Y. (1966) Peroxidase isozymes from horseradish roots: I.Isolation and physical properties. *J.Biol.Chem.*, 241, 2166-2172.
21. Kay, E., Shannon, L.M. and Lew, J.Y. (1967) Peroxidase isozymes from horseradish roots: II.Catalytic properties. *J.Biol.Chem.*, 242,2470-2473.
22. Mazza, G., Job, C. and Bouchet,M. (1973) Chemical composition and hydrodynamic characteristics of turnip peroxidases. *Biochim.Biophys.Acta.*, 322,218-223.
23. Welinder, K.G. and Mazza, G. (1975) Similarities and differences of five peroxidases from turnip and horseradish: peptide mapping studies on glycoproteins. *Eur.J.Biochem.*, 57, 415-424.
24. Welinder, K.G. (1979) Amino acid sequence of horseradish peroxidase: Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur.J.Biochem.*, 96, 483-502.
25. Mazza, G. and Welinder, K.G. (1980) Covalent structure of turnip peroxidase 7: Cyanogen bromide fragments, complete structure and comparison to horseradish peroxidase C. *Eur.J.Biochem.* 108, 481-489.
26. Welinder, K.G. (1985) Plant peroxidases: Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome C peroxidase. *Eur.J.Biochem.*, 151, 497-504.
27. van den Berg, B.M. (1984) On the regulation of peroxidase gene expression in petunia. Ph.D thesis. Univ. Amsterdam, Holland. 83pp.
28. Stafford, H.A., and Galston, A.W. (1970) Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isoenzymes in tobacco pith. *Plant physiol.*, 46,763-767.

29. Pickering, J.W., Powell, B.L., Wender, S.H. and Smith, E.C. (1973) Ferulic acid: A substrate for two isoperoxidases from *Nicotiana tabacum* tissue cultures. *Phytochemistry*, 12,2639-2643.
30. Reigh, D.L., Wender, S.H. and Smith, E.C. (1973) Scopoletin: A substrate for an isoperoxidase from *Nicotiana tabacum* tissue culture W-38. *Phytochemistry*, 12,1265-1268.
31. Lee, M.Y., Kim, J.A., and Kim, S.S. (1988) Characteristics of two anodic isoperoxidases from tobacco callus. *Korean Biochem.J.*, 21.(2), 161-168.
32. Reigh, D.L., Wender, S.H. and Smith, E.C. (1975) Scopoletin: Kinetic nature of isoperoxidase A3 catalyzed oxidation and its possible relation to the physiological action of this naturally-occurring growth effector. *Physiol.plant.*, 34,44-46.
33. Paul, K.G. and Stigbrand, T. (1970) Four isoperoxidases from horseradish roots. *Acta.Chem.Scand.*, 24, 3607-3617.
34. Einhellig, F.A., Rice, E.L., Risser, P.G. and Wender, S.H. (1970) Effects of scopoletin on growth, CO₂ exchange rates and concentration of scopoletin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. *Bull.Jorrey Bot.Club*, 97, 22-23.
35. Lagrimini, L.M, Burkhart, W., Moyer, M., and Rothstein, S. (1987) Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 84,7542-7546.
36. Choi, Y.H., and Kim, S.S. (1988) unpublished observations.
37. Raa, J. (1973) Cytochemical localization of peroxidase in plant cells. *Physiol.Plant.*, 28,132-133.
38. Schlob, P., Walter, C., and Mader, M. (1987) Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 170,225-229.
39. Espelie, K.E., Franceschi, V.R., and Kolattukudy, P.E. (1986) Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound healing potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 81,487-492.
40. Woo, k., Lee, M.Y., and Kim, S.S. (1987) Effect of tunicamycin and 2-deoxy-D-glucose on the cellular and secreted isoperoxidase levels of tobacco callus. *Korean Biochem.J.*, 20,58-66.
41. Oh, H.S. (1989) 담배 callus isoperoxidase들의 세포내 분포에 관한 연구. 연세대학교 석사학위 논문.
42. Skoog, F. and Miller, C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp.Soc.Exp.Biol.* 11,118-131.

43. Beck, M.J. and Caponetti, J.D. (1983) The effects of kinetin and naphthalene acetic acid on *in vitro* shoot multiplication and rooting in the fishtail fern. *Amer.J.Bot.*, 70(1),1-7.
44. Seemi, S. and Gnanam, A. (1981) Isozymes of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD⁺-malate dehydrogenase in shoot-forming foliar discs of tobacco. *Plant and cell Physiol.* 22(6). 969-977.
45. Thorpe, T.A., and Laishley, E.J. (1973) Glucose oxidation during shoot initiation in tobacco callus cultures. *J.Exp.Bot.*, 24,1082-1089.
46. Hasegawa, P.M., Murashige, T., and Mudd, .B. (1978) The fate of L-tyrosine-UL-14C in shoot forming tobacco callus. *Physiol. Plant*, 41,223-230.
47. Pryke, J.A, and ap.Rees, T. (1979) The pentose phosphate pathway as a source of NADPH for lignin synthesis. *Phytochemistry*, 18,557-560.
48. Theologis, A., Huynh, T.V., and Davis, D.W. (1985) Rapid induction of specific mRNAs by auxin in pea epicotyl tissue. *J.Mol.Biol.*, 183,53-68.
49. Mohnen, D., Shinshi, H., Felix, G., and Meins, F.Jr. (1985) Hormonal regulation of B-1,3-glucanase messenger RNA levels in cultured tobacco tissues. *The EMBO Journal*, 4(7),1631-1635.
50. Baulcombe, D.C. and Key, J.L. (1980) Polyadenylated RNA sequences which are reduced in concentration following auxin treatment of soybean hypocotyls. *J.Biol.Chem.*, 255, 8907-8913.
51. Martin, C., and Northcote, D.H. (1982) The action of exogenous gibberlic acid on protein and mRNA in germinating castor bean seeds. *Planta*, 154,168-173.
52. Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically activ ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18,5294-5298.
53. Kim, J.J., and Kim, S.S. (1987) *in vitro* translation and characterization of peroxidase mRNA from tobacco callus. *Korean Biochem.J.*, 20.(3),293-300.
54. Ad snick, M., and Darnell, J.E. (1972) Biogenesis and characterization of histon mRNA in Hela cells. *J.Mol.Biol.*, 67,397-406.
55. Milcarek, C., Price, R., and Penmen, S. (1974) The metabolism of a poly(A) minus mRNA fraction in Hela cells. *Cell*, 3,1-10.
56. Gray, R.E., and Cashmore, A.R. (1976) RNA synthesis in plant leaf tissue: The characterization of messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid. *J.Mol.Biol.*, 108,595-608.
57. Palatnik, C.M., Wilkins, C., and Jacobson, A. (1984) Translational cotrol during early Dictyostelium development: Possible involvement of poly(A) sequences. *Cell*, 36,1017-1025.

저 자 약 력

김 승 수 (金 承 洙) 박사

- 1946. 1. 5. 생
- 1969. 2 연세대학교 생물학과 (이학사)
- 1972. 12. 미국 Louisiana 주립대학교 미생물학과 (이학석사)
- 1978. 6. 미국 Oklahoma대학교 생화학과 (Ph. D.)
- 1982. 9. - 현재 연세대학교 생화학과 교수