

옥수수葉의 葉綠體發達에 따른 CO<sub>2</sub> 固定樣相에 관한 연구

李 舜 熙 · 康 榮 燾  
(延世大 理科大 生物學科)

Studies on the CO<sub>2</sub> Fixation Patterns Following the  
Chloroplast Development in Maize Leaves

Lee, Sun Hi and Yong Hee Kang  
(Dept. of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

These studies were undertaken to determine the CO<sub>2</sub> fixation patterns following the chloroplast development in maize leaves.

At the early stage of chloroplast development <sup>14</sup>C was incorporated into aspartate (41%) and malate (22%) respectively. Whereas the incorporation of <sup>14</sup>C into malate was higher than that of aspartate as chloroplast developed. Activity of NADPH-dependent malate dehydrogenase was increased throughout chloroplast development, but that of aspartate transaminase was not.

Much incorporation of <sup>14</sup>C into aspartate at the early stage of chloroplast development and into malate at later stage of chloroplast development lead us to conclude that NADPH-dependent malate dehydrogenase activity is closely associated with chloroplast development, but activity of aspartate transaminase is not.

서 론

C<sub>4</sub>-식물의 초기 광합성 산물은 oxaloacetate(OAA)로 (Kortschak et al., 1965; Hatch et al., 1966; Slack et al., 1967) 엽록체포에서 外氣로부터 받아들인 CO<sub>2</sub>를 phosphoenol pyruvate(PEP)가 수용한다. 이렇게 形成된 OAA는 *Sorghum*, 옥수수 등의 malate former 植物에서는 NADPH-dependent malate dehydrogenase에 의해 malate로 전환되며 *Amaranthus edulis*, *Atriplex spongiosa*, *Panicum miliacium* 등의 aspartate former 식물에서는 aspartate transaminase에 의해 aspartate로 전환된다. (Edwards et al., 1972; Hatch et al., 1973)

本 실험의 목적은 malate former인 옥수수엽에 있어 엽록체의 개체발생과정중 malate former plant와 aspartate former plant의 유연 관계를 밝히기 위한 수단으로 엽록체 발달에 따라 CO<sub>2</sub> 고정 양상과 NADPH-

dependent malate dehydrogenase와 aspartate transaminase의 活性를 측정하여 비교 검토하였다.

실험 재료 및 방법

실험 재료는 옥수수(*Zea mays* L., Golden Cross Bantham)를 사용하였다.

시료의 제조

옥수수의 種子를 0.5% formalin액으로 1시간 소독시킨후 여러번 흐르는 물로 씻은 다음 25°C 암소에서 1주일간 발아 생육시켜 나온 제 1엽을 사용하였다.

대조구로서 같은 기간 온실에서 발아 생육시켜 나온 제 1엽을 사용하였다.

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> feeding 및 추출 방법

암소에서 발아 생육시켜 나온 제 1엽에 약 1,000ftc의 빛을 1, 3, 6, 9, 18, 24시간 각각 조사시킨 후 CO<sub>2</sub> 고정 chamber에 넣어 NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (65μCi)로 3분간 각각 고정시킨후 곧 boiling ethanol(80%)로 처리하여 메

사 환성을 중지시키고 80% ethanol로 30분간 3회 열탕하여 추출하였다.

#### Aspartate 및 malate의 분석 및 고정

80% ethanol 추출물을 40°C이하에서 rotary evaporator로 농축시킨 다음 Dowex-50(H<sup>+</sup>)과 Dowex-1(CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)의 resin column에 통과시켜 각 resin에 amino산 유기산을 흡착시켰다.

Aspartate는 Dowex-50(H<sup>+</sup>) resin column에 흡착된 아미노산 fraction을 2N NH<sub>4</sub>OH로 유출(1cc/min)시켜 농축시킨후 paper chromatography(Watman No.1) 방법으로 분석하였으며 aspartate에 incorporation된 <sup>14</sup>C은 4% PPO (2,5-diphenyl oxazole)이 함유된 toluen과 absolute ethanol을 섞은 용액(1:1)에 넣어 liquid scintillation counter (Beckman Instrument Ltd.-250)로 측정하여 동정하였다.

Malate는 Dowex-1 (CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>) resin column에 흡착된 유기산 fraction을 Zelitch(1965) 방법에 따라 fraction collector로 fraction하여 분석하였으며 malate에 incorporation된 <sup>14</sup>C은 aspartate에서와 같은 방법으로 동정하였다.

#### 효소 활성의 측정

미리 냉은 처리한 mortar에 2~3gr의 잎과 소량의 sea sand를 추출액 10ml에 넣어 마쇄시킨 다음 4점의 cheese cloth로 여과시켜 여과물을 냉동원심분리기(10,000×g)로 20분간 원심시켜 얻은 상등액을 효소활성에 사용하였다. 이 모든 과정은 0~4°C에서 조작하였으며 추출액 조성은 다음과 같다.

20mM tricine, pH 8.3, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM 2-mercaptoethanol, 0.2mM EDTA.

Aspartate transaminase의 활성은 Hatch (1973)의 방법으로 NADH의 산화속도를 340nm에서 spectrophotometer로 측정하였고 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 활성은 Hatch (1969)의 방법으로 NADPH의 산화 속도를 340nm에서 spectrophotometer

로 측정하였다. Protein 함량은 Lowry (1951)의 방법에 따라 측정하였다.

#### 실험결과 및 논의

옥수수는 malate former plant로 기공을 통하여 엽육세포에 받아들인 CO<sub>2</sub>를 세포질속에 존재하는 PEP에 의해 수용되어 OAA를 형성한 다음 NADPH-dependent malate dehydrogenase에 의해 malate로 전환한다.

본 실험의 결과 암소에서 생육시킨 etiolated leaf에 3시간 정도 빛을 조사시켰을 때에는 aspartate에 41%, malate에 22% 정도 <sup>14</sup>C이 incorporation 되어 엽록체 발달초기에는 aspartate former인 양상을 보였으나, 6시간 빛을 조사시켰을 때에는 malate에 30%, aspartate에 25% <sup>14</sup>C이 incorporation 되었고 18시간 빛을 조사시켰을 경우에는 malate에 36%, aspartate에 12% <sup>14</sup>C이 incorporation 되어 온실에서 생육시킨 葉에서와 같이 aspartate 보다는 malate에 <sup>14</sup>C이 더욱 많이 incorporation 되어 엽록체가 발달함에 따라 malate former로 되는 경향을 나타내었다(Table 1).

Table 1의 결과가 엽록체 발달 초기에 aspartate former plant에서와 같이 aspartate transaminase의 활성이 높고 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 활성이 낮으며 엽록체가 발달함에 따라 이런 현상이 정반대로 나타나는지를 규명하기 위해 엽록체 발달에 따라 aspartate transaminase와 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 활성을 측정하였다.

Table 2에서와 같이 엽록체 발달에 따라 aspartate transaminase의 활성은 거의 일정하여 효소 환성의 변화를 찾아 볼 수 없었으나 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 활성은 엽록체가 발달함에 따라 증가하는 결과를 가져와 엽록체 발달과 밀접한 연관성을 갖고 있음을 찾아 볼 수 있었다. Hatch(1973)에

Table 1. Proportion of total <sup>14</sup>C incorporated into aspartate and malate following the chloroplast development in maize leaves

Illumination	Aspartate (% of total <sup>14</sup> C fixed)	Malate
3 hours	41	22
6 hours	25	30
18 hours	12	36
24 hours	12	14
Green House	5	21

Table 2. Enzyme activities of aspartate transaminase and NADPH-dependent malate dehydrogenase following the chloroplast development in maize leaves

illumination	Protein (mg/g fr. wt.)	Aspartate transaminase ( $\mu$ M/mg·protein/h)	NADPH-dependent malate dehydrogenase
0 hour	18.1	22.7	6.5
3 hours	17.0	24.5	7.3
6 hours	16.3	18.6	7.9
18 hours	16.1	21.8	12.7
24 hours	14.3	23.2	14.2
Green House	17.7	20.9	10.4

의하면 aspartate transaminase는 엽록체포에서는 세포질에서 유래하며 유관속초 세포에서는 mitochondria에서 유래한다는 보고와 Lee(1977) 등이 발표한 바와 같이 mitochondria는 3일간 암소에서 발아 생육시킨 엽에서도 cristae 구조가 잘 발달하였고 엽록체는 1주일간 암소에서 생육시킨 엽에 약 6시간 정도 빛을 조사해야 grana가 형성되었던 점으로 보아 상기 효소 활성과 밀접한 관계를 갖고 있음을 나타내었다.

아울러 엽록체 발달 초기에는 <sup>14</sup>C이 aspartate에 많이 incorporation 되었고 엽록체가 발달함에 따라 malate에 많이 incorporation 되는 것은 엽록체 발달에 따른 aspartate transaminase의 활성의 차가 아니라 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 활성의 차이에 기인하는 것이라 사료된다.

摘 要

Malate former인 옥수수葉을 재료로 葉綠體 發達에 따른 CO<sub>2</sub> 고정양상을 규명하기 위해 본 實驗을 시도하였다.

葉綠體 발달 초기에는 <sup>14</sup>C이 malate (22%) 보다 aspartate (41%)에 많이 incorporation 되었으나 葉綠體가 더 발달함에 따라 malate에 더욱 많이 incorporation 되었다.

Aspartate transaminase의 活性는 엽록체 발달과 아무런 關係가 없었고 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 活性는 엽록체 발달에 따라 증가하였다.

이런 결과로 보아 엽록체 발달 초기에 <sup>14</sup>C이 aspartate에 많이 incorporation 되고 엽록체가 발달함에 따라 malate에 많이 incorporation 된 것은 NADPH-dependent malate dehydrogenase의 活性가 엽록체 발달과 밀접한 關係를 갖고 있기 때문이라 사료된다.

參 考 文 獻

Edwards, G.E. and M. Gutierrez. 1972. Metabolic activities in extracts of mesophyll and bundle sheath cells of *Panicum miliaceum* in relation to the C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Plant Physiol.* 50 : 728—732.

Kortschak, H.P., C.E. Hartrt and G.O. Burr. 1965. Carbon dioxide fixation in sugar cane leaves. *Plant Physiol.* 40 : 209—213.

Lee, S.H., M. Ikeda and Y. Yamada. 1977. Comparative studies on chloroplast development and photosynthetic activities in C<sub>3</sub>-and C<sub>4</sub>-plants. I. Studies on ultrastructure of developing chloroplast within vascular bundle sheath and mesophyll cells of barley and maize leaves. *J. Fac. Kyushu Univ.* 22 : 65—74.

Lowry, O.H., N.J. Roberbrough, A.L. Farr and R.J. Raddall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 262—275.

Hatch, M.D. and C.R. Slack. 1969. Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101 : 103—111.

Hatch, M.D. and C.R. Slack. 1969. NADP-specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 34 : 589—593.

Hatch, M.D. and S. L. Mau. 1973. Activity, location, and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase isoenzymes in leaves with C<sub>4</sub> pathway photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 156 : 195—206.

Slack, C.R. and M.D. Hatch. 1967. Comparative studies on the activity of carboxylase and other enzymes in relation to new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation tropical grasses. *Biochem. J.* 103 : 660—665.

Zellich, I. 1965. The relation of glycolic acid synthesis to the primary photosynthetic carboxylation reaction in leaves. *J. Bio. Chem.* 240 : 1869—1876.

(1979년 3월 10일 접수)