

Gibberellic Acid의 作用機作에 관한 研究
I. GA₃에 의한 蛋白質의 生合成 및 磷酸化反應의 調節

沈 雄 燮·盧 光 洙
(高麗大學校 理科學 生物學科)

Studies on the Mechanisms of Gibberellic Acid Action
I. Regulation of Protein Biosynthesis and Phosphorylation
by Gibberellic Acid 3

Sim, Woong-seop and Kwang-soo Roh
(Department of Biology, Korea University, Seoul)

ABSTRACT

As a part of the studies on the regulatory mechanism of gene expression by GA₃, the effects of GA₃ on the protein biosynthesis and phosphorylation in maize seedlings were investigated.

1. The optimum concentration of GA₃ for the stimulation of the protein biosynthesis was 0.3mM.

2. The protein biosynthesis was remarkably increase by GA₃ during the germination. The reason for the decrease in the protein biosynthesis by 48hrs. after germination seems to be a staggered gene expression, and/or increases in protease and RNase activities.

3. The ratio of the amount of the newly synthesized protein in germinating seeds treated with GA₃ to the amount of proteins secreted into the endosperm was similar to that ratio in control. According to this result, it seems that GA₃ stimulates only the expression of certain definite genes.

4. By the treatment with GA₃, the rates of biosynthesis and phosphorylation of proteins were increased up to about 1.5 times during germination and 6 times by 72hrs. after germination, respectively. The ratio of the total soluble proteins to the phosphoproteins considerably increased in the early germination stage (24hrs.) but decreased after 24hrs. According to the above mentioned results, the stimulation of the phosphorylation of proteins by GA₃ seems to be attributed to the increases in the activities of protein kinases.

緒 論

Gibberellic acids는 細胞의 分裂(Sachs *et al.*, 1958) 및 성장(Haber *et al.*, 1969)에 영향을 미침으로써 식

물의 성장을 調節한다는 사실이 밝혀졌으며 그 후 GA 作用에 對한 보다 구체적인 연구가 進행된 結果, GA는 몇몇 특정 효소의 活性을 조절한다는 사실이 밝혀졌으나(Paleg, 1961; Chrispeels & Varner, 1966; Lips & Bejerano, 1969), GA에 의한 효소활성의 조절이

DNA合成, transcription 및 translation 중 어느 과정에서 어떤 기작에 의하여 調節되는지는 밝혀지지 못하고 있다. 최근 GA의 작용과 cyclic AMP와의 相互關聯性에 대한 研究가 進行되고 있는바, Galsky 및 Lippincott (1969)과 Kamisaka 등 (1972)은 cyclic AMP가 GA의 작용과 마찬가지로 植物體內에서 α -amylase의 activity를 증가시켰다는 사실을 보고한 바 있다.

본 연구에서는 植物의 成長에 미치는 GA의 장·단기 調節機作을 分子生物學的 측면에서 究明하려는 일단계 연구로서 단백질의 生合成 및 인산화반응에 미치는 GA의 효과를 구명하였다.

材料 및 方法

재료 옥수수(*Zea mays* L.) 種子는 Sakada(일본) 종자회사로부터 구입한 Golden growth-bandam T-51을 사용하였으며, 90% 이상의 gibberellic acid 3을 함유하고 있는 GA₃는 Sigma(London) 化學會社로부터, 그리고 ¹⁴C-tyrosine(531 mCi/m mol)은 Amersham(England)으로부터 구입하였다.

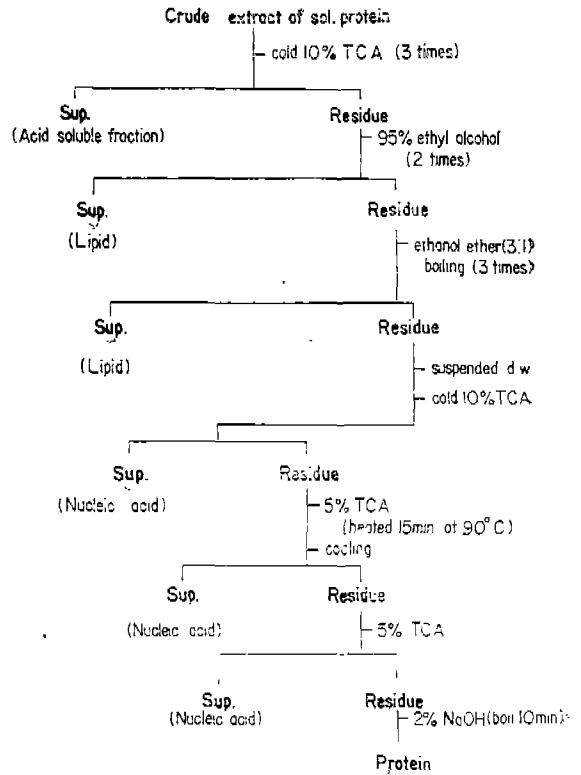
종자의 발아 비슷한 무게의 種子(±10mg)를 택해서 20% sodium hypochlorite 용액에 15分間 멸균시켜 2회 세척한 후 단백질의 인산화반응 실험시는 Nitsch배지 5 ml당 10 μ Ci ³²P를 부가하고, 단백질의 生合成능 實驗時는 Nitsch배지에 5時間 침운시킨 후 각 증자에 0.125 μ Ci ¹⁴C-tyrosine을 주입시켜 30°C에서 발아시켰다.

粗蛋白質의 造製(Preparation of crude proteins)

발아중의 증자를 一定한 간격으로 수확하여 endosperm과 endosperm-less seed로 分離시킨 후 各各의 무게를 測定한 다음 0.01M EDTA, 0.01M KCl 및 0.001M MgCl₂를 함유하는 0.2M phosphate buffer (pH 7.5)를 가해 mortar로 마쇄하였다. 마쇄後 4겹의 거즈로 濾過한 후 4,500g에서 20分間 遠心分離하여 얻어진 상등액에 10% TCA를 최종농도가 5%되게 부가하여 0°C에서 15분간 放置後 10,000g에서 10분간 遠心分離하였다. 遠心分離後 沈澱物에 5% TCA를 가해 현탁시켜 10,000g에서 10분 遠心分離하여 沈澱物을 5% TCA로 2회 洗滌한 後 이 沈澱物을 crude protein fraction이라 하였다.

蛋白質의 精製 Table 1에 표시된 바와같이 蛋白質은 粗蛋白質 分割으로부터 Schneider(1945) 方法에 따라 精製되었다. I. crude protein fraction으로부터 cold 10% TCA로 酸可溶性物質을 3회(30분, 15분, 15분) 抽出하고, II. 그의 residue를 95% ethanol로 2회 洗

Table 1. Preparations of Protein



滌한 후, III. alcohol-ether를 가하여 끓는 물에서 3회(各 3分) lipids를 제거하였다. IV. 과정(III)으로부터 얻은 沈澱物을 1.2 ml 蒸溜水에 현탁한 후 cold 10% TCA 1.3 ml을 가하여 遠心分離後 沈澱物에 5% TCA를 가하여 90°C에서 15分 가열한 후 冷却시켜 遠心分離後, 다시 沈澱物을 5% TCA를 가하여 核酸을 除去한 後 침전물을 蛋白質 分割으로 看做하였다.

放射能測定(Measurement of radioactivity) 蛋白質의 生合成 및 磷酸化能을 測定하기 위하여 crude protein fraction과 精製된 蛋白質 標品을 scintillation-cocktail에 넣어 Beckman LS-100 liquid scintillation system을 이용 방사능을 測定하였다.

結果

1. GA₃의 最適 濃度

Jones & Stoddart(1970)은 開花過程에서 GA₃를 처리했을 경우 蛋白質 生合成能이 時間의 經過에 따라서 많은 차이가 있음을 보고한 바 있으며, Kaldewey & Vardar(1971)은 exogenous GA농도에 對한 植物의 反應은 發生時期에 따라서 各各 다르다는 것을 보고한 바 있다. 본 研究에서는 蛋白質 生合成能의 促進에 미

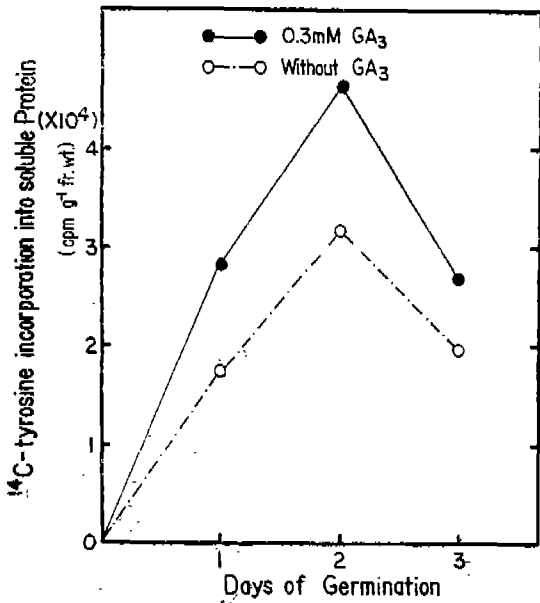


Fig. 1. Effect of GA₃ on the protein biosynthesis. Maize seeds treated with ¹⁴C-tyrosine(0.125 μCi/seed) were germinated in Nitsch medium for 2 days at 30°C. The radioactivity in the crude protein extract was counted for the estimation of the amount of soluble proteins.

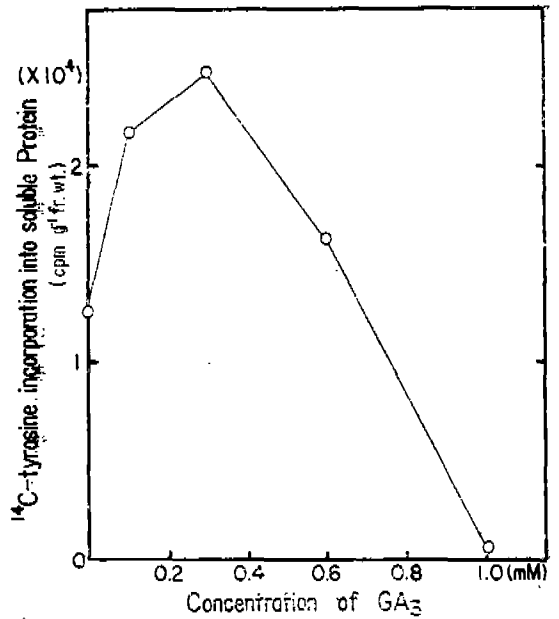


Fig. 2. Variations in the rate of ¹⁴C-tyrosine incorporation into soluble proteins during germination with and without GA₃. The crude protein extracts were prepared from maize seeds treated with ¹⁴C-tyrosine at various intervals during germination at 30°C. The amount of soluble proteins were measured by counting the radioactivities in the crude protein extracts.

치는 GA₃의 效果를 測定한 結果, Fig. 1에서 보는 바와 같이 0.3 mM이 最適 濃度이었으며 對照區에 비하여 100% 증가하였으나 1 mM에서는 蛋白質 生合成能은 거의 억제되었다.

2. 蛋白質의 生合成能

植物의 發芽 初期에는 RNA 및 蛋白質의 合成이 증가된다는 많은 報告(Fukushi *et al.*, 1977; Marcus & Feeley, 1965)가 있으며, GA₃는 α-amylase (Filner & Varner, 1967) 및 protease (Jacobsen & Varner, 1967; Varner & Chandra, 1964)의 合成을 增加시킬 뿐만 아니라 그 외의 다른 hydrolytic enzymes (Taiz & Jones, 1970)의 合成을 增加시킨다고 한다. 이상의 報告에 따라서 發芽中의 maize seed의 蛋白質 合成能을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 對照區 및 GA₃ 處理區 모두가 發芽 初期(24~48hrs.)에는 蛋白質의 合成能이 增加되었으나 48 내지 72hrs. 후에는 감소된다는 報告(Fukushi *et al.*, 1977)와 一致됨을 보여주고 있다. GA₃ 處理區에 있어서의 蛋白質合成能은 對照區에 비하여 發芽 72시간까지 현저한 增加를 보였다(Fig. 2).

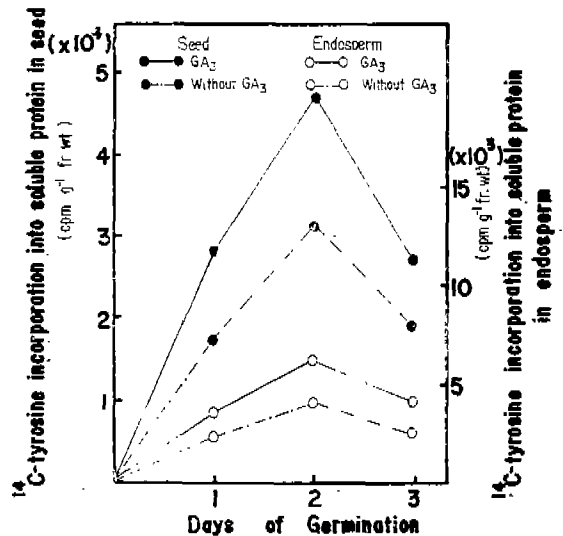


Fig. 3. Comparisons between the amount of total soluble proteins in seed and that secreted into endosperm during germination. The amount of total soluble proteins were measured by the method previously described

또한 발아도중 seed에서 합성되는 蛋白質量은 Fig. 3에 표시하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 seed내의 蛋白質 合成量과 endosperm으로의 분비량은 거의 비례적이었으며 GA₃ 處理區에 있어서의 seed에서의 蛋白質 合成能과 endosperm으로의 분비 比는 전발아 과정을 통하여 對照區에 있어서의 seed의 合成能과 endosperm으로의 분비 比와 비슷함을 보인다.

3. 蛋白質의 磷酸化 反應

Gibberellic acid와 단백질의 磷酸化 反應과의 相互 關聯性을 究明하기 위하여 發芽過程中 蛋白質의 磷酸化 反應量을 測定한 結果(Fig. 4), 對照區에 있어서의 蛋白質의 磷酸化 反應量은 發芽期間中 약간의 增加를 보인데 對하여, GA₃ 處理區에 있어서는 발아 1日까지는 對照區와 비슷하였으나 1日 後 부터는 현저히 增加하기 시작하여 3日 後에는 對照區에 比하여 약 6배의 증가율을 보였다.

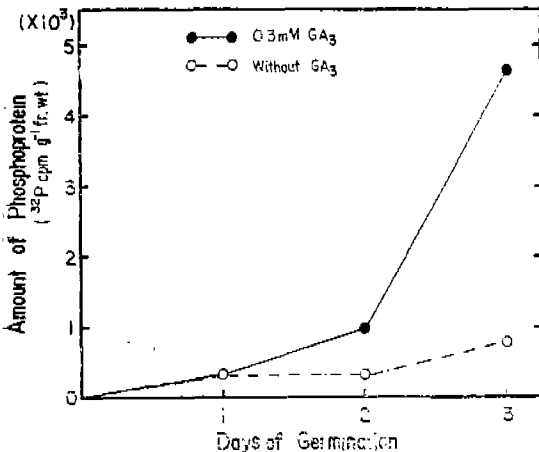


Fig. 4. Effect of GA₃ on the protein phosphorylation. Soluble proteins were isolated during germination from maize seeds treated with ³²P(10 μ Ci/5ml medium containing 10 seeds). The radioactivity in the above mentioned protein fraction was measured for the estimation of the amount of phosphorylated proteins.

4. 蛋白質合成 增加率과 磷酸化 反應增加率

GA₃에 의한 蛋白質의 生合成 增加率과 磷酸化 反應 增加率을 比較한 바 GA₃ 處理時 蛋白質의 合成 增加率은 發芽期間中 對照區에 比하여 약 1.5배의 增加率을 보였으나, 蛋白質의 磷酸化 反應 增加率은 發芽 1日까지는 蛋白質合成 增加率보다 낮았으며, 1日 후부터는 현저히 增加하여 3日 後에는 蛋白質合成 增加率보다 약 4배 높았다(Fig. 5).

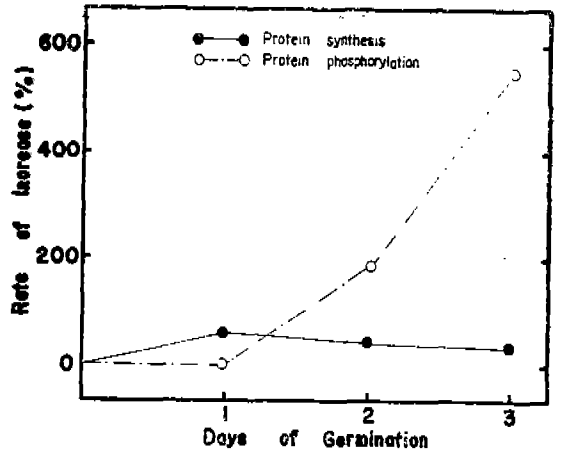


Fig. 5. Comparison between the increasing rates of protein biosynthesis and phosphorylation by GA₃.

5. 溶解性 Protein量과 ³²P-Protein量的 比

發芽過程에 따른 total soluble protein量과 phosphoprotein量을 比較하여 Fig. 6에 표시하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 對照區에 있어서는 發芽 2日까지는 phosphoprotein에 對한 total soluble protein의 比가 계속 增加하고 2日 後에는 현저히 減少되었으나,

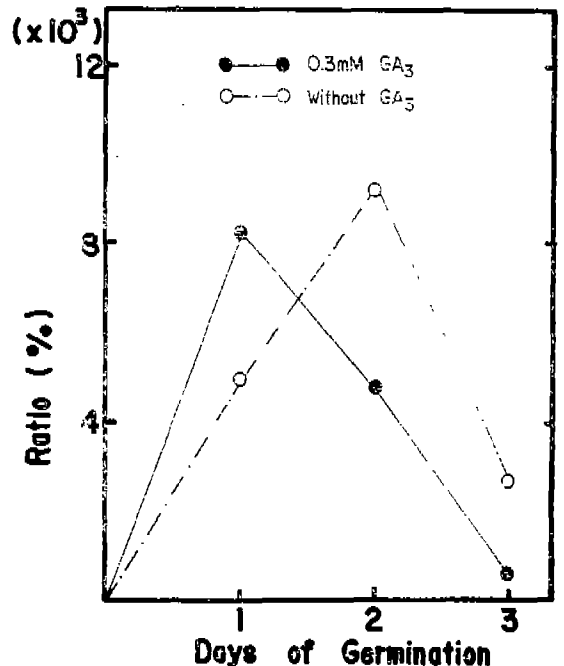


Fig. 6. Ratio of total soluble proteins to phosphoproteins in seeds during germination. The amount of total soluble proteins and phosphoproteins were measured by the method previously described.

GA₄處理區에 있어서는 發芽 初期(24hrs.)에는 phosphoprotein에 對한 total soluble protein의 比가 현저히 增加했으나 1일 후부터는 계속 減少를 보였다. 이와 같은 사실은 發芽 初期에는 GA₄에 의하여 蛋白質의 磷酸化 反應보다는 生合成이 促進되고 發芽가 어느 정도 進行된 후에는 蛋白質의 生合成 보다는 磷酸化 反應이 促進되는 것으로 생각된다.

考 察

發芽 途中 植物의 GA₄에 대한 反應은 發芽時期에 따라서 各各 다르며 GA₄ 濃度에 대한 植物의 敏感度는 發生時期 및 植物의 部位에 따라서 各各 다른데 本研究에서는 3日 동안의 發芽過程中 2일 後가 아미노산이 蛋白質로 incorporation되는 量이 가장 많았으므로 蛋白質 生合成을 促進하는 GA₄의 最適 濃度を 밝히는 데는 GA₄를 處理하여 發芽 2일된 種子를 사용하였다.

보리의 發芽 過程에 10⁻⁴M GA₄를 處理하였을 경우에는 發芽 過程中 amylase形成이 抑制되었는데(Kaldewey & Vardar, 1971), 本研究에서는 1 mM GA₄에서 2일간 發芽한 種子의 蛋白質 合成能은 거의 喪失되었다. 이와 같은 사실은 GA에 의한 protease 및 ribonuclease의 生合成의 促進(Srivastava & Meredith, 1962; Chrispeels & Varner, 1967)이 過多한데 起因되는 것으로 추측된다.

GA₄ 處理區에 있어서 seed 內에서의 蛋白質 合成量에 對한 endosperm으로의 分비량의 比는, 對照區에 있어서의 그것과 거의 一致되었다. 이와같은 사실은 gibberellic acid를 處理했을 경우 一定한 酵素蛋白質의 形成量이 增加된다는 報告(Marriott & Northcote, 1975; Varner & Chandra, 1964; Marriott & Northcote, 1977)와 關聯시켜 생각할 때, 本研究에서 사용한 0.3mM의 GA₄濃度에서 生合成이 促進되는 蛋白質의 種類는 對照區에서 合成되는 蛋白質의 종류와 다르다기 보다는 다만 一定한 蛋白質들을 coding하는 遺傳子들의 發現(expression)을 促進하는 것으로 간주된다. 또한 48시간 後에 蛋白質 合成能이 減少(Fig. 3)되는 것은 遺傳子들의 發現이 時差的으로 進行됨을 보여주는 것 같다.

GA₄에 의한 蛋白質의 磷酸化 反應은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 發芽 3일 후에는 對照區에 比하여 약 6배의 增加率을 보였는데 이는 protein kinase의 activity가 增加한 結果인지 또는 protein kinase의 基質이 되는 protein들의 生合成이 增加되었기 때문인지 斷定한 수는 없으나, 本 實驗 結果(Fig. 5) 發芽 1일

까지는 GA₄에 의한 蛋白質의 磷酸化 增加率은 GA₄에 의한 蛋白質의 生合成 增加率보다 낮았으나, 발아 2일 후 부터는 GA₄에 의한 蛋白質의 磷酸化 增加率이 蛋白質 合成 增加率을 凌駕하여 3日 後에는 蛋白質 合成 增加率보다 약 4배 높은 것으로 보아서 GA₄에 의한 蛋白質의 磷酸化 反應의 增加(Fig. 4) 이유는 發芽 1일 後 부터 protein kinase의 activity가 增加되었기 때문으로 생각되며, protein kinase의 生合成이 促進되었기 때문인지, 이미 存在하고 있는 不活性 protein kinase의 活性化에 기인된 것인지는 앞으로 究明되어야 할 課題이다.

摘 要

Gibberellic acid에 의한 遺傳子 發現의 調節機作을 究明하려는 연구의 일환으로써, 蛋白質의 生合成 및 磷酸化 反應에 미치는 GA₄의 작용을 조사하였다.

1. 蛋白質의 生合成을 促進하는 GA₄의 最適 濃度は 0.3mM이었다.

2. 蛋白質의 生合成은 發芽期間中 GA₄에 의하여 현저히 增加하였으며, 發芽 48시간 후에 蛋白質의 生合成이 減少되는 것은 遺傳子의 時差的 發現이나 또는 proteases 및 RNases의 活性이 增加되는데 起因되는 것으로 생각된다.

3. GA₄로 處理된 發芽中인 seed內에서의 蛋白質 合成量과 endosperm으로의 分비량의 比는 對照區의 그것과 비슷함을 보였다. 따라서 GA₄는 一定한 蛋白質을 coding하는 遺傳子들의 發現을 促進하는 것으로 看做된다.

4. GA₄에 의한 蛋白質의 生合成增加率은 發芽 72時間後에 6배에 達했으며, phosphoprotein에 대한 total soluble protein의 比는 發芽 初期(24hrs.)에는 增加되나 發芽가 進行됨에 따라 현저히 減少되는 것으로 보아 GA₄에 의한 蛋白質의 磷酸化 反應의 促進은 protein kinase의 activity가 增加되었기 때문이라 생각된다.

參 考 文 獻

- Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1966. Inhibition of gibberellic acid induced formation of amylase by abscisic acid. *Nature* 212: 1066-1067.
- Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1967. Gibberellic acid enhanced synthesis and release of amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42: 398-406.
- Filner, P. and J. E. Varner. 1967. A simple and unequivocal test for *de novo* synthesis of enzymes. *Proc. Nat.*

- Acad. Sci.* 58 : 1520—1526.
- Fukushi, S., K. Ishikawa and K. Sasaki. 1977. *In vitro* protein synthesis during germination and vernalization in winter wheat embryos. *Plant & Cell Physiol.* 18 : 969—977.
- Galsky, A. G. and J. A. Lippincott. 1969. Promotion and inhibition of α -amylase production in barley endosperm by cyclic AMP and adenosine diphosphate. *Plant & Cell Physiol.* 10 : 607—620.
- Haber, A. H., D. E. Foard and S. W. Perdue. 1969. Action of gibberellic and abscisic acids on lettuce seed germination without actions nuclear DNA synthesis. *Plant Physiol.* 44 : 463—467.
- Jacobsen, J. V. and J. E. Varner. 1967. Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42 : 1596—1600.
- Jones, T. W. A. and J. L. Stoddart. 1970. Gibberellin-induced changes in protein synthesis and enzyme activity in shoot apices of *Trifolium pratense*. *J. Exp. Bot.* 21 : 452—461.
- Kaldewey, H. and Y. Vardar. 1971. Hormonal regulation in plant growth and development. Verlag Chemie., pp.189—205.
- Kamisaka, H. S., M. Katsumi and Y. Masuda. 1972. Effects of cyclic AMP and gibberellic acid on lettuce hypocotyl elongation. *Plant & Cell Physiol.* 13 : 167—173.
- Lips, S. H. and N. R. Bejerano. 1969. Light and hormones: Interchangeability in the induction of nitrate reductase. *Science* 166 : 109—110.
- Marcus, A. and J. Feeley. 1965. Activation of protein synthesis in imbibition phase of seed germination. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 51 : 1075—1079.
- Marriot, K. M. and D. H. Northcote. 1975. The induction of enzyme activity in the endosperm of germinating castor bean seeds. *Biochem. J.* 152 : 65—70.
- Marriot, K. M. and D. H. Northcote. 1977. The influence of abscisic acid, adenosine 3',5' cyclic phosphate and gibberellic acid on the induction of isocitrate lyase activity in the endosperm of germinating castor bean seeds. *J. Exp. Bot.* 28 : 219—224.
- Paleg, L. G. 1961. Physiological effects of gibberellic acid, III. *Plant Physiol.* 36 : 829—837.
- Sachs, R. M., C. Bretz and A. Lang. 1957. Cell division and gibberellic acid. *Exp. Cell Res.* 18 : 230—244.
- Schneider, W. C. 1945. Phosphorus compounds in animal tissue. I. Extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and ribose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 164 : 293—303.
- Srivastava, B. I. S. and W. O. S. Meredith. 1967. Mechanism of action of gibberellic acid. *Can. J. Bot.* 40 : 1257.
- Taiz, L. and R. L. Jones. 1970. Gibberellic acid β -1, 3-glucanase and the cell walls of barley aleurone layers. *Planta* 92 : 73—84.
- Varner, J. E. and G. Ram Chandra. 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52 : 100—106.

(1980年 1月 11日 接受)