

# Auxin, GA 및 Cytokinin이 대두의 단백질합성 (축적)에 미치는 영향

류기중 · 박창규\* · 김수일\*

제주대학교 농화학과, \*서울대학교 농화학과  
(1986년 2월 1일 수리)

## Effects of Auxin, GA and Cytokinin on the Protein Synthesis (Accumulation) of Soybean

Ki-Jung Yoo, Chang-Kyu Park\* and Su-Il Kim\*

Dept. of Agricultural Chemistry, Cheju Nat'l University, Cheju  
\*Dept. of Agricultural Chemistry, Seoul Nat'l University, Suwon, Korea

### Abstract

Aqueous solutions of 2,4-D, BA or GA<sub>3</sub>(10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, and 10<sup>-4</sup>M, respectively) were sprayed onto soybean (*Glycine max*) plants in the flowering stage, and proteins of immature (33days after flowering) and mature (77days after flowering) seeds were analyzed by electrophoresis to elucidate the effects of the growth regulators on protein synthesis or protein accumulation in the seeds. Accumulations of some proteins were altered by 2,4-D or BA at certain concentrations, but no proteins were affected by GA<sub>3</sub>. The  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits of 7S and acidic subunit of 11S disappeared in mature seeds after treatments at the flowering stage with 2,4-D or BA. The presence of  $\alpha$  and  $\alpha'$  subunits of 7S and acidic subunit of 11S in immature seeds indicated that the absence of the above polypeptides in mature seeds did not result from inhibitions in syntheses of the polypeptides by the growth regulators. Disappearance of the above proteins in mature seeds seemed to be concerned with the action of specific proteolytic enzyme(s) (metalloendopeptidase?), and 2,4-D and BA might promote gene expression or activation of the enzyme.

### 서 론

단백질의 합성과 축적 그리고 분해와 이동은 종자에 있어서 중요한 대사 현상의 하나인데 이들의

자세한 기작은 아직 잘 알려져 있지 않고,<sup>1)</sup> 저장 단백질의 구조, 합성과정, 또는 발아와 관련된 단백질의 변화등이<sup>1,10)</sup> 부분적으로 알려져 있다. 종자의 단백질 합성과 축적, 그리고 분해는 적어도 부분적으로는 호르몬 작용과 관련이 있을것으로

\* 이 논문은 1985년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

생각되나, 현재 호르몬들이 이 과정에 어떻게 관여하는지에 대하여는 몇몇 보고를 제외 하고는 찾아보기 어렵다. 이 분야의 연구가 미흡한 데에는 여러가지 원인이 있으나, 그중 중요한 하나는 저장 단백질의 종류나 각 단백질의 구조가 잘 알려져 있지 않은 데에 있다.

본 연구에서는 대표적인 생장촉진 식물생장조절제로 알려져 있는 auxin과 cytokinin, 그리고 GA가 종자단백질의 조성에 어떤 영향을 주는지, 또 합성과 축적의 어느 단계에 어떤 식으로 작용하는가를 보기 위하여 단백질의 조성과 구조가 비교적 잘 알려져 있는 대두의 저장단백질에 대한 2,4-D와 BA 그리고 GA<sub>3</sub>의 영향을 조사하였다.

### 재료 및 방법

대두(장엽콩)종자를 6월 21일 파종하여 개화기 시작된 8월 8일 부터 격일로 2주일간 생장조절제 각각을 꽃을 중심으로 식물체 전체에 살포 처리하였다. 이때 사용된 생장조절제는 2,4-D와 BA, 그리고 GA<sub>3</sub>였으며 각각 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>M 농도의 수용액으로 만들었다.

개화후 33일의 미숙종자와 77일의 완숙종자에 대한 단백질과 polypeptide를 각각 Davis system<sup>4)</sup> (5%gel)과 SDS system<sup>8)</sup> (10%gel)의 Disc PAGE로 분석하였다. 이 전기영동에 사용한 단백질 시료는, 10mM β-mercaptoethanol을 함유하는 60mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.5) 20ml를 80 mesh의 대두분말 1g에 넣고 10°C에서 1시간 진탕 추출하고 8000g로 20분간 원심분리한 상등액을 사용하였다. SDS PAGE의 polypeptide 분자량측정을 위한 표준단백질로는 bovine albumin (66 KD), ovalbumin (45 KD), pepsin (34.7 KD), β-lactoglobulin (18.4 KD)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

Auxin과 cytokinin, 그리고 GA가 대두종자의 단백질 합성과 축적에 미치는 영향을 보기 위하여 2,4-D, BA 혹은 GA<sub>3</sub>를 개화기에 꽃을 비롯한 식물체 전체에 살포 처리하고 개화후 33일의 미숙종자와 77일의 완숙종자를 채취하여 비헤리계 전기영동<sup>4)</sup>으로 그 단백질 양상을 조사하였다(Fig. 1).

미숙종자의 단백질 양상은 각 생장조절제의 처리기간에 뚜렷한 차이가 없는 것으로 보아 이 시기

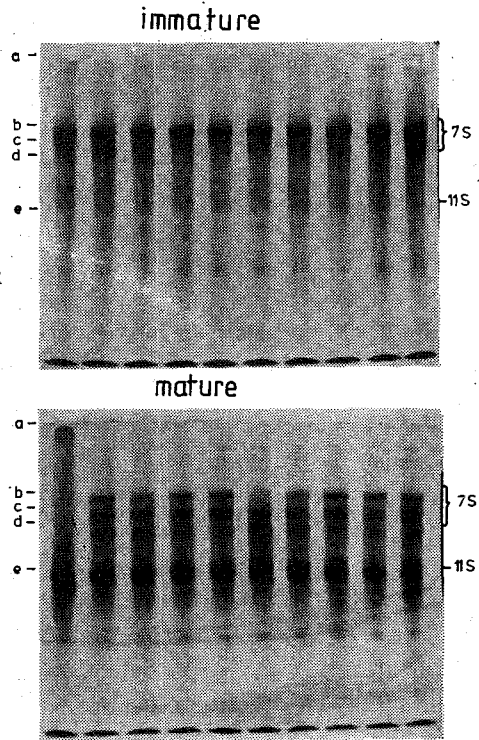


Fig. 1. Effects of 2,4-D, BA and GA on proteins of immature and mature soybean seeds. From the left column 2,4-D 10<sup>-4</sup>, 2,4-D 10<sup>-5</sup>, 2,4-D 10<sup>-6</sup>, BA 10<sup>-4</sup>, BA 10<sup>-5</sup>, BA 10<sup>-6</sup>, GA 10<sup>-4</sup>, GA 10<sup>-5</sup>, GA 10<sup>-6</sup>M, and control. Relative mobilities of a-, b-, c-, d-, e-band were 0.03, 0.25, 0.30, 0.35, and 0.50, respectively.

까지 종자에 합성 축적되는 단백질들은 2,4-D나 BA 혹은 GA<sub>3</sub>의 처리에 의하여 영향을 받지 않는 것으로 생각되었다. 그러나 미숙종자와는 달리 완숙종자의 경우에는 2,4-D 10<sup>-4</sup>M과 BA 10<sup>-6</sup>M 처리에서 특이한 단백질 양상을 보여 GA<sub>3</sub>는 완숙종자의 단백질 축적에 영향을 주지 않으나, 2,4-D와 BA는 일정 농도에서 영향을 주는 것으로 나타났다.

완숙종자의 단백질 중 2,4-D나 BA에 의해 영향을 받는 것으로 나타난 것은 a, b, c, d 및 e의 5 band인데, 이들은 BPB에 대한 상대이동도가 각각 0.02, 0.25, 0.30, 0.35 및 0.50인 것으로, Thanh과 Shibasaki<sup>12)</sup>, Gayler와 Sykes<sup>6)</sup>의 7S와 11S globulin의 전기영동 결과와 비교 동정한 결

과 b, c, d의 3 band는 7S, e의 band는 11S 단백질로 추정되었다. 2,4-D  $10^{-4}$ M에 없는 단백질은 b, c, d의 7S였고, BA  $10^{-6}$ M에 나타나지 않은 것은 7S의 하나인 b였는데 이것으로 보아 7S는 2,4-D뿐만 아니라 BA에 의해서도 정도의 차이는 있으나 축적이 저해되는 것으로 생각되었다. 한편 2,4-D  $10^{-4}$ M에서 e가 현저히 증가한 것으로 나타나 11S는 2,4-D에 의해 축적이 촉진되는 것처럼 보이나, e band에는 11S 이외에 이동도가 유사한 다른 단백질도 함께 있을 가능성도 있어서 확실치 않다.

그런데 완숙종자에서 2,4-D  $10^{-4}$ M과 BA  $10^{-6}$ M 처리에서 몇몇 band들이 나타나지 않은 것은, 이들 성장조절제에 의해 그 합성이 저해된 데에 원인이 있을 수도 있고, 이와 달리 합성은 되었으나 축적과정에서 다른 단백질로 전환 혹은 분해된 데에 원인이 있을 수도 있는데, 같은 처리의 미숙종자에는 이 단백질 band들이 있는 점으로 미루어 보면 단백질의 합성이 저해된 것이 아니라 축적과정에서 다른 단백질로 전환 혹은 분해된 것으로 생각되었다. 더욱이 2,4-D  $10^{-4}$ M의 b, c, d가 없어진 대신 e의 band가 현저히 증가했고, BA  $10^{-6}$ M에서도 b가 없어진 대신 d를 비롯한 다른 band들이 다소 증가한 것은 이러한 생각을 뒷받침해준다. 물론 2,4-D  $10^{-4}$ M에서 e가 b, c, d로부터 전환되었고 BA  $10^{-6}$ M에서 d등 증가한 band들이 b로부터 전환되었는지, 아니면 이들과 무관하게 e와 d등이 각각 2,4-D와 BA에 의해 그 합성이 촉진되어 증가되었는지는 알 수 없으나 대두 종자의 단백질들이 성숙도중 다른 단백질로 전환되는 것으로 생각할 수 있는 몇가지 결과가 알려져 있다.<sup>5,9)</sup>

이상에서 2,4-D와 BA는 7S 그리고/혹은 11S의 단백질 축적에 영향을 미치는 것으로 생각되었는데, 이들 성장조절제들이 각 단백질의 어떤 subunit에 영향을 주는지 보기 위하여 SDS 전기영동으로 polypeptide 양상을 조사하였다(Fig. 2).

각 polypeptide band들을 Thanh과 Shibasaki<sup>11)</sup> Gayler와 Sykes<sup>6)</sup>의 7S와 11S globulin의 SDS 전기영동 결과와 비교 동정한 결과 48, 66, 69KD band는 각각 7S의  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\alpha'$  subunit로, 35KD band는 11S의 acidic subunit로 추정되었다.

미숙종자의 polypeptide 양상은 각 성장조절제의 처리간에 뚜렷한 차이가 없었으나, 완숙종자의 경우에는 2,4-D  $10^{-4}$ M과 BA  $10^{-6}$ M에서 다른 처

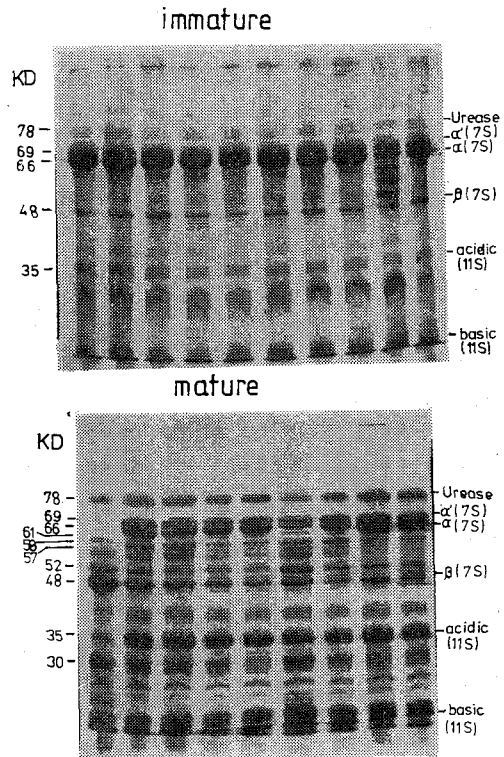


Fig. 2. Effects of 2,4-D, BA and GA on polypeptides of immature and mature soybean seeds. From the left column 2,4-D  $10^{-4}$ , 2,4-D  $10^{-5}$ , 2,4-D  $10^{-6}$ , BA  $10^{-4}$ , BA  $10^{-5}$ , BA  $10^{-6}$ , GA  $10^{-4}$ , GA  $10^{-5}$ , GA  $10^{-6}$ M and control, respectively.

리와는 다른 양상을 보였다. 2,4-D  $10^{-4}$ M에서 완숙종자의 경우 7S의  $\alpha$ ,  $\alpha'$  그리고 11S의 acidic subunit가 없거나 크게 감소했는데, 미숙종자에서는 7S의  $\alpha$ ,  $\alpha'$ 가 있고 11S의 acidic subunit도 다른 처리와 다르지 않은 것을 볼 때, 이들 subunit들은 2,4-D에 의해 그 합성이 저해된 것이 아니라, 합성된 후 축적도중에 다른 subunit로 전환 혹은 분해되었음을 보여 준다. 또 이것은 Fig. 1의 2,4-D  $10^{-4}$ M에서 b, c, d의 3단백질 band가 나타나지 않은 것이 단백질의 단순한 subunit 조합방법<sup>4,9)</sup>의 차이에 기인된 것이 아니고 이 단백질을 이루는 subunit 자체의 유무에서 비롯된 것임을 말해 준다. 그러므로 2,4-D나 BA는 단백질 축적 과정의 subunit 조합과정에 관여하는 것이 아니라 몇가지 특정 subunit의 전환 혹은 분해과정에 관여하는 것으로 생각된다. 한편 BA  $10^{-6}$ M의

polypeptide 양상에서 완숙종자의 경우  $\alpha$ 와  $\alpha'$  subunit가 감소 했는데 미숙종자에서는 이들 polypeptide band들이 정상적으로 나타난 것으로 보아 2,4-D에서와 마찬가지로 BA는 subunit들의 합성과정이나 축적과정에 영향을 주며 이 subunit들의 감소가 Fig. 1 BA  $10^{-6}M$ 의 b band 단백질의 소멸을 초래한 것으로 생각되었다. 그런데 2,4-D  $10^{-4}M$ 이나 BA  $10^{-6}M$ 에서 증가한 polypeptide들은 감소한 어떤 다른 polypeptide로부터 전환된 것일 가능성이 있으나 2,4-D나 BA에 의해 그 합성이 촉진되어 증가했을 가능성도 배제할 수 없다.

단백질과 polypeptide의 전기영동 양상에 대한 Fig. 1, Fig. 2 자료를 종합해 보면 2,4-D와 BA는 어떤 농도에서 몇몇 polypeptide 분해 혹은 전환을 촉진하며 이 결과 완숙종자에 있어서 특정 단백질이 축적되지 않음을 알 수 있다. 그런데 2,4-D나 BA가 어떤 기작을 통하여 특정 polypeptide로의 분해 전환을 촉진 하는가 하는 것은 이들의 생장조절제로서의 작용기작이나, 저장단백질의 축적 뿐만 아니라 발아생리의 측면에서도 매우 흥미있는 문제이다.

Bond와 Bowles<sup>2)</sup>는 성숙 대두종자 중에 metalloendopeptidase와 carboxylendopeptidase의 두 가지 endopeptidase가 있고 이중 metalloendopeptidase는 in vitro조건에서 7S의  $\alpha$ ,  $\alpha'$  subunit와 11S의 acidic subunit를 거의 완전히 분해하는 반면 7S의  $\beta$  subunit는 분해하지 않으며, carboxylendopeptidase는 분자량 30KD의 polypeptide를 주로 분해하는 것으로 보고 했는데, Fig. 2의 2,4-D  $10^{-4}M$ 에서 7S의  $\alpha$ ,  $\alpha'$ 와 11S의 acidic subunit들이 소멸된 양상을 보면 위의 metalloendopeptidase의 분해 특성과 일치한다. 그러므로 이 경우에 소멸된 band들은 metalloendopeptidase의 작용을 받은 것으로 보인다. 이와같은 결과로 미루어 보면 2,4-D는 어느 농도 이상에서 대두종자의 단백질 축적 과정중 어떤 단계에서 metalloendopeptidase의 활성을 촉진시켜 7S의  $\alpha$ ,  $\alpha'$ , 11S의 acidic subunit를 분해 하는 것으로 생각되며 BA의 경우에도 어떤 농도에서는 2,4-D와 유사하게 metalloendopeptidase 활성을 촉진하는 것으로 생각되나 그 정도는 2,4-D에 비해 작은 것으로 생각되었다.

한편 metalloendopeptidase의 활성이 증가한 것은 이 효소 자체의 gene expression 촉진 혹은

activation의 결과 일 수도 있으나, 이와 달리 이 효소의 inhibitor 합성이 저해된 결과 일 수도 있는데, metalloendopeptidase는 대두 종자로 부터 분리된 trypsin inhibitor나 agglutinin에 의해 in vitro에서 그 활성이 저해되지 않을 뿐 아니라, metalloendopeptidase를 포함하는 대두 성숙종자의 추출물이 metalloendopeptidase활성을 그대로 나타 낸다는 Bond와 Bowles<sup>2)</sup>의 연구결과를 감안 하면 metalloendopeptidase 활성이 증가한 것은 그 inhibitor 합성이 저해된 데에 기인하기 보다는 그 효소 자체의 gene expression이 촉진되었거나 activation된데 원인이 있는 것으로 보인다. 그러나 in vivo에서는 in vitro에서와 달리 metalloendopeptidase의 inhibitor가 관련될 가능성은 배제할 수 없다. 그리고 성숙종자와는 달리 미숙종자의 단백질들은 2,4-D나 BA에 의하여 영향을 받지 않는 점으로 보아 metalloendopeptidase의 발현 혹은 활성화 시기는 종자의 성숙후기(최소한 개화후 30일 이후)인 것을 알 수 있다.

요 약

Auxin과 cytokinin 그리고 GA<sub>3</sub>가 대두(*Glycine max*) 종자의 단백질 합성과 축적에 미치는 영향을 보기 위하여, 2,4-D와 BA 그리고 GA<sub>3</sub>을 각각  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}M$ 의 수용액으로 만들어 개화기에 식물체 전체에 살포 처리하고 개화 후 33일의 미숙종자와 77일의 완숙종자에 대한 단백질 전기영동 양상을 조사하였다.

GA<sub>3</sub>는 단백질 합성과 축적에 영향을 주지 않았으나 2,4-D와 BA는 일정농도에서 특정 단백질들의 축적에 영향을 주었다. 7S의  $\alpha$ 와  $\alpha'$  subunit, 11S의 acidic subunit 들이 2,4-D 혹은 BA처리에 의하여 나타나지 않았으며, 이 subunit들이 성숙종자에 없으나 미숙종자에는 있는 점으로 보아, 2,4-D나 BA는 이들의 합성을 저해하는 것이 아니고 축적과정의 어느 단계에서 이 subunit들의 분해 혹은 전환을 촉진하는 것으로 생각되었다.

2,4-D와 BA에 의해 위의 단백질이 성숙종자에 축적되지 않는 것은 어떤 단백질분해효소(metalloendopeptidase?)의 작용과 관련이 있는 것으로 보이며, 2,4-D나 BA는 성숙후기에 이 효소의 gene expression을 촉진하거나 활성을 증진시키는 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. Ashton, F.M.: Ann. Rev. Plant Physiol., 27 : 95~117(1976).
2. Bond, H.M. and Bowler, D.J.: Plant Physiol., 72 : 345~350(1983).
3. Catsimpooolas, N., Ekenstam, C., Rogers, D.A. and Meyer, E.W.: Biochem. Biophys. Acta, 168, 122(1968).
4. Davis, B.J.: Ann. New York Acad. Sci. U.S.A., 121, 404(1964).
5. Gayler, K.R. and Sykes, G.E.: Plant Physiol., 67 : 958~961(1981);
6. Ihre, J.N. and Dave, L.S.: J. Biol. Chem., 247 : 5048~5055(1972).
7. King, R.W.: Planta, 132 : 43~51(1976).
8. Laemmlli, U.K.: Nature (London), 277, 680(1970).
9. Lee, C.Y., Kim, S.U. and Park, K.Y. J. of the Nat'l Academy of Sciences Republic of Korea(Natural Sciences Series), 15 : 179~289(1976).
10. Millerd, A.: Ann. Rev. Plant Physiol., 26: 53~72(1975).
11. Thanh, V.H. and Shibasaki, K.: J. Agric. Food Chem., 24(6) : 1117~1121(1976).
12. Thanh, V.H. and Shibasaki, K.: J. Agric. Food Chem., 27(4), 805~809(1979).