

## 生體 生長에 關한 細胞 生物學의 研究

### —당근 細胞의 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 活성에 미치는 polyamine의 影響—

趙暎東\* · 李舜熙 · 康榮熹 · 金明苑 · 金成鎬 · 陳彥先

(延世大學校 理科大學 生物學科, \*生化學科)

## Cell Biological Studies on Growth and Development

### —Effect of polyamines on D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity in carrot cells—

Cho, Young Dong\*, Sun Hi Lee, Young Hee Kang, Myeong Won Kim,  
Seong Ho Kim and Eon Seon Jin

(\*Department of Biochemistry, and Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

#### ABSTRACT

Effects of putrescine, spermidine and spermine on the activity of D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase in the *Daucus carota* L. protoplast cultured for 4 days and effects of polyamines on the incorporation of D-[u-<sup>14</sup>C]-glucose treated to protoplasts in culture-medium were investigated. The activity of D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase was increased by polyamines and among them spermine was the most effective. Polyamines increased protein synthesis and this due to the increasing effect of the polyamines on the synthesis of glycoprotein which is one of cell wall components. The synthesis of cell polysaccharides, such as pectic substances, hemicelluloses and celluloses was increased by polyamines, which stimulated synthesis of pectin substances and hemicellulose more greatly than that of cellulose, and spermidine was the most effective. In the light of the above results it seems that the polyamines increase cell wall regeneration by the stimulation of enzyme activities which synthesize cell wall components.

#### 서 론

Cellulose는  $\beta$ -glucan synthetase에 의하여 합성되고 (Ray *et al.*, 1964; Ray, 1973), hemicellulose와 pectin질은 다음과 같은 두가지 경로에 의하여 합성된다. 즉, D-glucose-6-phosphate에서 *myo*-inositol을 형성한 후 UDP-D-glucuronic acid로 전환되는 *myo*-inositol 산화 경로(Ruberry and Northcote, 1970; Loewus and Loewus, 1974)와 D-glucose-6-phosphate

본 연구는 1985년도 문교부 기초과학육성 연구비 지원에 의한 것임.

에서 UDP-glucose로 전환한 다음 UDP-D-glucuronic acid로 다시 전환되는 UDP-D-glucose 산화경로(Ruberry, 1972; Roberts and Cetorelli, 1973)등이다. 이렇게 합성된 UDP-D-glucuronic acid는 hemicellulose와 pectin질의 전구물질로 이용된다(Hall *et al.*, 1982). 그런데 이러한 합성경로는 식물종에 따라 다르며 당근에서는 *myo*-inositol 산화경로에 의하여 hemicellulose와 pectin질이 합성된다(Rosenfield *et al.*, 1978). D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase는 *myo*-inositol 산화경로의 첫 단계에 작용하는 효소이다(Loewus and Loewus, 1974). 한편 분리배양한 원형질체에서 세포벽이 재생되는 것은 여러 종류의 식물에서 많이 관찰되었고(Nagata and Takebe, 1970; Horine and Ruesink, 1972; Takeuchi and Komamine, 1978 a, b; Asamizu and Nishi, 1980), 재생된 세포벽은 multilamellae 구조를 한다(Willison and Cocking, 1972). 당근 원형질체에서 cellulose의 합성속도는 배양 초기에는 느리며, 배양 수 일후 세포분열을 하는 시기에는 cellulose가 그물조직을 만들고(Asamizu *et al.*, 1977), 그 사이에 hemicellulose와 pectin질 등이 침투하여 세포벽을 구성한다(Asamizu and Nishi, 1980). 그러나 이러한 세포벽 구성물질들의 합성과정과 그 조성의 변화에 대한 생화학적 연구는 그리 많지 않다(Takeuchi and Komamine, 1978b; Asamizu and Nishi, 1980).

전보(Cho *et al.*, 1985)에서는 식물의 생장조절물질로 중요한 역할을 하는 polyamine (Bagni *et al.*, 1981; Galston and Kaur-Sawhney, 1982; Seriafini-Fracassini *et al.*, 1984)이 당근의  $\beta$ -glucan synthetase를 활성화 시켰음을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 hemicellulose와 pectin질 합성의 주요 효소인 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성화에 미치는 polyamine의 영향을 조사하고 D-[U- $^{14}$ C]-glucose를 처리하여 세포벽 구성물질에 incorporation되는 방사능량을 조사함으로써 세포벽 재생에 미치는 polyamine의 작용기작의 일부를 설명하고자 하였다.

### 실험 재료 및 방법

**실험재료.** 당근(*Daucus carota* L.)의 뿌리를 사용하여 전 보(Cho *et al.*, 1985)에서와 같이 원형질체를 분리하여 배양하였다.

**실험구의 설정:** 당근 뿌리에서 추출한 조효소원에 putrescinc, spermidine, spermine을  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M,  $10^{-4}$  M,  $10^{-3}$  M로 처리하였으며, 분리된 원형질체에 각 polyamine을  $10^{-3}$  M로 처리하여 4일간 배양하면서 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 활성을 측정하였다. 또한,  $4.52 \times 10^{-6}$  M의 D-[U- $^{14}$ C]-glucose (227 mCi/m mole)를 15  $\mu$ Ci씩 배양액에 처리하여 4일간 원형질체를 배양하여 각 세포벽 성분에 incorporation된  $^{14}$ C의 방사능량을 측정하였다.

**D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 추출과 활성측정.** Loewus와 Loewus (1971)의 방법으로 당근뿌리에서 cell-free extract를 얻은 다음 DEAE-cellulose column (10 $\times$ 300mm)으로 부분순화하여 Barnett등(1970)과 Donahue와 Henry(1981)의 방법으로 효소반응을 시킨다음 생성된 무기인산을 Chen등(1956)의 방법으로 정량하여 효소활성을 측정하였다. 즉, 효소반응은 0.1 mM EDTA, 1.0 mM ammonium acetate, 5 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8)에 5 mM NAD $^{+}$ 와 5 mM glucose-6-phosphate를 첨가한 후 800  $\mu$ l를 취하여 200  $\mu$ l의 효소원을 혼합시켜 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰으며 0.2 ml의 20% TCA(trichloroacetic acid)를 넣어 효소반

응을 중지시킨 후 원심분리(3,000×g)하여 침전물을 제거시켰다. 이어서 상정액에 0.2 M NaIO<sub>4</sub>를 0.5 ml 넣어 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이때 반응중지물질로 1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1 ml을 첨가하여 *myo*-inositol-1-phosphate에서 인산을 분리시켰다. 인산정량은 2.5% ammonium molybdate : 6N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 10% ascorbic acid: 증류수=1:1:1:2의 비율로 혼합하여 만든 반응액 2 ml와 인산분리액 2 ml을 혼합하여 37°C에서 2시간 방치한 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 활성은 1분간에 생성된 무기인산의 양을 단백질 mg당의 nmol로 비활성도를 표시하였다.

단백질내에 incorporation된 <sup>3</sup>H-leucine 측정. Polyamine이 함유된 원형질체 배양액에 <sup>3</sup>H-leucine (146.5 Ci/nmol) 0.5 μCi/ml을 첨가하여 원형질체를 1일부터 4일간 배양한 후에 날자별로 원형질체를 수확하여 배양액으로 3회 세척하였다. 원침물에 5% TCA를 가한다음 TCA insoluble 분획을 얻어 0.5 N NaOH로 처리하여 18시간 37°C에서 방치시켰다. 이 TCA insoluble 분획에서 일정량을 취하여 liquid scintillation counter(Packard Tricard 300)로 방사능량을 측정하였다.

세포벽 분획물의 추출과 함량측정. Dever등(1968)과 Asamizu와 Nishi(1979)의 방법으로 세포벽을 분리하여 다음과 같이 세포벽 분획물을 얻었고, 각 분획물에 incorporation된 동위원소량을 측정하였다. 이때 원형질체 시료에 unlabelled carrier로 당근뿌리 3g을 혼합하여 파쇄하였다.

① 세포벽 단백질: 세포벽 단백질을 세포벽 시료를 protease 용액으로 30°C에서 18시간 반응시킨 후 10,000×g로 20분간 원심분리한 상정액을 사용하였다. Protease 용액은 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.2) 10 ml에 protease 50 mg, toluene 25 μl를 첨가하여 사용하였다. 세포벽으로 incorporation된 동위원소의 양은 원심분리한 상정액 1 ml에 ethanol 1 ml, triton X-100-toluene-ppo-popop cocktail 용액 15 ml을 혼합하여 방사능량을 측정하였다.

② 세포벽 전체다당류: 세포벽 시료를 protease로 처리하고 10,000×g에서 20분간 원심분리한 침전물을 Büchner funnel에서 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.2)으로 2회, ethanol, acetone, petroleum ether로 각각 3회 세척하였다. 이 세척물에 72% 황산을 첨가하여 20°C에서 4시간 방치한 후 29배의 증류수로 3% 황산용액이 되게 희석한 다음 120°C에서 1시간 autoclave하여 가수분해 시켰다. 이 가수분해 용액 일정량을 취하여 방사능량을 측정하였다.

③ Pectin질: Pectin질은 세포벽 전체 다당류에 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA를 포함하고 있는 50 mM 초산완충용액(pH 4.5)을 100배(V/W) 첨가한 후 냉각탑을 이용하여 100°C에서 4시간 추출하였다. 추출물은 Whatman paper (No. 1)로 여과하여 여과액을 200배(V/V)의 증류수에서 48시간 동안 투석한 다음 이 투석액에서 일정량을 취하여 방사능량을 측정하였다.

④ Hemicellulose: Hemicellulose의 추출은 5%와 24% KOH 용해성 분획으로 나누어서 시행하였다. 5% KOH 용해성 분획은 Na<sub>2</sub>-EDTA로 처리한 여과물에 100배(V/W)의 5% KOH 용액을 첨가하고 질소가스를 충전시킨 후 실리콘 마개로 밀봉하여 27°C에서 24시간 동안 반응시켜서 추출하였다. 추출물은 Whatman paper (No. 1)로 여과하여 여과액을 6N 빙초산으로 중화시킨 다음 200배(V/V)의 증류수에서 48시간 동안 투석하였다. 24% KOH 용해성 분획은 5% KOH로 처리한 여과물에 100배(V/W)의 24% KOH를 첨가하고 실리콘 마개로 밀봉하여 질소가스를 충전시킨 후 27°C에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 Whatman paper (No. 1)로 여과하여 여과액을 6N 빙초산으로 중화시킨 후 200배(V/V)의

증류수에서 48시간 동안 투석하였다. 5%와 24% KOH 용해성 분획에 incorporation된 동위원소의 양은 pectin질 에서와 같은 방법으로 측정하였다.

⑤ Cellulose: Cellulose는 24% KOH로 처리한 여과물을 Büchner funnel에서 증류수로 세척하여 얻었고 cellulose로 incorporation된 동위원소의 양은 세포벽 전체 다당류에서와 같은 방법으로 측정하였다.

**ECP (extracellular polysaccharide)의 분리 및 함량측정.** 배지로 분리되는 ECP는 40 ml의 원형질체 현탁용액을 2,000×g에서 10분간 원심분리한 상정액을 200배 (V/V)의 증류수에서 48시간 동안 투석하여 분리하였다. ECP로 유입된 동위원소의 양은 투석된 용액 1 ml을 취하여 세포벽 분획과 같은 방법으로 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry등(1951)과 Bradford (1976)의 방법으로 비색정량하였다.

### 결과 및 고찰

**D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase에 미치는 polyamine의 영향.** Polyamine은 cellulose 합성효소인  $\beta$ -glucan synthetas의 합성을 촉진 시켰으므로(Cho *et al.*, 1985) polyamine이 hemicellulose와 pectin질의 합성효소인 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성에도 영향을 미치는가를 조사하여 세포벽 재생에 미치는 polyamine의 작용을 알아보려고 하였다.

우선 당근뿌리에서 얻은 조효소원에 polyamine을 농도별로 처리하여 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 조사하였다(Fig. 1). Polyamine을 처리하면 대조구에 비하여 농도증가에 따라 효소활성이 모두 증가하였다. 즉 putrescine은  $10^{-4}$ M과  $10^{-3}$ M에서 대조구에서보다 각각 2.3배와 2배로 효소활성이 증가하였으며 spermidine의 경우는  $10^{-5}$ M에서 1.4배,  $10^{-4}$ M에서 3배,  $10^{-3}$ M에서 3.8배로 각각 증가하였다. Spermine의 경우에서도  $10^{-3}$ M에서 가장 높은 4.4배의 활성증가를 나타내었다.

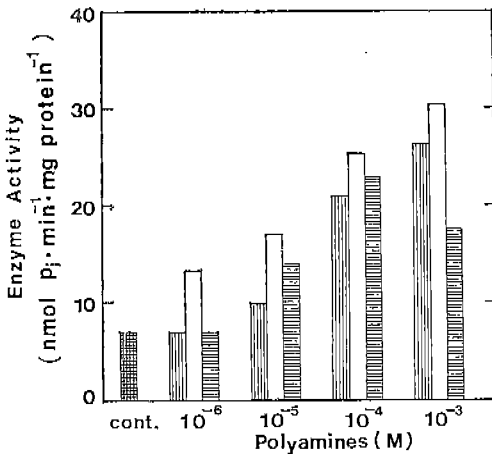


Fig. 1. Effect of polyamines on the activity of D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase. control, ; putrescine, ; spermidine, ; spermine,

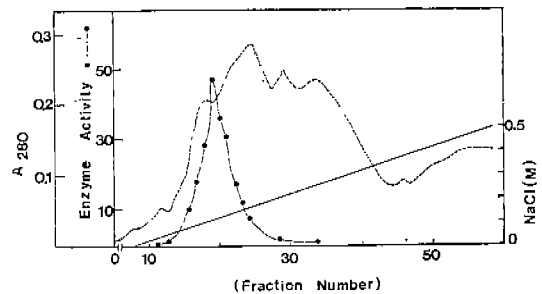


Fig. 2. Chromatography in DEAE-cellulose of 30~70% saturated ammonium sulfate fraction from *Daucus carota* extracts. Protein, measured by absorbance at 280 nm, is indicated by dashed line and enzyme activity ( $\bullet$ - $\bullet$ - $\bullet$ ) is also indicated. The DEAE-cellulose column was developed with a linear gradient of NaCl concentrations (0~0.5M). Each tube collected by 8ml.

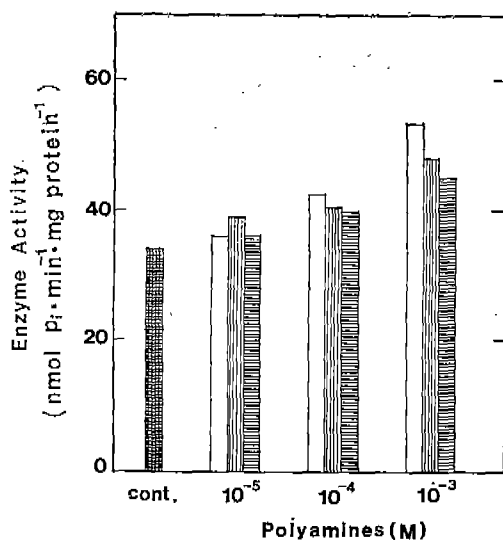


Fig. 3. Effect of polyamines on the activity of purified D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase.

control, ▨; putrescine, ▤; spermidine, ▧; spermine, □

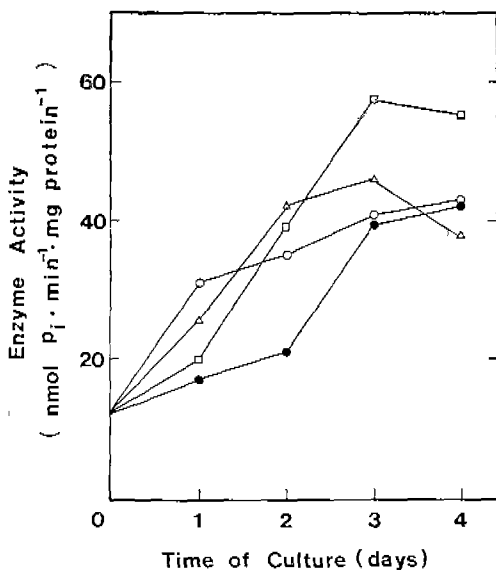


Fig. 4. Effect of polyamines on carrot root protoplast D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase on the time course.

Polyamines used are  $10^{-3}M$ , respectively. control, ●; putrescine, △; spermidine, ○; spermine, □.

또한 조효소원을 DEAE-cellulose column으로 순화시켜 가장 높은 효소활성을 나타낸 0.12 M NaCl의 분획물을 얻어 (Fig. 2), D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과,  $10^{-3}M$ 의 polyamine에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, spermine은 58%, spermidine은 41%, putrescine은 32%의 활성증가를 보였다. 이러한 결과는  $\beta$ -glucan synthetase의 활성증가와 일치하였으며 (Cho *et al.*, 1985), polyamine의 종류에 따라 효소의 활성증가가 서로 상이한 것은 생리적 pH에서 양전하를 띠는 polyamine의 특성에 따라 (Galston and Kaur-Sawhney, 1982; Altman *et al.*, 1982; Fuhrer *et al.*, 1982) diamine인 putrescine 보다 triamine인 spermidine과 tetramine인 spermine에서 더 높은 것으로 생각된다. 한편, D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 가장 촉진시킨 농

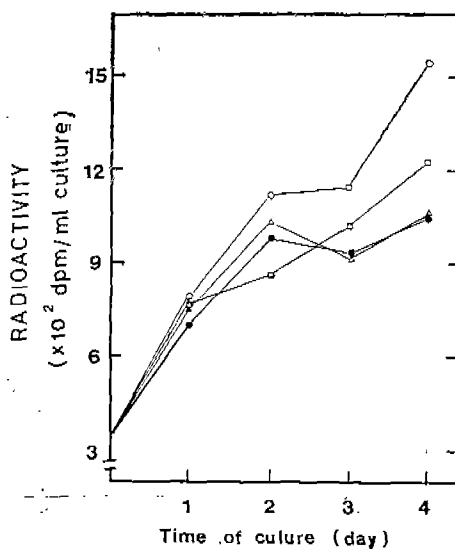


Fig. 5. Effect of polyamines on  $^3H$ -leucine incorporation into protein in carrot root protoplast on the time course.

Polyamines used are  $10^{-3}M$ , respectively. control, ●; putrescine, △; spermidine, ○; spermine, □.

도( $10^{-3}$  M)의 polyamine을 protoplast 배양액에 처리하여 *in vivo*에서 세포벽 제생에 따른 polyamine의 영향을 조사하였다(Fig. 4). 대조구에서는 배양 2일까지 완만하게 증가하지만 그 후 급증하여 배양 3일 후에는 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 원형질체 배양에서 cellulose의 그물구조가 배양 후 3일에 어느 정도 이루어져 4일째부터 세포분열이 왕성히 일어나고(Asamizu *et al.*, 1977), 배양초기에 형성된 세포벽이 주로 1,3-, 또는 1,4-linkage의 glucan으로 구성되며(Takeuchi and Komamine; 1981)  $\beta$ -glucan synthetase 활성도 배양 2일째 가장 높은 결과(Cho *et al.*, 1985)로 보아 D-glucose-6-phosphatase cyclohydrolase의 활성도 cellulose 그물조직이 합성되기 시작하는 배양 2일째에 가장 높은 것으로 생각된다. 그런데, polyamine을 처리하면 이러한 경향이 더욱 촉진되었고 spermine의 효과가 가장 현저하였다. 이러한 효소활성에 대한 polyamine의 영향이 polyamine에 의한 효소자체의 활성 이외에 효소의 *de novo* synthesis에도 영향을 미치는지를 알아보기 위하여  $^3\text{H}$ -leucine을 polyamine과 함께 처리하여 원형질체를 배양하고 이때 단백질에 incorporation된  $^3\text{H}$ 의 방사능량을 측정하였다(Fig. 5). Putrescine은 대조구와 별로 차이가 없었으나 배양 3일과 4일째에 spermine은 각각 9%와 13%, spermidine은 21%와 41%정도 단백질에  $^3\text{H}$ -leucine의 incorporation이 증가하였다. 이러한 결과는 귀리의 원형질체 배양에서와 같이 polyamine이 DNA와 RNA 및 단백질등의 합성을 촉진시키므로(Kaur-Sawhney *et al.*, 1980) 효소활성 뿐만 아니라 효소의 합성도 polyamine에 의하여 촉진됨을 의미한다.

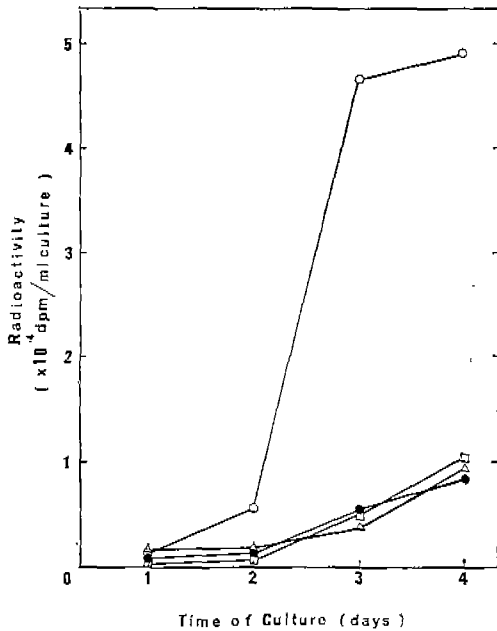


Fig. 6. Effect of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into cell wall associated protein of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.

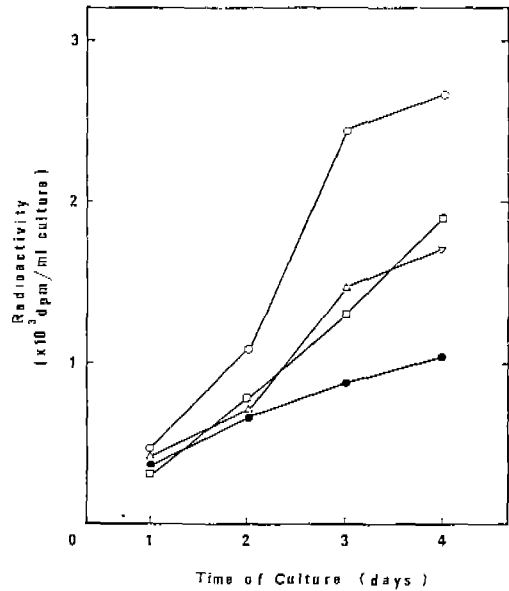


Fig. 7. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into total cell wall polysaccharides of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.

세포벽 분획물의 조성에 미치는 polyamine의 영향. 앞서의 결과와 같이 polyamine이  $\beta$ -glucan synthetase의 활성을 증가시키고(Cho *et al.*, 1985), D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 증가시키면 결국 이 효소들의 활성에 따라 cellulose, hemicellulose, pectin질 등과 그 이외의 세포벽 성분물질들의 합성에도 영향을 줄것이다. 우선 각 polyamine ( $10^{-3}$  M)과 D-[U- $^{14}$ C]-glucose를 원형질체 배양액에 처리하여 배양하면서 세포벽 단백질로 incorporation된  $^{14}$ C의 방사능을 측정하였다.

Putrescine과 spermine을 처리하면 대조구에서의 비슷한 결과를 나타내었으나, spermidine 처리구는 배양후 2일에 10배정도 급격히 증가하였으며 배양 3일 후에는 완만하였다(Fig. 6). 식물체의 일차세포벽은 glycoprotein을 2~10% 정도 함유하고, 이 glycoprotein 중에 hydroxyproline이 30% 정도로 많이 함유되어 있다(Talmadge *et al.*, 1973). 그런데 이 glycoprotein은 세포벽의 신장을 조절하는 데 관여하여 일차세포벽의 특징을 나타내게 한다(Lampert, 1970). Polyamine은 단백질에  $^3$ H-leucine의 incorporation을 증가시켜(Fig. 5) 단백질 합성을 촉진시키므로(Bagni *et al.*, 1981; Igarish *et al.*, 1981; Bradley *et al.*, 1984) 원형질체에서 세포벽이 재생될 때 세포벽의 단백질 합성도 촉진한다고 생각된다.

또한 진채 다당류에 유입된 방사성 glucose의 양을 측정할 결과 polyamine에 의하여 세포벽 전체 다당류의 합성이 모두 증가되었다. 즉, putrescine은 배양 2일까지는 대조구와 별다른 차이를 나타내지 않았지만 그 후 급증하여 배양 3일 후에는 대조구 보다 100% 정도 증가시켰다. Spermidine은 배양 2일에 66%, 배양 3일에, 186%, 배양 4일에는 155% 정도 크게 증가하였다. Spermine 처리구는 대조구에 비하여 배양 2일까지는 대조구와 유사하였으나, 배양 3일 후에는 51%, 배양 4일 후에는 84% 정도 증가시켰다. Putrescine과 spermine

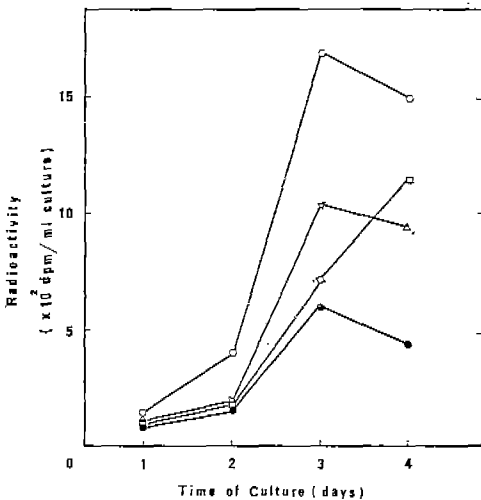


Fig. 8. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into EDTA-soluble fraction of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.

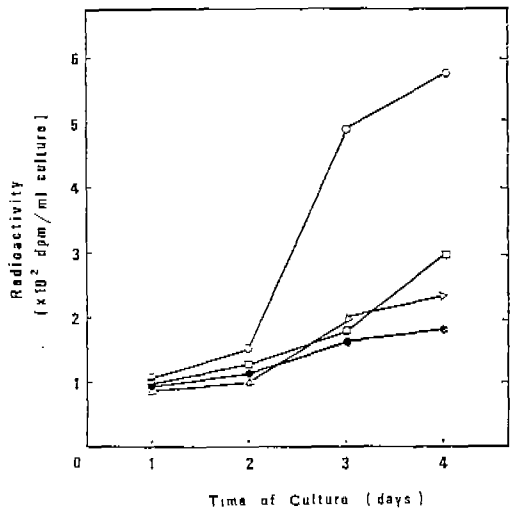


Fig. 9. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into 5% KOH-soluble fraction of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.

은 대조구에 비하여 배양 2일 후에 세포벽을 구성하는 전체 다당류의 합성을 증가시키는 반면 spermidine은 배양후 1일부터 증가시켰다(Fig. 7). 또한 pectin질 합성은 putrescine에 의하여 배양 3일후에 77%, 4일후에 117% 정도로 증가 되었으며 spermidine에 의해서는 배양 2일후에 140%, 3일후에 183%, 4일후에 242%로 급증되어 가장 효과가 컸다. Spermine 처리에 의하여서는 배양 2일 후까지는 대조구와 비슷하였으나 배양 3일후에 20%로 증가되었고 배양 4일 후에는 162%정도 급증되었다. 한편 pectin질 합성에 대한 전체적인 경향은 대조구와 putrescine 및 spermidine은 배양 3일째에 가장 높았고 그후 감소하는 경향이였으나 spermidine은 배양 4일째까지 계속하여 pectin질 합성을 증가시켰다(Fig. 8).

5% KOH 용해성 hemicellulose 분획물의 합성은 putrescine과 spermine에 의하여 배양후 3일까지는 대조구와 유사한 경향을 나타내었고, 배양후 4일에는 30%와 60%정도 각각 증가되었다. Spermidine에 의해서는 배양후 2일에 40%로 증가하여 배양후 3일에 200%로 급증하였고 배양후 4일에는 222% 정도 증가하였다(Fig. 9).

24% KOH 용해성인 hemicellulose 분획물 합성은 배양후 2일까지는 polyamine의 영향이 거의 없었으나 putrescine을 처리하면 배양후 3일에는 24%, 4일에는 50% 정도 각각 증가하였다. Spermine의 효과가 가장 낮았고, spermidine의 효과가 가장 높아 배양후 3일에는 107%, 4일에는 100% 정도 각각 증가되었다(Fig. 10).

한편, cellulose 합성은 putrescine 처리에 의하여 배양후 3일까지는 대조구와 거의 비슷하였으나 배양후 4일에는 26%정도 증가하였다. 그러나 spermidine 처리는 배양후 2일까지는 약 20% 정도로 cellulose 합성을 촉진시켰으나, 배양후 3일에는 125%정도 급증시켰고 배양후 4일에는 133%정도 증가시켰다. Spermine은 cellulose의 합성을 배양 초기부터 증가시켰

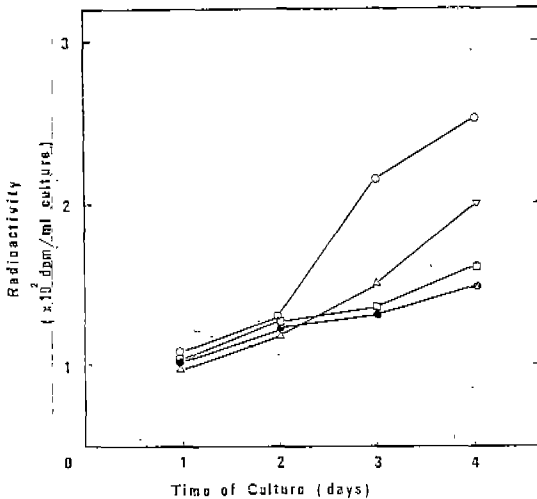


Fig. 10. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into 24% KOH-soluble fraction of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.

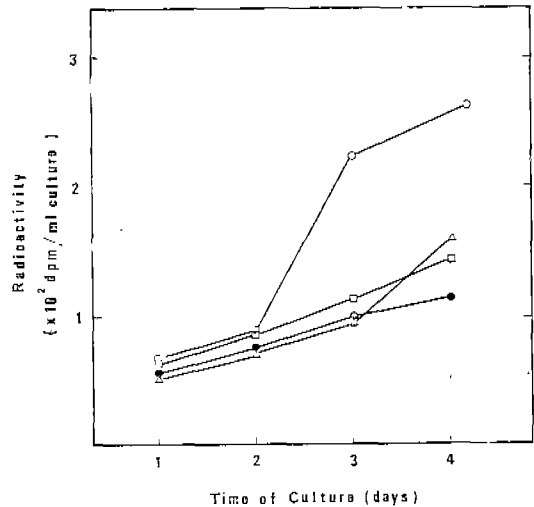


Fig. 11. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into 24% KOH-insoluble fraction of carrot protoplasts.  
control, ●; putrescine, ▲;  
spermidine, ○; spermine, □.



으나 그 효과는 크지 않았다(Fig. 11).

이상의 결과에서와 같이 polyamine은 pectin질과 hemicellulose 및 cellulose 등의 세포벽 다당류 합성을 전반적으로 증가시켰으며 그 중에서도 spermidine이 가장 효과적이었다. 특히 polyamine은 cellulose의 합성보다는 미 섬유질성 다당류인 pectin질과 hemicellulose의 합성을 더욱 증가시켰다. 당근 callus와 원형질체에서 세포벽을 재생시킬 때에도 cellulose 합성보다도 pectin질과 hemicellulose의 합성이 더 많이 되었으며(Asamizu and Nishi; 1980), *Catharanthus roseus*를 균질 배양하였을 때에도 cellulose보다는 hemicellulose와 pectin질의 합성이 많이 이루어졌다(Amino *et al.*, 1985).

Polyamine이 세포벽을 구성하는 다당류의 합성에 미치는 보고는 거의 없으나 이상의 결과에서와 같이 polyamine이 세포벽을 구성하는 다당류의 합성을 증가시키는 것은 먼저, polyamine이 원형질체를 분리할 때에 받는 높은 삼투압 충격과 세포막의 불안정 등으로부터 원형질체를 안정화 시키며(Altman *et al.*, 1982; Galston and Kaur-Sawhney, 1982) 세포벽재생에 유리한 여건을 제공하여 준다. 뿐만 아니라 polyamine은 DNA와 RNA등과 강하게 결합하여 그들의 구조를 안정화 시켜주고 기능을 촉진시키며(Kaur-Sawhney *et al.*, 1980; Altman *et al.*, 1982) 단백질의 합성을 촉진시키는(Bagni *et al.*, 1981; Igarish *et al.*, 1981; Bradley *et al.*, 1984) 등의 결과와도 관계가 있다고 생각할 수 있다. 그러나 무엇보다도 polyamine이  $\beta$ -glucan synthetase(Cho *et al.*, 1985)와 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase (Fig. 1, 3, 4)등의 활성을 증가시켜, 그 결과 cellulose와 hemicellulose 및 pectin질 등의 합성이 촉진된다고 생각된다. 이는 원형질체를 배양할 때에 배양후 2일과 3일째에 세포벽을 구성하는 다당류의 합성과(Fig. 6, 7, 8) 효소활성의 증가(Cho *et al.*, 1985; Figs. 1, 3, 4)가 급증한 결과에서도 찾아볼 수 있었다.

**Extracellular polysaccharide의 할량변화.**

배양세포는 세포외부로 중합체 화합물질을 분비하는데 이러한 물질들은 화학조성이나 구조가 일차세포벽을 구성하는 물질과 유사하기 때문에 세포벽의 일부가 배지로 분비되고 있다고 생각되고 있다(Becker *et al.*, 1964; Bauer *et al.*, 1973). *Vinca rosea*를 진탕배양할 때에 세포분열이 왕성하게 일어나는 시기에 ECP가 많이 생성되며(Takeuchi and Komamine, 1980a, b) 배양시기가 진행됨에 따라 ECP가 증가되어 여러 식물에서 보고 되었다(Asamizu and Nishi 1980; Masuda *et al.*, 1984). 본 실험에서도 배양이 진행됨에 따라 ECP 할량이 증가되었고 polyamine처리에 의하여 더욱

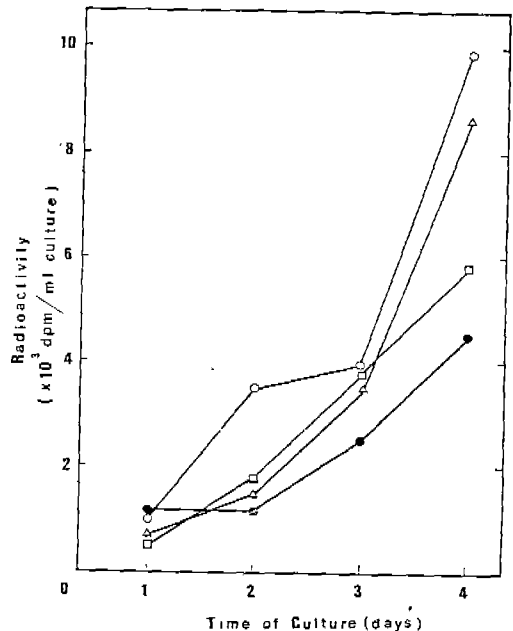


Fig. 12. Effects of polyamines on the incorporation rate of radioactive glucose into ECP fraction of carrot protoplasts. control, ●; putrescine, △; spermidine, □; spermine, ○.

증가되었다. 즉, putrescine과 spermine을 처리하면 ECP 함량은 2일까지는 대조구와 차이가 없었으나, 배양후 3일과 4일에 putrescine은 36%, 94%, spermine은 50%, 31% 정도로 각각 증가시켰다.

또한, 세포벽의 다당류보다는 ECP에 더 많은 방사능도가 측정되었는데 이는 Asamizu와 Nishi(1980)의 결과와 일치되는 것으로 배지로 분비되는 순수한 ECP 이외에도 배양중에 원형질체가 용출됨으로써 ECP 함량에 더 많은 방사능량을 부여할 수 있다고 생각된다. 그러나 본 실험에서 polyamine처리에 의하여 세포벽다당류의 합성도 증가되었으며(Fig. 6, 7, 8), ECP에 incorporation된 방사능량도 높게 나타나므로(Fig. 12), polyamine에 의하여 세포벽다당류의 합성이 증가되고 그 일부가 세포밖으로 빠져나와 ECP 함량을 높일 것으로 생각된다.

### 적 요

당근(*Daucus carota* L.) 뿌리에서 원형질체를 분리하고 putrescine과 spermidine 및 spermine 등을 처리하여 4일간 배양하면서 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 측정하였으며, 또한 D-[U-<sup>14</sup>C]-glucose를 polyamine과 함께 처리하여 세포벽 재생에 미치는 polyamine의 작용을 알아보았다. Polyamine은 농도증가에 따라 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성을 촉진시켰으며, spermine의 효과가 가장 높았다. 또한 polyamine은 단백질합성을 촉진시켰으며 그 결과는 세포벽 구성성분인 glycoprotein 합성과도 일치하였다. 한편, pectin질, hemicellulose, cellulose등 세포벽의 다당류의 합성도 polyamine의 종류에 따라 정도의 차이는 있지만 증가되었으며 spermidine이 가장 효과적이었다. 또한, polyamine을 세포벽을 구성하는 성분중에 cellulose의 합성보다는 pectin질과 hemicellulose등의 합성을 더욱 촉진시켰다.

이상의 결과로 보아 polyamine은 세포벽을 구성하는 물질들을 만드는 효소활성을 촉진시키고 그 결과 각 구성물질들의 합성이 증가되어 세포벽의 재생을 증진시킨다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Altman, A., R. Friedman, D. Amir and N. Nevin. 1982. Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. *In* Plant Growth Substances, P.F. Wareing, Ed. Academic Press, New York, pp. 483-494.
- Amino, S., Y. Takeuchi and A. Komamine. 1985. Changes in synthetic activity of cell walls during the cell cycles in a synchronous culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* 64: 202-206.
- Asamizu, T. and A. Nishi. 1979. Biosynthesis of cell wall polysaccharides in cultured carrot cells. *Planta* 146: 49-54.
- Asamizu, T. and A. Nishi. 1980. Regenerated cell wall of carrot protoplasts isolated from suspension cultured cell. *Physiol. Plant.* 48: 207-212.
- Asamizu, T., K. Tanaka, J. Takebe and A. Nishi. 1977. Change in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. *Physiol. Plant.* 40: 215-218.
- Bagni, N., D. Serafini-Fracassini and P. Torrigiani. 1981. Polyamines and growth in higher plants. *In*, Advances in Polyamine Research, C.M. Caldera, V. Zappia and U. Bachrach, Eds. Raven Press, New York, pp. 337-338.

- Barnett, J.E.G., R.E. Brice and D.L. Corina. 1970. A colorimetric determination of inositol monophosphates as an assay for D-glucose-6-phosphate-L-*myo*-inositol-1-phosphate cyclase. *Biochem. J.* 119: 183-186.
- Bauer, W.D., K.W. Talmadge, K. Keegstra, and P. Albersheim. 1973. The structure of plant cell walls. II. The hemicellulose of the walls of suspension cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51: 174-187.
- Becker, G.E., P.A. Hui and P. Albersheim. 1964. Synthesis of Extracellular Polysaccharide by Suspensions of *Acer Pseudoplatanus* L. cells. *Plant Physiol.* 39: 913-920.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley, P.M., F. El-Fiki, and K.L. Giles. 1984. Polyamines and arginine effect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Sci. Lett.* 34: 397-401.
- Chen, P.S., T.Y. Toribana and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 28: 1756-1758.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, M.Y. Kim and H.M. Lee. 1985. Cell biological studies on the mechanism of development and differentiation. X. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Korean J. Bot.* 28: 243-251.
- Dever Jr., J.E., R.S. Bandurski and A. Kivillan 1968. Partial chemical characterization of corn root cell walls. *Plant Physiol.* 43: 50-56.
- Donahue, T.F. and S.A. Henry. 1981. *Myo*-inositol-1-phosphate synthase: Characterizations of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J. Biol. Chem.* 256: 7077-7085.
- Fuhrer, J., R. Kaur-Sawhney, L.M. Shih and A.W. Galston. 1982. Effect of exogenous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. *Plant Physiol.* 70: 1597-1600.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1982. Polyamines: Are they a new class of plant growth regulator? In, *Plant Growth and Substances*. P.F. Wareing, Ed. Academic Press, New York, pp. 451-462.
- Hall, J.L., T.J. Flowers and R.M. Roberts. 1982. Cell wall. In, *Plant Cell Structure and Metabolism*. Longman Press, New York, pp. 430-472.
- Horine, R.K. and A.W. Ruesink. 1972. Cell wall regeneration around protoplasts isolated from *Convolvulus* tissue cultures. *Plant Physiol.* 50: 438-445.
- Igarish, K., K.T. Kashiwagi, and S. Hirose. 1981. Increase of degree of spermine stimulation of polypeptide synthesis in the presence of phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 207: 125-134.
- Kaur-Sawhney, R., H.H. Flores and A.W. Galston 1980. Polyamines induced DNA synthesis and mitosis in oat leaf protoplasts. *Plant Physiol.* 65: 368-371.
- Lampert, D.T.O. 1970. Cell wall metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 21: 235-270.
- Loewus, M.W. and F. Loewus. 1971. The isolation and characterization of D-glucose-6-phosphate cycloaldolase (NAD-dependent) from *Acer pseudoplatanus* L. cell cultures. *Plant Physiol.* 48: 255-260.
- Loewus, M.W. and F. Loewus. 1974. *Myo*-inositol-1-phosphate synthase inhibition and control of uridine diphosphate-D-glucuronic acid biosynthesis in plant. *Plant Physiol.* 54: 368-371.
- Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.L. Farr and Randle. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- Masuda, H., Y. Oreki, S. Amino and A. Komamine. 1984. Changes in cell wall polysaccharides during elongation in a 2,4-D free medium in a carrot suspension culture. *Physiol. Plant.* 62: 65-72.
- Nagata, J. and I. Takebe. 1970. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta* 92: 301-308.
- Ray, P.M. 1973. Regulation of  $\beta$ -glucan synthetase activity by auxin in pea stem tissue. *Plant Physiol.* 51: 601-608.
- Ray, P.M., T.L. Shininger and M.M. Ray. 1969. Isolation of  $\beta$ -glucan synthetase particles from plant cell and identification with Golgi membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 64: 605-612.
- Roberts, R.M. and J.J. Cetorelli. 1973. UDP-D-glucuronic acid pyrophosphorylase and the formation of UDP-D-glucuronic acid in plants. In, Biogenesis of Plant Cell Wall Polysaccharides, F. Loewus, Ed. Academic Press, New York, pp. 49-60.
- Rosenfield, C.L., C. Fann and F. Loewus. 1978. Metabolic studies on intermediates in *myo*-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. *Plant Physiol.* 61: 89-95.
- Ruberry, P.H. 1972. The activity of uridine diphosphate-D-glucose: nicotinamide-adenine dinucleotide oxidoreductase in cambial tissue and differentiating xylem isolated from sycamore trees. *Planta* 103: 188-192.
- Ruberry, P.H. and B.H. Northcote. 1970. The effect of auxin on synthesis of cell wall polysaccharide in cultured sycamore cell. *Biochem. Biophys. Acta* 222: 95-108.
- Serafini-Fracassini, D., P. Torrigiani and C. Branca. 1984. Polyamines bound to nucleic acids during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.* 60: 337-351.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine. 1978a. Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured *Vinca rosea* cells during culture. *Physiol. Plant.* 42: 21-28.
- Takeuchi, Y., and A. Komamine, 1978b. Composition of the cell wall formed by protoplasts isolated from cell suspension cultures of *Vinca rosea*. *Planta* 40: 227-232.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine. 1980a. Turnover of cell wall polysaccharides of *Vinca rosea* suspension culture. I. Synthesis and degradation of cell wall components. *Physiol. Plant.* 48: 271-277.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine, 1980b. Turnover of cell wall polysaccharides of *Vinca rosea* suspension culture. III. Turnover of arabinogalactan. *Physiol. Plant.* 50: 113-118.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine. 1981. Glucan in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 22: 1585-1594.
- Talmadge, K.W., K. Keegstra, W.D. Bauer and P. Albersheim. 1973. The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the cell wall suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol.* 51: 158-173.
- Willison, J.H.M. and E.C. Cocking. 1972. The production of microfibrils at the surface of isolated tomato protoplasts. *Protoplasma* 75: 397-403.