

## Cell Biological Studies on Growth and Development

### Effect of $Ca^{2+}$ and polyamine of $\beta$ -glucan synthetase activity in carrot root protoplast

Lee, Sun Hi, Young-Hee Kang, Byoung-Sik Pyo, Young-Dong Cho,\*  
Myeong-Won Kim\*\* and June-Seung Lee\*\*\*

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

### 生體生長에 관한 細胞生物學的 研究

#### 당근 뿌리의 원형질체에서 polyamine과 $Ca^{2+}$ 이 $\beta$ -glucan synthetase 활성도에 미치는 영향

李舜熙·康榮燾·表炳植·趙暎東\*·金明苑\*\*·李俊承\*\*\*  
(延世大學校 生物學科, \*生化學科, \*\*原州分校 生物學科, \*\*\*梨花女子大學校 生物學科)

#### ABSTRACT

The effect of polyamine,  $Ca^{2+}$  and calmodulin on GS ( $\beta$ -glucan synthetase) activity was studied in *Daucus carota* root. The  $Ca^{2+}$  is shown to have no effect on the GS activity whereas the GS II activity is increased in response to increase in concentration of the  $Ca^{2+}$ . When the protoplasts are cultured, for 4 days, the GS II activity increases as a function of time and reaches a maximum after 3 days at a time when the network of cellulose microfibrils is known to be synthesized. The effect of the  $Ca^{2+}$  and 1mM spermine on the GS II activity turns out to be synergistic, especially more synergistic at lower concentration of the  $Ca^{2+}$ . The GS II activity seems to be enhanced by the  $Ca^{2+}$ . The GS II activity in the protoplast treated by the calcium channel blocker, verapamil, turns out to be lower than that of the control.

Cumulative results suggest that the  $Ca^{2+}$  stimulates the cell wall regeneration via enhancement of the GS II activity responsible for synthesizing the cell wall component through synergistic effect with spermine.

#### 서 론

식물세포의 세포벽 성분중 cellulose와 hemicellulose는  $\beta$ -glucan synthetase에 의하여 합성되며(Ray *et al.*, 1969),  $\beta$ -glucan synthetase I (GS I)은 소포체, 골지체 및 coated vesicle등에 존재하고 1,4-linkage의 cellulose합성에 관여한다. 한편  $\beta$ -glucan synthetase II (GS II)는 원형질막에 존재하며 1,3-linked glucan인 callose형성에 관여한다(Cerenius and Söderh el, 1984). Polyamine은 isoleucyl-tRNA synthetase(Igarashi *et al.*, 1978), 6-phosphogluconate, glucose-6-

phosphate dehydrogenase(Mita and Yasumazu, 1980), RNase(Altman, 1982) 및 GS II (Cho *et al.*, 1985)의 활성에 영향을 미친다. 또한 protein phosphorylation에 관계하는 protein kinase의 활성을 증가시킨다(delta Fuente, 1984;Veluthambi *et al.*, 1984).

한편  $Ca^{2+}$ 은 식물생장의 필수원소중의 하나로 식물체의 구조와 생리, 생화학적으로 중요한 역할을 한다(Hepler and Wayne, 1985). 특히  $Ca^{2+}$ 은 동물세포에서 secondary messenger로서 작용한다는 것이 밝혀진 이후(Rasmussen, 1970), 최근 식물세포에서도 secondary messenger로서 그 중요성이 입증되고 있다. 그 작용은 calmodulin과 complex를 형성하여 효소 활성에 영향을 주어 세포대사를 조절한다(Marmé, 1982;Lukas *et al.*, 1984). 또한  $Ca^{2+}$ 은 calcium pectic acid의 salt로서 세포벽 구조에 영향을 주며(Rasmussen, 1983;Stoddart *et al.*, 1967), 특히 pectin화합물의 carboxyl group과 결합하여 세포벽의 강직성을 나타내게 한다(Levine and Dalgarno, 1983). 상기한바 이외에도  $Ca^{2+}$ 은 산성pH에서 세포벽 형성에 관여하는 효소 활성을 억제시키기도 한다(Cleland and Rayle, 1977;Bates and Ray, 1981).

이와같은 사실과 관련해서 polyamine과  $Ca^{2+}$ 은 세포벽 형성에 중요한 역할을 하고 있기 때문에 본 실험에서는 당근뿌리로부터 원형질체를 분리 배양하여 세포벽 재생시 세포벽 합성효소의 하나인 GS II의 활성에  $Ca^{2+}$ 과 polyamine 및  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex가 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

### 재료 및 방법

**재료.** 당근(*Daucus carota* L.)의 뿌리를 사용하여 Cho등(1985)에서와 같이 원형질체를 분리해서 배양하였다.

**실험구의 설정.** 당근뿌리와 뿌리로 부터 분리한 원형질체에서 추출한 조효소에 spermine은 1  $\mu$ M, 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM을,  $Ca^{2+}$ 은 0.1 mM, 1 mM, 10 mM을 각각 처리하였다. 또한  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex가 효소 활성의 영향 유무를 알아보기 위해 calmodulin을 5unit 처리하였으며(Leshem *et al.*, 1984) 분리된 원형질체에  $Ca^{2+}$ 의 channel blocker인 verapamil을 1 mM 첨가하며 4일간 배양하면서 GS II의 활성을 측정하였다.

**GS II의 추출과 활성측정.** Ray등(1977)과 Cerenius와 Söderhæl(1984)의 방법으로 효소추출과 활성을 측정하였다. 시험관내 실험은 당근뿌리 절편을 냉각수로 세척하고 세절한 다음 같은 무게의 마쇄액과 혼합하여 막자사발로 마쇄하였다. 마쇄액은 1 M sucrose, 4 mM  $Na_2EDTA$ , 1 mM DTT, 25  $\mu$ M GTP, 58 mM  $MgCl_2$ 등이 포함된 0.1 M Tris완충액(pH8.0)을 사용하였다. 마쇄된 용액을 나일론천으로 걸러서 여과액을 6,800 $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 다시 40,000 $\times$ g에서 60분간 원심분리해서 얻은 pellet을 Tris완충액에 현탁하여 조효소로 사용하였다. 원형질체 실험은 배양된 원형질체를 300 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 2배(V/V)의 마쇄액과 혼합하여 마쇄하였다. 이 마쇄액을 시험관내 실험과 같은 방법으로 조효소를 얻어 효소반응에 사용하였다.

효소반응은 200  $\mu$ l의 효소추출액과 800  $\mu$ l의 Tris완충액(0.02  $\mu$ ci의 uridine diphospho-D-[U- $^{14}C$ ] glucose, specific activity 223 mci/mmol, ICN,  $Ca^{2+}$ , polyamines, verapamil, pH8.0)을 27 $^{\circ}C$ 에서 2시간 반응시켰다.

GS I의 경우는 Tris완충액에 58 mM  $MgCl_2$ 를 첨가하였고 GS II의 경우는 첨가하지 않았다. 효소반응 중지를 위해 1 ml의 10% trichloroacetic acid를 첨가한 후 잘 혼합하였다. 이것을

Whatman GF/C glass filter로 여과한 후 반응하지 않은 기질을 세척해 내기 위해서 10 % trichloroacetic acid 용액으로 3 ml씩 세번, 96 % ethanol로 3 ml씩 세번 세척하였다. 이 glass filter를 말린 후 10 ml의 scintillation cocktail에 넣고 1시간 이상 방치한 후 scintillation counter-(PACKARD, TRI-CARB 4530)로 방사능량을 측정하였다.

단백질 정량. 단백질은 Lowry등(1951)의 방법을 이용하여 비색정량하였다.

### 결과 및 고찰

Polyamine이 cellulose 합성효소인 GS II의 활성을 당근 뿌리에서 촉진시키며(Cho *et al.*, 1985), 옥수수 종자에 Ca<sup>2+</sup>를 처리해서 발아시키면 자연초에서 polyamine의 함량이 증가하였다(Cho *et al.*, 1984).

따라서 당근 GS II의 활성에 polyamine과 Ca<sup>2+</sup>의 영향과 polyamine존재시 Ca<sup>2+</sup>의 효과를 조사하여 세포벽 재생에 있어서 이들의 영향을 알아보려고 하였다.

당근뿌리에서 추출해낸 조효소원에 Ca<sup>2+</sup>을 처리하여 GS I과 GS II의 활성을 조사하였다(Fig.1, Fig.2). GS I의 경우 Ca<sup>2+</sup>를 0.1 mM, 1 mM 처리했을때 각각 20 %, 10 %씩 활성이 증가하였으며 10 mM에서는 72 %의 증가를 보였다. GS II의 활성은 0.1 mM의 Ca<sup>2+</sup>에서 12 %, 1 mM에서 21 %, 10 mM에서 42 %로 농도가 높아감에 따라 효소활성이 증가되었다. 또한 당근뿌리에서 GS I과 GS II의 활성은 GS II가 GS I보다 10배 이상의 높은 활성을 보였는데 이 결과는 Cho등(1985)의 결과와 일치하였다.

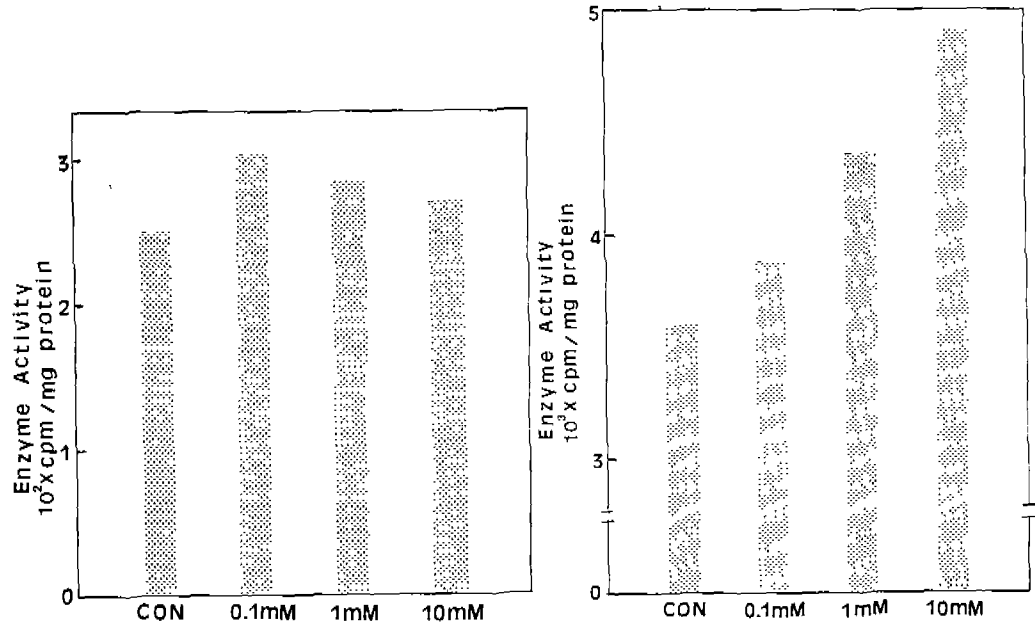


Fig. 1. Effect of Ca<sup>2+</sup> concentrations on carrot root  $\beta$ -glucan synthetase I activity. Fig. 2. Effect of Ca<sup>2+</sup> concentrations on carrot root  $\beta$ -glucan synthetase II activity.

한편 GS II의 활성은 polyamine 농도 증가에 따라 현저하게 촉진되었으며 1 mM의 polyamine을 처리하였을 때 가장 높았다. 이중에 spermine의 효과가 가장 높았다(Fig. 3). 1 mM의 spermine을 처리하여 Ca<sup>2+</sup> 농도 변화에 따른 GS II의 활성을 측정 한 결과(Fig. 4) 0.1 mM~10 mM의 Ca<sup>2+</sup>을 처리했을 때 Ca<sup>2+</sup>의 농도가 0.1 mM에서 4배, 1 mM에서 3.8배 10 mM에서 2배 정도 활성을 증가시켰다. 이때 Ca<sup>2+</sup>의 효소에 대한 영향은 비교적 낮은 농도에서 현저한 것 같다. 이는 Ca<sup>2+</sup>과 spermine과의 synergistic effect로서 Kauss와 Jeblick(1986)의 결과와 일치하였다.

이러한 Ca<sup>2+</sup>이 free ion으로만 작용하는지 또는 calmodulin과 complex를 이루어 효소활성에 영향을 미치는지 알아보기 위해서 0.1 mM, 1 mM, 10 mM의 Ca<sup>2+</sup>의 농도에 5 unit calmodulin을 처리했을 때 Ca<sup>2+</sup>만을 처리한 실험결과와 비슷한 양상의 GS II의 활성을 얻었다(Fig. 5). 즉

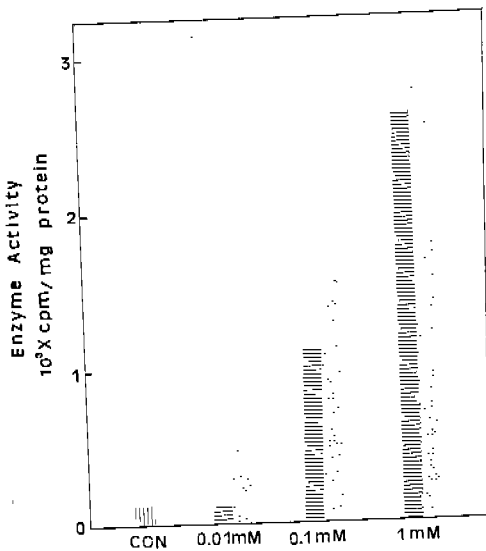


Fig. 3. Effect of putrescine, spermidine and spermine on carrot root  $\beta$ -glucan synthetase II activity.

- : putrescine
- ▨ : spermidine
- ▩ : spermine

Fig. 5. Effect of Ca<sup>2+</sup> with calmodulin on carrot root  $\beta$ -glucan synthetase II activity in the presence of 5 unit calmodulin.

- CON: no calmodulin
- A : 0.1mM CaCl<sub>2</sub>+5 unit calmodulin
- B : 1mM CaCl<sub>2</sub>+5 unit calmodulin
- C : 10mM CaCl<sub>2</sub>+5 unit calmodulin

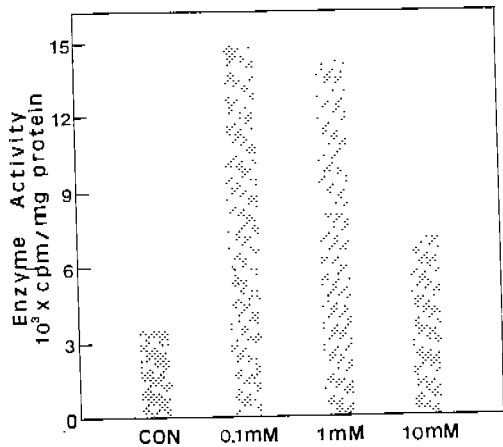
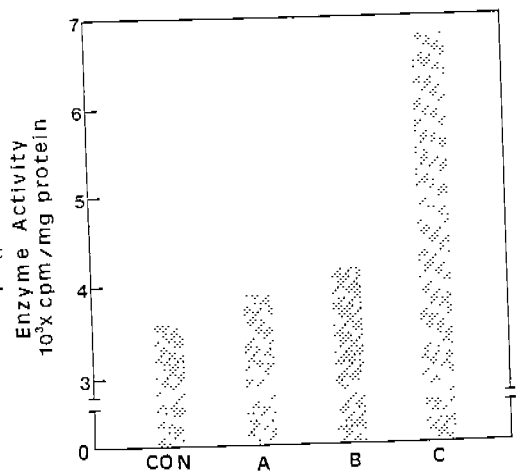


Fig. 4. Effect of Ca<sup>2+</sup> with spermine on carrot root  $\beta$ -glucan synthetase II activity in the presence of 1mM spermine.



calmodulin에 관계없이  $Ca^{2+}$ 의 농도가 높아감에 따라 효소의 활성도 증가하였는데 이는  $Ca^{2+}$ 이 free ion으로서 작용하는 것으로 사료된다. 지금까지 calmodulin은 고등식물 중에서 완두, 녹두, 땅콩의 종자, 시금치의 잎, 옥수수등에서 분리추출 되었으며  $Ca^{2+}$ 과 calmodulin이 complex를 이루어 NAD<sup>+</sup> kinase,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPase, protein kinase, NAD<sup>+</sup> oxidoreductase에 작용하는 것으로 알려져 있지만(Marmé, 1985; Cheung, 1983), 당근뿌리에서는 calmodulin이  $Ca^{2+}$ 과 complex를 이루지 않고 free ion으로서 GS II의 활성에 관계하는 것으로 사료되며 이와 같은 결과는 당근 callus에서도 유사한 결과를 얻고 있는 중이다(실험결과는 게재하지 않았음).

당근뿌리로 부터 분리해낸 원형질체에서  $Ca^{2+}$ 이 GS II의 활성에 미치는 영향을 조사한 것으로(Fig. 6) 0.1 mM, 1 mM의  $Ca^{2+}$  농도에서는 약 1.4배, 10 mM에서는 2배정도 활성을 증가시켰는데 이는 GS II가 원형질막에 존재하고 있으므로(Luttenegger and Nevins, 1985) 세포벽을 제거한 상태에서도 효소의 활성은 여전하며, 당근뿌리에서  $Ca^{2+}$ 에 대한 GS II의 활성의 변화 양상(Fig. 2)과 비슷함을 보여주고 있다. 이러한 원형질체를 4일 동안 배양하면서 날짜별로  $Ca^{2+}$ 에 대한 GS II의 활성의 변화를 조사하였다(Fig. 7). 원형질체 배양배지에는 원래  $Ca^{2+}$ 의 농도가 4 mM이 함유되어 있으므로  $Ca^{2+}$ 의 channel blocker로 알려진 verapamil(Saunders and Hepler, 1982)를 처리해서  $Ca^{2+}$ 의 원형질체내로의 이동을 막음으로써 간접적으로  $Ca^{2+}$ 이 GS II의 활성에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 원형질체 실험으로 보통배지에서 배양 1일째에 효소활성이 증가하기 시작하여 3일째에 가장 높은 활성을 보였으며 1 mM의 verapamil을 처리해서 배양시킨 실험구에서는 전반적으로 효소활성도를 감소시켰는데 특히 배양 2일째 경우 60%의 효소활성의 감소를 보였다. 이는  $Ca^{2+}$ 이 원형질체 배양시에 GS II의 활성을 증가시키

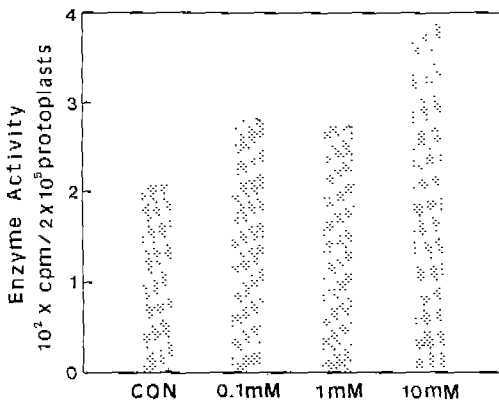


Fig. 6. Effect of  $Ca^{2+}$  concentrations on carrot root protoplasts  $\beta$ -glucan synthetase II activity.

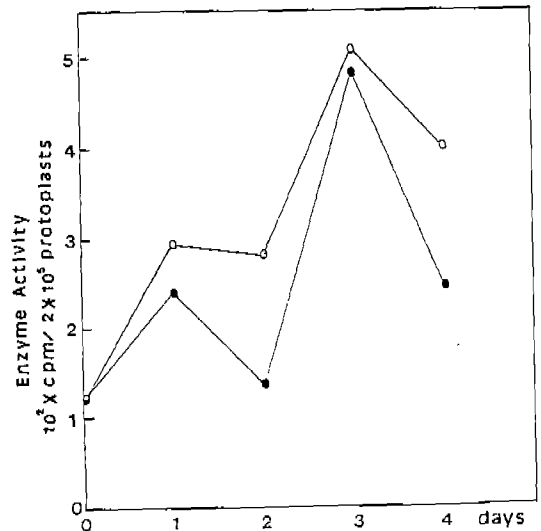


Fig. 7. Effect of verapamil on carrot root protoplasts  $\beta$ -glucan synthetase II activity in the presence of 1mM verapamil as function of time. (O) control (•) verapamil-treated protoplasts

기 때문이라 사료된다. 이러한 결과는 원형질체를 배양하면 cellulose의 그물조직이 3일째에 어느정도 이루어져서 4일째 부터 세포분열이 왕성히 일어나고(Asamizu *et al.*, 1977), 배양초기에 형성된 세포벽은 주로 1,3-1,4-linkage의 glucan으로 구성되며(Takeuchi and Komamine, 1981), GS II는 세포벽의 cellulose구성성분의 95% 이상을 차지하는 glucan을 합성한다(Van der Woude *et al.*, 1974).

따라서  $Ca^{2+}$ 과 polyamine은 GS II의 활성을 촉진시킴으로서 세포벽 재생 및 형성에 기여하며 GS II는 free calcium ion에 의해 그 활성이 촉진된다고 사료된다.

## 적 요

당근(*Daucus carota* L.)뿌리의 원형질체에서 세포벽 재생시 GS II의 활성에 미치는 polyamine과  $Ca^{2+}$ 의 영향을 조사하였다.  $Ca^{2+}$ 은 GS II의 활성을 촉진시키지 못했으나 GS II의 활성은  $Ca^{2+}$ 의 농도가 증가함에 따라 촉진되었다. 원형질체를 4일까지 배양했을시 GS II의 활성에 대한  $Ca^{2+}$ 의 효과는 시간이 경과함에 따라 증가시키는 경향을 보였으며 특히 cellulose의 그물조직이 어느정도 이루어지는 3일째에 가장 높은 활성을 나타냈다.

또한 polyamine 존재시  $Ca^{2+}$ 의 영향을 보면 1 mM의 spermine을 처리했을때  $Ca^{2+}$ 의 낮은 농도에서 현저하게 GS II의 활성이 촉진되었는데 이는 synergistic effect로서 낮은  $Ca^{2+}$ 농도에서 더욱 현저하였다.  $Ca^{2+}$ 과 calmodulin이 효소에 미치는 영향은  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex효과가 아니고  $Ca^{2+}$  자체만으로 GS II의 활성을 촉진시키는 것으로 나타났다.  $Ca^{2+}$ 의 channel blocker인 verapamil을 처리하여 배양한 원형질체에서는 GS II의 활성이 대조구보다 낮았다.

이상의 결과로 보아  $Ca^{2+}$ 은 세포벽을 구성하는 물질을 만드는 GS II의 활성을 spermine과 상승작용으로 촉진시켜 세포벽재생을 증진시킨다고 생각된다.

## REFERENCES

- Altman, A. 1982. Retardation of redish leaf senescence by polyamines. *Physiol. Plant.* **54**: 189-193.
- Asamizu, T., K. Tanaka, I. Takene and A. Nishi. 1977. Changes in molecular size of cellulose during regeneration of cell wall on carrot protoplasts. *Physiol. Plant.* **40**: 215-218.
- Betes, C.W. and P.M. Ray. 1981. pH dependent interactions between pea cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth. *Plant Physiol.* **68**: 158-164.
- Cerenius, L. and K. Söderh  el. 1984. Isolation and properties of  $\beta$ -glucan synthetase from the aquatic fungus, *Aphanomyces astaci*. *Physiol. Plant.* **60**: 247-252.
- Cheung, W.Y. 1983. Calcium and cell function. Academic Press, New York, pp. 264-311.
- Cho, Y.D., Y.H. Kang, S.H. Lee and B.S. Pyo. 1984. Participation of ornithine decarboxylase in the putrescine biosynthesis in corn embryo. *Kor. J. Bot.* **27**: 1-5.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, M.Y. Kim and H.M. Lee. 1985. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Kor. J. Bot.* **28**: 243-251.
- Cleland, R.E. and D.L. Rayle. 1977. Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin-induced elongation. *Plant Physiol.* **60**: 709-712.
- delta Fuente R.K. 1984. Calcium in the polar secreton of indoleacetic acid. *Plant Physiol.* **76**: 342-346.
- Hepler, P.K. and R.O. Wayne. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**:

- 397-439.
- Igarashi, K., I. Sakamoto, N.Goto, K.Kashiwagi, R.Homma and S.Hirose. 1978. Effect of polyamines on isoleucyl-tRNA formation by rat-liver isoleucyl-t-RNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* **82**: 301-307.
- Kauss, M. and W. Jeblick. 1986. Synergistic activation of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase by Ca<sup>2+</sup> and polyamines. *Plant Science.* **43**: 103-107.
- Leshem Y.Y., S. Sridhara and J.E. Thompson. 1984. Involvement of calcium and calmodulin in membrane deterioration during senescence of pea foliage. *Plant Physiol.* **75**: 329-335.
- Levine, B.A. and D.C. Dalgarno. 1983. The dynamic and function of calcium-binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **726**: 187-204.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* **193**: 265-275.
- Lukas, T.J., D.B. Inverson, M. Schleicher and D.M. Watterson. 1984. Structural characterization of a higher plant calmodulin. *Plant Physiol.* **75**: 788-795.
- Luttenegger, G., and D.J. Nevins. 1985. Transient nature of a (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -glucan in *Zea mays* coleoptile cell walls. *Plant Physiol.* **77**: 175-178.
- Marmé, D. 1982. The role of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin in plants. *What's New in Plant Physiol.* **13**: 37-40.
- Marmé, D. 1986. Calcium and cell physiology. Springer Verlag. pp.105-139.
- Mita, D. and I. Yasumasu. 1980. Inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in sea urchin eggs by plamitoyl coA and reversal by polyamine. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 322-329.
- Rasmussen, H. 1983. Pathway of amplitude and sensitivity modulation in the calcium messenger system. Calcium and cell function. Academic Press, New York, **4**: 1-61.
- Rasmussen, H. 1970. Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science* **170**: 404-412.
- Ray, P.M., U. Pohrmann and R. Hertal. 1977. Characterization of naphthaleneacetic acid binding to receptor sites on cellular membranes of maize coleoptile tissue. *Plant Physiol.* **59**: 357-364.
- Ray, P.M., T.L.Shininger and M.M. Ray. 1969. Isolation of  $\beta$ -glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **64**: 605-612.
- Saunders, M.J. and P.K. Hepler. 1982. Calcium ionophore A23187 stimulates cytokinin like mitosis in *Funaria*. *Science* **217**: 943-945.
- Stoddart, R.W. and D.H. Narthcote. 1967. Metabolic relationships of the isolated fractions of pectic substance of activity growing sycamore cells. *Biochem. J.* **105**: 45-49.
- Takeuchi, Y. and A. Komamine. 1981. Glucan in the cell walls regenerated from *Vinca rosea* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* **22**: 1585-1594.
- Van der Woude, W.J., C.A. Lembi and D.J. Morre. 1974.  $\beta$ -glucan synthetase of plasma membranes and golgi apparatus from onion stem. *Plant Physiol.* **54**: 333-340.
- Veluthambi, K. and B.W. Poovaiah. 1984. Calcium and calmodulin regulated phosphorylation of soluble and membrane proteins from corn coleoptiles. *Plant Physiol.* **76**: 359-365.
- Veluthambi, K. and B.W. Poovaiah. 1984. Calcium promoted protein phosphorylation in plants. *Science* **233**: 169-174.