

대두 유식물에서 Protein Kinase C에 의해서 인산화되는 단백질의 동정

崔允僖·許圭晶·李竣承

(梨花女子大學校 生物科學科)

Identification of Proteins Phosphorylated by Protein Kinase C in Soybean

Choy, Yoon Hi, Kyu Chung Hur and June Seung Lee

(Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul)

ABSTRACT

The previous report (Chung and Lee, 1992) in our laboratory demonstrated that the protein kinase C (PKC) activator, TPA, promotes the elongation of corn coleoptiles significantly. To understand the role of TPA on the growth, substrates of PKC were investigated using PKC partially purified from soybean by DEAE-52 cellulose column. The enzyme activity increased about 5-fold in the presence of Ca^{2+} , phosphatidylserine and diolein compared with that in the absence of these reagents. Phosphorylation of both cytosol and membrane proteins by the purified PKC increased in the presence of Ca^{2+} compared with that of EGTA treatment. However, the phosphorylation did not increase markedly by treatment with TPA or phosphatidylserine and diolein in the presence of Ca^{2+} compared with Ca^{2+} alone. The decrease in phosphorylation of 100, 61 and 43 Kd proteins of the cytosol, and 140, 110, 66, 47 and 32 Kd membrane proteins in hypocotyls, and 140, 110, 66, 47, 33, 31 and 16 Kd membrane proteins in the root was observed in the presence of PKC inhibitor staurosporine (STA). These results suggest that substrates of PKC in soybean may be 110, 63 and 41 Kd proteins of the cytosol, and 140, 110, 66, 47 and 32 Kd membrane proteins in the subapical region of the hypocotyl, and 140, 110, 66, 47, 33, 31 and 16 Kd membrane proteins of the root.

서론

다세포 생물의 경우 개체의 항상성 유지를 위한 신호 교환에 Ca^{2+} , cyclic AMP, inositol-1,4,5-triphosphate(IP_3) 등이 second messenger로 작용한다. 이들 중에서 IP_3 는 호르몬과 같은 물질들이 수용체와 복합체를 형성하면 phospholipase C가 활성화되어 phosphoinositide를 가수분해하고, 그 산물로서 diacylglycerol(DAG)과 함께 생성된다(Nishizuka, 1984). 동물에서는 IP_3 에 의해 소포체와 같은 Ca^{2+} 저장장소로부터 Ca^{2+} 이 방출되고(Berridge, 1984) 이 Ca^{2+} 에 의해 protein kinase나 calmodulin dependent

protein kinase 등이 활성화되며(Niedel and Blacksheer, 1988), DAG에 의해서는 Ca^{2+} dependent, phospholipid dependent protein kinase(PKC)의 Ca^{2+} 에 대한 친화도가 증가되어 생체내 농도의 Ca^{2+} 에 의해서 PKC가 활성화되어 여러 단백질을 인산화시켜 외부로부터 오는 정보가 세포내 반응으로 연결된다고 알려져 있다(Kaibuchi *et al.*, 1981).

최근 식물에서도 세포의 신장을 촉진하는 농도의 auxin이 phosphatidylinositol turnover에 관여하며(Morré *et al.*, 1984), auxin에 의해 IP_3 의 양이 증가되며(Ettlinger and Lehle, 1988), IP_3 가 액포와 같은 Ca^{2+} 저장장소의 표면에 있는 IP_3 의 수용체에 결합함으로써 Ca^{2+} 의 방출을 유도한다는 보고가 있다(Dröback and Ferguson, 1989). 이러한 사실은 식물체에 IP_3 cascade가 존재하며 IP_3 에 의한 세포내

본 연구는 교육부 학술진흥연구비에 의해 수행되었음.

Ca^{2+} 의 농도를 조절할 수 있는 기작들이 있음을 암시한다. 그러므로 IP_3 이외의 phosphoinositides의 또다른 가수분해 산물인 DAG에 의해 여러가지 생리적 현상이 유발될 가능성을 생각하여 볼 수 있다. 본 실험실에서는 이러한 가능성을 추적하기 위하여 옥수수의 자엽초에 IAA와 함께 DAG를 처리한 결과 IAA에 의한 신장생장 촉진에 상승효과가 있으며 또한 이것이 PKC의 활성화에 따른 몇몇 단백질의 인산화를 수반한다는 것을 알았다(Chung and Lee, 1992).

본 연구는 이러한 PKC가 신장생장 과정에 어떻게 작용하는가를 알아내기 위하여 대두(*Glycine max* L.) 유식물에서 부분적으로 분리한 PKC를 이용하여 순화된 세포질 단백질과 막 단백질의 인산화에 대한 Ca^{2+} , diolein과 phosphatidylserine의 효과와 staurosporine(STA)의 효과를 조사하여 세포질과 막에서 PKC의 기질이 되는 단백질을 찾고자 한 것이다.

재료 및 방법

실험재료. 대두(*Glycine max* L.) 유식물은 10 cm 정도 되는 것을 사용하였다. PKC 순화를 위해서는 떡잎을 제거한 유식물 전체를 사용하였으며, PKC 기질을 찾기 위해서는 하배축의 정단부 1 cm 부분과 뿌리부분을 분리하여 사용하였다. Histione H1, L- α -phosphatidyl-L-serine, diolein은 Sigma사에서 구입하였으며, column material인 DEAE-52 cellulose는 Whatman에서, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)는 Calbiochem에서, staurosporine(STA)은 Kamiya Biochemical Co.에서 구입하였다. [γ - ^{32}P] ATP는 ^{32}P -orthophosphate를 New England Nuclear에서 구입하여 Johnson 및 Walseth의 방법으로 제작하였다.

PKC 부분 순화. 대두 유식물은 떡잎을 제거하고 이들 부피의 1배 정도 되는 homogenization buffer(0.25 M sucrose, 50 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 20 mM Tris-Cl, pH 7.5)에 넣어 분쇄한 후 8겹의 거어즈로 걸러냈다. 걸러진 용액은 35,000 $\times g$ 에서 원심분리하여 상정액을 세포질 분획으로 사용하였다. DEAE-52 cellulose column(3 \times 45 cm)은 sucrose를 제외한 homogenization buffer로 미리 평형을 시킨 후 위의 방법으로 얻은 세포질 분획을 column에 직접 loading하여 0~0.6 M linear gradient KCl 1000 ml로 용출시켜 5.0 ml씩 받았다. 이렇게 얻은 분획들의 protein kinase activity의 결정은 Tsutomu *et al.*(1984)의 방법을 사용하였다. 25 mM Tris-HCl(pH 7.5), 200 $\mu g/ml$ histione H1, 10 mM $MgCl_2$, 200 μM ATP, [γ - ^{32}P] ATP 0.3 μCi /fraction, 400 μM EDTA, 0.5 mM $CaCl_2$, \pm 50 $\mu g/ml$ phosphatidylserine, \pm 0.5 $\mu g/ml$ diolein이 포함된 반응액 70 μl 에 DEAE-52 cellulose co-

lumn 각 분획의 30 μl 씩을 넣어 30 $^\circ C$ 에서 1분간 반응시킨 후 0.63% BSA(4 $^\circ C$) 100 μl 을 넣고 10% trichloroacetic acid(TCA), 5 mM NaH_2PO_4 (4 $^\circ C$) 1 ml을 넣어 반응을 중지시킨 후 3 MM 여과지로 여과시켜 10% TCA, 5 mM NaH_2PO_4 (4 $^\circ C$) 10 ml로 여과지를 씻어내고 scintillation cocktail 5 ml을 넣어서 Liquid Scintillation Counter로 radioactivity를 측정하였다.

단백질 인산화. 대두 유식물 하배축 정단부 부위의 1 cm 절편과 뿌리부분을 각각 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액과 2:1 비율(w/v)로 섞어서 분쇄한 후 8겹의 거어즈로 걸러냈다. 세포질 단백질은 걸러진 용액을 30분간 13,000 $\times g$ 로 원심분리하여 나온 상정액을 사용하였으며, 막 단백질은 거어즈로 걸러진 용액을 6,800 $\times g$ 에서 10분간 원심분리하여 상정액을 모아 80,000 $\times g$ 에서 다시 30분간 원심분리하여 나온 pellet을 증류수로 현탁하여 사용하였다. 각각 분리된 세포질 단백질과 막 단백질의 인산화는 다음과 같이 수행하였다. Standard incubation medium(20 mM HEPES, 5 mM $MgCl_2$, 1 μg PKC, 1 μCi [γ - ^{32}P] ATP, pH 7.5)에 단백질을 100 μg 을 넣어 최종 부피를 100 μl 으로 조절한 다음 30 $^\circ C$ 에서 1분간 반응시키고 10% TCA용액(4 $^\circ C$) 100 μl 을 넣어 반응을 중지시켰다. 이를 3분간 13,000 $\times g$ 로 원심분리하여 얻은 pellet을 5~20% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동한 gel은 건조하여 X-ray 필름에 밀착시켜 3~5일 동안 노출시킨 후 필름을 현상하였다. PKC의 단백질 인산화에 대한 TPA의 효과는 standard incubation medium에 1 mM EGTA, 1 mM EGTA+ 10^{-8} M TPA, 0.1 mM $CaCl_2$ 와 0.1 mM $CaCl_2$ + 10^{-8} M TPA를 넣어 비교하였으며, 단백질 인산화에 대한 Ca^{2+} 과 phospholipid의 영향은 standard incubation medium에 1 mM EGTA, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$ +50 $\mu g/ml$ phosphatidylserine+0.5 $\mu g/ml$ diolein을 넣어 비교하였다. 단백질 인산화에 대한 STA의 효과를 조사하기 위해서는 standard incubation mixture에 0.1 mM $CaCl_2$ +50 $\mu g/ml$ phosphatidylserine+0.5 $\mu g/ml$ diolein을 넣고 0.1~30 μM 의 STA를 넣어 인산화 실험을 하였다.

결 과

PKC 부분분리. 대두 유식물에서 인산화 반응을 일으키는 PKC를 부분적으로 분리하기 위하여 떡잎을 제거한 대두 유식물을 원심분리하여 모은 상정액을 DEAE cellulose에서 chromatography하여 두 개의 단백질 peak를 얻었다. 단백질 peak로 나타나는 58~122번 분획들을 대상으로 PKC 활성을 측정할 결과 대조구에 비해 phosphatidylserine과 diolein에 의해 5배 정도 활성이 증가되는 98번

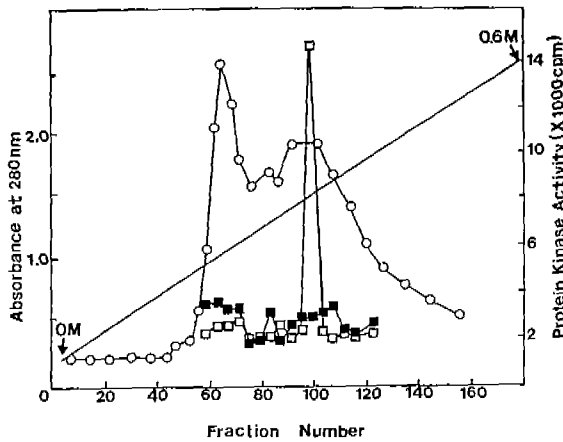


Fig. 1. DEAE-52 cellulose column chromatography of PKC. A 30 μ aliquot of each fraction was assayed for PKC. Open circle denote the absorbance at 280 nm and the straight line KCl gradient (0~0.6M). Close squares denote protein kinase activity in the presence of EDTA and open squares in the presence of phosphatidylserine and diolein.

분획을 찾았다(Fig.1). 이를 PKC 기질을 찾기 위한 인산화 실험에 PKC 효소원으로 사용하였다.

PKC의 기질. Fig. 2는 Ca^{2+} 와 PKC 활성물질로 알려진 TPA의 PKC 인산화에 대한 효과를 조사한 것이다. 세포질 단백질과 막 단백질들에서는 1 mM EGTA를 처리한 대조구인 lane 1과 5에 비해 1 mM EGTA와 10^{-8} M TPA를 같이 처리한 lane 2와 6에서 인산화가 증가되지 않았으며, 0.1 mM $CaCl_2$ 만 처리한 lane 3과 7보다 0.1 mM $CaCl_2$ 에 10^{-8} M TPA를 같이 처리한 lane 4와 8에서도 인산화가 증가되지 않았다. 특히 하배측 정단부와 뿌리의 세포질 단백질 중 100, 63, 41 Kd의 단백질들이 1 mM EGTA를 처리한 lane 1, 2, 5와 6보다 0.1 mM $CaCl_2$ 를 처리한 lane 3, 4, 7과 8에서 인산화가 증가되었으나 TPA를 처리한 lane 2, 4, 6과 8은 처리하지 않은 lane 1, 3, 5와 7보다 인산화의 뚜렷한 증가를 볼 수 없었다. 막 단백질들은 하배측의 정단부에서 125, 110, 76과 66 Kd의 단백질들이 1 mM EGTA를 처리한 대조구인 lane 1과 2에서 보다 0.1 mM $CaCl_2$ 를 처리한 lane 3과 4에서 인산화가 증가되었으나 10^{-8} M TPA를 처리한 lane 2와 4에서는 처리하지 않은 lane 1과 3에 비해 인산화의 뚜렷한 증가를 볼 수 없었다. 뿌리의 경우 140, 110, 90과 66 Kd의 단백질들이 1 mM EGTA를 넣어준 lane 5와 6에서 보다 0.1 mM $CaCl_2$ 를 넣은 lane 7과 8에서 인산화가 증가되었고 1 mM EGTA나 0.1 mM $CaCl_2$ 에 10^{-8} M TPA를 넣은 lane 6과 8은 넣지 않은 lane 5와 7에 비해 인산화가 뚜렷히 증가되지 않았다. 또한

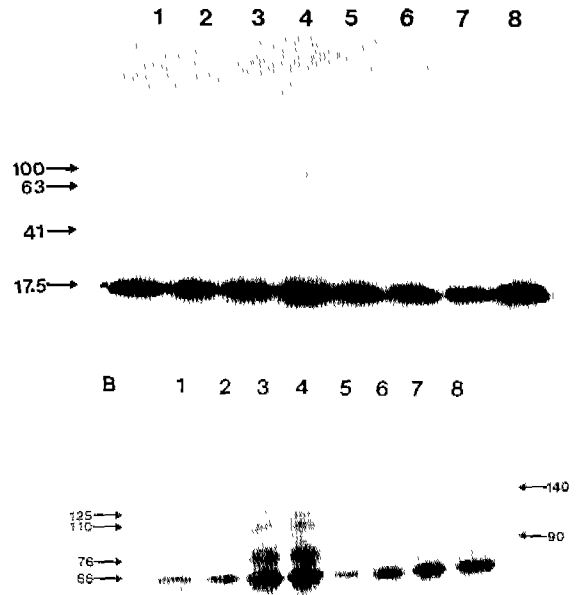


Fig. 2. Autoradiogram demonstrating the effect of TPA on protein phosphorylation. Proteins were incubated with [γ - ^{32}P] ATP in the presence of 1 mM EGTA (lanes 1 and 5), in the presence 1 mM EGTA and 10^{-8} M TPA (lanes 2 and 6), in the presence of 0.1 mM $CaCl_2$ (lanes 3 and 7) and in the presence of 0.1 mM $CaCl_2$ and 10^{-8} M TPA (lanes 4 and 8). Lanes 1 and 4 in A contained the cytosol proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 5 and 8 in A contained the cytosol proteins of the root. Lanes 1 and 4 in B contained the membrane proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 5 and 8 in B contained the membrane proteins of the root.

전반적으로 인산화의 정도는 lane 1~4와 5~8을 비교하여 볼 때 하배측의 정단부가 뿌리보다 강하게 나타났다.

따라서 PKC의 다른 활성물질인 phosphatidylserine과 diolein의 인산화에 대한 효과를 알아보았다(Fig. 3). 하배측의 정단부와 뿌리에서 얻은 세포질 단백질들은 Ca^{2+} 이 없는 대조구(1 mM EGTA)인 lane 1과 4에 비해 Ca^{2+} 만 넣은 lane 2와 5, Ca^{2+} 에 phosphatidylserine과 diolein을 같이 넣은 lane 3과 6에서 100, 63과 41 Kd 단백질의 인산화가 증가하였으나 17.5 Kd의 단백질은 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 diolein에 의하여 인산화가 증가되지 않았다. 하배측의 정단부와 뿌리에서 140, 110, 66, 64와 47 Kd 막

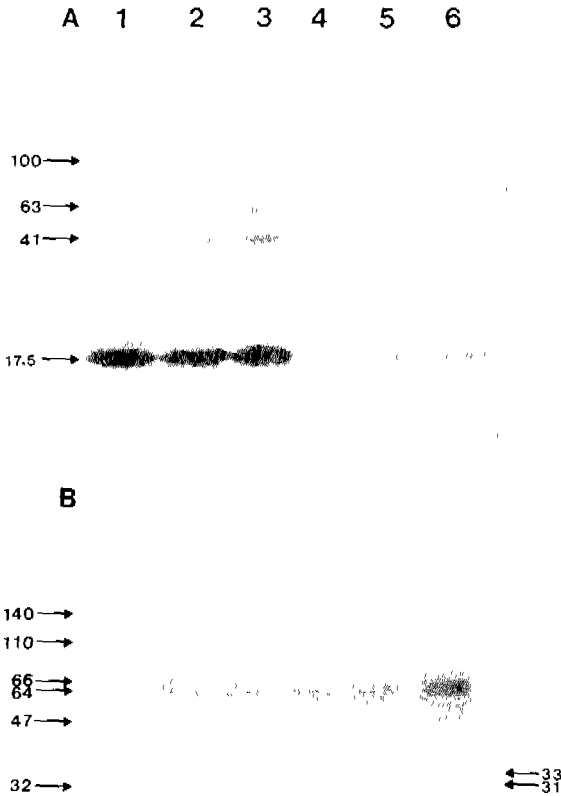


Fig. 3. Autoradiogram demonstrating the effects on phosphatidylserine and diolein on protein phosphorylation. Proteins were incubated with [γ - 32 P] ATP in the presence of 1 mM EGTA (lanes 1 and 4), in the presence of the 0.1 mM CaCl_2 (lanes 2 and 5) and in the presence of 0.1 mM CaCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phosphatidylserine and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diolein (lanes 3 and 6). Lanes 1 and 3 in A contained the cytosol proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 4 and 6 in A contained cytosol proteins of the root. Lanes 1 and 3 in B contained membrane proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 4 and 6 in B contained membrane proteins of the root.

단백질들의 인산화가 Ca^{2+} 이 없는(1 mM EGTA) lane 1과 4에 비해 Ca^{2+} 만 넣은 lane 2와 5에서 그리고 Ca^{2+} 에 phosphatidylserine과 diolein을 같이 넣은 lane 3와 6에서 인산화의 증가를 보였다. 이 외에 하배측 정단부는 32 Kd, 뿌리에서는 33 Kd과 31 Kd의 단백질 인산화가 증가하였다. 그러나 세포질 단백질들과 막 단백질들의 경우에는 모두

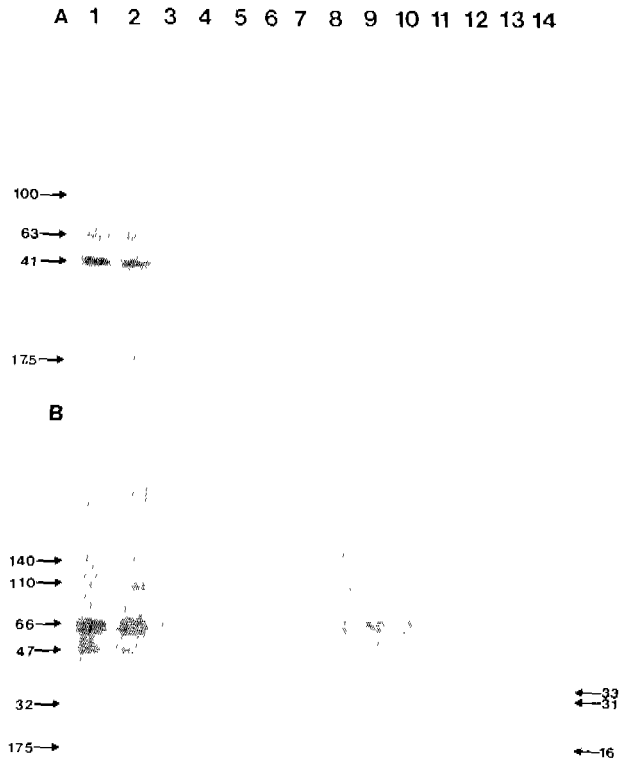


Fig. 4. Autoradiogram demonstrating the effects of PKC inhibitor (STA) on protein phosphorylation. Proteins were incubated with [γ - 32 P] ATP in the presence of 0.1 mM CaCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phosphatidylserine and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diolein in lanes 1~14. The concentrations of STA were 0.1 μM (lanes 2 and 9), 1 μM (lanes 3 and 10), 5 μM (lanes 4 and 11), 10 μM (lanes 5 and 12), 20 μM (lanes 6 and 13), 30 μM (lanes 7 and 14). Lanes 1 and 7 in A contained the cytosol proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 8 and 14 in A contained the cytosol proteins of root. Lanes 1 and 7 in B contained the membrane proteins in the subapical regions of the hypocotyl. Lanes 8 and 14 in B contained the membrane proteins of root.

Ca^{2+} 만 처리한 lane 2와 5에 비해 Ca^{2+} 에 phosphatidylserine과 diolein을 함께 처리한 lane 3과 6에서도 단백질 인산화의 뚜렷한 증가를 관찰할 수 없었다.

Ca^{2+} , phosphatidylserine과 diolein에 의한 인산화의 증가는 PKC에 의한 현상이라는 것을 암시해 주지만 TPA에 의한 뚜렷한 인산화의 증가가 없어서 PKC의 기질을 밝히기 위하여 PKC의 제해제로 알려진 STA를 처리하여 세포질과 막 단백질에서 인산화의 증가를 보인 단백질들이 STA 존재하에서 인산화가 감소되는 지를 알아보았다(Fig. 4). 하배측의 정단부에서 추출한 세포질 단백질의 경우는 100,

63 그리고 41 Kd 단백질들이 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn을 넣어준 대조구 lane 1에 비해 인산화가 0.1~30 μM STA 농도 중 1 μM STA를 넣어준 lane 3에서부터 현저히 감소하였으며 17.5 Kd의 단백질은 STA 존재하에서도 lane 1에 비해 lane 2~7에서 인산화가 감소하지 않았다. 뿌리의 세포질 단백질의 경우는 100, 63과 41 Kd의 단백질들이 하배측의 정단부와 같이 인산화가 감소하였으며 17.5 Kd의 단백질 또한 하배측의 정단부와 달리 10 μM STA을 처리한 lane 12부터 인산화가 감소하였다. 하배측의 정단부의 막 단백질은 140, 110, 66, 47과 32 Kd 단백질들의 인산화가 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn을 넣어준 대조구 lane 1에 비해 5 μM STA를 넣어준 lane 4부터 감소하였다. 그러나 17.5 Kd의 단백질은 STA의 존재하에서 인산화가 현저히 감소되지 않았다. 뿌리의 막 단백질은 140, 110, 66, 47, 33, 31과 16 Kd의 단백질들이 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn을 넣어준 대조구 lane 8에 비해 5 μM STA를 넣어준 lane 11부터 인산화가 감소하였다.

이러한 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에서 관찰된 Ca^{2+} 에 의한 인산화가 증가되나 TPA 또는 phosphatidylserine과 dioleïn에 의해서 뚜렷한 인산화의 증가가 일어나지 않은 대두 유식물의 단백질 중 PKC의 기질은 세포질 단백질의 경우는 100, 63 그리고 41 Kd의 단백질, 막 단백질로는 하배측의 정단부에 있어서는 140, 110, 66, 47 그리고 32 Kd의 단백질, 뿌리에서 140, 110, 66, 47, 33, 31 그리고 16 Kd의 단백질들이라 생각되어진다.

고 찰

동물에서 DAG이 PKC의 활성물질로 작용한다고 잘 알려져 있기 때문에(Nishizuka, 1984, 1986) DAG에 의한 IAA의 효과 증가가 PKC의 활성화에 따른 단백질 인산화에 의해서 나타나는 지를 밝히기 위하여 DAG와 같은 기능을 하는 TPA를 처리하여 길이생장을 측정한 결과 TPA에 의해서 길이 생장이 증가하였으며 동시에 단백질의 인산화가 TPA, IAA, TPA+IAA의 순서로 증가하였다(Chung and Lee, 1992). 이러한 결과는 식물세포 신장에 PKC가 관여할 가능성도 있다는 것을 암시한다. 만약 PKC가 신장생장에 관여한다면 PKC의 기질을 찾으므로써 그 기작을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다.

본 실험에서는 DEAE-52 cellulose column을 이용하여 부분적으로 순화한 PKC의 활성은 EDTA를 넣은 대조구에 비해 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn을 넣었을 때 활성이 5배 이상 증가하였는데, 이는 동물의 bovine heart에서 DEAE cellulose 크로마토그래피한 결과 5배 증가하였고(Bradley *et al.*, 1982), spleen에서 9배의 증가를 보인 것(Schatzman *et al.*, 1983)과 활성화되는 정도를 비교해 볼

때 유사함을 알 수 있다. 세포질 단백질과 막 단백질에 DAG처럼 PKC의 Ca^{2+} 에 대한 친화도를 증가시킨다고 알려진 TPA를 Ca^{2+} 과 같이 처리하였을 때는 뚜렷한 인산화의 증가를 찾아볼 수 없었다. 이 결과로는 Ca^{2+} 에 의한 인산화가 PKC에 의한 것인지 아니면 Ca^{2+} calmodulin protein kinase에 의한 것인지 명확하지 않았다. 따라서 PKC의 활성물질로 알려진 phosphatidylserine을 dioleïn과 같이 처리하여 식물세포의 PKC 혹은 이와 유사한 protein kinase에 의해 인산화되는 지를 알아보았다. 이 경우도 TPA와 같이 세포질 단백질을 중 100, 63 그리고 41 Kd의 단백질들과 막 단백질들 중 140, 110, 66, 64, 47, 33 그리고 32 Kd의 단백질들이 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn의 존재하에서 Ca^{2+} 만 있을 때보다 인산화 정도가 뚜렷한 증가를 보이지 않았다(Fig.3). 더우기 17.5 Kd의 단백질은 EGTA만 처리했을 때와 마찬가지로 Ca^{2+} 만 처리했을 때나 Ca^{2+} 에 phosphatidylserine과 dioleïn을 같이 처리한 경우에도 인산화가 증가되지 않았다. 이는 PKC나 Ca^{2+} calmodulin protein kinase에 의하지 않고 다른 protein kinase에 의해서 인산화가 되었음을 암시한다.

Phosphatidylserine과 dioleïn을 처리한 결과에서 TPA와 마찬가지로 PKC의 활성화가 일어나지 않았음은 다른 Ca^{2+} 의존성 protein kinase에 의한 인산화가 나타났거나 본 실험에서 사용한 인산화 조건이 phosphatidylserine과 TPA의 효과를 보기에 부적당하다고 생각해 볼 수 있다. 이러한 가능성을 확인하여 보기 위하여 PKC의 저해제인 STA를 처리하여 보았다. 하배측 정단부의 세포질 단백질 중 110, 63 그리고 41 Kd 단백질들이 Ca^{2+} , phosphatidylserine과 dioleïn을 처리한 경우보다 1 μM STA를 처리했을 때부터 인산화가 현저히 감소하였고 막 단백질들은 140, 110, 66 그리고 47 Kd의 단백질들과, 정단부에서는 32 Kd 단백질이, 뿌리에서는 33과 31 Kd의 단백질이 5 μM STA를 처리했을 때부터 현저히 감소하였다(Fig.4). 그러나 세포질 단백질과 하배측 정단부의 17.5 Kd의 단백질은 STA의 존재하에서도 STA의 영향을 받지않아 인산화가 감소하지 않았다. 이 사실들은 Fig. 3과 4에서 관찰된 Ca^{2+} 에 의해 인산화가 증가되나 TPA 또는 phosphatidylserine과 dioleïn에 의해서 뚜렷한 인산화의 증가가 일어나지 않은 대두 유식물의 단백질 중 PKC의 기질은 세포질 단백질의 경우는 100, 63 그리고 41 Kd의 단백질들이며, 막 단백질 중에서는 하배측의 정단부에 있어서는 140, 110, 66, 47 그리고 32 Kd의 단백질들이고 뿌리의 경우에는 140, 110, 66, 47, 33, 31 그리고 16 Kd의 단백질이라 할 수 있다. 또한 세포질 단백질들의 인산화는 전반적으로 하배측의 정단부가 뿌리보다 높게 나타났는데, 그 이유는 앞의 각 단백질들이 규명되고 무슨 작용을 하는지 밝혀야만 알 수 있을 것으로 생각된다. 이외에도 하배측의 정단부와 뿌리에서 공통적

으로 나타나는 100, 63 그리고 41 Kd의 세포질 단백질과 140, 110, 66 그리고 47 Kd의 막 단백질들은 아마도 식물 성장에 관여할 가능성이 높을 것이라 여겨지며, 이러한 단백질의 기능은 앞으로 밝혀져야할 과제라고 생각된다.

적 요

DEAE-52 cellulose column을 이용하여 부분적으로 분리한 PKC를 이용하여 대두 유 식물 하배축 정단부와 뿌리에서 각각 분리한 세포질 단백질과 막 단백질의 인산화 실험을 통해 PKC의 기질이 되는 단백질을 조사하여 보았다. PKC의 기질은 세포질 단백질의 경우 100, 63 그리고 41 Kd 단백질들이며, 막 단백질 중 하배축 정단부의 경우는 140, 110, 66, 47 그리고 32 Kd 단백질들이며, 뿌리의 경우는 140, 110, 66, 47, 33, 31, 16 Kd 단백질들이라고 생각된다.

참 고 문 헌

- Berridge, M.J. 1984. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messenger. *Biochem. J.* **210**: 345-360.
- Bradley, C.W., L.R. Robbert and J.F. Kuo. 1982. Phospholipid-sensitive Ca^{2+} dependent protein kinase from heart. *J. Biol. Chem.* **257**: 8481-8488.
- Chung, E.J. and J.S. Lee. 1991. Effect of TPA and IAA on corn coleoptile elongation. *Korean J. Bot.* **35**: 77-84.
- Drøbak, B.K. and I.B. Ferguson. 1985. Release of Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicle of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**: 3944-3949.
- Ettlinger, C. and L. Lehle. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature* **339**: 176-178.
- Kaibuchi, K., Y. Takai and Y. Nishizuka. 1981. Cooperative roles of various phospholipids in the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **156**: 7146-7149.
- Morré, D.J., J.T. Morré and R.L. Varnold. 1984. Phosphorylation of membrane located proteins of soybean *in vitro* and response to auxin. *Plant Physiol.* **75**: 265-268.
- Nidel, J.E. and P.J. Blackshear. 1986. Protein kinase C. In, Phosphoinositides and Receptor Mechanism, J.W. Putney, Jr. (ed). Alan, R. Liss, New York. pp. 47-88.
- Nishizuka, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-698.
- Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-311.
- Schatzman, R.C., R.L. Raynor, R.B. Fritz and J.F. Kuo. 1983. Purification to homogeneity, characterization and monoclonal antibodies of phospholipid sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase from spleen. *Biochem. J.* **209**: 435-443.
- Tamaoki, T., H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto and F. Tomota. 1986. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 397-402.
- Tsutomu, U. and R.F. Charles. 1984. Affinity chromatography of protein kinase C-phorbol ester receptor on polyacrylamide-immobilized phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* **259**: 12311-12314.

(1992. 3. 4 接受)