

벼잎 절편에서 Polyamine이 엽록소 함량 및 Chloroplast Peroxidase 활성에 미치는 영향에 관한 연구

표병식·김영준·*강영희

동신대학교 식품영양학과, *연세대학교 생물학과

Studies on the Effect of Polyamine on Chlorophyll Contents and Chloroplast Peroxidase Activities in Rice Leaf Segments

Byoung Sik Pyo, Young Jun Kim and *Young Hee Kang

Department of Food and Nutrition, Dongshin University

*Department of Biology, Yonsei University

ABSTRACT

The effect of polyamine on chlorophyll amount, chloroplast peroxidase and chloroplast thylakoid protein in rice leaf segments which were grown for 10 days(16 hrs, light : 8 hrs, dark) in a hormone-free MS medium containing polyamine was studied. Polyamine treatment increased the chlorophyll contents compared with the control in rice leaf segments. Especially spermine was most effective. Also, in rice leaf segments treated with polyamine chloroplast peroxidase activity was higher than in the control. The treatment with 1mM of spermidine increased the enzyme activity by 100%. In polyamine treatment and control two major polypeptide bands corresponding to 56 and 25Kd molecular weight were clearly resolved with other minor bands by SDS-PAGE in the insoluble protein fraction. However, in these bands(56, 25Kd), the total area of protein in treating with polyamine were higher than that of the control. These results suggest that polyamine was an important factor in the chloroplast development of rice seedlings.

서 론

식물의 생장과 분화에 관여하는 생장물질중의 하나인 polyamine은 모든 생물체에 광범위하게 분포하는 것으로 알려져 있으며(1), 세포의 증식과 분화 및 기능수행에 필수적이라고 보고된 바 있다(2, 3). 또한 이를 뒷받침 하는 많은 연구 결과에 의하면 polyamine이 세포소기관뿐만 아니라 기관 분화 촉진에 관여한다고 밝혀져 있다(4, 5). 그리고 polyamine은 생리학적 pH에서 다가양이온으로 작용하

며 음전하를 띠는 핵산과 강하게 결합함으로써 핵산을 안정화시키고(6, 7), 핵산의 합성을 촉진하며(8), 단백질 분해효소와 핵산 분해효소의 활성억제 및 노화억제 등의 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있다(9). 한편 polyamine이 대두 배의 발생과 생장시 체세포 발생에 관련되어 있고(10), 세포분열 과정과 생장과정 동안 대사과정에 작용하는 효소에 영향을 미치며(11), 식물체 종자들의 발아시 polyamine이 식물체 농도에 따라 전반적으로 생장과 분화에 영향을 미침과 동시에 단백질과 지질의 합성

및 DNA, RNA의 함량을 증가시키는 것으로 알려져 있다(12, 13).

식물에 생장과 분화에 관련된 효소로 알려진 peroxidase는 조직과 기관에 따라 특이하게 나타나며, 세포질과 미토콘드리아, 엽록체에 존재하고 식물의 기관 부위에 따라 특유한 동위효소 양상을 나타낸다(14, 15, 16). 그러므로 기관 발달시 peroxidase 활성을 조절하여 생장을 촉진시키거나 억제하여 결국 기관분화를 유도한다(17, 18). 또한 Kuroda 등(15)은 엽록소 함량과 chloroplast peroxidase의 활성과는 밀접한 관계가 있다고 보고하였으며, thylakoid막에 존재하는 chlorophyll a/b는 광포획 복합체를 구성하는 chlorophyll a/b binding protein과 결합하여 엽록체의 분화와 기능을 수행하는 주요 역할을 한다(19).

따라서 본 실험에서는 여러 세포 소기관중에서 식물세포에만 존재하는 엽록체의 분화조절 기작을 규명하기 위한 한 부분으로 그들의 구조적 특성 및 발현 조절인자를 살펴보기 위해 벼잎 절편을 실험재료로 하여 polyamine에 의한 엽록소 함량 및 chloroplast peroxidase의 활성 변화, 그리고 thylakoid membrane의 단백질 변화를 통하여 polyamine과 엽록체 분화와의 관계를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

벼(*Oryza sativa* L. cv. Dong-Jin)를 polyamine 농도별로 처리되고 호르몬이 결여된 MS 배지에서 10일 동안 발아생장(light, 16hrs : dark, 8hrs) 시켜서 얻은 잎 절편을 실험재료로 사용하였다.

엽록소 함량측정

엽록소 함량은 잎 절편을 80% acetone으로 마쇄한 후 원심분리(1,500xg, 10min.)하여 얻은 상등액을 Arnon(20)의 방법에 따라 측정하였다.

엽록체 순수분리

Schuler와 Zielinski(21)의 방법에 따라 벼잎 절편으로부터 엽록체를 추출하여 Nettleton 등(22)의 방법에 의해 3%(w/v) Ficoll 원심분리를 이용하여 순수한 intact 엽록체를 얻었다. 잎 절편(1g 생체량)을 Waring blender 내에 20ml의 냉각된 추출용 완충액(25mM Hepes-NaOH, 0.25M sucrose, 2mM EDTA, pH 7.6)과 함께 넣고 고속으로 10초

간 2회 마쇄하였으며, 이 마쇄액을 Nylon cloth로 여과시켜 여과액을 얻고 4,000xg에서 10분간 원심분리하여 crude 엽록체 pellet을 얻었다. 이 pellet을 1ml의 혼탁용 완충액(25mM Tris-HCl, 0.5M sucrose, 1mM EDTA, pH 7.8)으로 혼탁시키고 이 혼탁액을 3%(w/v) Ficoll액(3%, w/v, Ficoll, 25mM Tris-HCl, 0.5M sucrose, 1mM EDTA, pH 7.8) 10ml의 상층부에 부드럽게 loading한 다음 원심분리(1,500xg, 10min.)하여 이것을 다시 혼탁시킨 후 3% Ficoll액으로 재원심분리하였다. 이때 얻은 intact 엽록체 pellet을 10ml의 혼탁용 완충액으로 세척하여 Ficoll이 제거된 순수한 엽록체 pellet을 얻었다.

Thylakiod membrane 추출

Nettleton 등(22)의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. 순수한 엽록체 pellet을 2ml의 lysis 완충액(25mM Tris-HCl, 5mM MgSO₄, 12mM KCl, 0.04%, v/v, mercaptoethanol, pH 7.6)에 혼탁시켜 삼투적으로 깨뜨린 후 1,500xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 버리고 남은 pellet을 lysis 완충액으로 한번 더 세척하여 tyhlakoid 시료로 사용하였다.

Chloroplast peroxidase 활성 측정

순수한 엽록체 pellet을 2ml의 lysis 완충액(25mM Tris-HCl, 5mM MgSO₄, 12mM KCl, 0.04%, v/v, mercaptoethanol, pH 7.6)에 혼탁시켜 삼투적으로 깨뜨린 후 1,500xg에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소원으로 사용하였다. Peroxidase 활성은 Grison과 Pilet(18)의 방법을 수정하여 측정하였으며, 40mM phosphate buffer(pH6.5), 10mM guaiacol, 100μl 조효소원을 첨가하여 전체 부피가 3ml 되게 하여 10분간 반응시킨 후 10mM H₂O₂를 첨가하여 410nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성도는 1분간 흡광도의 변화로 정하였다.

Tylakoid membrane 단백질의 전기영동적 분석

Tylakoid membrane 단백질의 전기영동적 분석은 Laemmli(23)의 방법에 따라 SDS-PAGE 법으로 실시하였다. 단백질 시료와 0.12M Tris-HCl 완충액(4%, w/v, SDS, 10%, 2-mercaptopropanol, 20%, v/v, glycerol, 2mg/ml bromophenol blue, pH 6.8)을 동일 부피로 섞은 뒤 100°C의 수조에서 5분

Table 1. Changes of chlorophyll contents in rice leaf segments. The rice was germinated for 10 days(16hrs, light: 8hrs, dark) in hormone free MS medium treated with polyamine.

Treatment	chlorophyll a mg/g. fr. w.	chlorophyll b mg/g. fr. w.	chlorophyll a+b mg/g. fr. w.
Control	1.20	0.43	1.63
Putrescine	0.01mM	1.27	1.70
	0.1mM	1.36	1.88
	1mM	1.22	1.67
Spermidine	0.01mM	1.42	1.83
	0.1mM	1.46	2.02
	1mM	1.31	1.90
Spermine	0.01mM	1.26	1.74
	0.1mM	1.43	2.00
	1mM	1.35	1.81

간 중탕하고 이 시료를 12.5%의 polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하였다. 이때 분자량 marker로서 BSA(36Kd), Egg Albumin(45Kd), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36Kd), Carbonic anhydrase(29Kd), Trypsinogen(24Kd) 및 α -Lactalbumin(14.2Kd)를 사용하였으며, gel상에서 분리된 단백질 band들은 Coomassie Brilliant Blue R로 염색한 후 탈색시켜 Densitometer를 사용, 520nm에서 scanning하였다.

결과 및 고찰

엽록소 함량의 변화

Table 1은 벼를 polyamine이 농도별로 처리되고 호르몬이 결여된 MS배지에서 10일 동안 발아생장(light, 16hrs : dark, 8hrs) 시킨 후, 잎 절편에서 엽록소 함량을 측정한 것으로 polyamine을 첨가하지 않은 대조구에 비해 polyamine 처리구에서 그 함량이 높았다. 또한 chlorophyll a가 b에 비해 전반적으로 3배 정도 높게 나타났으며, 특히 0.1mM spermidine에서 엽록소 총 함량이 2.02mg/g. f. w., 0.1mM spermine에서 2.0mg/g. f. w.로서 대조구(1.63mg/g. f. w.)에 비해 20% 이상 증가하였다. 이러한 결과는 polyamine이 생체막의 구성성분 중 인지질의 음이온 group과 결합하여 막구조를 안정화시키고 엽록소의 파괴를 방지하여 노화를 지연시키는 등의 다양한 기능을 나타내고(5, 9, 24), 세포신장과 세포분열 및 기관 분화 형성에 관여한다는 기존의 연구 결과(25)를 고려해 볼 때 polyamine이 엽록소 함량을 증진시킴으로써 엽록체 발달을 촉진

하는 것으로 여겨진다. 또한 chlorophyll a로부터 chlorophyll b가 합성되기 때문에 chlorophyll a의 함량이 전체의 엽록소 함량을 좌우하게 되어(19) 본 실험 결과와 같이 chlorophyll a의 함량이 chlorophyll b 보다 훨씬 높았던 것으로 여겨진다. 결국 polyamine이 기관분화를 촉진시킨다는 결과(4, 5)를 고려해 볼 때 polyamine이 엽록소 함량을 증가시킴으로써 광합성 기구의 중요한 부분인 잎 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

Chloroplast peroxidase 활성의 변화

Fig. 1, 2, 3은 벼를 polyamine이 농도별로 처리되고 호르몬이 결여된 MS배지에서 10일 동안 발아생장(light, 16hrs : dark, 8hrs) 시킨 후 잎 절편에서 peroxidase 활성을 측정한 것으로 polyamine 처리구가 대조구에 비해 전반적으로 높았으며, 특히 0.01mM putrescine과 spermine에서는 약 70%, 1mM spermidine은 100% 이상의 활성을 촉진하였다. 식물의 분화와 밀접한 관계가 있는 peroxidase는 세포 소기관중 엽록체에 존재한다고 알려져 있으며(15, 17, 18), 엽록소의 손실을 인위적(kinetic 등)으로 감소시킬 때 chloroplast peroxidase 활성이 증가한다는 보고(15)와 본 실험 결과에서 polyamine이 순수 분리한 엽록체의 peroxidase 활성을 증가시켰던 것과 관련시켜 볼 때 잎의 엽록체 내에서도 peroxidase의 존재를 확인할 수 있었고, 실험 결과에서 나타난 바와 같이 polyamine이 chloroplast peroxidase 활성을 촉진시킨 것과 엽록소 함량이 증가한 결과(Table 1)는 Kuroda 등(15)이 보고한 엽록소 함량과 chloroplast peroxidase 활성과의

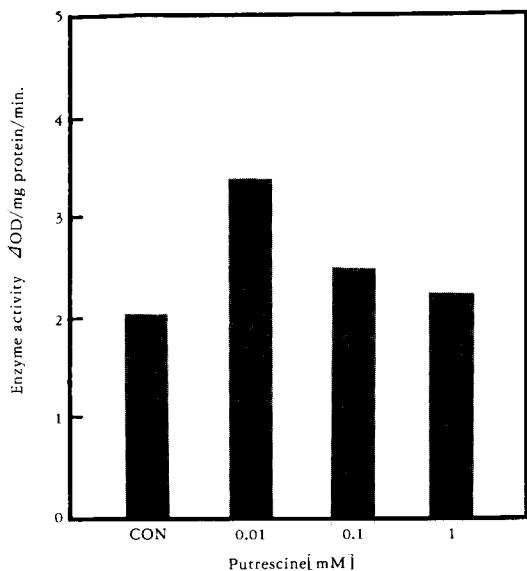


Fig. 1. Changes of chloroplast peroxidase activity in rice leaf segments. The rice was germinated for 10 days(16hrs, light:8hrs, dark) in hormone free MS medium treated with putrescine.

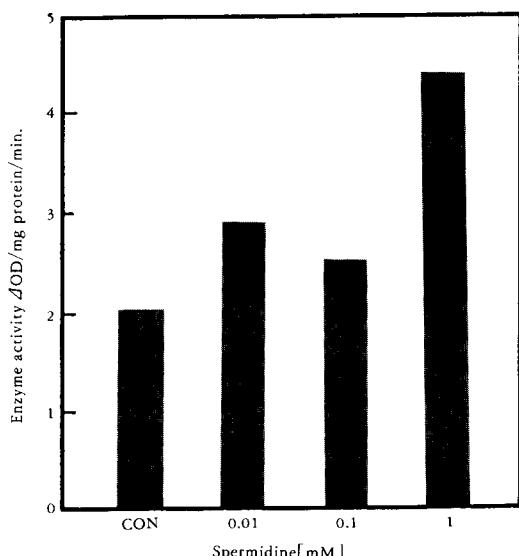


Fig. 2. Changes of chloroplast peroxidase activity in rice leaf segments. The rice was germinated for 10 days(16hrs, light:8hrs, dark) in hormone free MS medium treated with spermidine.

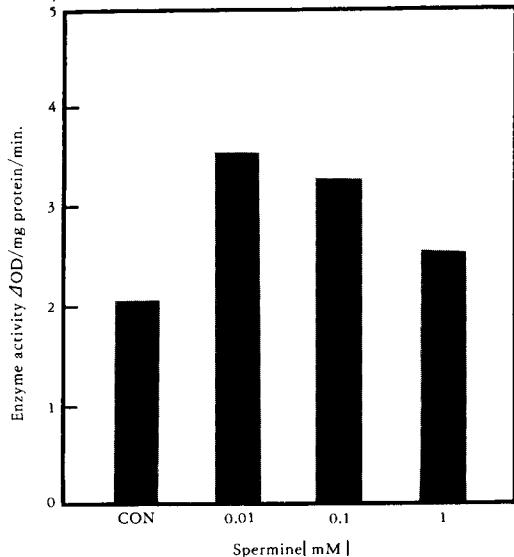


Fig. 3. Changes of chloroplast peroxidase activity in rice leaf segments. The rice was germinated for 10 days(16hrs, light:8hrs, dark) in hormone free MS medium treated with spermine.

관계가 밀접함을 시사해 주고 있다. 이러한 결과는 사시나무의 기관분화, 담배 배양 세포의 shoot 형성과 같은 식물 발달과정에서 peroxidase 활성이 증가한다는 것(26)과 polyamine이 ATPase와 peroxidase와 같은 membrane-bound enzyme를 조절한다는 보고(27)와도 일치함을 보여 주고 있다.

Thylakoid membrane protein 조성의 변화

Fig. 4, 5, 6, 7은 벼잎에서 엽록소 함량을 가장 높게 증가시켰던 polyamine 농도(0.1mM)를 MS 배지에 처리하여 벼를 10일 동안 발아 생장시킨 후 thylakoid membrane의 단백질 조성의 변화를 본 것으로 polyamine 처리구와 대조구에서 모두 비슷한 양상의 56Kd와 25Kd의 major band를 얻었다. 그러나 각 polyamine 처리구와 대조구에서 band peak의 차이는 있었으며, 이 단백질 band들의 total area에 있어서 56Kd band의 경우 spermidine과 spermine이 약 20% 정도, 25Kd band의 경우 모든 polyamine이 10% 이내의 증가를 보였다(Table 2). 대부분의 엽록체 단백질은 세포질에서 합성되며, 합성된 단백질은 엽록체로 이동되어 각 부분으로 합류되며, 엽록소와 chlorophyll protein complex(CP)

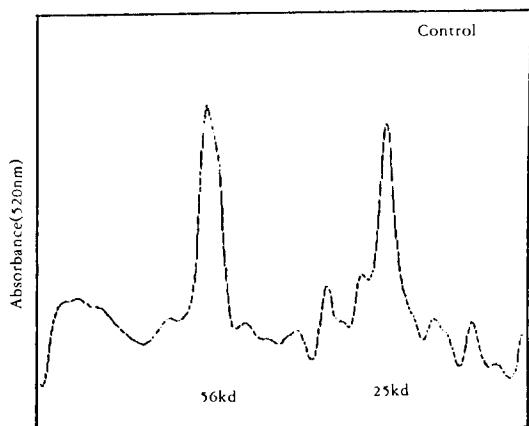


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scan of thylakoid membrane protein of rice leaf segments germinated for 10days in hormone free MS medium. Each gels were scanned at 520nm after coomassie Brilliant Blue R staining.

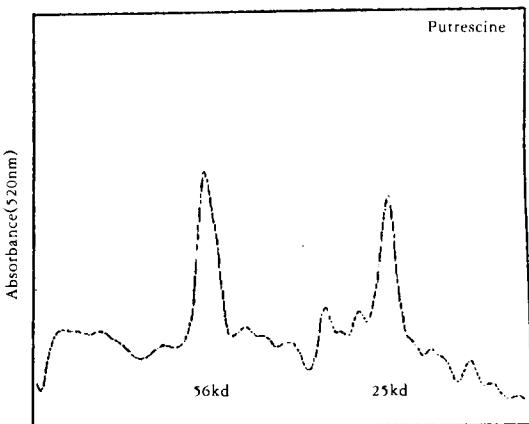


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scan of thylakoid membrane protein of rice leaf segments germinated for 10days in hormone free MS medium treated with 0.1mM putrescine. Each gels were scanned at 520nm after Coomassie Brilliant Blue R staining.

는 암상태에서는 존재하지 않고 빛이 조사되기 시작하면 생성되기 시작한다(28). 이렇게 해서 생성된 CP는 광합성 기구의 기능과 구조적 발달에 중요한 역할을 하게 된다(19). 이러한 특징을 지닌 thy-

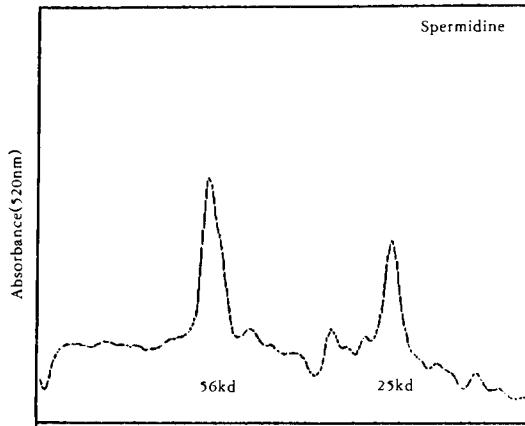


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scan of thylakoid membrane protein of rice leaf segments germinated for 10days in hormone free MS medium treated with 0.1mM spermidine. Each gels were scanned at 520nm after Coomassie Brilliant Blue R staining.

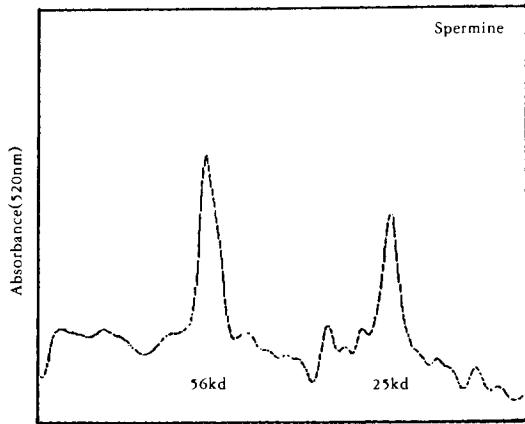


Fig. 7. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scan of thylakoid membrane protein of rice leaf segments germinated for 10days in hormone free MS medium treated with 0.1mM spermine. Each gels were scanned at 520nm after Coomassie Brilliant Blue R staining.

lakoid membrane 단백질은 본 실험결과에서 Nettleton 등(22)의 보고를 근거로 할 때 56Kd의 band는 CF(coupling factor, H⁺-ATPase), 25Kd의 band는 LHCP(light harvesting chlorophyll a/b

Table 2. Comparision of total area(%) of thylakoid membrane protein in rice leaf segments. The rice was germinated for 10 days (16hrs, light:8hrs, dark) in hormone free MS medium treated with polyamine. Each value was calculated at 520nm by densitometer.

Treatment	Total Area(%)	
	56Kd	25Kd
Control	31.36	30.29
Putrescine(0.1mM)	31.95	36.46
Spermidime(0.1mM)	51.46	34.34
Spermine(0.1mM)	45.68	35.22

protein complex)의 apoprotein으로 여겨지며 이 LHCP apoprotein은 thylakoid membrane의 안정을 위해서 chlorophyll a, b가 반드시 필요로 하는데 (19), 본 실험결과에서 polyamine에 의한 염록소 함량의 증가(Table 1)와 함께 thylakoid membrane protein의 major band들의 total area의 증가가 일어나 기존의 보고들과 같은 양상을 보여 주었다. 이는 잎의 노화를 억제시킬 때 LHCP apoprotein의 변화가 줄어드는 것(22)을 볼 때 thylakoid membrane의 안정이 잎의 발달에 중요한 요인으로 작용함을 알 수 있다. 따라서 polyamine 처리에 따른 처리구와 대조구를 비교해 보면 정성적으로는 큰 변화가 없었으나 정량적으로 CF(56Kd)와 LHCP(25Kd)가 증가한 것은, chlorophyll b의 증가가 LHCP의 증가와 함께 일어나며 CP의 형성은 chlorophyll a의 생성에 의해 조절된다는 사실(19)을 고려해 볼 때 polyamine이 염록소 함량을 증가시킨 결과(Table 1)와 일치하였다. 이는 polyamine이 thylakoid membrane의 안정화와 더불어 thylakoid membrane 단백질을 증진시킴으로써 잎 발달의 필수조건인 염록체 분화에 기여하는 것으로 사료된다.

요 약

호르몬이 결여되고 polyamine이 농도별로 처리된 MS배지에서 10일 동안 발아생장(light, 16hrs : dark, 8hrs) 시켜서 얻은 벼 잎 절편에서 염록소 함량은 polyamine 처리구가 대조구에 비해 높았으며, spermine(0.01mM, 0.1mM, 1mM)이 가장 효과적

이였다. 한편 chloroplast peroxidase의 활성을 polyamine 처리구가 대조구에 비해 전반적으로 높았으며, 특히 1mM spermidine 처리구는 약 100% 정도 활성을 증가시켰다. SDS-PAGE에 의해 chloroplast thylakoid membrane protein의 band를 조사한 결과 polyamine 처리구와 대조구에서 56, 25Kd의 major band를 얻었으며 이 band들의 total area는 polyamine 처리구가 대조구 보다 더 높았다. 이러한 결과들은 벼 유식물에서 염록체 발달에 polyamine이 중요한 인자로 작용한 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 세포분화 연구센터의 연구비 지원에 의해서 이루어졌다.

참 고 문 헌

1. A. Toninello, L. D. Via, D. Silipraanodi and K. D. Garlid(1992), *J. Biol. Chem.*, **267**(26), 18393.
2. C. W. Tabor and H. Tabor(1984), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 749.
3. H. Maki, S. Ando, H. Kodama and A. Komamine(1991), *Plant Physiol.*, **96**, 1008.
4. S. H. Cheng and C. H. Kao(1983), *Plant Cell Physiol.*, **24**, 1463.
5. B. I. Naik, and S. K. Srivastava(1978), *Phytochemistry*, **17**, 1885.
6. D. T. Hung, L. J. Marton, D. F. Deen and R. H. Shafer(1982), *Science*, **221**, 368.
7. H. S. Basu and L. J. Marton(1987), *Biochem. J.*, **224**, 243.
8. T. A. Smith(1985), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117.
9. A. W. Galston, A. Altman and T. Kaur-Sawney(1978), *Plant Sci. Lett.*, **11**, 69.
10. P. P. C. Lin, D. B. Egli, G. M. Li, and L. Meckel(1984), *Plant physiol.*, **76**, 366.
11. S. Valeria, P. Torrigiani and N. Bagni(1990), *Physiologia plantarum*, **80**, 515.
12. D. Burtin, J. M. Tanguy, M. Paynot, M. Caree and N. Rossin(1990), *Plant Physiol.*, **93**, 1398.
13. R. Rastogi and P. J. Davies(1991), *Plant*

- Physiol.*, **95**, 41.
- 14. A. Bassiri and P. S. Carlson(1978), *Crop. Sci.*, **18**, 955.
 - 15. M. Kuroda, T. Ozawa and H. Imagawa (1990), *Physiologia Plantarum.*, **80**, 55.
 - 16. P. S. Srivastava and A. Steinhauer(1981), *Zeitschrift fur Pflanzen Physiol.*, **130**(40), 341.
 - 17. L. E. Kay and D. V. Basile(1987), *Plant Physiol.*, **84**, 99.
 - 18. R. Grison and P. E. Pilet(1985), *J. Plant Physiol.*, **118**, 189.
 - 19. Y. Shimada, A. Tanaka, Y. Tanaka, T. Takabe and H. Tsuji(1990), *Plant Cell Physiol.*, **31**(5), 639.
 - 20. D. I. Arnon(1949), *Plant Physiol.*, **24**(1), 1.
 - 21. M. A. Schuler and R. E. Zielinski(1989), Methods in Plant Molecular Biology, Academic Press, San Diego, pp. 53-58.
 - 22. A. M. Nettleton, P. L. Bhalla and M. J. Dalling(1985), *J. Plant Physiol.*, **119**, 35.
 - 23. U. K. Laemmli(1970), *Nature*, **227**, 680.
 - 24. B. Veierskov and K. V. Thiman(1988), *Physiol. Plant*, **72**, 257.
 - 25. P. T. Evans and R. L. Malmberg(1989), *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **40**, 235.
 - 26. R. G. Berger, F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B. J. Radola(1985), *Plant Physiol.*, **77**, 211.
 - 27. S. K. Srivastava, M. S. Kansara and S. M. Mungre(1985), *Plant Growth Regulation.*, **3**, 339.
 - 28. H. M. Li, T. D. Sullivans and K. Keegstra (1992), *J. Biol. Chem.* **267**(26), 18999.