

녹두(*Vigna radiata*) 하배축에서 ACC의 에틸렌 전환에 미치는 Ca^{2+} 의 효과

徐孝源·吳承恩
(建國大學校 理科大學 生物學科)

Ca^{2+} Effect on the Conversion of ACC to Ethylene in Mungbean (*Vigna radiata*) Hypocotyls

Seo, Hyo Won and Seung-Eun Oh
(Department of Biology, Kon-Kuk University, Seoul)

ABSTRACT

Effect of Ca^{2+} on the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to ethylene was studied with 2.5 day-old mung bean hypocotyl segments. The conversion of ACC in these tissues was inhibited by plasmolysis and sulfosuccinimidyl (hydroxyphenyl) propionate (sulfo-SHPP). The ACC induced ethylene production in HC (high calcium)-tissue grown on the Ca^{2+} added medium was greater than that in N (normal)-tissue. HC-tissue had a lower inhibition rate of ACC conversion by EGTA and Ca^{2+} -channel blockers than N-tissue. The rates of the ACC conversion by both kinds of tissues were stimulated by the Ca^{2+} ionophore A23187. From these results, we suggest a mechanism for the stimulative effect of Ca^{2+} on the conversion of ACC to ethylene as follows; in some tissues where ACC conversion is linked with plasma membrane, Ca^{2+} may be transported from apoplast through Ca^{2+} -channel into the cytoplasm and stimulate ACC-oxidase activity.

서론

세포 형태와 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하는 Ca^{2+} 은 식물의 여러가지 성장과 발생과정들에 관여하는 에틸렌의 생합성 조절에도 관여한다. 특별히 Ca^{2+} 은 ACC에 의하여 유도되는 에틸렌 생합성을 촉진한다(Evensen, 1984). 이러한 Ca^{2+} 에 의한 ACC의 에틸렌으로의 전환 촉진은 Ca^{2+} 이 세포막을 안정화시킴으로써 해서 즉, Ca^{2+} 이 세포막 구조를 보존하고 막의 선택적 투과성을 유지시킴으로써 해서 막에 위치하고 있는 ACC-oxidase(일명 ethylene forming enzyme)에 의한 ACC의 에틸렌으로의 전환을 촉진하는 것으로 알려져 왔다. 하지만, ACC-oxidase가 부분적으로 정제되고, ACC-oxidase를 coding하고 있는 핵산의

염기서열이 밝혀짐에 따라(Dong *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992) ACC-oxidase가 이제까지의 추측과는 다르게 세포막에 위치하고 있지 않다는 것이 최근에 밝혀졌다. 그러므로 ACC-oxidase가 막에 위치하고 있다(Guy and Kende, 1984)는 사실을 전제로한 Ca^{2+} 에 의한 ACC의 에틸렌으로의 전환 촉진 기작은 재검토되어야 한다.

ACC의 에틸렌으로의 전환은 식물조직에 따라 서로 다른 장소에서 일어난다. Bouzayan 등(1990)은 높은 농도의 osmotica를 사용하여 원형질분리를 일으킨 후에 원형질분리에 의하여 ACC의 에틸렌으로의 전환이 억제되는지의 여부로 서로 다른 두 군데의 ACC의 전환 장소를 구분하였다. 그 중 하나는 원형질분리에 의하여 ACC의 전환이 억제되는 external site, 즉 원형질막이며 apoplast로부터 cytosol로 이동되는 ACC가 이곳에 쉽게 접근할 수 있다. 다른 전환 장소는 원형질분리에 의하여 ACC의 전환이 억제되지 않는 internal site, 즉 액포막이며 이 곳에서는 주로 cytosol에

본 연구는 1993년도 교육부 기초과학육성 연구비(BSRI-93-421) 지원으로 수행되었음.

있는 ACC가 전환되는 것으로 추측하였다. Bouzayen 등의 방법에 따르면 완두잎 조직은 internal site만을 갖고 있는데 반하여, 보리잎 조직은 두 전환 장소 모두를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다.

만약 조직 외부에 ACC를 첨가하면 ACC는 원형질막에 있는 ACC/H⁺-cotransport에 의하여 cytosol로 이동하고 (Bush and Langston-Unkefer, 1988), 원형질막의 membrane potential이 depolarization되면 원형질막에 위치한 Ca²⁺-channel이 열리게 된다(Starrach *et al.*, 1984)는 사실들로부터 다음과 같은 가능성을 생각할 수 있다.

ACC의 전환이 원형질막을 중심으로 해서 일어나는 조직의 경우 ACC를 첨가하면 ACC와 함께 cytosol로 H⁺이 이동하여 membrane potential이 depolarization되고, depolarization에 의하여 Ca²⁺-channel이 열리게 될 것이며, apoplast의 Ca²⁺의 이동으로 cytosol내의 Ca²⁺의 농도는 높아질 것이다. 만약 free한 ACC-oxidase가 cytosol에 위치한다면 Ca²⁺이 직접 ACC-oxidase 활성을 촉진하여 결국 Ca²⁺이 ACC의 전환을 촉진할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 ACC의 에틸렌으로 전환이 원형질막을 중심으로 일어나는 2.5일된 녹두 하배축 조직을 사용하여 위에서 언급한 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재 료. 녹두(*Vigna radiata* W.) 종자를 12시간 증류수에 침윤시킨 후, 10 mM CaCl₂를 첨가한 또는 첨가하지 않은 0.5%(w/v) 한천배지 위에서 2.5일간 발아시켰다. 성장 조건은 암상태, 온도 27±1°C, 습도를 90% 이상 유지하기 위하여 밀폐된 용기를 사용하였다. 용기내에 생장기간 중 발생하는 에틸렌의 축적을 막기 위하여 습도 유지를 위해 사용된 물에 4×10⁻⁵ M KMnO₄를 첨가해 주었다. 유식물의 정단골목부 바로 아래 부분, 즉 하배축 조직을 1 cm 절단기로 자른 후에 실험 재료로 사용하였다. Apoplast의 Ca²⁺ 농도가 서로 다른 조직은 문과 이(1989)의 방법을 변형하여 획득하였다.

녹두를 Ca²⁺이 첨가되지 않은 배지와 10 mM CaCl₂가 첨가된 한천배지 위에서 생장시킨 후에 실험재료로 사용하였고 이후의 실험과정에서는 더 이상 Ca²⁺을 첨가하지 않았다. CaCl₂를 첨가한 배지에서 생장시킨 재료를 HC (high calcium), CaCl₂를 첨가하지 않은 배지에서 자란 재료를 N(normal)으로 구분하였다.

ACC에 의한 에틸렌 생합성량 정량. 에틸렌 생합성량의 측정에는 dose response 실험 결과 K_m값으로 결정된 3×10⁻⁴ M의 ACC, 2%(w/v) Sucrose와 5×10⁻⁵ g/mL chloramphenicol이 첨가된 2 mL의 Mes-Tris(pH 7.2) 완충용액에 조직 절편 10개 또는 0.25 g 조직을 넣은 후에 암상태,

27±1°C에서 6시간 배양하였다.

에틸렌 생합성에 미치는 Ca²⁺-chelator, Ca²⁺-ionophore, Ca²⁺-channel blocker들의 효과는 실험 결과에서 언급한 농도를 완충용액에 첨가한 후 동일한 조건으로 배양하였다.

실리콘 마개로 막은 20 mL vial내에서 배양한 후 주사기로 기체 1 mL를 취한 후 active alumina(80/100 mesh)로 충전한 Gas Chromatograph(Shimazu GC-R1A, 3 m stainless column, Air; 0.4 kg/cm², Carrier(N₂); 50 mL/min, H₂; 0.6 kg/cm²)를 사용하여 정량하였다.

실험은 duplicate로 3~8회 실시하고 표준편차는 도표에 표시하였다.

조직내의 Ca²⁺ 농도 측정. Drøbak 등(1992)의 방법에 의하여 N-과 HC-조직내의 Ca²⁺ 농도를 측정하였다. 각 조직 1 g에 2 mL의 conc. HNO₃를 첨가하고 가열한 후에 다시 0.7 mL의 70%(v/v) HClO₄를 첨가하고 흰색 기체가 발생할 때까지 가열한 후에 AAS(atomic absorption spectrophotometer)(Perkin-Elmer 3100)를 사용하여 Ca²⁺ 농도를 측정하였다. 이때 실험 오차를 줄이기 위해 각 시료 용액에 2000 ppm LaCl₃를 첨가하였다.

ACC의 전환과정에 있어서 원형질막 관여 여부 판정. 실험에 사용된 녹두 하배축에서 ACC의 에틸렌으로의 전환이 원형질막을 중심으로 해서 일어나는지의 여부를 Bouzayen 등(1990)의 방법을 변형한 Ververdis와 John(1990)의 방법으로 판정하였다. 즉, 조직을 원형질분리 처리한 후에 Co²⁺ 처리에 의하여 ACC의 에틸렌으로의 전환이 더 이상 억제되는지의 여부로 결정하였다. 0.8 M mannitol을 사용하여 녹두 하배축 조직을 2시간 동안 원형질분리한 후에 10 mM Mes/Tris(pH 7.2) 완충용액으로 조직을 세척하고, ACC와 0~10⁻³ M CoCl₂이 첨가된 배지로 옮긴 후에 생성된 에틸렌량을 측정하고 비교하였다.

결 과

ACC의 전환과정에 있어서의 원형질막 관여 확인. 2.5일된 녹두 하배축에서 ACC의 에틸렌으로의 전환이 원형질막을 중심으로 해서 일어나는지의 여부를 확인하였다. 사용한 방법은 ACC-oxidase가 막에 결합되어 있다는 전제하에 ACC-oxidase가 위치하고 있는 막을 찾기 위해서 고안되었지만, ACC의 전환이 어느 막을 중심으로 일어나는가를 판정하는데 응용할 수 있다. Ververdis와 John (1990)에 의하면 조직을 높은 농도의 osmotica로 원형질분리한 후에 ACC의 전환이 Co²⁺에 의하여 더 이상 억제되지 않으면 원형질막을 중심으로 ACC의 전환이 일어나며, 반대로 원형질분리 후에 Co²⁺에 의하여 ACC의 전환이 억제되면 액포막을 중심으로 ACC의 전환이 일어난다는 것이다.

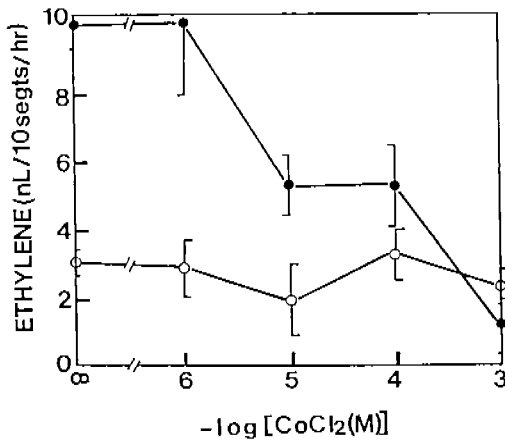


Fig. 1. Effect of CoCl₂ on the ACC-induced ethylene production from 2.5 day old hypocotyl segments treated with 0.8 M mannitol in Mes-Tris buffer for 2 h (empty circles) and Mes-Tris buffer (filled circles).

원형질분리를 시킨 녹두 하배측 조직의 경우 원형질분리를 시키지 않은 조직과 비교하여 에틸렌 생성이 70% 정도 억제되었다(Fig. 1). 반면에 원형질분리 처리되지 않은 조직은 10⁻⁴, 10⁻³ M CoCl₂에 의하여 에틸렌 생성이 각각 45%, 85% 억제되었으나, 원형질분리 처리된 조직의 경우 CoCl₂에 의하여 더 이상 억제되지 않았다.

2.5일된 녹두 하배측 조직에서 ACC의 전환이 원형질막을 중심으로 ACC/H⁺-symport와 Ca²⁺-channel의 관여하에 일어난다고 가정하면, 원형질막을 통과하지 못하면서 원형질막 표면에 있는 단백질들에 결합하고 변형시키는 sulfo-succinimidyl-(hydroxyphenyl)-propionate(sulfo-SHPP) (Thompson *et al.*, 1987)를 처리하면 ACC의 에틸렌으로의 전환이 억제될 것이다. 녹두 하배측 조직을 3×10⁻⁴ M sulfo-SHPP이 함유되어 있는 10 mM MES/Tris(pH 7.2) 완충용액에서 30, 60, 90분 전처리한 후에 조직을 MES/Tris 완충용액으로 세척하고 ACC를 첨가한 후에 생성된 에틸렌양을 측정하였다.

ACC의 전환과정에 원형질막과 액포막 모두가 관여하는 것으로 알려진 보리잎 조직의 경우에서는 3×10⁻⁴ M sulfo-SHPP 전처리에 의하여 ACC의 전환이 30% 정도 억제되었으나(Ververidis and John, 1990), 이와는 달리 2.5일된 녹두 하배측 조직의 경우 sulfo-SHPP 전처리를 30분 하면 에틸렌 생성이 30% 억제되며, 60분 이상 처리하면 55% 억제되었다(Fig. 2).

이상의 사실들로부터 실험에 사용된 2.5일된 녹두 하배측 조직에서는 ACC의 전환이 원형질막을 중심으로 일어남을 알 수 있다.

ACC의 에틸렌으로의 전환에 미치는 Ca²⁺의 영향.

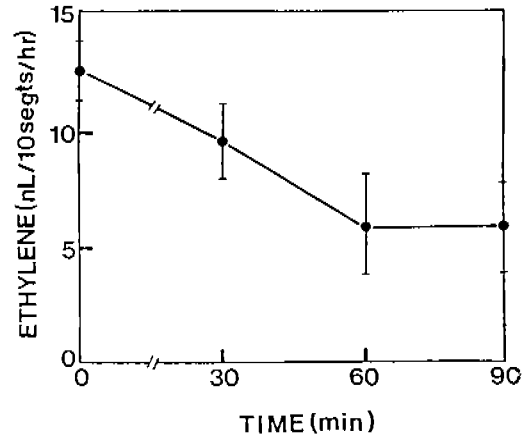


Fig. 2. Effect of sulfo-SHPP treatment on the ACC-induced ethylene production from 2.5 day old hypocotyl segments.

Apoplast의 ACC가 원형질막에 위치한 ACC/H⁺-symport를 통하여 cytosol로 이동할 때, apoplast의 Ca²⁺도 Ca²⁺-channel를 통하여 cytosol로 이동하여 ACC-oxidase의 활성을 촉진한다고 가정하면, apoplast내의 Ca²⁺ 농도 감소와 Ca²⁺-channel를 통한 Ca²⁺의 이동억제는 결국 ACC의 에틸렌으로의 전환을 억제할 것이다. 반면에 cytosol내의 Ca²⁺ 농도를 인위적으로 증가시키면 ACC의 전환이 촉진될 것이다. 더욱이 apoplast의 Ca²⁺ 농도가 높은 조직과 Ca²⁺ 농도가 낮은 두 종류의 조직을 사용하여 apoplast의 Ca²⁺ 이동 변화에 따른 두 조직간의 ACC의 전환율을 비교할 수 있다면, ACC의 에틸렌으로의 전환과정에 있어서의 Ca²⁺의 영향을 보다 명확히 밝힐 수 있을 것이다.

먼저 실험에 사용한 두 종류의 조직들 내의 Ca²⁺ 농도 차이를 비교하였다. 10 mM Ca²⁺이 함유된 배지에서 자란 HC-조직내의 Ca²⁺ 농도는 생중량 1g당 54.0±0.043 μg로 Ca²⁺이 함유되어 있지 않은 배지에서 자란 N-조직(11.7±0.041)에 비해 4.6배 더 많은 Ca²⁺이 축적되어 있었다.

Cytosol내의 Ca²⁺ 농도가 비교적 일정하게 유지된다는 (Gilroy *et al.*, 1989) 사실을 전제로 할 때 HC-조직의 apoplast에 N-조직보다 더 많은 Ca²⁺이 축적됨을 추측할 수 있다.

두 조직간에 ACC의 에틸렌 전환에 차이가 있는지를 time course로 실험한 결과 HC-조직이 4시간 이후부터 N-조직보다 더 많은 에틸렌을 합성하였다(Fig. 3). 10개의 조직 절편들에 의한 에틸렌 생성량을 측정한 결과 에틸렌 생성량의 표준편차 범위가 비교적 넓게 나타났으나, 매회의 실험에서 두 조직간의 에틸렌 생성량을 비교하면 일반적으로 4시간 배양 이후부터는 HC-조직이 N-조직보다 평균 에틸렌 생성량이 40~45% 높았다.

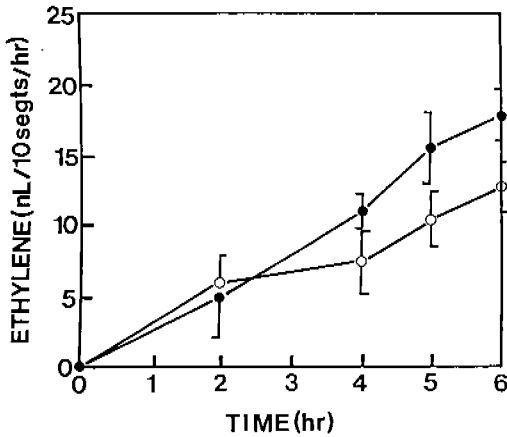


Fig. 3. Time course for ethylene production from N-tissue (empty circles) and HC-tissue (filled circles) in the presence of 3×10^{-4} M ACC.

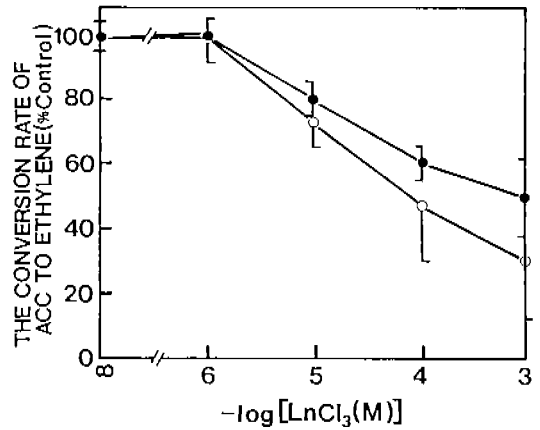


Fig. 5. Effect of $LaCl_3$ on the rate of ACC conversion in N-tissue (empty circles) and HC-tissue (filled circles) in the presence of 3×10^{-4} M ACC.

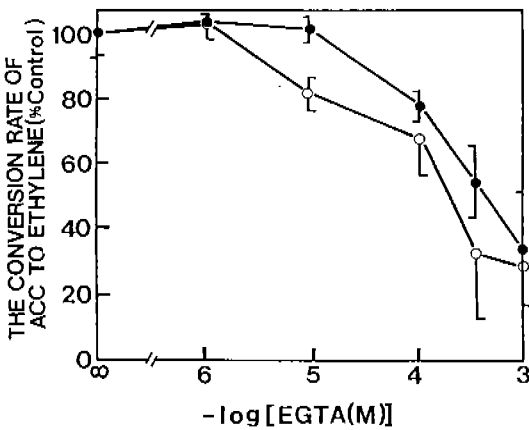


Fig. 4. Effect of EGTA on the rate of ACC conversion in N-tissue (empty circles) and HC-tissue (filled circles) in the presence of 3×10^{-4} M ACC.

ACC의 전환에 미치는 Ca^{2+} -chelator의 영향. Ca^{2+} -chelator인 EGTA를 조직에 처리하면 EGTA가 세포벽과 원형질막 표면에 결합되어 있는 Ca^{2+} 를 제거하여(Kauss, 1987) 이동될 수 있는 apoplast의 Ca^{2+} 농도를 감소시킬 것이다. Cytosol내의 Ca^{2+} 농도 증가의 억제는 결국 ACC의 에틸렌으로의 전환율을 감소시킬 것이다.

이 때에 각 조직에서 얻은 10개의 조직 절편 대신에 조직 절편 0.25 g을 사용하여 EGTA에 의한 두 조직간의 ACC 전환의 억제율을 비교하였다(Fig. 4).

조직들 간의 EGTA에 의한 ACC 전환 억제를 비교하기 위하여 각 조직에 EGTA를 처리하지 않았을 때를 기준으로 하여 100%로 하고 EGTA 처리에 의하여 감소된 에틸렌

생성량을 %로 환산해서 비교하였다. N-조직, HC-조직 모두 10^{-6} M EGTA에 의하여 ACC의 에틸렌으로의 전환이 약간 촉진되었으나, N-조직은 10^{-5} M부터, HC-조직은 10^{-4} M부터 억제 효과가 나타났다. $10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4}$ M 범위에서는 HC-조직의 평균 전환율이 N-조직의 평균 전환율보다 20% 정도 높았고, 10^{-3} M EGTA에 의하여 N-, HC-조직 모두 ACC의 전환이 평균 70% 정도 억제되었다.

ACC의 전환에 미치는 Ca^{2+} -channel blocker들의 영향. Apoplast의 Ca^{2+} 이 Ca^{2+} -channel을 통해서 이동한다면 Ca^{2+} -channel blocker들에 의하여 ACC의 에틸렌으로의 전환이 억제될 것이다.

Ca^{2+} 결합 부위에 Ca^{2+} 과 경쟁적으로 결합하는 'super-calcium'인 La^{3+} 을 사용하여 Ca^{2+} -channel를 통한 Ca^{2+} 이동을 억제한 후에 각 조직에서의 ACC의 전환율을 비교하였다(Fig. 5). $10^{-5} \sim 10^{-3}$ M $LaCl_3$ 에 의하여 ACC의 에틸렌으로의 전환이 N-조직과 HC-조직 모두에서 억제되었다. 이때 각각의 $LaCl_3$ 농도에 따른 HC-조직의 ACC 평균 전환율이 N-조직의 평균 전환율 보다는 일반적으로 높은 경향을 나타내었다.

Ca^{2+} -channel에 결합함으로써 Ca^{2+} 의 이동을 억제하는 verapamil(Anfrejaukas *et al.*, 1985)을 사용하면 La^{3+} 에 의한 ACC의 전환 억제 양상과는 다른 억제 양상을 나타낼 것이다. 만약 높은 농도의 verapamil을 사용하면 N-, HC-조직에서의 전환 억제 정도가 거의 비슷할 것이다.

$10^{-6} \sim 10^{-5}$ M verapamil에 의하여 N-조직의 평균 전환율이 HC-조직과 비교해서 20~25% 정도 낮았으나, 10^{-4} M verapamil에 의해서는 두 조직간의 평균 전환율 차이가 좁혀졌다(Fig. 6).

이상의 사실들로 Ca^{2+} -channel을 통하여 cytosol로 이동

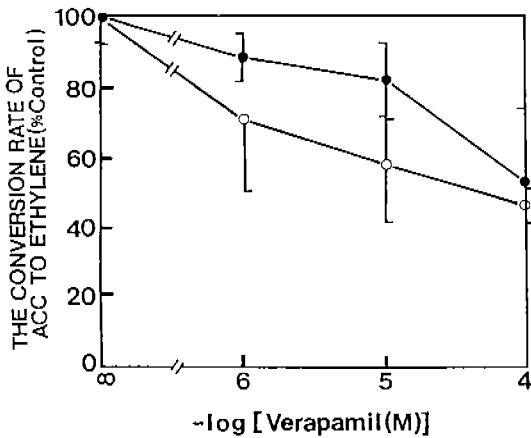


Fig. 6. Effect of verapamil on the rate of ACC conversion in N-tissue (empty circles) and HC-tissue (filled circles) in the presence of 3×10⁻⁴ M ACC.

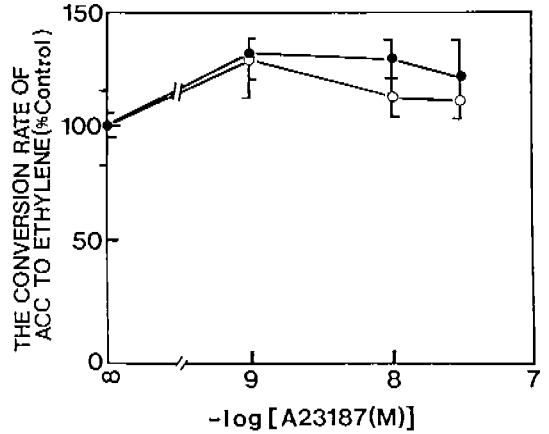


Fig. 7. Effect of A23187 on the rate of ACC conversion in N-tissue (empty circles) and HC-tissue (filled circles) in the presence of 3×10⁻⁴ M ACC.

한 Ca²⁺이 ACC의 에틸렌으로의 전환에 관여하는 ACC-oxidase의 활성을 조절할 가능성이 있다.

ACC의 전환에 미치는 Ca²⁺-ionophore의 영향. 만약 Ca²⁺-channel를 통한 cytosol내의 Ca²⁺ 농도 증가로 ACC-oxidase의 활성이 촉진된다면, Ca²⁺-ionophore의 처리만으로도 에틸렌 생합성량을 증가시킬 수 있을 것이다.

저농도의 A23187를 처리함으로써 cytosol의 Ca²⁺ 농도를 높인 후에 두 조직에서의 ACC 전환율을 비교하였다. 10⁻⁹ M A23187에 의하여 N-, HC-조직 모두 ACC의 평균 전환율이 25% 증가하였다(Fig. 7). 일반적으로 HC-조직의 ACC 평균 전환율이 N-조직보다는 조금 높았다.

고 찰

ACC의 에틸렌으로 전환이 원형질막을 중심으로 일어나는 2.5일된 녹두 하배축 조직을 사용해서 외부에서 첨가된 ACC가 cytosol로 이동할 때 동시에 apoplast로부터 cytosol로 이동한 Ca²⁺에 의해서 ACC-oxidase의 활성이 촉진될 수 있다는 가능성을 제시하였다.

보리잎 조직의 경우 ACC의 에틸렌으로의 전환이 원형질막과 액포막을 중심으로 해서 일어나지만(Ververidis and John, 1990), 어떤 식물에서는 액포막을 중심으로 일어난다. *Petunia* 잎 조직에서는 중심 액포의 형성 정도와 ACC의 에틸렌으로의 전환과 밀접하게 연관되어 있으며(Erdmann et al., 1989), 감두와 완두잎 조직의 경우 분리된 액포만으로도 ACC를 에틸렌으로 전환할 수 있다(Guy and Kennde, 1984).

이러한 식물들의 ACC 전환은 심한 원형질분리 처리에 의하여 거의 영향을 받지 않으며(Bouzaïen et al., 1990),

원형질분리 후 Co²⁺에 의하여 다시 억제되는 특성을 갖고 있다(Ververidis and John, 1990).

본 실험은 원형질막을 중심으로한 ACC의 에틸렌으로의 전환과정에 있어서 원형질막에 위치한 ACC/H⁺-symport와 Ca²⁺-channel이 중요한 역할을 한다는 가정하에 수행하였기 때문에 대부분 중심액포가 형성되어 있지 않은 어린 세포들로 구성되어 있는(결과제시 없음) 2.5일된 녹두 하배축 조직을 사용하였다. 사용한 조직에서 ACC의 전환이 높은 농도의 osmotica(0.8 M mannitol)에 의하여 억제되었고, 원형질분리 후 Co²⁺-ion에 의하여 ACC의 전환이 억제되지 않는 사실로(Fig. 1) 미루어, 조직을 형성하고 있는 대부분의 세포들에서는 원형질막을 중심으로 ACC의 전환이 일어남을 알 수 있다.

Apoplast의 Ca²⁺ 농도를 증가시키는 방법으로 녹두 종자를 10 mM CaCl₂가 첨가된 배지위에서 발아 성장시키는 방법을 사용하였다.

Apoplast내의 Ca²⁺ 농도를 결정하는 방법으로 right-side out 상태의 원형질막 vesicle 표면에 결합되어 있는 Ca²⁺ 농도 측정법들이 일반적으로 사용되지만(Cramer et al., 1985), cytosol내의 Ca²⁺ 농도가 일정하게 유지된다(Gilroy et al., 1989)는 사실을 전제로, 두 조직내의 Ca²⁺ 농도를 비교함으로써 HC-조직의 apoplast에 더 많은 Ca²⁺이 존재함을 추측할 수 있었다. 비록 cytosol의 Ca²⁺ 농도가 일정하게 유지되고 apoplast와 세포소기관에 많은 양의 Ca²⁺이 축적된다 하더라도 Ca²⁺-ion 농도 차이에 의한 두 유식물간의 형태학적인, 생리학적인 차이를 예측할 수 있다. 실제로 HC-조직이 N-조직에 비하여 단단하며, N-조직에서 관찰되는 cotyledon의 pigment가 HC-조직에서는 나타나지 않았다.

In vivo 상태에서의 ACC-oxidase의 활성은 조직 외부에서 ACC를 첨가한 후 ACC에 의한 에틸렌 생성량으로 측정하는데(Hoffman and Yang, 1982), ACC를 처리하지 않거나 또는 실험에 사용한 ACC 농도보다 낮은 농도의 ACC(10^{-6} ~ 10^{-5} M)를 처리할 경우에는 N-, HC-조직간에 ACC에 의한 에틸렌 생성량에는 차이가 없었다(결과제시 않음). 이러한 사실로 미루어 생장기간 동안 HC-조직에 비록 더 많은 Ca^{2+} 이 축적되더라도 3×10^{-4} M ACC가 처리되기 전의 ACC-oxidase 활성에 Ca^{2+} 이 영향을 주는 것 같지는 않다.

각 조직의 절편 10개(0.23~0.28 g)를 사용하여 각각의 배양시간에 따른 에틸렌 생성량을 비교할 경우(Fig. 3), 생성량의 표준편차의 범위가 넓었다. 이 경우 6시간 배양 후 N-조직의 에틸렌 생성량의 표준편차의 범위가 $\pm 20\%$ 이었지만 9~11개의 다양한 두께의 조직 절편들로 총 절편의 무게를 0.25 g되게 한 후 실험할 경우 N-조직 대조구의 에틸렌 생성량의 편차를 $\pm 7\%$ (Figs. 4~7)로 에틸렌 생성량의 변동을 최소화할 수 있었다. 후자의 방법으로 cytosol의 Ca^{2+} 농도 변화에 따른 N-, HC-조직간의 ACC 전환률 비교 실험들을 수행하였으나, HC-조직 대조구의 경우 에틸렌 생성량의 편차가 $\pm 17\%$ 로(Fig. 7) N-조직 대조구에 비하여 생성량의 변동이 심하였다. N-조직과 HC-조직 모두 Ca^{2+} -chelator, -channel blocker와 -ionophore 등을 첨가할 경우 에틸렌 생성량의 편차가 최고 $\pm 23\%$ (Figs. 4~7)로 에틸렌 생성량에 변동이 있었다.

EGTA와 A23187를 사용하여 두 조직의 ACC의 에틸렌 전환율을 비교할 경우(Figs. 4 and 7) cytosol내의 Ca^{2+} 농도 증가와 일치한다는 사실을 알 수 있다. 또한 apoplast Ca^{2+} 의 이동 통로인 Ca^{2+} -channel을 다른 작용 기작을 갖고 있는 blocker들을 사용하여 억제하였을 때 ACC의 에틸렌으로의 전환 억제 현상이 blocker들의 작용 기작과 동일하게 나타난다는 사실로(Figs. 5 and 6) 미루어 apoplast에서 유래된 Ca^{2+} 이 ACC-oxidase의 활성을 직접 조절할 가능성을 생각할 수 있다.

ACC의 에틸렌으로의 전환과정에서 원형질막에 있는 ACC/ H^+ -symport와 Ca^{2+} -channel이 중요한 역할을 한다고 가정하면, 이러한 막 단백질들이 작용하기 위해서는 먼저 막의 투과성이 보존되어야 한다. 이런 점에서 Ca^{2+} 이 세포막을 안정화시킴으로써 해서 ACC의 에틸렌 전환을 촉진한다(Cheverry *et al.*, 1988; Evensen, 1984)는 사실을 재해석할 수 있을 것이다.

적 요

ACC의 에틸렌으로의 전환이 원형질분리와 sulfosuccinimide(hydroxy-phenyl) propionate(sulfo-SHPP)에 의하여

억제되는 2.5일된 녹두 하배축 조직을 사용하여 ACC의 에틸렌으로의 전환에 미치는 Ca^{2+} 영향을 연구하였다. Ca^{2+} 이 함유된 배지에서 생장한 HC(high calcium)-조직이 N(normal)-조직보다 ACC를 에틸렌으로 보다 많이 전환하였고, EGTA와 Ca^{2+} -channel blocker들에 의한 ACC 전환 억제률도 낮았다. 반면에 두 조직 모두 Ca^{2+} -ionophore인 A23187에 의하여 ACC의 에틸렌 전환율이 증가하였다. 이상의 사실들로부터 ACC의 전환과정에 원형질막이 관여하는 조직의 경우 apoplast로부터 Ca^{2+} -channel를 통하여 cytosol로 이동한 Ca^{2+} 이 직접 ACC-oxidase의 활성을 촉진하여 ACC의 에틸렌으로의 전환을 촉진할 가능성을 생각할 수 있다.

참 고 문 헌

- Andrejauskas, E., R. Hertel, and D. Marme. 1985. Specific binding of the calcium antagonist [3H] Verapamil to membrane fractions from plants. *J. Biol. Chem.* **260**: 5411-5414.
- Bouzayen, M., A. Latche and J.C. Pech. 1990. Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta* **180**: 175-180.
- Bush, D.R. and Langston-Unkefer. 1988. Amino acid transport into membrane vesicles isolated from zucchini: evidence of a proton-amino acid symport in the plasmalemma. *Plant Physiol.* **88**: 487-490.
- Cheverry, J.L., J. Pouliquen, H. Le Guyader and P. Marcellin. 1988. Calcium regulation of exogenous and endogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid bioconversion to ethylene. *Physiol. Plant.* **74**: 53-57.
- Cramer, G.R., A. Lauchli and V.S. Polito. 1985. Displacement of Ca^{2+} by Na^{2+} from the plasmalemma of root cell. *Plant Physiol.* **79**: 207-211.
- Dong, J.G., J.C. Fernández-Maculet, and S.F. Yang. 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 9789-9793.
- Drobak, B., D. Bush, R.L. Jones, A.P. Dawson and I.B. Ferguson. 1992. Analysis of calcium involvement in host-pathogen interactions. In, *Molecular Plant Pathology*, S.J. Gurr, M.J. McPherson and D.J. Bowles (eds.). IRL, Oxford. pp. 159-194.
- Evenson, K.B. 1984. Calcium effects of ethylene and ethane production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in potato discs. *Physiol. Plant.* **69**: 125-128.
- Gilroy, S., W.A. Hughes and A.J. Trewaves. 1989. A Comparison between Quin-2 and aquorin as indicators of cytoplasmic calcium levels in higher plant cell protoplasts. *Plant Physiol.* **90**: 482-491.

- Guy, M. and H. Kende. 1984a. Ethylene formation in *Pisum sativum* and *Vicia faba* protoplasts. *Planta* **160**: 276-280.
- Guy, M. and H. Kende. 1984b. Conversion of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* **160**: 281-287.
- Hoffman, N.E. and S.F. Yang. 1982. Enhancement of wound-induced ethylene synthesis in preclimacteric cantaloupe. *Plant Physiol.* **69**: 317-322.
- Kauss, H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 47-72.
- Moon, H.J. and J.S. Lee. 1989. Role of calcium on auxin-induced ethylene production in etiolated mungbean (*Vigna radita* W.) hypocotyls. *Korean J. Bot.* **32**: 265-274.
- Smith, J.J., P. Ververidis and P. John. 1992. Characterization of the ethylene- Forming enzyme partially purified from melon. *Phytochemistry.* **31**: 1485-1494.
- Starrach, N., C. Freudling, W.E. Mayer and D. Gradmann. 1984. Aged preparations are electrophysiologically more representative of intact tissue than freshly excised preparations. *Planta* **160**: 88-90.
- Thompson, J.A., A.L. Lau and D.D. Cunningham. 1987. Selective radiolabelling of cell surface proteins to a high specific activity. *Biochemistry* **26**: 743-750.
- Ververidis, P. and P. John. 1990. Differentiation between two subcellular site of ACC-dependent ethylene formation in plant cells. *In*, Polyamine and Ethylene, H.E. Flores, R.N. Arteca and J.C. Shannon (eds.). ASPP. pp. 316-318.

(1993. 5. 19 接受)