

당근 배양세포에서 RGD Peptide가 에틸렌 생성에 미치는 영향

李 竣 承 · 朴 貞 美

(이화여자대학교 자연과학대학 생물학과)

Effect of RGD Peptide on Ethylene Production from Cultured Carrot Cells

LEE, June Seung and Jung Mi Park

(Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul)

ABSTRACT

It has been inferred that membrane-ECM (extracellular matrix) interaction in plants may be also mediated by an RGD-dependent recognition system as in animal cells. Effects of RGD peptide on ethylene production was examined in suspension cultured carrot cells. Treatment of the cells with RGD peptide containing RGD (Arg-Gly-Asp) sequence stimulated ethylene production. When RGD peptide was applied to carrot cells treated with IAA, the effect of RGD peptide appeared to be additive. ACC synthase activity in cells pretreated with RGD peptide likewise increased over the control. In an effort to check the sequence specificity of the RGD peptide, cells were treated with substituted RGD peptide, i.e. RGK (Arg-Gly-Lys) and RGE (Arg-Gly-Glu) peptide, respectively. RGK peptide did not stimulate ethylene production but RGE peptide did. The results strongly suggest that the stimulatory effect of RGD peptides on ethylene production may be associated with a physiological phenomenon through a specific recognition between RGD peptide including RGD sequence and their putative plasma membrane receptors.

서 론

식물세포의 extracellular matrix(ECM)는 다당류가 공유 결합에 의해 연결된 matrix를 이루는 물질과 몇 가지 단백질로 구성되어 있으며, 형태분화로부터 병원체에 대한 저항성에 이르기까지 다양한 기능을 수행하고 있다.

동물세포의 ECM은 laminin, fibronectin, collagen, vitronectin과 같은 단백질과 여러 가지 당단백질로 구성된 복잡한 구조를 이루고 있으며, 이들은 integrin이라고 불리는 막에 있는 수용체를 통하여 microfilament에 연결되어 질서 정연한 배열을 보이고 있다(Hynes, 1987; Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). ECM 구성 단백질들은 하나 이상의

Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열을 가지고 있으며, 이들이 원형질막의 수용체와 결합할 때에는 특이성을 가진다(Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). 이러한 ECM과 세포막 수용체간의 결합은 세포의 이동(Armant *et al.*, 1986), 분화(Leptin *et al.*, 1987), 세포막을 통한 정보 전달(Ruoslahti and Pierschbacher, 1987), 호르몬과 성장 요소에 대한 반응(Ignatz and Aebersold, 1987) 등에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

식물세포의 ECM도 동물세포의 ECM처럼 세포의 모양 유지, 발생, 자극에 대한 반응의 다양한 기능을 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. 식물세포의 형태는 탄성이 강한 cellulose로 구성된 microfibril이 세포 주위에 어떻게 배열되느냐에 따라서 달라지는데, 세포벽의 cellulose-microfibril의 배열은 cytoskeleton에 의해 조절되며, 또한 cytoskeleton의 배열은 에틸렌의 영향을 받는다. 최근에는 ECM의

본 연구는 '92~'93 과학재단 핵심전문연구과제(921-0400-039-2) 연구비 지원으로 수행되었음.

역할이 세포의 모양유지 뿐 아니라 발생과정, 성장조절에 중요한 역할을 한다는 사실이 입증되고 있다(Fry, 1989). 또한 식물에서도 세포벽과 원형질막의 결합이 세포분열과 증식에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다(Meyer and Abel, 1975). Schindler(1989) 등의 식물세포를 이용한 연구결과에서는 식물세포도 동물세포와 같이 ECM과 세포막의 결합이 Arg-Gly-Asp (RGD) 이미노산 서열에 의해 일어날 가능성이 있으며, RGD sequence를 가진 peptide가 세포벽의 형성과 배열에 관여한다고 보고하였다.

식물 호르몬인 에틸렌도 microtubule의 배열에 영향을 주어 세포의 형태형성에 관여하는데(Robert *et al.*, 1989; Eisinger and Burg, 1972), 에틸렌이 식물세포의 microtubule 배열에 영향을 주는 것은 auxin에 의한 신장촉진 효과에 에틸렌이 길항적으로 작용하여 세포의 형태분화를 조절하는 예이다(Chadwick and Burg, 1970). 그리고 에틸렌은 식물체의 방어기작에도 관여하고 있는데, 상처나 병원체의 감염으로 분해된 세포벽의 분획인 oligosaccharides는 에틸렌 생성을 촉진하며, 이 에틸렌은 phytoalexin의 합성에 관여하는 phenylalanine ammonia lyase(PAL), chitinase, β -1,3-glucanase 등의 효소의 생성을 촉진시킨다(Legrand *et al.*, 1987; Ecker and Davis, 1987; Felix and Meins, 1987; Chalutz, 1973). 이 과정에서 에틸렌은 가스 상태로서 외부 자극에 대한 일종의 신호 전달자 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

동물세포에서도 RGD sequence를 가지고 있는 ECM 단백질에 의해서 microfilament를 매개로 하는 세포 형태의 변화가 잘 알려져 있으나 어떻게 세포밖의 신호가 RGD 수용체를 통하여 세포내로 전달되어 microfilament의 배열을 바꾸게 되는지에 대한 기작의 설명은 보고되지 않았다. 더구나 식물세포에서도 RGD sequence가 어떻게 세포벽의 배열에 관여하는지는 전혀 연구된 바 없으며, RGD receptor 조차도 보고된 것이 없다. 본 연구는 앞에 Schindler(1989) 등의 보고와 같이 만약 RGD sequence가 식물세포의 형태형성에 관여한다면 이것이 혹 에틸렌을 매개로 할 가능성이 있는가를 조사한 것이다.

재료 및 방법

Peptide의 합성. 합성 peptides(GRGDSPE, GRGESPE, GRGKSPE)는 기초과학연구지원센터(서울시 강남구 대치동 966-5)에 의뢰하여 합성하였으며, Indole-3-acetic acid(IAA), α -Naphthaleneacetic acid(α -NAA), Kinetin, 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) 등은 Sigma에서 구입하였다.

캘러스 유도 및 배양. 깨끗이 씻은 당근을 적당한 크기로 잘라 70% ethanol에 30초, 1% sodium hypochlo-

rite에 20분간 담구어 두면서 소독한 후, 무균수에 5분, 10분, 15분간 차례로 담구어 소독액을 씻었다. 그런 후 당근의 관다발 부름켜(vascular cambium) 부분을 $1 \times 1 \times 0.5 \text{ cm}^3$ 의 크기로 잘라 'Murashige and Skoog Medium' [MS 배지; 3%(w/v) sucrose, 0.8%(w/v) agar, 2.0 mg/L α -NAA, 0.5 mg/L kinetin, pH 5.6]에 옮겨 27 \pm 1°C가 유지되는 항온기에서 캘러스를 유도하였다.

현탁배양. 세포의 현탁배양은 Fujimura 등(1980b)의 방법을 변형하였다. 유도된 캘러스는 다시 MS 액체배지 [3%(w/v) sucrose, 2.0 mg/L α -NAA, 0.5 mg/L kinetin, pH 5.6]에서 80~100 rpm으로 흔들어 주면서, 27 \pm 1°C 암소에서 배양하였다. 이와 같이 3회 연속 현탁 계대배양한 뒤 4회째 배양하는 동안 5~6일째 되는 생장이 활발한 세포를 사용하였다. 5~6일 후 현탁배양된 세포를 구멍의 크기가 61 μm 인 채로 걸러서 세포의 생체 무게(Fresh weight)가 약 500 mg이 되도록 저울로 재어서 각각의 vial에 넣는다.

에틸렌 생성량 측정. 17 mL vial에 500 mg의 현탁배양 세포와 2 mL의 Tris-Mes 완충용액(5 mM, pH 6.8)을 넣고 각각의 필요한 peptide를 농도별로 처리한 후 실리콘 마개로 밀봉한다. 준비된 vial은 27 \pm 2°C의 암소에서 약 20 시간 진탕(80~100 rpm)하면서 incubation시킨 후 vial로부터 1 mL의 가스를 채취하여 Gas chromatography(Simazu GC-9A, Flame Ionization Detector, Porapark Q column 100~200 mesh 90°C, Air: 0.5 kg/cm³, Hydrogen: 0.6 kg/cm², Carrier: 60 mL/min)로 측정하였다. 에틸렌 생성을 측정할 후 vial에 있던 세포는 다시 같은 크기(61 μm)의 채로 걸러서 증류수에 3회 세척한 후 여과지(Wattman filter paper No. 2)로 물기를 제거하여 이를 5회 반복하여 여분의 물기를 제거한 후 유지에 옮겨서 생체 중량을 재고, 에틸렌의 양은 생체 그램(g)당의 생성량으로 환산하였다.

ACC synthase의 활성 측정. ACC synthase 활성은 Boller 등(1979)의 방법을 변형하여 측정하였다. 당근 배양세포를 호르몬이 제외된 배지로 씻은 후, 호르몬이 제외된 MS 배지와 1.0 mg/mL RGD peptide가 첨가된 배지에서 22시간 동안 80~100 rpm으로 흔들어 주면서 배양시켰다. 배양 후 세포 3 g을 각각 수거하여 완충용액으로 잘 씻은 후 4 mM DTT, 0.5 μM pyridoxal phosphate(PLP), 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 2 M NaCl이 포함된 pH 8.5의 100 mM HEPES buffer 6 mL를 넣어 막자사발로 같은 뒤에 나일론천으로 걸러낸 후 25,000 g에서 15분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 각 상등액 6 mL를 취하여 0.5 mM DTT, 0.5 μM PLP, 1 mM EDTA를 포함한 pH 8.5의 2 mM HEPES buffer로 평형시킨 Sephadex G-25 column(2.2 \times 11 cm, bed volume, 30 mL)에 통과시킨다. 2.0 mL씩 받은 각각의 분획을 280 nm에서 읽어 ACC synthase를 포함한 단백질이 많은 분획을 고른다. 그런 다음 0.4 mL씩 준비된

효소와 0.5 μM PLP를 포함한 pH 8.5의 50 mM HEPES buffer에 여러 농도의 SAM을 넣은 반응용액 0.2 mL를 15 mL vial에 넣고 실리콘 마개로 막아 30°C에서 20분간 효소와 기질을 반응시킨 후 0.1 mL의 10 mM HgCl_2 를 주사기로 주입하여 얼음에 15분간 채우고, 다시 0.1 mL의 NaOCl (5% NaOCl 와 포화상태의 NaOH , 2:1, v/v)을 주사기로 주입 후 10분간 얼음에 채워둔 후 기체 1 mL을 일회용 주사기로 취해서 에틸렌 생성량을 측정하여 효소활성을 비교하였다.

결 과

실험에 사용할 당근 배양세포 중 생장율이 일정한 선형기 (linear phase)에 있는 세포를 선택하기 위한 시기를 정하기 위하여 3회 연속 계대배양한 세포의 생장 kinetics를 관찰한 결과 Fig. 1에서와 같이 나타났다. 그림에서와 같이 당근 배양세포는 새로운 배지에 옮긴 후 4일이 지나면서 활발히 성장하기 시작하여 6일에서 10일 사이가 선형기 성장을 나타내는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 실험에서는 계대 배양을 시작한 후 5~6일이 된 세포를 사용하였다. Fig. 2에서는 이러한 현탁 배양세포에서도 옥신 유발 에틸렌 생성이 정상적으로 반응하는가를 확인하기 위해서 옥신 농도에 대한 에틸렌 생성을 조사한 것이다. 옥신 농도가 10^{-5} M일 때 에틸렌 생성은 최대로 나타났으며, 그 이상의 고농도에서는 오히려 억제하였다. 이 결과는 녹두 하배축이나 옥수수 자엽초에서 보다 10배 정도 민감하게 오른

쪽으로 이동하여 나타나긴 했으나 전형적인 옥신 반응을 보였으며 본 실험에서는 옥신을 10^{-6} M로 사용하였다.

RGD(Arg-Gly-Asp) peptide가 에틸렌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RGD peptide를 농도별로 처리하여 일정시간 동안 배양시켜 에틸렌 생성량을 측정하였다(Fig. 3). RGD peptide는 각각 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg

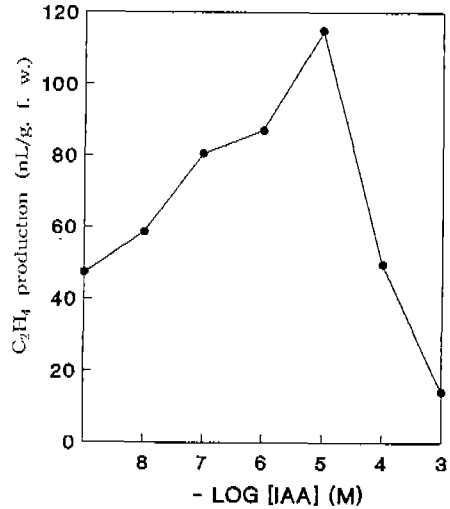


Fig. 2. IAA induced ethylene production in suspension-cultured carrot cells. Cells were incubated with various concentrations of IAA in MS medium. Ethylene production was measured at the end of a 24 h incubation period.

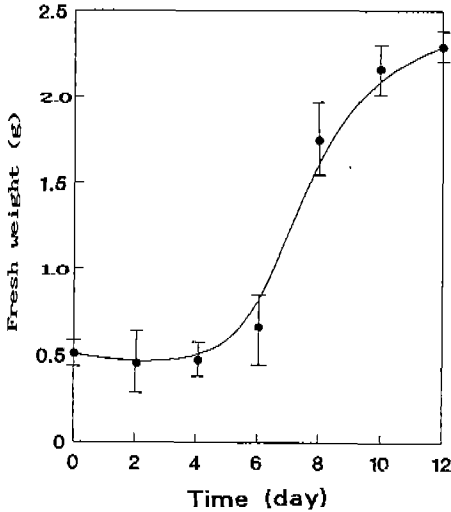


Fig. 1. Growth kinetics of suspension-cultured carrot cells grown in MS medium. Changes in fresh weight were monitored to measure growth. Each point represents the average of five experiments \pm SD.

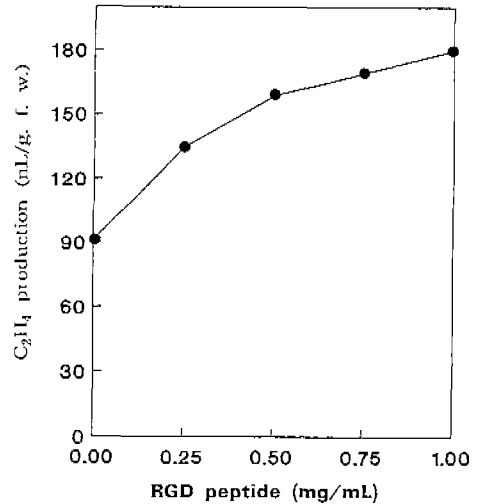


Fig. 3. Effects of various concentrations of RGD (GRGD-SPE) peptide on ethylene production in suspension-cultured carrot cells. Cells were incubated for 26 h in MS medium. Ethylene production was measured at the end of the incubation period.

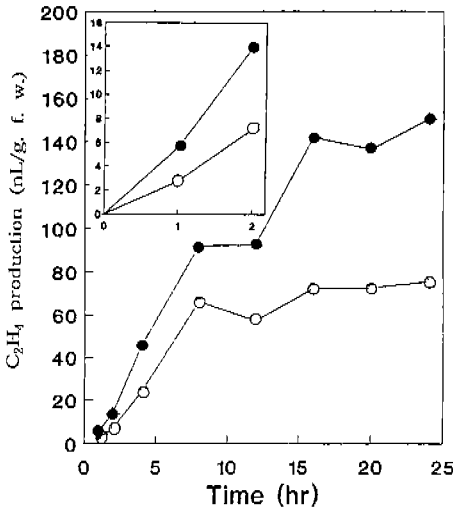


Fig. 4. Time course of ethylene production from suspension-cultured cells in the presence (●) or absence (○) of 0.5 mg/mL RGD peptide (GRGDSPE) in MS medium. Inset shows the time course of ethylene production during first 2 h on an expanded scale.

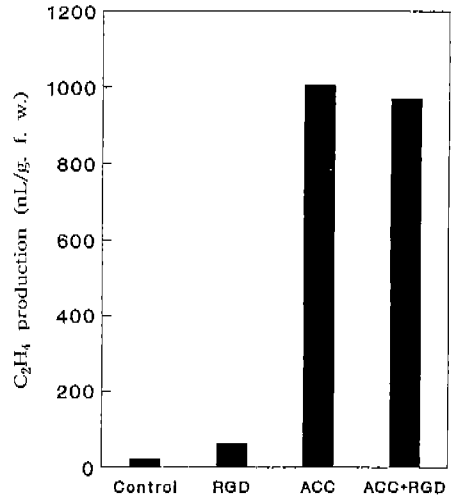


Fig. 6. Effects of RGD peptide (GRGDSPE) and ACC on ethylene production in carrot cells grown in MS medium. Ethylene production was measured at the end of a 24 h incubation period. RGD peptide: 0.5 mg/mL, ACC: 10^{-4} M.

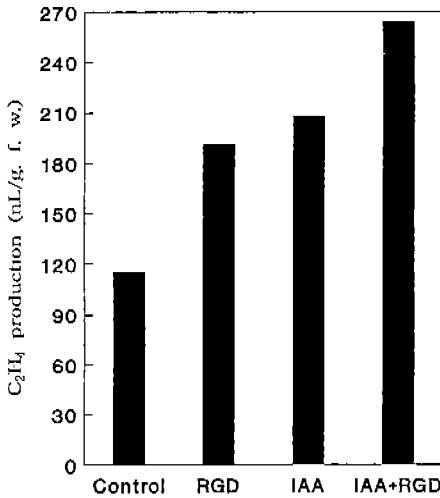


Fig. 5. Effects of RGD peptide (GRGDSPE) and IAA on ethylene production in suspension-cultured carrot cells. Cells were incubated for 29 h in MS medium. The concentration of RGD peptide was 0.5 mg/mL and that of IAA was 10^{-6} M.

/mL로 처리하였으며 농도가 증가함에 따라 비례하여 50~100%까지 에틸렌 생성이 증가하였다. 또한 RGD peptide의 에틸렌 생성에 대한 촉진효과가 시간에 따라서 어떤 변화를 나타내는지 알아보았다(Fig. 4). 0.5 mg/mL RGD peptide는 처리한지 1시간 이내에 에틸렌 생성을 대조구에 비해 70%

정도 촉진시키며 그 효과가 24시간까지 거의 같은 정도의 비율로 지속되었다. 에틸렌 생성이 1시간이라는 짧은 시간에 이미 70% 정도 촉진된다는 것은 이 peptide에 의한 생리적 효과가 대단히 빨리 나타난다는 것을 의미한다. 에틸렌의 생성은 여러가지 요인에 의해서 민감하게 변하기는 하지만 auxin을 제외한 다른 식물 성장 조절 물질, 예를 들어서 cytokinin, abscisic acid, Ca^{2+} 등은 에틸렌 생성에 영향을 주어도 그 효과가 적어도 3~6시간 이후에 나타난다. 이와 같은 RGD peptide에 의한 에틸렌 생성이 auxin과 연관되어진 생리적 현상인지를 조사하기 위하여 10^{-6} M IAA와 함께 처리하여 보았다. 10^{-6} M IAA를 처리했을 경우에는 대조구에 비해 약 80%의 증가를 보였으며, 0.5 mg/mL RGD peptide를 처리한 경우에는 약 67%의 증가를 보였다. 한편 10^{-6} M IAA와 0.5 mg/mL RGD peptide를 함께 처리하였을 때에는 대조구에 비해 130%나 많은 에틸렌이 생성되었다(Fig. 5). 이것은 IAA와 RGD peptide가 함께 있을 때에 에틸렌 생성이 더욱 촉진됨을 보여주는 것이며 또한 RGD peptide가 에틸렌 생성을 촉진시키는 경로는 오옥신 유발 에틸렌 생성경로와 어떤 관계가 있을 것이라는 가능성을 보여준다. RGD peptide가 에틸렌 생성경로 중의 한 물질인 ACC와는 어떤 관계가 있는지 알아보기 위해 10^{-4} M ACC를 처리해 보았다(Fig. 6). ACC를 처리하면 에틸렌 생성량이 대조구에 비해 470%나 증가되는데, RGD peptide와 ACC를 함께 처리해 주면 IAA와 RGD peptide를 함께 처리한 경우(Fig. 5)와는 달리

Table 1. Effect of RGD peptide on ACC synthase activity in suspension-cultured carrot cells. Cells were incubated with or without 1.0 mg/mL RGD peptide for 22 h. After the incubation, the ACC synthase activity was measured

SAM (μ M)	C_2H_4 production (nF/g.f.w.)	
	Control	RGD peptide (1.0 mg/mL)
3	0.47	1.49
10	1.64	3.36
20	1.89	3.23

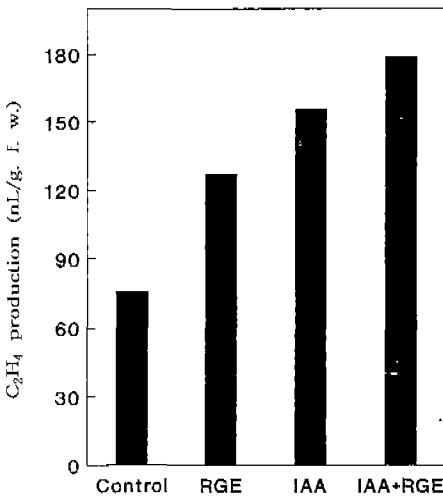


Fig. 7. Effects of RGE peptide (GRGESPE) and IAA on ethylene production in suspension-cultured carrot cells. Cells were incubated for 20 h in MS medium. RGE peptide: 0.5 mg/mL, IAA: 10^{-6} M.

더 이상의 에틸렌 생성의 증가가 없었다. 만약 RGD peptide가 아무런 생리적 의미없이 단순한 stress로 작용하여 에틸렌 생성을 촉진시켰다면 RGD peptide와 ACC를 함께 처리했을 때에도 에틸렌의 증가가 나타났어야 할 것인데 이때에는 더 이상의 증가가 없다는 것은 이 peptide가 단순한 stress가 아니며, 에틸렌 생성경로 중의 특정 단계에 영향을 끼쳐 에틸렌 생성을 촉진시켜서 어떤 생리적인 역할을 할 것이라는 가능성을 보여준다. 따라서 RGD peptide가 어떤 기작으로 에틸렌 생성을 촉진시키는가를 알아보기 위하여 우선 ACC synthase의 활성을 조사하였다 (Table 1). 1.0 mg/mL RGD peptide를 전처리한 배양세포에서 얻은 ACC synthase 경우에는 기질인 SAM과 반응시키면 기질의 양에 따라 ACC가 만들어진 후 생성되는 에틸렌양이 대조구에 비해 70~200%까지 증가되었다. 이

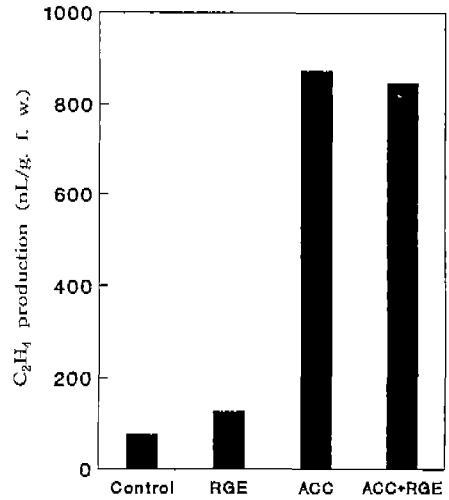


Fig. 8. Effects of RGE peptide (GRGESPE) and ACC on ethylene production in carrot cells grown in MS medium. Ethylene production was measured at the end of a 20 h incubation period. RGE peptide: 0.5 mg/mL, ACC: 10^{-4} M.

결과는 RGD peptide에 의해 ACC synthase의 활성이 증가되어 에틸렌 생성이 촉진된다는 것을 나타낸다.

또한 RGD 아미노산 서열이 특이성을 가지고 에틸렌 생성을 촉진시키는 것인지 알아보기 위하여 RGD peptide 대신 sequence가 유사한 RGE(Arg-Gly-Glu) peptide를 사용하여 실험하였다. 10^{-6} M IAA와 0.5 mg/mL RGD peptide를 함께 처리하면 대조구에 비해 135%의 에틸렌 생성이 증가되었고 IAA와 RGE peptide를 각각 처리했을 경우에는 105%, 67%의 에틸렌 생성을 보였다(Fig. 7). 이 결과는 IAA와 RGD peptide를 함께 처리했을 경우에는 대조구에 비해 130%의 에틸렌 생성이 증가되고 IAA만을 처리하면 81%, RGD peptide만을 처리하면 67%의 에틸렌 생성을 보인 Fig. 3와 매우 유사하다. 또한 ACC와 RGE peptide를 함께 처리했을 경우에는 ACC와 RGD peptide를 함께 처리한 경우와 마찬가지로 에틸렌 생성이 더 이상 증가되지 않았다(Fig. 8). 이처럼 RGE peptide를 처리한 경우는 RGD peptide를 처리한 경우와 그 결과가 매우 비슷하므로 RGE peptide도 RGD peptide와 마찬가지로 에틸렌 생성단계 중 ACC \rightarrow C_2H_4 단계가 아니라, 그 이전의 단계인 SAM \rightarrow ACC가 되는 단계에 영향을 미쳐 에틸렌 생성작용에 관여할 것이라 생각된다.

RGD peptide 뿐 아니라 RGE peptide도 에틸렌 생성에 관여한다는 사실을 바탕으로 RGD, RGE peptide와 화학적 성질이 다르다고 생각되는 RGK peptide를 각각 처리하여 에틸렌 생성량을 비교해 보았다(Fig. 9). 0.5 mg/mL RGD

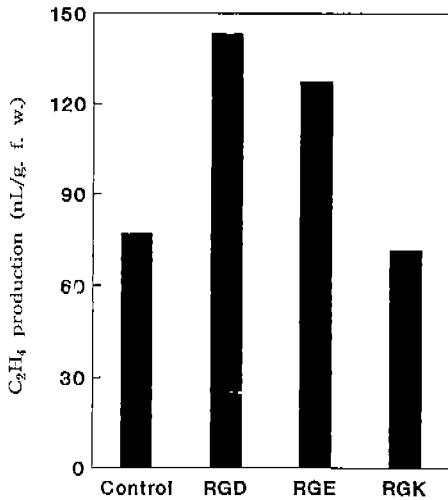


Fig. 9. Effects of various peptides (GRGDSPE, GRGESPE, GRGKSPE) on ethylene production in carrot cells grown in MS medium. Ethylene production was measured at the end of a 22 h incubation period. The concentration of these three peptides were 0.5 mg/mL.

peptide를 처리한 경우와 RGE peptide를 처리한 경우에는 각각 대조구에 비하여 86%, 65% 촉진되었으나 RGK peptide를 처리한 경우에는 대조구와 비슷한 정도의 에틸렌이 생성되었다. 이것은 RGD peptide는 단순히 세포에 어떤 자극(stress)을 주어 에틸렌 생성을 촉진시키는 것이 아니라 peptide가 특이성을 가지고 세포에 작용한 결과라고 생각되어진다.

고 찰

동물세포의 extracellular matrix(ECM)은 여러 가지 단백질과 당단백질로 구성된 복잡한 구조를 이루고 있으며, ECM의 구성 단백질들은 공통적으로 Arg-Gly-Asp(RGD) 아미노산 서열에 의해 원형질막에 있는 수용체인 integrin과 특이적으로 결합하고 있다. 최근 식물에서도 세포막과 세포벽 사이의 결합이 RGD binding 단백질들에 의한 것이라는 보고가 있었으며(Schindler *et al.*, 1989), 이 보고에서는 고등식물에 있는 RGD sequence 인식체계가 세포벽과 원형질막의 결합에 중요하며, 세포의 형태변화와 성장물의 변화를 가져온다고 밝히고 있다. 이 사실로 식물세포에서도 ECM이 RGD sequence를 매개로 원형질막과 연결되어 있으며, RGD sequence가 microtubule의 배열에 영향을 주어 세포분화나 형태형성에 영향을 준다고 말할 수 있으며 이것은 식물세포에서 microtubule의 배열에 영향을 주는 성장 조절 물질로 알려진 에틸렌과 관련지어

생각해 볼 수도 있다. 또한 최근 식물체내에서 내재적인 polypeptide가 식물체의 방어기작을 활성화하는 신호 역할을 한다(Pearce *et al.*, 1991)는 것과 에틸렌이 병원체의 침입에 대한 방어기작을 활성화시킨다는 사실을 관련시켜 생각해 볼 수 있으므로, 이런 사실을 바탕으로 RGD peptide와 에틸렌 사이에도 어떤 상호작용이 있을 것이라는 가능성을 생각해 볼 수 있다.

이러한 가능성을 검토하기 위해 RGD sequence가 포함되어 있는 합성 peptide를 당근 배양세포에 처리하였는데, RGD peptide는 당근 배양세포에서 에틸렌 생성을 촉진시켰다(Fig. 3, 4). RGD peptide가 에틸렌 생성을 촉진시킨다면 에틸렌 생성경로 중 어떤 단계에 영향을 미치는가를 알아보기 위해 IAA와 ACC를 함께 처리하여 보았다. IAA와 RGD peptide를 함께 처리한 경우에는 에틸렌 생성이 각각 처리한 경우보다 증가하였으나, ACC와 RGD peptide를 함께 처리한 경우에는 ACC만 처리했을 경우보다 에틸렌 생성이 증가되지 않았다(Fig. 5, 6). RGD peptide는 오옥신과 함께 있을 때 에틸렌 생성을 더욱 촉진시키므로 오옥신과 유사하게 작용할 것이라 생각되어 당근 배양세포에 RGD peptide를 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 ACC synthase 활성을 비교하여 보았다. RGD peptide를 전처리한 경우에는 대조구에 비해 ACC synthase 활성이 커져 에틸렌 생성이 증가되었다(Table 1). 이런 사실들로 미루어 RGD peptide는 오옥신처럼 ACC synthase의 활성에 관여하여 에틸렌 생성을 촉진시킨다고 생각된다. 그러나 이 실험 결과만으로는 RGD peptide가 효소에 어떻게 작용하게 되는지 또한 IAA와 상호작용 관계는 어떻게 되는지를 설명할 수가 없다.

동물의 ECM 뿐만 아니라 식물세포의 ECM이 세포막과 결합하여 생리적인 작용을 할 때에는 RGD sequence가 막에 있는 수용체와 특이성을 가지고 결합하여 작용을 한다고 밝혀져 있는데(Pierschbacher and Ruoslahti, 1984a, b; Pierschbacher *et al.*, 1983; Schindler *et al.* 1989), 식물세포의 에틸렌 생성과정에서도 RGD 아미노산 서열이 특이성을 나타내는지를 알아보기 위해 sequence 중 한 개의 아미노산만을 바꾼 RGE peptide와 RGK peptide를 처리하여 보았다. 실험 결과 RGE peptide를 처리하였을 때에도 RGD peptide를 처리한 경우와 같은 효과를 나타내었다(Fig. 7, 8). 그러나 RGK peptide를 처리한 경우에는 에틸렌 생성의 증가를 볼 수 없었다. 이 사실로 보아 에틸렌 생성에서는 RGD peptide 뿐 아니라 RGE peptide도 특이성을 가지고 작용한다고 생각되며 식물의 경우에는 RGD sequence의 특이성이 동물에 비해 광범위하게 나타난다고 생각된다. RGD peptide와 RGE peptide는 D(Asparatic acid)와 E(Glutamic acid)가 모두 (-) 전하를 띠는 산성 아미노산이므로 이 두 합성 GRGDSPE, GRGESPE pep-

ptide는 화학적 성질이 유사하다고 생각되며, 이런 화학적 유사성 때문에 에틸렌 생성시에는 RGD peptide 뿐만 아니라 RGE peptide도 특이적으로 작용한다고 생각된다. 에틸렌의 생성은 여러 가지 요인에 의해 민감하게 변화하므로 합성 RGD, RGE peptide가 단순한 stress로서 세포에 작용하여 에틸렌 생성을 촉진시켰다면 RGK peptide를 처리하였을 때에도 에틸렌 생성이 증가되었을 것이지만 실제로는 그렇지 않았다. 이것은 RGD, RGE peptide가 단순한 자극 물질이 아니라 이들 sequence가 어떤 특이성을 가지고 작용함을 보여주는 것이라 할 수 있다. RGD, RGE peptide의 D(Asparatic acid)와 E(Glutamic acid) 아미노산이 (-) 전하를 띠는 산성 아미노산인데 반해, RGK peptide가 포함하는 K(Lysine)은 (+) 전하를 띠는 염기성 아미노산으로 RGK peptide는 RGD, RGE peptide와는 다른 화학적 성질을 가진다고 생각된다. 그러므로 RGD peptide의 에틸렌 생성 촉진작용은 특정한 아미노산 서열을 요구하는 특이적 반응이라고 생각된다.

적 요

식물에서도 동물에서와 같이 RGD(Arg-Gly-Asp) sequence를 매개로 원형질막과 extracellular matrix(ECM)가 연결되어 있다는 사실이 알려지고 있으므로 RGD sequence가 식물세포의 성장, 분화 등의 여러 가지 생리적인 현상에 관여하리라는 가능성을 생각할 수 있다. 그래서 RGD sequence가 당근(*Daucus carota* L.) 배양세포에서 에틸렌 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

RGD sequence를 포함하는 합성 peptide는 당근 배양 세포에서 에틸렌의 생성을 촉진시켰다. RGD peptide는 Indole-3-acetic acid(IAA)와 함께 처리한 경우 에틸렌 생성을 더욱 촉진시켰으며, ACC synthase의 활성도 증가시켰다. RGD sequence가 에틸렌 생성을 촉진시킬 때 어떠한 특이성이 있는가를 확인하기 위해 이와 유사한 RGE(Arg-Gly-Glu) peptide, RGK(Arg-Gly-Lys) peptide를 각각 처리하여 보았다. RGE peptide는 RGD peptide와 마찬가지로 에틸렌 생성을 촉진시켰으나 RGK peptide는 에틸렌 생성에 영향을 미치지 않았다. 따라서 RGD peptide의 에틸렌 생성 촉진작용은 RGD dequence를 포함하는 RGD peptide가 ACC synthase의 활성을 증가시켜서 일어나는 현상이라 생각되며, 또한 특정한 아미노산 서열을 요구하는 특이적 반응이라고 생각된다.

참 고 문 헌

Armant, D.R., H.A. Kaplan, H. Mover and W.J. Lennarz. 1986. The effect of hexapeptides on attachment and

outgrowth of mouse blastocysts cultured *in vitro*: Evidence for the involvement of the cell recognition tripeptide Arg-Gly-Asp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6751-6755.

Boller, T., R.C. Herner and H. Kende. 1979. Assay for an enzymatic formation of ethylene precursor, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid. *Planta* **145**: 293-303.

Chadwick, A.V. and S.P. Burg. 1970. Regulation of root growth by auxin-ethylene interaction. *Plant Physiol.* **45**: 192-199.

Chalutz, E. 1973. Ethylene-induced phenylalanine ammonia lyase activity in carrot roots. *Plant Physiol.* **51**: 1033-1038.

Ecker, J.R. and Davis, R.W. 1987. Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5202-5206.

Eisinger, W.R. and S.P. Burg. 1972. Ethylene-induced pea internode swelling. *Plant Physiol.* **50**: 510-517.

Felix, G. and F. Meins. 1987. Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* **172**: 386-392.

Fry, S.C. 1989. Cellulases, hemicellulases and auxin-stimulated growth: a possible relationship. *Physiol. Plant.* **75**: 532-536.

Fujimura, T. and A. Komamine. 1980. The serial observation of embryogenesis in carrot cell suspension culture. *New Phytol.* **86**: 213-218.

Hynes, R.O. 1987. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* **48**: 549-554.

Igrotz, R.A. and J. Massague. 1987. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell* **51**: 189-197.

Lang, J.M., W.R. Eisinger and P.B. Green. 1982. Effect of ethylene on the orientation of microtubules and cellulose microfibrils of pea epicotyl cells with polyamellate cell walls. *Protoplasma* **110**: 5-14.

Legrand, M., S. Kauffman, P. Ceoffroy and B. Fritig. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6750-6754.

Leptin, M., R. Aebersold and M. Wilcox. 1987. Drosophila position-specific antigens resemble the vertebrate fibronectin-receptor family. *EMBO. J.* **6**: 1037-1043.

Meyer, Y. and W. Herth. 1978. Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis but not of nuclear division: in protoplast of *Nicotiana tabacum* L. cultivated *in vitro*. *Planta* **142**: 253-262.

Pearce, G., D. Strydom, S. Johnson and C.A. Ryan. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-898.

Pierschbacher, M.D., E.G. Hayman and E. Ruoslahti. 1983. Synthetic peptide with cell attachment activity of fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1224-1227.

- Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti. 1984a. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragment of the molecule. *Nature* **309**: 30-33.
- Pierschbacher, M.D. and E. Ruoslahti. 1984b. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5985-5988.
- Roberts, I.N., C.W. Lloyd and K. Roberts. 1989. Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helical arrays. *Planta* **164**: 439-447.
- Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**: 491-497.
- Schindler, M., S. Meiners and D.A. Cheresch. 1989. RGD-dependent linkage between plant cell wall and plasma membrane: Consequences for growth. *J. Cell Biol.* **108**: 1955-1965.

(1993. 11. 3 接受)