

앱시스산에 의해 기공이 닫히는 信號傳達過程에서 G-蛋白質의 役割

李俊商¹ · 李翰柱 · 李修珉 · 李永淑*

浦項工科大学校 生命科學科

식물 호르몬의 하나인 앱시스산이 식물의 기공을 닫게 하는 과정 중에 phospholipase C가 활성화되어 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)의 양이 증가함이 보고되었다 (Coté and Crain, 1994). 그러나 아직까지 공변세포에서 phospholipase C의 활성을 조절하는 G-단백질에 대한 보고는 없었다. 그러므로 앱시스산에 의한 기공닫힘과정에 G-단백질이 수반되는지를 조사하고자, G-단백질 활성의 저해제인 pertussis toxin과 촉진제인 cholera toxin을 처리하여 보았다. 닭의장풀(*Commelina communis* L.)의 잎 뒷면으로부터 얻은 온전한 표피층과 잠두(*Vicia faba* L.)의 잎을 부분 분해하여 공변세포만을 남긴 표피층에 pertussis toxin을 처리하였을 때, 앱시스산에 의한 기공닫힘이 부분적으로 억제됨을 관찰하였다. 그러나 cholera toxin의 경우는 아무런 영향이 없었다. 공변세포만을 지닌 표피층에 pertussis toxin을 전처리한 후 앱시스산을 가했을 때, 앱시스산에 의한 IP₃ 양의 증가 양상이 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과들로부터 앱시스산에 의한 기공닫힘과정에 pertussis toxin-sensitive, phospholipase C-linked G-protein이 관여하고 있음을 알 수 있었다.

주요어: G-단백질, 앱시스산, 신호전달과정, pertussis toxin, 공변세포

식물은 기공을 열고 닫음으로써 식물체내의 수분의 양과 이산화탄소의 양을 조절한다. 특히 수분결핍 상태에서는 기공의 닫힘을 유도하여 증산작용으로 인한 불필요한 수분의 손실을 방지하는데, 이러한 과정에 식물 호르몬인 앱시스산이 관여한다고 알려져 있다(Davies *et al.*, 1981). 앱시스산은 세포의 부피조절에 관여하는 여러 이온의 흐름을 변화시켜 그 결과 세포내 삼투압의 감소를 유도하여 기공이 닫히게 한다 (Fitzsimons and Weyers, 1987).

앱시스산에 의한 기공닫힘의 신호전달경로에 대해서는 많은 연구가 있었으나 아직까지 밝혀지지 않은 부분도 많다. 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, calcium ion이 이차 신호물질로 작용함이 보고되었고(McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Irving *et al.*, 1992), calcium ion에 의해 세포막에 존재하는 inward K⁺ channel(Schroeder and Hagiwara, 1989)과 anion channel(Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990)의 활성이 조절됨이 확인되었다. 또한 공변세포내로 미세현미주입된 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)가 기공을 닫게 하고(Gilroy *et al.*, 1990), inward K⁺ channel을 차단함이 보고되었으며(Blatt *et al.*, 1990), 앱시스산을 처리하고 공변세포의 IP₃의 양을 receptor-binding assay를 써서 정량한 결과, 앱시스산에 의해 세

포내 IP₃의 양이 증가함이 이미 입증되었다(Coté and Crain, 1994).

동물세포에서 보고된 여러 경우에, 신호전달과정에서의 IP₃의 생성은 G-단백질을 매개로 이루어진다(Hardie, 1991). 또한 식물에서도 G-단백질이 신호전달과정에 관여한다는 여러 증거들이 있다(Terryn *et al.*, 1993). 벼의 자엽초에서 얻은 membrane vesicle에 대한 GTP-γ-S의 결합이 옥신의 존재하에서 증가한다는 보고가 있는데, 이는 옥신 수용체가 세포막에 있어서 이것에 옥신이 결합할 때 아래 단계의 G-단백질을 활성화된 형태로 만들어 주기 때문이라고 해석되었다(Zaina *et al.*, 1990). *Acer pseudoplatanus* (Dillenschneider *et al.*, 1988)와 *Dunaliella salina* (Einspahr *et al.*, 1989)에서 guanine nucleotide에 의해 phospholipase C(PLC)의 활성이 증가한다는 보고도 있다. Ion channel과 관련하여서는, 잠두(*Vicia faba* L.) 공변세포에서, GDP-β-S에 의해 inward K⁺ current가 증가하고 역으로 GTP-γ-S에 의해서 그 current가 감소하는 현상이 관찰되었다(Fairley-Grenot and Assmann, 1991). 또한 *Avena sativa*에서 *cab*, *phy*와 같은 phytochrome에 의해 발현이 조절되는 유전자들이 cholera toxin(CTX)에 의해 각각 발현이 촉진 또는 억제됨이 보고되어, 일부의 광신호전달기작에 있어서 G-단백질이 관여하고 있음이 드러났다. 본 실험실에서도 GTP-γ-S/GDP-β-S의 미세현미주입실험을 통해, 닭의장풀(*Commelina communis* L.)의 공변세포에서 기공이 열릴 때 G-단백질이

¹현주소: 강원도 원주시 우산동 상지대학교 생물학과
*교신저자: Fax (0562) 279-2199
© 한국식물학회 [서울] 1994

관여함을 확인한 바 있다(Lee *et al.*, 1993).

이상의 증거들로 미루어 볼 때, 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 신호전달과정에서도 G-단백질이 관여할 가능성이 높다. 이를 시험하기 위해 저자들은 닭의장풀 잎 뒷면의 표피층에 pertussis toxin(PTx)이나 CTx를 전처리한 후 앱시스산을 처리하였을 때, 앱시스산에 의한 기공닫힘이 영향을 받는지를 실험하였고, 또한 잠두의 공변세포에서 앱시스산에 의해 생성되는 IP₃의 양이 PTx를 전처리했을 때 어떻게 달라지는지를 조사하였다. 이들 독소는 G-단백질의 subunit의 특정 아미노산 잔기를(PTx의 경우 Cys, CTx의 경우 Arg) ADP-ribosylation하여, G-단백질을 PTx는 비활성화시키고 CTx는 활성화시키므로, 신호전달과정 연구에 좋은 도구로서 널리 쓰이고 있다.

재료 및 방법

온전한 표피층에서 기공의 개폐 측정

4주 가량 자란 닭의장풀 (*Commelina communis* L.)의 큰 잎 중 건강한 것을 취하여 실험의 재료로 사용하였다. 잎의 아랫면이 위쪽을 향하도록 하여 물 속에 잠기게 한 채로 약 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 백색광하에서 2시간 가량 놓아 두어 기공이 활짝 열리도록 하였다. 3.5 cm 직경의 Falcon dish를 마련하여 각각에 30 mM KCl, 10 mM K⁺-Mes(pH 6.1), 0.1 mM EGTA가 든 용액 1 mL씩을 넣었다. 이들 중 독소(CTx 또는 PTx) 처리군에 해당되는 dish에 각 독소를 1 또는 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 가하였다. 그 후, 면도칼과 핀셋을 이용하여 잎의 중간 부위로부터 표피층의 작은 조각들을 얻었다. 이들 중 1개는 slide glass에 놓아 현미경하에서 eyepiece micrometer로 초기 기공 크기(stomatal aperture)를 측정하는데 사용하였다. 해당 실험군에 독소가 처리된 상태에서 CTx는 1시간, PTx는 30분 동안 전처리하였다(이때 앞에서의 광조건을 그대로 유지하였다). 전처리 후 기공 크기를 측정하고, 각 dish에 0.2 mM CaCl₂와 10 μM 앱시스산을 가한 후 같은 조건에서 주처리 과정에 들어갔다. 그리고 시간에 따른 기공 크기를 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

표피세포를 제거한 표피층에서의 기공 개폐 측정

공변세포의 세포벽은 표피층의 다른 세포들의 세포벽에 비해 훨씬 두꺼우므로, 세포벽 소화효소를 단시간 처리하면 표피세포를 제거하고 공변세포만이 남은 표피층을 얻을 수 있다. 3-4주 가량 자란 잠두의 완전히 자란 잎을 blender를 사용하여 간 다음, 220 μm 나일론체 위에서 수돗물로 씻어 공변세포만을

지닌 표피층의 조직을 얻었다. 이들 조직을 0.7% cellulase (Onozuka R-10), 0.1% polyvinylpyrrolidone 40, 0.25% BSA, 0.6 mM ascorbic acid, 0.27 M mannitol, 3 mM Mes-KOH (pH 5.5), 0.3 mM MgCl₂, 0.3 mM CaCl₂, 6 mM K⁺-phosphate로 구성된 효소용액에 30분간 처리하였다. 이를 220 μm 나일론체로 거른 다음 0.45 M mannitol, 0.5 mM CaCl₂의 용액으로 씻어내었다. 효소분해과정을 마친 표피층은 표피세포가 제거되고 공변세포만 남은 상태임을 현미경으로 확인하였다. 이렇게 부분분해된 표피층을 0.15 M mannitol, 5 mM Mes-KOH(pH 6.0), 10 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM ascorbic acid로 조성된 용액에 띄우고, 350-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 백색광을 1시간 조사하여 기공을 열게 한 다음, 실험군에는 PTx(최종 농도 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 1시간 처리하였다. 이후 최종 농도 10 μM 이 되도록 앱시스산을 가하여 1시간 간격으로 기공 크기를 측정하였다.

IP₃ 분석

3-4주 가량 자란 잠두의 완전히 자란 잎을 세포벽 분해 효소들로 처리하여 부분분해과정을 마친 표피조직을 0.15 M mannitol, 5 mM Mes-KOH(pH 6.0), 10 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM ascorbic acid로 조성된 용액에 띄우고, 350-400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 백색광을 1시간 조사하여 기공을 열게 한 다음, 실험군에는 PTx(최종 농도 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 2시간 배양하였다. 앱시스산을 가하기 20분 전에 LiCl(최종 농도 10 mM)를 위의 현탁액에 첨가했다. LiCl은 inositol 1,4-bisphosphate phosphatase, inositol 1,3,4-trisphosphate phosphatase, 그리고 inositol 4-monophosphate phosphatase의 저해제로서 (Nahorski *et al.*, 1991), IP₃의 분해 속도를 늦추기 위하여 넣어주었다. 앱시스산은 최종 농도가 10 μM 이 되도록 가하고, 10초 후에 삼염화초산(CHCl₃COOH)을 넣어 반응과정을 정지시켰다. 침전된 거대분자나 지질은 5분간 15,000 rpm에서 원심분리하여 제거하였다. 상정액을 취하여 냉동건조와 재용해 과정을 거쳐 4배로 농축한 다음, IP₃ 양을 receptor-binding assay 방법에 의해 결정하였다(Quarmby *et al.*, 1992). Receptor-binding assay는 소의 부신에서 분리한 IP₃ 수용체에 방사성동위원소로 표지된 IP₃와 시료 중에 들어있는 IP₃를 경쟁적으로 결합시켜 시료내에 들어있는 IP₃의 양을 측정하는 방법이다. 이때 사용된 IP₃ 수용체는 여러 IP₃의 이성질체 중 inositol 1,4,5-trisphosphate에만 선택적으로 결합하는 특성을 지니고 있다. 시료의 양에 따른 IP₃ 양의 변이는 전체 인지질 양을 구하여 나누어줌으로써 보정하였다(Barlett, 1959). 전체 인지질은 침전물로부터 chloroform:methanol(2:1) 3 mL과 0.7 M HCl 0.75 mL을 사용하여 추출하였다. 결과는 대조군

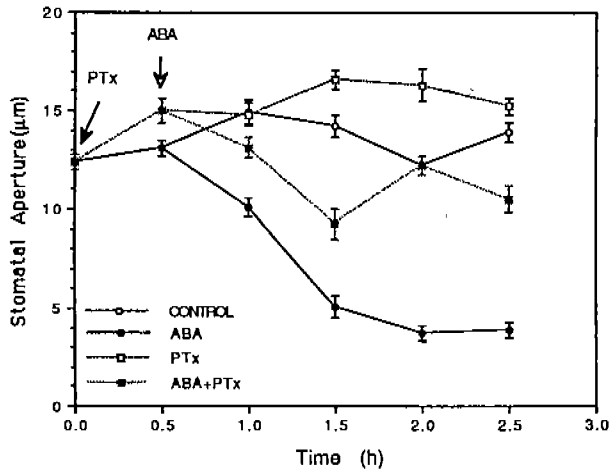


Fig. 1. Effect of PTx on ABA-induced stomatal closing in intact epidermal peels of *Commelina communis* L. The abaxial epidermis of fully expanded leaves of 4 wk-old *C. communis* L. was peeled and floated on test solutions containing 30 mM KCl, 10 mM K⁺-Mes (pH 6.1), 0.1 mM EGTA, with or without 1 µg/mL PTx for 30 min. ABA (10 µM) was then added to the test groups. Stomatal apertures were measured every 30 min. and averages and SE from an experiment are presented (n=20). A separate experiment with n=50 showed similar results. Samples were irradiated with white light (400 µmol·m⁻²·s⁻¹) throughout the experiment.

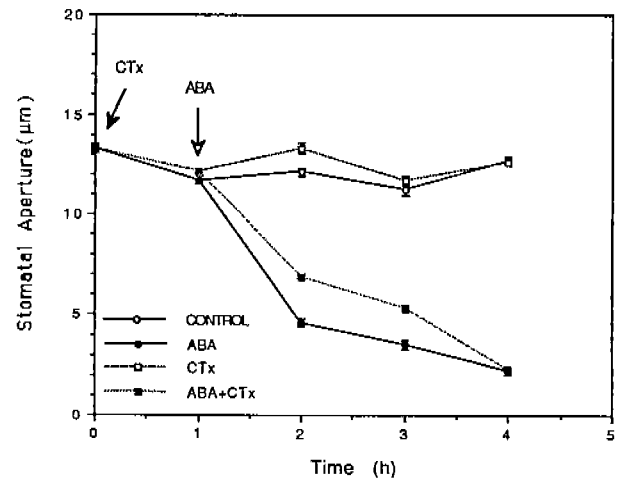


Fig. 2. Effect of CTx on ABA-induced stomatal closing in intact epidermal peels of *Commelina communis* L. The abaxial epidermis of fully expanded leaves of 4 wk-old *C. communis* L. was peeled and floated on test solutions containing 30 mM KCl, 10 mM K⁺-Mes (pH 6.1), 0.1 mM EGTA, with or without 1 µg/mL CTx and incubated for 1 h. ABA (10 µM) was then added to the test groups. Stomatal apertures were measured every hour, and averages and SE from an experiment are presented (n=50). A separate experiment with n=50 showed similar results. Samples were irradiated with white light (400 µmol·m⁻²·s⁻¹) throughout the experiment.

수준에 대한 %로써 나타냈다.

결 과

앱시스산에 의한 기공닫힘에 PTx와 CTx가 미치는 효과

앱시스산은 기공닫힘을 유도하는 1차 신호물질이다. 이 앱시스산에 의한 기공닫힘은 PTx에 의해 억제되었다. Fig. 1에서, 앱시스산만 처리된 실험군이 13 µm에서 4 µm까지 기공을 닫는 데 반해, PTx와 앱시스산이 둘 다 처리된 실험군에서는 초기에 15 µm이던 것이 10-11 µm 정도로 닫히는 데 그쳤다. 그러나 PTx에 의한 앱시스산 작용의 억제는 부분적이었다. 1 또는 0.5 µg/mL PTx를 처리해 보았을 때 처리농도에 따른 차이가 별로 없는 것으로 보아, PTx 처리농도가 낮아서 완전 억제가 아닌 부분적 억제에 그친 것은 아닌 것으로 보인다(자료 미제시). PTx만 처리한 경우 대조군에 비해 약간 기공의 열림을 유도하였는데, 이러한 결과는 Lee 등(1993)의 기공열림 과정에 관여하는 G-단백질의 연구에서도 이미 관찰된 바 있다.

PTx에 비해 CTx는 앱시스산에 의한 기공의 닫힘을 막지 못하였다. Fig. 2에서, 1 µg/mL CTx가 앱시스산과 함께 처리된 경우, 앱시스산 단독으로 처리한 실험군에 비해 다소 감소

양상이 느리기는 하지만 결국에는 앱시스산 단독 처리군과 같은 정도로 기공이 닫혔다. 또한 1 또는 0.5 µg/mL CTx만 처리한 실험군에서도 PTx와는 달리 대조군과 별 차이를 보이지 않았다(자료 미제시). 그러므로 CTx는 기공이 닫히는 과정에 영향을 미치지 않는다고 판단된다.

표피세포가 제거된 표피층에서의 앱시스산에 의한 기공닫힘에 PTx가 미치는 효과

원형질체 분리과정 중 효소에 의한 부분 분해과정을 마친 표피층은, 표피세포가 제거되고 공변세포만 남은 상태이다. 이 부분분해된 표피층에서도 앱시스산에 의한 기공의 닫힘은 유도된다. 이 표피층에 PTx를 전처리하고 앱시스산을 처리하였을 때의 기공운동을 관찰하였다. 이 표피층에서도 표피세포가 있는 표피층에서와 마찬가지로 PTx에 의해 앱시스산에 의한 기공닫힘이 부분 억제되었으며, PTx만 처리한 실험군이 대조군에 비해 약간 더 기공의 열림을 유도한 것으로 나타났다(Fig. 3). 이 실험으로부터 앞서의 실험결과에서의 PTx의 효과(Fig. 1)가 다른 표피세포에 작용하여 효과를 나타낸 것이 아니라 직접 공변세포에 작용하여 앱시스산의 작용을 방해한 것임을 알 수 있었다.

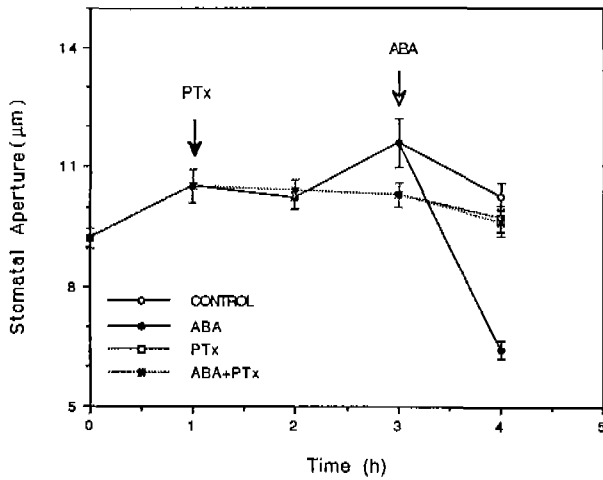


Fig. 3. Effect of PTx on ABA-induced stomatal closing in partially digested epidermal tissue which contained only guard cells and no other epidermal cells. The abaxial epidermis of fully expanded leaves of 4 wk-old *Vicia faba* L. was isolated, digested with cellulase until only guard cells remained in the tissue, floated on the solution containing 0.15 M mannitol, 5 mM Mes-KOH (pH 6.0), 10 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM ascorbic acid and incubated for 1 h. PTx was then added to a final concentration of 1 µg/mL, and the samples were incubated for 1 h. ABA (1 µM) was then added to the test groups. Stomatal apertures were measured every hour. Samples were irradiated with white light (350-400 µmol·m⁻²·s⁻¹) throughout the experiment. Averages and SE from 3 separate experiments are presented (n=60).

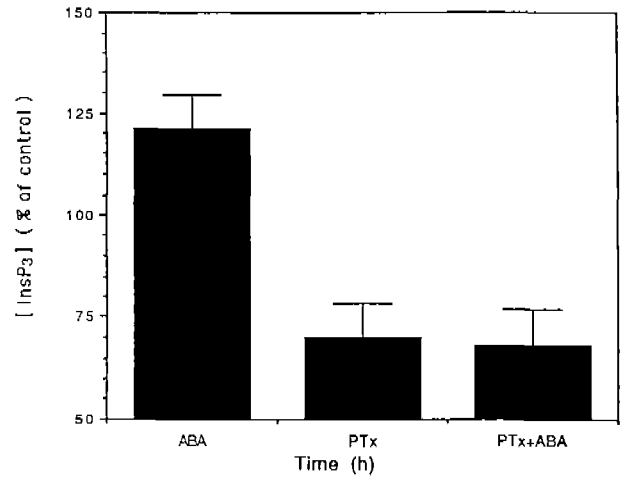


Fig. 4. Effect of PTx on ABA-induced IP₃ increase. The abaxial epidermis of fully expanded leaves from 4 wk-old *Vicia faba* L. was isolated and digested with cellulase until only guard cells remained in the tissue. The digested peels were floated on the solution containing 0.15 M mannitol, 5 mM Mes-KOH (pH 6.0), 10 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM ascorbic acid and incubated for 1 h. PTx (1 µg/mL) was then added to the test groups, and 2 h later ABA (10 µM) was added to the test groups. After 10 s of ABA treatment, the reaction was stopped by adding trichloroacetic acid to 5% and the supernatant was collected. The samples were irradiated with white light (350-400 µmol·m⁻²·s⁻¹) throughout the experiment. The amount of IP₃ in the supernatant was measured by the receptor binding assay. Averages and SE from 4 separate experiments with duplicate samples each are presented.

앱시스산에 의해 증가하는 IP₃에 PTx가 미치는 효과

효소에 의한 부분 분해과정을 마치고 공변세포만 남은 표피층에 최종 농도가 10 µM인 앱시스산을 10초간 처리했을 때, 앱시스산에 의해서 IP₃의 양이 대조군에 대해 121%로 증가하였다. 이 표피층에 PTx(최종 농도 1 µg/mL)를 2시간 전 처리한 뒤 앱시스산을 처리했을 때, PTx에 의해 앱시스산에 의한 IP₃의 증가가 완전히 억제되었다(Fig. 4). 또한 PTx를 전처리한 실험군은 앱시스산의 존재유무에 상관없이 대조군에 비해 IP₃ 양이 70% 가량으로 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 4). 이 실험은 독립적인 4번의 실험을 종합한 결과이다. 이 실험의 결과로 PTx에 의해 공변세포의 IP₃ 양이 감소되고, 앱시스산에 의한 IP₃ 증가가 억제되는 것을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험은 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 과정에서 G-단백질이 수반되는지를 조사한 내용이다. 닭의장풀의 잎 뒷면에

서 벗겨내어 표피세포와 공변세포를 모두 지닌 온전한 표피층이나 잠두의 잎의 뒷면 표피층을 부분분해시켜 공변세포만 존재하는 표피층 모두에서 PTx는 기공의 열림을 다소 유도하고 기공의 닫힘을 부분억제하였으나(Figs. 1 and 3), CTx는 효과가 없었다(Fig. 2). 이는 표피세포가 아닌 공변세포 자체가 PTx에 의해 직접 영향을 받음을 시사한다. 동물세포의 경우 PTx에 의해 ADP-ribosylation된 대부분의 G-단백질은 비활성화되는 경우가 많으므로, 공변세포에서도 PTx-sensitive G-단백질이 기공이 닫히는 과정에 관여하는 것으로 보인다. 그리고 기공이 닫히는 과정에서 PLC 활성화가 있는 것을 볼 때 (Coté and Crain, 1994), 아마도 이 G-단백질은 자신의 effector로서 PLC를 사용하는 것으로, 동물계에서 보고된 G_p 계열의 G-단백질로 보인다. 이는 동물계의 G_p 계열의 일부가 PTx에 의해 영향을 받지만 CTx에 의해서는 영향을 받지 않는 종류의 G-단백질이라는 사실과도 부합된다(Birnbaumer, 1990).

이 G-단백질이 PLC 활성화와 관련을 맺고 있는지를 조사하기 위해, 앱시스산 처리에 따른 IP₃ 양의 증가가 PTx에 의해 어떻게 영향을 받는지를 실험하였다. 세포벽 분해효소를 단기

간 처리하여 공변세포만 남은 잎의 표피층에 앱시스산을 처리하고 receptor-binding assay로 IP_3 양을 정량했을 때, 10초 후에 IP_3 의 양이 앱시스산을 처리하지 않은 대조군에 비해 190% 증가하여 60초 후까지 증가가 계속되다가 다시 원래 수준으로 돌아오는 것으로 보고되었다(Coté and Crain, 1994). 본 실험에서는 앱시스산을 10초 처리하였을 때 IP_3 가 증가하였으나 기존의 실험값만큼 증가하지는 않았다(Fig. 4). 이는 아마도 사용한 재료의 계절적 변이에 의한 것으로 보인다. 앱시스산을 처리하기 전에 PTx를 2시간 전처리하면 앱시스산에 의한 IP_3 증가가 완전히 억제되었다(Fig. 4). 즉, PLC의 전 단계에 위치한 G-단백질의 활성을 억제하였을 때 앱시스산에 의해 활성화되던 PLC의 작용이 제한되는 것으로 보아, 앱시스산에 의해 활성화되는 PLC는 PTx-sensitive G-단백질의 조절하에 있는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 앱시스산을 처리한 실험군이나 처리하지 않은 실험군 모두에서, PTx에 의해 IP_3 의 양이 대조군보다 감소한 것을 관찰하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 PTx를 처리했을 때 기공이 열리는 현상을 관찰했던 기존의 보고를 설명해 준다(Lee et al., 1993). 즉, 외부 자극이 없는 때에도 약간의 G-단백질이 활성화되어 있고 여기에 연결된 PLC가 활성화되어 IP_3 를 생산하고 있다가, PTx에 의해 G-단백질이 비활성화되면 PLC가 활성화될 수 없기 때문에 IP_3 양이 감소하여 기공이 열리게 될 가능성이 있다. 이상의 결과로부터 앱시스산에 의한 기공닫힘의 신호전달 윗 단계에는 PTx-sensitive, PLC-linked G-Protein이 관여한다고 결론을 내릴 수 있다.

사 사

본 연구는 1992-1994년도 과학재단 목적기초 연구비 지원에 의해 수행되었다. 아울러 공변세포내의 IP_3 분석방법을 확립하여 본 실험의 기초를 닦아준 최영봉씨와 좋은 지적을 해 주신 식물학회지 심사위원들께 감사드린다.

인 용 문 헌

- Barlett, G.R. 1959. Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.
- Birnbaumer, L. 1990. G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**: 675-705.
- Blatt, M.R., G. Thiel and D.R. Trentham. 1990. Reversible inactivation of K^+ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* **346**: 766-769.
- Coté, G.G. and R.C. Crain. 1993. Biochemistry of phosphoinositides. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 333-356.
- Coté, G.G. and R.C. Crain. 1994. Why do plants have phosphoinositides? *BioEssays* **16**: 39-46.
- Davies, W.J., J.A. Wilson, R.E. Sharp and O. Osonubi. 1981. Control of stomatal behaviour in water-stressed plants. In *Stomatal Physiology*. P.G. Jarvis and T.A. Mansfield (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 163-185.
- Dillenschneider, M., A. Hetherington, A. Graziana, G. Aliber, P. Berta, J. Haiech and R. Ranjeva. 1988. The formation of inositol phosphate derivatives by isolated membranes from *Acer pseudoplatanus* is stimulated by guanine nucleotides. *FEBS Lett.* **208**: 413-417.
- Einspahr, K.J., T.C. Peeler and G.A. Thompson. 1989. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C and phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* membranes. *Plant Physiol.* **90**: 1115-1120.
- Fairley-Grenot, K. and S.M. Assmann. 1991. Evidence for G-단백질 regulation of inward K^+ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* **3**: 1037-1044.
- Fitzsimons, P.J. and J.D.B. Weyers. 1987. Responses of *Commelina communis* L. guard cell protoplasts to abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **38**: 992-1001.
- Gilroy, S., N.D. Read and A.J. Trewavas. 1990. Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* **346**: 769-771.
- Hardie, D.G. 1991. Cell surface receptors - signal transduction. In *Biochemical Messengers; Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors*. D.G. Hardie (ed.). Chapman & Hall, Cambridge, U.K. pp. 147-187.
- Hedrich, R., H. Busch and K. Raschke. 1990. Ca^{2+} and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* **9**: 3889-3892.
- Irving, H.R., C.A. Gehring and R.W. Parish. 1992. Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1790-1794.
- Lee, H.J., E.B. Tucker, R.C. Crain and Y. Lee. 1993. Stomatal opening is induced in epidermal peels of *Commelina communis* L. by GTP analogs or pertussis toxin. *Plant Physiol.* **102**: 95-100.
- McAinsh, M.R., C. Brownlee and A.M. Hetherington. 1990. Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* **343**: 186-188.
- McAinsh, M.R., C. Brownlee and A.M. Hetherington. 1992. Visualizing changes in cytosolic-free Ca^{2+} during the response of stomatal guard cells to abscisic acid. *Plant Cell* **4**: 1113-1122.
- Nahorski, S.R., C.I. Ragan and R.A.J. Challiss. 1991. Lithium and the phosphoinositide cycle: and example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *TIPS* **12**: 297-303.
- Quarmby, L.M., Y.G. Yueh, J.L. Cheshire, L.R. Keller, W. J. Snell and R.C. Crain. 1992. Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **116**: 737-744.
- Schroeder, J.I. and S. Hagiwara. 1989. Cytosolic calcium

regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**: 427-430.

Terry, N., M.V. Montagu and D. Inze. 1993. GTP-binding proteins in plants. *Plant Mol Biol.* **22**: 143-152.

Zaina, S., R. Reggiani and A. Bertani. 1990. Preliminary

evidence for involvement of GTP-binding protein(s) in auxin signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile. *J. Plant Physiol.* **136**: 653-658.

(1994. 8. 23 接受)

Involvement of G-protein in Signal Transduction Process of Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure

Lee, Joonsang¹, Hanju Yi, Sumin Lee and Youngsook Lee*
*Department of Life Science, Pohang University of Science and Technology,
Pohang 790-784, Korea*

ABSTRACT

Activation of phospholipase C (PLC) and consequent elevation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) level have been reported during ABA-induced closure of stomata. However, it is not known yet whether G-protein regulates the PLC activity during the process. We tested if G-protein is involved in ABA-induced stomatal closure, using pertussis toxin (PT_x), which inactivates its substrate G-proteins, and cholera toxin, which activates its substrate G-proteins. PT_x inhibited ABA-induced stomatal closure both in intact epidermal peels from abaxial surface of *Commelina communis* L. and in partially digested epidermal tissue of *Vicia faba* L., which contained only guard cells and no other epidermal cells. Cholera toxin did not show any of the effect. Moreover, PT_x completely blocked ABA-induced elevation of IP₃ level in partially digested epidermal tissue of *V. faba* L. These results indicate that PT_x-sensitive, PLC-linked G-protein is involved in signal transduction process of ABA in guard cells.

Keywords : G-protein, ABA, signal transduction, pertussis toxin, guard cell

*Corresponding author: Fax +82-562-279-2199