

담배잎의 老化過程에 따른 蛋白質의 生化學的 變化

李相珪* · 沈相仁* · 姜炳華*

Biochemical Changes of Protein during the Senescence of Tobacco Leaf

Sang Gak Lee*, Sang In Shim* and Byeung Hoa Kang*

ABSTRACT: This experiment was conducted to obtain basic information of biochemical changes in the process of senescence by measuring the total RNA, protein, protease activity and electrophoretic pattern of protein in tobacco plant. The content of soluble protein increased by 15 days after leaf emergence and its level was not changed from 15 to 35 days after leaf emergence. The content of total RNA showed a maximum value at 15 days after leaf emergence and then decreased rapidly until 30 days after leaf emergence. The activity of protease of neutral fraction was higher than that of acidic fraction and rapidly increased up to the end of senescence after 50 days after leaf emergence. According to the analysis of electrophoresis, polypeptide band of 61kd was developed after 35 days after leaf emergence and increased by the end of senescence.

Key words: RNA, Protease activity, Protein, Senescence, *Nicotiana tabacum*.

植物的 老化(senescence)는 外部 環境과 生體 內部的 遺傳子 調節에 의해서 일어나는 현상으로 다양한 細胞內의 遺傳子는 老化에 접어들어 따라 老化에 관련된 酵素의 合成을 支配하고 酵素는 다시 細胞의 化學反應을 調節하여 器官이나 個體는 活力을 喪失하게 된다^{2,8,9}. 담배의 老化는 下位葉에서 上位葉으로 進行하는 漸進的 老化型으로서 經時的인 葉齡(aging)의 進行이 일어난 細胞에서 生命 維持에 필요한 遺傳子의 發現이 정지된 소극적인 죽음이 아니라 생활사의 최종 단계에 들어가기 위하여 계획된 遺傳子의 發現을 통한 적극적인 과정으로 진행된다^{5,8}. 老化 現狀과 관련되어 있는 葉綠素 崩壞, 色素의 變化, 高分子 物質의 分解 등과 같은 生化學的인 變화를 수반한다^{3,4,7}. 細胞

質內 리보오좀 및 葉綠體 리보오좀에서 合成된 蛋白質은 植物生理에 중요한 기능을 담당하고 分解되며 필요에 따라 再合成되어 細胞小器官으로 分配되며 合成된 蛋白質의 소멸되는 時間은 蛋白質 種類에 따라 다르지만 約5日에서 8日 정도이다. 蛋白質 分解는 蛋白質 分解酵素의 活性이 증가하여 일어나는 것으로서 pH, 溫度 및 光 등 여러 가지 複合的 要因이 參與한다^{1,6,10,12,13}.

담배는 잎이라는 營養器官을 收穫하는 作物로서 老化가 進行되는 過程에서 일어나는 蛋白質 合成과 分解는 酵素 活性, 同化物質의 轉流 및 代謝作用에 크게 영향을 미치며 그 정도의 차이는 收量과 品質에 막대한 영향을 준다⁷.

본 실험은 담배의 全 生育期間 中 葉齡이 증가

* 고려대학교 자연자원대학 식량자원학과(Dept. of Agronomy, College of Natural Resources, Korea Univ., Seoul 136-701, Korea) <'96. 7. 8 接受>

됨에 따라 植物體內에서 일어나는 蛋白質 合成과 分解가 老化機作 및 酵素 活性에 미치는 生化學的인 變化를 파악하여 老化 研究에 필요한 기초 資料를 제공하고자 실시하였다.

材料 및 方法

本 實驗의 供試品種은 黃色種 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. NC82)로서 5월 2일에 京畿道 德沼에 위치한 高麗大學校 自然資源大學 附屬農場 圃場에 移植하여 改良 멀칭 標準栽培法에 준하여 摘芯없이 栽培하였다. 試驗土壤은 pH 6.72, CEC 10.25me /100g, 全窒素含量 0.09%, 磷酸含量 26.53ppm, 有機化合物 1.37%의 微沙質壤土였다. 分析 試料는 各 植物當 葉位가 12 번째인 中位葉을 出葉 10일부터 5일 간격으로 12회 採取한 後 分析時까지 -70°C 의 초저온고에 보관하여 사용하였다. 出葉日의 計算은 肉眼으로 잎의 出現을 감지할 수 있는 시기(잎의 크기가 0.5cm 이상)를 出葉日로 잡고 이 기간으로부터 葉의 生育期間을 算出하였다. 總 RNA의 含量은 Rogers¹¹⁾의 방법에 따라 抽出한 다음 260 nm의 吸光度를 調查하여 含量을 算出하였다. Protease의 活性은 酸性 protease(pH 4.0)와 中性 protease(pH 7.8) 分割을 각각 分離하여 活性도를 測定하였다¹²⁾. 抽出은 生葉 1g에 抽出 溶液(Tris-HCl, 0.2%(w/v) ascorbic acid, pH 8.0)} 5.5ml을 가하여 15,000g에서 15분간 30,000g에서 30분간 遠心分離한 後 上澄液을 緩衝溶液(10mM Tris-HCl, 3.5% NaCl, 0.1% mercaptoethanol, pH 7.0)에 24시간 透析한 後, 遠心分離하여 上澄液을 protease 活性度 測定에 사용되었다. Protease 活性도는 0.2 M phosphate-citrate buffer (pH 4.0)와 0.2M Tris-HCl buffer (pH 7.8)을 酸性和 中性 分割의 活性을 보기 위하여 이용하였다. 反應 溶液을 各 pH별 緩衝液 4ml과 1ml의 蒸溜水, 2ml의 酵素 溶液을 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 섞은 後 0, 60, 120분간 진탕 항온수조에서 反應을 시킨 後, 시료당 1.75ml를 채취하여, 40%(w/v) trichloroacetic acid (TCA) 0.25ml을 가해서 2 $^{\circ}\text{C}$ 에서 4시간 방치 後,

15분간 5,000g에서 遠心分離한 後, 上澄液을 ninhydrin法에 따라 유리아미노산을 구하였다. Protease 活性도는 g당 1시간에 反應하는 아미노산의 nmoles로 나타냈고 標準物質은 glycine을 사용하였다. 可溶性 蛋白質의 含量은 BSA(bovine serum albumin)를 標準物質로 하여 CBB(Coomassie brilliant blue G-250)에 의한 發色法을 이용하여 정량하였다. 1次元 電氣泳動을 위한 蛋白質 抽出 및 精製는 總蛋白質을 抽出하는 方法으로 生葉 5g을 液體窒素에 넣고 抽出溶液[30mM Tris(pH 8.7), 1mM ascorbic acid, 5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM DDT, 0.5% PVP]을 가한 後 마쇄하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 33,000g로 15분 遠心分離한 後 上澄液만 抽出하였다. 0.07% 2-mercaptoethanol를 함유한 냉각 아세톤을 上澄液의 4배에 해당하는 양을 처리하여 -20°C 에서 1시간 沈澱시킨 後 33,000g에서 10분간 遠心分離하여 精製하였다. 20 μg 정도의 蛋白質을 含有한 試料는 sample buffer [60mM Tris(pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, bromophenol blue]에 1 : 2로 稀釋시킨 後 電氣泳動에 사용하였다. 1次元 電氣泳動은 SDS-PAGE로 실시하였고 染色은 silver staining法을 사용하였다. 各 밴드의 有無는 肉眼觀察과 fluoro-densitogram에 나타난 peak와 서로 比較分析 하였다.

結果 및 考察

生育段階別 12번째 잎의 可溶性 蛋白質과 總 RNA含量의 변화는 그림 1과 같다. 可溶性 蛋白質의 含量 變化는 잎이 出葉 後 15일까지 增加하였고 出葉 後 15일에서 35일까지는 生育過程에 따라 일정한 含量을 維持하다가 葉齡이 경과될수록 감소하는 것으로 나타났다. 老化末期인 出葉 後 55일에서 60일 사이에 蛋白質이 급격히 줄어드는 것은 잎의 代謝가 크게 低下되어 葉內 可溶性 蛋白質이 分解되어 他器官으로 移動되었기 때문으로 사료된다. 總 RNA 含量의 變化는 出葉 後 10일부터 증가하다가 出葉 後 15일에 최대치에 이르면

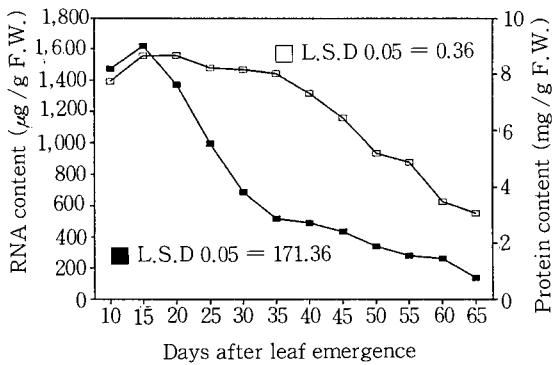


Fig. 1. Changes in amount of protein and total RNA content in the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development. ■ : RNA, □ : protein.

후 出葉後 30일까지 급격히 減少하였으며 35일부터 60일까지 減少幅이 적었다. 出葉後 65일까지는 92% 이상이 감소하였다. 可溶性 蛋白質과 RNA의 含量은 가시적 잎의 老化와는 시기적 불일치를 보였다.

老化에 있어서 가장 중요한 酵素인 protease 活性의 變化는 그림 2에 나타나 있다. Protease 活性은 基質을 内生 基質로 사용했을 때의 결과로서 酸性 protease (pH 4.0)와 中性 protease

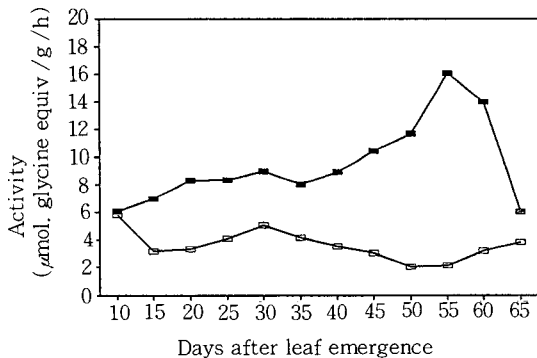


Fig. 2. Changes in activities of acid and neutral protease estimated using soluble proteins contained in the extracts as the substrate in the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development. ■ : neutral protease (pH 7.8), □ : acidic protease (pH 4.0).

(pH 7.8)의 活性度를 나타내 주고 있다. Protease 活性度는 pH 4.0과 pH 7.8 사이에 담배 잎 자체의 酵素液에 존재하는 可溶性 蛋白質을 基質로 사용할 경우에는 酸性 protease보다 中性 protease의 活性이 높았고, 酸性 protease 活性은 老化 末期까지 비교적 일정하게 유지되었으며, 특히 中性 protease는 蛋白質의 分解가 進行될수록 活性이 증가하다가 光合成 등 葉內 代謝가 停止될 무렵에 이르러 그 活性 減少가 일어났다^{7,13)}. 酸性 分割과 中性 分割 protease의 活性 중 葉內 蛋白質의 含量과 관련 지워 생각해 볼 때 中性 protease의 活性이 葉內 蛋白質의 活性에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되며, 이것은 담배잎의 老化에 따라 protease의 *de novo* 合成이 進行되어 老化된 잎의 蛋白質을 分解해 새로 발생하는 잎이나 花芽 등으로 轉流가 일어나는 것으로 보인다. 또

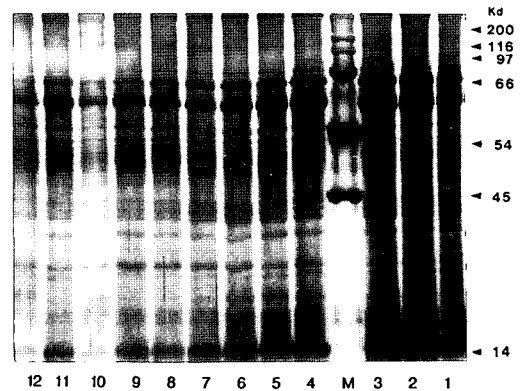


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development. Gel was stained by silver staining method. Estimated molecular weight in kilodalton are listed at right. Numbers indicated sampling time as following : 1 : 10 DAE, 2 : 15 DAE, 3 : 20 DAE, M : high molecular weight marker, 4 : 25 DAE, 5 : 30 DAE, 6 : 35 DAE, 7 : 40 DAE, 8 : 45 DAE, 9 : 50 DAE, 10 : 55 DAE, 11 : 60 DAE, 12 : 65 DAE. (DAE : Days after leaf emergence).

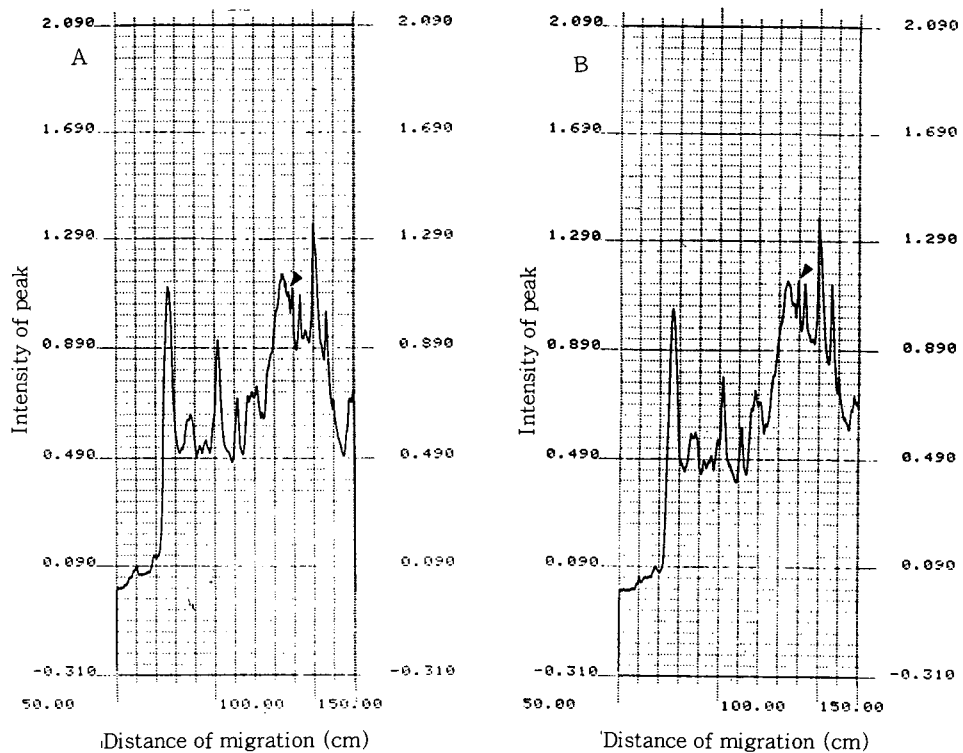


Fig. 4. Typical fluorodensitogram of the polypeptides separated by SDS-PAGE. Polypeptides were induced by the 12th leaf of tobacco plant according to the leaf development. A : 35 days after leaf emergence. B : 45 days after leaf emergence.

한 酸性과 中性 protease의 活性의 차이가 나는 것은 protease의 區劃化(compartmentation)의 차이에 기인된 것으로 추정되며, 液胞內 protease보다 細胞質內 protease가 잎의 老化에 직접적으로 관여하는 것으로 사료된다. 담배 葉內에 가장 많은 부분을 차지하는 蛋白質인 ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase(Rubisco)의 變化 樣相(그림 3)에 대한 결과와 비교할 때 出葉後 40일경부터 그 活力이 증가하는 protease活性和 Rubisco 量의 減少 樣相이 거의 일치하여 中性 protease의 活性 증가가 담배 葉內 代謝의 低下를 가져오는 것으로 사료된다^{7,10}.

즉 老化 過程 중 일어나는 蛋白質의 分解는 液胞에 위치하는 protease의 活性에 의해 좌우된다기 보다는 細胞質에서 새로이 合成되는 protease가 영향을 미친다고 볼 수 있다. 酸性 protease인

液胞內의 protease는 지속적으로 活性이 유지되는 것으로 보아 液胞內의 protease는 잎의 老化와 관계없이 단순히 불필요한 蛋白質의 分解에만 관여하는 것으로 사료된다.

그림 3은 잎의 일생에 있어 總 蛋白質의 電氣泳動 樣相을 나타낸 그림이다. 잎의 葉齡에 따른 蛋白質 밴드의 變化는 잎의 老化가 진행됨에 따라 蛋白質 밴드의 수는 거의 可視의으로 확인할 수 있는 變化가 없었으나 量的인 減少는 확인할 수 있었다.

그림 4는 電氣泳動의 결과를 fluoro-densitogram으로 나타낸 것으로 polypeptide 밴드의 樣相은 달라졌는데, 특히 61kd의 밴드가 出葉後 35일부터 生成된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 귀리의 老化過程 중 2次元 電氣泳動 分析을 통한 몇 가지 polypeptide가 合成되었고, 이 중

67kd의 비교적 高分子의 polypeptide가 合成된다는 보고⁴⁾를 고려할 때 老化過程 중 특이적으로 合成되는 polypeptide가 있으며 담배의 경우는 61kd의 polypeptide가 老化過程에서 特異적으로 合成되는 것으로 示唆되며 이 polypeptide에 대해서는 앞으로 特性 確因이 요구된다.

이상의 結果를 토대로 고려해 볼 때 葉出現으로부터 翌日 老化할 때까지 葉內의 蛋白質 含量은 새로이 合成되어지는 量과 蛋白質 分解過程에 의해 分解되어지는 量 사이의 關係에 의해 量이 결정된다고 볼 수 있다. 葉 蛋白質의 含量은 蛋白質 分解過程에 參與하는 protease 중 液胞內 protease보다는 細胞質內 protease의 活性에 의해 그 含量이 影響을 받는 것으로 示唆된다. 翌日의 老化는 溫度와 日長을 비롯한 環境 및 cytokinin과 같은 植物生長調節劑의 影響을 받으므로 이들과 葉內 protease 活性間의 關係에 대한 연구가 앞으로 要求되어진다.

摘 要

담배 生育段階別 RNA, protease 活性도와 蛋白質 패턴의 變化를 파악하여 老化가 進行되는 過程에서 生理·生化學的인 變化의 基礎資料를 얻고자 본 실험을 수행하였으며 結果는 다음과 같다. 可溶性 蛋白質 含量은 出葉 後 15일까지 增加하여 出葉 後 35일까지 일정하게 維持하였다. 總 RNA 含量은 出葉 後 15일에 가장 높았으며 出葉 後 30일까지 급격한 減少를 보였다. Protease 活性 變化는 中性 protease(pH 7.8)가 活性이 높았으며 老化末期인 出葉 後 50일부터 갑자기 增加하였다. 電氣泳動 패턴은 큰 變化가 없었으나 61.0 kd의 polypeptide은 出葉 後 35일부터 生成되어 老化末期까지 增加하였다.

引用文獻

1. Cuello, J., M. J. Quiles and B. Sabater. 1984. Role of protein synthesis and light

in the regulation of senescence in detached barley leaves. *Physiol. Plant.* 60:133-138.

2. Goldberg, A. L., and St. A. John. 1989. Protein degradation. *The Biochemistry of Plants*. Vol. 15, Molecular biology. Academic press, New York. pp.521-533.

3. Kang, S. M., H. Matsui and J. S. Titus. 1982. Characteristics and activity changes of proteolytic enzymes in apple leaves during autumnal senescence. *Plant Physiol.* 70:1367-1372.

4. Klerk, H., S. Tophof and L. C. Van Loon. 1992. Synthesis of proteins during the development of the first leaf of oat (*Avena sativa*). *Physiol. Plant.* 85:595-605.

5. Krul, W. R. 1974. Nucleic acid and protein metabolism of senescing and regenerating soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 54:36-40.

6. Lamattina, L., R. P. Lezica and R. D. Conde. 1985. Protein metabolism in senescing wheat leaves. *Plant Physiol.* 77:587-590.

7. Lee, S. G., S. I. Shim, and B. H. Kang. 1995. Changes in photosynthetic rate and protein content in the leaf during the senescence of tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.). *J. Kor. Soc. Tob. Sci.* 17:20-26.

8. Nooden, L. D. and A. C. Leopold. 1988. Senescence and aging in plants. Academic Press, pp 2-171.

9. Schuster, A. M. and E. Davis. 1983. Ribonucleic acid and protein metabolism in pea epicotyls. *Plant Physiol.* 73:809-816.

10. Peterson, L. W. and R. C. Huffaker. 1975. Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiol.* 55:

- 1009-1015.
11. Rogers, S. O. and A. J. Bendich. 1988. Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publisher A6:1-10.
 12. Van Loon, L. C., H. C. P. M. Van Der Valk, A. J. Haverkort and G. L. Lokhorst. 1987. Changes in protease activity in leaves during natural development and accelerated aging upon detachment. *J. Plant Physiol.* 127:339-353.
 13. Wittenbach, V. A., R. C. Ackerson, R. T. Giaquinta and R. R. Hebert. 1980. Changes in photosynthesis, ribulose bisphosphate carboxylase, proteolytic activity and ultrastructure of soybean leaves during senescence. *Crop Sci.* 20:225-231.