

## 무우의 유자엽에서 Polyamine의 수송 분석

조 봉 회

수원대학교 자연과학대학 생명과학부  
(1997. 9. 4 접수)

### Analysis of Polyamine Transport of Young Spring Radish Cotyledons

Bong-Heuy Cho

Division of Life Science, University of Suwon, Suwon 445-742, Korea  
(Received September 3, 1997)

**요 약:** 봄무우의 어린자엽을 이용하여 polyamine의 수송을 분석하였다. Spermidine(SPD)은 20분까지는 빠른 속도로 세포내로 수송되었고, 1시간 이후에는 포화상태에 도달하였다. SPD의 수송속도는 세포내에 polyamine(PA)의 농도가 증가될수록 감소되었다. PA의 수송속도는 외부배지의 pH에 의존되었고, 수송속도는 pH 7.5에서 최고에 도달되었다.  $K_m$ -과  $V_{max}$ -값도 외부 배지의 pH에 의존되었다. KCl은 세포막전위를 낮추어 PA의 수송을 방해하였다.

**Abstract:** Polyamines were analyzed in young cotyledons of spring radish. The uptake rate of SPD were transported within 20 min lineary and reached the saturation phase after 1hr. The uptake rate of SPD decreased gradually with the time by the increasing amount of SPD inside the cells. The uptake of PA depends on the external pH. The optimal pH of PA uptake are pH 7.5.  $K_m$ - and  $V_{max}$ -values depend on external pH also. The uptake rate of PA was inhibited by external KCl, which depolarized membrane potential in the cells.

**Key words :** spring radish, polyamine, spermidine, transport

#### 1. 서 론

Polyamine(PA)은 분자구조내에 질소를 함유하고 생리적인 pH에서 양전하를 띤 물질로서 식물 성장 조절에 관여하고 있다.<sup>1</sup> PA는 생체내에서는 유리된 상태로 존재하거나 또는 polyphosphate, DNA, 단백질, 세포벽과 결합된 상태로 존재하여,<sup>2</sup> 여러 다양한 기능을 발휘하는 것으로 알려져 있다. PA는 식물체 내에서 세포분열을 촉진시키고, 식물의 성장과 분화에 지대한 영향을 미친다.<sup>1,3-5</sup> 담배식물에서 PA은 꽃이 피고, 꽃봉우리를 형성하는데 관여하고,<sup>2,7</sup> spruce 나무에서는 생체내에 존재하는 PA의 농도가 계절적으로 변화하는 것이 관찰되었고,<sup>8</sup> 이 계절적인 PA농도의 변화는 식물의 성장과 분화에 밀접한 관련이 있었다.<sup>9</sup> 고구마 원형질체에다 PA를 첨가하면, 외

부 배지에 존재하는 PA가 고구마의 성장을 촉진하였다.<sup>10</sup>

외부배지에 첨가된 PA가 그 기능을 발휘하려면, PA이 일단 세포내로 수송되어야 한다. 그러나 PA의 생체내에 수송에 대한 연구는 매우 저조한 상태다. 현재까지의 PA 수송에 대한 정보는 PA의 수송이 pH와 밀접한 관련이 있고,<sup>11-12</sup> PA의 종류와 식물에 따라서 PA는 촉진 확산 또는 능동수송으로 생체내에 수송되었다. PA은 양전하를 띄우고 있으므로 외부배지의 pH에 변화에 따라 PA의 수송 kinetic도 변화되리라 기대된다.

본 연구에서는 무우의 어린 자엽을 이용하여 PA의 수송을 분석하고, PA의 수송속도, PA의 수송 속도의 미치는 pH의 영향, PA의 kinetic 등 PA 수송에 대한 기본적인 정보를 얻는 것이 그 목적이다.

**2. 실험방법**

**2.1. 기기 및 시약**

분석에서 사용한 기기는 cold microcentrifuge (VS-1500, CF, Vision Scientific Co., Ltd), lab chamber(KMC-12021, Vision Scientific Co., Ltd)와 liquid scintillation counter(Beckman, LS 9000)이다.

**2.2. 실험재료**

실험재료로 사용한 장춘 대형 봄무우(F1 spring White)는 서울 종로에서 구입하였다.

**2.3. 발아조건**

종자에 붙어 있는 불순물을 제거하기 위해 종자를 2% NaOCl에서 10분간 소독한 후 흐르는 물에서 하룻밤 씻었다. 소독된 종자는 비커에 스폰지를 이중으로 깔고 그 위에 소독된 여과지를 깔 후 종자를 여과지 위에 놓아 물을 충분히 빨아 들일 수 있게 하였고, 심은 후 20℃ 암소에서 3일간 발아시켰다. 물은 매일 일정량을 규칙적으로 주었고, 습기를 일정하게 유지시켜 주어 발아 조건을 균일하게 하였다.

**2.4. Polyamine 수송의 측정**

발아된 무우 자엽은 자른 후 정확히 0.5g의 무게를 재어서 citrate-phosphate(pH 4~7) 완충액과 trizma-HCl(pH 7~9) 완충액에 넣어 온도를 20℃로 유지시켰다. 측정하려는 PA의 농도범위는 0.2~3 mM이고, PA 수송의 측정은 방사성 동위원소 [<sup>14</sup>C]-spermidine과 [<sup>14</sup>C]-putrescine(PUT) 0.5 kBq·mL<sup>-1</sup>에 다 측정하려는 농도의 방사성 동위원소가 아닌 PA를 혼합하여 측정하려는 자엽이 들어 있는 준비된 배지에 PA를 가하므로서 PA의 수송을 출발시켰다.<sup>3</sup> 일정한 간격으로 자엽을 꺼내서 cold PA가 들어 있는 얼음같이 찬 완충액으로 씻은 후 즉시 scintillation vial에 넣어서 세포로 수송된 PA의 농도를 측정하였다.

**2.5. KCl의 처리**

KCl을 세포에 처리하면 세포막 전위를 탈분극시킨다(미발표된 연구결과). 따라서 KCl을 PA 수송을 측정하기 20분전에 30 mM, 100 mM, 200 mM를 처리하였다. 세포에다 전처리하여 세포막 전위를 탈분극

시킨 후(미발표된 연구결과), PA 수송을 2.4와 같은 방법으로 측정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. Polyamine의 세포내로 수송**

무우를 재료로 하여 PA수송의 측정은 처음 시도하는 연구로, 우선 시간당 세포내로 수송되는 SPD의 양을 측정하였다(Fig. 1). SPD는 처음에는 급속도로 수송되다가 시간이 경과함에 따라서 수송속도가 점차로 감소되었고, 1시간 후에는 포화상태에 도달하였다. 이 결과는 PA의 수송이 단순한 확산으로 진행되는 것이 아님을 보여 주고 있다. SPD의 수송속도는 시간에 경과에 따라서 감소되었다(Table 1). 이 결과는 세포내로 이미 수송된 PA이 세포내에 축적되어 세포막을 통해서 수송되는 다른 PA의 수송을 방해하거나,<sup>14</sup> 또는 SPD의 양전하가 세포막 전위를 탈분극시켜서 PA의 수송속도의 감소를 초래할 것으로 추정한다.

**3.2. Polyamine 수송에 대한 pH의 영향**

SPD와 PUT의 수송속도는 주어진 외부 pH에 따라서 변화되었다(Fig. 2). PA수송에 대한 최적 pH는 7.5였다. PA의 아미노기는 산성 pH에서는 양전하를 띄우나, 알칼리성으로 갈수록 배지에다 수소이온을 잃고 중성상태로 존재하게 된다. PA의 수송이 주어진

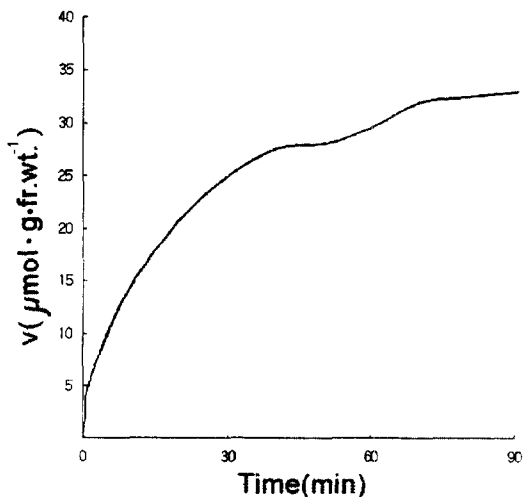


Fig. 1. The spermidine uptake of cotyledon of spring radish according to the time at 1mM spermidine concentration.

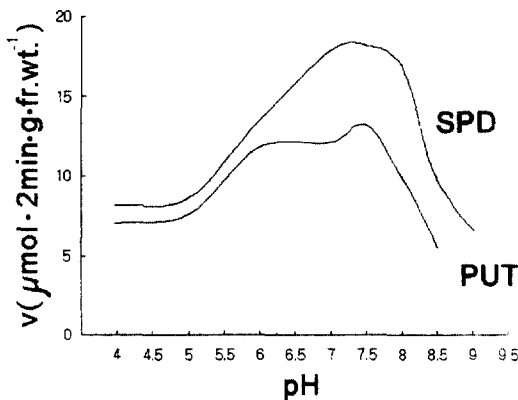
**Table 1.** The uptake rate of spermidine with the increasing time. **Table 1** showed the decreased uptake rate of spermidine with the time by the increasing amount of spermidine inside the cells. 1 mM of non-labeled spermidine was preincubated at the selective time. The spermidine was removed from the medium. The cotyledons were resuspended and was measured the uptake rate of spermidine

Time (min)	Flux rate ( $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ )
0.1	$600 \pm 0.25$
5	$118 \pm 0.26$
10	$77 \pm 0.15$
20	$74 \pm 0.32$
30	$48 \pm 0.27$
40	$41 \pm 0.22$
50	$35 \pm 0.36$
60	$30 \pm 0.13$

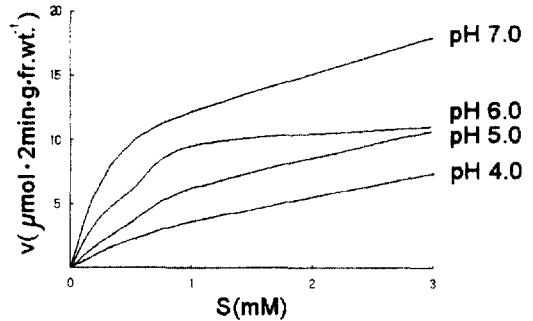
pH에 따라서 어떤 형태로 수송되는지에 따라서 PA의 수송속도가 좌우될 것이다. 무우의 어린 자엽에서 PA의 수송은 pH에 의존되었다(*Fig. 2*). PA에 수송에 대한 pH의 영향은 식물과 PA의 종류에 따라서 차이를 보이고 있다.<sup>11-13</sup> 사과나무에서 PA의 수송은 pH 5.0과 pH 8.0에서 두 번 최적 pH를 나타내었다.<sup>11-12</sup>

**3.3. Polyamine 수송에 대한 kinetic의 분석**

PA의 수송이 pH에 의존되므로(*Fig. 2*), 외부 배지에 주어진 pH에 따라서 PA수송에 대한 kinetic도 변화될 것으로 추정된다. SPD의 수송 kinetic은 pH에



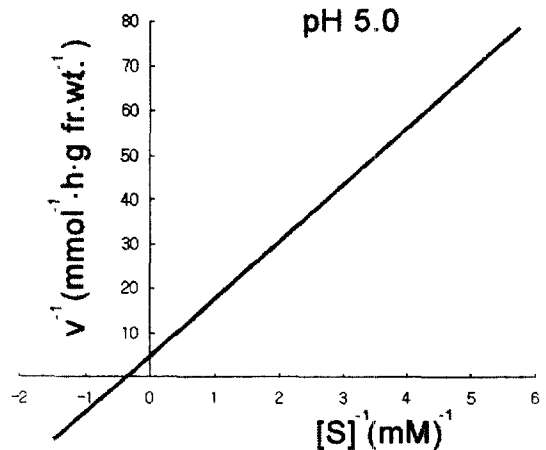
**Fig. 2.** The uptake rate of polyamine at the various pH values. The used polyamines were spermidine and putrescine with 1 mM concentration. The buffer system was citrate-phosphate and trizma-HCl (pH 4.0~9.0).



**Fig. 3.** The uptake rate of spermidine at various pH values and concentration. The buffer system was citrate-phosphate, and trizma-HCl. The uptake studies were performed with the 1 mM concentration of spermidine.

따라서 다음을 보여주었고, pH 5.0보다는 pH 7.0에서 PA의 수송속도가 더 증가되었다(*Fig. 3*).

pH 5.0과 pH 7.5에서 측정된 Lineweaver-Buker로 도시하면(*Fig. 3, 4*), 두 pH 범위에서  $K_m$ 값과  $V_{max}$ 값이 전혀 차이를 알 수 있다. 이 결과를 *Table 2*에 나타내었다. pH 4.0~5.0과 pH 7.5와 비교하여 나타나는  $K_m$ 값의 차이는 이들 pH에서 PA를 수송하는 운반자의 친화도가 다음을 보여주고 있는 흥미로운 결과이다. pH에 따라서 변화하는 PA의  $K_m$ 값의 변화는 사과에서 측정된 결과와 유사하였다.<sup>12</sup>  $K_m$ 값은 외부 pH에 증가에 따라 PA에 대한 친화도가 증가되었으나,  $V_{max}$ 값은 외부 pH의 값이 증가할수록 증가되었다 (*Fig. 5, Table 2*). 이 결과로 보아 PA의 수송은



**Fig. 4.** The kinetic of the spermidine uptake of cotyledons of spring radish at various spermidine concentration. The spermidine uptake was performed at pH 5.0.

Table 2.  $K_m$ -values of spermidine influx at the different pH-values. The used buffer system was citrate-phosphate. The concentration range of spermidine was between 0.2~3 mM. The experiment was repeated three times

pH	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ )
4.0	$2.50 \pm 0.25$	$115 \pm 1.25$
5.0	$1.82 \pm 0.15$	$116 \pm 0.45$
7.5	$0.34 \pm 0.14$	$272 \pm 0.84$

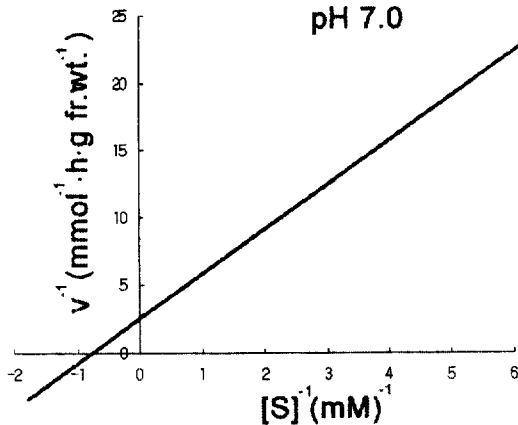


Fig. 5. The kinetic of the spermidine uptake of cotyledons of spring radish at various spermidine concentration. The spermidine uptake was performed at pH 7.0.

전하를 갖지 않는 중성상태로 수송될 것임을 추측할 수 있다. SPD분자구조를 보면  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ 로 정확한 pK값은 알 수 없지만, SPD의 3개의 아미노기의 pK값이 9.20 이상일 것이다. 그 이유는 PUT의 아미노기의 pK값은 pK<sub>1</sub>이 9.35이고, pK<sub>2</sub>는 10.82이다. 그러므로 SPD의 아미노기는 생리적인 pH 하에서는 전부 전하를 띄우게 된다. pH의 증가와 함께  $K_m$ 값의 감소는 SPD의 아미노기가 수소이온 농도가 감소됨에 따라 전하를 배지에 내어주고, 자신은 전하를 갖지 않는 상태로 존재하게 될 것이다. 그러므로 pH가 증가될수록 배지에는 전하를 갖지 않는 PA의 형태가 증가되고, PA은 전하를 갖지 않는 상태로 수소이온과 동반수송으로 세포 내로 수송될 것이다.

### 3.4. Polyamine 수송에 미치는 KCl의 영향

PA이 전하를 갖지않는 상태로 생체내에 수송된다면, PA의 수송은 생체막 전위에 영향을 받지 않을 것이고, 전하를 동반한 상태로 수송될 경우 생체막전위

Table 3. Effect of KCl on the uptake of spermidine. The cotyledons were preincubated with KCl for 20 min before the uptake was performed

Treatment	Uptake rate ( $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{g} \cdot \text{fresh weight}^{-1}$ )	% of control
-KCl	110	100
+ 30 mM KCl	119	103
+100 mM KCl	90	78
+200 mM KCl	58	54

에 영향을 받을 것이다. 식물에다 물질수송 10분전에 KCl를 처리하면, 세포막 전위가 탈분극되었다(미발표된 결과 중). 일반적으로 생체막 전위에 탈분극은 물질에 능동수송을 방해하는 결과를 초래한다. 생체막 전위에 탈분극은 50 mM KCl를 처리하면 -50 mV 정도 탈분극되었다(미발표된 결과 중). 따라서 무우의 자엽에다 KCl를 20분간 전처리하여 생체막의 탈분극을 유도하였다. 그 후 PA의 수송을 보면(Table 3), PA의 수송이 KCl에 의해 방해당했음을 알 수 있다. 이 결과는 PA의 수송은 막전위에도 의존됨을 보여주는 결과다.

### 감사의 글

본 연구는 1996-1997년도 기초과학연구소교육부 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. P. T. Evans and R. L. Malmberg, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 235(1989).
2. P. Torrigiani, M. M. Altmura, G. Pasqua, B. Monacell, D. Serafkni-Fracassini and N. Bagniv, *Physiol. Plant*, **70**, 453(1987).
3. A. A. Fienberg, J. H. Choi, W. P. and Z. R. Sung, *Planta*, **162**, 532(1984).
4. R. Friedman, A. Altman and U. Bachrach, *Plant Physiol.*, **79**, 80(1985).
5. R. Kaur-Sawhney, A. F. Tiburcio and A. W. Galston, *Planta*, **173**, 282(1988).
6. A. F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney and A. W. Galston, *Plant Cell Physiol.*, **7**, 241(1988).
7. R. Biasi, N. Bagni and G. Costa, *Physiol. Plant*, **72**, 201(1988).
8. H. Konigshofer, *J. Plant Physiol.*, **134**, 736(1989).

9. R. J. Ellers, J. G. Sullivan and R. M. Skirvin, *Plant Cell Report*, **7**, 216(1988).
10. E. M. Meijer and J. Simmonds, *J. Exp. Bot.*, **39**, 787(1988).
11. N. Bagni and R. Pistocci, *Plant Physiol.*, **77**, 398(1985).
12. R. Pistocci, R. N. Bagni and S. A. Creus, *Plant Physiol.*, **80**, 556(1986).
13. H. M. Harrington and R. R. Hinke, *Plant Physiol.*, 373(1981).
14. B. H. Cho, *Kor. Soc. Plant Tissue Culture*, **16**, 195(1989).