

Streptanthus tortus 자엽의 배양세포에서 사부세포 발달동안 Sucrose 능동수송계의 유도 시기

조봉희*

수원대학교 자연과학대학 생명과학과 기능성생명소재연구소

The Induction Time of Sucrose Active Transport System during the Phloem Cell Development in Suspension Cultures of *Streptanthus tortus* Cotyledon

Bong-Heuy Cho*

Center for Smart Bio-Material Department of Life Science, The University of Suwon, Suwon 445-890, Korea

ABSTRACT Parenchyma cells of *Streptanthus tortus* suspension cultures possessed the different transport system for aldose-formed D-glucose and for ketose-formed D-fructose. K_m value for D-glucose and D-fructose were 0.28 mM and 15.02 mM, respectively. K_m value of D-mannose was 0.44 mM which is similar to the D-glucose transport system, but D-mannose was transported also through its own special uptake system. Parenchyma cells possessed the transport system of L-glucose, but the function of L-glucose was not known at all. Protoplast of parenchyma cells possessed only the monosugars transport system, but didn't possess the disugars, sucrose transport system. Early developing phloem protoplasts possessed glucose and sucrose transport system at the same time. On the contrary, in the complete developed phloem cells disappeared preexisted glucose transport system in the parenchyma cells, only new induced sucrose transport system existed.

Key words: Cotyledon, phloem, sucrose active transport, suspension

서 론

당류 능동수송에 대한 연구는 단세포 녹색생물인 *Chlorella* (Komor 1973; Cho et al. 1981), *Ricinus* 자엽 (Komor 1977; Cho and Komor 1985), *Ricinus* 자엽 조직배양세포 (Cho and Komor 1985)와 배추과 자엽의 조직배양세포 (Cho 1987, 2000) 등에서 수행되었다.

단세포 생물인 *Chlorella*는 glucose인 단당류는 유도 가능한 고유한 육탄당 능동 수송계를 통해서 세포 내로 능동 수송되었으나 (Cho et al 1981), sucrose 같은 이당류는 생체막에 존재하는 이당류 능동 수송계가 결여되어 생체 내로 직접 수송될 수 없다 (Tanner 1969).

고등 식물인 *Ricinus* 자엽에서는 단세포 생물과는 정반대로 설탕은 고유한 설탕 능동 수송계를 통하여 생체 내로 능동 수송되나, 단당류는 생체막에 단당류 능동 수송계가 존재하지 못하여 생체막을 통한 능동 수송은 실행될 수 없다 (Komor 1977). 그러나 *Ricinus* 자엽 조직배양세포에서는 단당류는 고유한 단당류 능동 수송계를 통해서 생체 내로 수송되나, 이당류인 sucrose는 생체막을 통하여 직접 능동 수송되지 못하고, 생체막과 세포벽 사이에 빈 공간인 자유 공간에 존재하는 산성 invertase (Humphreys and Echeverria 1984)에 의하여 일단 가수분해 된 후 단당류인 포도당과 과당의 고유한 능동 수송계를 통해서 생체 내로 수송된다 (Cho and Komor 1985).

Ricinus 자엽 조직배양세포에서 설탕의 수송은 포화 부분과 직선 부분의 두 가지 양상을 나타내나 (Cho and Komor 1985), 직선 부분은 다만 기질이 고농도로 배지에

*Corresponding author Tel 031-220-2482 Fax 031-222-9385
E-mail bhcho@suwon.ac.kr

존재할 때만 나타난다 (Cho 1987). 식물체와 같은 식물에서 유래된 조직배양세포는 서로 다른 당류 능동 수송계를 소유하고 있으며, 당류 능동 수송계는 그들의 환경이 변화되면, 그 환경에 적합한 새로운 단백질을 유도시켜서 적응할 수 있는 능력을 소유하고 있다 (Komor 1977; Cho and Komor 1985; Cho 1987).

식물의 어떤 부위로부터 캘러스가 유도되었는지 간에 조직배양세포는 유조직의 특성을 지니고, 유조직 세포는 다당류 능동 수송계만 소유하고 있다 (Cho 1987). 그러나 캘러스로 유도된 유조직 세포를 분화 유도용 배지로 옮기면, 6일 이내에 유조직 세포로부터 사부가 유도되기 시작하여 2주 정도면 사부로 완전히 분화되고, 발달된다 (Cho 1996). 사부가 유도된 후 사부 원형질체와 유조직 원형질체를 순수 분리하여 단당류와 이당류의 능동 수송계를 분석한 결과에서는 유조직 원형질체에는 단당류 능동 수송계가 존재하고, 사부 원형질체는 단당류 능동 수송계는 사라지고, sucrose 능동 수송계가 새로이 유도되었다 (Cho 1998). 그렇다면, 유조직 세포를 사부 유도 배지로 옮긴 후 어느 시점에서 단당류 능동 수송계가 사라지고, 이당류 능동 수송계가 유도되는 것일까? 또는 사부의 발달과 함께 이당류 능동 수송계가 유도되어 어느 시점까지는 단당류 능동 수송계와 이당류 능동 수송계가 동시에 공존하다가 사부가 완전히 분화되고 난 후에 단당류 능동 수송계는 그때에 사라지는 것일까? 또는 같은 단당류 능동 수송계가 어느 시점에 이당류 능동 수송계로 전환되는 것일까? 이러한 질문의 해답을 얻기 위해서는 원형질체를 이용하여 산성 invertase로 기인된 설탕이 가수분해 되어 환원당으로 능동 수송되는 것을 차단한다면, 추적이 가능할 것이다. 유조직을 사부 분화배지로 계대배양 하기 전과 계대배양 후 초기에 사부의 분화 동안과 사부의 발달 시기에 원형질체를 분리하여 단당류와 이당류의 능동 수송계를 추적하여, 사부분화 단계에서 단당류의 능동 수송계와 이당류 능동 수송계를 분석하여, 사부분화과정에서 새로운 당류의 수송계의 합성 시기를 알고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 배양조건

배추과 *Streptanthus tortus*의 조직배양세포는 자엽에서 유도하였다. MS (Murashige and Skoog 1962) 기본배지에 다 4 mg/L의 2,4-D를 첨가한 배지를 사용하여 유도시켰고, 액체배지는 동일배지에 2 mg/L 2,4-D 를 첨가하여 사용하였다. 액체배양은 100 mL 삼각 플라스크를 이용하여 25°C 암소에서 200 rpm으로 진탕배양 하였고, 특별한 언급이 없는 한 2주에 한번씩 5 mL를 취하여 새로운 배양액에 주입

하여 계대배양 하였다. 유도된 캘러스 5 g을 MS 기본배지에다 2 mg/L의 2,4-D, 0.1 mg/L NAA와 1 mg/L의 kinetin 이 함유된 사부분화 액체배지에서 사부를 유도시켰다.

당류 능동수송의 측정

당류의 능동 수송은 계대배양 후 최대 성장기의 배양세포를 사용하였다. 세포를 사용하기 하루 전에 영양분의 고갈을 방지하기 위해 새로운 배지로 교체하였다. 여과지로 걸러 모아진 세포에 남아 있는 당류를 제거하기 위해서 당류가 제거된 배지로 세척한 다음 세포 1 g을 25 mM 인산 완충용액 (pH 6.0) 10 mL에 현탁한 다음 25°C에서 안정화 시켜 주었다. 사용한 방사선 동위원소는 독일 바이로이트 대학 Dr. Prof. Komor로부터 제공받은 것으로 사용하였다. 능동 수송 실험은 0.2 μ Ci의 14 C-U-sucrose, 0.14 μ Ci의 14 C-D-glucose, 0.2 μ Ci의 14 C-L-glucose와 0.2 μ Ci의 14 C-mannose에다 실험 목적에 따라 표지 되지 않은 각각의 당류를 다양한 농도로 (0.05 mM~1 mM) 잘 희석한 다음 세포에다 직접 첨가함으로써 측정하였다 (Cho 1987). 30초 간격으로 1 mL의 시료를 꺼내서 즉시 여과시키고, 각 시료를 냉각된 같은 당류로 씻은 다음 세포 내로 수송된 당류를 측정하였다.

당류의 K_m 과 V_{max} 의 측정

당류 운반자의 kinetic을 알기 위해서 K_m 값과 V_{max} 의 값을 측정하였다. K_m 과 V_{max} 의 값은 당류 농도에 의존하는 능동 수송 속도를 측정하여 결정하였다. 측정 방법은 위에 설명한 당류의 능동 수송 속도 측정방법과 마찬가지로 당류를 준비하여 능동 수송을 측정하였다. 측정에 사용한 농도 범위는 0.05 mM~1 mM이다. 능동 수송 속도를 측정할 결과로부터 double-reciprocal plot에서 K_m 과 V_{max} 의 값을 구하였다 (Cho 1987).

원형질체의 분리와 사부세포의 분리와 정제

조직배양 세포 1 g을 소독된 0.9 M sorbitol과 mannitol로 1시간 동안 전 처리한 다음 해리용 배지 [0.9 M sorbitol과 mannitol, 2 mM CaCl₂, 0.5 mg/mL BSA, 5 mM 인산나트륨 완충액, (pH 6.0)] 10 mL에 0.2% macerace (Cal Biochem), 0.03% cellulase (Cooper), 0.02% pectinase (Cooper), 0.02% rohadmet (Rdehm GmbH)와 proteinase inhibitor로 2 μ g/mL가 들어 있는 배지에서 3시간 해리시킨 다음 200 μ m 나일론 망을 통과시켜서 망 위에 있는 해리 되지 않은 세포들을 제거하였다. 망을 통과한 세포는 다시 70 μ m 나일론 망을 통과시킨 다음 효소가 제거된 해리용 용액으로 3회 세척하였다. 다시 150 μ m을 통과시키면 망 위에는 사부와 목부가

덩어리만 남고 원형질체는 망을 통과하게 된다. 망 위에 있는 사부는 실험 목적에 따라 해리용 배지에서 30분 해리 시키거나 효소가 없는 해리용 배지로 여러 번 세척한 다음 실험에 사용한다.

결과 및 고찰

당류의 능동 수송계

Streptanthus 조직배양 세포에서, D-glucose와 D-fructose는 같은 능동 수송계를 통해서 세포 내로 수송되는지 또는 각기 다른 수송계를 소유하는지를 알기 위해서 단당류의 능동 수송 kinetic을 분석하였다 (Table 1). 결과는 aldose형태인 D-glucose와 kotose형태인 D-fructose는 각기 다른 고유한 능동 수송계를 소유하고 있음을 알 수 있었다.

조직배양 세포는 유조직의 특성을 지니므로 당류는 단당류의 환원당 형태인 glucose와 fructose로 생체 내로 수송한다 (Cho 1987). *Ricinus* 자엽과 *Ricinus* 자엽에서 유도된 조직배양세포를 비교하면, 자엽에 있었던 이당류 능동 수송계는 자엽 조직배양세포에서는 완전히 사라지고, 대신 단당류 운반자가 새로이 유도되었다 (Cho and Komor 1985). 그러나 배추과 조직배양세포에서 유조직 세포로부터 분화된 사부세포에서는 유조직 세포에 존재하였던 단당류 능동 수송계는 다시 사라지고, 이당류인 sucrose 능동 수송계가 새로이 유도되었다 (Cho 1998).

같은 단당류임에도 불구하고, glucose보다는 fructose의 능동 수송이 각각의 능동 수송계에 대하여 매우 낮은 친화도를 지님을 알 수 있었다. 대개의 생명체는 glucose을 fructose보다는 우선적으로 선호하는 경향이 있는 것으로 알고 있다. D-glucose와 D-mannose의 K_m 값은 각각 0.28 mM 과 0.44 mM로 매우 유사한 친화도를 나타내어서 두 화합물은 같은 능동 수송계를 통하여 생체 내로 수송될 것으로 추정되었다. 살아 있는 생명체, 특히 고등 생명체는, 자연 상태에서 주로 D-form의 당류를 선호한다는 것은 이미 알려져 있다. 그러나 *Streptanthus* 조직배양세포는 L-form의 glucose도 그들의 고유한 수송계를 소유하고 있었다. L-form glucose의 고유 능동 수송계에 대한 친화도는 K_m

값이 8.33 mM로 D-form glucose의 당류 수송계보다는 수송계에 대한 친화도가 매우 낮았으나, 같은 D-form의 당류인 fructose보다는 수송계에 대한 친화도가 훨씬 더 높음을 알 수 있었다. 그러나 왜 생체가 L-form의 당류를 생체 내로 수송하는지는 의문이고, L-form의 대사 과정에 대한 생화학적인 회로는 아직 설명되지 않은 것으로 알고 있다. L-form의 당류의 능동 수송계가 존재한다는 의미는 무엇인가 어떤 대사나 또는 생체에 어떠한 역할이 있지 않을까 하는 의심이 생기며, 앞으로 연구할 수 있는 과제로 간주된다. 이당류인 sucrose는 조직배양세포에서는 사실은 단당류 형태로 생체 내로 수송되므로, sucrose에 대한 K_m 과 V_{max} 값은 포도당과 과당과는 다른 kinetic을 보이는 것은 당연하다. sucrose의 K_m 값은 실제로는 포도당과 과당이 혼합된 kinetic이다.

포도당은 미생물에서부터 고등 생체에 이르기까지 생체 내에서는 에너지 생산에 주요 원료가 된다. 그러나 glucose와 epimer 관계에 있는 mannose의 능동 수송계에 대하여는 거의 연구가 되어 있지 않았다. Mannose는 glucose와 같은 aldose 형태로 되어 있으므로 glucose와 같은 능동 수송계를 통하여 생체 내로 수송될 수 있을지도 모른다. 그러나 mannose에 대한 실험 결과는 glucose와는 다른 고유한 능동 수송계를 소유하고 있었다 (Figure 1). 고등 식물이 환원당의 aldose 형태의 단당류끼리도 서로 다른 고유한 능동 수송계를 선천적으로 소유하고 있었다. 진화적인 면에서 고찰하면, 당류의 능동 수송계는 아미노산 능동 수송계와는 다르게 간소화되는 경향이 조금 부족한 것 같다. 아미노산 능동 수송계는, 하등 생명체에서 고등 생명체로 진화될수록 20개의 아미노산 능동 수송계가 매우 간소화되는 경향으로 진화되는 것과는 대조적이다 (Oxender 1972; Cho and Komor, 1985; Robinson and Beevers 1981; Cho 1983;

Table 1. The K_m and V_{max} of sugars.

Sugar	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g fresh weight}$)
D-glucose	0.28	6.06
D-fructose	15.02	25.00
D-mannose	0.44	5.26
L-glucose	8.33	3.33
D-sucrose	0.80	5.01

Sugars were used at concentration of 0.05 mM - 1 mM

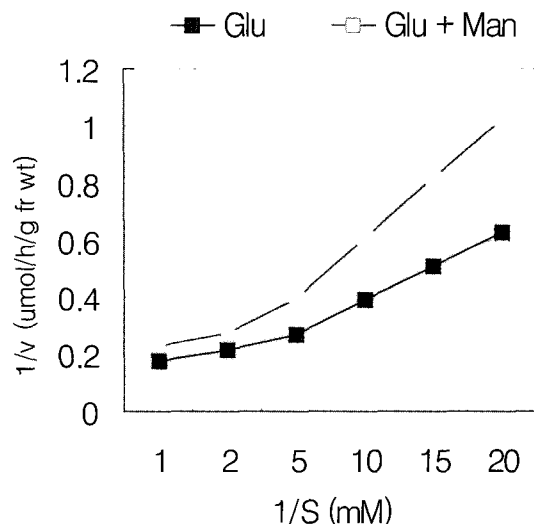


Figure 1. Inhibition test during the uptake of D-glucose with the concentration of 1 mM D-mannose.

Cho and Komor 1985; Wyse and Komor 1989). 아미노산 능동 수송계는 진화적으로 간소화되면서 하나의 아미노산 능동 수송계가 multiphasic한 특성을 나타내는 현상을 나타낸다 (Nissen 1978). 당류 능동 수송계에서도 multiple한 능동 수송계가 나타나지만 (Cho 1987), 아미노산보다는 훨씬 단순한 특성을 가진다.

앞으로 mannose에 대한 능동 수송계에 대한 연구와 mannose가 생체 내로 수송된 다음 어떤 대사 과정을 경유하는지, 또는 음식물로 glucose와 mannose가 배지에 동시에 존재할 때 이 식물은 어떤 양분을 선호하는지에 대한 연구도 관심 있는 영역이라고 본다.

사부전환 과정에 있는 세포에서 능동 수송계의 분석

식물 유조직 세포를 사부 유도배지로 옮기면 사부가 유도된다 (Cho 1996). 완전히 유도된 사부세포에서는 단당류 능동 수송계는 사라지고, sucrose 능동 수송계가 새로 유도되었다 (Cho 1998). 유조직 세포로 분화하는 동안 어느 시기에 이당류 능동 수송계가 유도되는지 또는 어느 시점까지 두 종류의 당류 수송계가 서로 공존하는지를 알고자 하였다. 세포의 자유 공간에 있는 산성 invertase의 활성을 막기 위해서 유조직 원형질체와 사부 원형질체 및 사부세포를 이용하여 당류들의 능동 수송을 측정하였다 (Table 2). 유조직 세포에서 사부로 발달되는 동안에서, 초기에는 유조직 원형질체처럼 사부 원형질체가 둥근 모양이나 사부가 완전히 발달되면 사부 원형질체보다는 사부세포로 길게 존재하여 사부세포에 분리가 더 간결하였다 (Cho, 1998).

유조직 원형질체는 단당류인 glucose는 능동 수송하나 이당류인 sucrose는 능동 수송하지 못하였다 (Table 2). 그러나 사부 유도배지에 유조직 세포를 옮긴 다음 4일 째에 얻어진 사부세포의 사부로 분화가 시작된 미분화된 사부 원형질체는 단당류와 이당류의 능동 수송계를 모두 소유하고 있었다. 이 시기에 원형질체는 다양한 사부 발달 시기를 나타내어 균질화가 결여된다는 점이 단점이다. 그리고 사부로 분화가 되는 원형질체는 광현미경에서 분간하기가 어렵고,

Table 2. The K_m and V_{max} of protoplast isolated from phloem developing cells.

Culture days	sugars (5 mM)	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/mL}$ packed cells)
0	D-glucose	0.19±0.14	8.70±1.87
	D-sucrose	nd *	nd
4	D-glucose	0.66±0.36	10.10±2.56
	D-sucrose	0.92±0.58	15.57±4.13
12	D-glucose	nd	nd
	D-sucrose	0.49±0.09	15.86±3.48

* nd means "not detected"

다만 전자현미경으로 핵막, 사부 단백질, sieve endoplasmic reticulum (SER)의 변화를 보고 알 수 있을 정도다 (Cho 1996). 원형질 세포로부터 사부로 분화로 되는 시기에 이미 이당류의 운반자가 합성이 되는 것이다. 핵막의 변화가 생기는 시기에 사부 단백질, SER의 합성이 시작되는데 (Cho 1966), 이때에 이당류 수송계도 같이 합성되고, 이당류의 수송계가 완전히 합성되면, 단당류의 수송계는 사라지는 것으로 판단된다. 이당류는 사부세포가 완전히 발달된 후 사부세포만을 순수하게 분리한 세포에서는 단당류 능동 수송계는 사라지고, 이당류 능동 수송계만이 존재하였다. 이당류의 K_m 값은 0.49 mM로 수송계에 대한 친화도가 상대적으로 높았다.

적 요

유조직 세포들은 aldose인 D-glucose ketose인 D-fructose에 대하여 다른 능동 수송계를 소유하고 있었다. D-glucose와 D-fructose 수송계의 K_m 값은 각각 0.28 mM과 15.02 mM이었다. D-mannose는 K_m 값이 0.44 mM로 D-glucose와 유사하였지만, 그러나 D-glucose와는 다른 수송계를 소유하고 있었다. L-glucose도 고유한 수송계를 통하여 세포 내로 수송되었으며, 그러나 그 기능을 전혀 알지 못하고 있다. 유조직 원형질체는 단당류 능동 수송계만을 소유하고, 이당류인 sucrose 능동 수송계는 소유하지 않고 있었다. 발달 초기단계에 있는 사부 원형질체는 glucose와 sucrose 수송계를 동시에 소유하고 있었다. 완전히 발달된 사부세포에서는 이미 존재하였던 glucose 능동 수송계는 사라지고, 새로 유도된 sucrose 능동 수송계만 존재하는 것으로 측정되었다.

인용문헌

Cho BH (1983) Mechanism of proline uptake by *Chlorella*. *Planta* 162: 23-39

Cho BH (1987) Analysis of the low affinity system of the uptake of fructose in suspension culture cells. *Kor J Bot* 30: 277-285

Cho BH (1996) Phloem differentiation of cell culture of *Streptanthus*. *Kor J Plant Tiss Cult* 23: 107-111

Cho BH (1998) Isolation of phloem cell and active transport of sucrose by isolated phloem and parenchyma cells of *Streptanthus tortus* suspension culture. *Kor J Plant Tiss Cult* 25: 109-112

Cho BH (2000) Effect of sugar starvation on the sugar transport system in suspension cultures of *Streptanthus tortus*. *Kor J Biotechnol* 27: 47-50

Cho BH, Komor E (1985) Comparison of suspension cells and cotyledons of *Ricinus* with respects to sugar uptake.

- J Plant Physiol 118: 381-390
- Cho BH, Sauer N, Komor E, Tanner W (1981) Glucose induced two amino acid transport system in *Chlorella*. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3591-3594
- Humphreys T, Echeverria E (1984) Invertase and maltase in the free space of the maize scutellum. Phytochemistry 19: 189-193
- Komor E (1973) Proton coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. FEBS Lett 38: 16-18
- Komor E (1977) Sucrose uptake by cotyledon of *Ricinus communis* L.: Characterization, mechanism and regulation. Planta 47: 1498-1502
- Murashige RD, Skoog E (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 161: 109-417
- Nissen P (1978) Multiphasic uptake of amino acid by barley roots. Physiol Plant 43: 181-188
- Oxender DL (1972) Membrane transport. Annu Rev Biochem 4: 777-814
- Robinson SD, Beevers H (1981) Amino acid transport in germinating castor bean seedlings. Plant Physiol 68: 560-566
- Tanner W (1969) Light driven active uptake of 3-O-methyl glucose via an inducible hexose uptake system of *Chlorella*. Biochem Biophys Res Commu 36: 278-283
- Wyse RE and Komor E (1984) Mechanism of amino acid uptake by sugarcane suspension cells. Plant Physiol 76: 865-870

(접수일자 2004년 3월 13일, 수리일자 2004년 6월 5일)