

# 대두(*Glycine max*) protoplast의 세포벽재생에 대한 benzyladenine의 영향

류기중, 박창규\*

## Effects of benzyladenine on the cell wall regeneration of soybean(*Glycine max*) protoplasts

Key-Zung Riu and Chang-Kyu Park

### Summary

A  $\beta$ -1,3-glucanase of soybean(*Glycine max*) was isolated, and the effects of benzyladenine(BA) on cellular levels of the enzyme content and activity were studied. The effects of BA on callose content in cell wall and wall regeneration of protoplasts were also studied to show promoting effect of cytokinin in cell wall regeneration and to elucidate action mode of cytokinin. The polypeptide of 21KD was identified as  $\beta$ -1,3-glucanase, and the cellular content and activity of this polypeptide were decreased by BA treatment. The callose content in cell wall of callus and the wall regeneration of protoplasts were increased by BA treatment. These results indicate that cytokinin promotes cell wall regeneration by inhibition of callose degradation via decreasing  $\beta$ -1,3-glucanase level in cell.

### 서론

식물의 세포벽은 세포나 조직의 형태를 유지하는 물리적 지지체로서 뿐만 아니라 수분 유지 및 병원균 침입에 대한 물리적<sup>1,2</sup>, 생화학적<sup>3,4,5</sup> 장벽으로서의 기능을 가지고 있다. 세포벽이 손상되면 수분의 유실<sup>6</sup> 또는 세포 대사의 이상으로 인하여 세포가 죽거나 조직의 정상적인 발육이 방해되며<sup>1,7,8,9</sup>, 상처를 통해 미생물이 침입하기 쉬워지기 때문에<sup>10,11,12</sup> 손상된 세포벽을 재생시키는 일은 환경에 대한 식물 스스로의 방어면에서 매우 중요하다.

손상된 세포로부터 재생된 세포벽은 정상 세포의 것과는 다소 다른데 특히 세포벽성분

중 callose 함량에서 차이가 있다. Callose는 정상세포 벽에는 미량으로 존재하지만<sup>13,14</sup> callus세포의 벽이나 protoplast로부터 재생된 세포벽에는 많은 양이 함유되어 있다<sup>13,14,15</sup>. 또 조직의 절단과 같은 기계적 또는 미생물의 침입과 같은 생물적 요인에 의하여 세포가 손상되었을 때 빠른 속도로 합성 된다는 것이 알려져<sup>13,16,17,18,19</sup>, callose는 세포벽의 물리적, 생화학적 기능과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되고 있다<sup>7,8,13,20</sup>.

Callose는 glucose가  $\beta$ (1→3)glycoside linkage로 연결된 glucan의 하나인데, 세포 내에서 주로  $\beta$ -1,3-glucan synthase에 의해 합성<sup>21,22,23</sup>되며  $\beta$ -1,3-glucanase에 의하여 분해<sup>24,25</sup>되는 것으로 알려져 있다.

\* 서울대학교

Cytokinin이 세포벽재생에 관여한 다는 직접적인 증거는 아직 없으나  $\beta$ -1,3-glucanase의 합성이 cytokinin에 의해 조절된다는 보고<sup>15,26)</sup>가 있다. 손상된 세포에 있어서 callose의 합성속도는 물론 합성효소인  $\beta$ -1,3-glucansynthase의 세포내 활동도 수준에 의존되겠지만 분해효소  $\beta$ -1,3-glucanase의 활동도수준에도 영향을 받을 것이라는 점을 감안할 때, cytokinin이 세포벽재생에 영향을 줄 가능성이 있다.

본 연구에서는 benzyladenine(BA)이 대두세포의  $\beta$ -1,3-glucanase 수준과 callose 함량 그리고 protoplast의 세포벽 재생에 미치는 영향을 조사하여 cytokinin이 세포내의  $\beta$ -1,3-glucanase 활동도 수준을 저하시켜 callose분해를 억제함으로써 세포벽재생을 촉진할 수 있음을 보였다.

## 재료 및 방법

### 1. Callus 및 protoplast

대두품종은 Acme였다. 유묘는 cytokinin을 넣지 않은 Miller배지<sup>8)</sup>에서 발아시키고 1주일간키워 사용하였다. Callus는 kinetin (0.5mg/l)이 첨가된 Miller 배지에서 유묘의 자엽절편으로부터 유기시켰고, 현탁배양은 B5배지<sup>27)</sup>에서 하였는데, 모두 27°C암조건으로 하였다.

Protoplast는 현탁배양세포에 효소용액(CaCl<sub>2</sub>: 5mM, sorbitol: 0.55M, Onozuka R-10:2%, Pectolyase Y-23: 0.25%, pH5.5)을 처리(60rpm, 30°C, 4hr)하여 분리했다.

그리고 세포찌꺼기를 nylon mesh(45um)로,

효소용액을 원심분리(80xg, 5min)하여 제거한 뒤 0.6 M sorbitol/0.6M sucrose의 density gradient계에서 원심분리(80xg, 7min)하여 정제하였다<sup>28)</sup>. Protoplast배양은 GA(0.1 mg/l)와 glucose(50g/l)를 첨가한 B5배지에서 하였는데 배양초기의 protoplast밀도는 10<sup>6</sup>/ml였다.

### 2. $\beta$ -1,3-Glucanase의 추출, 정제 및 활동도 측정

0.2M Sodium borate buffer(pH7.6, 4°C)로 세포단백질을 추출하고 acetone(0°C, 최종농도:70%)으로 침전시켜 crude  $\beta$ -1,3-glucanase를 얻었다<sup>29)</sup>. Crude  $\beta$ -1,3-glucanase는 Sephadex G-150 chromatography로 정제하였는데 용매는 citrate buffer(50mM, pH5.0, sodium azide:50mM)를 사용했다. 활동도는 기질용액[laminarin 5mg을 citrate buffer(50mM, pH 5.0, sodium azide:50mM) 1ml에 녹인 것] 1ml를 효소용액 0.5ml에 넣고 30°C에서 2시간 가수분해시켜서 유리되는 환원당의 양으로 측정하였다<sup>29)</sup>. 환원당은 가수분해액에 Miller시약 [1% dinitrosalicylic acid, 0.2% phenol, 1% NaOH, 0.05% sodium sulfite] 1.5ml를 넣고 100°C에서 10분간 환원시켜 560nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다<sup>30,31)</sup>.

### 3. SDS-Polyacrylamidegel electrophoresis (SDS-PAGE)<sup>32)</sup>

단백질은 SDS용액[SDS:2.5%, 2-mercaptoethanol:5%, Tris-Cl buffer:0.0625M (pH 8.8), glycerin:10%, bromophenol blue:0.002%]에 녹여 100°C에서 7분간 처리하여 200ug/20ul를 전기 영동하였다. Stacking gel과

resolving gel의 acrylamide 함량은 각각 2.5%와 15%였고, pH는 각각 6.8과 8.8이었다. 단백질의 염색은 0.05% coomassie blue R-250, 25% ethanol, 10% acetic acid를 포함하는 용액으로 하였고, methanol과 acetic acid가 각각 30%와 10%인 용액에서 탈색하였다. 각 분리대의 상대적 단백질량은 545nm에서 scanning하여 비교하였다.

#### 4. Callose의 정량<sup>33)</sup>

중류수와 ethanol로 세척한 callus에 10배의 1N NaOH를 넣어 마쇄하고 80°C에서 15분 처리한 후 원심분리하여 침전된 세포벽분획을 얻었다. 1N NaOH에 다시 현탁시킨 세포벽분획 0.6ml에 aniline blue(0.2%) 1.2ml, 1N HCl 0.6ml, 1M glycine/NaOH buffer (pH 9.5) 1.8ml를 넣고, 50°C에서 20분간, 실온에서 30분간 방치한 후 형광을 측정(excitation:400nm, emission:510nm)하여 laminarin 표준곡선으로부터 callose의 양을 계산하였다.

#### 5. 세포벽재생의 측정<sup>34,35)</sup>

Calcofluor White M<sub>2</sub>R을 protoplast배양계에 최종농도 0.01%가 되게 첨가하여 10분간 방치한 다음, 형광현미경에서 360nm에서 excitation시켰을 때, 세포벽이 재생되어 형광을 내는 protoplast의 수를 조사하여 전체 protoplast에 대한 백분율로 나타낸 것을 세포벽재생율로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. $\beta$ -1,3-Glucanase의 분리 및 동정

대두유묘로부터 borate buffer로 추출하고

acetone으로 침전시켜 얻은 단백질(crude  $\beta$ -1,3-glucanase)을 Sephadex G-150 column에서 용출시켰을 때 Fig.1과 같이 단백질은 6개분획(F1-F6)으로 분리되었다. 각 분획에 대해  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 측정된 결과 네번째 분획(F4)이 활성을 보였다. 효소활성을 측정하는데 영향을 줄 가능성이 있는 환원물질의 존재유무를 검정한 결과 이 분획에는 방해물질이 없는 것으로 나타나 이 것이  $\beta$ -1,3-glucanase분획임이 확인되었다.

Fig.1의  $\beta$ -1,3-glucanase분획(F4)을 SDS-PAGE로 분석한 결과 이 분획의 polypeptide는, Fig.2(A)에서 보는 바와 같이 bromophenol blue에 대한 상대이동도가 0.50인 비교적 정제된 분리대로 나타났다. 그리고 SDS-PAGE로 측정된 이 polypeptide의 분자량은 21kD였다. 대두에서 분리된 이  $\beta$ -1,3-glucanase의 분자량은 Felix와 Meins가 담배에서 분리한  $\beta$ -1,3-glucanase의 (33kD)<sup>15)</sup>과는 달랐다.

유묘의 21kD polypeptide와 동일한 polypeptide가 callus세포에도 있는지 확인하기 위하여, cytokinin이 없는 배지에서 3주간 배양한 callus로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다.

Fig.2(B)에서 보는 바와 같이 callus세포의 단백질에도 유묘의 21kD polypeptide와 같은 이동도(Rf=0.50)를 보이는 polypeptide가 있음이 확인되었다.

### 2. $\beta$ -1,3-Glucanase의 세포내 함량과 활동도 수준에 대한 BA의 영향

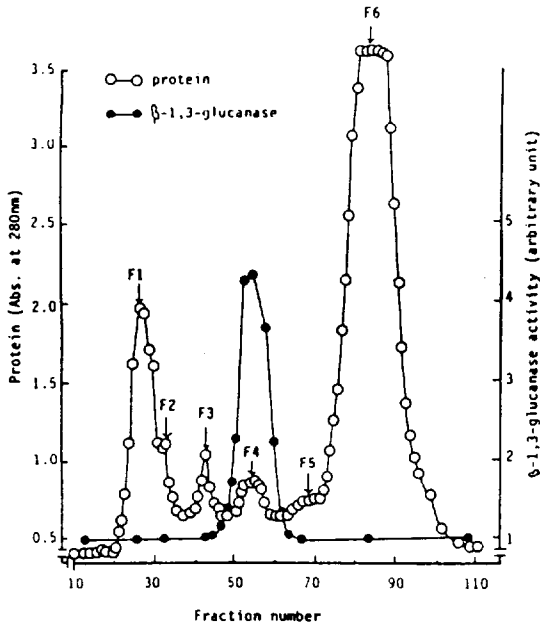


Fig. 1. Partial purification of  $\beta$ -1,3-glucanase of soybean on Sephadex G-150 gel permeation chromatography.

Fig.3은 BA가 세포내의  $\beta$ -1,3-glucanase 함량에 미치는 영향을 보기 위하여 BA수준을 달리하여 3주간 배양한 대두 callus의 polypeptide를 SDS-PAGE로 조사한 결과이다.  $\beta$ -1,3-Glucanase로 동정된 21kD polypeptide(↓)의 양은 BA수준이  $5 \times 10^{-4}$  mg/l 인 배지의 경우(B)에도 대조구(A)에 비하여 현저히 적었으며 BA수준이  $5 \times 10^{-2}$  mg/l보다 높은 경우에는 거의 보이지않아 BA는 이 polypeptide의 세포내 함량을 저하시키는 것으로 나타났다. 이결과는,  $\beta$ -1,3-glucanase의 세포내함량이 cytokinin에 의하여 감소하였다는 점에서, 담배 callus에 kinetin을 처리했을 때  $\beta$ -1,3-glucanase활성을 가진 33kD polypeptide가 감소되었다는

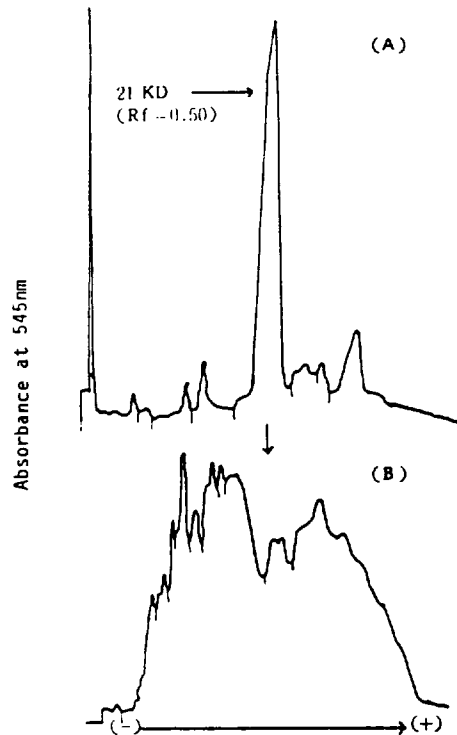


Fig. 2. Densitometric scans of proteins separated on SDS-PAGE of  $\beta$ -1,3-glucanase fraction on Sephadex G-150 chromatography(A) and extract from callus cell cultured on cytokinin free medium(B).

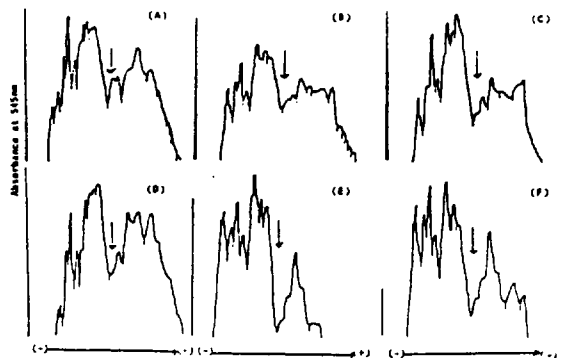


Fig. 3. Densitometric scans of proteins separated on SDS-PAGE of protein extract from callus cell cultured on BA medium. (A), (B), (C), (D), (E), and (F): 0, 0.0005, 0.005, 0.05, 0.5, and 5 mg/l of BA in medium, respectively. ↓: 21 kD polypeptide

Felix와 Meins<sup>15</sup>의 보고와 일치했다.

21kD Polypeptide의 합성이 BA에 의해 억제되면 세포내의  $\beta$ -1,3-glucanase 활동도 수준도 저하될 것으로 예상된다. 이것을 확인하기 위하여 BA수준을 달리하여 배양한 callus세포의  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 조사하였다(Fig.4). Fig.4의 활동도는 세포 1g의 borate buffer(0.2M, pH 7.6) 추출액에 대한 것으로서, BA를 첨가하지 않고 배양한 세포 추출액(대조구)의 활동도에 대한 상대치로 나타낸 것이다. 예상한 바와 같이 BA를 첨가한 배지에서 배양한 세포의  $\beta$ -1,3-glucanase 활동도는 대조구에 비해 낮았다. 즉 배지의 BA농도가  $5 \times 10^{-4}$ mg/l일 때 이미 세포의 효소활성이 대조구의 25% 이하로 크게 저하되었으며, 5mg/l까지 BA농도가 클수록 활성이 감소하는 경향을 보였다.

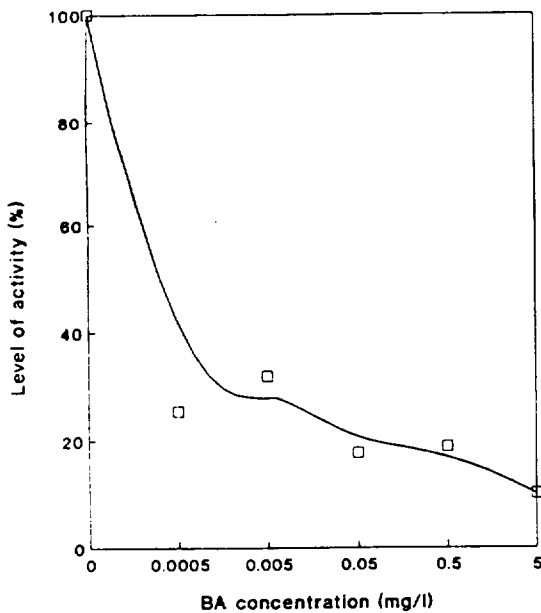


Fig. 4. Effect of BA concentration in culture medium on level of  $\beta$ -1,3-glucanase activity of callus cell.

### 3. 세포의 Callose 함량에 대한 BA의 영향

식물세포내에 있는  $\beta$ -1,3-glucanase의 수준이 달라질 때 수반되는 세포의 생리적 변화에 대하여 지금까지 알려진 것이 없기 때문에,  $\beta$ -1,3-glucanase의 세포내활성이 BA에 의하여 저하되는 것이 세포생리에 있어서 어떤 의미를 갖는지 알 수 없다. 그러나  $\beta$ -1,3-glucanase가 callose를 분해하는 효소라는 점에서, BA가 이 효소의 세포내 활성을 저하시키면 세포의 callose함량이 증가될 것으로 추정된다.

Fig.5는 BA농도가 다른 배지에서 3주간 배양한 callus로부터 분리한 세포벽 분획의 callose함량을 BA 농도별로 나타낸 것인데, 세포벽의 callose함량은 예상대로 BA수

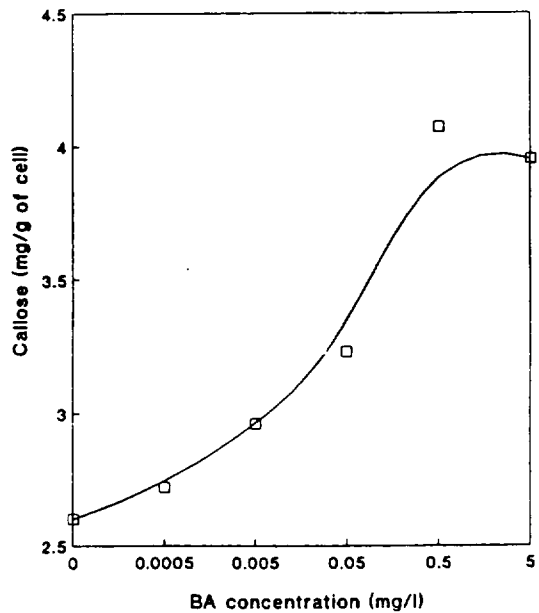


Fig. 5. Effect of BA concentration in culture medium on callose content of callus cell wall.

준이 높아짐에 따라 증가하는 경향을 보였다. 즉 BA를 첨가하지 않은 배지의 세포벽에는 2.6 mg/g · cell이던 것이 BA수준이 높아짐에 따라 증가하여 BA 0.5 mg/l에서는 4.1 mg/g · cell이었다. Callose의 함량은 BA에 의해  $\beta$ -1,3-glucan synthase가 활성화되어 증가되었을 수도 있으나 이와는 별개로 callose분해가 억제되면 증가될 수 있다. 그러므로 세포벽의 callose함량이 증가한 것은 적어도 부분적으로는 BA에 의하여  $\beta$ -1,3-glucanase활성이 저하된데 원인이 있는 것으로 생각되었다.

#### 4. Protoplast의 세포벽재생에 대한 BA의 영향

손상된 식물세포의 벽이 재생될 때 callose가 다량으로 축적되는 점<sup>13,14</sup>으로 미루어 보면 callose는 세포벽재생과 관련이 있는 것으로 생각되는데, callose축적은 BA에 의하여 영향을 받기 때문에 BA는 세포벽재생에도 영향을 줄 것으로 보인다. 이러한 가능성을 확인하고자 세포벽을 제거한 protoplast를 이용하여 세포벽재생에 미치는 BA의 영향을 조사하였다.

Fig.6은 BA를 1.0mg/l가 되게 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 protoplast를 배양하면서 세포벽이 재생된 protoplast의 비율을 배양시간 별로 조사한 결과이다. Protoplast의 세포벽재생율은 BA를 첨가하지 않았을 때 4시간 후 3%, 8시간 후 15%, 12시간 후 77%였는데, BA를 첨가했을 때는 4시간 후 16%, 8시간 후 42%, 12시간 후 93%로 BA를 첨가하지 않았을 때 보다 높았

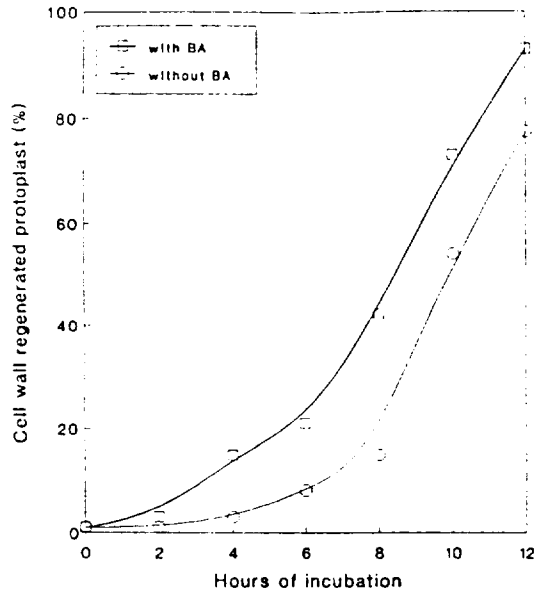


Fig. 6. Time course of change in percentage of cell wall regenerated protoplast incubated in medium without and with BA(1.0 mg/l).

다. BA의 세포벽재생 촉진효과의 크기는 시간별로 달랐는데, BA를 첨가했을 때가 첨가하지 않았을 때 보다 4시간 후 5배, 8시간 후 2.8배, 12시간 후 1.2배로 세포벽재생 초기에 효과가 컸다.

BA를 첨가한 배지에서의 세포벽재생율은 6시간 이후 급격히 증가했는데, 전보<sup>36</sup>에서 <sup>14</sup>C로 표지된 BA를 사용하여 protoplast의 BA흡수속도를 조사한 결과 protoplast의 방사능은 6시간 이내에 이미 포화치의 약 2/3에 도달한 것으로 보아, protoplast의 세포벽재생은 protoplast내의 BA수준과 직접적인 관계가 있는 것으로 생각된다.

Protoplast는 세포벽이 재생되는 기간인 약 12시간 이내에 viability가 급격히 저하되는데 BA를 첨가한 배지에서는 viability의 감소가 작았고, 세포벽 재생을 전제로 하는

protoplast의 세포분열이 BA처리에 의하여 촉진되었던 전보<sup>36)</sup>의 결과들도 BA가 세포벽 재생을 촉진하는 기능이 있다는 생각을 뒷받침해준다.

### 5. 세포벽재생에 있어서 cytokinin의 역할

대두callus세포에 있어서  $\beta$ -1,3-glucanase의 활성을 가진 21KD polypeptide의 함량과 세포내의  $\beta$ -1,3-glucanase의 활동도 수준이 BA처리에 의하여 감소하였는데, Felix와 Meins<sup>15)</sup>도 담배 callus의 배양배지에 <sup>35</sup>S로 표지된 아미노산을 첨가하여 조사한 결과  $\beta$ -1,3-glucanase활성을 가진 33kD polypeptide의 함성이 kinetin에 의하여 저해되었다고 보고한 점으로 미루어 볼 때 식물세포의  $\beta$ -1,3-glucanase수준은 cytokinin에 의하여 조절되는 것으로 생각된다. 그러므로 세포벽 중의 callose함량이 BA처리에 의하여 증가된 것은 cytokinin이 callose분해효소인  $\beta$ -1,3-glucanase의 세포내 수준을 저하시켜 callose분해를 억제함으로써 세포벽에 축적되는 callose의 양을 증가시킨 데에 기인하는 것으로 생각되었다. 그리고 BA처리에 의하여 protoplast의 세포벽재생율이 증가되어 cytokinin은 세포벽재생 촉진기능을 가지고 있는 것으로 나타났는데, 이 세포벽재생 촉진작용은, 적어도 부분적으로는, callose분해계의 조절을 통해서 이루어 지는 것으로 보인다. 물론 cytokinin이 callose합성계를 활성화시킴으로써 세포벽재생을 촉진할 가능성<sup>21,22,23,33)</sup>도 배제할 수 없으나 이 가능성에 관하여는 앞으로 연구검토되어야 할 것이다.

## 적 요

대두(*Glycine max*)의  $\beta$ -1,3-glucanase를 분리동정하고 benzyladenine(BA)이 이효소의 세포내 함량과 활동도에 미치는 영향을 조사하였다. 또 세포벽의 callose함량과 protoplast의 세포벽재생에 미치는 BA의 영향을 조사하여, cytokinin이 식물의 세포벽재생을 촉진하는 기능이 있음을 확인하고 세포벽재생에 있어서 cytokinin의 작용기구를 검토하였다. 대두  $\beta$ -1,3-Glucanase는 21KD의 polypeptide로 동정되었는데 이 polypeptide의 세포내함량과 효소활성은 BA처리에 의하여 저해되었다. 그리고 callus세포벽의 callose함량과 protoplast의 세포벽 재생율이 BA 처리에 의하여 증가되었다. 이 결과들은 cytokinin이 세포의  $\beta$ -1,3-glucanase 수준을 저하시켜 callose분해를 억제함으로써 세포벽 재생을 촉진할 수 있음을 보여주었다.

## 참 고 문 헌

1. Black, L.M.: Molecular biology of plant tumors, ed. by Kahl, G.: 99 (1982)
2. Swain, T.: Ann. Rev. Plant Physiol., 28 : 479 (1977)
3. Albersheim, P.: Ann. Rev. Plant Physiol., 26 : 31 (1975)
4. Green, T.R.: Science, 175 : 1176 (1972)
5. Yoshigawa, N., et al.: Physiol. Plant Pathol., 12 : 73 (1978)
6. Solsbury, F.B. and Ross, C.W.: Plant Physiology, 2nd ed. Wadsworth Pub.Co.:

270 (1978)

7. Conrad, K. and Kohn, B.:  
Phytochemistry, 14 : 325 (1975)

8. Hess, D. : Plant physiology, Springer-  
Verlag : 263 (1975)

9. Kahl, G.: Molecular biology of plant  
tumor, ed. by Kahl, G., Academic Press :  
211 (1982)

10. Crose, J.E., Goodman, R.N. and  
Schaffer, W.H.: Phytopathol., 62: 176  
(1972)

11. Herridge, E.A. and Schlegel, D.E. :  
Virology, 18 : 517 (1962)

12. Misaghi, I.J.: Physiology, biochemistry  
of plant-pathogen interactions, Plenum  
Press:5 (1982)

13. Currier, H.B. : Amer. J. Bot., 44 : 478  
(1975)

14. Eschrich, W.: Encyclopedia of Plant  
Physiol. vol. 1. ed. by Zimmerman,  
M.H. and Milburn, J.A., Springer-Verlag  
: 39 (1975)

15. Felix, G. and Meins, F. : Plant  
Physiol., 164 : 423 (1985)

16. Delmer, D.P. and Stone, B.A. : Plant  
Biochemistry, ed. by Priess, J, Academic  
Press. (1987)

17. Herth, W., et al : Cytobiologie, 9 : 344  
(1974)

18. Huwyler, H.R., Franz, G. and Meier, H.  
: Plant Sci. Lett., 12 : 55 (1978)

19. Kauss, H. : Ann. Rev. Plant Physiol.,  
38 : 47 (1987)

20. Davies, E. : The Biochemistry of  
plants, vol. 12, Academic Press : 243  
(1987)

21. Bell, A.A.: Ann. Rev. Plant Physiol., 32  
: 21 (1981)

22. Fincher, G.B. and Stone, B.A. : Encycl.  
of Plant Physiol., vol. 1. 13B, ed. by  
Tanner, W. and Loewens, F.A.,  
Springer-Verlag : 68 (1981)

23. Kauss, H., Kohle, H. and Jeblick, W. :  
FEBS Lett., 158 : 84 (1983)

24. Huber, D.J. and Nevins, D.J. : Planta,  
151 : 206 (1981)

25. Matheson, N.K. and McCleary, B.V.:  
The Polysaccharides III, Aspinall,  
G.O., Academic Press : 1 (1985)

26. Eichholz, R.J., Haper, J., Felix, G.,  
and Meins, F.: Planta, 158 : 410 (1983)

27. Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima,  
K. : Exp. Cell Res., 50 : 148 (1968)

28. Edwards, C.E., Robinson, S.P., Tyler,  
N.J.C., and Walker, D.A. : Plant Physiol.,  
62 : 313  
(1978)

29. Thaker, V.S., Saroops, S. and Singh,  
Y.

D. : Annals of Botany, 60: 579 (1987)

30. Bernfeld, P.: Methods in Enzymology,  
Vol.1 : 149 (1955)

31. White, C.A. and Kennedy, J.F. :  
Techniques in life science B3, B312/1  
(1981)



32. Laemmli, U.K. : Nature(London), 277 : 280 (1970)
33. Kohle, H., Jeblick, W., Potent, F., Blaschek, W. and Kauss, H.: Plant Physiol., 77 : 544 (1985)
34. Constabel, F.: Protoplast isolation and culture methods, 2nd ed. by Wetter, L.W. and Constabel, F., Nat'l Res. Couns., Canada : 38 (1982)
35. Fisher, J.M.C., Peterson, C.A. and Bols, N.C.: Stain Technology, 60:69(1985)
36. 류기중, 김형욱, 박창규, 김창오: 한국농화학 회지, 30(4) : 300 (1987)