

오이 자엽의 δ -Aminolevulinic Acid 및 엽록소 a, b의 형성에 미치는 외생 IAA의 영향

鄭 忠 德

Effect of Exogenous Indoleacetic Acid on δ -Aminolevulinic Acid and Chlorophyll Formation in Excised Cotyledons of Dark Grown Cucumber Seedlings

Chung Choong-duk

Summary

Pretreatment of excised etiolated cotyledons of cucumber (*Cucumis sativus* L. cv. Cheongcham) with indoleacetic acid and water-control were continuously irradiated under white light with 2200 lux. The δ -aminolevulinic acid synthetase activity and the rate of δ -aminolevulinic acid convert into porphobilinogen and protochlorophyll were higher than those of the control, in which case chlorophyll formation was stimulated by IAA and Light.

序 論

식물체에서의 엽록소 a, b의 형성과정은 글리신과 숙신산이 ALA(δ -aminolevulinic acid) 합성효소의 작용을 받아 ALA를 만들고(Lascelles, 1960; Jordan and Shemin, 1972; Miller *et al.*, 1979; Burnham and Lascelles, 1962), ALA 2분자는 ALA dehydratase의 작용(Shemin, 1972; Nandi

and Shemin, 1968)으로 PBG(porphobilinogen)을 합성하며, 이것은 다시 여러 단계를 거쳐서 Pchl(protochlorophyll)과 엽록소 a, b가 합성된다고(Castelfranco and Beal, 1983) 알려져 있다.

지금까지 보고된 바로는 이러한 과정 중에 BA(benzyladenine)이 광이 조사될 때 ALA와 엽록소 형성을 촉진 한다고 하였으며(Fletcher *et al.*, 1973; Naito *et al.*, 1980) kinetin(Buschmann and Sironval, 1978)과 BA(Lew and Tsuji, 1982)이 ALA와 엽록소 a, b의 생성 및 축적에 관여 한다고

* 이 논문은 1985년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 이루어진 것임

하였다. 또한 이러한 여러가지의 실험결과들은 cytokinin이 엽록소의 합성성 율을 좌우하는 ALA 합성효소와 다른 단백질들의 합성을 증가 시킨다는 가설(Fletcher *et al.*, 1973)을 뒷받침 하고 있다. cytokinin류가 엽록소 합성에 미치는 영향에 대하여는 많은 연구가 되고 있으나 IAA(indoleacetic acid)에 관한 보고는 거의 없다.

본 실험은 식물생장 호르몬인 IAA가 엽록소의 합성과정에서 어떠한 영향을 미치는가를 규명하기 위하여 ALA와 그 합성효소의 활성변화, PBG, Pchl, 엽록소 a, b양의 변화를 조사하였다.

材料 및 方法

실험재료 및 생육조건. 본 실험에서 사용한 오이 (*Cucumis sativus* L. cv. Cheongchangmadi)는 제일 종묘에서 구입하였고, $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 암조건하의 질석토에서 6일에 발아 시킨 후(Castelfranco *et al.*, 1974; Naito *et al.*, 1980) 하배측을 없앤 자엽만을 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 암실에서 12시간 동안 IAA 10^{-6}M 처리구와 2차증류수만을 넣은 대조구에서 침적시켰으며, 이 때 시험구에 일정농도의 산소를 유지시키기 위하여(Beal and Castelfranco, 1974) 기포발생기로 계속 공기를 공급시켰다. 12시간이 지난 후 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 2200 lux (Argyroudi-Akoyunglou and Akoyounoglou, 1970)의 형광등과 백열등이 조사되는 항온실에서 12시간 동안 처리구 별로 petri dish에서 침적하면서, 시간 별로 시료를 얻어 사용하였다.

ALA합성효소의 활성측정. ALA합성효소의 추출은 Xifra *et al.*(1971) 방법을 일부 변경시켜 효소를 추출하였다. 각 50개의 자엽을 Potter-Elvehjem형의 마쇄기에 넣고 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 9.0)을 10ml 더하여 마쇄한 후 2000g에서 10분간 원심분리(Hitachi 20 PR-5 centrifuge) 하였다. 상정액 10ml중 3ml만을 취하여 Sephadex G-25(Column PD-10^R, Pharmacia Fine Chemicals) column(1.5 × 5cm, bed volume 9.1ml)을 통과시켰고 여기에 0.05M Tris-HCl 완충액을(pH 9.0)을 4ml 더하여 효소가 없는 2ml를 제외한 나머지 3ml를 효소 추출액

으로 사용하였으며 여기까지의 과정은 전부 4°C 이하에서 진행되었다.

반응액 2ml는 1000μ mole의 숙신산 1000μ mole의 글리신, 0.5mg succinic acid thiokinase (specific activity 84 units per mg protein), 35n mole의 CoA, 100μ mole의 MgCl_2 , 2.5μ mole의 pyridoxal phosphate, 1000μ mole의 thioglycolic acid로 조성 되었으며, 여기에 1ml의 효소 추출액을 더하여 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 다음 0.3M trichloroacetic acid를 0.5ml 가하여 반응을 중지시켰다. 여기에 0.5M phosphate 완충액을 3ml, ethyl acetoacetate 1ml를 가한 후 100°C 항온수조에서 10분간 가열후 상온으로 식힌 다음 Ehrlich reagent를 3ml 가하여 섞은 후 15분 동안 방치 하였다가 3000g에서 10분간 원심분리하여 상정액만을 555nm에서 흡광도(Hitachi Model 200-20 Spectrophotometer)를 측정, 비색정량으로 생성된 ALA의 양을 측정하였다.

단백질 정량. 단백질은 Lowry *et al.*(1951)의 방법을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정, 비색정량 하였다.

ALA와 PBG양의 측정. ALA와 PBG의 분리는 mauzerall and Granick(1956)의 방법을 변경한 Urata and Granick(1963)의 방법을 사용하였고 Ehrlich reagent와 반응시킨 15분 후 비색정량 하였다.

엽록소 a, b 및 Pchl의 측정. Arnon(1949)의 방법을 변경한 Anderson and Boardman(1964)의 방법을 이용하여 측정한 후 이것으로 부터 산출해 냈다.

본 실험에서 사용된 ALA, PBG, Tris, succinic acid, glycine, thioglycolic acid, succinate thiokinase, pyridoxal phosphate, *p*-dimethylaminobenzaldehyde, bovine serum albumin, resin 등은 sigma에서 구입하였고 acetone은 Merck사 acetic acid, ethyl acetoacetate, sodium phosphate는 일본 Hayasi에서 각각 구입하였다.

結果 및 考察

ALA의 변화, 광을 조사하는 동안의 ALA양의 변화(Fig.1)는 침적 시작 3시간 후에, 대조구는 광을

조사하기 전보다 8.2배 증가하여 광의 조사가 엽록소 합성과정의 전구물질인 ALA의 합성에 영향을 주는것을 확인(Beal and Castelfranco, 1974)하였으며 침적후 6시간 까지는 증가하는 경향을 보였다가 그 이후 감소하고 9시간 이후에 증가하였다. IAA처리구는 광이 조사되기 전 상태에서 대조구 보다 약 2배의 ALA합량을 나타내었으나 3시간에서 9시간 까지에는 계속하여 대조구 보다는 낮은 합량을 보였다. 이러한 결과는 Fletcher *et al.*(1973)와 Lew and tsuji(1982)가 오이 자엽을 재료로 하여 BA과 ALA dehydratase의 경쟁방해 물질인 LA(levulinic acid)를 동시에 처리한 실험에서의 ALA축적결과와 비교가 되었다.

PBG양의 변화. 광을 조사하는 동안의 PBG양의 변화(Table 1)는 대조구 및 IAA 처리구에서 서서히 증가하는 경향을 나타내었으며, 대조구의 경우는 광 조사 후 12시간에 1.81 μ mole/g fresh weight으로 0.19 μ mole이 증가하였고 IAA 처리구는 1.86 μ mole로 0.25 μ mole이 증가하였다. 전 구간을 통하여 IAA처리구와 대조구 사이에는 유의한 차이를 보이지 않았다.

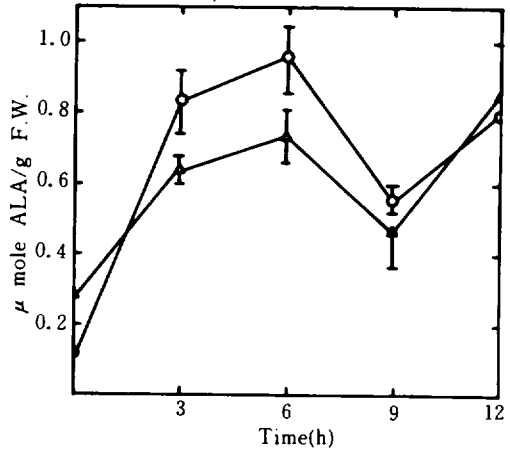


Fig.1. Effect of IAA on the accumulation of ALA in greening cucumber cotyledons during 12hr subsequent continuous illumination with 2200 lux of white light. Cotyledons were pretreated with 10^{-6} M IAA for 12hr in darkness or incubated with water throughout the dark preincubation period. Vertical bar indicates SEM; the SE of the data pint. control(○), IAA(△).

Table 1. Effect of IAA on accumulation of porphobilinogen in greening cucumber cotyledons

Treatment	Light (hours)				
	0	3	6	9	12
Control	1.62 ± 0.03	1.67 ± 0.02	1.77 ± 0.10	1.82 ± 0.03	1.81 ± 0.03
IAA	1.61 ± 0.03	1.66 ± 0.03	1.76 ± 0.08	1.82 ± 0.02	1.86 ± 0.01

Six day old etiolated cucumber cotyledons were preincubated for 12hr in the dark with 10^{-6} M IAA and water. Results are the means of 4 replicates with \pm SE from the mean.

ALA synthetase의 활성 변화. 대조구의 경우 ALA합성효소의 활성(Fig.2)은 12시간까지 서서히 증가하는 경향을 보였고 IAA처리구에서는 9시간까지 대조구보다 크게 증가하였다가 다시 감소되었다. 이러한 ALA 합성효소의 활성증가는 광선의 조사가 유발요인이라는 보고(Klein *et al.*, 1977; Ford and Kasemir, 1980)와 일치하였으며 Fletcher and McCullagh(1971), Fletcher *et al.*(1973) 등이 보고

한 BA가 엽록소 합성의 rate-limiting물질인 ALA를 합성하는 ALA합성효소의 생성과 다른 단백질의 합성을 촉진한다는 보고 및 Naito *et al.*, (1980), Buschmann and Sironval(1978)등의 ALA합성에 대한 kinetin, BA의 효과와 일치하는 결과를 나타내었다.

Protochlorophyll(ide)양의 변화. 광을 조사하는 동안의 Pchl(Fig.3)의 양은 대조구의 경우 6시간,

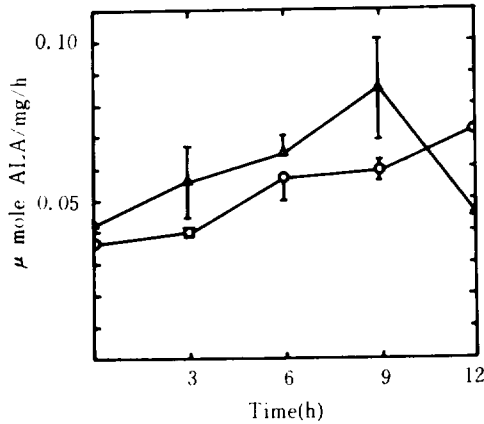


Fig. 2. Effect of IAA on the ALA synthetase activity in etiolated cucumber cotyledons during 12hr subsequent continuous illumination with 2200 lux of white light. Cotyledons were pretreated with 10^{-6} M IAA for 12hr in darkness or incubated with water throughout the dark preincubation period. Vertical bar indicates SEM; the SE of the data point. control(○), IAA(△).

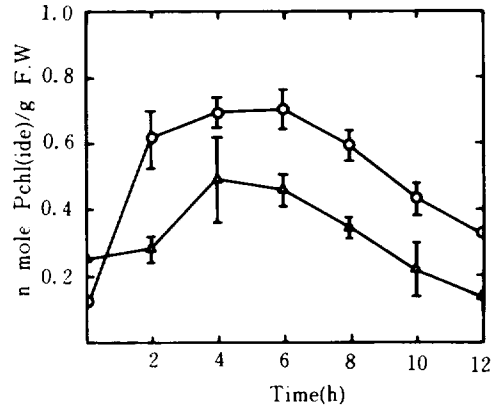


Fig. 3. Effect of IAA on the protochlorophyll(ide) formation in cucumber cotyledons during 12hr subsequent continuous illumination with 2200 lux of white light. Cotyledons were pretreated with 10^{-6} M IAA for 12hr in darkness or incubated with water throughout the dark preincubation period. Vertical bar indicates SEM; the SE of the data point. control(○), IAA(△).

IAA처리구의 경우 4시간까지 크게 증가하였다가 그 이후 서서히 감소되었다. IAA처리구의 경우 광선조사전의 Pchl함유량은 0.25n mole/g fresh weight으로 대조구의 0.122 n mole/g fresh weight 보다 약 2배를 나타내었으나 2시간 이후는 대조구보다 Pchl 함유량이 계속 낮은 경향을 나타내었다.

엽록소 a, b 양의 변화. 광의 조사가 시작된 2시간 후부터 엽록소 a, b의 양은 8시간까지 대조구 및 IAA처리구에서 크게 증가하는 경향을 나타내었으며 (Klein *et al.*, 1977), 2시간까지의 점진적인 증가는 Harel and Klein(1972)의 보고와 같이 ALA의 합성이 암상태에서 보다도 광 조사 후 더 증가시키는 때 문이라 사료되었으며 이러한 결과는 Deit(1984)가 보고한 BA의 진처리 후 엽록소 a, b의 양이 대조구에 비해 크게 증가 하였다는 결과와 일치하였으며, IAA처리구에서의 8시간 이후의 엽록소 a, b의 감소는 배양조건에 따른 노화현상이라고 사료되었다. 이제까지의 실험결과를 즉, 광조사 중의 ALA 함량의

변화와 ALA합성효소의 활성, Pchl양의 변화, 엽록소 a, b의 증가를 통하여 볼 때 IAA도 cytokinin류의 여러 식물호르몬과 같이 엽록소의 합성을 촉진시키는 효과를 나타낸다는 것을 시사하여 주었다.

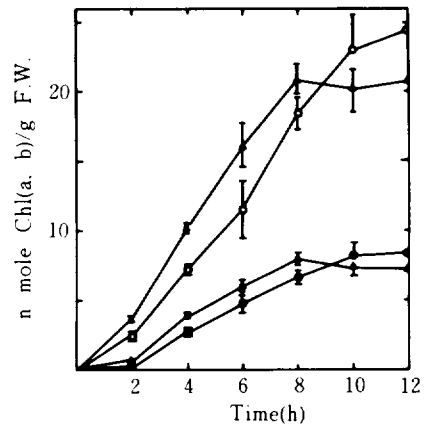


Fig. 4. Effect of IAA on the time course of chlorophyll a and b formation during 12hr subsequent continuous illumination with 2200

lux of white light. Cotyledons were pretreated with 10^{-6} M IAA for 12hr in darkness or incubated with water throughout the dark preincubation period. Vertical bar indicates SEM; the SE of the data point. control(○), IAA(Δ), chlorophyll a(○, Δ), chlorophyll b(●, \blacktriangle).

摘 要

오이(*Cucumis sativus* L. cv. Cheongchangmadi)의 자엽을 10^{-6} M IAA 용액에서 12시간 동안 잠자한 후 다시 2200lux의 광을 조사 하였을 때 엽록소 합성에 있어서 rate-limiting 물질인 ALA를 합성하는 ALA 합성효소의 활성이 물만을 처리한 대조군보다 높았으며 엽록소 a, b의 함량이 크게 증가하였다.

參 考 文 獻

- Anderson, J. M., and N. K. Boardman. 1964. Studies on the greening of dark grown bean leaves. *Aust. J. Biol. Sci.* 17: 93-101.
- Argyroudi-Akoyunoglou, J. H., and G. Akoyunoglou. 1970. Photoluduced changes in the chlorophyll a to chlorophyll b ratio in young bean plants. *Plant Physiol.* 46: 247-249.
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Beal, S. I., and P. A. Castellfranco. 1974. The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in higher plants. *Plant Physiol.* 53: 291-296.
- Burnham, B. F., and J. Lascelles. 1963. Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. *Biochem. J.* 87: 462-272.
- Buschmann, C., and C. Sironval. 1978. Influence of kinetin on protochlorophyll(ide) accumulation and on the shibata shift in *Raphanus* seedlings. *Planta.* 139: 127-132.
- Castellfranco, P. A., P. M. Rich, and S. I. Beale. 1974. The abolition of the lag phase in greening cucumber cotyledons by exogenous δ -aminolevulinic acid. *Plant Physiol.* 53:615-618.
- Castellfranco, P. A., and S. I. Beale. 1983. Chlorophyll biosynthesis: Recent advances and areas of current interest. *In. Ann. Rev. Plant Physiol.* 34: 241-278.
- Dei, M., 1984. Benzyladenine-induced stimulation of two components of chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledons. *Physiol. Plant.* 62: 521-526.
- Fletcher, R. A., and D. McCullagh. 1971. Benzyladenine as a regulator of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons. *Can. J. Bot.* 49: 2197-2201.
- Fletcher, R. A., C. Teo., and A. Ali. 1973. Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine. *Can. J. Bot.* 51: 937-939.
- Ford, M. J., and H. Kasemir. 1980. Correlation between 5-aminolaevulinate accumulation and protochlorophyll photoconversion. *Planta.* 150: 206-210.
- Harel, E., and S. Klein. 1972. Light dependent formation of δ -aminolevulinic acid in etiolated leaves of higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 49: 364-371.
- Jordan, P. M., and D. Shemin. 1972. δ -aminolevulinic acid synthetase. *In. The Enzymes, P. Boyer. Vol. 7 Academic press.* pp.339-359.
- Klein, S., E. Katz, and E. Neeman. 1977. Induction of δ -aminolevulinic acid formation

- in etiolated maize leaves controlled by two light systems. *Plant Physiol.* 60: 335-338.
- Lascelles, J., 1960. The synthesis of enzymes concerned in bacteriochlorophyll formation in growing cultures of *Rhodospirillum rubrum*. *J. gen. Microbiol.* 23: 487-498.
- Lew, R., and H. Tsuji. 1982. Effect of benzyladenine treatment duration on δ -aminolevulinic acid accumulation in the dark, chlorophyll lag phase abolition, and long-term chlorophyll production in excised cotyledons of dark-grown cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 69: 663-667.
- Mauzerall, D., and S. Granick., 1956. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219: 435-446.
- Miller, G. W., A. Denney., J. K. Wood, and G. W. Welkie., 1979. Light induced delta-aminolevulinic acid in dark-grown barley seedlings. *Plant & cell Physiol.* 20(1): 131-143.
- Naito, K., T. Takahashi., Y. Endo, and S. Shiimi-zu, 1980. Benzyladenine-induced chlorophyll formation in etiolated cucumber cotyledons. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 97. S. 309-316.
- Nandi, D. L., and D. Shemin. 1968. δ -Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* 243(6): 1236-1242.
- Shemin, D., 1972. δ -Aminolevulinic acid dehydratase. In, *The Enzymes. P. boyer, Vol. 7 Academic press. New York.* pp.323-338.
- Urata, G., and S. Granick, 1963. Biosynthesis of δ -aminoketones and the metabolism of aminooacetone. *J. Biol. Chem.* 238(2): 811-820.
- Xifra, E. A. W., A. M. C. Battle and H. A. Tigier., 1971. δ -Aminolevulinic acid synthetase in extracts of cultured soybean cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 235: 511-517.