

發芽中인 옥수수 種子內에서 RNA 의 生合成에 미치는 GA₃ 의 效果

鄭 相 浩 · 沈 雄 燮

(高麗大學校 理科學 生物學科)

Effects of GA₃ on RNA Biosynthesis in Germinating Maize Seeds

Chung, Sang-Ho and Woong-Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul)

ABSTRACT

In order to investigate the effects of GA₃ on RNA biosynthesis, the amounts of rRNA and tRNA in germinating maize seeds were measured. The amount of rRNA in the endospermless seedlings was remarkably increased by GA₃ treatment after 48 h of germination, but no effect of GA₃ after 12 h and 72 h of germination was observed. The amount of tRNA was slightly increased by GA₃ treatment throughout 24 h to 72 h after germination, but no effect was observed after 12 h of germination. While the amount of rRNA in 0.5 cm shoots in length was decreased by GA₃ treatment, both of the amounts of rRNA and tRNA were increased in 1~1.5 cm shoots. According to the above mentioned results, it may be suggested that RNA biosynthesis is affected by GA₃ treatment, and that GA₃ participates in the biosynthesis of rRNA rather than tRNA in germinating maize seeds.

緒 論

식물 호르몬의 일종인 gibberellic acid(GA₃)가 식물의 생장을 조절함은 이미 여러 학자들의 실험적 연구에 의해서 밝혀졌다. 식물의 종에 따라 차이는 있으나 종자의 발아에는 GA₃가 α-amylase를 포함한 여러 가수분해 효소의 생합성(Chrispeels and Varner, 1967 a, b)과 ribosome(Evins and Varner, 1972; Holmes and Speakman, 1973; Rao and Khan, 1975) 및 RNA 생합성(Broughton, 1968; Poulson and Beevers, 1970; Ho and Varner, 1974)에 관여한다고 알려졌다.

그러나, GA₃가 생리적 증폭효과를 나타내는 작용기작에 대해서 뚜렷이 밝혀진 바는 없
이 연구는 1980~81년도 아산사회복지사업재단의 연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

으므로 본 실험에서는 GA₃의 작용기작을 구명하기 위한 연구의 일환으로서 발아중인 옥수수 종자의 RNA 생합성에 미치는 GA₃의 효과를 알아보았다.

材料 및 方法

材料. 옥수수(*Zea mays* L. cv. Golden growthbandam) 종자는 Sakata's Seed Co.(Japan)에서, 그리고 gibberellic acid(GA₃)는 BDH Chemicals, Ltd.(England)로부터 구입하여 사용하였다.

種자의 發芽. 비슷한 무게(±10 mg)의 종자를 택하여 20% sodium hypochlorite 용액에 10분간 살균시켜 멸균 증류수로 세척한 후 대조구는 Nitsch 배지로, 실험구는 0.3 mM GA₃(Sim and Roh, 1979)가 함유된 Nitsch 배지로 옮겨 30°C에서 발아시켰다.

rRNA의 추출. 본 실험의 모든 과정은 특별한 언급이 없는 한 4°C에서 실행하였다. 채취한 10g의 실험 재료를 멸균 증류수로 3회 세척하고 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.8 (0.05 M KCl, 0.005 M MgCl₂, 0.45 M sucrose, 0.005 M 2-mercaptoethanol 함유)로 다시 3회 세척한 다음 동일한 25 ml의 buffer를 사용하여 마쇄시켰다. 마쇄물은 거즈에 여과시켜 조직들을 제거한 다음 10,000 g에서 5분간 원심분리하였다. 상정액은 다시 30,000 g에서 30분간 원심분리시키고 분리된 상정액에 20% Triton X-100을 최종 농도가 1% 되게 부가한 후 1 M 설탕용액이 들어있는 원심관에 넣어 150,000 g에서 3시간 초원심분리하였으며 그 결과 얻어진 상정액을 S-100, 그의 침전물을 ribosome 이라 하였다.

rRNA는 분리된 ribosome 으로부터 Moldave(1967)의 방법에 따라 추출하였다. Ribosome을 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.4로 현탁한 후 SDS와 water-saturated phenol의 혼합물로 추출한 물 층에 ethanol을 부가하여 -20°C에서 핵산을 침전시켰다. 이 침전물을 2% potassium acetate, pH 5.0에 용해시킨 후 원심분리를 하여 SDS를 제거하고 상액에 ethanol을 부가하여 -20°C에서 핵산을 침전시켰다. 이 침전물을 2% potassium acetate, pH 5.0 (in 66% ethanol)으로 세척한 다음 2% potassium acetate, pH 5.0에 현탁시켜 동일한 용액으로 투석을 한 후 260 nm와 280 nm에서 흡수치를 측정하고 이것을 rRNA라 하였다.

tRNA의 추출. tRNA의 추출 방법은 Brunngraber(1962)의 방법을 변형하여 사용하였다. S-100을 2번 phenol로 추출하고 여기서 얻어진 물 층에 ethanol을 부가하여 -20°C에서 4시간 방치한 후 생성된 침전물은 3 M sodium acetate, pH 6.0으로 현탁하였다. 그 상액에 ethanol을 부가하여 -20°C에서 4시간 방치한 후 형성된 침전물을 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6에 현탁하여 DEAE-cellulose(DEAE-23ss) column에 부가한 후 같은 buffer로 260 nm에서의 흡수치가 0이 될 때까지 세척시킨 다음 0.0 - 1.0 M NaCl gradient 용액으로 용출하였다. 용출된 tRNA 분획물들을 한 배 모아 ethanol을 부가하여 -20°C에서 overnight 시킨 다음 형성된 침전물을 증류수로 현탁하고 260 nm와 280 nm에서의 흡수치를 조사한 후 이것을 tRNA라 하였다.

핵산의 정량. Warburg와 Christian(1942)의 방법에 의거하여 핵산의 양을 측정하였다.

結 果

발아중인 종자내에서 rRNA의 양적 변화. 발아중인 종자로부터 내배유를 제거한 후 rRNA를

추출하여 그 양을 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 rRNA의 양은 대조구나 실험구 모두 발아 시간에 따라 변화가 많았다. 즉, 발아 12시간 후에 최대치를 보였고 발아 24시간 후에 최소치를 보였으나, 발아 48시간 후에는 24시간 후보다 현저히 증가되었다. 또한, rRNA의 함량에 대한 GA₃의 효과는 발아 24시간 후부터 나타나기 시작하여 발아 48시간 후에 가장 높았다.

Table 1. Effect of GA₃ on the amount of rRNA in germinating maize seeds. The rRNA was isolated from germinating seeds after removal of endosperm

Hours of germination	Amount of rRNA(mg/g f. wt)		Rate of increase(%)
	Control	GA ₃	
12	0.831	0.831	0.00
24	0.407	0.434	6.63
48	0.567	0.676	19.22
72	0.570	0.577	1.23

Shoot 내에서의 rRNA의 양적 변화. 발아중인 종자에서 shoot만을 채취하여 shoot내의 rRNA 함량을 측정할 결과를 Table 2에 표시하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 rRNA 함량은 대조구와 실험구 모두 shoot 길이가 0.5 cm일 때가 1~1.5 cm일 때보다 더 많았다. 또한, rRNA의 함량에 대한 GA₃의 효과를 보면, shoot의 길이가 0.5 cm일 때에는 GA₃에 의해 rRNA 함량이 감소된 반면에 1~1.5 cm의 shoot에서는 rRNA 함량이 GA₃에 의해 크게 증가되었다.

Table 2. Effect of GA₃ on the amount of rRNA in shoots with different lengths

Length of shoots(cm)	Treatment	Amount of rRNA (mg/g f. wt)	Rate of increase (%)
0.5	Control	1.086	-13.17
	GA ₃	0.943	
1.0~1.5	Control	0.423	17.02
	GA ₃	0.495	

발아중인 종자내에서의 tRNA의 양적 변화. 발아중인 종자로부터 내배유를 제거한 후 tRNA를 추출하여 그 양을 측정하였다. 발아 시간에 따라 tRNA의 양적 변화를 조사한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 대조구와 실험구 각각 발아 시간에 따라 변화가 있었다. 즉

Table 3. Effect of GA₃ on the amount of tRNA in germinating maize seeds. The tRNA was isolated from germinating seeds after removal of endosperm

Hours of germination	Amount of tRNA(mg/g f. wt)		Rate of increase(%)
	Control	GA ₃	
12	0.177	0.178	0.56
24	0.137	0.146	6.57
48	0.166	0.171	3.01
72	0.085	0.091	7.06

tRNA의 함량은 발아 12시간 후에 대조구나 실험구 모두 최대치를 보였고, 24시간 후에는 약 20% 감소되었으며 48시간 후에는 12시간 후의 양과 비슷하였으나 72시간 후에는 현저한 감소를 보여 tRNA의 함량은 12시간 후의 것에 비하여 약 50% 정도였다. tRNA 함량에 대한 GA₃의 효과를 보면, 발아 12시간까지는 그 효과가 거의 없다가 발아 24시간부터 72시간까지는 tRNA의 양이 약간 증가하였다.

Shoot 내에서의 tRNA의 양적 변화. 발아중인 종자로부터 1~1.5 cm 길이의 shoot만을 취하여 tRNA의 함량을 측정된 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 대조구와 실험구 모두 내배유를 제거한 종자에 비하여 (Table 3) tRNA의 양은 적었으나 GA₃에 의한 효과는 비슷하였다.

Table 4. Effect of GA₃ on the amount of tRNA in shoots

Length of shoot(cm)	Amount of tRNA(mg/g f.wt)		Rate of increase(%)
	Control	GA ₃	
1.0~1.5	0.036	0.039	8.33

考 察

식물의 생장 호르몬은 종자의 배에서 합성되며 (Radley, 1959; Yomo, 1960 a, b) 발아하는 동안 내배유로 분비된다(Paleg, 1960; MacLeod and Millar, 1962; Briggs, 1963; Varner, 1964). 또한, 발아중인 옥수수 종자의 경우 α-amylase가 scutellum에서 생성되어 내배유로 분비된다고 하였다(Dure, 1960). 따라서, 본 실험에서는 rRNA와 tRNA의 함량을 조사하기 위한 실험 재료로서 옥수수 종자의 내배유를 제거한 그 나머지 부분, 즉, scutellum, 뿌리 그리고 shoot를 사용하였다.

Wielgat 등(1974)은 발아중인 옥수수 종자에서 rRNA 함량에 미치는 GA₃의 효과가 발아 12시간까지는 나타나지 않았음을 관찰하였는데 이는 본 실험 결과(Table 1)와 일치한다. 그러나, 그들의 실험에서 GA₃의 최대 효과가 발아 24시간으로 나타난 것은 본 실험에서 48시간으로 밝혀진 것과는 다른 결과이며 이러한 차이는 실험 재료로 쓰인 종자의 부위와 처리된 GA₃의 농도 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. 한편, shoot의 경우 길이에 따라, 즉, 발아 시간이 다름에 따라 rRNA 함량에 미치는 GA₃의 효과가(Table 2) 다르게 나타났는데 이것은 shoot의 성장 시기에 따라 GA₃에 대한 민감도가 다르기 때문이 아닌가 사료되며 여기에 관해서는 더 많은 연구가 있어야 하겠다.

Zwar와 Jacobsen(1972)은 보리의 호분층에 GA₃를 처리한 결과, 대조구에 비하여 RNA의 합성이 증가되었는데 rRNA와 tRNA 보다는 mRNA로 추정되는 5S와 14S 사이의 RNA의 합성이 더욱 촉진되었다고 하였다. 한편, Jankowski 등(1975)은 옥수수의 scutellum 부위의 tRNA 양이 GA₃에 의해 거의 증가하지 않았음을 보고하였고, Wielgat 등(1974)은 GA₃가 주로 rRNA의 생합성을 촉진한다고 하였다. 이러한 보고들과 GA₃에 의한 tRNA의 양적 증가율(Table 3, 4)이 rRNA의 양적 증가율(Table 1, 2)에 비하여 현저히 적게 나타난 본 실험의 결과를 종합해 볼 때 GA₃는 rRNA와 tRNA의 합성을 촉진시키기는 하지만 tRNA 보다는 rRNA 합성에 더 많은 효과를 나타낸다고 할 수 있다.

摘 要

RNA 합성에 미치는 GA₃의 효과를 알아보기 위하여 발아중인 옥수수 종자로부터 rRNA 및 tRNA를 분리하여 그 양을 측정하였다. 발아 시간에 따라 종자를 대하여 내배유를 제거한 후 RNA를 추출하여 그 양을 측정한 결과, rRNA 양은 GA₃ 처리에 의하여 발아 48시간 후에 많은 증가를 보였으나 발아 12시간과 72시간에는 거의 변화가 없었다. tRNA의 양은 GA₃를 처리한 결과 발아 12시간 때에는 변화가 없었고 발아 24시간부터 72시간까지 약간의 증가를 보였을 뿐이다. Shoot만을 채취하여 RNA의 양적 변화를 조사한 결과 shoot의 길이가 0.5 cm인 경우에는 오히려 GA₃를 처리함으로써 rRNA의 양이 감소되었으며, 1~1.5 cm에서는 rRNA 및 tRNA의 양이 GA₃에 의하여 모두 증가하였다. 이상의 결과로 보아 GA₃는 발아중인 옥수수 종자에 있어서 RNA 합성에 영향을 미치며, 특히 tRNA 보다는 rRNA 합성에 많이 관여하는 것 같다.

參 考 文 獻

- Briggs, D. E. 1963. Biochemistry of barley germination: Action of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing* **69**: 13~19.
- Broughton, W. J. 1968. Influence of gibberellic acid on nucleic acid synthesis in dwarf pea internodes. *Biochim. Biophys. Acta* **155**: 308~310.
- Brunngraber, E. F. 1962. A simplified procedure for the preparation of soluble ribonucleic acid (rRNA) from liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**: 1~3.
- Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1967a. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **42**: 398~406.
- ____ and _____. 1967b. Hormonal control of enzyme synthesis: On the mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* **42**: 1008~1016.
- Dure, L. S. 1960. Site of origin and extent of activity of amylase in maize germination. *Plant Physiol.* **35**: 925~934.
- Evins, W. H. and J. E. Varner. 1972. Hormonal control of polyribosome formation in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* **49**: 348~352.
- Ho, D. T. H. and J. E. Varner. 1974. Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**: 4783~4786.
- Holmes, P. L. and P. T. Speakman. 1973. Turnover of ribosomes in embryoless half-seeds of barley induced by gibberellic acid. *Nature New Biology* **242**: 190~192.
- Jankowski, J., B. Wielgat and K. Kleczkowski. 1975. Gibberellin affected methylation and synthesis of rRNA in isolated maize seed scutellum. *Plant Sci. Lett.* **5**: 347~350.
- MacLeod, A. M. and A. S. Millar. 1962. Effect of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing* **68**: 322~332.
- Moldave, K. 1967. Preparation of RNA from mammalian ribosomes. In *Methods in enzymology*, L. Grossman and K. Moldave (eds.), Vol. 12. pp. 607~608. Academic Press, New York.
- Paleg, L. 1960. Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* **35**: 293~299.
- Poulson, R. and L. Beevers. 1970. Effects of growth regulators on ribonucleic acid metabolism of barley leaf segments. *Plant Physiol.* **46**: 782~785.

- Radley, M. 1959. Occurrence of gibberellin-like substances in malt. *Chem. Ind.* 877~878.
- Rao, V. S. and A. A. Khan. 1975. Enhancement of polyribosome formation by gibberellic acid and 3', 5'-adenosine monophosphate in barley embryo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62 : 25~30.
- Sim, W. S. and K. S. Roh. 1979. Studies on the mechanisms of gibberellic acid action. 1. Regulation of protein biosynthesis and phosphorylation by gibberellic acid. *Korean J. Bot.* 22 : 95~100.
- Varner, J. E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm. *Plant Physiol.* 39 : 413~415.
- Warburg, O. and W. Christian. 1942. Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Biochem. Z.* 310 : 384~421.
- Wielgat, B., L. D. Wasilewska and K. Kleczkowski. 1974. RNA synthesis in germinating maize seeds under hormonal control. In *Plant growth substances*, pp. 593~598. Hirokawa Pub. Co., Tokyo.
- Yomo, H. 1960a. Studies on the amylase activating substance. IV. On the amylase activating action of gibberellin. *Hakko Kyokaishi* 18 : 600~602.
- _____. 1960b. Studies on the amylase activating substance. V. Purification of the amylase activating substance in the barley malt. *Hakko Kyokaishi* 18 : 603~606.
- Zwar, J. A. and J. V. Jacobsen 1972. A correlation between a ribonucleic acid fraction selectively labeled in the presence of gibberellic acid and amylase synthesis in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 49 : 1000~1006.

(1983. 1. 10. 接受)