

Cytokinin 과 대두 (*Glycine max*) 잎단백질의 결합에 대하여

정창조 · 류기중 · 박창규*

제주대학교 방사능 이용연구소, *서울대학교 농화학과
(1985년 11월 1일 수리)

Binding of Cytokinin to Proteins of Soybean (*Glycine max*) Leaves

Chang-Cho Chung, Ki-Jung Yoo and Chang-Kyu Park

Cheju Applied Radioisotope Research Institute, Cheju
*Dept. of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
Seoul Nat'l University, Suwon, Korea

Abstract

A polyacrylamide gel electrophoresis technique was applied to cytokinin-protein binding assay. Binding of soybean leaf proteins to cytokinin and relative affinities of protein fractions to cytokinin were studied. The electrophoresis technique appeared to be very useful for determination of cytokinin-protein binding, for identification of protein species binding to cytokinin and for comparison of relative affinities of the proteins to cytokinin. The presence of cytokinin-binding proteins in soybean leaves was confirmed from assays with ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-25 chromatography, paper chromatography, and electrophoresis. Three groups of cytokinin-binding proteins were identified in the soybean leaf protein extract and two of the three showed low affinity to cytokinin, however, the third one with mobility between 0.0~0.2, probably high molecular weight protein (s), showed high affinity in the electrophoretic analysis.

서 론

Cytokinin은 auxin, GA 등과 함께 주요 식물 hormone의 하나로 식물의 생장과 분화에 매우 중요한데, 세포분열¹⁷⁾을 비롯한 기관형성¹⁷⁾, 잎의 노화억제²¹⁾, nutrient sink¹³⁾, 엽록체의 분화¹²⁾ 등 매우 많은 생리작용에 관여하는 것으로 알려져 있

다. 그러나 cytokinin의 이러한 생리작용들이 어떤 생화학적 과정을 거쳐 이루어지는 지에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않은데, 그 이유에는 여러가지가 있으나 receptor가 아직 밝혀지지 않은 데에도 큰 원인이 있다.

지금까지 cytokinin의 receptor에 관하여는 wheat germ 단백질에 대해 집중적으로 연구되고 있으나 아직까지 receptor로 확인된 것은 없고 다

* 이 논문은 1985년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

단 cytokinin에 대한 affinity가 큰 단백질이 있음이 확인되어 receptor로서의 가능성이 검토되고 있는 중이다^{1,9,16}.

Wheat를 제외한 다른 식물에 대한 cytokinin의 receptor 연구로는 강남콩¹⁸, 담배^{2,20} 등 몇가지에 국한되어 있고 또 단편적이어서 특기할만한 결과가 없는 실정이다.

본 연구에서는 cytokinin이 식물의 잎조직에 존재하고 엽록체의 합성과 분화¹², 잎의 노화저지^{4,24} 등 잎조직의 여러 생리작용에 관여한다는 사실을 기초로, 잎조직에도 cytokinin의 receptor가 있을 것으로 보고 이를 찾아내기 위한 기초연구로서, 대두의 잎에서 cytokinin과 결합하는 단백질의 유무와 종류 그리고 각 단백질의 cytokinin에 대한 상대적 affinity를 조사하였다.

재료 및 방법

대두(*Glycine max*) 장영콩을 vermiculite에 심고 25°C, 광조건으로 10일간 키워서, 1~2cm 길이의 잎을 채취하여 단백질을 추출하였다.

단백질은 2-mercaptoethanol(56mM), ascorbic acid(10mM), Na₂EDTA(10mM) 그리고 MgCl₂(50mM)를 함유하는 0.3M Tris-HCl(pH8.7) 완충용액(5ml/g.leaves)과 insoluble PVP(0.25g/g.leaves)를 사용하여 4°C에서 추출하였다. 이 단백질 추출액은 chlorophyll과 polyphenol을 비롯한 고분자 물질들을 제거하기 위하여⁸⁾ 2-mercaptoethanol을 포함하는 70% acetone을 처리하여 cytokinin과의 결합을 검정하는데 사용하였다.

단백질과 cytokinin의 결합을 검정하는데에 사용된 cytokinin은 benzyl[8-¹⁴C]adenine(Amersham, 50~60mCi/mmol)이었다.

Benzyl[8-¹⁴C]adenine의 순도와 BA-protein 결합을 검정하기 위한 paper chromatography는 Whatman No 1 paper에서 n-butanol-acetic acid-water(4:1:2) 용매계⁵⁾로 하였다. BA spot의 확인은 silver-dichromate법²²⁾으로 하였고, 표지 BA의 확인에는 autoradioscanner(Bushman)을 사용하였다.

Ammonium sulfate 침전법으로^{14,15,19)} 단백질-BA의 결합을 검정할 때는 단백질추출액에 표지 BA를 넣고 4°C에서 1시간 incubation한 후 ammonium sulfate를 90% 포화되도록 가하여 단백질을 침전시켰다. 단백질침전물은 90% 포화 am-

monium sulfate용액으로 5회 세척한 다음 상등액과 단백질침전물의 방사능을 측정하여 결합여부를 조사하였다.

Sephadex G-25 column chromatography로 BA-protein 결합을 검정할 때는 단백질을 0.3M Tris-HCl(pH 7.2)에 녹이고 표지 BA를 넣어 4°C에서 30분간 incubation한 다음 증류수로 용출시키고 각 분획의 단백질수준과 방사능을 측정하여 검정하였다^{10,20)}.

BA와 결합하는 단백질의 종류와 각 단백질의 BA에 대한 affinity를 조사하기 위하여 비헤리계의 Disc polyacrylamide gel electrophoresis 방법³⁾을 시도하였는데, 5% gel을 사용하였다. Tris-HCl 완충용액(0.3M, pH 7.2)에 녹인 단백질을 표지 BA와 혼합하여 4°C에서 30분 incubation한 후 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel(stacking gel: 2cm, separating gel: 10cm)은 1cm씩 잘라서 1.5ml의 증류수로 추출(overnight)한 액의 방사능을 측정하였다. 단백질 band의 확인을 위한 gel은 Coomassie blue로 염색시켰다.

방사능의 측정은 시료용액 1ml를 scintillation solution 9ml와 혼합하여 완전히 섞은 다음 liquid scintillation counter(Beckman LS100C)로 측정하였다. 이때 사용된 scintillation solution은 PPO(5.5g/l), POPOP(0.1g/l), toluene(667ml/l), Triton X-100(333ml/l)의 혼합액이었다.

결과 및 고찰

Receptor에 대한 cytokinin의 결합특성을 조사하는 데에 azido-substituted cytokinin을 이용한 photoaffinity labeling 기술이 제안되고 있으나^{10,11)} photoaffinity reagent의 합성에 어려움이 있고 또 이 화합물들의 물리화학적 특성이 잘 알려져 있지 않다는 점 등의 이유로 아직 보편적으로 쓰이지 않고, 현재까지는 주로 방사능표지 cytokinin이 이용되고 있다⁸⁾.

본 실험에서는 cytokinin과 결합하는 단백질을 검정하는 데에 방사능표지 cytokinin인 benzyl[8-¹⁴C]adenine을 85% ethanol에 녹여 저장하면서 사용했는데, 저장중의 분해 여부를 확인하기 위하여 paper chromatography로 검정한 결과 Fig. 1에서 보는 바와같이 분해산물은 보이지 않았다.

Table 1은 대두의 잎단백질중에 cytoinin과 결

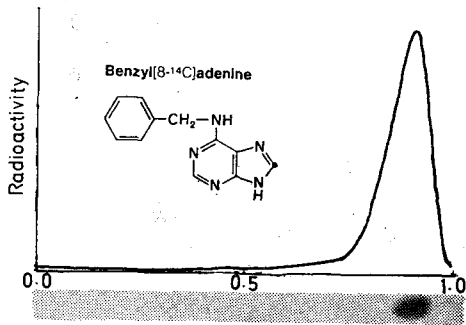


Fig. 1. Chromatogram of the labelled BA dissolved in 85% ethanol on Whatman No. 1 paper (solvent system: n-butanol:acetic acid-water=4 : 1 : 2).

합하는 단백질이 있는지를 보기 위하여 일단백질 추출액에 표지 cytokinin을 넣고 일정시간 incubation한 다음 ammonium sulfate로 90% 포화시켜 단백질을 침전시킨 후 5회에 걸쳐 단백질 추출용액의 ammonium sulfate 90% 포화용액으로 세척하면서 상등액과 단백질 침전물의 방사능을 측정 한 결과이다 (Table 1).

Table 1. Ammonium sulfate precipitation assay of soybean leaf protein binding to BA.

labelled BA+protein extract	1960 ^a
supernatant of 1st washing	34 ^a
supernatant of 5th washing	2 ^a
protein precipitate	1720 ^a
protein precipitate/supernatant	860 ^b

a : cpm $\times 10^{-3}/ml$, b : ratio of radioactivity

첫번째 상등액의 방사능은 34,000cpm으로 높았으나 다섯번째 상등액의 경우에는 2,000cpm으로 낮아진 것으로 보아 유리 BA의 상당한 양이 세척 과정에서 제거되었음을 알 수 있다. 한편 5회 세척 후 단백질 침전물의 방사능이 상등액에 비해 매우 높게 나타나 BA의 상당한 양이 단백질과 함께 남아있는 것으로 나타났다. 상등액에 비해 단백질 침전물의 방사능이 현저히 높은 것으로 미루어 보면 BA가 단백질 침전물에 단순히 혼입되어 있는 것이 아니라 어떤 단백질과 결합을 이루고 있는 것으로 보인다. 그러므로 위의 결과는 적어도 대두의 일단백질 중에 BA와 결합하는 것이 있고,

BA와 결합하는 단백질중에 BA의 receptor도 포함되어 있을 가능성이 있음을 보여 준다.

그런데 이 결합시험 조건에서는 고농도의 ammonium sulfate(90% 포화)가 사용되었으므로 이것이 BA를 단백질에 특이성 없이 결합하게 했을 가능성이 있는데, 이 가능성을 검토하기 위하여 Sephadex G-25 chromatography로 BA와 단백질의 결합여부를 조사하였다 (Fig. 2).

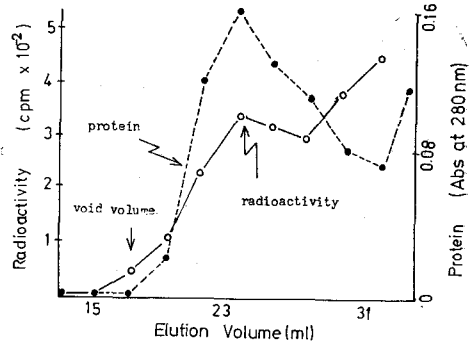


Fig. 2. Gel filtration assay of soybean leaf protein binding to BA on Sephadex G-25 column.

Tris-HCl 완충액 (pH 7.2)로 추출한 단백질 추출액에 표지 BA를 첨가하고 일정시간 incubation한 후 Sephadex G-25 column에서 증류수로 용출시킨 결과 방사능 peak는 단백질이 용출된 peak와 일치하였다. 유리 BA는 분자량이 작아 이 chromatography 조건에서는 단백질보다 늦게 용출되므로 단백질 용출분획에 방사능 peak가 나타난 것은 단백질에 결합된 BA에 의한 것으로 생각된다. 그러므로 ammonium sulfate 침전법에서 단백질 침전물에 BA가 함께 나타난 것은 ammonium sulfate에 의하여 BA가 단백질에 특이성 없이 단순히 혼입된 것이 아니고, BA가 어떤 단백질에 결합되어 있음을 알 수 있다.

한편 방사능은 elution volume 30ml 이후에 다시 증가한 것이 관찰되었는데, 이것은 Sephadex G-25의 분리 범위가 분자량 1,000~5,000인 것을 고려할 때 BA가 분자량이 비교적 작은 어떤 물질과도 결합할 가능성이 있음을 보여주는데, 이 분획의 280nm 흡광도도 함께 증가한 것으로 보아 분자량이 작은 어떤 polypeptide가 BA와 결합하였을 가능성이 있었다. Takegami와 Yoshida는^{20,23)} 담배잎으로부터 cytokinin과 결합하는 분자량 4,000의 polypeptide를 분리한 바 있는데, 대두의 잎에

도 이와 유사한 polypeptide가 있을 가능성이 있었다. 이러한 가능성을 검토하기 위하여 단백질 추출액과 표지 BA의 혼합물을 paper chromatography 한 결과는 Fig. 3 과 같다.

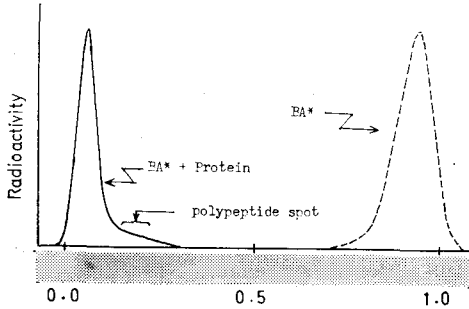


Fig. 3. Paper Chromatography assay of soybean leaf protein binding to BA on Whatman No. 1 paper(solvent system: n-butanol-acetic acid-water=4 : 1 : 2).

표지 BA 만을 chromatography 했을 때 Rf 약 0.9에서 방사능 peak가 나타났는데 반해, 표지 BA를 단백질추출액과 혼합하고 일정시간 incubation 한 다음 이것을 chromatography 했을 때는 Rf 0.0 ~ 0.1 사이에 주된 방사능 peak가 나타났다. Ninhydrin 용액으로 발색시켰을 때 단백질 spot는 방사능 peak와 거의 일치하는 부위에 나타나 BA와 단백질의 결합을 이 방법에 의해서도 확인할 수 있었다.

한편 상대이동도 0.2 부근에서 호리나마 ninhydrin에 의해 발색된 spot가 관찰되었고 이 부위의 방사능도 다소 측정되어, 분자량이 큰 단백질 이외에 분자량이 작은 polypeptide 중에도 BA와 결합하는 것이 있는 것처럼 보였다. 그러나 이 부위의 방사능이 매우 낮은 것을 보면 BA에 대한 이 polypeptide들의 affinity는 작은 것으로 생각되었다. Takegami와 Yoshida^{20,23}가 담배잎으로부터 추출한 polypeptide도 cytokinin에 대한 affinity가 낮아 이 polypeptide가 cytokinin의 receptor로 작용할 가능성은 적은 것으로 나타났다.

Receptor protein 연구의 일반적 과정에는 조직으로부터 단백질을 추출하고 salting out, gel permeation chromatography, ion exchange chromatography, affinity chromatography 등의 방법으로 단백질을 분리한 다음 각 단백질의 호르몬에 대한 affinity를 equilibrium dialysis등으로 조사하고 hormone-protein complex의 생리활성을

확인하여 receptor로서의 가능성을 검토하는 과정이 포함되는데^{6,7}, 이러한 과정중에 receptor후보 단백질을 분리하고 호르몬과의 결합여부와 affinity를 조사하는 과정이 간단하지 않다. 본 실험에서는 어떤 조직으로부터 추출된 단백질중에 receptor 후보로서 hormone과 결합하는 단백질이 있는지의 여부와 hormone에 affinity를 보이는 단백질의 종류를 확인하고, 각 단백질의 hormone에 대한 개략적인 affinity를 비교할 수 있는 비교적 간단한 방법으로서 polyacrylamide gel electrophoresis 방법을 시도하였다(Fig. 4).

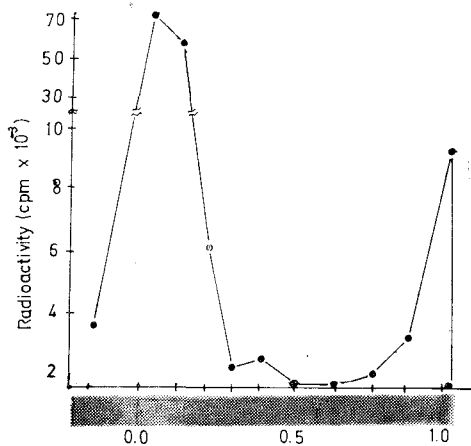


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of the mixture of labelled BA and protein extract of soybean leaves.

대두 잎단백질 추출액에 표지 BA를 첨가하고 일정시간 incubation한 다음 비해리계의 전기영동 조건으로 단백질을 분리한 다음 각 band에 해당하는 단백질분획의 방사능을 측정한 결과 BPB에 대한 상대이동도가 0.0~0.2와 0.9~1.0의 두곳에서 높은 방사능 peak가 나타났고, 상대이동도 0.4 부근에서 또하나의 작은 peak가 관찰되어, 대두 잎단백질 중에는 대체로 3group의 단백질이 BA에 affinity를 보이는 것으로 나타났다. 그런데 상대이동도 0.0~0.2 분획에서 방사능은 매우 높게 나타났는데 반해 Coomassie blue에 의한 염색 정도로 보아 단백질의 양은 매우 적은 것으로 나타났다. 이 분획이 높은 방사능을 보인 것은 BA가 polyacrylamide matrix에 결합된 데에 원인이 있을 수도 있고, sample apply 부위와 가까워 BA가 단순한 확산에 의해 polyacrylamide matrix에 혼입된 데 원인이 있을 수도 있으나, stacking

gel의 방사능이 이 부위의 것에 비해 현저히 낮은 것을 볼 때 이러한 두가지 가능성은 희박한 것으로 생각되었다. 그러므로 단백질의 양이 적은데에도 불구하고 방사능이 높은 것은, 오히려 이 분획의 단백질이 BA에 대해 높은 affinity를 지니고 있기 때문인 것으로 생각되었다. 그리고 이 분획은 전기영동이동도가 0.0~0.2로 매우 작아 분자량이 비교적 큰 단백질인 것으로 보이는데, wheat germ 단백질에 대한 Bringer 등¹⁾ 다른 사람들의 연구^{6,9,10,16)}에서도 cytokinin에 대해 affinity가 커서 cytokinin receptor일 가능성이 높은 것은 분자량이 큰 122~183KD의 단백질임이 알려져 있다.

Sephadex G-25 chromatography와 paper chromatography 결과의 검토에서 BA에 affinity를 보이는 분획중에 분자량이 작은 polypeptide가 존재할 가능성이 있음을 언급하였는데, Fig. 4에서도 그 이동도로 보아 분자량이 작은 polypeptide로 생각되는, 이동도 1.0부근의 band가 BA에 대해 affinity를 보였다. 그런데 이 band의 방사능은 비교적 높으나 이와함께 그 단백질 함량도 많아, BA에 대한 이 polypeptide들의 affinity는 그다지 크지 않은 것으로 생각되었다.

그리고 cytokinin과 단백질의 결합을 검정하는 하나의 방법으로서 시도된 위의 전기영동 방법은 cytokinin과 단백질의 결합여부 뿐만 아니라, cytokinin과 결합하는 단백질의 종류 및 각단백질의 cytokinin에 대한 상대적 affinity를 동시에 검정할 수 있는 장점이 있었다. 물론 본실험에서 사용한 비헤리계 전기영동 방법에서는 단백질들이 완전히 분리되는 것은 아니라는 점과 미량의 단백질을 정량적으로 측정하는 데에 어려움이 있다는 점, 그리고 affinity에 대한 정량적 자료를 얻기가 어렵다는 것등의 단점을 지니고 있어서 이 방법의 응용에는 한계가 있으나, 비교적 간단한 방법이고 cytokinin-단백질 결합에 대한 많은 유용한 정보를 얻을 수 있는 장점이 있어서 receptor protein에 대한 기존의 여러 검정 방법들과 상호 보완해서 사용할 수 있을 것으로 보인다.

지금까지의 실험결과에서 대두의 일단백질 중에는 BA와 결합하는 것이 있음을 알았고, BA와 결합하는 단백질에는 대체로 3가지 group이 있는데 이 중에서 분자량이 작은 polypeptide로 보이는 분획과 전기영동이동도 0.4 부근의 분획은 BA에 대한 affinity가 비교적 낮은 반면, 분자량이 큰 단백질로 보이는 이동도 0.0~0.2의 분획은 affinity

가 비교적 큰 것으로 나타났다. 그러나 본 실험에서 BA와 결합하는 각 단백질이 cytokinin에 대한 특이성이 있는지는 확인할 수 없었기 때문에 각 단백질이 cytokinin의 receptor로서 자격이 있는지 확실하게 알 수는 없었는데 여기에 관해서는 앞으로의 연구가 기대된다.

요 약

Cytokinin과 단백질의 결합을 간단하게 검정하는 방법으로서 전기영동법을 시도하고, 대두의 일 단백질과 cytokinin의 결합여부, cytokinin에 대한 affinity가 있는 단백질의 종류와 상대적 affinity를 조사하였다.

검토된 전기영동법은 cytokinin과 단백질의 결합 뿐만아니라, cytokinin에 대한 상대적 affinity를 동시에 검정할 수 있는 장점을 가지고 있었다.

Ammonium sulfate 침전법, Sephadex G-25 chromatography, paper chromatography, 그리고 전기영동법으로 대두의 일 단백질 중에 BA와 결합하는 단백질이 있음을 확인할 수 있었다.

전기영동법으로 검정한 결과 BA와 결합하는 것이 3 group이 있고, 이 중에서 전기영동 이동도로 보아 분자량이 작은 단백질 분획과 전기영동 이동도 0.4 부근의 분획은 BA에 대한 affinity가 비교적 낮은 반면, 이동도 0.0~0.2의 분획은 affinity가 큰 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Brinegar, A.C., Stevens, A. and Fox, J.E.: Plant Physiol., 79 : 706~710(1985).
2. Chen, C.M., Melitz, D.K., Petschow, B. and Eckert, R.L.: Eur. J. Biochem., 108 : 379~389(1980).
3. Davis, B.J.: Ann. New York Acad. Sci. U.S.A., 121, 404(1964).
4. Des Francs, C.C.: Plant Physiol., 78: 178 (1985).
5. Dyson, W.H. and Hall, R.H.: Plant Physiol. 50 : 616~621(1972).
6. Erion, J.L. and Fox, J.E.: Plant Physiol., 67 : 156~162(1981).
7. Erion, J.L., Keim, P., Rousell, D. and Fox, J.E.: Plant Physiol. Suppl., 61, 10

- (1978).
8. Hari, V.: Anal. Biomchem., 113 : 332~335 (1981).
 9. Keim, D., Erion, J. and Fox, J.E.: Metabolism and molecular activities of cytokinins, Springer-Verlag, Berlin, pp179~190(1981).
 10. Moore, F.H.: Plant Physiol., 64 : 594~599 (1979).
 11. Mornet, R., Theiler, J.B., Leonard, N.J., Schmitz, R.Y., Moore, F.H. and Skoog, F.: Plant Physiol., 64 : 600~610(1979).
 12. Parthier, B.: Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 174, 173(1979).
 13. Patrick, J.W.: Transport and Transfer Processes in Plants, Academic Press, N.Y., pp433~446(1979).
 14. Polya, G.M. and Davis, A.W.: Planta, 139 : 139~147(1978).
 15. Polya, G.M. and Davis, A.W.: Plant Physiol., 64 : 387~392(1979).
 16. Polya, G.M. and Davis, J.R.: Plant Physiol., 71 : 482~488(1983).
 17. Skoog, F.: Plant Growth Substances, 1979, Springer-Verlag, Berlin, pp1~50(1980).
 18. Starr, A.M., Fox, J.E.: Plant Physiol. Suppl., 61 : 10(1978).
 19. Sussaman, M.R. and Kende, H.: Planta, 140 : 251~259(1978).
 20. Takegami, T. and Yoshida, K.: Biochemical and Biophysical Research Communications, 67(2) : 782~789(1975).
 21. Thimann, K. V.: Senescence in Plants, CRC Press, Florida, pp3~60(1980).
 22. Whitfeld, P.: Data for Biochemical Research, pp 564~565(1969).
 23. Yoshida, K. and Takegami, T.: J. Biochem., 81 : 791~799(1977).
 24. Yu, S.M. and Kao, C.H.: Bot. Bull. Academia Sinica, 24 : 65~70(1983).