

## Cell Biological Studies on Growth and Development

### Effect of polyamine and $Ca^{2+}$ on D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity in carrot root protoplast

Lee, Sun Hi, Young Hee Kang, Eon-Seon Jin, Young-Dong Cho,\*  
Myeong-Won Kim\*\* and June-Seung Lee\*\*\*

(Departement of Biology, \*Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul, \*\*Department of Biology, Yonsei University, Wonju and\*\*\* Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul)

### 生體生長에 관한 細胞生物學的 研究

### 당근 뿌리의 원형질체에서 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 활성도에 미치는 polyamine과 $Ca^{2+}$ 의 영향

李舜熙 · 康榮熹 · 陳彥先 · 趙暎東\* · 金明苑\*\* · 李俊承\*\*\*

(延世大學校 生物學科, \*生化學科, \*\*原州分校 生物學科, \*\*\*梨花女子大學校 生物學科)

#### ABSTRACT

The effect of polyamine and  $Ca^{2+}$  on D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity was studied in *Daucus carota* root. The enzyme activity was reduced in response to increase in concentration of  $Ca^{2+}$ , not the  $Ca^{2+}$ -calmodulin complex. The inhibition effect due to  $Ca^{2+}$  was reversed by polyamine, especially remarkable at low concentration of  $Ca^{2+}$ . The effect of the  $Ca^{2+}$  on the enzyme seemed to compete with polyamine according to the Lineweaver-Burk plot. The enzyme activity from carrot root protoplast cultured in the presence of verapamil was higher than that of the control. Such cumulative results suggest that the inhibition by the  $Ca^{2+}$  and enhancement or reversal by polyamine could regulate the biosynthesis of pectin and hemicellulose to some extent.

#### 서 론

세포벽 구성 성분중 hemicellulose와 pectin은 다음의 두가지 경로에 의하여 합성된다. 즉, D-glucose-6-phosphate에서 myoinositol을 형성한 후 UDP-D-glucuronic acid로 전환되는 myo-inositol산화경로(Ruberry and Northcote, 1970; Loewus and Loewus, 1974)와 D-glucose-6-phosphate에서 UDP-glucose로 전환한 다음 UDP-D-glucuronic acid로 전환되는 UDP-D-glucose산화경로 (Ruberry, 1972; Roberts and Cetorelli, 1973)이다. 이렇게 합성된 UDP-D-glucuronic acid는 hemicellulose와 pectin의 전구물질로 이동된다(Hall *et al*; 1982). 이러한 합성 경로는 식물의 종에 따라 다르며 당근 (*Daucus carota* L.)의 경우는 myo-inositol산화경로로 생합성된다(Loewus and Loewus, 1974; Rosenfield *et al*; 1978).

본 연구는 1986년도 문교부 기초 과학 육성 연구비 지원에 의한 것임

한편  $Ca^{2+}$ 은 식물체의 필수원소중의 하나로써 식물세포의 구조와 생리 그리고 생화학적으로 중요한 역할을 한다(Hepler and Wayne, 1985). 구조적으로는  $Ca^{2+}$ -pectin cross linkage를 이루어 세포벽의 경성을 유도하여 세포와 세포간의 결합을 강화시키고 세포의 신장에 관여하는 auxin의 작용에는  $Ca^{2+}$ 이온이 필요하다.(Levine and Dalgarno, 1983; Cleland and Rayle, 1977). 또한 일차세포벽의 기질이 견고하면서도 탄력있는 gel 상태가 되도록 해준다(Soll and Bottger, 1982). 그외에 세포막이 낮은 pH와 염도, 영양적 불균형 등의 영향으로 부터 야기되는 세포막의 용출현상을 억제하는 데도 관여하고 있다(Clarkson and Hanson, 1980). 생리적 측면에서  $Ca^{2+}$ 은 식물의 성장과 발달 그리고 외부 환경변화에 대한 적응면에 조절적 기능이 있음이 보고되었다(Robinson and Jaffe, 1975; Hale and Roux, 1980). 특히 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 여러가지 생리적 기능을 조절하는 주요 요인으로 보고되고 있으며(Williamson, 1981), 세포내  $Ca^{2+}$ 은 calmodulin과 결합하며  $Ca^{2+}$ -calmodulin 복합체를 형성함으로써 secondary messenger로 작용한다(Rasmussen, 1970; Marme and Dieter, 1983; Lukas *et al.*, 1984).  $Ca^{2+}$ -calmodulin 복합체는 특정 효소의 활성을 촉진하는 것으로  $NAD^+$  kinase,  $NAD^+$  oxidoreductase 등의 효소활성에 영향을 미친다(Marme and Dieter, 1982; Dieter and Marme, 1984; Hills and Beevers, 1986; Putman-Evans and Cormier, 1987).

Cho 등 (1986)은 식물의 성장조절물질로 중요한 역할을 하는 polyamine (Bagni *et al.*, 1981; Galston and Kaur-Sawhney, 1982; Seratini-Fracassini *et al.*, 1984)이 당근의  $\beta$ -glucan synthetase와 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase를 활성화시켰음을 *in vitro*에서 보고 하였다. 이와 관련시켜 본 연구에서는 식물체의 필수원소로서 식물세포에서 구조적, 생리적으로 중요한 역할을 하는  $Ca^{2+}$ 이 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase활성에 미치는 영향을 관찰하고 polyamine과 calmodulin이 각각 존재시  $Ca^{2+}$ 이 이 효소에 미치는 영향도 함께 관찰하여  $Ca^{2+}$ 의 생리적, 생화학적 역할의 일부를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** 당근(*Daucus carota* L.)의 뿌리를 사용하여 Cho 등 (1985)의 방법과 같이 2% cellulase R-10, 1% macerozyme R-10 0.7M mannitol을 사용하여 원형질체를 분리하여 배양하였다. 실험구의 설정. 당근뿌리에서 추출한 조효소원에  $Ca^{2+}$ 을 농도별로(10-0.01mM)처리하고 polyamine (1~0.01mM)과  $Ca^{2+}$  (10~0.01mM)을 동시에 처리하였다. 또한 분리한 원형질체를 배양배지 ( $Ca^{2+}$ , 3mM)에 verapamil(1mM)을 처리하여 4일간 배양하였다.

**D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase추출과 활성 측정.** 효소원의 추출은 Loewus와 Loewus(1971)의 방법으로 당근뿌리에서 cell-free extract를 얻은 후에 DEAE-cellulose column(10×300mm)으로 부분순화 하였다. 효소의 활성 측정은 Cho 등 (1986)에서와 같이 Barnett 등 (1970)과 Donahue와 Henry(1981)의 방법으로 효소반응을 시킨다음 생성된 무기인산을 Chen 등(1956)의 방법으로 정량하여 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

Hemicellulose와 pectin의 생합성의 key enzyme인 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase활성에 대한  $Ca^{2+}$ 의 영향을 조사하기 위하여 우선 당근 뿌리로 부터 얻은 조효소에 1 $\mu$ M~10mM의  $CaCl_2$ 를 농도별로 처리하여 효소활성을 측정하였다.  $Ca^{2+}$ 농도가 증가함에 따라 효소활성은 점차 감소하였다. 즉  $Ca^{2+}$ 을 처리하지 않은 대조구에서의 효소활성을 100%로 하였을

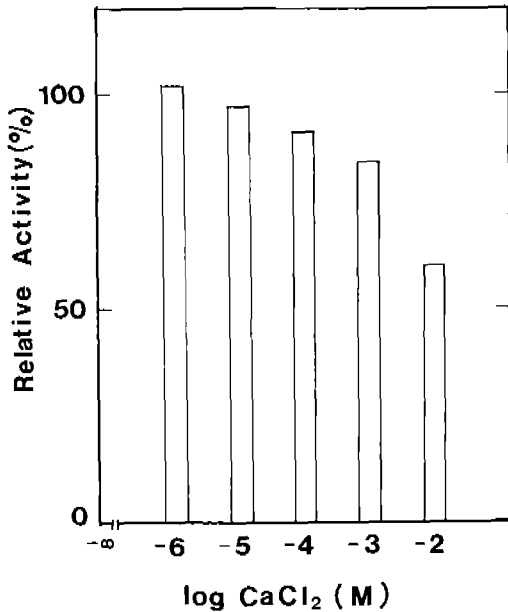


Fig. 1. Effect of Ca<sup>2+</sup> on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity.

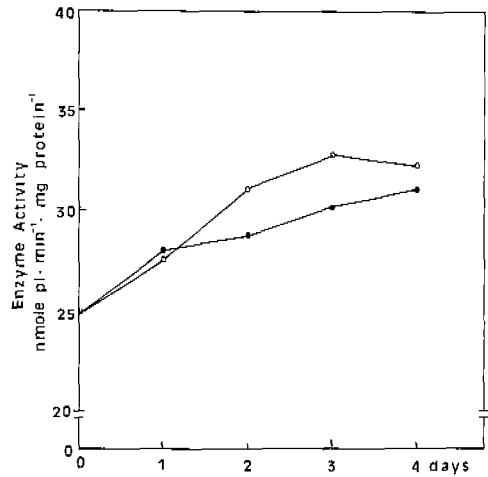


Fig. 2. Effect of verapamil on carrot root protoplasts glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity as function of the time course. Verapamil used was 10<sup>-3</sup> M, respectively.

(•) control  
(○) verapamil

때, 1mM CaCl<sub>2</sub>를 처리하였을 때는 20%, 10mM CaCl<sub>2</sub>를 처리하였을 때는 40% 정도의 효소활성이 감소되었다(Fig.1).

상기의 억제효과를 원형질체에서 관찰하기 위하여 당근 뿌리로부터 얻은 원형질체를 배양하여 세포벽을 재생시키면서 효소활성에 대한 Ca<sup>2+</sup>의 영향을 측정하였다. 즉, 배양액에는 약 3mM의 Ca<sup>2+</sup>이 존재하므로(Williamson, 1981) verapamil과 같은 Ca<sup>2+</sup> channel blocker를 배지에 함께 처리하여 효소활성의 변화를 조사하였다. 1mM의 verapamil을 배지에 처리하였을 때 대조구에 비하여 배양 2일이 지난 후부터 효소활성이 증가하였다(Fig. 2). 이는 verapamil에 의하여 배지로부터 세포내로 Ca<sup>2+</sup>의 전이를 차단하므로서 Ca<sup>2+</sup>에 의한 효소활성 억제가 일어나지 않기 때문인 것으로 추측된다. Glucose-6-phosphate cyclohydrolase에 대한 Ca<sup>2+</sup>의 이러한 작용이 calmodulin과 complex를 이루어 작용하는지 free ion상태로 작용하는지를 밝히기 위하여 부분순화한 효소에 calmodulin을 Ca<sup>2+</sup>과 함께 처리하여 효소활성을 측정하였다. 그 결과 calmodulin을 함께 처리하였을 때에도 효소활성에 차이점을 관찰하지 못하였다. 이는 Ca<sup>2+</sup>이 free ion상태로 이 효소활성을 억제하는 것으로 해석된다(Table 1). 이와 같이 free Ca<sup>2+</sup>이 효소활성

Table 1. The effect of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity

Treatment	Relative activity (%)
Control	100
CaM*	95
CaCl <sub>2</sub> 0.01 mM	100
1 mM	70
CaCl <sub>2</sub> 0.01 mM + CaM	97
1 mM + CaM	60

\*CaM: Calmodulin, 5unit.

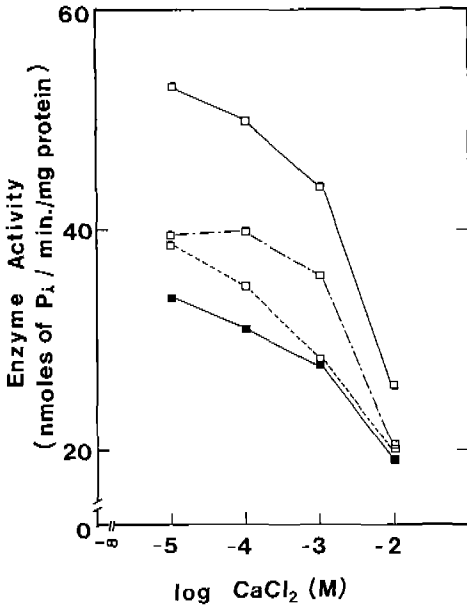


Fig. 3. Effect of concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and spermine on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity. Concentrations of spermine are 0;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ,  $10^{-5}$  M;  $\square$ ----- $\square$ ,  $10^{-4}$  M;  $\square$ ---- $\square$ ,  $10^{-3}$  M;  $\square$ — $\square$ , respectively.

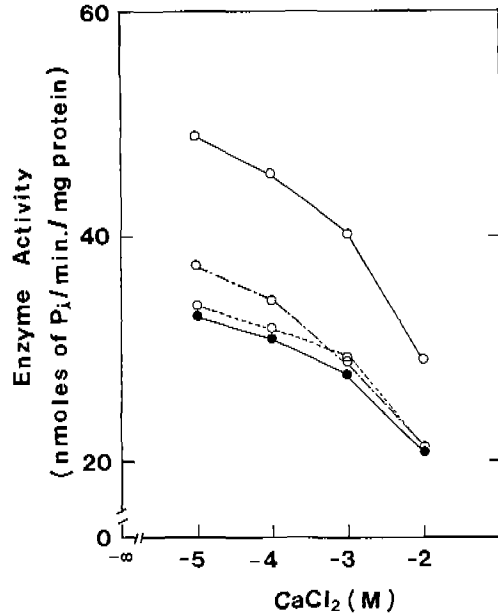
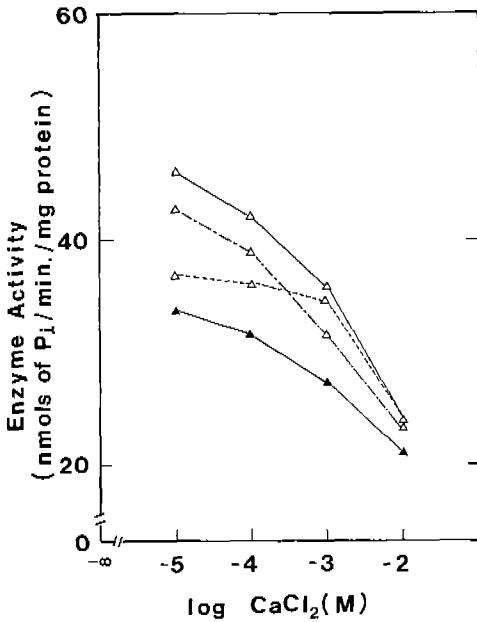


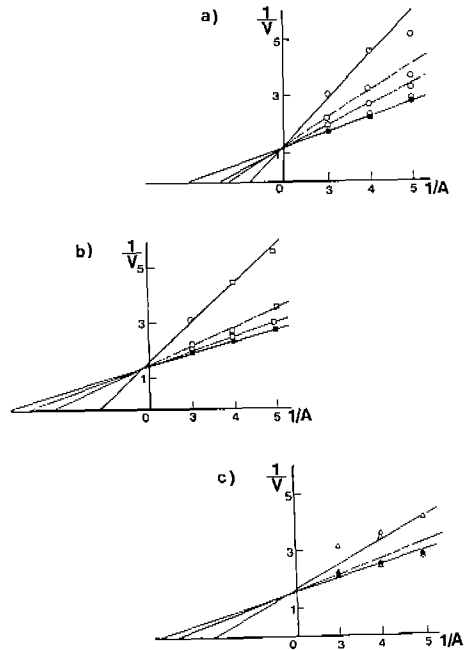
Fig. 4. Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and spermidine on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity. Concentrations of spermidine are 0;  $\bullet$ — $\bullet$ ,  $10^{-5}$  M;  $\circ$ ----- $\circ$ ,  $10^{-4}$  M;  $\circ$ ---- $\circ$ ,  $10^{-3}$  M;  $\circ$ — $\circ$ , respectively.

에 영향을 주는 경우는 castor bean의 neutral lipase(Hills and Beevers, 1987)와 soybean의 protein kinase (Harmon *et al.*, 1987)등에서도 볼 수 있다.

Cho 등 (1986)에서는 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성이 polyamine에 의해 시험관내와 원형질체에서 촉진되었다. 특히 생리적 pH에서 양이온 성질을 나타내는 polyamine의 특성에 따라 (Galston and Kaur-Sawhney, 1982; Altman *et al.*, 1982; Fuhrer *et al.*, 1982) diamine인 putrescine보다 triamine인 spermidine과 tetramine인 spermine에서 더욱 효과가 높은 것으로 보고된 바 있다. 반면에 양이온류인  $\text{Ca}^{2+}$ 은 이와 반대로 효소활성을 억제하였으므로 (Figs. 1, 2) 순화된 효소원에 polyamine과  $\text{Ca}^{2+}$ 을 각각 농도별로 동시에 처리함으로써 polyamine과  $\text{Ca}^{2+}$ 의 상호작용을 좀더 명확히 규명하고자 다음과 같은 실험을 하였다. Fig. 3은  $\text{Ca}^{2+}$ 과 spermine을 농도별로 처리하였을 때 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 활성을 나타낸 것이다.  $\text{Ca}^{2+}$ 은 농도가 높아짐에 따라 효소의 활성을 억제하는데 spermine을 함께 처리한 실험구에서는  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의해 감소된 효소 활성을 회복시키는 경향을 나타냈으며 spermine의 농도가 1mM일때 0.1mM과 0.01mM보다 회복 정도가 뚜렷하였고 특히  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도가 저농도일 때 회복효과가 현저하였다. Fig. 4와 Fig. 5는  $\text{Ca}^{2+}$ 과 spermidine, putrescine을 각각 동시에 처리하였을 때의 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase 활성을 나타낸 것이다. 이들 결과는 Fig. 3에서의 결과와 거의 비슷한 경향을 나타냈다. Fig. 6은 Fig. 3, 4, 5의 결과를 Lineweaver-Burk plot하여 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase에 대한  $\text{Ca}^{2+}$ 과 polyamine의 상호작용을 조사한 것이다. 즉 이들의 작용은 Y축에서 한 점으로 만나는 경쟁적인 상호작용을 나타냈다.



**Fig. 5.** Effect of Ca<sup>2+</sup> and putrescine on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity.  
Concentrations of spermine are:  $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ , 10<sup>-5</sup> M;  $\triangle$ ..... $\triangle$ , 10<sup>-4</sup> M;  $\triangle$ - - - $\triangle$ , 10<sup>-3</sup> M;  $\triangle$ — $\triangle$ , respectively.



**Fig. 6.** Effect of Ca<sup>2+</sup> and polyamines on carrot root D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity.\*  
A: -log[polyamine]  
a) spermidine b) spermine c) putrescine  
Plot based on Figs. 3, 4 and 5.

이상의 결과는 Ca<sup>2+</sup>의 정전기적 성질이 효소의 구조적 변화를 초래한다는 보고(Wolff and Cook, 1975; Galston *et al.*, 1982)를 고려하면 Ca<sup>2+</sup>이 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 negative site에 polyamine과 경쟁적으로 작용하기 때문으로 추측된다. polyamine이 특별한 효소에 가역적으로 결합함으로써 효소의 조절작용에 관여한다는 보고(Corley *et al.*, 1983)와 Ca<sup>2+</sup>과 polyamine이 효소에 대하여 상호적인 역할을 한다는 보고(Kauss and Jeblick, 1986)가 있지만 본 실험에서는 Ca<sup>2+</sup>은 free이온으로서 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase활성을 억제하며 polyamine과는 서로 경쟁적 작용에 의하여 효소활성을 조절한다고 생각된다.

### 적 요

당근(*Daucus carota* L.)뿌리로부터 얻은 D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase의 활성에 미치는 Ca<sup>2+</sup>과 polyamine의 영향을 조사하였다.

Ca<sup>2+</sup>의 농도(1 $\mu$ M~10mM)가 증가함에 따라 효소의 활성을 감소시키는 데 이는 Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex로 작용하지 않고 free Ca<sup>2+</sup>으로 작용하는 것 같다. Ca<sup>2+</sup>에 의한 효소활성 감소 효과는 polyamine에 의하여 회복되었고, 이러한 효과는 Ca<sup>2+</sup>이온의 농도가 낮을 수록 현저하였다. Lineweaver-Burk plot결과 polyamine과 Ca<sup>2+</sup>은 이 효소에 대하여 경쟁적인 방법으로 작용하는 것으로 사료된다. Verapamil첨가 하에

서 배양한 당근 원형질의 효소활성은 대조구에 비하여 전반적으로 높은 것으로 나타났다.

이러한 결과들은  $Ca^{2+}$ 이 효소의 활성을 감소시키고 반면에 polyamine은 활성을 증가시키는 기작으로 pectin과 hemicellulose합성을 조절하는데 어느 정도 기여할 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Altman, A., R. Friedman, D. Aamir and N. Nevin. 1982. Polyamine effects and metabolism in plants under stress conditions. *In*, Plant growth substances. Wareing, P.F., (ed.), Academic press, New York, pp. 483-494.
- Bagni, N., D. Serafinii-Fracassini and P. Torrigiani. 1981. Polyamines and growth in higher plants. *In*, Advances in Polyamine Research. Caldera, C.M.V. Zappia and U. Bachrach. (eds.), Raven press, New York, pp. 337-338.
- Barnett, J.E.G., R.E. Brice and D.L. Corina. 1970. A colorimetric determination of inositol monophosphates as an assay for D-glucose-6-phosphate L-myo-inositol-phosphate cyclase. *Biochem. J.* **119**: 183-186.
- Chen, P.S., T.Y. Toribara and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 1756-1758.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, M.Y. Kim and H.M. Lee. 1986. Cell biological studies on the mechanism of development and differentiation X. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Kor. J. Bot.* **28**: 243-251.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, M.Y. Kim, Y.H. Kang, S.H. Kim and E.S. Jin. 1986. Cell biological studies on growth and development. Effect of polyamines on D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase activity in carrot cell. *Kor. J. Bot.* **29**: 263-284.
- Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 239-298.
- Cleland, R.E. and D.L. Raylc. 1977. Revaluation of the effect of  $Ca^{2+}$  ion on auxin induced elongation. *Plant Physiol.* **60**: 709-712.
- Corly, E., R.A. Wolosiuk and C.M. Hertig. 1983. Regulation of the activation of chloroplast fructose -1-6-biphosphatase: Inhibition by spermine and spermidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 707-714.
- Dieter, p. and D. Marmé. 1982. The role of  $Ca^{2+}$  and calmodulin in plants. *What's New In Plant Physiol.* **13**: 37-40.
- Donahue, T.F. and S.A. Henry. 1981. Myo-Inositol-phosphate synthetase: Characterization of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **256**: 7077-7085.
- Fuhrer, J., R. Kaur-Sawhney, Liu-Mei Shih and A.W. Galston. 1982. Effect of exogeneous 1,3-diaminopropane and spermidine on senescence of oat leaves. *Plant Physiol.* **70**: 1597-1600.
- Galston, A.W. and R. Kaur-Sawhney. 1982. Polyamines: Are they a new class of plant growth regulator? *In*, Plant growth substance. Wareing, P.F. (ed.), Academic press, New York, pp. 451-462.
- Hale, C.C. and S.J. Roux. 1980. Photoreversible calcium fluxes induced by phytochrome in oat coleoptile cells. *Plant Physiol.* **65**: 658-662.
- Hall, J.L., T.J. Flowers and R.M. Roberts. 1982. Cell wall in plant cell structure and metabolism. Longman Press, New York, pp. 430-472.

- Harmon, A.C., C. Putman-Evans and M.J. Cormier. 1987. A calcium dependent but calmodulin-independent protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* **83**: 830-837.
- Hepler, P.K. and R.O. Wayne. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 307-439.
- Hills, M.J. and H. Beevers. 1986. Ca<sup>2+</sup> stimulated neutral lipase activity in castor bean lipid bodies. *Plant Physiol.* **84**: 272-276.
- Kauss, H. and W. Jeblick. 1986. Synergistic activation of 1, 3-D-glucan synthetase by Ca<sup>2+</sup> and polyamines. *Plant Science* **43**: 103-107.
- Levine, B.A. and D.C. Dalgarno. 1983. The dynamics and function of calcium binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **726**: 187-204.
- Loewus, M.W. and F. Loewus. 1971. The isolation and characterization of D-glucose-6-phosphate cyclohydrolase (NAD-dependent) from *Acer psedoplatanus L.* cell cultures. *Plant Physiol.* **48**: 255-260.
- Loewus, M.W. and F. Loewus. 1974. Myo-inositol-1-phosphate synthetase inhibition and control of uridine diphosphate-D-glucuronic acid biosynthesis in plant. *Plant Physiol.* **54**: 368-371.
- Lukas, T.J., P.B. Invenson, M. Schleichen and D.M. Wattenson. 1984. Structural characterization of higher plant calmodulin. *Plant Physiol.* **75**: 778-795.
- Marmé, D. 1983. Calcium transport and function in inorganic plant nutrition. *Physiol. Rev.* **64**: 938-984.
- Marmé, D. 1985. Pharmacology of calcium antagonists: Calcium and cell physiology. Springer-Verlag, Berlin, pp. 204-226.
- Marmé, D. and P. Dieter. 1983. Role of Ca<sup>2+</sup> and calmodulin plant calcium and cell function. Vol. 4. Academic Press, New York, pp. 263-311.
- Rasmussen, H. 1970. Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate, *Science* **170**: 404-412.
- Roberts, R.M. and J.J. Cctorelli. 1973. UDP-D-glucuronic acid pyrophosphorylase and the formation of UDP-D-glucuronic acid in plants. In, Biogenesis of plant cell wall polysaccharides. Loewus, F. (ed.), Academic press, New York, pp. 49-60.
- Robinson, K. R. and L. F. Jaffe. 1975. Polarizing fucoid eggs drive a calcium current through themselves. *Science* **187**: 70-72.
- Rosenfield, C.L., Carly Fann and F. Loewus. 1978. Metabolic studies on intermediates in myo-inositol oxidation pathway in *Lilium longiflorum* pollen. *Plant Physiol.* **61**: 89-95.
- Ruberry, P.H. 1972. The activity of uridine diphosphate-D-glucose. *Planta* **103**: 188-192.
- Ruberry, P.H. and B.H. Northcote. 1970. The effect of auxin on synthesis of cell wall polysaccharide in cultured sycamore cell. *Biochem. Biophys. Acta* **22**: 95-108.
- Seratin-Fracassini *et al.*, D.P. Torrigiani and C. Branca. 1984. Polyamines bound to nucleic acid during dormancy and activation of tuber cells of *Helianthus tuberosus*. *Physiol. Plant.* **60**: 337-351.
- Soll, H. and M. Bottger. 1982. The mechanism of proton-induced increase of cell wall extensibility. *Plant Sci. Lett.* **24**: 163-171.
- Williamson, R.E. 1981. Free Ca<sup>2+</sup> Concentration in the cytoplasm: A regulator of plant cell function. *What's New In Plant Physiol.* **12**: 45-48.
- Wolff, J.G. and H. Cook. 1975. Charge effects in the activation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* **250**: 6897-6903.