

## 조직 배양에서의 과당의 능동 수송에 대한 Low Affinity System의 분석

曹 鳳 姬  
(水原大學, 生物學科)

### Analysis of the Low Affinity System of the Uptake of Fructose in Suspension Culture Cells

Cho, Bong-Heuy

(Department of Biology, the University of Su-Won, Suwon)

#### ABSTRACT

Undifferentiated suspension culture cells had the ability to transfer glucose and fructose actively, but the suspension culture cells were unable to transfer saccharide without previously splitting to monosaccharides. The uptake of fructose showed the low- and high-affinity system compared to of glucose, which possessed only one saturable uptake system. In this paper, the low affinity system of the uptake of fructose has been studied intensively. Glucose did not inhibit the low affinity system of fructose competitively. The  $K_m$  value was 47 mM for fructose, 7.4 mM for glucose and  $V_{max}$  was 69  $\mu$ mol/h.g fresh weight for fructose, 9.8  $\mu$ mol/h.g fresh weight for glucose. Metabolizer inhibitors, both 50  $\mu$ M of CCCP and DNP, inhibited 70% of the uptake of the low affinity system of fructose. The proton ions were accompanied by the uptake of fructose. The stoichiometry showed ratio of proton to fructose was 0.17. The mechanism of the uptake was fructose-proton-symport. The molecules of fructose accumulated inside 25 times more than outside. Therefore, the low affinity system of fructose was not mere diffusion, but depended on metabolic energy and thus transported actively. The importance of this system was discussed.

#### 서 론

식물에서 가장 잘 알려진 능동 수송에 대한 연구는 단세포 녹조 생물인 *Chlorella* (Cho *et al.*, 1981; Komor, 1973)와 *Ricinus*의 자엽 (Komor, 1977; Cho and Komor, 1985)과 *Ricinus*의 조직 배양세포 (Cho and Komor, 1985)에서 이루어졌다.

*Chlorella*에서는 단당류, 즉 포도당이나 과당은 inducible된 hexose transport system을 통해서 능동 수송되나, 설탕 같은 이당류는 능동 수송될 수 없다(Tanner, 1969). 고등식물인 *Ricinus*자엽에서는 설탕은 능동 수송되나, 단당류는 능동 수송될 수 없다(Komor, 1977). 반면 *Ricinus*의 조직 배양 세포에서는 단당류는 능동 수송되나, 설탕은 운반 전 포도당과 과당으로 가수분해 된 후 비로소 hexose transport system을 통해서 능동 수송된다(Cho and Komor, 1985). *Ricinus*조직 배양 세포에서 과당이나 설탕의 수송은 saturable component와 linear com-

ponent의 두가지 양상을 보여 준다(Cho and Komor, 1985).

Linear component는 다만 기질의 농도가 높을 때만 존재하며, 지금까지는 능동 수송이 아닌 단순 확산으로 만이 간주 되어 왔다. 그러나 최근에 와서 linear component가 원형질막을 통한 양분 수송에 중요한 역할을 하며, 단순 확산이 아닐 것이라는 의견이 처음으로 제시되었다(Wilson *et al.*, 1985). 따라서 본 실험에서는 linear component의 중요성을 고려하여, 분화되지 않은 조직 배양 세포를 이용해서 과당 수송의 일부분인 linear component에 대해서 중점적으로 연구하여 그것이 단순한 확산이 아님을 보이려 하였다.

### 재료 및 방법

**식물세포와 조직 배양.** 본 실험에서 사용한 *Streptanthus tortuosus* (Brassicaceae)의 조직 배양 세포는 자엽에서 유도시킨 callus로서, Nickel and Marezki(1969)방법을 수정한 White's basalsalts, 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid, sucrose, arginine 그리고 yeast extract가 함유된 액체 배양액에서 배양했다. 조직 배양 세포는 100 ml의 배양액이 들어 있는 250 ml 삼각 flask을 사용해서, 암소에서 rotary shaker에 의해서 160 rpm으로 계속 흔들어 주었다. 배양 온도는 27°C이고 매 2주마다 한번씩 5 ml를 새로운 배양액에 주입 시켜서 계대배양 하였다.

**당류의 능동수송의 측정.** 새로운 배양액에 옮겨진 후 7일 내지 10일 동안 자란 세포를 사용하여 당류의 능동 수송을 측정했다. 일반적으로 세포를 사용하기 하루전 오래 된 배양액을 새로운 배양액으로 바꾸고 이때 목적에 따라 설탕이 첨가된 배양액, 또는 첨가되지 않은(starvation) 배양액으로 바꾼다. Cellulose filter(pore size 1.2  $\mu$ m; Schleicher & Scheull, Dassel)로 걸러 모아진 세포를 다시 멸균 증류수로 여러번 씻은후, 1 g의 배양 세포를 10ml의 25mM Sodium-phosphate buffer (pH 6.0)에 넣어서 27°C에서 흔들어 준다. 능동 수송 실험은 세포에다 0.2  $\mu$ Ci의  $^{14}$ C-U-sucrose(310mCi/m mole), 0.14  $\mu$ Ci의 D- $^{14}$ C, C-U-glucose(225 m Ci/m mole), 0.14-0.3  $\mu$ Ci의 D- $^{14}$ C-U-fructose(223ci/m mole), 0.2  $\mu$ Ci의  $^{14}$ C-G-sucrose (373 m Ci/m mole)에다 표지 되지 않은 각각의 당류를 다양한 농도(0.1 mM-50 mM)로 목적에 따라 잘 희석 한 후, 세포에다 직접 첨가하므로써 행하였다. 30초 간격으로 1ml의 시료를 꺼내서 즉시 여과시키고, 각 시료를 다시 20 ml의 냉각된 sodium-phosphate완충액으로 두번 씻어 낸후 여과지와 세포의 무게를 잰 후 5 ml의 scintillaton cocktail(toluene 250 ml:xylene 150 ml:PPO 3 g:POPOP 0.6 g)을 첨가하여 Beckman LS 5801를 사용해서 방사능을 측정했다.

**당류의 Km과 Vmax.** Km과 Vmax 값은 당류의 농도에 의존하는 능동 수송 속도의 측정으로 결정 했다. 두 당류 사이의 경쟁 방해 여부는 적당한 농도의 억제물질을 방사능이 함유된 기질과 동시에 세포에 가하므로써, 운반 속도의 방해 여부로 결정했다. 이 두 물질이 서로 경쟁적으로 방해할 때는, 같은 운반자를 가진 것으로 간주하고, 그렇지 않을 때는 다른 운반자를 가진 것으로 간주했다.

**당류의 물질대사와 축적의 분석.** 고농도(20 mM)의 과당을 1 g의 세포에 가한 후 정상 상태가 (약 한 시간 정도)될 때까지 기다린다. 세포를 즉시 여과 시킨 후, 능동 수송때 설명 했던 것처럼 처리했다. 즉 0.5 g의 세포를 시험관에 넣고, 70% 알코올 2 ml을 가해 잘 흔든후 60°C에서 한 시간 동안 추출시킨 다음 실온에서 식힌 후 탁상용 원심 분리기로 full speed에서 10분

간 원심 분리시켜서 세포를 가라 앉혔다. 원심 분리후 0.5 ml씩의 상정액을 시험관과 신틸레이션 병에 담는다. 후자로는 세포 내에 총 용해되어 있는 방사능의 양을 정하고, 전자는 종이 크로마토그래피를 사용해서, 물질대사 된 양과 물질대사 되지 않은 방사능의 양을 결정하는데 사용했다. 모든 상정액을 세포 침전물로부터 다 제거시킨 후, 침전물을 70% 알코홀로 재추출했다. 침전물을 다시 여러번 잘 씻어 낸 후 용해되지 않은 부분의 방사능의 양을 결정했다. 1차와 2차의 상정액의 부피를 감소시킨 후 종이 크로마토그래피(Whatman paper No. 3, 46 cm × 57 cm)에다 spot시켰다. 크로마토그램의 용매는 n-butanol:acetic acid:pyridine:water=1080 : 54 : 720 : 540(v/v)을 사용했다. spot시켜 말린 종이는 solvent system으로 포화된 용기에서 15시간 올린 후 말려서 제차 15시간 올리는 것을 반복했다. Acetone:Saturated silvernitrate=800 : 4(v/v)가 든 용기에 종이를 담갔다 즉시 꺼내 말리고, 알코홀 : NaOH(포화) 475 : 25(v/v) 용액을 뿌리면, 단 당류가 검출된다. 100°C 증기에서 2분 동안 종이를 상하좌우로 움직인 후, 0.5% Na-thiosulfate 용액 속에 5분간 처리하면 가수분해 되지 않은 당류를 검출할 수 있다. 방사능을 spot한 종이는 1cm간격으로 잘라 5ml cocktail을 넣고 방사능의 양을 측정했다. 측정된 방사능의 양은 그래프 용지에 cm당 방사능의 양을 도시해서 물질대사 된 양과 되지 않은 양을 결정한다.

매질의 가수분해된 설탕의 양과 가수분해 되지 않은 설탕의 양도 위에 방법으로 정했다.

**이온 움직임의 측정.** 과당의 능동 수송에 동반 되는 수소이온은 Cho and Komor (1983)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. Ion-sensitive한 수소이온 측정에 사용된 pH-microelectrode (Ingold, Zircuch)는 amplifier (Orion), pH-meter (Orion)와 strip chart recorder에 연결 되었다. (Cho and Komor, 1983). 1 g의 세포를 25 ml삼각 flask에다 넣고, 10 ml의 5mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가시킨 후, rotation장치를 이용해서 120 rpm으로 흔들어 주었다. 인산 완충액 대신 CaCl<sub>2</sub>를 사용한 이유는 수소이온 농도의 변화를 측정하기 위해서다. CaCl<sub>2</sub>이든지 NaCl중 어떤 것을 사용해도 수소이온의 농도를 변화없이 측정할 수 있었다. 수소이온의 움직임과 과당의 능동 수송은 (방사능 사용) 동시에 같은 세포에서 행해졌다. 과당의 능동 수송은 과당을 세포에다 가한 즉시 20초 간격으로 0.5ml을 꺼내서 능동 수송에 설명한 것처럼 처리했다. 수소이온에 대한 electrode의 calibration은 20 nmole의 HCl을 가해서 electrode의 반응 세기를 계산해서, 직접 세포에 의해서 반응 된 이온의 움직임을 계산했다. 보정은 수소이온의 농도를 측정 한 전후로 두번 했다. 세포의 삼투현상에 의한 수소이온의 변화를 보완하기 위해서 매 실험마다 mannitol을 control로 사용했다. 과당의 능동 수송에 동반되는 수소이온의 수송에 대한 stoichiometry는 20 nmole HCl을 가할 때 움직인 거리를 알고 있으므로, 과당을 가했을 때 20초 안에 움직인 수소이온의 기울기로 부터 계산했다.

**대사 방해 물질의 영향.** 물질 대사 방해 물질인 m-chlorophenyl-the hydrazone (CCCP)와 Dinitrophenol(DNP)를 능동 수송 측정 10분 전에 미리 세포에 가했다. CCCP와 DNP를 세포에 가할 때 최종 알코홀의 농도가 2% 이내가 되도록 하고, control도 같은 농도의 알코홀을 넣어 주었다.

## 결과 및 고찰

**조직 배양 세포의 일반적 특성.** 분화 되지 않은 조식 세포는 유조직 성격을 띠며, 일반적으

로 이 유조직 세포는 원형질막의 설탕 운반자가 없기 때문에 설탕을 직접 운반 할 수 없다(Cho and Komor, 1985). 본 실험에서 사용한 배양 세포로 설탕의 능동 수송을 조사한 결과, 시간의 경과에 따라 설탕의 수송 속도가 증가 함을 볼 수 있었다(Cho and Sjolund, 1986).

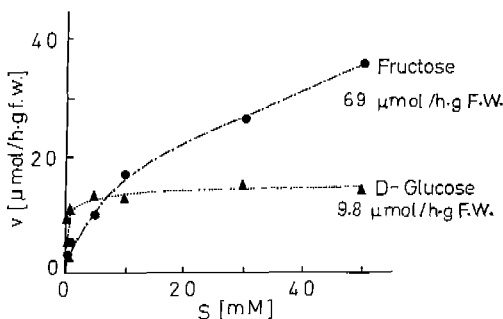
**Table 1.** Identification of saccharide in incubation medium by chromatogram

Sugars	cpm in medium	
<sup>14</sup> C-U-sucrose	total count	29,862
	sucrose	17,904
	reduced sugars	7,791
<sup>14</sup> C-U-sucrose	total count	23,831
	sucrose	14,268
	reduced sugars	3,681

The concentration of sucrose used was 1 mM. The incubation time was 1 hr.

세포를 굽기는 동안 설탕의 수송 속도가 증가 되는 것은 설탕 운반자가 새로이 합성 또는 활성화 되거나, 또는 인베르타아제가 유도 되어 설탕을 가수분해 시켜 주는 속도가 증가 되는 것이므로, 세포에 의한 설탕의 가수분해 여부를 매질로부터 측정했다(Table 1). 두 종류의 방사능 설탕을 사용했는데, 하나는 방사능을 설탕 분자에 균일하게 표지시킨 것이고, 다른 하나는 설탕의 포도당 부분만을 표지 시킨 것이다. 두 종류 모두에서 표지 된 설탕의 약 40%가 가수분해 되었다. 균일하게 표지 한 설탕에서는 가수분해 된 당 중 약 75%가 과당이고, 나머지 약 25%가 포도당이였다(크로마토그램 후 약 1 cm정도가 과당과 포도당이 서로 겹치므로 두 당을 합쳐서 Table 1에 기록했음).

포도당 부분 만을 표지한 설탕에서 가수분해 된 당은 전부 포도당이였다. 이 값은 균일하게 표지한 설탕에서 가수분해 된 값과 같다. 이 결과는 설탕의 능동 수송 속도가 증가한 것이 아니고, 설탕을 가수분해 시킬 수 있는 세포의 능력의 증가를 의미한다. 즉 인베르타아제의 활성화의 증가 또는 그의 양의 증가를 말한다. 세포를 굽기지 않으면, 설탕의 수송 속도가 매우 낮으므로(data not shown)세포가 처음부터 저 농도의 인베르타아제를 갖고 있거나 또는 고 농도로 있는데 불활성화한 상태로 있을 것이다. 그러므로, 핵소오즈 운반자가 최대의 기능을 보일 때는 인베르타아제의 활성화도도 최대로 된다고 판단된다.



**Fig. 1.** Sugar uptake into suspension culture cells.

The suspension cells were previously depleted.

조직 배양 세포를 하루 전 당류가 없는 배양액에서 처리한 후, 당류의 수송 속도를 보았다(Fig. 1). 저 농도에서는 포도당의 수송속도는 과당의 수송 속도 보다 빠르고, 포도당 운반자가 10mM이하의 포도당의 농도에서는 이미 포화 상태를 보였다. 그와는 달리, 과당은 저 농도에서는 포도당 보다 수송 속도가 느리나, 10mM이상의 고 농도에서도 과당의 수송 속도가 급격히 촉진되고, 50mM이상의 고농도에서도 계속 수송 됨을 볼 수 있었

다. 이 결과는 포도당 운반자는 단 하나의 포화될 수 있는 운반자를 갖는 반면, 과당 운반자는 saturable component와 linear component를 갖음을 알 수 있다. 이처럼 한 기질에 대해서 두개의 다른 양상을 보이는 예는 이온과 아미노산의 능동 수송에서 보고 되었다 (Aart *et al.*, 1982; Freichtinger and Trombella, 1983). 당류에 대한 두개의 phase에 대해서는 *Ricinus*조직 배양 세포(Cho and Komor, 1985)와 사탕 무우 (Clyde and Lucas, 1986)에서 보고하였다. 저자들은 운반자의 두 phase중 linear component는 단순한 확산으로 설명하였으며, 일반적으로 기질의 고 농도에서는 단순확산이 일어나는 것으로 받아들여졌다.

지금까지 포도당이나 그의 유도체에 대한 연구는 활발하지만(Komor, 1973; Tanner, 1969), 과당에 대한 연구는 거의 없다. 처음으로 *Ricinus*조직 배양 세포에서 과당 운반자는 포도당 운반자와는 다를 것이라는 견해를 제시했고 (Cho and Komor, 1985) Fig.1에서는 두 단당류는 다른 운반자를 통해서 세포로 수송될 가능성을 보였다. 따라서 과당의 수송이 단순한 확산이 아님을 밝히기 전에, 과당과 포도당이 서로 다른 운반자를 갖는지를 결정했다.

과당의 농도에 따른 수송 속도는, 동시에 가해진 10mM의 포도당에 의해 방해 되었다 (Fig. 2). 포도당에 의한 과당 수송의 방해는 경쟁적 방해가 아니고, 혼합된 방해다. 이것은 곧 과당과 포도당의 운반자가 결코 같을 수 없음을 의미한다. 만약 과당의 linear component가 단순한 확산이라면, 과당의 수송은 포도당에 의해서 방해되지 않을 것이다. 그러나 Fig. 1에서 포도당은 과당의 수송을 강하게 방해했다. 이 결과는 과당의 수송은 확산이 아니고, 대사 에너지에 의존됨을 암시 해주는 것이다.

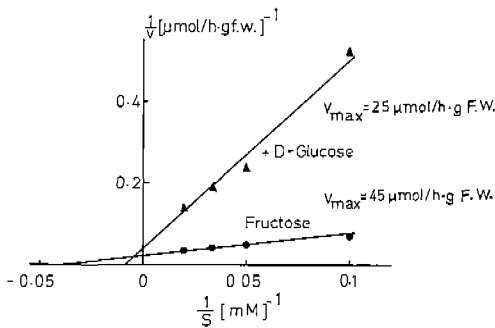


Fig. 2. Competition of fructose with glucose.

The concentration of the competing glucose was 10 mM. Fructose and glucose were added the same time into the cells at zero time.

Table 2. The Km and Vmax of sugars

Sugars	Km (mM)	Vmax (μ mol/h.g fresh weight)
fructose	47.0	69.0
glucose	7.4	9.8

The concentration used was 1-10 mM for glucose 10-50 mM for fructose.

과당과 포도당이 다른 운반자를 소유함을 보여주는 다른 결과는 Km값과 Vmax값이다 (Table 2). 고농도에서는 과당의 Km값이 47 mM이고, 포도당의 Km값은 7.4 mM이다. 과당 운반자의 기질에 대한 친화력은 포도당 운반자가 기질에 대해서 갖는 친화력 보다 7배 정도 낮다. 이 차이는 두 단 당류가 서로 다른 운반자를 갖음을 말해 준다. 최대의 수송 속도인 Vmax는 과당이 69 μ mol/h.g fresh weight이고, 포도당이 9.8 μ mol/h.g fresh weight이다. 포도당의 Vmax는 과당의 high affinity system과 비슷한 값을 준다(data not shown). 포도당 분자는 일단

세포 내로 수송되면, 물질대사 되지만, 포도당의 유도체인 3-o-methylglucose (3-o-MG)는 물질 대사 없이 변형 되지 않은 상태로 세포 내에 축적 된다. 따라서 3-o-MG를 다음 실험에서 이용했다. Fig.1에서, 포도당 운반자는 매질의 농도가 10mM일 때 이미 포화 상태를 보였다. 반면 과당은 같은 농도에서 포화 상태가 되지 않았다. 설탕은 일단 포도당과 과당으로 가수분해된 후 세포내로 수송된다. 이때 인베르타아제를 최대로 유도 시키면, 설탕이 44  $\mu\text{mol reduced sugars/h.g fresh weight}$ 로 가수분해 된다(data not shown). 세포는 과당 보다는 포도당을 먼저 수송시키고, 포도당의 농도가 아주 저 농도 일때만 과당을 수송시킨다(data not shown). 그러므로 설탕에서 가수분해 된 포도당 분자는 과당 분자 보다 훨씬 빠르게 자신의 고유한 운반자를 점령 할 수 있으나, 과당 분자는 그렇지 못할 것이다. 이 조건 하에서, 3-o-MG를 가하면, 포도당 분자가 같은 운반자에 대해서 3-o-MG분자 보다 훨씬 친화력이 높으므로(data not shown) 포도당은 3-o-MG에 의해서 거의 방해받지 않게 된다. 반면 과당 분자는 3-o-MG와 같은 운반자를 소유할 경우에만, 서로 운반자를 경쟁할 것이다. 이러한 결과를 Fig. 3에서 볼 수 있다. 100mM의 3-o-MG는 과당 운반자를 경쟁하지 못하고, 대신 서로 같은 에너지 근원을 경쟁하고 있다. 이상의 결과로 과당은 고유한 운반자를 소유함을 알 수 있다.

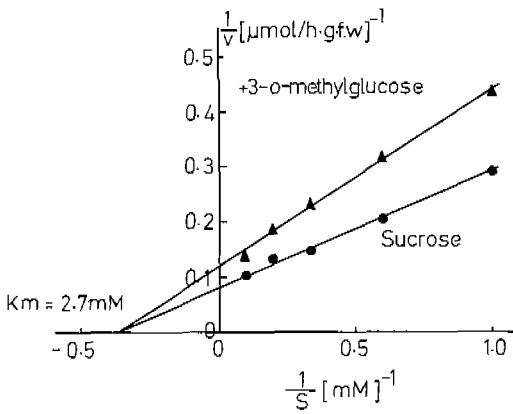


Fig. 3. Inhibition rest during the uptake of sucrose with the concentration of 100 mM 3-o-Methyl glucose.

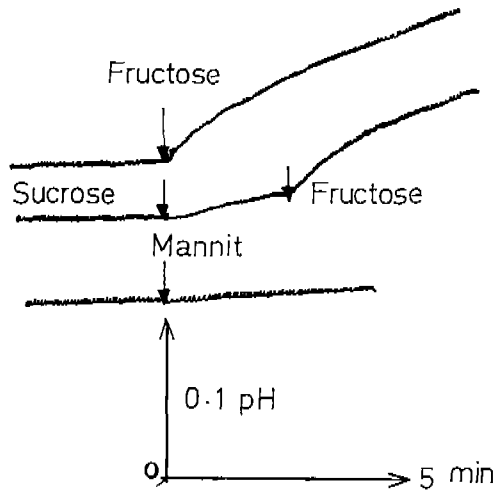


Fig. 4. The pH-transient during the uptake of fructose. The concentration of sugars used as 20 mM. The cells are incubated in 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

과당 수송의 에너지 의존. 과당의 low affinity system이 물질 대사 에너지에 의존하는지의 여부를 물질대사 방해 물질인 CCCP와 DNP처리로 실험 했다. 만일 과당 수송이 단순 확산 일 경우에는, 대사 방해 물질에 의해서 전혀 방해 받지 못한다. 50  $\mu\text{M}$ 의 DNP는 과당의 수송을 67% 방해했고, CCCP는 과당의 수송을 71% 방해했다(Table 3). CCCP는 수소 이온의 원형질막의 확산을 촉진 시켜, 수송막에 형성 되었던 proton motive force을 와해시키는 물질로서, 기질에 능동 수송전에 세포에 가하면, 기질와 능동 수송이 방해됨을 보였다(Komor, 1973). CCCP는 수소이온에 세포막으로의 확산을 촉진시키고, 이 결과는 세포에 pH-gradient에 영향을 주고, 따라서 수소이온의 양 전하는 membrane potential에도 영향을 준다. 물질대사

방해 물질에 의한 고농도 과당의 수송 방해는 과당의 수송이 fructose-proton-symport일 것임을 암시해 준다.

**Table 3.** CCCP and DNP effect on the uptake of high concentration of fructose

Substrate	v ( $\mu$ mol/h.g fresh weight)	% activity
control	11.4	100
+10 $\mu$ M CCCP	7.5	65
+30 $\mu$ M CCCP	5.5	48
+30 $\mu$ M CCCP	3.5	39
+10 $\mu$ M DNP	8.1	71
+30 $\mu$ M DNP	6.6	57
+50 $\mu$ M DNP	3.8	33

The concentration of fructose used was 20 mM. The inhibitors were preincubated 10 minute before beginning of uptake studies.

과당의 능동 수송 때 동반되는 이온의 흐름. 식물에서의 능동 수송에 대해서 가장 잘 연구된 예는 *Ricinus* 자엽에서 sucrose uptake system과 *Chlorella*에서 hexose uptake system이다(Komor *et al.*,1980). 특히 *Chlorella*는 high-and low-affinity system 이 같은 운반자로서, pH값에 따라서 운반자가 low affinity system에서 high affinity system 또는 그 반대로 전환된다. 이처럼 과당의 경우도 동일한 운반자가 두개의 역할을 하는지를 조사 하기 위하여 우선 고농도의 과당이 능동 수송 할 때 동반 되는 수소이온의 양을 조사 하였다.

Fig. 4는 20mM의 과당을 세포에 가했을 때 동반(cotransport)되는 수소이온의 움직임을 보여 준다.

**Table 4.** Stoichiometries of fructose and accompanying proton ion fluxes

Content	Rate and stoichiometry
fructose	19.8 $\mu$ mol/h.g fresh weight
H <sup>+</sup> -influx	3.3 $\mu$ mol/h.g fresh weight
H <sup>+</sup> /fructose	0.17

The cells were incubated in 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

과당을 세포에 가했을 때 즉시 매질의 수소 이온 농도가 감소(염기화)되었다. 과당이 다만 확산 작용에 의해서 세포 내로 수송된다면, 수소 이온 농도가 변화하지 않을 것이다. 설탕을 세포에 가하면, 처음에는 수소 이온 농도의 변화가 없다가, 시간의 경과에 따라서 수소이온 농도가 서서히 감소했다. 이는 설탕이 수송 되기 전에 가수분해 되는데 시간이 필요하기 때문이다. 설탕을 먼저 가한 세포에다, 다시 과당을 가했을 때 즉시 매질에 수소 이온 농도가 감소하는 것은, 과당이 능동 수송으로 수소이온을 동반 함을 말해 준다. 삼투 현상에 의한 인위적인 수소 이온 농도의 변화를 알기 위해서 mannitol을 세포에 가했을 때는 아무 변화도 없었다.

과당 한 분자 당 수소이온 0.17의 stoichiometry로 세포 내로 수송된다(Table 4). 이 값은 다른 세포들과 비교할 때 매우 낮다(Komor *et al.*,1981). *Ricinus* 자엽에서도 낮은 stoichiometry를

보였는데 설당 한 분자 당 0.3의 수소 이온의 비로 능동 수송 되었다. 자연에서는 수소 이온이 삼투 작용으로 인해 낮은 stoichiometry를 갖는 것으로 설명하였다. 본 실험에서 사용한 세포들이 낮은 stoichiometry를 갖는 이유는 다음과 같이 설명할 수 있다. 과당 분자와 동반 되는 수소 이온 농도를 측정할 때 저어주는 것 때문에 세포막에 있는 단백질이 기능을 상실하거나 또는 세포막이 다른 세포 보다는 자극에 예민하기 때문일 것이다. 다른 이유는 세포막에 있는 proton pump를 자극시켜서 수소 이온을 세포 밖으로 내 보낸다. Proton pump는 기질의 능동 수송 동안 동반된 수소 이온을 다시 세포 밖으로 내뿜어, 세포로 하여금 계속 능동 수송을 가능케 해 준다(Komor, 1973). 이론상으로는 과당 : 수소이온은 1 : 1의 비로 되는데, 그러나 proton pump에 의해서 강하게 수소 이온을 세포 밖으로 내 보내면, 능동 수송 때 동반된 수소 이온을 보상하게 되므로 실제로 측정 된 수소 이온 농도는 낮게 된다. 이와 비슷한 예를 *Chlorella*에서 proline의 능동 수송 때(Cho and Komor, 1983), arginine의 능동 수송 때(Cho and Komor, 1984) 그리고 효모에서 arginine는 능동 수송 (Seaston *et al.*, 1973)에서 볼 수 있다.

**Table 5.** The accumulation of fructose inside the cells

Condition	Concentration in mol
alcohol soluble	254.6
alcohol insoluble	22.5
free fructose inside cells	251.7
accumulation factor	24.7

The concentration of fructose used was 20 mM.

당의 세포 내의 축적. 과당은 세포 내에 변형 없이 축적되었다(Table 5). 과당은 농도에 거역해서 세포 안쪽에 25배 더 축적되었다. 이 결과는 과당의 수송이 능동적이고, 반드시 대사에 에너지를 요구함을 보여 준다. 과당도 포도당 처럼 물질 대사되는 기질이므로 수송 된 과당 중 약 11.1%가 물질 대사 되었고, 나머지는 세포내에 변형없이 남아 있었다. 이상의 결과를 종합하면, 과당의 low affinity system은 대사 에너지를 요구하는 능동 수송으로서 매우 중요한 역할을 담당한다고 하겠으며, 과당은 fructose-proton-symport메카니즘에 의하여 수송된다. 50mM정도의 농도에서는 carrier-mediated확산이 관여할 것으로 판단되나 50mM이상의 고농도는 측정이 불가능해, 정확한 값을 계산할 수 없었다. 단 한개의 동일한 과당 운반자가 과당의 농도에 따라서 두개의 운반자의 역할을 하는지, 또는 두개의 다른 과당운반자가 있어서 농도에 따라서 그 기능을 보이는지는 현 상태로서는 대답할 수 없다. 이 문제는 앞으로 방사능을 이종표지 시킴으로 규명할 수 있으리라고 본다.

## 적 요

분화되지 않은 조직 배양 세포는 포도당과 과당은 직접 능동 수송하나, 이 당류인 설당은 가수분해된 후 단당류로서 능동수송한다. 포도당은 한개의 포화될 수 있는 운반자를 가지나, 과당의 운반자는 low-와 high-affinity system을 가진다. 여기서는 과당 수송의 low affinity system을 중점적으로 공부했다. 포도당은 과당의 low affinity system을 경쟁적으로 방해하지 못한다. Km값은 과당이 47 mM이고, 포도당은 7.4 mM이며, Vmax값은 과당이 69  $\mu$  mol/h.g fresh weight이고, 포도당은 Vmax 9.8  $\mu$  mol/h.g fresh weight



이다. 물질대사 방해물질인  $50 \mu\text{M}$ 의 CCCP와 DNP는 과당의 수송을 70% 방해했다. 과당은 수소이온과 cotransport되고, 수소이온 : 과당의 비는 0.17로서 과당의 수송은 fructose-proton-symport의 메카니즘으로 진행된다. 과당 분자는 세포 안에 25배 더 축적되었다.

### 참 고 문 헌

- Aart, J. E. Ad c. Borstlap, A. Pinxteren-Bazuine and A. Anmerlaan. 1982. Analysis of valine uptake by comelina mesophyll cells in a biphasic active and a diffusional component. *Planta* **155**: 335-341.
- Cho, B.-H. and E. Komor. 1980. The role of potassium in charge compensation for sucrose-proton-symport by cotyledons of *Ricinus communis*. *Plant Science Letters* **17**: 425-435.
- Cho, B.-H. and E. Komor. 1983. Mechanism of proline uptake by *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta* **735**: 361-366.
- Cho, B.-H. and E. Komor. 1985. Comparison of suspension cells and cotyledons of *Ricinus* with respects to sugar uptake. *J. Plant Physiol.* **118**: 381-390.
- Cho, B.-H., N. Sauer, E. Komor, and W. Tanner. 1981. Glucose induced two amino acid transport system in *Chlorella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 3591-3594.
- Cho, B.-H. and R. D. Sjolund. 1986. In, An inducible sugar transport system in suspension cultures of *Streptanthus*: The role invertase, *Phloem transport* Cronshaw, J., W. J. Lucas and R. T. Giaquinta (eds.), Vol. **1**, Alan R. Liss. Inc., New York. pp. 47-50.
- Clyde, W. and W.J. Lucas. 1986. In, Kinetic analysis of sugar transport: From yesterday to tomorrow, *Phloem transport*. Cronshaw, J., W. J. Lucas and R. T. Giaquinta (eds.), Vol. **1**, Alan R. Liss, Inc., New York. pp. 3-15.
- Komor, E. 1973. Proton coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris*. *FEBS Lett.* **38**: 16-18.
- Komor, E. 1977. Sucrose uptake by cotyledon of *Ricinus communis* L.: characterizations, mechanism and regulation. *Planta* **137**: 119-131.
- Komor, E., M. Thom and A. Maretzkii. 1981. Mechanism of uptake L-arginine by sugar cane cells. *Eur. J. Biochem.* **116**: 527-533.
- Flechtinger, E. and H.W. Trombella. 1983. Functional characteristics of the two kinetic mechanism of  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ) uptake by *Chlorella fusca*. *Z. Pflanz. Physiol. Bd.* **109**: 301-308.
- Komor, E., M. Rotter, T. Waldheuser, E. Martin and B.-H. Cho. 1980. Sucrose proton symport for phloem loading in the *Ricinus* seedling. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.* **193**: 211-219.
- Nickel, L.G. and A. Maretzki. 1969. Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiol. Planta* **22**: 117-125.
- Scaston, A., C. Inkson and A.A. Eddy. 1973. The absorption of proton with specific amino acids and carbohydrates by yeast. *Biochem. J.* **134**: 1031-1043.
- Tanner, W. 1969. Light-driven active uptake of 3-O-methyl glucose via an inducible hexose uptake system of *Chlorella*. *Biochem. Biophysic. Reser. Commu.* **36**: 278-283.
- Wilson, O., J.W. Oross and W.J. Lucas. 1985. Sugar uptake into *Allium cepa* leaf tissue: in intergrated approach. *Planta* **164**: 227-240.