

녹화중 보리유식물에서 Phosphorylcholine대사의 변화

俞京希·權寧命
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Changes of Phosphorylcholine Metabolism in Barley Seedlings during Greening

Yu, Gyung Hee and Young Myung Kwon
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

We investigated the activities of choline kinase, CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase, and phosphatase during the greening of etiolated barley seedlings. Activities of choline kinase in leaves increased until 6 hours after illumination and decreased considerably after 6 hours, while activities of CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase increased after illumination. On the contrary, changes of these two enzymatic activities showed reverse pattern in roots. The activities of phosphatase which hydrolyze phosphorylcholine decreased in leaves but changed little in roots during greening. The concentration of phosphorylcholine increased in xylem exudate and in roots during greening, while decreased in leaves. These results suggested that more phosphorylcholine arrive in leaves from roots as greening of etiolated barley seedlings.

서 론

유식물단계의 벼와 보리 그리고 토마토등의 도관액에는 phosphorylcholine (P-choline)이 들어 있으며 이것의 함량은 다른 유기인산화합물보다 압도적으로 높을 뿐 아니라 뿌리의 인산 공급상태에 따라 그 양이 변하지 않는 것으로 보아 이러한 식물에서 P-choline대사가 잎과 뿌리간에 밀접하게 연관되어 있을 것으로 추정되어왔다. (Kwon, 1980; Maizel *et al.*, 1956; Martin and Tolbert, 1983; Tolbert and Wiebe, 1955). 한편 P-choline은 분리엽록체에서 전자전달계에는 영향을 미치지 않으나 광인산화활성은 억제하였으며 (Yu *et al.*, 1987), 녹화초기의 보리잎에서 P-choline의 함량은 높았으나 녹화가 진행되면서 그 양이 점차 낮아져 일정한 상태를 유지하였다(Yu *et al.*, 1986). 그런데 황백화상태인 보리유식물의 잎은 광조사후 24시간내에 엽록소량의 증가 및 전자전달 및 광인산화활성과 같은 광합성기구의 발달이 완성되므로(Lee *et al.*, 1983), 인지질 합성에 있어서 중요한 중간대사물질인 P-choline은 이 시기에 매우 예민하게 대

사가 조절될 수 있어야 하며 이를 위해서는 뿌리와 잎과 같은 기관간의 밀접한 연관관계가 있어야 할 것 같다.

이에 본 실험에서는 황백화상태인 보리유식물에서 P-choline대사와 밀접하게 연관되어 있는 choline kinase(EC, 2, 7, 1, 32), CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase (EC, 2, 7, 7, 15), P-choline phosphatase의 활성을 잎과 뿌리에서, 그리고 도관액에서의 P-choline함량을 경시적으로 측정하여 녹화과정에서 일어나는 P-choline대사의 일부를 알아보고져 하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 배양조건. 농촌진흥청 작물시험장으로부터 분양받은 보리종자 (*Hordeum vulgare* L. cv. Baecdong)를 Hoagland용액($\times 1/4$)에서 7일간 암처리하여 기른 다음 배양한 유식물을 8,000lux로 조사하여 녹화하면서, 녹화시간 별로 실험에 사용하였다. 모든 배양은 25°C인 배양실에서 행하였다.

P-choline의 함량측정. P-choline의 함량측정은 alkaline phosphatase로 P-choline을 완전히 가수분해한 후 방출된 choline을 Appleton 등 (1953)의 방법을 변형하여 측정하였으며 도관액에서는 방출된 무기인산을 Martin과 Tolbert(1983)의 방법에 따라 정량하였다.

Choline kinase의 활성측정. 채취한 잎이나 뿌리를 1mM Na-EDTA, 10mM mercaptoethanol, 400mM sucrose, 2% PVPP(polyvinylpolypyrrolidone)를 포함하는 100 mM Tris-HCl완충용액(pH 8.0)에서 마쇄한 후 100,000 $\times g$ 로 1시간 동안 원심분리한 상정액을 효소원액으로 사용하였다. 이 효소액을 67 mM glycine-KOH(pH 9.5), 1.33 mM DTT, 10 mM ATP, 11 mM MgCl₂, 5mM [methyl-¹⁴C] choline chloride (1.67 Ci/mol, Amersham)을 포함하는 반응용액과 함께 30°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액에 glacial acetic acid를 첨가해서 반응을 중지시킨 후 90분동안 방치한 다음 원심분리하여 얻은 상정액을 1.9 \times 9cm Watman No. 1 paper strip에 spotting하여 건조시켰다. 이 여과지를 ethanol: isopropanol: ammonium hydroxide(30% ammonia) (6.5 : 2.0 : 3.0)로 전개하여 말린 다음 원점으로 부터 2.5cm되는 부분을 잘라내어 Insta-Gel (Packard)이 들어있는 vial에 넣고 Packard liquid scintillation counter로 방사능양을 측정하였다(Rodney et al., 1977).

CTP: Phosphorylcholine cytidyltransferase의 활성측정. 각각의 시료를 상기와 동일한 추출용액으로 마쇄한 다음 이 마쇄액을 4°C에서 300 $\times g$ 로 10분간 원심분리 하였다. 여기에서 얻은 상정액은 다시 100,000 $\times g$ 에서 1시간 원심분리하여 상정액과 침전물을 각각 취하였다. 100,000 $\times g$ 침전물은 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 0.3 mM MgCl₂로 glass homogenizer를 사용하여 재현탁시켜 particulate fraction으로써 간주하였고, 100,000 $\times g$ 상정액은 soluble fraction으로써 사용하였다. 효소의 활성은 Borkenhagen과 Kennedy(1957)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응액에는 20 mM MgCl₂, 4 mM CTP(cytidine triphosphate), 0.25 μ Ci [methyl-¹⁴C]phosphorylcholine (50 Ci/mol, Amersham)이 포함되었으며 단백질양이 100-200mg 되도록 효소액을 첨가시켜 50°C에서 10분간 열처리를 한 후 30°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 5% TCA (trichloroacetic acid)를 5ml 첨가하여 반응을 중지시키고 1,000 $\times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. 이때 얻은 상정액 5ml에 2ml의 10mg/ml Norit A charcoal현탁액을 첨가하여 charcoal을 10분간 재현탁시킨 후 다시 1,000 $\times g$ 에서 5분간 원심분리하였다. 그후 charcoal을 5ml의 증류수로 3번 씻어주고 3N HCl 5ml을 첨가하여 100°C에서 1시간 동안 가열하여 ¹⁴C-choline이 유리되게 하였다. 원심분리에 의해서 회수된 charcoal을 2ml의 물로 2번 씻어

위의 산가수분해물과 함께 scintillation vial에 옮겨 수분을 증발시킨 후 ¹⁴C-choline의 방사능을 liquid scintillation counter로 측정하였다.

Phosphatase의 활성측정. 시료를 1mM Na-EDTA, 10mM mercaptoethanol을 포함하는 100mM Tris-HCl (pH 8.0)완충용액에서 마쇄한 후 20,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 이때 얻은 상침액을 Sephadex G-25로 거른 다음 효소액으로 사용하였다. 효소액을 3mM MgCl₂를 포함하는 83mM Tris-HCl (pH 8.0)완충용액과 섞은 후 30mM phosphorylcholine을 기질로 하여 30℃에서 1시간 반응시켰다. 얼음물에서 냉각시킨 10% TCA로 반응을 중지시킨 다음 1,300×g에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거시켰다. 방출된 무기인산을 Chen등 (1956)의 방법으로 정량하였다.

도관액의 채취. 7일간 재배한 식물이 들어 있는 배양통을 water bath(30℃)에 넣고 식물의 전이대 상단부 2-3mm되는 부위를 예리한 칼로 자른 후 30개체에서 1시간 동안 배출되는 도관액을 채취하였다.

결과 및 고찰

P-choline은 choline의 인산화로부터 합성된다. 그런데 녹화중인 보리 유식물에서 P-choline의 합성정도를 잎과 뿌리에서 알아보고자 choline kinase의 활성을 녹화중 측정하였다(Fig. 1).

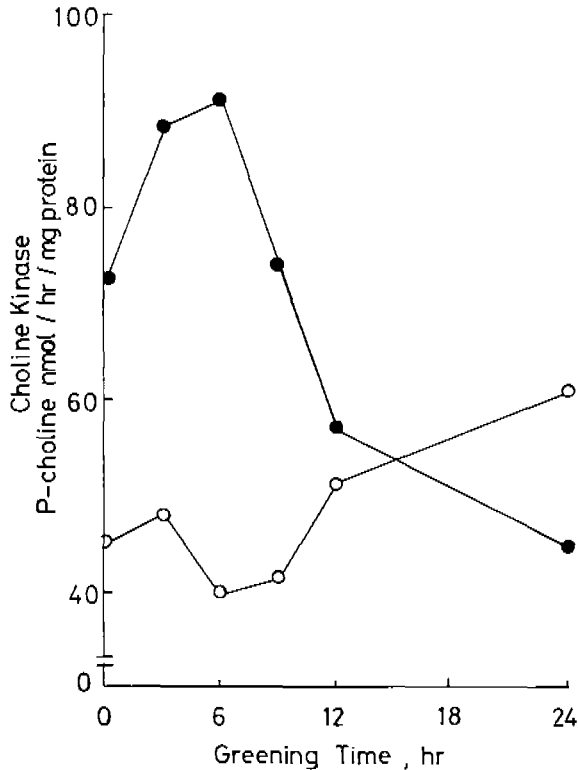


Fig. 1. Choline kinase activity in barley seedlings with greening time. ●—●, leaves; ○—○, roots.

녹화하기전 잎에서 choline kinase의 활성은 뿌리에서 보다 1.7배 정도 높았다. 그리고 녹화가 진행되면서 활성은 더욱 증가하여 녹화 6시간을 정점으로 그 이후에는 급속하게 저하되어 녹화 24시간에 이르러서는 최초 활성의 20%로 낮아졌다. 한편, 뿌리에서는 효소활성이 점진적으로 증가해서 녹화 24시간에는 잎보다 1.3배나 높게 유지되었다. 이와같은 결과로 녹화가 진행되면서 뿌리에서 P-choline의 합성이 활발하여짐을 알 수 있었다. 본실험에서 얻어진 choline kinase의 활성이 이미 보리에서 보고된 값 (Tanaka *et al.*, 1966)보다 약 30배나 높았는데 이것은 효소의 추출과 측정방법이 개선되어 온 결과인 것 같다.

한편, phosphatidylcholine합성에 있어서 합성속도를 결정하는데 중요한 역할을 하는 효소인 CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase의 활성을 측정하여 녹화중인 보리의 잎과 뿌리에서 P-choline이 어떻게 이용되는지를 알아보려고 하였다. Cytidyltransferase의 활성은 잎과 뿌리의 soluble fraction과 particulate fraction에서 모두 나타났으며 (Fig. 2) 녹화이전의 잎에서는 효소활성의 일부가 soluble fraction에서도 측정되었으나 녹화 24시간에는 거의 모든 활성이 particulate fraction으로 집중되었다. 그러나 뿌리에서는 잎과는 반대의 효소활성 패턴을 나타내었다. 그런데 식물체에서는 choline kinase가 soluble enzyme인데 비해 cytidyltransferase의 활성은 particulate fraction과 soluble fraction양쪽에 모두 분포하고 있다고 하며 (Kenneth and Kend, 1971; Morre *et al.*, 1970; Price-Jones and Harwood, 1983), 더우기 최근에는 particulate

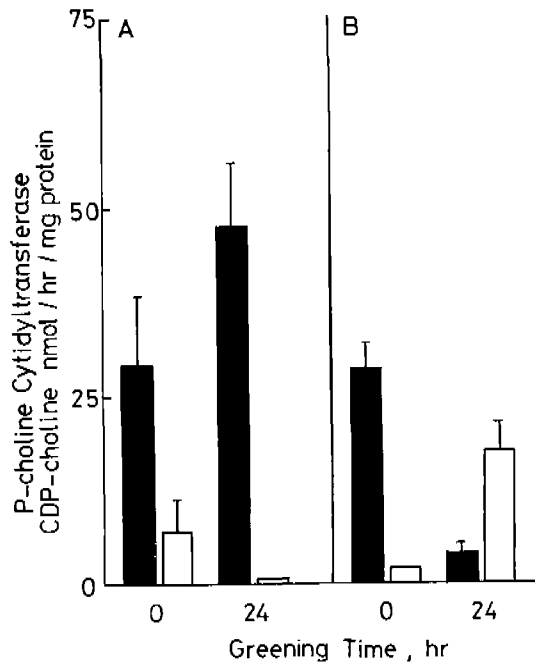


Fig. 2. Activity and distribution of CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase in barley seedlings with greening time. The particulate activity (filled bar) and soluble activity (open bar) of cytidyltransferase measured in the leaves (A) and roots (B) of barley seedlings. Standard errors are represented by vertical bars.

fraction에 있는 cytidyltransferase가 활성형으로 간주되고 있는 점 (Feldman *et al.*, 1985; Kinney and Moore, 1987)으로 미루어 보면 본 실험에서 녹화 24시간에 있어서는 cytidyltransferase활성이 증가되었고 뿌리에서는 활성이 낮아졌음을 알 수 있었다.

P-choline을 가수분해하는데 관여하는 phosphatase의 경우 P-NPP(P-nitrophenylphosphate)를 기질로 하였을 때의 1/10정도의 활성이 나타났다(미발표 결과). 녹화가 시작되기 전 phosphatase에 의한 P-choline의 분해활성은 서로 비슷하게 나타났으나 녹화가 진행되면서 잎에서 효소활성은 점차 낮아지는 반면 뿌리에서는 현저한 변동없이 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 3). 식물추출액에 의한 P-choline의 분해는 이를 분해하는 특이적인 phosphatase가 있는 것은 아니며, 이러한 비특이적인 phosphatase에 의한 P-choline의 분해는 다른 유기인산의 분해보다 10배 정도 속도가 느리다는 Tanaka등(1966)의 보고와 본 실험의 결과는 일치함을 알 수 있었다. Martin(1980)은 뿌리에서 choline kinase에 의해서 합성된 P-choline은 도관액을 통하여 이동해서 잎에 도달한후 phosphatidylcholine을 합성하는데 쓰이며 그중 적은양이 Pi와 choline으로 분해된다고 하였다. 또한 토마토 뿌리에서 choline kinase활성은 $9.6 \pm 2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{g fresh weight root})^{-1}$ 정도이었으며 이러한 활성의 수준은 토마토 도관액에서 측정되는 P-choline $0.4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{g fresh weight root})^{-1}$ 의 양을 설명하는데 충분하다고 하였다. 본 실험에서도 녹화시간에 따른 도관액의 P-choline함량을 측정하였던 바 (Fig. 4), 녹화 24시간이 되었을 때 도관액의 P-choline함량은 녹화전의 황백화된 상태에서 보다 35%정도 증가하였다.

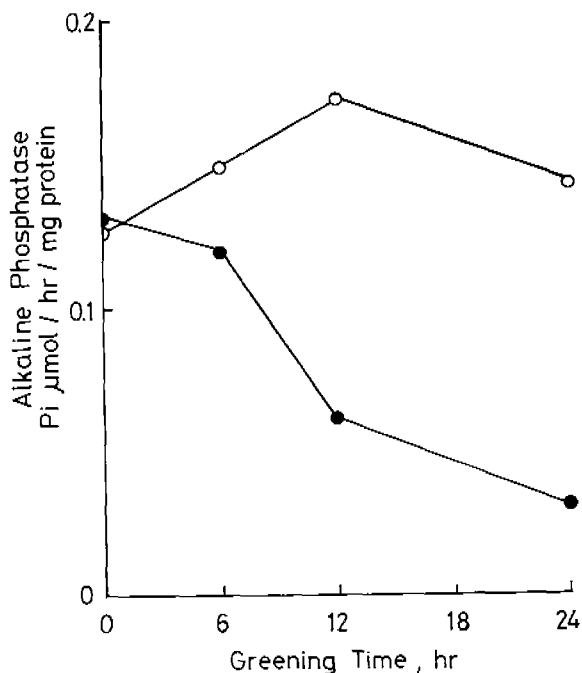


Fig. 3. Alkaline phosphatase activity in barley seedlings with greening time. ●—●, leaves; ○—○, roots. The enzyme activity measured by hydrolysis of phosphorylcholine.

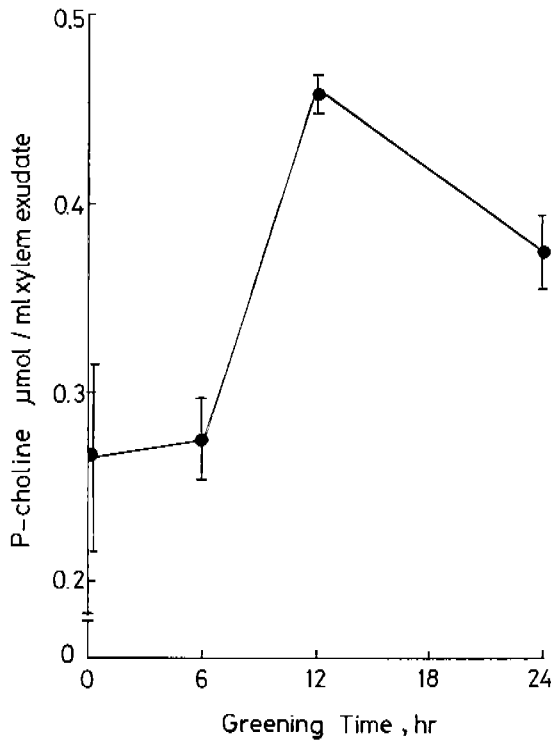


Fig. 4. Concentration of phosphorylcholine in the xylem exudate of barley seedlings with greening time. Standard errors are represented by vertical bars.

이는 녹화가 진행되면서 뿌리의 choline kinase활성이 증가하고 cytidyltransferase활성은 급격히 감소하기 때문에 도관으로 올라가는 P-choline의 양이 증가할 수 있는 것으로 추정할 수 있다.

도관액에서 발견되는 P-choline은 도관액에 들어있는 총 유기인산화합물의 90%나 되며 외부에서 공급되는 $^{32}\text{P-H}_2\text{PO}_4$ (^{32}Pi)에서 Pi가 P-choline으로 투입되는 속도가 매우 느리다는 점으로 보아 뿌리에서 P-choline pool은 상당히 클 것으로 추정되어왔다(Kwon, 1980; Martin and Tolbert, 1983). 따라서 녹화중인 잎과 뿌리에서 P-choline의 함량을 조사하였다(Fig. 5). 잎과 뿌리에서 P-choline함량은 녹화시간에 따라 서로 상이한 변화패턴을 보였다. 즉 잎에서는 감소하고 뿌리에서는 증가하였다. 이러한 결과는 Fig. 1의 choline kinase활성 변화패턴과 일치하는 면을 보였다. 녹화가 시작되기전 잎의 P-choline양은 생체 중량당 $0.8 \mu\text{mol}$ 이고 뿌리에서는 본 실험의 방법에 의해서는 검출되지 않았다. 보리유식물의 녹화가 완성되는 24시간(Lee *et al.*, 1983)에 이르러서 잎에서는 P-choline양이 생체 중량당 $0.13 \mu\text{mol}$ 로 저하되었고 뿌리에서는 잎과 거의 같은 수준으로 증가하였다. Tanaka등(1966)은 암처에서 키운 여러 식물에서 상당히 많은 P-choline이 축적된다고 하였는데, 본 실험에서도 황백화 상태와 녹화초기의 보리잎에서 많은 양의 P-choline을 측정할 수 있었으며 이는 choline kinase활성이 높음에 비해 cytidyltransferase활성이 낮음에 기인하는 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 뿌리에서는 잎과는

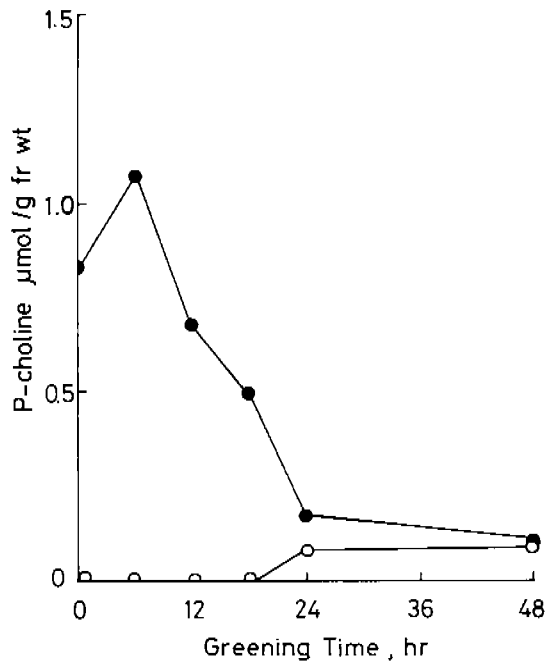


Fig. 5. Concentration of phosphorylcholine in barley seedlings with greening time. ●—●, leaves; ○—○, roots.

반대의 효소활성 패턴에 의해 녹화가 진행되면서 P-choline의 양이 증가하였으며 도관액의 P-choline양 또한 증가하였다.

이와같이 녹화중에 일어나는 효소활성과 도관액의 P-choline함량변화는 녹화 24시간내에 안정화되는 것으로 추정할 수 있었다. 그리고 녹화초기 앞에서 P-choline양이 많은 것은 잎 자체에서 유래한 것으로 보이며 녹화가 진행되면 점차로 뿌리에서 P-choline의 생성이 활발하여지면서 잎자체보다도 뿌리가 오히려 잎에 대한 P-choline의 중요한 공급원이 되는 것으로 추정된다.

적 요

황백화상태인 보리 (*Hordeum vulgare* L. cv. Baedong)유식물의 녹화시 choline kinase, CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase, phosphatase의 활성변화를 조사하였다. 녹화초기 choline kinase활성은 잎에서 높았으나 녹화 6시간을 정점으로 감소한 반면 CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase는 녹화시간에 따라 활성이 증가하였다. 그러나 뿌리에서는, 두 효소의 활성에 있어서 변화패턴이 잎과 반대되는 것으로 나타났다. P-choline의 분해효소라고 할 수 있는 phosphatase의 활성은 녹화시 잎에서 감소를 보였으나 뿌리에서는 별 변화를 보이지 않았다. 도관액의 P-choline함량이 녹화의 진행에 따라 증가하였으며 뿌리에서도 그 양이 증가하는 경향을 보였다. 반면에 잎에서는 P-choline의 양이 오히려 감소하였다. 그러므로 녹화가 진행되면서 뿌리에서 공급되는 P-choline은 잎에 대하여 점차 중요한 공급원으로 작용할 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- Appleton H.D., B.H. La Du, Jr., B.B. Levy, J.M. Steel and B.B. Brody. 1953. A chemical method for the determination of free choline in plasma. *J. Biol. Chem.* **205**: 803-813.
- Borkenhagen, L. F. and E.P. Kennedy. 1957. The enzymatic synthesis of cytidine diphosphate choline. *J. Biol. Chem.* **227**: 951-962.
- Chen, P.S., Jr., T.Y. Toribara and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**: 22-24.
- Feldman, D.A., M.E. Rounsifer and P.A. Weinholt. 1985. The stimulation and binding of CTP: phosphorylcholine cytidyltransferase by phosphatidylcholine-oleic acid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **429**: 429-437.
- Kenneth, D.J. and H. Kende. 1971. Hormonal control of lecithin synthesis in barley aleurone cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2674-2677.
- Kinney, A.J. and T.S. Moore. 1987. Phosphatidylcholine synthesis in Caster Bean endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**: 15-21.
- Kwon, Y.M. 1980. Inorganic phosphate and phosphorylcholine in the xylem exudate of rice plant. *Proc. Coll. Natur. Sci., SNU* **5**: 89-97.
- Lee, C.B., Y.N. Hong, S.H. Lee, Y.D. Cho and Y.M. Kwon. 1983. Development electron transport and photophosphorylation in greening barley seedlings. *Korean Biochem. J.* **16**: 61-71.
- Maizel, J.V., A.A. Benson and N.E. Tolbert. 1956. Identification of phosphorylcholine as an important constituent of plant sap. *Plant Physiol.* **31**: 407-408.
- Martin, B.A. and N.E. Tolbert. 1983. Factors which affect the amount of inorganic phosphate, phosphorylcholine, and phosphorylethanolamine in xylem exudate of tomato plants. *Plant Physiol.* **73**: 464-470.
- Martin, B.A. 1980. The synthesis, transport and metabolism of phosphorylcholine in tomato plants. Ph. D. Thesis. Michigan State University. East Lansing.
- Morre, D.J., S. Nyquist and E. Riverca. 1970. Lecithin biosynthesis enzymes of onion stem and the distribution of phosphorylcholine-cytidyltransferase among cell fractions. *Plant Physiol.* **45**: 800-804.
- Price-Jones, M.J. and J.L. Harwood. 1983. Hormonal regulation of phosphatidylcholine synthesis in plants. *Biochem. J.* **216**: 627-631.
- Rodney, E.U., L.L. Stephenson and P.M. Farrell. 1977. A rapid accurate assay for choline kinase. *Anal. Biochem.* **79**: 526-534.
- Tolbert, N.E. and H. Wiebe. 1955. Phosphorus and sulfur compounds in plant xylem sap. *Plant Physiol.* **30**: 499-504.
- Tanaka, K., N.E. Tolbert and A.F. Gohlke. 1966. Choline kinase and phosphorylcholine phosphatase in plants. *Plant Physiol.* **41**: 307-312.
- Yu, G.H., C.B. Lee and Y.M. Kwon. 1986. Inhibitory effect of phosphorylcholine on photophosphorylation of isolated chloroplasts from barley. *Korean J. Bot.* **29**: 157-165.
- Yu, G.H., C.B. Lee and Y.M. Kwon. 1987. Comparison of inhibitory effects of phosphorylcholine, phosphorylethanolamine, and chlorocholine on photophosphorylation of barley chloroplasts. *Korean Biochem. J.* **20**: 267-272.

(1988. 7. 5. 接受)