

발아 중인 옥수수에서 리보조음 단백질의 인산화반응에 미치는 GA_3 의 효과

安 境 燮·陰 眞 星·沈 雄 燮
(高麗大學校 生物學科)

Effect of GA_3 on Ribosomal Protein Phosphorylation in Germinating *Zea mays*

Ahn, Kyung Seop, Jin Seong Eum and Woong Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul)

ABSTRACT

In order to study the effect of GA_3 on the phosphorylation of ribosomal proteins during germination in *Zea mays*, ribosomal proteins were labelled with ^{32}P , extracted, electrophoresed and autoradiographed. There are five phosphorylated ribosomal proteins. One of these is in 40S subunit and has molecular weight of 33,000 daltons. Others are in 60S subunit and have molecular weights of 37,000, 16,000, 15,200 and 13,500, respectively. Phosphorylation of ribosomal proteins was increased maximum 47.7% in shoots of *Zea mays* treated with GA_3 .

서 론

단백질의 인산화반응이 세포활성을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다는 것과 protein kinase가 이 반응을 촉매하고 있다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. Kabat(1970)는 리보조음 단백질이 인산화된다는 사실을 처음 밝혔으며 고등식물에서는 *Lemna minor* (Trewavas, 1973), 완두의 유모(Kcates, 1973), 밀의 배(Yan and Tao, 1982), 토마토의 현탁배양세포(Scharf and Nover, 1982) 등에서 리보조음 단백질의 인산화와 여기에 관여하는 protein kinase 활성이 보고되었다. 또한 Grancharova 등(1975)은 밀의 리보조음과 여러 동식물로부터 추출한 protein kinase를 가지고 생체의 시스템에서 인산화시킨 결과 protein kinase는 광범위한 기질 특이성을 갖는다고 보고하였다. 식물의 성장과 분화과정을 GA_3 가 조절한다는

사실은 이미 알려져 있으며 Sim과 Roh(1979)는 단백질의 생합성과 인산화 반응은 GA_3 에 의해 현저하게 증가한다고 보고하였고 Rao와 Khan(1974)는 GA_3 가 폴리조음의 합성을 촉진한다고 보고하였다. 그러나 아직 리보조음 단백질의 인산화에 GA_3 가 어떠한 영향을 미치고 있는지에 대해서는 알려져 있지 않으며 다른 호르몬에 의한 효과도 거의 밝혀져 있지 않은 상태이다. 단지 Trewavas(1973)는 ABA 처리 24시간 이후부터 *Lemna minor*에서의 리보조음 단백질의 인산화가 감소된다고 보고하였으며 Scharf와 Nover(1982)는 토마토 현탁배양세포에 열차극을 주었을 때 인산화 수준이 급격하게 감소된다고 보고하였다. 본 연구에서는 GA_3 에 의한 단백질 생합성 조절기작을 밝히기 위한 중간단계로서 *in vivo* system에서의 GA_3 에 의한 리보조음 단백질의 인산화반응에 대한 효과를 구명하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 동위원소 처리. 옥수수종자(*Zea mays* L.)는 Sakada 종자회사(일본)로부터 구입한 Golden

*본 논문은 한국과학재단연구비(1989-1991)에 의한 연구 결과의 일부임.

Cross Barlam T-51 을 사용하였으며, GA_3 는 Sigma(미국), $^{32}P_i$ 는 한국에너지연구소로부터 구입하였다. 비슷한 무게의 옥수수 종자를 선택하여 20% sodium hypochlorite 용액에 10 분간 살균시켜 증류수로 2-8 회 세척한 후 암처에서 30°C를 유지시키면서 Nitch 배지에 GA_3 농도를 각각 0.1, 0.3, 0.5, 1 mM 되게 하였으며 $^{32}P_i$ 는 10 μ Ci/ml 을 각각 부가하여 암처에서 30°C를 유지하여 받아시켰다.

리보조음 및 리보조음 소단위의 분리. 본 실험의 전 과정은 4°C에서 수행하였으며 리보조음의 조제는 Roh와 Sim(1981)의 방법으로 실시하였다. 1-3 일 동안 받아서 키 옥수수 유묘(15-20 mm)를 Buffer I(100 mM Tris-HCl, pH 7.8, 50 mM KCl, 5 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 mM β -mercaptoethanol, 450 mM sucrose)에 수확한 후 Buffer I로 2 회 세척하여 물기를 제거한 후 2.5 배의 Buffer I을 부가하여 Buhler Homogenizer로 1 분간(각 15 초씩 4 회) 30,000 rpm 으로 마쇄하였다. 3,500 g에서 5 분간 원심분리 한 후 상등액의 4/5 를 취하여 30,000 g에서 30 분간 원심분리시켜 그 상등액의 3/4 을 취하여 S-30 표품이라 하였다. S-30에는 주로 소포체의 막에 폴리조음이 결합되어 있는 상태로 존재하는데 이것을 분리시키기 위해 S-30에 20% Triton X-100 을 최종농도가 1% 가 되게 부가하였다. 10 ml 초원심분리 tube 에 2 ml 1 M sucrose-Buffer I 을 넣은 후 S-30 8 ml 을 섞이지 않도록 가하여 150,000 g에서 3 시간 원심분리시켜 표품을 얻었다. 리보조음 소단위의 분리는 Roberts와 Morelos의 방법(1980)과 Baltus의 방법(1981)에 따라 수행하였다. 150,000 g에서 3 시간 원심분리시킨 침전물을 Leader와 Wool's buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 800 mM KCl, 12.5 mM $MgCl_2$, 20 mM β -mercaptoethanol)로 현탁시켜 50 A_{260} unit/ml 이 되도록 하고 37°C에서 15 분간 방치 후 Leader와 Wool's buffer에 대해 5 시간 투석시켜서 15-30% sucrose gradient ultracentrifugation에 의해 소단위를 분리하였다. Sucrose gradient 위에 투석액을 0.8 ml 섞이지 않도록 부가한 후 SW27 rotor에 넣어 Beckmann model L5-65 ultracentrifuge로 22,500 rpm에서 17 시간 원심분리시킨 다음 LKB2138 UV monitor를 이용해 60S와 40S 소단위를 각각 수확하였다. 각 소단위 분획에 $MgCl_2$ 를 부가해 최종농도가 15 mM이 되도록 하고 tRNA를 50 mg/ml만큼 부가해서 흔들준 다음 1 배의 ethanol(-20°C)를 부가하여 20°C에서 12 시간 이상 방치시켰다. 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리시켜 얻은 ethanol 침전물은 freeze drier에서 냉동건조시킨 다음 Buffer I로 현탁시켜 리보조음 단백질의 추출을 위한 시료로 사용하였다.

리보조음 단백질의 추출. 리보조음 단백질은 Hardy 등(1969)의 방법을 약간 변형시켜 추출하였다. Ribosome은 100-450 A_{260} unit/ml, 40S는 15-50 A_{260} unit/ml, 60S는 45-300 A_{260} unit/ml 되도록 Buffer I로 현탁시키고 각각 0.1 배의 1 M $Mg(OAc)_2$ 를 부가해서 흔들

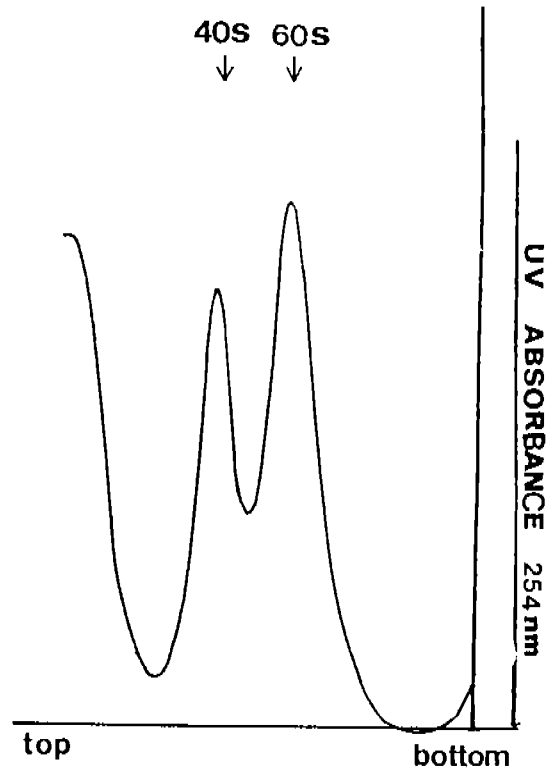


Fig. 1. Sucrose gradient profile of ribosomal subunits isolated from *Zea mays*. Ribosomal subunits were layered on a 34 ml 15-30% sucrose gradient and centrifuged at 22,500 rpm for 17 hrs. Gradients were removed by pumping out with peristaltic pump, and the A_{254} of gradient was measured through the LKB UV monitor.

준 다음 1 분 후 2 배의 빙초산을 부가하여 얼음 위에서 45 분간 계속 저어주었다. 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리시켜 얻은 상등액 중 1/3 을 취하여 다시 침전물을 현탁하여 얼음 위에서 10 분간 저어준 다음 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리시키고 RNA 침전물은 버렸으며 그 상등액을 처음 상등액과 합쳐서 단백질 침전을 위하여 시료로 사용하였는데, 5 배의 acetone(-20°C)을 시료에 부가한 후 2-3 회 전위시켜 잘 섞은 다음 침전된 단백질은 -20°C에 30 분간 방치하였다. 6,500 rpm에서 10 분간 원심분리시킨 침전물은 실온에서 5 분간 말린 다음 freeze drier에서 냉동건조시켜 -20°C에서 보관하였다.

단백질 정량과 전기영동. 리보조음 단백질은 Lowry 등의 방법(1951)에 의해 정량하였는데 이 때 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 한편 필요시 Lasitck와 McConkey(1976) 방법에도 정량하였는데 1 A_{260} unit는 0.6 mg/ml에 해당한다. 추출한 리보조음 단백질은 소량의 electrode buffer에 현탁하였고 각 well

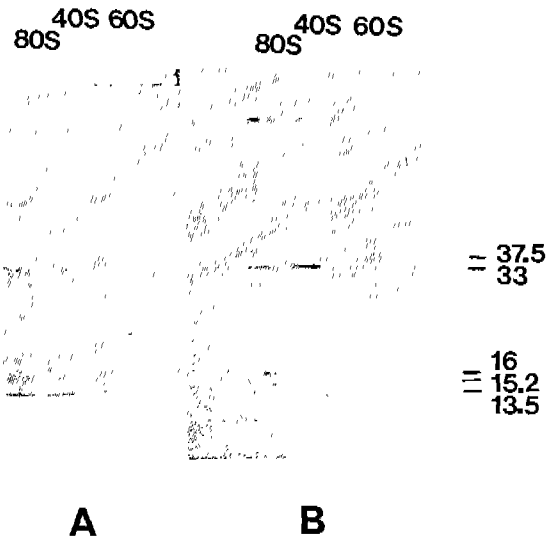


Fig. 2. Phosphorylated proteins in isolated ribosomal subunits. For ³²P labelling of Maize shoot and isolation of ribosomal subunits, see Materials and Methods. Proteins of total ribosome (80S) and of the large and small subunits (60S and 40S) were separated in one-dimensional SDS-PAGE. (A), Coomassie-stained gel; (B), autoradiograph.

당 100g 씩 apply 하여 전기영동하였다. 전기영동은 SDS-PAGE 를 행하였는데 Laemmli(1970) 방법을 약간 변형시켜 12% slab gel 또는 12-15% gradient slab gel 에서 실시하였다. Electrode buffer 는 Tris-Glycine buffer (pH8.3)로 slab gel 당 30mA 에서 전류로 4-7 시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel 은 coomassie brilliant blue R250 으로 30분간 염색하고 30% MeOH, 7.5% acetic acid 에 탈색시켜 패턴을 확인하였다.

Autoradiograph 와 scintillation counting 에 의한 방사능량 측정. 탈색한 gel 은 Whatman 2M filter paper 위에 올려놓고 gel drier 로 말린 다음 Agfa curix RPI X-ray film 에 올려놓고 intensifying screen 이 내재된 cassette 에 넣어 -70°C에서 15-20 일간 autoradiograph 하였다. 각 단백질 밴드의 인산화 정도를 정량적으로 측정하기 위하여 gel 을 2mm 크기로 잘라낸 다음 인산화된 단백질 밴드부분을 scintillation cocktail 에 넣어 Beckmann liquid scintillation counter (Model LS6800)로 방사능량을 측정하였다.

결 과

리보솜 소단위는 15-30% sucrose gradient centrifugation 에 의해서 분리하였다 (Fig. 1). 인산화된 리보솜 단백질들을 분석하기 위하여 먼저 리보솜과 각각의 리

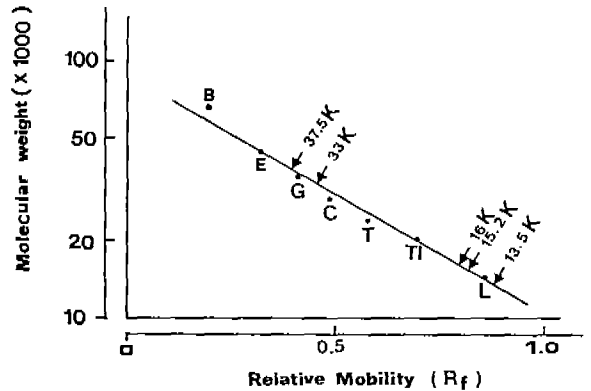


Fig. 3. Determination of M.W. for ribosomal phosphorylated protein by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel in presence of SDS. The standard protein markers used were bovine serum albumin (B), 66,000; egg albumin (E), 45,000; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G), 36,000; carbonic anhydrase (C), 28,000; Trypsinogen (T), 24,000; trypsin inhibitor (TI), 20,100; α-lactalbumin (L), 14,200.

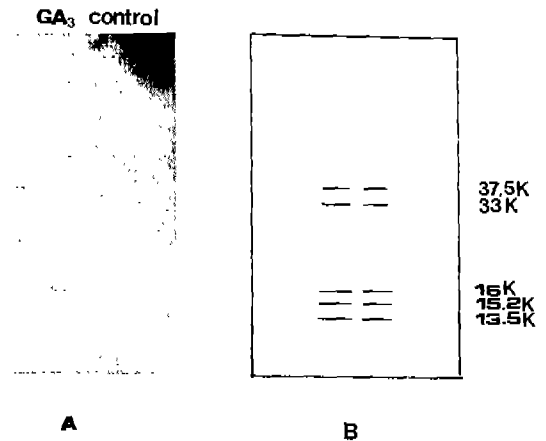


Fig. 4. Autoradiograph of ribosomal phosphorylated proteins isolated from 0.3 mM GA₃-treated and untreated maize shoots. 100 μg of ribosomal protein was loaded each well (A), (B) Diagram of (A).

보솜 소단위로부터 단백질을 추출한 뒤 SDS-PAGE 에 의해 전기영동하여 autoradiograph 방법으로 분석하였다. 대부분 리보솜 단백질의 분자량은 12,000-65,000 dalton 이며 인산화된 단백질들은 모두 5개인데 그 중 1개는 40S 소단위에 존재하고 나머지 4개는 60S 소단위에 존재하는 것이 확인되었다 (Fig. 2). 분자량 측정결과 40S 소단위에 존재하는 단백질의 분자량은 33,000 dalton 이었으며 60S 소단위에 존재하는 단백질의 분자량은 16,000 dalton, 15,200 dalton, 13,500 dalton 그리고 37,500 dalton 이었다. 분자량 측정시에는 separating gel 에서 7개의 표준단백질

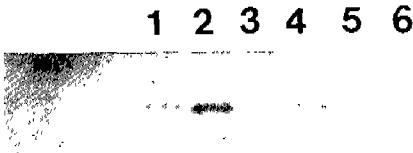


Fig. 5. Autoradiogram of 12% SDS-polyacrylamide gel of ^{32}P -labelled ribosomal protein. 3-day germination with GA_3 (lane 1,4), 2-day germination with GA_3 (lane 5), 1-day germination with GA_3 (lane 6), 1-day germination with GA_3 and treated with RNase (lane 3), 3-day germination without GA_3 (lane 2).

이 이동한 거리와 tracking dye 가 이동한 거리와의 비유로부터 R_f 값을 계산하여 표준곡선을 결정하였다 (Fig. 3). 발아시 0.3mM의 GA_3 를 처리한 옥수수줄기에서는 대조구에 비해 인산화가 많이 되어 있는 것을 볼 수 있었으며 단백질 밴드에 따라 차이는 있지만 대체적으로 처리하였을 때 3일까지는 시간이 지남에 따라 인산화 정도가 증가하였고, 추출한 단백질을 RNase로 처리한 다음 전기영동하여 나타난 밴드 역시 똑같은 패턴으로 나타나 RNA 단편으로부터 autoradiograph band가 유래할 가능성은 배제되었다 (Fig. 5). 발아 중인 옥수수에서 어느 정도의 GA_3 를 0.1mM, 0.3mM, 0.5mM, 1mM로 처리한 다음 3일간 발아시킨 옥수수줄기에서 리보솜 단백질을 추출하였는데 대조구에 비해 0.1mM에서 약간 증가되었다가 0.3mM에서 가장 인산화가 많이 되어 있고 0.5mM, 1mM로 농도가 커짐에 따라 다시 감소되었다 (Fig. 6).

고 찰

단백질 인산화반응은 동물호르몬이 작용하는데 있어서 중요한 요소라 할 수 있는데, 현재까지 동물호르몬의 작용기작에 대해서는 많이 밝혀졌다. 고등식물에서는 뒤늦게 protein kinase의 존재가 확인되었으며 (Kcates and Trewavas, 1974; Carratu *et al.*, 1974; Lin and Key, 1980; Murray *et al.*, 1978), 단백질이 생합성된 후 인산

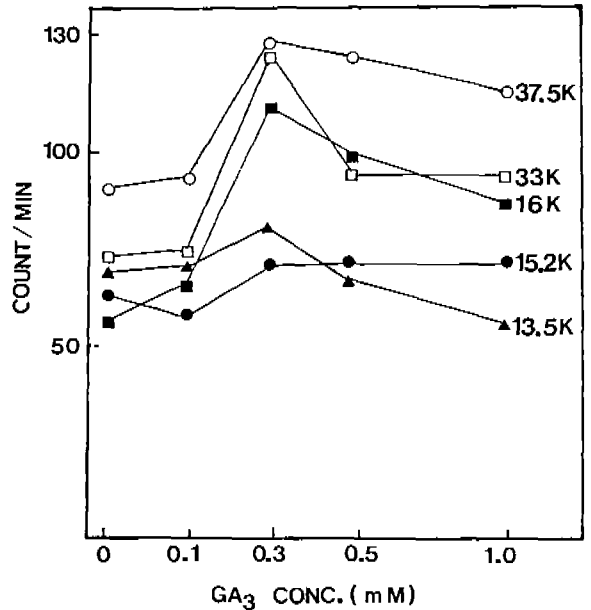


Fig. 6. Effect of GA_3 concentration on phosphorylation of ribosomal protein. Each $100\mu\text{g}$ of ribosomal protein was subjected to SDS-PAGE and the phosphorylated bands were excised and cpm was measured.

화에 의해 변형된다는 사실을 밝혀내었다 (Trewavas, 1973, 1976; Trewavas and Stratton, 1977). 한편 GA_3 가 식물체내에서 단백질 생합성의 translation 과정에서 작용한다고 알려져 있으며 (Sim *et al.*, 1982, 1983; Sim and Roh, 1979; Chen and Osborne, 1970), 또한 GA_3 는 리보솜의 활성화에 영향을 준으로써 작용한다는 보고도 있다 (Fuhr *et al.*, 1977; Wicks, 1974). 본 연구에서는 GA_3 가 리보솜 단백질의 인산화반응에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 *in vivo*에서 실험을 하였다. *In vitro* system에서는 정제된 ribosomal protein kinase를 사용하여 리보솜과 함께 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP를 처리하고 인산화시키게 되면 인산화되는 리보솜 단백질은 3-14개 정도로 실험조건에 따라 또는 리보솜이 inactive monomer인가 polymer인가에 따라 달라지기 때문에 실제로 생체내에서 일어나는 반응과는 큰 차이를 나타내고 있다고 볼 수 있다. 그러나 protein kinase의 활성을 조사하고 다른 효소나 기질과의 연관성을 분자적인 수준에서 밝히고자 할 때 유용하다고 할 수 있으며 리보솜 topology를 연구하는데에도 이용할 수 있다 (Eil and Wool, 1973). *In vitro*에서와는 달리 *in vivo*에서는 비교적 일정한 수의 리보솜 단백질이 인산화되는데 Gressner와 Wool(1976)은 정제된 리보솜에서는 40S 소단위에 있는 단 1개의 단백질만이 뚜렷하게 인산화된다고 하였고 총 radioactivity의 80-90%를 차지하며 이는 한 단백질 분자당 4-5 인산기가 결합되어 있

Table 1. Effect of GA₃ on the phosphorylation of ribosomal proteins

Phosphorylated proteins	*Control (Count/min.)	**GA ₃	Rate of increase (%)
37.5K	155.0	229.0	47.7
33K	162.0	226.0	39.3
36K	127.0	158.0	24.4
15.2K	109.4	130.0	18.9
13.5K	142.0	170.6	20.1
Total	696.0	913.2	31.2

*Sample was extracted from the shoots untreated.

**Sample was extracted from the shoots treated with 0.3 mM GA₃.

All results are averaged value from double expts.

다고 하였는데 통칭 이 단백질을 S6 단백질이라 한다. 본 실험의 결과에서는 S6 단백질 (Fig. 4B의 33K 밴드) 이외에 60S 소단위에서 4개의 인산화된 단백질이 추가로 나타나고 있는데, 그 중 3개는 Scharf와 Nover(1982)의 결과와 일치하고 있다. 또한 Browning 등(1985)은 *in vitro*에서 60S 소단위에서만 3개의 단백질이 인산화 된다고 보고하였는데 각각의 분자량이 38,000 dalton, 14,800 dalton, 12,600 dalton으로 본 실험의 결과의 60S 소단위에 있는 인산화된 단백질의 분자량과 비슷한 수치를 나타내고 있다. 그러나 본 실험의 경우 60S 소단위에서 16,000 dalton의 단백질이 추가로 나타나고 있는데 이것의 정확한 규명은 차후의 실험에서 이루어져야 할 것이다. 한편 GA₃를 처리하였을 때 확실히 인산화가 대조구에 비해 증가되었지만 아직까지도 단백질 생합성에 인산화가 어떤 직접적인 기능을 담당하고 있는지는 불확실하다고 하겠다. Eil과 Wool(1973)은 인산화된 상태와 탈인산화된 상태 사이에는 translation의 elongation 속도와 aminoacyl tRNA의 결합에 약간의 변화가 있다고 보고하였지만 리보솜 단백질의 인산화와 리보솜의 단백질 합성기능과의 관계는 좀 더 세심한 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

적 요

발아 중인 옥수수에서 리보솜 단백질의 인산화반응에 미치는 GA₃의 효과를 알아보기 위하여 발아시에 ³²P를 처리하였고 리보솜 단백질을 추출하여 전기영동한 다음 gel을 autoradiograph하여 인산화된 단백질을 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 인산화된 리보솜 단백질은 모두 5개인데 그 중 1개는 분자량이 33,000 dalton이고 40S 소단위에 존재하며, 다른 4개는 60S 소단위에 존재하며, 분자량은 각각 37,500 dalton, 16,000 dalton, 15,200 dalton, 13,500 dalton이었다. GA₃로 처리한 옥수수줄기에

서 대조구에 비해 리보솜 단백질의 인산화가 최고 47.7% 가량 증가되었다.

참 고 문 헌

Browning, K.S., T.F.J. Yan, S.T. Lauer, L.A. Aquino, M. Tao, and J.M. Ravel. 1985. Phosphorylation of wheat germ initiation factor and ribosomal proteins. *Plant Physiol.* **77**: 370-373.

Carratus, G., L. Manzocchi, G. Lanzani and M. Giannattasio. 1974. Soluble and ribosome-associated protein kinase from wheat embryos. *Plant Sci. Lett.* **3**: 313-321.

Chen, D. and D.J. Osborne. 1970. Hormones in the translational control of early germination in wheat embryos. *Nature*, **226**: 1157-1160.

Eil, C. and I.G. Wook. 1973. Phosphorylation of liver ribosomal proteins. *J. Biol. Chem.* **248**: 5122-5129.

Grancharova, Ts. V., T. Getova and T.K. Nikolov. 1976. Phosphorylation of ribosomal proteins from eukaryotes in homologous and heterologous cell-free systems. *Biochem. Biophys. Acta* **418**: 397-403.

Gressner, A.M. and I.G. Wool. 1976. Influence of glucagon and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate on the phosphorylation of rat liver ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* **251**: 1500-1504.

Hardy, S.T., C.G. Kurland, P. Voynow and G. Morad. 1969. The ribosomal proteins of *Escherichia coli* I. Purification of 30S ribosomal proteins. *Biochemistry.* **8**: 2897-2905.

Kabat, D. 1970. Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocyte. Characterization and regulatory aspect. *Biochemistry.* **2**: 4160-4175.

Keates, R.A.B. and A. Trewavas. 1974. Protein kinase activity associated with isolated ribosomes from peas and Lemna. *Plant Physiol.* **54**: 95-99.

Lastick, S.M. and E.H. McConkey. 1976. Exchange and stability Hela ribosomal proteins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **251**: 2867-2875.

Lin, P.P.C. and J.L. Key. 1980. Histone kinase from soybean hypocotyls: Purification, properties, and substrate specificities. *Plant Physiol.* **66**: 360-367.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Murray, M.F., T.J. Guilfoyle and J.T. Key. 1978. Isolation and characterization of a chromatin-associated protein kinase from soybean. *Plant Physiol.* **61**: 1023-1030.

Rao, V.S. and A.A. Kahn. 1974. Hormonal regulation of polysome and polysome-associated RNA synthesis in embryo and aleurone of barley. *Plant Physiol.* **53**: 5-53.

Roberts, S. and B.S. Morelos. 1980. Cerebral ribosomal protein phosphorylation in experimental hyperphenyl-

- alaninoemia. *Biochem. J.* **190**: 405-419.
- Roh, K.S. and W.S. Sim. 1981. Gibberellic acid action and protein synthesis on the gene expression. *Ph.D. Dissertation*.
- Scharf, K.D. and L. Nover. 1982. Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* **30**: 427-437.
- Sim, W.S., H.D. Park, K.S. Roh and H.Y. Moon. 1982. Studies on the mechanism of gibberellic acid action II. Regulation of protein biosynthesis and phosphorylation by GA₃ in the presence of actinomycin D. *Kor. J. Bot.* **25**: 3-8.
- Sim, W.S. and K.S. Roh. 1979. Studies on the mechanism of gibberellic acid action I. Regulation of protein biosynthesis and phosphorylation by gibberellic acid 3. *Kor. J. Bot.* **22**: 95-1000.
- Sim, W.S., K.S. Roh and H.Y. Moon. 1983. Studies on the mechanism of gibberellic acid action III. Regulation of protein biosynthesis and phosphorylation by cyclic AMP. *Kor. Biochem. J.* **16**: 27-33.
- Trewavas, A.J. 1973. The phosphorylation of ribosomal protein in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* **51**: 760-767.
- Trewavas, A. 1976. Post-translational modification of proteins by phosphorylation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**: 349-374.
- Trewavas, A. and B.R. Stratton. 1977. The control of plant growth by protein kinase. *In nucleic acid and protein synthesis in plants. Edited by L. Bogorad and J.H. Weil. pp. 309-329. Plenum Press, New York.*
- Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- Wicks, W.K. 1974. "Regulation of protein synthesis by cyclic AMP", in advances in cyclic nucleotide research, eds. Greengard, P. and Robinson, G.A. (Ravin Press, New York). **4**: 335-438.
- Yan, T.F.J. and M. Tao. 1982a. Purification of a wheat germ protein kinases. *J. Biol. Chem.* **257**: 7037-7403.
- Yan, T.F.J. and M. Tao. 1982b. Studies on an endogenous substrate of wheat germ protein kinase. *J. Biol. Chem.* **257**: 7044-7049.

(1990. 2. 26 接受)