

담배 현탁배양 세포에 있어 Polyamine 과 Ethylene 생합성시 중간산물로서 S-Adenosylmethionine 의 역할

朴 基 榮 · 李 舜 熙
(延世大學校 理科大學 生物學科)

Role of S-Adenosylmethionine as an Intermediate in Relation between Polyamine and Ethylene Biosynthesis in Suspension-Cultured Tobacco Cells

Park, Ky Young and Sun Hi Lee

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The role of S-adenosylmethionine (SAM) as an intermediate in interrelation between polyamine and ethylene biosynthesis was studied in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. Exogenous SAM stimulated the polyamine and ethylene biosynthesis in 4 day-cultured cells, which were in active cell divisions, and 10 day cultured cells, which went on with active cell elongation and senescence. SAM-induced ethylene production was more effective in 10 day-cultured cells than in 4 day-cultured cells, but SAM-induced polyamine biosynthesis was more effective in 4 day-cultured cells than in 10 day-cultured cells. Polyamine contents were increased by the blockage of ethylene biosynthetic pathway in the conversion of SAM to ethylene via 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) with aminooxyacetic acid (AOA). Also, ethylene production was increased by the inhibitors of polyamine biosynthesis such as methylglyoxal bis-(guanylhydrazine) (MGBG), dicyclohexylamine (DCHA), α -difluoromethylarginine (DFMA) and α -difluoromethylornithine (DFMO). These results suggest that there may be interrelations between polyamine and ethylene biosynthesis for the competition of SAM and the inherent mechanism of switch on-off in polyamine and ethylene biosynthetic activity with the progress of cell growth and senescence.

서 론

Polyamine (putrescine, spermidine 및 spermine)은 식물을 비롯한 동물, 미생물 등의 모든 생물체에 존재하는 물질로서, 식물의 경우에는 생장, 발생, 분화 등의 생리과정 뿐만 아니라 특히 노화를 억제하는 생장조절물질이다 (Galston, 1983; Tabor and Tabor, 1984; Evans and Malmberg, 1989).

식물에서 polyamine 이 생합성될 때 arginine 으로부터

arginine decarboxylase (ADC; EC 4.1.1.19)에 의하여, 그리고 ornithine 으로부터 ornithine decarboxylase (ODC; EC 4.1.1.17)에 의하여, diamine 인 putrescine 이 합성된다. 한편 methionine 에서 S-adenosylmethionine (SAM) 을 경유한 후 SAM decarboxylase (SAMDC; EC 4.1.1.50)에 의하여 생성된 decarboxylated SAM 이 putrescine 에 aminopropyl 기를 공급하여 줌으로써 triamine 인 spermidine 이 생성되며, 이어서 decarboxylated SAM 이 spermidine 과 반응하면 tetraamine 인 sperm-

ine이 생성된다(Smith, 1985). Spermidine과 spermine 생합성의 중간산물인 SAM은 식물호르몬인 ethylene의 전구물질로도 이용된다(Adams and Yang, 1977).

Polyamine은 노화를 억제하는데 반하여 공통의 전구물질로부터 유래되는 ethylene은 노화를 촉진하므로서, 몇몇 식물의 노화에 대해 polyamine과 ethylene은 서로 상반되는 생리효과를 나타낸다(Kaur-Sawhney *et al.*, 1982; Yang and Hoffman, 1984; Miyazaki and Yang, 1987). 그러나 이러한 상반된 생리작용을 나타내는 물질들의 생합성이 공통의 전구물질인 SAM으로부터 어떻게 상호조절되어 식물의 생장을 총체적으로 조절하는가는 아직 잘 알려져 있지 않다.

본 논문은 세포생장이 활발하게 일어나는 시기와 노화가 진행되는 시기의 담배 배양세포에서 SAM이 polyamine과 ethylene 생합성에 미치는 영향과, SAM의 유용성에 의거한 상호 생합성의 조절기작을 밝히기 위한 것이다.

재료 및 방법

실험재료. 담배(*Nicotiana tabacum* L.)잎에서 절편을 만들어 표면멸균한 다음 26°C의 암소에서 B5 한천배지를 사용하여 callus를 유도한 다음, B5 액체배지에서 현탁 배양하였다. Amino 등(1983)의 방법인 double phosphate starvation 방법에 의하여 동시성 세포를 얻어 재료로 사용하였다. 동시성 배양세포를 50ml의 Erlenmeyer flask에 넣은 후, 10ml의 B5 hormone 결핍배지와 함께 필요한 시약을 첨가하여 정해진 시간 동안 배양하였다. 활발하게 세포분열을 하는 세포로는 계대배양 후 4일된 세포를 선택하였고, 노화가 진행되는 세포로는 세포신장이 주로 일어나는 계대배양 후 10일된 세포를 선택하였다(Park, 1989).

Ethylene 생성량 측정. Yu와 Yang(1979)의 방법을 사용하였다. 배양세포 1g을 flask에 넣고 실리콘 마개로 막아 26°C 암소에서 진탕배양시켰다. 일정한 시간이 경과한 후 flask내의 기체 1ml를 주사기로 채취하여 Gas Chromatograph(Shimadzu GC-3BF, Flame Ionization Detector, Alumina Column: 100°C, Air: 0.4kg/cm, Carrier: 2kg/cm, H₂: 0.5kg/cm)로 ethylene 생성량을 측정하였다.

ACC 정량. Lizada와 Yang(1979)의 방법을 변형하여 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)가 ethylene으로 전환되는 것을 이용하여 Gas Chromatograph로 정량하였다. 세포 0.5g을 3% sulfosalicylic acid 5ml로 균질화시킨 후, 7,000×g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 1N HCl로 활성화시킨 이온교환 column(Dowex-50W, H⁺ form, bed volume 1 ml)에 상정액을 통과시킨 후, column resin에 흡착되지 않은 물질을 6ml 증류수로 제거한 다음, 2ml의 2N NH₄OH로 유출

하였다. 질소가스를 사용하여 건조시킨 후 1ml 증류수로 녹여 0.8ml를 취한 다음 25ml vial에 넣고 10mM HgCl₂ (0.1ml)를 첨가하여 실리콘 마개로 막고 얼음물에 10분 동안 채워두었다. 주사기로 NaOCl(5% NaOCl/포화된 NaOH, 2:1, v/v)을 0.1ml 주입한 후 얼음물에 5분간 채워두었다가 4ml의 기체를 주사기로 채취하여 생성된 ethylene량을 측정하여 표준정량표로 환산하였다. 표준정량표는 1, 2, 4, 6 및 8μM의 ACC로부터 위와 동일한 화학반응에 의하여 생성된 ethylene량을 측정하여 통계처리하였다($Y = -1.778 + 7.07X$, X: ACC의 농도, Y: ethylene 생성량, 상관계수: 0.9994).

Polyamine 추출 및 정량. Goren 등(1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 필요한 시약이 첨가된 B5 hormone 결핍배지에서 일정시간 배양된 현탁배양세포를 수거하여 증류수로 씻은 다음 5% perchloric acid로 균질화시킨 후, 15,000×g로 20분간 원심분리하여 상정액을 취하였다. 상정액 200μl, dansylchloride(0.05g/ml acetone) 400μl 및 포화된 Na₂CO₃ 200μl를 혼합하여 26°C의 암소에서 16시간 반응시킨 후 100μl의 proline(0.1g/ml)을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 500μl의 benzene으로 dansyl 유도체를 추출하여 200μl를 silica gel TLC plates(Kieselgel 60, Merck)에 점적하여 chloroform: triethylamine(100:9, v/v)로 전개시킨 후, 자외선 아래에서 표준시료와 비교하여 각각의 polyamine을 끊어내어 5ml의 ethylacetate로 용출하여 Fluorescence Spectrophotometer(Perkin-Elmer LS-5, excitation: 350nm, emission: 500nm)로 형광강도를 측정하여 정량하였다.

ADC, ODC 및 SAMDC의 활성 측정. Cohen과 Kende(1986)의 방법을 변형하여 사용하였다. 배양세포를 1mM pyridoxal phosphate, 0.1mM DTT, 20mM EDTA가 포함된 10mM potassium-phosphate 완충용액(pH 8.0)으로 균질화시킨 후, 17,000×g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 취해서 효소원으로 사용하였다. 효소원 200μl와 함께 50μl의 potassium-phosphate 완충용액(pH 7.5)과 기질이 포함된 용액 50μl를 혼합한 반응용액을 center well이 있는 flask에 넣은 후, 실리콘 마개를 막아 36°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Center well속에는 기질에서 발생하는 ¹⁴CO₂를 흡수시키기 위하여 100μl의 hyamine(methylbenzethonium hydroxide)를 흡수시킨 Whatman No. 1 paper(1.5×1cm)를 넣어주었다. 그리고 ADC의 기질로는 0.2μCi의 L-[U-¹⁴C]arginine hydrochloride(324mCi/mmol)를 사용하였으며 cold arginine으로 희석하여 최종 농도가 0.9mM이 되도록 하였다. ODC의 기질로는 0.2μCi의 L-[U-¹⁴C]ornithine hydrochloride(53mCi/mmol)를 사용하였으며, cold ornithine으로 희석하여 최종 농도가 0.3mM이 되도록 하였다. SAMDC의 기질로는 0.125μCi의 S-adenosyl-L-[carboxyl-¹⁴C]methionine(58mCi/mmol)을 사용하였으

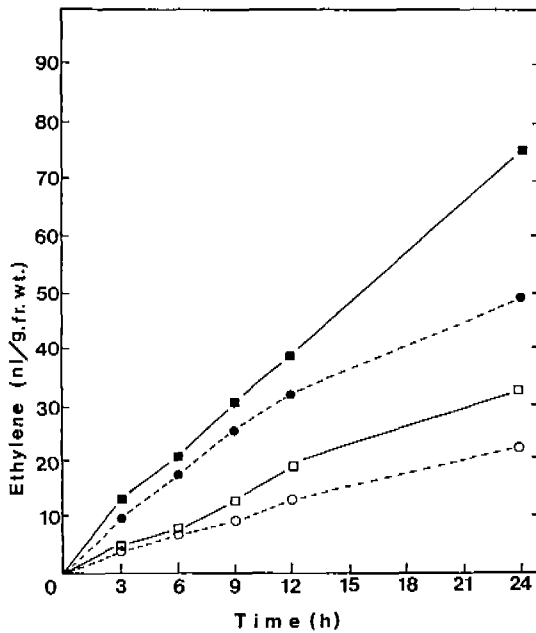


Fig. 1. Effect of SAM on ethylene production in 4 (O, □) and 10 (●, ■) day-cultured cells. Control (---); 200 μM SAM (—).

며, cold SAM으로 희석하여 최종 농도가 6.6mM이 되도록 하였다. 200 μl의 6N H₂SO₄로 반응을 정지시킨 후 45분 동안 36°C에서 반응시켜 ¹⁴CO₂를 흡입시킨 다음 Whatman No.1 paper를 꺼내어 Liquid Scintillation Counter (PACKARD, TRI-CARB 4530)로 radioactivity를 측정하였다.

결 과

SAM이 polyamine과 ethylene 합성에 미치는 영향.

SAM이 polyamine과 ethylene 합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포분열이 활발하게 일어나는 exponential phase의 초기인 계대배양 후 4일된 세포와, 세포분열의 속도가 떨어지고 세포신장이 주로 일어나는 stationary phase의 초기인 계대배양 후 10일된 세포에 (Park, 1989) 200 μM SAM을 첨가하여 24시간 배양하면서 ethylene 생성량을 비교하였다 (Fig. 1). 4일된 세포는 6시간 이후부터 ethylene 생성량이 증가하기 시작하여 24시간 경과 후에는 대조구에 비하여 약 40%가 증가하였으며, 10일된 세포는 처리 초기부터 증가하기 시작하여 24시간 경과 후에는 약 50%가 증가하였다.

Polyamine 합성은 4일된 세포에서 SAM 처리 후 6시간, 24시간이 경과함에 따라 putrescine 함량이 각각 30%, 33%가 증가하였으며, spermine 함량은 138%, 36%가 각각 증가하였고, spermidine 함량은 6시간 후에만 22%가 증가하였을 뿐 24시간 후에는 대조구와 유사하였다 (Table 1). 또한 10일된 세포에서는 200 μM SAM 처리 후, 6, 24시간이 지났을 때 putrescine 함량은 모두 15%, spermine 함량은 각각 90%, 26%가 증가하였고, spermidine 함량은 6시간에는 40%가 증가하였지만 24시간에는 오히려 11%가 감소하였다 (Table 1).

한편 polyamine 합성에 관여하는 ADC, ODC 및 SAMDC 등의 효소활성을 보면 4일된 세포에서 SAM 처리 후 6시간이 경과했을 때 ADC, ODC, SAMDC의 활성이 각각 25%, 20%, 32%가 증가하였고 10일된 세포에서는 ODC와 SAMDC의 활성은 11%, 16%가 각각 증가하였지만 ADC의 활성은 오히려 6%가 감소하였다 (Table 2).

이상의 결과에서 보듯이, 외부에서 처리한 SAM에 의하여 ethylene 생성은 4, 10일된 세포에서 모두 증가하였는데 특히 10일된 세포에서 더 효율적이었고, polyamine 합성도 4, 10일된 세포에서 모두 증가하였지만, 4일된 세포에서 더 효율적이었다. 따라서 SAM 처리에 의한 세포내

Table 1. Effect of SAM on putrescine, spermidine and spermine level in 4 and 10 day-cultured cells

Time after incubation	Treatment	4 day-cultured cells			10 day-cultured cells		
		Put.	Spd.	Spm.	Put.	Spd.	Spm.
(nmole/g.fr.wt.)							
6h	Control	101.3 (100)	115.3 (100)	18.2 (100)	71.4 (100)	112.5 (100)	32.7 (100)
	SAM	131.7 (130)	140.7 (122)	43.3 (238)	95.0 (133)	115.9 (103)	445. (136)
24h	Control	303.8 (100)	147.3 (100)	22.7 (100)	176.9 (100)	135.2 (100)	34.3 (100)
	SAM	349.4 (115)	206.2 (140)	43.1 (190)	203.4 (115)	120.3 (89)	43.2 (126)

The 4 and 10 day-cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium with or without 200 μM SAM at 26 °C in darkness for 6 h or 24 h. Percent control values are shown in parentheses.

Table 2. Effect of SAM on the activities of ADC, ODC and SAMDC in tobacco suspension cells cultured for 4 and 10 days

Treatment	4 day-cultured cells			10 day-cultured cells		
	ADC	ODC	SAMDC	ADC	ODC	SAMDC
	(nmole ¹⁴ CO ₂ /h.mg protein)					
Control	20.0 (100)	8.2 (100)	6.2 (100)	11.0 (100)	8.4 (100)	3.2 (100)
SAM (200 μM)	25.0 (125)	9.8 (120)	8.2 (132)	10.3 (94)	9.3 (111)	3.7 (116)

The cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium at 26°C in darkness for 6 h with or without the treatment of 200 μM SAM. Percent control values are shown in parentheses.

SAM pool 크기의 증가가 polyamine 과 ethylene 합성에 영향을 주는 것이 확인됨으로써, 다음은 두 물질의 생성 경로 사이의 SAM의 유용성 여부가 각각의 생합성을 조절하는가를 조사하였다.

AOA가 polyamine 과 ethylene 합성에 미치는 영향.
Polyamine 과 ethylene 이 SAM에서부터 각기 다른 경로를 통하여 생성되므로, ethylene 생성경로를 차단함으로써 SAM의 유용성을 증가시켰을 때 polyamine 생합성의 변화를 조사하였다. Ethylene의 생성 경로를 차단하기 위하여 SAM → ACC로의 전환을 억제하는 aminooxyacetic acid(AOA)를(Amrheim and Wenker, 1979) 처리했을 때, 제대배양 후 4일과 10일된 세포에서 모두 ethylene 생성이 감소하면서 동시에 polyamine 합성이 증가하였는데 특히 spermidine 함량의 증가가 두드러졌다(Table 3).

MGBG가 polyamine 과 ethylene 합성에 미치는 영향.
Polyamine 생합성을 억제하여 세포내 SAM의 유용성을

Table 3. Effect of AOA on ACC, ethylene and polyamine biosynthesis

Day after incubation	Treatment	ACC nmole/g.fr.wt.	Ethylene nl/g.fr.wt./24 h	Polyamine titers		
				Put. nmole/g.fr.wt.	Spd. nmole/g.fr.wt.	Spm.
4 day	Control	0.89 (100)	12.5 (100)	157.7 (100)	114.5 (100)	19.7 (100)
	AOA	0.49 (55)	5.3 (42)	195.6 (124)	232.4 (203)	29.4 (149)
10 day	Control	1.91 (100)	62.3 (100)	94.2 (100)	104.4 (100)	13.6 (100)
	AOA	1.13 (59)	24.5 (39)	128.1 (136)	231.8 (222)	16.7 (123)

The suspension cells which were cultured for 4 and 10 days were incubated in hormone-free B5 medium with or without 1 mM AOA at 26°C in darkness for 24 h. Percent control values are shown in parentheses.

Table 4. Effect of MGBG on ACC, ethylene and polyamine biosynthesis

Day after incubation	Treatment	ACC nmole/g.fr.wt.	Ethylene nl/g.fr.wt./24 h	Polyamine titers		
				Put. nmole/g.fr.wt.	Spd. nmole/g.fr.wt.	Spm.
4 day	Control	0.89 (100)	12.5 (100)	157.7 (100)	114.5 (100)	19.7 (100)
	MGBG	1.27 (143)	17.0 (136)	294.9 (187)	53.8 (47)	24.6 (125)
10 day	Control	1.91 (100)	62.3 (100)	94.2 (100)	104.4 (100)	13.6 (100)
	MGBG	2.94 (154)	89.1 (143)	182.7 (194)	138.9 (133)	18.8 (138)

The suspension cells which were cultured for 4 and 10 days were incubated in hormone-free B5 medium with or without 1 mM MGBG at 26°C in darkness for 24 h. Percent control values are shown in parentheses.

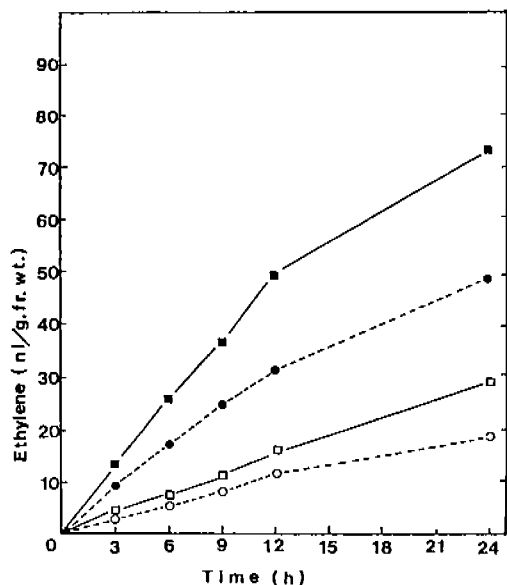


Fig. 2. Effect of DCHA on ethylene production in 4 (○, □) and 10 (●, ■) day-cultured cells. Control (—); 2 mM DCHA (---).

증가시켰을 때 ethylene 생성량을 조사하여 보았다. Polyamine 생성경로를 차단시키기 위하여 SAMDC의 활성을 가역적으로 억제하여 SAM → decarboxylated SAM을 감소시켜 결국 spermidine 합성을 억제하는 methyl glyoxal bis-(guanylhydrazone) (MGBG)를 (Suzuki and Hirasawa, 1980) 처리하였을 때, 4일된 세포에서 ethylene 생성량이 36% 증가하였고, putrescine 함량은 87%가 증가하였으며, spermidine 함량은 53%가 억제하였지만, spermine 함량은 25%가 증가하였다(Table 4). 그러나 10일된 세포에서는 1mM MGBG에 의하여 ACC와 ethylene 생성은 각각 54%, 43%가 증가하였지만, 예상밖으로 polyamine 합성도 증가하였다.

DFMA, DFMO 및 DCHA가 polyamine과 ethylene 합성에 미치는 영향. SAMDC에는 직접 작용하지 않더라도 polyamine 생합성에 관계하는 다른 효소들의 활성을 억제함으로써 세포내 SAM량을 증가시키는 (Papazafiri and Osborne, 1987) α-difluoromethylarginine (DFMA), α-difluoromethylornithine (DFMO) 및 dicyclohexylamine (DCHA)을 처리한 후 ethylene 생성량을 조사하였다. Spermidine synthase의 활성을 비가역적으로 억제하여 polyamine 합성을 억제하는 DCHA를 (Biondi *et al.*, 1988) 처리하면 ethylene 생성량이 4일, 10일된 세포에서 모두 배양 초기부터 증가하여 24시간 경과 후 각각 30%, 50%가 증가하였다(Fig. 2). 한편 polyamine 합성은 2mM DCHA를 3시간 처리했을 때 putrescine, spermidine, spermine 함량이 모두 크게 억제되었는데,

Table 5. Effect of DCHA on putrescine, spermidine and spermine level in 4 and 10 day-cultured cells

Treatment	4 day-cultured cells			10 day-cultured cells		
	Put.	Spd.	Spm.	Put.	Spd.	Spm.
	(nmole/g.fr.wt.)					
Control	112.5 (100)	112.7 (100)	23.5 (100)	69.4 (100)	117.9 (100)	30.3 (100)
DCHA	89.6 (80)	50.7 (45)	12.3 (52)	40.2 (58)	81.4 (69)	22.6 (75)

The 4 and 10 day-cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium with or without 2 mM DCHA at 26 °C in darkness for 3 h. Percent control values are shown in parentheses.

Table 6. Effect of DFMA and DFMO on polyamine titers and ethylene production in tobacco suspension cells cultured for 4 days

Treatment	Ethylene nl/g.fr.wt.	Polyamine titers nmole/g.fr.wt.		
		Putrescine	Spermidine	Spermine
Control	12.3 ± 0.3 (100)	152.3 ± 4.2 (100)	102.7 ± 0.6 (100)	17.3 ± 0.8 (100)
DFMA	16.4 ± 0.4 (133)	74.2 ± 0.5 (49)	87.7 ± 5.9 (85)	22.6 ± 2.2 (131)
DMFO	15.7 ± 0.2 (128)	109.2 ± 2.2 (72)	83.4 ± 7.9 (81)	22.1 ± 0.9 (128)
DFMA + DFMO	12.7 ± 1.1 (103)	70.8 ± 7.6 (47)	86.3 ± 9.4 (84)	30.1 ± 1.6 (174)

The cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium after addition of 1 mM DFMA, 1 mM DFMO, and both of 0.5 mM DFMA and 0.5 mM DFMO at 26 °C in darkness for 24 h. Percent control values are shown in parentheses. Values are average ± standard deviation.

spermidine 합성의 억제가 가장 효율적이었으며, 10일된 세포보다는 4일된 세포에서 억제효과가 더 높았다(Table 5).

Polyamine 합성의 rate-limiting step인 ADC와 ODC의 활성을 비가역적으로 억제함으로써 putrescine 합성을 억제하는 DFMA와 DFMO를 (Sjoerdsma, 1981) 각각 처리하여 24시간 배양하면 ethylene 생성량이 4, 10일된 세포에서 모두 20-33%가 증가하였다(Table 6과 7). Polyamine 합성은 억제물질처리구가 대조구보다 putrescine은 크게 감소하였지만, spermidine은 소량만 감소하였고 spermine은 오히려 증가하였다. 10일된 세포보다 4일된 세포에서 DFMA와 DFMO에 의하여 ethylene 생성의 증

Table 7. Effect of DFMA and DFMO on polyamine titers and ethylene production in tobacco suspension cells cultured for 10 days

Treatment	Ethylene nl/g.fr.wt.	Polyamine titers		
		Putrescine	Spermidine	Spermine
		nmole/g.fr.wt.		
Control	60.0 ± 1.2 (100)	90.5 ± 4.2 (100)	70.8 ± 2.8 (100)	25.5 ± 7.3 (100)
DFMA	76.8 ± 0.7 (128)	31.1 ± 1.8 (34)	65.6 ± 2.9 (93)	24.0 ± 4.5 (94)
DMFO	71.7 ± 1.4 (120)	50.7 ± 2.1 (56)	77.6 ± 0.2 (110)	31.9 ± 2.3 (125)
DFMA + DFMO	62.7 ± 1.2 (105)	24.5 ± 4.1 (27)	51.0 ± 3.9 (72)	51.6 ± 0.2 (202)

The cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium after addition of 1 mM DFMA, 1 mM DFMO, and both of 0.5 mM DFMA and 0.5 mM DFMO at 26°C in darkness for 24 h. Percent control values are shown in parentheses. Values are average ± standard deviation.

가와 spermidine 의 감소가 더 효율적이었다.

Polyamine 이 SAMDC 의 활성에 미치는 영향. SAM 에서 polyamine 으로의 전환경로가 자체적으로 조절되는가를 알아보기 위하여 polyamine 을 처리한 후 SAMDC 의 활성을 조사하였다. 0.1 mM putrescine 은 4 일, 10 일된 세포에서 모두 SAMDC 의 활성을 증가시켰지만, 0.1 mM spermidine 은 SAMDC 의 활성을 억제시켰다 (Table 8).

고 찰

담배의 현탁배양 세포는 세포분열이 활발한 시기에는 polyamine 함량이 최대치를 나타내고 ethylene 생성량은 비교적 적은 수준이지만, 세포분열의 속도가 늦어지고 세포의 길이 생장이 주로 일어나는 시기에는 polyamine 함량이 감소하면서 ethylene 생성량이 최대치를 나타내어 polyamine 과 ethylene 생합성은 서로 역상관관계를 나타낸다 (Park, 1989). 또한 귀리의 잎 (Kaur-Sawhney *et al.*, 1982), 카네이션 꽃의 절편 (Roberts *et al.*, 1984) 및 감자의 괴경 (Mikitzel and Knowles, 1989)에서도 조직의 노화가 진행됨에 따라 spermidine 과 spermine 함량은 감소하지만 putrescine 이 축적되고 또한 ethylene 생성량이 증가하였다. 이러한 결과들은 세포의 생장 정도나 조직의 노화에 따라 polyamine 과 ethylene 생합성량이 상반되는 양상을 의미하지만, 각각의 생합성과 상호 생합성이 조절되는 기작이 무엇인지는 아직 알려져 있지 않다.

Mikitzel 과 Knowles (1989)에 의하면 감자의 괴경에서 spermidine 과 spermine 함량이 감소하고 putrescine 이

Table 8. Effect of putrescine and spermidine on the activity of SAMDC in tobacco suspension cells cultured for 4 and 10 days

Treatment	4 day-cultured cells	10 day-cultured cells
	(nmole ¹⁴ CO ₂ /h.mg protein)	
Control	6.6 (100)	3.7 (100)
Putrescine (0.1 mM)	8.6 (130)	4.6 (124)
Spermidine (0.1 mM)	4.6 (70)	2.1 (57)

The cultured cells were incubated in hormone-free B5 medium after addition of putrescine and spermidine at 26°C in darkness for 6 h. Percent control values are shown in parentheses.

증가한 이유는 spermidine synthase 와 spermine synthase 의 활성이 감소했거나 혹은 효소들의 de novo synthesis 가 감소했기 때문이라고 했다. 또한 polyamine 생합성에 유용될 수 있는 decarboxylated SAM 이 감소한 것도 원인이 될 것이라고 하였다. 그러나 감자의 괴경에서 노화가 진행되면 오히려 SAMDC 의 활성이 증가한다. 노화가 일어남에 따라 polyamine 합성효소들의 활성이 억제 될 것이라는 앞의 가설 측면에서 SAMDC 의 활성이 증가한 결과에 대해서는 설명을 제시하고 있지 못하는 것으로 보아, 위의 여러 가설 중 polyamine 생합성에 유용한 decarboxylated SAM 의 감소가 polyamine 생합성 조절에 더 중요한 요인이 될 수 있을 것이라 생각된다. 그리고 polyamine 생성경로로 유입되었던 decarboxylated SAM 이 노화가 진행됨에 따라 ethylene 생성경로로 유입되는 변환이 작용했을 가능성도 생각해 볼 수 있다.

외부에서 담배 배양세포에 polyamine 을 처리해 주면 ACC synthase 와 ethylene forming enzyme (EFE) 의 활성이 모두 억제되면서 SAM 에서 ACC 로의 전환과 ACC 에서 ethylene 으로의 전환이 모두 억제되었다 (Lee and Park, 1988). 그리고 polyamine 이 ethylene 생성을 저해하는 현상은 다른 많은 식물에서도 보고된 바 있다 (Even-Chen *et al.*, 1982; Apelbaum *et al.*, 1981; Suttle, 1981). 또한 완두의 유식물에서는 ethylene 에 의하여 ADC 와 SAMDC 의 활성이 억제되어 polyamine 생합성이 감소한다 (Apelbaum *et al.*, 1985; Ickson *et al.*, 1986). 그러나 담배 배양세포에서는 ethylene 처리에 의하여 polyamine 생합성이 억제되지 않았다 (Park, 1989) 그러므로 ethylene 이 polyamine 생합성에 미치는 영향은 더 많은 연구가 필요한 상황이지만 polyamine 이 ethylene 생합성을 억제하는 것은 일반적인 현상이다. 그러나, polyamine 과 ethylene 이 서로의 생합성을 억제하기 이전에, 생

장 정도에 따른 각각의 생합성량을 조절하는 요인이 우선 결정되어야 할 것이다. 그리고 이러한 조절이 선행된 상태에서 서로의 길항적인 조절이 작용할 수 있으며, 또한 그러한 조절효과가 증폭될 수도 있을 것이다.

[3,4-¹⁴C] methionine을 ethylene 합성억제물질과 함께 노화가 진행되는 오렌지의 과육외피절편에 처리하면 labeled spermidine의 양이 크게 증가하므로 (Even-Chen *et al.*, 1982) SAM으로부터의 polyamine 생합성에서 ethylene으로의 생합성으로 변환되는 조절기작은 SAM에 대한 대사적 경쟁성에 기인한다고 주장되고 있으며, Roberts 등(1984)과 Mikitzel과 Knowles(1989) 등에 의하여 보장되고 있다. 그러나 오이의 유식물과 사과 유식물에서는 stress에 의하여 ACC와 polyamine의 합성이 동시에 증가하였으므로 각각의 생합성 조절이 SAM level에서의 경쟁성에 의한 것은 아니며 (Wang, 1987; Wang and Steffens, 1985), 또한 Kushad 등(1988)도 이와 유사한 결과를 얻고 있다.

Ethylene 생합성 억제물질인 AOA에 의하여 ACC와 ethylene 생성이 감소되면, polyamine 합성이 증가하였고 (Table 3), 반대로 polyamine 합성억제물질인 MGBG, DCHA, DFMA, DFMO 등에 의해서 polyamine 합성이 감소하면, 동시에 ethylene 합성이 증가하였다 (Table 4-7 및 Fig. 2). 또한 SAM에 의하여 ethylene과 polyamine 생합성이 모두 증가한 것으로 보아 (Fig. 1, Table 1과 2) 세포내 SAM의 증가는 ethylene과 polyamine의 생합성 증가를 유발한 것이다. *Ipomoea nil*에서도 methionine이나 SAM을 첨가해주면 ethylene 생성이 증가하였다 (Koning, 1989). 이러한 결과들은 결국 식물생장의 어느 시기에서든지 polyamine과 ethylene 생성경로 사이에서 SAM의 대사적 경쟁성에 의거한 SAM의 유용성이 각각의 생합성을 좌우할 수 있다고 생각된다.

그러면 세포내 SAM의 유용성이 polyamine과 ethylene 생성경로 중 어느 경로로 더 많이 유입되도록 결정해주는 요인은 무엇인가? SAM을 처리했을 때 ethylene 생합성의 증가가 4일된 세포보다는 10일된 세포에서 더 효율적이었고 (Fig. 1), polyamine 특히 spermidine 함량의 증가는 10일된 세포보다는 4일된 세포에서 더 효율적이었으며, 또한 10일된 세포에서 나타난 증가효과는 일시적이었었다 (Table 1). 그리고 효소활성의 증가도 4일된 세포가 더 높았다 (Table 2). 그리고 MGBG와 DCHA 등에 의한 ethylene 생성의 증가는 10일된 세포에서 더 높았다 (Table 4, Fig. 2). 이러한 결과들은 polyamine과 ethylene의 생성능이 특히 SAM에서 polyamine으로의 전환 혹은 SAM에서 ethylene으로의 전환이 세포의 성장 정도에 따라 on-off switch에 의하여 조절되는 것이라고 생각된다. 그러나 생장이 활발할 때 polyamine 합성이 높고, 노화가 진행될 때 ethylene 합성이 높지만, polyamine이 활발한 생장의 원인인지 혹은 결과인지, 또한 ethylene이

노화의 원인인지 혹은 결과인지가 아직 불명확하기 때문에, 식물의 성장 정도에 따라 polyamine과 ethylene 생성능의 on-off switch 기작을 촉발하는 것이 무엇인가를 예상하기는 어렵지만, 아마도 유전자 발현과정에 따른 내재된 조절일 수도 있을 것이다.

어떤 내재된 요인이 on-off switch 기작에 작용함으로써 methionine에서부터 SAM을 경유한 polyamine 합성능이 촉진되면 SAM에 대한 경쟁성과 동시에 내생 polyamine에 의한 ethylene 생성억제에 의하여 ethylene 생성이 낮은 수준을 이루다가, SAM에서 ethylene 생성경로의 switch on이 이루어짐으로써 polyamine 생합성이 감소하고 동시에 내생 polyamine에 의한 ethylene 생성억제 효과도 소멸함으로써 ethylene 생합성의 증가가 증폭되어 많은 양의 ethylene이 생성되는 것이라고 제안해 볼 수 있다. 또한 polyamine 생합성에서는 putrescine이 SAMDC의 활성을 촉진하고, spermidine은 SAMDC의 활성을 억제하며 (Table 8), 식물과 동물의 여러 조직에서 polyamine 함량이 상보적 특성을 나타내므로 (Icekson *et al.*, 1986) SAM에서 polyamine으로의 전환과정에서 자체조절 기작도 관여할 것이라고 생각된다. Polyamine과 ethylene 생합성의 상호조절관계에 대한 규명은 식물의 발생, 분화, 성장 및 노화 등에 관한 polyamine의 역할 및 작용기작을 밝히는데 도움이 될 것이라고 생각한다.

적 요

담배 (*Nicotiana tabacum* L.)의 현탁배양 세포에서 polyamine과 ethylene 생합성의 공통의 전구물질인 S-adenosylmethionine (SAM)이 두 물질의 생합성 과정에서 나타내는 역할을 조사하였다.

외부에서 처리한 SAM은 세포분열이 활발한 4일된 세포와 노화가 진행되는 10일된 세포에서 모두 polyamine과 ethylene 생성을 증가시켰으며, ethylene 증가효과는 4일된 세포에서, polyamine 증가효과는 10일된 세포에서 각각 더 효율적이었다. Ethylene 생성경로를 차단시키는 aminoxyacetic acid는 polyamine 합성을 증가시켰으며, polyamine 생성경로를 차단시키는 methylglyoxal bis-(guanylhydrazine), dicyclohexylamine, α -difluoromethylarginine, α -difluoromethylornithine 등은 ethylene 생성을 증가시켰다. 그리고 putrescine은 SAMDC의 활성을 증가시켰으나, spermidine은 SAMDC의 활성을 억제시켰다. 이상의 결과로 polyamine과 ethylene 생합성의 조절에는 SAM에서 polyamine 혹은 ethylene으로 전환되는 SAM의 유용성에 의거한 대사적 경쟁성, polyamine과 ethylene 생성능에 관한 내재된 on-off switch 기작, 그리고 자체조절 기작이 관여한다고 생각된다.

사 사

본 논문은 1989-1991년도 과학재단 목적기초연구비로 수행된 연구결과의 일부이다. 이 연구에서 사용된 DFMA와 DFMO를 회사하여 준 Merrell Dow Research Center의 Dr. Peter McCann에게 감사한다.

참 고 문 헌

- Adams, D.O. and S.F. Yang. 1977. Methionine metabolism in apple tissue. Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* **60**: 892-896.
- Amino, S., T. Fujimura and A. Komamine. 1983. Synchrony induced by double phosphate starvation in a suspension culture of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Plant.* **59**: 393-396.
- Amrhein, N. and D. Wenker. 1979. Novel inhibitors of ethylene production in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **20**: 1635-1642.
- Apelbaum, A., A.C. Burgoon, J.D. Anderson, M. Lieberman, R. Ben-Arie and A.K. Mattoo. 1981. Polyamines inhibit biosynthesis of ethylene in higher-plant tissue and fruit protoplasts. *Plant Physiol.* **68**: 453-456.
- Aplebaum, A., A. Goldlust and I. Ickson. 1985. Control by ethylene of arginine decarboxylase activity in pea seedlings and its implication for hormonal regulation of plant growth. *Plant Physiol.* **79**: 635-640.
- Biondi, S., P. Torrigiani, A. Sansovini and N. Bagni. 1988. Inhibition of polyamine biosynthesis by dicyclohexylamine in cultured cotyledons of *Pinus radiata*. *Physiol. Plant.* **72**: 471-476.
- Cohen, E. and H. Kende. 1986. The effect of submergence, ethylene and gibberellin on polyamines and their biosynthetic enzymes in deep water-rice internodes. *Planta* **169**: 498-504.
- Evans, P.T. and R.L. Malmberg. 1989. Do polyamines have roles in plant development? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 235-269.
- Even-Chen, Z., A.K. Mattoo and R. Goren. 1982. Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunts label from 3,4-[¹⁴C]methionine into spermidine in aged orange peel discs. *Plant Physiol.* **69**: 385-388.
- Galston, A.W. 1983. Polyamines as modulators of plant development. *Bioscience* **33**: 382-388.
- Goren, R., N. Palavan, H. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes in polyamine titer in etiolated pea-seedlings following red-light treatment. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Ickson, I., M. Bakhanashvili and A. Aplebaum. 1986. Inhibition by ethylene of polyamine biosynthetic enzymes enhanced lysine decarboxylase activity and cadaverine accumulation in pea seedlings. *Plant Physiol.* **82**: 607-609.
- Kaur-Sawhney, R., L.M. Shih, H.E. Flores and A.W. Galston. 1982. Relation of polyamine synthesis and titer to aging and senescence in oat leaves. *Plant Physiol.* **69**: 405-410.
- Koning, R. 1989. Manipulations of the polyamine system in *Ipomoea nil* filaments. *Plant Physiol.* **89**(Suppl.): 682.
- Kushad, M.M., G. Yelenosky and R. Knight. 1988. Interrelationship of polyamine and ethylene biosynthesis during avocado fruit development and ripening. *Plant Physiol.* **87**: 463-467.
- Lee, S.H. and K.Y. Park. 1988. The mechanism of polyamines on ethylene biosynthesis in tobacco suspension cultures. *Korean J. Bot.* **31**: 267-275.
- Lizada, M.C. and S.F. Yang. 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **100**: 140-145.
- Mikitzel, L.J. and N.R. Knowles. 1989. Polyamine metabolism of potato seed-tubers during long-term storage and early sprout development. *Plant Physiol.* **91**: 183-189.
- Miyazaki, J.H. and S.F. Yang. 1987. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol. Plant.* **69**: 366-370.
- Papazafiri, P. and H.B. Osborne. 1987. Effect of α -difluoromethylornithine on DNA methylation in murine erythro-leukaemic cells. *Biochem. J.* **242**: 479-483.
- Park, K.Y. 1989. Regulation of polyamine biosynthesis in suspension-cultured tobacco cells. Ph.D. thesis. Yonsei Univ., Seoul, 140 pp.
- Roberts, D.R., M.A. Walker, J.E. Thompson and E.B. Dumbroff. 1984. The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant Cell Physiol.* **25**: 315-322.
- Sjoerdsma, A. 1981. Suicide enzyme inhibitors as potential drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **30**: 3-22.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Suttle, J.C. 1981. Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* **20**: 1477-1480.
- Suzuki, Y. and E. Hirasawa. 1980. S-adenosylmethionine decarboxylase of corn seedlings. *Plant Physiol.* **66**: 1091-1094.
- Tabor, C.W. and H. Tabor. 1984. Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.
- Wang, S.Y. 1987. Changes of polyamines and ethylene in cucumber seedlings in response to chilling stress. *Physiol. Plant.* **69**: 253-257.
- Wang, S.Y. and G.L. Steffens. 1985. Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and poly-

- amine accumulation in apple seedling leaves. *Phytochemistry* **24**: 2185-2190.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 155-189.
- Yu, Y.B. and S.F. Yang. 1979. Auxin-induced ethylene production and its inhibition by aminoethoxyvinylglycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* **64**: 1074-1077.

(1990. 2. 27 接受)