

## *Nostoc muscorum*과 혼합배양한 담배 배양세포의 아미노산 함량 변화

鄭賢淑·康榮熹

(조선대학교 유전공학과, 연세대학교 생물학과)

### Changes of Amino Acid Content of Cultured Tobacco Cells by Association Culture with *Nostoc muscorum*

Cheong, Hyeon Sook and Young Hee Kang

(Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju and

Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

#### ABSTRACT

Induction of symbiosis between *N. muscorum* and cultured tobacco cells associately cultured on nitrogen-free medium and effects of polyamines on culture condition were carried out. Analysis of amino acid composition in associate cultures showed increase in total amino acid amounts than single culture of cultured tobacco cells and methionine was markedly increased in associative culture on N-free medium treated with 1 mM spermine. These results indicated that the composition of amino acids increased effectively in associative cultures by nitrogen fixation of *N. muscorum*.

#### 서 론

최근 식물의 공중 질소고정능을 증가시키거나(Sutherland *et al.*, 1985; Kawai and Yamamoto, 1986), 이 같은 질소고정능을 개발시키는 것은 간접적으로 태양광선의 에너지를 이용하여 고정된 질소를 식물체에 공급할 수 있으므로 실험실에서 집중적으로 연구가 이루어지고 있다(Yoch and Whitwing, 1986; Meek *et al.*, 1985; Shearer *et al.*, 1982; Skill and Smith, 1987; Rai and Raizawa, 1988). 한편, 남조류는 비교적 용이하게 고등식물과 공생관계를 유지하며, 혼합배양시에도 고등식물체가 질소원으로 이용 가능성이 있다고 보고되었다(Gusev *et al.*, 1986).

한편, 사상형 남조류의 경우 질소원을 첨가하지 않은 배지에서 질소고정능을 갖는 heterocyst가 형성되며(Fleming and Haselkorn, 1973; Murry *et al.*, 1983) 특히 *N. muscorum*은 무질소배지로 옮긴 후 24시간 이내에 heterocyst가 형성되어 nitrogenase 활성이 증가된다(Cheong *et al.*, 1986, 1987). 그리고 무질소배지에서 식물 배양세포와 *N. muscorum*을 혼합배양하였을 때 이들의 배양조건을 증

진시키는데, polyamine이 좋은 효과가 있음을 이미 보고(Cheong *et al.*, 1986, 1987; Cheong, 1990)한 바 있다. Igarashi 등(1981)은 polyamine의 주된 작용이 단백질 합성을 촉진시키는 것이며, 기내(*in vitro*)에서 핵산의 이중 나선과 상호작용하여 DNA와 RNA의 합성을 촉진시킨다는 보고를 한 바 있다. 그리고 Cyanobacteria의 단백질 조성 아미노산 함량을 몇 가지 종에서 비교 분석한 보고(Bergman, 1986)가 있으며, 이에 따라 질소 대사에 관여하는 아미노산을 조사함으로써 효소의 조절 기구의 변화를 알 수 있다고 하였다(Sakano and Tazawa, 1984; Kamada and Harada, 1984; Bagchi *et al.*, 1987).

전 보(Cheong, 1990)에서는 *N. muscorum*과 담배 배양세포의 공생유도에 따른 질소대사에 관여하는 효소활성을 조사하였을 때 polyamine 처리구에서 대부분의 활성이 높았음을 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 담배 배양세포를 *N. muscorum*과 혼합배양하였을 때 단백질 조성 아미노산의 함량 변화와 polyamine의 영향을 알아보고자 하였으며, 공생유도에 의한 아미노산 조성의 변화를 비교하였다.

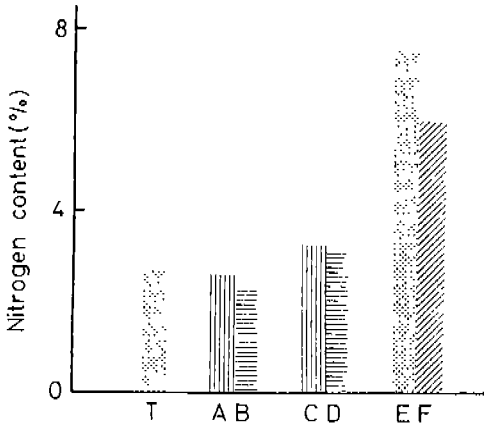


Fig. 1. Nitrogen contents by micro-Kjeldhal method. T, Cultured tobacco cells; A, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free media; B, Cultured tobacco cells in N-free media; C, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free media containing spermine.  $10^{-3}$  M; D, Cultured tobacco cells in N-free media containing spermine.  $10^{-3}$  M; E, *N. muscorum*; F, *N. muscorum* in N-free media.

재료 및 방법

**담배 배양세포와 *N. muscorum*의 혼합배양.** 담배 배양세포 및 *N. muscorum* 배양은 Cheong 등((1986)의 방법에 따라 시행하였고, 혼합배양은 활성이 좋은 담배 배양세포를 polyamine을 농도별로 처리한 무질소배지에 옮긴 다음 여기에 무질소 Arnon 배지에서 배양하여 heterocyst가 형성된 *N. muscorum*을 혼합배양 하였다. 이 때 현탁배양한 *N. muscorum*을  $10,000\times$ 에서 10분간 원심분리하여 모은 후 각 실험구에 담배 배양세포 0.5g(f.w.)과 0.1g(f.w.)의 *N. muscorum*을 접종하였다. 혼합배양에 사용한 배지는 1-B5 배지에서  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 를 제외시키고  $\text{KNO}_3$ 를 19.3 mM의 KCl로 대체시켰으며, sucrose는 1%로 농도를 낮추어서 사용하였다. 혼합배양한 세포는  $818 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$  ( $16:8$ )  $27\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 배양하면서 2주 간격으로 같은 조성의 배지에 계대배양하여 동일조건을 유지하면서 60일간 향온실에서 배양하였다.

**질소정량.** 질소의 정량은 micro-Kjeldhal법을 변형하여(Williams, 1951) 사용하였으며, 시료는  $105^\circ\text{C}$  건조기에서 2시간 동안 건조시킨 다음 150 mg을 취하여  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 ml를 넣고 여기에 분해 촉진제로, 1:9(w/w) 비율로 섞은  $\text{CuSO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{SO}_4$ 를 1.22g 첨가시켜 분해시킨 다음 50 ml로 희석시켜서 증류하였으며, 0.1 N NaOH로 적정하여 총 질소량을 정량하였다. 단, 혼합배양 세포는 표면의 *N. muscorum*을 제거하고 여러번 냉각수로 세척한 다음 시료로 사

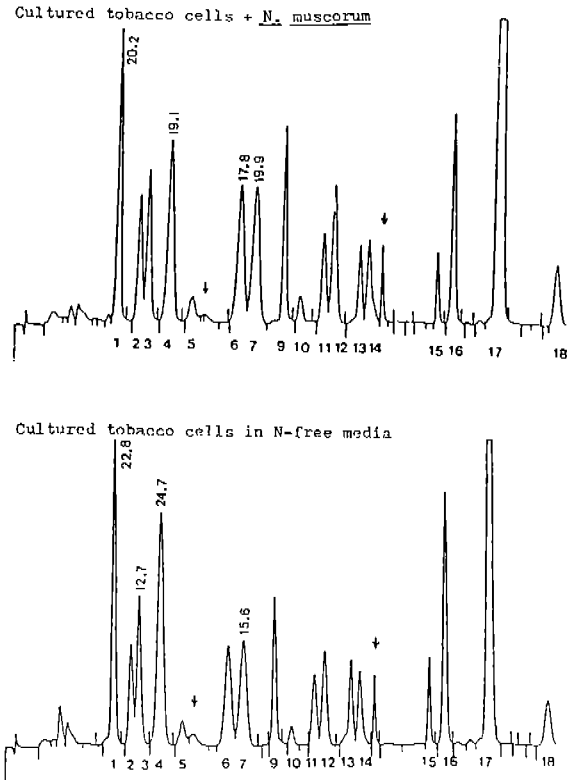


Fig. 2. Chromatogram of amino acid composition in cultured tobacco cells and association culture with *N. muscorum*.

용하였으며, 현탁배양한 *N. muscorum*은  $10,000\times$ 에서 10분간 원심분리하여 시료로 사용하였다.

**아미노산 조성.** 단백질 3 mg에 해당하는 건조시료를 경질 시험관에 취하고 2-mercaptoethanol이 0.04% 함유된 6N HCl 10 ml을 넣고  $\text{N}_2$  gas로 5분 동안 충전시켜 탈기한 후 밀봉하여  $110^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 가수분해하여 농축시켰다. 다음으로 sodium citrate 완충용액(pH 2.2) 4 ml에 용해한 후 0.2  $\mu\text{m}$  millipore filter로 여과하여 40  $\mu\text{l}$  취해서 ion exchange chromatography에 의한 아미노산 분석기(LKB 4151 ALPHA PLAS)로 정량하였다. 이 때 정량 표준시료는 LKB에서 광급된 것을 사용하여 5  $\mu\text{M}$ 당 18가지 amino acids 2.5  $\mu\text{mole}$ 을 sodium citrate 완충용액으로 1:9 비율로 15 nmole을 60  $\mu\text{l}$ , 10 nmole을 40  $\mu\text{l}$ 씩 취한 것을 분석하여 미지 시료 정량에 비교하였다.

결과 및 고찰

단백질 조성 아미노산 함량의 변화를 알아보기 전에 동일한 시료의 질소 함량을 조사하여 일정량의 단백질당

Table 1. Amino acid composition of cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media and N-free 1-B5 media containing  $10^{-3}$  M spermine ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein)

No	Amino acids	Tobacco <sup>a</sup>	<i>N. muscorum</i> <sup>b</sup>	Differentiated <sup>c</sup> <i>N. muscorum</i>	T in N-free <sup>d</sup> media
1	DL-Aspartic acid	77.3	91.2	102.3	101.3
2	L-Threonine	26.3	47.0	48.3	34.3
3	DL-Serine	36.8	42.0	44.6	46.4
4	L-Glutamic acid	104.0	104.3	108.7	120.9
5	L-Proline	31.3	31.7	34.4	39.4
6	Glycine	26.0	43.4	46.7	32.6
7	DL-Alanine	51.3	71.0	75.5	46.5
8	L-Cystine	—	—	—	—
9	DL-Valine	31.0	50.3	50.3	41.1
10	DL-Methionine	5.6	13.4	16.4	7.1
11	L-Isoleucine	23.6	47.1	46.8	29.9
12	L-Leucine	33.1	81.5	83.7	44.9
13	DL-Tyrosine	29.6	32.4	42.5	47.5
14	DL-Phenylalanine	26.6	49.3	51.5	37.7
15	L-Histidine	17.5	13.7	14.7	21.9
16	DL-Lysine	46.3	46.2	44.0	68.8
17	Ammonia	106.1	20.9	16.6	62.3
18	L-Arginine	26.2	61.5	70.7	41.3
Total amino acids		698.6	846.9	897.7	823.9

No	Amino acids	T+N in N-free <sup>e</sup> media	T in N-free media <sup>f</sup> containing Spm. $10^{-3}$	T+N in N-free media <sup>g</sup> containing Spm. $10^{-3}$
1	DL-Aspartic acid	89.7	71.3	86.8
2	L-Threonine	42.9	28.5	37.8
3	DL-Serine	46.9	38.1	40.1
4	L-Glutamic acid	93.9	76.9	83.4
5	L-Proline	40.6	33.5	36.8
6	Glycine	44.6	28.7	38.6
7	DL-Alanine	59.0	38.5	52.6
8	L-Cystine	—	—	—
9	DL-Valine	55.4	37.8	45.8
10	DL-Methionine	10.8	5.9	10.8
11	L-Isoleucine	38.2	27.2	35.1
12	L-Leucine	64.6	41.7	55.5
13	DL-Tyrosine	43.3	32.6	37.4
14	DL-Phenylalanine	48.0	31.2	40.0
15	L-Histidine	17.1	17.1	15.3
16	DL-Lysine	57.2	53.9	54.4
17	Ammonia	109.4	62.8	23.6
18	L-Arginine	48.8	29.9	41.5
Total amino acids		910.4	655.6	735.3

<sup>a</sup>, Cultured tobacco cells in 1-B5 media; <sup>b</sup>, *N. muscorum* cultured in Arnon media for 90 days; <sup>c</sup>, Differentiated *N. muscorum* cultured in N-free Arnon media for 90 days; <sup>d</sup>, Cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media for 60 days; <sup>e</sup>, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media for 60 days; <sup>f</sup>, Cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing  $10^{-3}$  M spermine for 60 days; <sup>g</sup>, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media containing  $10^{-3}$  M spermine for 60 days.

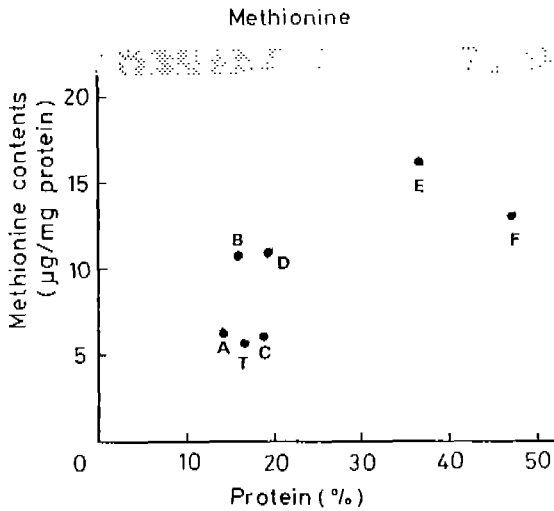


Fig. 3. Relationship between methionine and protein contents of cultured tobacco cells associated with *N. muscorum*. T, Cultured tobacco cells in 1-B5 media; A, Cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media; B, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media; C, Cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing spermine  $10^{-3}$  M; D, Cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media containing spermine  $10^{-3}$  M; E, Differentiated *N. muscorum* cultured for 90 days in N-free Arnon media; F, *N. muscorum* cultured for 90 days in Arnon media

아미노산 조성을 분석하였다.

Fig. 1은 micro-Kjeldhal 방법에 의한 총 질소함량을 나타낸 것이다. 정상적인 담배 배양세포를 대조구로 하면 무질소배지에서 담배 배양세포를 단독 배양했을 때 대조구에 비해 감소되었던 질소함량이 *N. muscorum*과의 혼합배양시 대조구와 거의 비슷하게 회복되었으며,  $10^{-3}$  M spermine을 포함한 배지에서 배양한 세포에서의 질소함량은 대조구에 비해 단독배양시는 약 10%, 혼합배양시는 약 18% 증가하였다. *N. muscorum*의 질소함량은 약 7.5%로 상당히 높게 나타났으나, 분화된 *N. muscorum*에서는 약 5.8%로 질소함량이 낮았다. 또한 micro-Kjeldhal법으로 측정된 총단백질 함량(Fig. 1)은 *N. muscorum*의 경우 Lowry 등의 방법에 의한 단백질 함량(Cheong, 1990)과 비교할 때 훨씬 증가하였는데, 이는 가용성 단백질이 배양세포보다는 적다는 것을 알 수 있다. Fig. 2는 무질소배지에서 담배 배양세포를 단독배양한 것과 *N. muscorum*과 혼합배양한 것의 아미노산 조성에 대한 chromatogram으로 혼합배양에서는 암모니아 함량이 많았으며, 단독배양의 경우에는 산성 아미노산 peak가 더 크게 나타났다. 프롤린과 글리신, 페닐알라닌과 히스티딘 사이에 몇개의 미확인된 peak를

찾아 볼 수 있었다. 이와 같이 chromatogram 상에 나타난 각각의 단백질 조성 아미노산의 함량변화를 총단백질 mg당 아미노산의 함량을  $\mu\text{g}$ 으로 나타냈을 때 *N. muscorum*은 분화되지 않았을 때나 heterocyst가 분화된 후의 총 아미노산 함량이 담배 배양세포보다 원등하게 높았다(Table 1). 이러한 결과는 Hayes 등(1986)이 *Anabaena*를 분화시켰을 때 분화되지 않는 일반세포의 아미노산 함량보다 높다고 보고한 것과 비슷한 경향임을 알 수 있다. Arnon 배지에서 배양한 *N. muscorum*은 정상적인 담배 배양세포와 비교할 때 단백질 조성 아미노산의 총량은 약 20% 정도 높았으며, 트레오닌, 발린, 루아신, 알기닌 등의 함량이 훨씬 높았다. Heterocyst 형성 후 산성 아미노산인 아스파라긴산은 약 12%, 글루타민산은 약 4% 증가했으며, 중성 아미노산인 티로신은 31%, 염기성 아미노산인 알기닌은 약 14% 증가했고, 총 아미노산 함량은 약 6% 증가했다.

그리고 정상적인 담배 배양세포를 대조구로 하여 무질소 배지에서 혼합배양한 세포의 아미노산 조성을 단백질 mg당  $\mu\text{g}$ 으로 나타냈을 때 대부분의 아미노산 함량은 혼합배양시 높게 나타났으나, 아스파라긴과 글루타민산의 양은 단독 배양한 담배 배양세포에서 현저하게 증가하였으며, 알기닌은 대조구에 비해 단독배양시 약 59% 증가하였다. 그리고 혼합배양시는 약 86% 증가하였다. 그리고 무질소 배지에서 단독 배양하였을 때는 대조구에 비해 단백질 mg당 총 아미노산의 함량이 약 18%, 혼합배양시는 약 30% 증가하였다. 이는 *N. muscorum*이 고정한 질소원이 혼합 배양한 담배 배양세포의 아미노산 함량을 증가시키는 것으로 사료된다. 또한 무질소배지에 polyimine을 첨가하여 담배 배양세포의 단독배양 또는 *N. muscorum*과 혼합배양시 단백질 함량이 증가하므로(Cheong *et al.*, 1987)  $10^{-3}$  M spermine 처리구에서 단백질 조성 아미노산의 함량을 비교해 본 결과 정상적인 담배 배양세포의 아미노산 함량보다  $10^{-3}$  M spermine 첨가한 무질소 1-B5 배지에서 *N. muscorum*과 혼합배양한 담배 배양세포의 글루타민산과 암모니아 함량이 현저하게 감소한 것을 제외하고는 대부분의 아미노산 함량이 높아졌으며, 특히 메티오닌 등이 약 2배로 현저하게 증가하였다.

Fig. 3은 제 1 제한 아미노산인 메티오닌과 단백질과의 관계를 나타낸 것으로 *N. muscorum*의 메티오닌 함량은 분화되지 않은 일반세포에서 분화된 것에 비해 약 22% 낮았다.

한편 담배 배양세포를 단독배양한 경우에 비해 *N. muscorum*과 혼합배양하였을 때 메티오닌 함량이 높게 나타났으며,  $10^{-3}$  M spermine이 첨가된 무질소 배지에서도 단독배양보다 혼합배양하였을 때 더 높은 함량을 나타냈다. 또한 이러한 결과는 고정된 질소가 질적으로 우수한 아미노산의 공급원으로 이용 가능하리라고 사료된다.

## 적 요

질소고정능이 있는 *N. muscorum*과 담배 배양세포의 혼합배양시 질소원을 제거한 배지에 polyamine을 첨가하여 배양조건을 개선하였다. 그리고, 단백질 조성 아미노산을 조사하여 *N. muscorum*과 혼합배양하여 담배 배양세포의 아미노산 함량변화를 조사한 결과 총 아미노산 및 메티오닌의 함량이 상당히 증가하는 것으로 나타났다. 특히  $10^{-3}$  M spermine을 처리한 배지에 혼합배양한 세포에서 메티오닌 등이 현저하게 증가하였으며, *N. muscorum*의 질소고정으로 혼합배양한 담배 배양세포의 단백질 조성 아미노산이 상당히 증가되었다.

## 참 고 문 헌

- Bergman, B. 1986. Glyoxylate induced changes in the carbon and nitrogen metabolism of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiol.* **80**: 698-701.
- Bagchi, S.N., Kaloya, P. and P.S. Bison. 1987. Effect of cyanophage N-1 infection on the synthesis and stability of *Nostoc muscorum* Nitrate reductase. *Current Microbiology*. Vol. 15. No. 2
- Cheong, H.S., C.M. Kim and Y.H. Kang. 1986. Induction of symbiosis between *Nostoc muscorum* and cultured plant cells. I. Effects of polymine on the association of *N. muscorum* with tobacco and soybean cultured cells. *Korean J. Bot.* **29**: 67-75.
- Cheong, H.S., B. Hwang and Y.H. Kang. 1987. Induction of symbiosis between *Nostoc muscorum* and cultured plant cells. II. Changes of nitrogen fixation ability and morphology by association of *N. muscorum* with cultured tobacco cells. *Korean J. Bot.* **30**: 257-266.
- Cheong, H.S. 1990. Changes of enzyme activity in nitrogen metabolism on induced association of *N. muscorum* with cultured tobacco cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **5**: 151-158.
- Fleming, H. and R. Haselkorn. 1973. Differentiation in *Nostoc muscorum*: Nitrogenase synthesized in heterocysts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **20**: 2727-2731.
- Gausev, M.V., T.G. Korzhenevskaya, L.V. Pyvovarova, O.I. Baulina and G. Butenko. 1986. Induction of a nitrogen-fixing cyanobacterium into tobacco shoot regenerates. *Planta* **16**: 1-8.
- Igarashi, K., K. Kashiwage, T. Kakegawa, R. Aoki and N. Hirose. 1981. Increase of degree of spermidine stimulation of polypeptide synthesis in the presence of phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* **207**: 128-134.
- Kamada, H. and H. Harada. 1984. Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant Cell Physiol.* **25**: 27-38.
- Kawai, Y. and M. Yamamoto. 1986. Increase in the formation and nitrogen fixation of soybean nodules by vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Plant Cell Physiol.* **27**: 399-405.
- Meeks, J.C., C.S. Enderline, C.M. Joseph, J.S. Chapman and M.W.L. Lollar. 1985. Fixation of [ $^{15}$ N]  $N_2$  and transfer of fixed nitrogen in the *Anthoceros Nostoc* symbiotic association. *Planta* **164**: 405-414.
- Murry, M.A., D.B. Jenson and J.R. Benemann. 1983. Role of ammonia in regulation of nitrogenase synthesis and activity in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Acta* **756**: 13-19.
- Rai, L.C. and M. Raizada. 1988. Impact of chromium and lead on the *N. muscorum*: Regulation of toxicity by ascorbic acid glutathion and sulfur-containing amino acid. *J. Gen. Virol.* **69**: 115-119.
- Sakano, K. and M. Tazawa. 1984. Intracellular distribution of free amino acids between the vacuolar and extracellular compartments in internodal cells of *Chara australis*. *Plant Cell Physiol.* **25**: 1477-1486.
- Shearer, G.L. Fledman, B.A. Bryan, J.L. Skeeters, D.H. Kohl, N. Amarger, F. Mariottii and A. Mariotti. 1982.  $^{15}$ N Abundance of nodules as an indicator of N metabolism in  $N_2$ -fixing plants. *Plant Physiol.* **70**: 465-468.
- Skill, S.C. and R.J. Smith. 1987. Synchronous akinete germination and heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7937 *Nostoc* PCC 6720. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 299-303.
- Sutherland, J.M., J. Reaston, W.D.P. Stewart, and M. Herdman, 1985. A kinetics of cyanobacterium *Nostoc* PCC 7524: macromolecular and biochemical changes during synchronous germination *J. Gen. Microbiol.* **131**: 28 55-2863.
- Yoch, D.C. and G.J. Whiting. 1986. Evidence of  $NH_4^+$  switch-off regulation of nitrogenase activity by bacteria in salt marsh sediments and root the grass *Spartina alterniflora*. *Appl. Env. Microbiol.* **51**: 143-149.
- Williams, A.E. and R.H. Burris. 1951. Nitrogen fixation by blue-green algae and their nitrogenase composition. *In*, Research of Wisconsin Agricultural Experiment. pp. 340-343.

(1990. 11. 5 接受)