

자엽을 제거한 대두 유식물에서 Polyamine과 Methylglyoxal bis(guanylhyazone)가 Diamine Oxidase의 활성에 미치는 영향

康政勳* · 趙暎東
(延世大學校 理科學 生化學科)

Effects of Polyamines and Methylglyoxal bis(guanylhyazone) on Activity of Diamine Oxidase in Soybean (*Glycine max*) Seedlings without Cotyledons

Kang, Jung Hoon* and Young Dong Cho
(Department of Biochemistry, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

The effect of polyamines and methylglyoxal bis(guanylhyazone)(MGBG) on the activity of diamine oxidase was studied in soybean (*Glycine max*) seedlings. 10^{-2} M of putrescine, spermidine, and spermine inhibited diamine oxidase activity, whereas 10^{-6} M putrescine increased enzyme activity. These results suggest that diamine oxidase can be induced by a specific substrate, putrescine. The content of putrescine was increased in response to the increase in concentration of MGBG. *In vitro*, 40% of the diamine oxidase activity was inhibited by 10^{-3} M MGBG. *In vivo*, the diamine oxidase activity was increased by a low concentration of MGBG. It was suggested that MGBG inhibited the formation of spermidine and that the accumulated putrescine induced diamine oxidase, whereas the diamine oxidase activity was inhibited by a high concentration of MGBG. It is suggested that a high concentration of MGBG increases the putrescine content by inhibiting diamine oxidase activity which is responsible for putrescine degradation.

서 론

Polyamine은 동물, 식물 및 미생물에서 발견되는 물질로 세포 대사의 중요한 조절역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Tabor and Tabor, 1984). Polyamine 류에 속하는 물질에는 주로 putrescine, spermidine과, spermine이 있으며, 생리적 pH에서 polycation으로 존재하여 세포내의 다양한 음이온적 생체계의 구조, 특성, 기능에 영향을 미친다고 알려져 있다(Smith, 1985). 예를들면, polyamine은 핵산의 phosphate group과 결합함으로써 핵산의 2차, 3차 구조에

영향을 미친다. Polyamine은 특히 핵산 중에서 GC가 많은 DNA 및 여러 가지 RNA와 화합한다고 보고 되었으며(Igarashi *et al.*, 1982) polypeptide 합성을 촉진시킨다고 알려졌다(Igarashi *et al.*, 1978).

또한 polyamine은 생체막과도 화합한다. 예를들어, spermine은 thylakoid membrane과 결합하여 membrane을 안정화시킨다고 보고되었다(Popovic *et al.*, 1979). 이밖에 β -glucan synthetase, β -1,4-endoglucanase 등의 효소 활성을 증가시킨다고 보고된 바 있다(Cho *et al.*, 1985, 1988).

Smith(1982)는 putrescine이 귀리 등 고등식물의 성장을 촉진시킨다고 보고하였다. Huhtinen 등(1982)은 ornithine과 putrescine은 *Alnus glutinosa*와 *A. incana*와 mesophyll protoplast에서 세포분열을 촉진하지만, spermidine과 spermine은 세포성장을 촉진하기 보다는 오히려

본 연구는 한국과학재단 연구비(880510)로 수행된 것임.

*원소속: 청주대학교 유전공학과

특성을 나타낸다고 보고하였다. Bagni 등(1983)은 일반적으로 식물체에서 polyamine의 농도는 활발하게 성장하는 조직에서 높다고 보고하였다.

이와 같은 생체내의 polyamine의 농도는 합성효소와 분해효소에 의해 영향을 받는데, polyamine을 분해하는 효소에는 putrescine을 분해하는 diamine oxidase와 spermidine, spermine을 분해하는 polyamine oxidase가 존재한다. 이 효소는 목초류에 널리 존재하며, 특히 옥수수의 도관(Smith, 1970), 귀리의 기공, 세포벽(Kaur-Sawhney *et al.*, 1981)에서 높은 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다. Hill(1971)은 처음으로 완두 묘목에서 diamine oxidase를 순수하게 정제하여 이 효소가 구리 이온을 포함하는 효소임을 보고하였다. 또한 Yanagisawa 등(1981)은 완두 상배측에서 diamine oxidase가 총 단백질의 3%를 차지한다고 보고하였다. Diamine oxidase는 putrescine 뿐 아니라 cadaverine, spermidine과 spermine도 분해하기 때문에 세포내의 polyamine 농도를 조절한다고 보고된 바 있으며 (Smith, 1985; Federico and Angelini, 1986) Sarivastava 등(1977)은 완두자엽에서 diamine oxidase가 putrescine과 spermidine에 의해 유도된다고 보고하였다. 이밖에 이 효소는 IAA의 합성경로에 작용하여 tryptamine을 IAA로 전환시키는데 관여한다는 보고도 있다(Srivastava *et al.*, 1977).

한편, methylglyoxal bis(guanylhydrazone)(MGBG)는 옥수수 유식물에서 spermidine과 spermine 합성에 필요한 decarboxylated s-adenosylmethionine을 형성하는 효소인 s-adenosylmethionine decarboxylase(SAMDC)의 억제제로 알려져 있을 뿐 아니라(Smith, 1985; Suzuki and Hirasawa, 1980), 완두의 상배측에서 putrescine을 분해하는 diamine oxidase의 억제제로도 알려져 있다(Yanagisawa *et al.*, 1981). MGBG는 식물 종양의 성장을 억제하며 이와 같은 현상은 spermidine에 의해 다시 회복된다는 보고가 있으며(Galsky and Kulpa, 1983), 녹두의 뿌리 형성을 방해하고 뿌리 형성의 초기 단계에서 polyamine을 증가시킨다는 보고도 있다(Jarvis *et al.*, 1983). 그러나 상기한 억제제가 putrescine의 함량에 미치는 영향과 합성 또는 분해효소의 활성에 미치는 영향과의 상호 관련성 여부에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 대두 유식물에서 putrescine 분해효소인 diamine oxidase의 활성을 성장과정 동안 관찰하고 diamine oxidase의 기질로 작용하는 polyamine을 처리하여 기질에 의한 효소의 유도를 관찰하고자 하였다. 또한 polyamine의 합성과 분해효소의 활성을 억제하는 MGBG가 putrescine의 농도와 diamine oxidase의 활성에 미치는 영향을 관찰하고 상호 관련성 여부를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험식물. 대두의 재배는 Kang과 Cho(1990)의 방법을 사용하였다. 대두(*Glycine max*)를 증류수로 세척한 후 상온에서 증류수에 24시간 담아두었다. 이렇게 처리한 대두를 네 겹의 가제로 덮은 재배 용기에 옮기고 20°C의 암소에서 발아시켰다. 일정 기간별로 성장시킨 대두의 자엽을 제거한 유식물을 구분하여 실험에 사용하였다.

Polyamine 및 MGBG 처리. 4.5일간 성장시킨 대두를 수확하여 자엽을 제거한 유식물을 얻었다. 5 mM potassium phosphate(pH 5.5), 0.1% Tween80에 polyamine 또는 MGBG를 각 농도별로 넣어준 100 ml 용액에 자엽을 제거한 유식물 10 g을 넣고 20°C에서 9-12시간 동안 서서히 흔들며 주면서 배양하였다. 처리용액은 putrescine, spermidine, spermine을 각각 최종 농도가 10^{-6} M, 10^{-4} M, 10^{-2} M되게 하였고, MGBG는 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M되게 하였다.

Polyamine 추출 및 정량. Polyamine 추출 및 정량은 Goren 등(1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 측정하고자 하는 실험체로 0.2 g에 5% perchloric acid 1 ml를 가하여 막자사발을 이용하여 마쇄하였다. 마쇄용액을 12,000 × g로 20분간 원심분리하여 그 상층액을 시료원으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4°C에서 수행하였다. 정량은 시료원 200 μl와 포화된 Na₂CO₃ 200 μl를 첨가한 후 잘 섞어 상온에서 12시간 이상 암처리하여 dansylation 시켰다. 반응한 시료에 100 μl proline(100 mg/ml)을 첨가하여 상온에서 30분간 암처리한 후 반응하지 않은 dansylchloride를 제거하였다. Dansylpolyamine은 300 μl 벤젠으로 추출하여 이 중 200 μl를 silica gel 60 plate에 점적하였다. 전개는 chloroform: triethylamine(25 : 2 v/v)로 구성된 전개용매로 수행하였다.

Plate에 나타난 dansylpolyamine band를 자외선에서 포준 시료와 비교하여 끊어낸 후 ethylacetate로 용출시켜 excitation: 360 nm, emission: 500 nm로 형광강도를 측정하였다.

Diamine oxidase의 제조. Diamine oxidase는 Smith(1983)의 방법을 변형하여 추출하였다. 조직에 50 mM potassium phosphate (pH 6.5)의 완충용액을 가한 후 막자사발을 사용하여 마쇄하였다. 마쇄용액은 네 겹의 가제로 거른 후 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 그 상층액을 효소원으로 사용하였다. 모든 과정은 4°C에서 수행하였다.

Diamine oxidase의 정제. Diamine oxidase의 정제는 Kang과 Cho(1989)의 방법에 따라 정제하였다.

Diamine oxidase의 활성 측정. Diamine oxidase의 활성은 Smith(1983)의 방법을 변형하여 측정하였으며, pu-

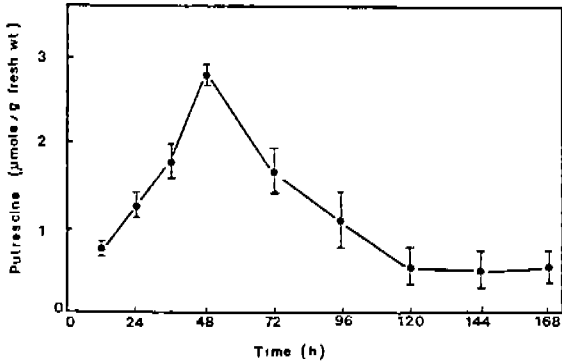


Fig. 1. Change in putrescine content in the soybean seedlings without cotyledons as a function of seed germination.

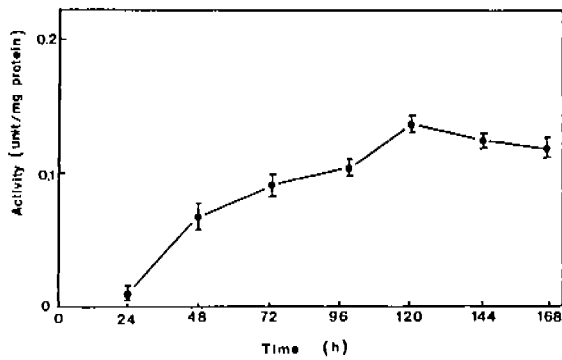


Fig. 2. Change in diamine oxidase activity in the soybean seedlings without cotyledons as a function of seed germination.

Putrescine을 기질로 사용하여 효소에 의하여 방출된 H₂O₂가 peroxidase에 의하여 guaiacol이 tetraguaiacol로 산화되는 정도를 470 nm에서 흡광도의 증가로 측정하였다. 효소 반응액은 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.5)과 20 mM guaiacol 및 5 unit peroxidase와 효소액을 포함하여 0.95 ml이 되게 하였다.

효소의 반응은 100 mM putrescine 50 µl를 가하여 시작하였다. 효소의 1 unit는 470 nm에서 1분 동안 흡광도를 1.0 변하게 하는 효소의 양으로 정하였다.

단백질 정량. 본 실험의 모든 단계의 단백질은 모두 Lowry(1951) 방법으로 정량하였고, 소의 혈청단백질을 표준 단백질로 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

대두 성장과정 동안 putrescine의 함량과 diamine oxidase의 활성 변화. 대두(*Glycine max*)의 성장과정 동안

Table 1. Effect of polyamine on diamine oxidase activity in soybean seedlings without cotyledons

Polyamine	Cone.(M)	Diamine oxidase
Control		100
Putrescine	10 ⁻⁶	156
	10 ⁻⁴	103
	10 ⁻²	22
Spermidine	10 ⁻⁶	85
	10 ⁻⁴	79
	10 ⁻²	25
Spermine	10 ⁻⁶	105
	10 ⁻⁴	54
	10 ⁻²	20

Various concentrations of polyamine were treated with excised soybean seedlings without cotyledons. Enzyme activities were measured 9 h after polyamine treatment.

안, 자엽을 제거한 유식물에서 putrescine의 함량은 발아를 시작한 후 48시간만에 최고의 함량을 나타냈으며, 시간이 경과함에 따라 감소하여 120시간 이후에는 일정 수준을 유지하였다(Fig. 1). 한편, putrescine 분해효소인 diamine oxidase의 활성은 발아 시작 후 증가하여 120 시간에서 최고의 활성을 볼 수 있었으며, 시간이 경과함에 따라 거의 같은 수준을 유지하였다(Fig. 2). 이같은 결과로 보아 발아 초기에는 putrescine 함량이 높으나 시간이 경과함에 따라 감소하고, 또한 이 시기에 putrescine 분해효소인 diamine oxidase의 활성이 높게 나타나므로, 이 효소가 생체내 putrescine의 함량조절에 관여할 것으로 사료된다.

Polyamine이 diamine oxidase의 활성에 미치는 영향.

4-5일간 성장시킨 대두(*Glycine max*)의 자엽을 제거한 유식물에 polyamine을 농도별로 처리한 후 diamine oxidase의 활성변화를 관찰한 결과 10⁻² M의 putrescine, spermidine 그리고 spermine을 처리해주었을 때에 모두 약 80% 억제효과를 나타냈는데 이는 과량의 polyamine 처리에 의한 독성현상이 아닌가 사료된다. 반면 10⁻⁶ M의 putrescine을 처리해주면 diamine oxidase의 활성이 증가하는 것으로 관찰되었는데(Table 1), 이는 기질에 의해 효소가 유도된다는 가능성을 제시해 주고 있다. 이와 같은 결과는 완두자엽의 diamine oxidase가 putrescine과 spermidine에 의해 유도된다는 결과(Srivastava *et al.*, 1977)와 상이하지만 완두자엽의 diamine oxidase에 대한 기질 특이성에 관한 보고가 없으므로 기질특이성의 차이에 따른 효소의 유도에 대해서는 언급할 수 없다. 그러나, 대두에서 자엽을 제거한 유식물의 diamine oxidase는 polyamines(putrescine, spermidine, spermine) 중에서 putrescine에 의해서만 유도되는 것으로 사료된다.

MGBG가 putrescine 농도와 diamine oxidase의 활성에

Table 2. Effect of MGBG on putrescine content in soybean seedlings without cotyledons

Conc. of MGBG (M)	Putrescine contents nmole/g. fresh wt (%)
Control	137.6 ± 11 (100)
10 ⁻⁶	157.4 ± 7 (114)
10 ⁻⁵	175.2 ± 8 (127)
10 ⁻⁴	195.8 ± 10 (142)
10 ⁻³	206.6 ± 9 (150)

Various concentrations of MGBG were treated with excised soybean seedlings without cotyledons. Enzyme activities were measured 9 h after MGBG treatment.

Table 3. Effect of MGBG on the purified diamine oxidase activity from soybean seedlings without cotyledons

Concentration of MGBG (M)	Relative Activity (%)
Control	100
10 ⁻⁶	99
10 ⁻⁵	86
10 ⁻⁴	80
10 ⁻³	63

미치는 영향. MGBG가 polyamine 대사의 억제제로 보고된 이후 많은 연구가 진행되었지만, MGBG가 putrescine 농도와 분해효소인 diamine oxidase에 미치는 영향이 상호 어떤 연관성이 있는지에 대한 연구 결과는 보고되어 있지 않은 실정이다. 본 연구에서는 4-5일간 성장시킨 대두의 자엽을 제거한 유식물에 MGBG를 처리해주었을 때 putrescine 농도의 변화를 관찰한 결과 MGBG의 농도가 증가할 수록 putrescine의 함량이 증가하는 것으로, 효소인 diamine oxidase의 활성 감소에 기인한 것인지를 알아보기 위해 우선 분리 정제한 diamine oxidase의 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 본 실험에서 정제한 diamine oxidase는 polyacrylamide gel 상에서 단일 띠를 나타냈으며, 분자량은 70,000 dalton으로 Kang가 Cho(1989)의 결과와 일치하였다. 정제된 diamine oxidase는 MGBG의 농도가 증가함에 따라 활성이 감소하여 10⁻³M에서는 효소활성의 약 40%가 감소하는 결과를 나타냈다(Table 3). 이와 같은 결과는 완두 상배축에서 분리 정제한 diamine oxidase가 MGBG에 의해 억제된다는 Yanagisawa(1981)의 보고와 일치하며 MGBG는 완두 상배축 뿐 아니라 대두의 배축에서 분리 정제한 diamine oxidase의 활성도 억제한다는 사실을 확인하였다. *In vitro*에서 diamine oxidase의 활성은 높은 농도인 10⁻³M MGBG에 의해 억제되는 것으로 보아 *in*

Table 4. Effect of MGBG on diamine oxidase activity from soybean seedlings without cotyledons incubated for 12 h in buffer containing various concentrations of MGBG

Concentration of MGBG (M)	Relative Activity (%)
Control	100
10 ⁻⁶	120.0
10 ⁻⁵	175.0
10 ⁻⁴	17.5
10 ⁻³	N.D.

N.D.: not detected.

*in vivo*에서도 높은 농도의 MGBG에 의해 diamine oxidase의 활성이 억제될 것으로 사료되었다. 4-5일간 성장시킨 대두의 자엽을 제거한 유식물에 MGBG를 농도별로 처리한 후 diamine oxidase의 활성을 관찰한 결과, 10⁻⁶, 10⁻⁵M MGBG 존재시에는 S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC)의 활성이 억제된다는 보고가 있다(Pegg, 1983; Suzuki and Hirasawa, 1980). SAMDC는 putrescine으로부터 spermidine을 합성하는 과정에 참여하는 효소로서 diamine oxidase의 활성이 증가한 이유는 SAMDC의 활성억제가 putrescine으로부터 spermidine 형성을 억제하고 이로 인해 putrescine양이 증가되어 고농도의 putrescine이 diamine oxidase를 유도하는 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 Table 1과 일치하였다. 하지만, 10⁻⁴M에서는 diamine oxidase의 활성이 급격히 감소하여 10⁻³M에서는 효소의 활성을 측정할 수 없었다(Table 4). 이와 같은 결과는 고농도의 MGBG 처리시 putrescine의 증가는 putrescine의 분해효소인 diamine oxidase의 활성억제에 기인하는 것으로 사료된다.

적 요

대두의 자엽을 제거한 유식물에서 polyamine과 methylglyoxal bis(guanylhydrazone)(MGBG)가 diamine oxidase의 활성에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 10⁻²M의 putrescine, spermidine과 spermine을 처리하였을 때에는 diamine oxidase의 활성이 약 80% 억제되었으나, 10⁻⁶M의 putrescine을 처리하였을 때에는 효소의 활성이 증가되었다. 이는 기질 특이성이 큰 putrescine에 의해 diamine oxidase가 유도될 수 있다고 사료된다. MGBG의 농도가 증가함에 따라 putrescine 함량이 증가되었다. *In vitro*에서 diamine oxidase의 활성은 10⁻³M의 MGBG에서 약 40% 억제되었다. *In vivo*에서 diamine oxidase의 활성은 저농도의 MGBG에서 증가되었는데, 이는

MGBG가 putrescine으로부터 spermidine 형성을 억제하여 이로 인해 축적된 putrescine이 putrescine으로부터 spermidine 형성을 억제하여 이로 인해 축적된 putrescine이 diamine oxidase를 유도하는 것으로 사료된다. 반면, 고농도의 MGBG에서는 diamine oxidase의 활성이 감소되었다. 따라서 고농도의 MGBG에 의해 putrescine의 함량이 증가하는 것은 MGBG가 putrescine을 분해하는 diamine oxidase의 활성을 억제하는데 기인하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bagni, N., P. Barbieri and P. Torrigiani. 1983. Polyamine titer and biosynthetic enzymes during tuber formation of *Helianthus tuberosus*. *J. Plant Growth Regul.* **2**: 177-184.
- Cho, Y.D., J.H. Kang, Y.M. Lee, S.H. Lee, J.S. Lee and Y.H. Kang. 1988. Cell biological studies on growth and development. Effect of polyamine and auxin on β -1,4-endoglucanase. *Korean J. Bot.* **31**: 239-247.
- Cho, Y.D., S.H. Lee, H.W. Kim and H.M. Lee. 1985. Effect of polyamines on glucan synthetase activity. *Korean J. Bot.* **28**: 243-251.
- Federico, R. and R. Angelini. 1988. Distribution of polyamines and their related catabolic enzyme in etiolated and light grown Leguminosae seedlings. *Planta* **173**: 317-321.
- Fong, W.F., J.S. Heller and E.S. Canellakis. 1976. The appearance of an ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of putrescine to cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta* **428**: 456-465.
- Galsky, A. and J. Kulpa. 1983. Spermidine and plant tumor growth *Plant Physiol.* **27**(Suppl.): 160.
- Goren, R., N. Palavan, H.E. Flores and A.W. Galston. 1982. Changes of polyamine titer in etiolated pea seedlings following red light treatments. *Plant Cell Physiol.* **23**: 19-26.
- Hill, J.M. 1971. Diamine oxidase (pea seedling). *Methods Enzymol.* **17B**: 730-735.
- Huhtinen, O., J. Honkanen and L.K. Simola. 1982. Ornithine- and putrescine-supported divisions and cell colony formation in leaf protoplasts of alders (*Alnus glutinosa* and *incana*). *Plant Sci. Lett.* **28**: 3-9.
- Igarashi, K., I. Sakamoto, N. Goto, K. Kashiwagi, R. Honma and S. Hirose. 1982. Interaction between polyamines and nucleic acid or phospholipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **219**: 438-443.
- Igarashi, K., Y. Watanabe, K. Nakamura, M. Kojima, Y. Fujiki and S. Hirose. 1978. Effect of spermidine on N-formyl-methionyl-tRNA binding to 30S ribosomal subunits and on N-formyl-methionyl-tRNA dependent polypeptide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**: 806-866.
- Jarivis, B.C., P.R.M. Shannon and S. Yasmin. 1983. Development in stem cuttings of mung bean. *Plant Cell Physiol.* **24**: 677-683.
- Kang, J.H. and Y.D. Cho. 1989. Purification and properties of diamine oxidase from soybean (*Glycine max*). *Korean Biochem. J.* **22**: 361-366.
- Kang, J.H. and Y.D. Cho. 1990. Purification and properties of arginase from soybean, *Glycine max*, axes. *Plant Physiol.* **93**: 1230-1234.
- Kaur-Sawhney, R., H.E. Flores and A.W. Galston. 1981. Polyamine oxidase in oat leaves: a cell wall localized enzyme. *Plant Physiol.* **68**: 494-498.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farh and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Pegg, A.E. 1983. Inhibitors of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Methods Enzymol.* **94**: 239-247.
- Popovic, R.B., D.J. Kyle, A.S. Cohen and S. Zalik. 1979. Stabilization of thylakoid membranes by spermine during stress-induced senescence of barely leaf disc. *Plant Physiol.* **64**: 721-726.
- Smith, T.A. 1970. Polyamine oxidase in higher plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**: 1452-1456.
- Smith, T.A. 1982. The function and metabolism of polyamines in higher plants. *Plant Growth. Substances.* Academic Press, New York. pp. 463-472.
- Smith, T.A. 1983. Polyamine oxidase (oat seedlings). *Methods Enzymol.* **94**: 311-314.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 117-143.
- Smith, T.A. 1985. The di- and polyamine oxidase of higher plants. *Biochem. Soc. Trans.* **13**: 319-322.
- Srivastava, S.K., V. Prakash and B.I. Naik. 1977. Regulation of diamine oxidase activity in germinating pea seeds. *Phytochemistry* **16**: 185-187.
- Suzuki, Y. and 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.
- Yanagisawa, H., E. Hirasawa and Y. Suzuki. 1981. Purification and properties of diamine oxidase from pea epicotyls. *Phytochemistry* **20**: 2105-2108.