

NaCl, 한발 및 온도 처리에 따른 유묘기 수도의 폴리펩티드 속성의 비교분석

임금춘 · 정영상 · 신정섭*

강원대학교 농과대학 농화학과, *고려대학교 자연자원대학 식량자원학과

초록 : 식물은 자극이 큰 환경적 stress에 반응 외견상의 변모 뿐 아니라 내적으로 생리적·생화학적인 변화가 있게 되며, 특히 체내의 단백질 합성계는 그러한 stress에 더욱 급격하게 반응한다. 여러가지 stress하에서 유묘기 벼의 단백질 수준이 어떻게 변화되는가를 일차적으로 조사하기 위하여 NaCl, 한발 및 온도를 각각 달리 처리하여 이에 따른 폴리펩티드의 변이 양상을 전기영동에 의하여 비교하여 보았다. 환경 변화에 내성이 다소 강한 벼의 경우에도 stress 처리에 따라 다수의 폴리펩티드가 변화되었으며, 새로운 폴리펩티드의 생성도 관찰되었다. 또한 기존의 1차 대사과정을 위한 단백질의 감소도 각각의 처리에 따라서 달리 표현되는 것이 확인되었다(1992년 8월 24일 접수, 1992년 11월 30일 수리).

생물학적 견지에서의 stress를 생체에 악영향을 미치는 외부적 요인이라고 규정할 때, 자연 상태에서나 재배적 환경 하에서 식물은 계속적으로 기후의 급변, 해안 토양속의 염농도 변화 등과 같은 여러 가지 stress에 노출되어 있다. 식물은 stress에 반응하여서 생체량의 면에서의 생장 뿐 아니라 CO₂와 미량원소 흡수 등에 대한 일차 동화 과정 등 대사과정에 급격한 변화를 보이게 되고, 결과적으로 전체생산량도 감소한다. 이러한 외견상의 변화 외에도 내재적으로 볼 때, 식물의 발아나 생육 등의 많은 생리적 현상이 물리·화학적인 stress에 의해서 영향을 받으며, 체내의 단백질 합성계는 그러한 stress에 더욱 급격하게 반응한다.^{2,13,24)}

대두에서의 anaerobiosis와 DNP 처리,¹⁸⁾ 옥수수에서의 water stress 혹은 낮은 물포텐셜에 의한 영향,^{12,22)} 그리고 저온이나 고온¹⁶⁾ 등의 환경 stress에 대한 폴리펩티드 변화가 여러 작물에서 보고된 바 있고, 또한 단백질 합성의 변화에 있어서 대부분의 정상 단백질의 합성은 일반적으로 감소되는 대신에 새로운 형태의 단백질이 합성된다는 것이 지적된 바 있다.^{2,4,16,25)} 또한 한발의 경우에는 여러가지 식물에 있어서 아미노산인 proline의 합성이 활발해 진다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 이러한 변화는 식물이 열악한 환경에 적응을 하기 위해서 기존의 필수 대사과정에 필요한 효소의 양을 감소시키는 대신에 그 자체의 생존을 위한 대사과정에 필요한 활성 단백질

(enzyme) 및 구조적 단백질(structural protein)을 만드는 경로를 택하는 이유 때문이다.

식물은 환경변화에 적응하여 체내 대사가 달라지게 되는데, 담수에 의한 산소 부족상태에 대한 옥수수의 반응은 벼의 경우와 동일하였고,²¹⁾ 콩의 뿌리에서도 이와 비슷한 생리적 적응을 나타내기도 한다.¹⁴⁾ 여러 작물의 고온에 대응한 새로운 단백질의 생성은 stress에 대한 적응 연구에 좋은 과제라고 할 수 있다.^{2,3,6,16,26)} 고온에 대한 반응은 식물에만 나타나는 것이 아니라 박테리아에서 부터 사람까지 다른 생물에서도 다양하게 존재한다는 것이 알려져 있다.^{1,9,10,15,19,20,23,28)} 이러한 stress 하에서도 정상적인 mRNA는 유전자 수준에서 보존되어 있으므로,^{18,25,27)} stress가 제거된 조건에서는 정상적인 단백질이 활동적으로 재합성될 수 있다. Czarnecka 등(1984)은 콩의 hs mRNA에 대한 cDNA clone을 이용하여 다양한 stress에 대한 mechanism 구명을 시도한 바, 많은 다른 종류의 stress에 자극받아 전사된 mRNA들은 heat shock의 경우와 비슷한 경향을 나타낸다는 것을 보고 하였다. 토마토에서의 염분의 처리¹⁷⁾와 벼에 있어서 염분과 한발 처리⁵⁾ 그리고 저온¹¹⁾ 등에 따른 단백질 변화 및 몇 종류의 cDNA clone도 확인된 바 있으나⁶⁾, 아직 까지 벼에 있어서 중요한 환경 요인에 대한 폴리펩티드 변화에 관한 연구는 적은 실정이다.

따라서 본 연구는 여러 가지 stress 하에서 유묘기

변의 폴리펩티드가 어떻게 변화되는 가를 일차적으로 조사하기 위하여 NaCl, 한발 및 온도를 각각 달리 처리하여서 나타난 변이 양상을 구명하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

재료 및 처리

본 실험에서 사용한 재료로는 2 mm 체별한 시양토로 설치된 보온절충못자리에서 재배한 추징벼 유묘를 사용하였다. NaCl 농도 처리는 0.1%, 0.3%, 0.6%로, 한발 처리로는 최적온도하에서 토양수분장력이 -3 bar 와 -1 bar로 떨어졌을 때의 두 수준으로 나누어서, 온도에 따른 영향을 관찰하기 위하여는 저온 5°C, 10°C 와 고온 40°C, 45°C로 나누어서 Growth chamber에서 각각 4~5일 간 처리하여서 형태적인 효과가 나타났을 때 잎과 줄기를 채취하였다.

단백질 추출 및 정제

식물체에서 총 단백질을 추출하는 방법으로는 Zivy 등(1983)의 방법과 Damerval 등(1986)의 방법을 변형하여서 사용하였다. 유묘 생체 약 10 g을 액체 질소하에서 갈아서 추출 용액[30 mM Tris(pH 8.7), 1 mM ascorbic acid, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% PVP]을 첨가하는 방법과, homogenizer를 얼음 속에서 차게한 후 추출용액 5 ml를 넣어서 곱게 분쇄하는 방법을 병행하였다. 33,000 g에서 15분씩 두 차례의 원심분리를 한 후 상등액만 추출하였다. 0.07% 2-mercaptoethanol을 함유한 냉각 acetone을 상등액의 4배에 해당되는 양을 처리하여 -20°C에서 1시간 동안 단백질을 침전시킨 후, 33,000 g에서 10분간 원심분리하여 정제하였다. 20 µg 정도의 단백질을 SDS reducing buffer[60 mM Tris(pH 6.8), 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, trace bromophenol blue]에 1:2로 희석시킨 후 전기영동에 사용하였다.

전기영동과 염색

전기영동은 discontinuous SDS-PAGE slab gel을 사용하였는데, 12%T의 separating gel과 4%T의 stacking gel을 1.5 mm 두께로 만들었다. 전기영동 시간이 약 5-6시간 되도록 일정전류세기로 조절하였으며, 염색은 coomassie blue법과 silver staining법을 모두 사용하였다. Coomassie blue법으로는 고정액에서 1시간, 염색액에서 3시간 동안 처리한 후, 12시간 정도 탈색하였다. Silver staining법을 이용할 때는 고정액에서 30분간 처

리하고, 10% glutaraldehyde액에 30분간 처리한 후, 세척 12시간하여서 5 µg/ml DTT액 30분, 0.1% silver nitrate에 30분 침적시켰으며, 발색용액[3% sodium carbonate와 0.0185% formaldehyde]에서 3~5분간 침적시켜서 발색되도록 하고, 2.3 M citric acid를 10 ml 가량 섞어서 발색 진행을 중지시켰다.

Data 해석

Band 변이와 유무는 육안으로 관찰하였으며, fluorodensitogram(gel scanner)에 나타난 peak와 서로 비교 분석하였다. 12%T gel에서 분리가 잘 이루어 지지 않은 부분은 7%T와 15%T 젤에서 보충하여 관찰하였고, 분자량은 standar marker로 사용한 고분자량 marker와 Rf치를 상대적으로 비교하여 계산하였다.

결과 및 고찰

NaCl 농도에 따른 폴리펩티드의 변화

NaCl 처리 농도에 따른 band의 변화(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3)를 고분자량 폴리펩티드에서 부터 나누어 보면; 첫째, 무처리에서 나타난 133.4 Kd, 126.0 Kd의 band가 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 없어지고, 190.6, 175.7, 143.4 Kd의 band가 새로이 생성되었다. 둘째, 52.5 Kd는 0.6%에서만 없어졌고, 49.1 Kd는 0.3% 농도까지는 없다가 0.6%에서 깨끗한 band로 관찰되었으며, 47.6 Kd의 band는 0.3%와 0.6% 농도에서 소멸되었다. 셋째, 46 Kd 크기 이하의 경우를 보면 45.6 Kd의 폴리펩티드는 모든 NaCl 처리에서 분자량의 크기가 무처리 보다 확연히 높은 band로 변형되어 나타났는데, 이는 낮은 NaCl 처리에도 쉽게 반응하는 변이에 해당되는 것인지의 여부는 더 확인이 필요하다. 45.1 Kd의 band는 0.1%에서 생성되었고, 0.3%에서는 44.7 Kd로 관찰되었다. 42.1 Kd는 0.3% 농도까지는 존재하다가 0.6%에서 소멸되었으며, 무처리에서의 40.5 Kd의 band가 0.3과 0.6%에서 변이된 형태를 가지는 것으로 보였고, 28.3 Kd에 해당하는 폴리펩티드가 0.3%에서 새로이 생성되었으며, 0.6%에서 27.7 Kd의 band로 확인되었다. 또한 작은 분자량의 25.7 Kd가 0.3%에서 없어지고, 10.6 Kd이 새로운 폴리펩티드로 확인되었다.

온도 처리에 따른 폴리펩티드의 변화

(1) 고온처리의 효과

온도처리의 종류에 따라서도 폴리펩티드 band의 양상이 달라졌는데(Fig. 1, Fig. 2), 133.4 Kd의 band가 없어지고 145.9 Kd와 113.3 Kd가 새로이 생성됨이 관찰되었고, 126.0 Kd가 소멸되는 것이 고분자량 부위에서 확

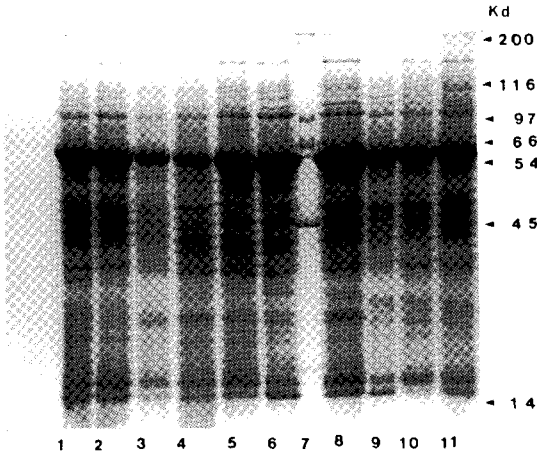


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from rice seedlings which were treated with several stresses.

Gel was stained with coomassie blue. Estimated molecular weights in kilodalton are listed at right. Numbers indicate treatments as following: 1: Drought 2(-3 bar), 2: Drought 1(-1 bar), 3: 0.6% NaCl, 4: 0.3% NaCl, 5: 0.1% NaCl, 6: Control (untreated), 7: High molecular weight marker, 8: 10°C, 9: 5°C, 10: 40°C, 11: 45°C

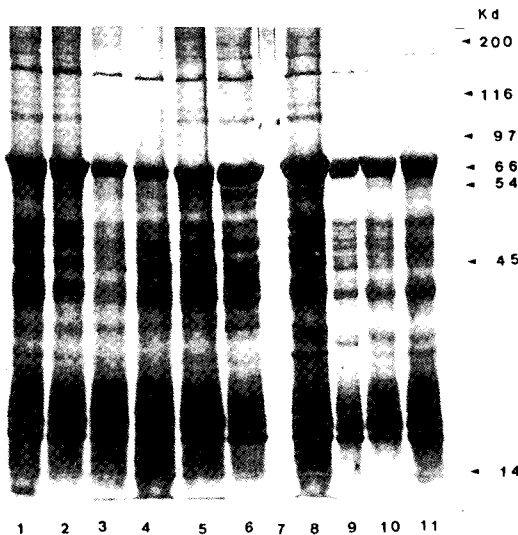


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from rice seedlings which were treated with several stresses.

Gel was stained by silver staining method. Estimated molecular weights in kilodalton are listed at right. Numbers indicate the same as in Fig. 1

인되었다. 92.8과 48.6 Kd의 band가 40°C 와 45°C 모두

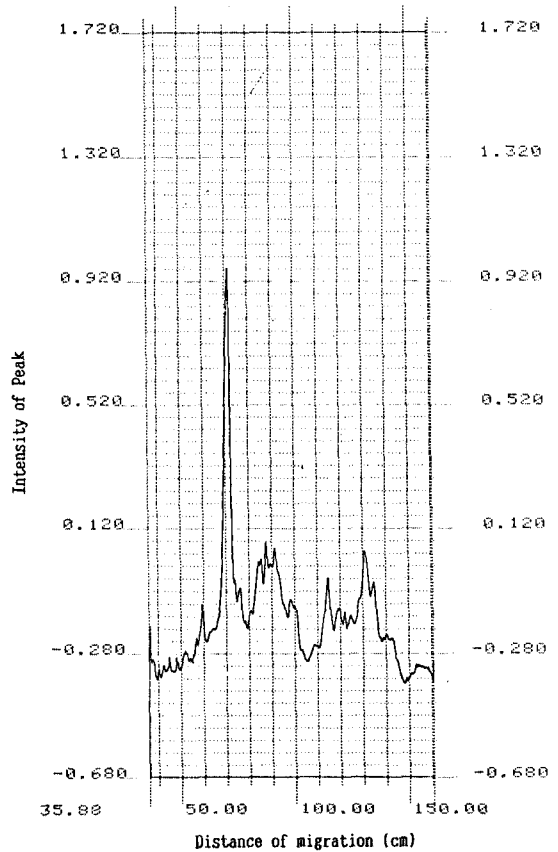


Fig. 3. Typical fluorodensitogram of polypeptides separated by SDS-PAGE.

Polypeptides were induced by the salt treatment of rice seedlings with 0.6% NaCl.

관찰되지 않은 반면, 71.6, 58.4, 56.0과 49.1 Kd에 해당하는 폴리펩티드들은 45°C 에서만 관찰이 불가능하였다. 또한 45°C 에서 97.0 Kd에 해당되는 폴리펩티드가 새로이 생성되었을 뿐만 아니라, 77.9 Kd의 band는 그 양이 현저히 증가되었다. 45 Kd 이하의 저분자량 단백질의 경우에도 다른 작물에서 보고된 것 처럼 많은 변이가 생성과 소멸의 교차를 이루었다. 무처리외의 45.6 Kd의 band는 고온 처리에서 분자량이 보다 큰 형태로 나타남이 확인되었는데, 앞으로 세밀한 검정이 필요할 것으로 사료된다. 고온으로 진전됨에 따라 31.6 Kd과 25.7 Kd가 없어지고, 44.7, 42.8, 30.3, 29.3 Kd의 band가 새로이 생성되었다. 또한 23.1 Kd의 band가 생성되었고, 21.7 Kd가 21.1 Kd로 변화되었거나 아니면 그러한 band가 소멸 및 생성된 것으로 추정되었다.

(2) 저온처리의 효과

고분자량의 경우 많은 변이가 나타나지 않았으나 고온

처리와는 명확한 몇 가지 차이점이 있었는데(Fig. 1), 126.0 Kd가 소멸되고, 180.6, 178.2, 175.7 Kd의 band가 생성되었는데, 이러한 고분자량의 경우에는 앞으로 보다 더 세밀한 연구가 요구된다. 175.7 Kd의 band는 NaCl의 작용에 의해서도 나타났었는데 같은 종류의 단백질인지는 확인이 필요하다. 5°C와 10°C에서도 고온에서 확인된 97 Kd의 band는 생성되지 않았으나, 56.2 Kd의 폴리펩티드가 저온으로 진전됨에 따라서 형성되었고, 49.1 Kd가 각각에서 새로이 생성되었다. 94.9 Kd가 10°C부터 소멸되었으며, 56.4 Kd의 band는 5°C의 경우에만 없어지는 것이 확인되었다. Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase 효소의 large subunit인 54.0 Kd의 band(그림에서 가장 많은 양을 나타내는 band)는 5°C부터 급격히 감소하였다. 또한 고온의 경우에서도 같은 경향으로 56.0 Kd의 폴리펩티드가 5°C에서 없어지는 것으로 판명되었다. 저분자량의 경우, 다른처리에서 처럼 5°C에서도 31.6 Kd의 band는 보이지 않았으며, 30.9와 30.3 Kd가 천천히 생성되었다. 또한 42.1, 36.9와 27.0 Kd가 생성되었는데, 이러한 변화는 2차 전기영도에서 보다 세밀하게 확인 중에 있다.

한발처리에 따른 폴리펩티드의 변화

다른 처리조건 하에서는 발견될 수 없었던 것(Fig. 1, Fig. 2)으로서 109.3 Kd의 band가 없어지고 112.0 Kd의 폴리펩티드가 대신 생성되는 것으로 판명되었는데 이는 건조처리에 따른 새로운 단백질의 발현을 나타낸 것인지는 더 확인할 필요가 있다. 126.0 Kd의 band는 NaCl 처리, 온도 처리 및 한발 처리 등에서 공히 확인되지 않는 것으로 보아 대부분의 stress에 매우 민감한 반응을 하는 폴리펩티드인 것으로 추정되었다. 46-120 Kd의 범위에서 86.4 Kd의 band가 소멸되었고 53.0 Kd와 50.0 Kd가 새로이 뚜렷한 band를 형성하였다. 또한 55.5 Kd와 53.0 Kd 사이에 그리고 50.0 Kd와 46.6 Kd 사이에 적어도 2개 이상의 폴리펩티드가 현격하게 감소되어 없어진 것이 관찰되었다. 저분자량의 범위에서 볼 때 44.7 Kd에 해당하는 band가 생성되었는데 이는 고온에서의 것과 다른 폴리펩티드일 것으로 사료된다. 23.7 Kd가 없어지고, 37.5 Kd와 21.4 Kd가 생성되었으며, 건조가 진전됨에 따라 42.8 Kd가 없어지고, 42.4 Kd의 폴리펩티드가 생성되는 것이 관찰되었다. 다른 처리에서 처럼 31.6 Kd가 소멸되었고, 또한 저온처리에서 관찰된 현상과 같이 30.9와 30.3 Kd의 폴리펩티드가 새로이 생성되었다.

이와 같이 다른 작물에서와 마찬가지로 벼의 경우에도 환경 stress에 반응하여 다수의 폴리펩티드가 변화되었으며, 새로운 폴리펩티드의 생성도 관찰되었다. 또한 식

물체에서 가장 풍부하게 존재하는 광합성 암반응 효소인 Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase 등의 정상 단백질의 감소도 각각의 처리에 따라서 달리 표현되는 것을 densitogram(Fig. 3)으로 확인할 수 있었다. 이렇게 확인된 결과는 앞으로 pulse-chase에 의해서, 즉 ³⁵S-methionine 등을 환경처리 중에 주입하여 보다 더 상세하게 확인할 필요가 있다. 또한 2차 전기영동법을 실행하여 변화된 단백질의 아미노산 조성 및 배열을 확인하고, 확인된 아미노산 서열을 토대로 oligonucleotide를 합성하여 cDNA clone에서 이러한 폴리펩티드를 coding하는 clone들을 찾기 위한 probe로 이용할 수 있을 것이다. 식물이 stress에 저항할 때 생체 내에서 어떠한 다른 대사과정으로 새로운 형태의 단백질을 생성하는지, 또한 stress에 내성인 품종을 궁극적으로 육성할 수 있을 것인지는 앞으로 관심을 갖고 연구할 필요가 있다.

사 사

이 논문은 '91 강원대학교 특별연구지원비에 의하여 연구된 것임.

참 고 문 헌

1. Ashburner, N. and Bonner, J. F.: Cell, 17: 241 (1979)
2. Barnett, T., Altschuler, M., McDaniel, C. N. and Mascarenhas, J. P.: Dev. Genet., 1(1980)
3. Baszczynski, C. L., Walden, D. B. and Atkinson, B. G.: Can. J. Biochem., 60: 569(1982)
4. Bewley, F. D. and Larsen, K. M.: J. Exp. Bot., 31: 1245(1980)
5. Claes, B., Dekeyser, R., Villarroel, R., Bulcke, M. V., Bauw, G., Montagu, M. V. and Caplan, A.: The Plant Cell, 2: 19(1990)
6. Cooper, P. and Ho, T. D.: Plant Physiol., 71: 215 (1983)
7. Czarnecka, E., Edelman, L., Schöffl, F. and Key, J. L.: Plant Mol. Biol., 3: 45(1984)
8. Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H.: Electrophoresis, 7: 52(1986)
9. Francis, D. and Lin, L.: Dev. Biol., 79: 238(1980)
10. Guttman, S. D., Glover, C. V. C., Allis, C. D. and Gorovsky, M. A.: Cell, 22: 299(1980)
11. Hahn, M. and Walbot, V.: Plant Physiol., 91: 930 (1989)
12. Hsiao, T. C.: Plant Physiol., 46: 281(1970)
13. Jolivet, Y., Pireaux, J. C. and Dizengremel, P.: Plant Physiol., 94: 641(1989)

14. Jung, Y. S., Lim, H. S., Ha, S. G. and Han, S.: J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert., 1 : 1(1992)
15. Kelley, P. M. and Schleisinger, M. J.: Cell, 15 : 1277 (1978)
16. Key, J. L., Lin, C. Y. and Chen, Y. M.: PNAS, 78 : 3526(1981)
17. King, G. J., Turner, V. A., Hussey, C. E., Wurtele, E. S. and Lee, S. M.: Plant Mol. Biol., 10 : 401(1988)
18. Lin, C. Y. and Key, J. D.: J. Mol. Biol., 26 : 237 (1967)
19. Loomis, W. F. and Wheeler, S.: Dev. Biol., 79 : 399 (1980)
20. McAlister, L. and Finkelstein, D.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 93 : 819(1980)
21. Mocquot, B., Prat, C. H., Mouches, C. and Pradet, A.: Plant Physiol., 68 : 636(1981)
22. Moriella, C. A., Boyer, J. S. and Hageman, R. H.: Plant Physiol., 51 : 817(1973)
23. Neidhardt, F. C. and van Bogelen, R. A.: Biochem. Biophys. Commun., 100 : 894(1981)
24. Rees, C. A. B., Gullons, A. M. and Walden, D. B.: Plant Physiol., 90 : 1256(1989)
25. Sachs, M. M., Freeling, M. and Okimoto, R.: Cell, 20 : 761(1980)
26. Scharf, K. D. and Nover, L.: Cell, 30 : 427(1982)
27. Schöffl, F. and Key, J. L.: J. Mol. Appl. Genet., 1 : 301(1982)
28. Yamomori, Y. and Yura, T.: PNAS, 79 : 860(1982)
29. Zivy, M., Thiellement, H., de Vienne, D. and Hofmann, J. P.: Theor. Appl. Genet., 66 : 1(1983)

Comparative study on the properties of polypeptides induced by NaCl, drought and temperature treatments in rice seedlings

Gum-Chun Lim, Yeoung-Sang Jung and Jeong-Sheop Shin* (Department of Agricultural Chemistry, Kangweon National University, Chucheon 200-701, Korea, *Department of Agronomy, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : Plants are altered not only in the outward appearance but also in their physiological and biochemical properties with reaction to the environmental stresses; particularly, the biosynthetic system of protein *in situ* rapidly responds to this. In order to investigate the change of properties of polypeptides in rice plants induced by several stresses, the seedlings were subjected to exposure to NaCl, drought, and low and high temperatures, respectively, and then some aspects of polypeptide variations were compared. Without exception, the rice plant, which is somewhat tolerant to environmental change, shows the alteration in several polypeptides. Moreover, newly synthesized polypeptides were observed in response to stresses. The existing proteins for the primary metabolic pathways were markedly decreased as each treatment progressed.