식물학회지 제35권 제1호
Korean J. Bot. 35(1) : 77~84

옥수수 자엽초의 신장에 미치는 TPA와 IAA의 효과

鄭 恩 朱 · 李 埈 承
(梨花女子大學校 自然科學大學 生物學科)

Effects of TPA and IAA on Corn Coleoptile Elongation

Chung, Eun Joo and June Seung Lee
(Department of Biology, Ewha Womans University, Seoul)

ABSTRACT

In view of the well-established role of protein kinase C effector element in signal transduction of animal systems, the possibility of diacylglycerol (DAG) and its analog 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) having an effect on auxin-induced growth of corn coleoptiles was explored. Both DAG and TPA were found to promote cell elongation in the coleoptile tissue. Treatment of tissue with these protein kinase C-activating agents resulted in increase in the growth rate over the control by about 300%. When IAA was applied to TPA-pretreated coleoptiles, auxin effect appeared synergistic. Morever, coleoptile growth was found to be inhibited by staurosporine and methylated TPA, both of which are known to specifically inhibit protein kinase C. Electrophoretic and autoradiographic patterns of soluble proteins from the coeoptiles indicated that either IAA or TPA tereatment resulted in increased phosphorylation of certain proteins of 205 Kd, 66 Kd and 32 Kd in size. The results obtained from the present work suggest that protein kinase C may be associated with auxin action on cell elongation in the corn coleoptile segments.

서 론

최근 동물세포에서 신호 전달 체계를 설명하는 secondary messenger pathway를 보면 호르몬이나 다른 외부 자극이 세포막에 있는 수용체와 작용하여 세포막의 phosphospholipid(PI)를 분해하는 효소인 phospholipase C를 활성시키면 이 효소가 PI를 inositol triphosphate(IP_3)와 diacylglycerol(DAG)로 분해한다(Berridge, 1984, 1987; Berridge and Irine, 1984). 이때 PI의 분해를 통해 생성된 IP_3와 DAG는 second messenger로 작용하며, IP_3는 Ca^{2+} pool로부터 Ca^{2+}을 방출하게 하고(Majerus *et al.*, 1986) DAG는 protein kinese C(PKC)를 활성시킨다(Holub *et al.*, 1970). 이렇게 세포내에 증가된 Ca^{2+}은 calmodulin(CaM)과 결합하여 Ca^{2+}에 의존적인 효소들을 활성시키고(Niedel and Blackshear, 1986), DAG에 의해 활성화된 PKC는 단백질을 인산화해서 세포의 생리적현상을 조절하는 것으로 알려져 있다.

식물에서도 식물세포 신장을 촉진하는 농도의 오옥신이 phosphatidylinositol turnover에 관여한다는 보고가 있다. 식물체내에 가용성의 phospholipase C가 존재하여(Helsper *et al.*, 1986a, b; Irvine, 1982) phosphoinositide가 1,2-diacyl-glycerol(DAG)과 inositol phosphates(IP_3)로 분해된다(Majerus *et al.*, 1986)는 보고와 Morré(1984)는 활성이있는 오옥신인 2,4-D 등은 콩의 하배축 세포의 신장을 촉진시키는 농도에서 phospholipid turnover를 증가시키지만, 활성이 없는 오옥신인 2,3-D 등은 이러한 효과를 보이지 않는다는 보고가 있다. 이같은 보고들은 식물에도 PI의 분해산물인 IP_3와 DAG가 존재할 수 있다는 예측을 뒷받침한다.

또한 오옥신에 의해 세포내 Ca^{2-} 농도가 조절되며(Evans, 1985) IP_3에 의해 호박의 미세한 소포체들과 귀리뿌리의 액포막에서 유래된 소포체들로부터 Ca^{2+}이 방출된다는 보고(Drøbak and Ferguson, 1985; Schumaker and

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구비 지원에 의해 수행되었음.

Sze, 1987)와 적당한 조건하에서는 세포내 Ca^{2+}의 농도의 증가가 오옥신과 비슷한 효과를 나타낸다는 보고(Hasenstein, 1986) 등은 IP_3가 second messenger로 사용될 수 있다는 것을 보여준다.

Morré(1984)는 식물에서 처음으로 Ca^{2+}과 DAG에 의해 활성화되는 protein kinase를 보고했고, Schafer(1985) 등은 호박으로부터 부분적으로 PKC를 분리했으며, DAG와 TPA가 배양된 밀 세포의 protein kinases를 활성시킨다(Oláh, 1986)는 보고들과, *A. tricolor*의 막에 있는 inositol lipid가 분해되어 생성된 DAG가 Ca^{2+}과 phospholipid에 의존적인 효소를 활성시킨다(Elliott and Skinner, 1986)는 연구 결과는 식물에도 IP_3 뿐만 아니라 DAG를 second messenger로 사용하는 동물과 유사한 secondary messenger pathway가 존재할 가능성을 제시해 준다.

본 연구는 앞의 연구 결과를 토대로 오옥신의 작용에도 second messenger가 이용될 가능성을 생리적인 측면에서 확인하기 위한 것으로 세포막에 있는 PI의 분해산물인 DAG의 *cascade*가 식물에도 존재하여 IP_3의 *cascade*처럼 적당한 조건하에서 오옥신과 유사한 효과를 나타낼 것이라는 가능성을 검토하고 호르몬(오옥신)이나 phorbol ester (TPA)가 PKC 활성에 의한 단백질 인산화를 통해 생리적인 효과를 나타나는 가를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료. 옥수수(*Zea mays* L.) 종자(품종 단옥, 중앙종묘에서 구입)를 증류수에 6시간 정도 침액시킨 후 배양접시(27×20×2.5 cm)에 증류수로 적신 휴지를 깔고 종자를 일렬로 배열시켰다. 종자를 심은 배양접시를 증류수가 담긴 큰 사각용기(37×33×5.5 cm)에 수직으로 세워서 암소, 26±1℃에서 3~4일 동안 발아시켜서 자엽초의 길이가 1.5~2 cm 정도일 때 사용했다. PKC에 의한 단백질 인산화를 확인하기 위한 실험은 100 μCi ^{32}P가 첨가된 50 mM Mes-Tris 완충용액(pH 7.0)에 옥수수를 앞의 방법으로 길러 ATP pool에 ^{32}P가 미리 표지되도록 한 뒤 실험 재료로 사용했다.

^{32}P(10 mCi/ml)는 DuPont사에서 구입하였으며 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA), oleoyl-acetyl-glycerol (OAG)과 dioleoyl-glycerol(DG), acrylamide, sodium dodecyl sulfate(SDS), ammonium persulfate, N,N,N′,N′-tetra methylenediamine(TEMED), Mes, Tris, 12-myristate-13-acetate-4-0-methyl ether(Me-TPA)와 staurosporine은 Sigma에서 구입하였다.

단기간의 옥수수 자엽초 신장 생장률 측정. 자엽초를 70배로 확대시키는 카메라와 비데오 모니터가 연결된 컴퓨터 시스템을 사용하였다. 7.5×5×6.5 cm의 투명한 아크릴 용기 한쪽면에 5 mm로 자른 4개의 옥수수 자엽초 절편을 수직으로 세운 뒤 Mes-tris 완충용액(50 mM, pH 6.4)을 채우고 용기의 다른 면에 가는 관을 연결하여 산소를 계속 공급해주었다. 준비된 아크릴 용기를 스탠드에 고정한 뒤 조명등을 켜고 확대 카메라로 비데오 모니터에 자엽초가 선명하게 나타나도록 촛점을 맞추었다. 비디오 모니터에 나타난 자엽초 상을 컴퓨터 모니터에 옮긴 후 커저(커저 1 칸=1/120 mm)를 이용하여 신장 중인 자엽초 끝의 좌표를 10분마다 기억시켰다. 온도는 26±1℃를 유지시키고, 이때 원하는 시약은 필요한 농도가 최종농도가 되도록 계산해서 아크릴 용기 속에 첨가하였다.

장기간의 옥수수 자엽초 신장 생장률 측정. 작은 petri 접시에 원하는 시약이 첨가된 50 mM Mes-tris 완충용액(pH 6.4)을 넣고 5 mm로 자른 옥수수 자엽초 절편을 넣어 26±1℃가 유지되는 암소에서 흔들어주며 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 자엽초의 길이를 눈금자로 측정하였다.

PKC에 의한 단백질 인산화 측정. ^{32}P가 첨가된 완충용액에서 키운 옥수수 자엽초를 각기 원하는 식물호르몬이나 시약이 처리된 완충용액에서 1 시간 동안 배양(26±1℃, 암소)한 뒤 얼음 속에 넣어 반응을 중지시켰다. 0.5 M의 sucrose와 1 mM EDTA, 0.1 mM $MgCl_2$, 50 mM Tris가 첨가된 pH 7.5의 완충용액과 자엽초 절편을 2 : 1 비율(w : w)로 섞어 분쇄하였다. 6겹의 거어즈를 사용하여 분쇄한 것을 거른 뒤 10000×g에서 30분간 원심분리하였다. 이때 상등액을 세포질의 단백질로 사용하였다. Laemmli (1970) 방법을 변형한 10% acrylamide gel에 0.1% SDS를 포함한 tris-glycin 완충용액를 사용하여 세포질 단백질을 전기영동하였다. 전기 영동한 gel을 말린 뒤 X-ray film에 밀착시켜 5일 정도 노출시킨 후 film을 현상하였다.

결 과

DGA가 자엽초 생장에 미치는 영향. 동물에서 PKC를 활성시키는 두 종류의 DAG(OAG, DG)를 자엽초에 처리했다. 5×10^{-5} M DG와 5×10^{-5} M OAG를 자엽초에 처리하면 DG는 처리 30분, OAG는 130분이 지난면서부터 생장 촉진 효과가 나타나 최대 500%까지 생장율이 증가하였다(Figs. 1, 2). Table 1은 5×10^{-5} M의 OAG와 DG를 자엽초 조직에 처리하여 24시간 동안 배양한 뒤 두 종류의 DAG가 옥수수 자엽초의 신장에 미치는 장시간의 효과를 조사한 것이다. 5×10^{-5} M의 OAG나 DG를 처리한 자엽초 조직이 대조구에 비해 230% 정도 더 자랐다. 이때 10^{-5} M IAA만 처리한 조직은 길이생장이 처리 전보다 260% 증가하는 것에 비해 DAG와 IAA를 함께 처리한 조직은 310% 증가해 두 종류의 DAG와 IAA가 자엽초 길이생장에서 상

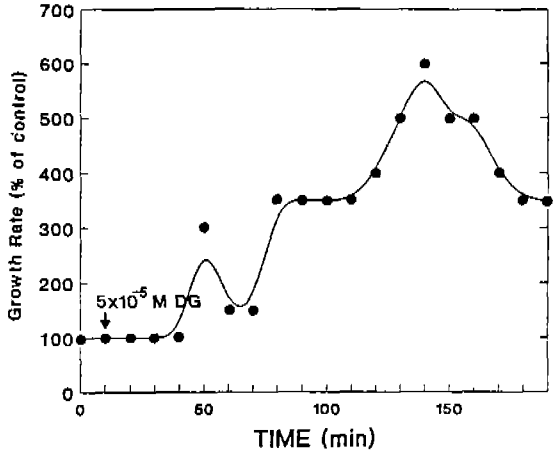

Fig. 1. Effect of dioleoyl-glycerol on corn coleoptile elongation. Dioleoyl-glycerol (5×10^{-6} M) was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrow.

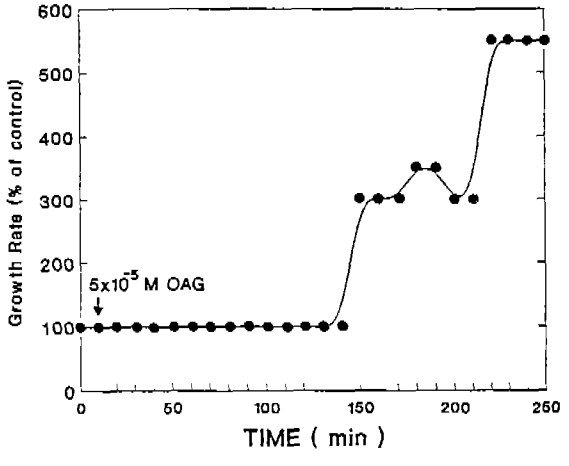

Fig. 2. Effect of oleoyl-acetyl-glycerol on corn coleoptile elongation. Oleoyl-acetyl-glycerol (5×10^{-6} M) was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrow.

Table 1. The DAG promotion of corn coleoptile growth in the presence or absence of IAA

Treatment	Growth (% of control)
Control	100
Oleoyl-acetyl-glycerol (5×10^{-6} M)	230
Dioleoyl-Glycerol (5×10^{-6} M)	230
IAA (10^{-5} M)	260
Oleoyl-acetyl-glycerol (5×10^{-6} M) +IAA (10^{-5} M)	310
Dioleoyl-Glycerol (5×10^{-6} M) +IAA (10^{-5} M)	310

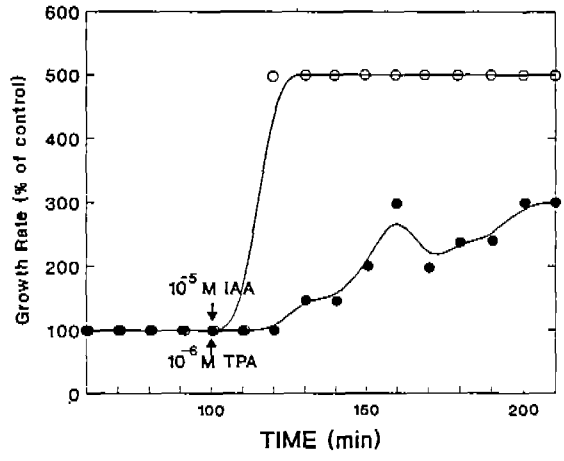

Fig. 3. Effects of TPA and IAA on corn coleoptile elongation. TPA (10^{-6} M) and IAA (10^{-5} M) was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrows. (●−●), 10^{-6} M TPA; (○−○), 10^{-5} M IAA.

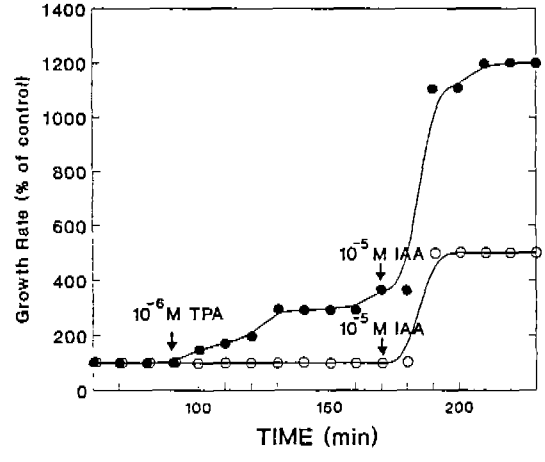

Fig. 4. Synergistic effect of IAA on corn coleoptiles pretreated with TPA. Corn coleoptile was pretreated with TPA (10^{-6} M) indicated by the arrow on the left. IAA (10^{-5} M) was added to corn coleoptiles at the time indicated by the arrows on the right. (●−●), 10^{-6} M TPA+ 10^{-5} M IAA; (○−○), 10^{-5} M IAA.

승효과를 보였다.

TPA가 자엽초 생장에 미치는 영향. TPA는 phorbol ester의 종류로 동물 세포에서는 PKC를 활성시켜 세포내의 단백질을 인산화하는 것으로 알려져 있다. 이러한 TPA가 식물세포의 신장생장에 어떤 효과를 나타내는 가를 알아보았다. Fig. 3에 의하면 10^{-6} M의 TPA는 처리하고 30분이 지난 후부터 자엽초의 신장 생장을 촉진하여 최대 300%

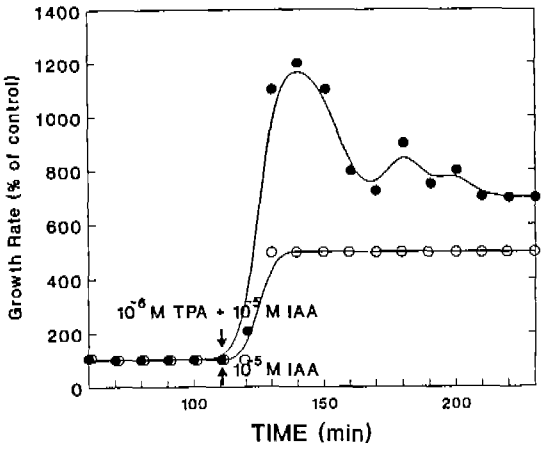

Fig. 5. Synergistic effect of TPA and IAA on corn coleoptile segment elongation. TPA (10^{-6} M) and IAA (10^{-5} M) were applied to corn coleoptiles as indicated by the up arrow. (●−●), 10^{-6} M TPA+10^{-5} M IAA; (○−○), 10^{-5} M IAA.

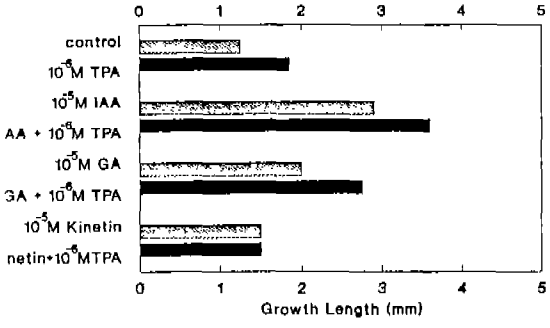

Fig. 6. Synergistic effect of TPA on corn coleoptile elongation. pretreated with plant hormones. Segments were incubated in buffer containing TPA or hormones as indicated and length was measured after 24 h.

까지 증가시켰다. 그러나 TPA는 IAA의 신장 생장 촉진 효과를 완전하게 대치하지는 못했다. 오옥신에 의한 신장 촉진이 TPA에 의한 PKC의 활성화와 관련되었는 가를 알아보기 위하여 TPA와 IAA를 자엽초에 함께 처리하였다. Fig. 4는 자엽초에 10^{-6} M TPA를 전처리하고 80분이 지나 TPA의 효과가 안정된 후 10^{-5} M의 IAA를 첨가하면, IAA와 TPA를 처리한지 10분만에 상승효과가 나타나 최대 1200% (TPA에 의한 생장촉진 효과와 IAA에 의한 효과를 합해도 최대 800%의 생장율 증가를 보일뿐이다)의 생장률 증가가 일어났음을 보여준다. Fig. 5는 TPA를 전처리 하지 않고 IAA와 동시에 처리해서 얻은 결과로 10^{-6} M TPA와 10^{-5} M IAA를 동시에 처리한 조직도 처리 후 10분만에 IAA와

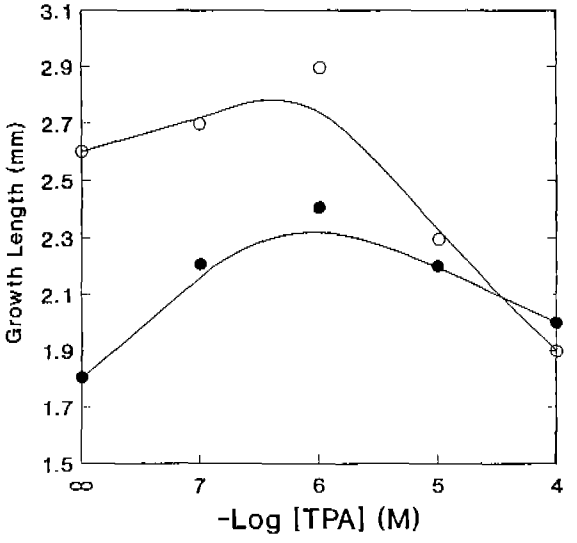

Fig. 7. Dose response curve for TPA promotion of corn coleoptile segment elongation in the presence or absence of IAA. Segments were incubated in buffer containing concentration of TPA for 24 hrs and measured the length. (○−○), 10^{-7}~10^{-4} M TPA+10^{-5} M IAA; (●−●), 10^{-7}~10^{-4}M TPA.

TPA에 의한 상승효과가 나타나 최대 1200%의 생장율이 증가되며 상승효과가 나타나고 50분이 경과되면서 부터는 생장율이 안정되었다. Fig. 6은 TPA를 다른 식물호르몬과 함께 처리했을 때도 오옥신과 같은 효과를 나타내는 가를 확인한 것으로서 kinetin에 의한 효과는 전혀 없고 GA와 함께 처리했을 때는 어느 정도 효과가 있는 것으로 나타났다. Fig. 7은 10^{-5} M의 IAA와 각각 다른 농도의 TPA를 함께 처리해서 24시간 배양시킨 실험 결과로 $10^{-7}\times10^{-4}$ M의 TPA를 각각 처리해서 얻은 자엽초 신장 생장 촉진 곡선과 10^{-5} M IAA를 각 농도의 TPA를 함께 처리해서 얻은 신장 생장 촉진 곡선이 같은 양상을 보였다. 10^{-6} M의 TPA가 신장 생장을 최대로 일으키며 IAA의 첨가에 의해서도 최대로 생장을 촉진하는 TPA의 농도는 변하지 않았다.

식물세포내의 단백질 인산화. TPA나 DAG에 의해 활성화된 PKC는 세포내 여러 종류의 단백질을 인산화시키는 것으로 알려져있는데, 식물 세포내에서도 이러한 경로로 단백질 인산화가 일어나는지 조사하였다. Fig. 8a에서 보여준 세포질 단백질을 전기영동한 사진에 의하면 각 lane의 band들은 동일하다. 그러나 Fig. 8b의 autoradiography 사진에 의하면 대조구, 10^{-6} M TPA, 10^{-5} M IAA, 10^{-6} M TPA+10^{-5} M IAA를 처리한 차례로 자엽초 세포질에 존재하는 단백질의 인산화가 증가되어 205 Kd, 66 Kd 주

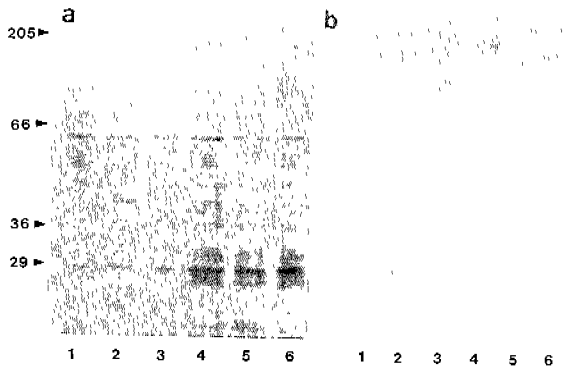

Fig. 8. Electrophoretic and autoradiographic patterns of ^{32}P labeled plant cell cytosol proteins. a, electrophoretic patterns. b, autoradiographic patterns. 1, control; 2, TPA; 3, IAA; 4, TPA+IAA; 5, GA; 6, GA+TPA.

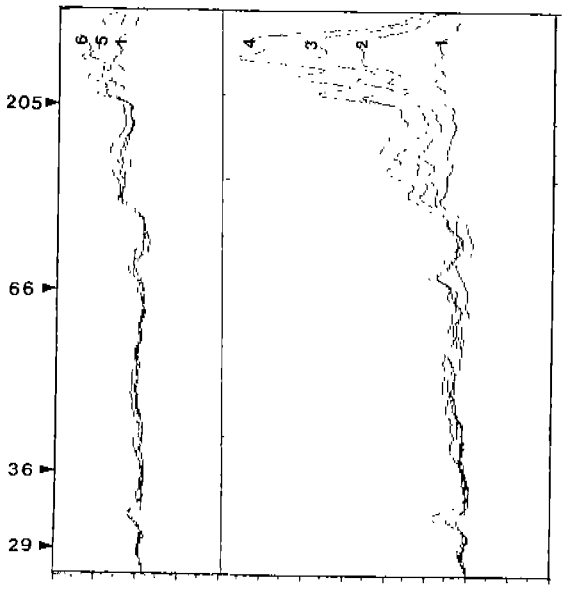

Fig. 9. Densitometric scanning of ^{32}P labeled cytosol proteins from corn coleoptiles. 1, control; 2, TPA; 3,IAA; 4, TPA+IAA; 5, GA; 6, GA+TPA.

변의 band들과 36 Kd와 29 Kd 사이의 band가 대조구에서는 희미하거나 보이지 않다가 10^{-6} M TPA+10^{-5} M IAA 처리구 쪽으로 갈수록 짙어졌다. Fig. 9는 Fig. 8b의 각 lane을 densitometer로 scanning한 결과인데 1부터 4까지 각 lane에 있는 205 Kd, 66 Kd 주변 band들과 36 Kd과 29 Kd사이 band 단백질의 인산화가 증가한 것을 볼 수 있다. 이 결과에 의하면 TPA 처리구의 단백질 인산화가 대조구에 비해 300% 더 증가했으며 IAA 처리구는 460%, IAA와 TPA를 함께 처리한 경우는 610%까지 단백질 인산화가

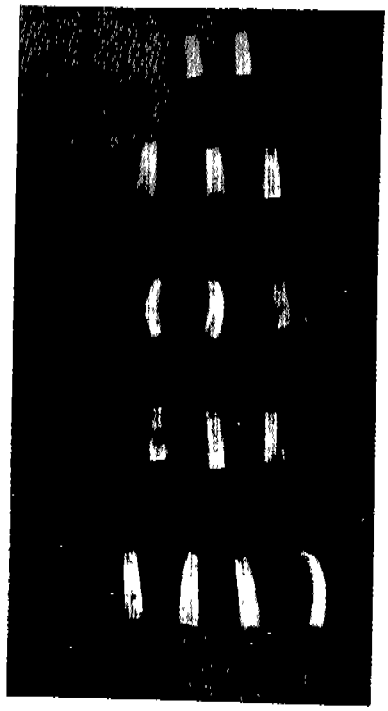

Fig. 10. Corn coleoptiles incubated with TPA and/or IAA for 24 hours. 1, control; 2, TPA; 3, IAA; 4, TPA+IAA.

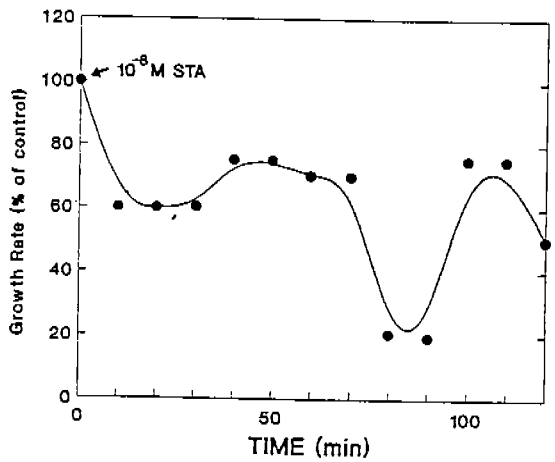

Fig. 11. Effect of STA on corn coleoptile segment elongation. STA (10^{-8} M) was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrow.

증가하였다. 이러한 결과들은 TPA와 IAA에 의해 식물세포질내 단백질의 인산화가 증가된다는 것을 말한다.

Fig. 10은 자엽초에 10^{-6} M TPA, 10^{-5} M IAA, 10^{-6} M TPA+10^{-5} M IAA를 각각 처리하여 24시간 배양한 뒤 각 조직의 길이 생장을 비교한 결과이다. TPA와 IAA를 함께

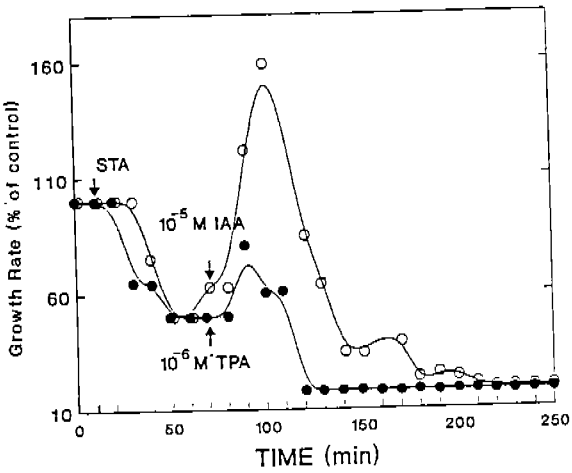

Fig. 12. Effect of TPA on corn coleoptile segments elongation pretreated with STA. STA was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrow on the left. TPA (10^{-6} M) was added to corn coleoptiles as indicated by the arrow on the right. (●−●), 10^{-7} M STA+10^{-6} M TPA; (○−○), 5×10^{-8} M STA+10^{-6} M TPA.

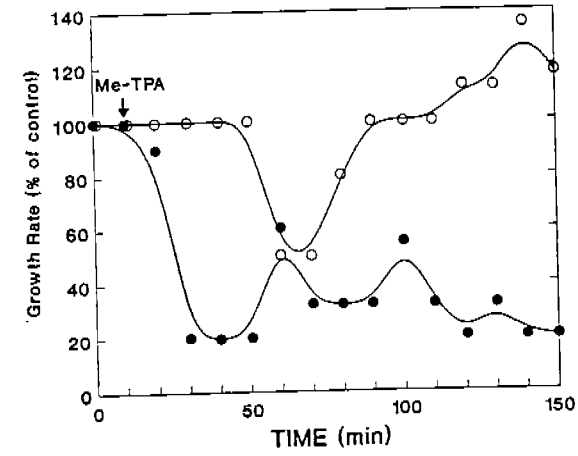

Fig. 13. Effect of Me-TPA on corn coleoptile elongation. Me-TPA was applied to corn coleoptiles as indicated by the arrow. (○−○), 10^{-6} M Me-TPA; (●−●), 5×10^{-6} M Me-TPA.

처리한 조직>IAA를 처리한 조직>TPA를 처리한 조직>대조구의 순서로 길이 생장이 증가했다.

Staurosporin과 methylated TPA의 효과. TPA나 IAA가 활성화시킨 PKC에 의해 증가되는 세포질 단백질의 인산화와 자엽초의 신장 생장 과정이 연관되어 있을 것이라는 가능성을 검토하기 위해 단백질 인산화를 억제하는 물질을 자엽초에 처리하였다. Fig. 11은 PKC에 작용하여 단백질 인산화를 억제하는 staurosporin(STA)을 자엽초에 처리한 것이다. 5×10^{-8} M의 STA에 의해 자엽초의 신장 생장이 STA 처리 후부터 계속 감소되어 최대 80%까지 감소되었다.

Fig. 12는 TPA에 의한 PKC 활성을 억제하며 weak phorbol ester agonist인 Me-TPA가 자엽초에 미치는 영향을 조사한 것이다. 5×10^{-6} M의 Me-TPA를 처리한 경우 Me-TPA가 첨가된 후부터 자엽초 생장이 억제되어 30분이 경과하면 처리 전보다 최대 80%까지 생장이 억제되며 10^{-6} M의 Me-TPA에 의해서는 처리 40분 후부터 생장이 저해되어 최대 50%까지 생장이 억제되었다.

고 찰

식물세포 신장 생장을 촉진하는 오옥신이 동물 호르몬처럼 IP_3를 second messenger로 사용하여 생리적 기작을 조절할 것이라는 가정은 오옥신이 세포내의 IP_3양을 증가시키며(Ettlinger, 1988) 증가된 IP_3에 의해 소포체나 액포로부터 Ca^{2+}이 방출된다는 보고(Drϕbak and Ferguson, 1985)와 Ca^{2+}가 오옥신의 작용에 중요한 역할을 한다는 보고(Hasenstein, 1986) 등으로 뒷받침되고 있다. 이렇게 오옥신의 작용이 IP_3를 매개로 일어난다는 실험결과와 식물에도 inositol phosphate(Coté *et al.*, 1987), DAG(Morse *et al.*, 1988)가 존재하며 inositol phospholipid(Boss and Massel, 1985)와 phospholipid를 분해하는 phospholipase C(Melin *et al.*, 1987; Pfaffmann *et al.*, 1987)가 존재한다는 보고를 토대로 DAG도 오옥신에 의해 일어나는 생리적인 현상에 관여할 가능성을 생각해 볼 수 있다.

이러한 가능성을 확인하기 위해서 오옥신에 의해 조절되는 생리현상 중 가장 현저한 효과를 관찰할 수 있는 자엽초 조직의 신장생장을 비교해 보았다. 본 실험에서 사용한 DAG인 DG와 OAG는 모두 자엽초의 생장을 2~3배 이상 촉진시키는 것을 관찰할 수 있었으며 DAG와 유사한 작용을 한다고 알려진 phorbol ester 인 TPA도 같은 정도의 생장촉진 효과를 보였다(Figs. 1~3). 그러나 본 실험에서 사용한 DAG(5×10^{-6} M)나 TPA(10^{-5} M)는 동물세포보다 약 100~1000배 높은 농도에서 생리적 효과를 보인다. 이것은 외부에서 공급되는 TPA나 DAG가 자엽초 절편의 표피세포 층을 투과하기 어렵거나 식물세포의 세포막 투과성은 동물세포와 같은 정도라 하더라도 세포벽이나 또 다른 요인에 의해서 투과 정도가 달라지기 때문일 수 있다고 생각되며, 또는 TPA나 DAG에 의해서 조절되는 PKC가 동물과 유사성은 있으나 동일한 특성을 가진 효소가 아니기 때문에 이러한 차이가 생길 수 있다고 생각된다.

Table 1이나 Fig. 3에서 보면 DAG나 TPA는 그것만으로도 생장촉진 효과가 2배 이상(230%) 나타나고 있으나

오옥신에 의한 효과만큼(260%) 크지는 않다. 그러나 이러한 물질들과 오옥신을 같이 처리했을 때는 각각을 처리했을 때보다 적어도 2시간 이내에는 훨씬 큰 상승효과를 관찰할 수 있으며 TPA에 의한 생장촉진에 필요한 lag period가 오옥신의 그것처럼 10~20분으로 상당히 빨리 나타난다 (Figs. 3~5). 상승효과는 다른 식물호르몬인 kinetin에 의해서는 전혀 나타나지 않으며 GA에 의해서는 어느 정도 상승효과가 있으나 오옥신과 함께 처리함으로써 가장 큰 효과를 보였다(Fig. 6). 특히 Fig. 9의 결과와 비교해 보면 205 Kd, 66 Kd 부근에서 GA에 의한 인산화 정도는 IAA와의 경우보다 뚜렷한 증가가 없는 것으로 보아 적어도 GA와는 큰 연관성이 없는 것으로 생각된다.

Fig. 7에서 보면 이와 같은 생장촉진 효과는 오옥신의 농도를 10^{-5} M로 고정시켜 놓을 때 TPA의 농도 10^{-6} M까지는 증가하고 있으나 그 이상의 고농도 TPA를 첨가하거나 TPA만으로도 10^{-5} M 정도의 고농도에서는 오히려 생장 억제효과를 보이는 것은 식물조직에서 오옥신에 의한 Dose-Response Curve와 상당히 일치되는 것을 알 수 있다. 이와 같이 오옥신에 의한 신장 촉진효과와 TPA에 의한 효과는 상당히 유사한 점이 관찰되는데 이 두 물질에 의한 신장촉진 작용기작이 서로 연관성이 있는 가를, 즉 IAA도 TPA처럼 PKC의 활성화에 어떤 연관성을 가지고 신장생장을 촉진하게 되는지 확인하였다. Fig. 12는 TPA에 의한 생장이나 오옥신에 의한 생장이 STA(Ki=0.0007)에 의해 저해됨을 보여 이들의 생장 촉진 기작이 PKC의 활성과 연관되어 있음을 의미한다. 이 결과에서 STA을 전처리한 조직에 오옥신을 처리한 경우 약 20분 경에 생장 촉진효과가 있는 것처럼 보인 것은 많은 오옥신의 작용 중 초기 H^+의 생성으로 인한, 세포벽과 관련된, 일시적인 효과로 보여진다. 그러나 특히 Fig. 9의 단백질 인산화 실험의 결과를 보면 205 Kd부근의 단백질의 경우 TPA+IAA>IAA>TPA의 순으로 인산화가 현저히 증가되는 것으로 보아서 이 부근의 단백질 인산화가 생장과 밀접한 관계가 있으리라고 생각된다.

이러한 결과들은 오옥신에 의한 신장 생장이 TPA를 매개로한 PKC의 활성화와 밀접한 관계가 있을 가능성이 크다는 것을 의미하며 여기서 205 Kd, 66 Kd, 36 Kd 부근의 단백질이 어떤 것인지는 앞으로 연구해 볼만한 과제로 생각된다.

적 요

오옥신의 작용이 PKC에 의한 단백질의 인산화 과정과 연관되어 있는지 확인하기 위하여 PKC를 활성화시키는 물질인 DAG와 TPA 그리고 오옥신이 옥수수 자엽초의 신장에 미치는 효과를 조사하였다. DAG와 TPA를 옥수수 자엽초에 처리하면 DAG는 최대 500%까지, TPA는 최대 300%까지 자엽초 생장율을 증가시켰다. 이때 IAA나 TPA 각각에 의한 생장율 증가의 합(최대 800%)보다도 TPA와 IAA를 함께 처리한 조직의 생장율 증가가 더 커서(최대 1200%) TPA와 IAA는 상승효과를 나타내었다. 전기영동을 통하여 TPA와 IAA를 처리한 자엽초 세포질의 단백질 인산화 정도를 비교한 결과 TPA+IAA>IAA>TPA>control의 순서대로 단백질의 인산화가 증가했다. 이러한 단백질 인산화의 증가와 신장 생장과의 관계를 명확히 하기 위해 PKC 억제제로 알려진 STA를 자엽초에 처리한 결과 TPA의 존재에 관계없이 생장율이 80%까지 저해되었으며, methyl기의 결합으로 구조가 변형된 Me-TPA에 의해서도 생장율은 80%까지 저해되었다. 이와 같은 실험 결과들은 IAA에 의한 자엽초 신장 촉진 과정의 적어도 한 단계에 동물의 PKC와 유사할 것으로 추측되는 PKC에 의한 단백질 인산화가 연관되어 있을 가능성이 있다고 생각하게 한다.

참 고 문 헌

Berridge, M.J. 1984. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**: 345-360.

Berridge, M.J. 1987. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 159-193.

Berridge, M.J. and R.F. Irvine. 1984. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**: 315-321.

Boss, W. and M.O. Massel. 1985. Polyphosphoinositides are present in plant tissue culture cells. *Biochem. Biophys. Res.Commun.* **132**: 1018-1023.

Coté. G.G., M.J. Morse., R.C. Crain and R.L. Scatter. 1987. Isolation of soluble metabolites of the phosphatidylinositol cycle from *Samanea saman*. *Plant Cell Reports* **6**: 352-355.

Drøbak, B.K. and I.B. Ferguson. 1985. Relese of Ca^{2-} from plant hypocotyl microsomes by inositol-1,4,5-triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130**: 1241-1246.

Elliott, D.C. and J.D. Skinner. 1986. Calcium-dependent, phospholipid-activated protein kinase in plants. *Phytochemistry* **25**: 39-44.

Ettlinger, C. and L. Lehle. 1988. Auxin induces rapid changes in phosphatidyl-inositol metabolites. *Nature* **331**: 176-178.

Evans, M.L. 1985. The action of auxin on plant cell elongation. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2**: 317.

Hasenstein, K.H. and M.L. Evans. 1986. Calcium dependence of rapid auxin action in maize roots. *Plant Physiol.* **81**: 439.

Helsper, P.F.G., P.F.M. de Groot, H.F. Linskens and J.E.J. Jacson. 1986a. Phosphatidylinositol phospholipase C activity in pollen of *Lilium longiflorum*. *Phytochemistry* **25**: 2053-2055.

Heisper, P.F.G., P.F.M. de Groot, H.F. Linskens and J.E.J. Jacson. 1986b. Phosphatidyl monophosphate in *Lilium* pollen and turnover of phospholipid during pollen tube extension. *Phytochemistry* **25**: 2193-2199.

Holub, B.J., A. Kuksis and W. Thompson. 1970. Molecular species of mono-, di-, tri-phosphoinositides of bovine brain. *J. Lipid Res.* **11**: 558-564.

Irvine, R.F. 1982. The enzymology of stimulated lipid turnover. *Cell Calcium* **3**: 295-309.

Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature* **227**: 680-685.

Majerus, P.W., T.M. Connolly, Deckmyn, T.S. Ross, T.E. Bross, H. Ishii, V.S. Bansal and D.W. Wilson. 1986. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* **234**: 1519-1526.

Melin, P.M., M. Sammarin, A. Sandelius and B. Jergil. 1987. Identification of Ca^{2+}-stimulated polyphosphoinositide phospholipase C in isolated plant plasma membranes. *FEBS Lett.* **223**: 87-91.

Morré, D.J., J.T. Morre and R.T. Varnold. 1984. Phosphorylation of membrane-located proteins of soybean *in vitro* and response to auxin. *Plant Physiol.* **75**: 265-268.

Morse, M.J., G.C. Coté, R.C. Crain and R.L. Scatter. 1988. Light-modulated phosphatidylinositol turnover in *Samanes saman*. *Plant Physiol.* **86**: 93-95.

Niedel, J.E., P.J. Blackshear. 1986. Protein kinase C. In Phosphoinositides and Receptor Mechanisms. J.W. Putney, Jr (ed.): Alan R. Liss, New York. pp. 47-88.

Oláh, Z. and Z. Kiss. 1986. Occurrence of lipid and phorbol ester activated protein kinase in wheat cells. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **195**: 33-37.

Pfaffmann. H., E. Hartmann, A.O. Brightman and D.J. Morre. 1987. Phosphatidyl-inositol specific phospholipase C of plant stem, membrane associated activity concentrated in plasma membranes. *Plant Physiol.* **85**: 1151-1155.

Schafer, A., F. Bygrave, S. Matzenauer and D. Marme. 1985. Identification of a calcium- and phospholipid-dependent protein kinase in plant tissue. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* **187**: 25-28.

Schumaker, K.S. and H. Sze. 1987. Inositol-1,4,5,-triphosphate releases Ca^{2+} from vacuolar membrane vesicles of oat roots. *J. Biol. Chem.* **262**: 3944.

(1992. 3. 4 接受)