

## 노쇠중인 밀잎에서 Benzyladenine에 의한 막단백질의 안정화

陳 昌 德

(江原大學校 自然科學大學 生物學科)

## Stabilization of Membrane Proteins by Benzyladenine during Wheat Leaf Senescence

Jin, Chang-Duck

(Department of Biology, Kangweon National University, Chuncheon)

### ABSTRACT

The effect of benzyladenine (BA) on lipid peroxidation and compositions of total insoluble proteins and chloroplast thylakoid protein from wheat primary leaves during senescence in the dark was studied. BA ( $10^{-5}$  M) treatment prevented conspicuously the loss of chlorophyll content and soluble and insoluble leaf protein contents in senescing wheat leaf segments during 4-day dark incubation. Under the BA treatment, especially, the level of insoluble protein was highly maintained than that of soluble protein. Also, the increase of malondialdehyde (MDA: the peroxidation product of membrane lipids) content was inhibited in the BA treated leaves. Three major polypeptide bands in quantity corresponding to 57, 26 and 12 KD molecular weight were clearly resolved with other minor bands by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in the insoluble protein fraction. The insoluble protein profiles of the control leaves showed a remarkable decrease in the intensity of the 57 and 12 KD band except for 26 KD band in the 72 h dark incubation. This loss during dark incubation was reduced by BA treatment. More than 20 polypeptides were resolved in the chloroplast thylakoid membrane fraction with the most prominent bands which are 59 and 57 KD ( $\alpha$  and  $\beta$  subunit of coupling factor: CF) and 26 KD (apoprotein of LHCP). The changes in thylakoid protein profile during 72 h dark incubation showed the rapid degradation in control, but this degradation was prevented in quantity by BA treatment. The above results suggested that BA would inhibit the peroxidation of membrane lipids, thereby preventing the loss of membrane proteins which led to the maintenance of the membrane integrity including chloroplast thylakoid.

### 서 론

잎의 노쇠가 진행될 때 세포수준에서 발생하는 중요한 대사의 하나는 세포막의 파괴현상이다. 노쇠과정의 세포막에 대한 손상은 막의 중요한 구성성분인 막지질(Pukacka, 1991; Pauls and Thompson, 1982)과 더불어 막단백질의 생화학적 변화(Soudain *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1989; Nettleton *et al.*, 1985; Bricker and Newman, 1980)로 나타난다. Bricker와 Newman(1980)은 엽록체의 노쇠시 틸라코이드막 구성단백질 사이에는 차등적인 분해가 나타나 이들 막단백질의 변화가 곧바로 엽록체의 구조 유지에 영향을 끼칠 것이라 보고하였으며, 또한 Soudain 등(1992)은 노쇠중인 토마토 과일에서 원형질막을 분리하여 노쇠진전에 따른 원형질막 구성단백질의 변화를 분석하여 과일의 성숙 및 노쇠현상과 이들 막단백질의 변화와의 관계를 조사하였다.

현재 막단백질의 분해과정 및 그 메카니즘은 명확히

밝혀져 있지 않은 실정이다(Huffaker, 1990; Casano *et al.*, 1990; Dalling and Nettleton, 1986; Gardner, 1979). 막단백질의 파괴과정을 설명해 주는 한 가지 가능성으로 지질의 과산화반응(Pukacka, 1991; Pauls and Thompson, 1982; Gardner, 1979)이 있다.

Lurie와 Ben-Arie(1983)는 원형질막의 물리적 변화가 막지각 조성의 변형에 기인되며 이 변화는 막구성단백질에 대해 중대한 결과를 초래한다고 하였다. Pauls와 Thompson(1982)은 인위적으로 오존이 처리된 콩자엽 세포내의 microsome막의 파괴현상에 대한 연구에서 시토키닌계 합성호르몬인 benzyladenine(BA)과 항산화제의 효과를 조사하였는데 이때 외부에서 가해진 BA와 propyl gallate와 같은 항산화제는 MDA 생성을 억제하고 총단백질 함량과 microsome 막단백질 함량의 손실을 억제하였음을 보고한 바 있다.

그러므로 본 실험에서는 노쇠중인 밀제일엽에서 세포막 파괴현상과 관련하여 일차적으로 노쇠억제호르몬으로 알려진 BA가 세포막지질의 과산화반응 및 수용성과 불용성 일단백질의 분해양상 그리고 엽록체 틸라코이드의 막단백질 조성의 변화에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

### 재료 및 방법

**재료식물의 생육조건 및 처리.** 본 실험에 사용된 밀(*Triticum aestivum* L. cv Chokwang)은 맥류연구소에서 분양받은 품종으로 크기, 모양, 색깔이 같은 종자를 선별한 후 1% sodium hypochlorite 용액에 10분간 담구어 표면 살균하였다. 살균된 종자를 세척한 후 여과지(Toyo No. 2) 3장이 놓여진 투명한 폴리프로필렌 용기(11.5×11.5×10 cm)에 20 ml의 증류수를 넣고 64개씩 파종한 다음 25±2 °C의 온도조건과 20 W/m<sup>2</sup>의 연속광 조건하의 환경배양기 내에서 6일간 발아 성장시켰다.

6일 후 제 1엽의 양끝 기저부와 정단부를 제외한 6 cm 길이의 잎절편을 잘라내어 10 mM Na-borate 완충용액(pH 6.0)과 10<sup>-5</sup> M Benzyladenine(BA)이 포함되어 있는 완충액 각 15 ml의 배지에 10개씩 띄우고 동일 조건의 배양기내에서 다시 4일간 암배양하면서 인위적으로 노쇠를 유도시켰다.

**엽록소 및 단백질 함량의 측정.** 엽록소 함량은 잎절편을 80% 아세톤(0.1% CaCO<sub>3</sub> 포함)으로 마쇄한 후 원심분리(1,000×g, 10 min)하여 얻은 상정액을 Arnon(1949)의 방법에 따라 측정하였다. 잎의 수용성 단백질 함량은 잎절편을 0.1 M Tris-HCl(pH 7.5) 완충용액으로 마쇄한 후 원심분리(20,000×g, 10 min)하여 이때 얻어진 pellet은 불용성 단백질 시료로하고 나머지 상정액 중 1 ml를 취하여 여기에 15% TCA 용액 1 ml를 가하고 24시간 냉암소에

보관하여 얻은 단백질을 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다. 불용성단백질 함량은 Hashimoto 등(1989)의 방법을 약간 변형하여 실시하였는데 처음 원심분리하여 얻은 pellet을 다시 0.1 M Tris-HCl (10% SDS 포함) 완충용액으로 마쇄한 후 이 마쇄물을 25°C에서 2시간 진탕배양하고 재원심분리(30,000×g, 30 min)하여 이때 얻은 상정액을 시료로하여 단백질 정량을 실시하였다.

**엽록체의 순수분리 및 틸라코이드막의 추출.** Murphy와 Walker(1982)의 방법에 따라 밀 제 1엽으로부터 엽록체를 추출하여 Nettleton 등(1985)의 방법에 의해 3% (w/v) Ficoll 원심분리를 이용하여 순수한 intact 엽록체를 얻었다. 100개의 잎절편(약 3 g 생체량)을 Waring blender 내에 30 ml의 냉각된 추출용 완충액(50 mM HEPES-NaOH, 0.33 M sorbitol, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.3)과 함께 넣고 고속으로 5초간 2회 마쇄하였으며, 이 마쇄액을 8점의 cheese cloth로 2회 여과시켜 여과액을 얻고 원심분리(1,500×g, 10 min)하여 crude 엽록체 pellet을 얻었다. 다시 이 pellet을 1 ml의 현탁용 완충액(25 mM Tris-HCl, 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.8)으로 현탁시키고 이 현탁액을 3%(w/v) Ficoll액(3%, w/v, Ficoll, 25 mM Tris-HCl, 0.5 M sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.8) 8 ml의 상층부에 부드럽게 loading한 다음 원심분리(1,500×g, 10 min)하여 엽록체 pellet을 얻고 이것을 다시 현탁시킨 후 3% Ficoll액으로 재원심분리하였다. 이때 얻은 intact 엽록체 pellet을 10 ml의 현탁용 완충액으로 washing하여 Ficoll이 제거된 순수한 엽록체 pellet을 얻었다.

틸라코이드막 추출은 엽록체 pellet을 2 ml의 lysis 완충액(25 mM Tris-HCl, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 15 mM KCl, 0.04%, v/v, mercaptoethanol, pH 7.6)에 현탁시켜 삼투적으로 깨뜨린 후 원심분리(1,500×g, 10 min)하였다. 이때 상정액은 버리고 남은 pellet은 lysis 완충액으로 한번 더 washing하여 틸라코이드 시료로 이용하였다.

**불용성 단백질과 틸라코이드 단백질의 전기영동적 분석.** 불용성 단백질과 틸라코이드 단백질의 전기영동적 분석은 Hashimoto 등(1989)과 Laemmli(1979)의 방법에 따라 SDS-PAGE법으로 실시하였다. 단백질시료와 0.125 M Tris-HCl 완충액(5% SDS, 5% mercaptoethanol, 10% glycerol 및 0.004% BPB 포함, pH 6.8)을 동부피 섞은 후 100°C의 수조에서 3분간 증탕하고 이 시료를 12.5%의 polyacrylamide gel에 loading하여 전기영동하였다. 이때 분자량 marker로서 BSA(66 KD), Egg albumin(45 KD), Trypsinogen(24 KD) 및 Myoglobin(18.8 KD)를 사용하였으며 gel 상에서 분리된 단백질 band들은 Coomassie Brilliant Blue R로 염색한 후 탈색시켜 Densitometer를 사용 520 nm에서 scanning 하였다.

**MDA(malondialdehyde) 함량의 측정.** MDA 함량은

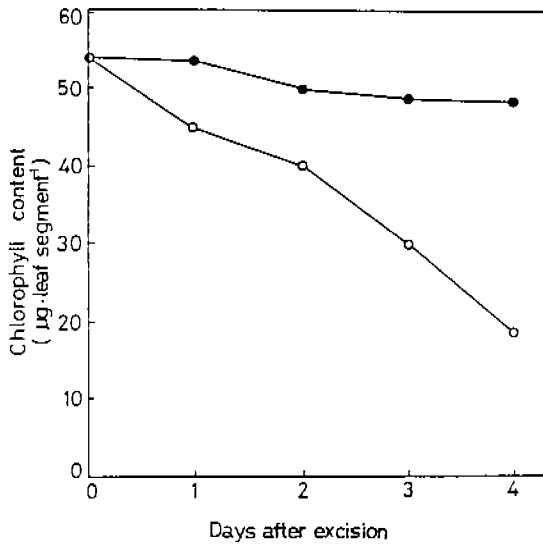


Fig. 1. Changes of the chlorophyll content in senescing wheat leaf segment treated with or without  $10^{-5}$  M benzyladenine for 4 days in the dark. ○-○-, Control; ●-●-, Benzyladenine.

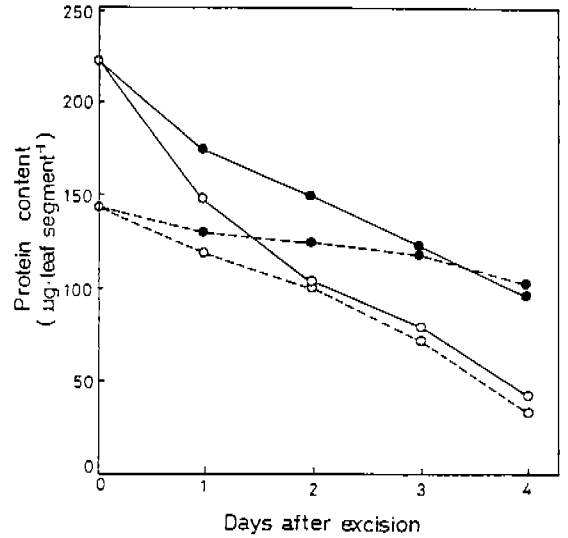


Fig. 2. Changes of soluble and insoluble protein contents in senescing wheat leaf segment treated with or without  $10^{-5}$  M benzyladenine for 4 days in the dark. ○-○-, Control; ●-●-, Benzyladenine; —, Soluble protein; ----, Insoluble protein.

Dhindsa 등(1981)의 방법을 기초로하여 수행하였다. 10개의 잎절편을 0.1% trichloroacetic acid 용액 5 ml와 0.3 g의 석영사를 이용 마쇄한 후 원심분리(10,000×g, 5 min)하여 얻은 상정액 1 ml에 20% TCA(0.5% thiobarbituric acid 포함) 용액 4 ml를 가하고 95°C에서 30분간 중탕한 후 급냉작시켰다. 이것을 재원심분리(10,000×g, 10 min)하고 이때 얻어진 상정액의 흡광도를 532 nm와 600 nm에서 측정 한 후 그 차이를 계산하였으며 잎 조직내의 MDA 함량은 MDA 몰흡광계수 155/mM/cm(Heath and Packer, 1968)로부터 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**엽록소 함량의 변화.** 잎의 노쇠과정은 엽록소 함량과 단백질 함량에 있어서 커다란 감소현상으로 특징지어진다(Kar and Feierabend, 1984; Kato and Shimizu, 1985; Hashimoto *et al.*, 1989). 이는 잎의 노쇠현상이 엽록체막의 분해를 포함한 세포막의 전반적인 파괴과정을 수반하여 진행되기 때문이다(Nettleton *et al.*, 1985; Kura-Hotta *et al.*, 1987).

잘라낸 밀잎을 재료로한 본 실험에서 4일간의 암배양 동안에 엽록소 함량은 노쇠과정의 진전에 따라 현저하게 감소하였다. 그러나 이때  $10^{-5}$  M의 BA로 처리된 잎에서의 엽록소분해가 거의 일어나지 않아 암배양 후 4일까지도 엽록소 함량이 조금 감소하였을 뿐 계속 높은 수준을 유

지하였다(Fig. 1).

이러한 사실은 노쇠중인 밀잎에서 Kinetin 처리시 엽록소와 단백질 함량의 감소가 지연되었다는 보고(Kar and Feierabend, 1984) 및 BA 처리시 벼잎에서 엽록소 소실이 억제되었다는 결과(Reddy *et al.*, 1985)와 일치하는 현상으로 엽록소 분해억제에 대한 BA의 강력한 효과를 보여 주는 것이 된다. 잎에서 엽록소는 통상적으로 틸라코이드 막내에 단백질과 결합되어 존재하는 점을 생각할 때 BA 처리시 잎에서 그와 같은 엽록소 손실의 억제효과는 BA에 의한 막단백질의 안정화 가능성을 나타내는 것으로 볼 수 있다. Kunert와 Boger(1984)는 담수녹조류인 *Senedesmus acutus*를 재료로한 연구에서 세포내 엽록소 파괴현상이 막구성 지질의 과산화반응과도 직접 관련됨을 그리고 그러한 산화반응적 엽록소 파괴에 대한 방어가 외부에서 α-토코페롤과 ascorbate와 같은 항산화제 처리에 의해 효과적으로 나타났음을 보고한 바 있다.

그러므로 본 실험에서 노쇠중인 밀잎에서 강력한 노쇠 억제호르몬인 BA의 엽록소 유지효과와 관련하여 BA의 막구조 안정화에 미치는 영향을 알기 위하여 세포막 수준에서 중요한 막구성 성분인 막단백질의 함량 및 조성의 변화에 미치는 BA의 효과를 조사하였으며 이때 동시에 밀잎의 막지질의 과산화반응 산물인 MDA 함량변화를 분석하였다.

**수용성 및 불용성 단백질 함량의 변화.** Hashimoto

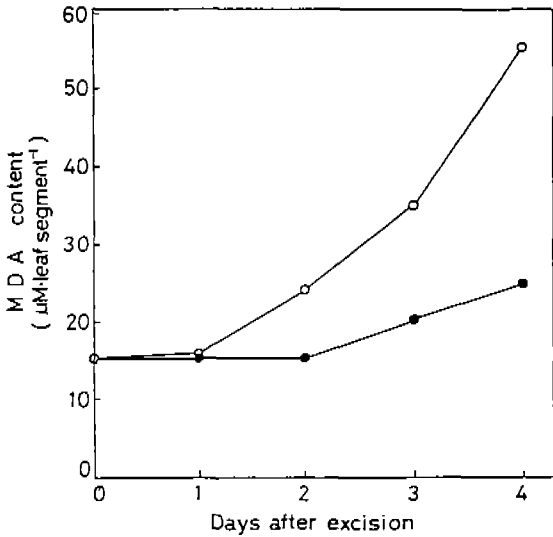


Fig. 3. Changes of MDA (malondialdehyde) content in senescing wheat leaf segment treated with or without  $10^{-5}$  M benzyladenine for 4 days in dark.  $\circ$ —, Control;  $\bullet$ —, Benzyladenine.

등(1989)은 벼잎에서 노쇠진전에 따른 광합성의 비활성화 연구를 수행하면서 일단백질 중 수용성단백질함량과 불용성단백질(막단백질) 함량의 변화를 나누어 조사하였는데 이때 두 단백질 함량이 모두 감소함을 관찰하였다. 본 실험에서도 4일간의 암배양을 통한 노쇠기간 중 단백질함량의 변화를 보면(Fig. 2) 대조구 잎에서 수용성과 불용성 단백질 함량의 모두가 급속히 감소되고 있었으나 BA 처리구 잎에서는 두 종류의 단백질 함량의 감소가 모두 대조구에 비해 억제되어 나타났다. 특히 수용성단백질에 비하여 불용성단백질 함량의 감소가 크게 억제되었으며 이 억제효과는 암배양시간이 길어질수록 크게 나타났다(Fig. 2). 즉, BA의 단백질 소실억제효과는 수용성단백질보다는 불용성단백질 분해지연에 더 크게 나타났으며, 이는 노쇠 중인 밀잎에서 BA가 막단백질의 분해를 억제하여 막의 안정화에 큰 기여를 하는 것으로 생각하게 한다.

이 불용성단백질들은 막구조의 유지, 이온의 수송 등과 같은 중요한 세포의 기능을 중재하는 원형질막 구성단백질을 포함하고 있으나 Hashimoto 등(1989)에 의하면 그 대부분은 광합성 수행과 관련된 엽록체의 틸라코이드막 구성단백질들로 이루어졌다고 한다. 본 실험에서도 BA로 처리된 잎에서 암배양의 전기간 동안에 불용성 단백질 함량의 높은 유지현상은 Fig. 1의 엽록소 유지경향과 잘 일치하여 나타나고 있었다.

**MDA 함량의 변화.** Dhindsa 등(1981)은 담배잎의 초기 성장중에는 MDA 함량이 낮은 수준으로 일정량 존재하다가

그후 잎의 노쇠가 진전됨에 따라 급속하게 증가한다는 결과를 보고하였으며 Kunert와 Ederer(1985)도 일년생 너도밤나무 잎과 다년생 전나무 잎을 재료로하여 잎의 나이와 관련하여 MDA 함량을 조사한 결과 MDA 함량은 잎의 나이에 따라 증가되며 세포막에 축적된다는 것을 확인하였다.

밀잎을 사용한 본 실험에서도 Fig. 3에서 보여지는 바와 같이 암처리에 의해 인위적으로 노쇠가 유도된 대조구 잎에서는 암배양 1일 이후부터 노쇠진행과 더불어 급속한 MDA 함량의 증가가 일어나고 있어 밀잎세포내 지질의 과산화반응이 빠르게 진전됨을 알 수 있었다. 그러나 BA 처리구 잎에서는 암배양 2일이 지난 후에야 조금씩 증가하는 경향을 보여주어 BA에 의한 지질의 과산화반응 억제효과가 명백함을 보여주었다.

이때 밀잎에서 암배양 시간의 경과에 따른 MDA 축적의 변화양상은 막단백질 소실량의 변화 경향(Fig. 2)과 시간적으로 유사하게 나타났다. Pauls와 Thompson(1982)은 강력한 산화제인 오존이 처리된 콩자엽내 microsome 막의 파괴현상에 대한 연구에서 BA와 항산화제의 효과를 조사하였는데 이때 BA와 propyl gallate와 같은 항산화제는 지질의 과산화반응을 억제하고 동시에 microsome의 막단백질 함량의 소실을 지연시켰음을 보고한 바 있다. 특히 Casano 등(1990)은 귀리잎에서 순수분리된 엽록체 현탁액에 강한 빛과 고농도의 산소를 처리하였을 때 엽록체 막 지질의 과산화반응이 촉진되면서 MDA 함량이 증가하고 그에 따른 엽록체 단백질의 분해속도가 빠르게 진전됨을 보고하였다. 그러므로 BA 처리에 의한 막단백질의 분해 억제 효과는 지질의 과산화반응계 조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 추정된다.

**노쇠중 불용성단백질 및 틸라코이드막 단백질 조성의 변화.** 노쇠중인 밀잎에서 불용성단백질 함량의 변화와 관련하여 전체 불용성 단백질 조성의 변화와 엽록체 틸라코이드막 단백질 조성의 변화 및 그에 대한 BA의 효과를 SDS-PAGE법으로 분석하였다(Fig. 4 and 5).

불용성 일단백질의 대부분은 엽록체 막단백질로 이루어져 있으며(Hashimoto *et al.*, 1989) 나머지 일부가 엽록체를 제외한 기타의 세포막단백질로 구성되어 있음(Soudain, 1992)이 보고되고 있다. 즉, Hashimoto 등(1989)은 노쇠 중인 벼잎에서 불용성 일단백질에 대한 SDS-PAGE 분석결과 정량적으로 대부분을 차지하는 단백질이 광합성의 감소와 함께 빠른 속도로 분해되는 점으로 보아 이들 단백질이 엽록체 틸라코이드막에서 유래된 것으로 분류하였으며, 그리고 나머지 소수의 단백질들은 원형질막을 포함한 기타의 세포막 구성단백질로 보았다.

노쇠중인 밀잎을 이용하여 SDS-PAGE 분석을 수행한 본 실험에서도 전체 불용성단백질의 조성(Fig. 4)과 동일

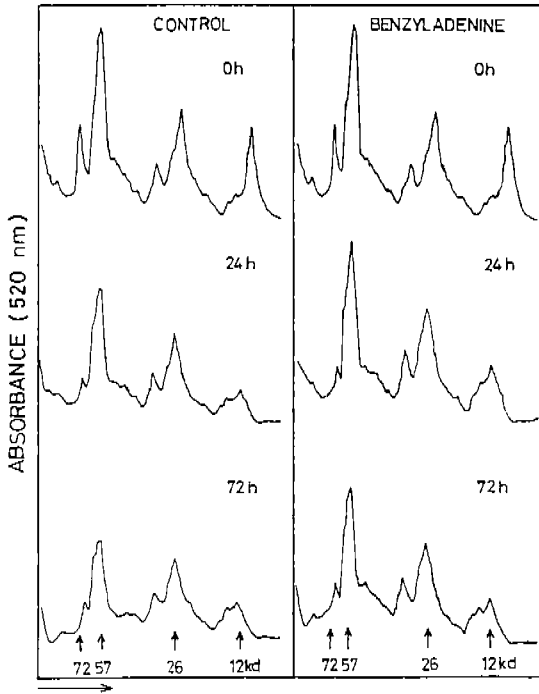


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scans of insoluble proteins of wheat leaf segments incubated in the dark with  $10^{-5}$  M benzyladenine or not. Dark incubation periods are 0 h, 24 h and 72 h, respectively. Each gels were scanned at 520 nm after Coomassie Brilliant Blue R staining.

앞에서 분리된 엽록체 틸라코이드 단백질 조성(Fig. 5)을 비교시 서로 유사한 단백질 조성의 유형(59-57 KD와 26 KD 분자량을 지닌 단백질들이 우점하여 분포)을 보여주고 있어 Hashimoto 등(1989)의 견해를 입증해주고 있다. Fig. 4에서 보여지는 것과 같이 노쇠현상이 유도되기 직전 전체 불용성단백질 중 57 KD, 26 KD 및 12 KD 단백질들이 양적으로 현저하게 우점으로 존재하고 있었으나, 대조구 잎의 경우 암배양을 통한 노쇠현상의 진전에 따라 72 KD, 57 KD 및 12 KD 단백질들이 모두 현저하게 감소하고 있었으며 다만 분자량 및 다른 보고(Nettleton *et al.*, 1985; Bricker and Newman, 1981)에 근거하여 볼 때 LHCP(light harvesting chlorophyll a/b protein complex)의 apoprotein으로 생각되는 26 KD 단백질만이 노쇠가 크게 진행된 암배양 72시간 후에도 약간 감소하였을 뿐 비교적 안정된 모습을 보여주고 있었다. 이러한 결과 26 KD 단백질량에 대한 57 KD 단백질량의 비율이 노쇠후기로 갈수록 크게 감소되어가는 경향을 나타내었다. 그러나 BA로 처리된 잎의 경우에는 암배양 72시간 후까지도 72 KD와 12 KD 단백질이 대조구

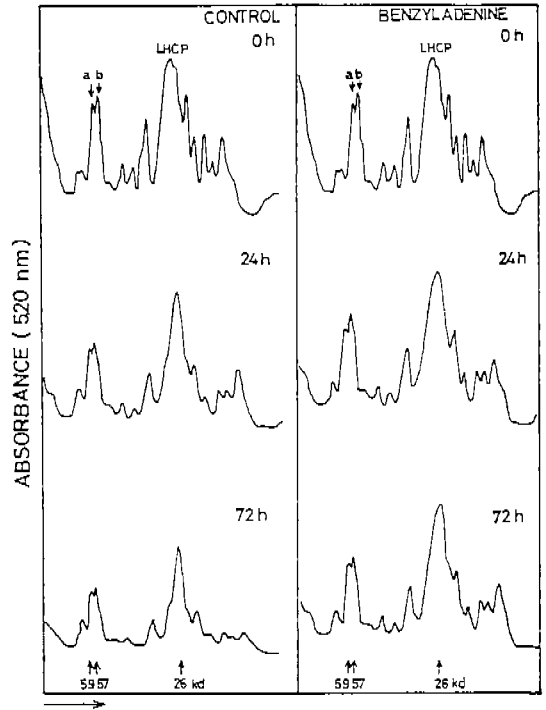


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic scans of chloroplast thylakoid membrane proteins isolated from wheat leaf segments incubated in the dark with  $10^{-5}$  M benzyladenine or not. Dark incubation periods are 0 h, 24 h, and 72 h, respectively. Gels were scanned at 520 nm after staining. Symbols of a, b and LHCP represent the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of coupling factor ( $H^+$ -ATPase), the apoprotein of light harvesting chlorophyll protein complex, respectively.

경우에서와 같이 빠르게 분해되는 점만 제외하고는 나머지 단백질들의 분해가 억제되어 안정된 상태를 보여주었으며 그 결과 26 KD 단백질량에 대한 57 KD 단백질량의 비율이 노쇠전 시기나 노쇠가 많이 진행된 72시간 후에도 거의 비슷하게 유지되었다. 이러한 현상은 외부에서 가해진 BA가 밀잎의 노쇠현상지연시 막단백질의 분해를 억제하여 물리적인 세포막구조의 안정화를 통해서도 잎의 노쇠진행을 억제할 수 있음을 보여주는 결과로 해석할 수 있다.

Fig. 5는 암배양을 통해 노쇠중인 각 밀잎에서 노쇠진행시기에 따라 대조구 잎과 BA로 처리된 잎에서 엽록체를 각각 순수분리하여 엽록체 틸라코이드막 단백질 조성의 변화를 분석한 결과이다. 틸라코이드막 구성단백질에는 몇 가지 기능적인 단백질들이 규명되어 왔는데, 그 중 틸라코이드막 구성단백질 중 단일 단백질로서 양적으로 가장 풍부하여 50% 이상을 점유하고 있는 26 KD의 LHCP의

단백질과 LHCP보다는 작지만 비교적 많은 양을 차지하는 59 KD와 57 KD의 분자량을 지닌 CF(Coupling factor:  $H^+$ -ATPase)의  $\alpha$ 와  $\beta$  subunits(Nettleton *et al.*, 1985; Dalling and Nettleton, 1986) 등이 있으며 이들 단백질과 비교하여 볼 때, 극히 작은량을 점하고는 있지만 60 KD의 CPI의 단백질도 알려져 왔다(Kura-Hotta *et al.*, 1987).

Fig. 5에서 보여지는 바와 같이 본 실험에서 분석된 밀 잎의 엽록체 틸라코이드막 단백질 조성에서도 분자량이 26 KD인 단백질이 단일 단백질로서 전체 단백질량 가운데 50% 정도를 점유하고 있는 것으로 보아 LHCP 단백질이 틀림없으며 또한 이보다는 작은량을 차지하지만 다른 단백질보다는 비교적 큰 59 KD와 57 KD의 분자량을 지닌 CF의  $\alpha$ 와  $\beta$  subunit가 명확히 분리되었으며 이밖에도 그 성질이 아직 분명하지 않은 단백질들이 소량으로 분리되었다.

72시간 암배양에 따른 엽록체의 노쇠현상 유도시 전체 틸라코이드막 단백질 조성의 변화를 보면 대조구 앞에서 분리된 엽록체의 경우 전반적으로 모든 단백질들이 분해되어 감소되고 있어 암배양 72시간 경우에는 LHCP와 CF의 단백질을 제외하고는 57-26 KD 사이의 단백질들과 25 KD 이하의 단백질들이 거의 다 소실되었으며 CF 단백질들도 많은 양이 분해 소실되었다. 그러나 상대적으로 LHCP 단백질만이 분해속도가 비교적 느려 많은 양이 남아 있었다. 이러한 사실은 벼잎의 엽록체 틸라코이드 단백질 중 25 KD의 LHCP 단백질이 가장 안정한 단백질이라는 보고(Kura-Hotta *et al.*, 1987; Hashimoto *et al.*, 1989)와도 일치하고 있다. 그러나 BA로 처리된 엽록체 틸라코이드 막단백질 조성의 변화를 보면 잎이 노쇠하는 동안 대조구 엽록체와 비교하여 볼 때 정성적으로는 큰 변화가 없었으나 정량적으로는 LHCP 및 CF의  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits를 포함한 전체 틸라코이드 단백질 분해가 크게 억제되어 암배양 72시간의 경우에도 거의 모든 단백질들이 노쇠가 아직 나타나기 직전의 안정된 모습을 보여주었다.

이런 결과는 BA가 엽록체 틸라코이드막 구조유지에 효과가 있음을 보여주는 것이다. Dalling과 Nettleton(1986)은 Kinetin 처리시 엽록체 미세구조에 대해 갖는 효과를 연구하면서 Kinetin은 엽록체 그라나를 안정화시킨다고 보고한 바 있다. 즉 그들은 Kinetin에 의해 틸라코이드 구성물질이 온전한 상태로 유지되면 그로인해 단백질 분해효소가 틸라코이드 막단백질에로의 접근이 제한받게 되어 결국 막단백질의 분해가 억제된다고 제안하였다. 최근 Casano 등(1990)도 틸라코이드막 내에 축적되는 MDA로 인하여 막의 변형이 유도되고 그 결과 막에 결합된 protease의 활성증가로 막단백질이 분해가 촉진될 수 있음을 보고하였다. 그러나 Gardner(1979)는 막단백질이 MDA와 직접 화학적으로 결합되어 schiff 염기를 형성하고 그로인해

protein 라디칼의 생성을 초래하게 되어서 단백질 절단 및 분해를 만들어 낸다고 발표하였다.

그러므로 BA는 노쇠중인 밀잎에서, MDA 함량변화(Fig. 3)와 Gardner(1979) 및 Casano 등(1990)의 보고와 관련지어 볼 때, 막지질의 과산화반응 억제제를 통하여 불용성 단백질과 엽록체 틸라코이드막 단백질의 분해를 지연시키며 이들 막단백질의 소실억제에 의해 세포막, 특히 엽록체막의 구조가 안정화 된다는 것을 알 수 있었다.

## 적 요

암배양을 통한 노쇠중인 밀 제1엽에서 지질의 과산화반응과 불용성 막단백질의 조성 및 엽록체 틸라코이드 막 단백질 조성의 변화에 대한 BA의 효과가 조사되었다. 성숙한 밀 제1엽을 잘라내어 4일간의 암배양을 통한 노쇠 유도실험에서  $10^{-5}$  M Benzyladenine(BA)은 노쇠중인 밀 잎에서 엽록소 함량 및 수용성과 불용성 단백질 함량의 감소를 크게 억제시켰다. 특히, 단백질 함량 감소에 대한 BA의 억제효과는 수용성 보다는 불용성 단백질에 있어서 더욱 현저하였다. 또한, BA로 처리된 잎에서 지질의 과산화물인 MDA 함량의 증가가 억제되었다.

불용성 단백질에 대한 SDS-전기영동 결과 양적으로 현저한 57, 26 및 12 KD 단백질이 다른 소량의 단백질 무리와 함께 분리되었다. 대조구에서의 불용성단백질 조성의 변화는 72시간의 암배양동안 57 KD와 12 KD 단백질이 현저하게 분해 소실되었으나 26 KD 단백질은 비교적 분해가 덜 일어났으며 BA 처리시 이들 단백질의 소실이 크게 억제되었다.

엽록체 틸라코이드막 단백질 조성의 경우, 각각 CF의  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits인 59 KD 단백질과 57 KD 단백질 및 LHCP 단백질인 26 KD 단백질을 포함하는 20개 정도의 단백질이 SDS-전기영동상에서 분리되었다. 72시간의 암배양 동안 대조구 엽록체에서 이들 단백질들이 급속히 분해 소실되었으나 BA로 처리된 엽록체의 경우 이들 단백질의 분해가 정량적으로 크게 억제되었다.

위의 결과들은 BA가 노쇠중인 밀잎에서 막지질의 과산화반응 억제제를 통해 막단백질의 손실을 지연시키며 그로 인하여 엽록체 틸라코이드막을 포함한 세포막이 유지될 수 있음을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- Arnon, D.L. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-5.
- Bricker, T.M. and D.W. Newman. 1980. Quantitative changes in the chloroplast thylakoid polypeptide complement

- during senescence. *Z. Pflanzenphysiol.* **98**: 339-346
- Casano, L.M., L.D. Gomez and V.S. Trippi. 1990. Oxygen and light induced proteolysis in isolated oat chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **31**: 377-382
- Dalling, M.J. and A.M. Nettleton. 1986. Chloroplast senescence and proteolytic enzymes. In, *Plant Proteolytic Enzymes*, M.J. Dalling (ed.), Vol. II, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 125-153.
- Dhindsa, R.S., P. Plumb-Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dimutase and catalase. *J. Exp. Bot.* **52**: 93-101.
- Gardner, H.W. 1979. Lipid hydroperoxide reactivity with protein and amino acid: A review. *J. Agric. Food Chem.* **27**: 220-229.
- Hashimoto, H., Kura-Hotta and S. Katoh. 1989. Changes in protein content and in the structure and numbers of chloroplasts during leaf senescence in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **30**: 707-715.
- Heath, R.L. and L. Packer. 1986. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of acid peroxidation. *Arch. Biochem. Physiol.* **125**: 189-198.
- Huffaker, R.C. 1990. Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol.* **116**: 199-231.
- Kar, M. and J. Feierabend. 1984. Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta* **160**: 385-391.
- Kato, M. and S. Shimizu. 1985. Chlorophyll metabolism in higher plant VI. Involvement of peroxidase in chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol.* **26**: 1291-1301.
- Kunert, K.J. and M. Ederer. 1985. Leaf aging and lipid peroxidation: The role of the antioxidants vitamin C and E. *Physiol. Plant.* **65**: 85-88.
- Kunert, K.J. and P. Boger. 1984. The diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. Action of antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* **32**: 725-728.
- Kura-Hotta, M., K. Satoh and S. Katoh. 1987. Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **28**: 1321-1329.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
- Lowry, H. N.J. Rosenbrough, A.J. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lurie, S. and R. Ben-Arie. 1983. Microsomal membranes changes during the ripening of apple fruit. *Plant Physiol.* **73**: 636-638.
- Murphy, D.J. and D.A. Walker. 1982. Acetyl coenzyme A biosynthesis in chloroplast. *Planta* **156**: 84-88.
- Nettleton, A.M., P.L. Bhalla and M.J. Dalling. 1985. Characterization of peptide hydrolase activity associated with thylakoid of the primary leaves of wheat. *J. Plant Physiol.* **119**: 35-43.
- Pauls, K.P. and J.E. Thompson. 1982. Effects of cytokinins and antioxidants on the susceptibility of membrane to ozone damage. *Plant Cell Physiol.* **23**: 821-832.
- Pukacka, S. 1991. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural aging of seeds of *Acer platanoids*. *Physiol. Plant.* **82**: 306-310.
- Reddy, K.P., S.M. Subhani, P.A. Khan and K.B. Kumar. 1985. Effect of light and benzyladenine on dark-treated growing rice (*Oryza sativa*) leaves II. Changes in peroxidase activity. *Plant Cell Physiol.* **26**: 987-994.
- Soudain, P., J. Guclu, D. Bureau, P. Pilard, C. Joulie, and J. Daussant. 1992. Purification of plasma membrane and protein composition changes during ripening and senescence of cherry tomato. *J. Plant Physiol.* **139**: 257-264. (1992. 4. 1 接受)