

귀리잎의 基底部 節間分裂組織에서 分離한 原形質體의 暗呼吸 活性에 미치는 ABA와 Ca²⁺의 抑制效果

尹 惠 源 · 陳 昌 德¹ · 洪 英 男*

서울大學校 自然科學大學 生物學科, ¹江原大學校 自然科學大學 生物學科

본 연구는 귀리잎 기저부 절간 분열조직의 원형질체 암호흡에 미치는 ABA와 칼슘의 효과를 조사하였다. 동시에 암호흡동안 세포막내 칼슘통로 및 칼모듈린의 관련 가능성을 조사하기 위해 세포막의 칼슘통로 차단제인 diltiazem (DTZ), verapamil(VPM), 및 LaCl₃ 그리고 칼슘-칼모듈린 결합 저해제인 trifluoperazine(TFP)이 원형질체 호흡 활성에 미치는 영향을 분석하였다. Abscisic acid 단독 처리시 10⁻⁶ M 농도에서 21%의 호흡억제를 보였으며, ABA가 처리되지 않은 상태에서는 칼슘에 의한 호흡감소 현상이 거의 나타나지 않았다. 그러나 10⁻⁶ M ABA 존재시 칼슘농도의 증가에 따라 현저한 호흡감소가 일어났다. 정도차이는 있었지만 DTZ나 VPM처리로 ABA와 칼슘에 의해 억제되었던 호흡활성이 회복되었으며 LaCl₃ 처리시에도 10⁻⁴ M 농도를 제외하고는 유사한 결과를 보였고 TFP는 10⁻⁶ M에서 10⁻⁴ M 농도범위에서 처리농도가 증가될수록 ABA에 의한 호흡억제를 회복시켰다. 이상의 결과로부터 ABA는 칼슘에 대한 agonist로서 세포막의 투과성을 증대시켜 칼슘 유입을 촉진시키고 그로인해 유입된 칼슘이 칼모듈린과 결합하여 귀리 원형질체 암호흡을 조절하는 것으로 생각되었다.

주요어: ABA, 암호흡, diltiazem, verapamil, trifluoperazine

식물 생장조절물질인 ABA는 관다발식물의 여러 발달과정에 중요한 역할을 하고 있다(Addicott, 1983). Abscisic acid에 대한 조직의 생리적 반응은 잘 보고되어 있으나 아직도 세포 수준에서 ABA의 분자적 작용 메카니즘은 충분히 이해되지 않고 있다(Walbot *et al.*, 1975a; Owen, 1988; Bush, 1993).

Abscisic acid가 세포 수준에서의 막과 연관된 반응에 영향을 미칠 수 있다는 연구로부터(Ho, 1983), 최근 주로 막을 가로 지르는 물질 수송에 ABA가 관여하는 것으로 알려지고 있다(Van Steveninck and Van Steveninck, 1983; Bowler and Chua, 1994). 특히 지질 대사에 관여하여 막조성을 변화시킴으로서 확산투과도에 영향을 미칠 수 있으리라는 것과 그 자체가 막구조에 끼어들어서 막투과성을 변화시킬 수도 있다는 사실이 보고되었다(Rubery and Astle, 1982). 또한 ABA는 K⁺의 수송과 관련된 양성자 펌프에서 급작스럽게 양성자 통로를 여는데 관계하는 것으로 알려졌다(Schaufl and Wilson, 1987). 더욱이 최근에 와서는 이러한 ABA의 작용에 있어서 Ca²⁺이 호르몬의 transducer와 외부환경에 대한 세포대사의 반응요소로서의 중요성에 관하여 많은 연구가 진행되고 있는데 이는 ABA가 *Commelina* 잎의 기공이 열리는 것을 억제하는 효과가

Ca²⁺에 의존하는 것을 발견함으로써 시작되었다(Hetherington *et al.*, 1986). 또한 ABA는 Ca²⁺의 agonist로 작용해서 세포내로 Ca²⁺의 유입을 유도하고 유입된 Ca²⁺은 Ca²⁺ 결합 단백질인 칼모듈린과의 작용에 의해 기공이 열리는 것을 억제하게 된다는 것이 다양한 Ca²⁺ 통로 차단제를 이용한 연구에서 입증되었다(Clint, 1985; Assmann, 1994).

이와 같은 연구들을 토대로 ABA가 호흡에 미치는 효과에 대한 연구에 Ca²⁺에 대한 agonist로서 ABA의 기능이 적용되었다. 그러나 ABA가 호흡에 미치는 효과에 대해서는 아직도 논란의 여지가 많은데 Walbot 등(1975b)은 ABA가 산소의 소비를 감소시킨다고 보고하였으며, Hemberg(1978)는 ABA의 호흡활성 증진효과를 동물세포에서 일어나는 것과 유사한 메카니즘으로 일치시키려고만 하였을 뿐 구체적인 작용 메카니즘은 언급하지 않았으며, 인산염 존재시의 간섭효과로 인한 호흡의 증가(Earnshaw and Cooke, 1984)는 고려하지 않았으므로 비판의 대상이 되었다. 최근에 와서는 미토콘드리아의 산소호흡에 칼슘 신호전달자 시스템(Marmé, 1986; Poovaiah *et al.*, 1987)을 적용하여 설명하려는 시도가 있으나 이것 역시 상반된 의견으로 갈라져 있다.

따라서 본 실험에서는 귀리 제1엽의 기저부 절간 분열조직 원형질체의 암호흡 활성에 영향을 미치는 ABA와 Ca²⁺의 호

*교신저자: Fax (02) 872-6881
© 한국식물학회 [서울] 1995

과를 관찰하고자 Ca^{2+} 통로 차단제를 이용하여 Ca^{2+} 통로의 존재를 간접적으로 증명함과 동시에 ABA가 Ca^{2+} 의 agonist로서 작용하는가를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

재료식물

본 실험에 사용된 귀리 종자(*Avena sativa* L. cv Meguir)는 맥류연구소에서 분양받은 품종으로서, 선별된 종자를 1%(v/v) sodium hypochlorite 용액에 30분간 담구어 표면 살균한 후 공기가 계속 주입된 증류수에서 48시간 침윤시켰다. 그 후 종자를 여과지(Toyo No. 2) 3장을 깔고 20 mL의 증류수를 넣은 투명한 폴리프로필렌 용기(115 mm×115 mm×109 mm)에 64개씩 파종하고 뚜껑을 덮은 다음 암상자에 넣고 2일에 한번씩 20 mL의 증류수를 공급하면서 $25 \pm 1^\circ C$ 의 배양기 내에서 성장시켰다.

암호흡을 측정하기 위한 최적 부위의 선정 및 활성도 측정

자엽초를 끊고 나온 8일된 제1엽에서 자엽초를 면도날로 제거하고 절간 분열조직의 기저부로부터 1 cm 간격으로 5 cm까지 5개의 절편으로 잘라서 15 mL의 7.5 mM HEPES-KOH 완충용액(pH 7.6)이 들어있는 petridish(ϕ 9 cm)에 10 개씩 띄우고 동일 조건의 배양기 내에서 암배양했다. 잎절편에서 암호흡 활성도는 2시간 배양 후 10개의 절편을 5 mL의 배양용액에 넣고 $25^\circ C$ 에서 암처리한 상태로 Clark-type oxygen electrode(Yellow Spring Instr. OH. U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 그 결과 호흡활성이 가장 높은 부위인 절간 분열조직의 기저부로부터 1 cm까지의 조직을 선정했다.

원형질체의 분리

귀리의 제1엽에서 자엽초를 제거하고 절간 분열조직의 기저부로부터 1 cm까지의 조직을 0.1 cm 간격으로 면도날로 잘랐다. 준비된 35개(약 0.2 g)의 잎조각을 0.6 M mannitol, 2 mM ascorbic acid, 10 mM L-arginine, 2 mM $CaCl_2$, 0.5% (w/v) bovine serum albumin(BSA)이 포함된 5 mM MES-KOH 완충용액(pH 5.6) 5 mL에 30분간 방치하였다.

원형질체 분리에 사용된 효소는 cellulase R-10(Yakult, Japan)과 macerozyme R-10(Yakult, Japan)이며 각각 3%, 1.5% (w/v)로 섞어 stock solution으로 사용하였다. 효소용액은 Van der Walk(1984)의 방법에 따라 $50^\circ C$ 에서 10분간 가열하고 급히 식힌 후 사용하기 전까지 보관하였다. 잎절편이 들어있는 배

양액에 준비된 효소용액 5 mL을 넣어 cellulase와 macerozyme이 각각 1.5%, 0.75%(w/v)가 되게 잘 혼합한 다음 30분간 orbital shaker에서 흔들어서 주었다. 이것을 $30^\circ C$ 의 수조에 넣고 3시간 동안 진탕배양하여 원형질체가 유리되게 하였다.

원형질체의 순수분리는 Hampp와 Ziegler(1980)의 방법을 변형하여 사용하였다. 유리된 원형질체와 잎절편이 들어있는 용액을 60 μm 의 stainless steelmesh에 걸어서 잎절편을 제거하였다. Mesh 위에 남은 절편은 5 mM MES-KOH(pH 5.8), 0.6 M mannitol, 1 mM $CaCl_2$ 로 이루어진 세척용액 2 mL로 3번 씻어내었다. 이렇게 씻어낸 용액과 잎절편을 걸러서 얻어낸 원형질체 현탁액을 합하여 800 g에서 5분간 원심분리하고 상정액은 버렸다. 원형질체의 침전물에 0.5 M sucrose와 1 mM $CaCl_2$ 로 된 원형질체 분리용액 I을 0.5 mL 넣고 흔들어서 주었다. 그 후 5 mL의 원형질체 분리용액 I을 더 넣고 뚜껑을 닫아 부드럽게 뒤집어서 쉬었다. 여기에 5 mM MES-KOH(pH 6.0), 0.4 M sucrose, 0.1 M mannitol, 1 mM $CaCl_2$ 로 구성된 원형질체 분리용액 II를 섞이지 않도록 조심스럽게 넣어서 층을 만들었다. 그리고 그 위에 1 mL의 5 mM MES-KOH 완충용액(pH 6.0), 0.5 M mannitol, 1 mM $CaCl_2$ 로 구성된 원형질체 분리용액 III을 넣어 또 한층을 만들었다.

이것을 800 g에서 2분간 원심분리한 후 원형질체 분리용액 II와 III 사이에 모여있는 원형질체를 1 mL의 피펫으로 뽑아내었다. 이렇게 모아진 원형질체 현탁액에 원형질체 분리용액 III을 5부피 이상 넣은 후 800 g에서 5분간 원심분리하여 상정액을 조심스럽게 버리고 난 후 정제된 원형질체 침전물을 얻었다. 이것을 7.5 mM HEPES-KOH 완충용액(pH 7.6), 0.6 M mannitol, 0.5% BSA로 구성된 용액 1 mL와 잘 섞고 흔들어서 준 후 실험에 사용할 때까지 암처리하여 냉장고에 보관하였다.

원형질체의 농도 측정

원형질체의 생존력은 0.025%(w/v) fluorescein diacetate 염색으로 확인하였으며 용액내의 원형질체 농도는 haemocytometer로 측정한 원형질체의 숫자와 분광광도계를 이용하여 450 nm에서 측정한 흡광도를 비교하여 환산하였다.

원형질체의 암호흡 활성도 측정

원형질체의 산소 소비는 $25 \pm 1^\circ C$ 의 배양기에서 2시간 동안 검은 천으로 덮은 다음 암상자에 넣어 배양한 후 $25^\circ C$ 에서 Clark-type oxygen electrode로 측정하였다.

각 처리용액은 7.5 mM HEPES-KOH(pH 7.6), 0.6 M mannitol, 0.5% BSA를 기준으로 하여 ABA, Ca^{2+} , EGTA, $LaCl_3$, trifluoperazine(TFP), diltiazem(DTZ), verapamil(VPM) 각각을

stock solution으로 만들어 최종 농도에 이르도록 하여 사용하였다.

산소 소비량의 측정은 1 mL당 10⁵개의 원형질체가 들어있는 현탁액을 3 mL씩 sample chamber에 넣고 3분간 공기로 평형이 되게 한 다음 5분 동안 산소의 소모량을 측정하였다. 용액내의 산소농도는 공기로 평형을 맞추었을 때 25°C, 1기압에서 산소농도를 5.98×10⁻⁹mg O₂·mL 표준용액으로 계산하였다.

결 과

ABA와 Ca²⁺이 기저부 절간 분열조직의 암호흡에 미치는 효과

기저부 절간 분열조직 원형질체의 암호흡에 미치는 ABA의 작용을 알아보기 위해 ABA의 효과적인 농도를 조사하였다 (Table 1). Abscisic acid는 기저부 절간 분열조직의 암호흡 억제효과를 나타냈는데, 대조구에 비하여 10⁻⁸ M과 10⁻⁷ M ABA 처리구에서는 각각 7%, 11%의 호흡억제를 가져왔으나 10⁻⁶ M과 10⁻⁵ M ABA 처리시는 21%, 23%의 호흡억제를 가져왔다.

유리 Ca²⁺은 식물의 대량원소로서 뿐만 아니라 물질대사와 발달에 주요한 세포기능의 조절자로서 큰 의의를 갖고 있다. 즉, 2차 신호전달자로서 외부의 자극을 여러가지 생리적 반응으로 변환시킨다. 그러므로 암호흡에 대한 ABA효과에 있어 Ca²⁺의 작용을 조사함은 매우 바람직하다. 그러나 동물세포에서 Ca²⁺에 의한 호흡촉진에 대한 연구는 조사됐으나 식물 미토콘드리아에 대한 Ca²⁺작용의 연구는 미흡한 실정이다. 특히 아직까지 미토콘드리아의 Ca²⁺의 유입과 유출의 생화학적 의의는 잘 모르고 있다. 10⁻⁶ M ABA의 농도하에서 Ca²⁺이 암호흡에 미치는 효과를 알아보았는데(Fig. 1), ABA가 없는 경우에는 10⁻⁵ M~10⁻² M의 CaCl₂ 처리구에서 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나, 10⁻⁶ M ABA가 존재할 때에는 10⁻³ M 이상의 CaCl₂ 존재시에 산소의 소비가 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 대조구에 비하여 약 40% 가량 감소하는

Table 1. Effect of ABA concentrations on the respiratory O₂ consumption by meristematic protoplasts

Treatment	O ₂ consumption (f mol O ₂ ·protoplast ⁻¹ ·h ⁻¹)
Control	524± 15
ABA 10 ⁻⁸ M	483± 20
ABA 10 ⁻⁷ M	464± 34
ABA 10 ⁻⁶ M	414± 37
ABA 10 ⁻⁵ M	403± 38

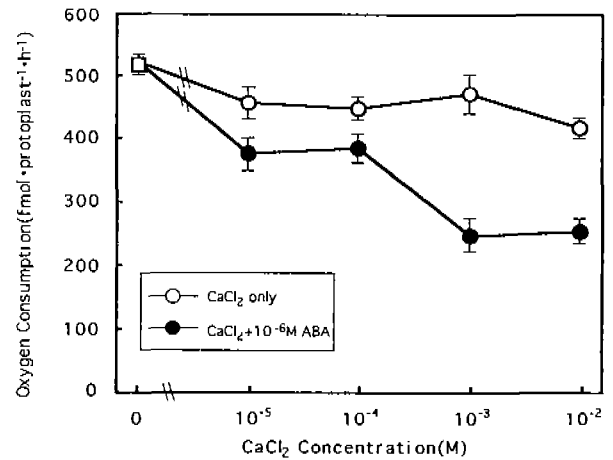


Fig. 1. Effect of CaCl₂ on the respiratory consumption of oxygen by meristematic protoplasts in the presence (●) and in the absence (○) of 10⁻⁶ M ABA. Error bars = ± SE.

것으로 나타났다. 이것은 Ca²⁺이 단독으로 기저부 절간 분열조직의 암호흡 활성억제에 관여하는 것이 아니라 ABA의 존재를 필요로 함을 말해주는 것이다. 즉 이러한 ABA와 Ca²⁺의 협동적 작용에 관한 현상은 기공 개폐 메카니즘에서도 찾아볼 수 있다(De Silva *et al.*, 1985). 이미 Walbot 등(1975b)이 발아중인 콩과식물의 호흡을 ABA가 억제한다는 보고를 하면서 ABA의 일반적인 효과로서 간주하였으나, 본 실험의 결과에 의하면 ABA와 Ca²⁺의 협동적 메카니즘에 의해 더욱 뚜렷하게 나타남을 알 수 있었다.

Ca²⁺ 유입 억제에 의한 기저부 절간 분열조직의 암호흡 억제 회복

Abscisic acid에 의한 귀리잎 기저부 절간 분열조직 원형질체의 암호흡 억제가 Ca²⁺에 의해 더욱 증가한다는 결과(Fig. 1)로부터, 칼슘 킬레이터인 EGTA를 사용하여 ABA와 Ca²⁺의 호흡활성 억제효과가 회복될 수 있는지를 조사하였다(Fig. 2). EGTA 첨가시 현저한 호흡 활성의 회복을 관찰할 수 있었다. 즉 ABA와 CaCl₂ 첨가시 대조구에 비해 약 55% 이하의 호흡활성 억제를 관찰할 수 있었는데 여기에 10⁻⁴ M EGTA를 첨가한 경우 30%의 호흡활성의 회복을 가져왔다. 그러나 이러한 EGTA에 의한 호흡활성의 회복은 10⁻³ M, 10⁻² M로 EGTA의 농도를 증가시켜도 포화된 양상을 나타내었다.

이와 같은 호흡활성의 회복은 Ca²⁺이 원형질막 바깥쪽에 부착되어 있는 것보다는 주로 배지에 분포하고 있으므로 배지내의 유리 Ca²⁺을 EGTA가 킬레이트하여 세포내로 유입되는 것을 방지했기 때문으로 생각된다. 그러므로 좀 더 자세한

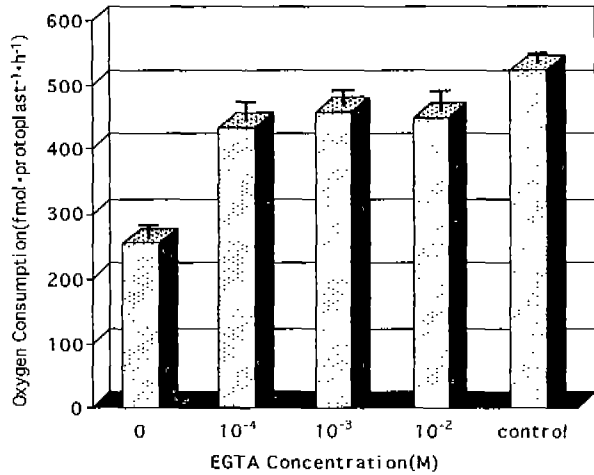


Fig. 2. Effect of EGTA on the respiration of meristematic protoplasts. All sample solution except control contain 10⁻⁶ M ABA and 10⁻³ M CaCl₂. Error bars = ± SE.

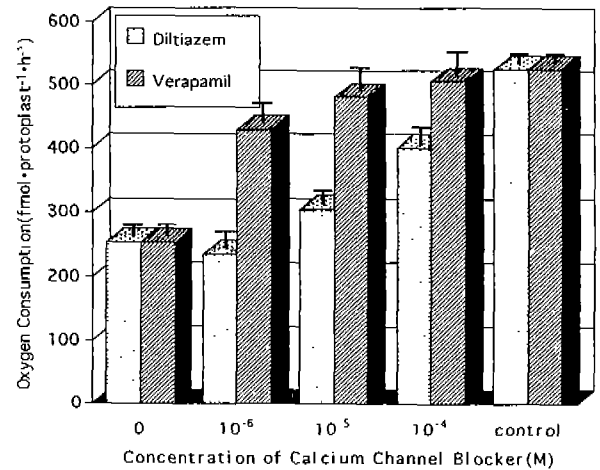


Fig. 3. Effect of calcium channel blocker on respiration of meristematic protoplasts. All sample solution except control contain 10⁻⁶ M ABA and 10⁻³ M CaCl₂. Error bars = ± SE.

관계를 알아보기 위하여 Ca²⁺ 통로 차단제를 처리하였다.

Ca²⁺의 유입과 관련하여 세포막의 Ca²⁺ 통로 차단제를 이용하여 ABA와 Ca²⁺의 효과를 제거할 수 있는지에 대하여 실험하여 보았는데, Fig. 3은 Ca²⁺ 통로 차단제인 DTZ와 VPM을 이용하여 Ca²⁺의 유입을 막은 결과를 나타낸 것이다. DTZ의 경우 10⁻⁶ M을 첨가했을 때는 ABA와 CaCl₂에 의해서 억제되었던 호흡을 거의 회복하지 못했고 10⁻⁵ M의 농도까지도 이와 유사한 결과를 보였으나, 10⁻⁴ M를 첨가하자 비로서 약 20% 정도 회복할 수 있었다. Verapamil의 경우에는 이와는 다소 다른 양상을 보였는데 10⁻⁶ M만 처리했을 때도 20% 이상의 호흡활성의 회복을 가져왔으며, 10⁻⁴ M 처리시에는 대조구와 거의 같은 양상을 나타내었다. 이와 같은 차이점이 나타나는 이유는 모든 Ca²⁺통로 차단제는 하나 이상의 작용 부위를 갖기 때문에 사용하는 조직이나 시약의 종류에 따라 다른 효과를 나타내는 것으로 생각된다(Godfraind, 1985). 본 실험의 경우 VPM이 DTZ보다 효과적으로 호흡억제 현상을 회복시켰다.

보통 Ca²⁺ 통로 차단제들은 외부로부터 Ca²⁺ 유입을 방지할 뿐만 아니라 세포 내부로부터의 방출 역시 저해한다. 이러한 Ca²⁺ 통로 차단제들의 효과는 주로 동물에서 많이 연구되고 있으며, Ca²⁺ 통로 존재의 간접적인 증거로 제시되고 있다 (Marmé, 1986). 따라서 본 실험에서는 VPM과 DTZ이 기저부 절간 분열조직의 암호흡 억제를 완화시키는 것을 통해 ABA와 이들의 작용부위는 같음을 알 수 있었다.

다음으로 Ca²⁺ 흡수의 경쟁적 억제제인 lanthanum이 ABA의 Ca²⁺ agonist로서의 효과에 미치는 영향을 알아 보았다 (Fig. 4). 이 경우 10⁻³ M까지의 LaCl₃가 어느정도 ABA에 의한

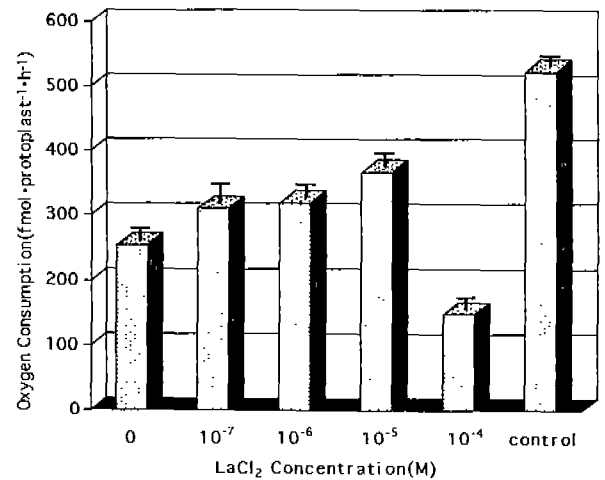


Fig. 4. Effect of lanthanum chloride on respiration of meristematic protoplasts. All sample solution except control contain 10⁻⁶ M ABA and 10⁻³ M CaCl₂. Error bars = ± SE.

호흡활성 억제를 회복하였으나 10⁻⁴ M 이상의 LaCl₃는 양이온적 효과가 가중되어 막 사이의 전위차를 교란시켜서 오히려 호흡활성을 더욱 억제하는 것이 아닌가 생각해 볼 수 있다.

이상의 결과에서 Ca²⁺ 통로 차단제가 ABA에 의한 호흡활성 억제를 회복할 수 있었으므로 기저부 절간 분열조직의 암호흡 활성억제에 Ca²⁺에 의해 조절되는 단백질인 칼모둘린의 역할을 알아보기 위해 칼모둘린 결합 저해제인 TFP을 사용하여 실험하였다(Fig. 5). 칼모둘린은 칼슘에 의해 조절되는 단백질로 세포 및 분자수준에서 칼슘작용에 매우 중요한 물질이다. Trif-

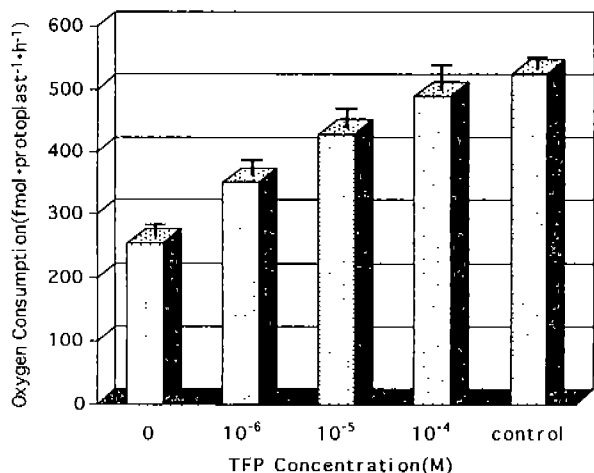


Fig. 5. Effect of trifluoroperazine on respiration of meristematic protoplasts. All sample solution except control contain 10⁻⁶ M ABA and 10⁻³ M CaCl₂. Error bars = ± SE.

luoperazine는 10⁻⁶ M ~ 10⁻⁴ M 범위에서 농도가 높아질수록 ABA의 호흡억제 효과가 회복되는 것으로 나타났다.

고찰

최근 식물 호르몬 연구에 있어 많은 진전이 이루어지고 있으나 호르몬에 대한 조직의 생리적 반응을 중재하는 세포내 2차 신호전달자의 정체 및 그 기능에 관해서는 대부분 미해결 상태로 남아 있다. 그리고 세포내 호르몬 작용에 있어 초기의 호르몬 수용체 분자들에 대한 동정 및 확인 연구도 이제 시작 단계에 와 있다(Asmann, 1994).

동물에서와 마찬가지로 식물에서도 Ca²⁺은 2차 신호전달자로서 많은 세포반응 조절에 관여하며 이는, Ca²⁺ 결합 단백질인 칼모듈린이 여러 식물종에서 분리, 특성화되었고(Marmé and Dieter, 1983), 식물 조직내 여러 효소의 활성도가 칼모듈린과 수 μmol 수준의 Ca²⁺ 농도에 의해 조절됨이 보고된 것(Hepler and Wayne, 1985)과 식물 세포막에 Ca²⁺ 통로 차단제가 결합된다는 증거(Hetherington and Trewavas, 1984) 등에 의해 입증되고 있다. 이들 연구 결과들은 Ca²⁺이 식물에서 ABA에 의해 유도되는 반응도 조절할 수 있는 2차 신호전달자가 될 가능성을 시사하는 것이다. 그러므로 이들 연구에 근거하여 본 실험에서는 귀리잎 기저부 절간 분열조직의 원형질체를 재료로 사용하여 원형질체 암호흡에 미치는 ABA와 Ca²⁺의 효과를 조사하였으며 동시에 Ca²⁺ agonist로서의 ABA 기능을 논의하였다.

ABA가 호흡에 미치는 효과에 대해서는 서로 상반되는 보고들이 발표되어 아직도 논란의 여지가 있다. Walbot 등(1975b)은 *Phaseolus vulgaris*의 배축을 재료로 최초 발아 24시간 동안에

ABA의 처리시간과 농도를 달리하면서 호흡량, RNA합성을 등에 대한 ABA효과를 조사하였는데 10⁻⁷ M ~ 10⁻⁴ M 농도에서 ABA는 RNA 합성을 억제하였으며 동시에 산소 소비를 감소시켰음을 보고하였다. 그러나 Hemberg(1978)는 감자 절편조직에 ABA처리시 산소 소비를 촉진시키고 무기 인산염 흡수를 억제함을 관찰하여 ABA는 호흡에 의한 전자전달과 인산화반응을 uncoupling하는 효과를 나타낸다고 제안하였으며, Owen 등(1987)은 보리 유식물의 기저부 절간 분열조직의 원형질체는 Ca²⁺이 존재할 때에 ABA 처리에 의해 호흡이 억제된다고 보고하였다. 이처럼 ABA가 호흡에 미치는 영향이 달리 나타나는 결과에 대해 Hemberg(1978)는 서로 다른 식물재료를 사용하였기 때문이라 하였으나 이 주장은 설득력이 없어 보인다. 왜냐하면 Ca²⁺이 존재할 때 ABA처리에 의해 호흡이 억제된다는 Owen 등(1987)의 보고와 또한 ABA가 *Commelina* 잎의 기공이 열리는 것을 억제시킬 때는 Ca²⁺이 요구된다는 Hetherington 등(1986)의 결과 및 식물에서도 Ca²⁺은 2차 신호전달자로서 세포내 대사과정이 조절에 관여한다는 점을 고려할 때 Walbot 등(1975b)과 Hemberg(1978)는 각각 그들의 실험에서 Ca²⁺ 요인을 고려하지 않아 비판의 대상이 될 수 있기 때문이다.

그러므로 본 실험에서는 호흡에 대한 ABA의 영향을 올바르게 분석하기 위해 귀리잎 기저부 절간 분열조직의 원형질체를 재료로 하여 호흡에 미치는 ABA와 Ca²⁺의 효과를 조사하였다(Table 1, Fig. 1). 먼저 Table 1에서 보는 바와 같이 ABA의 각 처리 농도에 따른 귀리 원형질체의 암호흡에 미치는 효과를 보면 분명히 10⁻⁶M 농도 이상에서는 ABA 단독으로도 호흡을 억제시키고 있었으나, Fig. 1에서처럼 호흡에 대한 Ca²⁺의 작용을 조사하였을 경우, ABA가 존재하지 않을 때에는 Ca²⁺에 의한 호흡감소 현상이 거의 나타나지 않은 데 비해 10⁻⁶M ABA 존재하에서는 Ca²⁺ 농도의 증가에 따라 현저한 호흡감소가 일어났다. 이 결과로 보아 ABA는 그 자체로도 호흡억제 효과를 보일 수 있지만 Ca²⁺과의 상호작용을 통해 호흡억제를 상승시키고 있음을 알 수 있었다.

Owen 등(1987)은 Ca²⁺ 통로 agonist인 BAY K8644가 보리 원형질체 암호흡을 유의성있게 억제시켰으며 이 현상은 ABA와 Ca²⁺을 같이 처리하였을 때 얻은 결과와 유사함을 관찰하고서 BAY K8644가 원형질체 내로 Ca²⁺ 유입을 증가 시킴에 의해 ABA 작용을 모방하는 것으로 해석하였다.

즉, 이 결과로부터 그들은 ABA가 Ca²⁺에 대한 세포막의 투과도를 증가시킨다는 것과 Ca²⁺이 미토콘드리아 호흡활성을 조절함을 제안하였다. 본 실험에서도 ABA에 의한 Ca²⁺ 의존성 호흡억제 발생시 세포막내 Ca²⁺ 통로 존재 및 칼모듈린의 관련 가능성을 평가하기 위해 세포막의 Ca²⁺ 통로 차단제인 DTZ, VPM 및 Ca²⁺ 흡수의 경쟁적 억제제인 LaCl₃ 그리고 Ca²⁺-

칼모듈린 결합 저해제인 TFP를 사용하여 암호흡 활성에 미치는 그들의 영향을 분석하였다(Figs. 3, 4 and 5). 정도차이는 있었지만 DTZ나 VPM처리시 모두 ABA와 Ca^{2+} 에 의해 억제되었던 호흡이 회복되는 현상을 보였다(Fig. 3). $LaCl_2$ 처리시도 10^{-4} M 농도를 제외하고는 $LaCl_2$ 농도가 증가할수록 호흡억제가 회복되고 있었다(Fig. 4). 이들 결과는 Ca^{2+} 통로 agonist BAY K8644를 이용한 Owen 등(1987)의 실험결과와 더불어 볼 때 귀리 원형질막 내에 Ca^{2+} 통로의 존재를 간접적으로 입증해 주는 것이 되며 ABA는 이 통로를 활성화시켜 Ca^{2+} 에 대한 세포막의 투과성을 변화시킨다. 이로 인해 Ca^{2+} 유입을 촉진시켜 호흡활성에 영향을 끼친다는 가설을 더욱 지지해 주는 것이 된다.

Ca^{2+} 2차 전달자 시스템에서 칼모듈린은 시토플asm Ca^{2+} 농도를 감지하는 단백질로 세포 및 분자수준에서 Ca^{2+} 작용에 중요한 구성원으로 알려졌다. 또한 많은 식물종에서도 칼모듈린의 분리가 보고되어(Marmé and Dieter, 1983) 귀리 암호흡 활성에 있어 ABA와 Ca^{2+} 의 효과와 관련하여 칼모듈린의 역할 가능성을 조사하였다(Fig. 5). 칼모듈린 결합 저해제인 TFP 처리시 ABA와 Ca^{2+} 에 의한 호흡억제가 회복되는 점으로 보아 TFP는 칼모듈린을 Ca^{2+} 전달계에서 불활성 상태로 만들어 그 결과 호흡활성의 억제로부터 회복되는 것으로 생각되었다.

이상의 결과에서 ABA는 귀리 기저부 절간분열조직의 암호흡 활성에 관여하며 이때 세포막의 투과성을 변화시켜 Ca^{2+} 의 유입을 촉진시키고 그로 인해 유입된 Ca^{2+} 이 칼모듈린과 결합하여 암호흡 활성을 억제시키는 것으로 생각할 수 있다.

사 사

이 논문은 서울대학교 발전기금 대우학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

- Addicott, F.T. 1983. Abscisic acid. Praeger Scientific Publisher, New York, 750 pp.
- Assmann, S.M. 1994. Ins and outs of guard cell ABA receptors. *Plant Cell* 6: 1187-1189.
- Bowler, C. and N.-H. Chua. 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* 6: 1529-1541.
- Bush, D.S. 1993. Regulation of cytosolic calcium in plants. *Plant Physiol* 103: 7-13
- Clint, G.M. 1985. The investigation of stomatal ionic relations using guard cell protoplasts. *J. Exp. Bot.* 36: 1726-1738.
- De Silva, D.L.R., A.M. Hetherington and T.A. Mansfield. 1985. Synergism between calcium ions and abscisic acid in preventing stomatal opening. *New Phytol.* 100: 473-482.
- Earnshaw, M.J. and A. Cooke. 1984. The role of cations in the regulation of electron transport. In *The Physiology and Biochemistry of Plant Respiration*. J.M. Palmer (ed.). Cambridge University Press, New York. pp. 177-182.
- Godfraind, T. 1985. Pharmacology of calcium antagonists. In *Calcium and Cell Physiology*, D. Marmé (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp. 204-226.
- Hampp, R. and H. Ziegler. 1980. On the use of *Avena* protoplast to study chloroplast development. *Planta* 147: 485-494.
- Hemberg, T. 1978. The effects of abscisic acid on the respiration and uptake of inorganic phosphate by potato pith disc. *Physiol. Plant.* 43: 65-67.
- Hepler, P.K. and R.O. Wayne. 1985. Calcium and plant development. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 36: 397-439.
- Hetherington, A.M. and A.J. Trewavas. 1984. Binding of nitrendipine, a calcium channel blocker, to pea shoot membranes. *Plant Sci. Letts.* 35: 109-113.
- Hetherington, A.M., D.L.R. DeSilva, R.C. Cox and T.A. Mansfield. 1986. Abscisic acid, calcium ions and stomatal function. In *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, A.J. Trewavas (ed.). Plenum Press, New York, pp. 202-248.
- Ho, T.-H.D. 1983. Biochemical mode of action of abscisic acid, F.T. Addicott (ed.). Praeger Publishers, New York, pp. 147-170.
- Marmé, D. and P. Dieter. 1983. The role of calcium and calmodulin in plants, In *Calcium and Cell Function*, Vol. 4, W.Y. Cheung(ed.). Academic Press Inc, London, pp. 263-311.
- Marmé, D. 1986. The role of calcium in the regulation of plant metabolism. In *Molecular and Cellular Aspects of Calcium in Plant Development*, A.J. Trewavas (ed.). Plenum, New York, pp. 1-10.
- Owen, J.H., A.M. Hetherington and A.R. Wellburn. 1987. Inhibition of respiration in protoplasts from meristematic tissues by abscisic acid in the presence of calcium ions. *J. Exp. Bot.* 38: 498-505.
- Owen, J.H. 1988. Role of abscisic acid in a Ca^{2+} second messenger system. *Physiol. Plant.* 72: 637-641.
- Poovaiah, B.W., A.S.N. Reddy and J.J. McFadden. 1987. Calcium messenger system; role of protein phosphorylation and inositol phospholipids. *Physiol. Plant.* 69: 569-573.
- Rubery, P.H. and M.C. Astle. 1982. The mechanism of transmembrane abscisic acid transport and some of its implication. In *Plant Growth Substances*. P.F. Waering (ed.). Academic Press, London, pp. 353-362.
- Schauf, C.L. and K.J. Wilson. 1987. Effects of abscisic acid on K^+ channels in *Vicia faba* guard protoplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145: 284-290.
- Van Der Walk, H.C.P.M. 1984. Determination of proteases in isolated washed protoplasts; Inactivation of proteases in cell wall-degrading enzyme mixtures used in protoplast isolation. *Plant Sci. Letts.* 36: 201-204.

Van Steveninck, R.F.M. and M.E. Van Steveninck. 1983. Abscisic acid and membrane transport. In *Abscisic Acid*, F.T. Addicott (ed.), Praeger Publisher, New York, pp. 171-236.

Walbot, V., M. Cultter and I. Sussex. 1975a. Effects of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 453-589.

Walbot, V., M. Cultter and I. Sussex. 1975b. Effects of abscisic acid on growth, RNA metabolism, and respiration in germinating bean axes. *Plant Physiol.* **56**: 570-574.

(Received March 17, 1995)

Inhibitory Effects of ABA and Ca²⁺ on Dark Respiration in Protoplasts Isolated from the Basal Intercalary Meristematic Tissues of Oat Leaves

Youn, Hye Won, Chang-Duck Jin¹ and Young-Nam Hong*

Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea; and

¹Department of Biology, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

ABSTRACT

The present study was made of the effects of abscisic acid (ABA) and calcium ions on dark respiration in protoplasts isolated from the basal intercalary meristematic tissues of oat (*Avena sativa* L.) seedlings. The influences of calcium channel blockers diltiazem (DTZ), verapamil (VPM), and LaCl₂ and the calmodulin antagonist trifluoperazine (TFP) on protoplast respiration activities were also investigated in order to evaluate the possible involvement of calcium channels and calmodulin during the dark respiration. The ABA only caused a 21% inhibition of protoplast respiration at 10⁻⁶ M, but the extent of inhibition was very low by calcium treatments in the absence of ABA. In the presence of 10⁻⁶ M ABA, however, this inhibition of respiration increased by the increment of calcium ions concentrations. Treatments of DTZ and VPM were all found to restore the calcium-dependent inhibition of protoplast respiration by ABA and it was the same in the LaCl₂ treatment except at 10⁻⁴ M. At concentration from 10⁻⁶ M to 10⁻⁴ M, TFP also restored an inhibition of respiration. These results support the possibility that ABA increases plasmalemma permeability to calcium ions which might then bind to calmodulin to regulate oat protoplast dark respiration.

Keywords: ABA, dark respiration, diltiazem, verapamil, trifluoperazine

*Corresponding author: Fax +82-2-872-6881