

배추과 식물현탁배양 세포내에서 산성 아미노산의 능동수송

조 봉 희

수원대학교 자연과학대학 생물학과

Active Transport of Acidic Amino Acids in Suspension Cultured *Brassica* sp. Cells

Bong-Heuy CHO

Department of Biology, the University of Suwon, P.O.Box 77, Suwon, 440-600

The acidic amino acids, aspartate and glutamate, which have a negative charge in physiological pH, possess the same transport system as neutral amino acids according to the competitive inhibitory studies with the neutral amino acids. The neutral amino acids cotransported with one H⁺ per molecule, and one K⁺ efflux per one molecule for charge compensation (Cho, 1994), but the acidic amino acids cotransported with two H⁺ per one molecule, and one K⁺ efflux per one molecule. The active transport system, which possess the same carrier, but cotransported with the different number of H⁺, reported for the first time. From the results, we can see that one of cotransported H⁺ protonated at first carboxyl group of pK_a of acidic amino acids, and then as a neutral form cotransported with H⁺. Therefore, *Brassica* possess two amino acids transport system for 20 amino acids, namely, general - and basic amino acids transport system. The evolutionary meaning of amino acid carriers described with other reported plants.

Key words: acidic amino acid, cotransport

식물에서 아미노산의 능동수송은 단세포 생물인 *Chlorella* (Cho and Komor, 1985; Komor et al., 1989), 사탕수수(Wyse and Komor, 1984), 토마토(Harrington and Henke, 1981; MacDaniel et al., 1982) 등의 조직배양 세포와 피마자 자엽과 그의 조직배양 세포에서(Robinson and Beevers, 1981; Cho and Komor, 1985) 이루어졌다.

단세포 생물인 *Chlorella*에서는 아미노산 능동수송의 특성 및 그 기작을 규명하는데 있어서 큰 어려움이 없으나(Cho and Komor, 1983; Cho and Komor, 1984), 고등식물로 갈수록 유조직 세포가 여러 층으로 겹쳐 있고, 각기 특성이 다른 세포로 구성되어 있어서 물질수송의 운반속도 및 특성을 정확하게 규명하기가 힘들고 그 기작을 규명하는데 단점이 있었다(Robinson and Beevers, 1981). 그러나 식물 조직배양 기술의 발달로 고등 식물에서도 액체 조직배양을 이용하면, 단세포 생물에서처럼 물질 수송의 기작을 규명하는데 이점이 있는 관계로 물질 수송 연구에 많이 이용되었다(Wyse and Komor, 1984; Harrington and Henke, 1981). 피마자 자엽과 그 자엽에서 유도한 캘러스로 액체 배양한 조직을 사용

하여 아미노산의 능동수송을 연구한 결과는 거의 같기 때문에(Cho and Komor, 1984), 이러한 연구에 식물의 조직 대신 캘러스 세포를 이용해도 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다.

일반적으로 아미노산의 능동수송은 매우 복잡하며 연구 대상이 되는 식물 종류에 따라서도 다른 결과가 발표되었다(Cho et al., 1981; Robinson and Beevers, 1981; Komor et al., 1989; Wyse and Komor, 1984). 어떤 때에는 미생물처럼 아미노산의 능동수송이 다양한 운반계를 보여 주는 경우도 있었고(Cho et al., 1985), 매우 간단한 능동운반계를 지닌 식물도 있었다(Robinson and Beevers, 1981). 이러한 결과들을 종합해 보면 하등식물에서 고등식물로 갈수록 아미노산의 운반계가 보다 간단한 방향으로 진화된 것이 아닌가하는 의문을 가지게 되었다.

배추과 식물에서는 지금까지 두개의 아미노산 능동운반계가 알려지고 있는데, 하나는 중성 아미노산 능동운반계(Cho, 1994)이고, 다른 하나는 알칼리성 아미노산 능동운반계(Cho, 1989)이다. 따라서 본 연구에서는 캘러스 상태의 생

리적인 환경을 달리한 조건에서 음전하를 띄우고 있는 산성 아미노산이 어떤 운반체를 경유해서 능동수송되는지를 관찰함과 동시에 그 기작을 규명하고, 진화적인 면까지를 고찰하려고 하였다.

재료 및 방법

현탁 세포 배양법의 확립

본 실험에서 사용한 *Brassica campestris* subsp. *rapa* 조직 배양세포는 자엽에서 유도된 캘러스로 Nickel and Maretzki(1969)의 방법을 수정한 액체 조직배양액에서 배양하였다. 배양액은 White's basal salts, 2mg/ml의 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 5.8 mM sucrose와 0.1%의 yeast extract가 첨가되었다. 조직 배양세포는 100 ml의 배양액이 들어 있는 250 ml의 삼각 플라스크를 사용해서, 암소에서 rotary shaker에 의해서 160 rpm으로 계속 흔들어서 주었다. 배양 온도는 27°C이고, 매 10일 마다 현탁배양 세포 5 ml를 새로운 배양액 100 ml에 주입시켜서 계대배양하였다.

능동수송의 측정방법

세포는 Vacuum suction에 의해 모은 세포를 완충액으로 두번 씻은 후 1g을 달아서 7 ml의 25 mM 인산나트륨완충 용액(pH 6.0)에 혼탁시킨다. 능동수송 실험은 세포에 0.25 μ Ci의 [¹⁴C]-L-glutamate (10 μ Ci/ μ mole)와, 0.2 μ Ci의 [¹⁴C]-aspartate (10 μ Ci/mole), 그리고 방사능이 표지되지 않은 아미노산 등을 다양한 농도로 실험 목적에 따라 희석하여 배양세포에다 직접 첨가하면서 측정을 시작하였다. 그 후 30초 간격으로 1 ml의 시료를 꺼내서 cellulose membrane filter (pore size 1.2 μ m : Schleicher & Scheule, Dassel)로 세포를 모았다. 각 시료는 냉각된 인산나트륨 완충액으로 두번 씻고(이 과정에서 능동수송된 아미노산에 손실이 없음을 확인함) 무게를 잰 후, scintillation vial에 넣고 scintillation cocktail (Cho, 1989) 5 ml를 첨가하여 liquid scintillation counter (Beckman LS 9000)에서 측정하였다.

K_m 과 V_{max} 값은 0.05 mM과 1 mM 사이에 농도 범위에서 위에 설명된 방법으로 결정하였다. 경쟁 반응에 대한 실험은 [¹⁴C]-labelled된 아미노산 0.1 mM에다 표지되지 않은 아미노산 0.5 mM 또는 1 mM을 첨가 또는 첨가하지 않은 조건(대조구)에서 결과를 대조구와 비교해서 %으로 나타내었다. 그 후 Lineweaver-Burke plots로 경쟁반응 여부를 결정하였다.

이온 움직임에 대한 측정

이온의 흐름을 측정하기 위해서 1g의 세포를 5 mM calcium chloride 10 ml가 들어 있는 25 ml 플라스크에 현탁시킨다. 이 시료는 계속 rotary shaker에 의해 120 rpm으로 흔들어서 주면서, 수소이온 농도가 안정 될 때까지 기다린 후 아미노산을 첨가하여 이온의 움직임을 측정하였다. 완충액 대신 calcium chloride를 사용한 이유는 이온농도의 변화를 측정하기 위해서였다. 아미노산의 능동수송과 이온의 움직임에 대한 측정은 동일 세포에서 행해졌다. 아미노산을 세포에 가한 즉시 20초 간격으로 배양 세포액 0.5 ml를 꺼내서 능동수송 때 설명한 것처럼 처리하였다. 수소이온에 대한 전극의 보정은 20 nmole HCl을 가하여 전극의 반응세기를 계산한 다음 그것을 기준으로 한 후 세포에 의하여 반응된 이온의 움직임을 직접 계산하였다. 칼륨전극에 대한 보정은 50 nmole KCl로 하였다. 수소이온 전극과 칼륨이온 전극은 Ingold, Zureuch를 사용하였다(Cho, 1987). 능동수송에 대한 화학량론(stoichiometry)은 20초 안에 움직인 기울기로부터 계산하였다(Cho, 1987). 이상의 모든 실험은 3번 이상 반복하였다.

결과 및 고찰

산성 아미노산의 능동수송

산성 아미노산인 aspartate와 glutamate가 중성 아미노산 능동운반체를 경유해서 수송되는지를 분석하였다(Table 1). Aspartate는 glycine, valine, alanine과 leucine 등의 능동수송을 방해하지 못하였다. 이 결과는 다음과 같이 설명할 수 있다. 첫째는 aspartate가 다른 중성 아미노산과 같은 능동

Table 1. Inhibition of uptake of neutral amino acids by acidic amino acids.^a

Labelled amino acid	non-labelled acidic amino acid	% Activity of control
glycine	—	100
	aspartate	100
	glutamate	22
valine	—	100
	aspartate	111
	glutamate	30
alanine	—	100
	aspartate	101
	glutamate	50
leucine	—	100
	aspartate	118

^aThe uptake of labeled amino acids was tested 0.1 mM in absence or presence of 1 mM non-labelled amino acids.

Table 2. Inhibition of uptake of acidic amino acids by other amino acids.^a

Labelled acidic amino acid	non-labelled amino acid	% activity of control
aspartate	—	100
	glutamate	8
	histidine	13
	glycine	5
	valine	2
	leucine	1
	alanine	3
glutamate	—	100
	aspartate	97
	glycine	22
	asparagine	22
	histidine	46
	arginine	90

^aThe uptake of acidic amino acids was tested the end concentration of 0.1 mM in absence or presence of 1 mM non-labelled amino acids.

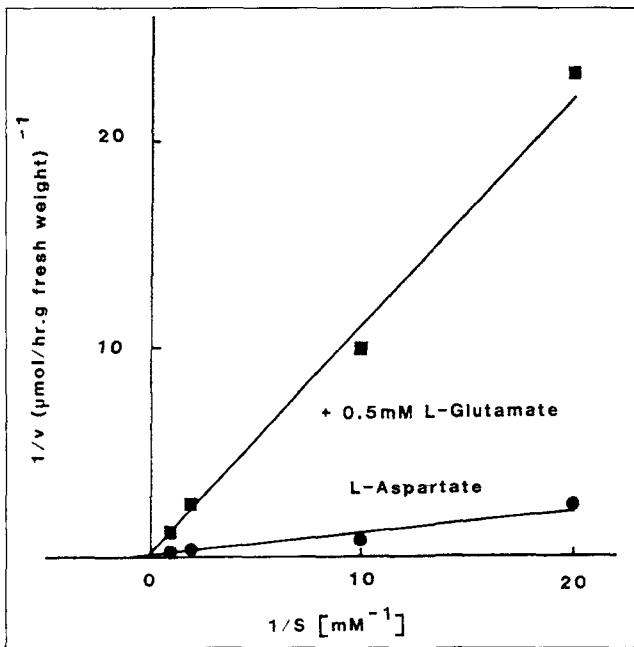


Figure 1. Inhibition test during the uptake aspartate with the concentration of 0.5 mM glutamate.

운반계를 경유해서 수송되지만, 운반자에 대한 친화성이 다른 중성 아미노산과 비교해서 훨씬 낮을 경우다 (Robinson and Beever, 1981). 이 경우에는 aspartate는 같은 운반자에 대해서 친화력이 높은 다른 아미노산을 경쟁적으로 저해시키지 못 할 것이다. 둘째로 가능한 경우는 aspartate가 사탕수수 조직배양 세포에서처럼 중성 아미노산과는 다른 고유의 특수 운반계를 경유해서 수송 될 경우다 (Wyse and

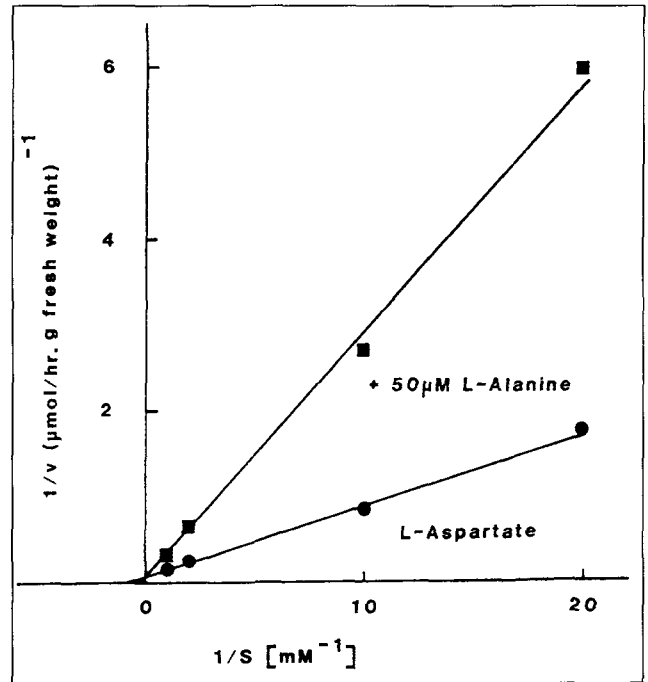


Figure 2. Inhibition test during the uptake aspartate with the concentration of 0.5 mM alanine.

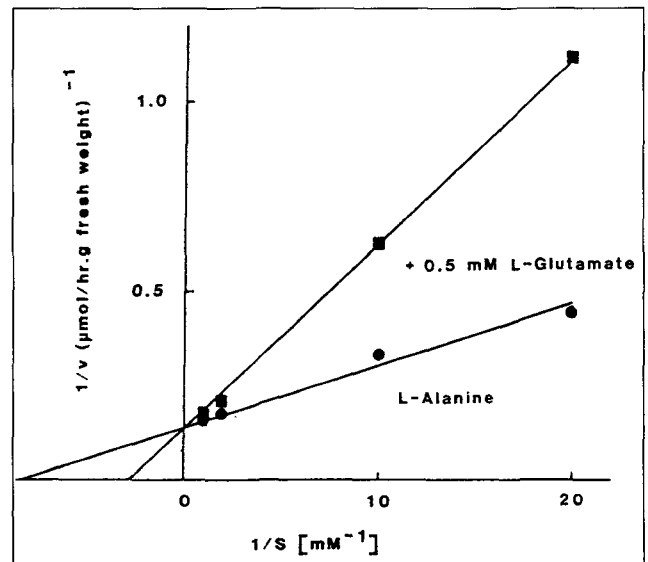


Figure 3. Inhibition test during the uptake of alanine with the concentration of 0.5 mM glutamate.

Komor, 1984). 이 경우에도 산성 아미노산은 중성 아미노산의 능동수송을 경쟁적으로 방해 할 수 없고, 다만 같은 세포내에서 에너지 근원만을 경쟁 할 것이다.

음전하를 가진 산성 아미노산이 그들 고유의 운반계를 가지고 있는지 또는 중성 아미노산 운반계를 경유해서 수송되는지를 알고자 하였다. Glutamate의 능동수송은 aspartate

와 arginine에 의해서 방해 당하지 않았으나, glycine과 asparagine에 의해서 강하게 방해 당했다. 반면 aspartate의 능동수송은 산성과 중성 아미노산에 의해서 강하게 방해 당했다(Table 2). 그러므로 산성 아미노산도 중성 아미노산 처럼 같은 운반계를 소유 할 것 임을 암시 해 주고 있다.

Glutamate는 같은 산성 아미노산인 aspartate의 능동수송을 경쟁적으로 방해 하였다(Fig. 1). 이 결과로 보면 glutamate는 aspartate 보다 같은 운반계에 대해서 더 친화력을 가짐을 보여 주었다. Aspartate 의 능동수송은 중성 아미노산인 alanine 에 의해서 경쟁적으로 방해 당했다(Fig. 2). 이 결과는 분명히 중성 아미노산과 산성 아미노산이 같은 운반계를 소유함을 말해 주고 있다.

산성 아미노산의 화학량론과 Km 및 Vmax 값

Table 2 에서 glutamate의 능동수송은 aspartate에 의해서 방해 당하지 않았음을 보여 주었다. Aspartate의 Km 값은 1.10 mM 이고, glutamate의 Km 값은 0.20 mM로써(Table 3) glutamate가 aspartate 보다 같은 운반계에 대해서 친화력이 높다. 그러므로 aspartate가 glutamate의 능동수송을 방해하지 못한 원인이기도 하다.

산성 아미노산은 생리적인 pH에서 음전하를 띄우므로 다른 중성인 아미노산과는 다르다. Aspartate와 glutamate는 중성 아미노산처럼 수소이온을 동반이온으로 생체 내로 cotransport 되었다(Table 4). 비율은 한개의 산성 아미노산 당 2개의 수소이온을 동반하는 것처럼 측정되었다. 이 결과는 같은 생체에서 중성 아미노산인 경우 아미노산 한개 당 수소이온 한개를 동반수송 하는 경우나(Cho and Komor, 1983), 생리적인 pH에서 양전하를 띄우고 있는 알카리성 아미노산인 경우에 수소이온을 세포 밖으로 배출시키는(Cho and Komor, 1984; Cho, 1989) 것과는 다른 결과다. 반면 전하의 보상을 위해서 배출되는 칼륨 이온은 산성과 중성 아미노산 모두 하나다. 산성 아미노산에 경우 동반된 2개의 수소이온 중 한개는 분자 내에서 음전하인 카르복실기의 전하를 보상하고, 다른 한개의 수소이온은 산성 아미노산과 함께 동반수송하는 것으로 알려져 있다. Table 4의 결과는 사탕수수의 조직배양 세포의 결과와 일치하나(Wyse and Komor, 1984), 미생물의 경우와는 달라서 aspartate 한 분자당 0.66의 수소이온이 동반수송 되었었다(Gale and

Table 3. Km and Vmax -values of the amino acid transport system of cell suspension culture.

Amino acid	Km (mM)	Vmax (μmole · h ⁻¹ · g · fresh weight ⁻¹)
Aspartate	1.10	12.7
Glutamate	0.20	1.3

Table 4. Stoichiometries of proton and potassium flux during amino acid uptake.^a

Amino acid	H ⁺ -influx	K ⁺ -efflux
	Amino acid	Amino acid
Aspartate	1.82	0.96
Glutamate	1.95	0.95

^aThe final concentration of amino acid was 1 mM.

Table 5. The amino acid transport system in Brassica suspension cells.

Transport system	Amino acid
General amino acid transport system	
Neutral amino acid transport system ^a	Glycine Proline Serine Alanine Valine Leucine Isoleucine Glutamine Asparagine Phenylalanine Tryptophane Tyrosine Histidine Threonine Methionine Cysteine
Acidic amino acid transport system ^b	Aspartate Glutamate
Basic amino acid transport system ^c	Arginine Slysine

^aCho, 1994; ^bCho, unpublished; ^cCho, 1989.

Linwellin, 1972; Layni, 1977). 효모에서는 aspartate 한 분자당 2개의 나트륨이온을 동반수송 하기 때문에(Layni, 1977), 이온의 동반수송은 생체마다 매우 다른 결과를 보여 주는 것으로 사료된다.

고등 식물인 유채의 경우에는 다만 2개의 아미노산 능동 운반계를 통해서 20개의 아미노산의 능동수송을 허락하고 있으며 (Table 5), 그 중 하나는 일반 능동운반계로 중성과 산성 아미노산 18개를 능동수송시키고, 다른 하나는 알카리성 아미노산 운반계로 arginine과 lysine만을 수송하는 특수 운반계를 선천적으로 가졌었다(Cho, 1989).

이상의 결과를 종합해 보면 진화적으로 매우 중요한 의미가 있음을 알 수 있다. 즉 하등 생물일수록 아미노산의 운반계가 복잡하고 배양조건에 의존되나, 고등 생물로 갈수록 아미노산 운반계는 단순화되는 방향으로 진화되었다. 그 예로 미생물에서는 20개의 아미노산에 대해서 15개가 넘는 운반계가 선천적으로 존재함을 보였다(Oxender, 1972). 이들

운반계는 단 하나의 아미노산에 대해서도 특수운반계, 일반운반계, 또는 몇 개의 아미노산을 능동수송 시키는 독특한 운반계로 구성되었다. 부가해서 미생물에서는 한개의 아미노산에 대해서 적어도 2개 이상의 운반계를 가지는 경우도 있었고, 이 때에 운반계는 같은 아미노산에 대해서 각기 다른 kinetic을 보였고, 각기 다르게 조절되는 것으로 보고되었다. 단세포 생물인 *Chlorella*에서는 20개의 아미노산에 대해서 7개의 아미노산 운반계를 선천적으로 가졌고(Cho and Komor, 1985), 이들 운반계는 환경조건에 따라서 매우 예민함을 보였다. 즉 포도당에 의하여 적어도 5개의 새로운 아미노산 운반계가 유도되었고(Cho and Komor, 1983; Cho and Komor, 1984), 이 중 2개의 아미노산 운반계는 질소원소의 부족(Sauer et al., 1983)과 암모니아에 처리(미 발표 논문 중) 등 외부환경 변화에 따라서 조절될 수 있음을 보였다. 여러 *Chlorella strain*을 중심으로 연구한 결과는 포도당에 의하여 유도될 수 있는 운반계는 선천적으로 존재하는 7개의 운반계보다는 더 진화된 것으로 보고 있다(Komor et al., 1989). 단자엽 식물인 사탕수수에서는 20개의 아미노산에 대해서 다만 3개의 독특한 운반계를 가지는 것으로 보고되었고(Wyse and Komor, 1984), 이들 운반계는 환경조건에 따라 예민함을 보이지 않았다. 본 실험에서 사용된 쌍자엽 식물인 유채에서는 다만 2개의 운반계를 소유하였고, 피마자에서는 단 한개의 운반계가 20개의 아미노산을 능동수송하였다(Robinson and Beevers, 1981). 이들 운반계는 아미노산에 대해서 multiphasic한 운반계의 특성을 나타내는 것으로 보고 되었는데(Nissen, 1978; Shtarkshall and Reinhold, 1974), 이에 관한 생리적인 조절에 대해서는 잘 보고 되지 않았다.

하등생물에서 고등생물로 갈수록 아미노산 수송에 대해서 단순한 운반계를 소유한다는 사실은 식물이 토양으로부터 아미노산을 흡수할 때 많은 종류의 토양 미생물과 항상 아미노산에 대한 경쟁이 있을 것으로 생각할 때, 한 개의 운반계를 통해서 20개의 아미노산을 능동수송할 수 있는 이점이 있을 것으로 사료된다. 그러나 과연 생명체가 어떻게 이것을 조절하는가 하는 문제가 제기된다. 그러나 다른 면에서 생각해 본다면 하등생물보다는 여러 가지 아미노산 운반계를 합성하는데 필요한 에너지를 절약하는 이점도 생각할 수 있다.

적 요

생리적인 pH에서 음전하를 띄우고 있는 산성 아미노산인 aspartate와 glutamate는 다른 중성 아미노산과 경쟁배해 실험을 행한 연구결과에 의하면 이들도 중성 아미노산이 갖는 능동운반계와 동일한 운반자를 소유한다. 중성 아미노산은 아미노산 한 분자 당 한개의 수소이온과 동반수송되고,

전하에 보상을 위해서 한 분자 당 한개의 칼륨 이온을 배출한다. 그러나 산성 아미노산은 한 분자 당 2개의 수소이온과 동반수송되고, 한 분자 당 칼륨 한 분자를 배출한다. 중성 아미노산과 같은 운반계를 소유하고, 2개의 수소이온과 동반수송되는 능동운반계는 본 실험에서 처음으로 보고된다. 이 결과로부터 두개의 동반수송된 수소이온 중 한개는 산성 아미노산에 있는 pK₃의 카르복실기를 먼저 중화시킨 후에 중성화된 형태로 수소이온 한 분자와 동반수송된다고 사료된다. 그러므로 유채는 20개의 아미노산에 대해서 다만 2개의 운반계, 즉 일반- 과 알카리성 아미노산 운반계를 가진 것으로 확인되었다. 다른 식물에서 이미 보고된 결과들을 참고하여 아미노산 운반계의 진화적인 의미를 고찰하였다.

사 사 - 본 연구는 독일 Regensburg 단체 연구비 조성으로 수행된 것임.

인 용 문 헌

- Cho BH (1987) Analysis of the low affinity system of the uptake of fructose in suspension culture cells. *Korean J Bot* 30: 277-285
- Cho BH (1989) The specific basic amino acid transport system in suspension culture cells. *Korean J Plant Tissue Culture* 16: 195-202
- Cho BH (1994) Transport system of specific neutral amino acids in suspension culture cells. *Korean J Plant Tissue Culture* 21: 201-206
- Cho BH, Sauer N, Komor E, Tanner W (1981) Glucose induced two amino acid transport system in *Chlorella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3591-3594
- Cho BH, Komor E (1983) Mechanism of proline uptake by *Chlorella vulgaris*. *Biochim Biophys Acta* 735: 361-366
- Cho BH, Komor E (1984) Mechanism of arginine transport in *Chlorella*. *Planta* 162: 23-29
- Cho BH, Komor E (1985) The amino acid transport system of the autotrophically grown green alga *Chlorella*. *Biochim Biophys Acta* 821: 384-392
- Gale EF, Linwellin JM (1972) The role of hydrogen and potassium ion in the transport of acidic amino acids in *Staphylococcus aureus*. *Biochim Biophys Acta* 266: 182-205
- Harrington HM, Henke RR (1981) Amino acid transport into cultured tobacco cells. I. Lysine transport. *Plant Physiol* 67: 373-378
- Komor E, Cho BH, Kraus M (1989) The occurrence of the glucose inducible transport systems for glucose, proline, and arginine in different species of *Chlorella*. *Bot Acta* 101: 321-326
- Lanyi JK (1977) Coupling of aspartate and serine transport to the transmembrane electrochemical gradient for sodium ions in *Halobacterium halobium* translocation stoichiometries and apparent

cooperativity. *Biochemistry* 17: 3011-3018

- MacDaniel CN, Halterman RK, Bone RF, Wozniak PM** (1982) Amino acid transport in suspension cultured plant cells. III. common carrier system for the uptake of L-arginine, L-aspartic acid, L-histidine, L-leucine, and L-phenylalanine. *Plant Physiol* 69: 246-249
- Nickel LG, Maretzki A** (1969) Growth of suspension cultures of sugarcane cells in chemically defined media. *Physiol Plant* 22: 117-125
- Nissen P** (1978) Multiphasic uptake of amino acid by barley roots. *Physiol Plant* 43: 181-188
- Oxender DL** (1972) Membrane transport. *Annu Rev Biochem* 41: 777-814
- Robinson SP, Beevers H** (1981) Amino acid transport in germinating

castor bean seedlings. *Plant Physiol* 68: 560-566

- Sauer N, Komor E, Tanner W** (1983) Regulation and characterization of two inducible amino acid transport system in *Chlorella vulgaris*. *Planta* 159: 404-410
- Shtarkshall RA, Reinhold L** (1974) Multipasic amino acid transport in leaf cells. In U Zimmermann and J Dainty, eds, *Membrane transport in plants*. Springer Verlag, New York, pp338-342
- Wyse RE, Komor E** (1984) Mechanism of amino acid uptake by sugarcane suspension cells. *Plant Physiol* 76: 865-870

(1995년 4월 21일 접수)