

Arabidopsis thaliana의 Ethylene Triple Response Mutant에서 에틸렌 생합성 과정의 생리 생화학적 특성

姜 熙 燕 · 金 佑 澤¹ · 李 竣 承*

梨花女子大學校 自然科學大學 生物科學科, ¹延世大學校 理科學大學 生物學科

*Arabidopsis thaliana*의 에틸렌 관련 돌연변이체인 에틸렌 과다 생성 돌연변이체(*eto1-1*)와 에틸렌에 대한 반응이 둔감한 돌연변이체(*etr1-3*과 *ein2-1*)의 생리·생화학적 특성을 분석하였다. 2~3주된 *Arabidopsis* 식물로부터 얻은 성숙한 잎을 재료로 이용하였다. 에틸렌 생성량은 *eto1-1*은 야생형의 2배, *etr1-3*은 야생형의 4배, 그리고 *ein2-1*은 야생형의 4.5배 더 많았다. *eto1-1*에서의 ACC synthase와 ACC oxidase 활성은 야생형과 비슷하였으나 ACC 함량은 야생형보다 4.5배 더 많았다. ACC N-malonyltransferase의 활성은 *eto1-1*이 야생형보다 3배 더 높았으며 SAM synthetase의 활성은 야생형보다 1.5배 더 높았다. 이들 결과로부터 *eto1-1*로의 변형은 SAM에서 ACC로 전환되는 과정 이전에 있음을 추측할 수 있다. *etr1-3*과 *ein2-1*에서 ACC synthase의 활성은 야생형보다 높았으나 ACC oxidase의 활성은 야생형보다 낮았다. 그러나 SAM synthetase 활성은 *etr1-3*에서는 야생형과 비슷하였고 *ein2-1*에서는 야생형보다 1.7배 높았다. 이것은 *etr1-3*과 *ein2-1*이 에틸렌에 대한 반응에 결함이 있기 때문에 그것으로 인하여 자가 조절이 되지 않았기 때문으로 추정된다. *etr1-3*의 ACC 함량은 야생형보다 2.3배 더 많았으며 ACC N-malonyltransferase의 활성은 야생형보다 3.9배 더 높았다. 그리고 *ein2-1*의 ACC 함량은 야생형보다 1.7배 더 많았으며 ACC N-malonyltransferase의 활성도 야생형보다 2배 더 높았다. 따라서 기질의 증가로 인하여 ACC N-malonyltransferase의 활성이 촉진된 것으로 추정된다. *In vitro* kinase assay를 한 결과 *eto1-1*과 *ein2-1*에서 36 kDa 단백질의 인산화를 관찰할 수 있었다.

주요어: *Arabidopsis thaliana*, ACC oxidase, ACC synthase, ethylene-related mutants, SAM synthetase

에틸렌은 식물 호르몬으로 비포화된 2개의 탄소를 가진 기체이며 식물체에서 세포 분열, 줄기 성장, 개화, 과일 성숙, 잎의 탈리와 노화, 씨앗의 발아 등의 발생 단계에서 그 합성이 증가되며 상처, 산소 부족, 냉해, 건조, Cd⁺와 Li⁺, 오옥신 처리, virus 침입, elicitor 등의 여러 외부 인자에 의해서도 유도된다(Yang and Hoffman, 1984; Abeles, 1992). 에틸렌은 식물의 모든 기관에서 발생하며 뿌리, 줄기, 잎, 눈, 피경, 꽃, 씨앗, 과일 등 기관의 종류 및 성장과 발생의 단계에 따라 에틸렌 생성 속도는 다양해진다. 고등 식물의 에틸렌은 Met → SAM → ACC → C₂H₄의 경로를 통하여 생성되며(Yang and Hoffman, 1984), 이 과정에서 첫번째 반응은 SAM synthetase에 의해서, 그리고 마지막 두 반응은 각각 ACC synthase와 ACC oxidase에 의하여

촉매된다. 에틸렌의 생성은 그 합성 효소계의 활성에 의해서 뿐만 아니라 ACC N-malonyltransferase에 의한 ACC의 불활성화에 의해서도 조절된다(Liu *et al.*, 1985).

*Arabidopsis thaliana*는 현화 잡초로 성숙한 개체가 높이 30 cm, 잎 너비 1 cm²인 작은 십자화과 식물이다(Koncz *et al.*, 1992). 씨가 작고 수가 많으며 세대 길이는 5~6주이다. Haploid genome은 5개의 작은 염색체로 구성되어 있으며 genome size는 약 7×10⁷ base pair이다(Leutwiler *et al.*, 1984). Dispersed repetitive DNA의 수준이 낮고 intron이 적으며 큰 genome을 가진 식물의 상동 유전자보다 gene family가 적다(Meyerowitz, 1989). 이런 잇점 때문에 large scale mutagenesis에 많이 이용되고 있다(Koncz *et al.*, 1992). *Arabidopsis*를 이용한 대부분의 돌연변이 실험은 1970년대부터 이루어져 현재는 고등 식물의 광합성, 지질 대사, 제초제 내성, 호르몬 효과 등의 연구를 위

*교신저자: Fax (02) 360-2385
© 한국식물학회 [서울] 1996

한 많은 돌연변이체가 선별되고 있다(Redei *et al.*, 1990). *Arabidopsis* 에틸렌 돌연변이체는 triple response의 변형을 통해 선별되었다. 암소에서 자란 유식물에 대한 에틸렌의 효과는 'triple response'로 줄기 성장이 억제되고, 줄기가 굵어지며 수평 성장 특성을 나타낸다. *Arabidopsis*의 에틸렌에 대한 반응이 둔감한 돌연변이체(*ein1*, *ein2*, *ein3*)는 외부에서 고농도의 에틸렌을 공급하여도 triple response를 보이지 않는다(Guzman and Ecker, 1990; Rothenberg and Ecker, 1993). *etr1*(ethylene resistance mutant)은 *ein1*의 allele로 우성 돌연변이체이고 ETR1 gene product는 *Arabidopsis*의 에틸렌 신호 전달 경로의 초기에 작용하며 이것의 carboxyl terminal은 박테리아의 two-component 신호 전달 체계에 관여하는 신호 전이체와 아미노산 서열이 유사하다(Bleecker *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1993). Constitutive triple response mutant는 외부의 에틸렌 공급이 없어도 triple response 표현형을 나타내는 돌연변이체로서 에틸렌 과다 생성 돌연변이체와 에틸렌 인식 및 신호전달의 돌연변이체의 두 class로 분류된다. 에틸렌 과다 생성 돌연변이체(*eto1*, *eto2*, *eto3*)는 에틸렌 생합성과 작용의 저해제에 의해 triple response가 회복되어 야생형의 표현형을 나타내며, 야생형보다 많은 에틸렌을 생성한다(Guzman and Ecker, 1990). 에틸렌 인식 및 신호전달 돌연변이체(*ctr1*; constitutive triple response mutant)는 에틸렌 생합성과 작용의 저해제에 의하여 triple response 표현형이 영향을 받지 않으며, 야생형과 비슷한 양의 에틸렌을 생성한다(Kieber *et al.*, 1993). *Arabidopsis* CTR1 gene product는 신호 전달 경로에서 ETR1 gene product의 하단에 위치하며 에틸렌 반응의 음성적 조절 인자로 carboxyl terminal의 아미노산 서열이 MAP kinase cascade를 활성화 하는 serine/threonine protein kinase의 Raf family와 비슷함이 밝혀졌다(Kieber *et al.*, 1993).

식물 성장과 분화에서 중요한 역할을 담당하는 에틸렌 생성에 관한 분자 수준에서의 조절과 신호 전달 경로가 아직 자세히 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 식물의 model genetic system으로 유용한 *Arabidopsis*를 이용하여 이미 분리된 에틸렌 과다 생성 돌연변이체(*eto1-1*)와 에틸렌에 대한 반응이 둔감한 돌연변이체(*etr1-3*, *ein2-1*)에서 에틸렌 생합성 과정에서 생리, 생화학적 특성이 어떻게 다른가를 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

모주는 *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia이며, ethyl methanesulfonate(EMS)를 이용하여 돌연변이시킨 triple response mutant의 씨앗을 미국 오하이오 주립대학의 *Arabidopsis* Biological Resource Center에서 분주받았다. 돌연변이체는 에틸렌 과다 생성 돌연변이체(*eto1-1*), 에틸렌에 대한 반응이 둔감한 돌연변이체(*etr1-3*과 *ein2-1*)의 세 종류이며 ARASYSTEM(Seed harvesting and growth system for plants; Beta Developments, B 9000 GENT, Belgium)을 이용하여 키운 2~3주된 rosette을 재료로 사용하였다. 성장 환경은 질석에 씨를 뿌린 후 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온실에서 빛을 계속 쬐여주었고 $1/2 \times$ Ken Feldmann 영양액(pH 5.7, 272 mg/L KH_2PO_4 , 114 mg/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 120 mg/L MgSO_4 , 85 mg/L CaCO_3 , 240 mg/L NH_4NO_3 , 2.16 mg/L H_3BO_3 , 1.38 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.14 mg/L ZnSO_4 , 0.04 mg/L CuSO_4 , 0.024 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18 mg/L EDTA, 0.5% Sucrose)을 3~4일에 한 번씩 공급하였다.

에틸렌 생성량 측정

15 mL vial에 2 mL의 완충용액(10 mM Mes-Tris buffer, pH 6.8)와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chloramphenicol을 넣은 후 *Arabidopsis* rosette을 0.05 g씩 넣고 실리콘 마개로 막아 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지되는 어두운 곳에서 55 rpm으로 흔들어서 주었다. 일정시간이 지난 후에 GC용 주사기로 vial내 기체를 1 mL 취하여 Gas Chromatography (Shimadzu GC-9A, Flame Ionization Detector, Porapak Q column 100~200 mesh 90°C , Air: 0.5 kg/cm^2 , Hydrogen: 0.6 kg/cm^2 , Carrier; Nitrogen: 60 mL/min)로 에틸렌 생성량을 측정하였다.

SAM synthetase의 활성 측정

2~3주된 *Arabidopsis*의 야생형과 각 돌연변이체의 rosette을 extraction buffer(100 mM Tris, pH 7.5, 2 mM EDTA, 20% glycerol, 20 mM β -mercaptoethanol, 1 mM DTT)를 넣고 갈아 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리(Beckman, AvantiTM 30 Centrifuge) 하였다. 상층

액만 취하여 단백질의 양은 BSA를 표준시료로 하여 Lowry 등(1951)의 방법으로 결정하였다. SAM synthetase의 활성은 Peleman 등(1989)의 방법을 변형하여 측정하였다. 반응 용액(100 mM Tris, pH 8.0, 30 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 20 mM ATP, 1.5 μCi ³⁵S-Methionine)과 조직 추출액(단백질 10 μg)을 섞어서 25°C, 1시간 반응을 시킨 다음 0°C에 두어 반응을 멈추게 하였다. 반응 용액을 thin layer chromatography plate(TLC aluminium sheets, Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)에 떨어뜨린 후 buthanol : acetic acid : d-water = 60 : 15 : 25를 전개 용매로 하여 전개시켰다. 전개 후 plate를 80°C의 oven에서 말려 X-선 필름에 감광시켰다. Packard radiochromatogram scanner(Instant Imager 2024 Electronic Autoradiography System, Packard)를 이용하여 plate로부터 SAM의 cpm을 측정하였다.

ACC synthase와 ACC oxidase의 활성 측정

ACC synthase의 활성은 Boller 등(1979)의 방법을 변형하여 측정하였다. 잎 조직을 4°C에서 extraction buffer(100 mM HEPES, pH 8.5, 4 mM DTT, 0.5 μM pyridoxal phosphate(PLP), 10 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 2 M NaCl)를 넣어 막자사발로 갈아서 가아제로 걸러낸다. 거른 액을 25,000×g에서 15분간 초원심분리(Beckman, L5-50)하였으며 상등액을 취한 후 내생 ACC를 제거하기 위하여 Sephadex G-25 Column (2×11 cm, bed volume, 30 mL)에 통과시켰다. 각각의 분획들을 280 nm에서 흡광도를 읽어 단백질이 많은 분획을 선택하였다. 30°C에서 1시간 반응하여 1 nmol의 ACC를 생성하는 효소의 활성을 1 unit으로 정의하였다.

In vivo 상태의 ACC oxidase의 활성은 완충 용액에 일정시간 배양시킨 rosette을 1 mM ACC를 첨가한 반응 용액과 vial에 담아 1시간 동안 배양시킨 뒤 GC로 에틸렌 생성량을 측정함으로써 추정하였다.

조직내의 ACC 정량

ACC의 정량은 Lizada and Yang(1979)의 방법에 따라 측정하였는데 화학적으로 조직내의 ACC를 에틸렌으로 전환시킨 다음 Gas Chromatography로 측정하여 ACC의 양을 정량하였다. *Arabidopsis*의 야생형과 각 돌연변이체의 rosette을 완충 용액이 든 vial에 담아 각 시간별로 배양한 후 수거하여 80%(v/v) ethanol을 넣

고 80°C에서 4시간 동안 가열하였다. 40°C에서 speed vacuum(Hetovac, VR-1)으로 돌려서 용매를 날려 버린 다음 남은 pellet을 증류수로 녹였다. ACC 표준곡선을 이용하여 생성된 에틸렌 양으로부터 각각의 ACC 함량을 계산하였다.

ACC N-malonyltransferase의 활성 측정

ACC N-malonyltransferase의 활성은 Liu 등(1985)의 방법을 이용하여 측정하였다. Rosette을 extraction buffer(100 mM K-P buffer, pH 7.2, 0.4 mM DTE, 100 mM KCl)를 넣고 갈아 가아제로 거른 후 4°C, 27,500×g에서 40분간 초원심분리(Beckman, L5-50) 하였다.

Total RNA의 추출과 Northern Hybridization

잎 조직 10 g을 액체 질소를 이용하여 마쇄한 후, 50 mL Guanidine buffer(4 M Guanidine-HCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM Na₂-EDTA, 0.5% SDS, 2% PVP)와 β-mercaptoethanol(1%)을 첨가하여 잘 섞은 후 10분간 8,000 rpm으로 원심분리(Beckman, Avanti™ 30 Centrifuge)하였다. 단백질을 제거하기 위해 상등액을 phenol/chloroform으로 처리하여 정제한 다음, 4 M LiCl로 RNA를 2시간 동안 분별 침전시킨 후 원심분리하여 pellet을 1 mL TE buffer(10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹였다. 그 후 100 μL 3 M sodium acetate를 첨가하여 잘 섞은 다음 2.5 mL ethanol을 첨가하여 RNA를 침전시키고 원심분리한 후 ethanol을 제거하고 pellet을 멸균한 증류수에 녹여 그 농도를 측정한 후 -70°C에 보관하였다. Total RNA 20 μg을 0.02% formaldehyde를 포함한 1% agarose gel에서 1×MOPS buffer(0.4 M MOPS, pH 7.0, 0.1 M sodium acetate, 0.02 M EDTA)를 running buffer로 사용하여 60 V로 2시간 동안 전기영동한 후, Vacuum Blotter(Hoefer, TE 80)를 사용하여 nitrocellulose membrane으로 transfer한 다음 UV로 고정하였다. Membrane filter를 6× SSC(pH 7.0, 0.75 M NaCl, 1 M sodium citrate), 5× Denhardt's solution, 100 μg/mL denatured salmon sperm DNA, 0.1% SDS와 함께 membrane이 든 sealing bag에 넣고 3~4시간 동안 prehybridization한 후 labeled probe를 넣고 18~20시간 hybridization 하였다. Membrane을 2× SSC+0.1% SDS로 10분간 3번 씻어준 후 말려서 plastic wrap으로 싸서 X-선 필름에 감광시켰다. Densitometer(GS670,

BioRad Image Analyzer)를 이용하여 필름으로부터 각 lane의 optical density를 측정하였다. ACC oxidase의 probe는 녹두 하배측에서 cloning한 pVR-ACO1을 사용하였다(Kim and Yang, 1994). ACC synthase의 probe는 Arabidopsis에서 cloning한 paACS1, paACS2, paACS4, 그리고 paACS5를 Plant Gene Expression Center(800 Buchanan Street, Albany, CA 94710)로부터 분양받아 사용하였다(Liang *et al.*, 1992). DNA probe의 labeling은 Amersham에서 구입한 random primer extension kit(rediprime)을 사용하였으며 방법은 Amersham rediprime protocol을 따랐다.

Autophosphorylation

잎 조직 1 g을 1 mL extraction buffer(20 mM Tris, pH 8.0, 40 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 50 mM NaF, 5 mM MgCl_2 , 100 μM Na_3VO_4 , 10 mM EGTA, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 3 mM PMSF)를 넣고 갈아 15,000 rpm에서 15분간 원심분리(Beckman, Avanti™ 30 Centrifuge)하였다(Leevers and Marshall, 1992). Autophosphorylation은 Nakielny 등(1992)의 방법을 이용하여 반응 용액(25 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM DTT, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MnCl_2 , 10^{-4} M ATP, 1 μCi [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] ATP, 40 nM tetradecanoyl phorbol acetate(TPA), 100 nM okadaic acid)에 조직 추출액을 넣고 35°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 sample buffer를 섞고 열음에 두어 반응을 멈추게 한 다음 Laemmli(1970)의 방법을 이용하여 150 V의 전압으로 12% SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색시켰고 다시 10% methanol, 10% acetic acid의 혼합용액으로 탈색하고 건조시킨 후 autoradiography 하였다.

결과 및 고찰

*Arabidopsis*의 triple response mutants는 주로 에틸렌의 생합성과 작용에 관계된 유전자에 문제가 있으며 따라서 에틸렌의 생합성과 작용 기전을 밝히는데 유용하다. *eto1-1*은 Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) 분석 결과 5번 염색체에서 돌연변이 된 열성 돌연변이체로 성장 특징은 천천히 자라고 rosette 크기는 야생형보다 작지만 bolting은 야생형과 같은 시간에 이루어진다(Guzman and Ecker, 1990).

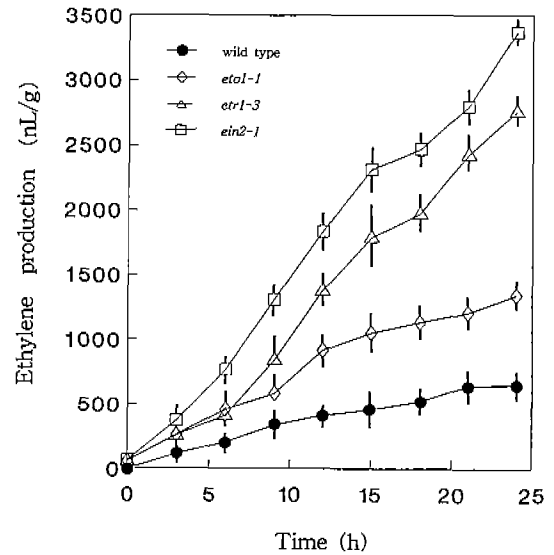
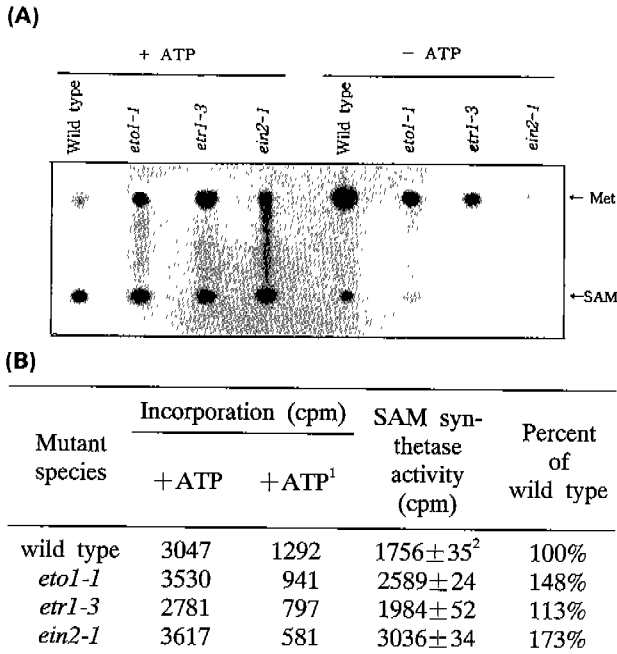


Fig. 1. Time course of ethylene production in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. Rosettes were incubated with buffer for various time periods. The bar represents the standard deviation from the mean.

Rosette은 야생형보다 더 진한 녹색을 띄며 화서와 곁가지는 1~2 cm 자란 후 보라색 색소를 침적시키며 암소에서 자란 유식물에서 외부의 에틸렌 공급이 없어도 triple response가 나타난다. *etr1-3*은 1번 염색체의 *ap-1* 좌위 근처에서 지도화된 우성 돌연변이체이며, *ein2-1*은 5번 염색체에서 지도화된 열성 돌연변이체이다(Guzman and Ecker, 1990). *etr1-3*과 *ein2-1*의 유식물은 에틸렌에 대한 triple response 표현형을 보이지 않으며 성장시 특징은 rosette이 야생형보다 더 크고 bolting이 지연된다. *Arabidopsis*의 야생형과 각 돌연변이체에서 에틸렌 생성량의 차이를 비교하기 위하여 빛을 계속 쬐어주면서 키운 2~3주된 rosette을 완충 용액에 배양하여 에틸렌 생성량을 시간에 따라 측정하였다(Fig. 1). 배양 1시간 후 야생형에서의 에틸렌 생성량은 GC로 측정할 수 없을 만큼 적은 양이었고, 돌연변이체 중에 *to1-1* 57.37 nL/g, *tr1-3* 40 nL/g, *ein2-1* 62.2 nL/g으로 배양 초기부터 돌연변이체들의 에틸렌 생성량은 모두 야생형보다 많았다. 이 후 각 시간별로 에틸렌 생성량을 측정된 결과, 배양 21시간째의 에틸렌 생성량은 야생형이 641.3 nL/g, *eto1-1*이 1207.9 nL/g으로 야생형보다 약 2배, *etr1-3*이 2427.0 nL/g으로 야생형보다 약 4배, *ein2-1*이 2793.5 nL/g으로 야생형보다 약 4.5배 더 많은 에틸렌을 생성하였다. 따라서 본 연구의 결과는 암실에서 키운 *eto1-1*의 유식물이 외부 에틸렌의 공급 여부와 관계없이 계속적인 triple response를



¹Control reactions containing all reactants except for ATP were used to correct for background activity.

²The results are the mean ± SD of values from three ex-

Fig. 2. SAM synthetase activity in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. (A) Enzyme extract was incubated with ³⁵S-labeled Met for 1 h at 25°C. After incubation of the reaction mixture, a 5 µL aliquot was spotted on a silica gel thin-layer plate and the plate was chromatographed in BuOH-MeOH-water (60:15:25, v/v) and subjected by autoradiography. Met and SAM standards were run in a separate lane and were visualized with ninhydrin spray. (B) The chromatogram was scanned for radioactivity were a Packard radiochromatogram scanner.

보이는 것은 *eto1-1*이 자체내에서 과도한 에틸렌을 생성한 결과라는 보고(Guzman and Ecker, 1990)와 일치 하였으며, *etr1-3*과 *ein2-1*은 에틸렌을 야생형보다 많이 생성하지만 triple response를 나타내지 않는 것으로 보아 에틸렌을 인식하지 못한다는 이전의 보고(Guzman and Ecker, 1990)와도 일치하였다.

각 돌연변이체가 과도한 에틸렌을 생성하는 것이 생합성 효소 중 어느 단계의 조절에 의한 것인지를 알아 보기 위하여 에틸렌 생합성 효소들의 활성을 측정하였다. 에틸렌 생합성 경로의 첫번째 효소인 SAM synthetase의 활성은 Fig. 2에 나타난 것처럼 *eto1-1*에서 야생형보다 약 1.5배 높았고, *etr1-3*에서는 야생형과 비슷하였으며, *ein2-1*은 야생형보다 1.7배 높았다. 또한 ACC synthase의 활성 측정을 위하여 야생형과 *eto1-1* 돌연변이체의 intact rosette과 21시간 동안 완충 용

Table 1. ACC synthase activity in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. The rosettes were incubated for 21 h. After incubation, the ACC synthase activity was assayed in a reaction mixture of enzyme extract and 50 µM SAM as a substrate. ACC was determined by the method of Lizada and Yang (1979)

Mutant species	Specific activity ^a (unit/mg of total protein)		Percent of wild type
	Intact rosette	Incubated rosette	
Wild type	ND ^b	0.59 ± 0.04 ^c	100%
<i>eto1-1</i>	ND	0.57 ± 0.06	97%
<i>etr1-3</i>	ND	0.77 ± 0.15	131%
<i>ein2-1</i>	ND	0.98 ± 0.11	166%

^aOne unit of enzyme = 1 nmol ACC produced per h at 30°C, ^bND: Not detectable, ^cThe results are the mean ± SD of values from five experiments.

Table 2. ACC *N*-malonyltransferase activity in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. Enzyme activities in rosette were measured at the end of a 21 h incubation period. The ACC *N*-malonyltransferase activity was assayed using 1 mM ACC and 1 mM malonyl-CoA as substrates. After incubation of the reaction mixture for 30 min at 35°C, the MACC was hydrolyzed by adding concentrated HCl to a final concentration of 2N, followed by boiling for 1 h. The hydrolysate was neutralized with 2N NaOH, and ACC was analyzed according to Lizada and Yang (1979)

Mutant species	ACC <i>N</i> -malonyltransferase activity ^a (unit/mg)	
	Intact rosette	Incubated rosette
Wild type	0.22 ± 0.001 ^b	0.42 ± 0.003
<i>eto1-1</i>	0.34 ± 0.005	1.32 ± 0.009
<i>etr1-3</i>	0.32 ± 0.004	1.64 ± 0.005
<i>ein2-1</i>	0.31 ± 0.005	0.84 ± 0.002

^aOne unit of enzyme activity was defined as the amount of proteins catalyzing the formation of 1 nmol MACC/h at 35°C, ^bThe results are the mean ± SD of values from three experiments.

액에 배양한 후 수거한 rosette에서 ACC synthase를 부분 분리하여 이 효소의 기질인 SAM과 반응을 시킴으로써 생성되는 ACC의 양을 측정하였다(Table 1). Intact rosette에서는 야생형과 각 돌연변이체에서 모두 GC로 측정할 수 없을만큼 ACC synthase의 활성이 낮았다. 그러나 21시간 동안 완충 용액에 배양했던 rosette에서 ACC synthase의 활성은 야생형에서 0.59 unit/mg이었으며, *eto1-1*은 0.57 unit/mg으로서 야생형과 거의 비슷하였고, *etr1-3*과 *ein2-1*에서는 각각 0.77

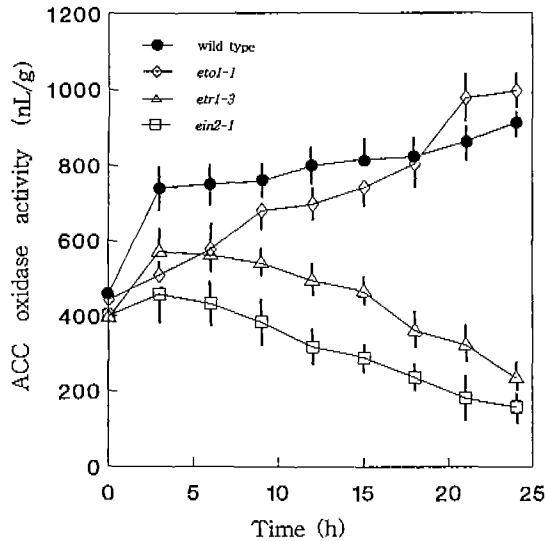


Fig. 3. Time course of the *in vivo* ACC oxidase activity in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. Each rosette was incubated with buffer for various time periods. After incubation, the ACC oxidase activity was measured for 1 h using 1 mM ACC as a substrate. The bar represents the SD from the mean.

unit/mg과 0.98 unit/mg으로 야생형보다 약간 증가하였다(Table 2). 에틸렌 생합성의 마지막 단계에 관여하는 ACC oxidase 활성은 야생형의 intact rosette에서는 457.9 nL/g이었고 *eto1-1*에서 444.0 nL/g, *etr1-3*에서 395.0 nL/g, 그리고 *ein2-1*에서는 401.1 nL/g으로 모두 비슷하였다. 배양 21시간 후 ACC oxidase의 활성은 야생형에서 861.8 nL/g, *eto1-1*에서 976.2 nL/g, *etr1-3*에서 322.9 nL/g, *ein2-1*에서 180.5 nL/g으로, *eto1-1*에서는 야생형과 비슷한 양상을 보여 배양 시간이 증가함에 따라 효소 활성도 증가하는 양상을 보였으나, *etr1-3*과 *ein2-1*에서는 배양 시간이 증가함에 따라 효소 활성은 현저히 감소하여 배양 21시간 후 야생형보다 활성이 매우 낮았다(Fig. 3). 이 결과들로부터 *eto1-1*에서의 증가된 에틸렌 생성은 주요 조절 효소인 ACC synthase나 ACC oxidase의 활성 변화와는 무관하며 SAM synthetase의 활성 증가 때문임을 추측할 수 있었다. 에틸렌의 작용 기작 중에 결함이 있는 *etr1-3*과 *ein2-1*은 에틸렌을 인식하지 못하여 증가한 에틸렌에 대한 조절이 이루어지지 못하므로 ACC synthase의 활성의 증가는 에틸렌에 의한 ACC synthase의 자가 억제가 되지 않았기 때문이며, ACC oxidase 활성의 감소는 에틸렌에 의한 ACC oxidase의 자가 촉매가 되지 않았기 때문으로 추측된다. 반면에 *etr1-3*과 *ein2-1*에서 ACC oxidase의 활성이 야생형에 비해 상당히

A. ACC synthase transcript

Wild type	<i>eto1-1</i>	<i>etr1-3</i>	<i>ein2-1</i>	Time (h)			
0	21	0	21	0	21	0	21



B. ACC oxidase transcript

Wild type	<i>eto1-1</i>	<i>etr1-3</i>	<i>ein2-1</i>	Time (h)			
0	21	0	21	0	21	0	21



Fig. 4. RNA gel blot analysis of ACC synthase and ACC oxidase in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. After the rosettes were incubated for the indicated times, total RNA was isolated. 20 μ g of total RNA were fractionated on gels, transferred to nitrocellulose membranes, and hybridized with the ACC synthase probe (*Arabidopsis* paACS2) and the ACC oxidase probe (Mungbean pVR-ACO1). Exposure time for the two blots was different (ACS2: 5 days; ACO1: 2 weeks).

낮았음에도 불구하고 그것이 에틸렌 생성량에 영향을 주지 않은 것은 세포내에서 꾸준히 발현되는 이 효소의 경우 basal level 이상이면 에틸렌 생성량에 크게 영향을 주지 않을 것으로 사료된다.

ACC synthase와 ACC oxidase의 효소 활성과 mRNA 양과의 관계를 보기 위하여 northern blotting을 행하였다(Fig. 4). *Arabidopsis*에서 cloning한 ACC synthase의 cDNA인 paACS1, paACS2, paACS4, 그리고 paACS5(Liang *et al.*, 1992)를 이용하여 ACC synthase의 mRNA 양을 측정하였고 녹두 하배측에서 cloning한 ACC oxidase의 cDNA인 pVR-ACO1(Kim and Yang, 1994)을 이용하여 ACC oxidase의 mRNA의 양을 측정하였다. Exposure time은 ACC synthase의 blot은 5일이며 ACC oxidase의 blot은 15일이었다. 따라서 film을 densitometer로 측정한 optical density(OD) 값을 이용하여 ACC synthase와 ACC oxidase의 mRNA 양을 절대값으로 비교할 수는 없었다. paACS2를 이용한 ACC synthase mRNA의 양은 야생형의 intact rosette에서 OD 35.6, 21시간 배양한 rosette에서는 OD 44.0이었으며 *eto1-1*의 intact rosette에서 OD 33.8, 21시간 배양한 rosette에서 OD 46.7로 야생형과 거의 차이가 없었다. *etr1-3*의 paACS2를 이용한 ACC synthase mRNA의 양은 intact rosette에서 OD 38.8, 21시

Table 3. Endogenous ACC content in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants

Mutant species	ACC content (M)	
	Intact rosette	Incubated rosette
Wild type	ND ^a	5.6×10^{-6}
<i>eto1-1</i>	ND	16.8×10^{-6}
<i>etr1-3</i>	ND	13.0×10^{-6}
<i>ein2-1</i>	ND	9.6×10^{-6}

^aND: Not detectable.

간 배양한 rosette에서 OD 46.7, *ein2-1*의 intact rosette에서 OD 58.6, 21시간 배양한 rosette에서 OD 59.8로 intact rosette에서는 야생형보다 약간 높았으나 배양 후에는 각각의 돌연변이체에서 mRNA 수준이 크게 변하지 않았으며 이는 *etr1-3*과 *ein2-1*의 에틸렌에 대한 작용 기작의 결함으로 인해 배양 시간이 증가하여도 ACC synthase의 mRNA 양에 크게 변화가 없는 것으로 추측된다. 그리고 paACS1, paACS4, paACS5를 probe로 이용한 ACC synthase mRNA의 수준은 매우 낮아 그 값을 비교할 수 없었다. pVR-ACO1을 이용하여 측정한 ACC oxidase mRNA의 양은 야생형의 intact rosette에서 OD 30.0, 21시간 배양한 rosette에서 OD 49.8이었으며 *eto1-1*의 intact rosette에서 O.D. 34.7, 21시간 배양한 rosette에서 OD 45.3, *etr1-3*의 intact rosette에서는 OD 35.4, 21시간 배양한 rosette에서는 OD 31.9, *ein2-1*의 intact rosette에서 OD 42.1, 21시간 배양한 rosette에서 OD 40.0이었다. 야생형과 *eto1-1*의 intact rosette과 21시간 동안 배양한 후 수거한 rosette에서 ACC oxidase의 mRNA의 양은 거의 비슷하였으나 *etr1-3*과 *ein2-1*에서 ACC oxidase mRNA의 양은 야생형보다 적었고 배양 후 약간 감소하였다. 따라서 이러한 결과는 ACC synthase와 ACC oxidase의 mRNA양이 효소 활성의 변화 양상과 비교적 잘 일치함을 나타내었다.

ACC N-malonyltransferase는 ACC를 MACC로 비가역적으로 전환시키는 효소이며, MACC는 불활성화된 최종 산물이 된다(Kionka *et al.*, 1984). 따라서 ACC의 malonylation은 에틸렌 생성량을 조절하게 된다. Intact rosette에서 ACC N-malonyltransferase의 활성은 야생형이 0.22 unit/mg이며 *eto1-1*이 0.34 unit/mg, *etr1-3*이 0.32 unit/mg, *ein2-1*이 0.31 unit/mg으로 야생형과 각 돌연변이체간에 약 1.4배 정도의 차이가 나타났다. 그러나 21시간 동안 완충 용액에서 배양한 rosette에서의 ACC N-malonyltransferase의 활성은 야생형이

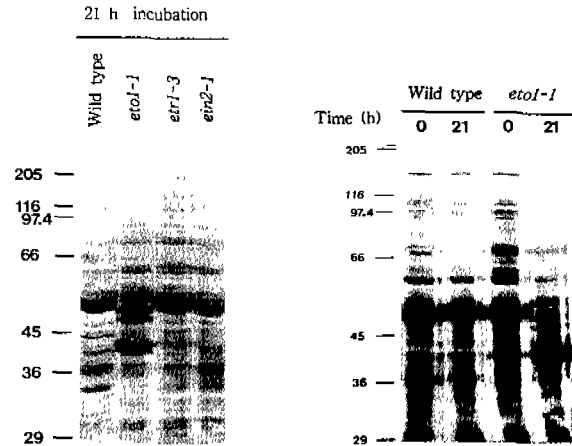


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of cytosolic proteins in *Arabidopsis* wild type and triple response mutants. After the rosettes were incubated with buffer for the indicated times, SDS-PAGE was conducted using 10% gel by the methods of Laemmli (1970). Proteins were detected by silver staining. Molecular mass markers at left are given in kilodaltons.

0.42 unit/mg, *eto1-1*이 1.32 unit/mg으로 야생형과 약 3배, *etr1-3*이 1.64 unit/mg으로 약 4배, *ein2-1*이 0.84 unit/mg으로 약 2배의 차이가 있었다. ACC의 함량은 intact rosette에서는 GC로 측정이 되지 않을 만큼 낮은 수준으로 존재하였고, 21시간 동안 완충 용액에서 배양한 rosette에서는 야생형이 5.64 μ M이었고, *eto1-1*이 16.8 μ M로 야생형과 약 3배의 차이가 있었고, *etr1-3*은 13.0 μ M로 야생형과 약 2.3배의 차이가 있었으며, *ein2-1*은 9.6 μ M로 야생형과 약 1.7배의 차이가 있었다(Table 3). 녹두 유식물에서 순수 정제한 ACC N-malonyltransferase는 malonyl-CoA의 농도를 포화 상태로 고정시켰을 때 ACC의 농도가 증가할수록 효소 활성도 증가하며(Guo *et al.*, 1992) ACC의 농도는 ACC N-malonyltransferase의 K_m 값보다 약 10배 정도 높아도 기질에 의한 효소 활성의 억제 효과를 나타내지 않는다(Guo *et al.*, 1993). 즉, *eto1-1*, *etr1-3*, 그리고 *ein2-1*에서 각각의 결함으로 인하여 증가된 ACC가 세포내에서 항상 어느 정도의 수준을 유지하던 ACC N-malonyltransferase의 활성을 촉진시켜서 증가된 에틸렌 생성량을 감소시키려 한 것으로 추정되며 각 돌연변이체의 변형은 ACC N-malonyltransferase와는 무관함을 알 수 있었다.

각 돌연변이체의 세포질 단백질을 분리하여 SDS-PAGE를 함으로써 단백질 pattern에 차이가 있는지를 조사하였다(Fig. 5). 21시간 동안 완충 용액에 배양시

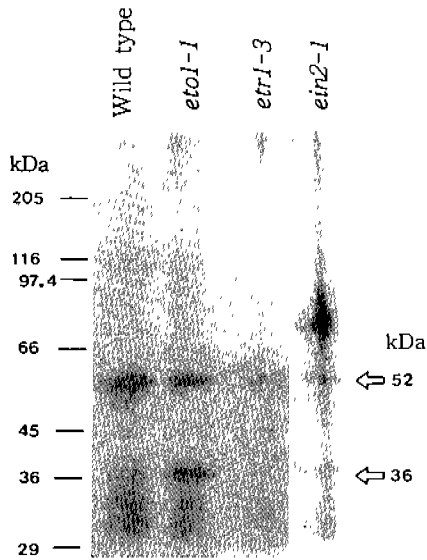


Fig. 6. Phosphorylation pattern of cytosolic proteins from *Arabidopsis* wild type and triple response mutants incubated with [γ - 32 P] ATP, tetradecanoyl phorbol acetate and okadaic acid. Rosettes were harvested and crude extracts were prepared for the *in vitro* kinase assays, as described in Methods. After incubation of the reaction mixture, proteins were electrophoresed on a 12% SDS-polyacrylamid gel. The labeled proteins were visualized by autoradiography.

킨 rosette에서 분리한 세포질 단백질의 양상은 야생형과 *etr1-3* 및 *ein2-1*에서는 큰 차이가 없었으나 *eto1-1*의 세포질 단백질에서 다른 점이 관찰되었다. 즉, *eto1-1*에서만 45~50 kDa에서 다른 pattern의 단백질이 관찰되었다. 다시 야생형과 *eto1-1*의 intact rosette과 21시간 동안 완충 용액에서 배양시킨 후 수거한 rosette에서 분리한 세포질 단백질을 PAGE한 결과 21시간 동안 완충 용액에서 배양시킨 경우에서만 단백질 pattern이 변화하여 50 kDa의 단백질이 사라지고 40 kDa 부근의 단백질이 관찰되었다. 즉 배양하는 과정 중 *eto1-1*에 의하여 축적된 에틸렌이 단백질 pattern의 변화에 관여한다고 볼 수 있다. 이 사실을 확인하기 위하여 야생형의 rosette에 10 μ L/L의 에틸렌을 처리하여 21시간 배양시킨 후 그 세포질 단백질을 추출하여 SDS-PAGE하였으나 단백질 pattern은 변화가 없이 야생형의 세포질 단백질과 비슷한 양상을 보였다 (제시하지 않음). 따라서 21시간 동안 완충 용액에 배양시킨 *eto1-1*에서 세포질 단백질 pattern의 차이는 외부 에틸렌에 의한 것이 아니며 *eto1-1* 내부의 어떤 다른 요인에 의한 것으로 추측된다. 식물의 에틸렌 신호 전달 경로에서 secondary messenger의 참여 및 여러

단백질의 인산화가 가능하다. 에틸렌에 의존적인 elicitor의 반응은 토마토의 배양 세포(Felix *et al.*, 1991)와 담배 잎(Raz and Fluhr, 1993)에서 인산화에 의해 매개된다고 보고된 바 있다. 또 elicitor를 처리한 담배 세포에서 myelin basic protein(MBP)의 인산화를 촉매하는 단백질이 확인되었으며 단백질의 tyrosine에 autophosphorylation 활성도 관찰되었다(Suzuki and Shinshi, 1995). 인산화와 같은 post-translational modification은 많은 transcriptional factor의 결합 친화도를 변화시킨다고 알려져 있다(Hunter and Karin, 1992) 따라서 에틸렌 신호 전달 경로에 관여할 가능성이 있는 인산화된 단백질을 각 돌연변이체를 이용하여 조사하기 위하여 각 돌연변이체에서 얻은 단백질과 [γ - 32 P] ATP를 반응 용액에 넣어 반응시킨 후 인산화가 일어난 단백질을 분석하였다(Fig. 6). 이 때 반응 용액에는 tetradecanoyl phorbol acetate(TPA)와 phosphatase 2(PP2A)를 억제하는 okadaic acid를 함께 처리하였다. 그 결과 두 종류의 인산화된 단백질이 관찰되었는데 52 kDa 단백질은 야생형 및 모든 돌연변이체에서 관찰되었으며, 36 kDa 단백질은 *eto1-1*과 *ein2-1*에서만 관찰되었다(Fig. 6).

이상의 결과로부터 각 돌연변이체의 에틸렌 생성과 에틸렌 생합성 효소계간의 변형에 관해 다음과 같이 추측이 가능하다. *eto1-1*의 지속적인 triple response는 자체내의 과도한 에틸렌 생성으로 인한 것이며 이런 과도한 에틸렌 생성은 조직내 ACC 함량의 증가가 직접적인 원인으로 이는 SAM synthetase의 활성이 증가했기 때문으로 추측된다. 그리고 세포내의 단백질에도 변화가 관찰되어 야생형과는 달리 45~50 kDa의 위치에서 단백질 pattern이 변하였고 36 kDa 단백질의 인산화가 관찰되었다. *etr1-3*과 *ein2-1*은 에틸렌 생성량이 야생형보다 많았으나 triple response를 나타내지 않는 것으로 보아 에틸렌에 대한 반응을 못하는 것으로 보이며 이에 따라 ACC synthase와 ACC oxidase에 대하여 mRNA 수준과 효소 수준에서 모두 에틸렌에 의한 자가 조절이 이루어지지 않은 것이 관찰되었다. 그리고 SAM synthetase의 활성이 *etr1-3*에서는 야생형과 비슷하였으나 *ein2-1*에서는 야생형보다 높았으며, 36 kDa 단백질의 인산화도 *ein2-1*에서만 이루어졌다. 현재까지 *etr1-3*은 에틸렌의 세포 수용체로, *ein2-1*은 에틸렌 신호 전달 경로의 중간 조절자로 알려져 있다(Chang *et al.*, 1993). 따라서, SAM synthetase의 활성과 36 kDa 단백질의 인산화에서 나타난 *etr1-3*과 *ein2-1*간의 차이는 이 두 돌연변이체의 유전 및 생화학적

변형의 차이로 인한 것으로 추측된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 호르몬연구센터 9523(이준승) 연구지원과 교육부 기초과학연구소 육성지원 연구비(김우택) (BSRI 95-4424)에 의하여 수행된 것임.

인 용 문 헌

- Abeles, F.B.** 1992. Ethylene in plant biology. 2nd. Ed., Academic press, N. Y., pp. 1-296.
- Bleeker, A.B., M.A. Estelle, C. Somerville and H. Kende.** 1988. Insensitivity to ethylene conferred by dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**: 1086-1089.
- Boerjan, W., G. bauw, M.V. Montagu and D. Inze.** 1994. Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine synthetase reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco. *Plant Cell* **6**: 1401-1414.
- Boller, T., R.C. Herner and H. Kende.** 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* **145**: 293-303.
- Bowler, C. and N.H. Chua.** 1994. Emerging themes of plant signal transduction. *Plant Cell* **6**: 1529-1541.
- Brady, C.J.** 1987. Fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **38**: 155-178.
- Bufler, G., Mor, Y., Reid, M.S. and S.F. Yang.** 1980. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content of cut carnations flowers in relation to their senescence. *Planta* **150**: 439-442.
- Chang, C., S.F. Kwok, A.B. Bleeker and E.M. Meyerowitz.** 1993. *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to Two-component regulators. *Science* **262**: 539-544.
- Felix, G., D.G. Grosskopf, M. Regenass and T. Boller.** 1991. Rapid changes of protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8831-8834.
- Guo, L., A.T. Phillips and R.N. Arteca.** 1993. Amino acid N-malonyltransferases from mung beans. *J. Biol. Chem.* **268**: 25389-25394.
- Guo, L., R.N. Arteca, A.T. Phillips and Y. Liu.** 1992. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyltransferase from etiolated Mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* **100**: 2041-2045.
- Guzman, P. and J.R. Ecker.** 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify Ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**: 513-523.
- Hunter, T. and M. Karin.** 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375-387.
- Kende, H.** 1989. Enzyme of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* **91**: 1-4.
- Kende, H.** 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 283-307.
- Kieber, J.J., M. Rothenberg, G. Roman, K.A. Feldmann and J.R. Ecker.** 1993. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441.
- Kim, W.T. and S.F. Yang.** 1994. Structure and expression of cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from excised mungbean hypocotyls. *Planta* **194**: 223-229.
- Kionka, C. and N. Amrhein.** 1984. The enzymatic malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in homogenates of mung-bean hypocotyls. *Planta* **162**: 226-235.
- Koncz, C., N.H. Chua and J. Schell.** 1992. Method in *Arabidopsis* research. World Scientific Publishing Co., Singapore, pp. 1-437.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Leevers, S.J. and C.J. Marshall.** 1992. Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21^{ras} oncoprotein. *EMBO J.* **11**: 569-574.
- Leutwiler, L.S., B.R. Hough-Evans and E.M. Meyerowitz.** 1984. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 15-23.
- Liang, X., S. Abel, J.A. Keller, N.F. Shen and A. Theologis.** 1992. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11046-11050.
- Liu, Y., L.Y. Su and S.F. Yang.** 1985. Ethylene promotes the capability to malonylate 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and D-amino acids in preclimacteric tomato fruits. *Plant Physiol.* **77**: 891-895.
- Lizada, M. C.C. and S.F. Yang.** 1979. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal. Biochem.* **100**: 140-145.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.L. Randall.** 1951. Protein determination. *J. Biol. Chem.* **183**: 265-275.
- Meyerowitz, E.M.** 1989. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* **56**: 263-269.
- Nakielny, S., D.G. Campbell and P. Cohen.** 1992. MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle; a novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* **308**: 183-189.
- Parkinson, J.S.** 1993. Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**: 857-871.
- Peleman, J., W. Boerjan, G. Engler, J. Seurinck, J. Botterman, T. Alliotte, M.V. Montagu and D. Inze.** 1989. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosylmethionine synthetase. *Plant Cell* **1**: 81-93.
- Raz, V. and R. Fluhr.** 1993. Ethylene signal is trans-

- duced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* **5**: 523-530.
- Redei, G.P.** 1990. In Abstracts of the Fourth International Congress on Arabidopsis Research, Vienna, p. 42.
- Rothenberg, M. and J.R. Ecker.** 1993. Mutant analysis an experimental approach towards understanding plant hormone action. *Sem. Dev. Biol.* **4**: in press.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Sato, T. and A. Theologis.** 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6621-6625.
- Suzuki, K. and H. Shinshi.** 1995. Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in Tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**: 639-647.
- Yang, S.F. and N.E. Hoffman.** 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 55-189.
- Yen, H.C., S. Lee, S.D. Tanksley, M.B. Lanahan, H.J. Klee and J.J. Giovannoni.** 1995. The tomato *Never-ripe* locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the *Arabidopsis ETR1* gene. *Plant Physiol.* **107**: 1343-1353.

(1996. 2. 17 接受)

The Physiological and Biochemical Characterizations of Ethylene Triple Response Mutants in *Arabidopsis thaliana*

Kang, Heui-yeon, Woo Taek Kim¹, June Seung Lee*

Department of Biological Sciences, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea; and

¹Department of Biology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

The physiological and biochemical characterizations of the ethylene-related mutants in *Arabidopsis thaliana* – ethylene overproducing mutant (*eto1-1*) and ethylene insensitive mutants (*etr1-3*, *ein2-1*) – were detailed in this studies. Two or three week-old mature rosette leaves (before bolting) were used as the plant materials. Ethylene productions of *eto1-1*, *etr1-3*, and *ein2-1* mutants were about 200%, 400%, and 450% compared to that of wild type, respectively. ACC synthase and ACC oxidase activities of *eto1-1* mutant were similar to those of wild type. ACC content and ACC N-malonyltransferase activity, however, were 4.5 times and 3 times higher than those of wild type, respectively. SAM synthetase activity increased by 50% in *eto1-1* mutant plant. These results indicated that the alteration in the *eto1-1* mutant occurred before the step of the conversion of SAM to ACC. In *etr1-3* and *ein2-1* mutants, ACC synthase activities increased, but ACC oxidase activities decreased. ACC content and ACC N-malonyltransferase activity were 2 times higher than those of wild type. SAM synthetase activity in *etr1-3* is similar to those of wild type, while it increased by 73% in *ein2-1*. These results showed that the block in ethylene action affected the autoregulation of ethylene biosynthesis, so that ACC synthase activity was not autoinhibited and ACC oxidase activity was not autostimulated by ethylene. When the leaf tissues were used for *in vitro* kinase assay, a cytosolic protein (approximately 36 kDa) was phosphorylated only in *eto1-1* and *ein2-1* mutants.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, ACC oxidase, ACC synthase, ethylene-related mutants, SAM synthetase

*Corresponding author: Fax +82-2-360-2385

e-mail: jsLee@mm.ewha.ac.kr