

Streptanthus tortus 배양 세포에서 당류고갈이 당류 수송계에 미치는 영향

조봉희
수원대학교, 생명과학부

Effect of Sugar Starvation on the Sugar Transport System in Suspension Cultures of *Streptanthus trotus*

CHO, Bong - Heuy

Division of Life Science, The University of Suwon, Suwon, 445-743, Korea

ABSTRACT In suspension cultures of *Streptanthus*, the uptake rate of sugar was increased during the cell starvation of sugar in the medium. The maximal uptake rate obtained with 3 days of cell starvation. Sugar transport system induced by the sugar starvation was completely inhibited by 10 μ M cycloheximide. Plant cells are known to possess only one sugar transport system, but the uptake rate of glucose obtained a saturated kinetic while the one of sucrose had two different kinetics after the sugar starvation. Induced sugar transport systems had different kinetics compared to plant cell. These results showed that higher plants have adaptable ability to induce new sugar transport systems when the environment changed unsuitable.

Key words: Cycloheximide, induced sugar transport system, uptake rate

서 론

살아 있는 생명체의 특징은 물질을 세포 내로 끊임없이 수송하여 세포 내에 물질을 고농도로 축적시키는 경향이 있다. 세포 내에 물질을 고농도로 축적시키기 위해서는 적절한 환경조건, 운반자와 에너지가 필수적이다. 식물은 동물 및 일부 미생물과는 달리 2차 능동수송에 필요한 에너지를 수소이온 형태로 사용하는 substrate-proton-cotransport 작용으로 물질을 세포 내로 수송한다 (Lanyi 1977; Komor et al. 1980).

단세포 생물은 보통 그 자신이 성장하고 분화하는데 필요한 당류와 아미노산 등 수송계를 선천적으로 소유하고 있으나 때로는 환경변화에 대응하여 필요한 수송계를 유도시켜서 적응한다 (Cho et al. 1981). 단세포 식물은 선천적인 당류 수송계와 유도될 수 있는 당류 수송계를 소유하고 있고 (Haass

and Tanner 1974), 또한 선천적으로 7개에 다른 아미노산 능동 수송계 (Cho and Komor 1985)와 4개의 아미노산 능동 수송계를 유도시킬 수 있으므로 수송 물질에 따라 다른 종류에 단백질을 합성해야 하므로 에너지 소모가 크다고 보겠다 (Cho and Komor 1984). 고등 식물에서는 한 개의 수송계를 통하여 20개의 아미노산을 수송할 수 있는 일반적인 아미노산 능동 수송계 (Komor 1977), 두 종류의 능동 수송계 (Harrington and Henke 1981)와 3 종류의 아미노산 능동 수송계 (Wyse and Komor 1984) 등 능동 수송계가 보고되었다. 그러나 고등 생체에서는 환경변화에 대응하여 당류와 아미노산 수송계를 유도시킨다는 보고는 지금까지 없다.

식물체와 비교해서 같은 식물에서 유도된 조직배양 세포들은 다른 당류 수송계를 가진다 (Cho and Komor 1985). 그 예로 피마자 (*Ricinus communis*) 자엽에서 유도된 조직배양 세포는 식물에서 존재하던 다른 당류 수송계를 소유하고 있는데, 당류 수송계는 자엽에서 캘러스가 유도되는 동안에 유도된다. 다른 당류 수송계란 자엽에서는 설탕 수송계가 선

*Corresponding author. Tel 0331-220-2482

E-mail chcho.mail.suwon.ac.kr.

천적으로 존재하나, 그 자엽의 조직배양 세포에서는 설탕 수송계는 사라지고, 단당류 수송계가 대신 유도된다 (Cho and Komor 1985). 고등식물의 조직배양 세포에서 환경 변화에 따라 다른 당류 수송계를 유도시킨다는 보고는 없다. 조직배양 세포는 같은 환경조건을 유지 시킬 수 있는 장점이 있고, *Streptanthus* 조직배양 세포는 환경변화에 잘 적응하므로 유도될 수 있는 당류 능동 수송계를 연구하는데 적당하므로 선택하였다. 본 연구에서는 *Streptanthus tortus* 조직배양 세포를 이용하여 당류의 고갈로 유도되는 새로운 당류 수송계가 있음을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

식물세포와 조직배양

본 실험에서 사용한 *Streptanthus tortus*의 조직배양 세포는 자엽에서 유도시킨 캘러스이다. 캘러스는 Nickel and Maretzki (1969) 기본배지에다 2 mg/L 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 20 g/L sucrose, 60 mg/L arginine과 0.1% yeast extract를 첨가한 배지를 사용하여 유도시켰고, 액체배지는 위와 동일하나 yeast extract가 제외된 배지를 사용하였다. 배양은 100 mL 삼각 플라스크를 이용하여 27°C 암소에서 하였고, 매 2주에 한번씩 5 mL를 취하여 새로운 배양액에 주입하여 계대배양하였다.

당류의 능동수송의 측정

당류의 능동수송은 계대배양 후 최대 생장기에 해당되는 10일째 배양 세포를 사용하였다. 세포를 사용하기 하루 전 새로운 배지로 바꾸고, 이때 목적에 따라서 포도당 또는 설탕이 첨가된 배지 또는 당류가 전혀 첨가되지 않은 배지 (starvation)으로 바꾼다. 여과지로 걸러 모아진 세포에 남아 있는 당류를 제거하기 위해 멸균 증류수로 씻었다. 여과지로 걸러진 세포 1g를 25 mM 인산 완충용액 (pH 6.0) 10 mL에 넣어서 27°C에서 안정화시켜 주었다. 능동수송 실험은 0.2 μ Ci의 14 C- sucrose와 0.14 μ Ci 14 C- glucose에다 실험 목적에 따라서 표지되지 않은 각각의 당류를 다양한 농도 (0.05 mM ~ 50 mM)로 잘 희석한 후 세포에다 직접 첨가하므로써 측정하였다. 30초 간격으로 1 mL의 시료를 꺼내서 즉시 여과시키고, 각 시료를 냉각된 같은 당류로 씻은 후 수송된 당류를 측정하였다. Cycloheximide는 실험 10분전에 전 처리하였다. 그외 부가된 실험 내용은 Cho (1987)와 동일하다.

당류의 K_m 과 V_{max} 의 측정

당류 운반자에 kinetic을 알기 위해서 K_m 과 V_{max} 의 값을

측정하였으며, K_m 과 V_{max} 의 값은 당류 농도에 의존하는 능동 수송 속도를 측정하여 결정하였다. 측정방법은 위에 설명한 당류의 수송속도 측정방법과 마찬가지로 당류를 준비하여 능동 수송을 측정하였다. 사용한 농도범위는 0.05 mM ~ 50 mM 이다. 능동수송 속도를 측정한 결과로부터 double-reciprocal plot에서 K_m 과 V_{max} 의 값을 구하였다.

결과 및 고찰

당류의 능동 수송계

지금까지 알려진 식물 조직배양 세포에서는 당류의 고갈과는 상관없이 당류 수송계는 항상 일정한 수송속도를 나타내는 것이 보통이나 (Komor et al. 1981; Cho and Komor 1985), 십자화과의 조직배양 세포는 다른 조직배양 세포와는 달리 처음에는 당류의 수송속도가 매우 느리다가 배양시간의 증가와 함께 수송속도가 증가되었다 (Figure 1). 당류 고갈을 12시간 동안 유도시킨 후 당류의 수송속도를 측정하면, 처음에는 당류 수송속도가 느리다가 고갈시간이 증가할수록 당류의 수송속도가 증가되었다. 그러나 배지에다 포도당 또는 설탕을 넣고 12시간 동안 유도시킨 세포에서는 상대적으로 매우 낮은 당류의 수송속도를 보였다. 이 경우에도 배양시간의 경과에 따라서 수송속도가 증가되었으나 당류의 고갈상태로 12시간 처리한 세포보다는 수송속도가 매우 낮았다. 조직배양 세포에 설탕을 가하면 설탕은 먼저 산성 invertase에 의하여 가수분해된 후 단당류 형태로 수송된다 (Cho 1987). 포도당과 과당은 같은 수송계를 통하여 수송되는 경우도 있고 (Cho and Komor 1985), 포도당과 과당이 다른 수송계를 통하여

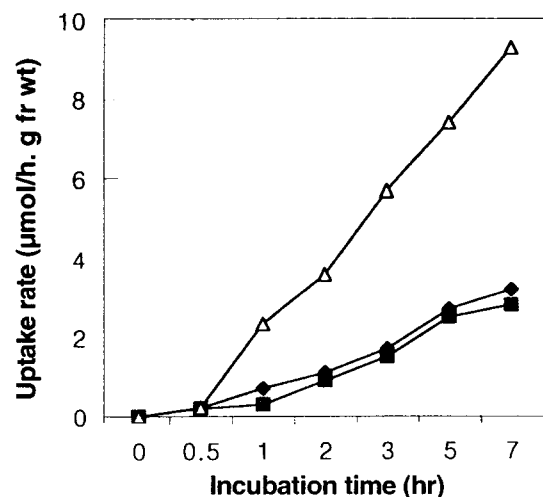


Figure 1. Effects of sugar starvation on the transport system of glucose in suspension cultures of *streptanthus tortus*. Cells were incubated without sugar (-Δ-) or in the presence of 10 mM glucose (-◆-) or 10 mM sucrose (-■-).

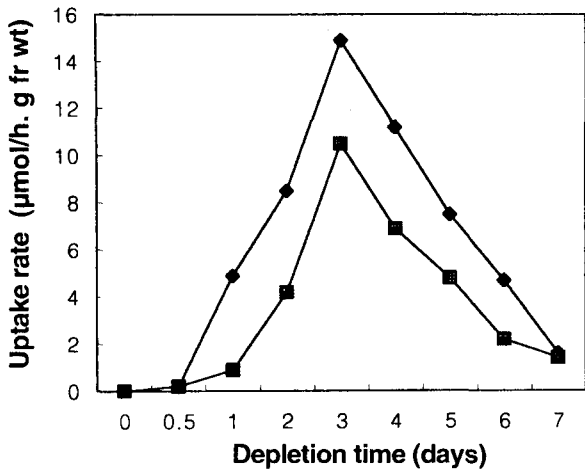


Figure 2. Effects of sugar starvation on the transport system of sugar in suspension cultures of *Streptanthus tortus*. The suspension cells were incubated without (- ♦-) or sucrose (- ■-). The concentration of sugars was 1 mM.

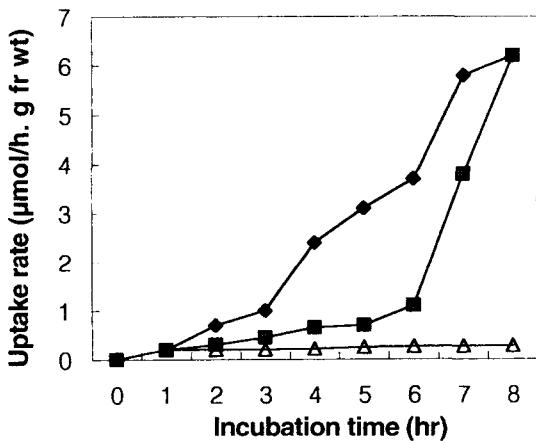


Figure 3. Effects of cycloheximide on the induction of the transport system of sugars during the sugar in suspension cultures of *Streptanthus tortus*. Cycloheximide was added 10 min before uptake (- ♦- 0 µM, - ■- 1 µM, - △- 10 µM). The concentration of tested was sugars was 1 mM.

Table 1. Kinetic changes on the uptake of sugars with the previously depleted suspension cells.

Condition	substrate	K _m (mM)	V _{max} (µmol · h · g fresh weight ⁻¹)
Undepleted cells	glucose	7.4	9.80
	sucrose ^a	1.73	5.90
Deplete cells	glucose	0.28	13.92
	sucrose ^a	0.48	5.60
		11.76	12.50

^aThe concentration of sugars was between 0.05 mM~10 mM for low affinity system and 1.0 mM~50 mM for high affinity system.

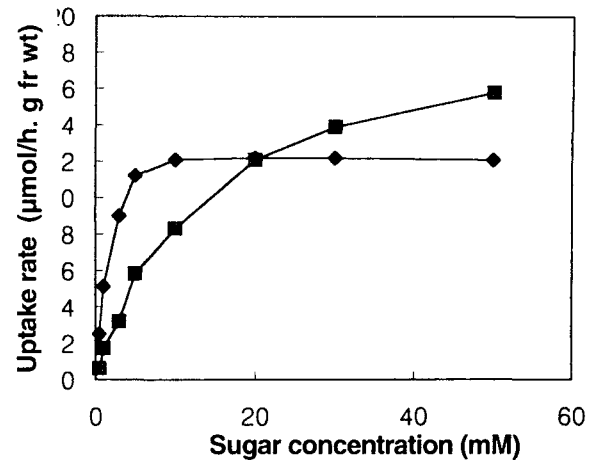


Figure 4. The uptake rate of glucose (- ♦-) or sucrose (- ■-) with the previously depleted suspension cultures of *Streptanthus tortus*. The concentration of sugars was between 0.05 mM ~50 mM.

수송되는 경우도 있다 (Cho 1987).

세포를 지속적으로 당류고갈 상태로 유지시키면, 얼마나 당류의 수송속도가 증가되는지를 보았다 (Figure 2). 당류의 고갈이 시작된 날로부터 3일째 될 때까지 당류의 수송속도가 증가되었으나 그 이후에는 서서히 감소되었고, 당류고갈 상태가 7일까지 계속될 때는 당류 수송속도가 다시 최하에 도달되었다. 이 현상은 당류에 고갈로 세포 내에 양분부족과 에너지 부족으로 세포가 더 이상 물질을 수송할 수 없기 때문일 것으로 추정한다. 또한 당류의 고갈로 당류의 수송속도가 증가되는 시기에 새로운 단백질이 유도되는지를 알기 위해서 단백질 합성방해 물질인 cycloheximide를 처리하였다 (Figure 3). 1 µM cycloheximide을 처리 하였을 때는 당류의 수송이 처음에는 방해 당하였다가 서서히 회복되었고, 10 µM cycloheximide를 처리하였을 때는 당류의 수송이 완전히 방해 당하여 당류 고갈동안 새로운 단백질이 합성되었음을 증명해 주고 있다.

당류 능동 수송계의 분석

조직배양 세포는 선천적으로 하나의 당류 수송계를 소유하나, 당류 고갈 상태에서 유도된 당류 수송계는 다른 kinetic를 보인다 (Figure 4). 포도당의 수송에서는 포화상태의 곡선을 보이나 설탕의 수송에서는 포화상태의 곡선을 나타내지 않았다. 물질 수송계에서 이러한 결과는 아미노산 또는 당류 수송계에서 이미 보고된 결과다 (Cho 1987; Shtarkshall and Reinhold 1974). 선천적인 포도당 수송계는 K_m이 7.4 mM이고, 당류 고갈로 유도된 포도당 수송계의 K_m은 0.25 mM이로, 두 개의 포도당 수송계가 다른 단백질이 관여함이 시사된다 (Table 1). 마찬가지로 설탕수송에서는 선천적인 수송계의 K_m은 1.73 mM이고, 당류 고갈로 유도된 설탕 수송계는 두 개의 K_m 값을 보이고, high affinity system은 K_m이 0.48

mM이고, low affinity system은 K_m 이 11.76 mM로 전혀 다른 수송계를 유도하였다. 이처럼 당류의 수송계가 환경요인에 따라서 달리 유도되는 경우는 고등식물의 조직배양 세포에서나 전체 식물에서는 보고된 바 없는 현상으로 앞으로 물질의 고갈동안 변화하는 생리 및 생화학적인 연구에 중요한 결과라고 본다.

적 요

당류의 수송속도는 당류 고갈동안 증가되었고, 당류 고갈 3 일째에 최대 수송속도를 보였다. 당류 고갈로 유도된 당류 수송계는 cycloheximide에 의해서 완전히 방해되었다. 선천적으로 식물에서 당류 수송계는 하나이나 당류 고갈동안 유도된 포도당 수송은 포화상태를 보이고, 설탕 수송은 포화되지 않았다. 유도된 당류 수송계는 선천적인 당류 수송계와는 다른 kinetic을 보였다. 이 결과는 고등식물도 불리한 조건하에서 새로운 수송계를 유도 시킬 수 있는 능력이 있음을 보여 주었다.

인용문헌

- Cho BH, Sauer N, Komor E, Tanner W (1981) Glucose induced two amino acid transport system in *Chlorella*. Proc Natl Acad Sci 78: 3591-3594
- 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*. Biochimica et Biophysica Acta 821: 384-392
- Cho BH, Komor E (1985) Comparison of suspension cells and cotyledons of *Ricinus* with respects to sugar uptake. J Plant Physiol 118:381-390
- Cho BH (1887) Analysis of the low affinity system of the uptake of fructose in suspension culture cells. Kor J Bot 30:277-285
- Haass D, Tanner W (1974) Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. Plant Physiol 53:14-20
- Harigton HM, Henke RR (1981) Amino acid transport into cultured tobacco cells I. Lysine. Plant Physiol 67:373-378
- Komor E (1973) Proton coupled hexose transport in *Chlorella vulgaris* FEBS Lett 38:16-18
- Komor E (1977) Sucrose uptake by cotyledon of *Ricinus communis*: Characteristics, mechanism and regulation. Planta 137:119-131
- Komor E, Thom M, Maretzki A (1981) The mechanism of sugar uptake by sugarcane suspension cells. Planta 153:181-192
- Komor E, Rotter M, Waldheuser T, Martin E, Cho BH (1980) Sucrose proton symport for phloem loading in the *Ricinus* seedling. Ber Deutsch Bot Ges Bd 193:211-219
- Lanyi JK (1977) Coupling of aspartate and serine transport to the transmembrane electrochemical gradient for sodium ions in *Halobacterium halbium* translocation stoichiometries and apparent cooperativity. Biochem 17:3011-3018
- Nickei LG, Maretzki A (1969) Growth of absorption of proton with specific amino acids and carbohydrates by yeast. Biochem J 134:1031-1043
- Shtarkshall RA, Reinhold L (1974) Multiphasic amino acid transport in leaf cells. In: Zimmermann U, Dainty J (eds) Membrane Transport in Plants Springer Verlag, New York, pp 338-342
- Wyse RE, Komor E (1984) Mechanism of amino acid uptake by sugarcane suspension cells. Plant Physiol 76:8645-870

(접수일자 1999년 12월 7일)