ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2010** Vol. 20. No. 11. 1667~1674 DOI : 10.5352/JLS.2010.20.11.1667

Influence of Nitrate on Growth, Chlorophyll Content, Content and Activity of Rubisco and Rubisco Activase of Tobacco Plant Treated with Cadmium *in vitro*

Kwang Soo Roh*

Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Received August 25, 2010 / Accepted October 28, 2010

Influence of nitrate on growth, chlorophyll content, content and activity of rubisco and rubisco activase of tobacco plant cultured on MS medium treated with cadmium *in vitro* was studied. *In vitro* growth and chlorophyll content reduced at 0.2 mM Cd was recovered by nitrate and this recovery was most significant at 80 mM nitrate. Rubisco content at 80 mM nitrate was more increased compared to that at other concentrations. A similar change was also shown in rubisco activity. These results indicate that the activation and induction of rubisco reduced by Cd were recovered by nitrate. The degree of intensity of 55 and 15 kD polypeptides identified as the large and small subunits of rubisco by SDS-PAGE analysis at 80 mM nitrate was significantly higher than that at other concentrations. The content and activity of rubisco activase at 80 mM nitrate was significantly increased than that at other concentrations. These data suggest that the recovery effects of rubisco by nitrate may be associated with rubisco activase.

Key words : Cd, chlorophyll, nitrate, rubisco, rubisco activase

서 론

Cadmium (Cd)은 주된 환경 오염원인 중금속으로서[29], 토양과 물에 고농도로 존재하면 식물의 뿌리에 의해 쉽게 흡수되어 주로 액포 내에 축적되며[5], 생장을 감소시키거나 대사과정을 손상시킴으로서 식물에 독성을 나타낼 뿐 만 아니라[47], 벼 유식물과 토마토에서 각각 RNase의 활성[39]과 지질의 조성[23]을 변화시키고, 보리 유식물에서 수분스트레스를 유발하여 기공의 개폐에 관여하며[3], 담배에서 산화적 burst [22]를 자극하고, 대두 뿌리에서 리그닌의 생합성에 관여한다[53].

Cd이 광인산화반응[18]과 광화학반응[42]에 관여하며, 칼빈회로에 관여하는 효소들의 활성[50] 및 엽록소의 생합성[24]과 함량[6]에 관여함으로서 광합성에 해로운 효과를 나타내는데, 이러한 연구가 녹두[43], 담배[34], 비둘기 콩[40], 사탕무우[11], 작두[17], 토마토[1] 및 해바라기[7]에서 보고되었다.

질소는 식물이 필요로 하는 주 영양원으로, 토양으로부터 뿌리에 의해 주로 질산염(NO_3^-)과 암모늄염(NH_4^+)의 형태로 흡수되며, 잎으로 운반된 질산염은 질산염 환원효소와 아질산염 환원효소에 의해 아질산염을 거쳐 암모늄염으로 환원된다[14]. 이 두 효소의 활성은 Cd 에 의해 억제된다[2]. 두 질소원 중 암모늄염보다는 질산염의 영향이 크지만, 암모늄염 만을 식물에 공급하면 대부분의 식물은 생장이 억제되며[10], 식물이 가장 쉽게 이용할 수 있는 질소원인 질산염은 중요한 생체조절 물질로서[46], 조직배양과정에서 가장 기본적인 질소원으로 사용되어[38], 시토키닌과 같은 식물호르몬에 영향을 미친다[48].

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)는 자연에 존재하는 단백질 중 가장 풍부한 물질로서 식물 잎 단백질의 약 반을 차지하고 있으며, 1년에 대기 중의 약 10^{11}톤 탄소가 생물학적으로 고정되는 반응에 관여한다. 불활성 상태의 rubisco에 활성 CO_2와 Mg^{2+}이 결합하여 활성화되어야만 광합성에서 ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP)와 CO_2 결합 반응인 carboxylation과 광호흡에서 O_2의 oxygenation을 촉매한다[34].

Pre-mRNA의 alternative splicing에 의해 형성된 2개의 isoform으로 구성되어 있는[54] rubisco activase는 ATP에 의존하여 불활성 상태의 rubisco로부터 RuBP를 제거함으로서 rubisco의 활성을 조절하는 chaperone [28]으로서, CO_2가 결합하는 rubisco의 carbamylation에 기여한다[35]. Rubisco activase는 빛에 의해 활성화되기도 하며 rubisco의 활성부위로부터 CA1P (2-carboxyarabinitol 1-phosphate)와 CABP (carboxyarabinitol 1,5-bisphosphate) 같은 저해제의 제거에 관여한다[49].

이와 같이 Cd의 독성 효과, 질산염의 생리적 작용 및 rubisco와 rubisco activase에 대해서는 각각 비교적 잘 연구되었으나, Cd의 효과에 대한 질산염의 영향을 rubisco와 rubisco activase 차원에서 연구한 논문은 거의 전무하다. 따라서 본 연구에서는 Cd과 질산염의 농도를 다르게 한 MS배지에서 담배를 기내 배양시킨 후, 각 농도에 따른 생장과 엽록소의 함량, rubisco와 rubisco activase의 함량과 활성을 측정함으로서, Cd의 저해에 대한 질산염의 영향을 연구하였다.

*Corresponding author
Tel : +82-53-580-5207, Fax : +82-53-580-5164
E-mail : rks@kmu.ac.kr

재료 및 방법

재료

본 실험을 위하여 담배(*Nicotiana tabacum* L. Wisconsin) 종자를 살균 처리하여 사용하였으며, 질산염으로서는 KNO_3를 사용하였다.

배양 및 생장 측정

담배 종자를 MS 배지[20]에서 무균적으로 발아시킨 후, 줄기를 1 cm의 동일한 크기로 절단하여 0.2 mM $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ [34]와 20, 40, 60, 80, 100 mM의 질산염이 각각 함유된 배지에 치상하여 배양하였다. 16 시간의 광(photo flux density 800 μmol $m^{-2} \cdot s^{-1}$)과 8 시간의 암 상태, 및 26±2°C의 온도를 유지하여, 7주 후 Cd과 각 농도의 질산염에 따른 생장을 비교하였다. 또한 이때의 잎을 채취하여, 이를 엽록소 함량, rubisco와 rubisco activase의 함량과 활성 측정 및 전기영동에 사용하였다.

엽록소 함량의 측정

Inskeep과 Bloom [12]의 방법에 의해 엽록소 함량을 측정하였다. 담배 잎을 80% DMF 용액에 넣어 40°C에서 하루 동안 둔 후, 8,000xg에서 5분간 원심분리를 하여 상등액을 얻은 다음, 664.5 nm와 647 nm에서 이들의 흡광도를 측정하였다. 아래의 식을 이용하여 엽록소 a와 b의 함량을 계산하였다.

Chlorophyll a (mg/g fr. wt.)=12.70 $A_{664.5}$-2.79 A_{647}

Chlorophyll b (mg/g fr. wt.)=20.70 A_{647}-4.62 $A_{664.5}$

Rubisco와 rubisco activase의 분리

Wang 등[49]의 방법을 이용하여 rubisco와 rubisco activase가 함유된 용액을 분리하였다. 액체 질소를 사용하여 마쇄한 잎 분말에 10 mM $NaHCO_3$, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.5 mM ATP, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 10 μM Leupeptin, 1.5% PVPP 및 3 mM MBT가 함유된 50 mM BTP buffer (pH 7.0)를 첨가하여 하루 동안 교반한 후, 4겹의 거즈와 1겹의 miracloth로 여과하고 이를 16,000 rpm에서 40분간 원심분리 하였다. 상등액에 분말 $(NH_4)_2SO_4$를 35%의 포화 농도가 될 때까지 천천히 가하여 30분간 교반한 후, 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 침전물과 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액에 분말 $(NH_4)_2SO_4$를 55%의 포화 농도가 될 때까지 천천히 가하여 30분간 교반한 다음, 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 얻어진 침전물에 DBR [50 mM Tricine (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$, 10 mM DTT, 2 mM MBT]을 가하고, 여기에 최종 농도가 18%가 되게 50% (w/v) PEG-10K을 첨가하여 5분간 교반하였다. 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 DBR로 다시 현탁한 후, 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하였다. 원심분리로 얻어진 상등액을 20 mM BTP (pH 7.2), 1 M $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$로 평형화시킨 Q-Sepharose column상에서 0.15-0.6 M NaCl gradient 용액으로 분당 2.5 ml의 유속으로 6 ml 씩 분획하였다. 가장 높은 rubisco 활성을 가지는 분획을 함량과 활성 측정을 위해 -70°C에 저장하였다.

Rubisco activase는 앞의 35% $(NH_4)_2SO_4$ 처리 후, 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 얻어진 침전물에 DBA [20 mM BTP (pH 7.0), 0.2 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM MBT]로 현탁하고, 최종농도가 18%가 되게 50% (w/v) PEG-10K를 첨가하여 5분간 교반하였다. 교반 후 8,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 DBA로 현탁하고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액과 그 침전물을 다시 DBA로 현탁하고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리후 얻어진 상등액을 합하여 rubisco activase를 분리하기 위한 용액으로 사용하였다. 이를 Q-Sepharose column상에서 0-0.4 mM NaCl gradient 용액으로 분당 1 ml의 유속으로 3 ml씩 분획하였다. 가장 높은 rubisco activase 활성을 가지는 분획을 함량과 활성 측정을 위해 -70°C에 저장하였다.

이 모든 분리 과정은 4°C에서 수행하였다.

Rubisco와 rubisco activase의 함량 측정

ELISA에 의해, rubisco와 rubisco activase의 함량을 측정하였다. Microplate well에 0.1 M sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) 용액으로 희석된 효소 용액을 넣은 후, 4°C에서 하루 밤 동안 반응시키고, 0.05% Tween 20이 함유된 0.01 M PBS (pH 7.4) 용액으로 세척하였다. 0.01 M PBS (pH 7.4)로 만든 0.1% BSA 용액을 사용하여 blocking하고, 1차 항체로서 토끼 항 rubisco와 항 rubisco activase 항혈청을 각각 가하고, 2차 항체로서는 0.1% BSA가 들어있는 0.01 M PBS (pH 7.4)로 1:20,000 희석시킨 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG 용액을 가하였다. Peroxidase의 기질로서 30% H_2O_2가 함유된 0.05 M citrate/0.1 M sodium phosphate buffer (pH 5.0)로 만든 OPD tablet 용액을 가하여 암상태의 실온에서 20분간 반응시킨 후, 1 N HCl로 반응을 정지시켰다. ELISA microplate reader (Bio-Rad model 3550-UV)를 사용하여 492 nm에서 이들의 흡광도를 측정하여 함량을 계산하였다.

Rubisco의 활성 측정

Racker [31]의 방법으로 rubisco의 활성을 측정하였다. 1 M Tris (pH 7.8), 0.006 M NADH, 0.1 M GSH, 0.5 M $KHCO_3$, 0.5% glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 0.025% 3-phosphateglycerate kinase, 0.05% α-glycerophosphate dehydrogenase-triose phosphate isomerase, 0.025 M ribulose bisphosphate, 0.2 M ATP 및 0.5 M $MgCl_2$의 용액에 분획된 rubisco 용액을 가하였다. 주입 즉시 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 RuBP가 PGA를 형성하고 이것이 GAP를 형성할 때 산화하는 NADH 양을 340 nm에서 측정하였다. 1분

에 1 μM의 ribulose bisphosphate를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 나타내었다.

Rubisco activase의 활성 측정

Robinson과 Portis [33]의 방법으로 rubisco activase의 활성을 측정하였다. 50 mM Tricine (pH 8.0), 20 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 2.5 mM ATP, 1 mM PEP, 0.3 mM NADH, 40 units/ml pyruvate kinase 및 40 units/ml lactic dehydrogenase로 구성된 reaction mixture에 분획된 rubisco activase 용액을 첨가하여 25°C에서 1분간 반응시킨 후, UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 이들의 흡광도를 측정하였다. 활성은 NADH oxidation 율로부터 ATP 가수분해율을 계산하여 나타내었다.

SDS-PAGE

Laemmli [15]의 방법에 따라 20% polyacrylamide gel을 사용하여, 분리된 rubisco를 SDS-PAGE하였다. 110 V에서 11시간 30분의 전기영동이 끝난 후, coomassie blue R-250 용액으로 염색하고, 7.5% acetic acid를 사용하여 탈색하였다.

결과 및 고찰

담배의 생장

Cd을 처리하여 기내 배양한 담배의 생장에 미치는 질산염의 영향을 조사하기 위해, 0.2 mM Cd과 각 농도의 질산염이 함유된 MS 기본배지에서 배양하여 생장을 비교하였다.

Cd은 완두 뿌리의 생장을 현저하게 억제시키며[36], 뿌리에서의 양분과 이온의 흡수를 저해시켜 영양결핍과 생장을 억제시킨다[37]. 뿌리의 생장은 전체적으로 빈약하였으나, 질산염의 농도가 증가됨에 따라 같이 증가하였으며, 이 중 80 mM에서 비교적 양호하였다(Fig. 1). 줄기와 잎은 뿌리보다 매우 양호하게 생장하였는데, 질산염의 농도의 증가에 따라 이들의 생장도 증가하여 80 mM에서 가장 높은 생장을 보였으며, 100 mM에서는 80 mM과 비교하여 약간의 차이를 보였다(Fig. 1). 이와 같은 현상은 Cd에 의한 생장 저해가 질산염에 의해 회복되고 있음을 의미한다. 60 mM 이하의 농도에서 보다 80 mM 이상에서 생장이 양호한 것은 Cd에 의해 나타나는 저해 현상이 저 농도보다는 고 농도의 질산염이 더 효과가 있기 때문으로 생각된다. 그러나 Ramage와 Williams [32]는 담배 배양시 신초의 수가 40 mM 질산염에서 가장 많이 생성되었다고 보고하였다.

Lasa 등[16]은 질산염과 암모늄염을 처리하여 생장시킨 해바라기에서 마그네슘의 효과를 연구하였으며, Roh와 Chin [34]은 Cd에 의한 생장억제가 칼슘에 의해 회복됨을 관찰하고, 칼슘은 카드뮴에 대한 독성현상을 제거하거나 또는 식물의 생장에 영향을 주는 세포내의 많은 반응을 유발시키는 유발원으로 작용한다고 하였는데, 이와 관련하여 질산염도 Cd에 의해 담배의 생장이 저해되는 것을 회복시키는 양의 효과(positive effect)로 추측된다.

엽록소 함량

Cd을 처리하여 기내 배양한 담배에서 엽록소의 함량에 미치는 질산염의 영향을 조사한 결과, 0.2 mM Cd를 첨가한 MS 기본배지에서 생장한 담배의 엽록소 a와 b, 전체 엽록소 함량은 각각 13.20 mg/g, 21.42 mg/g, 34.62 mg/g fr. wt로 나타났으며, 농도의 증가에 따라 각 함량도 증가하여 80 mM 질산염에서 14.1 mg/g, 22.3 mg/g, 36.4 mg/g fr. wt로서 가장 높은 값을 보였다. 그러나 100 mM 에서는 13.95 mg/g, 22.12 mg/g, 36.07 mg/g fr. wt로 감소하였다(Fig. 2). 이와 같이 질산염 농도를 20 mM에서 100 mM로 농도를 증가시키면 Cd에 의한 저해 효과가 회복되는 것으로 나타났다. 100 mM 질산염은 40 mM과 60 mM에서 보다 회복 효과가 높았으며 80 mM에서 보다는 감소하였다.

Cd은 protochlorophyllide reductase 활성에 관여하여 엽록소의 합성을 억제시키는데[45], 본 연구에서 질산염 농도의 증가에 따라 Cd에 의한 저해 효과가 회복되는 것은 이 효소의 활성을 억제시키는 Cd의 작용을 질산염이 방해하기 때문으로 해석된다. 질소원의 공급이 증가되면 엽록소의 함량이 증가한다는 Yamashita의 결과[52]와 일치한다. Cd에 의해 광합성이 억제되는 것은 엽록소와 같은 광합성 색소 함량의 감소에 의

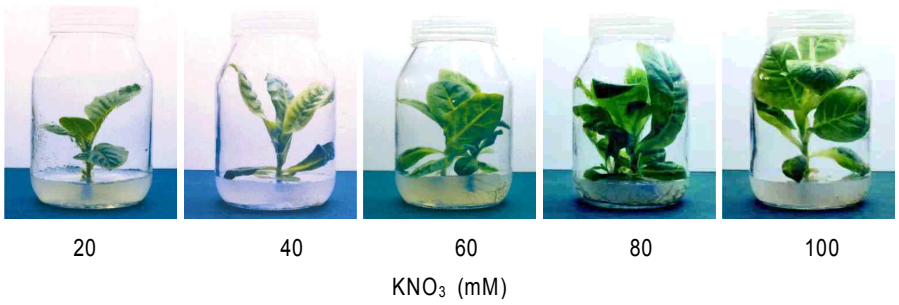

Fig. 1. Comparison of growth of tobacco plant cultured on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd and various concentrations of KNO_3 for 7 weeks.

해서도 기인된다[41]. Sandalio 등[36]도 Cd에 의해 엽록소의 농도가 현저하게 감소된다고 보고하였다.

Rubisco의 함량과 활성

Cd을 처리하여 기내 배양한 담배에서 rubisco의 함량과 활성에 미치는 질산염의 영향을 조사하기 위해, Cd과 각 농도의 질산염이 함유된 배지에서 성장시킨 담배 잎으로부터 anion exchange chromatography에 의해 rubisco를 분리한 결과, 흡광도와 activity의 peak가 한 fraction에서 일치하여(Fig. 3), 이 분획을 rubisco의 함량과 활성의 측정 및 전기영동에 사용하였다.

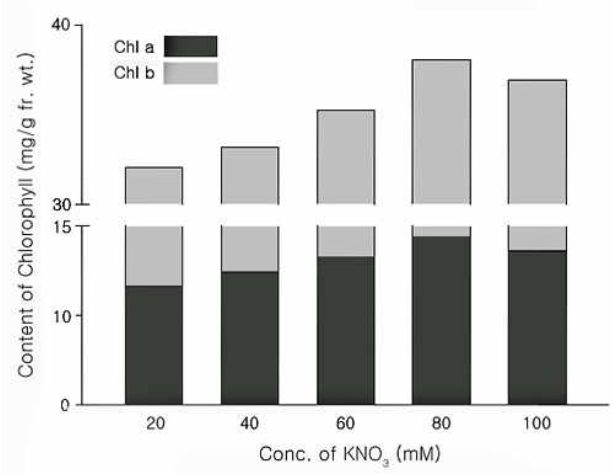

Fig. 2. Effect of nitrate on chlorophyll content of tobacco plant leaves. Plants were grown on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd for 7 weeks.

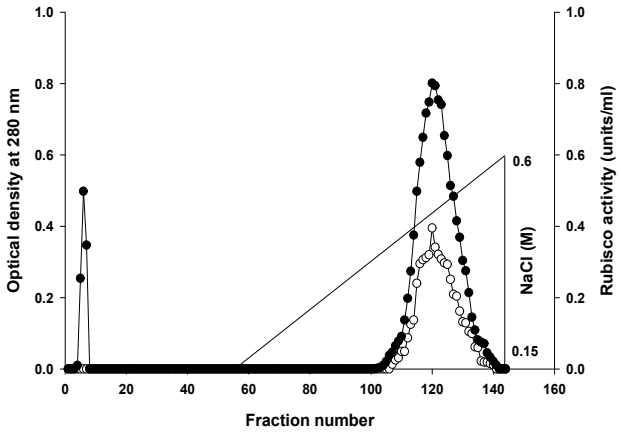

Fig. 3. Elution profile for protein (●) and activity (○) of rubisco from anion exchange chromatography on Q-Sepharose column. Rubisco was isolated from leaves of tobacco plant supplemented with Cd and 80 mM nitrate. Its activity was detected by oxidation of NADH at 340 nm. The straight line indicates the 0.15-0.6 M NaCl gradient in 20 mM BTP (pH 7.2).

Ishimaru 등[13]은 벼 잎에서 rubisco, 가용성 단백질 및 질소 함량 사이의 유전적 관계를 연구하였으며, Pietrini 등[26]은 Cd에 의해 rubisco의 함량이 낮아진다고 보고하여, 이들 사이에 연관성이 있음을 알 수 있다. Rubisco의 함량은 0.2 mM Cd과 20 mM 질산염에서는 0.183 mg/ml leaf extract, 40 mM에서는 0.26 mg/ml, 60 mM에서는 0.373 mg/ml로서 농도의 증가에 따라 점점 증가하다가, 80 mM에서는 0.48 mg/ml로서 최고값을 보였으며, 100 mM 에서는 0.419 mg/ml로 약간 감소하였다(Fig. 4). 이와 같이 질산염의 농도 증가에 따라 rubisco의 함량도 증가하였는데, 이는 잎의 질소 함량에 따라 rubisco의 함량이 비례적으로 증가한다는 결과[21]와 일치한다. 60 mM 이하의 농도에서 보다 80 mM 이상에서는 증가폭이 컸으며, 100 mM에서는 약간 감소하였다. 이 결과는 Cd에 의한 저해 효과가 질산염에 의해 회복되었음을 의미한다. 100 mM은 40 mM과 60 mM에서 보다 회복 효과가 높았으며, 80 mM에서 보다는 감소하였다.

Rubisco의 활성은 0.2 mM Cd과 20 mM 질산염에서는 0.135 unit/ml, 40 mM에서는 0.239 unit/ml, 60 mM에서는 0.321 unit/ml로 점차 증가하였으며, 80 mM에서는 0.395 unit/ml로 최고값을 나타내었고, 100 mM에서는 0.342 unit/ml로 감소하였다(Fig. 5). 이와 같이 질산염의 농도를 증가시키면 Cd에 의한 저해 효과도 비례적으로 회복되었으며, 80 mM에서 가장 많이 회복되었다. 이는 rubisco의 SH기에 Cd가 비가역적으로 결합하는 것을 질산염이 억제시켰기 때문으로 해석된다. Cd은 rubisco의 active site에 존재하는 cysteine의 SH기에 비가역적으로 결합하여 rubisco의 활성을 낮추는 방식으로[44], 칼빈회로에서 RuBP의 CO_2 고정과정에 작용한다[51]. 잎의 질소 함량에 따라 rubisco의 활성이 비례적으로 증가한다는 보고도 있다[8].

Rubisco의 함량과 활성이 같은 양상을 보인 점은 rubisco의

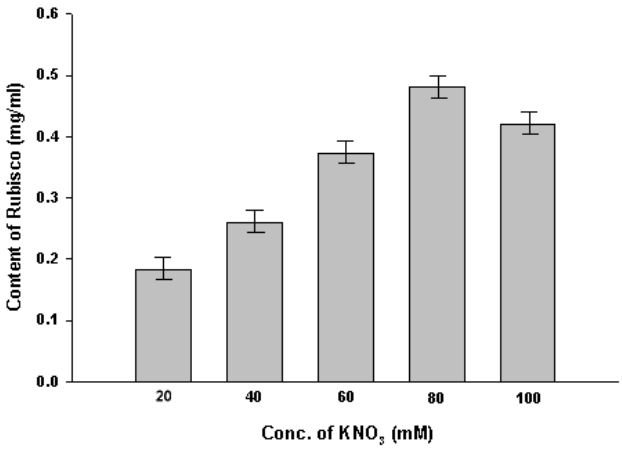

Fig. 4. Effect of nitrate on content of rubisco of tobacco plant leaves. Plants were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd and various concentrations of KNO_3.

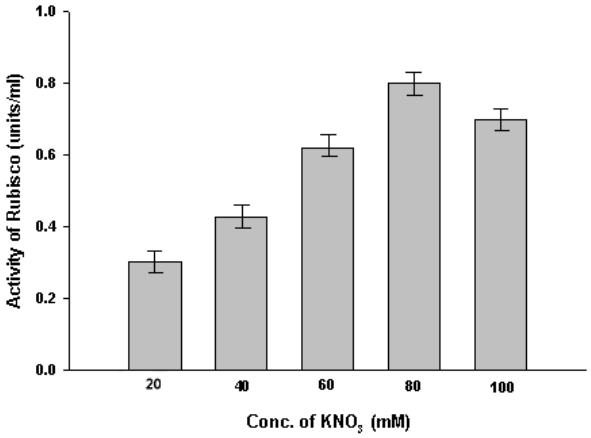

Fig. 5. Effect of nitrate on activity of rubisco of tobacco plant leaves. Plants were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd and various concentrations of KNO_3.

함량 변화가 활성의 변화와 관련되어 있다는 보고[25]로 보아 rubisco의 함량이 활성과 상호 연관되어 있음을 의미하며, 질산염의 농도가 증가함에 따라 rubisco의 함량과 활성이 모두 증가하였고, 80 mM에서 최고값을 나타낸 것은, Cd에 의해서는 rubisco의 합성과 활성화가 저해되고, 이 현상이 질산염에 의해서 회복되었기 때문으로 생각된다. 따라서 Cd은 rubisco에 대한 negative effector로, Cd에 대해 질산염은 positive effector로 작용하는 것으로 해석된다.

Cd은 rubisco의 활성을 60% 낮추며[26], 잎에 질소의 공급을 증가시키면 rubisco의 활성이 증가되나[4], 질소원이 결핍되면 Cd에 의해 유도되는 유전자의 발현이 변화된다[9]는 점에서 rubisco 유전자의 발현에도 영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

Cd에 의해 억제되었던 rubisco가 질산염에 의한 회복 정도를 조사하기 위하여 SDS-PAGE를 하였다. Cd과 질산염의 농도를 달리한 모든 실험구의 두 band가 55 kD와 15 kD의 분자량을 가지는 large subunit와 small subunit임을 확인하였다. 또한 질산염의 농도가 증가함에 따라 두 band의 강도가 증가하여 80 mM에서 가장 강하였으며, 100 mM에서는 감소하였다(Fig. 6). 이는 rubisco의 함량과 활성을 측정하여 나타낸 Fig. 4와 5의 결과와 일치하였다.

Rubisco activase의 함량과 활성

Cd을 처리하여 기내 배양한 담배에서 rubisco의 함량과 활성에 미치는 질산염의 영향을 설명할 수 있는 것 중에 하나는 Cd과 질산염에 의해 유도되는 rubisco의 변화를 rubisco activase 차원에서 관련성을 찾는 것이다. 이를 위해 본 연구에서는 anion exchange chromatography에 의해 분리한 rubisco activase (Fig. 7)의 활성과 함량을 측정하였다.

Rubisco activase의 함량은 0.2 mM Cd과 20 mM 질산염에서는 0.047 mg/ml, 40 mM에서는 0.065 mg/ml, 60 mM에서는 0.087 mg/ml로 점차 증가하다가, 80 mM에서는 0.106

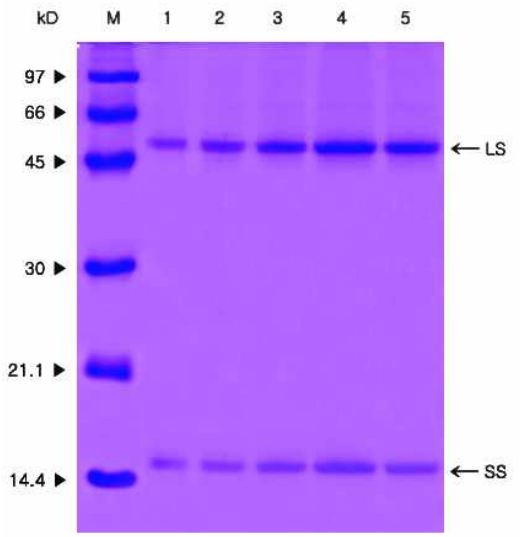

Fig. 6. SDS-PAGE analysis of rubisco isolated from tobacco plant leaves supplemented with Cd and nitrate. Proteins (40 μg) were separated on 20% SDS-PAGE gels. The molecular weight markers (M) were rabbit muscle phosphorylase b (97 kD), bovine serum albumin (66 kD), chicken egg white ovalbumin (45 kD), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kD), soybean trypsin inhibitor (21.1 kD), and bovine milk α-lactalbumin (14.4 kD). Lane 1, 0.2 mM Cd and 20 mM KNO_3; Lane 2, Cd and 40 KNO_3; Lane 3, Cd and 60 mM KNO_3; Lane 4, Cd and 80 mM KNO_3; Lane 5, Cd and 100 mM KNO_3. LS and SS mean large subunit and small subunit, respectively.

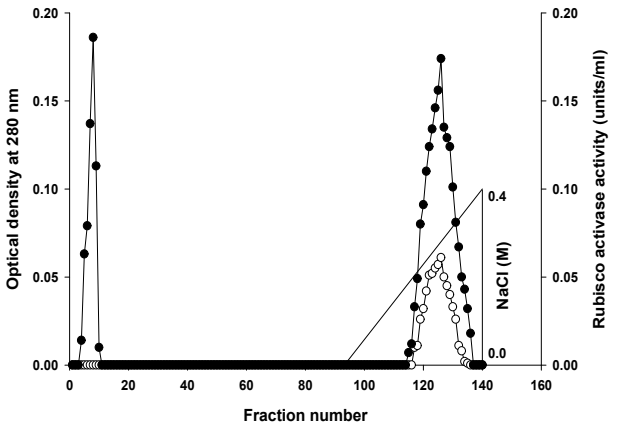

Fig. 7. Elution profile for protein (●) and activity (○) of rubisco activase from anion exchange chromatography on Q-Sepharose column. Rubisco activase was isolated from leaves of tobacco plant supplemented with Cd and 80 mM nitrate. Its activity was detected by oxidation of NADH at 340 nm. The straight line indicates the 0-0.4 M NaCl gradient in 20 mM BTP (pH 7.2).

mg/ml로서 최고값을 보였으며, 100 mM에서는 0.095 mg/ml로 다소 감소하였다(Fig. 8).

Rubisco activase의 활성은 0.2 mM Cd과 20 mM 질산염에서는 0.039 unit/ml, 40 mM에서는 0.041 unit/ml, 60 mM에서는 0.055 unit/ml로 점차 증가하였으며, 80 mM에서는 0.061 unit/ml로 최고값을 나타내었고, 100 mM에서는 0.058 unit/ml로서 감소하였다(Fig. 9). 이와 같이 질산염의 농도를 증가시키면 Cd에 의한 저해 효과도 비례적으로 회복되어, rubisco activase의 활성과 함량이 같은 변화를 나타내었는데, 이는 rubisco에 대한 질산염에 의한 회복 현상이 rubisco activase와 관련 있음을 보여주고 있다.

Rubisco activase의 반응에는 ATP의 가수분해가 요구되나 ADP는 이 반응을 도리어 억제하게 되므로 rubisco activase의 활성은 ATP/ADP 비에 의해 조절되며[27], 산화환원반응의 변화를 통해 조절되기도 한다[55]. 따라서 질소의 공급이 ATP/ADP 비[19]와 산화환원 전위에 영향을 미치게 되면 rubisco activase에 의한 rubisco의 활성화 상태에 변화가 일어날 수 있다는 결과[4]는 rubisco의 활성화와 질소의 함량이 밀접한 관계를 가지고 있다는 것을 증명해 주고 있다. Antisence 유전자로 형질전환시킨 담배에서 rubisco 활성화의 증가는 ATP/ADP 비의 증가와 연관되어 있다는 연구 결과가 있다[30].

결론적으로 질산염은 Cd에 의해 유발되는 엽록소의 합성 뿐만 아니라 rubisco와 rubisco activase의 합성과 활성에 대한 억제 현상을 회복시켜 광합성 능을 향상시키는 것으로 판단된다.

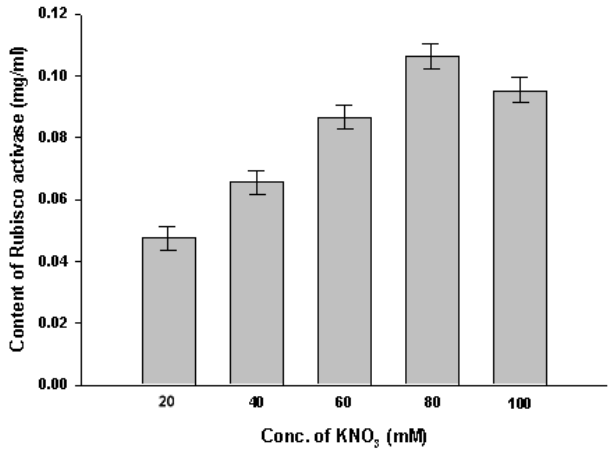

Fig. 8. Effect of nitrate on content of rubisco activase of tobacco plant leaves. Plants were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd and various concentrations of KNO_3.

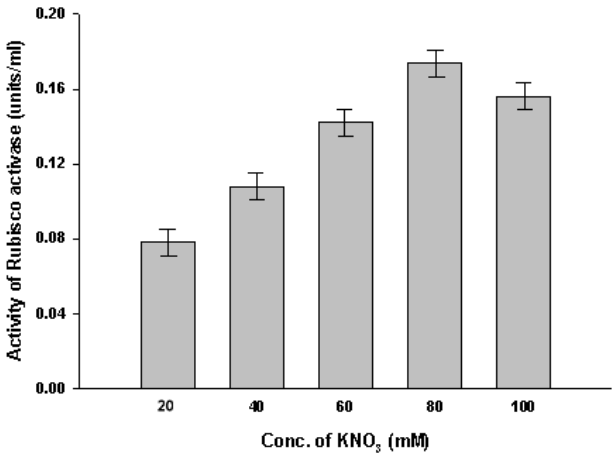

Fig. 9. Effect of nitrate on activity of rubisco activase of tobacco plant leaves. Plants were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mM Cd and various concentrations of KNO_3.

References

1. Baszynski, T., L. Wajda, D. Wolinska, Z. Krupa, and A. Tukendorf. 1989. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant* **48**, 365-370.
2. Chaffei, C., K. Pageau, A. Suzuki, H. Gouia, M. H. Ghorbel, and C. Masclaux-Daubresse. 2004. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1681-1693.
3. Chen, Y. and A. J. Huerta. 1997. Effect of sulfur nutrition on photosynthesis in cadmium-treated barley seedlings. *J. Plant Nutrition* **20**, 845-856.
4. Cheng, L. and L. H. Fuchigami. 2000. Rubisco activation state decreases with increasing nitrogen content in apple leaves. *J. Exp. Bot.* **51**, 1687-1694.
5. Choudhary, M., L. D. Bailey, and C. A. Grant. 1994. Effect of zinc on cadmium concentration the tissue of durum wheat. *Can. J. Plant Sci.* **74**, 549-552.
6. Chugh, L. K. and S. K. Sawhney. 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* **37**, 297-303.
7. Di Cagno, R., L. Guidi, L. De Gara, and G. F. Soldatini. 2001. Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. *New Phytologist* **151**, 627-636.
8. Evans, J. R. 1983. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* **72,** 297-302.
9. Finkemeier, I., C. Kluge, A. Metwally, M. Georgi, N. Grotjohann, and K. J. Dietz. 2003. Alterations in Cd-induced gene expression under nitrogen deficiency in *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Environ.* **26**, 821-833.
10. Gerendás, J., Z. Zhu, R. Bendixen, R. G. Ratcliffe, and B. Sattelmacher. 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. *Zeitschrift Pflanzenernährung Bodenkunde* **160**, 239-251.
11. Greger, M. and E. Ögren. 1991. Direct and indirect effects of Cd^{2+} on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*).

Physiol. Plant. **83**, 129-135.
12. Inskeep, W. P. and P. R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in *N, N*-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* **77**, 483-485.
13. Ishimaru, K., N. Kobayashi, K. Ono, M. Yano, and R. Ohsugi 2001. Are contents of rubisco, soluble protein and nitrogen in flag leaves of rice controlled by the same genetics. *J. Exp. Bot.* **52**, 1827-1833.
14. Joy, K. W. 1988. Ammonia, glutamine and asparagine: a carbon nitrogen interface. *Can. J. Bot.* **66**, 2103-2109.
15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
16. Lasa, B., M. Aleu, B. González-Moro, C. Lamsfus, and P. M. Aparicio-Tejo. 2000. Effects of low and high levels of magnesium on the response of sunflower plants grown with ammonium and nitrate. *Plant Soil* **225**, 167-174.
17. Lee, K. R. and K. S. Roh. 2003. Influence of cadmium on rubisco activation in *Canavalia ensiformis* L. leaves. *Biotech. Biopro. Eng.* **8**, 94-100.
18. Lucero, H. A., C. S. Andreo, and R. H. Vallejos. 1976. Sulphydryl groups in photosynthetic energy conservation. III. Inhibition of photophosphorylation in spinach chloroplasts by $CdCl_2$. *Plant Sci. Lett.* **6**, 309-313.
19. Mächler, F., A. Oberson, A. Grub, and J. Nösberger. 1988. Regulation of photosynthesis in nitrogen-deficient wheat seedlings. *Plant Physiol.* **87**, 46-49.
20. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
21. Nakano, H., A. Makino, and T. Mae. 1997. The effect of elevated partial pressure of CO_2 on the relationship between photosynthetic capacity and content in rice leaves. *Plant Physiol.* **115**, 191-198.
22. Olmos, E., J. R. Martinez-Solano, A. Piqueras, and E. Hellin. 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J. Exp. Bot.* **54**, 291-301.
23. Ouariti, O., N. Boussama, M. Zarrouk, A. Cherif, and M. H. Ghorbal. 1997. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* **45**, 1343-1350.
24. Padmaja, K., D. D. K. Parsad, and A. R. K. Parsad. 1990. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica* **24**, 399-404.
25. Panković, D., M. Plesničar, I. Arsenijević-Maksimović, N. Petrović, Z. Sakač, and R. Kastori. 2000. Effects of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd-treated sunflower plants. *Ann. Bot.* **86**, 841-847.
26. Pietrini, F., M. A. Iannelli, S. Pasqualini, and A. Massacci. 2003. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiol. Preview* **133**, 829-837.
27. Portis, A. R. Jr. 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**, 15-28.
28. Portis, A. R. Jr. 2003. Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth. Res.* **75**, 11-27.
29. Prasad, M. N. V. 1995. Cadmium toxity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* **35**, 525-545.
30. Quick, W. P., U. Schurr, R. Scheibe, E-D. Schulze, S. R. Rodermel, L. Bogorad, and M. Stitt. 1991. Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with 'antisense' rbcS. I. Impact on photosynthesis in ambient growth conditions. *Planta* **183**, 542-554.
31. Racker, E. 1962. Ribulose diphosphate carboxylase from spinach leaves. *Methods Enzymol.* **5,** 266-270.
32. Ramage, M. C. and R. R. Williams. 2002. Inorganic nitrogen requirements during shoot organogenesis in tobacco leaf discs. *J. Exp. Bot.* **53**, 1437-1443.
33. Robinson, S. P. and A. R. Portis Jr. 1989. Adenosine triphosphate hydrolysis by purified rubisco activase. *Arch. Biochem. Biophys.* **268**, 93-99.
34. Roh, K. S. and H. S. Chin. 2005. Cadmium toxicity and calcium effect on growth and photosynthesis of tobacco. *J. Life Sci.* **15**, 453-460.
35. Roh, K. S., I. S. Kim, B. W. Kim, J. S. Song, H. S. Chung, and S. D. Song. 1997. Decrease in carbamylation of rubisco by high CO_2 concentration is due to decrease of rubisco activase in kidney bean. *J. Plant Biol.* **40**, 73-79.
36. Sandalio, L. M., H. C. Dalurzo, M. Gómez, M. C. Romero-Puertas, and L. A. Del Río. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 2115-2126.
37. Sanità di Toppi, L. and R. Gabbrielli. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* **41**, 105-130.
38. Sathyanarayana, B. N. and J. Blake. 1994. The effect of nitrogen sources and initial pH of the media with or without buffer on in vitro rooting of jack fruit. pp. 77-82, In Lumsden, P. J., J. R. Nicholas, and W. J. Davies (eds.), *Physiology, Growth and Development of Plants in Culture*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
39. Shah, K. and R. S. Dubey. 1995. Effect of cadmium on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **33**, 577-584.
40. Shoeran, I. S., H. R. Signal, and R. Singh. 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzyme of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeopea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynth. Res.* **23**, 345-351.
41. Siedlecka, A. and Z. Krupa. 1996. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 833-841.
42. Skórzyńska-Polit, E. and T. Baszyński. 1995. Some aspects of runner bean plant response to cadminm at different stages of the primary leaf growth. *Acta Soc. Bot. Pol.* **64**, 165-170.
43. Somashekaraiah, B. V., K. Padmaja, and A. R. K. Prasad. 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgarts*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant* **85**, 85-89.
44. Stiborova, M. 1988. Cd^{2+} ions affect the quaternary structure

of ribulose-1.5 bisphosphate carboxylase from barley leaves. *Biochemia Physiologia Pflanzen* **183,** 371-378.
45. Stobart, A., K, W. T. Griffiths, I. Ameen-Bukhari, and R. P. Sherwood. 1985. The effect of Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiologia Plantarum* **63**, 293-298.
46. Trewavas, A. J. 1983. Nitrate as a plant hormone. In Jackson, M. B. (ed.), *British Plant Growth Regulator Group Monograph* Vol. 9, Oxford, British.
47. Van Bruwaene, R., R. Kirchmann, and R. Inpens. 1984. Cadmium contamination in agriculture and zoo technology. *Experientia* **40**, 43-52.
48. Wang, X. and F. E. Below. 1996. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. *Crop Science* **36**, 121-126.
49. Wang, Z. Y., G. W. Snyder, B. D. Esau, A. R. Portis Jr., and W. L. Ogren. 1992. Species-dependent variation in the interaction of substrate-bound ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and rubisco activase. *Plant Physiol.* **100**, 1858-1862.
50. Weigel, H. J. 1985. Inhibition of photosynthetic reactions of isolated chloroplasts by cadmium. *J. Plant Physiol.* **119**, 179-189.
51. Weigel, H. J. 1985. The effect of Cd^{2+} on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts. *Physiol. Plant* **63**, 192-200.
52. Yamashita, T. 1986. Changes in ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase concentration due to external nitrogen supply. *Ann. Bot.* **58**, 277-280.
53. Yang, Y. J., L. M. Cheng, and Z. H. Liu. 2007. Rapid effect of cadmium on lignin biosynthesis in soybean roots. *Plant Sci.* **172**, 632-639.
54. Zhang, N. and A. R. Portis Jr. 1999. Mechanism of light regulation of rubisco: A specific role for the larger rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **96**, 9438-9443.
55. Zhang, N., P. Schürmann, and A. R. Portis Jr. 2001. Characterization of the regulatory function of the 46-kD isoform of rubisco activase from *Arabidopsis*. *Photosynth. Res.* **68**, 29-37.

초록 : Cadmium을 처리하여 기내 배양한 담배 식물의 생장, 엽록소 함량 및 rubisco와 rubisco activase의 함량과 활성에 미치는 질산염의 영향

노 광 수*
(계명대학교 생물학과)

Cd을 처리하여 기내 배양한 담배 식물의 생장과 엽록소 함량, rubisco와 rubisco activase의 함량과 활성에 미치는 질산염의 영향을 연구하였다. Cd에 의해 억제되었던 담배 식물의 생장과 엽록소의 함량은 질산염에 의해 회복되었으며, 80 mM 질산염에서 회복 효과가 가장 높았다. 80 mM 질산염에서의 rubisco의 함량이 타 농도에서보다 현저하게 증가하였으며, rubisco의 활성 또한 rubisco의 함량과 같은 변화를 보였다. 이 결과들은 Cd에 의해 감소된 rubisco의 함량과 활성이 질산염에 의해 회복되었음을 의미한다. SDS-PAGE의 결과, 55 kD와 15 kD의 large subunit와 small subunit의 강도는 타 농도에서 보다 80 mM 질산염에서 현저하게 증가하였다. Rubisco activase의 함량과 활성을 측정한 결과, 80 mM 질산염에서의 rubisco activase의 함량은 타 농도에서 보다 현저하였으며, 이의 활성은 함량과 같은 양상을 나타내어, rubisco에 대한 질산염에 의한 회복 현상이 rubisco activase와 관련 있음을 추측하게 한다.