

식물세포 특이적 자극인지 연구

(New Approaches in Plant Cell-Specific Signal Recognition)

이 영 숙

포항공과대학 생명과학과

I. 서 론

식물은 여러가지 자극에 대해 민감하고 다양한 반응을 보인다. 그러므로 식물의 자극인지 기작은 동물이나 미생물에서와 마찬가지로 복잡하고 정교할 것임을 추측할 수 있다. 그러나 식물은 그 구조와 기능이 다른 생물들과 다른 점들이 많으므로, 그 자극인지 기작에도 특이한 면들이 존재할 것이다. 식물의 특이한 성질 중 중요한 것을 들면, 첫째로 식물의 성장, 분화 및 생리 기능들이 빛의 강도, 파장, 방향, 주기 등에 의해 크게 조절받는 점이다. 이렇게 photoreceptor의 역할이 중요한 이유는, 독립영양체로서 빛 에너지를 흡수하고 적절히 사용하는 과정이 중요하고, 고착생활에 적응하기 위해 환경을 잘 인지할 필요성이 있기 때문일 것이다. 즉 빛은 식물에게 에너지원과 더불어 환경에 관한 정확한 정보를 제공한다. 둘째로 식물세포는 단단한 세포벽으로 둘러 싸여 있다. 이 세포벽으로 인하여 팽압 등 압력이 생성되고 유지되며, 세포와 기관 수준의 압력들이 수분과 영양물질의 수송, 길이 신장 등에 중요한 기능을 한다. 셋째로, 식물의 meristem은 무한정 분열할 수 있는 potential을 가지고 있어서, 형태 발달 과정이 유전적으로 한정되지 않으며 환경의 영향을 크게 받는 점이다. 그러므로 식물의 자극인지 기작들은 독특하고 매우 흥미로운 것이다. 이러한 순수과학적 측면에서 뿐만 아니라, 인류의 식량자원이 궁극적으로는 모두 식물의 대사에 의존하며, 생태계에서 식물이 차지하는 위치를 고려할 때, 식물의 자극인지에 관한 연구는 큰 의의를 가진다.

본 실험실에서는 식물세포의 자극인지 기작을 연구하고 있다. 특히 여러가지 다양한 최신 또는 고전적 방법을 사용하고 있어서, 본 실험실에서 거둔 성과들을 사용한 방법과 함께 소개하고자 한다.

II. 본 론

1. 지질 생화학 (Lipid Biochemistry)

식물의 signal transduction에 Phospholipase A (Andre and Scherer, 1991), Phospholipase C (Morse et al., 1987; Einspahr et al., 1988; Einspahr and Thompson, 1990) 등이 중요하다는 보고들이 있어서 지질 생화학의 중요성이 크게 대두되었다. 지질 생화학의 기술을 single cell의 기능 연구에 사용하고자 할 때 single cell type을 분리하는 것이 쉽지 않은 일이다. 공변세포의 경우는 세포벽이 다른 세포들의 세포벽에 비해 훨씬 더 두꺼운 것을 이용하여, 공변세포만을 순수하게 분리할 수 있다 (Fig. 1). 즉 표피층에 cellulase를 일차 처리하면 표피세포들이 원형질체로 방출되는데, 이들을 제거하고 공변세포만 남은 표피층에 다시 cellulase를 처리하면 상당히 순도가 높은 공변세포의 원형질체를 얻을 수 있다.

(1) 공변세포에서 ABA의 신호전달기작

본 실험실에서 지질 생화학 기법을 이용하여 공변세포가 abscisic acid (ABA)를 받아 기공이 닫힐때 phosphatidylinositol (PI) cycle이 활성화됨을 밝혔다. *Vicia faba* L.(잠두)의 공변세포를 원형질체로 순수분리하여 $^{32}\text{PO}_4$ 로 표지하고, ABA를 준 후, 지방을 추출하여 TLC로 분리하여 autoradiogram을 얻었다 (Fig. 2). 각 band를 끊어 radioactivity를 쟀 결과, inositol을 함유하는 phospholipid들 만이 ABA에 반응하여 크게 변화함을 보았다 (Fig. 3). PI cycle이 활성화되어 phosphoinositide들이 분해되면 inositol phosphate들이 생산된다. 우리는 inositol trisphosphate (IP_3) receptor binding assay (Quarmby et al., 1992)를 이용하여 IP_3 를 정량하였다. LiCl을 10 mM 함유한 배지에서 공변세포의 원형질체에 ABA를 처리했을 때, 10 초 이내에 IP_3 level이 대조구에 비해 2배로 증가하였다 (Fig. 4). 배지에 LiCl가 함유되지 않는 경우의 ABA에 의한 IP_3 의 증가폭은 20%에 그쳤다. 이는 생성된 IP_3 가 빠르게 분해되고 이러한 분해를 LiCl가 저해시키기 때문인 것으로 보인다 (Nahorski et al., 1991).

A



B



Fig. 1. Intact guard cell pair (A), and isolated guard cell protoplasts(B) of Vicia faba leaves. Healthy guard cells contain round chloroplasts evenly distributed.

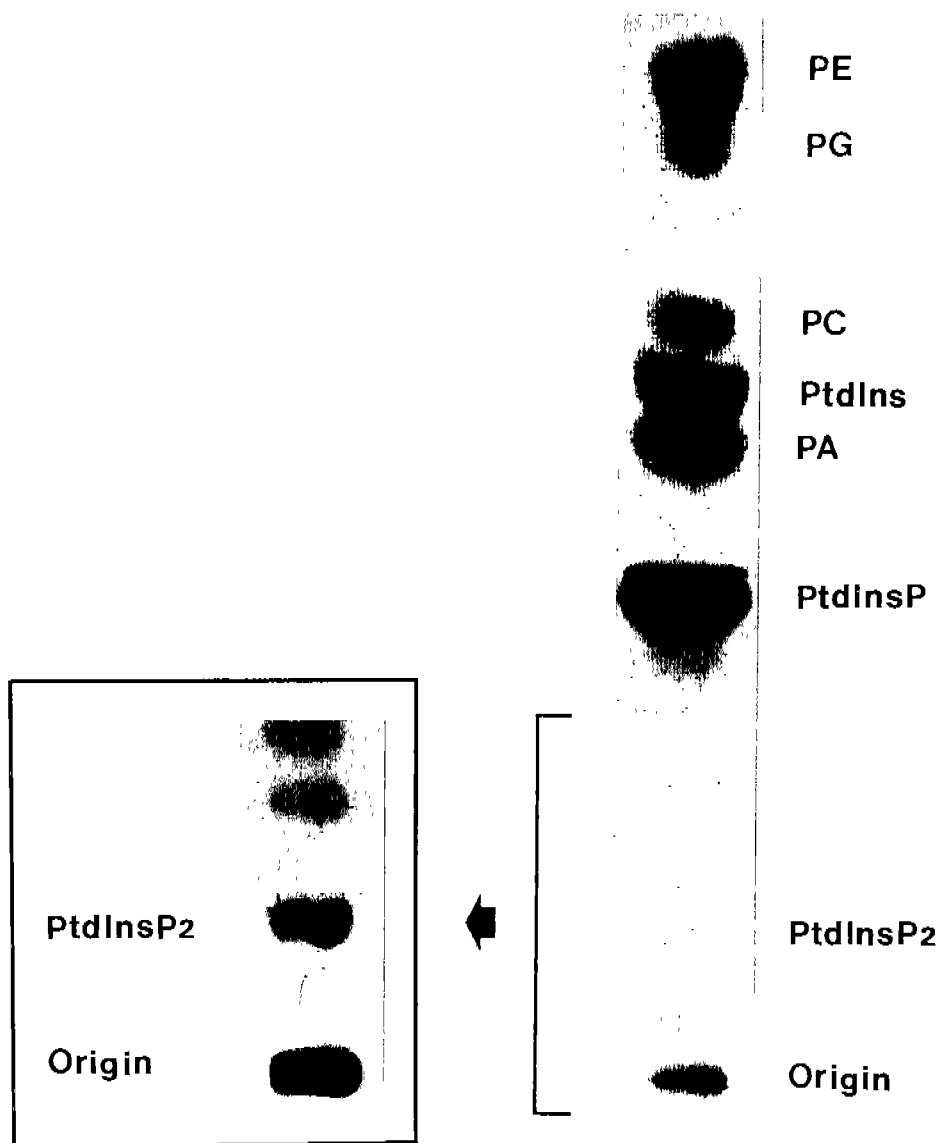


Fig. 2. Autoradiogram of $^{32}\text{PO}_4$ -labeled lipids in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. the plate was exposed to x-ray film (Kodak, X-OMAT) for 1 days. Inset: To observe PtdInsP₂ band, the plate was exposed for 2 days.

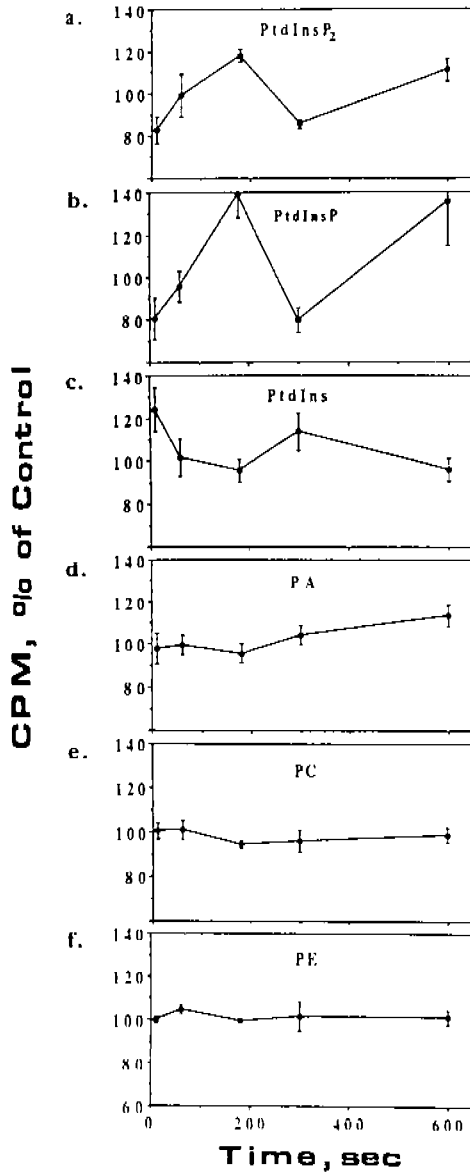


Fig. 3. Changes in levels of $^{32}\text{PO}_4$ -labeled lipids in guard cell protoplasts of *Vicia Faba* upon ABA treatment for 10, 60, 180, 300, and 600 sec. Data were normalized to cpm in total phospholipids of each lane and were presented as percentages of the control values. Total counts were about 20,000 cpm per lane. Averages \pm standard errors from five independent experiments are presented.

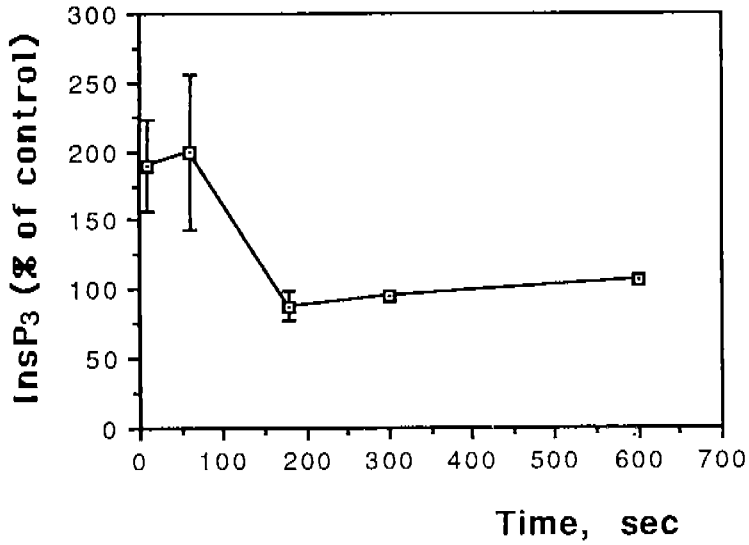


Fig. 4. Time course of InsP₃ production by guard cells of Vicia Faba upon ABA treatment. Data were normalized to total phospholipid phosphate in each sample and are expressed as percent of the values of control cells. Averages ± standard errors from 2-4 independent experiments with 2-3 replicates each are presented.

(2) Plant wound signal

초식동물 등에 의한 물리적인 상처 (Wound)도 식물의 형태 발달에 큰 영향을 미치는 환경요인이다. 식물의 기관들이 indeterminate growth에 의해 재생될 수 있고, 또한 식물체의 상처받지 않은 부위에서도 방어기작이 활성화된다는 점에서 물리적인 상처가 긍정적인 자극의 역할을 할 수 있다는 점이 다른 생물에서와는 특이하며, 따라서 식물의 wound signal transduction 기작도 매우 특이할 수 있다.

Wound에 의해 여러 유전자들이 발현되고 그 과정을 매개하는 second messenger로서 jasmonic acid가 작용함을 밝히는 여러 실험결과들이 보고되었다 (Staswick, 1992; Creelman et al., 1992). 즉 wounded plant에서 jasmonic acid가 축적됨이 보고되었으며, wound를 받지 않은 식물도 jasmonic acid를 인위적으로 처리해주면 wound-inducible gene 들을 발현한다. 그러나 wounded plant에서 jasmonic acid가 형성되는 과정에 관해서는 잘 이해가 되어 있지 않다.

Jasmonic acid의 전구물질이 linolenic acid라는 불포화지방산이며, 이것을 가장 간단히 생산해 낼 수 있는 효소가 phospholipase A₂ (PLA₂)이므로, 본 실험실에서는 wound에 의해 PLA₂가 활성화될 가능성을 검사하였다. *V. faba* 잎에서 1 cm 직경의 leaf disk를 만들어 ¹⁴C-ethanolamine을 포함한 배지에 24 시간 동안 incubation하여 phosphatidylethanolamine과 phosphatidylcholine을 표지한 후 침봉으로 찢러 상처를 주었다. 1 분 이내에 PLA₂의 산물인 lysophosphatidylethanolamine과 lysophosphatidylcholine의 양이 wounded sample에서 증가하는 것이 뚜렷이 관찰되었고, 1 시간 후에는 대조구에 비해 300% 정도로 증가하였다 (data not shown). Wound-inducible gene들의 발현에서와 마찬가지로 PLA₂의 활성화도 상처받은 부위 뿐만 아니라 몸 전체에서 발현되는가 (Systemic response), 그리고 wound에 의한 PLA₂ 활성화 과정에 G-protein이 관여하는가를 연구하고 있다.

2. 미세현미주입법 (Microinjection technique)

미세현미주입법을 이용하면 여러가지 극성물질이나 단백질, 핵산 등 세포막을 통과하지 않는 물질들을 세포내에 넣어서 이들이 그 세포내에서 실제로 신호전달에

관여할 가능성을 검사할 수 있다. 식물세포 내로의 미세현미주입은 식물세포에 특이한 큰 팽압 때문에 상당히 어렵다. 팽압이 injection 하려는 용액을 밀어내기 때문이다. 미리 고장액에 처리하여 팽압을 감소시킨 후에 injection을 하면 용이하다는 보고들이 있다 (Brownlee, 1987). 단순한 확산에 의해 약품이 들어가지 않을 경우, injection을 하는 방법으로 iontophoresis와 pressure injection이 있다. Iontophoresis는 positive 또는 negative current를 주어 charge를 띤 화합물을 세포 내로 밀어 넣는 방법인데, 얼마가 들어갔는지를 계산 또는 측정하기 어렵다. Pressure injection은 압축공기나 압축질소를 이용하여 injection needle에 강한 압력을 주어 needle에 있는 물질을 세포 내로 넣는 방법이다. 이 때 cell 안에 얼마의 volume이 들어갔는가를 추정하는 방법으로는 같은 조건에서 silicon oil을 넣어 그 직경을 재서 계산한다.

본 실험실에서는 실제로 이 방법을 사용하여 공변세포의 열리는 과정에 G-protein이 관여할 가능성이 있음을 밝혔다 (Lee et al., 1993). 공변세포에 해를 입히지 않고 염색약을 미세주입할 수 있었고, 들어간 염색약이 다른 세포로 퍼지지 않는 것을 보아 (Fig. 5), 이 기술로 single cell level에서의 반응을 검증할 수 있음을 확인하였다. *Commelina communis* (닭의장풀)의 공변세포에 미세현미주입된 GTP- γ -S는 기공을 열게 하였고 (Fig. 6), 반면 GDP- β -S 나 ATP- γ -S는 기공 운동에 아무 영향을 미치지 않았다.

3. Ion-sensitive microelectrodes

이 방법은 생체 내 이온 농도를 재는 데 적합하다. H^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- 등 이온의 이동이 동식물의 신호전달 과정에 중요한 역할을 하므로, 이들 이온 농도를 빠르고 정확하게 잴 수 있는 ion-sensitive electrode 기술은 앞으로 자극인지와 반응 기작 연구에 많이 사용될 것이다. 종래에는 한가지 이온만을 통과시키는 유리를 써서 electrode를 만들었는데, 제조하기가 매우 어려워 몇몇 연구실에서만 할 수 있는 기술이었으나, 1980년대부터는 liquid ion sensor를 pipette 끝에 채워 넣어 electrode를 만드는 방법이 개발되어 제작이 아주 용이해졌다. 이 방법도 미세현미주입법과 마찬가지로 식물에 적용할 때는 세포벽, 팽압 등이 문제가 된다. 그러나 plastic resin을 pipette tip에 채워 성공한 사례들이 있다 (Felle and Bertl, 1986).



Fig. 5. Fluorescent images of guard cells microinjected with carboxyfluorescein. Guard cell chloroplast accumulate carboxyfluorescein, thus fluoresce brightly.

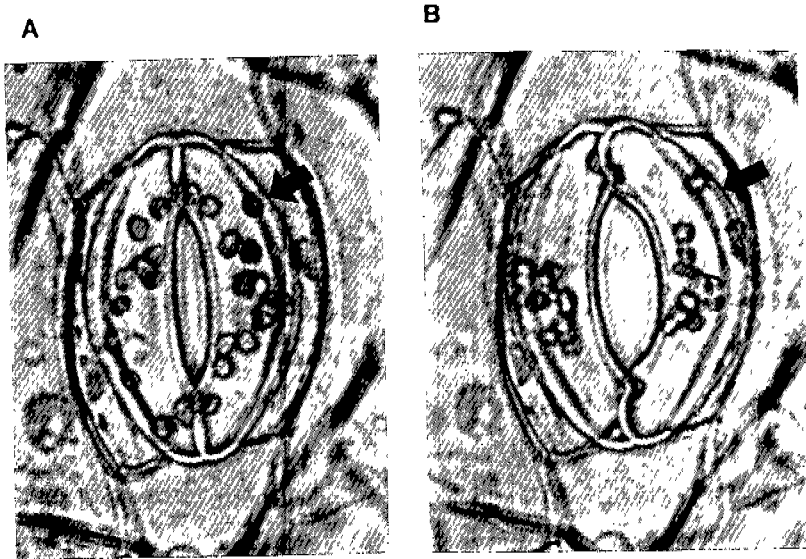


Fig. 6. The opening of a stoma bordered by a *Commelina communis* guard cell microinjected with caged GTP- γ -S. The arrows point the injected cell. Brightfield views before (A) and 2 h after (B) photolysis which released GTP- γ -S from the cage.

식물이 길이 신장을 할 때 H^+ 을 방출하고 K^+ 을 흡수하므로, 본 실험실에서는 이 기술을 이용하여 길이신장을 일으키는 자극의 전달과정들을 연구하고자 한다.

4. Patch clamping

Patch clamping technique은 동물세포에서 이미 많이 실행된 방법이다. 이 방법은 1980년 초기부터 독일의 electrophysiologist 들인 Dr. Neher와 Dr. Sakmann에 의해 개발되었으며 (Hamill et al., 1981), 이 방법에 의해 종전에 voltage clamping 실험결과를 토대로 추측하였던 대로 생체막에 ion channel들이 존재하고, 이들 하나 하나가 열고 닫는 것이 여러가지 요인들에 의해 조절받는 것을 직접 볼 수 있게 되었다. 이러한 공로로 Dr. Neher와 Dr. Sakmann은 1990년에 Nobel 생리 의학상을 공동 수상하였다. 이 방법의 특징은 electrode와 세포막 간의 결합이 전기저항으로는 $10^9 \Omega$ (gigaohm seal) 이상으로 단단하게 이루어져, 아주 적은 양의 전류를 측정할 수 있는 것이다.

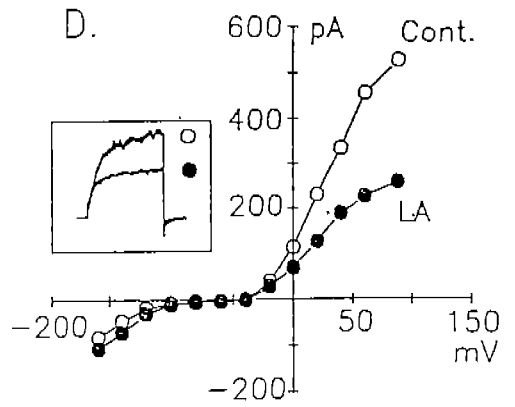
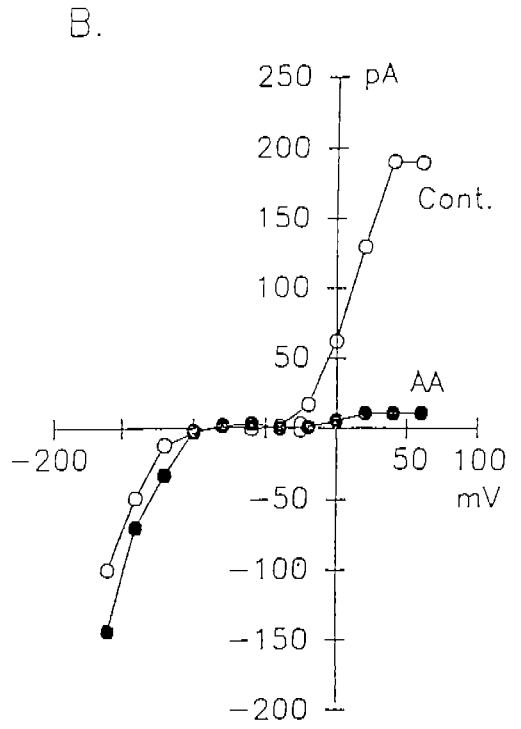
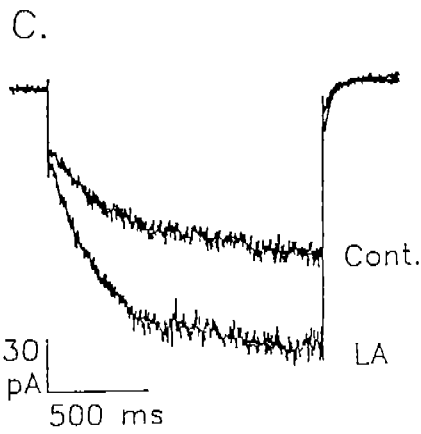
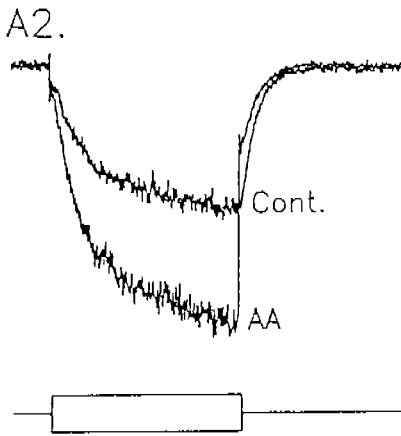
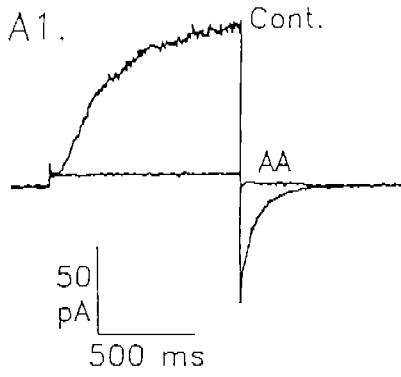
Patch clamping을 식물세포에 적용하기 위해서는 세포벽을 제거하는 과정이 선행되어야 한다. 이러한 목적으로 여러 종의 cellulase 들을 쓰는데, 이들이 세포에 미치는 상해를 최소화할 때 gigaohm seal이 더 잘 형성된다. 이미 액포 (Hedrich and Neher, 1987), 엽록체 등, 세포내 소기관의 막에도 patch clamping 방법을 적용할 수 있음이 보고되었으나, 기술적으로 어려움이 많아 아직 많은 결과들은 보지 못하였고, 앞으로 큰 발전이 예상되는 분야이다.

식물의 ion channel은 동물의 것에 비해 매우 느리게 열고 느리게 닫는 경향이 있다. Macroalgae 의 일종인 *Chara* 에서 action potential이 측정되었는데 그 속도가 동물의 것에 비해 1000 배 정도 느리다고 한다 (Brownlee, 1987). 본 실험실에서는 patch clamping 방법을 이용하여 polyunsaturated fatty acid들이 기공을 열게하고 K^+ channel들의 활성을 조절함을 보였다. 실험은 whole cell configuration에서 진행하였다. Holding potential인 -90 mV에서 0 mV로 막전위를 depolarize 시켰을 때 outward current가 생겼고, holding potential에서 -160 mV로 막전위를 hyperpolarize 시켰을 때 inward current가 발달하였다 (Fig. 7A). 이들 current는 K^+ 이온의 움직임 때문인 것을 reversal potential 측정과 K^+ channel blocker인 tetraethylammonium을 사용하여 알 수 있었다. 50 μ M arachidonic acid를 처리하였을 때, inward K^+

current는 증가하였고 outward K^+ current는 감소하였다 (Fig. 7A). 여러 다른 막전위에서 같은 실험을 반복하여 Current-Voltage (I-V) Curve를 그렸는데, 이 I-V curve는 arachidonic acid의 효과가 어떤 특정 막전위에서만 일어나는 것이 아님을 보인다 (Fig. 7B). Linolenic acid도 arachidonic acid와 같은 효과를 보였으나 (Fig. 7C,D), linoleic acid는 K^+ current에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Outward K^+ current가 감소하고 inward K^+ current가 증가하면 공변세포는 K^+ ion을 내보내지 않고 계속 축적할 것이라고 예측할 수 있다. 지방산에 의한 K^+ current들의 변화가 삼투압의 변화와 그에 따른 기공열림으로 연결되는가를 검사하기 위하여 표피층에 arachidonic acid나 linolenic acid를 처리하거나 (Fig. 8) phospholipase A_2 (Fig. 9)를 처리하였는데, 이 때 닫힌 기공이 열리고 (Fig. 8A,B; Fig. 9), 열린 기공이 암상태에서 닫히는 운동이 억제되는 것을 (Fig.8C, D) 관찰하였다. 우리는 이 결과를 공변세포의 opening signal transduction에 불포화지방산이 second messenger로 작용할 가능성이 있음을 시사하는 결과로 해석하고 있다.

Fig. 7. Effects of unsaturated fatty acids (AA=arachidonic acid, LA=linolenic acid) on outward K^+ current and inward K^+ current (A, C) developed when the voltage-protocol shown under A2 was applied, on current-voltage curves (B, D) of guard cell protoplasts of *Vicia faba*. Guard cell protoplasts were isolated from youngest fully expanded leaves of 2-4 week old *V. faba* plants by enzymatic digestions. Patch electrodes were pulled from N51A glass (Garnar Glass Co., California, USA). Pipette solution contained 100 mM KCl, 2 mM MgCl, 10 mM Hepes (pH 7.2), 5 mM EGTA, 2 mM Na_2ATP and its osmolarity was adjusted to 500 mosm using mannitol. The bath solution contained 11 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes(pH 7.2) and its osmolarity was adjusted to 550mosm using mannitol. Whole cell currents were recorded using 3911A Dagan patch clamp amplifier, filtered at 2 KHz, digitized, stored, and analyzed using Basic-Fastlab software. Experiments were performed at 50-100 $\mu m^2 s^{-1}$ white light at $23 \pm 2^\circ C$. Fatty acids were dissolved in DMSO (final [DMSO] < 0.5%) and applied to the cell from a large bore pipette (about 30 μm diameter tip) connected to a Picospritzer (General Valve, NJ, USA). DMSO alone had no effect on membrane currents (data not shown). Comparisons were made only between current measurements made from individual cells before and after drug application.



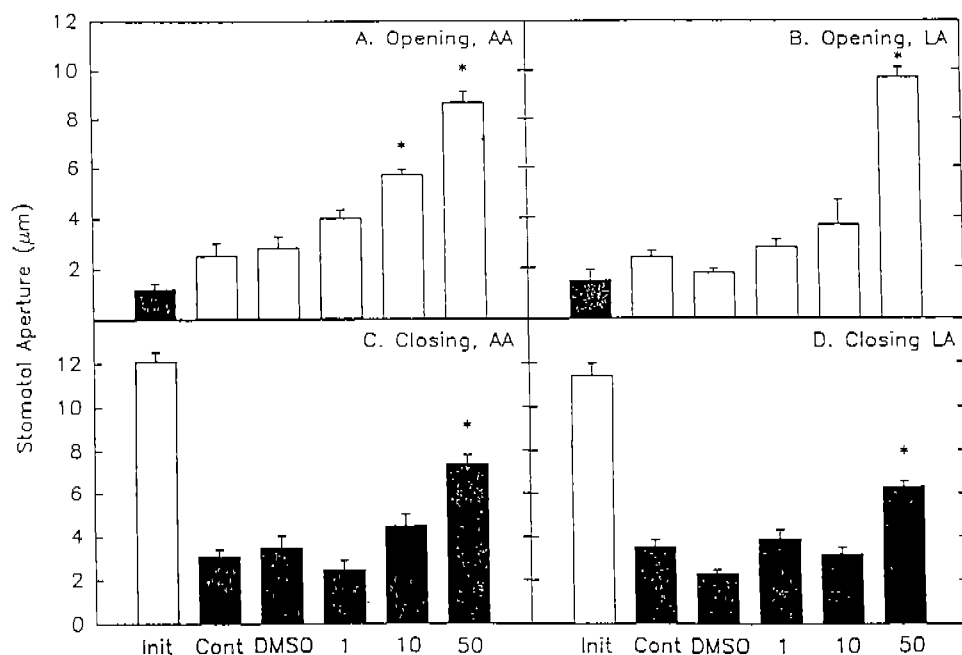


Fig. 8. Effects of 50 μM fatty acids on stomatal opening (A,B) under subsaturating level of white light ($100 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), and stomatal closure under darkness (C, D). Epidermal peels from 6-7 week old *Commelina communis* plants were floated on the solution containing 30mM KCl, 10mM K^+ -Mes (pH 6.1) with and without fatty acids. In case of closure experiments 0.1 mM CaCl_2 was added to the bathing medium to enhance the closure. Fatty acids were firstly dissolved in DMSO, and then sonicated in the solution for 1 min to make micelles. After 1 (closure experiment) or 2 (opening experiment) h incubation, 20 stomatal apertures per each treatment were measured with an eyepiece micrometer at 1,000x magnification. Averages and standard errors from at least 3 separate experiments are shown. AA=arachidonic acid, LA=linolenic acid.

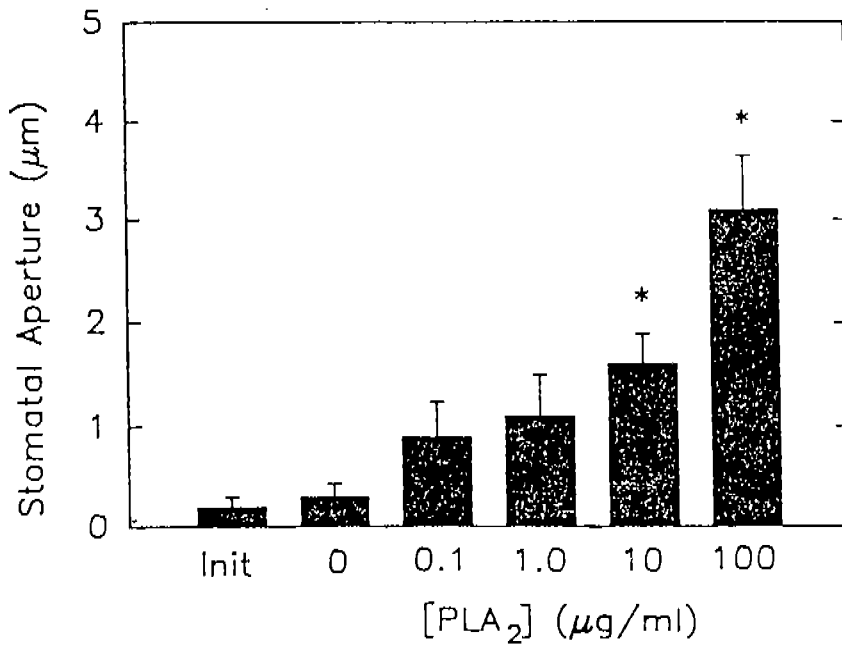


Fig. 9. Effect of exogenous PLA₂ on stomatal opening. Stomatal aperture was measured initially and 4 h after exposure to the illustrated concentrations of bee venom PLA₂ (1.22U/ug from Sigma Chemical Co.). Asterisks denote significance at $p < 0.005$. Other conditions were the same as in Fig. 8.

III. 요약

1. Techniques

이상 본 실험실에서 실시해 본 경험이 있는 기술들을 중심으로 식물 자극인지 기작 연구에 이용될 수 있는 기술들을 정리해 보았다. 이밖에도 형광 indicator들을 이용하는 방법, protein biochemistry, molecular technique 등 매우 중요한 기술들이 앞으로 식물의 자극인지에 관한 연구에 이용될 것이다. 이러한 강력한 신기술들이 도입되면 아직 풀리지 않은 중요한 문제들을 많이 가지고 있는 이 분야는 크게 발전할 것이다. 새로운 기술은 새로운 발견을 의미하므로 우리나라의 순수과학의 발전을 위해서도 기술개발의 중요성은 강조되어야 할 것이다.

2. 실험의 성과

1. 공변세포가 ABA에 의해 수축하는 과정에서 phosphatidylinositol cycle 이 활성화되는 것을 밝혔다.
2. 상처를 받은 식물에서 phospholipase A 가 활성화됨을 밝혔다.
3. 공변세포에 미세현미주입된 GTP- γ -S가 기공을 열게하는 것을 관찰하였다.
4. Linolenic acid와 arachidonic acid가 기공을 열게하고 공변세포의 inward K^+ channel을 열게하며, outward K^+ channel을 닫게 함을 밝혔다.

이상의 실험결과를 바탕으로 우리는 PLA₂가 빛 등의 기공의 열림을 유도하는 자극의 인지 과정과, wound signal transduction 과정에 중요한 역할을 한다는 가설을 세우고, 이것을 검증하는 실험들을 진행시키고 있다.

참 고 문 헌

- Ande B, Scherer GFE (1991) Stimulation by auxin of phospholipase in membrane vesicles from an auxin-sensitive tissue is mediated by an auxin receptor. *Planta* 185:209-214
- Brownlee C (1987) Microelectrode techniques and plant cells. In Standen NB, Gray PTA, Whitaker MJ ed, *Microelectrode Techniques, Chapter 10, The Plymouth Workshop Handbook*, The Company of Biologists Ltd., Cambridge.
- Creelman RA, Tierney ML and Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyl and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4938-4941
- Einspahr KJ, Peeler TC and Thompson GA (1988) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism associated with the response of Dunaliella salina to hypoosmotic shock. *J Biol Chem* 263:5775-5779
- Einspahr KJ, Thompson GA (1990) Transmembrane signaling via phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in plants. *Plant Physiol* 93:361-366
- Felle H, Bertl A (1986) The fabrication of H⁺-selective liquid membrane microelectrode for use in plant cells. *J Exp Bot* 37:1416-1428
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B and Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100
- Hedrich R, Neher E (1987) Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in plant vacuoles. *Nature* 329:833-836
- Lee HJ, Tucker EB, Crain RC, Lee Y (1993) Stomatal opening is induced in pidermal peels of Commelina communis L. by guanosine-5'-(3-Thiotriphosphate) or pertussis toxin. *Plant Physiol* 102:
- Morse MJ, Crain RC and Satter R (1987) Light-stimulated inositolphospholipid turnover in Samanea saman leaf pulvini. *Proc Natl Acad*

Sci USA 84:7075-7078

Nahorski SR, Ragan CI, Challiss, RAJ (1991) Lithium and the phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. TIPS 12:297-303

Quarmby LM, Yueh YG, Cheshire JL, Keller LR, Snell WJ and Crain RC (1992) Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in Chlamydomonas reinhardtii. J Cell Biol 116:737-744

Staswick PE (1992) Jasmonate, genes, and fragrant signals. Plant Physiol 99:804-807