

공변세포에서 앱시스산의 신호전달 과정

이영숙

포항공대 생명과학과

I. 서론

식물호르몬 앱시스산은 수분결핍시 기공을 닫게하는 강력한 신호이다. 수분이 모자라 식물이 시들게 되면 뿌리에서 앱시스산이 합성되어 물관을 타고 잎으로 운반된다. 앱시스산은 세포의 부피조절에 관여하는 여러 이온의 흐름을 변화시켜 공변세포 내 삼투압의 감소를 유도하고 그 결과 기공이 닫히게 한다 (Fitzsimons and Weyers, 1987).

앱시스산에 의한 기공닫힘의 신호전달경로에 대해서는 많은 연구가 있었으나 아직까지 밝혀지지 않은 부분도 많다. 앱시스산에 의해 기공이 닫힐 때, calcium ion이 이차 신호물질로 작용함이 보고되었고 (McAinsh *et al.*, 1990, 1992; Irving *et al.*, 1992), calcium ion에 의해 세포막에 존재하는 inward K⁺ channel의 활성이 저해되고 (Schroeder and Hagiwara, 1989) anion channel (Schroeder and Hagiwara, 1989; Hedrich *et al.*, 1990)의 활성이 촉진됨이 확인되었다. 또한 공변세포내로 미세현미주입된 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃)가 세포질의 calcium 농도를 높이며, 기공을 닫게 하고 (Gilroy *et al.*, 1990), inward K⁺ channel을 차단함이 보고되었다 (Blatt *et al.*, 1990). IP₃는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns₂P)가 phospholipase C (PLC)에 의해 분해된 산물인데, 여러가지 세포반응의 2차 신호전달물질로 작용한다. 이러한 결과들을 기초로 우리는 다음과 같은 가설을 세웠다. 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 과정에서 phosphatidylinositol (PI) cycle이 활성화되고 그 결과 형성된 IP₃가 calcium농도를 증가시켜 이온채널의 활성에 변화를 일으킨다. 이 가설을 검증하기 위해서는 앱시스산이 실제로 공변세포의 이노시톨 인지질들의 분해를 유발시켜 inositol phosphate를 형성시키는가를

확인하는 것이 필수적이다. 우리는 이것을 생화학적인 방법을 사용하여 증명하였다.

신호전달과정에서 IP_3 의 생성은 G-protein을 매개로 이루어지는 경우가 있다 (Hardie, 1991). 식물에서도 G-protein이 신호전달과정에 관여한다는 여러 증거들이 있다 (Terry *et al.*, 1993; Zaina *et al.*, 1990.). 잠두 (*Vicia faba* L.)의 공변세포에서, GDP- β -S에 의해 inward K^+ current가 증가하고 GTP- γ -S에 의해서는 그 반대로 current가 감소하는 현상이 관찰되었다 (Fairley-Grenot and Assmann, 1991). 본 실험실에서도 GTP- γ -S / GDP- β -S의 미세현미주입실험을 통해, 닭의 장풀 (*Commelina communis* L.)의 공변세포에서 G-protein이 신호전달에 관여함을 확인한 바 있다 (Lee *et al.*, 1993). 이상의 증거들로 미루어 볼 때, 엡시스산에 의해 기공이 닫히는 신호전달과정에서 phosphatidylinositol cycle이 활성화되는 과정에 G-protein이 관여할 가능성이 있다. 이를 시험하기 위해, G-protein에 작용하여 신호전달 기능을 변화시키는 독소들을 사용하여, 엡시스산에 의한 기공의 닫힘운동이나 IP_3 의 증가현상이 영향을 받는지를 실험하였다.

동물세포에서 actin이 신호전달매개체로 작용한다는 증거들이 있으며, 특히 actin-binding proteins (특히 profilin)이 PLC의 작용에 영향을 미친다는 보고들이 있다 (Forscher, 1989; Goldschmidt-Clermont *et al.*, 1990). 엡시스산에 의해 기공이 닫히는 과정에 actin이 영향을 미칠 가능성이 있는지를, actin polymerization 또는 depolymerization을 억제하는 약품을 사용하여 검사하고, 이 과정에서 실제로 actin filament의 분포상태가 변화하는지를 immunolocalization 방법으로 관찰하였다.

II. 본 론

제 1절 앱시스산에 의한 PI cycle 의 활성화

1.1. 앱시스산에 의한 이노시톨 인지질의 변화

앱시스산 처리 후 10, 60, 180, 300, 600초에서 공변세포 원형질체 인지질 양의 상대적인 변화를 정량하였다. 공변세포에서의 이노시톨 인지질들은 대조군에 비해 20~40%의 범위에서 변화하였다 (Fig.1).

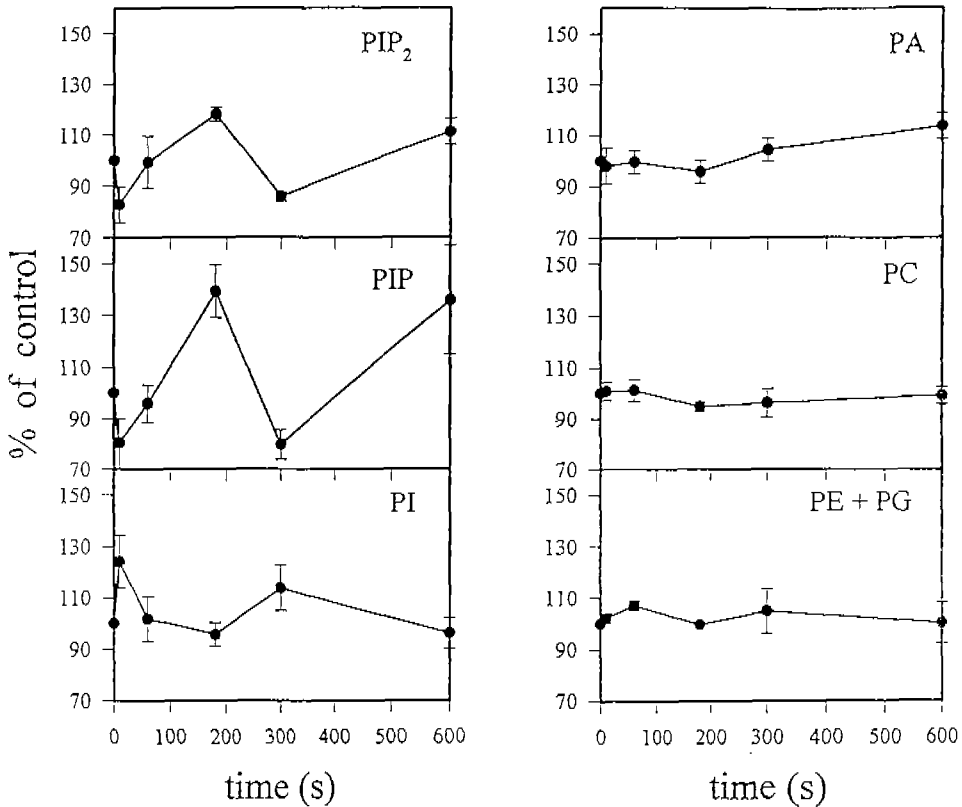


Fig. 1. Changes in levels of $^{32}\text{PO}_4$ -labeled lipids in guard cell protoplasts of *Vicia faba* upon ABA (10 μM) treatment for 10, 60, 180, 300, and 600 s (from Lee et al., 1996). Guard cell protoplasts were labeled with for 30 min, and the lipids were separated on a Merck 60 plate and exposed to x-ray film. Phospholipids were identified by co-separation with authentic standards, scraped from the plate, and the radioactivity of each bands were counted. PIP₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP: phosphatidylinositol 4-phosphate, PI: phosphatidylinositol, PA: phosphatidic acid, PC: phosphatidylcholine, PE: phosphatidylethanolamine, PG: phosphatidylglycerol

PtdInsP₂ 와 phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdInsP)의 양은 10초에서 처음으로 감소했다가, 60~180초에서 서서히 증가함을 보였다. 이 이노시톨 인지질의 두 번째 감소가 300초에서 관찰되었다. PtdIns 양은 10초에서 처음으로 증가했다가 그 후 점진적인 감소를 보이다가 300초에서 다시 증가하였다. PtdIns 양의 이같은 변화는 PtdInsP₂와 PtdInsP의 것과는 대조적인 모습을 보였다. PtdInsP₂의 감소에 따른 PtdIns의 증가는 *Chlamydomonas*에서 이미 관찰된 바 있다 (Quarmby et al., 1992). PA의 양은 300초까지는 커다란 변화를 보이지 않다가 그 후 300~600초에 걸쳐 점차 증가했다. 그리고 다른 종류의 인지질인 PC, PE, phosphatidylglycerol (PG) 등에서는 앱시스산 처리에도 불구하고 대조군과 비교할 때 5% 이하의 변화를 보였을 뿐이었다.

1.2. 앱시스산에 의한 inositol 1,4,5-trisphosphate의 증가

공변세포만을 포함하는 대조군 표피층의 IP₃ 양은 10 mM Li⁺의 유무에 따라 각각 0.14 ± 0.012 (n=35)와 0.14 ± 0.024 (n=22) pmol/nmol phospholipid로 차이가 없었다. IP₃ 양은 10 mM LiCl의 존재 하에서 앱시스산 처리 후 10초에서 대조군에 비해 190%까지 올라가서 60초까지 높은 정도로 유지되다가 다시 원래 상태로 돌아왔다 (Fig. 2). 그러나 10 mM LiCl이 없을 경우 IP₃ 양은 10초에서 단지 119%까지만 상승하였다.

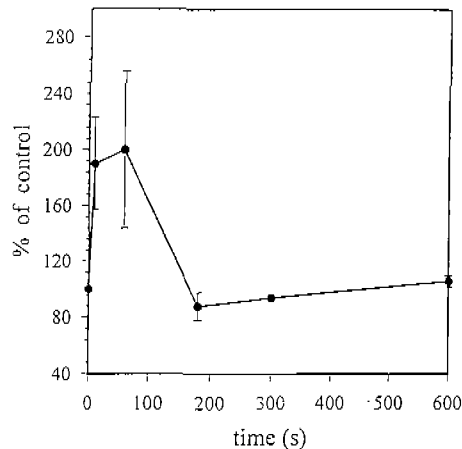


Fig. 2. Time course of IP₃ production by *V. faba* guard cells upon ABA (10 μM) treatment in the presence of 10 mM LiCl. Data were normalized to total phospholipid phosphate in each sample and are expressed as percentages of the values of control cells (from Lee et al., 1996).

제 2절. 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 과정에 G-protein이 관여함

백일해 독소 (Pertussis toxin, PTx)와 콜레라 독소 (Cholera toxin, CTx)는 G-protein의 특정 아미노산 잔기를 ADP-ribosylation시킨다. 그 결과는 PTx의 경우는 G-protein의 불활성화, CTx의 경우는 활성화를 일으키므로, 이들 독소들은 신호전달 과정 연구에 좋은 도구로서 널리 쓰이고 있다.

2.1. 독소 처리에 의한 기공 운동의 변화

앱시스산은 기공을 여는 조건인 강한 백색광 하에서도 기공을 닫았다. Fig. 3

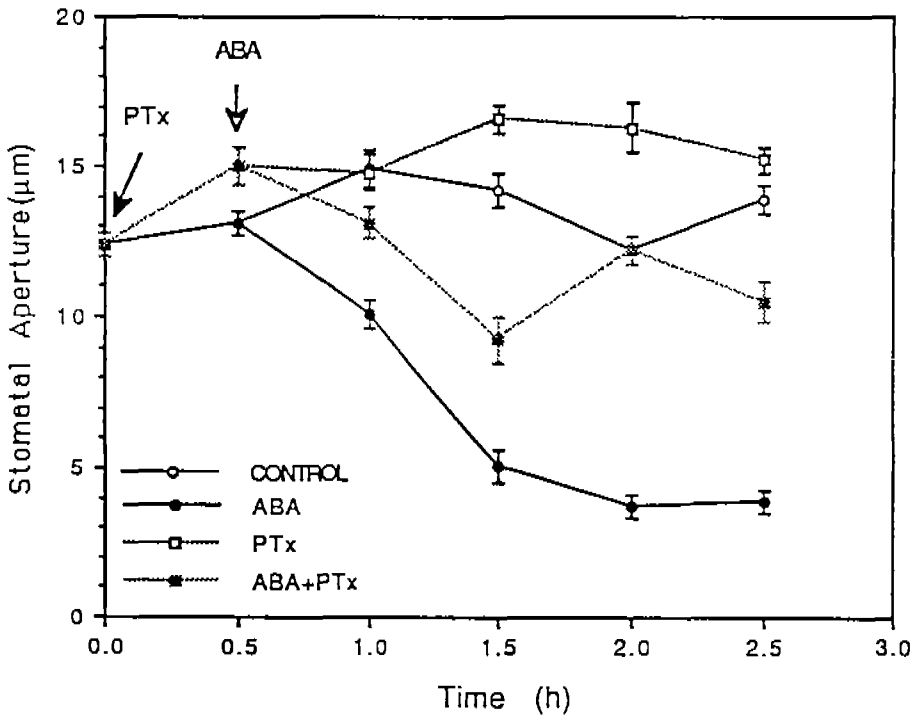


Fig. 3. Effect of PTx on ABA-induced stomatal closing in intact epidermis of *Commelina communis* L (from Lee et al., 1994). The adaxial epidermis of fully expanded leaves of 4 wk-old plants was peeled and floated on test solutions containing 30 mM KCl, 10 mM K⁺-Mes (pH 6.1), 0.1 mM EGTA, with or without 1 μg/ml PTx for 30 min. ABA (10 μM) was then added to the test groups. Stomatal apertures were measured every 30 min. Bars indicate standard errors (n=20).

에서, 백색광에 의해 12~13 μm 로 활짝 열려있던 기공이 엡시스산 처리 후 2시간 내에 4 μm 로 닫히는 것을 볼 수 있다. 엡시스산에 의한 기공닫힘은 PTx에 의해 억제되었다. 엡시스산만 처리한 실험군이 13 μm 에서 4 μm 까지 기공을 닫는데 반해, PTx와 엡시스산을 함께 처리한 실험군에서는 초기에 15 μm 이던 것이 10~11 μm 정도로 닫히는데 그쳤다. 그러나 PTx에 의한 엡시스산의 작용의 억제는 부분적이었다. 즉, PTx에 의해 완전한 억제가 이루어진다면 엡시스산 처리하기 전의 기공크기가 유지되어야 할 것이나 엡시스산이 처리된 이후 다소 기공이 닫히는 양상을 보였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 과 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 PTx를 사용해 보았는데, PTx의 처리농도에 따른 차이가 별로 없었다. CTx는 엡시스산에 의한 기공의 닫힘에 영향을 주지 못하였다.

2.2. 엡시스산에 의한 IP₃ 증가에 PTx이 미치는 효과

단기간 효소처리과정을 마치고 공변세포만 남은 표피층에 최종 농도가 20 μM 인 엡시스산을 10초간 처리했을 때, 엡시스산에 의해서 IP₃의 양이 대조군에 비해 121% 증가하였다. 이는 제 1절에서 보고한 190%에 비해 매우 낮은 증가율을 보인 것인데, 아마 사용한 시료의 계절적 변이에 의한 것으로 추정된다. 그런데 PTx (최종 농도, 1 $\mu\text{g/ml}$)를 2시간 전처리한 뒤, 엡시스산을 처리했을 때는 엡시스산에 의한 IP₃의 증가가 완전히 억제되었다. 또한 PTx의 처리만으로도 엡시스산의 유무에 상관없이 IP₃의 양이 대조군에 비해 70% 정도로 감소하는 것을 관찰하였다 (Fig. 4). 이 실험의 결과로부터 PTx에 의해 공변세포의 IP₃ 양이 감소되고, 엡시스산에 의한 IP₃ 증가가 억제되는 것을 알 수 있었다.

제 3절. 엡시스산에 의해 기공이 닫히는 과정에 Actin filament가 관여함.

세포내 골격을 이루는 microfilament, microtubule 등의 cytoskeletal elements

들은 호르몬, 환경의 변화 등의 자극에 따라 dynamic하게 변하며, 몇년 전부터는 여러 동물세포에서 cytoskeletal element들이 신호전달에 관여한다는 보고들이 있어서, 공변세포에서도 cytoskeletal element들이 신호전달이나 세포의 형태변화에 관여할 가능성을 조사하였다.

3.1. Actin filament가 기공운동에 미치는 영향

Actin depolymerization을 억제하는 phalloidin은 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 현상을 억제시켰고 (Fig. 5), actin polymerization을 억제하는 cytochalasin B는 앱시스산에 의해 기공이 닫히는 것을 억제하지 못하였다 (Kim, 1995).

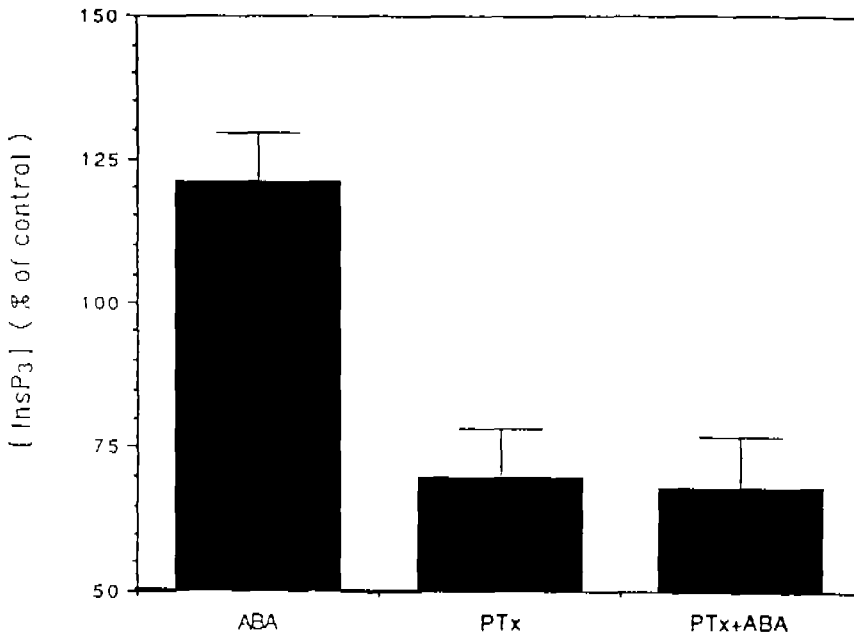


Fig. 4. Effect of PTx on ABA-induced IP₃ increase in guard cells of *Vicia faba* L (from Lee et al., 1994). The abaxial epidermis of fully expanded leaves from 4 wk-old *V. faba* plants was isolated and digested with cellulase until only guard cells remained in the tissue. The digested peels were floated on the solution containing 0.15 M mannitol, 5 mM ascorbic acid and incubated for 1 h. PTx (1 µg/ml) was then added to the test groups, and 2 h later ABA (10 µM) was added to both the test groups and controls. After 10 s of ABA treatment, the reaction was stopped by adding trichloroacetic acid to 5%, and the supernatant was collected. The amount of IP₃ in the supernatant was measured by the receptor binding assay.

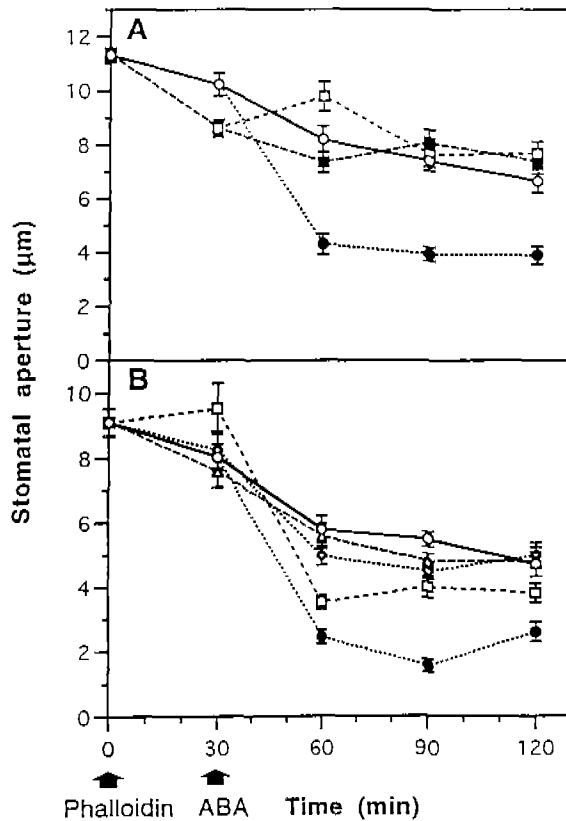


Fig. 5. Effects of phalloidin on ABA-induced stomatal closing in intact epidermis of *Commelina communis* L. (from Kim et al., 1995) The solution that floated the epidermal pieces either contained or did not contain 0.1 mM phalloidin (A) and various concentrations of phalloidin (B). A: ○, control; ●, ABA; □, phalloidin; ■, ABA plus phalloidin. B: ○, control; ●, ABA; □, 0.01 mM phalloidin plus ABA; △, 0.1 mM phalloidin plus ABA; ◇, 1 mM phalloidin plus ABA.

3.2. 앱시스산에 의해 유도되는 Actin filament의 변화

열린 기공의 공변세포에는 기공 쪽으로부터 반대쪽으로 부채살 형태로 가지런히 퍼진 actin filament들이 관찰된다 (Fig. 6). 앱시스산을 처리하면 이러한 actin filament들이 5-10분 이내에 짧게 끊어지고, 기공 쪽에만 더러 남아있으며, 30분 후에는 열린 기공에서 보이던 형태의 actin filament는 보이지 않고, 오히려 기공의 긴 축과 평행하는 방향, 즉 이전의 배치와는 직각 방향으로 짧은 actin

filament들이 분포하였다 (unpublished data). 60분 후에는 30분에서와 유사한 배치를 보였다.



Fig. 6. Distribution of actin filaments in guard cells of *Commelina communis* L. The actin filaments in guard cells were stained by indirect immunofluorescence microscopy using an antibody to actin from chicken gizzard. The entry of the antibody was facilitated by freezing the epidermal tissue in liquid nitrogen and cracking the guard cell in the frozen state.

3.3. Actin filament의 dynamics가 이온채널의 활성화에 미치는 영향

Actin filament들이 방사상으로 배열된 형태를 고정시켜 dynamic change를 저해하는 phalloidin은 inward K^+ channel과 outward K^+ channel의 활성을 저해시켰다 (Fig. 7). 이들 K^+ channel들은 기공이 열리고 닫히는데 필요한 이온 이동의 통로이다.

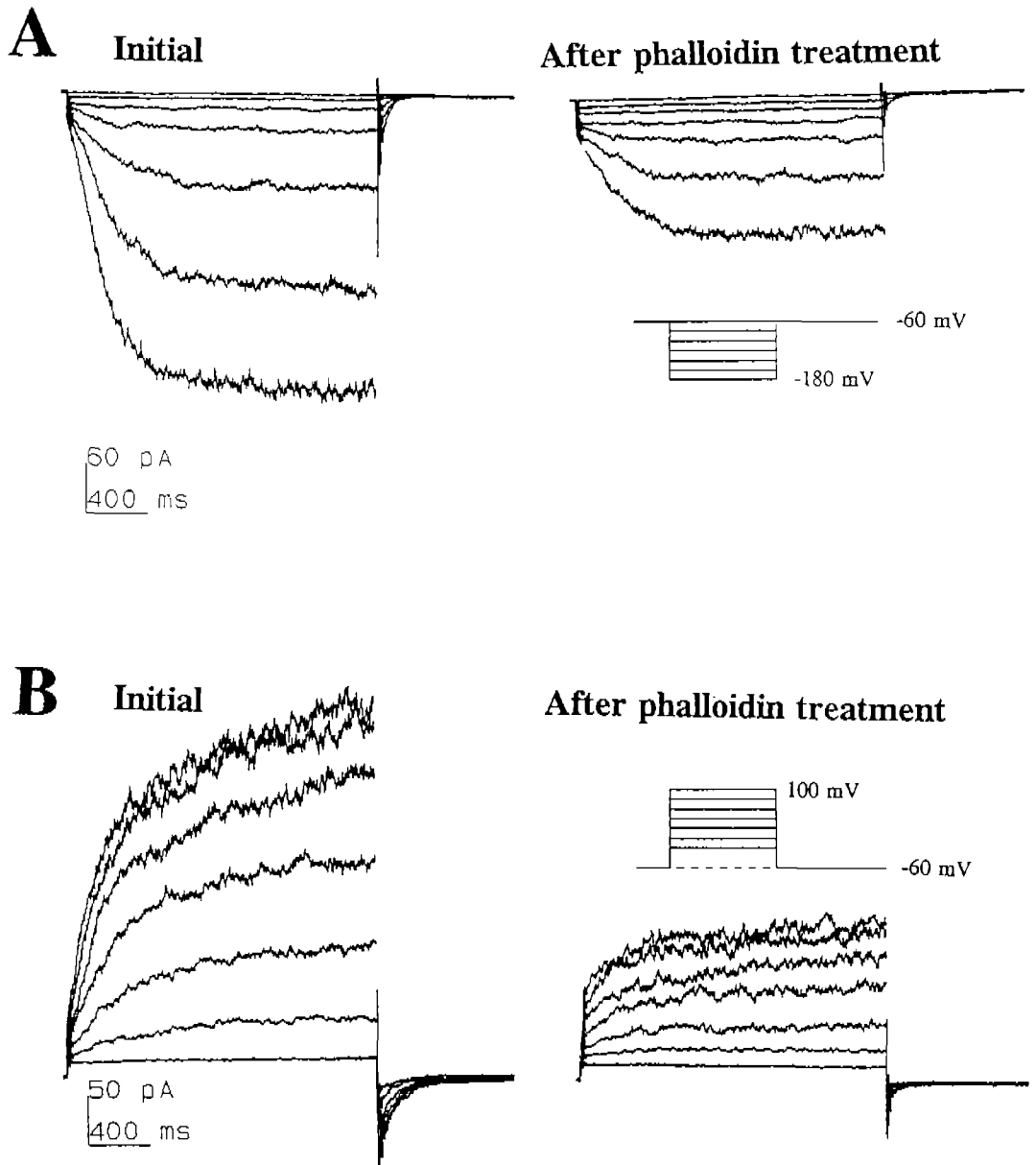


Fig. 7. Effects of phalloidin on inward (A) and outward (B) K^+ channel activities in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cell protoplasts. Whole-cell K^+ channel activities were measured using patch clamping techniques. Intracellular medium contained 100 mM K^+ -glutamate, 5 mM KOH, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM BAPTA, 4 mM MgATP, and 20 mM HEPES (pH 7.2 with N-methylglucamine) and D-mannitol to adjust the osmolarity to 520 mOsm. The extracellular medium contained 10 mM K^+ -glutamate, 1 mM KOH, 1 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, and 10 mM MES (pH 5.5 with N-methylglucamine) and D-mannitol to adjust the osmolarity to 480 mOsm.

III. 고 찰

제 1절. 앱시스산에 의한 PI cycle의 활성화

PI cycle을 통한 신호전달기작의 공통적인 특징 중의 하나는, agonist 처리 이후 수초 이내에 PtdInsP₂가 급속히 가수분해되어 세포내에서의 그 양이 감소된다는 점이다. 이러한 양상은 우리의 결과에서도 앱시스산 처리 후 10초에 PtdInsP₂의 빠른 가수분해가 일어남으로써 입증되었다 (Fig. 1). 300초 후에도 PtdInsP₂의 감소가 관찰되었는데 이것은 아마도 지질 가수분해의 2차 시기일 가능성이 있다. 이같은 PtdInsP₂의 수준의 변화는 *Chlamydomonas reinhardtii*에서 이미 관찰된 바 있다 (Quarmby et al., 1992). PtdInsP₂의 두번의 감소는 PLC에 의한 지질 가수분해에 의한 것일 수 있다. 우리는 PtdInsP₂의 감소에 이어 PtdIns의 감소와 동시에 PtdInsP₂의 재증가가 일어나는 것을, 앱시스산에 의해 PtdInsP₂의 가수분해가 일어나고 곧 이어서 PtdIns 4-kinase와 PtdIns(4)P 5-kinase가 활성화되는 것이라고 제안한다.

PI cycle을 수반한 신호전달기작에서의 공통적인 특징 중의 다른 하나는, 처리한 agonist에 의해 IP₃가 세포내에서 수초 내에 급속히 증가한다는 것이다. 이는 우리의 결과에서, 앱시스산 처리 후 10 초에서 IP₃가 증가하는 것으로 확인될 수 있었다 (Fig. 2). 이와 관련하여 PtdInsP₂의 감소가 나타난다. IP₃의 증가와 PtdInsP₂의 감소는, 앱시스산이 PLC를 활성화시켜 이노시톨 인지질을 분해시키고 그 결과 IP₃를 방출하였음을 뜻한다. 10초에서 PtdInsP₂의 감소와 동반된 IP₃ 양은 60초까지만 높게 유지되며 180초에 이르면 대조군 수준과 비슷한 정도로 떨어진다. 이처럼 신호전달의 급속한 전개 및 종결은, 다른 여러 system에서의 자극에 따른 반응의 kinetics에서도 보편적으로 발견되는 특징이다 (Quarmby et al., 1992; Fukami and Takenawa, 1989). IP₃의 short pulse는 IP₃-dependent Ca²⁺ release, Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, Ca²⁺ channel opening과 같은 다른 과정들을 유도할 수 있다. Bathing medium에 LiCl가 없을 때는 앱시스산 처리 후 IP₃ 양의 증가가

적었다. 이는 Li^+ 이 inositol mono- & bis phosphate phosphatase에 대한 반경쟁적 억제제이므로 (Hallcher and Scherman, 1980; Inhorn and Majerus, 1987), 이를 처리할 경우 생성된 IP_3 가 위의 두 효소에 의해 급속히 분해되는 속도를 경감시킬 수 있으나, LiCl 이 없을 때는 이런 효과를 기대할 수 없기 때문인 것으로 보인다. 300초에서 PtdInsP_2 와 PtdInsP 의 2차적 감소를 볼 수 있는데, 이에 따른 IP_3 의 2차적 증가가 생기지 않는 이유는 분명하지는 않다. 그러나 아마도 Li^+ 이 inositol의 복구를 막아서 그로 인해 PtdInsP_2 의 재생성이 이루어지지 않기 때문일 것이다 (Nahorski et al., 1991).

이상과 같은 우리의 결과는 PI cycle turnover가 *Vicia faba* L.에서 앱시스산에 의한 기공닫힘의 세포내 신호전달기작에서 중요한 역할을 함을 보여주고 있다. 영국의 한 실험실에서도 *Commelina communis* L.를 [^3H]-inositol로 표지한 실험에서 유사한 결과를 얻었다 (MacRobbie, 1992). 공변세포의 신호전달과정에서의 PI cycle의 수반에 대한 우리의 결과와 기존의 보고들 (Blatt et al., 1990; McAinsh et al., 1990; Gilroy et al., 1991)로부터 공변세포에 앱시스산 처리 이후의 전개 과정을 유추해 볼 수 있다. 앱시스산은 수용체를 통해 G-protein을 활성화하고, 그에 의해 이노시톨 인지질에 특이성을 지닌 PLC (PI-PLC)를 활성화한다. 활성화된 PI-PLC에 의해 PtdInsP_2 가 가수분해되고, 그 결과 IP_3 가 방출되어 cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ 을 상승시킨다. 증가된 $[\text{Ca}^{2+}]$ 은 inward K^+ flux를 억제하고 (Schroeder and Hagiwara, 1989), anion efflux를 촉진하여 기공의 닫힘을 유도한다.

제 2절. 기공닫힘에 관련된 앱시스산의 신호전달에서 G-protein의 역할

2.1. 앱시스산에 의한 기공닫힘에 G-protein의 관련성

PTx는 기공의 열림을 조장하고 (Lee et al., 1993) 기공의 닫힘을 억제하였다 (Fig. 3). PTx에 의해 ADP-ribosylation된 대부분의 G-proteins은 비활성화되는

경우가 많으므로, PTx-sensitive G-protein이 기공이 닫히는 과정에 관여할 것으로 보인다.

2.2. 앱시스산에 의한 IP₃ 증가와 G-protein과의 관련성

앞의 실험에서 단기간 효소처리를 하여 공변세포만 남은 잎 표피층에 앱시스산을 처리하고, IP₃ 양을 receptor-binding assay로 정량했을 때, 10초에 IP₃의 양이 대조군에 비해 190%까지 증가하여 60초까지 유지되다가 다시 원래 상태로 돌아옴을 보았다 (Fig. 2). 앱시스산을 처리하기 전에 PTx를 2시간 전처리한 경우에는 앱시스산에 의한 IP₃ 증가가 완전히 억제되었다 (Fig. 4). 이 결과에서 앱시스산에 의해 활성화되는 PLC가 G-protein의 조절을 받는 것을 알 수 있었다. 또 앱시스산을 처리한 실험군이나 처리하지 않은 실험군 모두에서 PTx에 의해 IP₃의 양이 대조군보다 감소한 것을 보았다. 이 결과는 PTx를 처리했을 때 기공의 열림이 유도된다는 기존의 보고와 서로 연관성이 있으며 (Lee et al., 1993), 외부 자극이 없는 때에도 약간의 G-protein의 활성이 있음을 시사한다. 즉 PTx가 resting level의 G-protein의 활성도 억제시켜 IP₃ 양이 감소하는 현상이라고 생각된다. 이상의 결과로부터 앱시스산에 의한 기공닫힘의 신호전달 단계에서 PLC의 활성화는 활성화된 G protein에 의해 일어난다고 결론내릴 수 있다.

제 3절. 앱시스산에 의한 기공닫힘에 있어서 microfilament의 역할

Phalloidin을 전처리한 실험군에서 앱시스산을 처리하여도 기공의 닫힘이 억제되었다 (Fig. 5). 이 결과는 actin이 신호전달과정에서 중요한 역할을 담당할 가능성을 시사한다. Actin이 신호전달과정에 기여하는 방법으로 두가지를 생각할 수 있다. 첫째는 actin이 phalloidin에 의해 polymerization 상태를 유지하여 상대적으로 profilin과 결합하는 monomer 형태의 G-actin이 감소하면서 오히려 profilin과 PtdInsP₂이 결합되어 그 결과 PLC의 PtdInsP₂에 대한 작용을 방해함으로써 기공

의 닫힘이 억제된다는 것이다. 들쭉는 phalloidin에 의해 polymerization이 된 actin이 이온채널의 활성을 저하시켜서 기공운동에 필수적인 이온의 흐름이 저해되어 기공운동이 저해된다는 것이다. Phalloidin이 K^+ channel을 저해한다는 우리의 실험결과는 (Fig. 7) 이러한 가능성을 뒷받침해 준다.

Cytochalasin B 단독으로는 광조건 하에서 열린 기공을 닫게 하지 않았고, 암시스의 기공닫힘 효과에 영향을 주지 않았으며, 암조건에서는 cytochalasin B 단독으로 닫혀있던 기공을 열게 하는 운동을 유도하였으므로, actin의 depolymerization만으로 PLC가 활성화되지는 않는 것 같다. 다만 actin의 depolymerization 과정은 기공이 열리거나 닫히는 운동을 시작하는데 있어서 permissive role을 수행하는 것 같다.

결론적으로 phalloidin에 의해 actin의 polymerized state가 유지될 경우에는 암시스에 의한 기공의 닫힘이 억제되고, cytochalasin B에 의해 actin의 depolymerized state가 유지될 때는 기공의 닫힘이 방해받지 않는다는 우리의 실험 결과는, 암시스에 의해 기공이 닫히는 과정에 microfilament의 depolymerization이 필수적임을 의미한다. 암시스를 처리하면 공변세포의 actin filament들이 5-10분 이내에 depolymerization되기 시작한다는 결과는 이러한 가설을 뒷받침한다.

IV. 결 론

이전의 여러 실험결과들이 암시스에 의한 기공닫힘에 PLC가 관련되어 있음을 간접적으로 시사하였는데, 우리는 직접 receptor-binding assay를 통해 암시스에 의해 IP_3 양이 증가함을 확인하였고, 이노시톨을 함유하는 지질들의 변화도 이에 상응하게 변화하는 것을 관찰하였다. 또 G-protein의 기능을 저해하는 PTx에 의해 암시스에 의한 기공닫힘과 IP_3 양의 증가가 모두 억제되는 것을 봄으로써, 암시스에 의한 기공닫힘의 신호전달경로에 G-protein과 연결된 PLC가 수반되어 있다고 결론내릴 수 있었다.

Actin이 암시스에 의한 신호전달과정에 관련될 가능성을 보기 위해 actin의

depolymerization이나 polymerization을 억제하는 약들을 각각 처리한 후 엡시스산에 의한 기공닫힘이 영향을 받는지 조사하였다. Phalloidin에 의해 actin의 polymerized state가 유지될 경우에는 엡시스산에 의한 기공닫힘이 억제되고, cytochalasin B에 의해 actin의 depolymerized state가 유지될 때는 기공닫힘이 방해받지 않았다. 직접 세포의 actin filament의 분포를 본 immunolocalization 실험 결과, 엡시스산을 처리하면 공변세포의 actin filament들이 5-10분 이내에 변화하는 것을 관찰하였고, 이러한 실험 결과로부터, 엡시스산에 의해 기공닫힘이 일어날 때 actin filament의 depolymerization이 필수적임을 알 수 있었다. Actin filament의 변화가 어떤 방법으로 기공운동과 연관되어 있을지는 아직 미지수이지만, 직접 이온채널의 활성을 조절할 가능성이 높음을 제시하는 실험결과를 얻었다.

V. 사 사

본 연구는 1992~1994년도 과학재단 목적기초 연구비, 1994년 교육부 자유공모, 1996년 과학재단 핵심과제 지원에 의해 수행되었다. 공변세포내의 지질분석과 IP₃ assay는 최영봉, 이준상, 이수민이 수행하였고, 전기생리학적 실험은 이한주, 황재웅, 서수정, Immunolocalization 실험은 은순옥 박사, 김문정, 배은신이 수행하였다. 식물을 관리하시는 김시인 선생님께 감사드립니다.

VI. 참고 문헌

Blatt, M. R., G. Thiel and D. R. Trentham. 1990. Reversible inactivation of K⁺ channels of *Vicia* stomatal guard cells following the photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate. *Nature* 346: 766-769.

- Fairley-Grenot, K. and S. M. Assmann. 1991. Evidence for G-protein regulation of inward K^+ channel current in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 3: 1037-1044.
- Fitzsimons, P. J. and J. D. B. Weyers. 1987. Responses of *Commelina communis* L. guard cell protoplasts to abscisic acid. *J. Exp. Bot.* 38: 992-1001.
- Forscher P. (1989) Calcium and polyphosphoinositide control of cytoskeletal dynamics. *TINS* 12: 468-474
- Fukami K. and T. Takenawa (1989) Quantitative changes in polyphosphoinositides, 1,2-diacylglycerol and inositol 1, 4, 5-trisphosphate by platelet-derived growth factor and prostaglandin F₂. *J. Biol. Chem.* 264: 14985-14989
- Gilroy, S., N. D. Read and A. J. Trewavas. (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 346: 769-771.
- Gilroy S., M. D. Fricker, M. D. Read and A. J. Trewavas (1991) Role of calcium in signal transduction of *Commelina* guard cells. *The Plant Cell* 3: 333-344
- Goldschmidt-Clermont P. J., L. M. Mechesky, J. J. Baldassare and T. D. Pollard (1990) The actin-binding protein profilin binds to PIP_2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247: 1575-1578
- Hallcher L. M. and W. R. Scherman (1980) The effects of lithium ion and other agentson the activity of *myo*-inositol-1-phosphatase from bovine brain.

J. Biol. Chem. 255: 10896–10901

Hardie, D.G. (1991) Cell surface receptors - signal transduction. *In*, Biochemical messengers; hormones, neurotransmitters and growth factors. Hardie D.G. (ed.). Chapman & Hall, Cambridge, U.K. pp.147–187.

Hedrich, R., H. Busch and K. Raschke. (1990) Ca^{2+} and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO. J.*9:3889–3892.

Inhorn R. C. and P. W. Majerus (1987) Inositol phosphate 1-phosphatase from calf brain. *J. Biol. Chem.* 262: 15946–15952

Irving, H. R., C. A. Gehring and R. W. Parish. (1992) Changes in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. *P.N.A.S.* 89: 1790–1794.

Kim M, P. K. Hepler, S.-O. Eun, K. S. Ha, and Y. Lee. (1995) Actin filaments in mature guard cells are radially distributed and involved in stomatal movement. *Plant Physiol.* 109: 1077–1084.

Lee, H. J., E. B. Tucker, R. C. Crain and Y. Lee. (1993) Stomatal opening is induced in epidermal peels of *Commelina communis* L. by GTP analogs or pertussis toxin. *Plant Physiol.* 102: 95–100.

Lee J., H. Yi., S. Lee, Y. Lee (1994) Involvement of G protein in signal transduction process of abscisic acid-induced stomatal closure. *J. Plant Biol.* 37:

- Lee Y., Y. B. Choi, J. S. Lee, S. M. Assmann, C. O. Joe, J. F. Keller and R. C. Crain (1996) Abscisic acid-induced phosphatidylinositol turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 110: 987-996
- McAinsh, M. R., C. Brownlee and A. M. Hetherington. (1990) Abscisic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure. *Nature* 343: 186-188.
- MacRobbie E. A. C (1992) Calcium and ABA-induced stomatal closure. *Phil Trans RSoc Lond B.* 338: 139-140
- Matsudaira P. and P. Janmey (1988) Pieces in the actin-servering protein puzzle. *Cell* 54:139-140
- Nahorski, S.R., C.I. Ragan and R.A.J. Challiss. (1991) Lithium and the phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *TIPS* 12: 297-303.
- Quarmby, L. M., Y. G. Yueh, J. L. Cheshire, L. R. Keller, W. J. Snell and R. C. Crain. (1992) Inositol phospholipid metabolism may trigger flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 116: 737-744.
- Schroeder, J. I. and S. Hagiwara. (1989) Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 338: 427-430.

Terryn, N., M. V. Montagu and D. Inze. (1993) GTP-binding proteins in plants.
Plant Mol. Biol. 22: 143-152.

Zaina, S., R. Reggiani and A. Bertani. (1990) Preliminary evidence for involvement of GTP-binding protein(s) in auxin signal transduction in rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile. *J. Plant Physiol.* 136: 653-658.