

大麥種子の Amylase 생성에 미치는 Gibberellic Acid의
촉진효과와 Indole-3-acetic Acid의 억제효과의 解析

蔡麟基·鄭英淑

(梨花女子大學校 文理科大學 生物學科)

Studies on Gibberellic Acid-promoted and Indole-3-acetic Acid-repressed
Amylase Synthesis of Barley Seeds

Chai, In Ki and Young Sook Chung

(Department of Biology, Ewha Woman's University, Seoul)

ABSTRACT

Using barley seeds (*Hordeum sativum* Jess, var.), the influences of gibberellic acid (GA) and indole-3-acetic acid (IAA) on the amylase synthesis and that of the nucleic acid metabolism were investigated.

1. With the deembryonized barley seeds, the increase of amylase treated with a 10^{-6} M of GA and the decrease of amylase treated with 10^{-5} M IAA were matched by a proportionate increase and decrease in the amount of RNA. The influence of the hormones on the RNA synthesis has appeared immediately after the treatment but on the amylase synthesis it has appeared 8 hours later. But no influence on the DNA synthesis was observed on both hormones.
2. The amylase from deembryonized barley seeds treated with GA and IAA have been fractionated by gel filtration on Sephadex G-100. The amylase components showed four fractions on both enzymes treated with GA and IAA. Fraction I (FI) was differed from fraction IV (FIV) in K_m value and the effects of temperature, pH and metal ions. On the basis of their enzymatic properties, it was considered that the FI was β -amylase and FIV was α -amylase. The influences of GA and IAA on each fractions appeared to be similar but on the amylase units per soluble protein, IAA inhibited the production of amylase FIV while it promoted that of amylase FI.
3. An experiment was conducted to determine whether IAA inhibits GA-promoted amylase synthesis competitively or non-competitively. Using a Lineweaver-Burk plot, it was clear that IAA was acting in a non-competitive fashion. From this, IAA was probably not competing with GA at the same site, but it was acting at some other site which resulted in partial blocking of the action of GA on the amylase synthesis.

서론

大麥種子의 amylase가 Payen과 Perzog (1833)에 의하여 확인된 후 Paleg(1960), Yomo(1960) 등은 그 amylase 생성이 gibberellic acid(GA)에 의하여 촉진된다고 하였으며, Varner(1964), Paleg(1964)와 MacLeod와 Miller(1962)는 α -amylase 생성이 aleurone layer 세포에 국한된다고 하였다. 그리고 aleurone layer에서 합성되는 α -amylase는胚에서 합성되는 GA에 의해 특별히 조절받는다는 것이 보고되었다(MacLeod and Palmer, 1963; Radley, 1967; Yomo and Inuma, 1966).

大麥種子의 amylase 중에서 α -amylase 합성은 발아에 즈음한 *de novo* 합성이며, 이것은 RNA 합성과 밀접하게 관련되어 있다고 하였다(Filner and Varner, 1967; Chrispeels and Varner, 1967).

그러나 β -amylase는 발아되기 전부터 starchy endosperm 속에 zymogen의 형태로 존재하다가 발아가 시작되면서, 또는 papain이나 reducing agent 처리로 활성화 한다는 것이 보고되고 있다(Nishitai *et al.*, 1958; Yomo, 1930). 또한 Jacobsen과 Varner(1967)는 발아중의 aleurone 조직에 protease를 처리하면 proteolysis로서 β -amylase가 유리된다고 보고하였다.

발아중의 大麥種子에서 발견된 amylase는 α -및 β -amylase의 isozyme이 9개 까지 보고되었는데(Frydenberg and Nielsen, 1965) 이들은 모두 GA 처리에 의해 그 생성이 촉진되고 있다(Momotani and Kato, 1966).

한편 식물종자는 일반적으로 endogenous auxin을 갖고 있어서 발아과정에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데(Datko and MacLachlan, 1968) 大麥種子에서도 이와같은 사실이 보고되고 있다(Nicholl and Paleg, 1933; Briggs, 1933; Cleland and McCombs, 1965).

저자는 이상의 여러 보고들을 감안하여, 大麥種子의 amylase 생성에 있어서의 GA와 inibole-3-acetic acid(IAA)의 상호관계를 핵산계사와 관련하여 밝혀보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료와 방법

大麥種子(水原 18호, *Hordeum sativum* Jess. var.)를 50% H_2SO_4 용액에 3시간 처리하여 외피를 용해한 후 흐르는 물에 충분히 씻고 횡단면분하여 有胚部는 버리고 無胚部만을 위하여 실험재료로 사용하였다. 이

것을 다시 0.2% bromine 용액으로 3분간 멸균하고 멸균종류수로 씻은 후 배양액(1mM acetate buffer, pH 5.0)을 담은 소형 삼각후라스크에 싣고 25°C에서 진탕하며 일정시간(0~24) 배양하였다. 실험에 사용된 hormone은 배양액에 포함시키고 GA는 10^{-6} M, IAA는 10^{-5} M의 농도가 되게 하였다.

2. Crude Amylase의 조제

일정시간 배양한 시료(1g half-seeds/4ml acetate buffer)를 2g의 석영사와 함께 4°C에서 마쇄한 후 1mM acetate buffer (pH 5.0)를 첨가하여 전체가 20ml되게 하였다.

이것을 1시간 진탕한 후 4°C에서 하루밤 방치한 다음 원심분리(3000rpm/15min)하여 상등액을 취하고 침전물은 다시 1g의 석영사와 함께 마쇄하여 원심분리하고 상등액을 위의 것과 합하여 crude amylase로 하였다.

3. DNA 및 RNA의 추출과 그 함량의 측정

배양중의 시료를(1g half-seeds/4ml acetate buffer) 일정시간마다 취하여 2g의 석영사와 함께 4°C에서 마쇄하고 0.1mM acetate buffer (pH 7.0)를 첨가하여 전체가 20ml되게 하였다.

이것을 1시간 진탕한 후 4°C에서 하루밤 방치하였다가 Schmidt-Thanhauser(1945) 변법으로 다음과 같이 추출하였다.

추출된 DNA의 deoxyribose는 phenylamine 법을 개량한 Burton 변법(1956)으로 측정하고 calf thymus DNA(Sigma)를 표준시약으로 사용하였다. RNA의 ribose는 Meijbaum 법(1939)에 의해 orcinol로서 측정하고 yeast RNA(Sigma)를 표준시약으로 하였다.

4. Soluble Protein의 측정

Crude amylase 용액중의 protein은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 bovine serum albumine(Sigma)을 표준시약으로 측정하였다.

5. Crude Amylase의 분획

10ml의 crude amylase를 평형상태를 이룬 Sephadex G-100 column(2×80cm)에 올리고 0.1M acetate buffer(pH 5.0)로 1ml/5min의 흐름속도로 1 tube마다 3ml씩 받았다.

5. Amylase 활성과 그에 미치는 여러 요인의 측정

1. Amylase 활성

Amylase의 효소활성은 DNSC 시약 사용법(1955)에 따라 maltose(Marck)를 표준시약으로 측정하였다.

2. 온도의 영향

10~90°C의 온도 범위에서 위의 amylase 활성 측정 방법으로 측정 비교하였다.

3. pH의 영향

pH 2.0~9.0의 범위에서 각각 amylase 활성을 측정 비교하였다.

4. 금속이온의 영향

반응에 사용할 acetate buffer에 Mn^{++} (0~10mM), Cu^{++} (0~5.0mM)와 Hg^{++} (0~2.5mM)의 염을 녹인 것으로 amylase 활성을 측정 비교하였다.

6. Amylase의 K_m 및 K_i 의 검증

1. Michaelis 상수(K_m)

Starch(CICA)를 acetate buffer에 녹여 여러 농도(0.02~0.2%)로 하고 amylase 측정법에 따라 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot(1934)로 K_m 값을 구하였다.

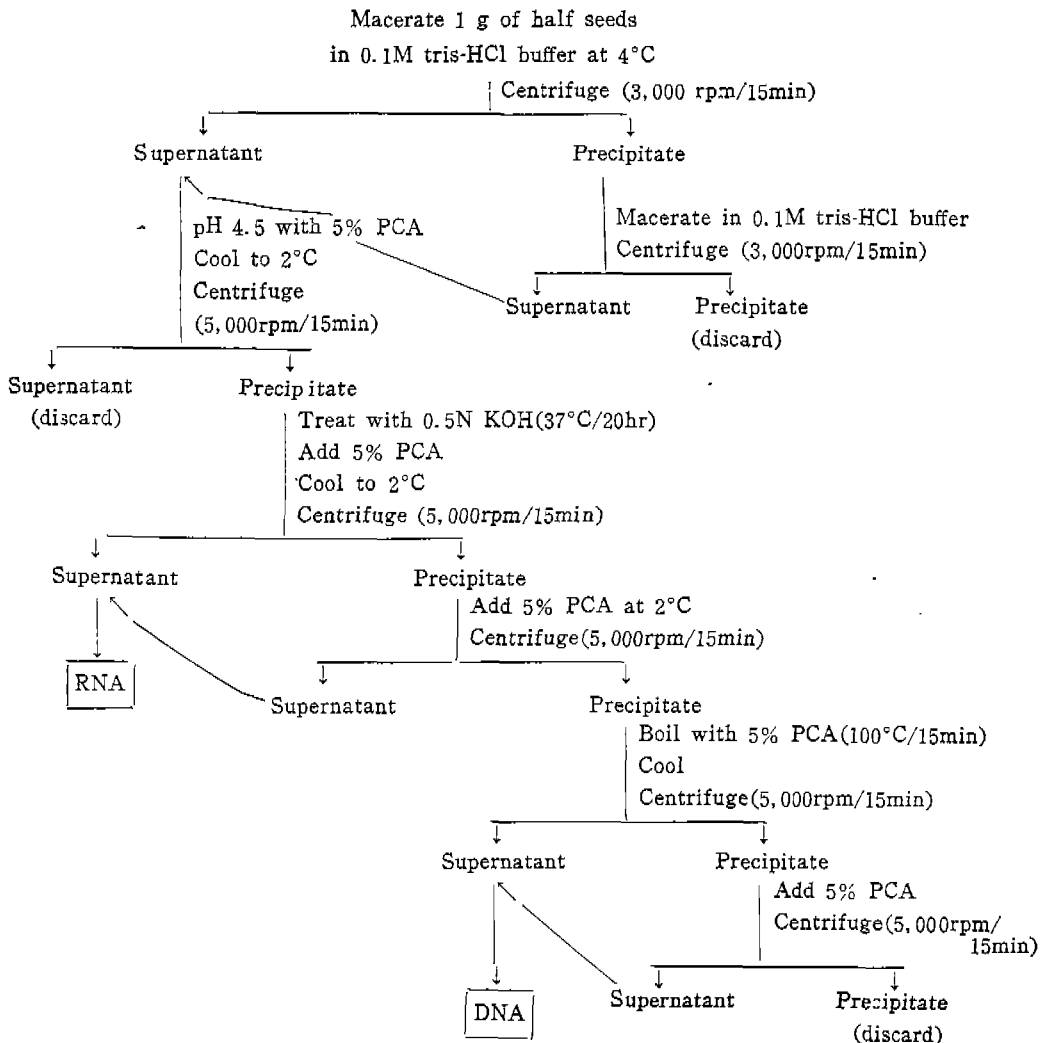
을 구하였다.

2. 저해 상수(K_i)

두 가지 starch 용액(1%, 2%)을 기질트 하고 효소 활성을 저해하는 금속이온(Cu^{++} , Hg^{++})이 여러 농도(0~2.5mM)로 포함된 acetate buffer를 써서 amylase 활성을 측정하고 Dixon 방법(1953)에 따라 각 금속이온의 효소에 대한 K_i 값을 구하였다.

7. Amylase 활성에 대한 GA와 IAA의 상호관계 검증

GA를 여러 농도(10^{-8} ~ $10^{-6}M$)로 배지에 포함시키고 IAA ($10^{-5}M$)의 첨가 유무에 따라 24시간 배양하여 각 실험구의 효소활성을 측정한후 Lineweaver-Burk plot로서 그 관계를 검증하였다.



결과 및 고찰

1. Amylase와 Protein 생성에 미치는 GA와 IAA의 효과

GA와 IAA로 처리한 無胚種子에서의 amylase나 protein의 생성은 배양 8시간 까지는 별한 촉진된 흔적이 없었으나 배양 24시간에서는 뚜렷한 촉진이 있었다(Table 1, 2 및 Fig 1, 2).

즉 GA 처리에 의한 amylase 생성은 배양 8시간 까지는 배양전과 거의 같았으나 배양 24시간에서는 배양전의 9배에 이르렀으며 24시간 배양의 control에 비하여서는 4배 정도에 이르렀다.

IAA 처리에서는 전반적으로 amylase 생성이 억제

Table 1. Amylase activities of embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C (units/g)

Treatment	Time of incubation, hrs				
	0	5	8	14	24
Control	21.60	20.40	24.80	33.75	47.20
GA(10 ⁻⁶ M)	21.60	22.50	23.20	83.75	192.80
IAA (10 ⁻⁵ M)	21.60	17.52	18.13	25.00	28.40
GA+IAA	21.60	16.25	20.63	26.25	149.60

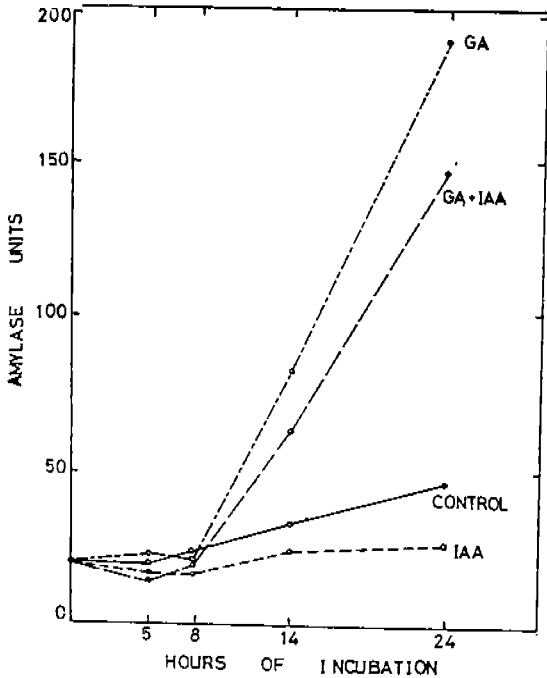


Fig. 1. Amylase synthesis in embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C.

된 경향을 띄고 있었으며 24시간 배양에서는 control의 약 40%를 억제받았다. GA와 IAA 동시처리에서는 24시간 배양에서 control 보다 거의 3배 가량 증가를 보였는데 이것은 GA 단독처리 때보다는 낮아서 IAA의 억제 효과가 작용한 것을 알 수 있었다.

Soluble protein의 생성에 대한 이들 hormone의 효과는 amylase 생성과 같은 경향을 나타내었다. GA 처리에 따른 amylase 생성의 촉진은 Paleg와 Varner (1964), Yomo (1960), Brigg (1963) 및 Chrispeels와 Varner(1967) 등이 보고한 바 있으며 Chrispeels와 Varner(1967)와 Filner 와 Varner (1967)는 GA를 첨

Table 2. Soluble protein contents of embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C(mg/g)

Treatment	Time of incubation, hrs				
	0	5	8	14	24
Control	10.91	11.38	11.07	11.12	11.36
GA(10 ⁻⁶ M)	10.91	11.16	11.52	15.27	19.78
IAA (10 ⁻⁵ M)	10.91	10.82	10.30	10.61	10.91
GA+IAA	10.91	11.05	11.09	11.67	12.22

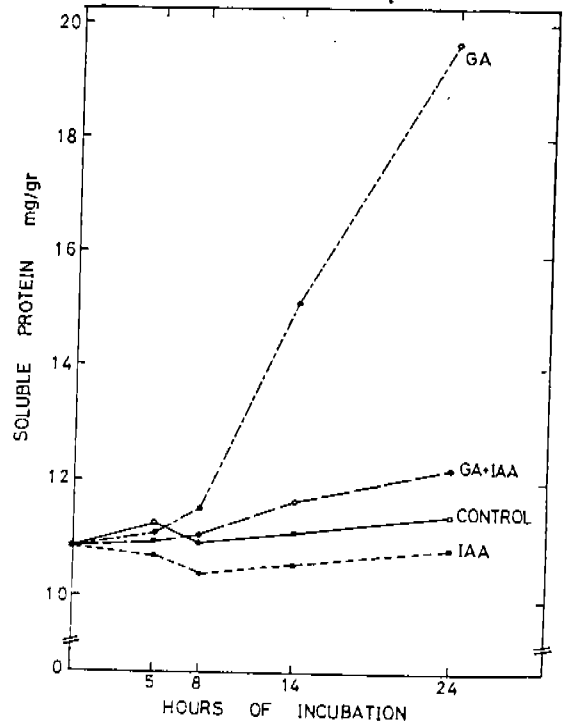


Fig. 2. Soluble protein synthesis in embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C.

하였을 때 8~10시간의 lag period를 거친 후에 α-amylase의 증가가 일어난다고 하였는데 본 실험에서는 배양 8시간까지 amylase 생성에 뚜렷한 변화가 없었음은 그들의 결과와 부합되는 것이었다. Boothby와 Vight(1962) 및 Khan과 Faust(1967)는 大麥種子에서 Matko과 Maclachlan(1968)은 *Pisum sativum* 種子에서 발아중의 amylase 생성이 IAA에 의해 억제된다고 보고하였으며, Nicholl과 Paleg(1963) 및 Cleland와 McCombs(1965)는 0.1μg/ml의 IAA 농도를 GA와 함께 처리하면 GA 효과 이상의 촉진효과를 나타낸다고 하였다. 그러나 10μg/ml 농도에서는 GA 효과에 별 영향이 없으며 그 이상 높은 농도에서는 amylolytic activity를 억제한다고 보고하였다.

본 실험에서는 생장촉진의 최적농도인 10⁻⁵M의 IAA를 처리하였는데 amylase 및 protein의 생성억제를 보였으며 GA와 IAA 동시처리에서 GA 단독처리보다 그 촉진효과가 적었던 것은 IAA 농도가 높았기 때문이라고 생각된다.

1. GA 및 IAA 처리에 따른 핵산함량의 변화

Table 3에서 보는 바와같이 DNA 함량은 hormone 처리의 유무를 막론하고 배양기간중 별 변화를 나타내지 않았다. RNA의 생성은 GA 처리에서는 촉진되었고 IAA 처리에서는 약간의 감소를 보였는데 두 horm-

one 동시처리에서는 control 보다 촉진되었으나 GA 단독일 때 보다는 그 정도가 낮았다. 특히 RNA는 배양 5시간에 벌써 생성증가를 보여 RNA의 생성이 amylase 생성에 선행되고 있음을 나타내었다.

Varner와 Chandra(1964)는 GA로서 촉진되는 amylase의 생성이 단백질 합성 저해제인 p-fluorophenylamine과 RNA 합성 저해제인 actinomycin D로 억제된다는 것을 지적하고 GA에 의한 大麥種子 amylase의 생성이 핵산대사와 관련된다고 시사하였다.

한편 Vigil과 Ruddat(1973)는 actinomycin D는 DNA-directed RNA 합성에 영향을 줄 뿐 아니라 rough endoplasmic reticulum의 형성에도 억제영향을 준다고 하였으며 Jones(1969)는 8~10시간의 lag period가 필요한 amylase 합성에 앞서서 rough endoplasmic reticulum의 형성촉진이 이루어진다고 보고하였다. 이러한 사실은 Evins와 Varner(1971)에 의해서도 확인되었다.

또한 Koehler와 Varner(1973)는 GA 처리 4시간후부터 ³²P의 phospholipid 전환이 증가한다고 하였고 Evins와 Varner(1972)는 GA가 polysome 형성을 촉진한다고 밝혔다. 또한 Collins 등(1972)은 GA에 의한 amylase의 증가는 GA가 endoplasmic reticulum attached ribosome의 형성과 endoplasmic membrane

Table 3. DNA contents of embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C(μg/g)

Treatment	Time of incubation, hrs				
	0	5	8	14	24
Control	102	105	103	102	103
GA(10 ⁻⁵ M)	102	107	104	102	104
IAA(10 ⁻⁵ M)	102	101	103	104	102
GA+IAA	102	102	105	103	103

Table 4. RNA contents of embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C (mg/g)

Treatment	Time of incubation, hrs				
	0	5	8	14	24
Control	2.40	2.04	2.10	2.09	2.03
GA(10 ⁻⁵ M)	2.40	2.51	2.83	4.16	5.72
IAA(10 ⁻⁵ M)	2.40	2.74	1.86	1.90	1.90
GA+IAA	2.40	2.18	2.50	3.17	4.40

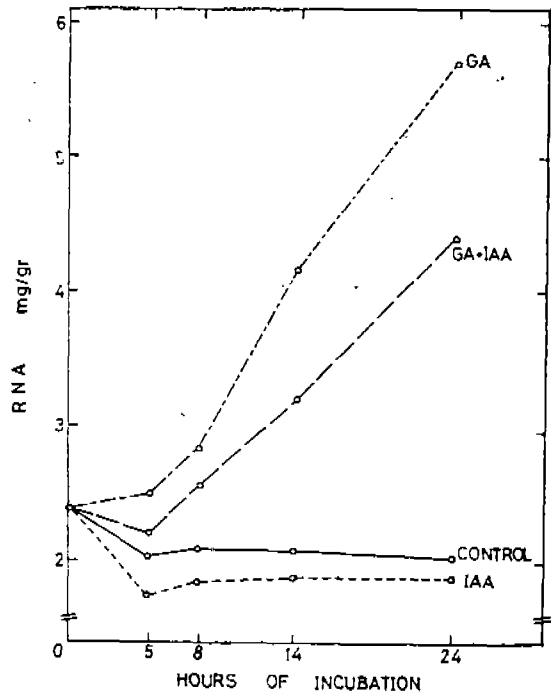


Fig. 3. RNA synthesis in embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA at 25°C.

의 phospholipid 합성 촉진의 두가지 면에 있어서의 촉진적인 역할로서 이루어진다고 하였다.

본 실험에서 GA와 IAA에 의하여 RNA 함량의 증가와 감소가 amylase 합성의 촉진과 억제에 선행되고 있음은 위의 여러 사실들과 견주어 이해할 수 있는 결과이었다.

Nitsan과 Lang(1965)은 lettuce epicotyl에서 GA로 촉진되는 생장이 5-fluorodeoxyuridine과 같은 DNA 합성 저해제에 의해 억제된다고 하였고 따라서 DNA 합성이 GA로 인하여 촉진된다고 추론하였다. 그러나 Haber 등 (1969)은 lettuce seed에서는 DNA 합성이 GA 효과로서 일어나는 생장을 관찰하므로써 상반된 의견을 발표하였다.

본 실험에서도 hormone 처리에 의한 DNA 함량 변화는 볼 수 없었는데 이는 Harber 등 (1969)의 실험결과와 부합되었다.

한편 Johri와 Varner(1968)는 hazel seed에서 GA에 의한 RNA 합성 증가는 DNA template activity의 고조에 따라 RNA polymerase 증가로서 수반되는 결과일 것이라고 추론하였다.

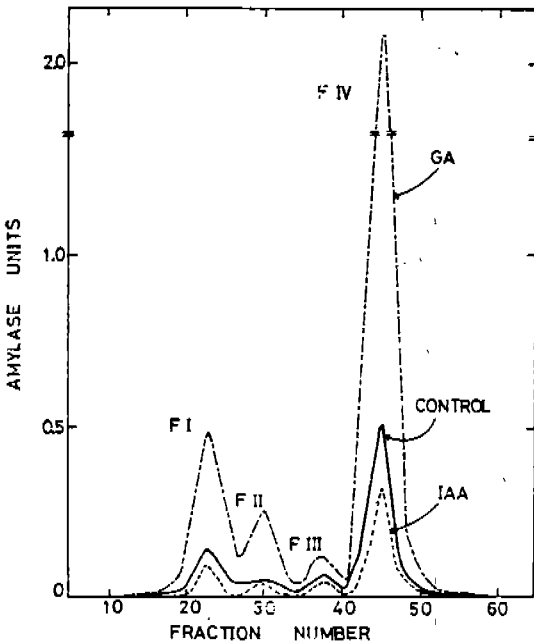


Fig. 4. Sephadex G-100 column elution patterns of amylase from 1 g embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA for 24 hrs at 25°C. Sample volume was 10 ml. The column was eluted with 1 mM acetate buffer, pH 5.0. Flow rates were 12 ml/hr and 3 ml fractions were collected.

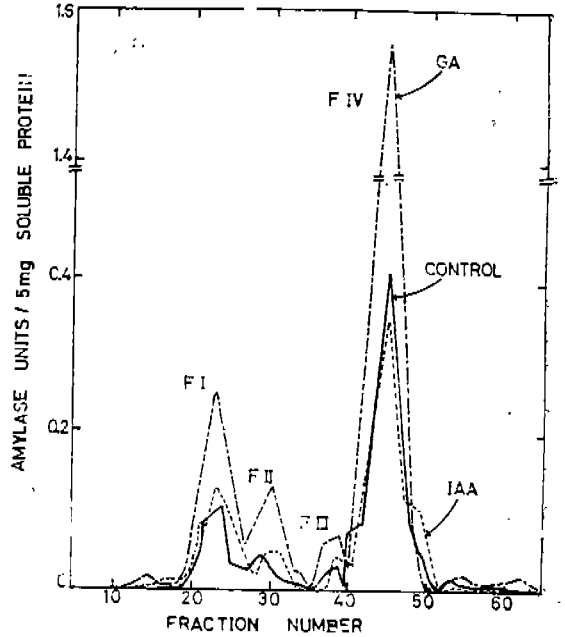


Fig. 5. Sephadex G-100 column elution patterns of amylase from 1 g embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA for 24 hrs at 25°C. Sample volume was adjusted containing 5 mg soluble protein. The column was eluted 1 mM acetate buffer, pH 5.0. Flow rates were 12 ml/hr and 3 ml fractions were collected.

3. Crude Amylase의 분획과 그 Pattern

GA에 의한 amylase 촉진과 IAA에 의한 억제에 따른 amylase 분자에 따라 어떻게 다른가를 살펴보기 위하여 crude amylase를 Sephadex G-100에 걸어 분획하였다.

Fig. 4 및 5에서 보는 바와 같이 모든 실험구에서 4개의 peak가 뚜렷하였는데 이것을 각각 fraction I, II, III, IV(FI, FII, FIII, FIV)로 하였다.

Fig. 4에서와 같이 분획하여 GA와 IAA 처리에 따른 생성 amylase의 각 fraction을 비교하여 본바 GA에 의한 촉진과 IAA에 의한 억제가 모든 fraction에서 뚜렷하였고 pattern은 거의 비슷하였다. 이러한 사실은 amylase 생성에 있어 GA의 촉진이나 IAA의 억제가 amylase fraction에 관계없이 동일한 효과를 나타내고 있음을 알 수 있게 하였다.

그러나 Fig. 5에서와 같이 soluble protein 함량을 일정하게 하여 분획하였을 때는 FIV에서 촉진과 억제 양상이 같았으나 FI에서는 crude amylase 기준의 결과는 차이가 있었다.

이것은 IAA 억제효과가 soluble protein의 분자종류에 따라 다른 영향을 주기 때문인 것으로 해석된다.

4. Crude Amylase와 그 Fraction(FI, FIV)의 효소화학적 성질

1. Michaelis 상수(K_m)

Table 5와 Fig. 7, 8에서 보는 바와같이 FI과 FIV의 K_m 값은 각각 6.18×10⁻⁴, 2.24×10⁻⁴ g/ml로 큰 차이가 있었다.

2. 저해상수(K_i)

Table 6과 Fig. 9 및 10에서 보는 바와 같이 crude amylase와 FI에서는 Cu⁺⁺(0~5.0mM)에 의하여 억제반응이 있었으나 FIV에서는 억제반응이 없었다. K_i에 있어서도 K_m과 마찬가지로 FI과 FIV는 각각 뚜렷한

Table 5. K_m values of crude amylase and its fractions from embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA for 24 hours at 25°C(g/ml)

Treatment	Amylase fraction		
	Crude	FI	FIV
Control	5.02×10 ⁻⁴	6.27×10 ⁻⁴	2.24×10 ⁻⁴
GA(10 ⁻⁶ M)	4.78×10 ⁻⁴	6.06×10 ⁻⁴	2.04×10 ⁻⁴
IAA(10 ⁻⁵ M)	5.28×10 ⁻⁴	6.20×10 ⁻⁴	2.44×10 ⁻⁴
Mean	5.03×10 ⁻⁴	6.18×10 ⁻⁴	2.24×10 ⁻⁴

차이를 나타내었다.

3. 온도, pH 및 금속이온의 영향

Table 7에서의 같이 최적온도는 hormone 처리나 amylase 구분에 상관 없이 모두 40°C로서 같았으나 70°C에서의 효소활성은 FI은 불안정, FIV는 안정하

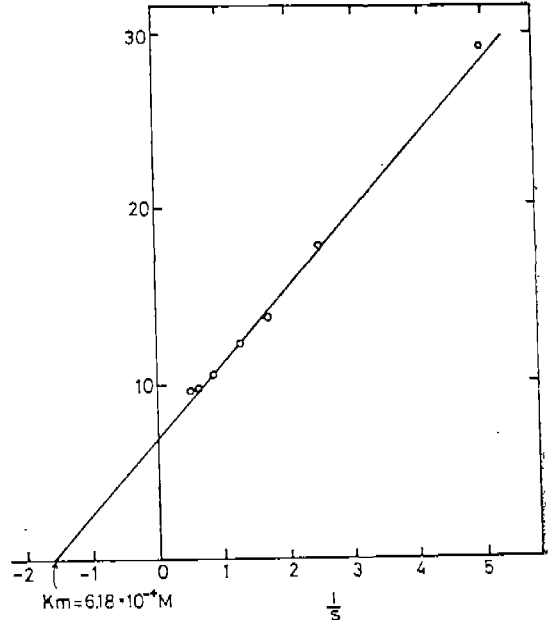


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of FI.

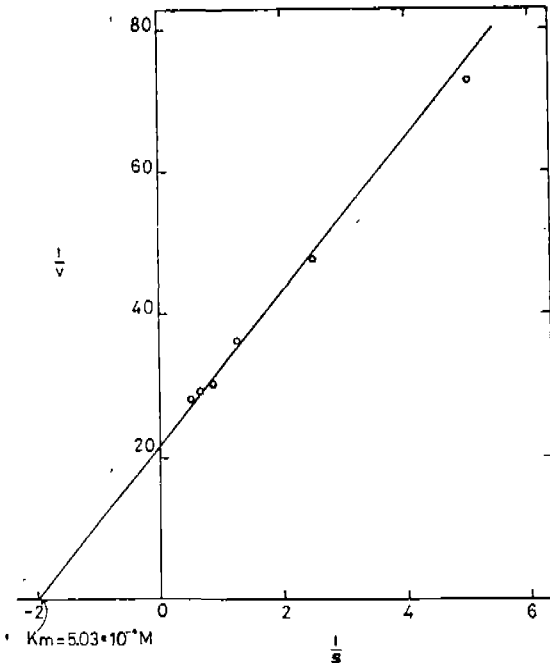


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot of crude amylase.

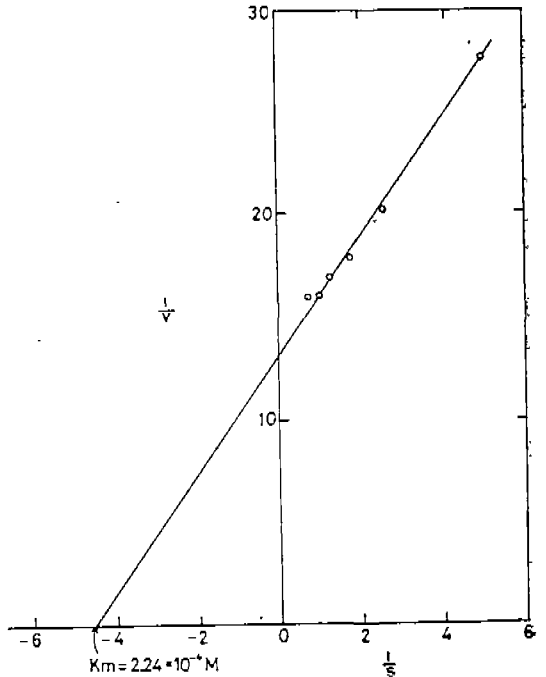


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of FIV.

Table 6. K_i values of crude amylase and its fractions from embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA for 24 hours at 25°C(mM)

Treat'ment	Amylase fraction		
	Crude	FI	FIV
Control	7.72×10^{-4}	1.27×10^{-4}	No inhibition
GA(10^{-5} M)	7.60×10^{-4}	1.25×10^{-4}	//
IAA(10^{-5} M)	7.59×10^{-4}	1.24×10^{-4}	//
Mean	7.64×10^{-4}	1.25×10^{-4}	//

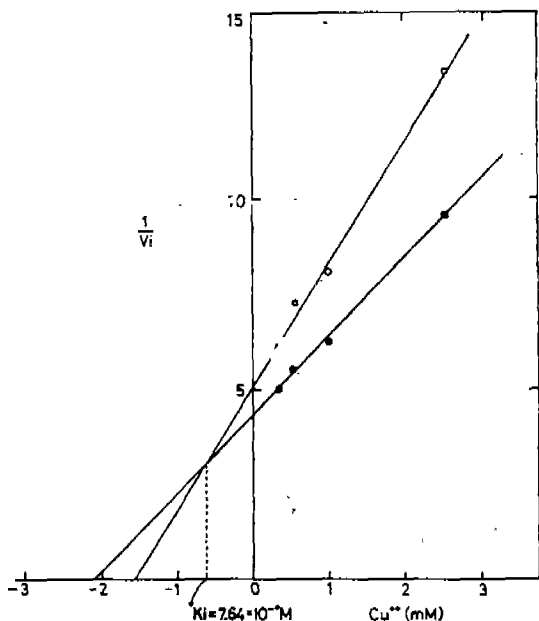


Fig. 9. Plot for the inhibition constant of Cu^{++} on the activities of crude amylase.

The substrates were 1% (○) and 2% (●) starch.

였다.

pH의 영향에서도 최적 pH는 별 차이가 없었으나 pH 3.5에서의 효소활성에는 차이가 있어서 FI은 안정, FIV는 불안정하였다.

금속이온에 대한 반응에서는 Mn^{++} 이 모든 amylase에 촉진적이었으나 Cu^{++} 와 Hg^{++} 는 FI에서 억제효과를 나타내었고 FIV에서는 촉진이나 억제가 없었다.

결국 FI과 FIV는 K_m , K_i , 온도, pH에 대한 안정성, 금속이온의 영향 등에서 차이가 있어 효소화학적 성질이 다르다는 것을 나타내었다.

Harris(1962), Kneen등 (1943)은 온도에 대한 성질을, Meyer (1951)는 온도와 pH에 대한 차이를 大麥種

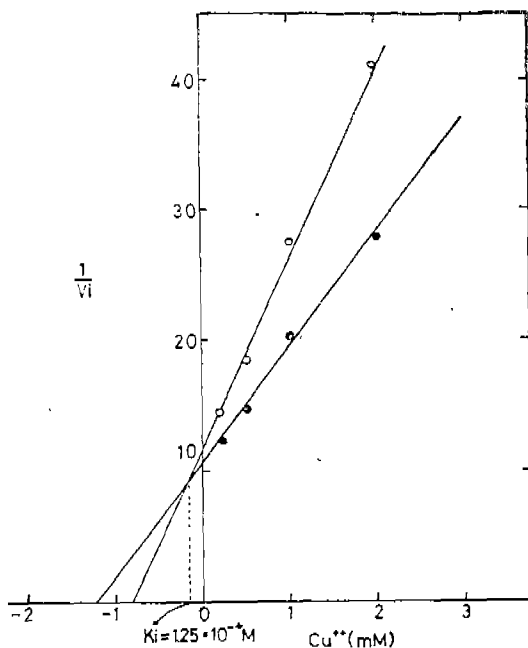


Fig. 10. Plot for the inhibition constant of Cu^{++} on the activities of FI. The substrate concentrations were 1% (○) and 2% (●) starch.

자의 α - 및 β -amylase에 대하여 조사하였다.

또한 Harris(1962), Frydenberg와 Nielsen(1966)은 大麥種子의 amylase isozymes을 분획한 바 있는데 α -amylase는 Ag^{++} , Cu^{++} , Hg^{++} 와 같은 금속이온의 영향을 받지 않으나 β -amylase는 그 활성억제를 받는다고 하였다.

이들 보문과 본 실험에서의 온도, pH 및 금속이온에 대한 반응으로 보아 FI은 β -amylase, FIV는 α -amylase인 것으로 생각된다.

한편 Swimmer와 Ball(1949)은 大麥種子의 α -amylase를 정제하고 그 분자량이 60,000이라고 하였으나 Fisher와 Stein(1960)은 약 50,000, Bilderback(1974)은 45,000이라고 발표하였다. β -Amylase는 Waldschmidt-Leitz 등 (1964)에 의해 93,000으로 계산되었으나 Cooper 와 Pollock(1957)은 15,20,40,60,70 및 80×10^3 의 여러 종류로 구성되어 있다고 하였다.

Bilderback(1974)도 86,000, 180,000, 400,000 등의 여러 종류로 구분하였는데 이러한 β -amylase 분자량의 다양성은 dimer, tetramer, octamer로 존재하기 때문이라고 하였다.

이러한 사실과 더불어 볼 때 大麥種子의 β -amylase는 α -amylase 보다 대체로 분자량이 큰 상태로 존재하고 있음을 알 수 있는데 본 실험에서도 효소화학적

Table 7. Some biochemical properties of crude amylase and its fractions of embryoless barley half-seeds incubated with GA and IAA for 24 hours at 25°C

Amylase		Temperature		pH		Response to ions of heavy metals		
		Optimum Temp. (C)	Sensitivity to 70°C	Optimum pH	Sensitivity to pH 3.5	Mn ⁺⁺	Cu ⁺⁺	Hg ⁺⁺
Control	Crude	40	—	6.0	—	activated	inhibited	inhibited
	FI	40	labile	5.0	stable	"	"	"
	FIV	40	stable	6.0	labile	"	no sensitive	no sensitive
GA (10 ⁻⁶ M)	Crude	40	—	5.0	—	activated	inhibited	inhibited
	FI	40	labile	5.0	stable	"	"	"
	FIV	40	stable	6.0	labile	"	no sensitive	no sensitive
IAA (10 ⁻⁵ M)	Crude	40	—	5.0	—	activated	inhibited	inhibited
	FI	40	labile	5.0	stable	"	"	"
	FIV	40	stable	6.0	labile	"	no sensitive	no sensitive

성질에 있어서 β-amylase로 생각되는 FI이 α-amylase로 보여지는 FIV 보다 gel filtration을 먼저 통과하여 분자량이 컸음을 나타내었다.

5. Amylase 생성에 대한 GA 및 IAA의 상호관계

GA에 의한 amylase의 생성촉진이 IAA에 의하여 억제된 것으로 나타났는데 실제 IAA는 GA에 대하여 어떤 관계로서 작용하였는지를 알아 보았다.

Khan과 Faust(1967)는 2-chloroethyl trimethylammonium chloride(CCC)와 같은 growth retardant도 IAA와 마찬가지로 大麥種子에서 amylase 생성을 억제하여 여기에 IAA를 첨가하면 IAA나 retardant

Table 8. Effect of an inhibitory concentration of IAA(10⁻⁵M) on the linear amylase activity by embryoless barley half-seeds incubated with the concentration range of 10⁻⁸~10⁻⁶M GA for 24 hours at 25°C

Treatment GA, M	Activity of amylase(units/g)	
	-IAA(10 ⁻⁵ M)	+IAA(10 ⁻⁵ M)
1×10 ⁻⁸	9.2	6.8
1×10 ⁻⁷	85.6	56.0
2×10 ⁻⁷	111.2	90.4
4×10 ⁻⁷	154.0	125.2
6×10 ⁻⁷	186.0	144.4
8×10 ⁻⁷	205.2	170.4
1×10 ⁻⁶	210.4	177.6

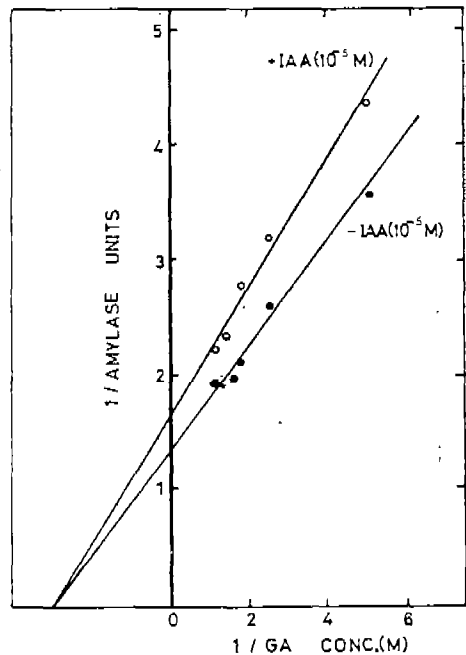


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot, showing effect of an inhibitory concentration of IAA(10⁻⁵M) on the linear amylase activity by embryoless barley half-seeds incubated with the concentration range of 10⁻⁸~10⁻⁶M GA for 24 hours at 25°C.

단독처리 때 보다 더 억제한다고 하였는데 이러한 retardant의 amylase 생성억제는 첨가 GA에 의하여서는 회복되는 것으로 보아 amylase 생성촉진에 관계하는 GA 생성을 근본적으로 억제함으로써 이루어진다고 하였다.

Kaufman 등 (1969)은 *Avena* 줄기의 성장에 관한 실험에서 IAA는 GA와 관계없이 세포성장 mechanism에서 GA의 작용을 제어하는 다른 부분에 부분적으로 작용함으로써 억제효과를 나타낸다고 하였다.

본 실험에서는 amylase 생성을 촉진하는 GA의 효과와 이를 억제하는 IAA의 작용을 조사하여 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot 하였을 때 Fig. 6에서 보는 바와 같이 비경쟁적인 억제(non-competitive)의 결과가 되었다. 첨가해 준 GA 농도를 높여준에 따라 IAA의 억제효과가 일부 회복되었지만 GA의 촉진 효과에는 달하지 못하였다.

결국 GA와 IAA의 생체내에서의 작용점이 다르다고 생각할 수 있었다.

적 요

大麥種子의 amylase 생성에 미치는 GA와 IAA의 영향을 알아보기 위하여 GA($10^{-6}M$)와 IAA($10^{-5}M$)를 단독 또는 동시투여하여 핵산생성과 아울러 amylase의 생성 및 그 fraction의 변화를 조사 검토하였다.

실험결과 다음과 같은 사실들을 알 수 있었다.

1. GA와 IAA 처리에 따른 DNA 함량 변화는 없었다.

2. RNA는 GA에 의하여 생성이 촉진되었고 IAA에 의하여서는 억제되었다.

3. Amylase는 배양 8시간 후부터 생성되기 시작하였는데 그 생성은 GA에 의하여 촉진되었고 IAA에 의하여 억제되었다.

4. RNA 생성은 배양 5시간에 이미 시작되어 amylase 생성의 시작보다 앞서고 있었다.

5. Amylase 생성의 GA에 의한 촉진과 IAA에 의한 억제는 RNA 생성의 촉진과 억제를 통하여 이루어진다고 생각되었다.

6. Crude amylase는 다시 fraction I, II, III, IV로 분획할 수 있었으며 이들은 Km 값, Ki 값, 온도, pH, 금속이온 등에 대한 반응에서 효소화학적 성질을 달리하고 있었다. 그리고 이들의 효소화학적 성질로 미루어 FI는 β -amylase, FIV는 α -amylase인 것으로 생각되었다.

7. GA와 IAA에 의한 amylase 생성의 촉진과 억제는 모든 fraction에 걸쳐서 균등하게 있었는데 soluble

protein 당 amylase 양으로 보았을 때 IAA의 억제효과는 FIV에서만 있었고 FI에서는 뚜렷하지 않았다.

8. Amylase 생성에 있어 억제적인 IAA와 촉진적인 GA의 관계는 비경쟁적이어서 이들 hormone의 세포내에서의 작용점이 다르다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Bernfeld, P., S.P. Colowick, and N.O. Kaplan. 1955. *Methods in enzymology*, Academic Press, P.149, New York.
- Bilderback, D.E. 1974. Amylase from aleurone layers and starch endosperm of barley seeds. *Plant Physiol.* 53: 480-484.
- Boothby, D. and S.T.C. Wright. 1962. Effects of kine-tin and other plant growth regulators on starch degradation. *Nature* 196: 389-390.
- Briggs, D.E. 1963. Biochemistry of barley germination: action of gibberellic acid on barley germination: action of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing* 69: 13-19.
- Burton, K. 1956. *Biochem. J.* 62: 315 (From 核酸の一般的分離・定量法, 1973, 東京大學出版會, 東京).
- Chrispeels, M. J. and J. E. Varner. 1967. Gibberellic acid enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 42: 398-406.
- Chrispeels, M.J. and J.E. Varner. 1967. Hormonal control of enzyme synthesis: on the mode of action of gibberellic acid and abscisic in aleurone layers of barley. *Ibid.* 42: 1008-1016.
- Cleland, R. and N. McCombs. 1965. Gibberellic acid: action in barley endosperm-does not require endogenous auxin. *Science* 150: 497-498.
- Collins, G.G., C.F. Jenner, and L.G. Paleg. 1972. The metabolism of soluble nucleotides in wheat aleurone layers treated with gibberellic acid. *Plant Physiol.* 49: 404-410.
- Cooper, A. H. and J. R. A. Pollock. 1957. Enzymes of barley and malt. I. Electrophoretic separation of the α -amylase of malt syrup. *J. Inst. Brew.* 63: 24-28.
- Datko, A.H. and G.A. MacLachlan. 1968. Indoleacetic acid and the synthesis of glucanases and poetic enzymes. *Plant Physiol.* 43: 735-742.
- Dixon, M. 1953. *Biochem. J.* 55: 170 (From Quantitative Problems in Biochemistry, 1965, The Williams and Wilkins Co., Baltimore).
- Evins, W.H. and J.E. Varner. 1971. Hormone-controlled synthesis of endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 1631-1633.
- Evins, W.H. and J.E. Varner. 1972. Hormonal control of polyribosome formation in barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 49: 348-352.
- Filner, P. and J.E. Varner. 1967. A test for *de novo* synthesis of enzymes: density labeling with $H_2^{18}O$ of barley α -amylase induced by gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 1520-1526.
- Fischer, E. H. and E.A. Stein. 1960. *The Enzymes*. Academic Press pp. 313-343, New York.

- Frydberg, O. and G. Nielsen. 1966. Amylase isozymes in germinating barley seeds. *Hereditas* 54 : 123—139.
- Harter, A.H., D.E. Foard, and S.W. Ferdue. 1969. Actions of gibberellic and abscisic acid on lettuce seed germination without actions on nuclear DNA synthesis. *Plant Physiol.* 44 : 463—467.
- Harris, G. 1962. Barley and Malt, Academic Press pp. 583—694, New York.
- Jacobsen, J.V. and J.E. Varner. 1967. Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley. *Plant Physiol.* 42 : 1596—1600.
- Johri, M. M. and J. E. Varner. 1968. Enhancement of RNA-synthesis in isolated pea nuclei by gibberellic acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 59 : 269—276.
- Jones, R.L. 1969. Gibberellic acid and the fine structure of barley aleurone cells. I. Changes during the lag phase of α -amylase synthesis. *Planta* 87 : 119—133.
- Kaufman, P.B., L.B. Petering, and P.A. Adams. 1969. Regulation of growth and cellular differentiation in developing *Avena* internodes by gibberellic acid and indole-3-acetic acid. *Amer. J. Bot.* 56 : 918—927.
- Khan, A.A. and M.A. Faust. 1967. Effect of growth retardants on α -amylase production in germinating barley seed. *Physiol. Plant.* 20 : 673—681.
- Kneen, E., R. M. Sandstedt, and C.M. Hollentbeck. 1943. The differential stability of the malt amylases. Separation of the alpha and beta components. *Cereal. Chem.* 20 : 399—423.
- Koehler, D.E. and J.E. Varner. 1973. Hormonal control of orthophosphate incorporation into phospholipids of barley aleurone layers. *Plant Physiol.* 52 : 208—214.
- Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. *J. Am. Chem. Soc.* 56 : 658 (From Quantitative Problems in Biochemistry, 1965, The Williams and Wilkins Co., Baltimore).
- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.L. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275.
- MacLeod, A.M. and A.S. Miller. 1962. Effect of gibberellic acid on barley endosperm. *J. Inst. Brewing* 68 : 322—332.
- MacLeod, A.M. and G.H. Falmer. 1966. The embryo of barley in relation to modification of the endosperm. *J. Inst. Brewing* 72 : 580—589.
- Meijbaum, W. 1939. *Z. Physiol. Chem.* 258 : 117 (From 核酸の一般の分離・定量法, 1973, 東京大學出版會, 東京).
- Meyer, K.H., E.H. Fisher, and A. Figuet. 1951. Purification et cristallisation de la α -amylase de malt. Sur les enzymes amylolytiques XVI. *Helv. Chim. Acta* 34 : 316—324.
- Momotani, Y. and J. Kato. 1966. Isozymes of α -amylase induced by gibberellic acid in embryo-less grains of barley. *Plant Physiol.* 41 : 1395—1396.
- Nicholls, P.B. and L.G. Paleg. 1963. A barley endosperm bioassay for gibberellins. *Nature* 199 : 823—824.
- Nishitai Y., N. Mugibayashi, M. Katae, and Y. Yoshida. 1958. Malt amylase. II. Barley zymogen amylase. *Hyogonaka Daigaku Kenkyu Hokoku* 3 : 123—126.
- Nitsan, J. and A. Lang. 1965. Inhibition of cell division and cell elongation in higher plants by inhibitors of DNA synthesis. *Devel. Biol.* 12 : 358—376.
- Paleg, L. G. 1964. Physiological effects of gibberellic acid I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm. *Plant Physiol.* 35 : 293—299.
- Paleg, L.G. 1964. Cellular localization of the gibberellic acid-induced response of barley endosperm. *Regulateurs Naturels de la Croissance Vegetale, C.R. C.* pp. 303—317, Paris.
- Payen, A. and J. Ferzog. 1833. *Ann. Chi. et Phys.* 53 : 73 (From The Enzymes, 1966, Academic Press, New York).
- Radley, M. 1967. Site of production of gibberellin-like substances in germinating barley embryo. *Planta* 75 : 164—171.
- Schmidt, G. and S. J. Thanhauser. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 161 : 83—89.
- Swimmer, S. and A.K. Balls. 1949. Isolation and properties of crystalline α -amylase from germinated barley. *J. Biol. Chem.* 179 : 1063—1074.
- Varner, J.E. 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of α -amylase in barley endosperm. *Plant Physiol.* 39 : 413—415.
- Varner, J.E. and G.R. Chandra. 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 52 : 100—106.
- Vigil, E.L. and M. Ruddat. 1973. Ultrastructural change in barley aleurone cells following treatment with gibberellic acid. *Plant Physiol.* 51 : 549—558.
- Waldschmidt-Leitz, E., L. Grafinger, and M. Westphal. 1964. Zur Struktur der β -Amylase aus Gerste und Malz. *Zeit. f. Phys. Chem.* 339 : 36—41.
- Yomo, H. 1960. Studies on the amylase activating substance. V. Purification of the amylase activating substance in barley malt. *Hakko Kyokaiishi* 18 : 603—606.
- Yomo, H., M. Ikemiya, and H. Katagina. 1961. Zymogen amylases. *Hakko Kogaku Zasshi* 39 : 203—208.
- Yomo, H. and H. Iinuma. 1966. Production of gibberellin-like substance in embryo of barley during germination. *Planta* 71 : 113—118.
- Zwar, J.A. and J.V. Jacobsen. 1972. Plant growth substances. Springer-Verlag pp. 359—364, Heidelberg.

(1977년 5월 9일 접수)