

담배 엽록체에서 제한효소 저해물의 분리

조 영 동 · 심 성 태

연세대학교 이과대학 생화학과

Isolation of endonuclease inhibitor from tobacco chloroplast

Young-Dong Cho, Sung-Tae Shim

Dept. of Biochemistry, College of Science, Yonsei University

(Received Apr. 13, 1988)

ABSTRACT

Endonuclease inhibitor was isolated from the chloroplast of the leaves of tobacco, Burley 21 and NC 82. The inhibitory effect on the activities of endonucleases including BamH1 was lost by the addition of trypsin or heat treatment. However, the treatment of α -amylase was unconcerned in the inhibitory effect. The endonuclease inhibitor was found to be a monomeric protein that plays a vital role for protection of tobacco chloroplast DNA from endonuclease action.

이 연구결과는 1985년도 문교부 국비해외과견연구 지원에 의한 것임.

(미국 University of Minnesota, 1985-1986)

서 론

Correus와 Bauer가 고등식물의 엽록체에 영향을 주는 돌연변이의 표현형이 멘델의 유전법칙을 따르지 않고 유전된다는 것을 확인하고 이를 세포질 유전이라 하였다. 따라서 엽록체 자체 내에 독특한 유전물질이 존재할 것으로 추측하였고 그 후 많은 연구자들에 의해 엽록체가 미토콘드리아와 마찬가지로 완전한 유전기관을 갖추고 있다고 밝혀졌다.

많은 미생물에는 외부의 DNA로부터 자신의 DNA를 보호하기 위한 restriction modification system을 갖고 있으며, wild type T4 phage DNA에는 cytosine이 glycosylated-hydroxymethyl cytosine으로 치환되어 제한효소에 의해 절단되지 않는다고 보고되었다^{2,3)}. 그러나 green algae인 *C. reinhardtii* mutant cell에 methylated cytosine의 변형된 염기가 존재한다고 보고만 있을 뿐⁴⁾ 모든 엽록체 DNA에는 자신의 DNA를 보호하기 위한 방어 수단으로 변형된 염기가 존재하지 않음이 보고되었다. 많은 연구자들은 Typell 제한효소를 이용하여 옥수수, 시금치, 유글레나, 담배, 대두에서 엽록체의 physical map을 만들었다^{5,6)}. Rochaix⁷⁾는 *C. reinhardtii* 엽록체 DNA를 분리하는 과정에서 제한효소 활성을 억제하는 물질이 DNA의 ethanol 침전물에 섞여 있음을 보고하였고, Sklar¹⁴⁾는 *Chlamydomonas reinhardtii*로부터 TATA 특정 염기 서열을 인식하는 Cre 1 제한효소를 정제하는 과정에서 Cre 1 제한효소 활성을 억제하는 억제물질의 존재를 보고하였다.

동물, 식물 그리고 미생물에서 leupeptin, pepstatin, chymostatin과 같은 protease inhibitor, cytochrome oxidase inhibitor와 mitosis를 방해하는 chalome과 같은 inhibitor protein들이 많이 보고되었다¹⁶⁾. 생물 세포에 존재하는 protease inhibitor pro-

tein들이 동물과 미생물에서 많이 발견되었다^{17,18)}. 지금까지 식물에서 발견된 대부분의 protease inhibitor protein들은 proteolytic modification과 세포 내에서 단백질 분해의 억제 등과 연관되어 protein degradation을 조절한다는 측면에서 많은 연구가 진행되어 왔다.

최근에는 inhibitor protein이 식물의 자기 방어 수단 가능성과 inhibitor protein들의 상호 연관관계 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이런 protease inhibitor protein과 같은 또 하나의 자신의 DNA를 보호하는 방어 수단을 밝힐 수 있는 좋은 소재가 될 것이라 사료된다.

고등식물로부터 순수한 엽록체 DNA만을 분리한다는 것은 상당히 어려운 문제이다. 왜냐하면 세포내 존재하는 chromosomal DNA와 미토콘드리아 DNA가 섞이게 되는데 이들 DNA의 비중은 서로 유사하기 때문에 순수한 엽록체 DNA를 얻기 위해서는 CsCl equilibrium density gradient를 사용해 장시간 초 원심분리하여야만 한다. 따라서 본 연구에서는 Rocha와 Ting(7) 방법에 의해 percoll gradient로 intact 엽록체와 broken 엽록체를 분리하여 chromosomal DNA와 미토콘드리아 DNA가 섞이지 않은 엽록체를 분리하였다. 제한효소의 반응을 억제하는 물질은 몇가지 알려진 바가 있고¹⁶⁾, 이러한 물질의 오염 가능성을 충분히 검토하고, 효소처리에 의한 방법으로 제한효소 활성 억제물질의 본질을 이해하기 위한 실험을 수행하였으며, 분리한 물질의 분자량 결정과 제한효소 활성의 억제 유무, trypsin, α -amylase 및 열처리 후에도 억제작용 여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험식물

엽록체 DNA를 분리하기 위해 사용된 담배

(Burley 21, NC 82 황색종) 잎은 7월경 담배밭에서 수확한 것으로서 푸른 잎으로만 골라 흐르는 물로 계속 세척하여, 물기를 제거한 후 -40°C 에 보관하여 사용하였다.

2. Intact 엽록체 분리

-40°C 에 보관한 담배잎 100 g을 1cm의 크기로 자른 후 350 ml의 완충용액 A(0.33M mannitol, 50mM Tris-HCl(pH 7.8), 2mM EDTA, 0.1mM MSH, 0.1% BSA(defatted fraction V))를 넣은 후, 미리 냉각시켜 놓은 가정용 믹서에다 넣고 세포내의 핵이 되도록 손상을 적게 입게 가능한 한 낮은 속도로 5초씩 5회 균일화하였다. 균일화된 액은 여섯 겹의 가제로 여과하였다. Whole cell, cell debris, 핵등을 제거하기 위해 100 xg에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 모았다. 이 상층액을 800 xg에서 15분간 원심분리하여 crude 엽록체 침전물을 얻고, 이 침전물은 15 ml의 완충용액 A에 녹인 후 DNase I(45 $\mu\text{g/ml}$)과 MgCl_2 를 가하여 10mM이 되게 하였다. 이것을 0°C 에서 45분간 반응시켰다. 반응후 여기에 40 ml의 완충용액 B(0.3M sucrose, 50mM Tris-HCl(pH 7.8), 20mM EDTA)를 가하여 1500 xg에서 20분간 원심분리하였다. 이 과정을 3회이상 반복해서 충분히 세척해 주었다. 이렇게 세척된 엽록체를 9.8 ml의 완충용액 A에 녹여 percoll gradient로 intact 엽록체 DNA를 분리하였다.

Intact 엽록체를 얻기 위해 Walbot⁵⁾와 Morgenthaler⁶⁾의 방법을 참조하여 밀도의 차이로 분리하였다. 이미 준비한 9%(V/V), 20%, 39%, 57% percoll 용액을 11 ml의 nitrocellulose tube에 각각 2.5 ml, 3.5 ml, 3.0 ml, 1 ml씩 넣어 단계적인 밀도구배를 만들었다. 위에서 얻은 엽록체를 tube 당 1.3 ml(약 110 μg 의 chlorophyll 함유)를 조심스럽게 loading 한 후, 4°C 에서 Hitachi high speed swing bucket rotor를 사용하여 2,500 xg로 8분간 원심분리

하였다. 층이 형성되면 조심스럽게 각 층을 분리하여 모았다. 분리한 각 층을 2배 부피의 완충용액 B를 가하여 1,500 xg에서 15분간 원심분리하여 percoll 용액을 제거하였다. 다시 완충용액 B에 녹여 3회이상 되풀이 하여 세척하였다. 세척한 각 층을 3.5 ml의 완충용액 C(50mM Tris-HCl(pH 7.8), 20mM EDTA)에 녹여 -40°C 에 얼려서 보관하였다가 DNA를 분리하는데 사용하였다.

Percoll step gradient centrifugation에 의해 분리한 각 층의 확인 및 순도는 광학현미경에 의한 관찰과 marker enzyme 활성 측정^{8,9)}, 엽록소 정량¹¹⁾에 의했다.

3. 제한효소들의 활성을 억제하는 물질의 분리

Kolodner와 Tewari, Hermann¹⁰⁾ 등의 방법을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 앞에서 얻은 원형상태의 엽록체 침전물을 3.5 ml의 완충용액 C에 녹이고 10% sodium lauryl sarcosine을 최종농도가 2%되게 가한 후 55°C 에서 5분간 방치 후, pronase(120 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하고 37°C 에서 50분간 반응시켰다. 이 엽록체 lysate에 phenol, chloroform, ether로 차례로 추출하였다.

엽록체 DNA를 추출하는 과정에서, DNA와 함께 ethanol 침전되는 제한효소 활성 억제물질을 분리하고자 DEAE sephacel column chromatography¹¹⁾를 사용하였다. 60mM NaCl을 함유하는 TE 완충용액(10mM Tris-HCl(pH 7.8), 1mM EDTA)으로 DEAE sephacel을 세척하여 pH가 7.8이 되도록 평형시켰다. 0.6M NaCl을 함유한 TE 완충용액, TE 완충용액, 0.1M NaCl을 함유한 TE 완충용액을 차례로 흘려보냈다. TEN 완충용액에 녹여있는 DNA를 loading하고 그 다음 0.3M NaCl을 함유한 TE 완충용액, 0.6M NaCl을 함유한 TE 완충용액으로 용출하여 받았다.

각 분획은 DNA띠의 확인 및, 각 분획을 첨가

한 여러가지 기질 DNA에 대한 제한효소들의 활성 억제 여부를 조사하는 데 사용하였다.

4. 제한효소 활성 측정

λ DNA 0.5 μ g, 10x 반응완충용액 (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol) 2 μ l, 그리고 DEAE sephacel column에서 흡착되지 않고 나오는 물질 (일종의 억제물질)을 넣어 최종농도가 0%, 0.3%, 0.5%, 0.9%, 1.2%, 1.5%, 2%되게 하여 제한효소들이 각각의 농도에서 작용하는지의 여부를 0.7% agarose gel로 전기이동하여 절단되는 양상을 기준으로 제한효소 활성 억제 여부를 판단하였다. 같은 방법으로 pBR322 DNA(1 μ g), pUC9DNA(1 μ g), Charon4DNA(2 μ g)에 대한 BamHI의 효소 활성을 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

5. Trypsin 처리에 따른 변화

DEAE sephacel column에 흡착되지 않고 나온 분획의 침전물에 trypsin 300 μ g(4,000 units), 10x 반응완충용액 (25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM CaCl₂) 50 μ l을 넣어주고 증류수로 반응액이 500 μ l 되게 채워주었다. 반응액을 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 phenol, chloroform으로 추출하여 trypsin의 작용을 정지시킨 후 2.5배의 차가운 ethanol로 -40 $^{\circ}$ C에서 침전시켜 microcentrifuge로 수확하여 원래 침전물의 부피대로 녹여 최종농도 0%, 0.3%, 0.5%, 0.9%, 1.2%, 1.5%되게, λ DNA (0.5 μ g)과 pBR322DNA(1 μ g)을 기질로 제한효소 활성 억제 여부를 관찰하였다. 이때 반응액에 남아 있는 trypsin을 제거하기 위해 사용된 phenol, chloroform추출과정에서 억제물질의 손실을 알아 보기위해, 이 억제물질만을 같은 과정을 거쳐 phenol, chloroform에 의한 추출 회수율을 조사하였다.

6. α -amylase 처리에 따른 변화

α -amylase의 농도가 1,000 units/ml, Cl의 최종농도가 10mM이 되도록 CaCl₂를 가하고, DEAE sephacel column에 흡착되지 않고 나온 분획의 침전물과 함께 반응시킨 후 같은 방법으로 제한효소 활성 억제 여부를 관찰하였다.

7. 열처리에 따른 변화

최종농도가 0%, 0.3%, 0.5%, 0.9%, 1.2%, 1.5%가 되도록 제한효소 활성 억제물질을 넣고 10x 반응완충용액 2 μ l를 넣은 시험관을 잘 막은 후 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하였다. 여기에 λ DNA(0.5 μ g)과 BamHI 2 μ l(4 units)를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨 후 0.7% agarose gel 상에서 전기이동하여 잘라진 띠를 확인하였다. 마찬가지로 pBR322 DNA를 기질로 제한효소 BamHI에 의한 억제 여부도 위와 동일한 방법으로 관찰하였다.

8. Disc polyacrylamide gel electrophoresis

앞서 DEAE sephacel column을 이용하여 분리한 제한효소 억제물질을 모아서 Laemmli¹²⁾ 등의 방법으로 전기이동하였다. 건조한 gel에 나타난 띠로 제한효소 억제물질을 확인하였다.

9. SDS polyacrylamide gel electrophoresis

앞서 분리한 제한효소 억제물질과 0.0625M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% B-PB를 혼합한 변성시약을 20-30 μ l 가한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 단백질을 완전히 변성시켰다. 이 시료들과 표준단백질 시료를 앞에서와 같은 Laemmli¹²⁾ 방법에 의해 전기이동을 실시하였다. 이때 사용한 완충용액과 running gel, stacking gel 모두 0.1% SDS를 함유한 것이었다. 표준단백질로는 phosphorylase b(97,000), BSA(66,000), ovalbumin

(44,000), trypsinogen (24,000) 등의 혼합물을 사용하였다. 건조한 gel에 나타난 띠로 제한효소 억제물질을 확인하였으며, 이동거리를 재고 표준단백질과 비교하여 소단위의 분자량 크기를 결정하였다.

10. Double immunodiffusion

앞에서 얻은 제한효소 억제물질을 complete Freund's adjuvant와 잘 혼합하여 emulsion을 만들었다. 이 emulsion을 토끼에게 주사하기 위해 생리식염수에 Evans blue를 2%되게 녹여 발바다에 피하주사하였다. 30분 후 popliteal fossa를 절개하여 popliteal lymph node를 찾아 가능한 한 많은 양을 주사하고 나머지는 등판에 피하 주사하였다. 15일후 incomplete Freund's adjuvant와 제한효소 억제물질을 잘 혼합하여 lymph node와 등판에 주사하여 제차면역시켰다. 두번째 주사를 놓은지 15일 만에 귀의 정맥에서 혈액을 채취하여 30분간 실온에 방치한 후 원심분리하여 제한효소 억제물질에 대한 항혈청을 분리하였다.

Ouchterlony²³⁾ 방법에 의해 위에서 얻은 항

혈청을 가지고 immunodiffusion을 하였다. Comassie brilliant blue R-250으로 염색하고 발색하여 결과를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. 염록체의 순도확인

분리한 각 층을 광학현미경을 사용하여 관찰한 결과 57%~39% 인접면에 위치한 층에서는 starch body 함량이 많은 염록체임을 알았고, 39%~20% 인접면에 위치한 층은 원형상태의 염록체가 많았다. 또 20%부분면에 위치한 층에는 stripped 염록체가 주로 많았다.

Gradient 각 분획에 대해 미토콘드리아의 contamination을 알아보기 위해 미토콘드리아의 marker로서 미토콘드리아에만 존재하는 succinate dehydrogenase (SDH)의 활성과 matrix에 존재하는 NAD-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH)의 활성을 조사했고, 염록체의 marker로서는 엽록소의 양을 측정하였다 (Table 1, 2).

Table 1. Distribution of maker enzymes in percoll gradient centrifuge tube.

percoll (v/v)	Activities (% of total recovered activities)	
	succinate dehydrogenase	NAD-dependent isocitrate dehydrogenase
57%	7.9	3.4
39%	9.1	11.5
	7.9	4.4
20%	9.0	4.4
	14.2	4.6
9%	36.5	47.7
	15.4	24.0

Activities in each percoll steps represent as percentage of the total activities in all steps. Centrifugation was done at 2,500xg for 8min.

Table 2. Chlorophyll (a+b) amount of Burley leaf following separation of discontinuous percoll gradient centrifugation.

percoll (v/v)	chlorophyll amount (a+b) (mg/ 100 g leaves)
57 %	0.051 ± 0.003
39 %	0.041 ± 0.004 0.548 ± 0.004
20 %	0.742 ± 0.004 1.473 ± 0.003
9 %	1.642 ± 0.003

Centrifugation was done at 2,500xg for 8 min.

SDH와 NAD-dependent IDH의 활성은 원형상태의 엽록체 층에서는 total recovered activity의 8%였고, 9%층에서만 크게 나타났다. 따라서 percoll step gradient centrifugation으로 분리한 원형상태의 엽록체 층에는 거의 미토콘드리아가 혼합되지 않고 분리되었음을 확인하였다.

2. 엽록체 조DNA의 분리

분리한 엽록체를 Kolodner, Tewari 방법에 의해 엽록체 DNA를 추출하여 TE 완충용액에 용해시켜 0.7% agarose gel electrophoresis를 한 결과 단일 띠를 관찰할 수 있었다. 엽록체 DNA에는 BamHI, XhoI, EcoRI, Sall의 cleavage site가 존재함은 알려져 있다²⁾. 엽록체 DNA용액에 상기한 제한효소의 양과 반응시간을 증가시켜보아도 엽록체 DNA는 절단되지 않았다. 또한 DNA에 엽록체 조DNA용액을 첨가시 제한효소는 DNA를 역시 절단하지 않는 것으로 보아, 제한효소 활성 억제물질의 존재 가능성을 암시하는 것 같다. 그러나 엽록체 DNA와 제한효소 활성 억제물질이 어떤 상태로 존재하는지는 분명하지 않다.

3. 제한효소 활성 억제물질의 추출

엽록체 DNA용액으로부터 DEAE sephacel column을 이용하여서 제한효소 활성 억제물질을 분리하였다. DEAE sephacel column에 흡착되지 않는 분획을 모아서 일부는 acrylamide gel electrophoresis로 순도를 확인한 결과 엽록체 DNA가 없는 한 개의 단백질 띠를 얻었다 (Fig.1). 이는 한가지 종류의 단백질이 주된 것으로 사료된다. 나머지 분획을 농축시켜 TE 완

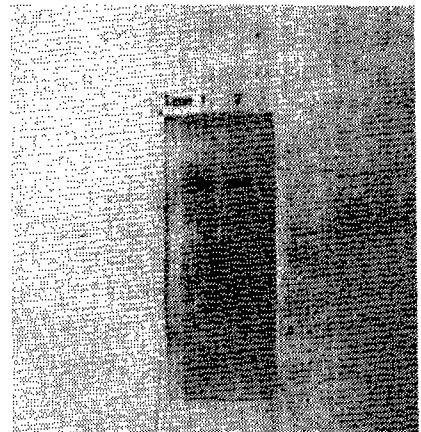


Fig.1. Polyacrylamide gel electrophoresis of inhibitory substance. Amount of inhibitory substance used was 8 μ g and 12 μ g (Lane 1, 2). The concentration of acrylamide in gel was 6%.

충용액에 용해시켜서 제한효소 반응액에 0 μg , 30 μg , 50 μg , 90 μg , 120 μg , 150 μg , 200 μg 씩 첨가하고 제한효소의 활성 억제 여부를 관찰하였다. BamHI의 기질로는 λ DNA, Chron 4 DNA, pUC9 DNA와 같은 BamHI cleava-

ge site가 있는 DNA를 사용하였다. Fig.2에서 볼 수 있는 바와 같이 억제물질의 양이 0.9 μg 이상에서부터 제한효소의 활성 억제 현상이 나타나고 있다. 이러한 제한효소의 활성 억제 현상은 XhoI, EcoRI, Sall에서도 관찰할 수 있었다.

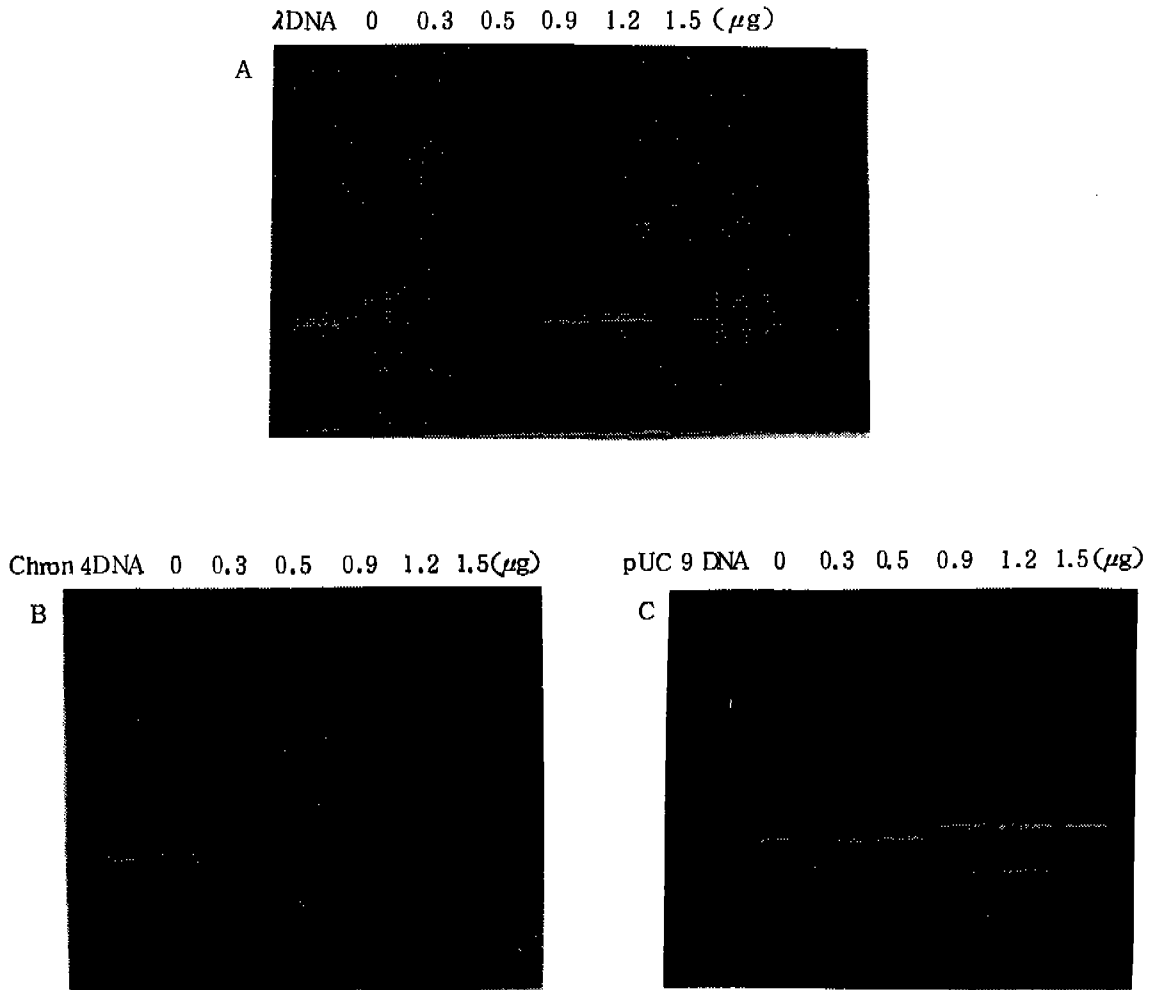


Fig.2. Effect of inhibitory substance on BamHI activity. The amount of BamHI used was 2 μl (4 units) in each reaction mixture containing inhibitory substance ranging 0 to 1.5 μg . A; 0.5 μg of λ DNA, BamHI and inhibitory substance described above. B; 2 μg of Chron 4 DNA, BamHI and inhibitory substance described above. C; 2 μg of pUC 9 DNA, BamHI and inhibitory substance described above.

담배 엽록체에서 분리한 제한효소 활성 억제물질이 CreI 활성의 억제 여부를 관찰하고, Sklar¹⁴⁾가 분리한 억제물질을 본 연구에서 사용한 제한효소의 활성에 미치는 영향을 관찰함도 의의가 있을 것으로 사료된다.

4. 제한효소 활성 억제물질의 특성

억제물질이 엽록체 DNA추출시 사용한 각종 시약의 잔사가 아님을 밝히고자 엽록체 DNA추출과 똑같은 과정으로 calf thymus DNA용액으로부터 DNA를 추출하였다. 그러나 calf thymus DNA추출중에서 제한효소 활성 억제물질이 전혀 나타나지 않은 것으로 보아 DNA추출시약의 잔사는 아님을 알았다. DEAE sephacel로부터 분리한 제한효소 활성 억제물질 분획을 phenol과 chloroform으로 다시 추출시 약 30% 정도의 억제물질이 손실되었음을 관찰할 수 있었다. 제한효소 활성 억제물질이 세포 내의 존재 장소를 밝히지 않은 보고^{4,14)}도 있지만, 본 실험 결과로 미루어 보아 엽록체에 존재함이 분명하다.

이 억제물을 SDS-PAGE 한 결과 한 개의 띠만을 관찰할 수 있었다(Fig.5). 이를 plot하여서 얻은 분자량은 53,000 dalton이었다(Fig.6). 이 값은 column에서 얻은 분자량과 동일하여서 monomer인 단백질로 사료된다. 이 억제물을 토끼에 주사하여서 혈청을 얻어 double immunodiffusion을 한 결과 하나의 띠로 나타났다. 이러한 과정에서 한 개의 항체만을 관찰할 수 있어서 추가되는 단백질은 한가지로 추측된다(Fig.3).

α -configuration의 moiety가 억제물질에 존재하여 활성에 관여하는지의 여부를 관찰하고자, α -amylase로 처리하여 보았으나 아무런 영향을 주지 못하였다. 따라서 α -configuration의 carbohydrate가 존재하지 않는지 또는 존재하더라도 활성과 관계가 없는지는 현재로서는 분명하지 않다. 그러나 억제물질 용액을 100°C에서

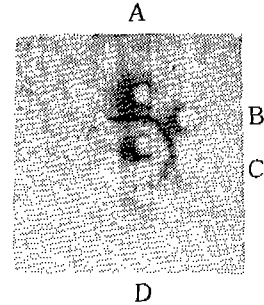


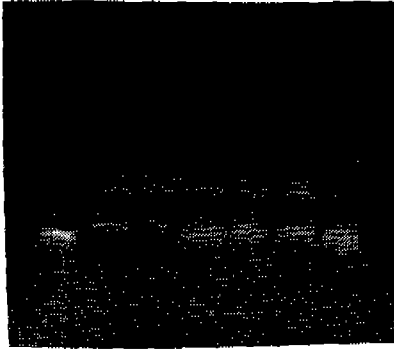
Fig.3. Ouchterlony double immunodiffusion analysis of the inhibitory substance. Center well contained inhibitory substance. Well A, B, C, D, E and F contained anti-serum from rabbit. A is no dilution, B is 2:1 dilution, C is 4:1 dilution, D is 8:1 dilution, E is 16:1 dilution and F is 32:1 dilution.

10분간 가열시 제한효소 활성 억제기능의 상실을 관찰할 수 있었다.

Trypsin으로 처리후 제한효소 활성 억제능력이 상실되었다. 즉 BamHI 활성에 전혀 영향을 주지 못하였다(Fig.4). 이는 Slater¹⁹⁾가 보고한 바와 같은 단백질 종 인지는 분명하지 않으나 trypsin의 처리 후 제한효소 활성 억제물질의 억제능력의 상실은 억제물질이 단백질임을 암시한다. 또한 식물에서 효소활성 억제물질이 단백질인 경우^{16,19-22)}와 특히 제한효소 CreI 활성 억제물질이 단백질이라는 보고¹⁴⁾가, 엽록체의 제한효소 활성 억제물질이 단백질임을 더욱더 분명히 하여 주는 것 같다.

효소활성 억제물을 열 또는 trypsin으로 처리한 후에는 XhoI, EcoRI, Sall과 같은 효소활성을 저하시키지 못하였으며, 기질로 사용한 λ DNA 이외의 pBR322 DNA, pUC9 DNA, Charon 4 DNA에서도 동일한 경향을 관찰하였다.

A λ DNA 0 0.3 0.5 0.9 1.2 1.5 (μ g)



B λ DNA 0 0.3 0.5 0.9 1.2 1.5 (μ g)

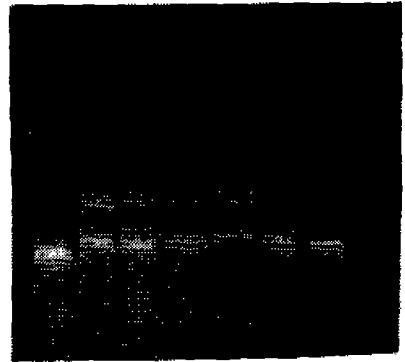


Fig. 4. Inhibitory effect of trypsin treated inhibitory substance using λ DNA on BamHI activity. A; React ion mixture containing 0.5 μ g of DNA and 4 units of BamHI was incubated at various concentration of trypsin treated inhibitory substance (0 μ g, 0.3 μ g, 0.5 μ g, 0.9 μ g, 1.2 μ g, 1.5 μ g) B; Procedures were same as A. except adding trypsin.

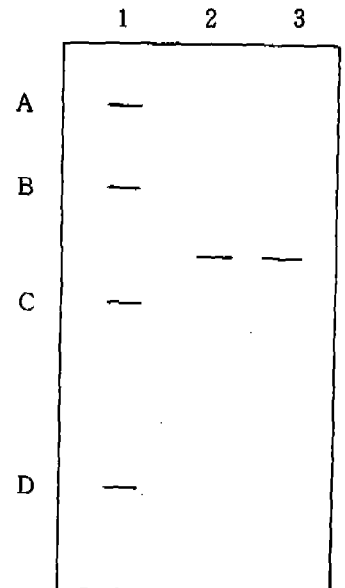
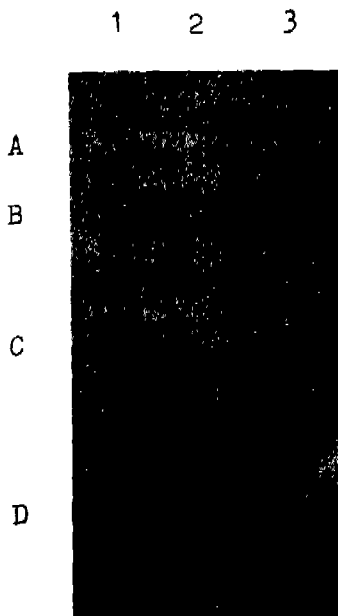


Fig. 5. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of inhibitory substance. Lane 1 shows molecular weight standard. A; phosphorylase b (M.W. 97,000), B; bovine serum albumin (M.W. 66,000), C; ovalbumin (M.W. 44,000), D; trypsinogen (M.W. 24,000). Lane 2,3 shows inhibitory substance.

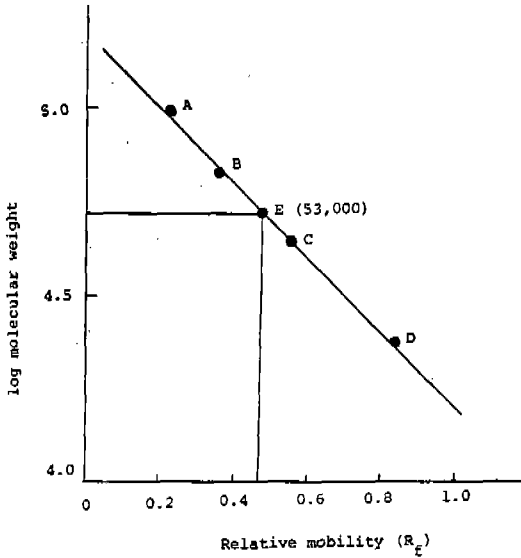


Fig.6. Graphic determination of subunit molecular weight of inhibitory substance by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. A; phosphorylase b(M.W. 97,000), B; bovine serum albumin(M.W. 66,000), C; ovalbumin(M.W. 44,000), D; trypsinogen(M.W. 24,000), E; shows subunit molecular weight of inhibitory substance.

이상과 같은 결과는 제한효소 활성 억제물질이 염록체에 존재하는 53,000 dalton의 monomer인 단백질을 밝혀주었다. 미생물에서 제한효소의 작용으로부터 DNA 보호기작은 methylated DNA를 만드는 것으로 알려져 있다^{2,3)} 식물의 경우는 Dyer²²⁾가 chlamydomonas의 염록체에서 methylated DNA보다는 제한효소 활성 억제물질인 단백질로 사료된다. 특히 담배의 경우에는 제한효소 활성 억제물질이 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

결 론

Burley 21, NC 82 황색종 잎으로부터 percoll

gradient centrifugation으로 염록체를 분리하고, 이 염록체로부터 제한효소 활성 억제물질을 분리하였다. BamHI을 포함하여 여러 제한효소 활성 억제효과는 trypsin으로 처리하거나 열로 처리하면 상실되나 α -amylase 처리로는 무관하다. 이 제한효소 활성 억제물질의 분자량은 53,000 dalton이며, monomeric 단백질을 밝혔다. 이 제한효소 활성 억제물질은 Burley 21, NC 82 황색종 잎 염록체 DNA를 제한효소 작용으로부터 보호하는 데 중요한 역할을 하는 단백질로 보인다.

참 고 문 헌

1. NasYROV Y.S., Ann. Rev. Plant Physiol., 29:215 (1978).
2. Wyatt G.R. and Cohen S.S., Biochem. J., 55:774 (1953).
3. Revel H.R. and Luria S.E., Ann. Rev. Gen., 4:177 (1970).
4. Rochaix J.D., "Method in Enzymol.", 65:785, Grossman, L. and Moldave, K., Ed., Academic press, New York. (1980).
5. Rocha V., Ting I.P., Arch. Biochem. Biophys., 140:398 (1970).
6. Morgenthaler J-J and Price C.A., Plant Physiol., 54:532 (1974).
7. Mills W.R. & Joy K.W., Planta, 148:75 (1980).
8. Hiatt A.J., Plant Physiol., 36:552 (1961).
9. Cox G.F., "Methods in Enzymol." 13:47, Lowenstein, J.M., Ed., Academic Press, New York. (1969).
10. Herrmann R.G., Bohnert H.J., Kowallik K.V. and Schmitt J.M., Biochem. Biophys. Acta, 378:305 (1975).

11. Manning J.E., Wolstenholme D.R., Ryan R.S., Hunter J.A. and Richards O.C., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 68:1169 (1971).
12. Laemmli U.K., Nature, 227:680 (1970).
13. Walbot V., Plant Physiol., 60:102 (1977).
14. Sklar R., J.Biol. Chem., 261:6806 (1986).
15. Boffey, S.A., "Techniques in Molecular Biology", 185, Walker, J.M. and Gaastra, W., Ed., (London, Croom Helm), (1983).
16. Odani S., Ono T., Ikenaka T. and Ikenaka T., J. Biochem., 88:297 (1980).
17. Laskowski M. and Kato I., Ann. Rew. Biochem., 48:593 (1980).
18. Ryan C.A., Ann. Rev. Plant. Physiol., 24:173 (1973).
19. Slater R.J., "Techniques in Molecular Biology", 113, Walker, J.M. and Gaastra, W., Ed., (London, Croom Helm), (1983).
20. Hass G.M., Ako H., Grahm D. T. and Neurath H., Biochem. J., 193:29 (1981).
21. Jacob R.T., Bhat P.G. and Pattabirama T.N., Biochem, J., 209:91 (1983).
22. Dyer Y.O., Nature, 298:422 (1982).
23. Ouchteriony O., Acta. Path. Microbial. Scand., 25:186 (1948).