

Alachlor에 의한 귀리 根端 分枝組織의 蛋白質 Pattern의 變異
 權長煥* · 朴基仁** · 金載喆*

Changes in the Polypeptide Patterns of Oat
 Root Tips Exposed to Alachlor

Kwon, S.W*., K.I. Park** and J.C. Kim*

ABSTRACT

The effect of alachlor treatment on protein synthesis was studied. Protein synthesis was inhibited by 1×10^{-4} M and 1×10^{-3} M of alachlor 5.8% and 86.5%, respectively, while did not occur blow 1×10^{-5} M alachlor.

Soluble protein of alachlor treated oat root tips was examined by polyacrylamide gel electrophoresis. The proteins extracted from oat root tips showed that they were made up of subunits blow 100 kd polypeptides by SDS-PAGE. As compared to control, high molecular proteins(above 47 kd) were inhibited of oat root treated with alachlor, while low molecular proteins(below 23 kd) were increased. Two-D gels showed that alachlor caused decrease(1-6 spots) or increase(7-10 spots) in number of polypeptides on silver staining. The intensity of some polypeptides of soluble proteins(molecular mass of 83 kd : 1, 2 spots, 70 kd : 3, 4 spots, and 47.5 kd : 5, 6 spots) decreased in alachlor treatment, whereas the intensity of other peptide bands(20 kd : 7 spot and 16 kd : 8, 9, 10 spots) increased. Oat root tip proteins present in the neutral zone are masked by diffusing of major proteins, but proteins in acid zone are resolved minor proteins.

Key words : Alachlor, oat root, protein pattern, protein synthesis

1. 緒 言

核酸 및 蛋白質合成은 植物의 代謝作用에 있어 서로 밀접한 關係를 갖고 植物生長에 決定的인 役割을 한다. 蛋白質은 DNA로 부터 遺傳 情報를 받아 合成되는데 이러한 分子 化合物들은 生物體의 形態 및 機能을 갖추는 基本 要素로서, 合成過程中 어떠한 障害를 받으면 代謝作用이 停止되어 生長이 멈춘다^{9,17)}. Mann 等⁹⁾과 Moreland 等¹⁴⁾은 chloroacetamide系인 CDAA가 브리와 *Heme sesbania*에서 蛋白質合成을 抑制시킨다고 報告하였으나, Moreland¹³⁾는 대두에 處理할 때는 特定한 蛋白質合成 抑制를 觀察할 수 없

다고 하였다. Ashton 等¹¹⁾은 propachlor가 蛋白質合成 過程中 aminoacyl-tRNA에서 polypeptide化를 妨害함으로써 植物生長이 停止되는 것으로 推定하고 있다. 이러한 研究들은 核酸 및 蛋白質含量, 그리고 ATP 等を 빠른 時間 內에 測定하여 더 많이 抑制된 作用을 除草劑의 機作을 推定하고 있으나 合成 抑制過程 自體를 究明하지 않았기 때문에 正確한 殺草機構를 찾기에는 不充分한 點이 많이 있다.

따라서 alachlor處理時 變化되는 蛋白質含量을 定量하고 나아가서 變化하는 polypeptide subunits를 SDS 電氣泳動 및 二次元的 電氣泳動法으로 確認 分析하여 alachlor의 機作을 좀 더 究明하려고 試圖하였다.

* 全北大學校 農科大學 園藝學科 College of Agriculture, Chonbuk National University, Chonju 550-756, Korea.

** 全北大學校 自然科學大學 生物學科 College of Natural Science, Chonbuk National University, Chonju 550-756, Korea.

<1992. 11. 18 接受>

2. 材料 및 方法

1) Alachlor 處理後 蛋白質 測定 : ^{14}C -leucine 을 利用하여 귀리에 8時間 동안 alachlor를 處理한 後 合成되는 net protein을 權과 金⁷⁾의 方法으로 測定하였다.

2) 電氣泳動 試料準備 : 36時間 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 暗發芽된 귀리를 均一한 것들만 選拔하여, 濃度別 alachlor가 處理된 Petri-dish에 옮겨서 12時間 동안 培養하였다. 培養된 귀리의 根端 分裂組織 (約 2mm)을 400個씩 잘라서 0.8ml 抽出 緩衝液 (20% glycerol, 2% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 2mM PMSF, 100mM Tris-HCl, pH 6.8)로 유리 磨碎器에서 完全 磨碎하였다. 粉碎된 組織을 80°C 에서 3分間 放置하였다⁵⁾. 10,000 xg로 30分間 遠心分離한 뒤, 上澄液을 SDS-PAGE의 試料로 使用하였다. 또한 二次元的 電氣泳動은 -20°C acetone을 상등액과 混合한 後, 다시 遠心分離하였다. 이때 沈澱된 蛋白質을 80% acetone으로 suspension하여, 遠心分離한 後 上澄液을 버리고 沈澱物質을 N_2 가스에 말려서 lysis buffer(9.5M Urea, 2% NP-40, 1.8% ampholyte pH 5-7, 0.2% ampholyte pH 3-10, 5% 2-mercaptoethanol)에 溶解시켜 試料로 使用하였다^{2,4,5)}.

3) SDS-PAGE는 O'Farrell¹⁰⁾의 方法을 약간 修正하였으며, 機具는 LKB slab gel(16cm×14cm)을 利用하여, 不連續 方法으로 實施하였다. 또한 SDS의 沈澱을 防止하기 위해서, 約 10°C 를 維持하면서 實施하였다.

Resolving gel의 acrylamide 濃度は 13.5%, stacking gel은 4%로 하여, resolving gel의 約 1cm 위에 試料를 loading할 수 있도록 stacking gel을 굳혔다. 電流는 stacking gel을 通過할 때 까지는 10mA를 維持하고, resolving gel에서는 25mA로 높여서 gel 밀의 約 1cm 정도 running 할 때까지 電流를 통해 주었다. 또한 molecular marker는 Sigma에서 購入한 7個의 表示된 分子量을 使用하였다. 染色은 0.025% coomassie blue-R-250으로 over night 하였으며, 脫色은 1次와 2次로 나누어 back ground를 完全히 脫色시켰다. 處理區와 無處理區間의 band의 差異는 supercellro 3 densitometer를 利用하여

調査하였다.

4) 2-dimensional gel electrophoresis

Isoelectric focusing : 一次元的 電氣泳動은 1.3 mm(D)×13cm(L)의 rod gel system을 利用하였으며, O'Farrell¹⁰⁾方法으로 實施하였다. Gel을 굳힌 後 overlay buffer(9M Urea, 2% ampholyte)와 lysis buffer을 各各 $10\mu\text{l}$ 씩 넣고, 陰極에는 0.1N NaOH와 陽極에는 0.1N H_3PO_4 을 채웠다. 200V에서 15分, 300V에서 30分, 400V에서 60分동안 gel을 순환 시킨 後, 一定量의 試料와 $5\mu\text{l}$ overlay buffer을 넣고 400V에서 16時間, 900V에서 1時間 running하였다^{4,5,6)}.

二次元的 電氣泳動 : Focusing한 gel을 equilibration buffer(62.5mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol)에 10分間 담근 後, SDS-slab gel에 air bubble이 없도록 완전히 密着시켜서 indicator gel과 1% agarose gel을 넣었다. 方法은 SDS-PAGE와 同一하게 實施하였다.

5) Silver staining : 10% glutaraldehyde에 固定한 後, ammoniacal silver를 만들어 Merrill等¹²⁾의 方法으로 實施하였으며, develop 後 1% 水醋酸에 넣어 固定하여 調査하였다.

3. 結果 및 考察

1) Alachlor 處理 後 蛋白質 合成

Alachlor 處理 後 蛋白質合成은 $1 \times 10^{-3}\text{M}$ 에서 86.5%, $1 \times 10^{-4}\text{M}$ 은 5.8% 抑制되는 現象을 보였지만 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 以下の 濃度에서는 오히려 增加되는 現象을 보였다(Table 1).

蛋白質合成 抑制는 除草劑의 作用에 特히 敏感한 것으로 알려져 있는데, 特히 amide 系統의 除草劑는 一般적으로 蛋白質合成 抑制가 그 primary action으로 推定하고 있다. 그러나 本實驗에서는 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 以下에서는 오히려 蛋白質含量이 增加되는 現象을 보였다. Carlson等³⁾은 pronamide 0.5ppm을 귀리에 4時間동안 處理時 蛋白質合成이 增加되는 現象을 보였는데, amide 系統의 除草劑는 核酸 및 蛋白質合成 抑制가 一次的作用으로 報告된 것과는 좀 다르다고 하였다. Lyons와 Raison⁹⁾ 의하면 作物이 低溫의 刺戟을 若干 받으면 低溫에 適應하기 위하여 蛋白質合成이 增加하는 것으로 報告하였다. Alach-

Table 1. The effect of a alachlor on protein synthesis 8hrs after treatment.

Alachlor conc. (M)	Protein (¹⁴ C-leucine) (cpm/15 root tips)	% of control
0	23,161 b	100
1×10 ⁻⁶	26,403 b	114.0
1×10 ⁻⁵	32,026 a	138.3
1×10 ⁻⁴	21,814 b	94.2
1×10 ⁻³	2,621 c	13.5

Mean values within a column that are followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan test.

lor 1×10⁻⁵M 이하 處理時 增加된 蛋白質은 本 除草劑의 作用에 對應하기 爲해서 만들어진 것으로 推定되며, 이때 增加되는 蛋白質과 抑制되는 蛋白質을 좀 더 究明하고자 電氣泳動을 實施하였다.

2) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis 에 의한 蛋白質 類型 分析

Alachlor을 處理한 귀리의 根端을 SDS-PAGE 로 展開한 結果 分子量 100kd 以下의 subunit로 構成되어 있으며, 無處理區의 band는 12個의 강한 band와 約 22個의 弱한 band로 나타났다 (Fig. 2). Maslenkova 等¹⁰⁾은 보리의 葉組織에서 抽出된 蛋白質은 分子量 98kd에서 14.3kd 사이의 polypeptide로 構成되어 있으며, 電氣泳動 上에서 約 30個의 band가 나타난다고 報告했는데 本 實驗 材料인 귀리에서도 이와 비슷한 樣相으로 나타나다.

電氣泳動 gel의 各 lane을 3個로 部位別로 나누어 調査한 結果, alachlor를 12時間 處理時 全體의 peak 面積中에서 A部分(47kd이상)이 차지하는 比率은 無處理區에서 40.9%이었으나, 1×10⁻⁵M alachlor 處理區는 32.9%, 2×10⁻⁵M은 31.5%, 1×10⁻⁴M에서는 19.2%로, 除草劑의 濃度가 增加할수록 高分子의 蛋白質들이 차지하는 比率은 減少되었다. 그러나 C部分(23kd以下)이 차지하는 比率은 無處理區에서 29.0%이었으며, 1×10⁻⁵M에서 32.0%, 1×10⁻⁴M은 44.5%로, 濃度가 增加함에 따라서 점차 增加하였다(Fig. 1). 特히, A部分에 있는 主要 band中 83, 70과 47.5kd의 蛋白質이 顯著하게 減少된 反面, C部分의 16kd과 그 以下의 低分子 蛋白質은 除草劑

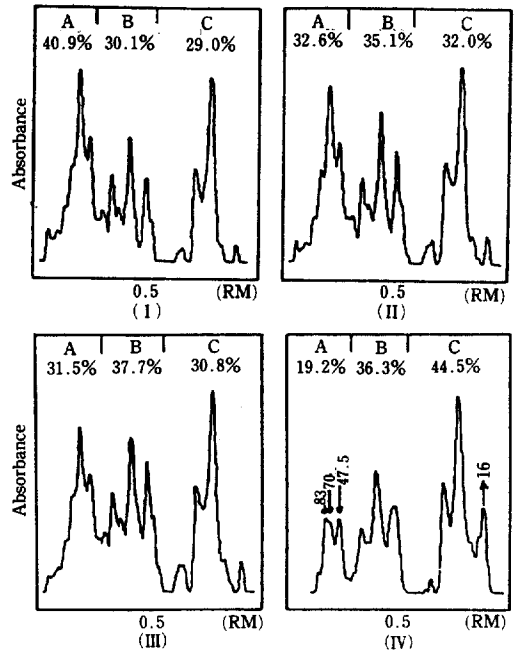


Fig. 1. Scan of oat root tips on SDS-PAGE 12 hours after treatment alachlor. (I) Control; (II) 1×10⁻⁵M; (III) 2×10⁻⁵M; (IV) 1×10⁻⁴M alachlor. ↓ Bands appeared weakly in alachlor treatment. ↑ Band appeared intensity in alachlor treatment.

處理時 無處理區에 比하여, coomassie blue에 질게 染色되어 나타났다.

Zalik와 Jones¹⁸⁾에 의하면 아미노산은 매우 安全한 狀態로 細胞에 存在하기 때문에, polypeptide化 하기 위해서는 ATP가 要求되며, ATP가 供給될 때는 遺傳子의 codon에 따라서 tRNA가 아미노산과 結合하여 amino-acyl-tRNA가 되면서 ribosome上에서 하나의 蛋白質이 合成된다고 하였다^{11,19)}. 이러한 蛋白質合成 過程中 alachlor處理時 蛋白質 合成이 減少된 것은 ATP 生成抑制에서 오는 結果라고는 생각되지 않는다. 이는 Table 1에서 나타난 바와 같이 1×10⁻⁵M alachlor處理時 全體의인 蛋白質 含量은 無處理區에 比하여, 38% 더 增加한 것으로 보아 ATP의 不足現象이라고 할 수 없으며, 만약 ATP가 不足하다면 低分子의 蛋白質도 合成할 수 없기 때문이다. Alachlor 1×10⁻⁴M을 處理할 때 全體의인 蛋白質含量에는 거의 變化가 없었지만 47 kd 以上의 蛋白質 band들이 弱해지고, C zone, 特히 16kd 以下의 band가 強해진 것은 高分子의

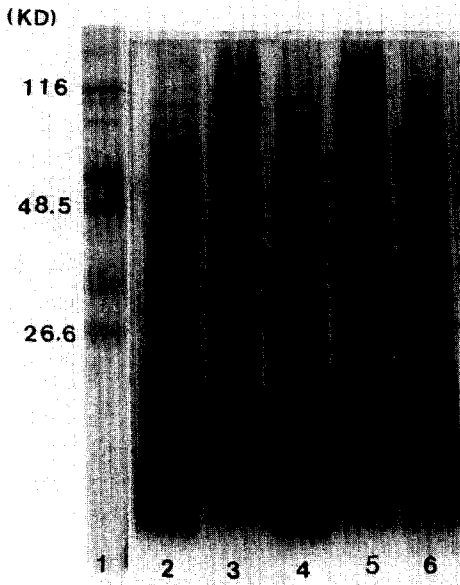


Fig. 2.

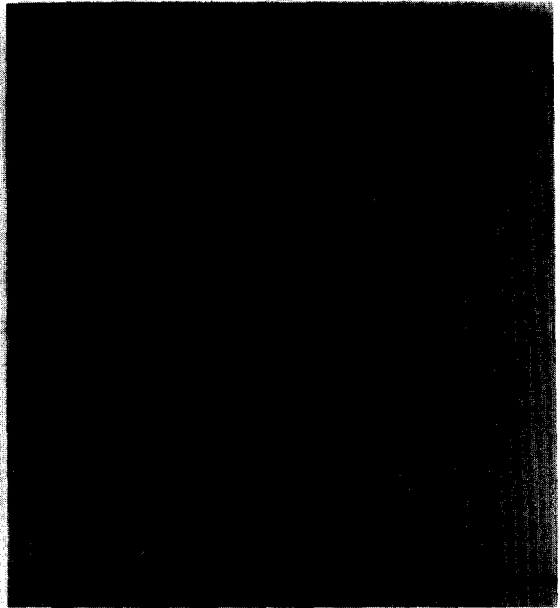


Fig. 3.



Fig. 4.

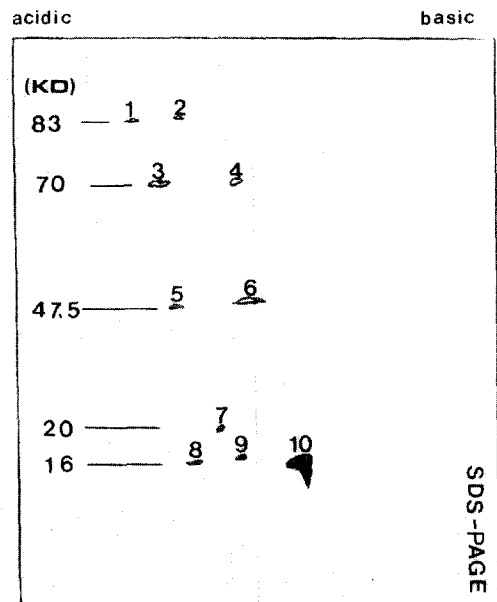


Fig. 5.

- Fig. 2. Alachlor effect on protein pattern in oat root tips. 1 lane : MW standard, 2 lane : 1×10^{-4} M alachlor, 3 and 5 lane : control, 4 lane : 2×10^{-5} M alachlor, 6 lane : 1×10^{-5} M alachlor
- Fig. 3-4. Two dimensional electrophoretograms of polypeptides from oat root tips. (3) : control, (4) : 2×10^{-5} M alachlor
- Fig. 5. Schematic presentation of protein with treatment of 2×10^{-5} M alachlor. ○ spots which decrease in intensity, ● spots which increase in intensity.

蛋白質들이 分解되어 低分子化로 되거나, 또는 低分子的 蛋白質들이alachlor로 因하여 高分子化로 重合되지 못한 結果로 假定할 수 있다. 그런데 $1 \times 10^{-5}M$ alachlor 濃度 以下에서는 全體 蛋白質 含量이 增加된 것은, 分解되지 않고 合成되었기 때문에 增加한 것으로 생각된다. 즉,alachlor는 低分子的 蛋白質들은 繼續적으로 合成하지만 高分子 단백질로 重合하지 못하여 高分子의 polypeptide band는 減少되고, 저분자의 polypeptide band는 增加된 것으로 思料된다.

Wareing과 Phillips¹⁷⁾는 완두잎이 老化될 때 水溶性 蛋白質中 高分子의 蛋白質은 없어지고, 低分子的 蛋白質들은 마지막까지 남아 있다고 하였다. Trippi와 Van¹⁸⁾는 植物이 老化될 때 蛋白質과 核酸의 合成이 抑制되며, 또한 蛋白質合成이 減少되면 代謝過程을 衰退시킬 뿐만 아니라 蛋白質 分子의 크기도 줄어들며, 모든 物質을 合成할 수 있는 能力도 弱해진다고 報告하였다. 이는 SDS 電氣泳動에서 나타난 바와 같이alachlor處理 後 增加된 蛋白質은 低分子的 蛋白質로서, 正常的인 植物體의 生育時에 만들어지는 polypeptide가 아니라 植物體가 除草劑의 stress에서 살아 남기 위하여 만들어지는 蛋白質로 生覺된다. 그러나 이러한 低分子的 蛋白質들이 高分子 蛋白質로는 重合하지 못한 結果로 인하여, 즉 蛋白質로 變化로 因하여 植物의 生長이 抑制되는 것으로 思料된다.

2) 二次元的 電氣泳動을 利用한 蛋白質 分析

二次元的 電氣泳動에 의한 分析은 動物과 bacteria에서는 자주 利用되어 왔지만 植物에서는 극히 드물게 利用되고 있는데, 植物體에서 抽出되는 것은 蛋白質 含量이 거의 낮은 狀態로 存在하기 때문에, 一般적으로 電氣泳動上에서는 動物에 비하여 折半정도 蛋白質 band가 나타나는 것으로 보고되었다^{5,6)}. 植物體의 蛋白質을 좀 더 敏感하게 感知하기 위해서는 二次元的 電氣泳動, autoradiography 및 silver staining 方法을 利用하여 植物體의 hormone 處理時 또는 stress時 發現되는 蛋白質을 分析할 수 있는 것으로 알려져 있다^{2,4,5,6)}. 本 實驗에서는 equilibrium isoelectric focusing을 一次元的 電氣泳動으로 전개하여 分析한 結果, major spot는 주로 中性쪽에 存在하고 있는 反面, minor spot는 酸性쪽에 많이

分離되는 現象을 보였으며, 鹽基性쪽에는 spot가 거의 나타나지 않았다(Fig. 4, 5). 따라서 根端 分裂組織은 酸性 蛋白質이 많은 것으로 보아 amino acid 中 glutamic acid, glutamine, aspartic acid 및 asparagine을 많이 含有하고 있는 것으로 推定된다⁸⁾. Alachlor 處理時 減少되는 蛋白質은 83kd의 1, 2 spots, 70kd의 3, 4 spots, 47.5kd의 5, 6 spots이고, 增加되는 蛋白質은 20kd의 7 spot, 16kd의 8, 9, 10 spots로 나타났다(Fig. 5).

結論적으로alachlor는 分裂組織內에서 蛋白質을 合成하는 過程中 polypeptide를 非正常的으로 合成함으로써 特히, 83kd, 70kd 및 47.5kd의 蛋白質들이 감소되고, 20kd과 16kd의 蛋白質들은 增加시킴으로써 生長이 抑制되는 것으로 推定된다.

4. 摘 要

귀리에alachlor를 處理할 때 變化되는 蛋白質을 分析한 結果 要約하면 다음과 같다.

Alachlor 處理時 蛋白質 合成은 $1 \times 10^{-4}M$ 에서 5.8%, $1 \times 10^{-3}M$ 에서는 86.5% 抑制되는 現象을 보였지만 $1 \times 10^{-5}M$ 以下の 濃度에서는 增加되는 現象을 보였다.

귀리의 根端分裂組織에서 抽出된 蛋白質은 100 kd 以下の polypeptide로 構成되어 있으며,alachlor 處理時 47kd 以上の 高分子 蛋白質들은 抑制되었지만 23kd 以下の 低分子 蛋白質들은 오히려 增加되는 現象을 보였다.

二次元的 電氣泳動 結果alachlor 處理時 83kd의 1, 2 spot, 70kd의 3, 4 spot, 47.5kd의 5, 6 spot의 polypeptide가 抑制된 反面, 20kd의 7 spot, 16kd의 8, 9, 10 spot는 增加되는 現象을 보였다. 또한 귀리 根端 分裂組織은 酸性 蛋白質로서, 主로 中性 部位에 큰 polypeptide spots들이 存在하고 있으며, 작은 spots들은 酸性쪽에 分離되어 나타났다.

引用 文獻

1. Ashton, F.M., O.T. de Villier, R.K. Glenn, and E.B. Duke. 1977. Localization of metabolic sites of action of herbicides. Pestic. Biochem.

- Physiol. 7 : 122-141.
2. Booz, M.L. and R.L. Travis. 1980. Electrophoretic comparison of polypeptides from enriched plasma membrane fractions from developing soybean roots. *Plant Physiol.* 66 : 1037-1043.
 3. Carlson, W.C., E.M. Lignowski, and H.J. Hopen. 1975. The mode of action of pronamide. *Weed Sci.* 23 : 155-161.
 4. Hurkman, W.J. 1990. Use of two-dimensional gel electrophoresis to characterize changes in gene expression associated with salt stress of barley. *Environmental injury to Plants* 205-229.
 5. Hurkman, W.J. and C.K. Tanaka. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81 : 801-806.
 6. Hurkman, W.J., C.K. Tanaka, and F.M. DuPont. 1988. The effect of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. *Plant Physiol.* 88 : 1263-1273.
 7. 權晟煥 · 金裁喆. 1990. Alachlor의 除草機構에 관한 研究. I. Alachlor가 귀리의 核酸, 아미노산 및 蛋白質合成에 미치는 影響. *韓雜草誌* 10(3) : 227-232.
 8. Lyons, J.M. and D.J.K. Raison. 1979. Low stresses in crop plants. Academic press, New York pp. 464-473.
 9. Mann, J.D., L.S. Jordan, and B.E. Day. A survey of herbicides for their effect upon protein synthesis. *Plant Physiol.* 40 : 840-843.
 10. Maslenkova, L.T., T.S. Miteva, and L.P. Popova. 1992. Changes in the polypeptide patterns of barley seedlings exposed to jasmonic acid and salinity. *Plant Physiol.* 98 : 700-707.
 11. Mazelis, Mendel. 1980. Amino acid metabolism. *The Biochemistry of Plants.* 5 : 541-568.
 12. Merrill, C.R., Goldman, D., and Van Keuren, M.L. 1982. Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 3 : 17-23.
 13. Moreland, D.E. 1980. Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31 : 597-638.
 14. Moreland, D.E., S.S. Malhotra, R.D. Gruehagen, and E.H. Sholrah. 1969. Effects of herbicides on RNA and protein synthesis. *Weed Sci.* 17 : 556-563.
 15. O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of protein. *J. Bio. Chem.* 250 : 4007-4021.
 16. Trippi, V.S., M.T. Van. 1971. Change in the pattern of some coenzyme of the corolla after pollination in *Phalaenopsis amabilis* Blume. *Plant Physiol.* 48 : 506-508.
 17. Wareing, P.F. and I.D.J. Phillips. 1981. Growth and differentiation in plant. Pergamon Press, New York.
 18. Zalik, S. and B.L. Jones. 1973. Protein biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24 : 47-68.