

# 해너콩 잎의 Canavanine 대사에 관여하는 수종 효소의 활성변화에 대하여

高 碩 贊

## On the Activities of Enzymes of Canavanine Metabolism in the Leaves of *Canavalia lineata* (L.) DC

*Koh Suck-chan*

### Summary

The levels of the activities of ornithine carbamyltransferase, arginase and urease were measured in the leaves from matured shoots of *Canavalia lineata* (L.) DC according to the leaf plastochron index(LPI). The activities of all enzymes were prominently high at approximately LPI-0.5 and the activities of canaline-dependent carbamyltransferase(CDC) and canavanine-dependent arginase(CDA) were relatively high above LPI 0.5 in contrast with those of ornithine-dependent carbamyltransferase(ODC) and arginine-dependent-arginase(ADA) which were rapidly decreased above LPI 0.5. The contents of total free amino acids decreased significantly during leaf development while canavanine were not detected, and the activity patterns of CDC and CDA were respectively different from those of ODC and ADA. And then citrulline and ureidohomoserine seemed to be rapidly synthesized at young leaves and to be transported to other organs or transformed into various polyamines, and the properties of ornithine carbamyltransferase and arginase seemed to be changeable according to the leaf age.

### 序 論

Canavanine은 arginine의 guanidino-oxy 유사

理工大學 助教授

체로서 *Canavalia*속 식물을 비롯한 Papilionideae  
종자에 광범위하게 존재한다(Bell등, 1978). 종자  
의 canavanine 함유량은 종에 따라 변이가 있으나

(Rosenthal, 1982), *Canavalia ensiformis*의 경우 전 질소량의 55% 그리고 전 유리 아미노산의 95%를 차지하고 있으며(Rosenthal과 Janzen, 1983), 종자의 발아와 함께 canavanine-dependent arginase에 의해 분해되어 canaline과 urea로 되며 canaline은 homoserine으로 그리고 urea는 urease의 작용으로  $\text{NH}_3$ 과  $\text{CO}_2$ 로 변화하는 것으로 알려져 있다(Damodaran과 Narayanan, 1940; Rosenthal, 1970). 그러나 canavanine의 합성에 대하여는 pod에서 합성되어 종자로 이동된다는 주장(Waren과 Hunt, 1969)과 잎에서 만들어져 pod와 종자로 이동된다는 주장(Rosenthal, 1972)이 있으나, 자엽의 canavanine이 발아와 함께 잎이나 뿌리로 전이된다는 연구결과(Rosenthal, 1970; Kwon등, 1986)도 있다.

따라서 본 실험에서는 성숙한 개체의 발달단계가 상이한 잎에서 canavanine의 합성이나 분해 또는 체내이동 등을 알아보기 위하여 canavanine 합성의 marker 효소인 ornithine carbamyl transferase와 canavanine 분해에서 marker 효소인 arginase와 urease의 활성을 잎의 발달단계(leaf plastochron index)별로 측정하고, 총유리 아미노산과 canavanine의 함량을 측정하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 材料

제주도 자생 해너콩(*Canavalia lineata* (L.) DC) 종자를 채취하여 5월말에 노지에 파종하고 7월말에 잎의 길이가 5cm인 것을 기준으로 하여 각 식물의 plastochron index (PI)를 산출, PI가 각각 6.17, 6.39, 6.91인 개체에서 각각의 잎이 leaf plastochron index(LPI)를 산출(Erickson과 Michelini, 1957)하여 실험재료로 사용하였다.

### 2. 方法

채취한 잎은 LPI별로 구분하여 생체량을 측정하고 단백질 함량과 효소활성 측정용 그리고

chlorophyll함량 측정용으로 하고, 일부재료는 생체량 측정후 80°C 건조기에서 48시간 이상 건조시킨후 전체량을 측정함과 아울러 유리 아미노산과 canavanine 측정용으로 사용하였다.

생체량을 측정한 재료를 0.1M trismaleate 완충용액(pH7.0, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1% Triton X-100, 2% PVPP를 함유하는 용액)을 5ml 넣고 마쇄하여 1,000g에서 10분간 원심분리 한후 상등액을 15,000g에서 30분간 재차 원심분리하여 상등액을 조효소 용액으로 하였으며(Polacco, 1977), bovine serum albumin을 표준으로 단백질량을 측정하였다(Lowry등, 1951). ornithine-dependent carbamyltransferase(ODC)와 canaline-dependent carbamyltransferase(ODC)의 활성은 O'Neal(1975)의 방법으로 반응시킨 후 생성된 citrulline과 ureidohomoserine을 각각 측정하고(Boyde와 Rahmatullah, 1980; Rosenthal, 1973a) 효소활성 단위는 흡광도 변화량으로 나타내었다. Arginine-dependent arginase (ADA)와 canavanine-dependent arginase (CDA)는 Downum등(1983)의 방법으로 반응시킨후 생성된 ornithine과 canaline을 측정하였으며(Roubelakis와 Kliever, 1978; Rosenthal, 1973b), urease의 활성은 Polacco(1976)의 방법으로 반응시켜 기질인 urea의 감소량을 측정하였다.

Total chlorophyll함량은 Arnon(1949)의 방법으로 측정하였으며, 총유리 아미노산은 Rosenthal(1976)의 방법으로 추출, ninhydrin법(Plumer, 1978)으로 glycine을 표준으로 하여 측정하였으며 canavanine 함량은 PCAF법으로 발색시켜 측정하였다(Rosenthal, 1976).

## 結果 및 考察

생체량과 전체량의 변화는 LPI -0.5와 0.5사이의 잎에서 급격히 증가하고 LPI 3.5인 잎에서 감소하는 양상을 보이고 있는데(Fig.1), LPI 0를 전후하여 생장이 급격하게 진행되는 것으로 볼 수 있으며 LPI 3.5와 4.5에서는 생체량과 전체량이 감소하고 있으나 생체량과 전체량의 비가 어린잎에

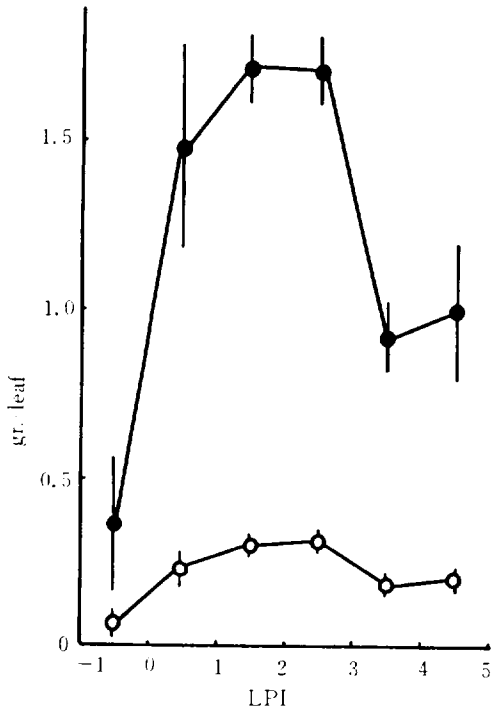


Fig. 1. The changes of fresh weight(●) and dry weight(○) of the leaves according to the leaf plastochron index.

서와 같이 거의 일정하며 잎의 노화정도를 알아 보는 척도로서 total chlorophyll과 단백질의 함량한 결과 (Fig. 2) chlorophyll 함량이 잎이 발달함에 따라 일정한 것으로 보아 노화가 진행되는 것으로는 볼 수 없으며, 단백질 함량(Fig. 2)이 LPI 0.5인 상태에서 급격히 감소하고 이후 거의 일정한 상태를 나타내는 것으로 보아 LPI 0를 전후하여 대사 활성이 높음을 알 수 있다.

ODC와 CDC의 활성을 보면 LPI -0.5인 잎에서 높고 이후 계속하여 ODC는 활성이 감소하나 CDC는 비교적 높은 활성이 지속되고 있다 (Fig. 3). 이는 어린잎에서 citrulline과 ureidohomoserine의 합성속도가 빠르고, 잎이 성숙함에 따라서 citrulline 합성속도는 감소되고 ureidohomoserine을 지속적으로 합성되고 있음을 나타내며, 잎이 발달함에 따라 생체량이 증가하는 추세

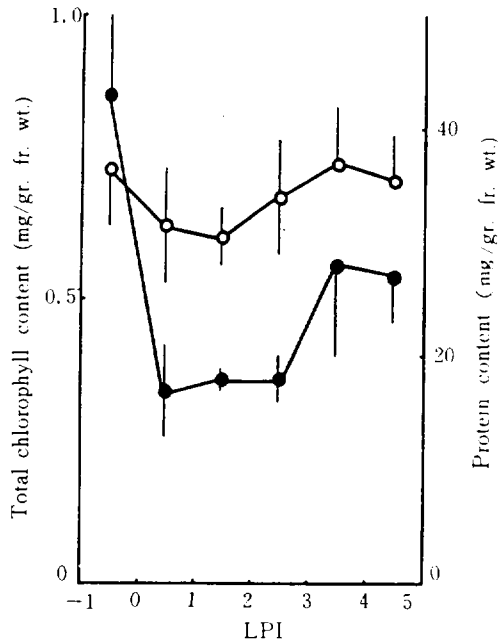


Fig. 2 The contents of total chlorophyll(○) and protein(●) in the leaves according to the leaf plastochron index.

이므로 (Fig. 1) 개체일을 기준으로 했을 때 citrulline이나 ureidohomoserine의 함성량은 많아짐을 나타내고 있다. ADA의 활성은 LPI -0.5인 잎에서 높은 반면 이후 낮은 활성을 보임에 따라 (Fig. 4) arginine의 분해가 어린잎에서 더 활발히 일어나고 성숙함에 따라 분해속도가 느림을 알 수 있으며, CDA는 거의 일정한 상태를 유지하고 있어 잎이 성숙함에 따라 개체일을 기준으로 했을 때 canavanine 분해량이 크게 증가하는 것으로 볼 수 있다. urease의 활성은 LPI -0.5인 잎에서 급격히 감소하여 이후 낮은 효소활성이 나타나고 있으며 (Fig. 5), ADA와 CDA활성과 비교해 볼때 어린잎에서는 urea의 생성량보다 분해량이 적고 잎이 성숙함에 따라 생성량과 분해량이 거의 일치하는 양상을 보이고 있다. 한편 총유리 아미노산의 함량은 생체량을 기준으로 했을때는 LPI -0.5인

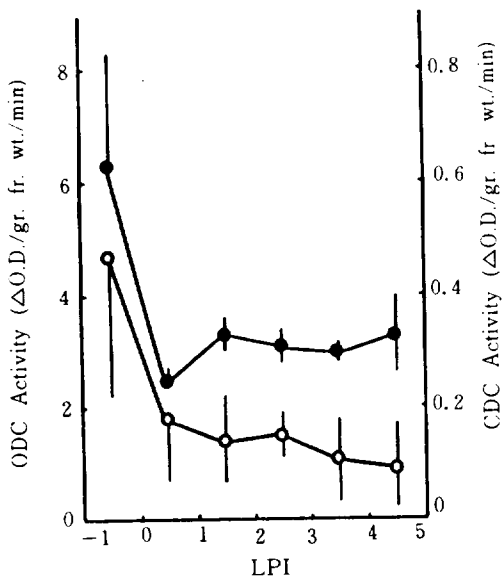


Fig.3 The activities of ornithine-dependent carbamyltransferase( $\circ$ ) and canaline-dependent carbamyltransferase( $\bullet$ ) in the leaves according to the leaf plastochron index.

앞에서 높고 이후 서서히 감소하고 있는데, 개체 잎을 기준으로 했을 때는 LPI -0.5와 0.5사이에서 급격히 증가하고 LPI 0.5와 2.5 사이에서 높은 함량을 보이고 이후 계속하여 감소하며, canavanine은 전혀 검출되지 않고 있다(Fig.6).

이와 같은 결과를 볼때 LPI 0이하인 잎에서 citrulline과 ureidohomoserine이 급격한 속도로 만들어지나 개체잎을 기준으로 했을때는 잎이 성숙함에 따라 많은 양이 만들어질 수 있음을 알 수 있으며, 이는 arginosuccinate와 canavaninosuccinate, arginine, canavanine등의 아미노산이 모든 잎에서 생성될 수 있음을 시사해 주는 것으로 볼 수 있으나, canavanine이 전혀 검출되지 않은 것으로 보아 ureidohomoserine이나 canavaninosuccinate 등이 여러가지 polyamine의 형성에 관여하든지 (Malmberg, 1983) 또는 ureidohomoserine이나 canavaninosuccinate 등의 형태로 다른기관 즉 pod나 종자로 전이되는 것으로 생각하여 볼 수 있으나 canavanine과 arginine 대사에 관여하는 유리

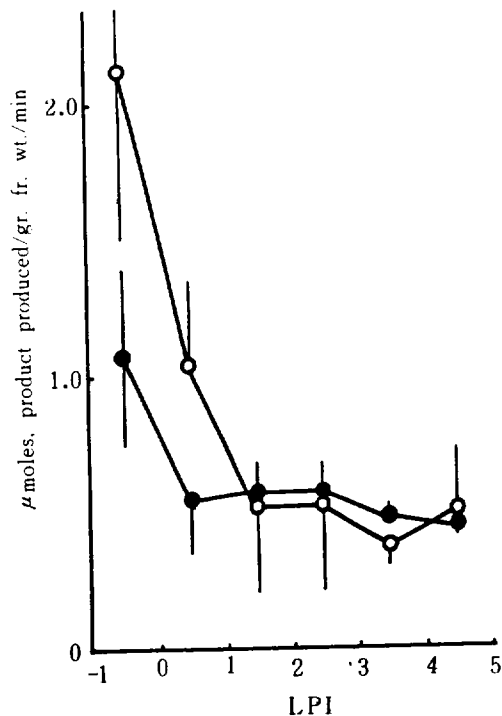


Fig.4. The activities of arginine-dependent arginase( $\circ$ ) and canavanine-dependent arginase ( $\bullet$ ) in the leaves according to the leaf plastochron index.

아미노산을 전체적으로 분석 검토할 필요가 있으며, canavanine이 존재하지 않은데도 CDA의 활성이 나타나는 것은 생체내에서의 CDA의 활성은 canavanine의 존재를 반드시 필요로 하지는 않은 것으로 보이며 ADA가 canavanine분해 능력을 유지하는 것으로 보인다. 또한 *Canavalia ensiformis*의 잎의 ODC와 CDC의 특성연구에서 CDC/ODC 비가 거의 일정(0.9~1.3)한 사실(O'Neal, 1975)과 비교하여 볼때 잎의 발달 단계별로 ODC와 CDC활성의 비가 다름을 알 수 있으며, 자엽에서 ADA와 CDA의 비가 4.5정도에 이르는 사실(Downum 등, 1983)에 비추어 보아 ADA와 CDA의 비가 1이 되어 CDA의 활성이 대단히 높아서 자엽과 잎에서의 arginase의 성질이 크게 다름을 알려 주고 있는데, 이와같은 사실은 잎의 발달단계에 따라서 또는 조직에 따라서 기질에 대한 친화

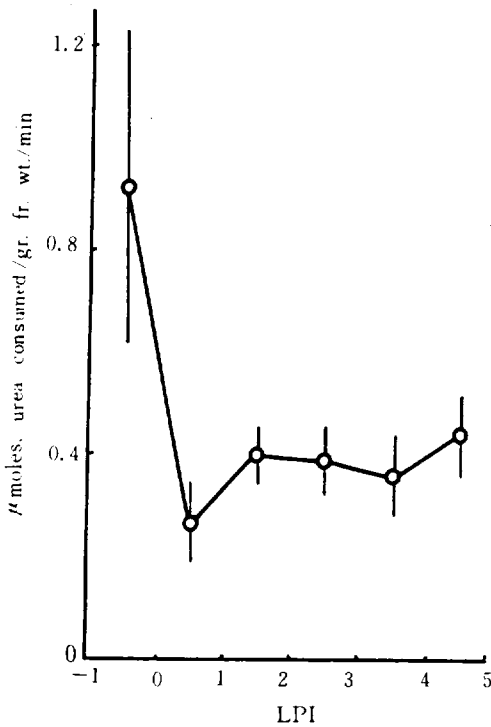


Fig.5. The urease activities in the leaves according to the leaf plastochron index.

력이 달라지는 것으로 추측하여 볼 수 있는데, 이들 효소를 분리하여 isozyme pattern의 변화나 효소학적 특성등에 대한 연구가 진행되어야 할 과제라고 생각된다.

### 摘 要

LPI -0.5~0.5인 잎에서 대사가 활발하여 효소활성이 높았으나 잎이 발달함에 따라 생체량이 증가함으로 대사량은 성숙한 잎에서 더 많음을 알

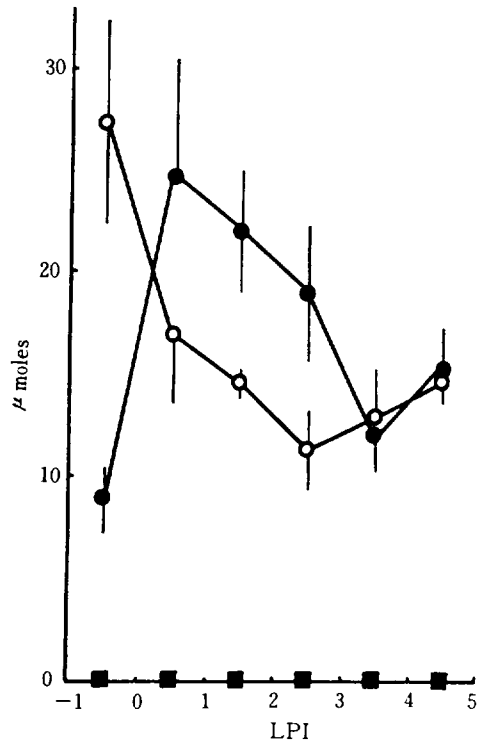


Fig.6. The contents of total free amino acids and canavanine (■) in the leaves according to the leaf plastochron index. The data for amino acids were represented with fresh weight base(○) and leaf base(●).

수 있으며 총유리 아미노산의 함량은 잎이 성숙함에 따라 감소하였으나 canavanine은 검출되지 않아서, 잎에서 생성된 아미노산은 canavanine 전단계에서 다른 기관으로 선이되는지 polyamine의 형성에 관여하는 것 같다. 또한 CDC와 ODC의 비와 ADA와 CDA의 비가 LPI의 변화에 따라 크게 다르므로서 잎이 발달함에 따라 이들 효소의 특성이 변하는 것으로 생각된다.

### 引 用 文 獻

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.

is. *Plant Physiol.* 21:1-15.  
Bell, E. A., J. A. Lackey and R. M. Polhill.

1978. Systematic significance of canavanine in the Papilionoideae (Faboideae). *Biochem. Syst. Ecol.* 6 : 201-212.
- Boyde, T. R. C. and M. Rahmatullah. 1980. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetylmonoxime. *Anal. Biochem.* 107 : 424-431.
- Damodaran, M. and K. G. A. Narayanan. 1940. A comparative study of arginase and canavanase. *Biochem. J.* 34 : 1449-1459.
- Downum, K. R., G. A. Rosenthal, and W. S. Cohen. 1983. L-Arginine and 1-canavanine metabolism in jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC and soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Physiol* 73 : 965-968.
- Erickson R. O. and F. J. Michelini. 1957. The plastochron index. *Amer. Jour. Bot.* 44 : 297-305.
- Kwon, Y. M., H. C. Chung, S. C. Koh and Y. -N. Hong. 1986. On utilization of canavanine and activity of canavanase during germination and growth of *Canavalia lineata* (L.) DC. *Korean J. Bot.* 29(2) : 85-94.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Malmberg, R. L. 1983. Mutants of *Nicotiana tabacum* that alter polyamine synthesis. In: *Current topics in plant biochemistry and physiology*, vol.2 (Eds. by Randall, D.D., D.G. Blevins and R. L. Larson). pp.211-221. University of Missouri-Columbia, Missouri.
- O'Neal, T. D. 1975. *In vitro* synthesis of ureidohomoserine by an enzyme from jack bean (*Canavalia ensiformis*) leaves. *Plant Physiol.* 55 : 975-977.
- Plummer, D. T. 1978. The quantitative estimation of amino acids using the ninhydrin reaction. In: *Introduction to practical biochemistry* (Ed.), pp.144-145. McGraw-Hill, London.
- Polacco, J. C. 1976. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. *Plant Physiol.* 58 : 350-357.
- , 1977. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. *Plant Physiol.* 59 : 827-830.
- Rosenthal, G. A. 1970. Investigations of canavanine biochemistry in the jack bean plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. I. Canavanine utilization in the developing plant. *Plant Physiol.* 46 : 273-276.
- , 1972. Investigations of canvanine biochemistry in the jack bean plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. II. Canavanine biosynthesis in the developing plants. *Plant Physiol.* 50 : 328-331.
- , 1973a. Preparation and colorimetric analysis of o-ureidohomoserine. *Anal. Biochem.* 56 : 435-439.
- , 1973b. The preparation and colorimetric analysis of 1-canaline. *Anal. Biochem.* 51 : 354-361.
- , 1976. Preparations and colorimetric analysis of 1-canavanine. *Anal. Biochem.* 77 : 147-151.
- , 1982. Toxic constituents and their related metabolite. In: *Plant nonprotein amino and imino acids* (Ed.), pp.56-156. Academic Press, London & New York.
- , and D. H. Janzen. 1983. Avoidance of nonprotein amino acid incorporation into protein by the seed predator, *Caryedes brasiliensis* (Bruchidae). *J.Chem. Ecol.* 9 : 1353-1361.
- Roubelakis, K. A. and W. M. Kliever. 1978. Enzymes of Krebs-Henseleit cycle in *Vitis vinifera* L. I. Ornithine carbamyltransferase : isolaton and some properties. *Plant Physiol.* 62 : 337-339.
- Waren, R. P. and G. E. Hunt. 1969. Asymmetric labeling in the carbon-14 biosynthesis of canavanine in the jack bean (*Canavalia ensiformis*). *Plant. Physiol.* 44 : S-7.