

해너콩 (*Canavalia lineata*) 의 자엽에서 Concanavalin A의 특성 및 양적 변화

고석찬*, 허인옥*, 고정균**

On the Properties and Quantitative Changes of Concanavalin A
in the Cotyledons of *Canavalia lineata*

Suck-Chan Koh*, In-Ok Huh*, Jung-Goon Koh**

Summary

The properties of concanavalin A (Con A) was investigated in the mature seeds and the quantitative changes of Con A was studied in the cotyledons during germination and growth of *Canavalia lineata*.

Con A was isolated from the crude extract by Sephadex G-50 in mature seeds and the isolated Con A was separated as four subunits with molecular weights of 30 kD, 21 kD, 17 kD and 11 kD by SDS-PAGE, but Con A subunits with 21 kD, 17 kD and 11 kD did not have immunoaffinity for 30 kD subunit. About 75 μ g of Con A agglutinated 50 μ l of 1% human erythrocytes and Con A was bound to horseradish peroxidase. Con A subunit with 30 kD decreased rapidly 8 days after sowing and the subunits with 17 kD and 11 kD decreased remarkably 12 days after sowing, indicating that Con A is hydrolyzed by proteases at late stage of germination.

서 론

Concanavalin A (Con A)는 *Canavalia ensiformis*의 종자에서 처음 분리된 lectin의 일종으로 총 단백질 함량의 20~28%를 차지하며 (Sumner, 1919; Dalkin and Bowles, 1983), α -D-mannopyranosyl-, α -D-glucopyranosyl- 또는 β -D-fructofuranosyl- 말단잔

기를 갖는 탄수화물과 특이하게 결합하고, 다양한 동물세포를 응집시키는 특성을 갖는 식물 단백질이다 (Sumner and Howell, 1936; Goldstein and Hayes, 1978).

Con A는 *C. ensiformis*의 종자 성숙과정에서 당단백질인 pro-Con A (34 kD)가 형성된 이후 27 kD인 Con A 단위체와 18 kD, 13 kD, 11 kD와 8 kD인 Con A 단위체로 modification되어 형성되며

* 자연과학대학 생물학과 (Dept. of Biology, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

** 대학원 생물학과 (박사과정)

(Herman *et al.*, 1985), *C. gladiata*에서는 30 kD인 단위체와 분자량이 작은 3 개의 단위체로 구성된다고 보고되고 있다 (Yamauchi and Minamikawa, 1986). Con A의 구조는 27 kD인 4 개의 단위체로 구성되어 있으며 pH 7.0이상에서는 4량체로 존재하나 pH 6.0이하에서는 2량체 상태로 되며, 또한 각각의 단위체는 Mn^{2+} 과 Ca^{2+} 이온 및 탄수화물의 결합부위를 갖고 있는 것으로 알려져 있다 (Liener, 1976). 그러나 분자량이 작은 단위체의 분자구조에 대하여는 밝혀진 바가 없다. 한편 Con A의 생리적 역할에 대해서는 토양 박테리아에 대한 항체로서의 역할과 당의 저장과 이동에 관여할 것이라는 추측과 함께 세포분열과 세포신장에 관여하는 것으로 생각되고 있다 (Sharon, 1979). 그러나 아직도 식물체에서 Con A들의 생리적 역할에 대해서는 구체적으로 밝혀지지 않았으며, 종자 성숙 과정에서 합성된 Con A들이 종자 발아와 유식물 생장동인의 변화에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *C. ensiformis*와 같은 속 식물인 해너콩 (*Canavalia lineata*)의 종자에서 Con A를 분리하여 그 특성을 확인하고, Con A의 생리학적 역할을 밝히는 기초를 구명하고자 종자의 발아와 유식물 생장시의 Con A의 양적 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 해너콩 (*Canavalia lineata*) 종자는 다려도에서 채집하여 사용하였다. Con A 분리는 성숙한 종자를 사용하여 실시하였으며, Con A 함량 변화는 종피를 제거한 종자를 파종하여 growth chamber에서 발아시키고 자엽을 채취하여 조사하였다. 생육온도는 25°C를 유지하고, 빛은 형광등을 사용하여 7,000 lux의 연속광 하에서 증류수로 일정한 수분 함량을 유지하며 생육시켰다.

2. 해너콩 자엽에서의 단백질 추출 및 전기영동

자엽에 존재하는 단백질은 Yamauchi와 Minamikawa (1986)의 방법을 따랐으며, 자엽당 10 ml의

0.1 M borate 완충용액 (pH 8.0)으로 추출하고 30 분간 12,000xg로 원심분리하여 상정액을 단백질 시료로 사용하였다.

전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 의해 12.5% acrylamide 겔에 단백질 시료 50 μ 를 loading하여 SDS-PAGE를 실시하였으며, 분자량을 결정하기 위하여 bovine serum albumin (66 kD), egg albumin (45 kD), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kD), carbonic anhydrase (29 kD), trypsinogen (24 kD), trypsin inhibitor (20 kD), α -lactalbumin (14.2 kD)을 표준단백질로 사용하였다.

3. 해너콩 종자에서의 Con A의 분리 및 특성조사

해너콩 종자에서 Con A의 분리는 Agrawal과 Goldstein (1967)의 방법을 기초로하여 실시하였다. 성숙한 종자를 마쇄하여 분말을 만든 뒤 acetone으로 탈지시킨 후, 1 M NaCl로 용해시키고 ammonium sulfate을 90%가 되게 첨가한 뒤 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 침전물은 1 M NaCl로 녹여 동일한 용액에 투석한 후, Sephadex G-50 column에 넣어 10 mM glucose을 포함하는 1 M NaCl로 용출시켜 Con A분획을 취하였다.

분리한 Con A에서의 적혈구 응집반응은 Kochibe (1986)의 방법을 기초로하여 O형인 사람의 적혈구를 사용하여 조사했다. 즉, 분리한 Con A용액을 5 mM EDTA를 포함하는 PBS 완충용액 (pH 7.2; 5 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl)으로 투석시킨 뒤 microtiter plate에 연속적인 Con A 희석액과 1% 적혈구 현탁액을 동량 혼합한 후 2 시간 동안 실온에 정지시켜 응집여부를 확인하였다.

Con A-binding peroxidase활성은 Richard (1981)의 방법을 기초로하여 실시하였다. 즉, 분리한 Con A용액을 TBS 완충용액 (pH 7.4; 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl)으로 투석시킨 후, 연속적인 Con A 희석액을 microtiter plate의 well에 각각 넣어 coating 시켰다. Con A가 coating된 well은 5% 탈지분유를 포함하는 TBS 완충용액으로 blocking 시킨 뒤, 10 μ g peroxidase가 들어있는 TBS 완충용액을 각각의 well에 넣어 Con A와 결합하게 하였다. Con

A-binding peroxidase는 0.012% H₂O₂와 0.04% phenylene diamine을 함유하는 0.2 M sodium phosphate-0.1 M citrate 완충용액 (pH 5.0)에서 반응시키고 2.5 M sulfuric acid로 반응을 중지시킨 후 관찰하였다.

Con A의 항체는 30 kD인 단백체를 사용하여 제조하였다. 즉, 분리한 Con A를 SDS-PAGE를 실시한 뒤 30 kD인 밴드를 잘라내어 이를 1:3의 비로 나누어 각각 Freund's complete adjuvant와 Freund's incomplete adjuvant를 넣어 마쇄하여 현탁액을 만든 뒤 10 일 간격으로 토끼의 피하조직에 4 회 주사한 후, 경정맥에서 현액을 취하고 원심분리하여 상층액을 항체로 사용하였다(Johnstone and Thorpe, 1982). Immunoelectroblotting은 Towbin 등(1979)의 방법을 따랐다. SDS-PAGE가 끝난 후 겔에서 nitrocellulose 필터로 단백질을 이동시킨 후 nitrocellulose 필터를 5% 탈지분유를 포함하는 TBS로 blocking 시키고 1,000배 희석된 항체 용액에서 반응시키고 2,000배로 희석된 anti-inraunoglobulin G 용액에서 반응시킨 뒤, 염색액(2.5 mg 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, 20 μ l의 30% H₂O₂가 들어있는 TBS)에 담가 어두운 곳에서 발색시켰다.

결과 및 고찰

Con A의 분리 및 특성

해너콩의 종자로부터 분리한 Con A와 마른 종자의 단백질 시료의 SDS-PAGE 패턴을 비교하였다 (Fig. 1). 그 결과, 마른 종자에는 해너콩의 주요 단백질로 밝혀진 49 kD인 canavalin이 주요 단백질로 나타났으며 (Fig. 1A; Koh *et. al.* 1991), 양적으로 canavalin보다 적으나 30 kD인 단백질도 주요 단백질로 나타났다. 분리한 Con A는 30 kD인 주요 밴드와 21 kD, 17 kD와 11 kD인 3 개의 작은 밴드로 나타났고, 이들 중에서 30 kD인 밴드는 다른 밴드와 비교하여 함량이 높게 나타났으나 21 kD인 밴드는 상대적으로 가장 낮은 함량을 보였다(Fig. 1B). 이러한 결과는 *C. ensiformis*와 *C. gladiata*의 성숙한 종자에서 나타난 Con A의 패턴과 일치되는 것으로 (Yamauchi and Minamikawa, 1987), 해너콩에도

30 kD, 21 kD, 17 kD와 11 kD인 4 개의 서로 다른 단백질체가 존재한다고 판단되었다.

분리한 Con A의 특성을 알아보기 위하여 적혈구 응집반응과 Con A-binding peroxidase 활성을 조사하였다(Fig. 2). 분리한 Con A를 적혈구와 응집시킨 결과, 75 μ g 이상의 Con A는 50 μ l의 1% 적혈구를 응집시킬 수 있는 활성을 갖고 있으며, 10 μ g 이하의

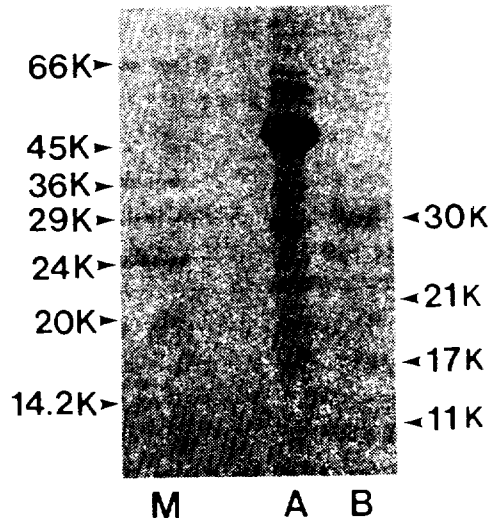


Fig. 1. Comparison of SDS-PAGE patterns between total protein(A) and Con A(B) from mature seeds of *C. lineata*. The mol wt markers(M, left) and Con A subunits(right) were represented at the side of electrophotogram.

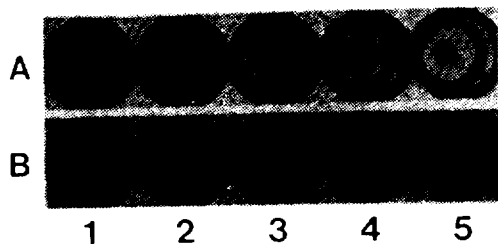


Fig. 2. Hemagglutination activity(A) and peroxidase-binding activity(B) of Con A isolated from *C. lineata* seeds. About 150 μ g (1), 75 μ g (2), 37.5 μ g (3), 18.75 μ g (4) and 9.37 μ g (5) of Con A were loaded on each well of U-shaped microtiter plate.

Con A에서는 적혈구를 거의 용집시키지 못하였다 (Fig. 2A). 한편, 당단백질로 알려진 peroxidase와 Con A를 결합시켰을 때 Con A의 농도가 증가함에 따라 peroxidase 활성이 높게 조사되어 peroxidase에 대한 Con A의 결합 정도가 Con A 함량에 비례함을 알 수 있었다 (Fig. 2B). 그러나 분리한 Con A가 적혈구를 용집시키고 peroxidase와 결합하는 현상은 Fig. 1B에서 나타난 것과 같이 4 개의 서로 다른 Con A 단위체로 구성된 혼합액에 의해 얻어진 결과로, 이러한 활성을 갖는 것이 4 종류의 단위체의 복합적인 작용에 의해 이루어진 것인지 또는 어떤 특정 단위체에 의해 이루어진 것인지는 알 수 없다. 그러나 30 kD의 단위체는 *in vivo* 상태에서 4량체인 약 100 kD의 형태로 존재하고 각각의 단위체에는 하나의 binding site가 존재하는 것으로 알려진 반면 (Wang *et. al.* 1971) 나머지 세 개의 작은 단위체의 *in vivo*에서의 구조가 밝혀져 있지 않을 뿐 만 아니라 carbohydrate-binding 또는 cell binding 활성을 갖는지는 규명되지 않고 있어, 이들 분자량이 작은 단위체들의 특성에 대한 연구가 필요하다 하겠다. 그러나 각각의 단위체들이 단백질 분리과정에서 Sephadex G-50이나 glucose에 결합하는 성질은 동일하여, Fig. 2에서 적혈구 세포를 용집시키는 특성과 당단백질인 peroxidase와 결합할 수 있는 특성은 이들 4 개의 단위체들의 복합적인 작용인 것으로 생각된다.

한편, 해녀콩 자엽에서 분리한 30 kD인 Con A 단위체의 항체에 대한 자엽내 단백질의 immunoaffinity를 조사한 결과 (Fig. 3), 30 kD인 Con A 단위체 이외의 단백질은 immunoaffinity를 전혀 나타내지 않았을 뿐 아니라 21 kD, 17 kD, 11 kD인 다른 3 개의 단위체도 30 kD인 단위체와 immunoaffinity를 보이지 않아서, 성숙한 자엽내에 존재하는 4 종류의 Con A 단위체간의 면역학적 동질성이 없는 것으로 나타났다. 이는 종자 성숙 과정에서 형성된 Con A의 다양한 단위체들 중에 30 kD보다 작은 단위체들은 30 kD인 Con A가 enzymic 또는 nonenzymic한 분해에 의해 초래 된다는 보고와는 상반되는 결과이다 (Wang *et. al.* 1971). 그러나 Con A는 성숙한 종자내의 endopeptidase에 저항성을 가지며 적어도 성장 초기에는 30 kD인 Con A와 분자량이 작은 단위체들

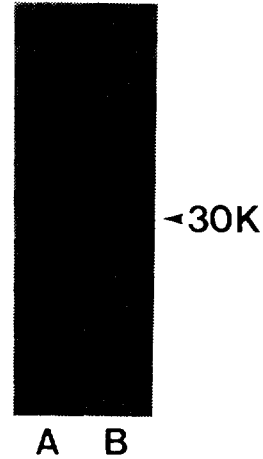


Fig. 3. SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) patterns of the crude extracts obtained from mature seeds of *C. lineata*. The antisera to 30 kD Con A subunit were used in B.

은 endopeptidase에 민감하지 않은 것으로 밝혀져 (Dalkin and Bowles, 1983) 해녀콩의 종자에서 분자량이 작은 단위체들이 30 kD 단위체에 대해 immunoaffinity를 보이지 않는 것으로 보아 이들 작은 단위체들이 30 kD 단위체의 분해산물은 아닌 것으로 판단되며, Con A 전구체의 posttranslational processing에 의하여 30 kD인 Con A 단위체와 분자량이 작은 각각의 단위체가 생성된다는 보고도 있어 (Bowles *et. al.* 1986), 해녀콩 자엽의 4 개의 Con A 단위체는 Con A 전구체의 posttranslational processing에서 기인한 것으로 추측된다. 그러나 *C. ensiformis*의 성숙한 종자에서 27 kD와 11 kD인 단위체에서 27 kD인 Con A 항체에 대해 immunoaffinity를 보였으나 13 kD인 단위체에서는 immunoaffinity를 보이지 않고 (Marcus *et. al.* 1984), 30 kD 단위체는 적어도 두 개의 cleavage site가 존재하고 분자량이 작은 단위체들의 $-NH_2$ 와 $-COOH$ terminal이 30 kD 단위체와 연계되어 있기 때문에 30 kD 단위체의 분해산물로 몇몇 단위체가 만들어 질 수 있다고 추측한 바도 있어 (Waxdel *et. al.* 1971; Dalkin and Bowles, 1983), 30 kD 단위체의 분해기작과 21 kD, 17 kD, 11 kD인 단위체들의 합성 과정에 대한 연구

가 더욱 진행되어야 할 것으로 판단된다.

해너콩의 발아와 성장시 자엽 단백질과 Con A 함량의 변화

해너콩 종자의 발아와 유식물 성장시 자엽에서 주요 단백질의 변화를 SDS-PAGE에 의해서 조사하였다(Fig. 4). 그 결과, 밴드 A의 49 kD인 canavalin은 성장초기에 급속한 감소를 보인 반면 canavalin 분해산물로 밝혀진 24~25 kD인 밴드 B는 성장초기에 형성된 뒤 이후 점차 감소하였다. 이는 해너콩의 발아와 성장 초기에 49 kD인 canavalin이 발아 4 일 이후에 canavalin 분해효소에 의해 급격하게 분해되고 24~25 kD canavalin 분해산물은 그 이후에 다른 단백질 분해효소에 의해 분해 될 것이라는 보고와 일치하였다(Koh *et. al*, 1991). 그러나 Fig.1B의 분리한 Con A의 주요 밴드와 분자량이 일치하여 Con A로

판단되는 30 kD인 밴드는 8 일 이후부터 감소되었으며, 분자량이 작은 다른 Con A단위체로 판단되는 17 kD인 밴드와 11 kD인 밴드는 10 일 이후에 점차 감소하였으며, Fig. 1B에서 나타난 21 kD인 단백질은 육안으로 식별이 곤란하여 변화를 관찰하지 못하였다. 분리한 Con A와 분자량이 일치되는 30 kD, 17 kD와 11 kD인 Con A의 경우 성장초기에 양적인 변화를 보이지 않는데, 이는 proteolytic 활성이 높은 발아 초기에도 endopeptidase에 민감하지 않는 것으로 밝혀진바 있어(Dalkin *et. al* 1983) 해너콩 자엽에서도 발아 초기에는 protease에 의한 Con A분해가 이루어지지 않는 것으로 판단 할 수 있다. 그러나 주요 단백질이 감소된 8 일 이후에 30 kD인 Con A 단위체가 먼저 감소하나, 그 분해 산물로 해석할 수 있는 polypeptide가 관찰되지 않았다. 따라서 Con A 단위체들의 감소가 자엽내의 endopeptidase의 분해에 의해 초래되지는 않는 것으로 볼 수 있고 이들의 감소가 exopeptidase에 의해 분해될 가능성을 보여 주고 있어, 발아 8 일 이후의 Con A의 분해 기작과 분해된 Con A의 생리적 역할에 대한 연구가 필요하다 하겠다.

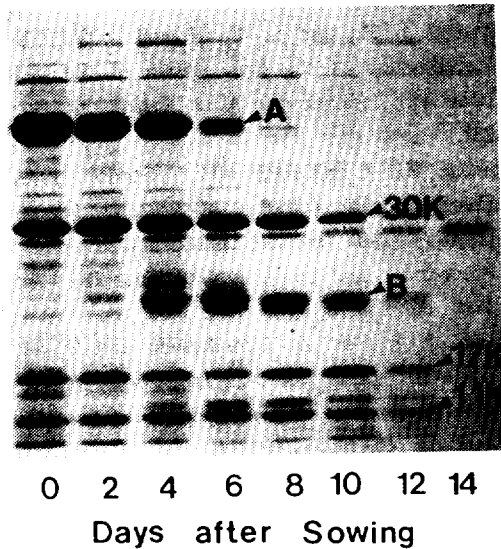


Fig. 4. SDS-PAGE patterns of total protein in the cotyledons during germination and growth of *C. lineata*. The arrows(A and B) represent the 49 kD canavalin subunit and its hydrolyzed products respectively, and the arrows(30 K, 17 K, 11 K) represent Con A subunits.

적 요

해너콩 (*Canavalia lineata*)의 성숙한 종자에서 Con A를 분리하여 그 특성을 확인하고, 발아와 유식물 성장시 Con A의 양적 변화를 조사하였다.

분리한 Con A는 30 kD인 주요 단위체와 분자량이 각각 21 kD, 17 kD와 11 kD인 3 개의 작은 단위체로 나누어 졌고, 75 μ g의 Con A는 50 μ l의 1% 적혈구를 응집시킬 수 있었으며 당단백질인 peroxidase와 결합하는 성질을 가지고 있었다. 또한 분자량 30 kD인 Con A 단위체의 항체에 대하여 다른 세계의 Con A 단위체는 immunoaffinity를 보이지 않았다. 해너콩이 성장하는 동안 30 kD인 Con A 단위체는 8 일 이후부터 감소하였으며 17 kD인 단위체와 11 kD인 단위체는 10 일 이후에 점차 감소되었다.

참 고 문 헌

- Agrawal, B. B. L. and I. J. Goldstein, 1967. Protein-carbohydrate interaction, VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels, *Biochem. Biophys. Acta.* 147 : 262-271.
- Bowles, D. J., S. E. Marcus, D. J. C. Pappin, J. B. C. Findlay., E. Eliopulos, P. R. Maycox and J. Burgess, 1986. Post-translational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons, *J. Cell Biol.* 102 : 1284-1297.
- Dalkin, K. and D. J. Bowles, 1983. Analysis of interrelationship of jack bean seed components by two-dimensional mapping of iodinated tryptic peptides, *Planta* 157 : 536-539.
- Goldstein, I. J. and C. E. Hayes, 1978. The lectins; Carbohydrate-binding proteins of plants and animals, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35 : 127-340.
- Johnstone, A. and R. Thorpe, 1982. *In*, Immunochemistry in practice. Blackwell, Oxford. 22-40.
- Herman, E. M., L. M. Shannon and M. J. Chrispeels, 1985. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor, *Planta* 165 : 23-29.
- Kochibe, N., 1986. Mannose binding lectins of *Vicia tetrasperma* seed and their immunological relationship to other legume lectins of similar specificity. *Plant Cell Physiol.* 27 : 661-669.
- Koh, S. C., I. D. Hwang and Y. M. Kwon, 1991. Some properties and fate of canavalin in the cotyledons of *Canavalia lineata*, *Biochem. J.* 24 : 578-584.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 : 680-685.
- Liener, I. E., 1976. Phytohemagglutinins (Phytolectins), *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27 : 291-391.
- Marcus, S. E., J. Burgess, D. R. Maycox and D. J. Bowles, 1984. A study of maturation events in jackbeans (*Canavalia ensiformis*), *Biochem. J.* 222 : 265-268.
- Richard, H., 1981. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and blotting, *Anal. Biochem.* 123 : 143-146.
- Sharon, N., 1979. *In* Glycoconjugate Research (Eds by Oppenheim J. J. and D. L. Rossinreich), Academic press, New York, 31-34.
- Sumner, J. B., 1919. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*, *J. Biol. Chem.* 37 : 137-142.
- Sumner, J. B. and S. F. Howell, 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32 : 227-237.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel into nitrocellulose sheets: Procedures and some applications, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76 : 4350-4354.
- Wang, J. L., B. A. Cunningham and G. M. Edelman, 1971. Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68 : 1130-1134.
- Waxdel, M. J., J. L. Wang, M. N. Pflumm and G. M. Edelman, 1971. Isolation and order to the cyanogen bromide fragments of concanavalin A, *Biochemistry* 10 : 3343-3347.
- Yamauchi, D. and T. Minamikawa, 1986. *In vivo* studies protein synthesis in developing seeds of *Canavalia gladiata* DC, *Plant Cell Physiol.* 27 : 1033-1041.
- Yamauchi, D. and T. Minamikawa, 1987. Synthesis of concanavalin A in maturing *Canavalia gladiata* seeds, *Plant Cell Physiol.* 28 : 421-430.