

代謝過程에 있어서 律速段階

決定에 關한 研究 (I)

發芽種子子葉에 있어서 酸素活性에 미치는 光線의 影響

(1) Studies on the Determination of the Rate Control Steps in the Various Metabolic Cycles. (I) The Affect of the Light to the Enzyme Activities in the Cotyledons of the Germinating Seeds.

申 貴 男

全南大學校 農科大學

(1962年 2月 15日 受理)

一 目 次

- I 머릿말 및 研究概要
- II 材料 및 方法
- III 實驗結果
- IV 考 察
- V 摘 要
- VI 引用文獻
- VII 英文摘要

I. 머릿말 및 研究概要

發芽過程에 있어서 子葉內에 存在하는 各種酸素의 活性에 關한 研究報告는 相當히 많다.

J Lowell young⁽¹⁾, Borner⁽²⁾, D.A. Walker, H. Beerer⁽³⁾ 등은 細胞를 Cell Debris,

Mitochondria, Microsomal fraction으로 分離해서 研究했으며 이에 關한 化學的 組成도 研究 報告되었 으며⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾ 單色光線에 依한 植物體形成 物質의 組成에 對해서도 報告되었다.⁽⁷⁾

發芽初期에 暗所에서 生長하는 植物과 光線下에서 生長하는 植物等에 對한 窒素代謝도 Schlutze, Wood等에 依하여 研究되었다는 것이 Bonner⁽²⁾에 依해서 發表되었다.

그러나 代謝過程에 있어서 律速反應의 存在와 位置에 關해서는 研究된 바가 없다. 著者는 모든 代謝過程에 있어서는 代謝를 支配하는 律速反應이 있다고 推定하고 이가 가진 生化學的 意味는 그로 因해서 生體內的 各種 代謝過程이 생겼고 따라서

生物의 種과 器官의 機能에 差異가 생겼다고 보며 이를 促進 함으로써 代謝를 빨리 終結시켜 代謝生成物을 單位時間에 많이 얻을수가 있고 生化學的 機作을 分明히 하여 代謝經路를 人工的으로 變換시킬 수가있다고 보며 그의 位置는 (1) 代謝過程에서 中間生成物이 가장 많이 分離되는곳, (2) 그 種의 代謝過程에서의 分岐點이 될수 있는곳, (3) 各種酸素中에서 이 代謝를 가장 빨리 促進시킬수 있는 酸素가 關與하는곳, (4) 自由 Energy의 含量이 가장 적은곳등이라고 볼 수있으며 이 段階의 決定은 代謝研究에 重要한 意味를 가진다고 본다.

以上과 같은 目的으로 著者는 우선 光線의 有無가 生長에 顯著한 差異를 가져온 것은 子葉內에 있어서의 代謝過程을 支配하는 律速段階에 對한 光線이 關與하는 酸素의 活性度를 測定해서 代謝 Cycle의 어느 部分에 光線의 影響이 가장 큰 가를 決定하고 生長과 葉綠素 形成을 支配하는 因子⁽⁸⁾⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾를 決定하기 爲하여 子葉을 形成하는 細胞의 各部分 即 Celldebris, Mitochondria, Microsomal fraction等을 分離해서 蛋白質代謝에 重要한 Glutamic Alanine Transaminase, Glutamic Aspartic Transaminase 등의 活性度⁽¹¹⁾⁽¹²⁾를 測定하였다.

本研究에 있어서 李殷喆 金廣植 兩碩士의 親切한 助力에 對하여 感謝하는 바이다.

II. 材料 및 方法

(1) 供試植物種子の 發芽

供試植物種子是 大豆(콩나물 콩) Glycine Max

(L) Merrill을 이용했으며 이를 28°C에서 光線下와 暗所로 나누어 10時間 浸漬(更水10回)하여 물로 洗滌하여 節別한 細砂가 들어있는 Pot에 심었다. 種子는 Pot의 上面에 反程度 露出시켜 發芽時間 充分히 光線이 照射되도록 設하였으며 充分한 給水를 했다. 發芽時間中 100V 100W의 電光으로 1m의 거리에서 照射했다.

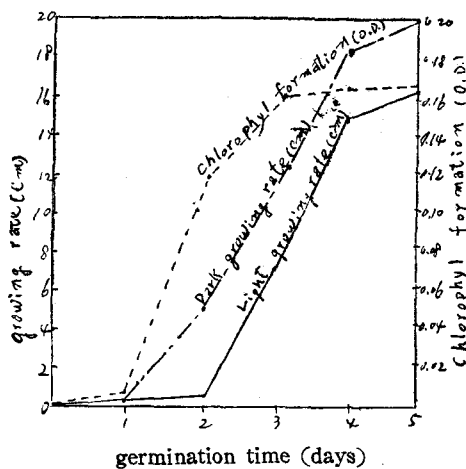
II. 發芽種子子葉의 全酵素液調製 및 그 活性化度 測定

A) 發芽種子子葉의 全酵素液調製는 Alvin Nason法을 主로 參考하여 暗所와 光線下에서 發芽한 子葉을 發芽期間中 每日 午前 10時에 採取하여 1gr 式 秤量한 後 0.25m Sucrose溶液을 5ml 加하여 2000 RPM의 Homogenezer로 5分間 磨碎한 다음 다시 0.25m Sucrose Buffer Solution을 4ml 式 加하여 攪拌後 1700 RPM으로 遠心하여 沈澱物은 除去하고 上澄液 3ml을 取하여 全酵素液으로 했다.

B) 發芽種子子葉의 細胞 各部分 酵素液 調製

上述한 上澄液에서 3ml를 取하여 International equipment Co 製 20,000×8Type 遠心器로 1,000g에서 10分間 遠心하여 Cell Debris를 分離하고 그 上澄液을 다시 10,000g에 分 10分間 遠心하여 Mitochondria(下部)와 Microsomal fraction(上部)을 分離하여 Cell Debris와 Mitochondria에 0.25m Sucrose Buffer Solution을 加하여 Microsomal fraction과 同一量으로 調節하여 細胞 各部分의 酵素液으로 하였다.

Fig. I Effects of the light on the formation of Chlorophyll and growth of germinating peas.



C) 發芽種子의 酵素活性化度 測定

이는 主로 Stanley Reitman, Sam Frankel. H.의 方法을 利用했다.

D) 發芽種子子葉의 葉綠素 含量測定

葉綠素는 石油—ether 45ml Benzen 7ml, Methyl alcohol 15ml 混合液을 Mortar로 잘 磨碎해서 2,000 R. P. M.에서 10分間 遠心하여 上澄液을 Spectrophotometer로 550m μ 에서 Optical density를 測定하여 葉綠素含量을 決定하였다.

III. 實驗結果

A) 發芽種子子葉에 있어서 GOT Activity, 葉綠素形成 및 光線과의 相互關係

本 實驗에 있어서는 葉綠素는 生長이 增加함에 따라서 增加하였으며 暗所에 있어서는 葉綠素의 形成을 볼 수 없었다. 그리고 子葉 全體의 GOT Activity는 光線下에서는 生長이 增加함에 따라서 增加하여 3日間 生長 後에는 次次 減少하는 傾向을 보였다.

그리고 暗所에서 發芽한 子葉은 發芽過程中 거의 一定한 GOT Activity를 나타냈다. 細胞 各部分에 있어서 G. O. T. Activity에 對한 光線의 影響을 보면 Mitochondria에 있어서는 發芽過程中 GOT Activity는 相當히 減少했으며 Cell Debris에서는 增加하는 傾向을 보이다가 末期에는 減少하였다.

그리고 Microsomal fraction에 있어서는 漸進的

Fig. II Effects of the light on the distriauion of GOT activity in the Cotyledons of germinating peas.

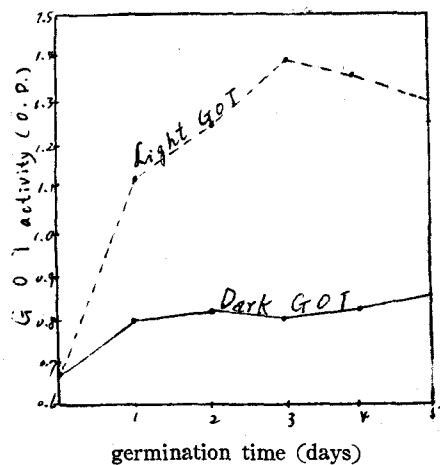
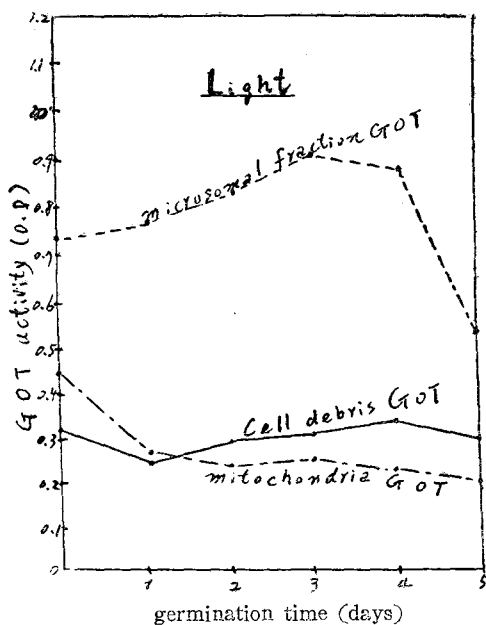


Fig III (A) Effects of the light on the distribution of GOT activity in the fractions obtained from cotyledons of germinating peas. (growth in the light)

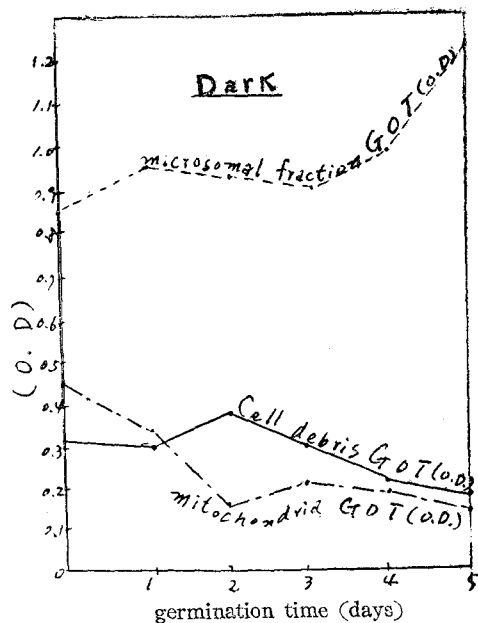


으로 증가하였다. 그 결과를 보면 Fig(I)(II)(III A)(III B)와 같다. 暗所에서 發芽한 子葉은 葉綠素의 形成을 볼 수 없으나 生長率은 大端히 增加하고 Cell Debris Mitochondria는 初期에는 若干 減少하나 發芽末期에는 거의 一定한 結果를 나타냈으며 光線下에서와 暗所에서의 Microsomal fraction의 GOT Activity는 反對되는 結果를 보였다. (Fig III A Fig III B)

B) 發芽種子子葉에 있어서 GPT의 Activity, 葉綠素形成 및 光線과의 相互關係

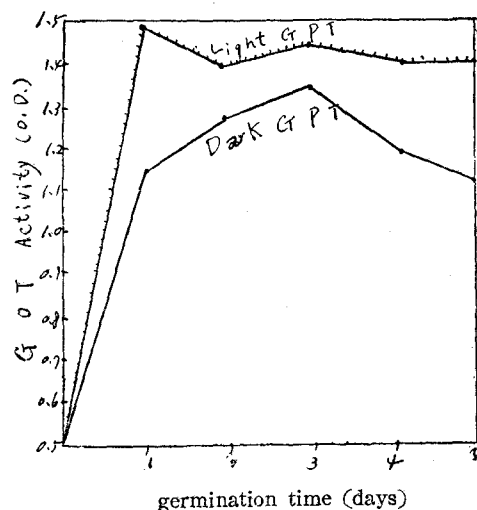
本 實驗에 있어서는 葉綠素形成과 生長率 그리고 GPT에 對한 光線의 影響을 보았는데 生長率에 있어서는 前述한 實驗에서와 같이 光線下에서의 生長率보다 暗所에 있어서 生長率이 相當히 增加했으며 子葉全體의 GPT를 보면 一般적으로 光線下에서 發芽한 것이나 暗所에서 發芽한 것이 거의 同一한 傾向으로 發芽 第一日에 있어서 뚜렷한 Activity의 增加를 나타내어 末期에 이르면 多少 減少하는 傾向이 있으나 全體적으로 보아서 光線下의 GPT Activity가 暗所에서 보다는 增加되었음을 보여주고있다. 葉綠素形成은 前記한 바와같으나 暗所에 있어서 細胞 各部分의 GPT Activity를 보면 Microsomal fraction에 있어서는 發芽過

Fig. III (B) Effects of the light on the distribution of GOT activity in the fractions obtained from cotyledons of germinating peas. (growth in the dark)



程 第一日에는 急速히 增加하였다고 漸次 減少되었으며 Mitochondria는 發芽함에 따라서 減少하였다가 發芽過程 4일부터 5일까지에는 相當히 增加

Fig. IV Effects of the light on the distribution of GPT activity in the cotyledons of germinating peas.

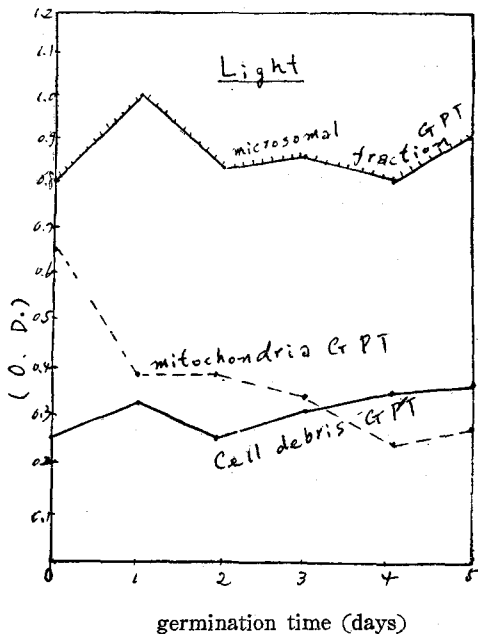


하였다.

그리고 Cell Debris는亦是發芽中 3日間은 同一한 傾向으로 減少하였다가 若干 增加하는 傾向이 있다.

大體로 GPT의 Activiy 順位를 보면 Microsomal fraction이 가장 強하며 Mitochondria, Cell Debris의 順으로 되고 Microsomal fraction은 Cell Debris에 比하여 그 Activity가 約 3배에 達하고 있는 境遇도 있다.

Fig. V (A) Effects of the light on the distribution of GPT activity in the fractions obtained from cotyledons of germinating peas. (growth in the light)



IV. 考 察

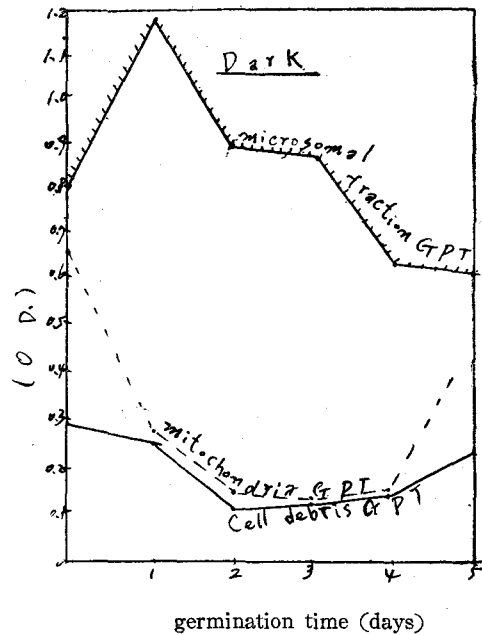
A) 植物에 있어 Transaminase Activity에 對한 研究는 처음에 Kritzman이 Pea에 對한 GL→AL, AS→AL等에 對해서 報告한 바있으며 그後 Cedrangolo Caranadante가 種子等에 對해서 그 Activity를 測定했으나 分析法이 定性的이고 信賴性이 적었다고 한다. (14)

著者는 上述한 두 가지 Transaminase 1,2에 對하여 大豆를 供試植物로서 實驗하였는데 Fig (I) (II) (III A) (III B)에서 본바와같이 發芽過程에 있어서 子葉內의 GOT는 暗所에서 發芽한 것은 發芽期間 거의 變化가 없으나 光線下에서 發芽한 것은

以上 結果는 Fig (I) (II) (IV) (VA) (VB)와 같다. 光線下에서 GPT activity를 보면 Microsomal fraction에 있어서는 暗所에서와 같이 急激한 增加 減少는 나타내지 않으나 大體로 緩慢한 增減을 나타내며 末期에는 若干 增加하는 傾向을 보였다.

Cell Debris Mitochondria는 光線下에서 거의 비슷한 結果를 나타냈으며 그 結果는 Fig (VA)와 같다.

Fig. V (B) Effects of the light on the distribution of GPT activity in the fractions obtained from cotyledons of germinating peas. (growth in the dark)



相當히 變化가 있었다. GOT Activity는 最高 約 1.7배가 增加하였다.

그러나 生長과 葉綠素形成이 緩慢해짐에 따라 그의 比例해서 減少하였다. 葉綠素가 形成되지 않은 暗所에서는 生長은 빠르나 GOT가 一定한 値를 取한다는 것은 確實히 生長과는 關係가 적은데 葉綠素形成과는 關係가 크다는 것을 證明하고 있다.

Rowell young에 依하면 暗所 發芽過程에서 Amylase phosphatase는 發芽過程과 併行해서 子葉內에서 急激히 增加하고 있는데 對해서 Protease는 거의 一定値를 維持했었으며 또 Ernst Schlutz (15)가 幼植物에 對해서 實驗한 結果에 依하면 暗所에서는 Aspartic Acid가 蓄積된 것이 光線下에

서는 消失된다는 것을 實證하였다.

이것은 바로 GOT의 Activity의 增加를 意味한 것이며 Protease와는 比例的이고 Amylase, phosphatase와는 反比例的인 關係가 있다고 본다. GOT의 Activity增加에 依하여 形成된 Glutamic Acid는 Chromatography에 依하면 發芽前과 거의 同量인 것을 認定했는데 이것은 Glutamic Acid의 代謝가 子葉內에서 增加한다는 것이며 急速한 Glutamic Acid의 deamination이 Sivarama Krishnan⁽⁹⁾에 依해서 實證되었다. 이와같이 增加되는 GOT Activity가 細胞의 어느 部分에서 增加하는가는 Fig (III A)에서 볼 수 있다. 即 Cell을 Cell Debris, Mitochondria, Microsomal fraction으로 分離해서 各部分의 GOT Activity를 測定한 結果 Cell Debris와 Mitochondria는 實驗誤差內에서 거의 平行으로 增減이 없으나 Microsomal fraction에 있어서는 暗所發芽에 있어서도 相當한 差가 있었다. 特히 發芽後 4日부터는 Cell Debris Mitochondria는 若干 減少하는데 Microsomal fraction은 오히려 增加되고 있었다는 것은 Rowell young의 暗所發芽에서 Protease의 增加가 없다는 것을 參考할때 이 條件下에서는 GOT를 構成하는 Protein이 Cell Debris, Mitochondria內에서 合成되는 것이 아니고 오히려 Microsomal fraction (이 中에는 Light Mitochondria, Microsomal fraction) Supernatant로 分離될 수 있는 部分이 混合되어 있다.)內에 있는 proenzyme이 活性化解되며 生成된 것이라고 볼 수 있다. E.M Martina and R.K. Morton에 依하면 酵素에 따라서는 Mitochondria에서 生起되는 것도있고 Microsomal fraction에서 生起되는 것도있는데 그의 報告한 바를 檢討한 結果 dehydrogenase에 屬하는 酵素는 주로 Mitochondria에서 生成되고 DPNH-Cytochrome C. Reductase, DPNH-diaphorase等은 Microsomal fraction에서 生成되고 있다.

이와같은 見地에서 볼때 GOT는 dehydrogenase보다 오히려 Reductase와 密接한 關係가 있으며 이것은 一種의 Exchange Reduction을 일으키는 酵素이므로 條件에 따라서는 어데서나 生成되어야 할 것이다. Fig (III B)에서는 光線下에서 細胞各部分의 GOT가 如何히 變化하는가를 보는 것이며 Fig (III A)에서 보는 바와같이 Cell Debris, Mitochondria等에서는 相應한 變化를 보이고있다. 여기서 볼때 光線은 주로 Microsomal fraction에 影響을 미치며 上述한 바와같이 葉綠素合成은 주로

이 部分에서 이루어진다고 본다.

B) Fig IV는 GPT에 關한 것인데 여기 서로亦是 光線下의 GPT Activity는 暗所에서 發芽한 것보다 크다.

그러나 그 變化는 처음에 急激히 增加한 後는 發芽期間 平衡의으로 變化한다.

이는 $GL + Pu \rightleftharpoons KG + AL$ 에서 Pu나 GL의 反應係로부터의 除去가 이 反應을 左測으로 促進시키든지 或은 Transaminase의 活性自體가 增加되든지 할 것인데 初期에는 GPT自體가 活性化되었고 其後 暗所에서는 Pu의 增加로 因해서 GPT는 一定한 值를 維持한다고 본다.

Pu의 增加될 可能性은 Amylase活性的에 依한 Glucose의 生成에 基한다고 본다. 勿論 Glutamic Acid는 GOT때와 같으니까 여기서는 Pu만을 考慮하고있다.

C) Fig (VA)는 GOT의 경우와 같이 Cell의 各部分에 따라서 GPT Activity의 增減을 光線下의 發芽過程에서 考慮한 것인데 GPT도亦是 Microsomal fraction에 가장 많이 含有되어있고 Cell Debris, Mitochondria에는 量이 적다. Fig (VB)도 同一한 傾向을 보이고 있다.

여기서 光線의 影響을 받는 子葉과 細胞各部分의 GOT와 GPT間的 關係는 Green, Loir Nocito⁽¹⁷⁾等에 依하면 GOT가 GPT보다 Activity가 大端히 크게 되어 있는데도 不拘하고 本 實驗에서는 GPT Activity가 오히려 크다는 것은 이들 可逆的인 反應에서 Products의 除去 或은 缺乏이 重要な 因子가 되겠는데 前記 D.A. walker, H. Beever에 依하면 Mitochondria內에서는 Krebs Cycle에 關與하는 Oxalacetic-Acid, Malic Acid, Fumaric Acid, Succinic Acid α -K.G. iso citric Acid cis acotinic Acid, Citric Acid等 中에서 Pyruvate의 酸化를 많이 促進시키는 것이 Oxalacetic Acid, Succinic Acid, α -KG인데 Microsomal fraction內에서는 Reductase가 많다는 事實에서 Pyruvate의 酸化는 抑制될 것이며 따라서 結局 光線下에서는 Amylase의 失活에 依한 Pyruvate의 缺乏이 GPT Activity增加의 重要な 原因이된 것 같으며 GOT의 경우도 大略같은 傾向이라고 본다.

V. 總 括

1. 暗所와 光線下에서 發芽된 콩의 子葉의 新鮮한 抽出物은 各 Fraction으로 分離해서 各各에 對한 GOT, GPT Activity를 研究하기 위하여 이들

에 依해서 生成된 Oxalacetate, Pyruvate에 (前者에 對해서는 Aniline Citrate을 加해서 Pyruvate로 만들어) 2.4-dinitrophenyl Hydrazine을 加해서 Pyruvate 2.4 dinitrophenyl Hydrozone으로 變化시켜 이의 alkali Solution中에서 色의 濃度を Beckman Model D.U spectrophotometer로 測定했다.

2. 暗所에서 生長한 子葉과 光線下에서 生長한 子葉에 對해서 前述한 것과같은 方法으로 GOT, GPT를 測定한 結果 兩者間에 顯著한 差異가 生겼다. 即 光線下에서 生長한 子葉內에는 GOT GPT의 Activity가 暗所에서 生長한 子葉보다 크며 發芽過程을 通해서 變化하는 現象도 다르다.

各 GOT GPT의 關係를 對照하면 GOT는 漸進的으로 增加하고 GPT는 急激히 增加하는데 Chlorophyll形成에는 GPT가 GOT보다 큰 影響을 주고 生長에는 GOT가 GPT보다 二次的인 關係를 가지고 있다고 본다.

3. 各 fraction에 있어서의 GOT GPT를 보면 이들은 一般的으로 Microsomal fraction에서 Proenzyme의 活性에 依해서 生기며 光線은 이의 活性을 促進한다고 본다.

4. Chlorophyll을 形成하는데 있어서 蛋白質 代謝過程은 주로 Microsomal fraction에서 일어나고 律速段階는 GOT GPT를 生成할 수 있는 proenzyme을 活性化시키는 點에 있으며 이는 日光에 의해서 促進된다고 본다.

VII. 引用文獻

1. J Lowell young bud J.E. Varner (1959) Archives of Biochemic and Biophysics 84, 71-78
2. Borner, J (1950) "Plant Biochemistry" P59 P304 Academic press, New York.
3. D. A Walker and H. Beever (1956) Biochem J. 62 120
4. E.D Coru et al (1960) Biochem J 75
5. M.D. Hath et al (1960) Biochem J 75 66
6. E.R Martin R.K Marton (1956) Biochem J 64 221
7. Hisao Ishikawa and Katsumi Takaich (1957) 日林誌 39 70
8. Johu B Walff (1959) Archives of Biochem and Biophysics 72, 293
9. V.H. Sibaromakrishnan and P.S Sarwa (19

- 56) Biochem J 62 132.
10. David W. and Krowan (1958) Archives of Biochem and Biophysics 76 75
11. E.E Jacob S AS Holt et al (1957) Archives of Biochem and Biophysics 72, 495
12. Philip Cabawd Robert Leeper et al (1956) An J.P.C 26 1101
 - A) M.L Anson John T. EDSON (1947)
 - B) "Advances in protein chemistry" N. vol 3 P23 Arcodemic press N.P.
13. Sidrey P. Colowick and Nathan Kaplan (1955) "Method in Enzymology" vol I p62
 - C) Philip Cabawd Robert Leeper et al Am J.C.P. vol26 P1101 (1956)
 - D) 京大農藝化學教室編 農藝化學實驗書 Vol2 p774
14. Stanley Reitman and Sam. Frankel (1957) An J.P.C 28 P57
15. Above (B) P22
16. Above (2) P300
17. N.S Radin D. Rittenberge D. Shemin (1950) J.B.C 184 P745. 755
18. Above (B) P52

Summary

In order to study the rate control step in the protein metabolic course of the chlorophyll formation, the transaminase activities which are obtained freely in the extracts of cotyledons of germinating peas at the light and the dark places, are measured in Beckman moppel D.U, spectrophoto meter at 490 mu.

In this case, of two enzymatic reaction products: oxalacetic acid and pyruvic acid, the former is converted to pyruvic acid by aniline citrate and after each pyruvate phenyl hydrazones are extracted by toluenes; when this is treated with strong alcoholic alkali, a colored hydrazone is formed and it is measured by above apparatus.

The estimated G.O.T. and G.P.T. in the germinated cotyledons at dark and light places considerably differ in their activities: G.O.T. and G.P.T. activities which are formed at the light are more increased than at the dark and

also they differ in their rates through germination, though G.O.T. activity increment is smoothly but that of G.P.T. is more sharply, and they are considered to be directly affected to the chlorophyll formation and indirectly to the growth.

G.O.T. and G.P.T. in each fractions of cell in the cotyledons should be formed by dissocia-

tion of zymogens in the microsomal fractions and it seems to promoted by light.

In the formation of the chlorophyll, the protein metabolism occurred mainly in the microsomal fractions and the rate determining step is found at the point where the zymogene that is able to produce G.P.T. is activated, and this activation is promoted by light as noted above.