

콩科植物花粉의 Leucine Aminopeptidase 檢出과 그 Isozyme에 對하여

郭 炳 華
(高麗大學校 農科大學 園藝學科)

Identification of Leucine Aminopeptidase in Legume-Pollen Extracts
and the Isozymes

KWACK, Beyoung-Hwa
(Dept. of Horticulture, College of Agriculture, Korea University)

ABSTRACT

Identification and observations of leucine aminopeptidase (LAP) and multiple molecular forms of the enzyme, isozymes, were made with a technique of starch-gel electrophoresis for various legume pollen. Plants tested other than *Leguminosae* demonstrated either no indication of the presence or at least trace of the enzyme and the isozymes, although all legume pollen tested showed strong LAP patterns.

The electrophoretic patterns of LAP failed to be shown if the extracts were heated or otherwise denatured. Extent of zymogrammatic appearance of LAP and the isozymes were characteristic of a species.

緒 論

植物에 있어서의 生理現象을 左右하는 重要한 體內物質은 結局 蛋白質이겠지만 그 中에서도 特別 各種 酵素의 役割이 크다(Bonner and Varner, 1965). 同一酵素 가운데에서도 種類에 따라서는 分子의 크기가 다른 各種의 相同한 酵素 即 isoenzyme 또는 isozyme이 存在한다는 것이 近來 알려져 있는데(Markert and Møller, 1959; Beckman, 1963) 植物에 對해서는 처음으로 옥수수에서 Schwartz (1960)가 電泳法的 그리고 免疫學的分析으로서 이를 表現했으며 特別 簡便하고 正確성이 높은 starch-gel을 利用한 電泳分析으로 옥수수酵素에서 各種 isoenzyme(isozyme)을 쉽게 分離함에 이르렀다(Scandalios, 1964). 最近 高等植物의 花粉을 利用하여 各種 酵素의 isozyme이 存在함을 指摘하고 있는데(Mäkinen and Brewbaker, 1967) 이 中에서도 Beckman *et al.* (1964)에 依하면 aminopeptidase가 starch-gel로서 比較的 簡單히 容易하게 檢索되고 또 그 isozyme을 調查할 수 있는 것으로 알려져 있어 筆者는 近來 發達된 所謂 starch-gel electrophoresis 法(Beckman *et al.*, 1964; Brewbaker *et al.*, 1968)을 利用하여 몇몇 園藝植物의 花粉에서 leucine aminopeptidase(LAP)가 特殊植物에 限하여 甚히 檢出되었으므로 그들의 isozyme의 出現과 그 程度에 關連해서 本報에 그 研究結果를 報告하는 바이다.

材 料 및 方 法

Starch-gel electrophoresis에 使用된 澱粉은 Canada의 Toronto市에 있는 Connaught Medical Research Laboratories의 元製인 所謂 "starch hydrolysed"의 36 gm를 緩衝液으로서 Ashton #1

(물 1l 中 LiOH 1.2 gm + H_3BO_3 11.8 gm)의 하나와 Ashton #2(물 1l 中 Citric acid 1.6 gm + Tris 6.2 gm)(Brewbaker *et al.*, 1968)의 아홉의 比率로 混合하여 300 ml(pH 6.0)에 投入하여 糊精化될 때 까지 끓이고 이것을 plastic 板上에 平穩히 부어서 冷却시켜 (約 7°C) 凝固케 하였다. 이것을 兩端이 前記한 Ashton #1 液이 들어있는 tank에서 上昇된 sponge 크서 starch gel을 若干 떼게하고 Ashton #1 液이 든 tank에 濾過筒(濾器)로부터 連結된 白金極이 들어있어 여기에 15 ampere에 250 volt가 通하게 해서 plastic 兩端상의 sponge 위에 얼음이 든 그릇을 上下에 놓아 starch-gel을 約 5°C 内外로 維持되도록 했다. 負極側에 광로서 直線을 그어 各種 花粉抽出液에 1cm의 濾過紙片을 挿入하여 約 1~5時間 浸漬시켰다. 그 大體의 裝置는 Fig. 1에서 볼 수 있다. 그 後 starch-gel을 잘어내어 methanol : 물 : 氷醋酸을 1 : 1 : 0.2의 比率로 混合한 液이 約 30分間 固定시키고 Brewbaker *et al.*(1968)이 指摘한 Tris 緩衝液이 든 染色液(Tris-A 50 ml와 Tris-B 10 ml 그리고 H_2O 40 ml, Black K salt-diazonium dye—50 mg 및 1-leucyl- β -naphthylamide hydrochloride 40 mg 混合液)에 넣어 LAP의 位置를 檢出하고 따라서 그 isozyme의 存在를 證明하라.

以試한 花粉은 各種植物으로서는 주로 *Leucaena glauca*, *Erythrina indica*, *Crotalaria juncea*, *Strougyodon macrobotrys*, *Phaseolus vulgaris*와 *Vigna marina* 였으며 其他科 植物花粉으로서는 *Ricinus sativus*, *Lilium longiflorum*, *Oenothera organensis*, *Petunia inflata*, *Hordeum sativum*, *Stemmadenia galootiana* 등이 였으며 이들 花粉抽出液은 1ml 분에 約 25 mg의 採取花粉을 投入하여 10~20分間 放置하여 얻은 上澄液을 利用한 것이다.



Fig. 1. Set-ups of starch-gel electrophoresis applied in the present studies (p, power regulator; t, tray with ice cubes; s, starch-gel plate; c, buffer container with electrode).

結 果

各種植物 花粉과 同질에 屬하지 않는 豚骨科(*Euphoniaceae*), 백합과(*Liliaceae*), 목서과(*Oleaceae*), 가지과(*Solanaceae*), 벼과(*Gramineae*) 및 합죽드과(*Apocynaceae*)의 花粉은 LAP의 痕跡이 거의 나타나지 않았으며 다만 豆科(*Leguminosae*)에 屬하는 各種의 供試花粉의 抽出液에는 모두 LAP의 存在가 뚜렷했는데 濾過紙片에 浸漬시킬 때 花粉抽出液의 濃度를 높였을 때는 starch-gel 上的 LAP 表識이 더욱 明白해졌으며 各種植物 以外의 것은 花粉抽出液의 濃度에는 그다지 關係없이 LAP의 存在가 잘 認定되지 못했다. Fig. 2는 豆科의 *Leucaena glauca* 花粉抽出液(A), *Erythrina indica* (B) 및 백합과의 *Lilium longiflorum* (C)의 LAP 存, 不在狀을 나타

내고 있으며 LAP가 同질에 있어서만 確然했고 LAP는 또한 *Leucaena*와 *Crotalaria*의 帶線(band zone)에는 差가 있어 *Crotalaria*에는 2線으로 *Leucaena*가 가지는 LAP 外 또 하나의 LAP가 있어 *Crotalaria*의 isozyme을 表示하고 있다. 事實 各種植物에서든 類에 따라 LAP의 isozyme이 그 數에 있어서나 性質이 各各 다름을 알며 주었고 그 表現은 種이 따라 特異했다(Fig. 3). *Crotalaria* 花粉抽出液에 濃度를 變지한 石灰(50 및 500 mg/l의 Ca-sulfate와 Ca-hydroxide)를 넣어 酵素分子에 그 離散率이 높은 것을 利用해서 α -amylase 環境과 같이 이를 噴霧시키고 LAP 分子運動에 變化를 시켜본 생각(Beckiran *et al.*, 1964)을 했으나 Ca 添加時나 添加量에 따라 LAP 移動速度와 isozyme 表現形狀에는 아무런 變化가 없었으며(Fig. 5) 다만 花粉抽出液은 約 5% 内外 浸漬한 것은 豆科植

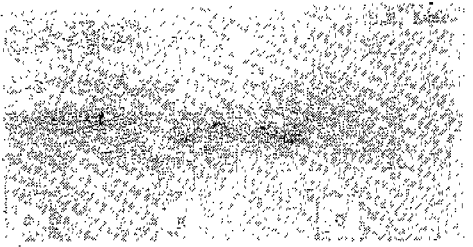


Fig. 2. Zymogram showing leucine aminopeptidase and the isozymes in pollen extracts of either *Leucaena glauca* (A), *Erithrina indica* (B), or *Lilium longiflorum* (C).

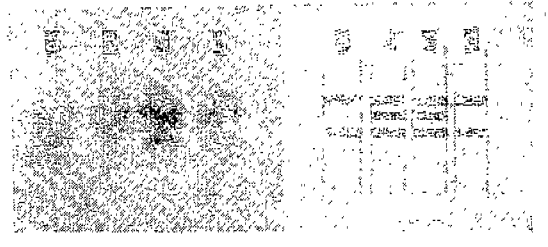


Fig. 3. Leucine aminopeptidase zymogram (left) and the diagrammatic representation (right) of four legume species (a, *Strogylodon macrobotrys*; b, *Erythrina indica*; c, *Phaseolus vulgaris*; d, *Vigna marina* pollen extracts).

物花粉抽出液의 特色인 LAP의 starch-gel 上에는 잘 나타나지 않았다.

考 察

LAP는 蛋白質合成에 있어서 leucine의 分離 및 結合을 擔當하는 酵素로서 動物과 植物에 있어서 多少의 差는 있으나 生物界에 比較的 널리 分布하고 있으며 甚之於 사람의 血清에도 LAP가 發見되고, 또 그 isozyme이 있음을 紹介하고 있다(Beckman *et al.*, 1964). Starch-gel electrophoresis에 있어서는 LAP를 비롯하여 esterase, catalase, peroxidase나 phosphatase 같은 酵素와 더불어 쉽게 그 存在를 確認할 수 있는 染色法이 發見되어 있기에 過去 2~3 年間に 이것이 相當히 研究對象이 되었는데(Beckman, 1963; Beckman *et al.*, 1964; Scaddalton, 1964; Brewbaker *et al.*, 1968). 주로 種子다른가 莖葉의 汁液을 利用하여 特別植物의 遺傳的인 背景을 探知하는 目的에서 研究되었던 것이다.

LAP는 特別히 우수수種子에 對한 starch-gel electrophoresis가 始初(Beckman *et al.*, 1964)인 것 같은데 Mäkinen과 Macdonald(1968)가 各種 植物의 花粉을 利用하여 LAP의 痕跡이 있는 것과 없는 것을 觀察한 일이 있지만 供試한 여러 種類 가운데서 콩과에 屬하는 植物이 하나 뿐이었던 關係인지 그 研究結果에 있어서는 콩과와 他科 植物과의 LAP 出現上 確然한 差를 發表하고 있지 않고 있는데 本研究에 있어서는 LAP가 花粉抽出液으로서 starch-gel electrophoresis로서 LAP와 그 isozyme으로 보아 콩과에서는 他科植物에서 보다 더 確然히 나타나고 있는 것을 指摘하는 바이다. 따라서 LAP 그 自體나 그 isozyme의 種類와 數가 콩과內에 있어 그들 花粉液이 表示하는 程度가 種類에 따라 相當히 特定的이었다.

콩과植物에 對한 이러한 點은 Mäkinen과 Macdonald(1968)가 指摘한 바 없으나 그들이 電泳時에 緩衝液으로 Ashton 外. trizina phosphate 등의 4種을 써서 esterase isozyme이 나타내는 Rf 值가 大同小異하더라는 事實外 LAP에 對한 isozyme 存在를 나타내는 starch-gel 上의 帶線 染色度가 表示하는 差異에 對해서도 言及이 안되어 있다. 技術的으로나 또 經驗的으로 보아 電泳速度를 보다

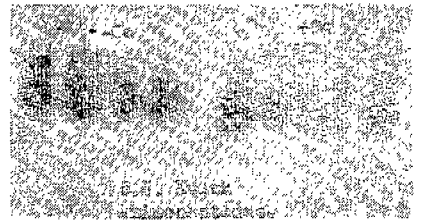


Fig. 4. Zymogram of leucine aminopeptidase from *Crotalearia juncea* pollen extract showing no difference in migration pattern and isozyme when with or without Ca.

낮게 할 때 콩과植物外의 花粉에 있어서도 LAP 帶線이 아주 弱한 程度이나마 나타나기 때문에 그 存在가 알려져 있기는 하다(Mäkinen and Macdonald, 1968). 過去 이 方面 研究者들이 指摘한 바와 같이 緩衝液의 種類差라든가 花粉發芽生長을 促進하는 Ca-ion의 添加效果(Kwack and Macdonald, 1965) 등은 本研究의 結果에 있어서와 같이 LAP와 그 isozyme 出現 및 移動速度 等に 變化를 주지 않는 것 같으며 다만 異種들의 花粉 LAP 사이에는 오로지 遺傳的인 特異性 即 種類別 特異性을 잘 찾아 볼 수 있음을 알 수 있었던 것이다. 酵素가 60°C 以上の 高温에서 加熱되어 凝固하면 電泳을 期待못 할 뿐만아니라 LAP等 出現이 zymogram 에는 나타나지 않는 것이 當然한 일이다. 그러니까 콩과植物花粉에 있어서의 LAP와 그 isozyme의 存在意義는 結局 花粉發芽 및 伸長時에 leucine을 통한 蛋白質合成 또는 分解가 他科의 그것보다 程度가 높거나 더욱 뚜렷하다는 것을 暗示해 주고 있다.

摘 要

Starch-gel electrophoresis 法을 利用하여 他科植物花粉에는 잘 檢出되지 않는 leucine aminopeptidase의 뚜렷한 存在가 콩과植物에서 認定되었으며 콩과植物內에 있어서도 種類에 따라서 그 isozyme이 存在하여 分子의 크기가 다른것 또 그것이 있는 것과 없는 것 등이 發見되었고 이들을 高温에서 加熱하거나 分解시키지 않는 以上 그 表現이 環境要素에 따라 쉽게 變하지 않는 것을 알 수 있었다.

文 獻

1. Beckman, L., 1963. Serum protein variations in primates. Symp. Zool. Soc. (England) 10:251-261.
2. Beckman, L., Scandalios, J. G. and Brewbaker, J. L., 1964. Genetics of leucine-aminopeptidase isozymes in maize. Genetics (USA) 50:899-904.
3. Bonner, J. and Varner, J. E., 1965. Plant biochemistry. Academic Press, Inc., N.Y.
4. Brewbaker, J. L., Upadhyya, M. D., Mäkinen, Y. and Macdonald, T., 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. III. Gel electrophoretic methods and applications. Physiol. Plant. (Sweden) 21:930-940.
5. Fisher, E. H. and Stein, E. A., 1960. Alpha-amylase. In: the enzymes (Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrbäck, K. eds.) 4:313-343, Academic Press, Inc., N.Y.
6. Kwack, B. H. and Macdonald, T., 1965. The role of calcium in pollen growth as expressed by various water-soluble substances. Bot. Mag. (Japan). 78:163-170.
7. Mäkinen, Y. and Brewbaker, J. L., 1967. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. I. Diffusion of enzymes out of intact pollen grains. Physiol. Plant (Sweden). 20:477-482.
8. Mäkinen, Y. and Macdonald, 1968. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. II. Pollen enzymes and isoenzymes. Physiol. Plant (Sweden). 21:477-486.
9. Markert, C. L. and Møller, F., 1959. Multiple forms of enzymes. Tissue, ontogenic and species specific patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 45:753-763.
10. McCune, D. C., 1961. Multiple peroxidases in corn. Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA), 93:723-730.
11. Scandalios, J. G., 1964. Tissue-specific isozyme variations in maize. Jour. Heredity (USA) 55:281-285.
12. Schwartz, D., 1960. Electrophoretic and immunochemical studies with endosperm protein of maize mutants. Genetics (USA). 45:1419-1427.