Korean Journal of Botany
Vol. 26, No. 4, 173~180(1983)

Canavanine에 依한 보리 無胚部 種子의 Amylase 活性과 蛋白質 含量의 變化

全 芳 郁·高 碩 賛·權 寧 命
(서울大學校 自然科學大學 植物學科)

Canavanine Effects on the Amylase Activity and Protein Content in Barley Half Seeds

Jun, Bang Ook, Suck Chan Koh and Young Myung Kwon
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

L-canavanine was added to GA_3 treated barley seeds, and induced amylase activity, soluble protein content, and arginine content were measured. Canavanine, added at the beginning of the incubation period, inhibited amylase activity and protein accumulation. Amylase activity decreased markedly by addition of canavanine at 6 hr after incubation, where soluble protein content was not affected. The addition of canavanine after 12 hr incubation did not show serious inhibitory effect on the amylase activity and protein accumulation. GA_3 incubation caused decrement in arginine content per mg protein, but it was somewhat recovered by canavanine treatment. The longer the time between GA_3 and canavanine addition was, the less the recovery ratio was. Arginine content in the α-amylase fraction (ammonium sulfate 20~50% saturation) was lower than in 0~20% fraction, but higher than in 50~80% fraction. These results and control experiments, using cordycepin and cycloheximide, support the idea that canavanine might incorporate into protein.

緖 論

Arginine과 構造가 類似한 非蛋白質性 아미노산인 canavanine은 大部分의 生物에서 代謝拮害劑로서의 特性을 나타내는데 微生物 및 動物에서 밝혀진 바에 依하면 canavanine이 이러한 毒性을 나타내는 理由는 主로 arginyl t-RNA가 arginine과 canavanine을 區別하지 못하여 canavanine이 包含된 蛋白質이 一次的으로 合成되고 二次的으로는 이와 같이 만들어진 非正常的인 蛋白質에 依해 DNA, RNA 및 蛋白質 合成이 抑制되기 때문이라고 알려져 있다 (Rosenthal, 1977). 그러나 植物에서는 分子的인 水準에서의 canavanine의 作用性이 잘 밝혀져 있지 않다.

本 硏究結果는 1983年度 韓國科學財團 究硏費로 遂行한 內容의 一部임.

보리 糊粉層에서 誘導되는 amylase는 그 合成 機作이 比較的 잘 알려져 있기 때문에 canavanine의 作用性을 追求하는데 效果的인 biochemical marker로 使用될 수 있다. Gibberellic acid (GA_3)를 보리의 無胚部 種子에 處理하면 2~3時間까지 cycloheximide와 actinomycin D sensitive stage로서, α-amylase mRNA 合成 以前에 α-amylse 合成에 必要한 蛋白質의 合成이 進行되며 (Goodwin, 1974;Goodwin and Carr, 1972), 3~4時間 後부터 10時間 前後까지는 cordycepin sensitive stage로서 α-amylase mRNA의 合成이 일어나고 10時間 後부터는 그 水準이 最高에 到達한다. 따라서 α-amylase는 GA_3 處理 後 4~8 時間의 lag period를 거쳐 糊粉層으로부터 分泌되기 始作하며, 이 酵素의 合成率은 GA_3 處理 12時間 後에는 最大에 到達하고 이 때 α-amylase는 全體 可溶性 蛋白質의 약 40%를 차지하게 된다 (Ho, 1979).

本 實驗室에서는 이미 보리 無胚部 種子에서 GA_3에 依해 誘導되는 amylase 活性 增加에 미치는 canavanine의 影響을 調査하였는 바, canavanine은 GA_3에 依한 amylase 活性增加를 顯著히 抑制하였고, 이러한 抑制 效果는 arginine에 依해 減少될 수 있었으며, GA_3 處理 後 canavanine을 添加하는 時間 間隔이 커질수록 canavanine에 依한 amylase 活性 增加의 抑制 效果는 점점 減少하였다 (Park and Kwon, 1981). 그러나 canavanine이 amylase의 活性增加를 抑制하는 效果가 canavanine의 添加 時間에 따라 變化하는 理由가 GA_3 處理 後 일어나는 核酸 代謝의 어떤 段階를 低害한 結果로 蛋白質 合成이 抑制되기 때문인지, 또는 直接的으로 α-amylase의 合成을 抑制한 結果인지 確實치 않았다. 또한 amylase에 canavanine이 投入되었을 때 酵素 活性이 크게 달라질 수 있을 것인가도 알려진 바 없다.

따라서 本 實驗에서는 보리 無胚部 種子에 canavanine을 處理하였을 때 amylase 活性과 蛋白質 含量을 同時에 測定하고 cordycepin 및 cycloheximide를 處理한 境遇를 對照區로 하여 canavanine이 GA_3에 依하여 誘導되는 α-amylase 合成 및 活性에 미치는 分子的 水準의 作用性을 一部 究明하고자 하였으며 蛋白質 內의 arginine 含量을 調査함으로써 α-amylase 內에 canavanine이 投入되었을 때 amylase의 活性이 크게 달라질 수 있을 것인가를 間接的으로 알아보고자 하였다.

材料 및 方法

보리 (*Hordeum vulgare* L. cv. Baecdong) 種子의 處理와 全 amylase 活性의 測定은 Park과 Kwon (1981)의 方法을 따랐다.

Canavanine은 Folin-phenol 試藥을 還元시켜 Lowry法 (1951) 使用時 深刻한 誤差를 가져오므로 可溶性 蛋白質은 10% trichloroacetic acid로 沈澱시킨 後 Lowry法으로 500 nm에서 그 含量을 測定하였으며 이때 bovine serum albumin을 標準 蛋白質로 使用하였다 (Jun and Kwon, 1983).

蛋白質 內의 arginine 定量에 使用되는 p-nitrophenylglyoxal은 Steinbach와 Becker (1954)의 方法을 基礎로 合成하였으며 이때 p-nitrophenylglyoxal은 60.6%의 收率로 만들어졌다.

試料 內의 蛋白質과 free arginine은 Sephadex G-25 column을 使用하여 分離하였다. Syringe tube (ϕ=11.5 mm)에 5 ml의 前處理한 Sephadex G-25 gel을 넣고 蒸溜水로 充分히

씻어낸 다음 clinical centrifuge로 3分間 최대속도로 遠心分離한 後, 1.6 ml의 試料를 얻고 다시 3分間 遠心分離하였다. 低分子 物質이 排除된 蛋白質 溶液 中 一部를 取하여 蛋白質 內의 arginine 含量 測定에 使用하였다. 이 때 蛋白質의 回收率은 84%였다.

蛋白質 內의 arginine 含量 測定을 위해서는 Yamasaki 等 (1981)의 方法을 修整하여 使用하였다. 蛋白質 溶液 1 ml에 0.2M $CaCl_2$, 活性化된 trypsin 0.2 mg을 包含하는 0.01N HCl 溶液 0.1 ml를 添加하고 1M 燐酸緩衝溶液 (pH 8.0) 0.1 ml로 pH를 調整하여 6時間 동안 37°C 培養器에서 反應시킨 後, 이 溶液에 다시 0.2 mg pepsin을 包含하는 0.1N HCl 0.1 ml를 添加하여 2時間 동안 37°C에서 反應시켰다. 이 溶液에 0.3 mmole pyrophosphate, 0.45 mmole ascorbic acid를 包含하는 水溶液 (pH 9.0)를 1.7 ml 加하여 잘 섞은 後 10% (w/v)의 p-nitrophenylglyoxal의 methanol 溶液 25 μl를 添加하여 30°C에서 反應을 開始시켰다. 反應이 開始된지 正確히 30分 經過 後 475 nm에서의 吸光度를 測定하여 arginine 含量을 算出하였다. Bovine serum albumin을 標準試料로 使用하여 調査한 結果, 이 方法의 正確度는 91.4%였다.

結果 및 考察

Canavanine의 濃度가 amylase 活性 및 蛋白質 含量에 미치는 影響을 알아보기 위하여 GA_3와 同時에 各其 다른 濃度의 canavanine을 보리 無胚部 種子에 24時間 處理하여 amylase 活性과 蛋白質 量을 測定하였으며 이를 cordycepin과 cycloheximide의 境遇와 比較하였다 (Fig. 1). 添加한 canavanine의 濃度가 增加할수록 GA_3에 依한 amylase 活性 및 蛋白質 含量 增加는 더욱 抑制되었으며, 2 mM 以上에서는 amylase의 活性 增加抑制率은 60%이며 蛋白質 含量 增加 抑制率은 30%로서 一定한 水準을 維持하였다(Fig. 1a). 100 μM cordycepin은 amylase 活性 增加를 70%, 蛋白質 含量 增加를 30% 程度 抑制하였으며 (Fig. 1b), 10^{-4}M cycloheximide는 amylase 活性增加를 90%, 蛋白質含量增加를 100% 抑制하였다(Fig. 1c). 以上의 結果로 미루어 보아 비록 GA_3와 同時에 canavanine을 處理하더라도 cycloheximide처럼 蛋白質含量增加를 完全히 抑制하지 않는 것으로 보아 單純히 蛋白質 合成 抑制를 通

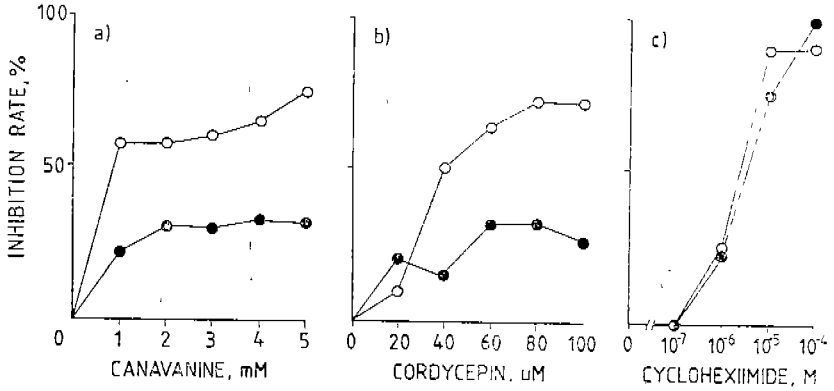

Fig. 1. Inhibition of GA_3 induced amylase activity (○) and protein accumulation (●) by canavanine, cordycepin, and cycloheximide in barley half seeds. The experiments were repeated 3 times; each value presents mean value of triplicates.

하여서 amylase 活性이 減少되었다고 解析하기에는 無理가 있다. Park과 Kwon (1981)은 初期에 處理한 canavanine의 濃度가 2mM 以上일 때 蛋白質 合成을 完全히 抑制하여, amylase가 合成되지 않아 그 活性이 減少되었다고 하였으나, 이는 本試料의 境遇, Biuret 法에 依한 蛋白質 定量時 白色 沈澱이 생기기 때문에(未發表 結果), 이 것이 實驗結果에 相當한 影響을 미쳤을 것으로 解析된다.

Canavanine이 어떤 經路를 通하여 amylase 活性을 抑制하는가를 一部 살펴 보기 위하여 canavanine, cordycepin 및 cycloheximide가 GA_3 處理 後, 時間 間隔을 두고 處理되었을 때의 amylase 活性과 蛋白質 含量에 미치는 影響을 調査하였다. 그 結果 canavanine, cordy-

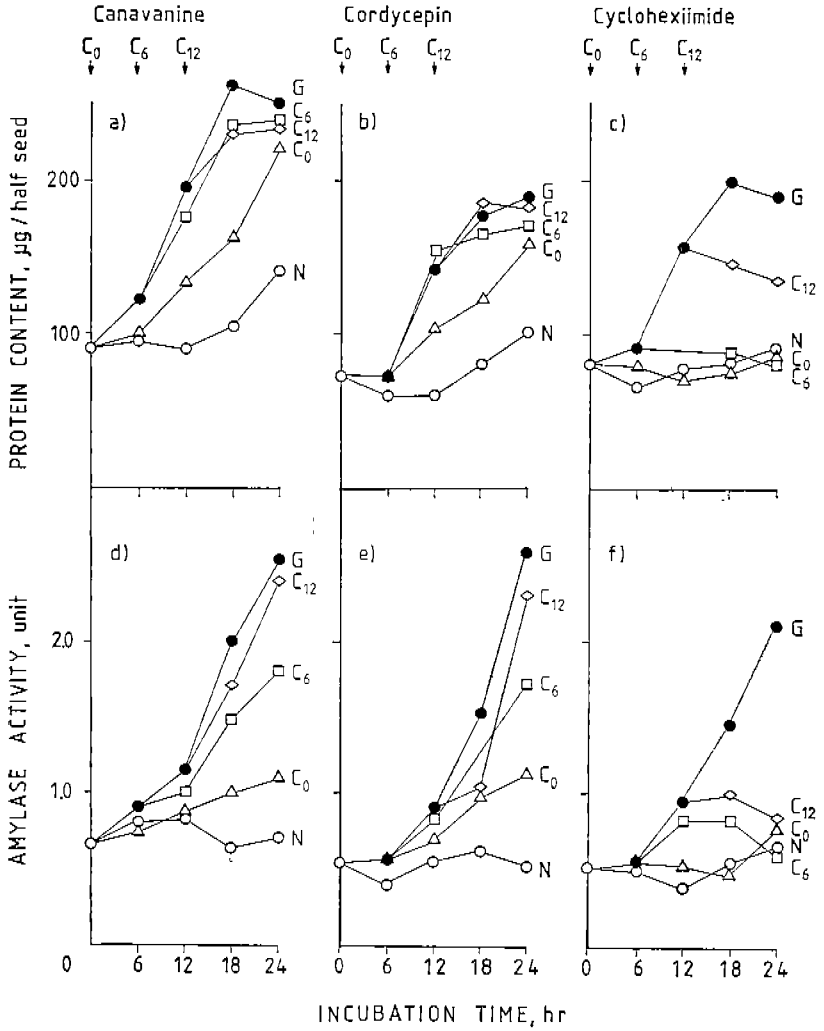

Fig. 2. Alteration of protein content and amylase activity after the addition of 2mM canavanine, 100μM cordycepin, and 10^{-4}M cycloheximide at intervals of 6 hr during the first 12 hr. GA_3, 3×10^{-6}M was added at the zero time. Abbreviation: N (○), no additions; G(●), GA_3 only; C_0 (△), C_6 (□), and C_{12} (◇), addition of chemicals.

cepin, cycloheximide는 다같이 GA_3 處理後, 添加時間에 따라 蛋白質 含量 增加와 amylase 活性增加를 顯著하게 抑制하였으나 그 樣相은 서로 달랐다 (Fig. 2). GA_3와 同時에 添加한 cordycepin은 蛋白質 含量 增加를 抑制하였으나 GA_3 處理 後 12時間만에 處理한 cordycepin은 蛋白質 含量에 影響을 주지 못했는데 (Fig. 2b), 이는 mRNA의 合成이 12時間 內에 終了된다는 것을 나타낸다. 反面, 各 時期에 處理한 cycloheximide는 蛋白質 含量 增加를 顯著하게 抑制하는 것으로 보아 (Fig. 2c), 實驗 全 期間을 通하여 蛋白質 合成은 持續되는 것을 알 수 있다. 初期에 處理한 canavanine이라도 蛋白質 含量 增加를 完全히 抑制하지 못하는 것으로 보아 (Fig. 2a), 確實한 證據는 없지만, 이미 transcription이 끝난 酵素 合成系는 (Bewley and Black, 1978) canavanine 處理時에도 繼續 作用할 것으로 思料된다. 또한 蛋白質만 合成되는 時期인 GA_3 處理後 12時間에 添加된 canavanine은 蛋白質含量을 低下시키지 않는다는 事實은 (Fig. 2a) canavanine이 이미 만들어진 mRNA에 依한 蛋白質의 合成을 抑制한다기 보다는 arginine代身 蛋白質 分子 內로 投入되어 活性이 낮은 蛋白質을 合成한다는 것을 意味한다 (Dahlman and Rosenthal, 1975). Amylase 活性역시 GA_3 處理後 canavanine 添加 時間에 따라 顯著히 그 增加가 抑制되었다 (Fig. 2d). Amylase가 보리 種子내 全體 可溶性 蛋白質의 40%를 차지한다는 事實에서 (Ho, 1979), GA_3와 同時에 添加된 canavanine은 二次的인 蛋白質 合成 抑制에 依해 amylase 活性을 抑制하였다고 思料된다. GA_3로 培養 6時間 經過 後 canavanine을 添加하면 蛋白質 含量은 GA_3만 單獨으로 處理하였을 때와 같고 amylase 活性增加는 40% 減少한 것은 蛋白質 合成이 되지 않아 amylase의 活性이 낮아진 것이 아니라, 蛋白質 內에 canavanine이 投入됨으로써 amylase의 活性을 低下시켰기 때문일 것이다. GA_3 處理 後 12時間에 添加된 canavanine은 蛋白質 含量 增加를 抑制하지 않았으며 amylase 活性 增加도 거의 抑制하지 않았는데 이는 GA_3 處理後 6時間에 添加한 境遇와 相當한 相異點을 나타내고 있다. 이는 12時間 以前에 이미 만들어진 amylase와 canavanine 添加 後에 만들어지는 amylase가 混合되어 나타난 結果일 수도 있으며, 時間에 따른 生體 內의 arginine 含量등 生理的인 差異에 따라 蛋白質 內로 canavanine이 投入되는 比率이 낮게되어 나타난 結果라고 推測되지만, 이에 對하여는 canavanine 投入時 amylase의 純粹分離 및 그 生化學的인 性質 究明 等의 많은 硏究가 뒤따라야 한다고 생각된다.

Table 1. Effect of GA_3 and canavanine on the arginine content per mg protein in enzyme extract

Addition*	Arginine Content
	μmole/mg protein
None	0.519±0.032
GA_3, 3μM	0.429±0.031
GA_3, 3μM+Can, 1 mM	0.482±0.006
GA_3, 3μM+Can, 2 mM	0.476±0.002
GA_3, 3μM+Can, 3 mM	0.434±0.023
GA_3, 3μM+Can, 4 mM	0.451±0.043
GA_3, 3μM+Can, 5 mM	0.450±0.053

* Samples were treated with chemicals for 24 hrs.

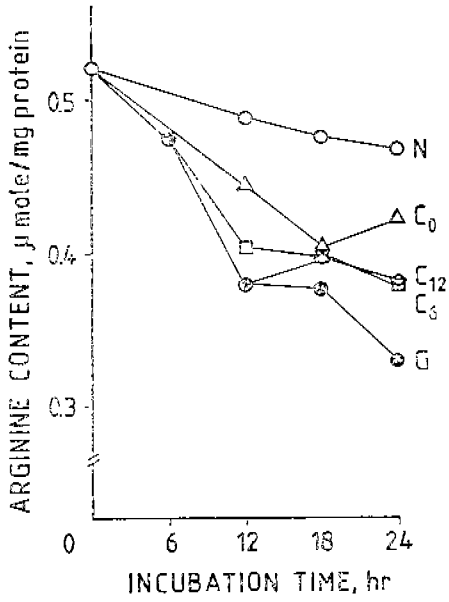

Fig. 3. Effect of 2mM canavanine addition time on the arginine content per mg protein in enzyme extract. Abbreviations are those given in Fig. 2.

Canavanine이 蛋白質 內의 arginine 含量에 미치는 影響을 調査하였다 (Table 1). GA_3를 處理한 對照區는 GA_3를 處理하지 아니한 對照區에 比하여 蛋白質 mg當 arginine의 含量이 減少하였다. GA_3가 處理되었을 때 合成된 蛋白質의 arginine 含量은 낮아지고, 이 때 蛋白質의 大部分이 amylase라는 報告로 (Ho, 1979) 미루어 볼 때 amylase 內의 arginine 含量은 다른 一般 蛋白質보다 낮은 것으로 推測된다. Canavanine을 添加하면 GA_3 處理 對照區에 比하여 蛋白質 mg當 arginine 含量이 커졌는데, 이는 初期에 GA_3에 依해 誘導된 arginine 含量이 낮은 蛋白質이 canavanine에 依해 合成이 抑制된다는 事實로 解析될 수 있다. 그러나 그 값이 GA_3를 處理하지 않은 對照區에 比하여 작은 것은 canavanine 處理時에도 蛋白質 合成이 어느 程度 繼續되기 때문이라 解析된다.

GA_3 處理 後, canavanine을 添加하는 時間 間隔이 커질수록 蛋白質 mg當 arginyl residue 數는 그 增加의 程度가 多少 緩化됨을 보여주고 있다 (Fig. 3). 이는 蛋白質 內에 canavanine이 投入되어 arginine 含量이 減少되는 程度보다 蛋白質合成이 抑制되어 arginine 含量이 增加되는 程度가 더 많음을 보여주고 있으며 時間이 지남에 따라 arginine 含量이 낮은 蛋白質 合成의 抑制가 줄어듬을 알 수 있다.

無胚部 種子의 粗酵素溶液을 ammonium sulfate로 分劃한 後, 各 分劃의 arginine 含量을 調査하여본 結果 (Table 2), 0~20% 分劃의 arginine 含量은 다른 分劃에 比하여 0.494로 相當히 높았으나 20~50% 分劃의 α-amylase 分劃과 50~80% 分劃의 境遇 各各 0.358과

Table 2. Arginine content of ammonium sulfate fractions of GA_3 treated barley half seed

Ammonium Sulfate Fraction	Protein Content	Amylase Specific Activity	α-Amylase Specific Activity	Arginine Content
%	μg/half seed	mg starch hydrolyzed/mg protein·min	△OD/mg protein·min	μmole/mg protein
Enzyme Extract	210	19.9	25.7	0.326
0~20	10	10.7	0	0.494
20~50	86	30.8	58.3	0.358
50~80	142	13.4	0	0.304

For α-amylase assay, enzyme solution was diluted to 1/5 with 20 mM $CaCl_2$ containing 1 mM Na-acetate buffer (pH 4.8) and this diluted solution was incubated at 30°C with 0.5 ml β-limit dextrin. The reaction was stopped by addition of 5ml of KI-I_2-HCl solution and resultant absorbance was measured at 525 nm (Stoddart, 1971). Standard β-limit dextrin was prepared from 500 mg starch solubilized in 1 mM Na-acetate buffer (pH 4.8) 100ml; the starch solution was incubated at 30°C for 30 min with 267 units of β-amylase and diluted to 2/5 with the same buffer.

0.304로써 全體 粗酵素溶液 內의 arginine 含量을 낮추는데 寄與하였다고 할 수 있다. 그러나 實際 α-amylase 內에 arginyl residue의 數가 얼마나 되는지에 대하여는 現在 直接的인 實驗結果가 없으므로 精製 等의 다른 實驗을 必要로 한다고 보여진다.

以上의 結果로 미루어보아 GA_3 處理 後 canavanine의 添加時間에 따라서 蛋白質 含量 및 amylase 活性의 減少程度는 달라지며 이렇게 달라지는 機作은 添加時間에 따라 다르다는 것을 알 수 있으며 또한 大部分이 amylase라 여겨지는, GA_3에 依해 誘導되는 蛋白質의 mg當 arginyl residue의 數는 다른 蛋白質의 境遇보다 적은 것으로 推定되었다.

摘 要

L-canavanine을 보리 無胚部 種子에 添加한 後, amylase 活性, 可溶性 蛋白質 量 및 arginine 含量을 測定하였다. GA_3와 同時에 canavanine을 添加하면 蛋白質 含量과 amylase 活性은 共히 低下되었으나, GA_3 處理 6時間 後 添加하면 蛋白質 合成은 GA_3만 單獨으로 處理하였을 때와 같고 amylase 活性은 40% 減少하였으며, 培養 12時間만에 添加된 canavanine은 蛋白質 合成과 amylase 活性을 抑制하지 않았다. 蛋白質의 arginine 含量은 GA_3를 處理하지 않았을 때보다 GA_3를 處理하였을 때에 더욱 낮아졌으나 canavanine을 添加하면 다시 回復되었으며, 이러한 回復程度는 GA_3 處理 後에 canavanine을 添加하는 時間 間隔이 커질수록 減少되었다. 한편 ammonium sulfate 20~50%의 α-amylase 分劃 內의 arginine 含量은 0~20% 分劃보다 낮았으나 50~80% 分劃보다는 높았다. 以上의 結果와 cordycepin과 cycloheximide를 處理한 實驗結果를 綜合해보면 canavanine은 蛋白質 內로 投入되는 것으로 推定된다.

參 考 文 獻

Bewley, J. D. and M. Black. 1978. Development, germination and growth. *In* Physiology and biochemistry of seeds 1, pp. 245~263. Springer-Verlag, New York.

Dahlman, D. L. and G. A. Rosenthal. 1975. Non-protein amino acid-insect interactions-I. Growth effects and symptomology of L-canavanine consumption by tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **51** : 33~36.

Goodwin, P. B. 1974. Early protein synthesis requirement for the hormonal enhancement of protein phosphorylation and α-amylase synthesis in barley aleurone cells. *In* Plant growth substances 1973 (Proceedings of the 8th international conference of plant growth substances), pp. 616~625. Hirokawa Publishing Co., Japan.

_____. and D. J. Carr. 1972. Actinomycin D and the hormonal induction of amylase synthesis in barley aleurone layers. *Planta* **106** : 1 ~12.

Ho, T-H. D. 1979. Hormonal control of enzyme formation in barley aleurone layers. *In* Plant molecular biology, I. Rubenstein (ed.), pp. 217~240. Academic Press, New York.

Jun, B. O. and Y. M. Kwon. 1983. Error in Lowry protein determination by canavanine. *Korean Biochem. J.* **16** : 360-363.

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.

Park, I. H. and Y. M. Kwon. 1981. Effect of L-canavanine on the GA_3 induced amylase activity in barley half seeds. *Korean Biochem. J.* **15** : 261~268.

Rosenthal, G. A. 1977. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Quart. Rev. Biol.* **52** : 155~178.

Stoddart, J. L. 1971. Sequential changes in amylase isozymes during grain maturation in barley. *Planta* **97** : 70~82.

Yamasaki, R. B., D. A. Shimer and R. E. Feeney. 1981. Colorimetric determination of arginyl residues in proteins by p-nitrophenylglyoxal. *Anal. Biochem.* **111** : 220~226.

(1983. 11. 29. 接受)