

發芽中 油菜子葉 퓨린 分解酵素의 活性變化 및 細胞內 位置

權德基·權寧命·洪英男
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

Intracellular Localization and Developmental Changes of Purine Catabolic Enzymes during Germination in Cotyledons of Rape Seedlings

Kwon, Duck-Kee, Young Myung Kwon and Young-Nam Hong
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Intracellular localization and the developmental changes in activities of uricase and allantoinase during germination were investigated with the cotyledons of rape (*Brassica napus* L.) seedlings. The development and disappearance of uricase activity took place independently of light, but allantoinase activity was increased by light. The temporal pattern of uricase activity showed that uricolysis was actively taking place in the cotyledons during their early stages of germination. While uricase can be localized in the microbody fraction isolated from crude organelle extracts of the cotyledons by density gradient centrifugation, most of the allantoinase activity found in the microbody fraction did not appear to be an integral part of the microbody.

緒 論

퓨린分解는 동물과 미생물에서는 그 과정이 잘 밝혀져 있으나 고등식물에서는 아직도 그 연구가 미흡한 실정이다 (Thomas and Schrader, 1981). 그러나, 퓨린분해 과정의 중간대사물인 ureide중 allantoin과 allantoic acid가 콩과식물을 비롯한 여러 식물에서 질소의 이동과 저장, 탄소의 보존 등에 있어서 중요한 化合物이라는 사실은 일반적으로 받아들여지고 있다 (Reinbothe and Mothes, 1962; Matsumoto *et al.*, 1977; Reynolds *et al.*, 1982).

특히, 물질대사를 통한 질소화합물인 난백질과 핵산의 분해는 분비기관을 갖고 있지 않은 식물체로서는 재이용하는 기작을 통하여 解毒과정과 아울러 매우 경제적인 대사를 하고 있다 (Richter, 1976). 그러므로 이들 분해과정에 대한 연구는 고등식물의 기초 대사에 중요한

이 논문은 1984년도 분교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

위치를 차지하고 있을 것으로 생각되고 있다.

퓨린분해 과정에 참여하는 한 효소인 uricase는 동·식물의 microbody에서 발견된다 (Hruban and Rechigl, 1969; Huang *et al.*, 1983). 그러나 그 외의 퓨린분해 효소들은 동물에서는 microbody에서 발견되었으나 (Scott *et al.*, 1969; Noguchi *et al.*, 1979), 植物에서는 콩과식물의 뿌리혹을 제외한 조직에서 조사한 결과는 아직도 논쟁의 여지가 남아 있다 (Theimer and Beevers, 1971; Hecker, 1982). 더우기 植物의 발달에 따른 분해효소의 活性變化는 거의 연구되지 않고 있는 실정이다.

따라서 本 研究에서는 발아중 유체자엽에서 일어나는 퓨린분해 효소 활성의 양상과 아울러 이 효소들의 세포내 위치를 조사함으로써 발아중 퓨린분해 효소의 출현과 퓨린분해를 담당하는 세포소기관을 밝히고자 한다.

材料 및 方法

種子の 處理. 本 研究에 사용된 油菜(*Brassica napus* L.) 種子를 1% sodium hypochlorite 용액에 20分間 담그어 표면살균한 후, 여과지(Toyo No. 2) 3장을 간 투명한 폴리프로필렌 용기(115×115×55 mm)에 파종하여 growth chamber 내에서 발아시켰다. Chamber 내의 온도는 25±2°C였으며 7,000 lux의 빛을 지속적으로 照射하였다.

酵素溶液의 製造. Uricase(UO; EC 1.7.3.3)의 活性測定을 위해서는 100쌍의 子葉을, allantoinase(AL; EC 3.5.2.5)를 위해서는 40쌍의 子葉을 잘라 5 ml의 0.07 M potassium phosphate완충용액(pH 8.0)에 넣고 1 g의 석영사와 함께 5分間 마쇄하였다. 특히 AL을 위해서는 0.75%(w/v) sodium deoxycholate를 함유한 완충용액을 사용하였다. 마쇄후 용액을 27,000 g에서 20分間 원심분리하고 상정액을 sephadex G-25 column(12×40 mm)에 통과시킨 후 효소활성 측정에 사용하였다. 위의 모든 과정은 4°C에서 실시하였다.

酵素的 活性測定. Uricase의 活性은 Müller and Møller(1969)의 방법을 수정하여 urate의 분해량을 293 nm에서 흡광도 감소로 측정하였고, 물 흡광계수 $1.22 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Müller and Møller, 1969)로부터 算出하였다. Allantoinase의 活性은 Hong(1978)의 방법을 수정하여 측정하였고, 물 흡광계수 $1.38 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Hong, 1978)로부터 算出하였다.

細胞小器官의 分離. 세포소기관의 분리는 Hong and Schopfer(1980)의 방법을 사용하였다. 파종후 4일된 유체자엽 15 g을 homogenization medium(sucrose 0.4 M, KCl 0.01 M, Mg-Cl₂ 0.001 M, EDTA 0.001 M, DTE 0.01 M, Tris 0.15 M, pH 7.5) 14 ml와 함께 면도칼로 다진 후 나일론 주머니에 넣고, 16 ml의 homogenization medium을 넣은 mortar에서 pestle로 눌러 짜내었다. 이 용액을 270 g에서 10분간 원심분리하고, 지질층을 제거한 상정액을 11,000 g에서 20分間 재원심분리하여 얻은 pellet에 2 ml의 homogenization medium을 첨가하여 재현탁시킨 후 이 용액을 30%~60%(w/w) sucrose density gradient 위에 얹고 65,000 g에서 7시간 동안 원심분리하였다. 이렇게 하여 얻은 용액을 0.7 ml씩 분획하였다.

酵素學的 基礎實驗. 생리실험에서 주어진 조건에 따른 효소학적 기초 자료는 근본적으로 차이가 있어서는 안된다. 그러므로 이를 확인하고 또한 효소 활성측정의 최적 조건을 결정하기 위하여 各 酵素的의 최적 pH, Km 값, 安定度를 조사하였다. 그리고 효소활성에 미치는 빛의 영향을 알아보려고 mixing experiment를 통하여 저해물질이나 촉진물질의 존재 여부를 조

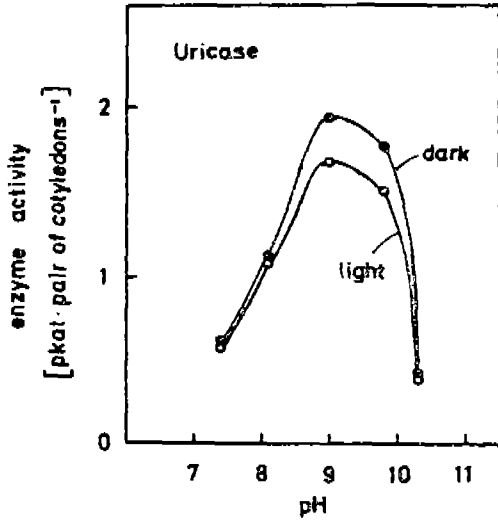


Fig. 1. The effect of pH on the activity of uricase from cotyledons of 72 h old dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings.

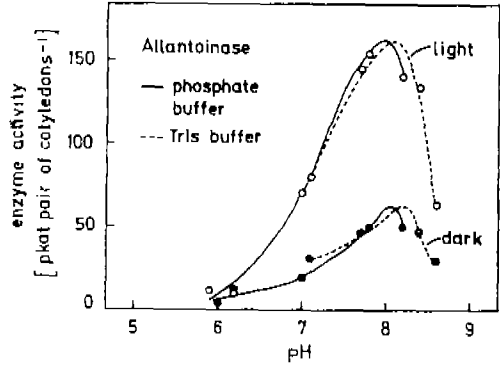


Fig. 2. The effect of pH on the activity of allantoinase from cotyledons of 72 h old dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings.

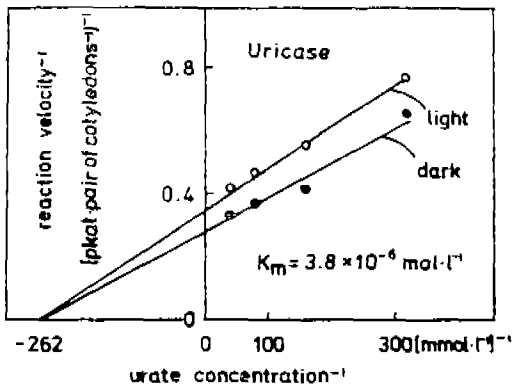


Fig. 3. The effect of substrate concentration on uricase activity from cotyledons of 72 h old dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings(Lineweaver Burk plot).

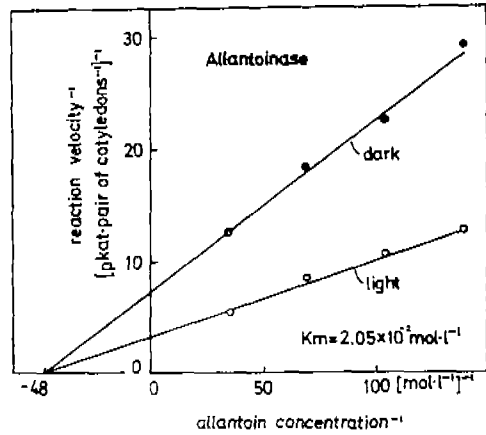


Fig. 4. The effect of substrate concentration on allantoinase activity from cotyledons of 72 h old dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings(Lineweaver Burk plot).

사하였으며, 그 결과는 다음과 같았다.

1. 최적 pH는 UO의 경우 9.0 (Fig. 1)이고, AL의 경우 8.0 (Fig. 2)을 나타내었다.
2. Km 값은 UO가 $3.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fig. 3)이었고, AL은 $2.05 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 이었다 (Fig. 4).
3. 各 酵素의 安定度는 UO는 12시간 이상 活性이 安定하였으나 AL은 6시간 후에 약 50%의 활성 감소를 나타내었다.

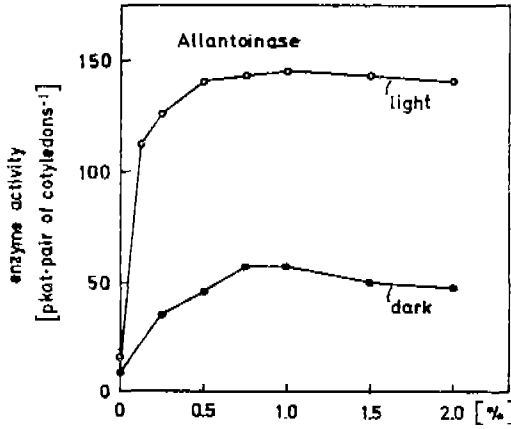


Fig. 5. The effect of Na-deoxycholate in the homogenization buffer on the activity of allantoinase in the enzyme extract.

4. Mixing experiment 결과, 효소 추출액 내에는 저해물질이나 촉진물질이 없음을 알 수 있었다.
5. 이상의 모든 결과는 암처리와 광처리한 것 사이에 차이점이 없이 동일하였다.
6. 효소추출 완충용액에 Na-deoxycholate 를 1%(w/v)까지 첨가하여 효소를 추출하였을 경우, UO는 아무런 효과가 없었으나 AL은 약 10배의 활성증가를 보였다(Fig. 5).
7. Xanthine oxidase (EC 1. 2. 3. 2)와 allantoinase (EC 3. 5. 3. 4)는 유채 자엽에서 측정할 수 없었다.

結果 및 考察

發芽中 子葉에서의 UO와 AL의 活性變化. 발아중 植物體의 酵素 活性變化는 그들이 관여하는 대사과정과 밀접한 관계가 있다. 그러므로 유채 종자의 발아중 자엽에서의 UO와 AL의 活性變化 양상을 조사·비교함은 자엽에서의 퓨린분해와 유식물의 발달과의 관계를 알아볼 수 있다.

UO의 活性(Fig. 6)은 Hong and Schopfer (1981)가 겨자 자엽으로부터 얻은 결과와는 다른 양상을 보여 주고 있다. 즉, 겨자 자엽에서는 파종후 2일째부터 서서히 증가하여 자엽이 노쇠에 접어들 때까지 계속 증가하고 있는 반면에 유채 자엽은 2일째 극대를 보이고 6일째에 다시 증가하는 경향을 나타내고 있다. 유채 자엽에서의 RNA함량의 變化는 파종후 3일째까지 급격히 증가하여 극대를 보인 후, 서서히 감소하고 있다(미발표 자료). 이 RNA함량 변화양상으로부터 기대했던 결과는 UO의 活性이 RNA함량이 극대를 보이기 이전에 증가하기 시작하여, 계속 증가하는 UO의 活性變化였다. 그러나, 이와는 달리 RNA의 함량變化의 극대를 나타내는 시간보다 먼저 UO活性的 극대를 보이는 것은 RNA의 合成과 분해가 생장이 왕성한 유식물의 초기에 활발하여 RNA의 함량의 초기 변화에 있어서 RNA분해도 높게 나타날 가능성을 시사하고 있다. 그 후에 노쇠과정에 이르는 시기와 더불어 다시 UO의 活性 증가를 보이는 것 같다. 그러나 本 研究에서는 증류수로 키운 유식물이므로, 유채 자엽이 6일 이후 매우 급격히 노쇠화하여 효소활성측정에 어려움이 있어 계속

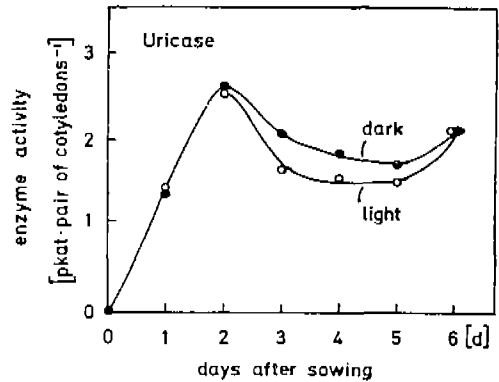


Fig. 6. Time courses of uricase activity in the cotyledons of dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings.

측정을 하지 못하였다.

더우기 UO 活性變化가 빛에 의하여 영향을 별로 받지 않으며 그 변화양상도 glyoxisome 기능의 표지효소인 유채 자엽의 isocitrate lyase 와 비슷한 것으로 나타났다 (Pee *et al.*, 1982). 그러므로 유채 자엽에서의 uricolysis는 빛과는 관계 없이 발아 초기에 활발히 진행되는 것으로 보이며, Hong and Schopfer (1981)가 겨자 자엽의 UO 가 빛에 의하여 그 活性이 증가하였다는 보고와는 다른 결과를 얻었다.

Urate 分解産物인 allantoin을 allantoinic acid 로 전환시키는 데 작용하는 AL의 活性양상은 Fig. 7과 같다. 광처리한 유채 자엽의 경우, 파종 후 3일째까지 급격히 증가하여 최대 활성을 나타낸 후 서서히 감소하여 6일째에도 최대 활성의 80%를 나타냈다. AL의 活性은 UO 의 활성과는 달리 빛에 의해 그 활성이 유도되었다. 이 결과는 겨자 자엽의 AL이 빛에 의해 활성이 증가됨과 일치하였다 (Hong and Schopfer, 1981).

이와 같이 UO 의 활성양상과 AL의 활성이 다르며, 또한 빛에 의한 효과도 다르게 나타남은 이 두 효소가 세포내에서 서로 다른 소기관에 위치함을 간접적으로 시사하고 있다.

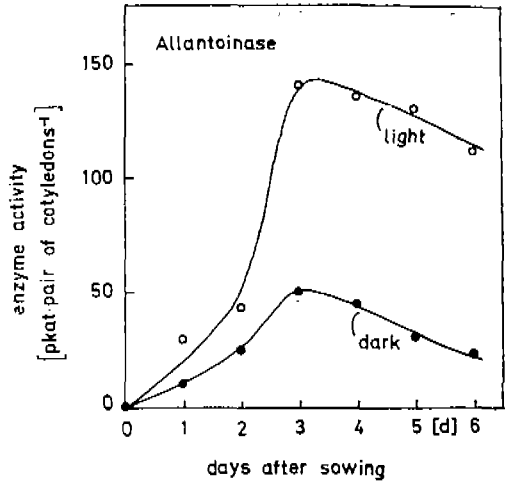


Fig. 7. Time courses of allantoinase activity in the cotyledons of dark-grown(●) and light-grown(○) rape seedlings.

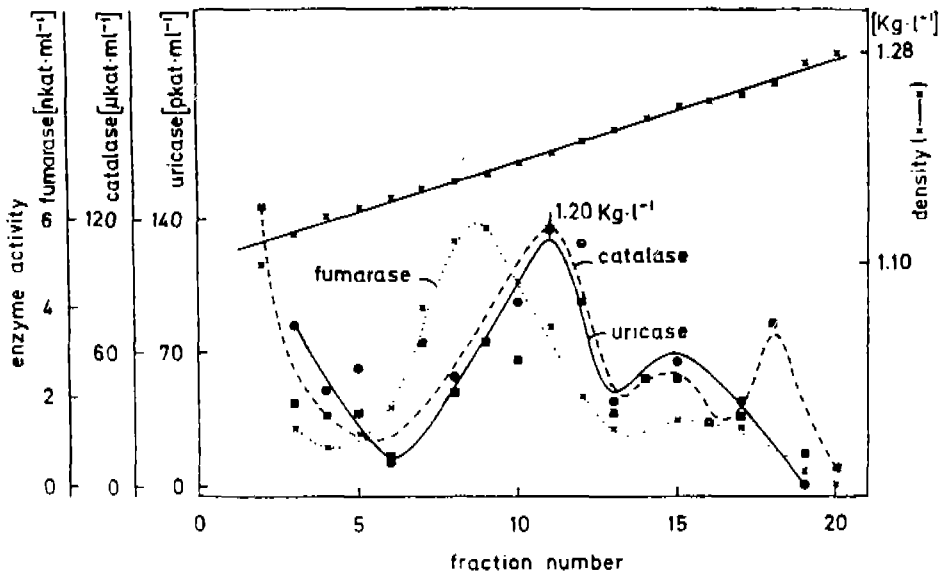


Fig. 8. Banding patterns of particulate enzyme activities on sucrose density gradients. Fumarase was included as a marker for mitochondria. The sucrose concentration is indicated by the refractive index.

UO와 AL의 細胞內 位置. 지금까지 여러 고등식물에서 UO가 microbody에 존재한다는 것은 밝혀졌으며 (Huang and Beevers, 1971; Theimer and Beevers, 1971; Hong and Schopfer, 1981), Afzelius (1965)는 UO에 의해 urate를 분해하는 기능을 가진 microbody를 uricosome 이라 명명한 바 있다. 본 연구에서도 유채 자엽에 존재하는 UO의 세포내 위치를 조사한 결과 Fig. 8에서와 같이 UO의 活性이 microbody의 대표적인 표적효소인 catalase와 같은 위치에 나타나 유채 자엽의 UO도 microbody에 존재함을 확인하였다. 그러므로 유채 자엽의 microbody 역시 uricosome 기능을 갖고 있다고 사료된다.

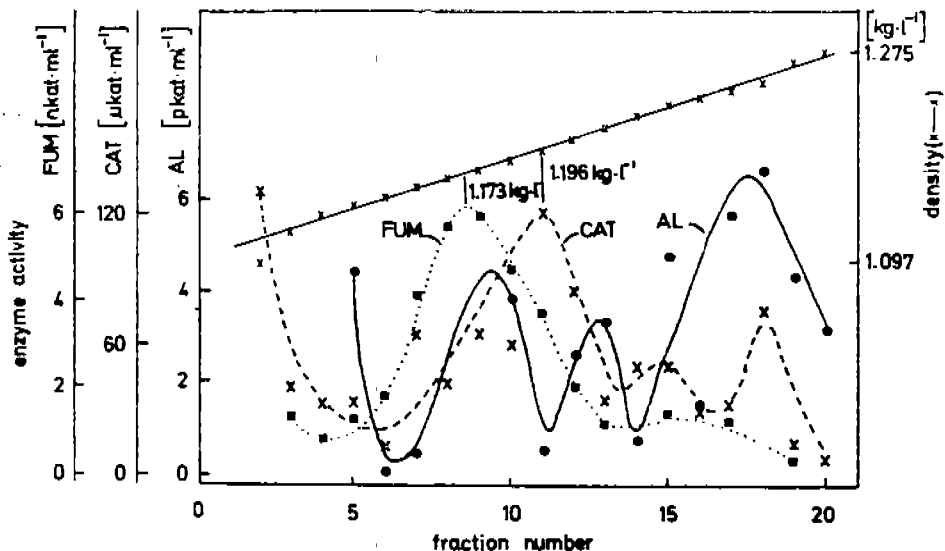


Fig. 9. Banding patterns of particulate enzyme activities on sucrose density gradients. Fumarase (FUM) was included as a marker for mitochondria. The sucrose concentration is indicated by the refractive index.

AL의 活性은 gradient 상에 불규칙하게 나타나 microbody의 표적효소라고 확증할 수 없었다 (Fig. 9). 이 결과는 겨자 자엽의 경우와 동일하였다 (Hong and Schopfer, 1981). St. Angelo and Ory (1970) 및 Theimer and Beevers (1971)들이 AL의 세포내 위치를 microbody로 추정했으나 매우 의심스러운 결과이다. Tolbert (1981)는 AL이 소포체에 존재한다고 보고하였는데, 본 연구의 결과로 보아서도 혹시 소포체막 조각이 다른 세포소기관에 붙었다가 원심분리하는 동안에 떨어져나가 gradient 상에 불규칙하게 나타나는 것으로 생각할 수 있다면, AL이 소포체에 위치하고 있음을 뒷받침하는 결과로 받아들일 수 있을 것으로 본다.

摘 要

발아중인 유채 자엽에서 푸린 분해효소인 uricase (UO) 및 allantoinase (AL)의 活性양상과 이들 효소의 세포내 위치를 조사하였다. 발아중 UO는 활성의 극대를 파종후 2일째에 보였으며 AL은 3일째에 보여 이들의 활성양상이 다르게 나타났다. 특히, UO는 그 活性이 빛에 의하여 아무런 효과도 나타나지 않는 반면, AL은 빛에 의하여 활성의 증가를 보였다. 세포내 위치에 있어서도 UO는 microbody에 존재함이 확인되었으나 AL은 gradient 상에 불규칙하게 나타났다.

參 考 文 獻

- Afzelius, B.A. 1965. The occurrence and structure of micobodies. A comparative study. *J. Cell Biol.* 26: 835-843.
- Hecker, M. 1982. Purinabbau in N₂-fixierenden Wurzelknöllchen der Leguminosen. *Biol. Rdsch.* 20: 375-380.
- Hong, Y.-N. 1978. Untersuchungen zur Regulation von Microbody-Enzyme(Uratoxidase, Allantoinase, Katalase) durch Phytochrom im Senfkeimling(*Sinapis alba* L.). Dissertation, Univ. Freiburg.
- Hong, Y.-N. and P. Schopfer. 1980. Density of microbodies on sucrose gradient during phytochrome-mediated glyoxysome peroxisome transformation in cotyledons of mustard seedlings. *Plant Physiol.* 66: 194-196.
- Hong, Y.-N. and P. Schopfer. 1981. Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase activities during mustard(*Sinapis alba* L.) seedlings. *Planta* 152: 325-335.
- Hruban, Z. and M. Rechcigl. 1969. Microbodies and related particles. Morphology, biochemistry and physiology. Academic Press, New York. 296 pp.
- Huang, A.H.C. and H. Beevers. 1971. Isolation of microbodies from plant tissue. *Plant Physiol.* 48: 637-641.
- Huang, A.H.C., R.N. Trelease and T.S. Moore, Jr. 1983. Plant peroxisomes. Academic Press, New York. 252 pp.
- Matsumoto, T., M. Yatazawa and Y. Yamamoto. 1977. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant Cell Physiol.* 18: 353-359.
- Müller, M. and K.M. Möller. 1969. Urate oxidase and its association with peroxisomes in *Acanthamoeba* sp. *Eur. J. Biochem.* 9: 424-430.
- Noguchi, T., Y. Takada and S. Fujiwara. 1979. Degradation of uric acid to urea and glyoxylate in peroxisomes. *J. Biol. Chem.* 254: 5272-5275.
- Pee, M.J., D.-K. Kwon and Y.-N. Hong. 1982. Effect of light on development of microbody functions in the cotyledons of rape (*Brassica napus* L.) seedlings. *Korean J. Bot.* 25: 73-81.
- Reinbothe, H. and K. Mothes. 1962. Urea, ureides, and guanidines in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13: 129-150.
- Reynolds, P.H., D.G. Blevins, M.J. Boland, K.R. Schubert and D.D. Randall. 1982. Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureide- and amide-transporting plants. *Physiol Plant.* 55: 255-260.
- Richter, G. 1976. Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Thieme, Stuttgart. 540 pp.
- Scott, P.J., L.P. Visentin and J.M. Allen. 1969. Enzymatic characteristics of peroxisomes of amphibian and avian liver and kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 168: 244-265.
- St. Angelo, A.J. and R.L. Ory. 1970. Localization of allantoinase in glyoxysomes of germinating castor beans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 290-296.
- Theimer, R.R. and H. Beevers. 1971. Uricase and allantoinase in glyoxysomes. *Plant Physiol.* 47: 246-251.

- Thomas, R.J. and L.E. Schrader. 1981. Ureide metabolism on higher plants. *Phytochem.* 20: 361-371.
- Tolbert, N.E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 133-157.

(1985. 8. 3. 接受)