

배추 유식물의 성장과 Allantoin대사에 미치는 Allopurinol의 효과

朴淵一 · 權寧命 · 朴敏哲* · 洪英男

(서울대학교 自然科學大學 植物學科 · *聖心女子大學 生物學科)

Effects of Allopurinol on the Growth and Metabolism of Allantoin in Chinese Cabbage Seedlings

Park, Youn-II, Young Myung Kwon, Min Chul Park* and Young-Nam Hong

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul and *Department of Biology,

Song Sim College for Women, Bucheon)

ABSTRACT

Effects of allopurinol (2mM), a specific inhibitor of xanthine oxidase, on the growth and metabolism of allantoin in dark grown Chinese cabbage (*Brassica campestris* L.) seedlings were investigated. Allopurinol treatment maintained the fresh and dry weights of cotyledons at higher levels, but inhibited the elongation of hypocotyls and roots of the seedlings. Total nitrogen content in the cotyledons decreased at slower rate by allopurinol. Accordingly, the levels of total nitrogen contents in the hypocotyls and roots, were depressed by the inhibitor. In the cotyledons, allopurinol began to elevate RNA levels after day 3, which it did not affect DNA level throughout the experiment. Activities of xanthine oxidase (XO:EC 1.2.3.2), uricase (UO:EC 1.7.3.3) and allantoinase (AL:EC 3.5.2.5) in the cotyledons were examined. The activity of XO was not detected, but the accumulation of xanthine by allopurinol treatment presented an indirect evidence of the existence of XO in the organ. Allopurinol kept UO activity high up to day 2 after sowing and depressed AL activity throughout the experiment. By allopurinol treatment, allantoin content was kept high over the control both in cotyledons and roots, but it was kept low in hypocotyls. The level of allantoic acid in the 3 organs were shown to be depressed by allopurinol. These results suggest that allantoin and allantoic acid produced by the degradation of stored and newly synthesized RNA are transported from the storage tissue to hypocotyls and roots as important nitrogen sources for the development of Chinese cabbage seedlings.

緒 論

핵과 세포질 사이의 끊임없는 상호작용의 결과 특정 세포나 기관에서 선택적인 유전자가 발현됨으로써 매개되는 식물의 발달과정에서 핵산은 계속적으로 합성되고 분해된다. 퓨린과 피리미딘은 핵산의 구조적 구성단위로서 작용할 뿐만 아니라 thiamine, riboflavine, pteridine,

본 논문은 1986년도 문교부 학술연구비지원으로 이루어진 것임.

histidine 등의 합성에 관여하며, cytokinin, purine alkaloid 등의 구성성분으로 작용하고 allosteric enzyme의 조효소로서의 조절기능도 있다. 또한 뉴클레오티드와 그 유도체는 에너지의 합성, 저장 및 수송 등의 에너지 대사에 관여한다 (Wasternack, 1982). 생체물질의 합성을 보다 분해율이 더 큰 노쇠에서 핵산과 단백질의 합량이 감소하는데 이는 노쇠의 지표가 되기도 한다. 이때 DNA보다는 RNA합량 감소가 현저하게 나타난다 (Nooden, 1980). 동물과는 달리 분비기관이 없는 식물에서는 노쇠하는 기관의 탄소원과 질소원은 다른 기관에서 재이용하게 된다 (Nooden, 1980). 이 과정에서 단백질 분해산물인 아미노산은 amide로 전환된 후 다른 기관으로 이동되어 재이용된다는 것은 널리 알려진 사실이다 (Thimann, 1980; Bray, 1983). 그러나 세포에서 단백질 다음으로 많은 질소원을 갖는 핵산의 분해산물인 퓨린과 피리미딘이 분해되어 다른 기관으로 이동된 후 재이용될 가능성이 매우 높음에도 불구하고 이들의 분해대사에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

퓨린분해대사는 미생물과 동물에서 많이 연구되었다. 그러나, 고등식물에서는 단지 콩과식물에서 퓨린분해대산물인 ureide중 allantoin과 allantoinic acid가 질소원의 저장과 이동 및 탄소원의 보존, 그리고 해독기능을 하는 것으로 알려졌다 (Reinbothe and Mothes, 1962; Guranowski, 1982; Reynolds *et al.*, 1982; Schubert, 1986). 콩과식물 이외의 버즘나무, 단풍나무 등의 목본 식물에서 ureide가 검출되었으며 (Trachey, 1955), 겨자 (Hong and Schopfer, 1981)나 유채 (Kwon *et al.*, 1985)의 유식물에서 퓨린 분해를 매개하는 xanthine oxidase (XO:EC 1.2.3.2), uricase (UO:EC 1.7.3.3) 및 allantoinase (AL:EC 3.5.2.5) 등의 효소가 microbody의 uricolysis기능과 연관하여 보고된 바 있으나, 식물의 발달 과정에서 퓨린 분해중 allantoin대사의 기능에 대한 체계적인 연구는 미흡한 실정이다. Allantoin대사의 기능을 구명하기 위해서는 저장된 영양물질을 성장하는 배측에 공급하고 노쇠하는 기관인 자엽을 갖고 있는 유식물을 조사 대상으로 사용하는 것이 바람직하다. 그런데 광조건에서는 유식물이 광형태발생으로 인해서 자엽이 종속영양에서 독립영양 단계로 전환된다. 이 과정에서 광합성 기구의 생성과 제1엽의 발달이 수반됨으로써 (Mohr and Shropshire, 1983) 질소원의 분산이 일어나기 때문에, 자엽의 질소원이 하배측과 뿌리의 길이 성장에만 국한되어 이용되도록 유도할 수 있는 암형태발생 (skotomorphogenesis)이 질소원의 이동과 재이용에 관한 연구에 적합하다. 또한 성장하는 유식물에 nitrate, ammonium, urea 등의 질소원이 공급되면 allantoin대사가 전반적으로 억제되기 때문에 (Thomas and Schrader, 1981) 질소원을 공급하지 않고 증류수만 공급하면서 성장시키는 것이 연구수행에 적합할 것이다. Allantoin대사의 비가역적인 제1단계 반응은 hypoxanthine과 xanthine의 uric acid로 전환되는 과정인데 XO 혹은 XDH가 관여하며 이 효소의 고유 억제물로서 allopurinol이 알려졌다. 따라서 본 실험은 질소원의 공급이 없는 상태에서 암형태발생하는 배추 유식물에 allopurinol을 처리함으로써 자엽 RNA의 분해 결과 생성된 퓨린의 분해산물인 allantoin과 allantoinic acid가 성장중인 하배측과 뿌리로 이동하는 질소원으로 작용할 가능성과 유식물의 발달에서 allantoin 대사의 생리적 기능을 알아보고자 하였다.

材料 및 方法

실험재료 및 생육조건. 재배용 품종인 흥농 엷갈이 배추 (*Brassica campestris* L. cv. Hung-Nong)의 종자중 크기, 형태 및 색깔이 비슷한 것을 선별하여, 이를 1% sodium hypochlorite 용액에서 15분 간 소독한 후 수도물로 세척하고 증류수로 행구었다. 다음, 여과지 (Toyo

No. 2) 3장을 간 투명한 폴리프로필렌 용기 (11.5 × 11.5 × 5.5 cm)에 20 ml의 멸균한 증류수를 넣고 49개의 종자를 파종하여 27±2°C 온도의 암조건에서 7일 동안 성장시켰다. 처리구에는 20ml의 멸균한 2 mM allopurinol을 넣어, 무균 상태에서 파종하였다.

Allopurinol의 처리농도 결정. 각 농도의 allopurinol이 들어있는 생육용기내에서 60시간 암발아시킨 배추 유식물로부터 하배축과 뿌리를 분리한 후 각각의 길이를 측정하여 하배축과 뿌리의 길이생장을 최대로 억제하는 2 mM allopurinol을 사용하였다(Fig. 1).

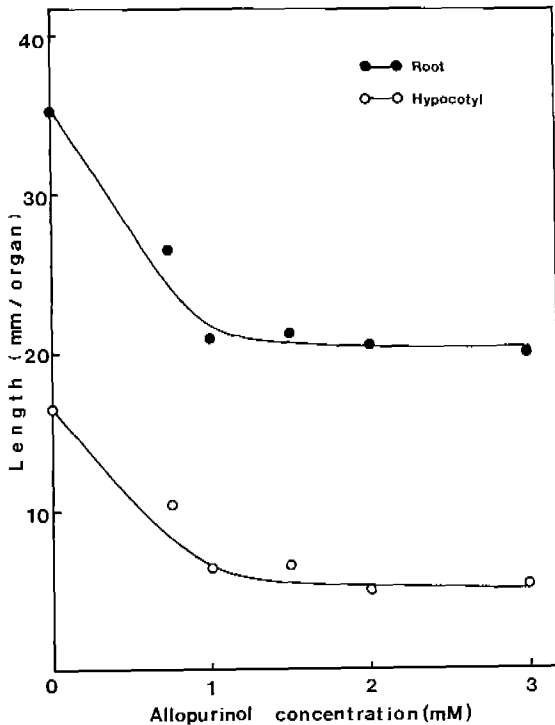


Fig. 1. Effect of allopurinol on growth of hypocotyls and roots of Chinese cabbage seedlings grown for 60 hrs.

자엽의 생체량, 건량 및 하배축과 뿌리의 길이생장 측정. 암발아 시킨 배추 유식물 40개체를 취하여 자엽의 생체량, 건량 및 하배축과 뿌리의 길이를 측정하였다. 자엽의 생체량은 표면의 물기를 제거한 뒤 측정하였으며, 건량은 80°C에서 24시간 건조시킨 뒤 측정하였다. 하배축과 뿌리의 길이는 방안지 위에서 측정하였다.

총질소 함량의 측정. 총질소 함량의 측정에는 Koroleff(1975)의 방법을 변형하여 사용하였다. 40쌍의 자엽, 각 60개씩의 하배축 또는 뿌리에 0.5g의 분해촉매 (1 g, CuSO₄ + 10 g, K₂SO₄)와 3 ml의 conc H₂SO₄를 넣고 2시간 동안 서서히 가열하였다. 분해된 용액에 증류수를 가하여 50 ml로 하였다. 자엽의 분해용액에서 0.5 ml를, 하배축 또는 뿌리의 분해용액에서 각기 1 ml를 취한 후, 1 ml의 Rochelle reagent (10% Na-K tartrate 용액), 0.25 ml의 0.16% (w/v) sodium nitropruside용액, 0.5 ml의 sodium phenate reagent (5 ml, phenol+25 ml, 40% NaOH+10 ml, D.W.)와 0.25 ml의 5% sodium hypochlorite용액을 차례로 첨가한 후 625 nm에서 5분간 흡광도 증가를 측정한 후 (NH₄)₂SO₄ 표준곡선에서 총질소 함량을 산출하였다.

DNA와 RNA 함량의 측정. 자엽의 DNA와 RNA 함량은 Cherry (1962)의 방법을 변형하여 측정하였다. 40쌍의 자엽을 4 ml의 cold methanol과 0.5 g의 석영사와 함께 마쇄한 후 5,000×g에서 20분간 원심분리 하였다. 상정액을 제외한 침전물을 4 ml의 cold methanol, 0.2 N HClO₄ 및 absolute ethanol을 사용하여 차례로 현탁, 원심분리 하였다. 이때 얻어진 침전물을 5 ml의 ethanol : ether=2 : 1(v/v)로 현탁한 후 50℃에서 30분간 방치한 후 원심분리하여 상정액을 버리고 5 ml의 50% HClO₄로 침전물을 현탁한 후 70℃에서 40분간 방치하였다. 이것을 12,000×g에서 20분간 원심분리한 후 얻은 상정액을 총핵산 함량과 DNA함량 측정시료로 사용하였다. 총핵산 함량은 240 nm에서 320 nm까지 走査한 후 Cherry (1962) 방법으로 산출하였다. DNA함량은 diphenylamine반응으로 측정하였다. 측정시료 1 ml을 취하여 2 ml의 diphenylamine reagent(2 g, diphenylamine/200 ml, glacial acetic acid+5.5 ml, conc HCl)과 섞은 후 100℃에서 10분 동안 반응시켰다. 이 반응액을 식힌 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 calf thymus DNA표준곡선에서 DNA함량을 산출하였다. RNA함량은 총핵산 함량에서 DNA함량을 감해줌으로써 산출하였다.

Uricase활성도 측정. Uricase(UO)의 활성도는 Müller와 Möller (1969)의 방법을 변형하여 측정하였다. 60쌍의 자엽에 4 ml의 70 mM K-phosphate완충용액 (pH 8.0)과 0.5 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4 ml의 chloroform과 함께 18,000×g에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상정액 1.2 ml를 취하여 Sephadex G-25 column(1.2cm×4cm)에 통과시킨 후 효소용액으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4℃에서 실시하였다. 0.88 ml의 20 mM borate완충용액 (pH 9.0)과 0.1 ml의 효소액을 넣고 혼합한 후 20 ml의 기질 (21 mg, urate/20 ml, 20 mM borate완충용액, pH 9.0)을 첨가함으로써 반응을 시켰다. 효소활성도는 urate분해량을 293 nm에서 흡광도 감소로 측정한 후 urate몰흡광계수 $1.22 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Müller와 Möller, 1969)에 의하여 산출하였다.

Allantoinase 활성도 측정. 60쌍의 자엽에 4 ml의 0.75% Na-deoxycholate(w/v)가 포함된 70 mM K-phosphate완충용액 (pH 8.0)과 0.5 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 18,000×g에서 20분 동안 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상정액 1.2 ml를 취하여 Sephadex G-25 column (1.2cm×4cm)에 통과시켜 효소용액으로 사용하였다. 위의 모든 과정은 4℃에서 행하였다. Allantoinase (AL)의 활성도는 Hong (1978)의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.9 ml의 기질용액(52.5 mg, allantoin/10 ml, 0.1M Tris완충용액, pH 7.0)에 100 ml의 효소용액을 넣고 25℃에서 10분 동안 방치한 후 20 μl의 25% HCl을 넣어 반응을 중지시켰다. 여기에 50 μl의 1% phenylhydrazine-HCl용액을 넣고 끓는 물에서 3분 동안 가열한 후 얼음이 들어있는 수조에서 5분 냉각시켰다. 이것을 1,200×g에서 3분간 원심분리한 후 얻은 상정액에 500 μl의 25% HCl과 1% K₃Fe(CN)₆를 가하여 섞은 후 540 nm에서 흡광도 증가를 측정하였다. 효소 활성도는 allantoin몰흡광계수 $1.38 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Hong, 1978)에 의해 산출하였다.

Xanthine함량 측정. Xanthine 함량의 측정에는 Fried와 Fried (1974)의 방법을 변형하여 사용하였다. Xanthine함량 측정을 위한 시료는 UO 효소용액 제조와 같은 방법으로 얻었으며 Sephadex G-25 column통과는 제외하였다. 0.1 M disodium phosphate HCl완충용액 (pH 7.8)과 10mM EDTA (pH 7.8), 1% gelatine용액, 0.4% nitroblue tetrazolium용액(4 mg, NBT/ml 완충용액), 0.02% phenazine methosulfate 용액(0.2 mg, PMS/ml 완충용액)을 4 : 6 : 5 : 3 : 2의 비율로 섞은 반응용액 1.3 ml에 증류수 0.1 ml, 시료용액 0.5 ml을 넣은 후 0.2 ml

의 xanthine oxidase (16.7 pkat/ml, 25°C)를 넣고 혼합한 후 38°C에서 20분간 방치하여 형성된 formazine양을 540 nm에서 흡광도로 측정한 후 xanthine표준곡선으로부터 산출하였다.

Allantoin과 allantoinic acid함량 측정. Vogels와 Drift (1970)의 방법을 변형하여 allantoin과 allantoinic acid함량을 측정하였다. 40쌍의 자엽, 80개씩의 하배측 또는 뿌리를 4 ml의 70 mM K-phosphate완충용액 (pH 8.0)에 0.5 g의 석영사를 넣고 마쇄한 후 4 ml의 chloroform과 함께 18,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 시료용액으로 사용하였다. Allantoinic acid함량의 측정은 다음과 같다. 0.5 ml의 시료용액에 0.5 ml의 증류수, 0.25 ml의 phenylhydrazine-HCl용액 (100 mg, PHZ/30 ml, D.W.), 0.25 ml의 0.15 N HCl을 넣고 100°C에서 10분간 가열한 후 얼음이 들어 있는 수조에서 냉각시켰다. 여기에 1 ml의 0.4 M K-phosphate완충용액 (pH 7.0)과 0.25 ml의 phenylhydrazine-HCl을 넣고 25°C에서 10분간 방치한 후 다시 냉각시켜 1 ml의 conc HCl과 0.25 ml의 K₃Fe(CN)₆용액 (500 mg, K₃Fe(CN)₆/30 ml, D.W.)을 넣고 25°C에서 15분간 방치하였다. 1,200×g에서 3분간 원심분리한 후 535 nm에서 흡광도로 측정하고 표준곡선에서 allantoinic acid함량을 산출하였다. Allantoin함량 측정은 allantoin과 allantoinic acid함량을 동시에 측정한 후 allantoinic acid함량을 감해줌으로써 allantoin함량을 산출하였다. 0.5 ml의 시료용액에 0.5 ml의 증류수, 0.25 ml의 phenylhydrazine-HCl용액 (100 mg, PHZ/30 ml, D.W.)와 0.25 ml의 0.5 N NaOH를 섞고 100°C에서 10분간 가열한 후 얼음이 들어 있는 수조에서 10분간 냉각시켰다. 여기에 0.25 ml 0.65 N HCl을 첨가하고 100°C에서 10분간 재가열한 후 냉각시켰다. 이후부터는 allantoinic acid함량 측정과 동일하게 하였다.

結果 및 考察

배추 유식물의 생장. 암발아한 배추 유식물의 자엽의 생체량과 건량, 하배측과 뿌리의 길이생장 변화에 미치는 allopurinol의 효과를 조사하였다. 자엽의 생체량은 파종직후부터 크게 증가하기 시작하여 5일 째에 최대에 이른 후 감소하였다. 이때 allopurinol에 의한 생체량 변화는 대조구와 동일한 양상을 보였으나 전 조사기간 동안 높게 유지되었다 (Fig. 2). 자엽의 건량은 파종직후 급격하게 감소하였으며 3일 이후부터 감소율이 둔화되었다. Allopurinol은 자엽의 건량 감소를 억제시킴으로써 대조구에 비해 그 양을 계속 높게 유지시켰다 (Fig. 3). 하배측의 길이는 파종 후 계속 증가하였으며 6일 이후에는 증가율이 현저히 감소하였다. 이때 allopurinol에 의해서 생장이 지연되었으나 생장 양상은 동일하였다 (Fig. 4). 뿌리의 길이는 파종이후 계속 증가하였으며 allopurinol에 의해서 생장이 억제되었다 (Fig. 5). 이 같은 allopurinol의 효과는 발아하는 유채 유식물에서와 동일하였다 (Pee, 1982). 그런데 자엽의 저장물질이 감소함으로써 건량이 감소하고 하배측과 뿌리의 길이생장이 왕성하게 일어나는 것은 암형태발생하는 유식물에서는 일반적인 현상이다 (Mohr and Shropshire, 1983). 따라서, 이와 같은 생장에 대한 allopurinol의 억제효과는 allopurinol이 하배측과 뿌리로의 자엽내 저장물질의 이동을 억제하기 때문이다.

총 질소 함량의 변화. 유식물의 생장에 미치는 allopurinol의 효과가 자엽으로부터 하배측과 뿌리로의 질소원 이동의 억제에 기인한 것인지를 조사하기 위하여 자엽, 하배측 및 뿌리에서의 총질소 함량의 변화를 조사하였다. 자엽에서의 총질소 함량의 변화는 Fig. 6과 같다. 유식물이 생장함에 따라서 자엽의 총질소 함량은 5일째까지 크게 감소하였으며 그 이후부터는

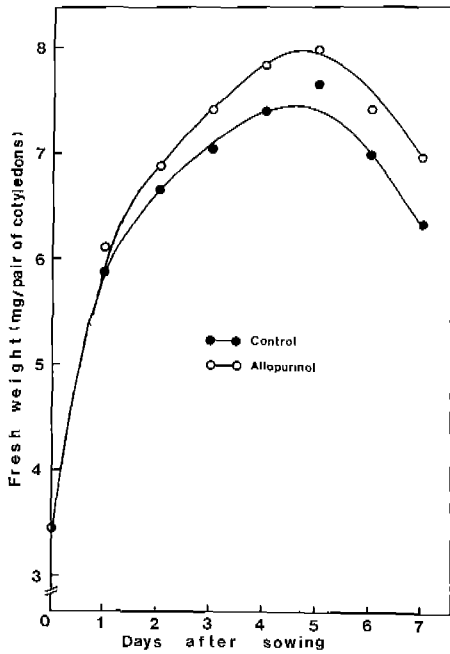


Fig. 2. Effect of allopurinol on fresh weight of the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

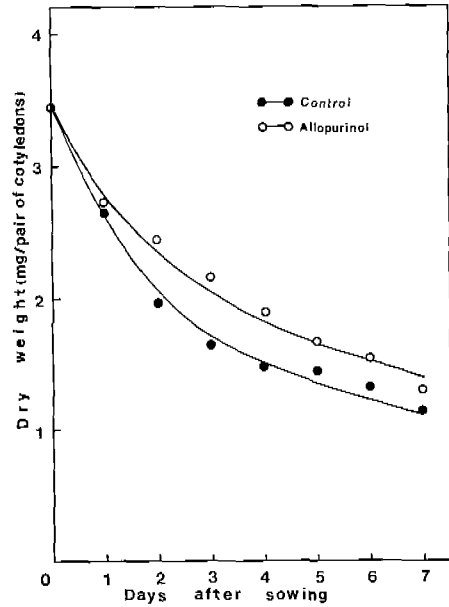


Fig. 3. Effect of allopurinol on dry weight of the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

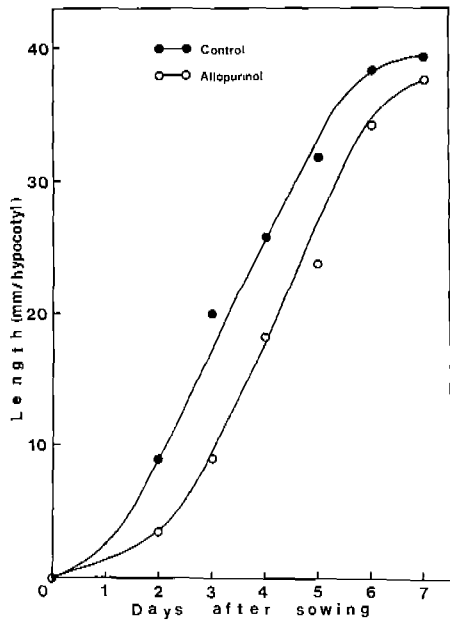


Fig. 4. Effect of allopurinol on hypocotyl elongation in Chinese cabbage seedlings.

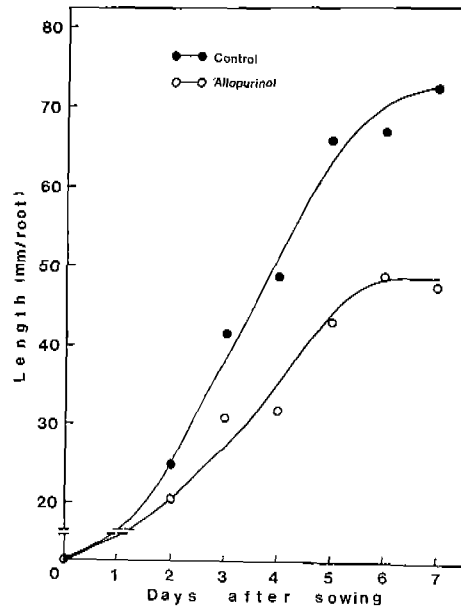


Fig. 5. Effect of allopurinol on root elongation in Chinese cabbage seedlings.

감소율이 저하되었다. 이때 allopurinol은 자엽에서의 총질소함량 감소를 억제시켰다. 하배측의 총질소 함량은 발아 3일째까지 크게 증가한 후 증가율이 둔화되었으며, allopurinol은 하배측의 총질소 함량증가를 억제하였다 (Fig. 7). Figure 8은 뿌리의 총질소 함량 변화를 나타낸 것으로서 제3일을 중심으로 크게 증가한 후 감소하였으며, allopurinol은 전기간 동안 낮게 유지시켰다. 일반적으로 자엽으로부터 하배측과 뿌리로 이동하는 질소원은 저장 단백질의 분해로부터 생성된 아미노산인 것으로 알려졌다 (Bray, 1983). 그러나, allopurinol에 의해서 질소원의 이동이 억제되는 결과에서 아미노산 이외의 퓨린 분해산물의 질소이동형이 유채유식물에서와 같이 (Pee, 1982;Kwon *et al.*, 1985)배추 유식물의 발달에도 관여함을 시사한다.

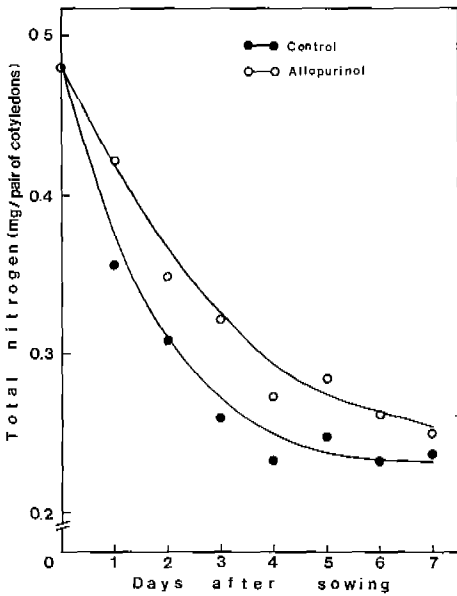


Fig. 6. Effect of allopurinol on total nitrogen content in the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

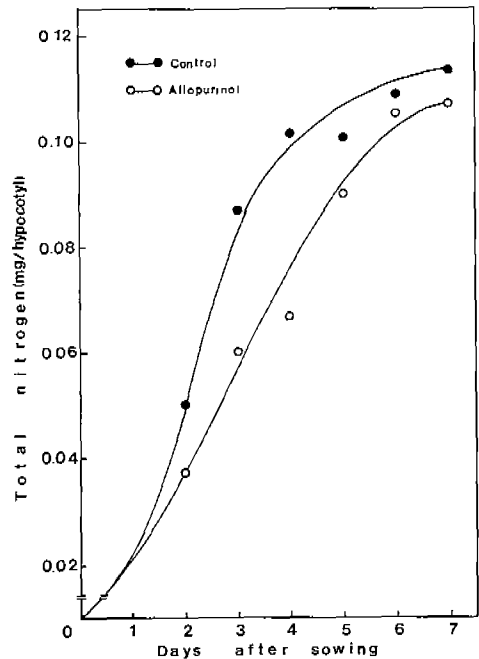


Fig. 7. Effect of allopurinol on total nitrogen content in the hypocotyl of Chinese cabbage seedlings.

자엽의 DNA와 RNA 함량의 변화. 자엽으로부터 하배측과 뿌리로 이동하는 질소원이 부분적으로 핵산의 분해에서 유래하는지의 여부를 조사하기 위하여 자엽내의 DNA와 RNA 함량 변화를 조사하였다 (Fig. 9). 조사기간 동안 DNA 함량은 일정하게 유지되었으며 allopurinol에 의해서도 변화가 없었다. 따라서, 배추 유식물의 발달에서 DNA는 이동하는 질소원의 공급원으로서의 기능이 없음을 알 수 있다. RNA는 종자에서도 많은 양이 검출되었으며 발아가 진행됨에 따라서 증가하다가 4일 이후부터 점차 감소하였다. Allopurinol 처리로 RNA 함량은 대조구에 비하여 낮은 수준을 보이다가 3일 이후에는 오히려 높게 유지되었으며 4일 이후의 감소도 억제되었다.

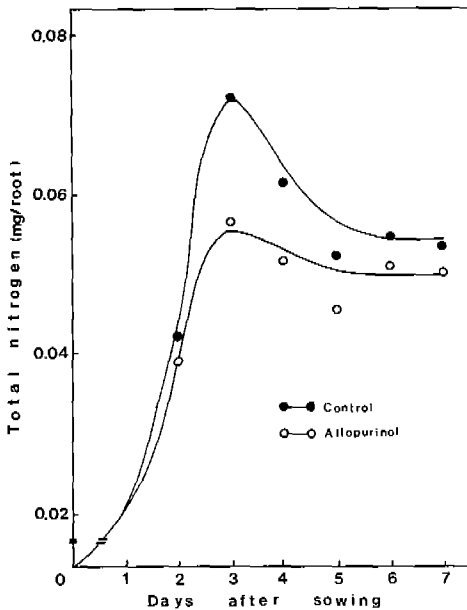


Fig. 8. Effect of allopurinol on total nitrogen content in the root of Chinese cabbage seedlings.

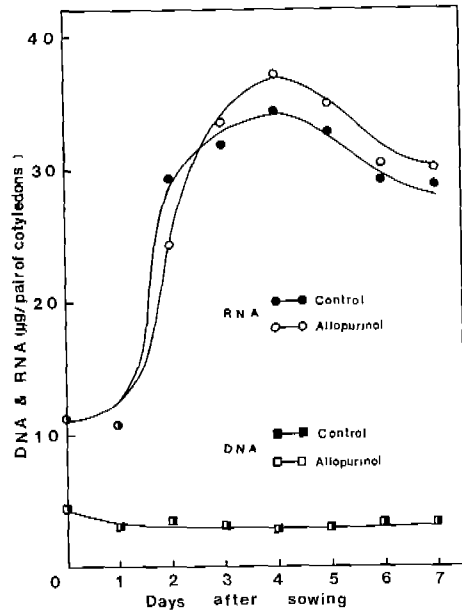


Fig. 9. Effects of allopurinol on DNA and RNA contents in the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

Atkins *et al.* (1982)은 저장 RNA가 종자의 발아와 함께 가수분해 되어 퓨린과 ureide의 공급원으로 작용하며, Schubert (1981)는 ureide가 핵산 분해로부터 생성될 가능성을 시사한 바 있다. RNA함량변화에 allopurinol이 영향을 미치는 것으로 보아 배후 자엽의 RNA분해 산물인 퓨린과 ureide가 질소원의 이동형일 것으로 생각된다.

자엽에서 Xanthine함량의 변화. 자엽에서 hypoxanthine과 xanthine을 uric acid로 전환시키는 XO의 활성은 검출되지 않았으나, XO가 자엽에 존재함을 간접적으로 확인하기 위하여 이 효소의 고유억제물인 allopurinol을 처리하여 xanthine함량 변화를 조사하였다 (Fig. 10). Hypoxanthine 함량을 측정하지 않은 것은 질소고정 식물에서 allopurinol에 의해서 hypoxanthine이 축적되지 않고 ¹⁴C₂를 이용한 실험에서 ¹⁴C가 xanthine에서는 검출되나 hypoxanthine에서는 검출되지 않으며 (Boland and Schubert, 1982), 차나무에서 hypoxanthine이 xanthine에 비하여 재이용율이 높기 때문에 (Suzuki and Takahashi, 1975) hypoxanthine의 함량 측정이 용이하지 않기 때문이었다. Xanthine은 종자에서는 검출되지 않았으나, 발아가 진행됨에 따라 자엽에서 3일째까지 함량 증가가 현저하였으며 그 후에는 증가가 둔화되었다. Allopurinol처리구에서 xanthine함량은 1일 이후 대조구에 비해 계속적으로 높게 나타났다. 이같은 결과는 대두 (Fujihara and Yamaguchi, 1978)와 유채 (Pee, 1982)에서 allopurinol에 의해서 xanthine이 축적된다는 보고와 일치하는 결과로서, RNA분해가 발아와 함께 일어나며 XO가 자엽에 존재한다는 간접적인 증거가 된다.

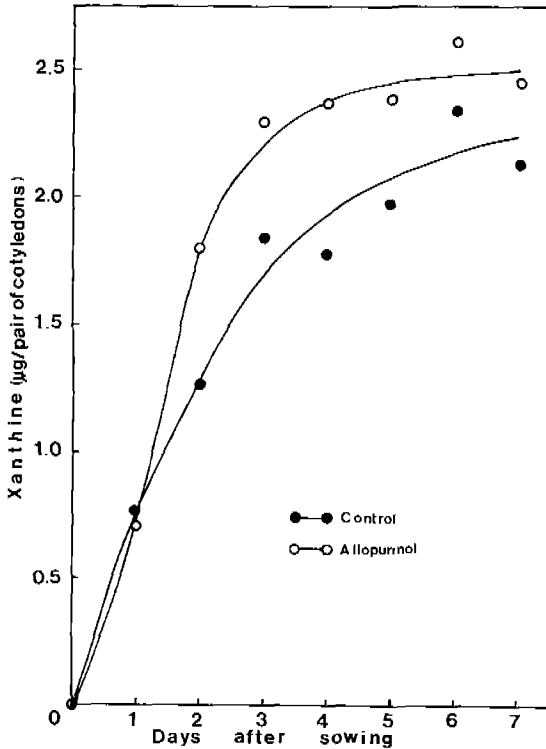


Fig. 10. Effect of allopurinol on xanthine content in the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

자엽에서의 **UO** 및 **AL**의 활성도 변화. 배추 유식물의 자엽에서 uric acid를 allantoin으로 전환시키는 **UO**의 활성도 변화를 조사하였다 (Fig. 11). **UO**의 활성도는 종자에서도 검출되었으며 유식물이 발달함에 따라서 계속 증가하였다. 이같은 결과는 겨자 자엽에서의 **UO** 활성도 변화와 유사한 양상을 보였으나 (Hong and Schopfer, 1981), 유채 자엽에서와는 다른 양상 (Kwon *et al.*, 1985)을 보이고 있다. Allopurinol에 의해서 **UO**의 활성도는 제2일 까지 빠르게 증가한 후 거의 일정하게 유지되면서 대조구보다 낮은 활성도를 보였다. 그런데, 완두, 대두 및 동물에서 hypoxanthine과 xanthine의 농도가 높아지면 **UO**의 활성도가 억제되는 것으로 보고되었다 (Theimer and Beevers, 1971; Tajima and Yamamoto, 1975). 따라서 allopurinol에 의해 자엽에 축적된 xanthine (Fig. 10)에 의해서 **UO**의 활성도가 억제되었을 것으로 생각된다. Figure 12는 자엽에서 allantoin을 allantoic acid로 전환시키는 **AL**의 활성도 변화를 나타낸 것이다. **AL**의 활성도는 **UO**의 활성도와는 달리 종자에선 검출되지 않았으나 발아와 함께 활성도가 증가하다가 3일째 최대에 도달한 후 계속 감소하였다. 이와같은 **AL**의 활성도 변화는 겨자 (Hong and Schopfer, 1981) 및 유채 (Kwon *et al.*, 1985) 자엽에서와 동일한 양상을 나타냈다. Allopurinol 처리에 따른 **AL**의 활성도 변화양상은 대조구와 동일하였으나 전기간 동안 대조구보다 낮은 활성도를 나타냈다. 그런데, 콩과식물인 cowpea의 뿌리혹에서 xanthine, hypoxanthine, uric acid의 존재하에 ¹⁴C-guanine의 ¹⁴C가 allantoin으로 incorporation되는 정도가 10~30% 억제되는 것으로 보고되었다 (Woo *et al.*, 1980). 따라서 allopurinol처리로 자엽에 축적된

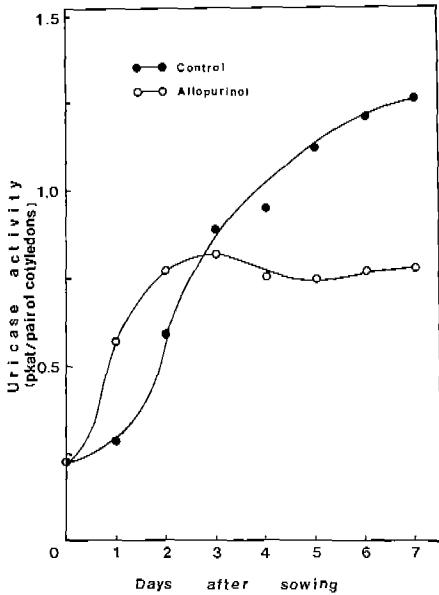


Fig. 11. Effect of allopurinol on uricase activity in the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

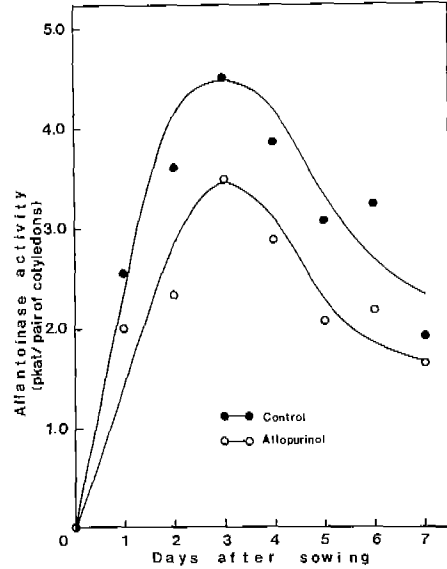


Fig. 12. Effect of allopurinol on allantoinase activity in the cotyledons of Chinese cabbage seedlings.

xanthine (Fig. 10)이 AL의 활성도를 억제하기 때문에 대조구보다 낮은 AL 활성도를 나타낸 것으로 생각된다.

Xanthine 함량, UO 및 AL의 활성도 변화와 이들에 미치는 allopurinol의 억제 결과 (Figs. 10, 11 and 12)에서 배추 자엽에서 allantoin 대사가 활발하게 일어남을 알 수 있다. 또한, allopurinol에 의한 자엽의 총질소 함량의 감소 및 하배축과 뿌리에서의 총질소 함량의 증가 억제 (Figs. 6, 7 and 8) 결과가 부분적으로 allopurinol에 의한 allantoin 대사의 억제에서 기인했음을 시사하고 있다. 왜냐하면 외부에서 질소원을 공급하지 않은 상태에서 유식물을 생산시켰기 때문에 하배축과 뿌리의 성장에 필요한 질소원은 자엽에서 공급된 질소원에만 의존하기 때문이다. 따라서 allantoin 대사의 대사물질인 allantoin과 allantoic acid의 함량변화를 조사하였다.

Allantoin과 allantoic acid 함량의 변화. 콩과식물에서 질소원의 저장 및 이동형으로 알려진 allantoin과 allantoic acid의 함량 변화를 배추 유식물의 자엽, 하배축 및 뿌리에서 조사하였다. Figure 13은 allantoin 함량의 변화를 나타낸 결과이다. 자엽에서의 allantoin 함량은 1일 이후 급격히 증가하여 3일째 최대치에 이른 후, 다시 급격하게 감소하여 4일 이후에는 거의 일정하게 유지되었으며 allopurinol 처리에 의한 allantoin 함량은 전기간 동안 대조구보다 높게 유지되었다. 특히, 최대치를 보이는 제3일 이후의 감소폭이 매우 적어 4일 이후의 대조구와의 allantoin 함량의 차가 크게 나타났다. 하배축에서의 allantoin 함량변화는 자엽에서와 같이 3일째 최대치에 도달한 후 급격히 감소하였으나 5일 이후 완만하게 증가하였다. 이때 allopurinol에 의한 allantoin 함량의 변화는 대조구와 비슷한 변화양상을 보이기는 하나 대조구에 비하여 전기간 동안 비교적 낮게 유지되었다. 그러나, 뿌리의 allantoin 함량 변화에 미치는 allopurinol의 효과는 자엽에서와 동일하였다. Figure 14는 세기관에서서의 allantoic acid 함량변화를 나타낸 결과이다. 조사된 세 기관 모두에서 allantoic acid 함량은 allopurinol에 의해서 전기간 동안 대조구보다 낮

게 유지되었다. Figure 13과 14에서 allantoin과 allantoic acid가 종자에서 검출되었는데, 대두에서 종자가 형성될 때 질소원 저장에 ureide형태로도 일어난다 (Rainbird *et al.*, 1984)는 점에 비추어, 이와 같은 결과는 배추에서도 종자가 형성될 때 질소원의 이동 및 저장에 ureide가 관여할 가능성을 시사한다. 또한, 대조구와 처리구 간의 allantoin과 allantoic acid의 함량차이가 발아초기보다 발아후기인 4일 이후에 더 큰데 (Figs. 13 and 14), 이 시기는 RNA 함량이 감소하는 시기와 일치한다 (Fig. 9). 이와 같은 결과는 ureide공급원이 발아초기에는 저장 RNA가

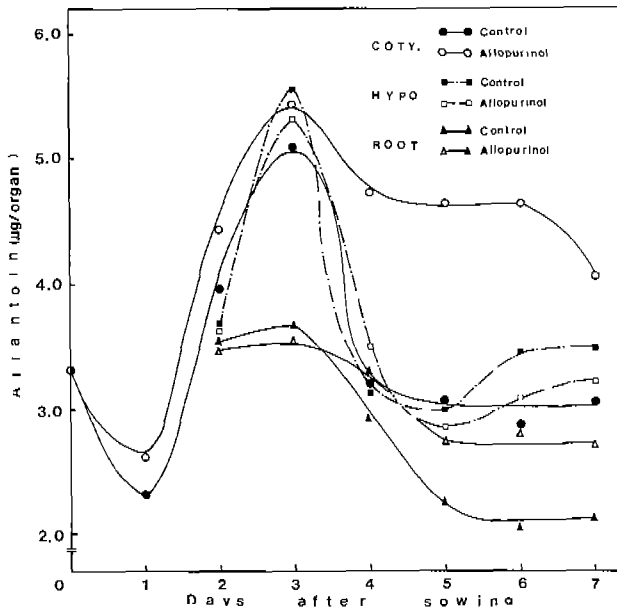


Fig. 13. Effects of allopurinol on allantoin contents in cotyledons, hypocotyls and roots in the Chinese cabbage seedlings.

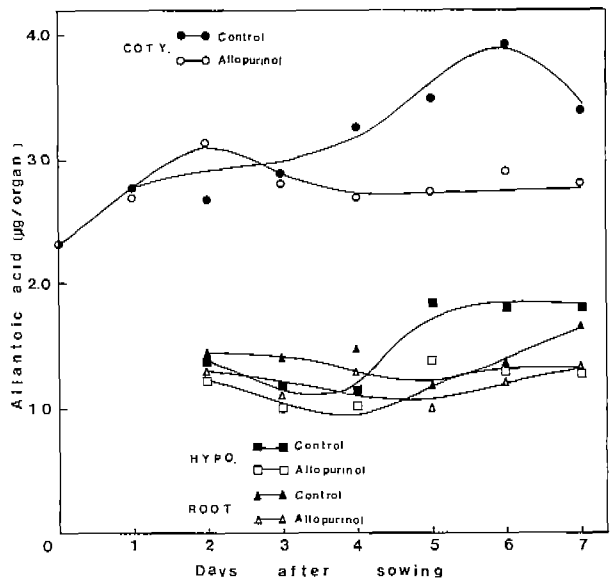


Fig. 14. Effects of allopurinol on allantoic acid contents in cotyledons, hypocotyls and roots in the Chinese cabbage seedlings.

(Fujihara and Yamaguchi, 1978), 발아후기에는 발아과정에서 새로이 합성된 RNA (Schubert, 1981)일 것이라는 가정을 뒷받침함과 동시에, 발아가 진행됨에 따라서 퓨린의 재이용대사보다는 분해대사가 더욱 활발하게 진행된다는 보고 (Ashihara, 1983; Nobusawa and Ashihara, 1983)와도 상응한다. Allopurinol 처리에 의해서 allantoin함량은 자엽과 뿌리에서 대조구보다 높았다 (Fig. 13). 이는 allopurinol로 처리된 콩과식물의 뿌리혹에서 allantoin함량이 대조구보다 낮게 나타난다는 보고 (Fujihara and Yamaguchi, 1978; Thomas and Schrader, 1981)와는 다른 결과이다. 그런데, 본 실험에서는 대조구에 비해 allopurinol로 처리된 자엽의 초기 RNA 함량이 낮았고 (Fig. 9), UO의 초기 활성도는 높았으며 (Fig. 11), AL의 활성도는 전기간 동안 낮았다 (Fig. 12). 따라서, allopurinol 처리시 낮은 AL의 활성도로 인해 종자에 저장되어 있거나 발아초기의 높은 UO활성도에 의해 생성된 allantoin이 allantoinic acid로 적게 전환됨으로써 결국 자엽내의 allantoin 함량이 대조구보다 높게 나타난 것으로 생각된다. 일반적으로 자엽에서 생성된 ureide는 자엽에서 더 이상 분해되지 않고 다른 기관으로 이동하며 (Ashihara and Nobusawa, 1981), 이동된 ureide의 75~90%가 매우 빠르게 대사되어 (Shelp and Ireland, 1985; Schubert, 1986) 아미노산과 단백질로 전환된 후 식물의 생장에 재이용되는 것으로 알려졌다 (Herridge *et al.*, 1978; Luthra, 1983; Coker III and Schaefer, 1985). Allopurinol이 위와 같은 ureide의 생성을 억제함으로써 부분적으로 자엽의 건량 감소 및 하배축과 뿌리의 길이생장을 억제한 것 (Figs. 3, 4 and 5)으로 생각된다.

암형태발생하는 배추 유식물에 allopurinol을 처리한 이상의 실험결과에서, 자엽의 RNA는 allantoin 대사를 통하여 성장하는 배축이 필요로 하는 질소원의 공급원으로 작용하며, 이동하는 질소형으로 ureide가 관여함으로써 배추 유식물의 발달에 allantoin대사가 매우 중요한 기능을 갖고 있음을 제시하였다.

摘 要

Xanthine oxidase의 고유억제물인 allopurinol (2 mM)이 암발아하는 배추 (*Brassica campestris* L.) 유식물의 성장과 allantoin대사에 미치는 효과를 조사하였다. 조사기간동안 allopurinol은 자엽의 생체량과 건량을 높게 유지시켰으나 하배축과 뿌리의 길이생장을 억제하였다. 또한 allopurinol은 자엽의 총질소 함량감소를 억제시켰으므로써 하배축과 뿌리의 총질소 함량을 낮게 유지시켰다. 자엽의 DNA함량은 변화가 없으나 RNA함량은 allopurinol처리 3일 이후부터 높게 유지되었다. 자엽에서 allantoin대사에 관여하는 효소인 xanthine oxidase (XO:EC 1.2.3.2), uricase (UO:EC 1.7.3.3) 및 allantoinase (AL:EC 3.5.2.5)의 활성도 변화를 조사하였는데, XO활성도는 검출되지 않았으나 allopurinol처리에 따른 xanthine의 축적은 XO가 자엽에 존재하는 간접적인 증거가 된다. UO의 활성도는 allopurinol에 의해 발아초기 (2일까지)에 높게 나타났으며, 2일후 부터는 allopurinol에 의해 낮게 유지되었다. 반면, AL의 활성도는 전기간동안 allopurinol에 의해 낮게 유지되었다. Allantoin의 함량은 allopurinol처리구에서 자엽과 뿌리에서는 높게, 하배축에서는 낮게 유지되었으며 allantoinic acid 함량변화는 조사된 세 기관에서 모두 낮게 유지되었다. 이같은 결과는 배추 유식물의 발달에서 RNA분해산물인 allantoin과 allantoinic acid가 질소원의 이동형으로 작용하며, ureide대사에 관여함을 의미한다.

參考文獻

- Ashihara, A. 1983. Changes in activities of purine salvage and ureide synthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 47-60.
- Ashihara, H. and E. Nobusawa. 1981. Metabolic fate of (8-¹⁴C)adenine and (8-¹⁴C)hypoxanthine in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **104**: 433-458.
- Atkins, C.A., J.S. Pate, A. Pitchie and M.B. Peoples. 1982. Metabolism and translocation of allantoin in amide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* **70**: 476-482.
- Boland, J.J. and K.R. Schubert. 1982. Purine biosynthesis and catabolism in soybean root nodules: Incorporation of ¹⁴CO₂ into xanthine. *Arch. Biochem. Biophys.* **213**: 489-491.
- Bray, C.M. 1983. Nitrogen metabolism in plants. pp. 183-206. Langman, London and New York.
- Cherry, J.H. 1962. Nucleic acid determination in storage tissue of higher plants. *Plant Physiol.* **37**: 670-678.
- Coker III, G.T. and J. Schaefer. 1985. ¹⁵N and ¹³C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **77**: 129-135.
- Fried, R. and L.W. Fried. 1974. Hypoxanthine and xanthine colorimetric assay. In, *Methods of Enzymatic Analysis*, (H. U. Bergmeyer ed.), Vol. 4, pp. 1945-1950. Academic Press, New York.
- Fujihara, S. and M. Yamaguchi. 1978. Effects of allopurinol (4-hydroxypyrazolo (3,4-d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. *Plant Physiol.* **62**: 134-138.
- Gurranowski, A. 1982. Purine catabolism in plants. *Plant Physiol.* **70**: 344-349.
- Hammett, J.R. and F.R. Katterman. 1975. Storage and metabolism of poly(adenylic acid)-mRNA in germinating cotton seeds. *Biochemistry* **14**: 4375-4379.
- Herridge, D.F., C.A. Atkins, J.S. Pate and R.M. Rainbird. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Plant Physiol.* **62**: 495-498.
- Hong, Y.-N. 1978. Untersuchungen zur Regulation von Microbody-Enzyme (Urate oxidase, Allantoinase, Katalase) durch Phytochrome im Senfkeimling (*Sinapsis alba* L.). *Dissertation*, Univ. Freiburg.
- Hong, Y.-N. and P. Schopfer. 1981. Control by phytochrome of urate oxidase and allantoinase during peroxisome development in the cotyledons of mustard (*Sinapsis alba* L.) seedlings. *Planta* **152**: 325-335.
- Koroleff, E. 1975. in, *Methods of Seawater Analysis*. Grasshoff, M., M. Ehrhardt and K. Kremling (eds), pp. 150-173.
- Kwon, D.-K. Y.M. Kwon and Y.-N. Hong. 1985. Intracellular localization and developmental changes of purine catabolic enzymes during germination in cotyledons of rape seedlings. *Kor. J. Bot.* **28**: 225-232.
- Luthra, Y.P., I.S. Sheoran, A.S. Rao and R. Singh. 1983. Ontogenic changes in the level of ureides and enzymes of their metabolism in various plant parts of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Exp. Bot.* **34**: 1358-1370.
- Mohr, H. and W. Shropshire, Jr. 1983. An introduction to photomorphogenesis for the general reader. In, *Encyclopedia of Plant Physiology*. W. Shropshire, Jr. and H. Mohr (eds.), New Series 16A, pp. 24-38. Springer-Verlag, Berlin.
- Müller, M. and K.M. Möller. 1969. Urate oxidase and its association with peroxisomes in *Acanthamoeba* sp. *Eur. J. Biochem.* **9**: 424-430
- Nooden, L.D. 1980. Senescence in the whole plants. In, *Senescence in Plants*. Thimann K.V. (ed.), pp. 219-258. CRC Press, Florida.

- Nobusawa, E. and H. Ashihara. 1983. Purine metabolism in cotyledons and embryonic axes of black gram (*Phaseolus mungo* L.) seedlings. *Int. J. Biochem.* **15**: 1059-1065.
- Pate, J.S. 1980. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 313-340.
- Pee, M.J. 1982. Studies on microbody enzyme (uricase, isocitrate lyase, glycolate oxidase) activities during germination in the cotyledons of rape (*Brassica napus* L.) Seedlings. M.S. Thesis. Seoul Nat. Univ.
- Rainbird, R.M., J.H. Throne and R.W. Hardy. 1984. Role of amides, amino acids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* **74**: 329-334.
- Reinbothe, H. and K. Mothes, 1962. Urea, urcides and guanidines in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**: 129-150.
- Reynolds, P.H.S., M.J. Boland, D.G. Blevins, K.R. Schubert and D.D. Randall. 1982. Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. *Plant Physiol.* **69**: 1334-1338.
- Schubert, K.R. 1981. Enzymes of purine biosynthesis and catabolism in *Glycine max.* *Plant Physiol.* **68**: 1115-1122.
- Schubert, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation: synthesis, transport, and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Shelp, B.J. and R.J. Ireland. 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. *Plant Physiol.* **77**: 779-783.
- Suzuki, T. and E. Takahashi. 1975. Metabolism of xanthine and hypoxanthine in the tea plants (*Thea sinensis* L.). *Biochem. J.* **146**: 79-85.
- Tajima, S. and Y. Yamamoto. 1975. Enzymes of purine catabolism in soybean plants. *Plant Cell Physiol.* **16**: 271-282.
- Theimer, R.R. and H. Beevers. 1971. Uricase and allantoinase in glyoxysomes. *Plant Physiol.* **47**: 246-251.
- Thimann, K.V. 1980. The senescence of leaves. In, *Senescence in plants*. Thimann K.V. (ed.), pp. 85-115. CRC Press, Florida.
- Thomas, R.J. and V.E. Schrader. 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochem.* **20**: 361-371.
- Trachey, W.V. 1955. Urea and ureides. *Modern Methods in Plant Analysis* **4**: 119-141.
- Vogels, G.R. and C. van der Drift. 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* **33**: 143-157.
- Wasternack, C. 1982. Metabolism of pyrimidines and purines. In, *Encyclopedia of Plant Physiology*. Parthier, B. and D. Boulter (eds.), New Series 14B, pp. 263-401. Springer-Verlag, Berlin.
- Woo, K.C., C.A. Atkins and J.S. Pate. 1980. Biosynthesis of ureides from purines in a cell-free system from nodule extracts of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Physiol.* **66**: 735-739.

(1987, 5. 17 接受)