

해녀콩 幼植物 子葉內 BApNAase의 性質

高 碩 贊* · 許 仁 玉 · 權 寧 命¹

濟州大學校 自然科學大學 生物學科, ¹서울大學校 自然科學大學 生物學科

해녀콩(*Canavalia lineata*) 유식물 자엽에서 *N*- α -benzoyl-*DL*-arginine *p*-nitroanilide hydrolase(BApNAase)를 부분정제하여 그 성질을 밝혔다. 부분정제한 BApNAase는 purification fold가 77.5이었고 회수율은 7%이었으며 비활성도는 7.75 unit/mg이었다. BApNAase의 분자량은 200 kD이고 젤라틴분해효소 P₃인 것으로 밝혀졌으며 최적 pH는 9.5이었다. BApNAase의 V_{max}와 K_m은 각각 15.5 unit/mg와 1.6 mM로 최대반응속도가 동물의 트립신보다 7배 가량 낮은 반면에 *N*- α -benzoyl-*DL*-arginine *p*-nitroanilide(BApNA)에 대한 기질 친화성은 4배 가량 높았다. 또한, BApNAase는 1 mM의 phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)에 의해 90%나 크게 억제된 반면 aprotinin에 의해서는 크게 억제되지 않아 트립신과는 다른 serine proteinase로 판단되었으며, 효소활성은 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해 다소 증가하나 Mn²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺에 의해 크게 억제되었다.

주요어: endopeptidase, BApNAase, serine proteinase, 해녀콩

식물의 endopeptidase(EP)는 노화중인 기관에서 저장단백질을 비특이적으로 분해하여 exopeptidase에 의한 아미노산의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있으나(Storey, 1986) 다른 생물체의 단백질을 기질로 사용하는 일종의 방어물질로 작용할 가능성도 제기되고 있다(Boller, 1986). 또한, 전효소의 활성화, 단백질 합성 후 변형, 단백질의 불활성화, 불완전한 단백질의 분해 등 동물이나 미생물의 EP가 가지는 기능을 식물의 EP도 가질 것으로 생각되어 많은 연구가 진행되고 있다(Storey, 1986). 그러나 EP는 종류가 다양하고 정량적 측정이 까다로와 생화학적 성질을 밝히기가 어렵다(Shutov and Vaintraub, 1987). 따라서, EP의 생화학적 성질을 밝히기 위해 *N*- α -benzoyl-*DL*-arginine *p*-nitroanilide(BApNA), *N*-acetyl-*L*-tyrosine ethyl ester 등의 합성기질을 이용하고 있는데(Storey, 1986), BApNA는 포유동물의 트립신 활성을 측정하기 위하여 개발되었으나 식물의 EP 활성 측정에도 많이 활용되고 있으며 그 활성을 trypsin-like activity로 부르기도 한다(Davies and Chapman, 1979; Nielsen and Liener, 1984). 그러나, 동물과는 달리 식물체내에서는 BApNA가 dipeptidase, carboxypeptidase, arylamidase 등 트립신이 아닌 EP에 의해서도 분해되므로, 일률적으로 BApNA를 분해하는 효소를 트립신과 동일시 하는 것은 문제가 있어 *N*- α -benzoyl-*DL*-arginine *p*-nitroanilide hydrolase (BApNAase)라 한다(Shibata and Doi, 1984; Wilson, 1986).

한편, *Canavalia*속 식물에서 protease에 대한 연구는 jack

bean(*C. ensiformis*)의 종자에서 ¹²⁵I insulin B chain을 분해하는 metalloproteinase의 존재가 밝혀진 바 있으며(Dalkin *et al.*, 1983), 발아 중인 해녀콩(*C. lineata*) 자엽에서 3종의 aminopeptidase를 밝힌 바 있다(Yoon and Kwon, 1993). 또한, *Canavalia*속 식물의 vicilin계 단백질인 canavalin이 트립신에 의해 분해되며 그 분해산물이 *in vivo*에서의 분해산물과 분자량이 유사하여 트립신과 유사한 EP가 존재할 것으로 생각되어 왔으나(Smith *et al.*, 1982; Sammour *et al.*, 1984; Koh *et al.*, 1991), 최근에 canavalin 초기분해에는 트립신과 무관한 2종의 metalloproteinase가 관여하는 것을 밝힌 바 있다(Koh *et al.*, 1993). 그러나, DEAE-Sephacel 크로마토그래피로 canavalin 초기분해효소를 분리하는 과정에서 BApNAase 활성 peak가 canavalin 초기분해효소와는 무관하지만 젤라틴분해활성 peak와 일치하여, 해녀콩 자엽의 BApNAase는 trypsin-like enzyme일 가능성을 제시해 주고 있다(Koh *et al.*, 1993).

본 연구에서는 발아중인 해녀콩 유식물 자엽에서 BApNAase를 부분정제하여 protease 억제제와 2가 양이온의 효과 등의 성질을 조사하고 트립신과의 동질성 유무를 밝혔다.

재료 및 방법

조효소액의 제조

암소에서 키운 해녀콩 유식물의 자엽을 채취하여 자엽 1쌍에 10 mL의 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)을 가하여 마쇄한

*교신저자: Fax (064) 56-3541

후, 10,000g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

Protease 활성의 측정

BApNAase의 활성은 180 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0) 500 μ L에 180 mM CaCl₂와 효소용액을 각각 100 μ L씩 첨가한 후 9 mM BApNA 100 μ L를 가하여 30°C에서 반응시키고, 500 μ L의 30% 초산으로 반응을 중지시켜 410 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 활성도는 1분당 흡광도 0.1의 증가를 1 unit로 나타내었다.

젤라틴분해활성은 Heussen과 Dowdle(1980)의 방법을 따랐다. 즉, β -mercaptoethanol(β -ME)이 제거된 시료용 완충용액(pH 6.8, 63 mM Tris-HCl, 0.01% bromphenol blue, 25% 설탕, 2.3% SDS)과 효소용액을 동량 혼합하여 0.04% 젤라틴을 함유하는 7% polyacrylamide 겔에서 SDS-PAGE를 행한 후, 젤라틴이 분해되어 생긴 밴드를 조사하였다(Ohtsubo *et al.*, 1989).

BApNAase의 부분정제

파종 후 4일째의 자엽 40 g을 400 mL의 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)으로 마쇄하여 10,000g에서 30분간 원심분리하여 상정액을 취하고, ammonium sulfate를 가하여 30-60% 침전물을 얻은 후 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)에서 12시간 투석하였다. 이어서, 20 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)으로 12시간 투석한 후 원심분리하여 상정액을 취하여 약산성에 불용성인 단백질을 제거하고, 다시 100 mM borate 완충용액으로 2.5시간씩 2회 투석하였다.

약산성에 불용성인 단백질을 제거한 후, 78 mg의 단백질을 함유하는 효소용액은 DEAE-Sephacel 컬럼(ϕ 2.4 \times 8.5 cm)에 loading하여 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 효소용액을 loading하기 전에 DEAE-Sephacel 컬럼은 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)으로 equilibrium시켰으며, loading한 후 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)으로 washing하고 NaCl의 농도 기울기가 0-100 mM인 동일한 완충용액으로 분획당 4.0 mL이 되게 용출시켰다. DEAE-Sephacel 컬럼에서 용출된 분획 중 BApNAase 활성이 높은 분획을 모아 Molecular/Por C-20K 필터로 농축하여 분자량이 20 kD 이하인 단백질을 제거하고, 12.7 mg의 단백질을 함유하는 효소용액을 Sephacryl S-300 컬럼(ϕ 1.6 \times 60 cm)에 loading하여 겔여과 크로마토그래피를 실시하였다. 효소용액을 loading하기 전에 Sephacryl S-300 컬럼은 100 mM borate 완충용액(pH 8.0; 10% 글리세

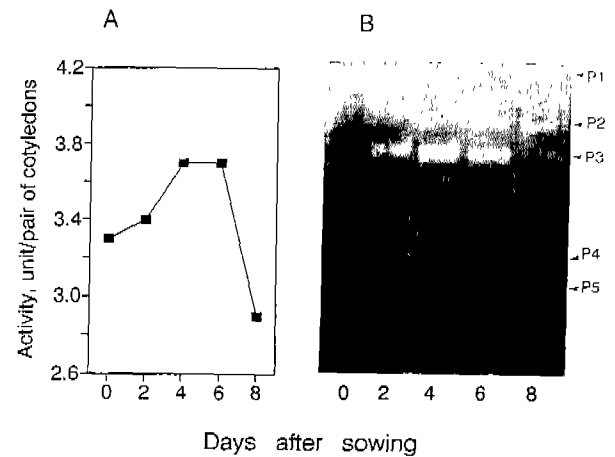


Fig. 1. The changes of BApNAase activities (A) and electrophoretic patterns of gelatin-degrading activities (B) in the cotyledons of *Canavalia lineata* seedlings grown in the dark. One-1,200th of protein in each cotyledon pair was loaded in each sample well. P₁-P₅ indicate the protease zones in terms of increasing mobility toward the anode.

린과 100 mM NaCl 함유)으로 equilibrium시켰으며, loading한 후 동일한 완충용액으로 분획당 4 mL이 되게 용출시켜 BApNAase 활성이 높은 분획을 취하였다.

BApNAase의 성질 조사

Protease 억제제와 2가 양이온의 효과는 BApNAase 활성과 동일한 방법으로 조사하였다. 다만, 2가 양이온의 효과를 조사할 때는 CaCl₂가 제거된 용액에서 반응시켰다. Protease 억제제로는 aprotinin, phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF), diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester(DAN), pepstatin, dipicolinic acid, phenanthroline, *p*-chloromercuribenzoic acid (pCMB), IAA, dithiothreitol(DTT), β -ME를 사용하고, 2가 양이온으로는 Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺를 사용하였다.

결과 및 고찰

발아와 유식물 생장시 protease 활성의 변화

발아와 유식물 생장시 BApNAase 활성을 조사한 결과(Fig. 1A), 다른 종자에서도 검출될 뿐만 아니라 파종 후 6일까지 점차 증가하고 그 이후에 감소하였다. 한편, 젤라틴분해활성을 조사한 결과(Fig. 1B), 5개의 밴드(P₁-P₅)를 확인할 수 있었다. 즉, 다른 종자에서는 젤라틴분해활성이 검출되지 않았으나 발

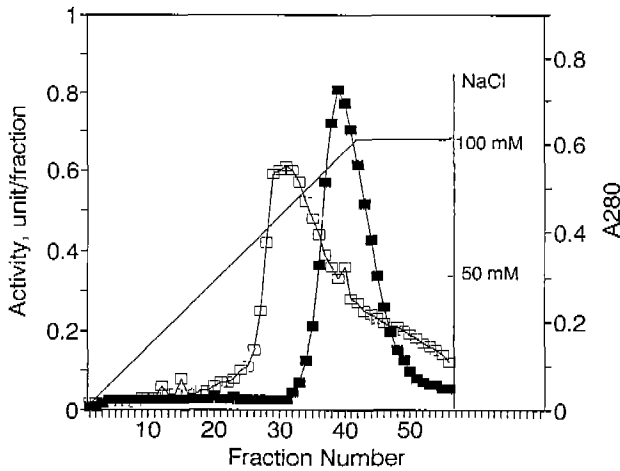


Fig. 2. DEAE-Sephacel column chromatography of BAPNAase in the cotyledons of *Canavalia lineata* seedlings grown for 4 days in the dark. After sample loading, the column was washed with 100 mM borate buffer (pH 8.0) and the protein was eluted with a NaCl gradient (0-100 mM; -). Protein (□) and BAPNAase (■) were assayed in each fraction.

아 2일 이후 P₃가 나타나기 시작하여 4일에 최대 활성을 보인 후 점차 그 활성이 감소하며, P₂도 2일 이후 계속 증가하는 패턴을 보이고 있다. 또한 canavalin 초기분해효소로 밝혀진 P₁(Koh *et al.*, 1993)은 6일째에 나타나서 8일에는 가장 큰 활성을 나타내었고, 8일째에는 약하나마 2종류(P₄ 그리고 P₃)가 더 나타났다. 따라서, EP의 기능을 가지는 BAPNAase가 존재한다면, Fig. 1A에서 BAPNAase 활성 변화와 유사하게 발아 후 4-6일에 최대 활성을 보이는 P₃가 BAPNAase일 것으로 판단되었다.

BAPNAase의 부분 정제

파종 후 4일째의 자엽 40 g을 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)으로 마쇄하고 원심분리하여 취한 조효소액의 비활성도는

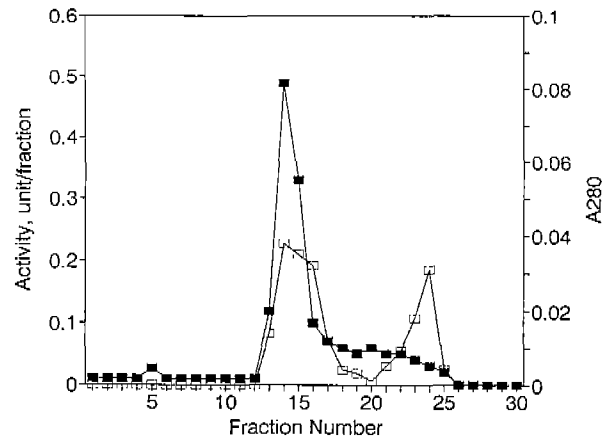


Fig. 3. Sephacryl S-300 column chromatography of BAPNAase eluted by DEAE-Sephacel column chromatography in Fig. 2. The protein (□) and BAPNAase (■) were assayed in each fraction.

0.1 unit/mg이었다. 이 조효소액에 ammonium sulfate를 가하여 30-60%로 포화시켜 얻은 침전물에서 효소의 비활성도는 0.65 unit/mg이었으며, 20 mM citrate-phosphate 완충용액으로 투석하여 저농도 염용액에 불용성인 단백질을 제거한 후의 비활성도는 1.14 unit/mg이었다. 이 용액은 다시 100 mM borate 완충용액으로 투석하여 DEAE-Sephacel 크로마토그래피를 실시하여 36-45번째 분획에서 BAPNAase가 용출되었고 비활성도는 4.44 unit/mg이었다(Fig. 2). 이 효소분획을 모아 농축하여 Sephacryl S-300 크로마토그래피를 수행한 결과 2개의 단백질 피크가 나타났으며 BAPNAase는 그 중 분자량이 큰 피크와 부분적으로 일치하였고 13-16번째 분획의 비활성도는 7.75 unit/mg이었다(Fig. 3). 이러한 과정을 통해 얻은 BAPNAase는 조효소액에 비하여 77.5배 정제되었으며 회수율은 7%이었다(Table 1).

BAPNAase의 성질

부분정제된 BAPNAase가 젤라틴분해활성을 가지는지를 확

Table 1. Purification of BAPNAase from the *Canavalia lineata* cotyledons

Fraction	Total activity (unit ^a)	Total protein (mg)	Specific activity (unit ^a /mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	132.7	1328.0	0.10	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitation (30-60%)	105.5	162.0	0.65	79.5	6.5
Acid precipitation	89.1	78.0	1.14	67.1	11.4
DEAE-Sephacel chromatography	56.4	12.7	4.44	42.5	44.4
Sephacryl S-300 chromatography	9.3	1.2	7.75	7.0	77.5

^aOne enzyme unit is defined as ΔA₄₁₀ 0.1/min under the assay condition.

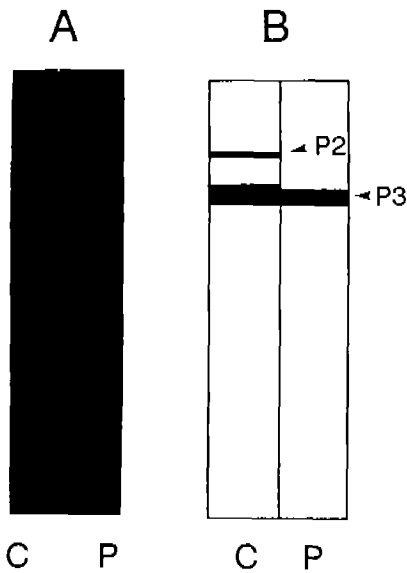


Fig. 4. Gelatin-degrading activities (A) and its diagram (B) of crude extract (C) and partially purified BApNAase (P) from the cotyledons of *Canavalia lineata* seedlings grown for 4 days in the dark.

인하기 위하여, 4일 동안 자란 유식물 자엽의 조효소액과 비교하여 부분정제된 BApNAase의 젤라틴분해활성을 조사하였다(Fig. 4). 그 결과, BApNAase는 Fig. 1B의 발아 2일째 이후 계속하여 나타나는 P₃에 해당하는 것으로 나타났으며 2일째 이후에 소량이지만 활성이 증가하는 P₂는 제거되었다. 따라서, 마른 종자에서 P₃가 검출되지 않으면서 BApNAase 활성이 나타나는 것은 본 실험에서 부분정제된 BApNAase(P₃)와는 성질이 다른 BApNAase가 존재하는 때문인 것으로 해석되는데, 식물체내에서는 dipeptidase, carboxypeptidase, arylamidase 등도 BApNA를 분해하는 것으로 알려져 있어 이러한 해석을 뒷받침하고 있다(Wilson, 1986). 따라서, 4일째의 자엽에는 젤라틴분해효소 P₃에 해당하는 BApNAase만이 존재하든지 또는 마른 종자에 존재하는 BApNAase가 같이 존재하더라도 본 실험조건에서는 제거된 것으로 판단된다.

Sephacryl S-300 gel filtration으로 측정된 BApNAase의 분자량은 200 kD로(Fig. 5), 노화중인 보리(*Hordeum vulgare*) 잎에서 cysteine proteinase로 조사된 BApNAase(EP₁)의 분자량이 28.3 kD인 것과는 크게 다르나(Miller and Huffaker, 1981), BApNA 분해와는 무관하지만 해녀콩 자엽에서 canavalin을 분해하는 것으로 알려진 metalloproteinase와 유사하였다(Koh *et al.*, 1993). 그리고, pH 3.0-11.0의 구간에서 pH와 완충용액에 따른 활성변화를 측정된 결과, 최적 pH가 9.5이며 Tris-HCl 완충용액에서 효소활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 BApNA를 기질로 하여 조사된 EP 중에서 보리 잎의

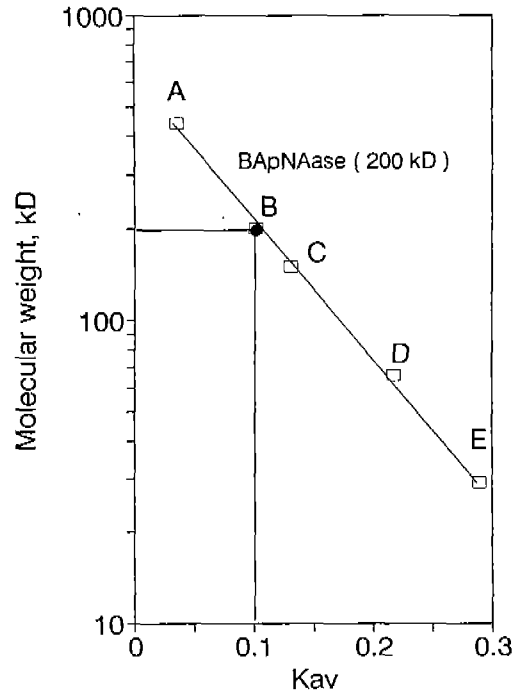


Fig. 5. Native mol wt determination of BApNAase by Sephacryl S-300 gel filtration. Apoferritin (443 kD, A), β -amylase (200 kD, B), alcohol dchydrogenase (150 kD, C), BSA (66 kD, D) and carbonic anhydrase (29 kD, E) were used as molecular markers.

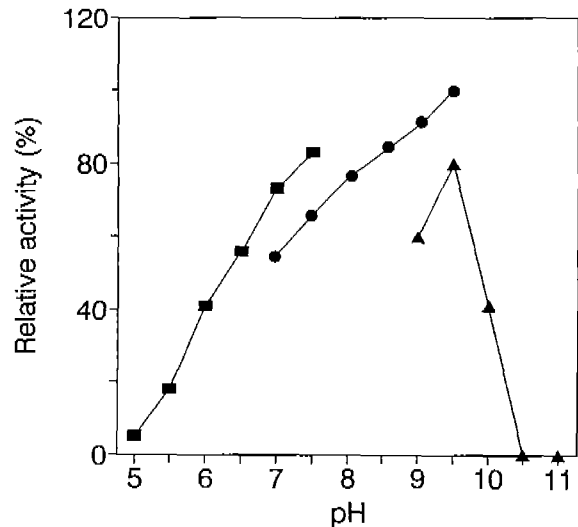


Fig. 6. Effects of pH on the activity of partially purified BApNAase. 100 mM citrate-phosphate buffer (■) was used from pH 5.0 to 7.5, 100 mM Tris-HCl buffer (●) from pH 7.0 to 9.5 and 100 mM borate buffer (▲) from pH 9.0 to 11.0.

cysteine proteinase는 최적 pH가 5.5-5.7이나(Miller and Huffaker, 1981) *Simmondsia chinensis* 자엽의 serine proteinase는

Table 2. Effects of protease inhibitors on BAPNAase purified partially from *Canavalia lineata* cotyledons. Non-enzymatic and spontaneous color was determined in parallel assays and has been subtracted from the reported values. The activities were expressed relative to the activity in the absence of protease inhibitors

	Concentration	Relative activity %
Control	None	100
Aprotinin	0.6 TIU ^a	91.8
	3.0 TIU	90.1
PMSF	0.1 mM	102.3
	1.0 mM	11.6
DAN	1.0 mM	102.3
	10.0 mM	95.3
Pepstatin	0.1 mM	104.7
	1.0 mM	107.0
Dipicolinic acid	1.0 mM	123.2
	10.0 mM	160.4
Phenanthroline	1.0 mM	109.3
	10.0 mM	100.0
pCMB	0.1 mM	83.7
	1.0 mM	107.0
IAA	0.1 mM	103.3
	1.0 mM	72.1
DTT	1.0 mM	103.3
	10.0 mM	93.0
β -ME	1.0 mM	98.0
	10.0 mM	90.0

^aOne trypsin inhibitor unit is defined as the decrease of the activity of 2 trypsin units by 50%.

최적 pH가 8.0으로(Samac and Storey, 1981), *Simmondsia chinensis*의 serine proteinase와 비교적 유사하다고 할 수 있다. 그리고 대부분의 serine proteinase가 높은 pH에서 최대 활성을 나타내는 것과 일치하여 본 BAPNAase는 serine proteinase일 것으로 예측되었다(Barrett, 1986).

BAPNAase의 성질을 알아보기 위하여 억제제의 효과를 조사하였다(Table 2). 그 결과, 10 mM dipicolinic acid는 오히려 60%의 촉진을 보인 반면 1 mM PMSF는 90%나 크게 억제하였으며, 그 외의 protease 억제제의 효과는 미약하였다. 이러한 결과는 PMSF가 serine proteinase의 대표적인 억제제이기 하나 일부 cysteine proteinase를 억제하는 것으로 알려져 있어 본 BAPNAase는 serine proteinase 또는 cysteine proteinase일 것으로 해석할 수 있으나(Ryan and Walker-Simmons, 1981), cysteine proteinase 억제제인 pCMB와 IAA에 의한 억제 효과가 낮을 뿐 아니라 cysteine proteinase 활성을 촉진하는 DTT와 β -ME의 효과도 낮아서 본 BAPNAase는 serine proteinase일 것으로 판단되었다. 그러나, 대표적인 트립신 억제제인

Table 3. Effects of divalent cations on BAPNAase purified partially from *Canavalia lineata* cotyledons. Non-enzymatic and spontaneous color was determined in parallel assays and has been subtracted from the reported values. The activities were expressed relative to the activity in the absence of divalent cations

	Concentration (mM)	Relative activity %
Control	None	100
CaCl ₂	1	113.3
	10	117.8
MgCl ₂	1	117.8
	10	128.9
CoCl ₂	1	55.6
	10	22.2
CuCl ₂	1	86.7
	10	71.1
CdCl ₂	1	88.9
	10	6.7
MnCl ₂	1	15.6
	10	0
ZnCl ₂	1	11.1
	10	6.7
HgCl ₂	1	6.7
	10	6.7

aprotinin에 의해 크게 억제되지 않는 것으로 보아 트립신과는 다른 serine proteinase로 해석되었다(Wagner, 1986).

한편, 2가 양이온이 BAPNAase 활성에 미치는 효과를 조사한 결과(Table 3), Mn²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺은 낮은 농도에서도 효소활성을 90% 이상 억제하였으나, Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺은 10 mM에서 각각 95%, 80%, 30% 정도 억제하였고 1 mM에서는 Co²⁺이 45% 가량 억제한 반면에 Cu²⁺과 Cd²⁺의 효과는 적었다. 반면에 Ca²⁺과 Mg²⁺은 효과가 미약하지만 농도가 증가함에 따라 효소활성을 다소 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 보리 잎의 EP₁과 EP₂(Miller and Huffaker, 1981), 그리고 jack bean의 metalloproteinase(Dalkin *et al.*, 1983)와 비교하여 보면, 이들 효소들도 본 BAPNAase와 같이 정도의 차이는 있으나 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해 촉진되었다. 다만, 본 BAPNAase와 크게 다른 것은 보리의 EP₁은 cysteine proteinase로 5 mM Cu²⁺에 의해 100% 억제되지만 10 mM Mn²⁺에 의한 억제효과가 낮았으며 EP₂는 serine proteinase일 것으로 판단되는데 5 mM Cu²⁺과 2 mM Zn²⁺에 의해 10% 정도 촉진되나 5 mM Mn²⁺에 의한 억제효과가 낮았고, jack bean의 metalloproteinase는 5 mM Mn²⁺에 의해 85%나 촉진되나 5 mM Cu²⁺에 의해 100% 정도 억제되었다. 따라서, Mg²⁺과 Ca²⁺의 효과는 EP의 종류에 따라서 다소 다르지만 활성을 촉진하는 경향이 있는 것으로 보이며 그 이외의 2가 양이온은 EP의 종류에 따라 그

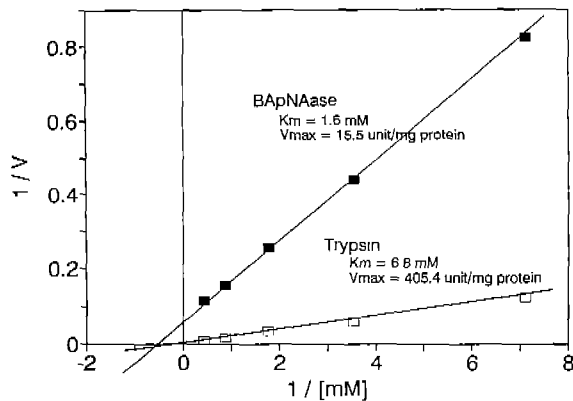


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot for BApNA with partially purified BApNAase (■) or bovine-pancreatic trypsin (□).

효과가 다른데, 본 BApNAase는 특히 Mn^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} 에 의해 크게 억제되는 성질을 가진다고 할 수 있다. 다만, 본 BApNAase가 미약하지만 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 에 의해 활성이 다소 증가하는 것은 serine proteinase가 가지는 성질로 절대적으로 필요한 것은 아니지만 전효소 활성화나 효소의 안정성을 유지하는데 요구되는 것으로 해석되나(Barret, 1986), 사람이나 쥐의 간조직에서 정제된 arginine aminopeptidase가 Cl^- 에 의해서 그 활성이 촉진되는 것으로 알려지고 있어(Söderling, 1983) 효과가 적게 나타나는 Ca^{2+} 이나 Mg^{2+} 에 대하여는 좀더 세밀한 조사가 요구된다.

다음에는, 대표적인 serine proteinase이며 BApNA를 기질로 하는 효소인 트립신과 비교하기 위하여 BApNA의 농도를 변화시키면서 돼지 췌장의 트립신과 BApNAase의 활성을 비교 조사하였다(Fig. 7). 그 결과, 기질에 대한 BApNAase와 트립신의 V_{max} 는 15.5 unit/mg와 405.4 unit/mg으로 트립신이 해녀콩의 BApNAase보다 7배 가량 높았으며, K_m 은 각각 1.6 mM과 6.8 mM로 트립신보다 해녀콩의 BApNAase가 기질에 대한 친화도가 4.5배나 높아서, 충분한 양의 BApNA가 주어졌을 때는 트립신이 BApNAase보다 빠르게 기질을 분해하지만 기질의 농도가 낮을 때는 BApNAase의 활성이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 그러나, *in vivo* 상태에서 본 BApNAase가 어떠한 단백질을 분해하게 되는지 또는 Fig. 1에서 P₃ 이외의 나머지 4개의 EP와의 기능상의 차이가 무엇인지 등은 또 다른 연구로 밝혀져야 할 것이다.

사 사

이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모 과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

- Barrett, A.J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. *In*, Plant Proteolytic Enzymes. M.J. Dalling (ed.). Vol. 1, CRC Press, Boca Raton. pp. 1-16.
- Boller, T. 1986. Role of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms. *In*, Plant Proteolytic Enzymes. M.J. Dalling (ed.). Vol. 1, CRC Press, Boca Raton. pp. 67-96.
- Dalkin, K., S. Marcus and D.J. Bowles. 1983. Endopeptidase activity in jackbeans and its effect on concanavalin A. *Planta* **157**: 531-535.
- Davies, H. and J. Chapman. 1979. The control of food mobilization in seeds of *Cucumis sativus* L. I. The influence of embryonic axis and testa on protein and lipid degradation. *Planta* **146**: 579-584.
- Heussen, C. and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**: 196-202.
- Koh, S.C., I.D. Hwang and Y.M. Kwon. 1991. Some properties and fate of canavalin in the cotyledons of *Canavalia lineata*. *Korean Biochem. J.* **24**: 578-584.
- Koh, S.C., I.D. Hwang and Y.M. Kwon. 1993. Isolation and characterization of canavalin-hydrolyzing proteases in the cotyledons of *Canavalia lineata*. *Korean Biochem. J.* **26**: 485-491.
- Miller, B. and R. Huffaker. 1981. Partial purification and characterization of endoproteases from senescing barley leaves. *Plant Physiol.* **68**: 930-936.
- Nielsen, S.S. and I.E. Liener. 1984. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination: Role of endogenous proteases and protease inhibitors. *Plant Physiol.* **74**: 494-498.
- Otsubo, K., K. Harada and S. Kawasaki. 1989. Changes in levels of proteases and their inhibitors during development of the seeds of Job's tears (*Coix lacrymajobi* L. var. Ma-Yuen Stapf) and their localization and interactions. *Plant Cell Physiol.* **30**: 699-705.
- Ryan, C.A. and M. Walker-Simmons. 1981. Plant proteinases. *In*, The Biochemistry of Plants. P.K. Stumpf and E.E. Conn (eds.). Vol. 6, Academic Press, New York. pp. 321-350.
- Samac, D. and R. Storey. 1981. Proteolytic and trypsin inhibitor activity in germinating jojoba seeds. *Plant Physiol.* **58**: 1339-1344.
- Sammour, R.H., J.A. Gatehouse, J. Gilroy and D. Boulter. 1984. The homology of the major storage protein of jack bean (*Canavalia ensiformis*) to pea vicilin and its separation from α -mannosidase. *Planta* **161**: 61-70.
- Shibata, D. and Doi, E. 1984. Purification and characterization of rice embryo BAPAase (benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide hydrolase). *Plant Cell Physiol.* **25**: 1411-1417.
- Shutov, A.D. and I.A. Vaintraub. 1987. Degradation of sto-

- rage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* **26**: 1557-1566.
- Smith, S.C., S. Johnson, J. Andrews and A. McPherson.** 1982. Biochemical characterization of canavalin, the major storage protein of jack bean. *Plant Physiol.* **70**: 1199-1209.
- Söderling, E.** 1983. Substrate specificities of Cl^- -activated arginine aminopeptidases from human and rat origin. *Arch. Biochem. Biophys.* **220**: 1-10.
- Storey, R.D.** 1986. Plant endopeptidases. In, Plant Proteolytic Enzymes. M.J. Dalling (ed.). Vol. 1, CRC Press, Boca Raton. pp. 119-140.
- Wagner, F.W.** 1986. Assessment of methodology for the purification, characterization, and measurement of proteases. In, Plant Proteolytic Enzymes. M.J. Dalling (ed.). Vol. 1, CRC Press, Boca Raton. pp. 17-39.
- Wilson, K.A.** 1986. Role of proteolytic enzymes in the mobilization of protein reserves in the germinating dicot seed. In, Plant Proteolytic Enzymes. M.J. Dalling (ed.). Vol. 2, CRC Press, Boca Raton. pp. 19-47.
- Yoon, J.W. and Y.M. Kwon.** 1993. Partial purification and properties of aminopeptidases in cotyledons of *Canavalia lineata* L. *Mol. Cells* **3**: 83-88.

(1994. 1. 20 接受)

Characterization of BAPNAase in Cotyledons of *Canavalia lineata* Seedlings

Koh, Suck-Chan*, In-Ok Heo and Young Myung Kwon¹*Department of Biology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea; and**¹Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea***ABSTRACT**

N- α -Benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide hydrolase (BAPNAase) was partially purified and characterized from the cotyledons of *Canavalia lineata*. The overall purification and final recovery were 77.5-fold and 7%, respectively. The apparent mol wt of the native enzyme was estimated as 200 kD from the gel filtration and this enzyme was revealed as one of the gelatin-hydrolyzed proteases by activity staining with gelatin-containing gel. The optimum pH for the hydrolysis of *N*- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPNA) was about 9.5. This enzyme catalyzed the hydrolysis of BAPNA with V_{max} of 15.5 unit/mg and K_m value of 1.6 mM which were different from them of bovine-pancreatic trypsin. The catalytic activity of this enzyme was strongly inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) but insensitive to aprotinin, indicating that it was a serine proteinase but not a trypsin-like one. And this enzyme was slightly stimulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} but remarkably inhibited by Mn^{2+} , Hg^{2+} and Zn^{2+} .

Key words : endopeptidase, BAPNAase, serine proteinase, *Canavalia lineata*

*Corresponding author: Fax +82-64-56-3541