

해너콩(*Canavalia lineata*) 유식물 자엽에서 Canavalin 분해효소의 성질

고 석 찬

Characterization of Canavalin-hydrolyzing Protease in the Cotyledons of *Canavalia lineata* Seedlings

Koh, Suck-Chan

Abstract

The canavalin-hydrolyzing protease was isolated by a DEAE-Sephacel column from the cotyledons of *Canavalia lineata*, and characterized by sensitivity to protease inhibitors and divalent cations, and hydrolytic specificity on synthetic substrates. This protease was inhibited by metalloproteinase inhibitors such as phenanthroline, EDTA and DTT, and also inhibited by divalent cations of Zn^{2+} and Cu^{2+} . Furthermore, this protease readily hydrolyzed synthetic esters of Cbz-gly-ONP, Cbz-gln-ONP and Cbz-ala-ONP, indicating that this canavalin-hydrolyzing protease is similar to vicilin peptidohydrolase in mung bean.

서 론

종자의 저장단백질은 대부분 비수용성이고 저장 이외의 특정기능은 가지고 있지 않다(Larkins, 1981; Miège 1982; Wilson, 1986). 그렇지만 종자의 발아와 유식물 생장시 특정 endopeptidase에 의해 분해되어 용해도가 증가하게 되면서 또 다른 protease의 작용을 받을 수

있게 된다(Shutov and Vaintrub, 1987). 그러므로 endopeptidase에 의한 저장단백질의 초기분해는 발아와 유식물 생장초기에 있어서 저장단백질 이용의 시작이라 할 수 있다. 한편, 콩과식물의 주요 저장단백질인 globulin류인 vicilin의 초기분해에 관여하는 효소에는 cysteine proteinase가 많은 것으로 알려져 있으며(Baumgartner and Chrispeels, 1977; Shutov and Vaintraub,

1987), metalloproteinase와 serine proteinase의 성질을 갖는 것도 있다(Bond and Bowles, 1983; Mitsuhashi *et al.*, 1986). 그러나 vicilin은 그 구성 단위체의 종류가 다양하여 protease에 의한 초기분해에 대한 통일된 연구가 어렵다. 그러나 *Canavalia*속 식물 종자의 주요 저장단백질인 canavalin은 단위체의 구성이 다른 콩과식물의 vicilin단백질에 비하여 단순하여 vicilin의 분해특성을 이해하는 데 유용한 대상이다(Smith *et al.*, 1982; Yamauchi and Minamikawa, 1986; Koh *et al.*, 1991).

Canavalin의 초기분해에 대하여는 유식물의 자엽에서 분해산물이 검출되었고 canavalin이 동물에서 분리한 트립신에 의해서 두 개의 폴리펩티드로 분해되는 것으로 보아, 자엽에서도 트립신과 유사한 protease에 의하여 canavalin이 분해될 가능성이 있음을 지적한 바 있다(Smith *et al.*, 1982; Sammour *et al.*, 1984; Koh *et al.*, 1991). 그러나 최근에 canavalin의 초기분해에 관여하는 효소를 분리하여 합성기질의 분해에 대한 protease억제제의 효과를 조사한 바 canavalin의 초기분해에 관여하는 효소는 두 종류로 트립신과는 무관한 metalloproteinase로 밝혀진 바가 있으나(Koh *et al.*, 1993), 생체내의 단백질인 canavalin을 기질로 하였을 때의 canavalin분해효소의 특성은 밝혀진 바가 없다.

본 연구는 발아중인 해너콩 자엽에서 canavalin 초기분해에 관여하는 protease를 분리하여 canavalin을 기질로 했을 때의 protease억제제의 효과와 합성기질에 대한 특이성을 조사하여 canavalin분해효소의 성질을 밝히고자 실시되었다.

재료 및 방법

효소액의 제조

암소에서 8일 동안 키운 해너콩 유식물의 자엽을 채취하여 자엽 1쌍에 10 ml의 100 mM borate 완충용액(pH 8.0)을 가하여 마쇄한 후, 10,000 × g에서 30분 간 원심분리하여 상침액을 취하고 효소액으로 사용하였다.

DEAE-Sephacel 크로마토그래피

효소액 20 ml을 100 mM borate완충용액(pH 8.0)으로 투석하고 DEAE-Sephacel컬럼(ϕ 2.8 × 3.8cm)에 loading한 후, 50 ml의 동일한 완충용액을 용출시키고 이어서 NaCl의 농도기울기가 0-1 M인 80 ml의 완충용액으로 용출시켰다.

Protease활성의 조사

N- α -benzoyl-DL-arginine ρ -nitroanilide hydrolase (BA ρ NAase)활성은 25 mM CaCl₂, 1.25 mM N- α -benzoyl-DL-arginine ρ -nitroanilide (BA ρ NA)를 함유하는 125 mM Tris-HCl완충용액(pH 8.0) 0.8 ml에 효소액 0.2 ml를 가하여 30°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 0.5 ml의 30% 초산으로 반응을 중지시켜 410 nm에서 흡광도를 측정하였으며 분당 흡광도 0.1변화를 1 unit로 나타내었다.

Canavalin분해활성은 분리한 canavalin을 0.36 mg/ml이 되게 100 mM NaCl에 녹이고(Koh *et al.*, 1993), canavalin용액과 효소액을 0.2 ml 씩 혼합하여 30°C에서 24 시간 동안 반응시킨 후 시료용완충용액(63 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0.01% bromphenol blue, 25% 설탕, 5% β -

mercaptoethanol, 2.3% SDS)을 0.2 ml 첨가한 후 3분간 중탕하여 반응을 중지시켰으며, 반응중 지역 50 μ 를 loading하여 SDS-전기영동을 실시하고 canavalin이 분해되어 생긴 폴리펩티드를 조사하였다. SDS-전기영동은 12.5% acrylamide겔을 사용하여 Laemmli(1970)의 방법으로 실시하였다.

Canavalin 분해효소의 특성조사

합성기질에 대한 기질특이성은 아미노기에 carbobenzyloxy (Cbz-)기를 갖는 nitrophenyl ester (-ONP) 화합물에 대한 분해활성을 Baumgartner와 Chrispeels (1977)의 방법으로 조사하였다. 즉, 0.9 ml의 100 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.1; 15% 메칠알코올 포함)에 5 mM 합성기질 35 μ 과 효소액 70 μ 를 넣어 흡광도 0.1변화를 1 unit로 나타내었다.

Canavalin의 분해에 대한 protease억제제가 2가 양이온의 효과는 canavalin분해활성과 동일한 방법으로 실시하였으며, 1 mM iodoacetic acid, 1 mM diazoacetyl norleucine (DAN), 2.44 TIU/ml aprotinin, 10 mM phenanthroline, 10 mM EDTA, 10 mM DTT 등이 존재하에서 조사하였고, 2가 양이온은 Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 를 각각 2 mM이 되게하여 조사하였다.

결과 및 고찰

발아 후 8 일된 자엽에서 얻은 효소액을 100 mM borate완충용액 (pH 8.0)에서 투석한 후 DEAE-Sephacel컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과 (Fig. 1), 컬럼에 붙지 않는 단백질 peak와 컬럼에 붙는 단백질 peak가 나타났고 합

성기질인 BA ρ NA를 분해하는 BA ρ NAase의 활성은 컬럼에 흡착되었던 peak와 부분적으로 일치하여 전보에서와 같은 결과를 얻었으며 (Koh *et al.*, 1993), 컬럼에 붙지 않는 단백질 peak를 취하여 protease억제제의 존재하에서 canavalin분해활성을 SDS-전기영동으로 조사하였다. 그 결과 (Fig. 2), 억제제가 없는 control에서는 49 kd인 canavalin단위체가 분해되어 24 kd와 25 kd의 폴리펩티드가 생성되었으며 cysteine proteinase 억제제인 iodoacetic acid와 serine proteinase 억제제인 aprotinin은 control과 차이 없이 canavalin분해를 억제하지 못하였다. 또한, metalloproteinase 억제제인 phenanthroline은 이들 폴리펩티드의 생성을 크게 억제하였으며 aspartic acid proteinase 억제제인 DAN은 다소 억제하였으나 그 정도가 낮았다. 그러나, DAN인 경우는 이를 용해시킬 때 사용한 dimethylsulfoxide의 억제효과와 동일하여 DAN의 효과라기 보다는 dimethylsulfoxide의 효과로 판단되며 phenanthroline은 dimethylsulfoxide만이 존재할 때에 비교하여도 24 kd와 25 kd의 폴리펩티드가 거의 관찰되지 않았다. 따라서, metalloproteinase억제제인 phenanthroline과 EDTA 그리고 cysteine proteinase활성은 촉진하면서 metalloproteinase의 작용은 억제하는 것으로 알려진 DTT의 효과를 조사하였다 (Fig. 3; Barrett, 1986; Köehler and Ho, 1990; Yamaoka *et al.*, 1990). 그 결과, phenanthroline과 EDTA 그리고 DTT는 모두 canavalin의 분해를 크게 억제하였다. 이러한 결과는 휴면중인 메밀 (*Fagopus esculentum*) 종자에서 분리한 13 S의 globulin을 분해하는 protease가 EDTA나 phenanthroline에 의해 억제되는 것과 유사하였다 (Dunaevsky *et al.*, 1983). 이러한 결과는 본 canavalin분해효소를

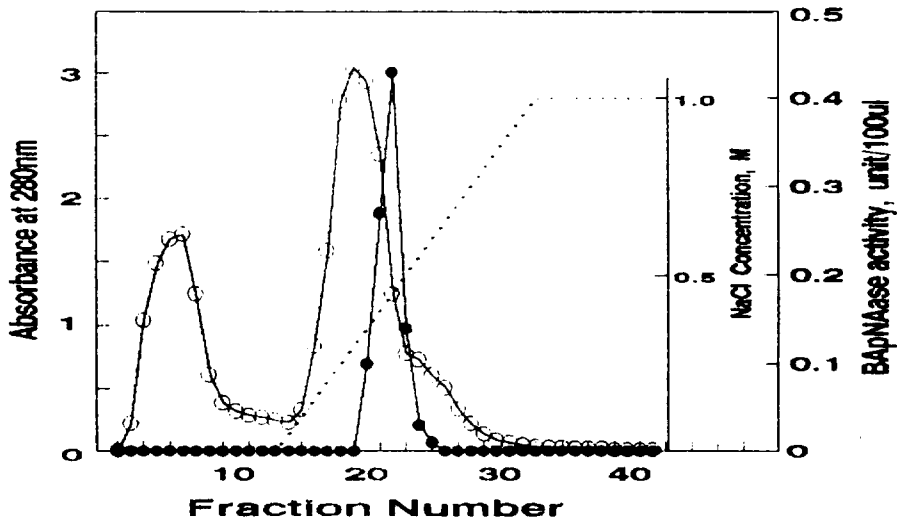


Fig. 1. DEAE-Sephacel column chromatography of the enzyme solution from the cotyledons of *Canavalia lineata* seedlings. After sample loading, the column was washed with 100 mM borate buffer (pH 8.0) and the protein was eluted with a NaCl gradient (0-1 M). Protein (○) and BAPNAase (●) were assayed in each fraction.

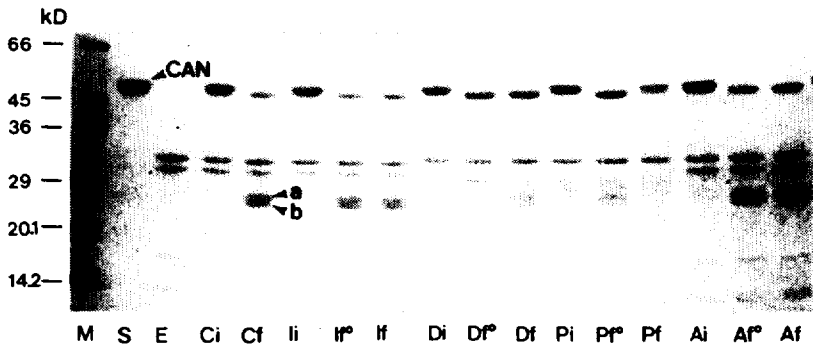


Fig. 2. Effects of prorease inhibitors on the canavalin hydrolysis by the canavalin-hydrolyzing protease. The molecular markers were loaded in lane M. The reaction mixtures were incubated in the absence (S, only canavalin; E, only enzyme; C, control) and the presence (I, iodoacetic acid; D, DAN; P, phenanthroline; A, aprotinin) of protease inhibitors. The letters (i and f) represent respectively initial and final mixtures in reaction and f° represent final mixture in absence of inhibitors but in the presence of solvents for each inhibitor. The arrow (CAN) indicates 49 kD canavalin subunit used as the substrate and the arrows (a and b) indicate the hydrolytic products of 49 kD canavalin subunit.

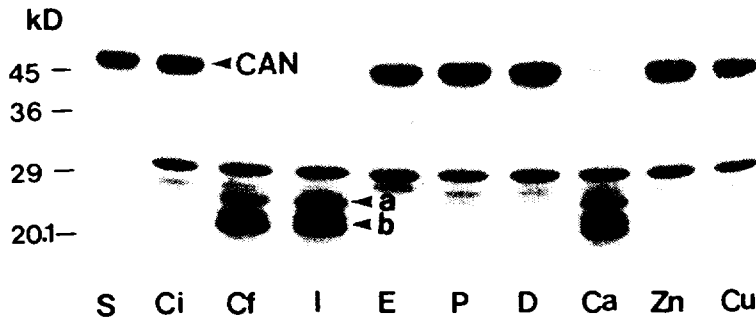


Fig. 3. Effects of protease inhibitors (A) and divalent cations (B) on the canavalin hydrolysis by the canavalin-hydrolyzing protease. The reaction mixtures were incubated in the absence (C) and the presence of protease inhibitors (E, EDTA; P, phenanthroline; D, DTT) or divalent cations (Ca, Ca^{2+} ; Zn, Zn^{2+} ; Cu, Cu^{2+}). The letters (i and f) in lane C represent respectively initial and final mixtures in reaction. The arrow (CAN) indicates 49 kD canavalin subunit used as the substrate and the arrows (a and b) indicate the hydrolytic products of 49 kD canavalin subunit.

Sephacryl S-300 크로마토그래피로 재차 분리하여 얻은 protease I 과 II 가 각각 Cbz-ala-ONP 와 Cbz-gln-ONP 의 분해에 미치는 protease 억제제의 효과를 조사했을 때 protease I 과 II 모두 metalloproteinase 로 밝혀진 바와 일치하여 (Koh et al., 1993), 합성기질을 사용하는 경우나 *in vivo* 에서 기질이 되는 단백질인 canavalin 을 기질로 하였을 경우에 동일한 성질을 가지는 것으로 판단되었다. 또한, 2가 양이온의 존재하에서 canavalin 분해효소의 활성을 조사하였던 바 (Fig. 3), Zn^{2+} 와 Cu^{2+} 는 효소작용을 크게 억제하였으며 Ca^{2+} 은 조금 억제하는 결과를 나타냈으나 그 정도는 미약했다. 이러한 결과는 canavalin 분해효소인 protease I 이 Cbz-ala-ONP 를 기질로 하였을 때 metalloproteinase 를 억제하는 것으로 알려지고 있는 Cu^{2+} 와 Zn^{2+} 에 의해 크게 억제되었으며 metalloproteinase 를 촉진하는 것으로 알려진 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} 등에 의해서 촉진되지는 않았으나 다소 억제된 것과 대단히 유사하였으나, 또

다른 canavalin 분해효소인 protease II 는 Cbz-gln-ONP 를 기질로 하였을 때 이들 2가 양이온이 모두 20-30% 가량 억제하여 특정 2가 양이온의 효과를 알아볼 수 없었던 것과는 달랐다 (Koh, 1991). 그러나 본 canavalin 분해효소가 이들 protease I 과 II 로 구성되고 있음을 감안하면 protease I 의 2가 양이온에 대한 반응과 유사하여 합성기질을 기질로 하였을 때와 동일한 결과로 해석되었다. 그러나 Ca^{2+} 이 canavalin 분해를 촉진하지 않는 것은 jack bean 의 자엽에서 측정된 metalloproteinase 의 ^{125}I -iodoinsulin B chain 의 분해활성 조사에서 Ca^{2+} 인 경우 0.5 mM 과 5 mM 에서 각각 0% 와 40% 의 촉진효과를 보인다는 보고로 보아 이들 2가 양이온의 농도와 관계가 있을 것으로 보인다 (Dalkin et al., 1983).

한편, canavalin 분해효소의 합성기질에 대한 기질특이성을 조사하였다 (Baumgartner and Chrispeels, 1977; Sarath et al., 1989). 그 결과 (Table I), Cbz-gly-ONP, Cbz-gln-

ONP, Cbz-ala-ONP 등의 순으로 가수분해활성이 높았다. 이러한 결과는 Cbz-ala-ONP, Cbz-leu-ONP 등의 지방족사슬을 가지는 아미노산의 ester결합을 잘 분해하는 protease I 이나 Cbz-asn-ONP, Cbz-gln-ONP 등의 아미드기를 가지는 아미노산의 결합을 잘 분해하는 protease II와는 다르지만, 이들 protease I 과 II의 합성기질에 대한 분해활성을 합한 것과는 일치하였다(Koh *et al.*, 1989). 이러한 현상은 protease I 과 II의 분자량이 각각 200 kd와 27 kd로 실제 *in vivo* 상태에서는 canavalin분해효소가 27 kd의 단위체가 중합되어 존재할 가능성을 제시한 바 있어(Koh *et al.*, 1993) 이들 protease I 과 II의 관계가 밝혀져야 할 것으로 생각된다. 또한 본 canavalin분해효소가 Cbz-gly-ONP, Cbz-gln-ONP, Cbz-ala-ONP 등의 순으로 가수분해활성이 높은 것은 mung bean에서 vicilin을 분해하는 효소인 vicilin peptidohydrolase의 기질특이성과 대단히 유사하여(Baumgartner and Chrispeels, 1977), vicilin peptidohydrolase와의 상동성 유무도 밝혀져야 할 것이다.

Table I. Hydrolysis of synthetic substrates by the canavalin-hydrolyzing protease. Non-enzymic, spontaneous degradation of the substrates was determined in parallel assays and was subtracted in the reported values.

Substrates	Activity unit/mg ⁻¹ protein
Cbz-gly-ONP	3.9 ± 0.2
Cbz-gln-ONP	3.7 ± 0.1
Cbz-ala-ONP	3.7 ± 0.2
Cbz-val-ONP	2.6 ± 0.1
Cbz-asn-ONP	2.1 ± 0.4
Cbz-tyr-ONP	2.1 ± 0.2
Cbz-trp-ONP	1.6 ± 0.1
Cbz-leu-ONP	1.6 ± 0.1

참고 문헌

- Barrett, A. J. 1986. *In*, Plant proteolytic enzymes (Vol. I). Dalling, M. J. (Ed.). CRD Press, Boca Raton. pp.1-16.
- Baumgartner B. and M. J. Chrispeels. 1977. *Plant Physiol.* 58 : 1-6.
- Bond, H. M. and D. J. Bowles. 1983. *Plant Physiol.* 72 : 345-350.
- Dalkin, K., S. Marcus and D. J. Bowles. 1983. *Planta* 157 : 531-535.
- Dunaevsky, Y. E., A. M. Belozersky and Elpidina. 1983. *Biokhimiya* 48 : 572-576.
- Köehler, S. M. and T. -H. D. Ho. 1990. *Plant Physiol.* 94 : 251-258.
- Koh, S. C., 1991. "On the protease catalyzing the hydrolysis of canavalin in the cotyledons of *Canavalia lineata*" Ph. D. thesis, Seoul National University. pp.1-96.
- Koh, S. C. I. D. Hwang and Y. M. Kwon. 1991. *Korean Biochem. J.* 26 : 578-584.
- Koh, S. C., J. G. Koh, I. D. Hwang and Y. M. Kwon. 1993. *Korean Biochem. J.* 26 : 485-491.
- Larkins, B. A. 1981. *In*, The biochemistry of plants (Vol. 6), Stumpf, P. K. and E. E. Conn (Eds.). Academic Press, New York. pp.449-489.
- Laemmli, U. K. 1970. *Nature* 227 : 680-685.
- Miége M. -N. 1982. *In*, Encyclopedia of plant physiology (Vol. 14A), Boulter, D. and B. Parthier (Eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp.291-345.

Mitsuhashi, W., T. Koshiba and T. Minamikawa. 1986. *Plant Physiol.* 80 : 628-634.

Sammour, R. H., J. A. Gatehouse, J. Gilroy and D. Boullter. 1984. *Planta* 161 : 61-70.

Sarath, G., R. S. de la Motte and F. W. Wagner. 1989. In, *Proteolytic enzymes*, Beynon, R. J. and J. S. Bond (Eds.). IRL Press, Oxford, pp.25-55.

Shutov, A. D. and I. A. Vaintraub. 1987. *Phytochemistry* 26 : 1557-1566.

Smith, S. C., S. Johnson, J. Andrews and A. McPherson. 1982. *Plant Physiol.* 70 : 1199-1209.

Wilson, K. A. 1986. In, *Plant proteolytic enzymes (Vol. II)*. Dalling, M. J. (Ed.). CRC Press, Boca Raton. pp.19-47.

Yamaoka, Y., M. Takeuchi and Y. Morohashi. 1990. *Plant Physiol.* 94 : 561-566.

Yamauchi, D. and T. Minamikawa. 1986. *Plant Cell Physiol.* 27 : 1033-1041.

적 요

해너콩(*Canavalia lineata*) 자엽에서 canavalin 분해활성을 갖는 endopeptidase를 DEAE-Sephacel 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 protease 억제제의 효과와 합성기질에 대한 특이성을 조사하였다. Canavalin 분해효소의 활성은 phenanthroline, EDTA 그리고 DTT에 의해 크게 억제되었으며 Zn²⁺와 Cu²⁺ 등의 2가 양이온에 의해서도 크게 억제되어, canavalin 분해효소는 metalloproteinase로 밝혀졌다. 또한 Cbz-gly-ONP, Cbz-gln-ONP, Cbz-ala-ONP 등의 ester 결합을 잘 분해하여 합성기질에 대한 분해특성이 mung bean의 vicilin peptidohydrolase와 대단히 유사하였다.