

---

석사학위논문

해녀콩 (*Canavalia lineata* (L.) DC) 의 자엽에서  
Concanavalin A의 특성 및 Proteolytic Cleavage

제주대학교 대학원

생물학과



1990년 12월

---

해녀콩(*Canavalia lineata*(L.) DC)의 자엽에서  
Concanavalin A의 특성 및 Proteolytic Cleavage

지도교수 허 인 옥

고 정 군

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함.

1990년 12월

고정군의 이학석사학위 논문을 인준함.



심사위원장

위 원

위 원

제주대학교 대학원.

1990년 12월

---

On the Properties and Proteolytic Cleavage  
of Concanavalin A in the Cotylendons of  
*Canavalia lineata*(L. ) DC.

Jung-Goon Koh  
(Supervised by Professor In-Ok Heo)

 제주대학교 중앙도서관  
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY  
A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF NATURAL SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1990. 12

목 차

SUMMARY ..... 1

I . 서 론 ..... 2

II . 재 료 및 방 법 ..... 5

III . 결 과 및 고 찰 ..... 11

IV . 적 요 ..... 29

REFERENCES ..... 30



---

## Summary

The quantitative changes and the proteolytic cleavage of concanavalin A(Con A) were investigated in the cotyledons during germination and growth of *Canavalia lineata*. And then, the effect of protease inhibitor prepared from seeds of *C. lineata* was investigated on the cleavage of Con A by trypsin or chymotrypsin.

Four fragments with molecular weights of 30,000, 21,000, 17,000 and 11,000 were isolated as Con A from matured seeds of *C. lineata*. Changes of Con A content in the cotyledons during germination and growth of *C. lineata* decreased gradually 8 days later and digestion of Con A was not appeared by endogenous protease. Isolated Con A yielded fragments with molecular weights of about 23,000 and 14,000 by trypsin and yielded fragments with molecular weights of about 25,000, 19,000 and 15,000 by chymotrypsin.

Protease inhibitor prepared from seeds of *C. lineata* inhibited the intact Con A(mol wt 30,000) cleavage by chymotrypsin but did not inhibited the intact Con A cleavages by trypsin.

These results suggest that intact Con A in the early stage of growth is not cleaved by endogenous protease and not susceptible to proteolysis but could be cleavage of Con A by endogenous chymotrypsin-like protease.

## 1. 서 론

*Canavalia ensiformis*의 종자에서 총 단백질 함량의 30-28%를 차지하는 concanavalin A(Con A)는 canavalin 다음으로 높은 함량을 지니고 있으며 (Hague, 1975; Balkin and Bowles, 1983), 이들 Con A는 *C. ensiformis*에서 처음 분리된 lectin의 일종으로 (Sumner, 1919)  $\alpha$ -D-mannopyranosyl-,  $\alpha$ -D-glucopyranosyl- 또는  $\beta$ -D-fructofuranosyl- 말단 잔기를 갖는 탄수화물과 특이하게 결합하고(Goldstein and So, 1972; Goldstein and Hayes, 1978), 다양한 동물세포를 응집시키는 (Sumner and Howell, 1936) 특성을 갖는 식물 단백질이다.

Con A의 생리학적 역할에 대해서는 토양 bacteria에 대한 항체로서의 역할을 할 것이라는 보고(Bohlood and Schmidt, 1974; Bhuvanewari *et al.*, 1977)와 당의 저장과 이동에 관여 될 것이라는 보고(Kauss and Ziegler, 1974 ; Kauss, 1977) 및 세포분열과 세포신장에 관여된다는 제안(Bowles and Kauss, 1976; Bowles *et al.*, 1976)이 제시되고 있으나 아직도 식물체에서 Con A를 포함하는 여러 lectin의 생리학적 역할에 대해서는 밝혀지지 않았다(Sharon, 1979).

Con A의 구조에 대한 연구도 상당히 진행되어 분자량 27,000을 갖는 4개의 subunit로 구성되어 있으며(Wang *et al.*, 1971), pH 7.0 이상에서는 tetramer로 존재하나 pH 6.0 이하에서는 dimer상태로 되며(Wang *et al.*, 1975), 또한 각각의 subunit는 하나의  $Mn^{2+}$ 과  $Ca^{2+}$  이온(Sharon *et al.*, 1973) 및 하나의 탄수화물 결합부위를 갖고 있다고 보고 되고 있다 (Edelman *et al.*, 1972; Becker *et al.*, 1975; Reeke *et al.*, 1975). 한편 *C. ensiformis*의 종자 성숙과정에서 Con A는 분자량 30,000, 24,000, 17,000과 11,000을 갖는다는 보고(Marcus *et al.*, 1984; Carrington *et*

*al.*, 1985)와 이들 중에서 분자량 27,000-30,000인 intact Con A가 다른 것과 비교하여 함량이 높은 것으로 보고되고 있으며(Edmundson *et al.*, 1971; Wang *et al.*, 1971), 종자 성숙과정에서 Con A의 합성 및 특성에 관한(Susan *et al.*, 1984; Bowles *et al.*, 1986) 많은 연구가 진행되고 있다.

한편 Con A가 발아와 성장에 따른 분해기작에 대해서는 상당한 차이와 불일치되는 가설이 제안되고 있는데 종자 성숙과정에서 형성된 Con A의 다양한 polypeptide중에 intact Con A(Mr wt 30,000)보다 작은 polypeptide는 intact Con A가 enzymic 또는 nonenzymic cleavage에 의해 초래될 것이라고 보고하고 있으며(Edmundson *et al.*, 1971; Wang *et al.*, 1971) 이들 fragment의 -NH<sub>2</sub>와 -COOH terminal이 intact Con A와 연계되어 있기 때문에 Con A의 분해 산물로 몇몇 fragment가 만들어 질 수 있다고 추측한 보고(Waxdel *et al.*, 1971)와 intact Con A의 경우 적어도 두 개의 cleavage site가 존재한다는 보고가 있다(Dalkin and Bowles, 1983). 이에 반하여 Con A는 성숙한 종자내의 endopeptidase에 저항성을 가지며 적어도 성장초기에는 Con A와 이와 연계되는 fragment가 이동과 분해에 민감하지는 않다고 보고(Karen *et al.*, 1983)되고 있어 아직도 Con A의 분해기작에 대하여 정확한 결론을 내리지 못하고 있으며, 생장에 따른 Con A의 분해기작 및 함량변화에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

이들 대부분의 연구는 *C. ensiformis*을 재료로 이용 연구되어 왔으며 *C. gladiata*의 경우 Yamauchi와 Minamikawa(1986, 1987)에 의해 성숙하는 동안의 Con A합성에 대한 생화학적 특성에 대한 연구가 보고 되었으나, *C. lineata*에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 해너콩(*C. lineata*)종자에서 Con A를 분리하여 그 특성을 확인하고, Con A의 분해기작에 대해 알아보기 위하여 trypsin과 chymotrypsin의 처리로 인해 형성된 분해 산물을 분석하고, 이들의 분해 시 자엽에 존재하는 protease inhibitor의 영향을 확인하며 해너콩 종자

---

의 발아나 유식물의 성장에 따른 Con A의 변화를 알아보고자 실시하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 해너콩의 생육 조건과 생체량 및 전체량의 측정

#### 1) 종자의 준비 및 생육조건

본 실험에 사용한 해너콩(*Canavalia lineata*(L.) DC.) 종자는 제주도 북제주군 조천읍 다려도에서 채취하여 상온에 보관하면서 실험에 사용하였다. 먼저 균등한 무게를 갖는 종자를 선별하여 종피를 제거하고, vermiculite가 들어있는 pot(4 7.5 x 7.5 x 5.0 cm)에 5개씩 일정한 간격으로 파종하여 growth chamber에서 발아 및 성장을 시켰다. 생육온도는 25°C 를 유지하고, 빛은 형광등을 사용하여 7,000 lux의 연속광 하에서 증류수로 일정한 수분함량을 유지하며 생육시켰다.

#### 2) 유식물의 생체량 및 전체량 측정

발아와 생장중인 균일한 9 개체의 유식물을 자엽, 뿌리, 줄기, 잎으로 구분하여 2일 간격으로 채취하고 생체량을 측정한다. 다음, 80°C dry oven에서 48시간 동안 건조시킨 후 전체량을 측정하였다.

### 2. 해너콩 발아와 생장시 자엽에서의 단백질 추출 및 정량

#### 1) 단백질의 추출

자엽에 존재하는 단백질의 추출은 Yamauchi와 Minamikawa(1986)의 방법을 따랐다. 생장중인 식물체의 자엽을 취하여 자엽당 10 ml의 0.1 M borate buffer(pH 8.0)와 약간의 석영사를 넣고 마쇄한 후, 15,000 xg 로 30 분간 원심분리하여 상정액을 시료로 총 단백질 함량을 측정하였다. 또한 총 단백질을 albumin과 globulin으로 분리 측정하기 위하여 상정액을 20 mM citrate-potassium phosphate buffer(pH 5.0)로 24-30 시간 투

적하고 계속하여 증류수에서 2-3 시간 투석시켜 10,000 xg 에서 10 분 동안 원심분리한 다음 침전물을 globulin으로 하고 상정액을 albumin으로 하였다.

### 2) 단백질 함량측정

단백질 함량측정은 Lowry 등(1951)의 방법을 기초로 하여 실시하였다. 추출액을 1/20로 희석한 시료 0.5 ml에 10% trichloroacetic acid(TCA)를 0.5 ml 가하여 1,500 xg 에서 10 분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시키고, 침전물에 0.5 ml의 1N NaOH를 가한 후 발색용액은 0.098 N NaOH, 1.96% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.027% Na, K-tartrate, 0.01% CuSO<sub>4</sub>를 포함하는 3.5 ml 용액에 0.5 ml phenol reagent를 혼합하여 실온에서 30 분간 반응시킨 뒤 700 nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin(BSA)를 표준시료로 하여 단백질 함량을 산출하였다.

### 3. 전기영동

전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 의해 12.5% acrylamide gel을 이용하여 sodium dodecyl sulfate-acrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 실시하였다. 단백질 시료는 시료용완충용액(pH 6.8; 0.0625 M tris, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, 2.3% SDS)과 동량을 혼합한 다음, 90°C에서 5 분 동안 끓이고 사용하였다. 전극조 완충용액으로는 0.025 M tris-0.192 M glycine 완충용액(pH 8.3)에 0.1% SDS를 첨가하여 사용하였다. 전기영동은 stacking gel에서는 50 V로, running gel에서는 100 V로 정전압을 걸어주어 실시하였으며 전기영동이 끝난 후 gel은 염색액(0.025% Coomassie brilliant R-250, 50% methanol, 5% acetic acid)으로 염색하고 탈색용액(5% methanol, 7.5% acetic acid)으로 탈색시켰다. 표준단백질은 bovine serum albumin(66,000), egg albumin(45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), carbonic anhydrase

(29,000), trypsinogen(24,000), trypsin inhibitor (20,000),  $\alpha$ -lactalbumin (14,200)을 사용하였다.

#### 4. 해녀콩 종자에서의 Con A의 분리

Con A의 분리는 Agrawal과 Goldstein(1967)의 방법을 기초로하여 실시하였다. 우선 해녀콩 종자의 종피를 제거한 후에 mortar에서 마쇄하여 분말을 만들었다. 20 g의 해녀콩 분말에 500 ml의 acetone를 넣고 30 분 동안 현탁시킨 후 여과시켜 residue를 냉동실에 보관하면서 acetone을 증발시켰다. 탈지된 분말 20 g에 1 M NaCl을 200 ml를 넣고 30 분 동안 재현탁시킨 후 여과시켜 여과액에 ammonium sulfate을 서서히 녹이면서 90%로 포화시키고 10,000 xg 에서 10 분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 침전물을 20 ml의 1 M NaCl로 녹인 다음, 4°C에서 2 l의 1 M NaCl에 12 시간 동안 투석을 시켜 Con A 시료로 사용하였다.

Con A의 분리는 Con A가 탄수화물과 결합할수 있는 성질(Golstein, 1976; Goldstein and Hayes, 1978)을 이용하였으며 Sepadex G-50 column ( $\phi$  1 x 20 cm)을 1 M NaCl로 충분히 equilibrium시키고 10 ml의 시료를 넣고 유출시킨 뒤 200 ml의 1 M NaCl를 흘려 보내고, 10 mM glucose을 포함하는 1 M NaCl를 흘려 보내면서 50 ml의 Con A 분획을 모으고 실험에 사용하였다.

#### 5. Con A의 특성 확인

##### 1) 적혈구의 응집반응

분리한 Con A에서의 적혈구 응집반응은 Kochibe(1986)의 방법을 기초로 하여 O형의 human erythrocyte를 갖고 실시하였다.

분리한 Con A 용액을 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid, disodiumsalt (EDTA)를 포함하는 PBS buffer(pH7.2; 5 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl)로 4°C에서 12 시간 투석시킨 뒤 U-shaped microtiter plate

에 150  $\mu$ l의 연속적인 Con A 희석액과 50  $\mu$ l의 1% 적혈구 suspension를 혼합한 뒤 2 시간 30 분 동안 실온에 정치시켜 응집여부를 확인하였다.

## 2) Con A-binding peroxidase 활성 조사

Con A가 당단백질과 결합할 수 있는 성질을 이용하여(Richard, 1981) Con A-binding peroxidase 활성을 조사하였다. 분리한 Con A 용액을 coating buffer (pH 7.4; 50 mM tris-HCl, 200 mM NaCl)로 12 시간 동안 투석시킨 뒤, 연속적인 Con A 희석액을 U-shaped microtiter plate의 well에 각각 200  $\mu$ l를 넣고 12 시간동안 coating 시켰다. Con A가 coating된 well은 TBS buffer(pH 7.4; 50 mM tris-HCl, 200 mM NaCl)로 10 분 동안 씻고, 5% 탈지 분유를 포함하는 TBS buffer로 30 분 동안 blocking 시킨뒤, 0.5% Tween 20을 포함하는 TBS buffer로 15 분간 3 회 씻어내고 5% 탈지 분유를 포함하는 TBS buffer에 peroxidase를 50  $\mu$ g/ml 되게 만들어 각 well에 200  $\mu$ l를 넣은뒤 30 분 동안 Con A와 결합되게 하였다. Con A-binding peroxidase는 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 0.04% phenylene diamine을 함유하는 0.2 M sodium phosphate -0.1 M citrate 완충용액(pH 5.0) 200  $\mu$ l를 각각의 well에 넣고 10 분 동안 반응시키고 50  $\mu$ l의 2.5 M sulfuric acid로 반응을 중지 시킨 후 관찰하였다.

## 6. 발아와 생장시 Con A 함량 변화 조사

Con A의 함량 변화는 생장중인 식물체의 자엽의 단백질을 SDS-PAGE로 분리하여 595 nm에서 gel scanning한 후, 분자량 30,000의 Con A에 해당되는 부분을 OD x Scanning length로 조사하였다.

## 7. Protease inhibitor와 BAPNAase 활성 측정

### 1) Protease inhibitor와 조효소의 추출

Protease inhibitor와 조효소액의 추출은 Baumgartner과 Chrispeels

(1976)의 방법을 따랐다. 한 쌍의 자엽을 10 ml의 0.1 M borate buffer (pH 8.0)로 마쇄하고 15,000 xg 에서 30 분 동안 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 하였으며, 상정액을 70°C에서 10 분 동안 끓인뒤 protease inhibitor로 사용하였다.

### 2) Trypsin-like protease의 활성 측정

Trypsin-like protease의 활성 측정은 Nielsen 과 Liener (1984)의 방법을 따라 실시하였는데 반응용액은 1 mM BAPNA( $\alpha$ -N-3-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide)과 20 mM CaCl<sub>2</sub>을 포함하는 0.1 M tris-HCl(pH 8.0) 1.6 ml과 0.4 ml의 조효소액을 혼합하여 35°C에서 1 시간 30 분 동안 반응시킨 뒤 1 M acetic acid로 반응을 중지시켜 BAPNA의 분해정도를 410 nm에서 측정하였다.

### 3) protease inhibitor 활성 측정

Protease inhibitor의 활성은 trypsin inhibitor 활성을 측정하는 것으로 대신하였으며 Nielsen 과 Liener(1984)의 방법을 토대로 하여 실시하였는데 반응용액은 1  $\mu$ g의 trypsin, 1 mM BAPNA, 20mM CaCl<sub>2</sub>를 함유하는 0.1M tris-HCl (pH 8.0) 1.6 ml과 0.2 ml의 inhibitor 추출액을 혼합하여 35°C에서 1 시간 동안 반응시킨 뒤 1 M acetic acid로 반응을 중지시켜 BAPNA의 분해정도를 410 nm에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도 0.1 억계정도를 1 unit로 규정하여 inhibitor 활성을 계산하였다.

## 8. Trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해 및 그에 대한 protease inhibitor의 효과

Trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해는 Cunningham 등(1972)의 방법을 사용하였다.

분리한 Con A는 충분한 양의 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로

12 시간 동안 투석시키고, 투석시 생긴 침전물은 원심분리에 의해 제거한 뒤 시료로 사용하였고 trypsin과 chymotrypsin은 증류수로 녹여서 사용하였다.

Con A분해는 35°C를 유지하여 실시하였으며, 반응시 Con A의 농도는 1 mg/ml이 되게하고 trypsin과 chymotrypsin의 경우는 각각 0.1 mg/ml이 되게하여 반응시킨 후, SDS-시료완충용액을 동량 첨가한 뒤 90°C에서 5 분 동안 끓여 반응을 중지시켜서, SDS-PAGE로 각각의 분해 정도를 분석하고 필요에 따라서는 595 nm에서 gel scanning으로 분석하였다.

Trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A 분해시 protease inhibitor에 의한 효과를 알아보았다. 각각의 반응용액에 35 unit의 trypsin-inhibitor의 추출액을 혼합하여 35°C에서 시간별로 반응시킨뒤, SDS-완충 시료용액과 동량 혼합한 뒤 90°C에서 5 분 동안 끓여 반응을 중지시키고 SDS-PAGE로 조사하였다.



### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 해녀콩의 발아와 성장시 성장량의 변화와 단백질 함량변화

성장중인 유식물에서 각 부위의 생체량의 변화를 보면(Fig. 1. A), 자업을 제외한 부위에서 성장과 더불어 지속적으로 증가되었고, 잎의 생체량은 10일 이후 급속한 증가를 보이다가 16일 이후 점진적인 증가를 나타냈다. 반면 자업에서는 수분의 흡수로 초기에 증가를 보이거나 이후 완만하게 감소됨을 볼 수 있었다. 또한 전체량의 변화를 보면(Fig. 1. B) 자업을 제외한 각 부위에서 성장과 더불어 지속적인 증가를 나타냈고 자업에서는 18일까지 계속하여 감소하였다.

또한 유식물이 성장하는 동안의 자업내에서의 단백질 함량의 변화를 보면(Fig. 2), 총 단백질 함량의 변화는 성장과 더불어 지속적으로 감소되었으며, albumin함량의 경우는 8일 이후에 미세한 양의 감소만을 보인 반면 globulin함량의 경우는 총 단백질 함량의 변화와 유사하게 성장과 더불어 지속적인 감소를 나타냈다. 특히 성숙한 종자의 경우 단백질의 함량은 전체량의 30%정도를 차지하였는데, 이는 대부분 콩과 식물의 경우 종자의 전체량에 대해 차지하는 비율인 약 25-30%와 유사하며, globulin과 albumin의 함량은 각각 총 단백질 함량의 85%, 15%를 차지하여 다른 콩과 식물과 유사하였다

이러한 결과로 볼때 Fig. 1에서 증류수에서 생육되는 유식물의 생장은 자업의 무게 감소와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있고 증류수에서 생육하여 다른 영양분의 공급이 차단되었다고 볼 때 자업의 단백질을 포함하는 유기화합물이 뿌리, 줄기, 잎 등의 배속 부위로 이동되었을 것으로 보이며, 자업에서 단백질 함량의 감소가 이를 뒷받침하고 있다. 또한 조사 기간 동안 자업의 단백질 감소량의 대부분은 globulin이라 볼 수 있고, 생

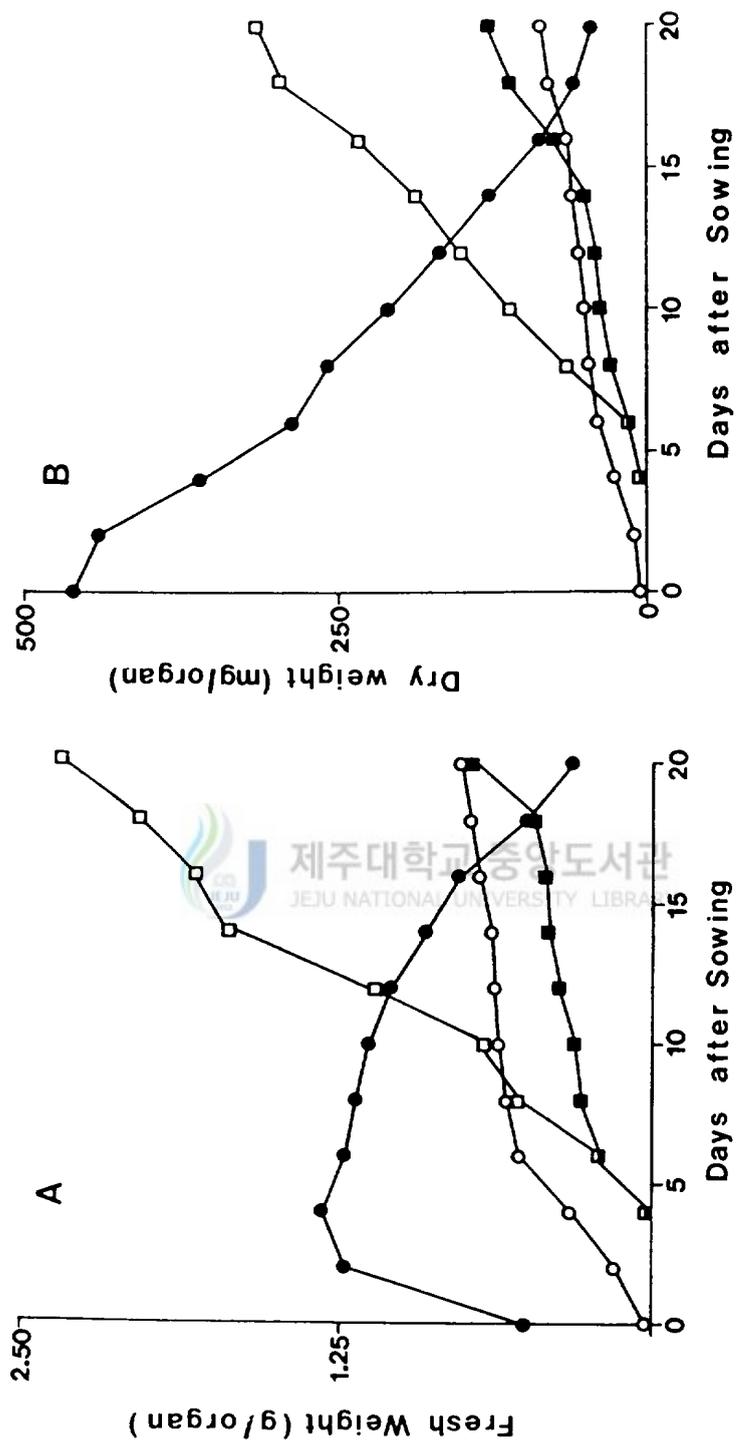


Fig. 1. Changes of fresh weight (A) and dry weight (B) in each plant part during germination and growth of *C. lineata*.  
 ● : cotyledons, ○ : leaves, □ : fruits, ■ : stems. Each value represents the mean of three separate determinations performed with nine seedlings.

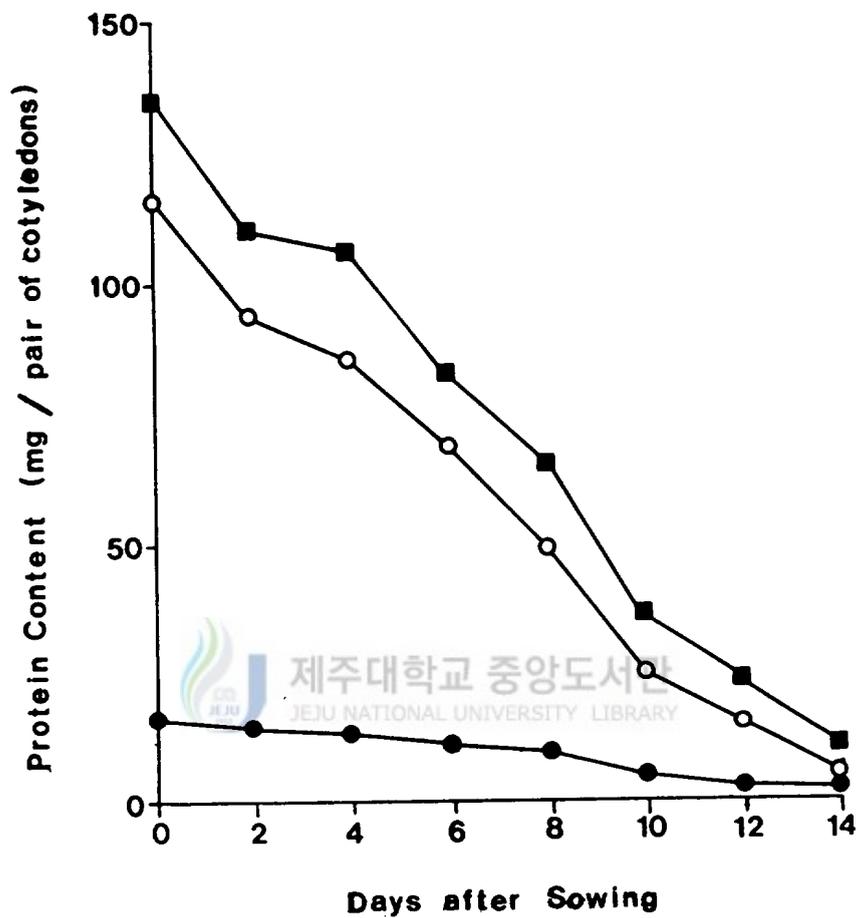


Fig.2. Changes of protein content in the cotyledons of seedlings during germination and growth of *C. lineata*.

■ :total protein contents, -○- :globulin contents, -●- : albumin contents. Each value represents the mean of three separate determinations performed with nine pairs of cotyledons.

장 12일 이후 대부분의 단백질이 소실되었는데 Fig. 1에서 발아와 생장시  
아의 생장량의 증가로 보아 12일 이후 autotrophic한 생장이 이루어진다  
고 사료된다.

## 2. 해녀콩의 발아와 생장시 자엽 단백질의 전기영동 pattern

생장하는 동안의 자엽에서 SDS-PAGE에 의한 주요 단백질의 변화를 살펴  
보면(Fig. 3) 분자량 48,000정도를 갖는 band A의 경우 생장초기에 급속  
한 감소를 보인 반면 분자량 30,000정도를 갖는 band B와 분자량 17,000  
정도를 갖는 band D의 경우 8일 이후부터 감소되었으며 분자량 23,000정  
도를 갖는 band C의 경우는 생장초기에 형성된 뒤 이후 점차 감소됨을 볼  
수 있었다. 이들 4개의 주요 단백질 band외에는 생장과 더불어 생장 10일  
까지 지속적인 감소를 보였다. 이는 Fig. 2의 단백질 함량 변화에서  
globulin의 감소와 비교하여 보았을때 48,000의 band A, 23,000의 band  
C, 17,000의 band D와 30,000의 band B 등은 globulin에 속하는 것으로  
해석된다.

## 3. Con A의 분리 및 특성

### 1) Con A의 분리

해녀콩의 종자로 부터 분리한 Con A를 시료로하여 SDS-PAGE를 실시한  
결과(Fig. 4) 분자량 30,000을 갖는 하나의 주요 band와 분자량 21,000,  
17,000과 11,000을 갖는 세 개의 작은 band가 나타났다. 이와같은 결과는  
*C. ensiformis*에서 분자량 27,000, 18,000, 13,000과 11,000을 갖는 Con  
A가 있다는 보고(Karen *et al.*, 1983)와는 다르게 나타났으나, *C.*  
*ensiformis*와 *C. gladiata*에서 나타난 보고(Yamauchi and Minamikawa,  
1987)와 일치되는 것으로 보아 *Canavalia*속 식물에 존재하는 Con A는 분  
자량 30,000, 21,000, 17,000과 11,000을 갖는 4개의 다른 polypeptide가  
존재된다고 볼 수 있으며, 특히 분자량 30,000인 polypeptide는 Fig. 3에

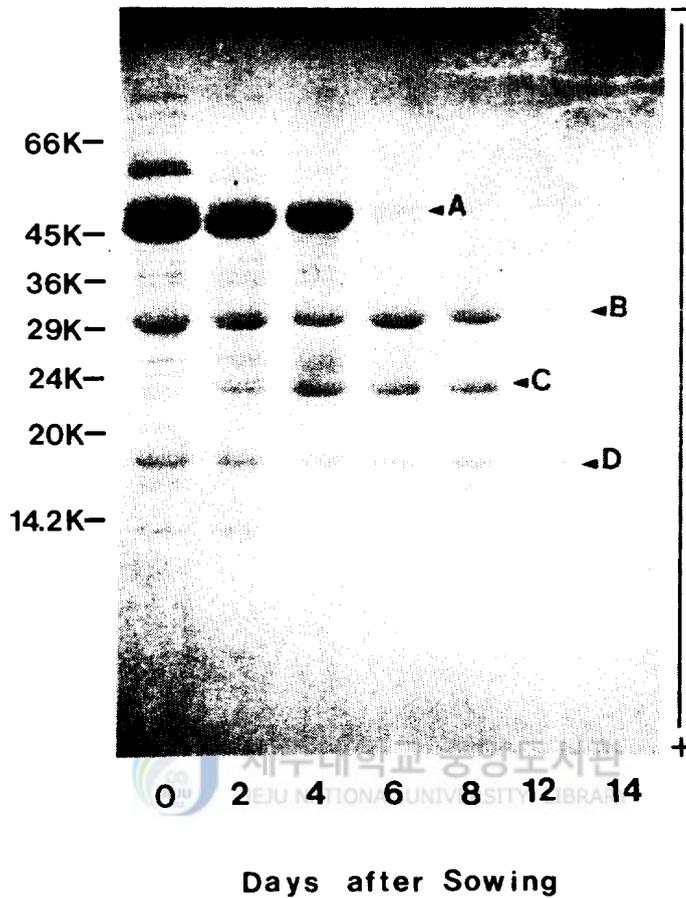


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of total protein in the cotyledons during germination and growth of *C. lineata*.

The representation of mol wt markers signified at the left side of electrophoretogram, (from top to botom: bovine serum albumin(66,000), egg albumin(45,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000), carbonic anhydrase(29,000), trypsinogen(24,000), trypsin inhibitor(20,000) and  $\alpha$ -lactalbumin(14,200).

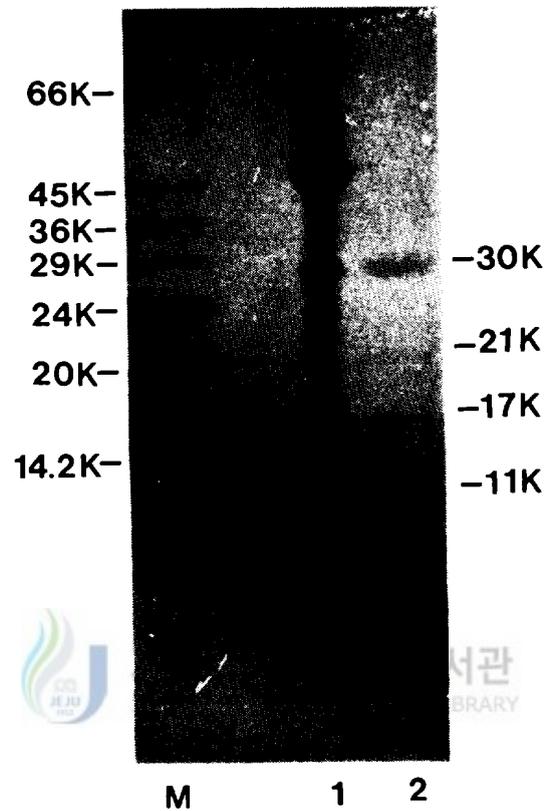


Fig.4. Comparison of SDS-PAGE patterns of total protein(lane 1) and Con A(lane 2) isolated from matured seeds of *C. lineata*.

Mol wt markers in lane M are the same as for Fig.3 and mol wt markers at the right side of electrophoretogram were determined by comparison with migration distances of a series of standard proteins on SDS-PAGE.

서의 band B와 일치하였으며 다른 Con A fragment와 비교하여 높은 함량을 차지하고 있음을 알 수 있다.

### 3) Con A의 특성

Con A는 적혈구 뿐만 아니라 그외 다양한 세포들을 응집시키는 성질을 갖고 있는 lectin의 일종으로(Sumner and Howell, 1936), 당단백질과 결합할 수 있는데 Con A의 경우 당단백질인 peroxidase와 결합할 수 있는 특이성을 갖고 있다(Richard, 1981).

따라서 분리한 Con A를 적혈구와 응집시킨 결과 75  $\mu\text{g}$ 이상의 Con A는 50  $\mu\text{l}$ 의 1% 적혈구를 응집시킬 수 있는 활성을 갖고 있으며, 10  $\mu\text{g}$ 이하의 Con A에서는 거의 적혈구를 응집시키지 못하였다(Fig. 5. A). Con A와 peroxidase를 결합시킨 결과는 Con A의 농도가 증가함에 따라 peroxidase 활성이 높게 조사되었다(Fig. 5. B).

또한 Con A의 용해성을 알아보기 위하여 미발아 종자의 조효소액을 globulin과 albumin으로 분리하여 SDS-PAGE를 실시한 결과(Fig. 6) globulin의 성질을 갖고 있음을 알 수 있었고 *C. gladiata*에서 Con A는 globulin으로 축적된다는 보고(Yamauchi and Minamikawa, 1986)와 일치되었다.

이러한 결과들로 볼 때 Fig. 4의 분리된 단백질이 탄수화물에 결합하는 성질과 적혈구 세포를 응집시키는 특이성 및 당단백질인 peroxidase와 결합할 수 있는 특이성을 갖는 결과로 보아 lectin의 일종인 Con A라 할 수 있다.

### 4. 해녀콩의 발아와 성장시 Con A함량의 변화

해녀콩의 성장하는 동안 성숙한 종자에서의 Con A 함량에 대한 상대적인 변화를 보면(Fig. 7), 성장초기에는 거의 변화를 나타내지 않았으나 8일 이후 급속한 감소를 보였으며, 자엽내의 대부분의 단백질이 소실된 단

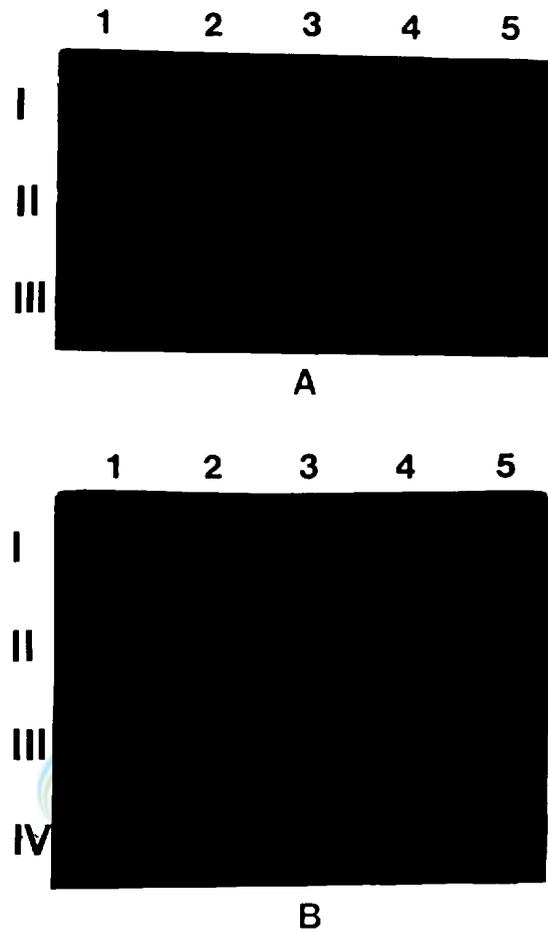


Fig.5. Agglutination test(A) and peroxidase-binding activity(B) of Con A isolated from *C. lineata* seeds.

About 150 ug(lane 1), 75 ug(lane 2), 37.5 ug(lane 3), 18.75 ug (lane 4) and 9.37 ug(lane 5) of Con A were loaded on each well of U-shaped microtiter plate and each lane was repeated triply(I, II and III). Transversal lane IV in B represent complete reaction mixture in the absence of Con A.

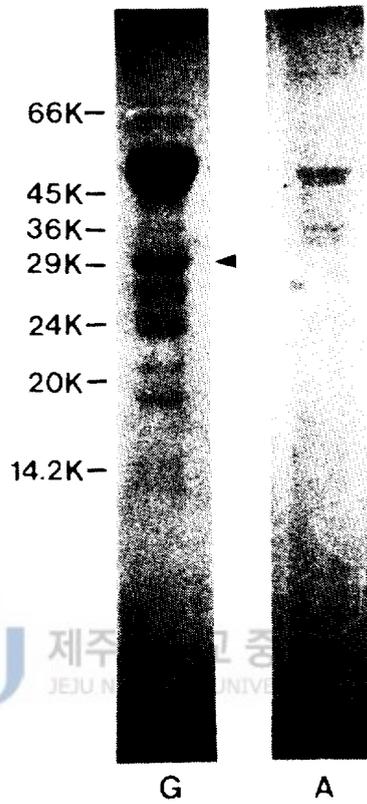


Fig. 6. SDS-PAGE patterns of globulin(G) and albumin(A) fractions prepared from matured seeds of *C. lineata*. The arrow represents the major polypeptide of Con A (30,000) in Fig. 4. Mol wt markers are the same for Fig. 3.

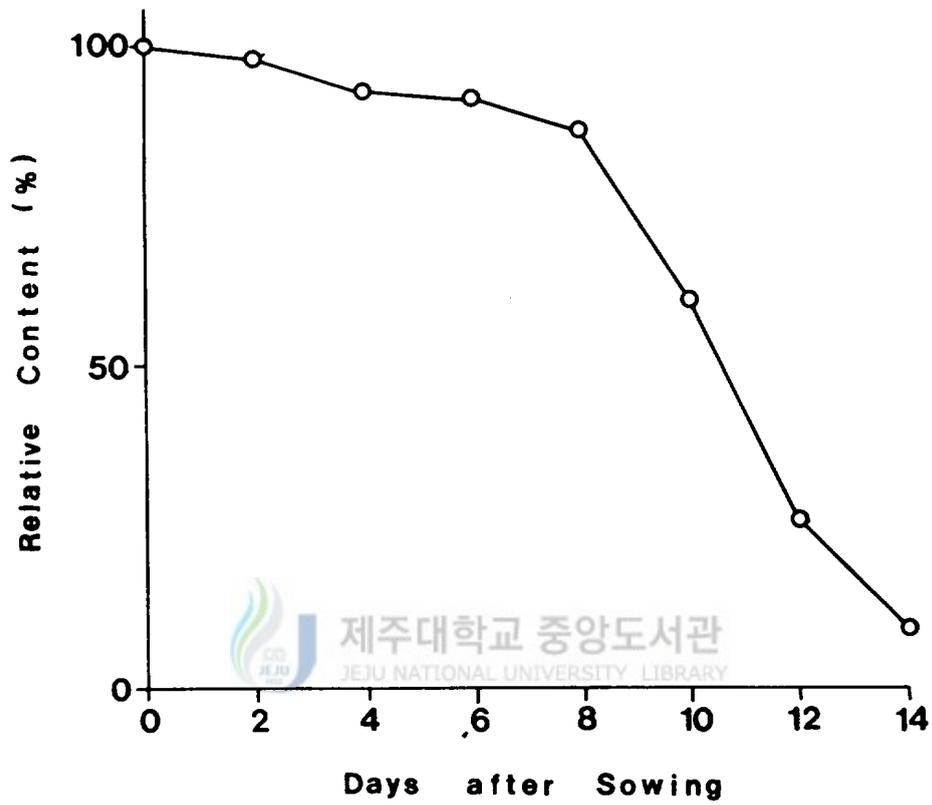


Fig. 7. Changes in relative content of Con A during germination and growth of *C. lineata*.

Amounts of each Con A were based on the weight of peaks corresponding to the Con A from scans after SDS-PAGE. Each values were determined relative to Con A content of dry seed.

계에서도 소량 남아있는 상태를 보였다. 이러한 결과는 Fig. 3에서 band B의 변화와 일치하고 있음을 알 수 있으며 발아 후 8일까지 Con A가 크게 변화하지 않는 것으로 보아 발아 후 8일까지는 생장에 크게 관여하지 않는 것으로 볼 수 있다.

## 5. Con A의 분해

### 1) Endogenous protease에 의한 Con A의 분해

Endogenous protease에 의한 Con A의 분해를 알아보기 위하여 우선 발아 단계별로 trypsin-like protease 활성과 trypsin inhibitor의 활성을 측정하였다. 그 결과(Fig. 8) trypsin-like protease활성의 경우 생장 초기에 완만히 증가되다가 6일 이후 지속적인 감소를 나타내었고, trypsin inhibitor활성은 초기에 완만한 감소를 보이다가 6일 이후 성숙한 종자보다 50% 이상의 활성이 감소되었으며 14일까지 자엽에서는 대부분의 inhibitor 활성이 감소된 양상을 보였다. 따라서 Con A가 endogenous protease에 의하여 분해되는지 여부를 알아보기 위하여 미발아 종자와 trypsin inhibitor활성에 비해 trypsin-like protease활성이 상대적으로 높은 발아후 8일째 자엽의 조효소액을 사용하여 다양한 조건에서 autodigestion을 시킨 결과(Fig. 9) 어느 조건에서도 Con A는 분해되지 않았다. 이러한 결과는 Fig. 8에서 tyrrpsin-like protease활성이 존재하나 분해되지 않는 것으로 보아 endogenous한 trypsin-like protease에 의해서 Con A 분해되지는 않는 것으로 보이며 *C. ensiformis*인 경우에 있어서 endogenous한 protease에 의한 protolysis가 일어나지 않는다는 보고(Dalkin *et al.*, 1983; Karens *et al.*, 1983)와 일치하며 Con A가 발아와 생장이 진행됨에 따라 endogenous한 protease에 의해 분해되지는 않는 것으로 추측된다.

### 2). Trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해 및 그에 대한 protease

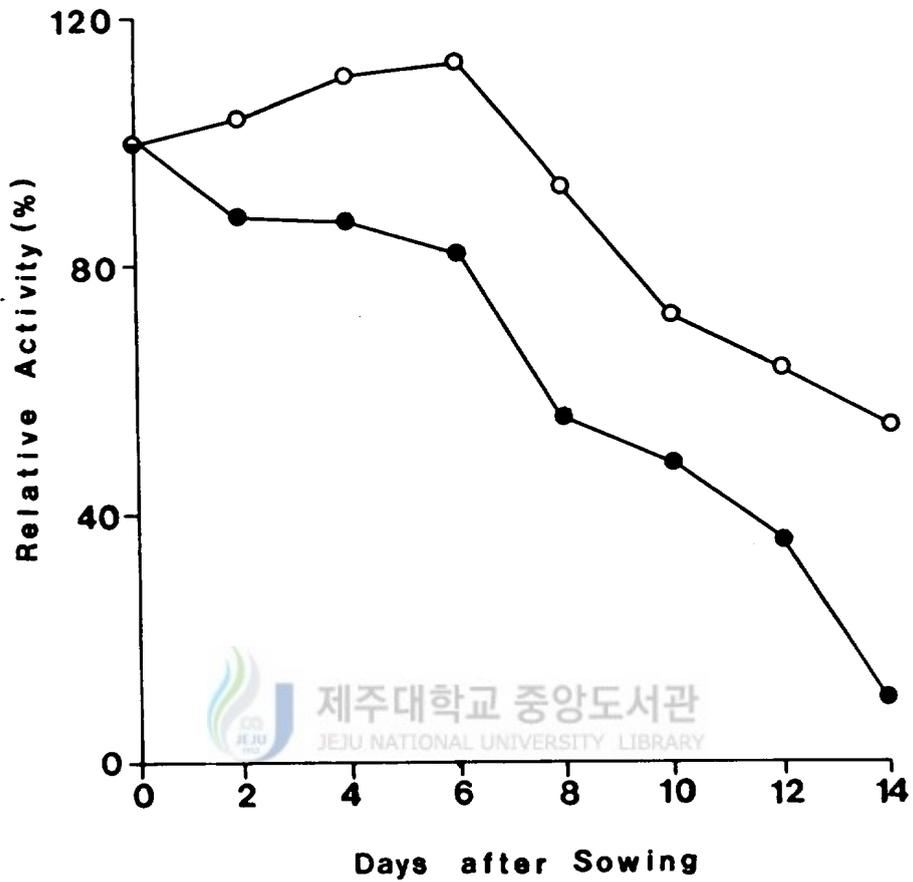


Fig.8. Changes in trypsin-like activity and trypsin inhibitor activity in the cotyledons during germination and growth of *C. lin eata*.

-○-;trypsin-like activity, -●-;trypsin inhibitor activity. Relative activities are expressed in relation to activity determined in dry seed.

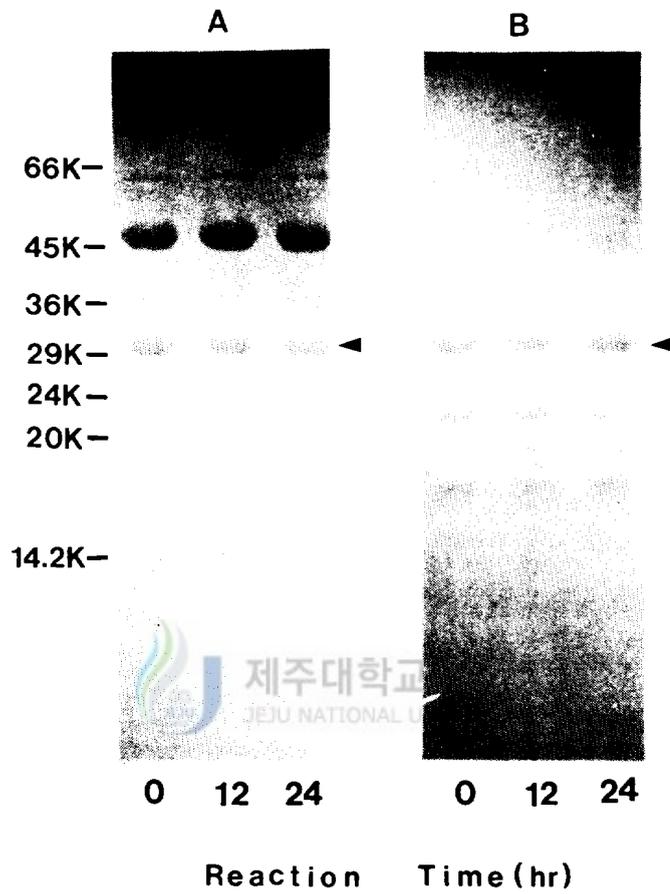


Fig.9. Time courses of the intact Con A degradation by autodigestion in the cotyledons of *C. lineata*.  
 A: dry seed, B: 8-days-old cotyledons after sowing. Arrows correspond to intact Con A and mol wt markers are the same as for Fig.3.

## inhibitor의 효과

Trypsin 및 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해를 조사한 결과(Fig. 10), trypsin처리시 분자량 30,000의 intact Con A의 경우 23,000과 14,000경도의 분자량을 갖는 새로운 두개의 band가 나타났으며, chymotrypsin처리시에는 분자량 25,000, 19,000 과 15,000을 갖는 새로운 세개의 band가 나타났다. 이런 결과는 trypsin/Con A의 비가 0.01이 되게 처리할때 분자량 20,000과 8,000을 갖는 새로운 두개의 band가 나타난다는 보고(Cunningham *et al.*, 1972)와 분자량에 있어 다소 차이를 나타냈으나 분해되는 유형은 비슷하였다.

한편 trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해에 있어서 protease inhibitor의 효과를 알아보기 위해 inhibitor활성이 가장 높은 미발아 종자상태일 때 추출한 protease inhibitor용액을 이용하여 각 효소에 의한 분해시 효과를 조사하였다. trypsin에 의한 Con A의 분해시 inhibitor의 영향(Fig. 11)은 inhibitor를 처리하지 않은 경우(Fig. 11. A)는 반응 시간의 경과함에 따라 Con A의 감소가 일정하게 진행될 뿐만 아니라, 새롭게 형성된 분자량 23,000, 14,000을 갖는 polypeptide경우도 trypsin에 의해 지속적으로 감소되었다. 그리고 inhibitor를 처리한 경우(Fig. 11. B)에도 점차적으로 감소하여 inhibitor에 의한 억제정도는 아주 낮았으며 분해물의 양상은 특이한 분해물의 형성없이 전체적으로 단백질이 감소됨이 특징적이어서 대조구와는 차이를 보였다. 그러나 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해시 inhibitor의 영향을 보면(Fig. 12) inhibitor를 처리하지 않은 경우 반응 시간이 경과됨에 따라 Con A의 감소가 일정하게 진행될 뿐만 아니라 새롭게 형성된 분자량 25,000, 19,000과 15,000의 경우도 chymotrypsin에 의해 지속적으로 감소됨을 볼 수 있는데(Fig. 12. A) 반해 inhibitor를 처리하면 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해가 크게 억제되었다(Fig. 12. B).

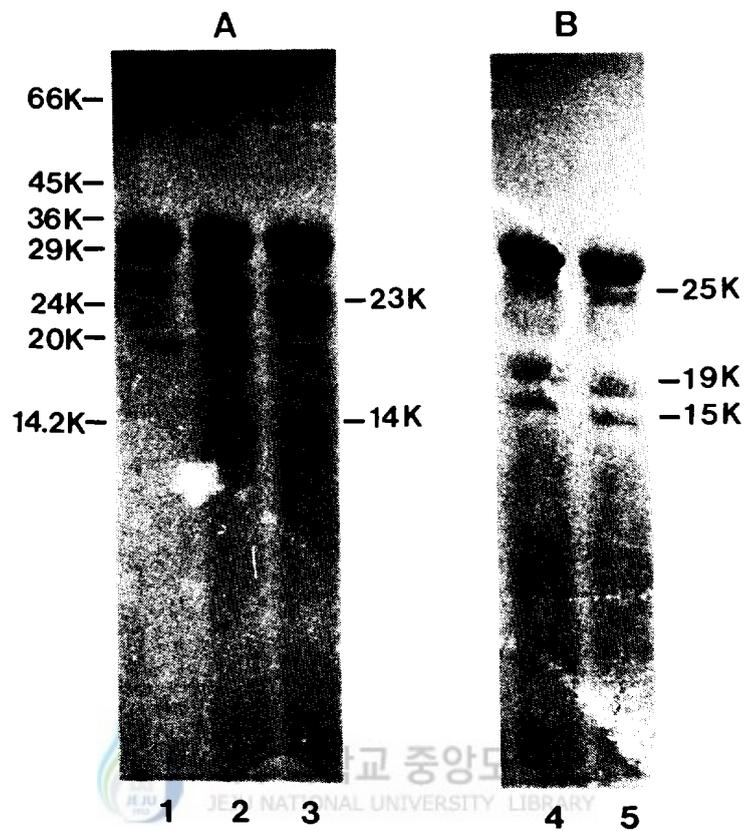


Fig. 10. Comparison of SDS PAGE patterns on Con A cleavages by trypsin(A) and chymotrypsin(B).

Lane 1:Con A before addition of enzyme, Lane 2, 4:after 5 min, Lane 3, 5: after 15 min. Mol wt markers are the as for Fig. 3. The complete reaction mixture in A consisted of 1 mg/ml Con A and 0.1 mg/ml trypsin and the complete reaction mixture in B consisted of 1 mg/ml Con A and 0.1 mg/ml chymotrypsin.

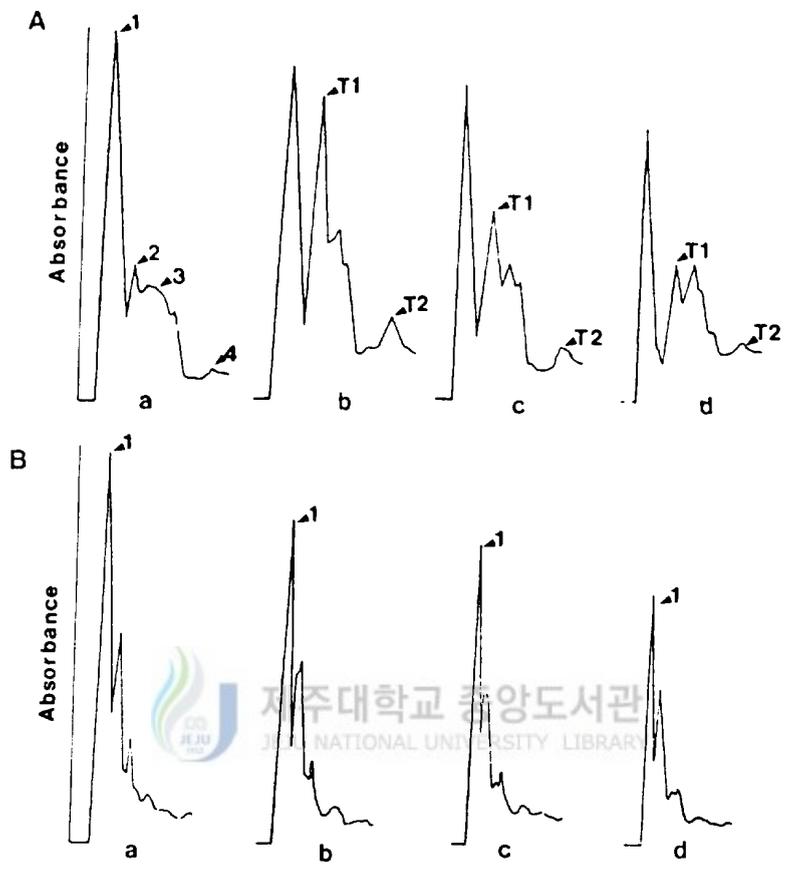


Fig. 11. Gel scans of SDS PAGE gel patterns on Con A cleavages by trypsin. A:control(1 mg/ml Con A, 0.1 mg/ml trypsin) B:inhibitor tretment (1 mg/ml Con A, 0.1 mg/ml trypsin,35 units inhibitor), (a) before addition of enzyme, (b) 30 min after addition of enzyme, (c) after 1 hr, (d) after 2 hr. Arrows labelled "1-4" refer to the different molecular species on Con A and "T1-T2" refer to products obtained from tryptic cleavage.

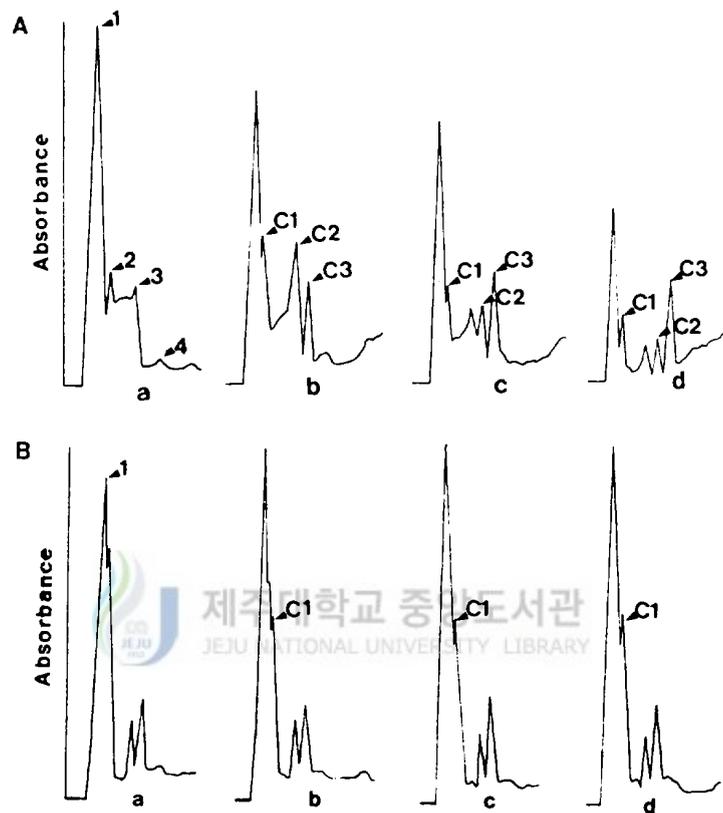


Fig.12. Gel scans of SDS-PAGE patterns on Con A cleavages by chymotrypsin. A:control(1 mg/ml Con A, 0.1 mg/ml chymotrypsin) B:inhibitor treatment(1 mg/ml Con A, 0.1 mg/ml chymotrypsin,35 units inhibitor), (a) Con A before addition of enzyme, (b) 30 min after addition of enzyme, (c) after 1 hr, (d) after 2 hr. Arrows labelled "1-4" refer to the different molecular species on Con A and "C1-C3" refer to products obtained from chymotryptic cleavage.

이들 결과를 종합하여 보면 (Table 1) intact Con A의 분해시 2시간 반응시킨 결과 trypsin에 의해 최초 Con A의 함량의 26.4%를 분해시켰고 chymotrypsin에 의해 49.7% 정도를 분해시켜 chymotrypsin이 trypsin에 의한 분해보다 두배 정도 높은 분해를 보였으며 inhibitor처리시 trypsin에 의한 분해는 거의 영향을 받지 않는데 반하여 chymotrypsin에 의한 분해는 대부분 억제되었다. 이와같이 trypsin에 의한 분해는 억제되지 않는

Table 1. Effect of inhibitor on intact Con A cleavage by trypsin and chymotrypsin treatment.

Proteolytic cleaved amounts were estimated as decrease of intact Con A by gel scanning and each values were expressed in relation to intact Con A at zero time.

Relaction Time(min)	Tryptic cleavage %		Chymotryptic cleavage %	
	- inhibitor	+ inhibitor	- inhibitor	+ inhibitor
0	100	100	100	100
30	91.5	91.1	80.7	98.8
60	83.0	87.7	72.4	98.0
120	73.6	75.3	50.3	97.6

데 반하여 chymotrypsin에 의한 분해가 억제되는 결과는 발아와 생장 중에 Con A의 변화가 endogenous한 chymotrypsin류에 의한 분해 가능성을 시사하고 있다. 그러나 nonenzymic하게 Con A가 분해된다는 보고 (Edmundson *et al.*, 1971; Wang *et al.*, 1971)로 보아 Con A의 분해 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 사료된다.

#### IV . 적 요

해녀콩(*Canavalia lineata*)종자에서 발아와 유식물의 생장에 따른 Con A의 변화와 분해기작 및 분해시 자엽에 존재하는 protease inhibitor의 영향을 알아보았다.

해녀콩의 종자에서 Con A는 분자량 30,000, 21,000, 17,000, 11,000을 갖는 4개의 polypeptide band로 분리되었다. 해녀콩의 발아와 생장시, Con A의 함량변화는 생장 8일 이후에 완만한 감소를 보였고, endogenous protease에 의해 분해가 이루어지지는 않았다. Trypsin과 chymotrypsin에 의한 Con A의 분해를 보면, trypsin에 의한 분해시에는 분자량 23,000, 14,000을 갖는 새로운 polypeptide가 생성되었으며, chymotrypsin에 의한 분해시에는 분자량 25,000, 19,000과 15,000을 갖는 새로운 polypeptide가 생성되었다. 그리고 intact Con A의 분해는 chymotrypsin에 의한 분해가 trypsin에 의한 분해보다 3배정도 높게 나타났다. 성숙한 해녀콩 종자에서 추출한 protease inhibitor는 trypsin에 의한 intact Con A분해에는 영향을 주지 않았지만, chymotrypsin에 의한 intact Con A의 분해시는 억제 효과가 크게 나타났다.

이상의 결과로 볼때 Con A가 발아 초기에 endogenous한 protease에 의해 분해되지는 않았으나, endogenous chymotrypsin류에 의해서 분해될 가능성이 있으며 생장초기의 분해에 민감하지는 않은 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Agrawal, B. B. L. and I. J. Goldstein. 1967. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. *Biochem. Biophys. Acta.* 147:262-271.
- Baumgartner, B. and M. J. Chrispeels. 1976. Partial characterization of a protease inhibitor which inhibits the major endopeptidase present in the cotyledons of mung beans. *Plant. Physiol.* 58:1-6.
- Becker, J. W., G. N. Reeke., J. L. Wang., B. A. Cunningham and G. M. Elleman. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *J. Bio. Chem.* 250:1513-1524.
- Bhuvanewari, T. V., S. G. Pueppke and W. D. Bauer. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. *Plant Physiol.* 60:486-491.
- Bohlood, B. B. and E. L. Schmidt. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Sci.* 185:296-271.
- Bowles, D. J. and H. Kauss. 1976. Characterization, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from *Phaseolus aureus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 443:360-374.
- Bowles, D. J., C. Schnarrenberger and H. Kauss. 1976. Lectins as membrane components of mitochondria from *Ricinus communis*. *Biochem. J.* 160:375-382.

- Bowles, D. J., E. M. Susan., J. C. P. Darryl., B. C. F. John., E. Elias., R. M. Deter and B. Jeremy. 1986. Post translational processing of concanavalin A precursors in jack bean cotyledons. *J. Cell. Biol.* 102:1284-1297.
- Cunningham, B. A., J. L. Wang., M. N. Pflumm and G. M. Edelman. 1972. Isolation and proteolytic cleavage of the intact subunit of concanavalin A. *Biochemistry* 11:3233-3239.
- Carrington, D. M., A. Auffret and D. E. Hanke. 1985. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. *Nature.* 313:64-67.
- Dalkin, K. and D. J. Bowles. 1983. Analysis of inter-relationship of jack bean seed components by two-dimensional mapping of iodinated tryptic peptides. *Planta.* 157:536-539.
- Edelman, G. M., B. A. Cunningham., G. N. Reeke., J. W. Becker., M. J. Waxdal and J. L. Wang. 1972. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2580-2584.
- Edmundson, A. B., K. A. Sly., F. A. Westholm., D. A. Powers and I. E. Liener. 1971. Isolation and characterization of concanavalin A polypeptide chains. *Biochemistry* 10:3554-3559.
- Goldstein, I. J. 1976. In, concanavalin A as a Tools. (Eds by Bittiger, H. and H. P. Schnebli). Wiley-Interscience, New York. pp.57-65.
- Goldstein, I. J. and C. E. Hayes. 1978. The lectins ; Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340.
- Goldstein, I. J. and L. L. So. 1972. Protein-carbohydrate interac-

- tion. N. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide-concanavalin A interaction. *J. Bio. Chem.* 242:1617-1622.
- Hague, D. R. 1975. Studies of storage proteins of higher plants. I. Concanavalin A from three species of the genus *Canavalia*. *Plant Physiol.* 55:636-642.
- Karens, D., M. Susan and D. J. Bowle. 1983. Endopeptidase activity in jack bean and its effect on concanavalin A. *Planta*, 157: 31-535.
- Kauss, H. and H. Ziegler. 1974. Carbohydrate-binding proteins from the sieve-tube sap of *Robinia pseudoacacia* L. *Planta*. 121:197-200.
- Kauss, H. 1977. In: Cell Wall Biochemistry related to Specificity in Host-Plant pathogen Interactions (Eds by B. Solheim and J. Raa) Universitets forlaget, Tromsø-Oslo-Bergen, pp.347-358.
- Kochibe, N. 1986. Mannose binding lectins of *Vicia tetrasperma* seed and their immunological relationship to other legume lectins of similar specificity. *Plant Cell Physiol.* 27:661-669.
- Lacmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- 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.
- Marcus, S. E., J. Burgess, P. R. Maycox and D. J. Bowles. 1984. A study of maturation events in jack beans (*Canavalia ensiformis*). *Biochem. J.* 222 : 265-268.
- Nielsen, S. and I. E. Liener. 1984. Degradation of the major storage

- protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* 74:494-498.
- Reeke, G. N., J. W. Becker and G. M. Edelman. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 250:1525-1547.
- Richard, H. 1981. Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting. *Anal. Biochem.* 123:143-146.
- Sharon, N. 1979. In. Glycoconjugate Research (Eds by Oppenheim J. J. and D. L. Rossensteich). Academic Press, New York, pp.31-34.
- Sharon, N., A. J. Kalb and I. Pecht. 1973. Specificity of metal ion interaction with concanavalin A. *Biochemistry* 12:1914-1917.
- Sumner, J. B. 1919. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*. *J. Biol. Chem.* 37:137-142.
- Sumner, J. B. and S. F. Howell. 1936. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32:227-237.
- Susan, E. M., B. Jeremy., R. Peter and J. B. Dianna. 1984. A study of maturation events in jack beans (*Canavalia ensiformis*). *Biochem. J.* 222:265-268.
- Wang, J. L., B. A. Cunningham and G. M. Edelman. 1971. Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68:1130-1134.
- Wang, J. L., B. A. Cunningham., M. J. Waxdal and G. M. Edelman. 1975. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *J. Bio. Chem.* 250:1419-1502.
- Waxdal, M. J., J. L. Wang, M. N. Pflumm and G. M. Edelman. 1971.

---

Isolation and order to the cyanogen bromide fragments of concanavalin A. *Biochemistry*. 10:3343-3347.

Yamauchi, D. and T. Minamikawa. 1986. *In vitro* studies protein synthesis in developing seeds of *Canavalia gladiata* DC. *Plant Cell Physiol.* 27:1033-1041.

Yamauchi, D. and T. Minamikawa. 1987. Synthesis of concanavalin A in maturing *Canavalia gladiata* seeds. *Plant Cell Physiol.* 28: 421-430.



## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많은 지도와 격려를 해주신 고석찬 교수님께 감사드리며 논문 심사를 맡아 도움 말씀을 주신 허인옥 교수님, 김문용 교수님께 감사드립니다.

그리고 부족한 저를 지도하여 주신 오문유 교수님, 이용필 교수님, 오덕철 교수님, 김원택 교수님, 이화자 교수님, 김세재 교수님께 감사드리며 실험을 여러모로 도와준 식물발생학 실험실 학형들과 친구 창호에게 고마움을 표합니다.

마지막으로 따스한 사랑으로 보살펴 주신 아버님과 동생 정심이에게 조그마한 정성으로 이 논문을 드립니다.

