

담배의 바이러스 罹病葉과 健全葉에 있어서의 遊離아미노酸에
關한 定量的 研究 (豫報)

李 康 業

(全南大學校·文理科大學)

(1964. 1. 26. 受理)

ABSTRACT

LEE, Kang Up (Dept. of Biology, Chunnam National Univ.) Qualitative study of free amino acids in healthy and tobacco mosaic virus diseased tobacco leaves (*Nicotiana Tabacum* L., White burley). Kor. Jour. Bot. VII (1): 1-4, 1964.

A comparative study of free amino acid content in healthy and virus diseased tobacco leaves was carried out by author throughout the growing season from June to November of 1963.

The methods of qualitative analysis of free amino acids applied in this experiment is followed by Moore and Stein. 1,2 Free amino acids determined in this experiment are shown in Fig. I, II and Table I. As the figure and the table are shown, four more amino acids such as a spartic acid, glutamic acid, tyrosine and phenylalanine are detected in the healthy leaves; these four additional amino acids in the healthy leaves are conspicuous. More quantities of asparagine and alanine are detected in the diseased leaves than the healthy leaves and more quantities of tryptophan is detected in the healthy leaves.

It is presumed that such amino acids as tyrosine and phenylalanine are decreased by the incooperation of free amino acid to TMV protein in the process of the process of the leaf protein metabolism which is caused by TMV-RNA trapping action in the diseased leaf protoplasm. It is thought that the decrease of asparagine and the increase of aspartic acid in the healthy leaves are the results of in incooperation of NH_2 , produced by the protein dissimilation in the diseased leaves, to aspartic acid; it's reaction is caused by the respiration of the diseased leaves accelerated by TMV attack. It is presumed, consequently, that the check of the diseased tobacco leave growth is influenced by the reduction of such amino acids as tryptophane and glutamic acid, which reduction may be due to the abnormal protein metabolism and the action of certain enzyme caused by TMV attack on host protoplast.

緒 論

우리 나라에서 多量으로 栽培되고 있는 담배 植物에 많이 發生하고 있는 담배 virus 病(TMV)으로 因해서 莫大한 被害가 있으며 그것으로 因한 담배의 質的인 低下와 또한 TMV가 다른 農作物에 病傳染을 한다는 事實을 생각할 때 TMV에 對한 研究는 必의가 있다고 생각된다.

일찌기 Knight (16)는 TMV의 構成成分인 amino acid의 分析으로서 TMV와 다른 Strain인 J 14 D1의 定性 및 定量的인 差異를 보았으며 12系統을 化學的으로 分離報告하였다. 우리 나라에서도 數年前에 TMV에 對해서 物理化學的인 實驗을 거쳐서 우리나라에서 栽培되고 있는 White Burley (Kentucky 33)의 罹病葉에서 얻은 TMV가 美國의 TMV common strain과 同一한 系統이 아니라는 點을 明白히 하였다⁽¹⁷⁾.

Bawden과 Pirie⁽¹⁸⁾가 宿主細胞內에서의 Virus 形成에 酵素가 關係하고 있음을 記錄하고 있다. 그리고 또한 歐美各國에서도 *N. Tabacum*, L., (White Burley)를 材料로 해서 여러가지 體內蛋白質代謝에 미치는 TMV의 影響을 生化學的으로 究明해왔다. 著者는 이 實驗에서의 free amino acid의 定性的 分析으로 우리나라에 發生하고 있는 TMV Strain이 어떤 系統에 屬하는가를 究明하고 또한 담배가 TMV 感染으로 因해서 virus가 host plant內의 protein metabolism에 어떠한 影響을 갖어오는가를 究明코자 했다.

우리 나라 在來種인 淸州葉과 導入品種인 White Burley 와의 比較實驗을 하기 爲한 試圖로서 몇가지 實驗結果를 豫報로서 報告하는 바이다.

材料와 方法

實驗材料로서는 學校構內에 隣接되어 있는 個人所有 달래 밭에서 耕作하고 있는 White Burley 種과 淸州 種의 健全葉과 罹病葉을 各各 1963年 8月25日과 9月10日에 두번에 걸쳐 採取해서 蒸溜水로 씻어 낸 다음 dry oven 에서 $70^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 사이에 乾燥시켰다.

이것에서 free amino acid 를 抽出해 낸 方法은 Moore 와 Stein^(1,2)의 method 에 따라 다음과 같이 했다.

材料는 24時間 80% ethanol 로 抽出한 다음 5,000 rpm 로 30 分間 遠心分離하여 表面上澄液을 採取한다. 이 液을 80°C 로 加熱하여 여기에다 10% trichloroacetic acid 를 넣어서 可溶性蛋白質을 沈澱시켜서 除去한다. 그리하여 이 液을 ether 로서 3回 洗滌해서 脫脂하여 filter paper 로 걸러낸다. Filter paper 로 걸러낸 液을 Water-bath 上에서 $80\pm 5^{\circ}\text{C}$ 로 湖狀이 될때까지 濃縮한 것을 全體容量이 100 cc 가 되도록 한다. 이것을 sample 로 하여 冷藏庫에 $3^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지시킨다.

Filter Paper 는 Watman No 1 을 使用했으며 sample 을 spotting 할때는 寒暖計의 끝을 蘸어서 水銀을 내 버린다음 그 끝을 뾰족하게 뽑아서 利用했다.

Spotting 한 量은 100 μ 로 했다.

Spotting 한 paper 는 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 正確히 維持되고 있는 恒溫室에서 2次 展開用 유리그릇에 한쪽으로는 (1次) Phenol 과 물의 比率이 1:1 로 되게한 溶媒로 上昇시키고 또 한쪽으로는 (2次) n-butanol 4:acetic acid 1:water 5 의 比로 上昇시켰으며^(3,4) 順序를 이의 反對로도 上昇시켰다.

上記의 溶媒로 上昇시킨 paper 를 室溫에서 4日~5日 直射光을 피해서 完全 乾燥시켜서 ninhydrin 과 n-butanol 0.1% 溶液으로 spray 한 다음 $80^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$ 사이에 維持시킨 incubator 에 5分~10分間 乾燥시켜서⁽⁵⁾ 呈色反應이 나타났것을 1次와 2次의 展開溶媒의 順序를 各各 달리한 paper 의 Rf value 를 standard amino acid 로 上昇시킨 paper 와 그 色과 位置를 比較해서 確定 시켰으며 그것은 그림 I, II 와 같다.

結果와 考察

그림 1, 2 에서와 같이 Burley 種의 健全葉에서는 14 種의 free amino acid 를 確定했으며 罹病葉에 있어서는 10 種의 free amino acid 가 나타났다.

Fig. 1. Paper chromatogram of free amino acids in TMV diseased tobacco leaves.

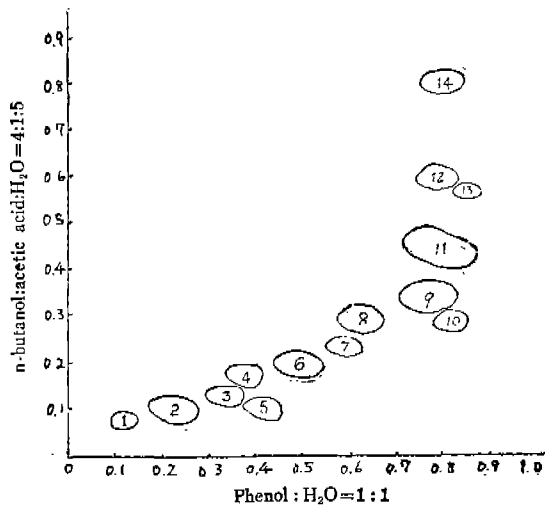
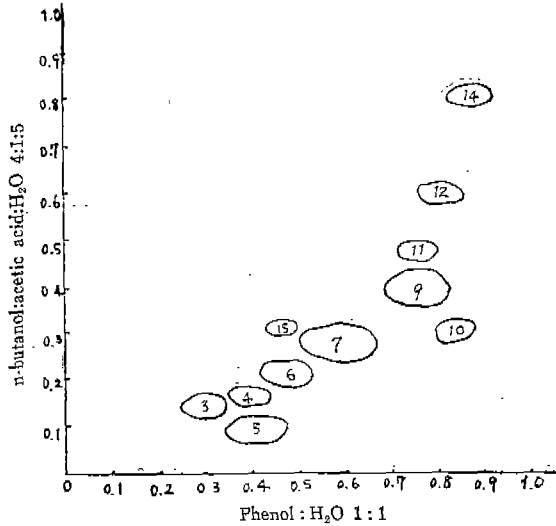


Fig. 2. Paper chromatogram of free amino acids in healthy tobacco leaves.



다른 研究者에 依하면⁽⁶⁾ Virus 病에 걸린 대추나무의 경우 健全葉에서 보다는 罹病葉에서 L-Asparagine 과 histidine, glutamin 이 增加한 것을 보았다. 그런데 本 實驗에서는 健全葉에 있어서 phenyl-alanine 과 tyrosine 그리고 glutamic acid 가 나타나고 罹病葉에 있어서는 나타나지 않았다. 代身에 罹病葉에서는

Table 1. Paper chromatogram of free amino acid in healthy and TMV diseased leaves of tobacco.

Free amino acids	Tobacco leaves		Color
	Healthy leaves	Diseased leaves	
1. Aspartic acid	+		Blue purple
2. Glutamic acid	+++		Purple
3. Serin	++	++	Purple
4. Glycine	++	++	Red Purple
5. Asparagine	++	+++	Brown
6. Threonine	+++	+++	Red Purple
7. Alanine	++	++++	Purple
8. Tyrosine	+++		Violet purple
9. Valine	++++	++++	Purple
10. Proline	++	++	Yellow
11. Tryptophane	++++	++	Purple
12. Leucine	++	++	Purple
13. Phenylalanine	+		Violet purple
14. isoleucine(?)	++	++	Purple
15. Pigment	-	+	Yellow

alanine 의 量的 增加를 보았다. 또한 健全葉에서는 aspartic acid 가 나타났는데 罹病葉에서는 나타나지 않고 代身에 asparagin 의 spot 와 색이 健全葉에서 보다 더 크고 그 색의 濃度가 짙었다.

Tryptoplane 은 健全葉에서 그 spot 의 크기와 색이 罹病葉에서 보다 크고 濃度가 짙은것으로 보아 量的 增加를 볼 수 있다. 끝으로 現在 著者가 하고있는 淸州葉實驗의 中間結果에서 보면 健全葉이 罹病葉에서 보다 거의 倍가 된 free amino acid 의 種이 나타났다.

여기에서 健全葉이 罹病葉보다 phenyl-alanine 과 tyrosine 이 나타났다는 사실은 罹病葉 葉內原形質內에서의 TMV-RNA trapping 作用이 free amino acid 가 TMV Protein 으로 添加되는 代謝過程에 phenyle alanine 과 tyrosine 의 減少를 招來케 하여 罹病葉에는 나타나지 않은것으로 推定된다. (7,8,10,11)

Asparagin 이健全葉에서 보다罹病葉에서 量的增加를 가져왔다는事實은 TMV 感染에 依해서罹病葉의呼吸作用이 促進되어罹病葉體內蛋白質의異化作用에서生成된 amino 基가 aspartic acid 에添加된結果罹病葉에서는 aspartic acid 가 감소되고 그反面에 asparagine 의 量的增加를 가져왔다고 볼수있다⁽¹²⁾.

Tryptophane 이健全葉에서 量的增加를 나타낸것은 tryptophane 이罹病葉內에서 TMV protein 으로 incorporate 되었기 때문에 Host Plant 內에 있는生長物質인 indole acetic acid 의原料物質인 tryptophane 의 감소가 일어나 host plant 의生長이 抑制 당했다고推定된다⁽¹³⁾.

glutamic acid 가罹病葉에서는 나타나지 않고 그代身이 alanine 이健全葉에서 보다 더 量的增加를 나타낸것은罹病葉內에서 glutamic alanine transaminase 作用으로 glutamic acid 가 alanine 으로合成된結果 alanine 의 量的增加를 가져와서結果적으로罹病葉의生長에阻害作用을 일으켰다고 볼수있다^{(14) (15)}.

Burley 種에서 보다淸州葉에서罹病葉의 free amino acid 의 감소율이 많은것은 TMV 에對한病低抗성이 강한 White Burley 種의葉內蛋白質代謝에 미치는알려지지 않은 factor 의作用으로 White Burley 의罹病葉의 free amino acid 의 감소율을 적게하고淸州葉에 있어서는罹病葉의 free amino acid 의 감소율을增加해서 그結果淸州葉의 TMV 에對한罹病성이增加되었다고推定된다.

摘 要

TMV 에 感染된 담배(*Nicotiana Tabacum* L, White Burley)의罹病葉과健全葉에 含有되어 있는游離 amino 酸의 定性的인比較實驗은 1963 年 6 月부터 同年 11 月 사이에 著者에 依해서 行해졌다.

本實驗에서 適用한游離 amino 酸의 paper chromatography 에 依한 定性的分析方法是 Moore 와 Stein^{(1) (2)} 의方法에 따랐다. 이實驗結果健全葉에서는罹病葉에서 보다 많은種類의游離 amino 酸을 含有하고 있음을 나타냈다. 그種類(表 1, 그림 I, II 와 같이)로는健全葉에서는 14 種이나 나타났는데罹病葉에서는 10 種이 나타났다. 卽健全葉에서는 aspartic acid, glutamic acid, tyrosine, phenylalanine 이 더檢出되어罹病葉에서 보다 4 種이 더 많았다는것이 特異한 現象이며 또한罹病葉에서는 asparagine 과 alanine 이健全葉에서 보다 量的增加를 나타내고健全葉에서는 tryptophan 이罹病葉에서 보다 더 많은 量的增加를 나타냈다.

이런 特異한 現象은罹病葉葉內原形質內의 TMV-RNA trapping 作用이健全葉에서 보다 差異를 나타낸結果 TMV protein 代謝過程에 異狀을 갖어왔으며 또한 TMV 가 宿主原形質內에 侵入해서蛋白質代謝와 어떤 特定한 酵素系에 異狀을 일으켜 free amino acid 가減少된結果罹病葉의生長阻害에 影響을 가져왔으리라推定된다. 끝으로 未完된 것이나마淸州葉에對한中間實驗結果淸州葉과의比較實驗에서淸州葉이 Burley 種 보다罹病葉의 free amino acid 種類減少가 많았다는 것은淸州葉의 TMV 에對한耐病성이 Burley 種 보다 弱한結果라고推定된다.

文 獻

1. Moore and Stein, W.H., 1951. J. Biol. Chem., 192:663.
2. Moore and Stein, W.H., 1954. J. Biol. Chem., 211:893.
3. Block, R.J., 1950. Anal. Chem., 22:1327.
4. Block, R.J. and Weis, K.W., 1956. Amino acid Handbook: Method and Results of Protein Analysis. Springfield, 111., U.S.A.
5. Consden, R., A.H. Gordon, A.J.P. Martin, 1944. Biochem. J., 38:224.
6. Hong, Soon Woo and Hah, Young Chil, 1961, Kor. Jour. Bot. 4:(1), 9.
7. Bawden, F.C., and Pirie, N.W., 1952, Ann. Rev. Plant Physiol., 3:171.
8. _____, 1957, J. Gen. Microbiol., 14:460.
9. Griene, Australian J, 1943, J. Exptl. Biol. Med. Sci., 21:89.
10. Gale and Folkers, 1954, Nature 173:1223.
11. Owen, P.C., 1957, Ann. Appl. Biol., 45:327.
12. _____, 1959, Ann. Rev. Plant. Physiol.,
13. James Bonner, 1952, Plant Biochemistry. Academic Press.
14. Braunstein, A.E., 1947, Advance in Protein Chemistry, Academic Press.
15. Green, D.E., Leloir, L.F., and Nocito, V., 1945, J. Biol. Chem., 161:559.
16. Knight, C.A., 1947, Symp. Quant. Biol., 12:115.
17. Kim, Woon Seo and So, In Young, 1963, Kor. Jour. Microbiol. 1:10-13.