

콩나물의 Asparagine 生合成에 관한 研究

邊時明* · 許南應 · 李春寧

* 韓國科學院 生物工學科 · 서울大學校 農科大學 農化學科
(1977년 2월 10일 수리)

Asparagine Biosynthesis in Soybean Sprouts

Si-Myung Byun,* Nam-Eung Huh* and Chun-Yung Lee

* Department of Biological Science and Technology,
Korea Advanced Institute of Science
Department of Agricultural Chemistry, College of
Agriculture, Seoul National University

(Received Feb.10 1977)

SUMMARY

Asparagine biosynthesis by soybean sprouts grown under the dark conditions has been demonstrated. The amount of free asparagine synthesized in ten day-old soybean sprouts increases to 22.7% on the dry weight base. The effects of nitrogen compounds such as NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and urea on asparagine synthesis during the sprouting were examined and the results showed that urea was more effective than other two compounds.

Glutamine-dependent asparagine synthetase was partially purified (8.6 folds) through ammonium sulfate fractionation, followed by Sephadex G-150 gel filtration. The enzyme was very labile and required protection by thiol groups or high level of glycerol. The mixture of ATP and Mg^{++} ion also stabilized the enzyme activity.

The enzyme utilized glutamine more effectively than NH_4^+ as an amide donor for the formation of asparagine. The enzyme required L-aspartate ($K_m=3.1 \text{ mM}$), L-glutamine, ATP and Mg^{++} . It showed pH optimum of 7.5 and catalyzed the formation of β -aspartyl hydroxamate in the presence of L-aspartate, ATP, Mg^{++} and NH_2OH in the reaction mixture.

序 論

植物에 있어서 asparagine(Asn)의 生合成은 암모니아의 毒性을 減少시키기 위하여 이를 amide 형태로 貯藏하거나 (1), TCA cycle을 통한 amide의 傳達과 더불어 代謝物質로서 활발한 keto acid 및 carbon skeleton의 供給 역할을 하고 있는 것으로

알려져 왔다(2). 그러나 이 아미노산이 自然界에서 제일 먼저 發見된 것이면서도 生合成에 관한 機作은 자세히 알려져 있지 않았다. 近來에 이 生合成에 관하여 차츰 研究가 되고 있으나 微生物 (3-6), 植物(7-10) 및 動物(11-16)의 경우에 機作이 다소 다르다는 것이 報告되었다. Ravel 등 (3)은 *Lactobacillus arabinosus*의 asparagine synthetase

* 本 論文에서 사용한 略語는 다음과 같다. Asp (aspartic acid), Asn (asparagine), Gln (glutamine), Glu (glutamic acid), TCA cycle (tricarboxylic acid cycle), PPI (pyrophosphate), AMP (adenosine-3'-monophosphate), ADP (adenosine-3',5'-diphosphate), ATP (adenosine-5'-triphosphate), Enz-Asp-AMP (enzyme, Asp 및 AMP의 complex), K_m (Michaelis-Menten constant).

(E.C. No. 6.3.1.1. 이후부터 synthetase라 칭함)는 Mg^{++} 존재하에서 L-Asp, NH_4^+ , ATP와 反應하여 L-Asn과 AMP 및 pyrophosphate를 生成하고, 이때 NH_4^+ 대신 hydroxylamine을 이용하면 β -aspartyl hydroxamate를 生成함을 報告하였다. 이러한 反應은 *Escherichia coli*의 경우에도 報告되었다(5, 6). 微生物의 酵素는 amide donor로서 ammonia 대신 L-Gln을 이용 못하는 점이 특징이다.

이와는 달리 動物組織에서 얻은 synthetase는 ammonia 대신 L-Gln이 amide donor로서 주로 작용하지만 ammonia도 약간 L-Gln을 대신할 수 있다고 報告되었다(11, 17-19). 이때 Gln의 amide nitrogen이 Asn의 amide로 移動됨을 N-15 同位元素實驗으로 알 수 있었다.

일찍이 特種植物에 있어서 상당량의 유리 Asn이 植物組織內에 蓄積된다는 것이 알려졌음에도(20, 21) 植物에 있어서 Asn의 生合成機作이 완전히 究明되지 않은 것은 놀라운 사실로서 lupine seedling의 경우 乾物量의 24%가 Asn임이 報告되었다(22). 이후 植物의 경우도 계속 研究가 進행되어 lupinus에 있어서 synthetase는 L-Asp와 L-Gln 및 ATP를 이용하여 L-Asn, Glu, AMP 및 pyrophosphate를 生成하는 反應이 動物組織에서 비슷하게 일어나는 것이 報告되었다(10). 이때 Mg^{++} 을 요구하며 ammonia는 어느정도 L-Gln 대체효과를 보이나 L-Gln 보다 훨씬 떨어진다. 그러나 Nair 등(7, 8)은 고구마에 γ -線을 照射하였을 때 Asn 生合成 능력을 관찰하였으며 여기서 얻은 synthetase는 L-Gln을 amide donor로 이용하지 못하고 ammonia를 이용하며, 특히 ATP의 분해산물은 AMP와 pyrophosphate가 아니고 glutamine synthetase의 反應처럼 ADP와 orthophosphate임을 報告하므로써 植物에 따라 生合成機作이 다를 수 있음을 알았다. 植物에 있어서 또다른 asparagine 生合成과정은 HCN- β -cyanoalanine반응에 의해 이루어진다는 것이 報告되었다(23-25).

콩나물은 暗所에서 發芽時 Asn을 상당히 蓄積한다는 것이 알려져 왔고(21, 26), 같은 豆科作物인 lupinus가 Asn을 生合成함을 비추어 볼때 흥미로운 사실로서 本研究에서는 콩나물에서 synthetase를 추출분리하여 그 生合成反應을 살펴보았다.

實驗材料 및 方法

實驗材料 :

ATP, ninhydrin, hydroxylamine, L-Asp, Triton

-X-100, L-Asn 및 L-Gln은 Sigma Co. (USA)에서 特級試藥을 구입하여 사용하였고 deoxycholate는 Difco제품을 사용하였다. Sephadex G-150은 Pharmacia Fine Chem. Co.에서 구입하였고 acid alumina는 Merk製품을 사용하였다. 기타 시약은 지적하지 않는 한 특급시약을 시중에서 구입하였다.

本實驗에서 사용한 標準 β -aspartyl hydroxamate는 The Samuel Roberts Noble Foundation Inc. (Oklahoma, USA)의 M.K. Patterson, Jr. 박사께서 친절히 보내주셨다. 콩은 청량리시장에서 콩나물콩을 구입하였으며 콩나물은 필요에 따라 청량리시장에서 신선한 것을 구입하여 효소실험에 사용하였다.

實驗方法 :

콩나물 : 100g의 콩을 0.01% $HgCl_2$ 용액에 30분 담가 殺菌處理한 후 물로 충분히 씻었다. 이 콩을 하룻밤 실온에서 수도물에 담갔다가 물을 뺀 후 밀바닥이 뚫린 철망 그릇에 cheese cloth를 두 겹 깔고 그 위에 고루 퍼 2겹의 층을 만들고 물에 적신 cheese cloth를 다시 덮어서 실온의 암실에 둔다. 약 6시간 간격으로 물을 살포하여 건조하지 않도록 15일 가량 길렀다. 각 형태의 질소 화합물 효과를 볼 때는 물 대신 각 형태의 질소 화합물, NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, urea, 2% 용액을 만들어 살포하였다. 자란 콩나물은 시간에 따라 일정량씩 취하여 증류수로 잘 씻고 실험에 사용하였다.

콩나물에서 asparagine 結晶製造 : 일정량의 콩나물(100g)을 취하여 증류수 500 ml를 넣고 Waring blender로 마쇄한 후 cheese cloth로 여과하여 찌꺼기를 제거한 후 여액에 2배의 95% alcohol을 가하여 蛋白質을 침전시켰다. 6000×g의 원심분리로 침전을 제거하고 여과한 후 투명한 여액을 rotary evaporator로 50°C에서 농축시켜 50 ml로 만들었다. 농축시킨 후 생긴 침전을 다시 여과하여 여액을 냉각고에 하룻밤 방치한 후 생성된 결정을 Whatman No.1 여지로 여과하여 여지 상에 결정을 모았다. 風乾한 crude Asn을 소량의 물에 녹여 재결정 시켰다. Asn의 純度는 silica gel 박층크로마토그래피로 檢定하였다. 표준 Asn과 함께 2-propanol: formic acid: water (20:1:5, v/v) 용매로 3시간 전개시킨 후 ninhydrin으로 발색시켰다.

Asparagine, aspartic acid, glutamine 및 glutamic acid 定量 : acid alumina(27)을 사용하여 아미노산을 분리한 후 ninhydrin으로 발색시켜 570 nm에서 吸光度를 측정하고 똑같이 처리한 아미노산 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

Asparagine定量; synthetase의 活性度를 측정할 때 amide donor로서 NH_4^+ 를 사용하는 경우에는 생성된 Asn을 hydroxylamine과 반응시켜 Nair(7)의 방법으로 정량하였다. 이 방법을 확인하기 위해 표준 β -aspartyl hydroxamate를 사용하여 표준곡선을 작성한 결과 만족한 결과를 얻었다.

Asparagine synthetase 活性度測定: synthetase 活性度는 다음 2가지 방법으로 측정하였다.

a) β -Aspartyl hydroxamate法

Ravel등의 방법(3)에 따라 10 mM L-Asp (pH 7.0으로 조절), 10 mM ATP (pH 7.0으로 조절), 0.4 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (pH 7.0으로 조절), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 15 mM MgCl_2 , 1.5 mM mercaptoethanol과 효소액을 1.5 ml에 넣고 35°C에서 1시간 반응시킨후 FeCl_3 액 2.5 ml를 가하여 반응을 중지시키고 동시에 단백질을 침전시켜 여과하고 540 nm에서 吸光度를 측정하였다.

b) Acid alumina法

Amide donor로서 Gln을 사용할 경우 생성된 Glu을 Bessman法(27)에 따라 acid alumina column을 통해 분리후 ninhydrin으로 발색시켜 정량하였다. 효소반응액은上記 β -aspartyl hydroxamate 방법에서와 같이 사용하였으나 0.4M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 대신 10 mM L-Gln (pH 7.0)을 사용하여 35°C에서 1시간 반응시키고 20% TCA용액 0.5 ml를 넣어 반응을 중지시키고 침전된 단백질을 원심분리하여 제거한 후 여액 1 ml를 취하여 1.0N KOH로 pH 7.0으로 조절후 acid alumina column(27)에 통과시켰다.

Glutaminase 活性度 測定: synthetase preparation이 glutaminase의 活性度를 함유하고 있는지 보기 위하여上記 synthetase 活性度 측정용액에서 $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 과 基質인 L-Asp을 빼고 대신 10 mM L-Gln을 사용하여 35°C에서 1시간 반응시킨후上記 acid alumina column의 방법으로 Gln이 분해되어 생성된 Glu를 정량하였다.

Asparagine synthetase의 정제: 콩나물을 증류수로 깨끗히 씻고 2°C로 냉각시킨 다음 Waring blender로 0.1 M phosphate완충액(pH 7.0, 1.5 mM 2-mercaptoethanol 및 1.0 mM MgCl_2 함유)을 가하여 마쇄시켰다. 이때 EDTA 0.1 mM, 0.5% Triton X-100나 0.5% deoxycholate를 따로따로 사용하여 酵素抽出을 증진시키고자 시도하였으나 효과가 없었다. 마쇄한 콩나물현탁액을 cheese cloth로 여과하고 27,000×g에서 25분간 원심분리하고 상등액에

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 (313 g/l) 50%로 포화시켰다. 침전을 원심분리하여 소량의 50 mM phosphate 완충액 (pH 7.0, 1.5 mM 2-mercaptoethanol 및 1.0 mM MgCl_2 함유)에 녹인다음 2.1 cm×80 cm 크기의 Sephadex G-150에 통과시켰다. 同一 50 mM phosphate 완충액으로 elution시켜 gel chromatography를 행하였다. 流速은 시간당 20 ml로 조절하였고 6 ml씩 모았다 酵素活性度를 보인 fraction을 모아 실험에 사용하였다. 酵素活性度는 β -aspartyl hydroxamate(3)으로 측정하였고 단백질량은 280nm에서 吸光度를 측정함과 동시에 또한 Lowry法(28)으로 측정하여 bovine serum albumin을 표준곡선으로 하여 표시하였다.

實驗結果 및 考察

콩나물 生育中 asparagine의 變化

실험실에서 기른 콩나물을 AOAC표준법에 따라 수분을 정량한 결과 콩이 발아하여 점차 자람에 따라 증가하여 보통 식품으로 이용하는 7~10일째에는 수분이 85~90%에 달하였다. 본실험에서는 제 10일째 자란 콩나물을 사용하였고 필요에 따라 20일까지 생육을 계속시켰다. 콩나물이 자람에 따라 유리 Asn은 점차 증가하여 제 15일째에는 최고에 달하였다. 이때 제 7일째 이후 만일 光을 조사하게 되면 콩나물의 색깔이 파랗게 변하면서 Asn의 양은 급격히 감소하였다. 콩나물의 생육과 Asn의 변화를 乾物量에 대하여 표시한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 보는 바와같이 Asn은 콩나물이 생육함에 따라 점차 증가하여 발아후 10일째에는

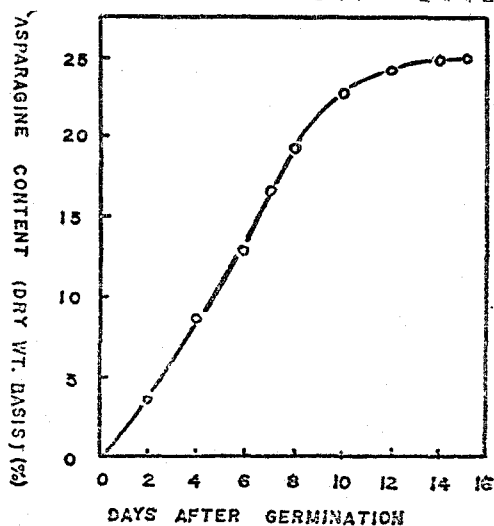
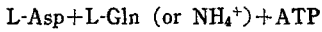


Fig. 1. Asparagine Formation During Soybean Sprouting

Asn量은 乾物量의 22.7%에 달했고 15일째에는 최고 25%에 달하였다. 생성된 Asn은 원래 콩 속 에 포함되어 있는 단백질의 加水分解에 의하여 生成된 것이 아니고 발아하여 콩나물이 점차 생육함에 따라 생성된 것이라고 보고 되었고(29) 같은 豆科植物인 lupine seedling (21)에서도 관찰되었다.

따라서 콩나물의 생육중 유리 Asn이 증가하는 것은 酵素에 의한 生成成으로 생각할 수 있으며 豆科植物에 있어서 Asn은 L-Asp와 NH_4^+ (또는 L-Gln)에 의해 ATP를 에너지源으로 사용하여 synthetase의 작용으로 다음 반응식 1과같이 生成成되는 것이 알려져 있다. (3, 10, 21),



→ L-Asn + AMP + PPI (+L-Glu) ... 반응식 (1)
 콩나물에서도 synthetase가 반응식 (1)과 같이 작용하여 Asn을 생성하는지는 아직 명확치 않으나 같은 豆科植物인 lupine에서 이와같은 반응에 의해 生成되는 것을 미루어보아 비슷하게 生成되리라 추측된다.

이렇게 콩나물이 생육함에 따라 Asn이 증가하므로서 공업적으로도 콩나물에서 Asn을 얻고자 하는 노력도 종종 이루어져 왔다. 실제 15일 자란 콩나물을 이용하여 실험방법대로 추출정제한 결과 신선한 콩나물 100 g당 (수분 89.4%) 2.29 g의 Asn을 얻었고 이를 재결정하여 1.62 g을 얻었다. 이 결과를 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Preparation of Asparagine from Fresh Soybean Sprouts

Soybean Sprouts (g)	Moisture (g)	Crude Asn		Recrystallized Asn	
		Weight (g)	Yield(%) ^a (dry weight base)	Weight (g)	Yield(%) ^a (dry weight base)
100	89.4	2.29	86.4	1.62	61

a: Asn content on dry weight was 25% (2.65 g of Asn from 100 g of fresh soybean sprouts) by chemical analysis.

재결정시킨 Asn의 純度를 보기 위하여 5×12 cm 크기의 Eastman Kodak silica gel thin layer chromatogram을 사용하여 2-propanol : formic acid : H₂O=20:1:5 용매로 전개시킨후 0.5% ninhydrin-propanol용액으로 발색시켜 본 결과 표준 Asn과 같이 순수한 것임을 알았다.

콩나물의 생육시 여러형태의 질소화합물이 Asn 生成成에 미치는 영향을 살피고저 콩을 하루밤 각각의 질소화합물 NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$ 및 urea의 2% 용액에 따로 따로 침지시켰다가 발아후 계속하여 실험이 끝날때까지 각각의 질소화합물 용액을 살포한 후 시료를 취하여 실험방법의 acid alumina 法으로 Asn을 분리정량하였다. 對照區로서는 순수한 증류수를 살포하여 콩나물을 생육시켰다. Fig. 2는 각질소화합물이 콩나물 생육시 Asn의 생성에 미치는 영향을 보여준다.

NH_4Cl 과 $(NH_4)_2SO_4$ 는 반응식 (1)에서 NH_4^+ 이온을 공급해 주는 역할을 할수 있을 것으로 생각되나 실험결과를 보면 큰 영향을 미치지 못하였다. 더욱이 NH_4Cl 과 $(NH_4)_2SO_4$ 를 살포하면 콩나물이 잘 부패하여 제대로 생육하지 못하는 결점이 있었다.

$(NH_4)_2SO_4$ 살포구에서 NH_4Cl 보다 Asn이 약간 더 생성된 것은 NH_4Cl 의 Cl^- 이온 특성때문이 아닌가

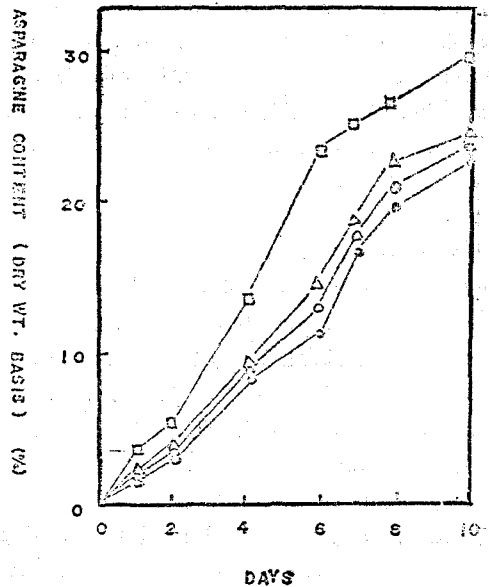


Fig. 2. Effects of Nitrogen Compounds on Asparagine Formation during Soybean Sprouting.

- : urea treatment
- △-△-△ : $(NH_4)_2SO_4$ treatment
- : NH_4Cl treatment
- : control

생각된다. 특히 NH_4Cl 살포구가 콩나물의 생육이 덜되고 자주 부패한 결과로 미루어 보아 Cl^- 이온의 독성이 문제되는 것 같았다. 2%의 urea를 살포한 경우에는 對照區보다 훨씬 많은 양의 Asn이 생성되었다. 제10일째에는 對照區의 22.7%보다 많은 29.4%로 증가하였고 콩나물도 對照區와 비교하여 손색없이 잘 자랐다. 이것은 urea가 吸收에 있어서 쉽게 이루어지는 점과 독성이 별로 없는 점에 기인한다고 판단된다. Urea가 어떻게 Asn생합성에 있어서 amide donor로 작용하는지는 분명치 않으나 生體內에 흡수된 urea가 urease에 의해 분해되어 NH_4^+ 로 이용되는 것인지 혹은 Gln을 amide

donor로 이용하는 豆科植物의 경우에 어느정도 Gln을 대체하는 것인지는 본 실험에서는 증명할 수 없었다.

Asparagine synthetase의 作用

일주일 자란 콩나물 40 g을 사용하여 추출한 酵素溶液은 0.256 $\mu\text{moles/mg}$ protein의 Asn을 생성하였다. crude enzyme을 0-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 劃分시키고 이를 Sephadex G-150으로 gel filtration시켜 얻은 synthetase의 정제결과를 Table 2에 표시하였다.

Sephadex G-150에 의하여 8.6배정도 정제되었으나 이효소제품은 5% acrylamide disc gel electr-

Table 2. Purification of Asparagine Synthetase Preparation

	Total volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Activity [Asn $\mu\text{moles/ml}$ protein]	Specific activity [Asn $\mu\text{moles/mg}$ protein]	Total activity (Asn μmoles)	Yield (%)	Purification
1. Crude extract	100	15.6	1,560	4.0	0.256	400	100	1
2. Ammonium sulfate 50% saturation	20	36.4	728	10	0.275	196	50	1.07
3. Sephadex G-150	40	0.82	52.4	1.8	2.20	72	18	8.6

ophoresis로 분석한 결과 적어도 7개 정도의 단백질 band를 나타내므로 아직도 완전히 정제되지 않은 상태였다. 더 이상의 정제를 시도하였으나 효소가 극히 불안정하여 DEAE-Cellulose 크로마토그래피를 행하거나 Sepharose 4B를 CNBr로 활성화시킨 후 1,6-hexamethyldiamine을 expansion arm으로 사용한 후 L-Asp이나 L-Asn을 ligand로 붙인 affinity chromatography에 의해서도 실험중 活性도가 완전히 상실되어 정제가 불가능하였다. 本實驗을 행하는데 있어서 가장 큰 난점은 효소의 安全性이 극히 낮은 점이었다.

Synthetase는 2-mercaptoethanol등의 thiol reagent가 존재하지 않는 경우는 24시간후에는 거의 活性도를 상실하였다. 다른 source에서 얻은 효소도 극히 불안정하다는 것이 lupine(10), 고구마(7,8)에서 관찰되었다. 특히 효소의 不安定性은 基質이 존재하지 않을 경우 더욱 심하게 일어났다. Table 3의 결과에서 볼수 있는 바와 같이 이러한 基質의 保護作用은 $\text{MgCl}_2 + \text{ATP}$ 에 의한 것으로 생각된다.

Glycerol이 酵素活性도를 보호하는 역할은 잘 알려져 있지 않으나 원두콩에서 抽出한 酵素에 대해서도 동일한 효과를 나타냄이 보고되었다(10). 일반적으로 高濃度の sucrose나 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 또는 glycerol이 酵素活性도를 보호시키는 현상은 자주

Table 3. Stability of Crude Asparagine Synthetase Activity by Various Stabilizing Agents at 4°C.

Protein dissolved in	Asparagine synthetase activity remained (a)	
	0(hr)	24(hr)
Buffer only (b)	13	0
Buffer+mercaptoethanol	100(a)	47
Buffer+Asp+ATP+Mg ⁺	74	31.2
Buffer+ATP+Mg ⁺	72.5	30.4
Buffer+ATP	14.2	0
Buffer+Mg ⁺	15.7	0
Buffer+Asp	12.1	0
Buffer+glycerol 30% as final	62	30.8

a) Asparagine synthetase activity of the 0-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractionation preparation in the presence of mercaptoethanol was assumed as 100%.

b) The extracting buffer was 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) only. This buffer did not contain mercaptoethanol.

관찰되는 일로서 이들이 효소단백질의 水素結合을 安定시켜주는 効果 때문인 것으로 추측하고 있다 (30,31). 그러나 이러한 보호제 존재하에서도 本 synthetase는 酵素活性도가 오래 보존되지 못하고

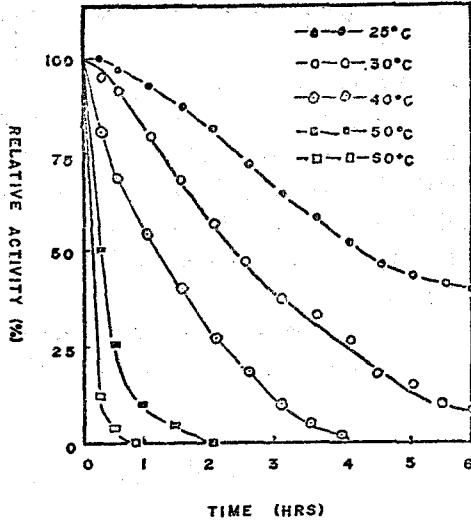


Fig. 3. Loss of Asparagine Synthetase Activity at Various Temperature

상실되므로서 극히 불안정한 효소임을 알수 있었다. Fig. 3은 시간에 따른 각온도에서의 효소활성도가 상실되어가는 양상을 보여주고 있다.

Sephadex G-150에서 얻은 효소를 사용하여 Asn의 생성을 실험한 결과 L-Asp, Gln, ATP, Mg⁺⁺가 작용하여 L-Asn을 생성함을 알수 있었다(Table 4).

Table 4. Asparagine Formation of the Reaction Catalyzed by Asparagine Synthetase

Reaction mixture	Activity (Asn μ moles formed/ml)	% of complete(a)
Complete (a)	3.0	100
-Gln	0.01	<1
-Gln+50 mM NH ₄ Cl	0.65	22
-ATP	0.05	<2
-Enzyme	0.0	0

a) The complete reaction mixture contained 10 mM ATP(pH 7.0), 10 mM Asp(pH 7.0), 10 mM Gln, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 15 mM MgCl₂ and 1.5 mM 2-mercaptoethanol and enzyme preparation (0.41 mg protein) in a total volume of 1.5ml

콩나물의 효소는 Table 5에서 볼 수 있는 바와 같이 Mg⁺⁺이온을 필요로 하였으며 다른 2가 이온인 Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Zn⁺⁺으로서 대체효과가 없었고, 이것은 Mn⁺⁺이나 Co⁺⁺가 動物의 효소에 대하여 대체효과를 보여주는 것과는 상이한 결과이다(32).

또한 콩나물에서 얻은 효소는 amide donor로서

Table 5. Requirements of Metal Ion for Asparagine Formation^{a)}

Metal ion	Activity (Asn μ moles formed/ml)	
MgCl ₂	3	100%
MnCl ₂	0.22	7.1
ZnSO ₄	0.02	<1
FeSO ₄	0.01	<1

a) The incubation mixture contained 10 mM Asp, 10 mM ATP, 10 mM Gln, 50 mM Tris-HCl buffer containing 1.5 mM 2-mercaptoethanol and enzyme protein (0.41 mg protein) in a total volume of 1.5 ml. Metal ion was included in the buffer solution with 15 mM as final concentration.

NH₄⁺ 보다 Gln을 훨씬 더 잘 이용하였으며(Table 4) 最適의 條件에서 Gln(10 mM)은 NH₄⁺(50 mM) 보다 약 4배 더 많은 Asn을 생성할수 있었다. 이 결과를 보면 콩나물에서 얻은 효소는 glutamine-dependent임을 알수가 있다(Fig.4 및 5).

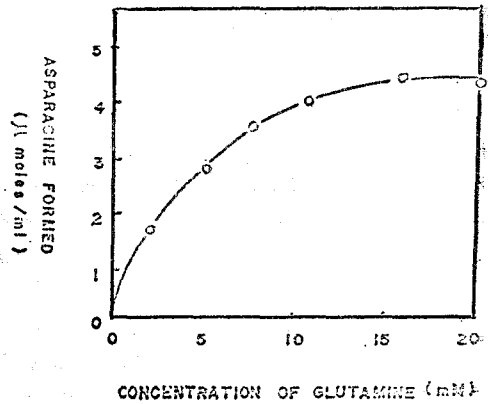


Fig. 4. Effect of Concentration on Asparagine Formation.

Incubation mixture contained 10 mM Asp, 10 mM ATP and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 15 mM MgCl₂ and 1.5 mM 2-mercaptoethanol in a total volume of 1.5 ml. Concentration of Gln varied from 0 to 20 mM in the assay tube.

지금까지 報告된 synthetase는 amide donor를 이용하는데 있어서 각기 다르다고 報告되었다. 微生物인 경우 Al Dawody등 (32, 33)은 baker yeast와 *Streptococcus*에서 얻은 효소가 NH₄⁺를 이용하며 Gln은 이용하지 못함을 보고하였고 動物인 경우 Levintow(18)는 Hela cell에서, Patterson등(11, 12)은 Novikoff hepatoma에서와 Jensen sarcoma

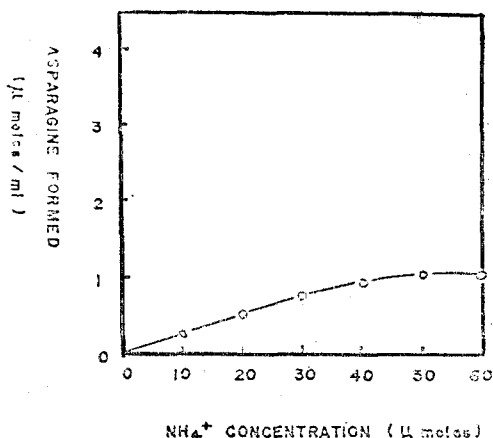


Fig. 5. Effect of Concentration of NH_4^+ on Asparagine Formation.

Incubation mixture contained 10 mM Asp, 10 mM ATP and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 15 mM MgCl_2 and 1.5 mM 2-mercaptoethanol in a total volume of 1.5 ml. Concentration of NH_4^+ varied from 0 to 60 mM in the assay tube.

에서 얻은 효소인 경우 주로 Gln을 이용하며 NH_4^+ 는 극히 적게 이용함을 보고하였다. 이에 비하여 植物에서는 그 source에 따라 각기 다르다.

Nair(7,8)는 γ -線을 照射한 고구마에서 얻은 효소가 NH_4^+ 를 이용함을 발견하였으나 Rognes(10)는 *Lupinus luteus*에서 얻은 효소는 NH_4^+ 를 이용하기 보다 Gln을 이용함을 보고하였다. 이로 미루어 보아 synthetase는 source에 따라 amide donor로서 NH_4^+ 나 Gln을 달리 이용하는 것으로 생각되며 같은 豆科植物인 大豆의 경우 Gln을 주로 이용하였다. 또한 大豆의 synthetase는 基質인 Asp를 효소반응액에 넣지 않아도 Gln을 分解하여 Glu를 生成하였다 (complete system의 65%, Table 4). 이것은 Arfin(19)이 완두콩에서 얻은 synthetase가 여러조각의 정제과정을 거쳐도 synthetase의 活性化나 glutaminase의 活性化가 같은 비율로 比活性化가 증가하는 것을 보고서 synthetase가 glutaminase의 活性化도 동시에 가지고 있다고 하였다. 本實驗에서 synthetase가 glutaminase 活性을 원래 띠고 있는지 혹은 다른 별개의 효소인 glutaminase가 혼합되어 있는지는 효소정제가 완전치 못하여 분간할 수 없었다.

Fig.6은 ATP의 농도를 변화시키므로서 生成되는 Asn을 보여준다. ATP의 농도는 10 mM에서 최

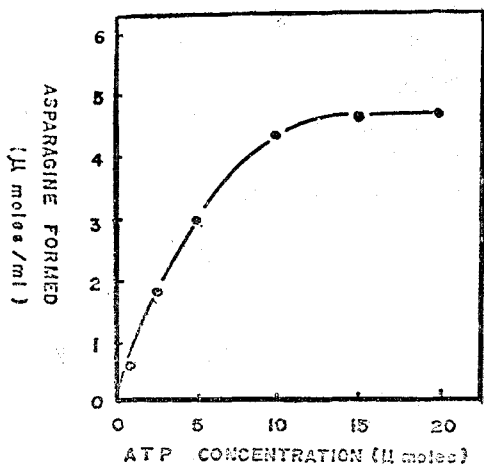


Fig. 6. Effect of Concentration of ATP on Asparagine Formation.

Incubation mixture contained 10 mM Asp, 10 mM Gln and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 15 mM MgCl_2 and 1.5 mM 2-mercaptoethanol in a total volume of 1.5 ml. ATP varied from 0 to 20 mM in the assay tube.

고의 Asn을 生成하였다.

Fig. 7은 Sephadex G-150에서 얻은 synthetase를 사용하여 基質에 대한 affinity를 알아보고자 Km 값을 Lineweaver-Burk plot에 의해 얻은 것을 보여준다.

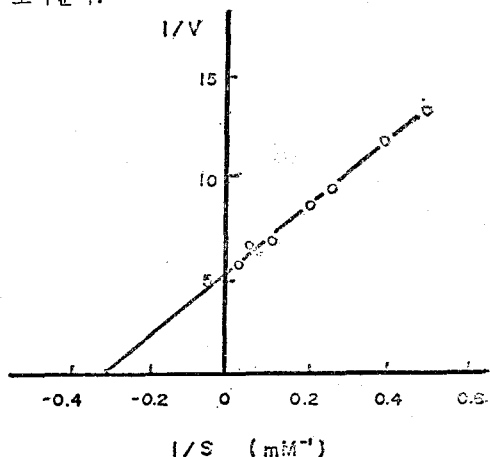


Fig. 7. Lineweaver-Burk Plot of $1/V$ against $1/S$ for Aspartic acid. $K_m=3.1 \text{ mM}$

大豆 synthetase의 Km값은 基質인 L-Asp에 대하여 3.1 mM이었다. 이 값은 완두효소(10)의 1.3 mM보다 다소 높은 값이나 효소가 충분히 정제되자

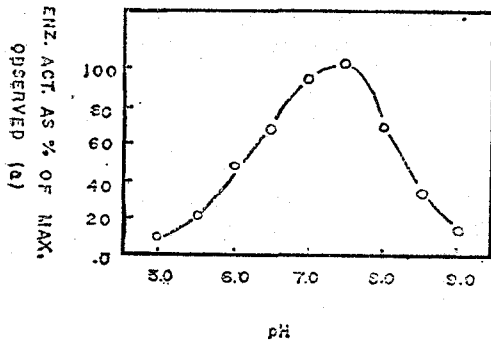


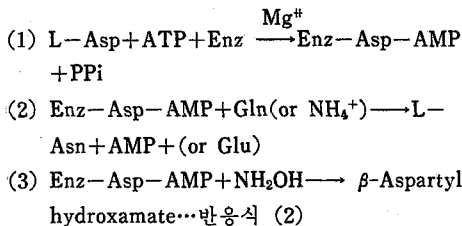
Fig. 8. Effect of pH on Asparagine Synthetase Activity of Soybean Sprouts.

a) Activity at pH 7.5 was assumed as 100%.

못한것에 기인한 것으로 추측된다. Fig.8은 pH의 영향으로서 최적 pH 7.5를 보여준것으로 다른 synthetase와 같은 결과를 보여준다.

콩나물의 synthetase가 L-Asp, ATP, L-Gln을 사용하여 L-Asn을 생성하는 것은 지금까지 알려진 豆科作物의 완두에서 얻은 酵素作用과 비슷한 것으로 판명되었다. 이것은 酵素反應의 여러 성질을 종합하여 보면 amide donor로서 L-Gln이용, 熱不安定性 및 SH基 保護에 의한 酵素의 安定性 등으로 미루어 보아 완두와 비슷할 것으로 추측한다.

ATP를 이용하여 L-Asp에 NH₂를 transfer시키므로서 L-Asn을 생성하는 이 효소의 作用機作은 중간산물로서 β-aspartyl adenylate가 생성된다고 報告되었다. 이것은 L-Asp와 ATP및 Mg²⁺를 포함한 反應溶液에 효소를 가하고 NH₂OH를 넣어 반응시키면 β-aspartyl hydroxamate가 생성됨을 보고 쉽게 알수 있으며, 또한 AMP+PPi 사이에서 放射性同位元素의 交換反應에 의해서도 추측되었다 (3.11)(반응식 2).



콩나물효소를 이용하여 이러한 反應機作을 시험하기 위하여 L-Gln이나 NH₄⁺대신 高濃度 NH₂OH를 반응용액에 넣고 효소반응을 시킨후 FeCl₃시약으로 발색시켜 생성된 β-aspartyl hydroxamate를 540 nm에서 吸光度를 측정 한 결과 이 효소도 β-aspartyl hydroxamate를 생성하였다(Fig.9). 그리

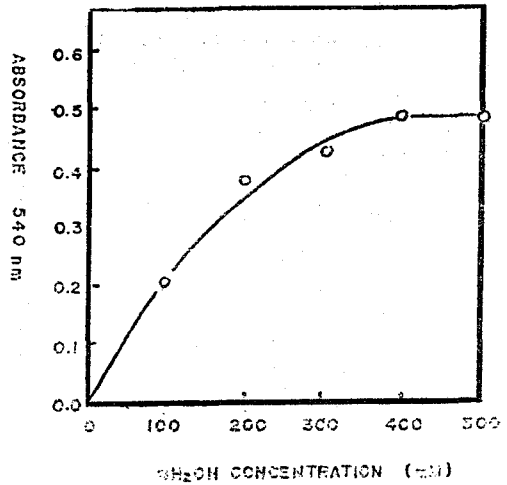


Fig. 9. Effect of Hydroxylamine Concentration on Asparagine Synthetase Activity.

Incubation mixture contained 10 mM Asp, 10 mM ATP, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 containing 15 mM MgCl₂ 1.5 mM 2-mercaptoethanol and 0.5 ml enzyme solution. Concentration of NH₂OH varied from 0 to 500 mM in assay tube.

나 사용한 NH₂OH 양은 L-Gln이나 NH₄⁺보다 훨씬 높은 400 mM에서 最適의 濃度가 되었다.

지금까지 콩나물의 asparagine 生合成반응에 대하여 몇가지 추궁하였으나 酵素가 極히 不安定하므로 分離精製 및 反應機作을 연구하는데 큰 난관이 있었다. 植物體에서 amide 化合物인 Asn이 蓄積되는 것은 암모니아 毒性을 除去하기 위한 目的과 代謝過程中 중요한 dicarboxylic acid를 저장하는 目的으로 추측이 되나 生理的 역할은 아직 확실치 않다. 여러가지 아미노산이 炭脫酸反應에 의해 ammonia를 생성할때 動物에서는 transaminati on이나 urea cycle에 의해 이용하나 urea cycle이 작용하지 않는 植物에 있어서는 Gln이나 Asn의 amide형태로 축적하리라 추측한다. 이러한 amide 化合物은 植物의 종류에 따라 함량이 달라지는 것으로 어떤 植物은 Gln을 많이 축적하고 다른 植物은 Asn을 축적한다. 같은 植物에 있어서도 種子發芽時 한 종류의 amide가 初期에 많고 다음 단계에는 다른 amide가 많이 축적되는 경우도 있으나 그 調節機作에 대해서는 알려지지 않았다. 또한 Gln 生合成을 일으키는 glutamine synthetase 反應機作, 調節機作은 아주 잘 알려진 반면 asparagine synthetase는 그렇지 못하다. *E. coli*(34)를 NH₄Cl 과 glucose를 함유한 배지에서 배양시켜 분리한

glutamine synthetase는 non-adenylated form (enzyme I)으로 존재하나 Gln과 glycerol배지에서 분리한 효소는 adenyated form (enzyme II)로 존재하며 enzyme I은 II보다 훨씬 活性이 높은 것으로 알려졌다. I과 II는 adenytransferase에 의해 쉽게 서로 轉換되므로서 Gln 生合成을 調節하는 것으로 이러한 예는 phosphorylase b와 a(35), glycogen synthetase D와 I(36)에서도 볼수 있다. 더욱이 *E. coli*의 glutamine synthetase는 2가 이온인 Mn^{2+} 과 Mg^{2+} 에 대한 효과가 서로 다른 것으로 Table 6과 같이 enzyme I은 Mg^{2+} 에 대해서 더 效果的이다.

Table 6. The Effects of Divalent Cations on Glutamine Synthetase Activity

Enzyme	Mg^{2+}	Mn^{2+}
I	60.1	2.0
II	12.8	8.9

이와 비교하여 asparagine synthetase도 그 source에 따라 2가이온에 대한 효과가 다르게 보고되었다. *E. coli*효소는 Mg^{2+} 이 Mn^{2+} 보다 效果的이나 *L. arabinosus*는 Mn^{2+} 이 Mg^{2+} 보다 效果的이다. 따라서 asparagine synthetase가 分子的인 면에서 glutamine synthetase처럼 一次構造(아미노산 배열)의 변화 없이 어떤 共有結合의 變動에 따라 調節되는 機作이 없지 않나 추정해보나 아직 이에 대한 연구는 전혀 없어서 흥미있는 과제라 생각이 된다. Nair (7,8)등이 원래 asparagine synthetase의 活性이 전혀 없는 고구마에 γ 線을 照射함으로써 活性이 증가하는 것을 發見하고서 그는 inactive상태 酵素가 γ 線 處理에 의해 活性化되거나 또는 酵素生成이 induction되었으리라 추측하였고 이러한 사실과 관련하여 콩나물이 暗所에서 生育하는동안 Asn生成이 증가하나 生育後期에 光을 照射하므로서 Asn 양이 급격히 감소하는 현상은 asparagine synthetase 調節機作과 어떤 관련이 있나 추측하므로서 앞으로 이에 대한 연구가 흥미롭지 않을까 생각한다.

要 約

콩나물에 많이 존재하는 Asn의 生合成에 관하여 연구하고자 콩나물 生育期間中 水分含量 및 Asn 함량을 조사한 결과 10일째 水分은 85~90%에 달했으며 Asn은 6일째부터 급격히 증가하여

10일째는 乾物量의 22.7%에 달하였다. 콩나물 100g에서 Asn을 抽出한 결과 2.29g을 얻었고 재결정하여 1.62g을 얻었다.

콩나물 生育時 NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$ 및 urea를 살포하여 질소화합물에 대한 영향을 고찰하였던 바 NH_4Cl 및 $(NH_4)_2SO_4$ 區는 Asn이 control보다 약간 증가하였으나 urea區는 10일째 29.5%로 증가하였다.

콩나물에서 asparagine synthetase를 $(NH_4)_2SO_4$ fractionion 및 Sephadex G-150에 의해 정제하여 8.6배 정제하였다. 이 효소는 매우 不安定하였으나 glycerol, mercaptoethanol 및 基質인 ATP, Mg^{2+} 이온에 의해 보호를 받았으며 이 酵素에 의해 最高의 Asn이 生成되는 ATP, Gln(또는 NH_4^+)의 농도는 표준반응 용액에서 각각의 구성농도를 변화시키면서 측정하였을 때 ATP 10 mM, NH_4^+ 는 50 mM, Gln은 10 mM이었다. Mg^{2+} 이온 대신 Mn^{2+} , Zn^{2+} , 및 Fe^{2+} 로 대체할수 없었으며 Asp에 대한 Km값은 3.1 mM이었고 효소작용의 最適 pH는 7.5이었다. Amide donor로서 NH_2OH 로 대체한 결과 β -aspartyl hydroxamate가 生成되어, 효소의 熱不安性, amide donor로서 Gln 이용 및 SH基에 의한 효소안정성을 비추어 보아, 같은 豆科植物인 완두와 비슷하게 asparagine synthetase는 β -aspartyl adenylate의 中間反應을 거치는 機作에 의해 Asn을 生合成하는 것을 알았다.

引 用 文 獻

1. Prianishinikow, D.N., Ber. Deutsch. Bot. Ges., 40, 242(1922)
2. Waelsch, H., Adv. in Enzymol., 13, 265 (1952)
3. Ravel, J.M., S.J. Norton, J. S. Humphreys and W. Shieve, J. Biol. Chem., 237, 2845 (1962)
4. Burchall, J.J., E.C. Reichelt, M.J. Wolin, J. Biol. Chem., 239, 1794(1964)
5. Cedar, H. and J.H. Schwartz, J. Biol. Chem., 244, 4112(1969)
6. Cedar, H. and J.H. Schwartz, J. Biol. Chem., 244, 4122(1969)
7. Nair, P.M., Arch. Biochem. Biophys., 133, 208(1969)
8. Nair, P.M., and A. Sreenivasan, Indian J. of Biochem. and Biophys., 8, 204(1971)

9. Kanamori, T. and H. Matsumoto, *Phytochem.* **13**, 1407(1974)
10. Rognes, S.E., *Phytochem.*, **14**, 1975(1975)
11. Patterson, Jr., M.K. and G.R. Orr, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 228(1967)
12. Patterson, Jr., M.K. and G.R. Orr, *J. Biol. Chem.*, **243**, 376(1968)
13. Holcenberg, J.S. and J. Pease, *Biochim. Biophys. Acta*, **158**, 500(1968)
14. Prager, M.D. and N. Bachynsky, *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 645(1968)
15. Horowitz, B. and A. Meister, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6708(1972)
16. Wedler, F.C. and K. Eismann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 778(1976)
17. Meister, A., *The Enzymes*, ed. by Boyer, Vol. **10**, 561(1974)
18. Levintow, L., *Science*, **126**, 611(1957)
19. Arfin, S.M., *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 233(1967)
20. Chibnall, A.C., *Protein Metabolism in the plant*, Yale Univ. Press, New Haven, Conn., 1964.
21. Vickery, H.B. and G.W. Pucher, *J. Biol. Chem.*, **150**, 197(1943)
22. Meiss, A.N., *Bull. Conn. Agr. Exp. Sta.*, New Haven, 553(1952)
23. Blumenthal-Goldschmidt, S., G.W. Butler, and E. E. Conn, *Nature*, **197**, 718(1963)
24. Hendrickson, H.R. and E.E. Conn, *J. Biol. Chem.*, **244**, 2632(1969)
25. Castric, P.A., K. J. F. Farneden, and E.E. Conn, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 62(1972)
26. Byun, S.M. and C.Y. Lee, Unpublished data.
27. Bessman, S.P., *Methods in Enzymol.*, ed. by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, **3**, 575(1957)
28. Lowry, O., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
29. Vickery, H.B., G.W. Pucher, and C.G. Deuber, *J. Biol. Chem.*, **145**, 45(1942)
30. Qureshi, A.A., E. Beytia, and J.W. Porter, *J. Biol. Chem.*, **248**, 1848(1973)
31. Gerlsma, S.Y., *J. Biol. Chem.*, **243**, 957(1968)
32. Al Dawody, A., and J.E. Varner, *Fed. Proc.*, **20**, 10 C(1961)
33. Straudenbauer, W.L., and J. L. Strominger, *Methods in Enzymol.*, **17A**, 718(1970)
34. Kingdon, H.S., and E.R. Stadman, *J. Bacteriol.*, **94**, 949(1967)
35. Krebs, E.G., D.S. Love, G.E. Bratvold, K.A. Trayser, W.L. Meyer, and E.H. Fischer, *Biochem.*, **3**, 1022(1964)
36. Friedman, D.I. and J. Lerner, *Biochem.*, **2**, 669(1963)