

## 해너콩(*Canavalia lineata*)잎에서 Arginase 활성의 세포내 분포

俞京希·權寧命  
(서울대학교 자연과학대학 식물학과)

### Subcellular Distribution of Arginase in Leaves of *Canavalia lineata*

Yu, Gyung Hee and Young Myung Kwon

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

Subcellular distribution of arginase activity was measured in leaves of *Canavalia lineata*. Both mitochondrial and cytosolic fraction were found to contain the arginase activity. It was noticeable that cytosolic fraction contained a substantial amount of arginase activity. Different mobility of arginase from these two fractions was showed on DEAE-Sephacel chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. Also different pI value was showed 6.3 in cytosolic and 6.7, 7.1 in mitochondrial fraction on IEF gel electrophoresis. However, canavanine-dependent-activity (CDA) of arginase in these two fractions were not different. These results indicate that heterogeneity of arginase occurs in leaves of *C. lineata*.

#### 서론

Canavanine은 비단백질성 아미노산으로 500여종의 콩과식물에서 그 존재가 확인되었으며, 특히 *Canavalia*속 식물의 종자에는 canavanine 함량이 높은 것으로 알려져 있다(Bell, 1971; Rosenthal, 1982). Canavanine은 arginine의 guanidino-oxy 구조 유사체로서 박테리아는 물론 여러 동식물에서 발생과 분화를 포함하는 생장전반에 저해적인 영향을 미치기 때문에 allelochemical로서의 기능도 갖는다(Rosenthal, 1982; Weeks and Hunt, 1974). Canavanine 감수성 식물은 canavanine이 단백질의 합성 과정에서 arginine과 경쟁하여 폴리펩티드에 편입되기 때문에 고유기능에 결함이 생긴 단백질을 합성한다(Jun and Kwon, 1986). 그렇지만 canavanine을 합성하는 식물에서는 canavanine이 단백질 합성에 참여할 수 없도록 하는 기작을 갖고 있을 뿐 아니라 생장에 필요한 질소원으로도

이용할 수 있다(Kwon *et al.*, 1986; Rosenthal, 1970). 한편 canavanine이 종자발아와 유식물생장에서 영양원으로 이용되기 위하여는 먼저 arginase에 의하여 canaline과 urea로 분해되어야 하는데, 이 때 생성된 NH<sub>3</sub>와 CO<sub>2</sub>는 재동화되고 canaline도 다시 대사계에 투입되어야 한다(Rosenthal *et al.*, 1988; Rosenthal and Berge, 1989).

우리나라 제주도에 자생하는 해너콩(*Canavalia lineata*)의 종자에도 건량의 10%, 전 질소량의 50%에 상당하는 canavanine이 함유되어 있으며, 이러한 저장 canavanine은 발아와 유식물의 생장시 일부는 자엽에서 그리고 나머지의 대부분은 잎과 뿌리로 이동된 다음 대사되어 생장에 필요한 질소화합물로 전환되는 것이 알려져 있다. 한편 해너콩에서 arginase와 urease의 활성이 자엽, 잎 그리고 뿌리에서 다같이 높은 것으로 추정되었다. 특히 잎에서는 자엽이 탈락한 후에도 오히려 arginase의 활성이 점진적으로 증가하는 경향을 보였다(Kwon *et al.*, 1986).

Jack bean(*Canavalia ensiformis*)이나 해너콩과 같이 canavanine을 함유하는 식물에 있어서 arginase는

본 논문은 한국과학재단연구비로(1987-1990) 수행된 연구 결과의 일부임.

canavanine 과 arginine 을 다같이 기질로 이용할 수 있는 것으로 알려져 있다(Downum *et al.*, 1983; Yu *et al.*, 1988). 이러한 결과들은 주로 자엽만을 대상으로 한 실험에서 얻은 것들이다. 그렇지만 해너콩에서 canavanine 이 전 생육기간에 걸쳐 식물체의 모든 부위에 분포하고 있을 뿐만 아니라 도관액에서도 canavanine 이 높은 농도로 존재한다는 사실이 밝혀지므로써 적어도 해너콩에서는 질소 회합물의 수송을 포함하는 질소대사에 있어서 canavanine 은 극히 중요한 위치에 있다는 새로운 증거가 제시되었다(Park and Kwon, 1990). 그러므로 canavanine 의 대사가 활발하게 이루어지고 있는 해너콩잎에서 canavanine 을 기질로 하는 arginase 에 관한 보다 상세한 내용을 앞서서 알아보고져 먼저 세포내의 존재부위를 밝히고, 각 부위의 arginase 가 canavanine 에 대하여 갖는 효소학적 성질을 밝혀보려 하였다.

## 재료 및 방법

**종자의 준비 및 생육조건.** 해너콩 종자는 제주도 일대의 서식지에서 직접 채취한 것을 사용하였다. 크기가 일정한 종자를 선별하여 종피를 제거하고 하룻 동안 실온에서 물에 침윤시킨 다음 3일 동안 암발아시킨다. 발아한 유식물을 7,000 lux (16 : 8) 및 27°C의 배양실에서 30일 정도 수경재배한 후 잎을 시료로 사용하였다.

**조효소 용액의 조제 및 시토졸의 분리.** 40g의 잎을 0.35M mannitol, 4mM cysteine, 0.2% bovine serum albumin (BSA), 0.6% polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) 이 포함된 30mM MOPS (3-[N-morpholino]propane sulfonic acid) 완충용액 (pH 7.5) 30ml에 넣어 Waring blender에서 2-3초간 마쇄하여 nylon mesh ( $\phi$  50  $\mu$ m)로 걸른 것을 조효소용액 (cell free homogenate)으로 하였다.

시토졸분획을 얻기 위하여는 조효소용액을 1,500 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 버리고 다시 20,000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하였다. 이 때 얻은 침전물은 미토콘드리아 분리를 위한 시료로 사용하였으며, 상정액은 140,000 $\times$ g로 30분간 원심분리하였으며 여기에서 얻은 상정액을 더 이상의 처리과정을 거치지 않고 시토졸로 실험에 사용하였다.

**미토콘드리아분획의 분리.** 시토졸분획의 분리과정에서 얻어진 침전물 시료를 미토콘드리아 세척용액인 0.3M mannitol과 0.2% BSA가 포함된 20mM MOPS 완충용액 (pH 7.2)에 현탁시킨 후 2,000 $\times$ g에서 1분간 원심분리하여 침전물은 버린다. 여기에서 얻은 상정액을 20,000 $\times$ g로 5분간 원심분리하고 침전물을 모아 미토콘드리아 분리용액인 0.25M 설탕과 0.2% BSA가 포함된 10mM MOPS 완충용액 (pH 7.2)에 재현탁하였다. 이와 같은 방법으로 얻어진 조미토콘드리아분획의 정제를 위하여는 Percoll의 농도구배가 15, 21, 27 및 45%로 구성된 튜브에

시료를 넣고 Sorvall SS-34 rotor로 10,500 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 각 농도의 Percoll 용액은 미토콘드리아 분리용액으로 제조하였으며, 15%와 21% 층에는 100 mM propane-1,2-diol을 첨가하였다.

원심분리한 후 kontron piercing unit로 튜브내의 용액상단부로부터 1.4 ml씩 받아내어 효소활성을 측정하였다. 한편, 미토콘드리아가 존재하는 것으로 판명된 분획은 미토콘드리아 세척용액으로 10배 희석한 다음 13,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 이 때 얻은 침전물을 1mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM dithiothreitol (DTT) 및 1% Triton x-100이 포함된 30mM MOPS 완충용액 (pH 7.5)에 현탁하여 미토콘드리아 시료로 사용하였다 (Schwitzgubel and Siegenthaler, 1984). Percoll의 농도는 refractometer로 측정하였다.

**엽록체의 분리.** 잎 8g을 엽록체 분리용액 0.33M Sorbitol과 0.1% BSA가 포함된 50mM Tricine-KOH 완충용액 (pH 7.9)에 넣어 Waring blender에서 2-3초간 마쇄하여 cheese cloth로 거른 후 1,500 $\times$ g에서 1분간 원심분리하였다. 이 때 얻은 침전물은 엽록체 분리용액으로 여러번 씻은 후 재현탁하였다.

이와 같은 과정으로 얻은 엽록체 현탁액을 보다 정제하기 위하여는 Percoll의 농도구배가 15, 33, 60%로 구성된 튜브에 넣어 Sorvall HB-4 rotor로 2,500 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 밀도구배의 분리가 끝나면 튜브 하단으로부터 1.4 ml씩을 받아내었으며, 엽록체분획은 엽록체 분리용액으로 10배 희석한 다음 다시 1,000 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 상정액을 버리고 침전물을 정제된 엽록체분획으로 실험에 사용하였다.

**DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피.** 조효소용액을 Yu 등 (1988)의 방법에 따라 전처리하고 DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다.

**효소활성의 측정.** Arginase 활성은 Kwon 등 (1986)의 방법을 약간 변형한 Yu 등 (1988)의 방법으로, NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.9)의 활성은 Wolosiuk와 Buchanan (1976)의 방법으로 측정하였다. Cytochrome C oxidase (EC 1.9.3.1)의 활성은 Rafael (1983)의 방법을 따랐고, Catalase (EC 1.11.1.6)는 Chance와 Maehly (1955), 그리고 acid phosphatase (EC 3.1.3.2)는 Yamaya 등 (1982)의 방법으로 활성을 측정하였다.

**Polyacrylamide 겔 전기영동과 등전점겔 전기영동.** Polyacrylamide 겔 전기영동 (PAGE)은 Davis (1964)의 방법을 따랐고, 등전점겔 전기영동 (IEF)은 O'Farrell (1975)의 방법으로 실시하였다.

**엽록소 및 단백질의 정량.** 엽록소의 함량은 80% acetone으로 추출하여 측정하였으며 (Hoden, 1965), 단백질은 Lowry 등 (1951)의 방법으로 정량하였다. 표준단백질로는 건조한 소혈청알부민 (fraction V)을 사용하였다.

**Table 1.** Distribution of arginase activity from 30-day-old leaves of *C. lineata* following differential centrifugation

	ADA <sup>a</sup>			CDA <sup>b</sup>		
	Total units	Specific activity	Yield (%)	Total units	Specific activity	Yield (%)
	(umol urea/min)	(unit/mg protein)		(umol urea/min)	(unit/mg protein)	
Homogonate	740	8.1	100	78.1	0.9	100
1,000g pellet	49.8	17.2	7	3.4	1.2	4
20,000g pellet	115.3	18.0	16	11.4	1.8	14
40,000g pellet	3.7	1.6	—	0.3	0.1	—
140,000g pellet	3.0	2.1	—	0.2	0.1	—
140,000g super	402.9	15.8	54	46.1	1.8	59

<sup>a</sup>arginine-dependent-activity and <sup>b</sup>canavanine-dependent-activity according to Downum *et al.* (1983).

**Table 2.** Distribution of arginase activity from 3-day-old cotyledons of *C. lineata* following differential centrifugation

	ADA <sup>a</sup>			CDA <sup>b</sup>		
	Total units	Specific activity	Yield (%)	Total units	Specific activity	Yield (%)
	(umol urea/min)	(unit/mg protein)		(umol urea/min)	(unit/mg protein)	
Homogonate	1869.0	2.0	100	82.8	0.1	100
1,000g pellet	310.4	18.7	17	16.3	1.0	20
20,000g pellet	911.9	27.6	49	41.3	1.3	50
40,000g pellet	52.4	1.3	3	0.3	—	—
140,000g pellet	18.1	0.6	1	0.3	—	—
140,000g super	178.4	0.2	10	10.5	—	12

**결과 및 고찰**

**Arginase의 세포내 분포.** 해너콩 잎에서 얻은 조효소액을 분별 원심분리하여 각각의 분획에서 arginase의 활성을 측정할 결과 (Table 1) 미토콘드리아 분획에 상당하는 20,000×g 침전물에서 specific activity가 가장 높은 것으로 나타났다. 그렇지만 전체 효소활성 중 이 분획이 차지하는 비율은 16%에 불과하였다. 한편, 140,000×g 상정액에는 전체의 54%에 상당하는 arginase의 활성이 분포되었을 뿐 아니라 specific activity 또한 조효소액의 경우보다 2배나 높은 것으로 나타났다.

발아 후 3일째인 자엽으로부터 arginase의 활성분포를 조사한 결과 (Table 2)에서는 20,000×g 침전물에 전체 효소활성의 50%가 집중되어 있는 것으로 나타났으며, specific activity 또한 가장 높게 나타났다. 한편, 140,000×g 상정액에서는 arginase의 specific activity가 조효소액의 1/10에 불과할 정도로 낮은 것으로 보아 자엽에서 arginase 활성의 대부분이 미토콘드리아 분획에 분포되어 있음을 알 수 있다.

지금까지 포유동물이나 *Neurospora*의 경우 arginase는 시토플라에 존재하는 것으로 알려져 있으며 (Gambie and

Lehninger, 1973; Weiss and Davis, 1973), 식물에서는 대개의 경우 미토콘드리아에 존재하고, 드물게 시토플라소임이 보고되기도 하였다 (Kollöffel and Dijke, 1975; Splittstoesser, 1969). 작두콩 (*C. gladiata*)의 경우 자엽에서는 미토콘드리아 분획에 arginase의 활성이, 그리고 줄기와 뿌리에서는 미토콘드리아와 40,000×g 상정액에 각각 같은 정도의 활성이 분포한다는 보고는 (Kollöffel and Weiss, 1975), 해너콩의 경우와 유사하다고 볼 수 있다. 해너콩의 경우에 잎에서 시토플라에 arginase 활성의 대부분이 들어 있다는 사실은 해너콩잎에서 arginine이나 canavanine 대사가 자엽과는 다른 가능성이 있을 것으로 해석된다. 해너콩은 발아와 생장시 자엽에 저장된 canavanine이 arginase에 의하여 분해되는데 이러한 분해작용은 자엽은 물론 잎과 뿌리에서도 일어날 것이다 (Kwon *et al.*, 1986). 그러므로 시토플라 미토콘드리아 분획에서 arginase의 활성을 arginine의 분해활성 (ADA; arginine-dependent-activity)과 canavanine의 분해활성 (CDA; canavanine-dependent-activity)를 구분하여 보았다 (Table 1, 2). 그 결과 ADA와 CDA의 분포패턴이 잎과 자엽 모두에서 같은 것으로 밝혀졌다. 즉 jack bean에서 ADA와 CDA의 세포내 분포가 일치한다는 결과와

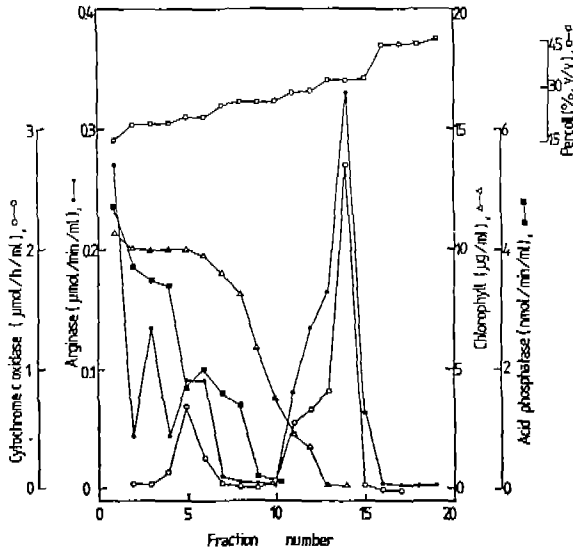


Fig. 1. Distribution of arginase and organelle marker enzyme after centrifugation of the 1,500 to 20,000g pellet from 30-day-old leaves of *C. lineata* on a Percoll density gradient. The gradient was collected in 1.4 ml fractions. The fractions were diluted approximately 10 times with 20 mM Mops (pH 7.5) containing 1 mM  $MnCl_2$ , 1 mM DDT, 1% Triton X-100 and assayed for arginase and other enzymes.

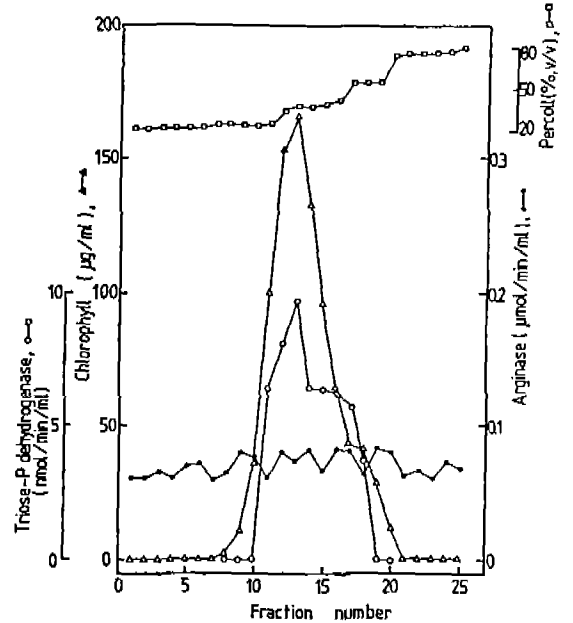


Fig. 2. Distribution of arginase and NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Percoll density gradient of *C. lineata* leaf chloroplast fraction. Chloroplast was prepared as described under "Materials and Methods". The gradient was collected in 1.4 ml fractions and diluted with the same buffer as Fig. 1 for enzyme assay.

(Downum *et al.*, 1983) 같은 것이다. 그러므로 canavanine 이 함유되어 있는 해너콩에서도 canavanine 에 대하여 기질특이성이 특이하게 높은 arginase 는 존재하지 않는 것으로 해석된다.

분별 원심분리 실험의 결과에서 (Table 1) arginase 의 specific activity 가 20,000×g 침전물에서 가장 높게 나타났으나 여기에는 상당량의 엽록체 파편이 들어 있어서 순수한 미토콘드리아 분획으로 보기 어려웠다. 따라서 Percoll 을 사용한 밀도구배 원심분리법으로 잎의 미토콘드리아를 분리하였다 (Fig. 1). 그 결과 27% Percoll 분획에서 미토콘드리아의 marker 인 cytochrome C oxidase 의 활성이 측정되었으며, arginase 의 활성분포도 미토콘드리아 분획과 일치하였다. 또한 미토콘드리아 분획에는 엽록소의 흔적이 일어나지 않았기 때문에 arginase 는 미토콘드리아에 존재하는 것으로 간주되었다. 엽록체에도 arginase 가 존재하는지를 확인하기 위하여 Percoll 밀도구배 원심분리법으로 엽록체를 분리하였다 (Fig. 2). 그 결과 37% 분획에서 intact 한 엽록체를 얻을 수 있었으며, marker 인 NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 의 활성 peak 가 엽록소의 peak 와 같은 위치에서 나타났다. 그러나 arginase 의 활성은 모든 분획에서 base line 을 이루며 분포하는 것으로 나타났다. 따라서 해너콩잎에서 엽록체에는 arginase 가 존재하지 않음이 밝혀졌다.

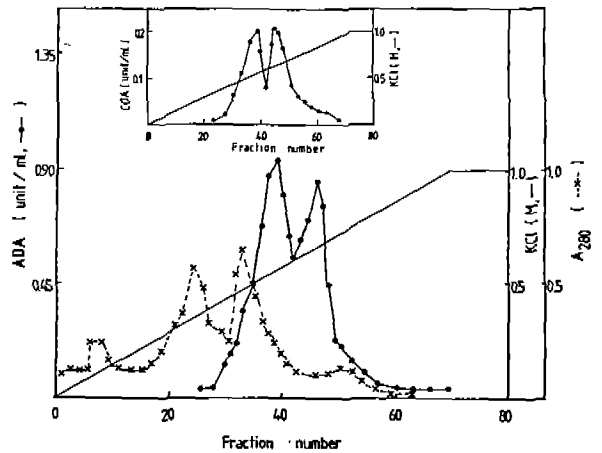


Fig. 3. DEAE-Sephacel salt gradient column chromatography of total arginase from leaves of *C. lineata*. Arginase was extracted using 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) containing 1 mM  $MnCl_2$ , 1% Triton X-100, and 2% PVPP, then centrifuged at 13,000g for 20 min. This resultant supernatant was adjusted to streptomycin sulfate precipitation, ammonium sulfate precipitation before DEAE-Sephacel chromatography (Yu *et al.*, 1988).

**Table 3.** Comparison of arginine-dependent and canavanine-dependent arginase activity from mitochondrial and cytosolic fraction of leaves of *C. lineata*

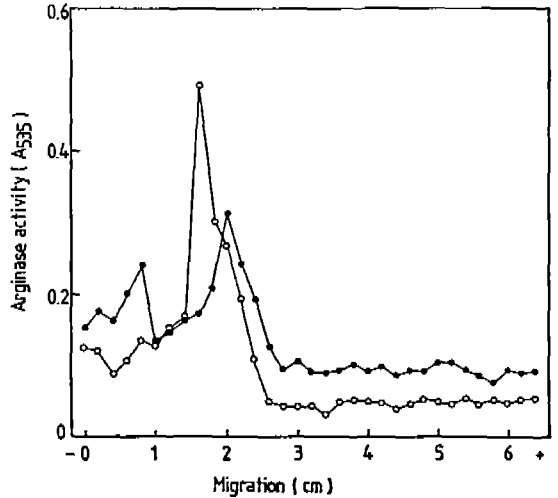
	pH 7.0 ADA:CDA	pH 8.0 ADA:CDA	pH 9.0 ADA:CDA
Mitochondrial fraction	2.5:1	3.4:1	6.2:1
Cytosolic fraction	2.6:1	3.8:1	7.2:1

Arginase was partly purified by streptomycin sulfate precipitation, ammonium sulfate precipitation, and DEAE-Sephacel chromatography from mitochondrial fraction (1,500-20,000g pellet) and cytosolic fraction (140,000g supernatant). Arginase activity was measured at 300 mM canavanine/or arginine.

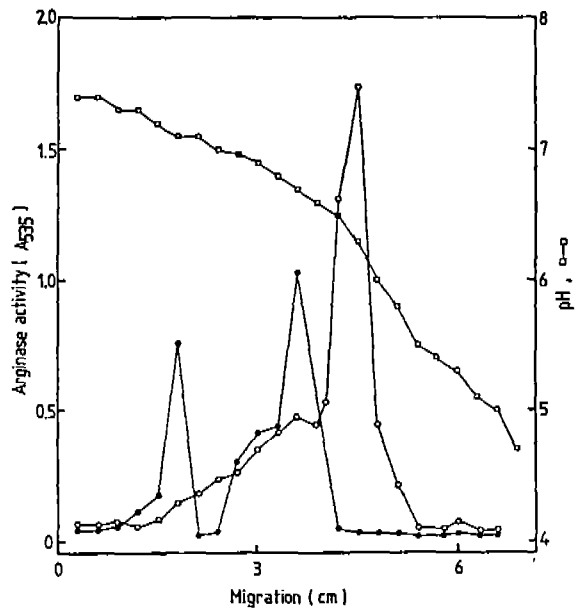
**Arginase의 성질.** 해너콩잎에서 arginase의 성질을 보다 상세히 알아보기 위하여 이온교환 크로마토그래피를 수행하였다. 그 결과(Fig. 3), 자엽의 경우에 1개의 활성 peak 만을 볼 수 있었다는 보고(Yu *et al.*, 1988)와는 달리 잎에서는 2개의 활성 peak가 얻어졌다. 즉 거의 대부분의 arginase가 미토콘드리아에 분포하는 자엽에서는 단일의 활성 peak를 보였고 arginase가 각각 미토콘드리아와 시토플라스마에 분포하는 잎에서는 활성 peak가 2개로 나타난 사실에서 arginase 단백질이 미토콘드리아에 존재하는 것과 시토플라스마에 존재하는 것이 전기적인 성질이 서로 다를 수 있었다.

한편, canavanase의 존재에 대한 관심이 지속되어 왔으나(Damodaran and Narayanan, 1940), jack bean의 경우 arginase가 단일 효소로서 arginine과 canavanine을 다같이 기질로 이용한다고 하였으며(Downum *et al.*, 1983), 해너콩 자엽에서도 arginase가 두 화합물을 모두 기질로 이용한다는 사실이 밝혀졌다(Yu *et al.*, 1988). 그렇지만 해너콩 유식물이 생장할 때 잎 arginase의 CDA가 자엽이나 뿌리보다 높은 것으로 나타났고(Kwon *et al.*, 1986), 자엽에서 분리한 arginase의 기질친화도가 pH 9.0에서는 arginine이 높지만 pH 8.0인 조건에서는 canavanine이 arginine보다 높게 변하였다(Yu *et al.*, 1988).

이러한 내용들로 보아, 도관을 통하여 계속적으로 잎으로 수송되어 온 canavanine은 시토플라스마나 미토콘드리아에서 분해되어야 하는데, 이 때 특히 CDA 활성이 높은 arginase가 존재할 가능성이 있을 것으로 생각되었다. 이와 같은 가능성을 검토하기 위하여 각 분획에서 arginase를 정제하고 pH에 따른 ADA와 CDA의 비를 측정하였다(Table 3). 그 결과 각 분획의 ADA:CDA 값은 pH가 낮아질수록 CDA의 비율이 커졌지만, 두 분획간에는 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 그렇지만 *in vivo*에서 시토플라스마는 미토콘드리아 matrix보다 pH가 낮은 사실을 고려하면 잎에서 canavanine을 보다 활발하게 분해할 수 있는 것으로 생각되지만, 해너콩잎에는 상당량의 canavanine이



**Fig. 4.** Polyacrylamide gel electrophoresis of arginase from cytosolic fraction (O-O) and purified mitochondria (●-●). The gel was cut out in 2 mm slices and each slices was assayed for arginase.



**Fig. 5.** Isoelectric focusing gel electrophoresis of arginase from cytosolic fraction (O-O) and purified mitochondria (●-●). The gel was cut out in 3 mm slices and each of slices was assayed for arginase.

추적될 수 있다는 사실에서(Park and Kwon, 1990) 잎 arginase에 대한 또 다른 차원의 연구가 필요하다고 볼 수 있다.

미토콘드리아와 시토플라스마 분획의 arginase를 전기영동한

결과(Fig. 4, 5) 미토콘드리아 arginase는 polyacrylamide 겔 전기영동에서 각각 mobility가 다른 두 개의 밴드로 나타났으며, 시토플 arginase는 단일밴드이기는 하지만 미토콘드리아 arginase와는 mobility와 PI가 서로 달랐다. Arginase의 heterogeneity에 관하여는 동물이나 *Neurospora*에서는 활발하게 연구가 이루어지고 있음에 비하여(Borkovich and Weiss, 1987; Harzfeld and Raper, 1976; Zamocka and Poremska, 1988) 식물에서는 Iris 구근에서 정제된 arginase와 *Cicer arietinum* 종자의 발아시 arginase의 heterogeneity를 밝힌 연구가 있을 뿐이다(Boutin, 1982; Pawashe and Srivastava, 1987). Iris의 경우 전기영동 과정에서 여러개의 예측하지 못한 arginase의 활성밴드가 생겼는데, 이러한 현상은  $Mn^{2+}$ 의 소실에 기인하여 효소단백질의 subunit가 분해된 결과라고 하였다. 그렇다면 본 실험의 결과에서 미토콘드리아나 시토플 arginase 중 어느 하나가 안정성이 상대적으로 떨어지는 것이 있다는 추정을 할 수도 있으나 정확한 설명은 할 수 없다.

이상과 같은 결과로 볼 때, 해너콩잎에서 arginase는 미토콘드리아와 시토플에 존재하여 이들이 전기적 성질이 다른 단백질임을 확인할 수 있었다. 그러나 canavanine의 분해활성에 있어서는 이 두 분획의 arginase는 유의성 있는 차이를 보이지 않아, 이러한 두 부위의 arginase가 canavanine 대사에서 어떠한 기능을 갖는지에 대하여는 canavanine의 축적의 문제와 함께 앞으로 밝혀져야 할 과제라 하겠다.

## 적 요

해너콩(*Canavalia lineata*)잎에서 arginase의 세포내 활성을 조사하였다. Arginase의 활성은 미토콘드리아 및 세포질 분획에서 측정되었으며, 특히 세포질 분획의 arginase 활성이 차지하는 비율이 가장 높았다. 이들은 DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피, polyacrylamide 겔 전기영동에서 각각 다른 mobility를 보였으며, PI값 또한 세포질 분획에서 6.3 미토콘드리아 분획에서 6.7과 7.1로써 차이가 있었다. 그러나 canavanine 분해활성에서는 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 이러한 실험결과에서, 해너콩잎의 arginase는 heterogeneity하게 존재하는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

Bell, E.A. 1971. Comparative biochemistry of non-protein amino acids. In, Chemotaxonomy of the leguminosae, Harbone, J.B., D. Boulter, and B.L. Turner (eds.), pp. 179-206. Academic Press, New York.

Borkovich, K.A. and R. Weiss. 1987. Purification and characterization of arginase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **262**: 7081-7086.

Boutin, J.P. 1982. Purification, properties and subunit structure of arginase from iris bulbs. *Eur. J. Biochem.* **127**: 237-243.

Chance, B. and A.C. Maehly 1955. Assay of catalase and peroxidase. In, Methods in Enzymol. Vol. 2, Colowick, S.P. and N.O. Kaplan (eds.), pp. 764-775. Academic Press, New York.

Damodaran, M. and K.G.A. Narayanan. 1940. A comparative study of arginase and canavanase. *Biochem. J.* **34**: 1449-1459.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.

Downum, K.R., G.A. Rosenthal and W.S. Cohen. 1983. L-Arginine and L-canavanine metabolism in jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. and soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Physiol.* **73**: 965-978.

Gamble, J.G. and A.L. Lehninger. 1973. Transport of ornithine and citrulline across the mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **248**: 610-618.

Harzfeld, A. and S.M. Raper. 1976. The heterogeneity of arginases in rat tissues. *Biochem. J.* **153**: 469-478.

Holden, M. 1965. Chlorophylls. In, Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, Goodwin, T.W. (ed.), pp. 461-488. Academic Press, New York.

Jun, B.O. and Y.M. Kwon. 1986. Isolation and characterization of  $\alpha$ -amylase from barley halfseed treated with canavanine. *Kor. Biochem. J.* **19**: 179-186.

Kolloffel, C. and H.D. Dijke 1975. Mitochondrial arginase activity from cotyledons of developing and germinating seeds of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **55**: 507-510.

Kwon, Y.M., H.C. Chung, S.K. Koh and Y.N. Hong. 1986. On utilization of canavanine and activity of canavanase during germination and growth of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Bot.* **29**: 85-94.

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.

O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

Park, G.S. and Y.M. Kwon. 1990. The analysis of canavanine content in leaves, roots, and xylem exudate of *Canavalia lineata* (L.) DC. in preparation.

Pawashe, A.B. and S.K. Srivastava. 1987. Effect of an endogenous factor on arginase activity in germinating Bengal gram (*Cicer arietinum*) seeds. *Physiol. Plant.* **71**: 229-235.

Rafael, J. 1983. Cytochrome c oxidase. In, Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3, Bergmeyer, J. and M. Grabi (eds.), pp. 266-273. Berlag Chemie, Weinheim.

- Rosenthal, G.A. 1970. Investigation of canavanine biochemistry in the jack bean plant. *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **46**: 273-276.
- Rosenthal, G.A. 1982. Toxic constituents and their related metabolites. In, *Plant Nonprotein Amino and Imino Acids*. pp. 57-157. Academic Press, New York.
- Rosenthal, G.A. and M.A. Berge. 1989. Catabolism of L-canavanine and L-canaline in the jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Leguminosae). *J. Agric. Food Chem.* **37**: 591-595.
- Rosenthal, G.A., M.A. Berge, A.J. Ozinskas and C.G. Hughes. 1988. Ability of L-canavanine to support nitrogen metabolism in the jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *J. Agric. Food Chem.* **36**: 1159-1163.
- Schwitzguebel, J.P. and P.A. Siegenthaler. 1984. Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiol.* **75**: 670-674.
- Splittstoesser, W.E. 1969. The appearance of arginine and arginase on pumpkin cotyledons. Characterization of arginase. *Phytochemistry* **8**: 753-758.
- Weaks, T.E. and G.E. Hunt. 1974. The effects of canavanine on the growth of isolated roots of four plant species. *Bot. Gaz.* **135**: 45-49.
- Weiss, R.L. and R.H. Davis. 1973. Intracellular localization of enzymes of arginine metabolism in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **248**: 5403-5408.
- Wolosiuk, R.A. and B.B. Buchanan. 1976. Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **251**: 6456-6461.
- Yamaya, T., M. Tanigawa and H. Matsumoto. 1982. Specific increase in phosphatase isozymes in cucumber roots caused by calcium deficiency. *Plant Cell Physiol.* **23**: 385-395.
- Yu, G.H., B.O. Jun, Y.N. Hong and Y.M. Kwon. 1988. Purification and characterization of arginase from cotyledons of *Canavalia lineata*. *Kor. Biochem. J.* **21**: 497-504.
- Zamecka, E. and Z. Poremska. 1988. Five forms of arginase in human tissues. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **39**: 258-266.

(1990. 3. 13 接受)