

해너콩(*Canavalia lineata*)의 잎, 뿌리 및 도관액에서 Canavanine의 함량분석

朴景荀·權寧命
(서울대학교 自然科學大學 植物學科)

The Analysis of Canavanine Content in Leaves, Roots, and Xylem Exudate of *Canavalia lineata*

Park, Kyung Soon and Young Myung Kwon

(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

The content of canavanine was measured and analyzed in leaves, roots and xylem exudate of *Canavalia lineata*. In non-nodulated plants, the cotyledons were removed after a week of sowing and the plants were grown for 3 weeks. The quantity of canavanine measured by canavanine specific-PCAF colorimetric assay was 9-10 $\mu\text{mol/g}$ fresh wt. in leaves, 5-6 $\mu\text{mol/g}$ fresh wt. in roots, and 0.3-0.5 $\mu\text{mol/ml}$ in xylem exudate. When free amino acids of leaves, roots, and xylem exudate were analysed by HPLC, the relative proportion of asparagine plus glycine was the highest and canavanine was high secondarily. And the relative proportion of canavanine among total free amino acids was 30-35% in leaves and roots, and 12-13% in xylem exudate. In non-nodulated plants grown for 8 weeks, the canavanine content of each part was similar to that of 3-week-old plants. By the formation of nodules, the canavanine content of leaves, roots, xylem exudate, and nodules decreased apparently. In xylem exudate, the nitrogenous compounds were also analyzed. The relative contents of NO_3^- , free amino acids, and ureides (allantoin and allantoic acid) were 60-80%, 20-30%, and 5%, respectively. From these results, it can be assumed that canavanine is synthesized in the root of plant and nodulation affects the canavanine content. It is obvious that canavanine is considered one of the reduced-N forms transported via xylem.

서론

Canavanine은 arginine의 guanidino-oxy 구조 유사체로서 jack bean(*Canavalia ensiformis*)의 종자에서 처음 분리된 후(Kitagawa and Tomiyama, 1929) *Canavalia* 속을 비롯한 콩아과의 종자에 광범위하게 존재하는 것으로 알려져 있으며(Bell *et al.*, 1978; Rosenthal, 1982a), 그 함량은 종자 건중량의 2-4%로부터 10-13%이고, 총

유리아미노산의 90% 이상을 차지하고 있다(Rosenthal, 1977). Canavanine이 여러 생물에서 나타내는 대사저해 효과는 canavanine이 arginine 대사에 참여하기 때문인 것으로 알려져 있어서, allelochemical로서의 기능이 제시되기도 하였다(Horowitz and Srb, 1948; Maas, 1960; Rosenthal, 1982b).

우리나라 제주도에 자생하는 해너콩(*Canavalia lineata*) 종자에도 canavanine이 함유되어 있으며 건중량의 10%에 해당되는 것으로 보고되었고, canavanine은 발아와 유식물 생장 동안 자엽내에서는 물론 잎과 뿌리로 이동되어

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

분해된 후 생장에 이용되는 것으로 확인되었다. (Kwon *et al.*, 1986). 최근에는 canavanine 이 몇몇 아미노산 합성에서 질소원으로 작용한다는 보고가 있어 (Rosenthal *et al.*, 1988) 질소저장원으로서 canavanine 의 역할이 확실해지고 있다.

종자내에 저장된 canavanine 은 종자 발달시기 동안에 콩각지 (pod)에서 합성된 후 종자내로 이동하는 것 같으나 아직까지 발달단계에 있는 종자에서 canavanine 의 합성이 있는지에 관해서는 정확히 알려진 바 없다 (Williams and Hunt, 1967; Rosenthal, 1971). 한편 canvanine 은 arginine 의 생합성 경로와 같은 Krebs-Henseleit ornithine-urea cycle 을 통해 합성되는 것으로 보고 있으며, 이에 관하여는 효소들이 잎이나 자엽에서 검출되었고 (Rosenthal and Naylor, 1969; Shargool and Cossins, 1969; Shargool, 1971), jack bean 의 조직으로부터는 중간산물인 유리 canaline 이 분리된 바 있다 (Miersch, 1967). 그러나 이러한 cycle 이 *in vivo* 에서 canavanine 합성에 실제로 작용하는지에 대한 것은 분명치 않다.

한편, 고등식물에서 뿌리로부터 도관을 통하여 잎으로 이동되는 질소의 주된 형태는 NO_3^- , 아미노산, amides, ureides 인 것으로 밝혀졌다 (Reinbothe and Mothes, 1962; Pate, 1973). 뿌리에서 NO_3^- 를 흡수하여 환원시키는 능력은 식물의 종마다 다양하며 이것은 도관액에서 측정되는 NO_3^- -N : organic-N 의 비율과 밀접한 관계가 있다 (Oghoghorie, 1971; Atkins *et al.*, 1979). 또한 질소고정 식물에서 도관을 통하여 이동되는 질소의 주된 형태는 amide 나 ureide 인 것으로 알려져 있다 (Sprent, 1980; Pate and Atkins, 1983).

이상의 보고들을 살펴보면 생장 중인 식물체에서 canavanine 합성에 관한 연구가 비교적 많지 않은 실정이며 더욱이 종자시기에 존재하는 canavanine 이 발아와 더불어 이용된 다음 영양 생장기간 동안 식물체내에서 존재하는지 또는 합성되고 있는지 등에 대한 연구도 거의 없는 실정이다 (Rosenthal, 1972). 따라서 본 연구에서는 종자내에 canavanine 함량이 높고 이미 그 이용적 측면이 조사되어 있는 해너콩을 대상으로하여 canavanine 합성에 관한 기초적인 지식을 얻고자 잎, 뿌리, 도관액에서 canavanine 함량조사를 하였으며 이를 위해 PCAF 발색법을 통한 정량 분석과 HPLC 아미노산 정성분석을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 배양조건. 본 실험에서 사용된 해너콩 (*Canavalia lineata*) 종자는 제주도 토기섬 일대의 자생지에서 채취한 것으로서 (1986년) 4°C 암소에서 보관하면서 모든 실험에 사용하였다. 발아된 유식물의 유근을 Hoagland 배양액으로 채워진 plastic 용기 (11×12.5 cm) 의 상단에 고정시킨 1 cm 두께의 polyurethane foam 에

꽂고 1 일 동안 암 조건에 둔 다음 7000 lux (16 : 8) 하에서 배양액에 연속적인 통기를 하면서 growth chamber (25±2°C)에서 배양하였다.

본 실험에서는 영양생장 중에 있는 해너콩을 실험대상으로 하였는데 자엽으로부터 이동하는 canavanine (can)을 배제하기 위하여 파종 후 1주만에 자엽을 제거하고 (근류가 없는 해너콩의 경우), 각각 3주와 8주간 배양한 것들을 재료로 하였다. 3주 배양한 해너콩의 경우는 근류가 없는 것으로, 4배 희석한 Hoagland 액에서 배양하였고, 질소원의 영향을 알아보는 실험에서는 마지막 1주간을 KNO_3 로 NO_3^- 농도치리를 하여 사용하였다. 8주 배양한 경우는 근류가 없는 것과 있는 것으로 10배 희석한 Hoagland 액에서 배양하였으며 근류형성은 Lee와 Kwon (1990)의 방법을 따랐다.

도관액의 수집. 도관액은 매번 오후 1-6 시까지 5시간에 걸쳐 수집하였다. 도관액을 수집하기 2시간 전에 배양액을 새 것으로 갈아주었고, 온도 30-33°C에서 배양액에 연속적인 통기를 하면서 면도날을 이용하여 자엽마디 바로 아래 부위를 자른 후 자른 부위에서 나오는 도관액을 주사기로 받아서 Eppendorf tube (1.5 ml)에 모았다. 도관액은 수집되는 동안 0-4°C에서 유지되었고 수집 후 -40°C에 보관하였다.

Canavanine 과 총 유리아미노산의 추출 및 함량측정. Canavanine 과 총 유리아미노산의 추출은 Pate (1980)의 방법을 기초로 하였다. Canavanine 의 정량은 PCAF (pentacyanoammonioferrate)에 의한 발색법으로 하였는데, 발색시킨 후 530 nm에서 흡광도를 측정하였으며 L-canavanine sulfate로 얻은 표준곡선에 대입하여 canavanine 함량을 산출하였다 (Rosenthal, 1976). 총 유리아미노산의 정량은 canavanine 정량용 시료에 ninhydrin 시약을 혼합하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 아미노산으로는 glycine을 사용하였으며, 표준곡선을 이용하여 총 유리아미노산의 함량을 산출하였다 (Plummer, 1978).

Reverse phase HPLC (high performance liquid chromatography)에 의한 아미노산의 분석. 시료의 유리아미노산 분석은 아미노산의 phenylthiocarbonyl 유도체를 합성하고 이것을 HPLC로 분석하는 방법을 따랐다. 아미노산의 추출, 전처리 및 PITC 유도체의 제조는 Heinrichson과 Meredith (1984), Ebert (1986), Lavi와 Holcenberg (1986)의 방법을 기초로 하였다. HPLC에 의한 분석과정은 Seferiadis 등 (1987)의 방법을 기초로하여 시행하였으며 분석시스템은 Beckman model 338 conventional gradient system이었다. NEC controller (model 420, Beckman)를 사용하여 2대의 pump (model 110A, Beckman)를 조작하였고, column (Ultrasphere™-ODS, C_{18} , 5 μm , 4.6×250 mm, Waters)을 통과해 나온 물질은 UV detector (model 166, Beckman)로 254 nm에서 흡광도가 측정되었으며, computing integrator (model 427, Beckman)

를 사용하여 분석상황을 기록하고 integration 하였다. 분석과정은, 먼저 용매 A (0.05M ammonium acetate, pH 6.8)로 40분간 column을 equilibration시킨 후 20 μ l의 injection loop가 장착된 manual injector (model 210, Beckman)에 분석시료를 주입하였다. 이후 용매 A와 용매 B (0.1M ammonium acetate in acetonitrile : methanol : water=44 : 10 : 46, pH 6.8)로 gradient를 조정하여 아미노산들을 용출시켰는데 gradient 조성은 0-15% B (15분), 15-38% B (10분), 38-60% B (10분) 및 60% B (10분)로 하였다. 위의 모든 경우 유속은 1 ml/min. 이었고 column은 온도를 39 $^{\circ}$ C로 유지시켰으며 모든 용매는 HPLC grade를 사용하였다.

NO₃, allantoin 과 allantoic acid 함량의 측정. 도관액 내의 NO₃ 함량을 Cataldo 등 (1975)의 방법을 이용하여 측정하였으며, allantoin 과 allantoic acid의 함량은 Vogels와 Drift (1970)의 방법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

근류가 없는 해너콩의 잎, 뿌리, 도관액에서 canavanine의 함량. 유식물의 생장시 자엽에서 공급되는 canavanine의 영향을 배제하기 위하여 피종 후 1주만에 자엽을 제거하고 3주 배양한 해너콩에서 PCAF 발색법에 의한 canavanine의 정량결과 잎, 뿌리, 도관액 (exudation rate ; 2-10 μ l/plant \cdot hr) 모두에서 canavanine이 존재하는 것으로 나타났으며 그 함량은 잎과 뿌리에서 생체 중량당 각각 9-10 μ mol, 5-6 μ mol 이었고 도관액에서는 0.3-0.5 mM 이었다. 이러한 함량은 총 유리아미노산 중 24-60%를 차지하는 높은 수준의 것이었다 (Table 1). 현재까지 잎에서는 canavanine이 검출된 사실이 있으나 (Rosenthal,

Table 2. Amino acid content expressed as the relative peak area percentage of HPLC analysis from leaves, xylem exudate, and roots of 3-week-old, non-nodulated *Canavalia lineata* grown in nutrient solution containing 10 mM KNO₃ for a final week

Amino acids	Relative content (%)		
	Leaves	Xylem exudate	Roots
Asp	2.6	0.4	2.9
Glu	3.2	0.4	1.8
Ser	1.6	5.6	2.5
Asn + Gly	37.0	40.3	26.0
Can	33.9	12.5	30.8
Ala	1.3	3.5	1.8
Arg	1.2	1.7	1.7
Pro	4.0	2.4	2.1
Val	0.3	5.6	1.1
Phe	4.6	5.4	7.0
Others ^a	10.3	22.2	22.3
Total	100.0	100.0	100.0

^aGln, His, Thr, Tyr, Met, Cys, Ile, Leu, Trp, Lys.

1972) 생장 초기에 자엽을 제거하여도 뿌리와 도관액에 canavanine이 존재한다는 결과는 아직까지 보고된 바 없다.

한편 총 유리아미노산 중에서 canavanine이 차지하는 양적관계를 보다 상세히 알아보려고 HPLC에 의한 아미노산의 정성분석을 해본 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이, 잎과 뿌리에서는 canavanine 함량이, 총 유리아미노산의 30-48%를 차지하고 있어, 30-40%를 차지하고 있는 asparagine+glycine과 함께 가장 높은 비율로 존재하였으며 도관액에서도 canavanine의 함량은 총 유리아미노산 중 12-13%를 차지하고 있어서 40%를 차지하는 asparagine+glycine 다음으로 높았다. 지금까지 jack bean과 해너콩에서, 생장기간 중 잎, 줄기 및 뿌리에서 검출된 canavanine은 자엽으로부터 이동된 것으로 알려져 왔으며 (Rosenthal, 1970; Rosenthal and Rhodes, 1984; Chung, 1987), 해너콩은 발아가 시작된 후 9-18일 사이에 자엽의 canavanine 함량이 크게 저하되면서 canavanine이 잎과 뿌리로 이동한다고 하는데 (Kwon *et al.*, 1986; Chung, 1987), 본 실험에서는 자엽으로부터 본격적인 canavanine 이동이 시작되기 전인, 피종한지 1주 후에 자엽을 제거시켰다. 따라서 각 부위에서 보여지는 높은 함량의 canavanine이 자엽으로부터 이동된 것만은 아님이 분명하다. 해너콩 유식물의 잎과 뿌리에서 canavanine을 분해하는 arginase 활성이 용이하게 측정된 사실로 (Kwon *et al.*, 1986; Yu *et al.*, 1988) 미루어 보아, 자엽이 제거된지 2주 후에도 canavanine의 함량이 여전히 높게 유지되고

Table 1. Content of canavanine and free amino acid measured by PCAF and ninhydrin colorimetric assay from leaves, roots, and xylem exudate 3-week-old, non-nodulated *Canavalia lineata*

Plant material		Content		Canavanine/ Free amino acid (%)
		Canavanine	Free amino acid	
Leaves ^a	N-free	9.1 \pm 0.64	19.4 \pm 2.8	47
	NO ₃ ⁻ 10 mM	9.7 \pm 2.9	20.7 \pm 6.9	47
Roots ^a	N-free	5.6 \pm 1.5	8.6 \pm 2.3	65
	NO ₃ ⁻ 10 mM	5.8 \pm 1.9	10.9 \pm 2.5	53
Xylem ^b exudate	N-free	0.26	0.86	30
	NO ₃ ⁻ 10 mM	0.48	2.0	24

^aEach value is averaged over 9 replicates and the dimension of value is μ mol/g fresh wt.

^bEach value is averaged over 2-3 replicates and the dimension of value is μ mol/ml.

Table 3. Comparison of canavanine and free amino acid in leaves, roots, and xylem exudate of non-nodulated with that of nodulated *Canavalia lineata* grown for 8 weeks

Plant material	Non-nodulated			Nodulated		
	Canavanine	Free amino acid	Canavanine/ Free amino acid (%)	Canavanine	Free amino acid	Canavanine/ Free amino acid (%)
Leaves ^a	6.2 ± 0.67	11.9 ± 1.4	52	2.6 ± 0.41	8.3 ± 2.0	31
Roots ^a	4.7 ± 1.1	6.5 ± 0.73	72	2.1 ± 1.2	7.2 ± 0.57	29
Xylem ^b exudate	0.49	3.4	14	0.19	3.4	6
Nodules ^c	—	—	—	1.8	29.4	6

^aEach value is averaged over 6-9 replicates and the dimension of value is $\mu\text{mol/g}$ fresh wt.

^bEach value is averaged over 1-2 replicates and the dimension of value is $\mu\text{mol/ml}$.

^cEach value is averaged over 2 replicates and the dimension of value is $\mu\text{mol/g}$ fresh wt.

Table 4. Amino acid content expressed as the relative peak area percentage of HPLC analysis from leaves, xylem exudate, roots, and nodules of 8-week-old, non-nodulated and nodulated *Canavalia lineata*

Amino acids	Relative content (%)						
	Non-nodulated			Nodulated			
	Leaves	Xylem exudate	Roots	Leaves	Xylem exudate	Roots	Nodules
Asp	6.7	0.3	7.3	3.2	8.4	2.2	1.8
Glu	7.0	0.1	3.9	2.5	1.0	2.9	7.7
Ser	4.1	0.7	5.2	4.1	2.3	3.5	1.4
Asn + Gly	32.4	24.7	29.5	46.6	49.4	46.7	39.9
Can	20.3	11.5	20.5	4.7	1.5	12.5	3.3
Ala	2.4	0.5	7.2	4.7	3.6	3.5	4.2
Arg	0.6	2.3	0.2	7.2	0.1	1.0	0.4
Pro	2.9	2.5	1.4	2.7	1.3	1.0	5.4
Val	2.6	12.0	1.3	0.3	2.9	2.2	0.8
Phe	3.8	8.1	2.6	4.8	5.7	4.6	5.7
Others	17.2	37.3	20.9	19.2	23.8	19.9	29.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

^aGln, His, Thr, Tyr, Met, Cys, Ile, Leu, Trp, Lys.

있으며 또한 8주 배양한 해너콩의 경우, 모든 부위에서 canavanine 이 총 유리아미노산에 대해 3주 배양했을 때와 비슷한 함량으로 존재하였다 (Table 3) HPLC 분석에 의한 canavanine 의 함량비율도 (Table 4) 3주 배양했을 때와 큰 차이가 없는 것으로 나타난 것은 영양생장 중에도 해너콩에서는 canavanine 합성이 이루어지고 있음을 의미하는 것이다. 특히 도관액에서 canavanine 이 검출된다는 사실은 뿌리에서 canavanine 이 합성되고 있음이 확실시되는 것이다. 이러한 점은 allelopathic 한 면에서도 해너콩에 유리할 것으로 사료된다 (Rosenthal, 1977).

한편, 도관액내의 canavanine 함량은 뿌리로부터 이동되는 아미노산들 중 asparagine+glycine 다음으로 높은 비율을 차지하고 있었고, 이러한 양상이 파종 후 8주까지

도 유지되는 것으로 보아 도관을 통한 canavanine 의 수송이 유식물 단계에만 국한된 현상은 아니며 이러한 점에서 canavanine 은 해너콩의 뿌리로부터 이동되는 환원된 질소 이동형의 하나임이 분명하다.

이상의 결과들로부터 canavanine 은 해너콩의 뿌리에서 합성되어져 도관을 통하여 수송되는 것으로 해석할 수 있는데 뿌리보다 함량이 높게 유지되고 있는 잎의 canavanine 이 뿌리로부터 수송되어온 것이라고만 해석하는 것은 다소 무리가 있는 것으로 사료될 수도 있다. 그러나 *Neurospora* 와 식물세포에서 arginine 이 액포에 축적될 수 있다는 사실로부터 (Karlin *et al.*, 1976; Micallef and Shelp, 1989) 해너콩에서도 canavanine 이 cytosol 이 아닌 액포에 저장될 수 있는 가능성이 있기 때문에 앞에서 canavanine 의

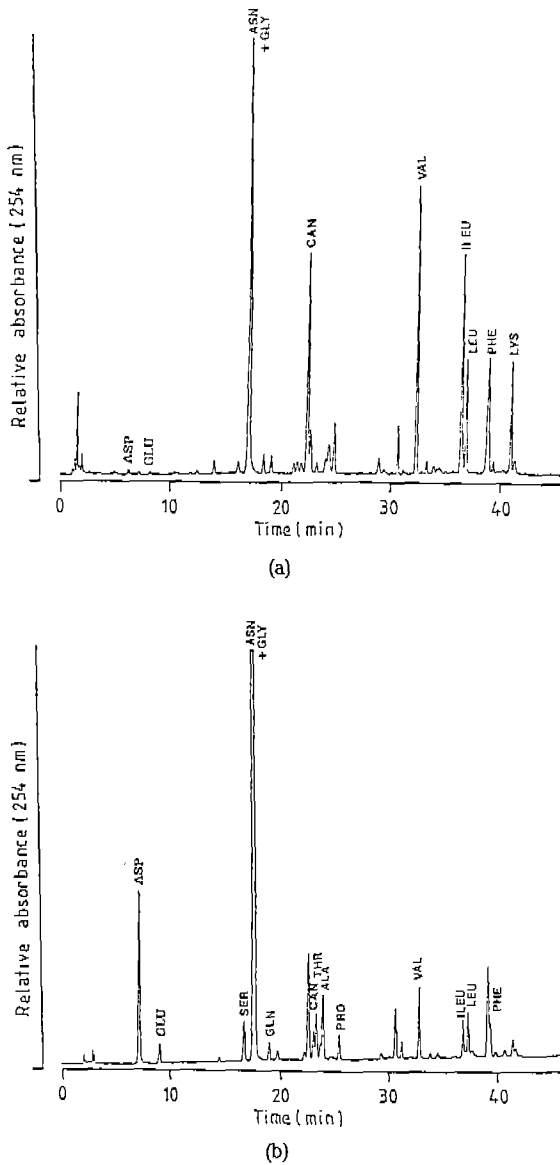


Fig. 1. HPLC chromatograms of amino acids from xylem exudate of 8-week-old, non-nodulated(a) and nodulated(b) *Canavalia lineata*.

함량이 뿌리보다 높은 것만으로는 잎에서 canavanine 이 합성되는지에 대하여 설명할 수는 없을 것 같다. 잎에 존재하는 canavanine 이 전적으로 뿌리에서 유래하는지 또는 잎에서도 합성되는 것인지 구분하기는 본 실험만으로 판단하기 어려우나 뿌리에서 합성된 canavanine 이 도관을 따라 지상부로 수송될 것이라는 해석은 벼와 밀의 유식물 뿌리에서 합성된 phosphorylcholine 이 도관으로 수송된다는 사실과 (Martin and Tolbert, 1983 ; Yu *et al.*, 1987 ; Yu

and Kwon, 1988) 견주어볼 때 타당할 것으로 보인다. 한편 잎세포에 있는 arginase 활성이 생리적 pH에서 canavanine 에 대한 친화도가 낮다는 사실로부터 (Yu and Kwon, 1990), 잎에서 여분의 canavanine 은 액포에 축적될 수 있을 것 같다.

근류가 있는 해너콩의 잎, 뿌리, 도관액, 근류에서 canavanine 의 함량. 자생하는 해너콩에는 뿌리혹 박테리아와의 공생으로 근류가 형성되어 있으므로 본 연구에서도 근류를 유도하여 8주 배양한 개체의 잎, 뿌리, 도관액 및 근류에서 canavanine 함량을 조사를 하였다. 그 결과 HPLC 아미노산 정성분석에서는 (Fig. 1, Table 4) 잎, 도관액 및 근류에서 canavanine 함량이 총 유리아미노산 중 5% 미만으로 근류가 없는 경우에 비해 크게 낮아졌을 뿐만 아니라 PCAF 발색법을 통한 canavanine 의 정량분석 결과에서도 canavanine 함량과 총 유리아미노산에 대한 canavanine 의 함량비율은 근류가 없는 경우에 비해 현저히 낮았다 (Table 3). 한편 근류를 제외한 뿌리의 경우는 HPLC 아미노산 정성분석 결과 (Table 4) canavanine 함량이 12% 정도로 asparagine+glycine 다음으로 높았으나 정량결과 (Table 3) canavanine 함량과 총 유리아미노산에 대한 함량비율을 모두가 잎, 도관액, 근류에서와 마찬가지로 근류가 없는 경우에 비해 매우 낮아진 것으로 나타났다.

실제 자생지인 제주도 토끼섬에서 채집한 (1989년) 해너콩의 잎과 뿌리에서도 PCAF 법을 통해 canavanine 정량을 해본 결과 canavanine 함량은 실험실에서 배양한 해너콩 (근류가 형성된)의 잎과 뿌리에서 보이는 것과 비슷한 수준이었다 (미발표 결과). 이상과 같이 뿌리혹 박테리아와의 공생으로 근류가 형성됨으로 인하여 canavanine 함량이 현저히 줄어드는 것으로 보아 근류의 존재로 뿌리에서 합성되는 canavanine 의 양이 감소하고 또한 도관으로 적재되는 canavanine 의 양이 크게 저하되는 것으로 해석할 수 있으며 그 영향으로 잎의 canavanine 함량도 저하되는 것으로 해석된다. 따라서 근류형성에 의하여 잎에서의 canavanine 생합성이 저하된다고 볼 수는 없기 때문에 잎에 존재하는 canavanine 은 뿌리로부터 수송된 것이라 해석하는 것이 타당할 것 같다. 근류가 형성됨에 따라 뿌리의 canavanine 함량이 감소되는 이유나 내용에 관한 설명을 할 수는 없지만 해너콩의 뿌리혹에서 분리한 *Rhizobium* SNU 003의 생장이 canavanine 에 의해 억제되고 또 canavanine 을 분해하는 효소를 가지고 있지 않다는 사실 (Lee and Kwon, 1990)로 보아 뿌리혹 형성에 따른 canavanine 생합성계의 활성이 예민하게 조절되는 것으로 해석된다.

도관액에서 이동형 질소화합물의 함량. 근류가 없는 해너콩에서 canavanine 은 도관을 통하여 뿌리로부터 이동되는 환원된 질소 이동형의 하나로서 작용함이 본 연구에서 밝혀졌다. 이와 아울러 해너콩에서 도관을 통한 질소화합물들의 이동양상을 좀 더 상세히 알고자, NO₃⁻, 총 유리아

미노산, ureide(allantoin, allantoic acid)의 상대적 함량비율을 조사하였다. 그 결과 근류가 없는 해너콩의 도관액에서 NO₃⁻가 60-80%, 유리아미노산이 20-30%, allantoin과 allantoic acid가 5% 순으로 존재함이 나타났다(Fig. 2). 높은 NO₃⁻의 함량비율은 잎과 뿌리에서 측정된 nitrate reductase 활성이 잎에 비해 뿌리가 낮았던 결과를(비발표 결과) 반영하는 것이라 보여진다(Oghoghorie, 1971; Atkins *et al.*, 1979).

이러한 함량비율은 외부에서 NO₃⁻가 공급되면 질소원이 공급되지 않은 경우(control)에 비해 NO₃⁻의 상대적 함량비율이 약간 증가하는 경향을 보이고 있으나 그 차이는 미미하였는데 이러한 결과는 1주일의 NO₃⁻ starvation으로 해너콩의 NO₃⁻ pool에 아무런 영향을 미치지 못하였기 때문이라 여겨진다. Canavanine 함량 역시 1주간의 NO₃⁻ 처리에 영향을 받지 않았던 것도(Table 1) 마찬가지로 이유에서라 보여진다. 그러므로 보다 확실한 실험으로, 보다 확실한 내용이 규명되어야 할 것이다.

한편, 해너콩의 뿌리에서 환원된 질소는 근류가 없는 경우 대부분 asparagine+glycine(C₁₈, Nova-pack column)을 이용하여 asparagine과 glycine을 분리시켰을 때 asparagine이 95% 정도로 대부분이 asparagine임을 알 수 있었다) 형태로 지상부로 이동하고 있었으며(Table 4, Figs. 1, 3) canavanine도 질소를 운반하는 carrier로서 작용함을 알 수 있었다. 그러나 근류가 형성되면 도관액에서 allantoin과 allantoic acid의 함량비율이 근류가 없는 경우에 비해 높아져(Fig. 3) allantoin과 allantoic acid로도 환원된 질소의 상당부분이 이동하고 있음을 알 수 있었다. Allantoin과 allantoic acid의 합성장소가 nodule 이기에 nodule에서 N₂ fixation으로 고정된 질소가 allantoin과 allantoic acid로 대사되어 이동되는 결과라 보여진다

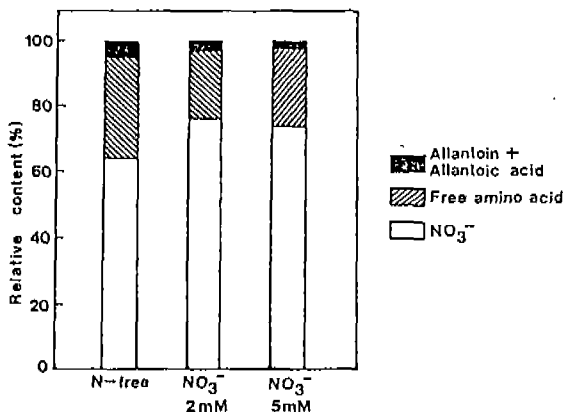


Fig. 2. Distribution of N-forms in xylem exudate of 3 week-old, non-nodulated *Canavalia lineata* grown in 1/4 strength Hoagland solution for 2 weeks and treated with KNO₃ solution for a final week.

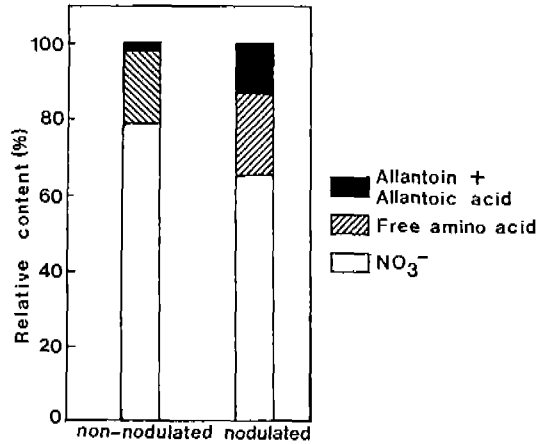


Fig. 3. Distribution of N-forms in xylem exudate of 8 week-old, non-nodulated and nodulated *Canavalia lineata* grown in 1/10 strength Hoagland solution for 8 weeks.

(Streeter, 1979; Atkins, 1987). 이처럼 근류의 존재로 뿌리에서 질소대사의 내용이 달라지는 예는 다른 콩과식물에서도 볼 수 있는 사실로서(McClure and Israel, 1979; Peoples *et al.*, 1986), 특히 해너콩에서는 canavanine 대사가 근류의 존재에 의하여 영향을 받는 것으로 해석된다.

적 요

해너콩(*Canavalia lineata*)의 잎, 뿌리, 도관액에서 canavanine 함량분석을 하였다. 파종 후 1주만에 지엽을 제거시키고 근류없이 3주 배양된 개체에서, PCAF 발색법에 의한 canavanine 정량결과, 잎과, 뿌리에서 canavanine은 생체중당당 각각 9-10 μmol, 5-6 μmol 수준으로 존재하고 있으며, 도관액에서는 0.3-0.5mM 수준으로 존재함을 알 수 있었다. 또한 HPLC 아미노산 정성분석 결과, 총 유리아미노산 중 canavanine이 차지하는 함량비율은 잎과 뿌리에서는 20-48%, 도관액에서는 12-13%로 총 유리아미노산 가운데서 가장 높거나 asparagine+glycine 다음으로 높았다. 이러한 함량과 함량비율은 8주 배양한 개체에서도 거의 비슷했다. 근류가 형성되면, 잎, 뿌리, 도관액, 근류에서 canavanine 함량과 총 유리아미노산에 대한 함량비율은 현저히 낮아졌다. 한편 도관액에서는 canavanine과 아울러 이동형 질소 화합물의 함량분석도 하였는데 NO₃⁻, 유리아미노산, allantoin과 allantoic acid의 상대적 함량비율은 60-80%, 20-30%, 5%의 순이었다. 이상의 결과로부터 영양 생장 중인 해너콩의 뿌리에서 canavanine이 합성되는 것으로 보여지며 특히 도관액내에서 canavanine이 뿌리로부터 이동되는 환원된 질소화합물 중 중요한 위치를 차지하고 있어 canavanine이 도관을 통해 이동되는 환원된 질소 운반형태임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Atkins, C.A. 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. *Plant and Soil* **100**: 157-169.
- Atkins, C.A., J.S. Pate and D.B. Layzell. 1979. Assimilation and transport of nitrogen in nonnodulated (NO_3^- -grown) *Lupinus albus* L. *Plant Physiol.* **64**: 1078-1082.
- Bell, E.A., J.A. Lackey and R.M. Polhill. 1978. Systematic significance of canavanine in the *Papilionoideae* (*Faboideae*). *Biochem. Syst. Ecol.* **6**: 201-212.
- Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* **6**: 71-80.
- Chung, H.C. 1987. On the utilization of canavanine during germination and growth of *Canavalia lineata* (L.) DC. M.S. thesis. Seoul Nat'l Univ., Seoul, Korea.
- Ebert, R.F. 1986. Amino acid analysis by HPLC: Optimized conditions for chromatography of phenylthiocarbonyl derivatives. *Anal. Biochem.* **154**: 431-435.
- Heinrikson, R.L. and S.C. Meredith. 1984. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* **136**: 65-74.
- Horowitz, N.H. and A.M. Srb. 1948. Growth inhibition of *Neurospora* by canavanine and its reversal. *J. Biol. Chem.* **174**: 371-378.
- Karlin, J.N., B.J. Bowman and R.H. Davis. 1976. Compartmental behavior of ornithine in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **251**: 3948-3955.
- Kitagawa, M. and T. Tomiyama. 1929. A new amino compound in the jack bean and a corresponding new ferment. *Biochem. J.* **75**: 618-620.
- Kwon, Y.M., H.C. Chung, S.C. Kho and Y.N. Hong. 1968. On utilization of canavanine and activity of canavanase during germination and growth of *Canavalia lineata* (L.) DC. *Korean J. Bot.* **29**: 85-94.
- Lavi, L.E. and J.S. Holcenberg. 1986. Sensitive analysis of asparagine and glutamine in physiological fluids and cells by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Chrom.* **377**: 155-163.
- Lec, J.Y. and Y.M. Kwon. 1990. Effects of canavanine and arginine on the growth of *Rhizobium* SNU003 and properties of arginine deiminase. *Korean Biochem. J.* **23**: in printing.
- Maas, W.K. 1960. Studies on repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **26**: 183-191.
- Martin, B.A. and N.E. Tolbert. 1983. Factors which affect the amount of inorganic phosphate, phosphocoline and phosphorylethanolamine in xylem exudate of tomato plants. *Plant Physiol.* **73**: 464-470.
- McClure, P.R. and D.W. Israel. 1979. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.* **64**: 411-416.
- Micallef, B.J. and B.J. Shelp. 1989. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* **91**: 170-174.
- Miersch, J. 1967. Nachweis und Isolierung von canavine. *Naturwissenschaften* **54**: 169-170.
- Oghoghorie, C.G.O. 1971. The physiology of the field pea *Rhizobium* symbiosis in the presence and absence of nitrate. Ph.D. thesis. Queen's Univ., Belfast, Northern Ireland.
- Pate, J.S. 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 109-119.
- Pate, J.S. 1980. Nitrogen nutrient and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiol.* **65**: 961-965.
- Pate, J.S. and C.A. Atkins. 1983. Nitrogen uptake transport and utilization. In, Nitrogen Fixation, W.J. Brouton (ed.), Vol. 3, Clarendon, Oxford. pp. 245-298.
- Peoples, M.B., J.S. Pate, C.A. Atkins and F.J. Bergersen. 1986. Nitrogen nutrition and xylem sap composition of peanut. *Plant Physiol.* **82**: 946-951.
- Plummer, D.T. 1978. The quantitative estimation of amino acids using the ninhydrin reaction. In, Introduction to Practical Biochemistry, McGraw-Hill, London, 144 pp.
- Reinbothe, H. and K. Mothes. 1962. Urea, ureides and guanidines in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**: 129-150.
- Rosenthal, G.A. 1970. Investigations of canavanine biochemistry in the jack bean plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **46**: 273-276.
- Rosenthal, G.A. 1971. An ontogenic study of canavanine formation in the fruit of jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **47**: 209-211.
- Rosenthal, G.A. 1972. Investigations of canavanine biochemistry in the jack bean plant, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **50**: 328-331.
- Rosenthal, G.A. 1976. Preparation and colorimetric analysis of L-canavanine. *Anal. Biochem.* **77**: 147-151.
- Rosenthal, G.A. 1977. The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Q. Rev. Biol.* **52**: 155-178.
- Rosenthal, G.A. 1982a. L-Canavanine metabolism in jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **69**: 1066-1069.
- Rosenthal, G.A. 1982b. Toxic constituents and related metabolites. In, Plant Nonprotein Amino and Imino Acids, Academic Press, London and New York, pp. 56-156.
- Rosenthal, G.A. and A.W. Naylor. 1969. Purification and general properties of argininosuccinic acid lyase from jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Biochem. J.* **112**:

415-419.

- Rosenthal, G.A. and D. Rhodes. 1984. L-canavanine transport and utilization in developing jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Plant Physiol.* **76**: 541-544.
- 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.
- Seferiadis, K.S., S. Frillingos and O. Tsolas. 1987. Amino acid analysis by PITC derivatization. Chromatogram. Sept. 2 pp.
- Shargool, P.D. 1971. Purification of argininosuccinate synthetase from cotyledons of germinating peas. *Phytochemistry* **10**: 2029-2032.
- Shargool, P.D. and E.A. Cossins. 1969. Further studies of L-arginine biosynthesis in germinating pea seeds. *Can. J. Biochem.* **47**: 467-475.
- Sprent, J.I. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some *Leguminosae*. *Plant Cell and Environment* **3**: 35-43.
- Streeter, J.G. 1979. Allantoin and allantoic acid in tissue and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.* **63**: 478-480.
- Vogels, G.D. and C. Van der Drift. 1970. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* **33**: 143-167.
- Williams, S.E. and G.E. Hunt. 1967. Canavanine distribution in jack bean fruit during fruit growth. *Planta* **77**: 192-202.
- Yu, G.H., B.O. Jun, Y.N. Hong and Y.M. Kwon. 1988. Purification and characterization of arginase from cotyledons of *Canavalia lineata*. *Korean Biochem. J.* **21**: 497-504.
- Yu, G.H., C.B. Lee and Y.M. Kwon. 1987. Comparison of inhibitory effects of phosphorylcholine, phosphoryl ethanolamine and chlorocholine on photophosphorylation of barley chloroplasts. *Korean Biochem. J.* **20**: 267-272.
- Yu, G.H. and Y.M. Kwon. 1988. Changes of phosphorylcholine metabolism in barley seedlings during greening. *Korean J. Bot.* **31**: 259-266.
- Yu, G.H. and Y.M. Kwon. 1990. Subcellular distribution of arginase in leaves of *Canavalia lineata*. *Korean J. Bot.* **33**: 73-80.

(1990. 2. 17 接受)