

해너콩 캘러스에서 pH 변화에 따른 Arginase의 활성

李 周 鏞* · 金 相 九 · 權 寧 命

(서울대학교 自然科學大學 生物學科)

Arginase Activity in Response to pH Change in *Canavalia lineata* Callus

Lee, Ju Yong, Sang-Gu Kim and Young Myung Kwon

(Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

As callus from *Canavalia lineata* L. (DC) was treated in pH 8 buffer solution for one hour, arginase activity in its cell free extracts was twice higher than in pH 6. From the cell free extracts, two forms of arginase, heavy and light, were appeared in Sephacryl S-200 gel filtration. One form of arginase (heavy form) was estimated in 380 kD and another form (light form) was 179 kD in Sephacryl S-300 column chromatography. The heavy form at pH 8 and light form at pH 6 were predominant, respectively. However, even at pH 6 the heavy form was mainly appeared by the addition of 0.5 mM Mn^{2+} in the callus floating solution. And the light form from the column was easily transformed into the heavy form in pH 8. Arginase activity of light form was increased to about same value of heavy form by the incubation with Mn^{2+} for 30 min *in vitro*, but heavy form did not showed any increasment in its catalytic activity with additional Mn^{2+} . In condition of Mn^{2+} free assay system, K_m and V_{max} was estimated in 22 mM and 1.61 $\mu\text{mole urea} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein of heavy form, and 30 mM and 0.79 $\mu\text{mole urea} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein of light form at pH 9.7.

서 론

Arginase(L-arginine amidinohydrolase, EC 3.5.3.1)는 아르기닌을 오르니틴과 요소로 가수분해하는 효소로 여러 동·식물 및 박테리아에 분포하며 아미노산 대사에서 중요한 위치를 차지한다. 특히 canavanine을 함유하는 콩과 식물에서는 arginase가 아르기닌 이외에 canavanine을 canaline과 요소로 분해(Downum *et al.*, 1983; Yu *et al.*, 1988)하고, urea를 다시 urease(EC 3.5.1.5)가 CO_2 와 NH_3 로 분해함으로써 질소원 공급에 있어서 중요한 역할을 하기도 한다(Rosenthal, 1970).

식물에서 arginase는 세포질과 미토콘드리아에 분포(Kollöffel and Dijke, 1975; Yu, 1991)하고 있으며, Mn^{2+} 을

함유하는 효소로(Hirsch-Kolb and Greenburg, 1968) Mn^{2+} 은 효소의 3, 4차 구조의 안정화(Carvajal *et al.*, 1971; Green *et al.*, 1988, 1990, 1991) 및 촉매활성의 유지(Vielle-Breitburd and Orth, 1972; Green *et al.*, 1990)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 arginase는 여러 동물과 일부 식물에서 하전과 분자량이 다양한 형태로 존재(Legaz and Vicente, 1982; Spolarics and Bond, 1988; Zamecka and Poremska, 1988)하는데, 조건에 따라 활성을 갖는 보다 작은 분자량의 것으로 분리되기도 하고(Boutin, 1982), 시료의 배양조건에 따라 각기 다른 크기의 oligomer들이 생장시기를 달리하여 나타나기도 한다(Legaz, 1991). 이러한 보고들을 바탕으로 다양한 특징을 지닌 arginase에 대한 상호간의 연관성 및 기능조절에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.

해너콩(*Canavalia lineata*)에서 arginase는 유 등(1988)에 의해서 분리정제된 바 있으며, 해너콩 잎절편을 pH 8인

본 연구는 한국과학재단 세포분화연구센터의 연구비(92-5-1, 93-5-5) 지원에 의하여 수행된 연구의 일부임.

완충용액에 한 시간 동안 처리하면 세포내 arginase의 활성이 약 두 배 정도 증가됨이 보고된 바 있다(Yu and Kwon, 1992). 따라서 본 연구에서는 pH 8에 처리하였을 때 어떤 내용으로 arginase의 활성이 증가되는지 같은 조건에서 활성의 증가가 확인된 일에서 유도한 캘러스를 재료로하여 이를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 배양조건. 해너콩(*Canavalia lineata*)의 캘러스는 황 등(1991)에 의해 확보된 세포주로 10^{-6} M의 2,4-D와 10^{-5} M의 BAP가 첨가된 Miller 배지(Kransnuk *et al.*, 1971)에서 계대배양하였으며, 계대 3주 후 실험재료로 사용하였다.

pH 6과 8 및 pH effector의 처리. 생장상태가 양호한 캘러스 2g을 pH 6과 8의 MOPS-NaOH 완충용액(25 mM, 0.45 M sorbitol)에 현탁하여 27°C에서 100 rpm으로 저어 주며 60분간 배양하였다. 또한 이때 pH effector의 효과를 보기 위하여 세포질을 산성화시키는 cyanide로는 0.1 mM의 potassium cyanide를, 그리고 알칼리화시키는 procaine(Felle, 1987)은 1 mM의 농도로 처리하였다.

Arginase의 활성측정. 캘러스를 각각의 pH에 한 시간 동안 현탁처리한 후, 완충용액 A(Tris-HCl, pH 7.7, 20 mM, 10 mM EDTA)과 종류수로 세척하였으며 감압장치를 이용하여 배양완충용액으로부터 캘러스를 얻고 냉각된 막자사발에서 동량(v/v)의 완충용액 B(Tris-HCl, pH 7.7, 100 mM, 1 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol)로 마쇄하였다. 얻어진 cell free extract를 Eppendorf tube에 넣고 15,000g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상침액을 조효소액으로 사용하였다. Arginase의 활성측정은 유 등(1988)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. 즉 Mn^{2+} 이 제거된 완충용액 C(Tris-HCl, pH 9.7, 50 mM, 1 mM DTT 포함)에 기질인 60 mM의 아르기닌을 첨가하여 30°C에서 10분간 평형화한 후, 원심분리 후 얻어진 효소액을 즉시 첨가하여 반응을 개시하였다. 반응개시 20분 후 7%(w/v) perchloric acid를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, 반응 후 생성된 요소를 Polacco(1976)의 방법으로 발색시켜 표준곡선에 대입하여 활성을 계산하였다. 요소 측정을 통한 효소의 활성측정은 사용한 시료에서는 urease의 활성이 거의 없음을 확인한 후 실시하였다. 각각 다른 조건에서 처리한 후 추출한 arginase의 활성에 대한 Mn^{2+} 의존성을 보기 위하여, pH 6과 8, 그리고 pH 6에 0.5 mM의 Mn^{2+} 를 첨가하여 위와 동일한 조건에서 현탁처리한 후 조효소액을 얻었다. 이들 조효소액에 대한 arginase 활성측정 방법은 Mn^{2+} 을 제거하고 30분간 전처리한 것, 전처리하지 않고 조효소액의

첨가로 반응을 개시한 것, 반응혼합액에 0.5 mM의 Mn^{2+} 를 첨가하고 조효소액의 첨가로 반응을 개시한 것, 그리고 Mn^{2+} 첨가 후 조효소액과 30분간 전처리한 후 각각 활성을 측정하여 비교하였다.

Gel filtration. 각기 다른 pH에 처리한 캘러스에서 arginase의 활성분포를 보기 위하여 gel filtration 크로마토그래피를 실시하였다. Arginase의 활성분포의 확인은 Sephacryl S-200 컬럼을 사용하였는데 이는 S-300 컬럼을 사용할 경우 시간에 따른 분자량이 작은 arginase의 활성 저하가 심해 시간을 단축할 수 있고 활성분포의 확인이 가능한 S-200 컬럼을 사용한 것이다. 완충용액 B로 채워진 Sephacryl S-200 컬럼(1.5×23 cm)에 조효소액을 loading한 후 한 시간에 10 mL의 속도로 동일한 완충용액으로 용출시켰다.

위의 과정에서 나온 두 peak의 분자량을 조사하기 위한 gel filtration은 S-300으로 실시하였다. Sephacryl S-200 gel filtration을 통해 나온 두 peak를 각각 Amicon PM 30 filter로 농축한 후 동일한 완충용액으로 채워진 Sephacryl S-300 gel 컬럼으로 분획하였으며 표준단백질을 이용하여 분자량을 계산하였다. 표준단백질로는 apoferritin(443 kD), β -amylase(200 kD), alcohol dehydrogenase(150 kD), bovine serum albumin(60 kD)를 사용하였다.

분자량이 작은 arginase 분획이 pH 변화에 의해 분자량이 큰 arginase로 서브유니트의 회합에 의하여 전이될 수 있는지 알아보기 위하여 pH 6 처리시 우세했던 분자량이 작은 arginase(179 kD)를 완충용액 D(Tris-HCl, pH 8, 100 mM, 1 mM β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 50 μ M $MnCl_2$, 2 M sucrose)에서 한 시간 동안 투석하며 농축하였다. 농축된 시료를 다시 Sephacryl S-200 컬럼으로 분획하였으며 분획된 효소활성의 위치를 비교 확인하였다.

Mn^{2+} 의 측정. pH 변화에 따른 Mn^{2+} 과 단백질의 결합양상을 알아보기 위하여 원자흡광 광도계(Model M-901, G.B.C. Scientific Equipment)를 사용하여 Mn^{2+} 을 검출하였다. pH 5.5~7.0의 Mes-Tris 완충용액(100 mM, 1 mM $MnCl_2$ 포함)과 pH 7.0~8.5의 Tris-HCl 완충용액(100 mM, 1 mM $MnCl_2$ 포함)에 pH 7인 완충용액 B로 추출한 조효소액(8.53 mg 단백질 포함)을 한 시간 동안 처리한 후 10% TCA를 첨가하여 침전된 단백질을 원심분리하여 얻었다. 얻어진 단백질 침전물을 황산-peroxide 방법으로 분해한 후 원자흡광 광도계로 Mn^{2+} 의 상대적인 양을 $A_{279.5}$ 에서 측정하였다(Allen *et al.*, 1986).

단백질 정량. 모든 시료의 단백질함량은 10% TCA를 첨가하여 얻은 침전물을 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였으며, 이때 소의 혈청단백질을 표준단백질로 사용하였다.

결과 및 고찰

pH 8 처리에 따른 arginase의 활성변화. 켈러스를 pH 8인 완충용액에서 배양하면서 arginase의 활성변화를 경시적으로 측정하였다(Fig. 1). 배양 20분 후부터 활성이 증가하기 시작하여 60분이 경과하면 처음보다 약 2배 정도 활성이 증가하였다. 이러한 결과는 해너콩 잎에서의 결과 (Yu and Kwon, 1992)와 일치하는 것이다. 그러나 효소의 활성증가가 일어나는 과정에서 단백질 함량의 변화는 일어나지 않으므로, pH 8 처리에 의한 arginase의 활성증가는 단백질의 양적변화(*de novo synthesis*)에 의한 것이라기 보다는 이미 존재하는 arginase의 성질변화에 기인한 결과로 해석할 수 있었다.

Arginase와 Mn^{2+} 과의 관계. pH 6과 8의 완충용액에서 각각 한 시간 처리한 켈러스로부터 조효소액을 얻고 활성측정 방법을 달리하여 효소활성과 Mn^{2+} 과의 관계를 알아보았다(Fig. 2). pH 6 처리한 켈러스로부터 추출한 arginase는 활성측정시 Mn^{2+} 을 첨가하지 않고 효소의 첨가로 반응을 개시한 것을 대조구로 하였을 때, 전처리(30분간 30°C에 방치)한 후 기질을 첨가하여 반응을 개시하면 활성이 약 70% 저하되나, 0.5 mM의 Mn^{2+} 을 첨가하면 오히려 큰 폭의 활성증가를 보인다. 이러한 결과로부터 pH 6 처리 후 추출한 arginase는 매우 불안정하며 활성도 낮게 나타나는데, 이는 Mn^{2+} 은 arginase의 안정성을 높이고(Bond et al., 1983) Mn^{2+} -free 완충용액에 있을 때 매우 불안정하다는 보고(Boutin, 1982; Wright et al., 1981)로 볼 때, 안정성 및 활성유지에 필요한 만큼의 Mn^{2+} 과 결합하지 않고 있기 때문으로 생각된다. 그러나 pH 8 처리 후 추출한 arginase는 Mn^{2+} 없이 전처리하여도 활성이 저하되지 않았으며, Mn^{2+} 을 첨가하여도 활성증가가 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 pH 8 처리시 arginase가 세포내의 Mn^{2+} 과 안정성 유지 및 활성에 충분한 정도로 이미 결합을

하고 있어 활성측정시 더 이상의 Mn^{2+} 이 필요치 않았음을 의미하는 것으로 생각된다. 또한 이 결과는 pH 6 처리시 완충용액에 0.5 mM의 Mn^{2+} 을 처리하고 배양한 후 추출한 arginase와 유사하였다. 그러나 pH 8 처리구에 비하여 pH 6 + Mn^{2+} 처리구로부터 추출한 arginase가 활성측정시 첨가해준 Mn^{2+} 에 의하여 활성증가의 폭이 약 50~100% 정도 더 크게 나타나는 사실로부터, pH 6인 조건에서는 과량의 Mn^{2+} 이 세포내로 투입되어도 Mn^{2+} 이 arginase와 결합하기 위하여는 또 다른 조건이 갖추어져야 한다는 것을 알 수 있었다. 이는 arginase는 Mn^{2+} 에 의하여 활성화되며, 이 과정은 pH에 대단히 민감하여 pH 6에서는 0.3 μ M, 그리고 pH 8에서는 0.08 μ M의 K_d 값을 갖는다는 보고(Kuhn et al., 1991)와 비교해 볼 때, 본 실험의 pH 8 처리가 세포질의 조건을 Mn^{2+} 과 arginase가 결합할 수 있는 상태로 변화시킨 결과로 해석된다.

pH에 변화에 따른 Mn^{2+} 과 조효소액의 단백질과의 결합 정도를 조사한 결과(Fig. 3A), pH가 높아질수록 단백질은 보다 많은 Mn^{2+} 을 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 이 결과로부터 arginase와 Mn^{2+} 의 결합양상이 pH 변화에 따라 달라질 수 있음을 추측할 수 있었다. 또한 조효소액을 추가적인 Mn^{2+} 의 첨가없이 단지 pH만 달리하여 30분간 처리한 후 같은 조건(완충용액 C)에서 활성을 측정한 결과(Fig. 3B), pH가 높을 때가 낮을 때에 비하여 약 50~60% 정도의 활성증가가 나타났는데 이는 조효소액내의 Mn^{2+} 이 arginase와 결합한 결과로 생각된다. Mn^{2+} 은 세포내에서도

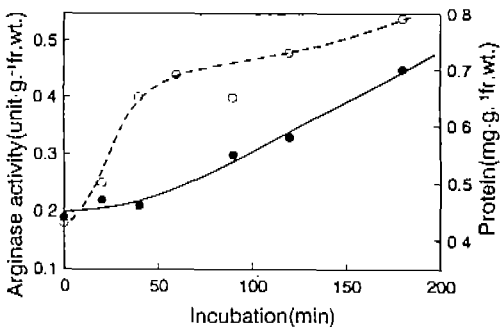


Fig. 1. Changes of arginase activity and protein content during incubation in pH 8 buffer. ○-○, arginase activity; ●-●, protein.

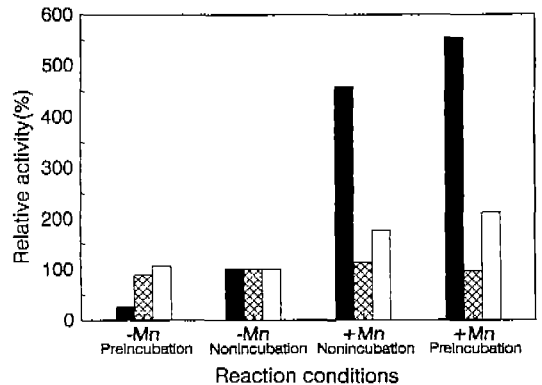


Fig. 2. The effect of Mn^{2+} on the arginase activity. Incubation and reaction condition of each assay was described in "Materials and Methods". Preincubation meant that reaction was started by addition of substrate since then crude extract was incubated in reaction mixture for 30 min. Nonincubation meant that reaction was started directly by addition of crude extract into the reaction mixture containing substrate. ■, pH 6; ▨, pH 8; □, pH 6 plus Mn^{2+} .

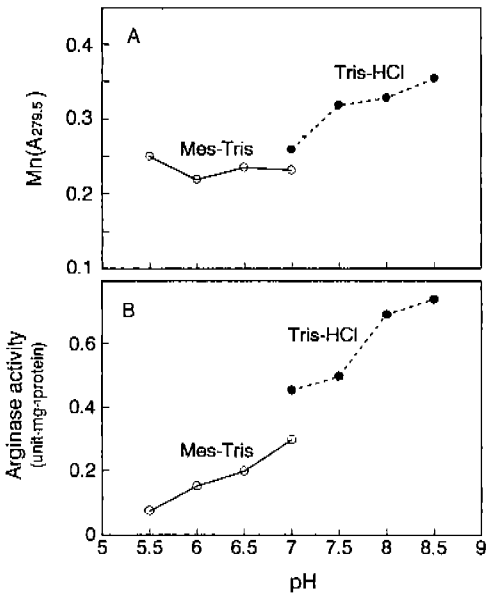


Fig. 3. Mn-protein binding versus various pH (A), and change of arginase activity after incubation in those pH (B). Incubation and reaction condition of each assay was described in "Materials and Methods".

arginase의 활성조절에 대단히 중요한 역할을 할 것으로 생각되는데, 쥐간의 arginase는 pH 변화에 대단히 민감하여 생리적 pH 범위내에서도 Mn²⁺에 의해 9배의 활성증가를 일으킬 수 있으며(Kuhn *et al.*, 1991), streptozotocin을 주사한 토끼간의 arginase는 큰 폭의 활성증가가 나타나는데 이는 세포질에서 free-Mn²⁺이 arginase와 결합한 결과라고 하였다(Bond *et al.*, 1983). 이러한 결과들과 본 실험의 결과로부터 *in vivo*에서도 Mn²⁺의 결합이 arginase의 활성증가를 일으킬 수 있으며 arginase-Mn²⁺의 결합은 pH 변화에 의해 야기될 수 있음을 예상할 수 있었다.

pH effector의 효과. pH가 다른 완충용액에서 캘러스의 pH가 어떻게 변하는지를 측정하지는 못하였으나 세포질의 pH를 변화시킬 수 있는 effector를 사용하여, 그 결과로부터 pH 8 처리가 세포질의 pH를 상승시킬 수 있다는 것을 간접적으로 증명하고자 하였다. Effector로는 procaine과 cyanide를 사용하였는데, procaine은 *Sinapis alba*의 뿌리털세포의 세포질을 알칼리화시켰으며 cyanide는 산성화를 일으켰다는 보고가 있다(Felle, 1987). 사용한 두 effector는 모두 arginase의 활성에 영향을 주지 않음을 *in vitro*에서 확인한 후 실험에 사용하였다. 그 결과(Table 1) pH 6에 effector를 처리하지 않은 것을 대조구로 하였을 때, procaine 처리로 2.2배의 활성증가가 나타나 pH 8 처리시의 1.8배 보다 오히려 높게 나타났으며, pH 8에 1 mM procaine을 첨가하였을 때의 2.7배 보다는 적게 나타났다.

Table 1. Effects of external cyanide and procaine on arginase activity in callus of *Canavalia lineata*

Chemicals	Relative activity			
	pH 6		pH 8	
	none	added	none	added
Cyanide, 0.1 mM	100	78	207	107
Procaine, 1.0 mM	100	223	181	265

이는 pH 8 처리가 1 mM의 procaine 처리보다는 낮으나 세포질의 pH를 높인 결과이고, pH 8에 procaine을 처리했을 때에는 보다 더 세포질이 알칼리화된 결과로 해석된다. 또한 procaine을 pH 6보다 pH 8에 처리하였을 때 효과가 크게 나타난 것은 pH 8에 의한 직접적인 효과와 더불어 pH가 높을 때가 낮을 때 보다도 procaine에 의한 세포질을 알칼리화시키는 효과가 크게 나타났기 때문으로 보인다(Felle, 1987). 즉 앞의 결과(Fig. 2)와 비교해 볼 때, 세포질이 알칼리화할수록 충분한 Mn²⁺과 결합할 수 있는 조건이 되어 보다 많은 arginase가 활성화 될 수 있었고, 그로 인하여 arginase의 활성이 크게 증가된 것으로 생각된다. Cyanide의 경우 pH 8일 때 0.1 mM의 KCN을 처리하면 대조구와 비슷한 활성을 보였으며 대조구에 cyanide를 처리하였을 때에는 오히려 22%의 활성저하가 나타났다. 이는 cyanide가 pH 8 처리에 의해 증가한 세포질의 pH를 저하시켜 arginase의 활성증가에 영향을 미치지 못한 결과이고, pH 6에 처리했을 때 활성이 저하된 것은 Mn²⁺과 결합해 있던 arginase가 세포질이 산성화됨으로 인하여 Mn²⁺을 잃고 활성이 저하된 결과로 해석된다.

이러한 결과들로부터 pH 8 처리는 세포질의 pH를 높일 수 있고, 세포질의 알칼리화는 arginase와 Mn²⁺을 결합시켜 촉매활성을 촉진시키게 되며 그로 인하여 전체적인 활성이 증가된 것으로 해석된다.

pH에서 따른 arginase의 활성비교. pH 6 또는 8을 처리한 각 캘러스로부터 추출한 조효소액을 Sephacryl S-200 gel filtration하였는데 세포질과 미토콘드리아에 분포(Kollöfell and Dijke, 1975; Yu, 1991)하는 arginase의 구분없이 전체 arginase가 혼합된 상태로 실시하였다. 그 결과(Fig. 4) 각각 두 개의 peak가 나타났는데 pH 6 시료의 경우(Fig. 4A), 분자량이 작은 쪽이 우세하였으나 pH 8 시료의 경우(Fig. 4B), 오히려 분자량이 큰 쪽에서 우세한 활성을 보였다. 두 peak의 분자량을 Sephacryl S-300 gel filtration 크로마토그래피로 조사한 결과(Fig. 5) 각각 380 kD와 179 kD로 나타났다. 또한 이러한 두 peak 사이의 상대적인 활성비율의 차이가 pH 변화에 의해 일어날 수 있는지 알아본 결과(Fig. 6), 179 kD의 arginase는 알칼리 pH에서 380 kD의 arginase로 전이될 수 있음을 알 수 있었다. 따라서

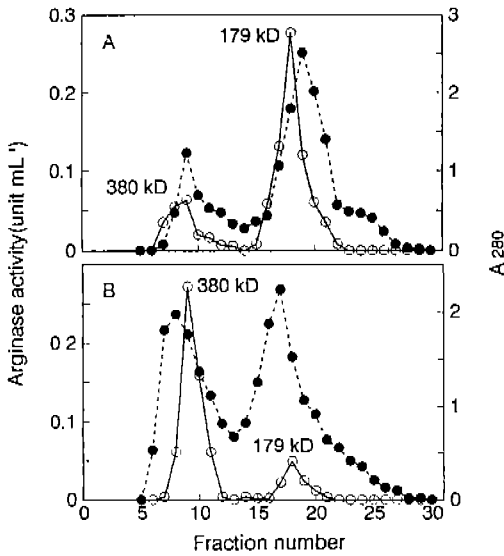


Fig. 4. Elution profile of arginase activity on Sephacryl S-200 gel filtration chromatography. The crude extract was extracted from callus incubated in pH 6 (A) and pH 8 (B) buffer as described in "Materials and Methods". ○-○, arginase activity; ●-●, protein.

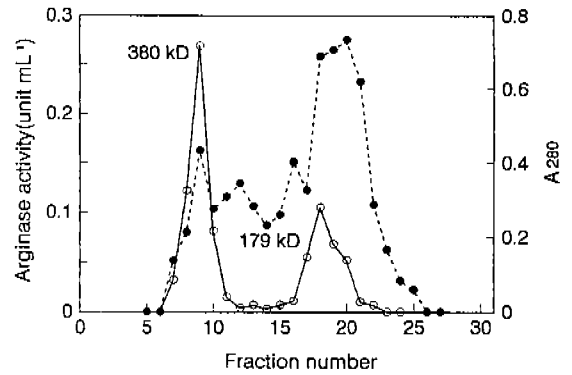


Fig. 6. Sephacryl S-200 gel filtration chromatography of 179 kD arginase after treatment of pH 8. The treatment of pH 8 was carried out as described in "Materials and Methods". ○-○, arginase activity; ●-●, protein.

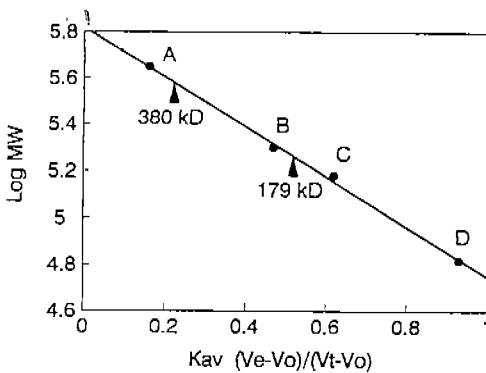


Fig. 5. Molecular weight determination of two forms of arginase on Sephacryl S-300 gel filtration chromatography. A, apoferritin (443 kD); B, β -amylase (200 kD); C, alcohol dehydrogenase (150 kD); D, BSA (660 kD).

유 등(1988)이 자엽으로부터 분리한 arginase의 분자량이 180 kD인 것과 비교해 보면 해너콩 세포(자엽)의 arginase는 정상조건일 때 주로 작은 분자량의 상태로 존재하고 있을 것으로 해석된다. 또한 pH 변화에 따른 이러한 분자량의 변동은 위의 결과와 비교해 볼 때 arginase와 Mn^{2+} 과의 결합여부에 의해 야기된 결과로 추측할 수 있었다. 지금까지 보고된 대부분의 arginase는 Mn^{2+} 의존성인데 Mn^{2+} 은 arginase를 활성화시키고 분해활성을 유지시켜 줄

뿐만 아니라(Garganto and Bond, 1986; Green *et al.*, 1990; Vielle-Breitburd and Orth, 1972) 효소단백질의 3, 4차 구조유지에 매우 중요하다(Carvajal *et al.*, 1971; Green *et al.*, 1988, 1990, 1991). Yeast의 arginase는 EDTA를 처리했을 때 삼량체가 단량체로 바뀔 수 있고(Green *et al.*, 1990), 붓꽃 구근의 arginase는 전기영동시 전기장하에서 Mn^{2+} 을 잃어버려 보다 작은 크기의 oligomer로 되는데(Boutin, 1982), 이들 두 경우 모두 분리된 후에도 약한 활성을 갖고 있으며 Mn^{2+} 에 의하여 다시 native arginase로 바뀔 수 있다고 하였다. 이렇게 arginase는 Mn^{2+} 의 존재 여부에 따라 그 구조를 달리할 수 있다. 이러한 구조의 변화는 pH에 의해서도 비슷하게 나타날 수 있는데, *Evernia prunastri*의 경우 pH 변화에 따라 상호전환이 가능한 330 kD와 180 kD의 두 형이 존재하며(Martin-Falquina and Legaz, 1984), 동물의 간(Vielle-Breitbund and Orth, 1972; Hosoyama, 1972)에서도 서브유니트의 분리(dissociation) 및 회합(association)이 pH와 Mn^{2+} 에 의해 일어날 수 있다고 보고된 바 있다. 이와 같은 성질을 갖는 또 다른 효소에는, 대두의 α -galactosidase의 경우로 pH의 변화에 따라 서브유니트의 회합이 일어나 분자량이 증가하여 열에 대한 안정성과 기질특이성이 변하게 되며(Porter *et al.*, 1992), 인간의 insulin receptor는 알칼리 pH에서 Mn/Mg ATP의 존재시 구조적 변화에 의해 비활성형이 활성형으로 변한다고 하였다(Wilden *et al.*, 1989). 따라서 본 실험에서의 이러한 arginase의 분자량 변동은 pH 변화와 그로 인한 Mn^{2+} 의 결합여부에 의한 서브유니트의 회합의 정도의 변화 때문에 나타나는 현상으로 해석된다.

한편 arginase 서브유니트의 회합의 정도에 따라 촉매 활성이 변할 수 있는지 알아보기 위하여 두 형태의 arginase에 대하여 아르기닌을 기질로하여 K_m 과 V_{max} 를 조사

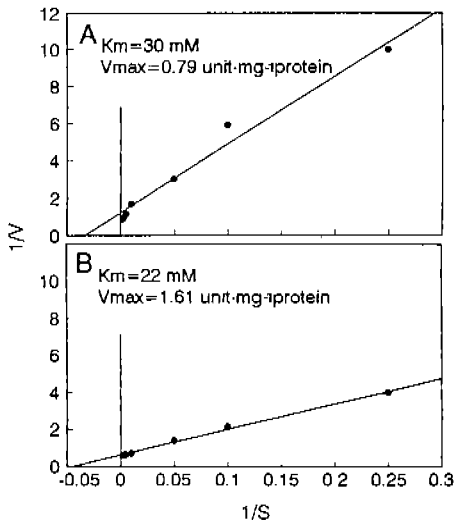


Fig. 7. Lineweaver-Burk plots of two forms of arginase. Reaction condition of each assay was described in "Materials and Methods". A, 179 kD; B, 380 kD.

하였다(Fig. 7). 그 결과 K_m 은 179 kD형(Fig. 7A)에서는 30 mM, 380 kD형(Fig. 7B)에서는 22 mM로 산출되었고, V_{max} 도 각각 $0.79 \text{ unit} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$ 과 $1.61 \text{ unit} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$ 으로 산출되어, 세포내에서 380 kD형의 arginase가 우세하게 존재하는 조건, 즉 Mn^{2+} 과 결합할 수 있는 알칼리 pH일 때 arginase의 활성이 크게 증가할 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 보고들과 본 연구의 결과를 종합해 볼 때, arginase는 구조적으로 여러 형태로 존재할 수 있는데, 이는 pH 변화나 chelating agent에 의해 유도될 수 있다. 그러나 이러한 모든 구조적 변화는 Mn^{2+} 과 같은 금속이온에 의해 유도되어지는 것임을 알 수 있다. 또한 Mn^{2+} 이 arginase의 구조형성에 영향을 미치는 데에는 pH가 대단히 민감하게 작용하게 되며, 그 결과로 arginase의 활성을 크게 높일 수 있게 된다. 본 연구의 결과에서도 이와 유사한 결과가 얻어졌는데, pH 8은 세포질을 알칼리화시켜 arginase가 Mn^{2+} 과 결합할 수 있는 유리한 환경을 제공하게 되고 그 결과 구조적인 변화, 즉 서브유니트의 회합이 일어나 활성이 크게 증가된 것으로 해석된다. 그러나 이러한 pH의 변화가 미토콘드리아의 arginase에도 영향을 줄 수 있는지는 본 연구로는 알 수 없었으며, arginase의 이러한 구조 및 활성변화가 해너콩 세포에서 액포에 축적된 canavanine을 질소원으로 이용할 때 어떻게 기여하는지 알기 위하여는 보다 상세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

적 요

해너콩(*Canavalia lineata* L. DC) 잎에서 유도한 캘러스를 pH 8인 완충용액에 한 시간 동안 처리하면 pH 6에서 보다 arginase의 활성이 약 두 배로 증가했다. 캘러스에서 얻은 arginase의 조효소액을 Sephacryl S-200 컬럼에서 분획하면 분자량이 각각 380 kD과 179 kD으로 나타났는데 분자량이 큰 arginase의 분획은 pH 8 처리구에서, 그리고 분자량이 작은 arginase의 분획은 pH 6 처리구에서 각각 상대적으로 많이 나타났다. 그리고 pH 6에 0.5 mM Mn^{2+} 를 첨가하였을 때도 380 kD arginase의 분획이 크게 나타났으며, pH 6 처리에서 얻은 179 kD arginase 분획에 pH 8 처리를 하면 380 kD 분획으로 쉽게 전이될 수 있었다. pH 6 처리 후 추출한 arginase는 Mn^{2+} 의 첨가로 활성이 크게 증가하여 pH 8 처리 후 추출한 arginase와 비슷한 활성을 보이나, pH 8 처리 후 추출한 arginase는 Mn^{2+} 의 첨가로 더 이상의 활성증가를 보이지 않았다. Mn^{2+} 이 없는 조건에서 두 arginase의 K_m 값과 V_{max} 를 조사한 결과, 380 kD arginase는 22 mM과 $1.61 \mu\text{mole urea} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$, 그리고 179 kD arginase는 30 mM과 $0.79 \mu\text{mole urea} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{protein}$ 으로 추정되었다.

사 사

본 연구의 실험 중 원자흡광도계의 사용에 많은 도움을 준 유영환, 이훈복씨께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Allen, S.E., H.M. Grimshaw and A.P. Rowland. 1986. Chemical analysis. In, Method in Plant Ecology, P.D. Moore and S.D. Chapman (ed.). 2nd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh. pp. 298-304.
- Bond, J.S., M.L. Failla and D.F. Unger. 1983. Elevated manganese concentration and arginase activity in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biol. Chem.* **258**: 8004-8009.
- Boutin, J.P. 1982. Purification, properties and subunit structure of arginase from iris bulbs. *Eur. J. Biochem.* **127**: 237-243.
- Carvajal, N., A. Venegas, G. Oeistreich and M. Plaza. 1971. Effect of manganese on the quaternary structure of human liver arginase. *Biochem. Biophys. Acta.* **250**: 437-442.
- 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.). *Plant Physiol.* **73**: 965-968.
- Felle, H. 1987. Proton transport and pH control in *Sinapis*

- alba* root hairs: a study carried out with double barrelled pH micro-electrodes. *J. Exp. Bot.* **38**: 340-354.
- Garganta, C.L. and J.S. Bond. 1986. Assay and kinetics of arginase. *Anal. Biochem.* **154**: 388-394.
- Green, S.M., A. Ginsburg, M.S. Lewis and P. Hensley. 1991. Roles of metal ions in the maintenance of the tertiary and quaternary structure of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 21474-21481.
- Green, S.M., E. Eisenstein, P. McPhie and P. Hensley. 1990. The purification and characterization of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**: 1601-1607.
- Green, S.M., J.R., Knutson and P. Hensley. 1988. Time-reversed and steady-state fluorescence monitor unfolding of trimeric arginase. *J. Cell Biol.* **107**: 200a(abstr).
- Hirsch-Kolb, H. and D.M. Greenberg. 1968. Molecular characteristics of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.* **243**: 6123-6129.
- Hosoyama, Y. 1972. The reversible inactivation of rat-liver arginase at low pH. *Eur. J. Biochem.* **27**: 48-52.
- Hwang, I.D., S.C. Koh and Y.M. Kwon. 1991. Induction and free amino acid analysis of callus from *Canavalia lineata*. *Korean J. Bot.* **34**: 223-228.
- Kollöffel, 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.
- Krasnuk, M., F.J. Witham and J.R. Tegley. 1971. Cytokinins extracted from pintobean fruit. *Plant Physiol.* **48**: 320-324.
- Kuhn, N.J., J. Talbot and S. Ward. 1991. pH-sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 217-221.
- Legaz, M.E. 1991. Regulation of different arginase forms in *Evernia prunastri* thallus. *Symbiosis* **11**: 263-277.
- Legaz, M.E. and C. Vicente. 1982. Two forms of arginase in *Evernia prunastri* thallus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**: 1441-1446.
- Lowry, O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Martin-Falquina, A. and M.E. Legaz. 1984. Purification and properties of the constitutive arginase of *Evernia prunastri*. *Plant Physiol.* **76**: 1065-1069.
- Polacco, J.C. 1976. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. *Plant Physiol.* **58**: 350-356.
- Porter, J. E., A. Sarikaya, K.M. Hermann and M.R. Ladisch. 1992. Effect of pH on subunit association and heat protection of soybean α -galactosidase. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 609-613.
- Rosenthal, G.A. 1970. Investigation of canavanine biochemistry in jack bean, *Canavalia ensiformis*. *Plant Physiol.* **46**: 273-276.
- Spolarics, Z. and J.S. Bond. 1988. Multiple molecular forms of mouse liver arginase. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 469-479.
- Vielle-Breitburd, F. and G. Orth. 1972. Rabbit liver arginase. *J. Biol. Chem.* **247**: 1227-1235.
- Wilden, P.A., B.D. Morrison and J.E. Pessin. 1989. Relationship between insulin receptor subunit association and protein kinase activation: insulin-dependent covalent and Mn/Mg ATP-dependent noncovalent association of $\alpha\beta$ heterodimeric insulin receptor into an $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameric state. *Biochemistry* **28**: 785-792.
- Wright, L.C., C.J. Brady and R.W. Hinde. 1981. Purification of properties of the arginase from jerusalem artichoke tubers. *Phytochemistry* **20**: 2641-2645.
- Yu, G.H. and Y.M. Kwon. 1992. Alteration of arginase activity in leaf protoplasts of *Canavalia lineata*. *Korean Biochem. J.* **25**: 196-202.
- 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. 1991. Characterization of arginase and subcellular distribution of canavanine in *Canavalia lineata*. Ph. D. Thesis, pp. 57-70, Seoul National University, Seoul.
- Zamecka, E. and Z. Poremska. 1988. Five forms of arginase in human tissue. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **39**: 258-266.