

뽕나무 종자 발아시의 Protease 발현기구

裴 啓 宣

東亞大學校 農科大學

Activation Mechanism of Protease in the Germination of Mulberry Seeds

Kae Sun Bae

College of Agriculture, Dong-A University

Abstract

The activity change of mulberry seeds protease was compared during germination for 5 days at 28°C in the dark place after daily hormone injection of different concentration.

The protease from germinated mulberry seeds for 4 days was partially purified and the enzyme characteristics was investigated. The protease activity of mulberry seeds treated by hormone was highest with 10 μ M GA₃ followed by 10 μ M zeatin and 10 μ M kinetin. The protease activity of mulberry seeds was increased by 14% with 10 ml agar culture than control at 4th day of germination. The protease from mulberry seeds was purified 313 fold by DEAE-Toyopearl 650 M, Butyl-Toyopearl, Hydrozylapatite and Toyopearl HW 55 M. After purification, the specific activity of the enzyme was 175 units/mg. Optimum pH and temperature of protease from mulberry seeds was 5.0 and 37°C, respectively. The protease was stable below 37°C and the enzyme activity was decreased by 50%, when incubated at 52°C for 10 minutes. The protease activity of mulberry seeds was inhibited by metal ions such as mercury, iron, zinc, copper, but activated by magnesium, chromium, aluminium ions.

The Km value of the protease was 0.89 mM with azocasein as a substrate.

Key words: Mulberry seed, protease.

序 論

種자의 發芽過程에 있어서 저장물질의 加水分解酵素는 필수적인 존재로서 그 발현기구에 관해서는 많은 연구가 진행되고 있다.

저장물질 분해의 메카니즘에 관해서는 대맥(Cripspeels and Varner, 1967), 소맥(Collins *et al.*, 1972), 벼(Ogawa *et al.*, 1966) 등의 많은 저장종자에 관해서 胚가 가수분해효소 발현을 조절하고 있다고 보고했으며 배로부터 방출된 gibberellic acid(GA₃)가 전분층 세포에 의해 mRNA의 합성을 유발하고 이 mRNA가 가수분해효소인 amylase와 protease의 합성에 관여한다고 했다(Holley, R. *et al.*, 1986).

鄭(1983) 등은 rRNA양은 GA₃를 처리한 후 48시

간에 많은 증가를 보였으나 발아 12~72시간에는 거의 변화가 없었으며 tRNA양은 GA₃ 처리후 12시간 때에는 변화가 없었고 발아 24~72시간까지 양의 증가를 보였다고 했다.

Yomo(1975) 등은 식물생장 hormone이 종자내에서 합성되며 발아하는 동안 내배유로 분비된다고 했다. GA₃와 cytokinin을 동시에 처리하면 amylase 활성이 증가된다고 했다(Locker, 1977).

국내에서는 Lee(1976) 등은 밀, 상치, 토마토 등에 decursin과 cecursionol의 처리가 발아종자의 amylase 활성이 低下되었다는 보고와 Kwon(1974) 등은 당근종자에 acetone의 처리가 α -amylase, β -amylase 및 protease의 활성이 control보다 높았다고 보고했다. 그러나 桑實의 발아종자에 대한 protease의 발현 me-

chanism은 연구보도된 바 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 뽕나무종자를 사용하여 저장물질의 加水分解효소인 protease의 活性發現기구와 hormone과 효소활성조절의 메카니즘을 구명하고 아울러 그 protease 특성을 조사하여 뽕나무 종자의 발아력向上을 위한 기작을 밝히는 기초 자료로 활용코저 실시하였다.

材料 및 方法

1. 시료

실험재료인 뽕나무 종자(*Morus Lhou Koidz*)는 0.5% sodium chloride 용액으로 소독하고 깨끗이 씻은 후 자연건조시켜 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다.

2. 培養方法

1) 種子를 25°C에서 4시간 동안 自然水에 침지시킨 후 5g씩 직경이 12cm인 petridish에 여과지를 깔고 그 위에 심는다. 培地는 멸균기에서 15분간 소독하고 cooking foil로 싸서 항온기에 넣어 발아시켰다.

2) 培養의 條件

3종류의 배지조건을 설정한다.

폭 12cm petridish에 10ml의 증류수와 5g의 種子를 넣은 control구와 10ml 한천(0.8%) 용액을 넣은 구와 20ml에 0.8% 한천용액을 넣은 용기에 5g의 種子를 넣어 각각 3반복으로 하여 뚜껑을 덮고 28°C의 暗條件下에서 5日間 incubation시켰다.

3. Hormone 處理

Protease와 hormone과의 關係를 조사하기 위하여 hormone의 種類別, 濃度別, 混合別, control과 比較調査하였다.

1) Hormone 單獨處理와 混合處理

植物 hormone인 GA_3 , kinetin, benzyladenine, zeatin을 각각 10^{-4} ~ 10^{-7} M을 처리하여 매일 같은 시간, 같은 양을 분주하여 control과 比較하였다. 그리고 hormone 單獨처리에서 가장 효과가 좋았던 濃度를 택하여 混合處理한 후 효소 活性이 가장 높은 조합을 찾아냈다.

4. 종자발아 및 효소추출

종자 발아는 28°C incubator에서 4일간 발아시킨 것을 종자 1g에 citrate phosphate buffer(pH 5.0) 7ml를 첨가하여 마쇄한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다.

5. Protease 활성의 측정 및 단백질정량

효소 1ml에 0.1M citrate phosphate buffer(pH 5.0) 1ml, 2% azocasein 0.5ml를 가한 다음 37°C에서 3시간 반응시킨다. 반응후 20% TCA 1ml를 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 여과시켜 닌히드린 법(Menin and Cocking, 1955)을 써서 유리시킨 아미노산을 비색정량하여 440nm에서 효소활성을 측정하였다.

단백질량의 측정은 Lowry(1951) 등의 方法에 따라 정량하였으며 효소정제 과정중의 단백질량은 흡광도 280nm에서 측정하여 정량하였다.

6. Protease 정제

조효소액을 먼저 유안염석(30~80%)을 행하여 조효소액을 침전시킨다. 이것을 투석하여 유안을 제거시킨 후 농축한 조효소액을 DEAE-Toyopearl 650 M로 gel 여과를 행하여 조효소액을 분리시키고 효소활성부분을 pool하여 Butyle-Toyopearl과 Hydroxylapatite로 조효소액을 분리시키고 효소활성 분해를 수집하여 Toyopearl HW-55 M colum chromatography법을 이용하여 조효소액을 정제하였다.

結果 및 考察

1. 培養條件에 대한 Protease 活性

Petridish에 증류수 10ml구와 10ml의 한천배지, 20ml 한천배지의 날짜별 protease 活性을 보면(Fig.

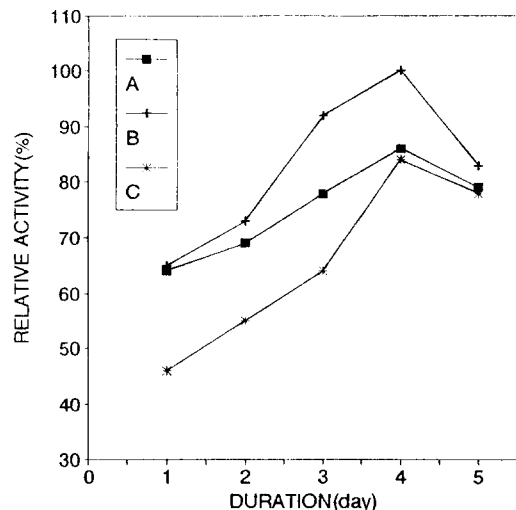


Fig. 1. Changes in protease activity in mulberry seeds following germination.

A: 10 ml distilled water, B: 10 ml agar bath, C: 20 ml agar bath.

1) 3구 공히 4일째까지 증가하다가 5일째 때부터 감소했다. 대조구에 비해 한천배지 10 ml/ 한천배지구가 4일째 14% 활성이 높았으나 20 ml/ 한천배지구는 평균 25% 감소되었는데 이는 한천이 저장물질대사에 어느정도 영향을 미친 것으로 사료되나 20 ml/ 배지는 용량이 너무 많아 종자의 산소공급이 불충분하여 배와 배측의 발생에 지장을 준 것으로 사료된다.

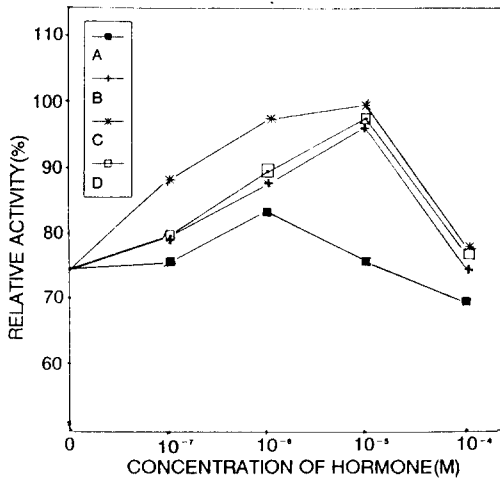


Fig. 2. Effect of hormones on protease activity in mulberry seeds.

A: benzyladenine, B: zeatin, C: gibberellin, D: Kinetin, O: control

Table 1. Effect of gibberellic acid, zeatin and kinetin on protease activity in mulberry seeds.

Growth substances	Protease activity(unit/mg)
NONE	1.21 ± 0.04
GA(10μM)	1.25 ± 0.03
K(10μM)	1.22 ± 0.04
Z(10μM)	1.24 ± 0.03
GA(10μM)+(10μM)	1.32 ± 0.04
GA(10μM)+(10μM)	1.29 ± 0.03
K(10μZ)+(10μM)	1.27 ± 0.04

*GA: gibberellic acid. K: Kinetin. Z: Zeatin.

Table 2. Summary of purification procedure.

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	1380	10450	5855	0.56	100	1.0
DEAE-Toyopearl	50	225	4600	20	78	35.7
Butyle-Toyopearl	32	25	1340	54	23	96.4
Hydroxylapatite	27	8.0	710	88	12	15.7
Toyopearl HW-55M	23	2.0	350	175	6	313

2. Hormone 처리구의 효소활성

각 호르몬 농도별 및 효소의 활성을 측정한 결과 benzyladenine을 제외하고는 control보다 평균치간에 높은 수치를 나타내었다.

처리구들중 hormone 농도가 10⁻⁵M에서 GA₃, zeatin 및 kinetin이 최고치를 나타내었고, benzyladenine은 10⁻⁶M에서 최고치를 나타내었는데 이는 Varner (1983) 등이 GA₃와 zeatin이 單子葉植物과 雙子葉植物에 있어서 休眠種子의 發芽와 生長을 促進한다는 보고와 林(1977)이 hop에 GA₃ 10~20 ppm 처리에서 약 20% 수량이 증가되었다는 보고와 유사하게 나타났다.

Hormone 단독처리에서 효소활동이 가장 높았던 농도를 서로 혼합하여 처리한 결과는 Table 1과 같다.

Control에 비해 GA₃ 및 zeatin 10⁻⁵M에서 높았으며 混合區에서는 hormone 單獨處理區보다 높은 수치를 나타내었는데 이는 Locker(1975) 등이 완두 종자 발아시에는 GA₃ 혼합처리구에서 다른 처리구들보다 가장 높았으며 zeatin은 10⁻⁵M에서 높게 나타났다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다.

3. 효소의 정제

뽕나무 종자를 4일째 효소활성이 가장 높은 시기에 조효소를 추출하여 먼저 유안염석(30~80%)을 행하여 효소액을 침전시킨다. 이것을 투석하여 유안을 제거시킨 후 농축 효소액을 DEAE-toyopearl 650 M column에 여과를 행하여 효소액을 분리시킨 효소활성 분획을 수집하여 이 중 32 ml를 Butyl-toyopearl 650 M에 걸어 효소활성분획을 취한다. 그 중 27 ml를 hydroxylapatite와 toyopearl HW55 M에 다시 걸어 효소활성 분획(23 ml)을 얻었다(Table 2).

이 정제액으로 효소활성의 특성을 조사하였다.

4. 作用最適 pH

효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 기질용액의 pH를 3~7까지 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 3, 4와 같다. 본 효소의 최적 pH는 5.0 부근으로 산성측에서

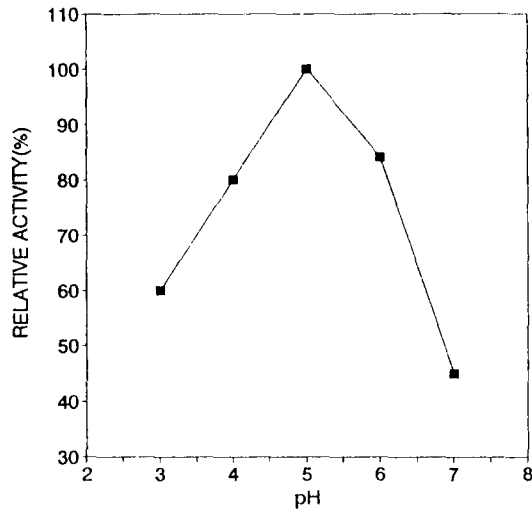


Fig. 3. Effect of pH on activity of protease in mulberry seeds.

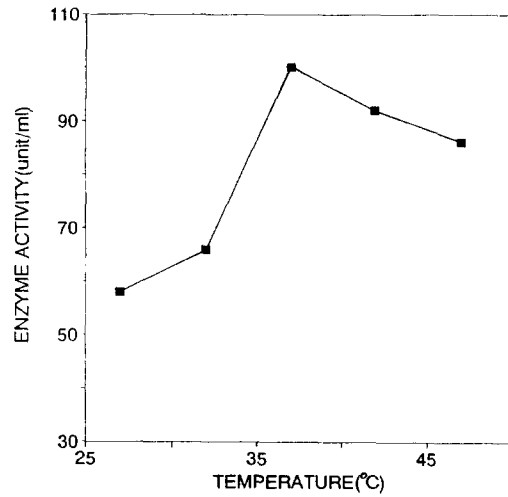


Fig. 5. Effect of temperature on activity of protease in mulberry seeds.

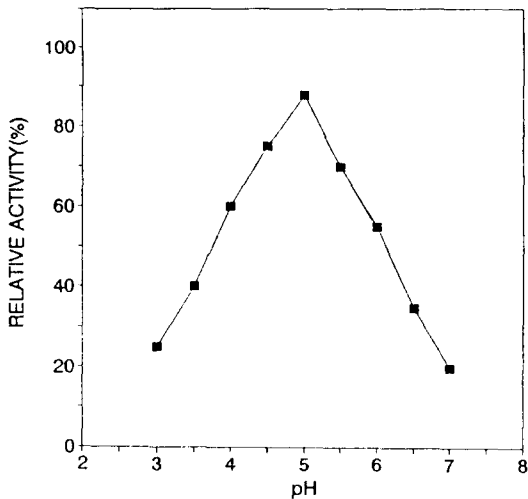


Fig. 4. Effect of pH on stability of protease in mulberry seeds.

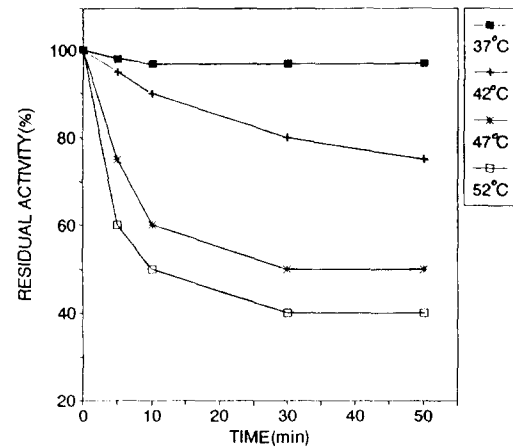


Fig. 6. Effect of incubation temperature on stability of protease in mulberry seeds.

높은 활성을 보였고 pH 4 이하와 pH 6.0 이상에서는 20% 이상 감소하였다.

이와 같은 사실은 Yamaoka(1990) 등이 녹두에서 pH 5.5에서 최고치를 나타내었다는 보고와 비슷한 경향이였다.

5. 作用適用 溫度 및 熱安定性

효소활성에 미치는 溫度的 영향을 觀察하기 위하여 27°C ~ 47°C 까지 5°C 간격으로 효소활성을 測定하였다. 그 결과 Fig.5와 같이 최적온도는 37°C 부근이

였다. 이는 Yamaoka(1990)의 완두에서와 金 등(1984)이 보고한 최적온도가 각각 37°C와 40°C인 것과 비슷한 경향을 보여주었다.

이 효소의 열에 대한 安定性을 관찰하기 위하여 27°C에서 47°C까지 10, 30, 50분간 처리하였다가 급냉시켜 그 잔존활성을 측정 한 결과는 Fig.6과 같다.

본 효소는 37°C에서 50분간 열처리로 거의 변화가 없었으나 42°C에서는 50분간 열처리로 약 22% 정도 감소하였다. 52°C에서는 10분 처리에 약 50% 정도 급격한 감소를 보였다.

이는 40°C에서 60분간 열처리로 거의 변화가 없

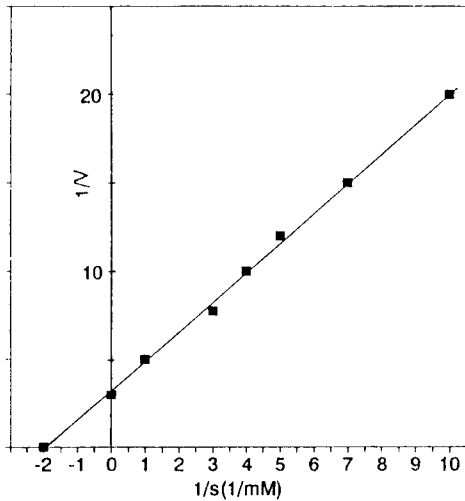


Fig. 7. Lineweaver-Burk plot of protease with azocasein as a substrate.

Table 3. Effect of metal ions activity of protease from mulberry seeds.

Metal ions(10 mM)	Relative activity(%)
Control	100.0
EDTA	73.0
MgCl ₂	107.0
HgCl ₂	33.0
CrCl ₂	225.0
BaCl ₂	125.0
ZnCl ₂	100.0
CuCl ₂	32.0
CaCl ₂	89.0
AlCl ₃	164.0
NiCl ₂	104.0
FeCl ₃	18.0

었다는 金(1984) 등의 보고와 유사하였다.

6. Michaelis 상수 측정

Lineweaver-Burk법으로 plots하여 azocasein에 대한 Km값을 측정한 결과 0.89 mM이었다(Fig. 7). Kim (1992) 등이 정제한 Halmonas sp. Esio의 protease는 Km값이 7.4 mg이었다고 하였다.

7. 금속이온의 영향

금속이온의 본 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 몇가지 금속염을 사용하여 조사하였다. 금속이온의 농도가 효소반응액의 10 mM이 되도록

각각 조절하고 효소활성도를 측정한 결과 Table. 3과 같다.

MgCl₂, CrCl₂, BaCl₂, AlCl₃는 효소활성을 촉진시킨 반면 HgCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, CuCl₂는 활성을 억제하였다.

이는 Yamaoka(1990)의 HgCl₂와 金(1984)이 ZnCl₂, CuCl₂, HgCl₂, FeCl₃가 효소활성이 저해되었다는 보고와 一致하였다. 그리고 EDTA도 金(1984)의 보고와 비슷하게 억제되었다.

摘 要

뽕나무종자(Morus Lhou Koidz)를 28°C의 암소에서 5일간 발아시키면서 매일 hormone을 농도별로 처리한 후 protease 활성의 변화를 각각 비교하였다. 또 효소활성이 가장 높았던 4일째 시료로부터 protease를 추출하여 부분정제하고 그 효소의 특성을 조사하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. Hormone 처리구의 發芽種子는 酵素活性이 GA₃가 가장 높았고 그 다음이 zeatin과 kinetin이었으며 hormone 混合區는 GA₃ 10 μM에 zeatin 10 μM과 kinetin 10 μM을 혼합한 구가 가장 活性이 높았다.

2. 효소活性은 10 ml/ 주입한 한천배지구가 대조구보다 4일째 약 14% 증가하였다.

3. 뽕나무씨앗으로부터 추출한 protease는 DEAE-Toyopearl 650 M, Butyl-Toyopearl, Hydrozyl apetite 및 Toyopearl HW55 M 方法으로 조효소의 313배로 정제하였다. 정제한 후 효소의 비활성이 175 unit/mg였다.

4. 효소반응이 최적 pH는 5.0, 최적온도는 37°C였다. 효소는 37°C 이하에서는 안정하였으나 52°C에서는 10분간 처리로 약 50% 감소하였다.

5. 효소活性을 수은, 철, 아연 및 구리 이온에 의하여 活性이 抑制된 반면 Mg, Cr 및 Al은 촉진되었다. 또한 효소활성은 azocasein을 기질로 했을 때 Km값은 0.89 mM이었다.

사 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 1990년도 지방대육성 학술 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

引 用 文 獻

Chrispeels, M. J and J. E Varner(1967) Gibberellic acid-enhanced Synthesis and release of amylase and

- ribonuclease by isolated barley aleurone layers, *Plant Physiol.* **42**: 398-406.
- Chrispeels, M. J and J. E. Varner**(1967) Hormonal control of enzyme synthesis, on the mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley, *Plant Physiol* **7**: 1008-1016.
- Collins et al.**(1972) The metabolism of soluble nucleotides in wheat aleurone layers treated with gibberellic acid, *Plant Physiol* **49**: 404-410.
- Palmiano and Juliano**(1972) Biochemical changes in the rice grain during germination, *Plant Physiol.* **49**: 751-756.
- Hooley, R. and Zwar, J. A.**(1986) Hormonal regulation of α -amylase Gene transcription in wild Oat (*Avena fatua* L.) Aleurone protoplasts, *Plant Physiol.* **80**: 459-463.
- Multhukrishnan, S. et al.**(1983) Hormonal control of α -amylase Gene expression in barley, *J. Biol. Chem.* **258**: 2370-2375.
- Yomo, H and M. P. Tylor Histo**(1975) Chemical studies on protease formation in the cotyledons of germinating bean seeds, *Planta*, **112**: 35-43.
- Lee Chin Bum, Min Jai Lee, Hyung Jeon Chi, Young Myung Kwon**(1976) Effects of decursin and dicursinol on the germination and growth of plants. *Korean Jour. Botany* **19**(1). 7-13 formation in the cotyledons of germinating bean seeds, *Planta* **112**: 35-43.
- Kwon, Dh Young**(1974) Studies on protein profiles and isozymes in germinating seeds. *Korean Jour. Botany.* **17**(4): 143-157.
- 林雄圭**(1977), GA₃ 처리가 HOP 수량에 미치는 영향에 관한 연구 *Korean Jour. Botany.* **20**(1): 59-61.
- A. Lolcker and I. Ilan**(1975) On the nature of the hormonal regulation of amylase activity in cotyledons of germinating peas. *Plant&cell Physiol.* **16**: 449-454.
- 鄭相浩 · 沈雄變**(1983), 발아중인 옥수수 종자내에서 RAN의 생합성에 미치는 GA₃의 효과, *Kor. Jour. Botany*, vol. **26**(1): 1-6.
- Lowry OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall, RJ** (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Yoshiko Yamaoka, Michio Takeuchi, and Yukio Morohashi**(1990) Purification and characterization of a cysteine Endopeptidase in cotyledons of Germinated mung bean seeds, *Plant Physiol.* **94**: 561-566.
- Kim Kang-Shin, Han Kang-Wan, Kim Hyung-Rho**(1984) Studies on the Characterization of protease produced by streptomyces alboniger, *J. Korean Agri. chem society*, vol. **27**(3): sept. 174-179.
- Chang-Jo Kim, Man-Jin Oh and Seomg-Hyun Choi** (1992) Characteristics of the alkaline protease from the moderate halophile, *Halomonas* Sp. Es10. *J. Korean Agric. chem. soc.* **35**(4): 237-241.