

## 해녀콩(*Canavalia lineata*) 자엽에서 Homoserine Dehydrogenase의 정제 및 특성

李 周 鏞 · 李 貳 · 權 寧 命\*

서울대학교 自然科學大學 生物學科

발아 후 8일된 해녀콩 자엽에서 성질이 서로 다른 두 개의 homoserine dehydrogenase를 분리하였다. 자엽에서 얻은 조효소액을 열처리, 황산 암모늄 침전, DEAE-Sephacel 및 Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피와 Procion red dye, Cibacron blue dye 및 Resource Q 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 겔 크로마토그래피에서 얻은 2개의 활성분획 중 T-형(트레오닌 감수성)과 K-형(트레오닌 비감수성)의 분자량은 각각 230 kD과 135 kD이었다. 10 mM 트레오닌 첨가로 T-형 효소는 70% 이상의 활성저해를 받았으나 K-형 효소는 전혀 억제를 받지 않았다. Homoserine에 대한 Km은 T-형이 1.6 mM, K-형이 0.3 mM이었고, NAD에 대한 Km은 T-형이 2.34 mM, K-형이 0.03 mM이었으며 NADP에 대한 Km은 두 효소에서 동일하게 0.01 mM로 산출되었다. 400 mM KCl에서 T-형은 4.9배, K-형은 2.8배의 활성증가를 보였다. 부분정제(Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피)된 상태의 T-형과 K-형은 조건에 따라 쉽게 상호전환되었다.

주요어: 해녀콩, homoserine dehydrogenase, Procion red dye 컬럼, Resource Q 컬럼, 상호전환

Homoserine dehydrogenase(HSDH, EC 1.1.1.3)는 aspartate 3-semialdehyde와 homoserine의 상호 전환을 촉매하는 효소로서 아스파르트산계 아미노산 생합성계의 대사활성 조절에 있어 중요한 역할을 한다. 이 효소에 대한 지금까지의 연구결과를 보면 첫째, 한 종에는 최소한 두 개 이상의 동위효소가 존재하는데 트레오닌에 의해 억제되는 것(T-형) 영향을 받지 않는 것(K-형)으로 대표된다(DiCamelli and Bryan, 1980; Matthews et al., 1989; Turano et al., 1990). 그 밖에 세린이나 이소루이신에 의해 활성이 억제되는 것도 있지만(Giovanelli et al., 1988; Hama et al., 1991) 흔한 것은 아니다. 둘째, 거의 모든 HSDH는 K<sup>+</sup>에 의해 활성이 촉진되며, 셋째, T-형과 K-형은 pH와 트레오닌 및 K<sup>+</sup>의 농도변화에 의해 상호전환이 가능한 것으로 알려져 있다(Krishnaswamy and Bryan, 1983a, 1983b; Angeles et al., 1989; Matthews et al., 1989). 세포내의 환경변화에 의한 이러한 상호전환의 특성은 아스파르트산계 아미노산 대사경로의 속도조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며, 특히 aspartokinase의

활성도 갖고 있다는 사실로(Angeles et al., 1989; Wilson et al., 1991) HSDH의 기능에 대한 관심은 더욱 커지고 있다. 한편, 식물에서 이 효소는 엽록체에 존재하는 것으로 알려져 있어서(Bryan et al., 1977; Sainis et al., 1981), 대사경로의 조절이 광합성과 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다(Mills, 1980; Bryan, 1990a; Turano et al., 1990).

지금까지 식물의 HSDH는 잎, 분리엽록체, 배양세포에서 주로 연구가 진행되었으며(Bryan et al., 1977; Matthews et al., 1989; Turano et al., 1990), 엽록체가 충분히 발달하지 못한 발아 초기의 자엽에 있는 HSDH의 생리 생화학적 역할에 대한 연구결과가 거의 없는 실정이다. 해녀콩에서는 건조상태의 종자에서도 HSDH 활성이 상당히 높은 것으로 측정되었으며, 해녀콩과 같은 *Canavalia*속의 식물에는 많은 양의 canavanine이 존재하고 있으며, 이 유리아미노산은 arginase와 canaline reductase에 의해서 homoserine으로 대사될 수 있기 때문에(Rosenthal, 1992) 발아 초기의 해녀콩에서는 homoserine이 HSDH에 의하여 aspartate 3-semialdehyde로 전환된 후 다른 아미노산이나 유기산으로의 전환이 일어나서 이용될 수 있을 것이다(Bryan, 1990b). 따라서 본 연구에서는 해녀콩 유

\*교신저자: Fax (02) 872-6881  
© 한국식물학회 [서울] 1996

식물의 자엽에서 HSDH를 분리 및 정제하고 그 특성을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료의 준비

해너콩(*Canavalia lineata*)의 크기가 비슷한 종자를 선별하여 종피를 제거한 후 질석이 들어있는 플라스틱 용기( $\phi 10 \times 5$  cm)에 넣고 30°C에서 5일 동안 발아시킨 후 3일 동안 하루 16시간씩 빛을 비추고 키웠다. 빛을 비추는 후 3일째에 자엽의 HSDH의 활성 총량과 비활성이 모두 가장 높았기 때문에 이것을 재료로 사용하였다. 플라스틱 용기에는 증류수를 공급하여 항상 충분한 수분을 유지하도록 하였다.

### Homoserine dehydrogenase의 추출과 활성측정

발아 후 8일된(5일-암-3일-명) 자엽에 인산 완충용액(50 mM, pH 7.5, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM KCl, 5 mM 트레오닌, 1 mM EDTA 포함)을 1:1(v/w)로 첨가하여 Waring blender로 마쇄하였다. 마쇄액을 6겹의 거즈로 거른 후 20,000 g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성은 기질인 15 mM homoserine이 포함된 50 mM 글리신-KOH 완충용액(pH 10, 0.15 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA 포함)에 적정량의 효소액을 첨가하여 35°C에서 10분간 평형화시킨 후 0.48 mM NADP 또는 15 mM NAD를 첨가하여 반응을 시작케 하였다. 효소 활성의 계산은 반응개시 후 5분 동안에 일어나는 흡광도의 변화를 분광분석법으로 측정하였고 1 mL의 반응액에서  $A_{340}$ 을 1분에 0.001 증가시키는 효소활성을 1 unit로 하였다(Matthews and Widholm, 1979).

### 전기영동 겔에서의 효소활성 염색

Davis(1964)의 방법에 따라 acrylamide 평판 겔에서 시료를 전개한 후 기질과 발색시약이 포함된 0.1 M 글리신-KOH 완충용액(1 mM EDTA, 0.21 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.15 M KCl, 24 mM homoserine, 30 mM NAD 또는 0.96 mM NADP, 0.266 mg/mL의 nitroblue tetrazolium, 0.025 mg/mL의 phenazine methosulfate 포함)에 겔을 넣고 35°C 암소에서 30분간 흔들 어주며 반응시켜 HSDH의 활성부위를 발색시켰다

(Matthews *et al.*, 1975).

### Homoserine dehydrogenase의 정제

#### 열처리와 황산 암모늄침전법

조효소액을 55°C의 물에 담구어 8분간 열처리한 후 0°C에서 30분간 냉각시켰다(Matthews *et al.*, 1989). 이때 침전된 단백질을 20,000 g에서 20분간 원심분리하여 제거하고 얻은 상정액에 황산암모늄 결정을 가하면서 활성이 나타나는 분획(25~55%)의 침전을 20,000 g에서 원심분리하여 얻었다. 얻어진 침전물을 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM KCl, 5 mM 트레오닌 포함)에서 16시간 동안 투석하고 20,000 g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 컬럼용 시료로 사용하였다.

#### DEAE-Sephacel 크로마토그래피

시료를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM KCl, 5 mM 트레오닌 포함)이 채워진 DEAE-Sephacel 컬럼(2.5×30 cm)에 적재하고 컬럼 부피의 3배의 동일한 완충용액으로 컬럼을 씻어준 후, 0~0.5 M의 NaCl 농도 기울기로 효소를 용출시켰다. 용출속도는 시간당 20 mL로 하였으며, 분획당 부피는 3 mL로 하였고 효소 활성이 있는 분획을 모아 Amicon kit(YM 30 membrane)로 농축하였다.

#### Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피

농축된 시료를 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 50 mM KCl, 5 mM 트레오닌 포함)이 채워진 Sephacryl S-300 컬럼(1.2×75 cm)에 적재한 후 동일한 완충용액으로 시간당 20 mL, 분획당 2 mL씩 용출시켰다. 효소 활성측정 결과 2개의 활성 peak가 나타났고 10 mM 트레오닌 처리에 의한 활성변화를 분광분석법과 전기영동으로 조사하여 T-형과 K-형을 분별하였다. T-형과 K-형의 시료를 Amicon kit를 이용하여 각각 농축하여 다음 단계에 사용하였으며, 분자량 결정을 위해서는 apoferritin(443 kD),  $\beta$ -amylase(220 kD), alcohol dehydrogenase(150 kD), BSA(66 kD)를 표준단백질로 사용하였다.

**Procion red dye, Cibacron blue dye 및 Resource Q 크로마토그래피**

Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피에서 분리된 K-형 HSDH 분획을 50 mM 인산 완충용액(pH 7.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 포함)으로 평형시킨 Procion red dye 컬럼에 적재하였다. 적재 후 동일한 완충용액으로 시간당 20 mL의 속도로 씻어주면 모든 K-형 분획은 컬럼에 결합하지 않고 완충용액과 함께 흘러나왔다. 세척 중 용출된 효소가 포함된 분획을 농축하고 20 mM Mes-KOH 완충용액(pH 6.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 포함)에서 3시간 동안 투석한 후 동일한 완충용액으로 처리한 Procion red dye 컬럼에 다시 적재하였다. 적재 후 컬럼부피의 5배 용량의 동일한 완충용액으로 씻어준 후, 0~0.5 M KCl의 농도기울기로 용출시켰다. 활성분획을 모아 농축한 후 20 mM Mes-KOH 완충용액(pH 6.5, 50 mM KCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 포함)으로 평형시키고 같은 완충용액으로 평형시킨 Cibacron blue dye 컬럼에 적재한 후 1 mM NADP가 포함된 동일한 완충용액으로 용출시켰다.

한편, Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피에서 분리된 T-형 HSDH 분획은 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 2 mM β-mercaptoethanol, 50 mM KCl, 5 mM 트레오닌 포함)으로 평형시키고 동일 완충용액으로 평형시킨 Procion red dye 컬럼에 적재하였다. 적재 후 컬럼부피의 5배의 동일한 완충용액으로 씻어주었으며, 효소의 용출은 0~0.5 M의 NaCl 농도기울기로 실시하

였다. 여기에서 활성분획을 모아 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM 트레오닌, 2 mM β-mercaptoethanol, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 포함)으로 평형시킨 후 동일 용액으로 평형시킨 Resource Q 컬럼에 적재한 후 0~1 M NaCl 농도기울기로 용출시켰다. T-형 효소가 K-형으로 전환되는 것을 막기 위하여 트레오닌을 필요한 과정에 첨가하였다.

**효소학적 특성의 조사**

Sephacryl S-300 겔 컬럼을 거친 T-형과 K-형 효소를 사용하여 온도, 트레오닌과 K<sup>+</sup>의 영향 및 NAD, NADP와 homoserine에 대한 친화도, 그리고 T-, K-형의 상호전환 등의 실험을 실시하였다.

T-형을 K-형으로 전환시키기 위해서는 pH 7.5인 50 mM Tris-HCl 완충용액(150 mM KCl, 2 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA 포함)에서, 반대의 경우는 pH 8.5인 50 mM Tris-HCl 완충용액(10 mM 트레오닌, 2 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA 포함)에서 각각 16시간 동안 투석하였으며, 투석 후 전기영동으로 동위효소의 위치와 활성변화를 조사하였다.

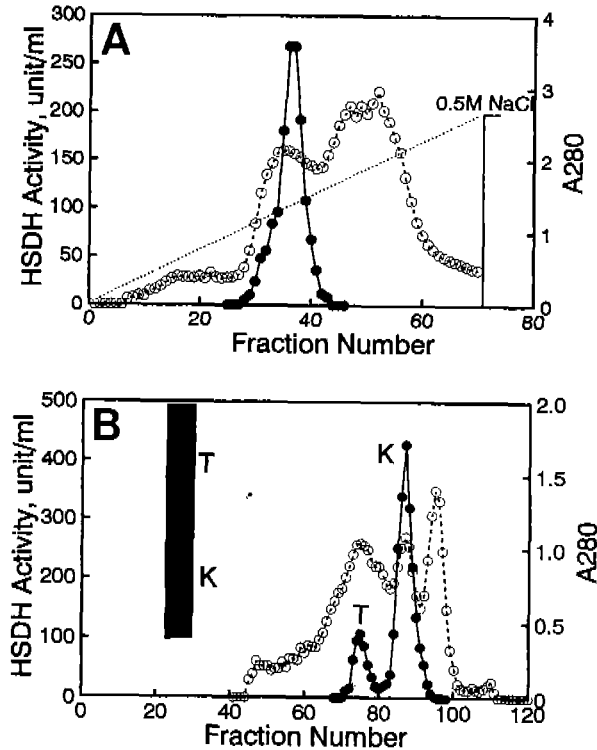
**결과 및 고찰**

**Homoserine dehydrogenase의 정제**

Table 1에서 보는 바와 같이 두 HSDH의 정제결과,

**Table 1.** Purification of homoserine dehydrogenases from cotyledons of *C. lineata*

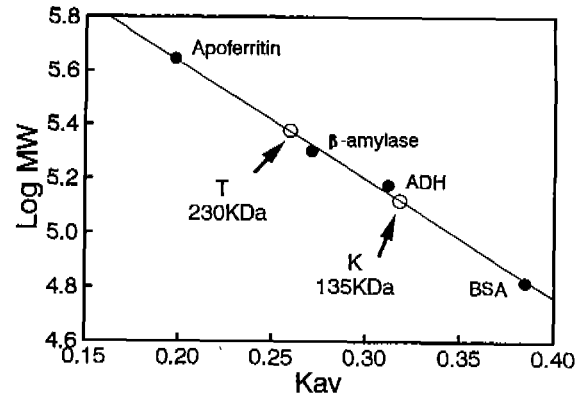
Fraction	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (unit/mg protein)	Purification fold
Crude extract	24700	6590	3.75	1
Heat denaturation	25200	5430	4.64	1.24
Ammonium sulfate fractionation (25~55%)	17100	1650	10.4	2.76
DEAE-Sephacel chromatography	13700	92.5	148	39.5
Sephacryl S-300 chromatography (T)	968	9.6	101	26.9
Sephacryl S-300 chromatography (K)	7230	7.7	939	253
(-) Procion red dye chromatography (T)	-	-	-	-
(-) Procion red dye chromatography (K)	6140	1.83	3350	894
(+) Procion red dye chromatography (T)	872	0.91	958	256
(+) Procion red dye chromatography (K)	4860	0.71	6850	1830
Cibacron blue dye chromatography (T)	-	-	-	-
Cibacron blue dye chromatography (K)	1370	0.05	20000	5330
Resource Q column chromatography (T)	655	0.22	2980	794
Resource Q column chromatography (K)	-	-	-	-



**Fig. 1.** Chromatographies of HSDH. HSDH activity (●) was assayed at standard condition and protein concentration (○) was determined by  $A_{280}$ . A, DEAE-Sephacel ion exchange column (2.5×30 cm) with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM threonine, 1 mM EDTA with 0–0.5 M NaCl linear gradient. Fractions of 3 mL were collected. B, Sephacryl S-300 column (1.2×75 cm) with buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 mM threonine, and 1 mM EDTA. Fractions of 2 mL were collected. T, T-form HSDH; K, K-form HSDH. Inset shows the activity staining profile of T and K-form of HSDH.

K-형과 T-형은 각각 5,300배와 790배 정제되었다. 일반적으로 HSDH는 비교적 열에 안정하다는 보고에 따라(Matthews *et al.*, 1989; Turano *et al.*, 1990) 정제과정 중에 55°C에서 8분 동안 열처리한 결과, 약 20%의 단백질을 제거할 수 있었으며 총활성량은 거의 변화가 없는 것으로 나타나 본 시료의 HSDH도 역시 열처리에 의하여 정제가 가능한 것을 알 수 있었다.

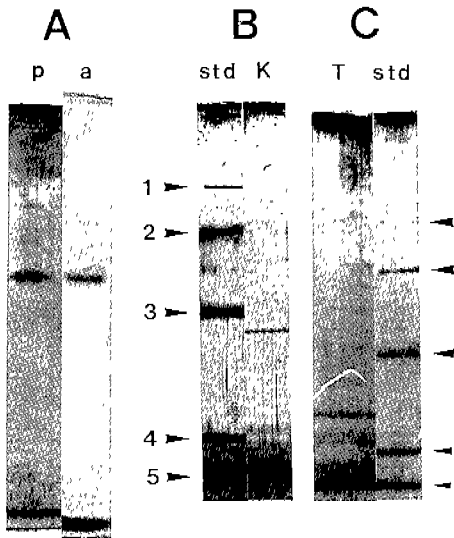
DEAE-Sephacel 이온교환 크로마토그래피에서는 T-형과 K-형이 분리되지 않았으며 활성 피크가 약 0.25 M NaCl에 해당되는 35–40번 분획에서 나타났다(Fig. 1A). 그러나 Sephacryl S-300 겔 크로마토그래피에서 효소 활성이 두개의 분획으로 분리되었는데(Fig. 1B), 10 mM 트레오닌을 첨가했을 때 활성이 크게 억제되



**Fig. 2.** Estimation of molecular weight of K- and T-form of HSDH by gel filtration. Standard protein (●) and HSDH (○) were eluted from a Sephacryl S-300 column (1.2×75 cm). Fractions of 2 mL were collected. The elution volume of each standard protein was determined by observing absorbance at 280 nm. The standard protein used were apoferritin (443,000),  $\beta$ -amylase (220,000), ADH (alcohol dehydrogenase, 150,000), and BSA (bovine serum albumin, 66,000). The elution volume of HSDH was determined by observing enzyme activity.

는 T-형 HSDH가 앞쪽에서(73–77번 분획), 트레오닌의 영향을 전혀 받지 않는 K-형 HSDH는 뒤쪽에서(85–89번 분획) 얻어졌다. 이러한 결과는 두 개의 분획을 전기영동한 후 10 mM 트레오닌 유무에 따른 효소 활성의 변화로도 확인되었다. 표준단백질을 사용하여 각 분획의 분자량을 측정된 결과, T-형은 230 kD로 K-형은 135 kD로 산출되었다(Fig. 2). 이러한 분자량의 측정결과는 T-형의 분자량이 K-형보다 일반적으로 크다는 보고와 일치하며, 각 분자량은 T-형의 경우 피마자는 290–350 kD(Grego *et al.*, 1980), 당근은 240 kD(Matthews *et al.*, 1989), 옥수수 190 kD(Walter *et al.*, 1979), 밀의 280 kD(Grego *et al.*, 1980)와 비슷하거나 다소 작은 것으로 나타났다. 그러나 K-형의 분자량은 당근의 180 kD(Matthews *et al.*, 1989)보다는 작고 밀의 75 kD(Grego *et al.*, 1980)와, 옥수수의 70 kD(Walter *et al.*, 1979) 보다는 큰 것으로 나타났다.

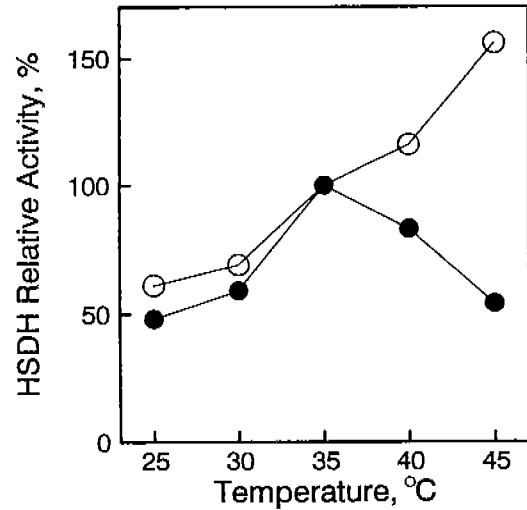
Procion red dye 크로마토그래피에서 두 HSDH는 보다 더 정제되었는데, 이 과정에서 두 효소는 resin에 대한 결합력에서 뚜렷한 차이를 보였다. 즉 K-형은 pH 7에서는 컬럼에 결합되지 않고 pH 6 이하에서 컬럼에 결합되었으나, T-형은 pH 8에서도 쉽게 컬럼에 결합하는 것으로 나타났다. 그래서 1차로 겔 filtration 분획중 K-형의 시료를 Procion red dye 컬럼(pH 7.0)에 흘려주면 약 50% 정도의 단백질이 효소와 분리되었다. 1차 Procion red dye 컬럼의 활성분획을 pH 6.0의



**Fig. 3.** Polyacrylamide gel electrophoresis of purified HSDH. A, polyacrylamide (7.5%) gel electrophoresis of purified HSDH (K-form); protein was visualized by silver staining (p), HSDH activity was developed with activity staining (a). B, SDS-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis of purified HSDH (K-form); C, SDS-polyacrylamide (10%) gel electrophoresis of purified HSDH (T-form). Molecular weight standards (std) are rabbit muscle phospholylase B (1, 97,400), bovine serum albumin (2, 66,000), hen egg white ovalbumin (3, 45,000), bovine carbonic anhydrase (4, 31,000), soybean trypsin inhibitor (5, 21,500).

동일한 컬럼에 적재한 후 용출시켰을 때 정제효율이 매우 좋았다. 반면 T-형의 경우는 pH 7.5 이하에서는 resin에 대단히 강하게 결합하는 관계로 컬럼의 pH를 8로 조정하여야만 용출시킬 수 있었다.

Procion red dye 컬럼에서 얻은 K-형은 Cibacron blue dye 컬럼에서 더욱 정제되었으며 정제 fold가 5,300으로 증가되었다. 한편, T-형은 Cibacron blue 컬럼에 전혀 결합하지 않아 Resource Q 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과 정제 fold가 790으로 증가되었다(Table 1). 이들 두 시료의 전기영동에서 K-형은 native-PAGE와 SDS-PAGE 결과 단일밴드로 나타났으며(Fig. 3A, B), 분자량이 44 kD이어서 동일 서브유니트의 3량체로 추정되었으나, T-형은 순수정제가 되지 않아 단량체의 확인이 불가능하였다(Fig. 3C). 옥수수수의 경우 K-형과 T-형이 모두 2량체와 4량체로 존재하는 경우와(DiCamelli and Bryan, 1980) K-형과 T-형이 모두 2량체이면서 서브유니트의 조성이 다른 경우(Walter *et al.*, 1979)가 보고되었으며, 최근에는 K-형은 2량체, T-형은 3량체인 경우도 보고되고 있어서



**Fig. 4.** Dependence of HSDH activity on temperature of the assay medium. (●), T-form HSDH; (○), K-form HSDH. All results derived from triplicated determinations and are expressed as per cent of the activity at 35°C.

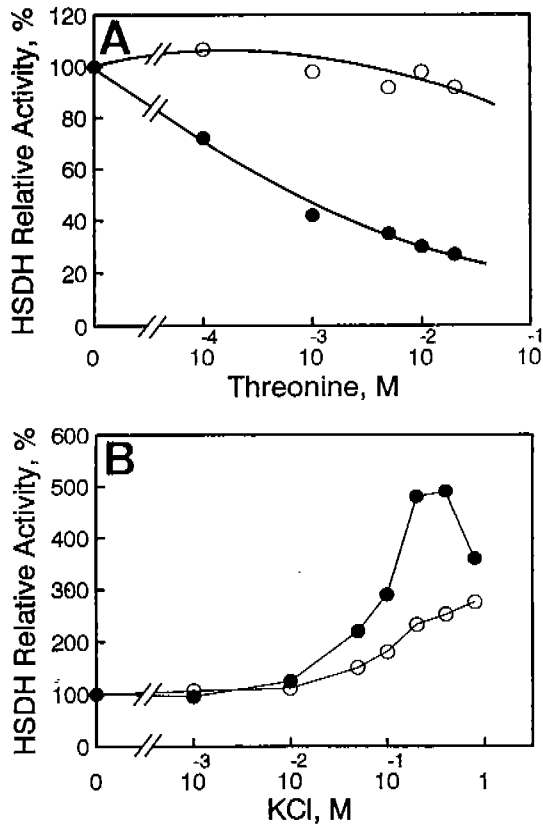
(Turano *et al.*, 1990) HSDH의 각 동위효소의 서브유니트 구성은 다양한 것 같다.

**Homoserine dehydrogenase의 성질**

두 동위효소의 활성 최적 온도는 T-형이 35°C이고, K-형은 실험조건에서 45°C까지 활성이 계속 증가하여 25°C에서보다 약 3배의 활성을 보여(Fig. 4) 두 동위효소가 온도에 대해 매우 다른 반응을 보임을 알 수 있었다.

트레오닌과 K<sup>+</sup>이 두 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과, 10 mM 트레오닌에 의해 T-형의 활성은 70%의 억제를 나타냈으나 K-형은 거의 영향을 받지 않았다(Fig. 5A). T-형에서 나타난 이러한 결과는 옥수수수와 당근의 경우 10 mM 트레오닌에서(Matthews *et al.*, 1975; Matthews *et al.*, 1989), 보리의 경우 1 mM 트레오닌에서 각각 100%의 활성 억제를 보인다는 결과(DiCamelli and Bryan 1980; Sainis *et al.*, 1981)와는 달리 본 재료의 T-형은 고농도의 트레오닌에 의해서도 20~30%의 활성은 계속 유지되었다. 한편, K<sup>+</sup>의 영향을 보면 400 mM KCl에 의해 T-형은 4.9배 K-형은 2.8배의 활성증가를 보였는데(Fig. 5B) 이러한 결과는 당근의 T-형과 K-형이 200 mM KCl에 의해서 각각 2.57배, 1.55배 증가하였다는 결과와 유사하였다(Matthews *et al.*, 1989).

기질에 대한 효소의 특성을 조사한 결과, NADP가

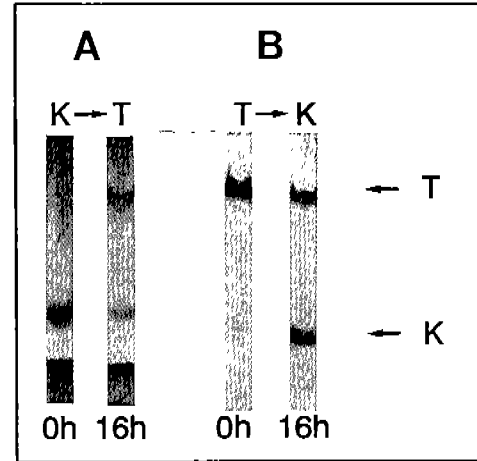


**Fig. 5.** The effects of threonine (A) or KCl (B) in the assay medium on the velocities of T-form (●), and K-form (○) HSDH.

**Table 2.** Km values of T- and K-form of homoserine dehydrogenase for its substrates

Substrate	Km value	
	T-form	K-form
	mM	mM
Homoserine (NADP, 0.05 mM)	1.6 (r=0.997)	0.3 (r=0.997)
Homoserine (NAD, 10 mM)	5.4 (r=0.999)	12.0 (r=0.987)
NADP (homoserine, 4.5 mM)	0.01(r=0.997)	0.01(r=0.998)
NAD (homoserine, 30 mM)	2.34(r=0.969)	0.03(r=0.990)

조효소일 때, homoserine에 대한 Km은 T-, K-형이 각각 1.6, 0.3 mM로 나타났고, NAD가 조효소일 때에는 5.4, 12.0 mM로 나타났다(Table 2). 한편, 조효소에 대한 기질친화도를 보면 NADP에 대하여는 0.01 mM로 두 동위효소가 같은 Km 값을 나타낸 반면, NAD에 대하여는 T-형과 K-형이 2.34와 0.03 mM로 약 80배의



**Fig. 6.** Interconversion of K- and T-form of HSDH. A, conversion of K-form to T-form by dialyzing (16 h) with buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), and 10 mM threonine. B, conversion of T-form to K-form by dialyzing (16 h) with 25 mM Tris-HCl (pH 7.5, 2 mM β-mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 150 mM KCl). Electrophoresis was conducted with 5% native PAGE. HSDH activity was stained by the addition of 0.266 mg/mL nitroblue tetrazolium and 0.025 mg/mL of phenazine methosulfate.

차이를 보였다. 이러한 결과는 옥수수의 경우 K-형이 T-형에 비해 NAD에 대한 친화도가 약 2배 정도 높다는 보고(Bryan and Lochner, 1981)와는 큰 차이를 보인 것이다.

두 효소간의 상호전환 실험은 부분 정제된 효소액 (Sephacryl S-300)을 사용하여 수행하였는데, 그 결과, K-형은 pH 8.5와 10 mM 트레오닌 존재시 T-형으로, T-형은 pH 7.5와 150 mM의 K<sup>+</sup> 존재시 K-형으로 각각 상호전환이 가능하였다(Fig. 6). 이러한 상호전환의 결과는 옥수수(Walter *et al.*, 1979)를 제외한 대부분의 식물재료에서 관찰되는 결과와 같았다(Krishnaswamy and Bryan, 1983a; Matthews *et al.*, 1989).

따라서, 해녀콩에서 상호전환될 수 있는 HSDH의 두 동위효소는 뚜렷한 생화학적 성질의 차이를 갖고 있었고, 특히, T-형이 K-형보다 온도, 트레오닌, KCl 등의 조건에 의해서 활성의 변화가 뚜렷한 것으로 나타났다. 따라서 HSDH는 세포내의 환경변화에 따라 T-형과 K-형의 전환으로 일부 아미노산 대사를 조절할 수 있을 것으로 해석된다.

사 사

본 연구는 서울대학교 대학발전기금 대우학술연구비

(94-06-2058)와 세포분화연구센터의 연구비(94-5-1)의 일부 지원으로 이루어진 것임.

## 인 용 문 헌

- Angeles, T.S., P.A. Smanik, C.L. Borders and R.E. Viola.** 1989. Aspartokinase-homoserine dehydrogenase I from *Escherichia coli*: pH and chemical modification studies of the kinase activity. *Biochemistry* **28**: 8771-8777.
- Bryan, J.K.** 1990a. Differential regulation of maize homoserine dehydrogenase under physiological condition. *Plant Physiol.* **92**: 785-791.
- Bryan, J.K.** 1990b. Advances in the biochemistry of amino acid biosynthesis. In *The Biochemistry of Plants. A comprehensive treatise.* B.J. Milfin and P.J. Lea (ed.), Vol 16. Academic Press, New York, pp. 162-173.
- Bryan, J.K. and N.R. Lochner.** 1981. quantitative estimates of the distribution of homoserine dehydrogenase isozymes in maize tissues. *Plant Physiol.* **68**: 1400-1405.
- Bryan, J.K., E.A. Lissik and B.F. Matthews.** 1977. Changes in enzyme regulation during growth of maize: III. Intercellular location of homoserine dehydrogenase in chloroplasts. *Plant Physiol.* **59**: 673-679.
- Davis, B.J.** 1964. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- DiCamelli, C.A. and J.K. Bryan.** 1980. Comparison of sensitive and desensitized forms of maize homoserine dehydrogenase. *Plant Physiol.* **65**: 176-183.
- Giovanelli, J., S.H. Mudd and A.H. Datko.** 1988. *In vivo* regulation of the threonine and isoleucine biosynthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm. 6747. *Plant Physiol.* **86**: 369-377.
- Grego S., D. Tricoli and G.D. Harco.** 1980. Comparison of homoserine dehydrogenases from different plant sources. *Phytochemistry* **19**: 1619-1623.
- Hama, H., T. Kayahara, M. Tsuda and T. Tsuchiya.** 1991. Inhibition of homoserine dehydrogenase I by L-serine in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **109**: 604-608.
- Krishnaswamy, S. and J.K. Bryan.** 1983a. Characterization of ligand-induced interconversion of maize homoserine dehydrogenase among different states. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**: 449-463.
- Krishnaswamy, S. and J.K. Bryan.** 1983b. Characterization of ligand-induced states of maize homoserine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **227**: 210-224.
- Matthews B.F. and J.M. Widholm.** 1979. Regulation of homoserine dehydrogenase in developing organs of soybean seedlings. *Phytochemistry* **18**: 395-400.
- Matthews, B.F., A.W. Gurman and J.K. Bryan.** 1975. Changes in enzyme regulation during growth of maize. I. Progressive desensitization of homoserine dehydrogenase during seedling growth. *Plant Physiol.* **55**: 991-998.
- Matthews, B.F., M.J. Farrar and A.C. Gray.** 1989. Purification and interconversion of homoserine dehydrogenase from *Daucus carota* cell suspension cultures. *Plant Physiol.* **91**: 1569-1574.
- Mills, W.R.** 1980. Photosynthetic formation of the aspartate family of amino acids in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* **65**: 1166-1172.
- Rosenthal, G.A.** 1992. Purification and characterization of the higher plant enzyme L-canaline reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1780-1784.
- Sainis, J.K., R.G. Mayne, R.M. Wallsgrove, P.J. Lea and B.J. Mifflin.** 1981. Localization and characterization of homoserine dehydrogenase isolated from barley and pea leaves. *Planta* **152**: 491-496.
- Turano, F.J., R.L. Jordan and B.F. Matthews.** 1990. Immunological characterization of *in vitro* forms of homoserine dehydrogenase from carrot suspension cultures. *Plant Physiol.* **92**: 395-400.
- Walter T.J., J.A. Connelly, B.G. Gengenbach and F. Wold.** 1979. Isolation and characterization of homoserine dehydrogenases from maize suspension cultures. *J. Biol. Chem.* **254**: 1349-1355.
- Wilson, B.J., A.C. Gray and B.F. Matthews.** 1991. Bifunctional protein in carrot contains both aspartokinase and homoserine dehydrogenase activities. *Plant Physiol.* **97**: 1323-1328.

(1996. 1. 4 接受)

---

## Purification and Properties of Homoserine Dehydrogenases in *Canavalia lineata* Cotyledons

Lee, Ju Yong, Yi Lee and Young Myung Kwon\*

*Department of Biology and Research Center for Cell Differentiation,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

### ABSTRACT

Two forms of homoserine dehydrogenase have been isolated from 8-day-old cotyledons of *Canavalia lineata* by a heat denaturation, ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephacel ion exchange and Sephacryl S-300 gel filtration chromatographies, and Procion red dye, Cibacron blue dye and Resource Q column chromatographies. The molecular weights of T-form (threonine-sensitive) and K-form (threonine-insensitive) were estimated to 230 kD and 135 kD, respectively. In the presence of 10 mM threonine, the activity of T-form was inhibited with almost 70%, but that of K-form was not at all. The  $K_m$  values for homoserine of T- and K-form were 1.6 mM and 0.3 mM, respectively. The  $K_m$  values for NAD of T- and K-form were 2.34 mM and 0.03 mM, respectively. And  $K_m$  values for NADP of two isozymes were the same as 0.01 mM. The activities of T- and K-form were markedly stimulated up to 4.9- and 2.8-fold, respectively, by 400 mM KCl. The partial purified (gel filtration) enzymes (T-form and K-form) can be reversibly converted.

*Keywords:* *Canavalia lineata*, homoserine dehydrogenase, Procion red dye column, Resource Q column, interconversion

---

\*Corresponding author: Fax 82-2-872-6881