

Chitinase, β -1,3-glucanase 및 lysozyme 효소활성을 보유한 벼잎 산성단백질 RCG-2

엄성연 · 김수일*

서울대학교 농업생명과학대학 농화학과 및 농업생물신소재연구센터

초록 : 벼잎의 산성용액 추출물로부터 ion exchange chromatography·chitin affinity chromatography·chromatofocusing·gel slicing 등의 방법으로 단백질 RCG-2를 순수분리하였다. 본 단백질은 chitin과 laminarin을 가수분해하므로 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 이외에도 *M. lysodeikticus* cell wall을 가수분해하는 lysozyme 활성도 보유하는 것으로 판명되었다. 분자량이 29.77 kd인 본 효소의 chitinase 활성은 pH 4.0에서, β -1,3-glucanase 활성은 pH 7.0에서 최대로 나타났고, 최적온도는 두 효소 활성 모두 40°C 이었다. chitin에 대한 K_M 값은 7.86 mM, V_{max} 는 0.025 μ M/min, laminarin (β -1,3-glucan)에 대한 것은 각각 5.95 mM, 0.16 μ M/min. 이었으며, 정제된 효소는 chitin을 chitooligosaccharide로 분해하는 것으로 나타나서 endochitinase로 판명되었다(1994년 11월 15일 접수, 1994년 12월 27일 수리).

서 론

식물은 병원성 미생물에 감염되었을 경우, peroxidase 및 산화효소의 활성 증가,^{1,2)} PR(pathogenesis-related) protein 합성³⁾과 phenol류 및 flavonoid 화합물의 축적⁴⁾ 등 다양한 기작으로 병원성 미생물에 대항하여 그 자신을 방어한다. 이중 대부분의 PR protein은, 병원성 미생물 세포벽의 주요구성물질이지만 식물체 내에서는 거의 존재하지 않는 chitin이나 β -1,3-glucan을 가수분해하는 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 보유하고 있다.⁵⁻¹²⁾ 지금까지 여러종류의 식물에서 chitinase와 β -1,3-glucanase가 각각 정제되었고 그들의 특성이 보고되고 있으며,¹³⁻²⁹⁾ 이중 고등 식물에서 추출한 몇 가지 효소들은 두 종류의 기질에 작용하는 bifunctionality가 있는 것으로 발표되고 있다. 즉, chitinase의 경우 lysozyme^{9,13,19,24,25,30,31)} 이나 phenylalanine ammonia lyase²¹⁾ 활성을 동시에 보유하거나 또는 α -amylase를 저해하는 inhibitor²²⁾로서의 기능도 함께 보유하는 것으로 보고되고 있으며, β -1,3-glucanase는 glucosidase^{23,33)} 활성을 같이 나타내는 것으로 보고되고 있다. 그러나 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 한 효소가 같이 보유하고 있다는 보고는 아직 없었다. 최근에 본 실험실에서는 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있는 단백질의 분획을 벼잎의 산성용액 추출물에서 발견하였고 이들의 전기영동 결과 한 단백질이 위의 두 효소활성을 같이 보유할 수 있는 가능성을 시사한 바 있으며 또한 이들을 염기성 및 산성 효소군으로 분리한 바 있다.³⁴⁾

본 연구에서는 벼잎의 산성 효소군으로부터 한가지 단백질 RCG-2를 순수하게 분리하고 이것이 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 같이 가지고 있음을 밝혔으며 또한 이의 효소적 성질을 규명하였다.

산성효소 분획의 제조

재료 및 방법

산성효소 분획은 엄 등³⁴⁾의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 벼잎의 산성용액추출물을 ammonium sulfate로 침전시킨 후 DEAE-cellulose 및 chitin affinity column chromatography를 통과시킨 CC 분획을 산성효소 분획 조효소로 하였다.

Chromatofocusing

조효소의 0.025 M imidazole-HCl buffer(pH 7.4) 용액을 동일 buffer에 평형시킨 Polybuffer exchanger(Sigma)

Key words : *Oryza sativa* leaves, Chitinase, β -1,3-Glucanase, Bifunctional enzyme

*Corresponding author : S.-I. Kim.

94로 충전된 column(0.8×20 cm)에 주입한 후 Polybuffer 74-HCl로 pH 7.0에서 3.0까지 직선상의 gradient를 걸어 chromatofocusing을 실시했다. Resin에 흡착되지 않은 단백질이 모두 용출되면, Polybuffer 74-HCl(pH 3.0)의 NaCl 용액으로 resin에 흡착된 단백질을 2 ml/10 min. 속도로 용출시켰다. 5 ml씩 수집한 각 분획들의 280 nm에서의 흡광도와 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 측정한 뒤 두 효소활성이 있는 분획을 모아 증류수에서 투석, 냉동건조하였다.

Gel slicing에 의한 단백질의 분리

Chromatofocusing에 의하여 분리된 CF-2 분획의 각 단백질 band의 분리는 15% polyacrylamide를 사용한 native-PAGE gel을 사용하였다. 전기영동 후 나타나는 단백질 band 양상에 따라 자른 gel을 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 넣고 분쇄하여 4°C에서 단백질을 추출하였다.

전기영동

Native-PAGE(non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 엄³⁴⁾ 등의 방법에 따라 행하였고, 이차원 PAGE(2-dimensional PAGE)³⁵⁾는 먼저 IEF(isoelectrofocusing)을 6% acrylamide 농도로 Tris-HCl buffer(pH 8.80, pH 6.80)를 사용한 discontinuous system으로 실시한 뒤, gel을 오려내어 0.1%의 SDS를 사용한 slab gel에서 SDS-PAGE를 행하였으며, IEF는 PhastSystem(Pharmacia)의 PhastGel IEF 3-9을 이용하였고 이때 단백질 band는 silver staining으로 검출하였다.³⁶⁾

효소활성 측정

Chitinase 활성은 regenerated chitin³⁷⁾을 기질로 한 Boller 등¹³⁾의 방법을 사용하였고, β -1,3-glucanase 활성은 laminarin을 기질로 한 Fink 등의 방법¹⁷⁾을, lysozyme 활성은 *Micrococcus lysodeikticus* 세포벽을 기질로 한 Martin 등의 방법²⁴⁾을 이용하여 측정하였다. 효소 단위 1 unit는 각 실험반응조건에서 1분에 1 nmole의 환원당 및 NAG(N-acetylglucosamine)를 생산하는 효소량으로 하였다. 단, Lysozyme의 경우 1분에 0.001의 흡광도 감소를 가져오는 효소량을 1 unit으로 하였다. 효소의 비활성도 측정을 위한 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 BCA(bicinchonic acid)방법을 사용하였다.³⁸⁾

pH 및 온도에 따른 효소활성 변화를 검토하기 위하여,

pH 3~8 범위에서 50 mM citric acid- Na_2HPO_4 (McIlvaine) buffer(pH 3~7) 및 sodium phosphate buffer(pH 8)를 이용하여 37°C에서 효소활성을 측정하였으며, 온도의 영향은 chitinase의 경우 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.0)에서, β -1,3-glucanase는 pH 5.0인 동일 buffer에서 반응온도를 20~83°C로 각각 유지시키면서 효소 활성을 측정하였다.

K_M , V_{max}

Chitinase 및 β -1,3-glucanase의 K_M 및 V_{max} 의 측정은, chitinase의 경우 0.02~1.0 mM 농도의 NAG₆를, β -1,3-glucanase는 0.15~1.8 mM 농도의 laminarin을 이용하여 각 기질농도 별로 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 초기 속도를 구한 뒤, 이로부터 각각 K_M , V_{max} 값을 구하였다. 이때 NAG₆의 분자량은 1237.2로, laminarin의 평균 분자량은 Wong 등의 기준³⁹⁾에 따라 중합도가 20인 것으로 하여 3300으로 계산하였다.

효소의 작용양상

Chitinase의 효소 작용양상은 NAG trimer-hexamer 및 pNp-NAG(*p*-nitrophenyl NAG)을 기질로 한 가수분해물을 시료로 하여 이를 점적한 silica gel plate를 propanol : distilled water : ammonia water = 70 : 30 : 1(v/v)의 전개용매⁴⁰⁾로 2중전개 후 *O*-aminophenol reagent로 검정하였다.⁴¹⁾

결 과

RCG-2 단백질의 순수분리

산성 효소분획 CC는 10% gel PAGE에서 4개의 주

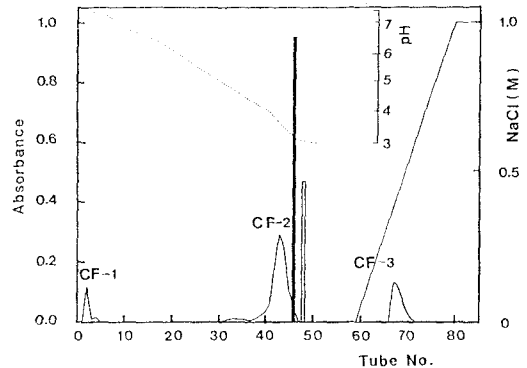


Fig. 1. Chromatofocusing of CC fraction isolated by chitin affinity chromatography.

—, Absorbance at 280 nm; ---, Absorbance at 585 nm (chitinase activity); ···, Absorbance at 500 nm (β -1,3-glucanase activity); - - - - , pH gradient.

band를 포함하고 있으며, 비활성도는 chitinase 경우 12.16 unit/mg protein, β -1,3-glucanase는 300.50 unit/mg protein 이었고 이외에 lysozyme활성(0.8 unit/mg protein)도 보유하고 있었다.

본 CC 분획을 pH 3~7의 범위에서 chromatofocusing으로 정제한 결과, 분리된 3개의 단백질 peak 중 두번째 peak인 CF-2에서만 두 효소활성이 검출되었다 (Fig. 1). 본 CF-2 분획은 15% gel PAGE상 5개의 band로 분리되었으며(Fig. 2A), 이들을 전기영동 이동도에 따라 RCG-1,2,3,4,5로 각각 명명하였다. 각 band를 잘라내어 단백질들을 추출한 후 이들을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 추출한 각 단백질은 모두 단일 band를 나타내어서 순수하게 분리되었음을 확인 할수 있었고 분자량은 세 종류로 분류되었다(Fig. 2B). 즉, RCG-1,2,3는 29.7 Kd, RCG-4는 28.97 Kd, RCG-5는 20.58 Kd의 분자량을 각각 가지고 있었다. Chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성은, 5개의 단백질 중 4개 즉 RCG-1,2,3,4에서 두 효소활성이 함께 검출되었으며 RCG-5에서는 β -1,3-glucanase 활성만이 존재하였다(Table 1). Chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 같이 보유하는 것으로 나타난 4개의 단백질, RCG-1,2,3,4에서의 β -1,3-glucanase대 chitinase 비활성도 비율은 1.62~568.08(Table 1)로 서로 상이하여 이러한 결과로 이들이 전기이동도 및 분자량의 차이 뿐만 아니라 효소활성에서도 다른 isozyme 또는 isoprotein됨을 확인할 수 있었다.

본 실험 결과, β -1,3-glucanase에 비하여 chitinase활성이 상대적으로 낮게 나타나는 것은, 본 효소들이 다

음에 나타나는 바와 같이 endo형 chitinase이며 그 효소활성 측정방법으로써 NAG만을 주로 정량하는 DMAB (*p*-dimethylaminobenzaldehyde)방법을 사용한 결과 때문으로 추정할 수 있다. 실제 효소 반응물에 cytohelicase를 처리하여 효소분해산물인 chitooligosaccharides를 NAG로 분해 후 효소활성을 측정하면 효소활성이 약 7배 증가하는 결과가 보고되고 있다.⁴²⁾ 따라서 이러한 사실을 감안한다면, RCG-1,2 는 주로 β -1,3-glucanase 활성을, RCG-3,4 는 주로 chitinase 활성을 보유하는 것으로 생각할 수 있다. *Micrococcus lysodeikticus* 세포벽을 분해하는 lysozyme 활성은 RCG-2,4,5에서만 검출되었다 (Table 1). 이상의 실험결과들을 종합하여 보면, 5개의 효소 중 RCG-2가 β -1,3-glucanase 및 chitinase 활성을 상대적으로 고르게 보유하고 있으며 또한 lysozyme 활성도 보유하고 있었으므로(Table 1), 다음 실험에서는 이를 양적으로 분리, 그 효소적 특성들을 조사하였다.

RCG-2의 효소적특성

순수도 및 pI(isoelectric point)

RCG-2를 이차원 PAGE로 다시 분석한 결과, 30 kd와 pH 3 부근의 지역에서 단일 단백질 band로 검출되었으므로(Fig. 3A), 본 단백질은 chitinase, β -1,3-glucanase 및 lysozyme 활성을 동시에 보유하는 단일 단백질임을 재

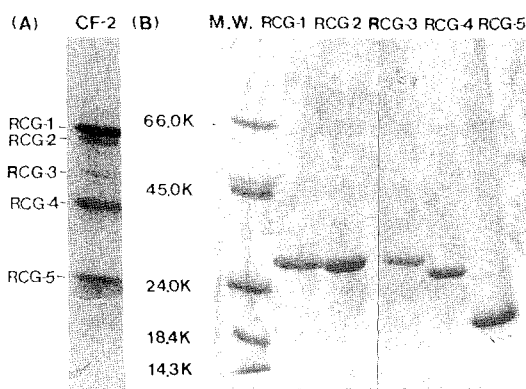


Fig. 2. Electrophoresis patterns of fractions separated by chitin affinity chromatography and gel slicing. A, Native PAGE, protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); CF-2, Fraction on chromatofocusing; B, SDS-PAGE, protein bands (stained with Coomassie brilliant blue); RCG-1, RCG-2, RCG-3, RCG-4, RCG-5, Fraction on gel slicing.

Table 1. Purification table of acidic protein fraction from rice leaves

Fraction		Total Activities (unit)	Total Proteins (mg)	Specific Activity (unit/mg)	Activity Ratio (G/C)
CF-2	G	1675.80	1.82	920,000	26.07
	C	62.75		34.00	
RCG-1	G	1136.16	1.14	996.63	568.08
	C	2.86		2.51	
RCG-2*	G	547.10	0.84	651.31	44.99
	C	12.16		14.48	
RCG-3	G	254.76	0.80	318.45	4.89
	C	52.01		65.01	
RCG-4*	G	72.82	1.15	102.35	1.62
	C	72.82		63.32	
GCG-5*	G	127.70	1.00	127.7	----

C, Chitinase activity; G, β -1,3-Glucanase activity
*Lysozyme activity (specific activity, unit/mg)
RCG-2; 0.767 RCG-4; 2.181 RCG-5; 0.888.

확인할 수 있었으며, pI는 3으로 나타났다(Fig. 3B).

최적활성 pH 및 온도

RCG-2의 pH 및 온도에 따른 두 효소활성의 변화를 조사하였다. Chitinase는 pH 4에서, β -1,3-glucanase는 pH 7에서 활성이 제일 높았으며(Fig. 4A), chitinase 활성은 최적 pH 이상 또는 이하에서 급격히 감소하여 pH 3과 5에서 최대 활성의 33% 만을 나타내고 있는 반면 β -1,3-glucanase 활성은 pH 3~8에서 최대 활성의 50% 이상을 보여주고 있어 chitinase 활성에 비하여 광범위한 pH에 걸쳐 작용하는 것으로 생각되었다(Fig. 4A).

효소활성이 최대로 나타나는 최적온도는 두 효소 모두 40°C로 나타났으나, 이들의 온도에 대한 영향은 pH에 대한 영향과 마찬가지로 서로 상이한 양상으로 나타났다(Fig. 4B). 즉, β -1,3-glucanase 활성은 20~83°C 전 범위에서 최대활성의 59% 이상을 나타내는 등 온도의 영향을 크게 받지 않았으나, chitinase 활성은 최적 온도 이상 또는 이하에서 급속히 감소하여서 20°C일 때 최대 활성의 27% 만이, 70°C 이상에서는 활성이 완전히 없어지는 것으로 나타났다(Fig. 4B). 따라서, 실험결과를 종합해 보았을 때 RCG-2의 chitinase 활성은 β -1,3-glucanase 활성에 비하여 pH 및 온도에 큰 영향을 받는 것을 알 수 있었다. Lysozyme 활성 RCG-2의 lysozyme 활성을 측정할 결과, 본 효소의 lysozyme 비활성도는 0.767

unit/mg protein 이었다(Table 1).

K_M, V_{max}

RCG-2의 chitinase 활성 K_M 및 V_{max} 값은 NAG₆를 이용하여 구한 결과 각각 7.86 mM, 0.025 M/min. 이었고, laminarin을 기질로 한 β -1,3-glucanase 활성 K_M 은 5.95 mM, V_{max} 는 0.16 μ M/min. 이었다.

이러한 결과는 버디에서 추출한 염기성 β -1,3-glucanase의 laminarin에 대한 K_M, V_{max} (0.47 mM, 1.38 M/min.),⁴³⁾ acacia 세포배양에서 얻은 exo β -1,3-glucanase의 K_M (0.64 mM)⁴⁴⁾ 보다 높은 수치여서, RCG-2 단백질이 다른 고등식물로부터 정제한 chitinase 및 β -1,3-glucanase

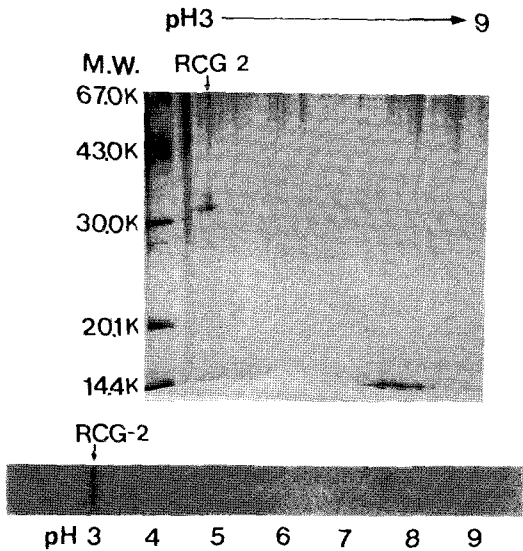


Fig. 3. Electrophoresis patterns of RCG-2. A, 2-dimensional PAGE, protein bands (stained with silver staining); RCG-2, Fraction on gel slicing; B, Isoelectrofocusing, protein bands (stained with silver staining).

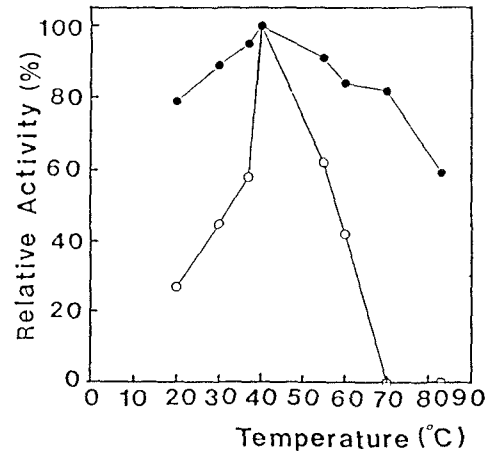
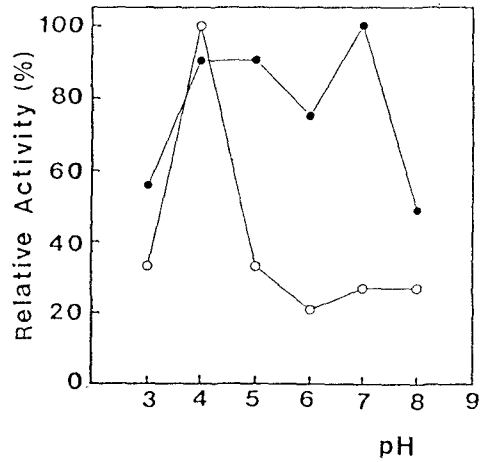


Fig. 4. Effect of pH and temperature on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of RCG-2. A, Effect of pH on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of RCG-2; B, Effect of temperature on the chitinase/ β -1,3-glucanase activity of RCG-2; ○-○, Chitinase activity; ●-●, β -1,3-Glucanase activity.

nase 보다 각 기질에 대한 친화력이 다소 떨어짐을 알 수 있었다. 이러한 현상은 RCG-2 이외에도 쥐 간의 peroxisome에 위치한 bifunctional β -oxidation enzyme에서도 찾아볼 수 있다.⁴⁵⁾

Chitinase의 작용양상

NAG₃로부터 NAG₆까지의 chitoofigosaccharide를 기질로 하여 RCG-2와 반응시키고 그 반응산물들을 TLC로 분석한 결과, NAG₃는 NAG와 NAG₂, NAG₄는 NAG₂, NAG₅는 NAG₂와 NAG₃, NAG₆는 NAG₂와 NAG₄로 각각 분해됨이 확인되었으므로(Fig. 5A), 본 효소가 endochitinase로 기능함을 추정할 수 있었다. 그러나, exochitinase도 NAG₃을 NAG와 NAG₂로 분해할 수 있으므로,⁴⁶⁾ 이를 조사하기 위하여 pNp-NAG를 기질로 한 RCG-2의 반응산물들을 TLC로 분석하였다. 그결과, pNp-NAG가 전혀 분해되지 않는 것으로 나타났으므로(Fig. 5B), 본 효소가 end형 chitinase인 것을 확인할 수 있었다.

고 찰

벼잎으로부터 추출, 정제한 단백질 RCG-2는, chitin 및 laminarin을 가수분해하는 chitinase 및 β -1,3-glucanase 활성을 함께 보유하고 있었으며(Table 1), 두 효소활성의 각 기질에 대한 pH 및 온도변화에 따른 효소활성양상(Fig. 3, 4)과 K_M 및 V_{max} 값에 뚜렷한 차이가

존재하였다. 또한, 본 효소는 *Micrococcus lysodeikticus* 세포벽을 가수분해할 수 있었으며(Table 1), 이러한 사실들과 전기영동 결과(Fig. 2, 3)를 종합해 볼 때, RCG-2는 서로 성질이 다른 효소활성들이 함께 존재하는 multifunctional enzyme으로 생각되었으며, SDS-PAGE 결과 다른 식물체에서 발견되는 PR-protein과 같이 subunit이 없는 단일 polypeptide로 나타났다(Fig. 2). RCG-2가 보유한 chitinase와 β -1,3-glucanase는 식물의 자가방어기작에 관여하는 PR protein의 일종으로, *in vitro*에서 두 효소의 병원성 미생물에 대한 성장저해 실험 결과 단독 처리시 보다는 두 효소를 동시 처리하였을 때 성장저해가 더 크게 나타나는 현상이 보고되고 있다.^{14,46)} 따라서, 두 효소활성이 함께 존재하는 RCG-2는 병원성 미생물에 대하여 매우 강력한 항균활성을 나타낼 것으로 추정할 수 있다.

본 효소는 chitin 및 laminarin에 대한 기질친화성이 기존의 chitinase와 β -1,3-glucanase에 비하여 1/5~1/10이었으며, 이는 두 가지 이상의 기질에 작용하는 bi 또는 multifunctional enzyme의 특징으로 추정된다.⁴⁵⁾ 벼의 RCG-2와 옥수수,^{11,23)} 보리,^{18-20,26)} 밀¹⁵⁾ 등 단자엽 식물^{17,29)}에서의 chitinase와 β -1,3-glucanase들을 비교해보면, 모두 저분자량의 isozyme으로 식물체 내에서 존재하며 end형 효소로 작용하는 공통점이 있었으나, 벼 이외의 단자엽 식물에서는 chitinase와 β -1,3-glucanase 활성이 단일 단백질에 함께 존재하는 multifunctional enzyme 형태로는 존재하지 않았다. 벼에서는 bifunctional enzyme인 RCG-2이외에도, 종자에서 β -amylase와 미생물의 단백질 분해효소인 subtilisin을 동시에 억제하는 20 Kd의 bifunctional inhibitor의 존재⁴⁷⁾가 보고되어 있어서, 또 다른 다기능성 물질의 존재 가능성을 추측할 수 있다. 현재 벼에서의 chitinase 및 β -1,3-glucanase 연구는, 두 효소의 mRNA 및 단백질생성유도현상³⁷⁾과 chitinase의 유전자 서열⁴⁸⁾ 및 이에 따른 class 분류⁴⁹⁾ 실험결과가 보고되고 있으나, 효소적 측면에 관한 연구는 아직 발표되어 있지 않다. RCG-2는 전기영동 이동도(Fig. 2), chromatofocusing(Fig. 1), 2-D PAGE 및 IEF 결과 산성단백질로 밝혀졌는데, 일반적으로 산성 chitinase 및 β -1,3-glucanase는 식물체내의 세포의 공간에 위치하여,⁵⁰⁾ 침입한 병원성 미생물들의 세포벽으로부터 식물의 방어작용을 촉진하는 신호전달물질(signaling molecules), 즉 elicitor^{51,52)}를 방출시키는 인지작용에 관여하여 식물의 자가방어작용에 기여하는 것으로 추정되고 있다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 지정 농업생물신소재연구센터

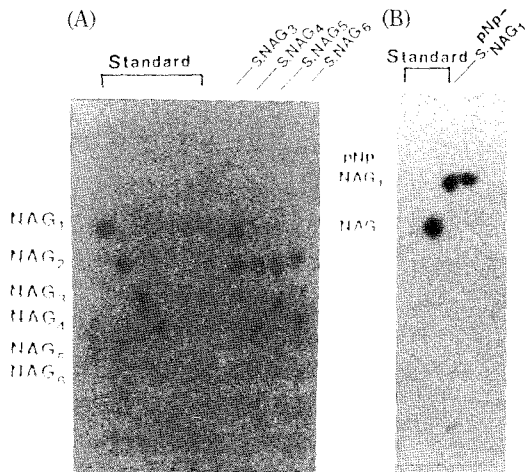


Fig. 5. Thin layer chromatograms of the hydrolysis products of NAG oligomers by RCG-2 as chitinase. A, Detection of the hydrolysates of NAG_{3,4,5,6} by RCG-2; B, Detection of the hydrolysates of pNp-NAG₁ (β -nitrophenyl NAG) by RCG-2; s. means the substrates for RCG-2.

의 부분 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Boller, T.: In 'Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives, Kosuge, T. and Nester, E. W. (ed), 1st, Ed., Vol. 2, Chap. 5, McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A.(1987)
2. Bowles, D. J.: Annu. Rev. Biochem., 59 : 873(1990)
3. van Loon, L. C.: Plant Mol. Biol., 4 : 111(1985)
4. Vinhyasekaran, P.: In 'Physiology of disease resistance in plants' Vol. 1, 2, Chap. 1, 2, CRC Press, Inc., Florida, U.S.A.(1989)
5. Ham, K. S., Kauffmann, S., Albersheim, P. and Davill, A. G.: Mol. Plant-Microbe Interact., 4 : 545 (1991)
6. Joosten, M. H. A. J. and De wit, P. J. M.: Plant Physiol., 89 : 945(1989)
7. Jung, J.-L., Fritig, B. and Hahne, G.: Plant Physiol., 101 : 873(1993)
8. Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. and Fritig, B.: EMBO J., 6 : 3209(1987)
9. Kombrink, E., Schr der, M. and Hahlbrock, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85 : 782(1988)
10. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84 : 6750(1987)
11. Nasser, W., De tapia, M., Kauffmann, S., Montasser-Kouhsari, S. and Burkard, G.: Plant Mol. Biol., 11 : 529(1988)
12. van Loon, L. C., Gerritsen, Y. A. M. and Ritter, C. E.: Plant Mol. Biol., 9 : 593(1987)
13. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and V geli, U.: Planta, 157 : 22(1983)
14. Boller, T.: In 'Oxford surveys of plant molecular and cell biology', Mifflin, B. J. (ed), Vol. 5, p. 145, Oxford University Press, Oxford, Great Britain (1988)
15. Broekaert, W. F., Van Parijs, J., Allen, A. K. and Peumans, W. J.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 33 : 319 (1988)
16. Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelson, J. D., Nielson, K. K., Rasmussen, U. and Vad, K.: Plant J., 3 : 31(1993)
17. Fink, W., Liefland, M. and Mendgen, K.: Plant Physiol., 88 : 270(1988)
18. Hrmova, M. and Fincher, G. B.: Biochem. J., 289 : 453(1993)
19. Jacobson, S., Mikkelson, J. D. and Hejgaard, J.: Physiologia Plantarum, 79 : 554(1990)
20. Koga, D., Nomura, Y., Tabata, H., Ide, A. and Nakamura, Y.: Biosci. Biotech. Biochem., 56 : 1331(1992)
21. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Physiol. Mol. Plant Pathol., 31 : 201(1987)
22. Kurosaki, F., Tashiro, N. and Nishi, A.: Phytochemistry, 28 : 2989(1989)
23. Labrador, E. and Nevins, D. J.: Physiologia Plantarum, 77 : 479(1989)
24. Martin, M. N.: Plant Physiol., 95 : 469(1991)
25. Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T.: Plant Physiol., 87 : 325(1988)
26. Swegle, M., Kramer, K. J. and Muthukrishnan, S.: Plant Physiol., 99 : 1009(1992)
27. Verburg, J. G. and Huynh, Q. K.: Plant Physiol., 95 : 450(1991)
28. Wadsworth, S. A. and Zikakis, J. P.: J. Agric. Food Chem., 32 : 1284(1984)
29. Yamagami, T. and Funatsu, G.: Biosci. Biotech. Biochem., 57 : 643(1993)
30. Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P.: J. Gen. Microbiol., 134 : 169(1988)
31. van Loon, L. C.: In 'Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives, Kosuge, T. and Nester, E. W. (ed), 1st, Ed., Vol. 3, Chap. 8, McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A.(1987)
32. Ary, M. B., Richardson, M. and Shewry, P. R.: Biochim. Biophys. Acta., 993 : 260(1989)
33. Cline, K. and Albersheim, P.: Plant Physiol., 68 (1981); 207
34. 엄성연, 김수일: 한국농화학회지 36 : 370(1993)
35. Rickwood, D., Chambers, J. A. A. and Spragg, S. P.: In 'Gel electrophoresis of proteins: practical approach', Rickwood, D. and Hames, B. D. (ed), 2nd Ed., p. 228, IRL press, Oxford, Great Britain (1991)
36. Merril, C. R., Harasewych, M. G. and Harrington, M. G.: In 'Gel electrophoresis of proteins', Dunn, M. G. (ed), p. 323, Wright, Bristol, Great Britain (1986)
37. Molano, J., Polacheck, I., Duran, A. and Cabib, E.: J. Biol. Chem., 254 : 4901(1979)
38. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, B. J., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Anal. Biochem., 150 : 76(1985)
39. Wong, Y. and Maclachlan, G. A.: Biochem. Acta, 571 : 256(1979)
40. Krebs, K. G., Heusser, D. and Wimmer, H.: In 'Thin-layer chromatography', Stahl, E. (ed), 2nd, Ed., p. 832, Springer-Verlag, New York, U.S.A. (1966)

41. Kirchner, J. G. : In 'Technique of chemistry', Perry, E. S. (ed), 2nd, Ed., Vol. 14, p. 200, John Wiley & Sons, Inc., New York, U.S.A.(1978)
42. 윤기도: 서울대학교 석사학위 논문(1992)
43. 최홍규: 서울대학교 석사학위 논문(1992)
44. Lienart, Y., Comtat, J. and Barnoud, F.: *Biochim. Biophys. Acta*, 883 : 353(1986)
45. Yang, S. Y., Cuebas, D. and Schulz, H.: *J. Biol. Chem.*, 261 : 15390(1986)
46. Mauch, F., Mauch-mani, B. and Boller, T.: *Plant Physiol.*, 88 : 936(1988)
47. Otsubo, K. I. and Richardson, M.: *FEBS Lett.*, 309 : 68(1992)
48. Zhu, Q. and Lamb, C. J.: *Mol. Gen. Genet.*, 226 : 289(1991)
49. Flach, J., Pilet, P. E. and Joll s, P.: *Experientia*, 48 : 701(1992)
50. Samac, D. A., Hironaka, C. M., Yallaly, P. E. and Shah, D. M.: *Plant Physiol.*, 93 : 907(1990)
51. Anderson, A. J.: In *Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives*, Kosuge, T. and Nester, E. W. (ed), 1st, Ed., Vol. 3, McGraw-Hill, Inc., New York, U.S.A.(1987)
52. Mauch, F. and Staehelin, L. A.: *The Plant Cell*, 1 : 447(1989)

Isolation and Properties of a Protein, RCG-2, Having Chitinase, β -1,3-Glucanase and Lysozyme Activities from Rice Leaves

Sung-Yon Um and Su-Il Kim* (Department of Agricultural Chemistry and Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea)

Abstract : An acidic protein, RCG-2, containing chitinase and β -1,3-glucanase activity concurrently was purified from rice leaves by chromatofocusing and gel slicing. The purified enzyme gave a single band on polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was appeared to be 29.7 kd using SDS-PAGE. This enzyme also had lysozyme activity. The optimal temperature for both enzyme activities was 40°C, optimal pH were 4.0 for chitinase activity and 7.0 for β -1,3-glucanase activity. K_M and V_{max} values for chitinase were 7.86 mM and 0.025 μ M/min., and those for β -1,3-glucanase were 5.95 mM and 0.16 μ M/min. respectively. TLC analysis of the enzyme hydrolysates of chitooligosaccharides indicated that this enzyme acts as endochitinase.