

강낭콩과 대두 잎에서 세포간액 키틴분해효소의 분포와 유도

박노동^{1*} · 조유영¹ · 전덕영²

¹전남대학교 농화학과, ²식품영양학과

초록 : 식물-미생물 상호작용에 관한 연구의 일부로 식물 병저항성 단백질로 간주되는 키틴 분해효소(Chitinase, EC 3.2.1.14)의 식물 세포간액에의 분포와 유도를 몇가지 조건에서 연구하였다. 강낭콩과 대두의 잎에서 병원균, 상처, 에틸렌 등의 스트레스 조건에서 유도되는 endochitinase 가운데 강낭콩에서는 34 kD chitinase가, 대두에서는 30 kD와 36 kD chitinase가 뚜렷이 세포간액에 축적되었다. 스트레스 조건에서 시간이 경과함에 따라 이들의 세포간액에 축적되는 양은 많아졌다(1994년 7월 25일 접수, 1994년 9월 1일 수리).

서 론

키틴분해효소(Chitinase, EC 3.2.1.14)는 곰팡이 세포벽의 주요구성분인 키틴(chitin)의 N-acetyl-D-glucosamine polymer의 β -1,4-glycosidic linkage를 가수분해시키는 효소이며, 식물에서 이의 활성은 상처, 에틸렌, 병원균의 감염 등의 스트레스 조건에 노출되면 증가한다.^{1,2)} 이 효소는 대부분의 식물에 널리 분포하지만 이의 기질은 식물에서 발견되지 않는다. 그러므로 이 단백질은 병원균의 침입에 대한 식물의 방어기능을 담당하는 방어 단백질의 하나일 것으로 오래 전부터 간주돼왔다.³⁾

강낭콩 잎의 chitinase가 조제된 *Fusarium oxysporum* 세포벽 성분을 분해하였으며,²⁾ 보리에서 정제한 chitinase는 시험한 몇가지 병원균의 생장을 저해하였고,³⁾ 더우기 에틸렌이나 병원균을 처리한 식물체에서 얻은 조효소액은 더욱 증강된 항균활성을 보였다.⁴⁾ 보고 등을 미루어보면, 식물 chitinase가 식물의 병저항성 기구 구성체로서 병원균의 침입으로부터 숙주를 방어하는 역할을 할 것처럼 보인다. 그렇지만 이 효소가 병저항성 기구로 관여하는지에 관한 직접적인 증거는 아직도 불충분한 실정이다. 병저항성과 관련하여 chitinase의 역할을 이해하기 위하여는 스트레스 조건에서 이의 동위 효소들이 어디에 각각 축적되는가를 아는 것이 중요하다.

우리는 전보에서⁵⁾ 강낭콩 잎의 파쇄물에서 chitinase 동위효소가 몇가지 스트레스 조건에서 특이하게 유도되는 것을 활성염색을 통하여 보고한 바 있다. 본 연구에

서는 강낭콩과 대두의 잎에서 에틸렌, 상처, 병원균을 처리하고 세포간액(Intercellular fluid)에서 키틴분해효소 동위효소를 조제하여 스트레스에 따른 이들의 특이한 분포와 유도를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재배

식물재료로 강낭콩(*Phaseolus vulgaris*, L.)과 대두(*Glycine max*, L.)를 암실에서 3일 동안 키워 발아시킨 후, vermiculite 묘상에 심어 옥외에서 5엽이 될 때까지 키웠다.

식물체의 처리

1) 에틸렌

식물체를 온전히 데시게이터에 옮긴 다음 1 mg/m³의 농도의 ethephon을 충분히 분무하고 6시간과 30시간 후에 각각 3, 4, 5엽을 채취하였다.

2) 병원균

*Fusarium oxysporum*을 PDA broth에 24시간 현탁배양해서 이를 5배 희석하여 에틸렌과 같은 방법으로 처리한 뒤 잎을 채취하였다.

3) 상처

식물체의 3, 4, 5엽을 따서 각각 사방 1 cm로 잘라서 두 개의 삼각 플라스크에 넣은 다음 밀폐하여 6시간과 30시간 후에 잎을 수거하였다.

Key words : Intercellular fluid, chitinase, enzyme induction, activity staining, stress, bean, soybean

*Corresponding author : R.-D. Park

세포간액의 조제

각각 처리된 잎을 증류수가 담긴 비이커에 넣고 잎이 뜨지않도록 사기 조각을 얹은 다음 강낭콩잎에는 10분간, 대두잎에는 20분간 각각 vacuum을 걸어주었다. 이들을 Kimwipes 위에 놓고 간단히 물기를 제거한 다음, 플라스틱 주사기 내에 잎을 말아넣었다. 이를 원심분리관에 꽂아 넣은 다음 4℃, 5000 rpm, 10분간 원심분리하여 세포간액을 얻었으며, 이를 희석하지 않고 사용하였다.⁶⁾

키틴분해효소의 활성염색(Activity Staining)

SDS-PAGE상에서 chitinase 동위효소를 전보에⁹⁾ 보고한 대로 Trudel과 Asselin의 방법⁷⁾ 따라 활성염색하여 검출하였다. 즉, 0.1% glycol chitin이 포함된 12.5% SDS-PAGE를 Laemmli의 방법에 따라 조제하고 전기영동하였다.⁸⁾ SDS sample buffer에는 2-mercaptoethanol을 넣지 않았다. 전기영동이 끝난 후 SDS를 제거하기 위해서 gel을 1% Triton X-100/1% skim milk/150 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에서 2시간 동안 37℃에서 배양한 후, 다시 1% Triton X-100/150 mM sodium acetate buffer에서 1시간 배양하였다. 이 gel을 0.01% Calcofluor White M2R/0.5 M Tris-HCl(pH 8.9) 용액에서 7분간 배양한 후 증류수로 충분히 세척하고 UV illuminator 위에서 UV를 조사하여 lytic zone을 관찰하고 황색 필터를 사용하여 사진을 찍었다.

결과 및 고찰

우리는 강낭콩 잎에 에틸렌을 처리하면 chitinase가

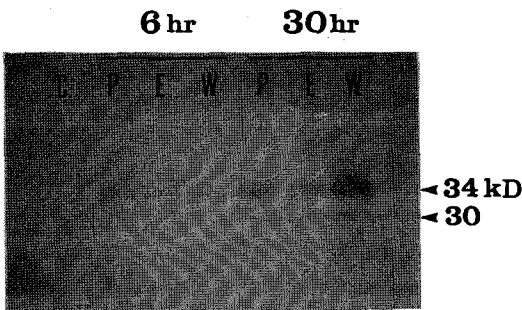


Fig. 1. Induction of intercellular endochitinases in bean leaves. Plants were treated with pathogen *Fusarium oxysporum* (P), ethylene (E), or wounding (W) for 6 hr or 30 hr. Control (C) is included. Intercellular fluids were prepared, separated in 12.5% SDS-PAGE containing 0.01% glycol chitin, and stained with Calcofluor White M2R.

유도되는 것과, 이때 유도되는 30 kD chitinase를 정제하고 그 성질을 일부 밝혔으며, 이는 상처와 병원균의 감염에 의하여도 유도되는 것을 확인한 바 있다.^{5,9)}

각종 처리를 마치고 세포간액을 조제하기 위하여 본 실험에 사용된 대두 잎의 무게는 1.5~1.9 g이었으며, 강낭콩의 잎의 무게는 1.0~1.3 g이었다. 위의 방법에 따라 감염하에서 증류수를 침투시킨 다음 원심분리하면 대개 500 μ l/g 정도의 세포간액이 침출되어 나왔다. 이때 강낭콩 잎 침출액의 단백질의 농도는 8~30 mg/ml이었고 대두 잎의 그것은 1~2 mg/ml 범위였으며, 이를 희석하거나 농축하지않고 바로 전기영동에 사용하였다.

Fig. 1은 강낭콩 식물체에 몇가지 스트레스를 준 다음 그 잎에서 조제한 세포간액을 전기영동하여 chitinase를 활성염색한 결과이며, 34 kD chitinase가 세포간액에 뚜렷이 축적되었다. 이와 같이 세포간극에 chitinase 동위효소가 축적되었다는 여러 보고들이 있다. TMV의 처리에 의하여 유도된 담배 chitinase 동위효소 가운데 들이 세포간극에 축적되었으며,¹⁰⁾ 감자 잎에서 병원균 또는 elicitors의 처리에 의하여 유도된 6개 chitinase 동위효소 가운데서 넷이 세포간극에 축적되었으며,¹¹⁾ 보리의 잎에서 병원균의 감염에 의해 유도되는 몇가지 chitinase 가운데 class II chitinase와 class III chitinase도 세포간극에 축적되었다.¹²⁾

이 34 kD chitinase는 막수송과정을 통하여 세포간극으로 수송되는 분비 단백질의 하나로 여겨지는데, 그것은 강낭콩 chitinase가 전구체 형태로 합성되며¹³⁾ 에틸렌에 의하여 유도되는 강낭콩 chitinase는 27잔기의 신호서열을 가지고 있었다는¹⁴⁾ 보고 등에 비추어볼 때 그러하다.

한편, 이 결과는 병저항성 관련 단백질인 chitinase가 보다 효율적으로 병원균의 세포벽을 가수분해하기 위하여는 여러 식물병원균들의 일반적 공격위치가 되는 세포간극에 축적되어 있어야한다는 요구를 충족시키는 것이기도 하다.

이 34 kD chitinase는 대조에서는 아주 약하게 그 활

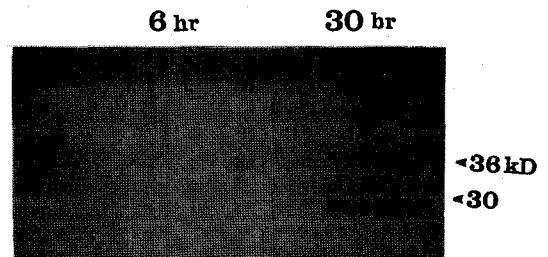


Fig. 2. Induction of intercellular endochitinases in soybean leaves. Treatments are same as in Fig. 1.

성이 검출된데 비하여 병원균의 감염, 에틸렌, 상처 등의 스트레스 조건에 오래 접하면 접할수록 더 많은 활성이 세포간액에 축적되었다. 이는 강낭콩 잎과 감자에서 각각 에틸렌과 병원균의 처리시간에 비례하여 chitinase가 유도되었다는 보고와 일치하는 것이다.^{11,13)}

전보에서⁵⁾ 우리들은 강낭콩 잎에서 조제한 조효소액을 전기영동한 후 활성염색하여 6개의 chitinase 동위효소를 확인하였으며, 이들 동위효소들이 에틸렌, 상처, 병원균 등의 스트레스에 의하여 특이하게 유도 조절되는 것을 확인하였다. 이때 30 kD chitinase는 이러한 스트레스에 의하여 가장 강하게 유도되는 동위효소였다.

그렇지만 본 실험에서 강낭콩 30 kD chitinase는 어느 경우이나 아주 미미하게만 세포간액에 나타났으며, 나머지 동위효소의 활성은 전혀 확인할 수 없었다. 스트레스에 의하여 강하게 유도되는 30 kD chitinase가 세포간액에서 거의 검출되지 아니한 까닭은 30 kD chitinase가 에틸렌의 처리에 의하여 강하게 유도되는 class I chitinase이지만 이것이 주로 액포에 저장되면서 세포 외로의 분비는 되지 않기 때문으로 보인다. Boller와 Vogeli는 강낭콩 잎에서 에틸렌에 의하여 유도되는 chitinase는 에틸렌 접촉시간에 비례하여 유도되며 그 활성은 대부분이 액포에 분포한다는 것을 조직과 원형질체에서 확인한 바 있으며,¹³⁾ Mauch와 Staehelin도¹⁵⁾ 강낭콩 잎에서 에틸렌에 의하여 유도되는 chitinase는 액포에만 분포하는 것을 확인하였다.

한편, 강낭콩 잎에 스트레스를 주었을 때, 스트레스에 의하여 유도되는 30 kD chitinase가 그 잎에서 조제한 조효소액에서는 뚜렷이 유도된 것처럼 나타났지만⁵⁾ 세포간액에서는 거의 그 활성이 나타나지 아니하였다는 것은, 세포간액의 조제과정에서 염려되는 세포의 파손이나 파괴에 의한 세포내 효소들의 누출은 거의 일어나지 않는다는 것을 시사한다. 그러므로 전보에서⁵⁾ 확인된 6개의 chitinase 동위효소 가운데 Fig. 1에 나타나지 아니한 4개의 동위효소와 30 kD chitinase는 아마도 세포내에 분포하는 효소(intracellular chitinase)일 것으로 보였다.

Fig. 2는 대두의 잎에서 조제한 세포간액을 전기영동하여 chitinase를 활성염색한 것으로, 스트레스 조건에 30시간 노출된 경우에 30 kD와 36 kD chitinase가 축적되는 것을 보여준다. 강낭콩의 경우와 다르게 30 kD chitinase의 축적이 눈에 띄며, 36 kD chitinase 동위효소와 거의 비슷한 수준으로 세포간액에 분포하였다. 병원균의 처리에 의한 chitinase의 유도가 30시간까지도 뚜렷하지 않았으나, 상처를 준 경우에 30 kD와 36 kD의 chitinase 동위효소가 가장 많이 세포간액에 축적되었다. 에

틸렌의 처리시에도 30 kD chitinase와 함께 36 kD 동위효소가 축적되었다.

이는 두가지 점에서 강낭콩 잎에서 발견된 것과 다르다. 먼저 강낭콩 잎에서는 34 kD chitinase가, 대두 잎에서는 36 kD chitinase가 세포간액에 축적되는 chitinase이며, 또하나 강낭콩에서 축적되지 아니한 30 kD chitinase가 대두의 세포간액에는 축적되었다는 것이다.

이런 차이의 원인으로 우선 chitinase는 식물의 종류에 따라 다양한 동위효소를 가지고 있으며, 조직에 따라 또는 발육단계별로 또는 조직배양한 시료의 경우 배양 방법과 배양액의 조성에 따라 이들이 특이적으로 조절 발현된다는 것을 꼽을 수 있다.¹²⁾ 한편, 본 활성염색법은 그 원리상 endochitinase 활성만을 보다 예민하게 검출한다는 한계를 갖고있다는 것이다. 식물의 chitinase는 일반적으로 endochitinase로 알려져있지만 그 동위효소마다 endochitinase와 exochitinase의 활성비가 서로 다를 수 있다.²⁵⁾

종합하건대, 강낭콩이나 대두의 잎에서 병원균, 상처, 에틸렌 등의 스트레스 조건에서 endochitinase가 뚜렷이 유도되며 그 중에 일부 동위효소는 주로 세포간극에 축적되었다. 이들의 세포간극에 축적되는 양상은 대두와 강낭콩에서 서로 달랐다. 세포간극에 축적된 chitinase들은 침입해오는 병원균의 세포벽을 일차적으로 공격할 것으로 예상하지만, 이렇게 유도된 세포간극의 chitinase가 반드시 병원균을 공격하는 방어기구가 된다고는 아직 말할 수 없다. 왜냐하면 세포간극 chitinase는 병원균 뿐만 아니라 에틸렌이나 elicitor 등에 의하여도 유도되기 때문이다.

감사의 글

이 논문은 1991년도 교육부 유전공학 학술연구조성비 지원에 의하여 연구된 내용의 일부이며, 연구비의 지원에 감사합니다.

참 고 문 헌

1. Abeles, F. B., Bosshart, P. P., Forrence, L. E. and Habig, W. E. (1971) *Plant Physiol.* 44, 129-134
2. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. (1983) *Planta* 157, 22-31
3. Roberts W. K. and Selitrennikoff, C. P. (1988) *J. General Microbiol.* 134, 169-179
4. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. and Boller, T. (1986) *Nature* 324, 365-367

5. 박노동, 이춘명, 전덕영 (1992) 한국생화학회지 25, 101-106
6. de Wit, P. J. G. M. and Spikman, G. (1982) *Physiol. Plant Pathol.* 21, 1-11
7. Trudel, J. and Asselin, A. (1989) *Anal. Biochem.* 178, 362-366
8. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
9. Park, R. D., Lee, C. M. and Park, N. M. (1991) *Kor. Biochem. J.* 24, 121-126
10. Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6750-6754
11. Kombrink, E., Schroder, M. and Hahlbrock, K. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 782-786
12. Kragh K. M., Jacobson, S., Mikkelsen, J. D. and Nielsen, K. A. (1993) *Physiol. Plant.* 89, 490-498
13. Boller, T. and Vogeli, U. (1984) *Plant Physiol.* 74, 442-444
14. Broglie, K. E., Gaynor, J. J. and Broglie, R. M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6820-6824
15. Mauch, F. and Staehelin, L. A. (1989) *Plant Cell* 1, 447-457

Induction of intercellular chitinase isozymes in bean and soybean leaves under stress

Ro-Dong Park^{1*}, Yu-Young Cho¹, and Deok-Young Jhon² (¹Department of Agricultural Chemistry, and ²Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea)

Abstract: Using the enzyme activity staining, we studied the induction and distribution of chitinase isozymes, pathogenesis-related proteins, in intercellular fluids of bean and soybean leaves under stress conditions. The chitinase in intercellular fluids was barely detected in healthy plant leaves. By treatment of ethylene, pathogen (*Fusarium oxysporum*), or wounding, only 34 kD intercellular endochitinase was induced in bean leaves, while 30 kD and 36 kD intercellular endochitinases were induced in soybean leaves.