

## 고등식물의 병원균에 대한 항균성을 나타내는 효소(Chitinase와 Glucanase)에 관한 고찰

홍순강

전북대학교 화학과

### The Study of antibiotic Enzyme from higher plant

Soon Kang Hong

*Department of Chemistry, Chon buck National University*

#### Abstract

Several reports have suggested that these hydrolases(chitinase, glucanase) are likely involved in defense reactions in this plant.

In this paper, Induction by ethylene, mechanism, properties and function for Activation of these enzymes were Summarized.

#### I. 서론

고등식물들은 병원균 침입에 대한 방어능력은 polypeptide들을 생합성축적하여 병에 대한 저항성을 강화하게 된다<sup>1,2)</sup> 이들을 분류해보면 세균과 곰팡이에 유도한 이차대사물인 phytoalexin의 생합성에 관여하는 효소들, 식물세포벽의 변조(modification)을 통하여 fungi 침입에 대한 물리적 장벽을 형성하도록 하는 효소들, Serine endoprotease 들과 같은 해체들, fungi 세포벽을 분해시키는 분해효소

(lytic enzyme)들이 있다<sup>3)</sup>

병원균이 식물체를 공격할 때 병원균의 성장을 저해하기 위하여 식물체가 방어 반응으로 새로이 합성을 시작하는 단백질 가운데 Chitinase와 glucanase는 각각 병원균 세포벽의 구성 성분인 chitin과 1,3-β-glucanase을 분해하여 침입을 저지하는 것으로 알려져 있다.

#### II. 본론

##### 1. 생화학적 특성

정제된 효소는 pathogenic fungi의 세포벽을 파괴시키는 활성을 나타내고 있으며<sup>4)</sup> lysozyme의 활성을 나타내고 있다.<sup>5)</sup> Chitinase는 곰팡이 세포벽의 주요 구성분인 chitin의  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage(N-acetyl-D-glucosamine polymers)를 가수 분해시키는 효소인데(그림 1.A) 식물에는 존재하지 않는 Chitin이 기질로 작용하고 Oomycetes를 제외한 미생물 세포벽의 주요 구성분을 이루고 있다.<sup>5)</sup>

Boller(1983)등은 ethylene에 의해 유도된 chitonolytic 활성의 95%가 endochitinase화했으며 분자량은 콩잎에서 30000dalton이고 박테리아 세포벽에서 peptidoglycan의 n-acetyl-b-d-muramate의 c-1 과 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine의 C4사이의 glycosidic bond를 가수분해 하는 Isozym의 활성이 있는 것으로 보고하였다(그림 1.B)

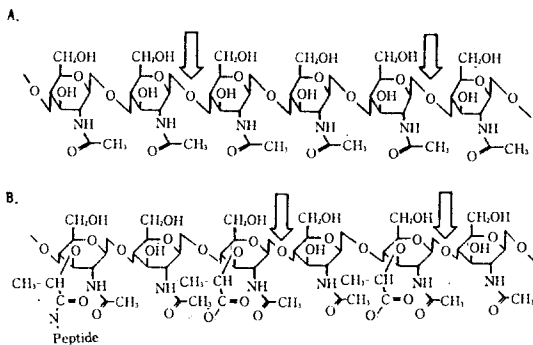


Fig. 1. A.B Chitin and bacterial peptidoglycan, two substrates for plant chitinase. (A) Chitin, a  $\beta$  1, 4- polymer of N-acetylglucosamine(Boller et al., 1983) (B) bacterial peptidoglycan (Howard and Glazer, 1979)

Chitinase의 활성은 상처 또는 미생물의 elicitor<sup>6,7)</sup>에 의해 현저하게 증가하여 chitinase는 미생물의 공격에 대한 과민성 저항 반

응에 관여하고 있다.

정제된 식물체의 glucanase와 chitinase의 병원성 진균의 세포벽을 분해시키고 성장을 저해하는 것으로 알려져있다.<sup>9)</sup>

## 2. 분해성 효소의 종류와 방해기작

chitinase와 glucanase는 완두<sup>10)</sup>, 담배<sup>11)</sup>, 토마토<sup>2)</sup>, 강남콩<sup>12)</sup> 그리고 알팔파<sup>13)</sup> 등에 몇가지 isozyme 형태로 존재한다.

glucanase는 basic glucanase와 acidic glucanase가 있으며 강남콩의 basic glucanase는 acidic glucanase보다 훨씬 다량으로 존재하며 분자량은 35KD이고 주로 액포에 존재한다.<sup>12)</sup>

Acidic glucanase들은 미량으로 존재하며 분자량은 28KD와 30KD 정도로 주로 세포벽에 존재하는 것으로 알려져 있다. 또한 액포에는 미량이 존재하고 병원균 침입시 저항성이 있는 품종이 이병성이 있는 품종보다  $\beta$ -1,3-glucanase의 발현 유도 시기 및 생성 속도가 훨씬 빠르다<sup>14)</sup>. glucanase는 침입 병원균의 세포벽으로부터 elicitor 역할을 하는 glucan 분자를 생기게 해서 glucanase의 생성은 물론 항 미생물성 phytoalexin의 생성과 세포벽 강화에 필요한 다른 효소들의 생성을 촉진한다.

chitinase의 분류로는 아미노산서열과 세포내의 위치를 토대로 3종류로 나눈다. 이중 basic chitinase는 주로 중앙액포에 위치하고 있으며 catalytic domain은 고목나무의 Hevein과 유사한 cystein-rich domain을 가지고 있다. acidic chitinase는 acidic isoform으로서 Hevein domain이 없다. 또한 보통 식물 잎의 경우에는 세포의 체액에 존재하고 현탁 세포 배양액에 있는 것으로 보아 apop-

lastic compartment에 위치하며 방어 반응의 역할을 하는 것으로 생각된다. 최근 오이에서 발견된 chitinase와 같은 chitinase는 basic chitinase와 acidic chitinase와는 유사성이 없으나 parthernocissus quin quifolia의 lysozyme과 유사하다. 대부분의 chitinase는 basic chitinase이며 acidic chitinase는 미량으로 존재한다.<sup>15)</sup> chitinase와  $\beta$ -1, 3-glucanase 방어반응에 대한 모형은 그림 2와 같이 나타낼수있다.

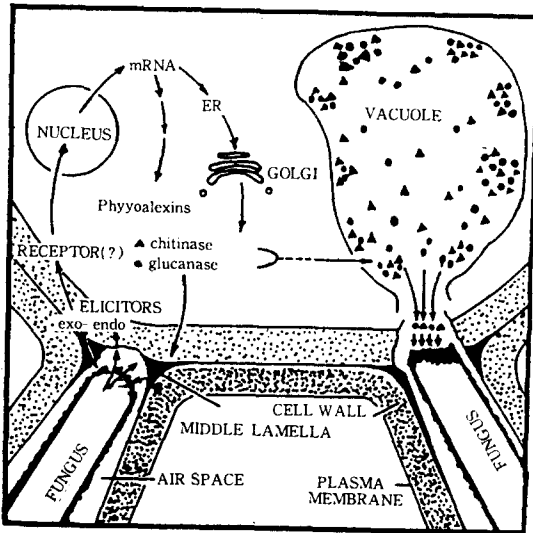


Fig. 2 Model outlining for the roles of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in a bean plant's defense against pathogen attacks (Mach. F., and Staehein, L. A., 1989)

Boller(1983)등은 chitinase와  $\beta$ -1, 3-glucanase로 식물성 호르몬인 ethylene이나 병원균의 반응 혹은 elicitor에 의해 유도된다고 보고하였다. 다양한 가수분해효소들은 병원균과 반응해서 유도 되는대  $\beta$ -1, 3-glucanase는 식물의 Virus 침입과정서 강하게 증가된다.<sup>17,18)</sup> 그러나 chitinase와  $\beta$ -1, 3-

glucanase의 활성은 진균감염에 대해서는 똑같이 유도되는것이 관찰되었다.<sup>19)</sup> chitinase와 glucanase 두효소는 강낭콩 잎에서 ethylene에 의해 발현이 강하게 촉진되는데 glucanase는 ethylene을 처리한 강낭콩 잎의 세포벽과 액포에 존재하는반면 chitinase는 액포에만 제한적으로 존재한다.<sup>16)</sup> 액포 내 효소들은 최후 방어선의 역할을 하는 한편 세포벽에 위치하고 있는 glucanase는 elicitor의 방출및 인식에도 관련이 있는것으로 생각된다.

Ethylene에 의한 chitinase와  $\beta$ -1, 3-glucanase의 유도는 Abeles와 Firrence (1970)에 의해서 처음으로 관찰되기 시작하여 ethylene의 영향에 대하여 자세히 연구되어 왔다.<sup>5)</sup>

최근에 고등식물에 대한 유전공학의 기법이 놀라울 정도로 진전되고있어서 chitinase와  $\beta$ -1, 3-glucanase에 대한 유전자를 cloning하여 농작물에 병저항성 있는 개체를 개발하는데 연구가 집중되고 있다.

### III. 결 론

분해효소의 유도에 관한 실험과정에서  $10 \mu$  l/ml 에틸렌을 처리했을때, 많은양의 chitinase가 짧은시간에 생성되고 ethylene의 처리후 24시간 정도에 30배가 증가하며 잎에서 생성된 전체 단백질의 1%이상의 많은양이 포함되어 있다(Boller 1983) 이러한 사실을 유전공학적인 방법의 단일단계 유도과정을 이용하여 직접 방어기작에 관여하는 유도과정을 이용하여 직접 방어기작에 관여하는 것으로 생각되는 Chitinase와 glucanase의 발현양상 및 작용부위의 조절과 고도의 활성을 갖는 혼

성효소를 개발하는 등 이를 통하여 식물체의 병원 저항성을 증진 시킬수있는 가능성을 나타내고 있다. 또한 이들 유전자의 분리와 발현 기작등에 대한 연구는 물론 유전자의 조작에 의한 효소의 역할규명과 유전자의 실용적 이용을 가능하게 하였다.

Table 1. Amino acid composition of endochitinase Wheat germ(Molano *et al.*, 1979): bean leaf deduced from cDNA(Brogli *et al.*, 1986): potato leaf deduced from cDNA (Gaynor 1988). Values are given as numbers of residues per molecule assuming the molecular mass included in the table.

Amino acid	wheat germ	Bean leaf	Potato leaf
Asx	28	29	40
Thr	22	22	12
Ser	24	26	23
Glx	20	22	18
Pro	15	20	22
Gly	52	37	44
Ala	27	26	21
Cys	12	16	17
Val	14	10	9
Met	3	2	3
Ile	9	11	15
Leu	13	17	14
Tyr	14	15	11
Phe	14	13	15
His	4	3	4
Lys	8	8	8
Arg	14	16	18
Trp	4	7	8
No of residues	297	301	302
Mol. mass, kDa	30.9	32.4	32.5

유전정보의 DNA RNA 단백질간의 흐름에 대한 이해를 유전자의 조작에 의하여 유전정보의 최종 생성물인 단백질의 생산량과 성질

의 조절이 가능하게 됨에 따라 유전자의 조작에 의하여 유전자의 분리가 진전되고 있다. <표 1>

강남콩<sup>1)</sup>, 담배<sup>20)</sup>, 오이<sup>15)</sup>, 감자<sup>21)</sup>등의 Chitinase유전자와 담배<sup>22)</sup>, 강남콩<sup>23)</sup>의 glucanase 유전자가 분리되었으며 국내에서도 강남콩의 chitinase의 c-DNA Clone이 분리되었다.<sup>24)</sup>

#### IV. 고찰

고등식물에서 항균성이 있는 가수분해 효소에 대한 연구는 주로 쌍자엽식물을 대상으로 하였으며 단자엽 식물에 대한 연구는 희귀하다. 최근 단자엽 식물에서 가수분해효소에 대하여 연구가 되어 벼의 chitinase genomic clone<sup>24)</sup> 보리의 glucanase의 c DNA Clone<sup>25)</sup> 이 분리되었다. 단자엽식물의 유전자가 분리되고 발현될수 있다면 장래에 환경오염의 주요 원인 농약의 사용없이도 병에 저항이 강한 농작물의 품종이 개발될것이 기대된다. 본인등은 이런 가수분해효소 특히 chitinase의 분리정제와 이효소의 3차원구조를 밝혀 활동부위(active site)를 알아 내고 효소의 구조적특성을 연구중에 있다.

#### 참고 문헌

1. Broglie K. E, J.J.gayner and R.M. Brogil: Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A. 83, 6820-6824, 1986.
2. Kombrink,E, M. Schrodor and K. Hahlbrock: Proc.natl.Acad.scu U.S.A 84, 782-786, 1988.
3. Matthien,H,A, J.Joosten,J.G.Pierre and

- MDewit : Plant Physiol., 89, 945-951, 1989.
4. Pegg.G.F. and Young,D.H. : Physiol. Plant Phthol.,14, 127-133, 1982.
  5. Boller,T.,Gehri, A., Mauch, F. and Voger,U : Planta,157, 22-31, 1983.
  6. Hedick,S,A., Bell,J.H., Boller,T. and Lanb,C.j. : Plant physiol.,86, 182-186, 1988.
  7. Parsons et al : Proc, Natl .Acad. Sci. U. S.A., 86, 7895-7899, 1989.
  8. Metraux,J.P. and Boller, T. : Physiol. Plant Phtol., 28, 161-169, 1986.
  9. Schlumbaum,A., Mauch, F. Vogeli U. and Boller T. : Nature 324, 365-367, 1986.
  10. Mauch,F., Mauch- Mani.B.,Boller,T. : Plant physiol. 88, 936-942, 1988.
  11. Kauffman,S., Legrand,M, Geoffrey,P. and Fritig,B. : EMBO J.,6, 3209-3212, 1988.
  12. Awade et al : Plant Sci., 63, 121-13, 1989.
  13. Mazau,D. and Esquerre- Tugaye,M.T. : Physiol.Mol.Pathol., 29, 147-157, 1986.
  14. Benhamou,N., Grenier,J., Asselin,A., Legrnad,M : Plant Cell, 1, 1209-1221, 1989.
  15. Metraux,J.P.,Burkhart,W., Moyer,M., Dincher,S., Willians,S., Payne,G., Carnes.M., Ryals,J. : Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A., 86, 896-900, 1988.
  16. Mauch,F. and Staehelin,L.A. : Plant Cell, 1, 447-57, 1989.
  17. Moore,H.E. and Stone,B.A. : Virology, 50, 791-798, 1972.
  18. Kearney,C.M. and Wu,J.H. : Can.J.Bor., 62, 1984-1988, 1984.
  19. Mauch,F., Habwigr,L.A. and Boller,T. : Plant physiol.,76, 607-611, 1984.
  20. Shinshi,H., Mohned,D., Meins,F.Jr. : Proc.Natl.Acad.Sci., U.S.A., 84, 89-93, 1987.
  21. Gaynor,J.J. : Nucl.Acids res., 16, 5210, 1988.
  22. Neale AD., Wahleithner J.A., Lund M, Bonnett H.T., Kelly A., Meels- Wagner Dr., Peacock W.J., Dennis E.S. : Plant cell, 2, 673-684, 1990.
  23. Edington B.V., Lamb C.J., Dixon R. A. : Mol.Biol., 16, 81-94, 1991.
  24. Kim,D.L., Park,D.H., Park,S.K. : Proc Mol.Biol.Genet., Korea 3, 143-150, 1988.
  25. Hoj, P.B., Hartman,D.J., and Fincher,G. B. : Plant Mol.Biol., 13, 31-42, 1989.