

저온에서 세포밖 공간에 축적되는 보리 단백질

황철호

단국대학교 농과대학 농학과

Analysis of the Proteins Accumulated During Cold Treatment in Intercellular Space of Barley

Cheol Ho HWANG

Department of Agronomy, Dankook University, Cheonan, 330-714

In order to identify an antifreeze proteins responsible for freeze-tolerance in barley, the proteins accumulated in extracellular space during cold acclimation were extracted and analyzed. After 42 days cold treatment there were several proteins sized of 70, 21, 16, 14 KDa increased in their amount accumulated in extracellular space. In addition, continuously sized polypeptides smaller than 10 KDa were found to be increased in their amount as cold treatment prolongs. Since these proteins were not detectable in total leaf protein extracts it appears that the procedure used to isolate extracellular extract was valid. A similarity in profile of the extracellular proteins isolated from barley and rye may indicate a possibility for these proteins to be an antifreeze proteins since the same extract from rye was reported to show an antifreezing activity.

Keywords: antifreeze, cold acclimation, extracellular, *Hordeum vulgare*

식물의 내동성에 관여하는 반결빙단백질과 이에 상응하는 유전자의 분리를 목적으로, 저온에서 보리세포에 의해 세포밖 공간에 축적되는 단백질을 분석하였다. 이는 결빙온도에서 세포밖 공간에서의 얼음결정의 성장이 주변세포의 탈수를 초래하고, 또한 커진 얼음에 의해 세포막이 파괴되는 것으로 알려진 식물의 동사기작에 대한 이해를 기초로 하였다(Pearce and Ashworth, 1992). 반결빙단백질은 극지방의 어류가 혈액의 결빙을 막기위해 가을의 저온조건에서 만들어 축적하는 것으로 알려졌다. 축적된 반결빙단백질은 친수성 부분을 통해 얼음의 형성에 필수적인 빙핵에 수소결합을 하여, 얼음결정의 성장을 막는 것으로 알려져 있다(DeVries, 1986; Raymond et al., 1989). 이러한 어류의 반결빙단백질을 이용하여 식물의 내동성 증진을 위한 시도들이 있었다. George 등(1990)과 Hightower 등(1991)은 광어의 반결빙단백질유전자를 옥수수 세포 또는 담배에 도입하여 해당유전자의 발현을 mRNA와 단백질의 수준에서 확인하였고, 얻어진 식물추출액에서 반결빙활성도가 있음을 확인한 바 있다. 그러나 얻어진 형질전환식물의 식물 또는 조직 수준에서의 내동성 변화는 아직 보고된 바 없다.

위와는 다르게 월동식물들이 보여주는 뛰어난 내동성을

기초로 하여, Griffith 등(1992)은 호밀에서 반결빙활성을 갖는 단백질의 추출을 시도하였다.

특히, 세포밖 공간으로부터 저온순화 중에 축적되는 단백질을 추출하고, 크기에 따라 분리한 후에 일부 단백질에서 반결빙활성도를 확인함으로써 월동식물이 동사를 방지하기 위해 반결빙단백질을 세포간극에 축적하는 것을 증명하였다. 이는 식물의 내동성 증진을 위해서 식물에서 유래된 반결빙단백질을 직접 이용할 수 있는 기회를 제공하기에 중요한 시도이다. 본 논문에서는 Griffith 등 (1992)의 보고를 바탕으로, 다른 종의 월동식물인 보리에서 반결빙에 관여하는 단백질을 추출 및 특성 규명한 결과와 함께 반결빙활성도 측정방법에 관한 고찰을 하였다.

재료 및 방법

식물체의 생육 및 저온처리

수원 작물시험장에서 분양 받은 동보리 1호 종자를 30°C 생장장에서 24시간 암조건하에서 발아시킨 후에 토양(50%

vermicuete)에 옮겨 10시간 광조건하에서 식물체를 생육하였다. 3엽기에 도달하였을 때에 4/10°C(명/암; 8/16시간)조건에서 일정 기간동안 저온순화를 하였다. 두루호밀의 경우는 단국대학교 농과대학 포장에서 월동중인(파종후 55일째) 식물체를 사용하였다.

세포밖 공간 단백질의 추출

세포밖 공간에 축적되는 단백질의 추출은 Mauch와 Staehelin (1989)의 방법을 따라서 하였다. 처리가 끝난 잎조직을 0.5 cm 길이로 자른다음 증류수로 조직표면에 흘러나온 세포 내용물을 3회 씻어서 제거한 다음 추출용액(5 mM EDTA, 10 mM ascorbic acid, 10 mM mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 mM caproic acid, 2 mM benzamidine)을 진공을 이용하여 20분간 조직내로 스며들도록 한다. 조직표면에 묻어있는 용액을 여과지로 두드려 제거한 다음, 10 mL 주사기에 조직을 넣고, 주사기를 원심분리용 시험관에 넣은 후에 20분간 830 x g에서 원심분리하여 세포밖 공간액을 시험관에 모은다. 얻어진 세포밖 공간액은 4배 부피의 acetone을 넣고 -20°C에 16시간 저장한 후에 12,000 x g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 단백질침전물을 진공건조한 후에 단백질 Laemmli buffer (Laemmli, 1970)에 용해하였다. 상이한 처리의 조직간의 정량적인 비교를 하기 위해 단백질추출에 사용된 조직의 무게에 따라 일정한 양의 buffer를 사용하여 조직 무게당 단백질 추출 시료의 양(10 µl/g(생체중))을 일정하게 유지하였다. 얻어진 단백질은 필요에 따라 Lowry방법(Sigma proteins assay kit)으로 정량화 하였다.

SDS-PAGE와 Silver-Staining

단백질의 양적 또는 질적인 비교를 위해서 15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) 방법을 사용하였다. 특별히 어류에서 발견되는 반결빙단백질은 glycoprotein으로 coomassie brilliant blue 또는 amido black으로는 염색이 안되기 때문에 (Devries, 1986), 단백질의 가시화를 위해서 Oakley 등(1980)의 방법을 따라 silver staining을 하였다. 단백질의 분자량 측정을 위해 prestained 표준단백질(Sigma: 25,000-127,000 Da)을 사용하였다.

결과 및 고찰

세포밖 공간 단백질의 선택적 추출

보리잎조직의 세포밖 공간으로부터 단백질을 얻기위해 Mauch와 Staehelin(1989)의 방법을 따랐다. 선택성을 확인하기 위해 전체 잎단백질을 분리하여 세포밖 공간 단백질 추

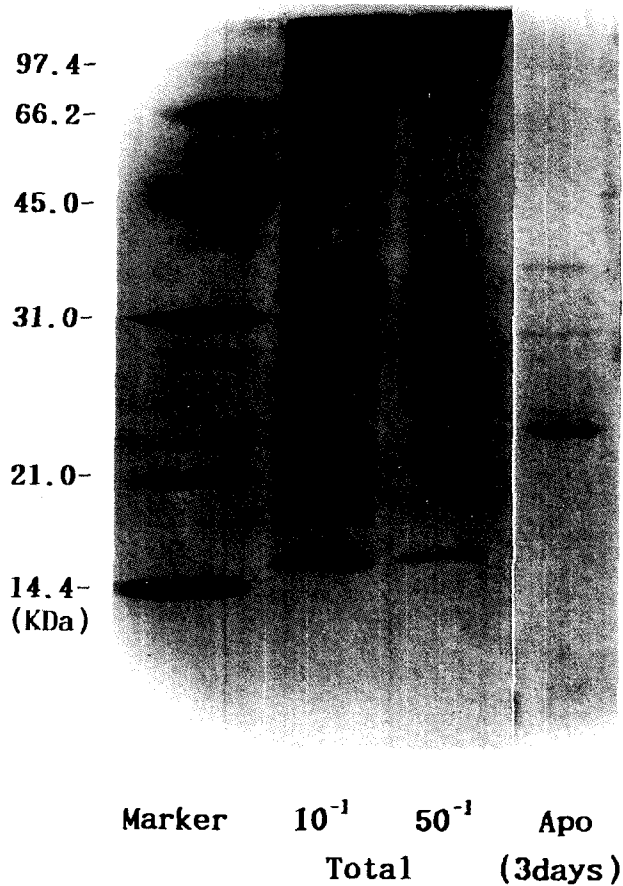


Figure 1. 15% SDS-PAGE analysis of the protein from barley total leaves (Total) and extracellular space after 3 days cold acclimation. The protein samples (Tot) equivalent to a 1/10 or 1/50 of the fresh weight of the tissue (Apo) were loaded. The molecular weights of standard proteins (Marker) are indicated on the left.

출물과 비교하였다(Figure 1). 같은 무게에 해당되는 식물 조직으로부터 추출된 단백질의 비교시 양의 차이가 크므로, 전체 잎단백질을 1/10 또는 1/50으로 희석하여 질적인 비교가 가능하도록 하였다. 세포밖 공간 단백질의 주요 band들은 전체단백질의 구성단백질에서 큰 부분을 차지하지 않음을 알수 있었다. 전체 잎단백질 중의 주요 단백질이 세포밖 공간에서 발견되지 않는 점으로 미루어 전체단백질의 오염 가능성을 어느정도 배제할 수 있었다. 또한, 세포밖 공간물질의 추출을 위한 원심분리후 얻어진 추출물에서의 염색소의 포함여부를 용액의 색으로 판정하여 세포내의 물질의 오염의 가능성을 사전에 배제할 수 있었다. Hon 등(1994)은 좀 더 단순화된 용액을 사용하여 세포밖 공간 추출물의 얻는 과정에서 세포질 내용물의 오염여부를 확인하기 위해 Rubisco단백질의 유무를 항체를 이용하였다. 이상의 여러 방법과 Figure 1에서 얻어진 결과를 통해 세포밖 공간 단백질을 선택적으로 얻기위해 사용된 방법의 정확성을 확인할

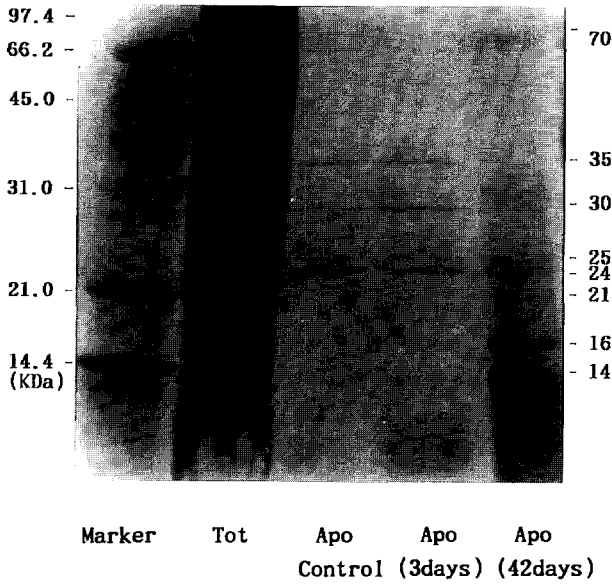


Figure 2. Fifteen percent SDS-PAGE analysis of the proteins isolated from extracellular space (Apo: apoplast) and total tissue (Tot) of barley leaves. Extracellular proteins were extracted from plants before or 3, 42 days after cold acclimation. Total protein was isolated from plants 42 days after cold-treatment. The sizes of major extracellular proteins are marked on the right.

수 있었다.

저온 순화과정에서 세포밖 공간에 축적되는 단백질

저온순화과정의 진행 중에 보리의 세포밖 공간에 축적되는 단백질의 변화를 보기위해 저온처리기간을 다르게 한 후에 얻어진 단백질을 비교하였다. 그림 2에 따르면 저온처리 3일후 세포밖 공간에 축적되는 주요 단백질은 처리전(대조구)과 비교하여 거의 같으나, 70 KDa에 해당되는 단백질과 10 KDa 이하의 다양한 크기의 단백질 또는 polypeptide가 증가됨을 볼 수 있었다. 이들 두 가지 종류의 단백질들은 3일간의 처리에서는 양이 적었으나, 42일간의 저온처리 후에는 많은 양이 축적됨을 볼 수 있었다. 특히 10 KDa 이하의 단백질들은 그 양이 급격히 증가할 뿐 아니라, 그 수에 있어서도 다양함을 보여준다. 보고된 어류의 반결빙단백질의 크기가 22-26 KDa인 점으로 미루어, 이들이 식물에 상응하는 반결빙단백질로 추측되었다. 이외에도 21, 16, 14 KDa 단백질이 42일의 저온 처리 후에 양이 급격히 늘어났다. Griffith 등(1992)은 호밀의 19, 26, 32, 34, 36 KDa 단백질에서 반결빙활성을 확인하였기에 보리의 14-21 KDa 단백질의 경우도 상응하는 반결빙단백질로 예상되었다. 이들 단백질이 저온처리로 그 생성이 유도되어 증가되는지 또는 세포밖 공간으로의 이동이 증가되는지는 해당유전자의 분리를 통해 밝혀지리라 생각한다.

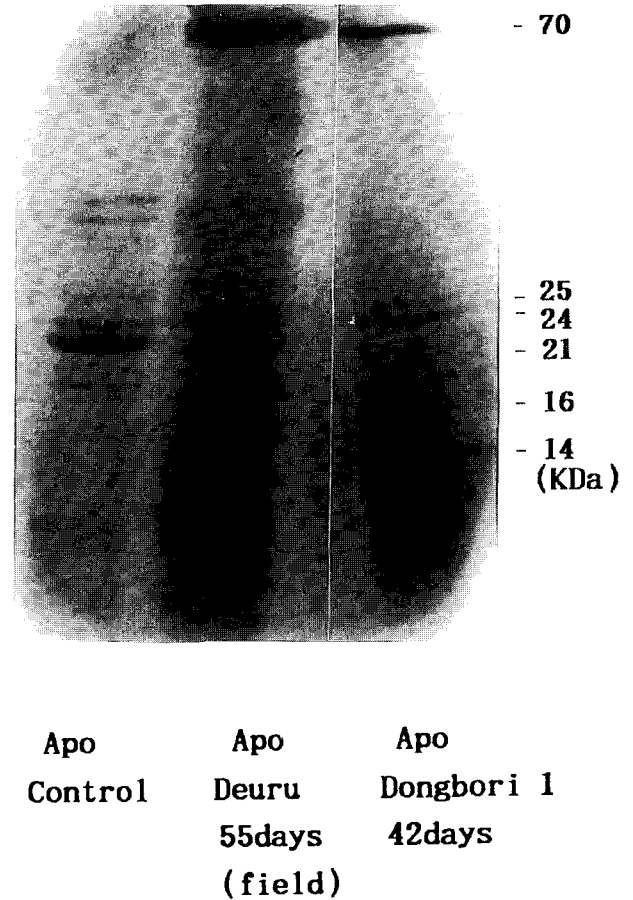


Figure 3. Fifteen percent SDS-PAGE analysis of the extracellular proteins isolated from the Dongbori 1 before (Control) or 42 days after a cold acclimation and from the Deuru rye under the natural cold acclimation by growing in field for 55 days during winter season. For quantitative comparison, the proteins of on equivalent amount of the tissue are analyzed.

보리와 호밀의 세포밖 공간 단백질의 비교

식물에서는 호밀이 유일하게 반결빙단백질의 존재 가능성이 보고되었으므로, 보리와 호밀이 저온처리시 세포밖 공간에 축적하는 단백질을 같은 방법으로 추출하여 비교하였다(그림 3). 호밀의 경우 70 KDa 단백질이 양적으로 더 많을뿐 아니라, 여러 크기로 나누어져 존재함을 볼 수 있었다. 이는 여러 유전자의 산물이거나 변형후 변형된 isoform으로 여겨진다. 14-25 KDa 범위의 단백질들을 비교하면 그 크기에 있어서 다소간의 차이를 볼 수 있으나, 14 KDa 이하의 범위에서는 연속된 크기의 단백질 또는 polypeptides를 공통적으로 볼 수 있었다. 사용한 polyacrylamide gel 농도의 차이를 고려하여 볼때 Griffith 등(1992)의 결과와는 전체적인 profile에서 큰 차이가 없었다. 이로써 얻어진 보리의 세포밖 공간 단백질이 호밀에서 보고된 바와 같이 반결빙활성도를 나타낼 지는 이들 보리단백질에 대한 반결빙활성도의 측정

을 통하여 최종적으로 반결빙단백질의 확인 및 이용이 가능하겠다. 구체적인 방법으로는 얻어진 단백질을 진공을 이용하여 실험식품조각내 스며들게한 후에 조직의 연속된 결빙/해동과정에서의 반결빙단백질의 효과를 관찰하거나 (Cutler et.al., 1989; George et.al., 1990), 얻어진 단백질 용액을 극저온의 금속관위에서 얼음결정이 만들어지는 과정을 관찰함으로써(Knight et.al., 1988; Hightower et.al.,1991) 결정할 수 있다. 위의 두 가지 방법 외에도 분리된 단백질을 이용하여 해당 유전자를 분리한 후, 아미노산 배열 또는 2, 3차 구조상의 유사성을 다른 알려진 동물의 반결빙단백질과의 비교를 통해 확인할 수도 있겠다.

적 요

보리의 내동성기작에 관여할 것으로 예상되는 반결빙단백질을 분리하기 위해서 저온순화기간 중에 세포밖 공간에 축적되는 단백질을 분리 및 비교하였다. 42일간의 저온처리를 통해 70, 21, 16, 14 KDa의 단백질과 10 KDa 이하의 연속된 크기의 단백질들의 축적이 증가됨을 확인하였다. 이들 단백질들은 3일간의 저온처리에서도 어느정도 축적되었으나, 42일간의 처리시 그 양에 있어서 더욱 증가됨을 볼 수 있었다. 위 방법으로 얻어진 단백질을 전체 잎조직의 단백질과 비교하여 세포밖 공간의 단백질 추출방법의 정확도를 검증하였다. 또한 호밀의 저온처리시 세포밖 공간에 축적하는 단백질과의 비교를 통해 구성 단백질의 크기에 있어서 차이를 확인하였으나, 호밀과 보리에서 공통적으로 10 KDa 이하의 범위에서 연속적인 크기의 단백질이 축적됨을 볼 수 있었다. 알려진 광어의 반결빙단백질은 크기가 3,300에서 33,000 dalton에 이르는 점으로 미루어 보리와 호밀에서 공통적으로 발견되는 10 KDa 이하의 단백질이 반결빙단백질로 작용할 가능성은 매우 높다. Griffith 등(1992)은 호밀의 세포밖 공간 단백질중 일부에서 반결빙활성도를 확인하였고, 보리와 호밀간의 해당단백질의 전체적인 profile에서의 유사성을 미루어 보리로부터 얻어진 세포밖 공간의 단백질에서 반결빙단백질을 발견할 가능성은 매우 높다.

사 사-본 본문의 실험을 도와준 김동준에게 고마움을 표한다. 아울러 이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음을 밝힌다.

인 용 문 헌

- Cutler AJ, Saleem M, Kendall E, Gusta LV, George F, Fletcher GL (1989) The winter flounder antifreeze proteins improves the cold hardiness of plant tissues. *J Plant Physiol* 135: 351-354
- DeVries AL (1986) Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water. *Method in Enzymology* 127: 293-303
- Hightower R, Baden c, Penzes E, Lund P, Dunsmuir P (1991) Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol* 17: 1013-1021
- Hon W-C, Griffith M, Chong P, Yang DSC (1994) Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol* 104: 971-980
- George F, Saleem M, Cutler AJ (1990) Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze proteins and its expression in plant cells. *Gene* 91: 159-165
- Griffith M, Ala P, Yang DSC, Hon W-C, Moffatt BA (1992) Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiol* 100: 593-596
- Knight CA, Hallett J, DeVries AL (1988) Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique. *Cryobiology* 25: 55-60
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Mauch F, Staehelin LA (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1, 3-galactanase in bean leaves. *Plant Cell* 1: 447-457
- Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105: 301-363
- Pearce RS, Ashworth EN (1992) Cell shape and localization of ice in leaves of overwintering wheat during frost stress in the field. *Plant* 188: 324-331
- Raymond J, Wilson P, DeVries AL (1989) Inhibition of growth of nonbasal planes in ice by fish antifreezes. *PNAS* 86: 881-885

(1995년 1월 10일 접수)