

흰나리 인편으로부터 PR-Proteinase의 유도 및 특성 규명

오순자¹⁾, 박영철¹⁾, Ok Young Lee-Stadelmann²⁾, 고석찬¹⁾

¹⁾제주대학교 생물학과, ²⁾제주대학교 방사능이용연구소

Induction by Salicylic Acid and Characterization of PR-Proteinases from Bulbs of *Lilium formosanum* Wallace

Soon Ja Oh¹⁾, Young Chul Park¹⁾, Ok Young Lee-Stadelmann²⁾ and Suck Chan Koh¹⁾

¹⁾Department of Biology, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea,

²⁾Applied Radioisotope Research Institute, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea

ABSTRACT

Some morphological characters were surveyed and PR-proteinases were induced and characterized from *Lilium formosanum* Wallace endemic to Cheju island. Its flower characters were similar to those of white trumpet lilies (*Lilium longiflorum* Thunb.) although its flowering period was later than that of white trumpet lilies and it had a wide range of variation among individuals. Six PR-proteinases (II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2 and V) were induced from bulbs by 2.5 mM salicylic acid and almost excreted into the intercellular spaces. These PR-proteinases were strongly activated by Ca²⁺, whereas they were strongly inhibited by Cu²⁺, Co²⁺ and Fe²⁺. Three PR-proteinases (II-2, IV-1 and IV-2) were strongly inhibited by 1,10-phenanthroline, indicating that these enzymes are metallo-proteinases. Three PR-proteinases (III-1, III-2 and V) had a high sensitivity to PMSF and required β -mercaptoethanol for their activities. These results indicate that these proteinases are cysteine proteinases.

Key words: PR-proteinases, salicylic acid, metallo-proteinases, cysteine proteinases, *Lilium formosanum*

서 론

백합(*Lilium longiflorum* Thunb.)은 우리 나라 4대 절화 중의 하나로 재배면적과 생산량이 최대이며 대부분 종간교잡이나 품종간교잡에 의해 육성된 종이 재배되고 있다. 다른 작물과 마찬가지로 바이러스나 기타 병충해에 감염되면 구근의 수량이 감소되고 절화 품질이 저하되므로(이 등, 1995), 국내환경에 적합하고 재배가 용이하며 병충해에 저항성을 지닌 신품종의 개발이 요구된다. 백합속 식물의 내병성과 관련된 신품종 육성은 주로 야생종이 지니고 있는 내병성이 강한 특성을 이용하여 종간교잡을 통하여 이루어지고 있다(van Tuyl 등, 1986). 이러한 관점에서 최근에 흰나리(*L. formosanum* Wallace)가 제주도에 자

생하는 것으로 밝혀져(Song, 1996) 종간교잡을 통한 백합의 신품종 육성을 위해 유전자원으로서 가치가 있을 것으로 기대된다.

한편, 식물체는 바이러스나 기타 병원균에 감염되면 이에 대한 반응으로 pathogen-related protein(PR-protein)을 합성하여 자신을 보호하게 된다(van Loon, 1985). 이들 PR protein은 병원균의 감염 뿐만 아니라 salicylic acid 등의 화합물에 의해서도 유도되는데(White, 1979; Vera와 Conejero, 1989), proteinase도 PR protein 중 하나이다(Vera와 Conejero, 1988; Tornero 등, 1996). PR-proteinase는 병원균의 침입에 대하여 병원체를 구성하는 단백질을 분해하거나 자기 방어작용에 관여하는 단백질을 변형·활성화시키는 작용을 하여 식물의 방어기구¹⁾ 있어 중요한 역할을 한다(Tornero 등, 1996). 따라서, 백합의 내병성과 관련하여 종간교

중에 의한 신품종 육성과 더불어 PR-proteinase 등 자기 방어기구에 대한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 제주도에 자생하는 흰나리의 주요 형질을 조사하여 유전자원으로서의 가치를 검토하고, virus나 기타 병원체에 대한 저항성과 관련된 유용 유전자를 선별하는 기초단계로서 인편조직을 salicylic acid로 처리하여 6종류의 PR-proteinase를 유도하고 이들 PR-proteinase의 일부 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

흰나리의 주요 형질 조사

흰나리(*Lilium formosanum* Wallace)의 주요 외부 형질은 Li 등(1978)이 백합속 식물에 대하여 기술한 내용을 중심으로 조사하였다. 즉, 인편, 잎, 줄기 및 화기 구조 등의 색깔, 형태 및 양적 형질을 조사하였으며, 양적 형질은 vernier calipers를 사용하여 측정하였다. 개화 시기는 자생지에서 흰나리의 꽃피는 빈도를 주기적으로 관찰하여 조사하였다.

PR protein의 유도 및 단백질의 추출

자생지에서 채집한 흰나리에서 인편을 채취하고 4mm²의 크기로 자른 후, 증류수로 3차례 세척하여 10ml의 증류수, 2.5mM과 5mM의 salicylic acid 용액이 들어있는 플라스크에 각 2g씩 넣어 30℃에서 130rpm으로 흔들며 주면서 3일 동안 PR protein을 유도하였다. PR protein을 유도시킨 후, 플라스크 내용물을 4겹의 cheesecloth로 거르고 거른 용액을 분비 단백질의 분석에 사용하였다. 또한 증류수나 salicylic acid를 처리하지 않은 신선한 인편조직은 액체 질소가 들어 있는 막자사발에서 마쇄한 후, 10ml의 100mM borate 완충용액(pH8.0)에 넣어 4℃에서 10,000g로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 취하여 사용하였다.

Proteinase의 전기영동 분석

단백질 용액을 β -mercaptoethanol을 제거한 시료용 완충용액(pH6.8; 0.125M Tris-HCl, 0.005% bromophenol blue, 40% glycerol, 10% SDS)과 동량 혼합하여 0.04% gelatin을 함유하는 7% SDS-polyacrylamide gel 위에 넣어 전기영동을 실시하였다 (Heussen과 Dowdle, 1980).

전기영동 후 1% Triton X-100을 함유하는 100 ml의 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.0)으로 10분씩 2차례 세척하여 SDS를 제거하고, 100ml의 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.0)으로 10분 동안 세척하여 Triton X-100을 제거하였다. Triton X-100이 제거된 겔은 10 mM CaCl₂가 포함된 100ml의 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.0)에서 24시간 동안 37℃에서 정치하여 반응시켰다. 반응시킨 겔은 0.025% coomassie brilliant blue R-250용액으로 염색하고 겔 속의 gelatin이 분해되어 생긴 투명한 밴드를 관찰함으로써 proteinase활성을 분석하였다.

Protease inhibitor와 2가 양이온이 proteinase활성에 미치는 영향

상기한 방법과 같이 0.04% gelatin을 함유하는 7% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 겔을 각 lane 별로 잘라내어 상기한 방법으로 SDS와 Triton X-100을 차례로 제거하고 각 lane을 protease inhibitor 또는 2가 양이온이 첨가된 100ml의 50mM Tris-HCl 완충용액(pH8.0; 10mM CaCl₂ 포함)에서 24시간 동안 37℃에서 반응시켰다. Protease inhibitor로는 20 μ M pepstatin, 10 μ M trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane(E-64), 30mM β -mercaptoethanol, 5mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 100 μ M 3,4-dichloroisocoumarin(DCI), 10mM 1,10-phenanthroline 등을 사용하였고, 2가 양이온으로는 각각 10mM인 Ca²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ 등을 사용하였다. 다만 2가 양이온이 proteinase활성에 미치는 영향을 조사할 때는 CaCl₂가 제거된 용액에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 상기한 방법으로 겔을 염색한 후 gelatin이 분해되어 생긴 투명한 밴드를 비교 관찰하였다.

결과 및 고찰

흰나리의 주요 형질

백합의 신품종 육성을 위한 유전자원으로서의 가치를 파악하기 위하여 흰나리의 주요 형질을 조사하였다(표 1과 그림 1). 특징적인 형질은 백합이 5-6월에 개화하는데(이, 1982) 반하여 흰나리는 7-8월에 개화하여 백합이 지나는 개화특성을 보완할 수 있을 것으로 보이며, 1개 또는 2-4개의 꽃이 옆을 향해 별

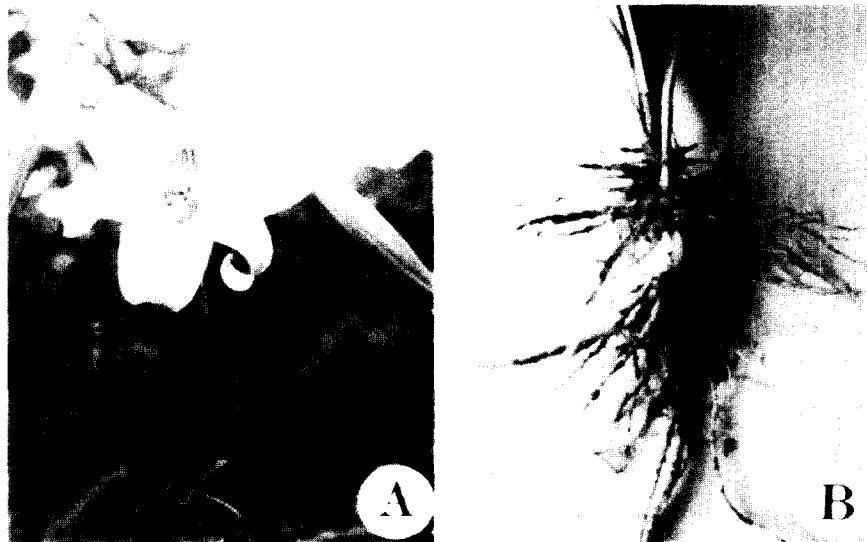


Figure 1. Photographs of *L. formosanum* Wallace. A: Flowers, B: Bulbs and roots

Table 1. Comparison of some important morphological characters between two *Lilium* species

Characters		<i>L. formosanum</i>	<i>L. longiflorum</i> *
Bulb	type	globose or more or less broadly elliptical	sulglobose
	diameter	2.94-0.66cm	5 - 6cm
Stem	type	slender, glabrous	scabrid-pubescent
	height	99.75-25.40cm	60 - 90cm
Leaf	length	18.78-2.68cm	20.0 - 25.0cm
	width	0.72-0.16cm	0.8 - 1.2cm
Flower	number	usually solitary, rarely 2-3 or 4 in raceme	1 to several
	fragrance	delightfully fragrant	very fragrant
	length	12.06-2.32cm	13 - 18cm
	diameter	8.18-2.18cm	8 - 10cm
	filament length	10.85-2.18cm	8 - 9cm
	anther color	purple at first and turning to yellow	purple at first and turning to yellow
	ovary type	cylindrical	elongate
	style type	slender, cylindrical	elongate, slightly curved
	stigma color	whitish-green	dark green and then grayish-green
	Capsule type	cylindrical	obvoid

* Data obtained from the literature(Li et al., 1978)

어지고, 향기가 조금 있어 백합의 대용으로서 가치가 있을 것으로 판단되었다. 또한 화피는 백합처럼 반점이 없는 백색이며 뒷면이 다소 녹색이 들지만 드물게 자주색이 들기도 하여 유전적 변이가 다양한 것으로 나타났다. 수술은 화피보다 짧으며 꽃밥은 백합과는 달리 자주색이나 성숙하면 홍색으로 변하고 삭과는 긴 타원형이었다. 흰나리가 갖는 이와 같은 형질은 백합속 식물의 육종을 위하여 중간교잡 연구가

활발하게 진행되고 있는 것으로 보아(van Tuyt 등, 1986; van Cretij 등, 1990) 백합의 육종에 활용될 가능성이 높은 것으로 판단된다.

Proteinase 활성의 변화

Proteinase(Vera 등, 1989; Tornero 등, 1996), proteinase inhibitor(Walker-Simmons와 Ryan, 1977), chitinase(Boller와 V geli, 1984) 등 식물의 방어와 관련된 단백질들

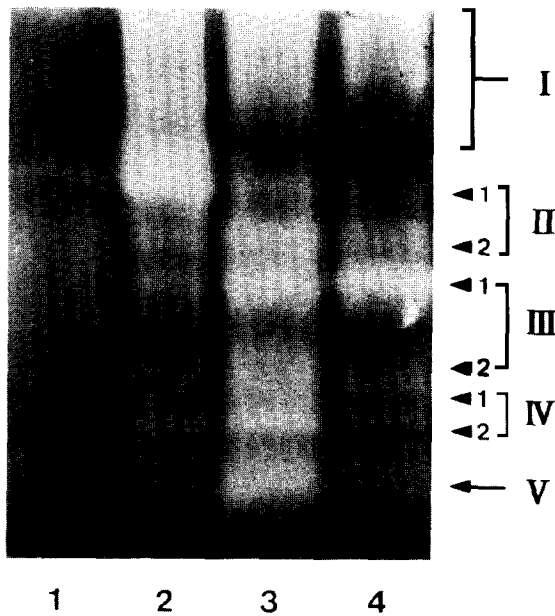


Figure 2. Gelatin-degrading activities of proteinases induced by salicylic acid from bulbs of *L. formosanum* Wallace. Lane 1, extract of fresh bulb scales; lane 2, excrete from bulb scales in DW; lane 3, excrete from bulb scales in 2.5 mM salicylic acid; lane 4, excrete from bulb scales in 5 mM salicylic acid.

은 세포내 분비기구의 중심인 액포에 존재하며 경우에 따라 세포밖으로 분비되어 방어기능을 수행하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 흰나리 인편 조직을 증류수나 salicylic acid로 처리하였을 때 분비되는 단백질에서 proteinase의 전기영동 패턴을 조사하여 PR proteinase의 유도 여부를 알아 보았다 (그림 2). 분비 단백질 용액에는 전체적으로 5군(I, II, III, IV와 V)의 proteinase들이 나타났는데 이들은 증류수 또는 salicylic acid를 처리하지 않은 인편조직에 이미 존재하는 4종류와는 이동상이 달라 증류수 또는 salicylic acid에 의해 유도되는 것으로 해석되었다. 증류수를 처리하였을 때는 5군의 proteinase들이 모두 존재하였지만 그 중 일부(I과 II-1)는 salicylic acid를 처리했을 때 보다 증류수를 처리했을 때 더 뚜렷한 활성을 나타냈다. 반면에 다른 proteinase들(II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2와 V)은 증류수에서보다 2.5mM salicylic acid에서 더 많이 유도되어 이들은 PR-proteinase일 것으로 판단되었다. 하지만 5mM salicylic acid를 처리했을 때 이들 효소들의 활성이 2.5mM salicylic acid

에서보다 낮아 2.5mM salicylic acid 처리시 다양한 proteinase들을 많이 유도시킬 수 있었다. 이러한 결과는 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill) 잎조직에 3mM의 salicylic acid를 처리하였을 때 PR-proteinase(P69)가 유도된 것과 유사하지만(Vera와 Conejero, 1989), 해바라기(*Helianthus annuus* L.) 잎 조직에 5mM acetylsalicylic acid를 처리하여 glucanase, chitinase, mannosidase 등의 PR protein들을 유도할 수 있었던 것과는 달랐다 (Jung 등, 1993). 따라서 PR protein을 유도하기 위한 salicylic acid의 농도는 식물종이나 PR protein의 종류에 따라서 다소 다른 것으로 보인다. PR-proteinase를 유도하기 위한 적절한 시간을 알아보기 위하여 2.5mM salicylic acid를 다양한 시간 동안 처리했을 때 4종류(I, II-1, III-1과 V)가 48 시간에 유도되기 시작하여 72시간 후에는 더 뚜렷한 활성을 나타내며 나머지 proteinase들(II-2, III-2, IV)도 뚜렷하게 유도되었다(결과 미제시). 이는 토마토 잎조직에 3mM salicylic acid를 처리했을 때 PR-proteinase(P69)가 3일 째에 유도되기 시작하여 7일 째에 최대로 유도된 것과 비교하여(Vera와 Conejero, 1989) 본 실험 조건에서의 PR-proteinase 유도 속도가 빨라, 식물종이나 조직의 종류에 따라 다를 것으로 판단된다.

PR-proteinase들의 특성

2가 양이온이 proteinase 활성에 미치는 효과를 알아보기 위해 전기영동 후 겔을 여러 가지 2가 양이온이 첨가된 25mM Tris-HCl 완충용액(pH8.0)에 담가 효소활성 밴드의 출현을 비교하였다(그림 3). 2가 양이온의 효과를 보기 위해 대조구는 2가 양이온을 처리하지 않았으며 이 때 일부(I, II-2, III-1과 V)는 2가 양이온이 없을 때에도 다른 것들에 비해 비교적 높은 활성을 유지하였다. 하지만, Ca^{2+} 을 처리하였을 때는 2가 양이온이 없을 때보다 모든 효소의 활성이 높게 나타났으며, 특히 salicylic acid에 의해 유도되는 6 종류(II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2와 V)는 Ca^{2+} 에 의해 활성이 강하게 촉진되는 것으로 보인다. 반면에 Mg^{2+} 과 Mn^{2+} 을 처리했을 때에는 Ca^{2+} 을 처리했을 때보다 모든 효소들의 활성이 낮아 전반적으로 2가 양이온을 처리하지 않은 것과 거의 유사하게 나타났다. 그리고 Cu^{2+} , Co^{2+} 와 Fe^{2+} 들은 2가 양이온을 처리하지 않은 것보다도 효소활성이 매우 낮게 나타났으

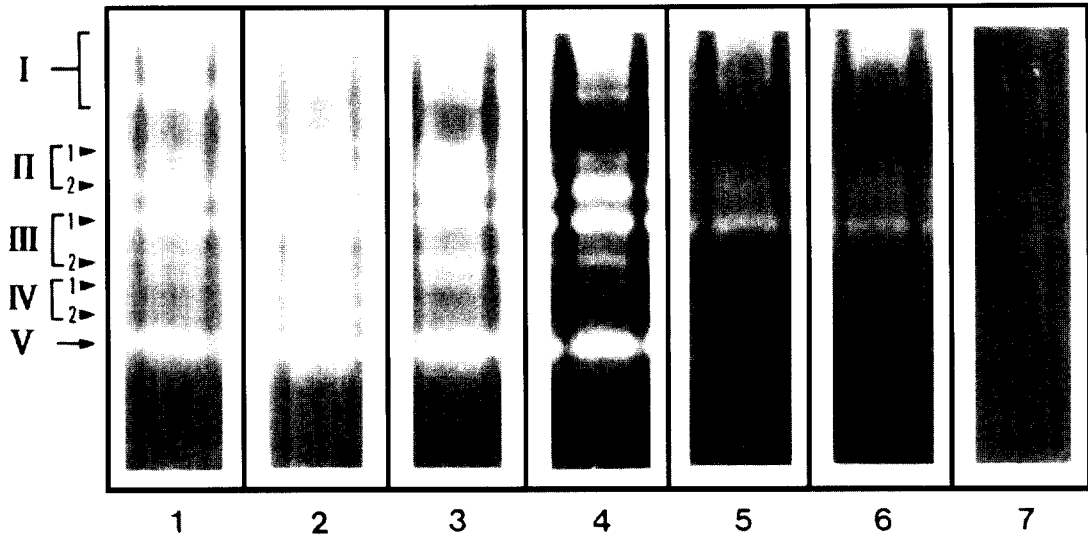


Figure 3. Effects of divalent cations on the activities of proteinases induced by 2.5 mM salicylic acid from *L. formosanum* bulbs. Lane 1, control; lane 2, 10 mM CaCl₂; lane 3, 10 mM MgCl₂; lane 4, 10 mM MnCl₂; lane 5, 10 mM CuCl₂; lane 6, 10 mM CoCl₂; lane 7, 10 mM FeCl₂.

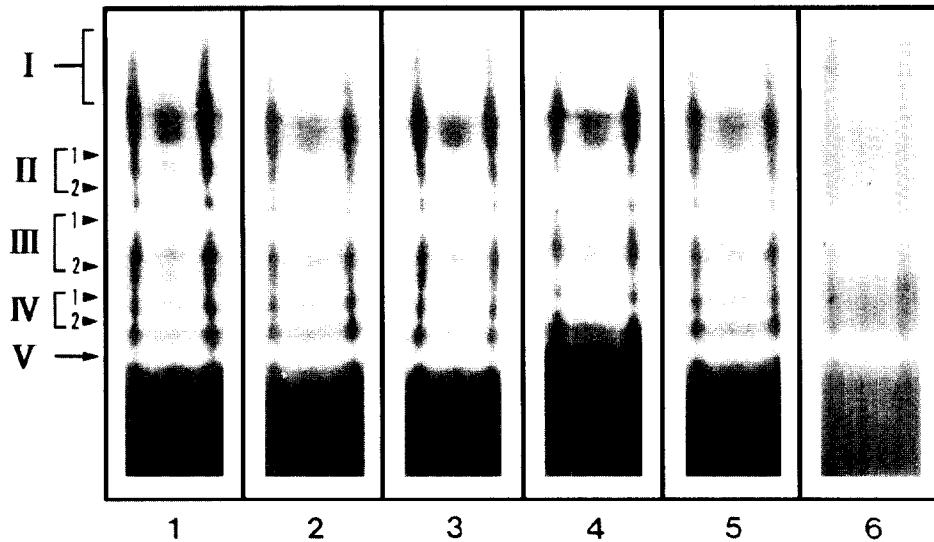


Figure 4. Effects of protease inhibitors on the activities of proteinases induced by 2.5mM salicylic acid from *L. formosanum* bulbs. Lane 1, control; lane 2, 20 μ M pepstatin; lane 3, 10 μ M E-64; lane 4, 5mM PMSF; lane 5, 100 μ M DCI; lane 6, 10 mM phenanthroline

며, Ca²⁺을 처리하였을 때 두드러지게 강한 활성을 보인 6 종류의 PR-proteinase들(II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2와 V)은 억제되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 토마토 잎조직에서 유도된 PR-proteinase 활성이 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해 촉진되며 Hg²⁺에 의해 억제되는 것과 유사하여(Vera와 Conejero, 1988). 흰나리 인편조직에

서 salicylic acid에 의해 유도되는 PR-proteinase들은 토마토 PR-proteinase 처럼 그 활성을 위해 Ca²⁺을 필요로 한다는 것을 나타내 준다.

Proteinase활성에 미치는 protease inhibitor의 효과를 조사하였다(그림 4). 그 결과 모든 군의 proteinase 활성이 pepstatin, E-64 또는 DCI에 의해서는 억제되

지 않았다. 그러나 metallo-proteinase의 대표적인 억제제인 1,10-phenanthroline에 의해 3종류(II, IV와 V)의 효소들이 크게 억제되어 있는는 metallo-proteinase일 것으로 해석할 수 있었다. 이와 다른 효소들의 활성이 그림 3에서 Ca^{2+} 에 의해 촉진되는 것으로 보아, 활성을 추출해 볼 수 있다. 그리고 III군과 V군의 serine proteinase와 cysteine proteinase의 억제제로 알려진 PMSF에 의해 민감하게 반응하였으나, cysteine proteinase를 촉진하는 것으로 알려진 β -mercaptoethanol에 의해 높은 활성을 나타내는 것으로 나타나, 그림 5) cysteine proteinase일 것으로 판단된다. 따라서 salicylic acid에 의해 유도되는 PR-proteinase들(II-2, III, IV과 V) 중 II-2와 IV는 metallo-proteinase이고 III과 V는 cysteine proteinase임을 알 수 있다. 이는 토마토 잎에서 유도된 PR-proteinase가 cysteine protease 억제제인 p-chloromercuribenzoic acid(pCMB)에 의해 억제되고 환원제인 DTT에 의해 촉진된 후 아미라 Ca^{2+} 과 Mg^{2+} 에 의해 촉진되는 현상과 매우 유사한 것으로 해석되었다(Vera와 Conjero, 1988). PR-proteinase는 아니지만 대두(*Glycine max* Merr.) 잎조직에서 분리되는 proteinase도 pCMB에 의해 억제되어 본 연구에서 III군과 V군의 proteinase와 유사함을 보였다(Huangpu와 Graham, 1995). 하지만 본 연구의 III군과 V군의 PR-

proteinase가 토마토의 PR-proteinase나 대두의 cysteine proteinase와 기능이 같은 것인지는 아직 의문이며, 본 연구에서 밝혀진 metallo-proteinase들이나 cysteine proteinase들의 PR-proteinase로서의 생체내 기능 등에 대하여는 좀 더 깊은 연구가 필요하다.

적 요

제주도에 자생하는 흰나리의 주요 형질을 조사하여 유전자원으로서의 가치를 검토하고 인편으로부터 PR-proteinase들을 유도하여 그 특성을 밝혔다. 흰나리는 화기 형태가 백합과 유사하나 개화시기가 달랐으며 유전적 변이가 다양하였다. 그리고 흰나리 인편을 salicylic acid를 처리함으로써 6종류의 PR-proteinase들(II-2, III-1, III-2, IV-1, IV-2과 V)을 유도할 수 있었으며 이들 proteinase들은 거의 대부분 세로 형태로 분리되며 Ca^{2+} 에 의해 그 활성이 크게 촉진되었으나, Cu^{2+} , Co^{2+} 와 Fe^{2+} 에 의해 크게 억제되었다. 또한 3종류의 PR-proteinase들(II-2, IV-1과 IV-2)은 1,10-phenanthroline에 의해 크게 억제되어 metallo-proteinase이고, 다른 3종류의 PR-proteinase들(III-1, III-2와 V)은 PMSF에 의해 억제되고 β -mercaptoethanol을 필요로 하여 cysteine proteinase로 판단되었다.

사 사

이 논문은 1996년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의해 연구되었으며 연구비를 지원하여 준 학술진흥재단에 감사의 뜻을 포함합니다.

인 용 문 헌

- Boller T. and V. Geli, U. 1984. Vacuolar localization of ethylene induced chitinase in bean leaves. *Plant Physiol.* 74:442-444.
- Heussen, C. and Dowdle, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102:196-202.
- Huangpu, J. and Graham, J. S. 1995. Purification and developmental analysis of an extracellular proteinase from young leaves of soybean. *Plant Physiol.* 108:969-

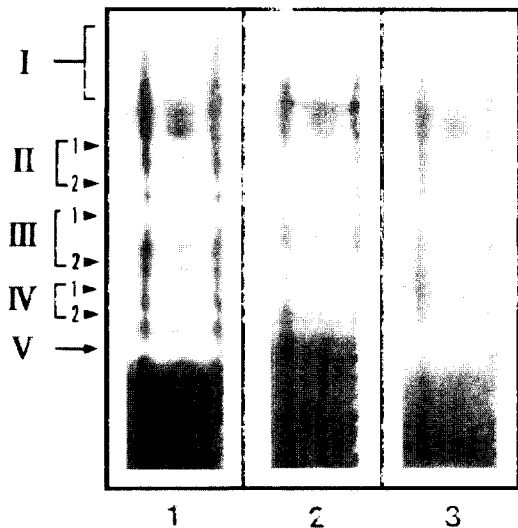


Figure 5. Effects of PMSF and β -mercaptoethanol on activities of proteinases induced by 2.5 mM salicylic acid from *L. formosanum* bulbs. Lane 1, control; lane 2, 5 mM PMSF; lane 3, 30 mM β -mercaptoethanol

- 974.
- Jung, J. L., Fritig, B. and Hahne, G. 1993. Sunflower(*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins: Induction by aspirin(acetylsalicylic acid) and characterization. *Plant Physiol.* 101:873-880.
- 이창복. 1982. 대한식물도감. 향문사. 서울. pp. 206-209.
- 이은모, 정해준, 이영복. 1995. 백합 기내자구 유래 소인편배양에서 기관분화에 미치는 성장조절제 및 배지조성의 영향. *식물조직배양학회지* 22(2):89-93
- Li, H. L., Liu, T. S., Huang, T. C., Koyama, T. and Devol, C. E. 1978. Flora of Taiwan(V. Angiospermae). Epoch Publishing Co. Taipei. pp. 57-62.
- Song, N. H. 1996. The karyotype of *Lilium formosanum* Wallace from Cheju Island in Korea. *Acta Hort.* 414:151-153.
- Tornero, P., Conejero, V. and Vera, P. 1996. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease(PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6332-6337.
- van Loon, L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 4:111-116.
- van Cretij, M. G. M., van Raamsdonk, L. W. D. and van Tuyl, J. M. 1990. Wide interspecific hybridization of *Lilium*: Preliminary results of the application of pollination and embryo-rescue methods. *North American Lily Society Yearbook* 43:28-37.
- van Tuyl, J. M., Franken, J., Jongerius, R. C., Lock, C. A. M. and Kwakkenbos, T. A. M. 1986. Interspecific hybridization in *Lilium*. *Acta Hort.* 177:591-595.
- Vera, P. and Conejero, V. 1988. Pathogenesis-related proteins of tomato: P69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiol.* 87:58-63.
- Vera, P. and Conejero, V. 1989. Immunogold localization of the citrus exocortis viroid-induced pathogenesis-related proteinase P69 in tomato leaves. *Plant Physiol.* 91:119-123.
- Vera, P., Hernandez-Yago, J. and Conejero, V. 1989. The induction and accumulation of the pathogenesis-related P69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and after chemical treatments. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34:323-334.
- Walker-Simmons, M. and Ryan, C. A. 1977. Immunological identification of proteinase inhibitors I and II in isolated tomato leaf vacuoles. *Plant Physiol.* 60:61-63.
- White, R. F. 1979. Acetylsalicylic acid(aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99:410-412.