

Phytophthora cambivora KACC 40160로부터 새로운 elicitin의 분리

여운수* · 윤상홍 · 배신철¹ · 박인철 · 구본성 · 김용환

농업생명공학연구원 신기능소재개발과, 분자생리과

(2003년 2월 20일 접수, 2003년 4월 18일 수리)

난균류에 속하는 *Phytophthora spp.*와 *Pythium spp.*에서 분리되는 단백질인 elicitin은 식물과 병원균과의 비친화적 관계에서 과민감반응을 유도하는 인자로 알려져 왔다. 국내에서 수집된 5종의 *Phytophthora spp.*로부터 분리된 elicitin들은 무, 배추, 고추에서 과민감 반응을 유도 하였으나 오이, 토마토에서는 볼 수 없었다. 특히 지금까지 보고가 되지않은 *P. cambivora* KACC 40160 균주의 배양액으로부터 ion exchange와 gel filtration을 이용하여 고추에 과민감반응을 유도하며 분자량이 10 kDa인 새로운 elicitin을 순수분리 하여 cambivorein이라 명명 하였다. 분리된 cambivorein의 N-말단 아미노산 서열분석 결과 β -isoform의 특징인 13번째 아미노산이 lysine을 가지고 있었으며 기존의 다른 종류의 elicitin과는 다른 아미노산으로 구성되어 있었다.

Key words: elicitin, *Phytophthora cambivora*, 과민감반응

서 론

병원균과 식물간의 상호작용은 식물에 병을 유발하는 친화적 관계 (compatible interaction)와 저항성을 유도하는 비친화적 관계 (incompatible interaction)로 나눌 수 있는데 후자인 비친화적 관계에서 과민감반응(HR: hypersensitive response)이 관여한다. 이러한 과민감 반응은 병원균 침입시 식물체의 침입부위 세포가 괴사 하는 것으로 병원균의 계속된 성장과 확산을 방해함으로써 기주식물의 병 저항성을 유도한다.^{1,3)} 따라서 이러한 과민감 반응을 유도하는 물질을 식물 병 예방물질로 개발하려는 연구가 세계적으로 계속 이루어져 왔다. 약 10여년 전에 Oomycetes에 속하는 식물병원균인 *Phytophthora spp.*나 *Pythium spp.*에서 식물에 과민감 반응을 유도하는 분자량 10 kDa 정도의 단백질인 elicitin이 분리된다는 보고는 많은 과학자들의 흥미를 일으켰다.^{4,5)}

예를 들어 *Phytophthora* 속의 일부 종들이 분리하는 10 kDa의 작은 단백질인 elicitin을 담배에 처리하고 담배 역병(*P. nicotianae*)을 접종하면 과민감반응(HR)을 유도하여 병 저항성을 유도한다.⁴⁾ 이 단백질은 담배역병균에서는 생성되지 않으면서 담배와의 상호작용에 있어서 avirulence factor로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이러한 elicitin의 특성은 acidic과 basic form으로 구성되어 있고 basic form의 활성이 acidic form보다 50배~100배 정도 강한 것으로 알려졌으며⁶⁾ HR 반응외에도 SAR(Systemic Acquired Resistance)반응을 유도하는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 이후부터 현재까지 *Phytophthora* 속의 여러 종들에서 10여종의 elicitin이 분리, 정제되어 아미노산 서열이 밝혀졌고, 이들 간의 아미노산 배열의 상동성은 68~94% 정도이

었다.⁸⁻¹¹⁾ 특히 최근에 Yu 등¹²⁾은 이들 아미노산 서열상에서 극소수의 아미노산 차이에 따라 과민감반응 활성도가 크게 영향을 보고하였다. 일반적으로 elicitin은 plasma membrane에 있는 receptor와의 상호작용에 의한 초기인식단계로부터 시작하여 식물의 병 방어에 관여하는 일련의 생화학적 반응을 가지는데 이는 급속한 전해질 누출, 활성산소생성, 단백질 인산화, phytoalexin생성 등으로 식물세포에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹³⁾

본 연구에서는 한국 농업미생물 보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에 보유하고 있는 국내 분리균주인 80여종의 *Phytophthora* 균주들로부터 elicitin생산 균주를 선발하고 이들로부터 elicitin을 분리하여 작물별 과민감반응에 대한 기주특이성을 비교분석하였으며, 특히 지금까지 보고되지 않은 *Phytophthora cambivora* KACC 40160균주의 elicitin을 정제하여 이것의 N-말단 아미노산 염기서열을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

균주 배양. 한국농용미생물보존센터로부터 분양 받은 *Phytophthora* 균주들은 V8 juice(V8 juice 200 ml, CaCO₃ 3 g/l)배지에서 1.5% agar를 첨가하여 25°C에서 배양하였다.

Elicitin 분리. V8 juice agar에 자란 *Phytophthora* 균주들의 elicitin 분비를 유도하기위해서 Plich배지(KH₂PO₄: 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O: 0.25 g, asparagines: 1 g, thiamine: 1 mg, yeast extract: 0.5 g, glucose: 25 g/l) 100 ml이 분주된 Roux bottle에 균주를 접종하고 25°C 암 조건 하에 4주간 정치 배양하였다. 배양액은 miracloth와 0.22 μ m membrane filter로 여과하여 균체를 제거하고 단백질을 침전시키기 위하여 100 ml의 배양액당 (NH₄)₂SO₄를 70.7 g을 첨가하여 4°C냉장고에 15시간 정도 정치 후 원심분리 하였다. 원심분리된 crude elicitin은 1 ml의 TE buffer[10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA]로 녹인후

*연락처

Phone: 82-31-299-1743, Fax: 82-31-299-1732
E-mail: syseo@rda.go.kr

sephacryl HR(Amersham사) column에서 elution buffer(75 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)로 용출하였고 이 시료를 여러 종의 식물체에 대한 과민감 반응 유도 탐색에 사용하였다. 또한 보다 더 정제를 하기 위하여 crude elicitin은 cation exchange인 Fast-flow sepharose S(Amersham사) column에 linear gradient(0-300 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)로 분리 하였다. 순수하게 분리된 elicitin은 Tricine-SDS-PAGE (16.5% gel)로 전기영동하여 그것의 정제 및 분자량을 최종 확인하였다.

과민감 반응 유도. 본 원의 온실에서 4주 정도 자란 무, 배추, 오이, 토마토, 고추 유묘의 잎을 날카로운 칼로 엽병과 함께 자른 후 여러 종의 *Phytophthora* 균주로부터 분리된 100 nM crude elicitin 시료에 30분간 침지하여 충분히 흡수시킨 다음 암조건의 28°C 항온기에서 습도를 충분히 주면서 2일간 배양하여 괴사 정도를 확인하였다.

N 말단의 아미노산 서열 분석. 순수하게 분리된 100 pmol의 elicitin을 PVDF membrane에 blotting한 다음 Edman degradation법으로 아미노산 서열을 분석 하였다.

결과 및 고찰

Elicitin 기주 특이성. 농용미생물 보존센터로부터 분양받은 다양한 *Phytophthora* 균주로부터 분리한 각 elicitin들의 기주 특이성을 조사하기 위하여 4주 정도 자란 식물체 엽병을 100 nM crude elicitin에 침지한 후 2일 정도 암조건 하에 습기를 유지 하면서 배양하여 식물체 잎의 괴사 정도를 관찰하였다(Fig. 1). Table 1에서와 같이 분리된 모든 elicitin은 십자화과 식물에서 강한 과민감반응을 보인 반면, 박과인 오이, 가지과인 토마토

에서는 괴사정도가 매우 미약하거나 활성이 없었다. 또한, 우리나라의 주요 경제작물인 고추의 품종별 괴사정도는 *P. cactorum*의 경우 KACC 40176 균주를 제외하고 강한 활성을 보였으나 *P. cryptogea*는 KACC 40189 균주를 제외하고 거의 활성을 보이지 않았다. 또한, *P. cambivora* KACC 40160 균주와 *P. citrophthora* KACC 40188 균주에서는 대부분의 고추품종에 대하여 활성을 보였다. 특히, *P. cambivora* KACC 40160인 경우 부강품종에서는 괴사정도를 볼 수 없었으나 금탑품종에서는 매우 강한 활성도를 보였다. Kamoun 등¹⁴⁾에 의하면 *P. parasitica*와 *P. cryptogea*의 elicitin은 무를 제외한 *Arabidopsis*, 배추등의 십자화과, 담배를 제외한 고추, 가지 등의 가지과 식물에서 활성을 보이지 않아서 elicitin은 식물에 따라 기주특이성을 가지고 있으며 특히, 무는 품종에 따라 활성에 큰 차이를 보여 cultivar 특이성을 가지고 있다고 하였다. 이는 Ricci 등⁴⁾이 주장한대로 elicitin은 담배의 비병원성균인 *P. parasitica*와 상호작용에서 특이적으로 작용하며 avirulence factor로 작용한다는 주장을 뒷받침 해준다. 그러나 Pernollet 등¹⁵⁾에 의하면 토마토가 기주인 *P. cryptogea*(cryptogein)와 *P. capsici*(capsicein)는 토마토 잎에서 괴사를 볼 수 있을 뿐만 아니라 capsicein인 경우 β -form인 cryptogein보다 담배에서 큰 활성을 보였으며 특히, 고추에 병원성을 유발하는 역병원균(*P. capsici*)에서 분리된 elicitin(capsicein)의 경우에도 기주인 고추에 큰 활성을 보여서 elicitin은 기주 특이성을 가지고 있지 않으며 이는 병원균 확산에 앞서 조직괴사를 유도하는 병원성 관여인자라고 하였다. 본 결과에서도 *P. cryptogea*와 *P. melonis*의 각 기주식물인 배추, 오이에서도 괴사를 보여서 병원성을 가진 역병원균은 기주식물에 괴사를 보이지 않는다는 Ricci 등⁴⁾, Kamoun 등¹⁴⁾의 결과와 상반되었다.

Table 1. Leaf necrosis assays of elicitins from Korean *Phytophthora* spp. to various plants

Strains	Radish	Chinese cabbage	Cucumber	Tomato	Cherry tomato	Pepper cultivars*			
						DM	KB	BK	KT
<i>P. cactorum</i>									
KACC 40174	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+	+++**
KACC 40175	+++	+++	+	-	+	+	++	++	+
KACC 40176	+++	+++	nd	nd	nd	-	-	-	+
KACC 40166	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+	++
<i>P. cambivora</i>									
KACC 40159	+++	+++	nd	nd	nd	-	-	-	-
KACC 40160	+++	+++	-	-	+	+	++	-	+++
<i>P. citrophthora</i>									
KACC 40186	+++	+++	-	nd	nd	-	-	-	-
KACC 40188	+++	+++	-	-	-	++	+++	++	+
<i>P. cryptogea</i>									
KACC 40413	+++	+++	nd	nd	nd	-	-	-	-
KACC 40189	+++	+++	-	-	+	+	-	++	+
KACC 40161	+++	+++	nd	nd	nd	-	-	-	-
<i>P. melonis</i>									
KACC 40189	+++	+++	+	-	-	+	+++	-	+

*Radish: Baek Kwang, Chinese cabbage: Sam Jin, Cucumber: Baek Bong, Tomato: Seo Kwang, Cherry tomato: Mini Carol, DM: Dae Myoung, KB: Kwang Bok, BK: Boo Kang, KT: Kum Top.

**Detached leaves were treated by the petiole dip assay with 100 nM elicitins: - indicates no visible response; + indicates single spot; ++ indicates minute necrotic spots; +++ indicates large necrotic areas; nd, not determined.

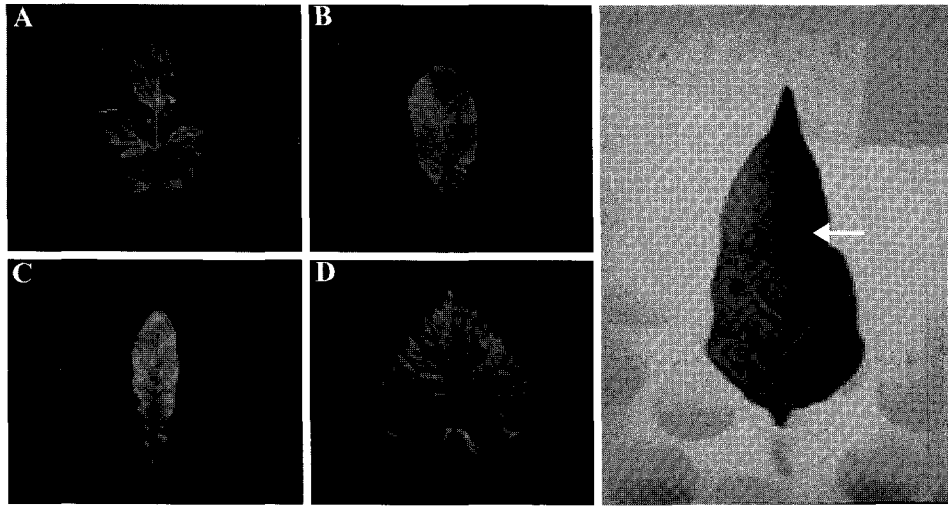


Fig. 1. Hypersensitive reactions on various plants induced by *P. cambivora* KACC40160 elicitin. A, tomato (Seo kwang); B, chinese cabbage (Sam Jin); C, radish (Baek Kwang); D, cucumber (Baek Bong) and E, hot pepper cultivar (Kum Top). The white arrow indicates necrosis. Leaves were photographed 2d after elicitin application.

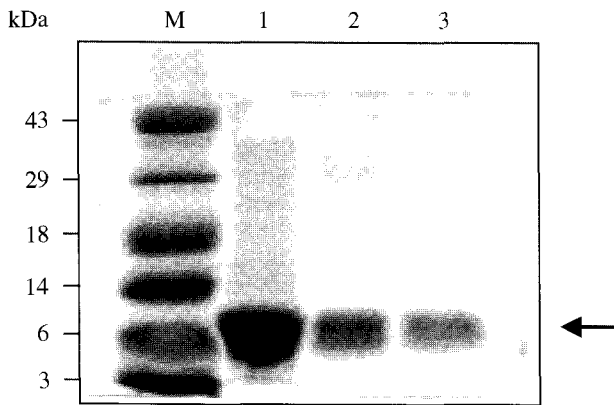


Fig. 2. Tricine-SDS-PAGE of protein samples at each stage of purification processes from culture filtrates of *P. cambivora* KACC 40160. Lane M, standard protein markers (LMW kit from Invitrogen Co); Lane 1, crude culture filtrate; Lane 2, bound to Sephrose S column; Lane 3, purified elicitin from Sephacryl HR column. Elicitin bands are indicated by arrow in the figure.

Elicitin 분리 및 정제. 새로운 종류의 elicitin을 분리하기 위해서 지금까지 elicitin의 존재가 보고되지 않은 *P. cambivora*

KACC 40160를 선발하여 배양한 후 단백질을 침전하였다. 이것의 정제를 위해 배양액으로부터 ammonium sulfate에 의해 침전된 crude단백질은 TE buffer로 녹인 후 sephacryl HR, ion exchange column 등에 의하여 FPLC로 순수 분리하였다. 최종적으로 분리된 elicitin은 식물의 과민감반응을 유도하는 물질임을 확인 하였고 특히, Tricine-SDS-PAGE에서 순수 하게 정제 되었음을 알았으며 그 분자량이 10 kDa임을 추정하였다(Fig. 1 와 2). *P. cambivora* KACC 40160에서 정제된 elicitin은 이후 cambivorein이라 명명하고자 한다. 또한, 균주 배양기간에 따라 elicitin의 생산정도를 측정하기 위하여 3일 간격으로 5 ml씩 배양액을 취하여 전기영동 한 결과 배양 후 6일 후부터 생산되기 시작하여 18일에 최대 생산을 볼 수 있었으며 그 이후로는 발현량의 차이를 볼 수 없었다(Fig. 3). 이는 *P. cambivora*의 균사체는 18일 이후부터는 생육을 하지않거나 mRNA의 발현이 이루어지지 않음을 간접적으로 알 수 있는데 실제로 Terce-Laforgue 등¹⁶⁾은 mRNA의 발현이 2일부터 볼 수 있었으며 18일 이후에는 발현을 볼 수 없었고 또한 균사체의 양도 18일 이후에는 차이가 없었다고 하여 본 결과와 유사하였다. 또한 최근에 보고된 *P. palmivora*의 경우 배양후 5일부터 elicitin이 분

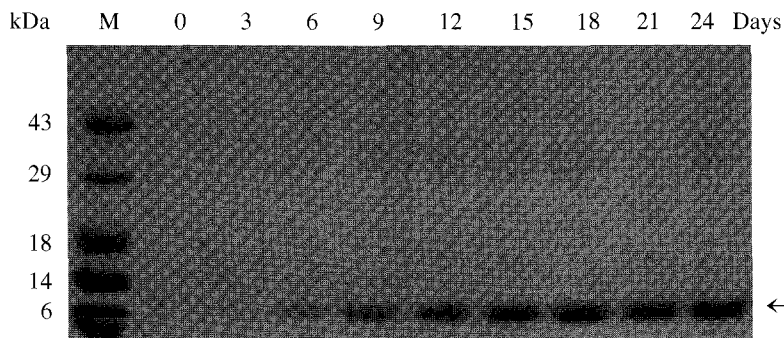


Fig. 3. Extracellular proteins secreted by *P. cambivora* grown in Plich media for every three days. Culture filtrates were separated on a 16.5% polyacrylamide gel of Tricine-SDS-PAGE then stained with Coomassie brilliant blue R250. Lane M is standard protein marker (LMW kit from Invitrogene Co). Elicitin bands are indicated by arrow in the figure.

		5	10	15	20
Camβ	T A	C T	S T Q Q T A A	Y K T	L V S I L S
Cinβ	T A	C T	A T Q Q T A A	Y K T	L V S I L S
Cryβ	T A	C T	A T Q Q T A A	Y K T	L V S I L S
Dreβ	T A	C T	S T Q Q T A A	Y T T	L V S I L S
Mgmβ	T A	C T	T T Q Q T A A	Y K T	L V S I L S
Cinα	T T	C T	S T Q Q T A A	Y V A	L V S I L S
Dreα	T T	C T	S T Q Q T A A	Y V T	L V S I L S
Mgmα	T T	C T	S T Q Q T A A	Y V T	L V S I L S
Citro	T T	C T	T T Q Q T A A	Y V A	L V S I L S
Cryα	T T	C T	T T Q Q T A A	F V A	L V S I L S
Cap	A T	C T	T T Q Q T A A	Y V A	L V S I L S

Fig. 4. Comparison of the N-terminal sequences of elicitin isoforms from various *Phytophthora* spp.. Boxes show the conserved consensus regions. Each elicitin isoform is arranged in decreasing order of their toxicity to tobacco from the top to bottom of the figure. Camβ, *P. cambivora* elicitin; Cap, capsicein, *P. capsici* elicitin; Cin, cinnamomin, *P. cinnamomi* elicitin; Citro, *P. citrophthora* elicitin; Cry, cryptogein, *P. crytozea* elicitin; Dre, *P. drechleri* elicitin; Mgm, *P. megasperma* elicitin.

비되기 시작하여 20-35일 사이에 최대 생산을 볼 수 있었다고 하였는데¹⁷⁾ 이렇게 약간의 생산기간 차이를 보이는 것은 균의 종류, 배양시 균사체의 접종량 또는 생육환경조건등에 따라 약간씩 다를 수 있다.

N-말단 아미노산 염기서열. Elicitin은 98개의 아미노산과 10 kDa의 분자량을 가지고 있으며 두개의 isoform인 α 및 β-elicitin을 가지고 있는데 활성도면에서는 β-form이 α-form보다 50배정도 강하며 지금까지 10종류의 elicitin 아미노산 염기서열이 밝혀졌다.⁸⁻¹¹⁾ 다른 elicitin과 비교분석된 cambivorein은 N-말단영역의 아미노산 배열이 일반적으로 매우 conserved되어 있으며, 특히 di-sulfide(-S-S-) 결합에 의해 elicitin의 folding에 관여하는 3개 domain중 하나의 영역인 N말단 영역의 3번 위치에 역시 cysteine(C)을 가지고 있었다(Fig. 4).¹²⁾ 또한 일반적으로 elicitin isoform에서 α-form(acidic elicitin)인 경우 13번째 아미노산이 hydrophobic잔기인 valine(V)을 가지고 있는 반면 β-form(basic elicitin)은 hydrophilic잔기인 lysine(K), threonine(T)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. O'Donohue 등¹⁸⁾은 *P. crytozea*로부터 분리된 β-crytogein의 13번째 아미노산을 valine으로 돌연변이시킨 경우 기존의 β-form보다 과시활성도가 낮았으며 이는 이 위치의 아미노산 종류가 α,β-isoform을 구별해주는 중요한 기준임을 밝혔다. 따라서 본 연구에서 정제한 cambivorein(Camβ)은 13번째 위치에 lysine이 존재하므로 β-form elicitin임을 알 수 있었다. Fig. 4와 같이 Camβ은 13번째 위치의 lysine을 제외하고 *P. drechleri*에서 유래된 Dreβ와 가장 유사하였으나 보다 정확한 것은 전체 아미노산 배열이 결정되어야 알 수 있을 것 같다.

참고문헌

- Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors-A defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 243-293.
- Dixon, R. A. and Lamb, C. J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 347-364.
- Ebel, J. and Scheel, D. (1990) In *Plant gene research: Elicitor recognition and signal transduction*. Boller, T. and Meins, F. (eds.) Springer-Verlag, Vienna, pp. 184-205.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.-C., Sallantin, M., Beauvais, Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.-C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* **183**, 555-563.
- Huet, J. C., Le Car, J. P., Nespoulos, C. and Pernollet, J. C. (1995) The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 302-310.
- Nespoulos, C., Huet, J.-C. and Pernollet, J.-C. (1992) Structure function relationships of α and β elicitins signal proteins involved in the Plant-Phytophthora interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- Ricci, P. (1997) In *Plant Microbe Interactions (vol 3): Induction of hypersensitive response (HR) and systemic acquired resistance (SAR) by fungal proteins: the case of elicitins*. Stacey, G., Keen, N. T. (eds.) Chapman and Hall, New York, pp. 53-75.
- Huet, J.-C., Nespoulos, C. and Pernollet, J.-C. (1992) Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechleri*. *Phytochem.* **31**, 1471-1476.
- Huet, J.-C. and Pernollet, J.-C. (1993) Sequence of acidic and basic elicitin isoforms secreted by *Phytophthora megasperma megasperma*. *Phytochem.* **33**, 797-805.
- Huet, J.-C., Mansion, M. and Pernollet, J.-C. (1993) Amino acid sequence of the α elicitin secreted by *Phytophthora cactorum*. *Phytochem.* **34**, 1261-1264.
- Ricci, P., Trentin, F., Bonnet, P., Venard, P., Mouton-Perronet, F. and Bruneteau, M. (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathol.* **41**, 298-307.

12. Yu, L. M. (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 4088-4094.
13. Viard, M-P., Martin, P., Pugin, A., Ricci, P. and Blein, J-P. (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **104**, 1245-1249.
14. Kamoun, S., Young, M., Glascock, C. and Tyler, B. M. (1993) Extracellular protein elicitor from *Phytophthora*: Host specificity and induction of resistance to fungal and bacterial Phytopathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 15-25.
15. Pernollet, J-C., Sallantin, M., Salle-Tourne, M. and Huet, J-C. (1993) Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: Comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Path.* **42**, 53-67.
16. Terce-Laforgue, T., Huet, J-C. and Pernollet, J-C. (1992) Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol.* **98**, 936-941.
17. Churngchow, M. and Raltarasam, M. (2000) The elicitin secreted by *Phytophthora palmivora*, a rubber tree pathogen. *Phytochem.* **54**, 33-38.
18. O'Donohue, M. J., Gousseau, H., Huet, J-C., Tepfer, D. and Pernollet, J-C. (1995) Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding -cryptogein, an elicitin produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Mol. Biol.* **27**, 577-586.

Purification of a New Elicitin from *Phytophthora cambivora* KACC40160

Yun-soo Yeo*, Sang-hong Yoon, Shin-chul Bae¹, In-cheol Park, Bon-sung Koo and Young-hwan Kim (*Metabolic Engineering Division; ¹Molecular Physiology Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea*)

Abstract: Elicitins, proteinaceous elicitors secreted from Oomycetes fungi (*Phytophthora* spp. and *Pythium* spp.), have been known as inducer of hypersensitive response (HR) in incompatible interactions between plant and pathogens. Five elicitins among many Korean *Phytophthora* species caused the reactions of distal HR in radish, chinese cabbage and some hot pepper cultivars, but not in cucumber and tomato. Because the isolation of elicitin from *Phytophthora cambivora* hasn't been reported yet, we have purified a cambivorein, a new member of the elicitin family, from the culture filtrate of *Phytophthora cambivora* (KACC 40160) by using FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, AKTA) with sepharose S and Sephacryl HR columns. We confirmed that it induces necrosis activities in some hot pepper cultivars and its molecular weight is about 10 KDa by Tricine-SDS-PAGE. Comparison of amino acid sequences of its N-terminal ends also informed the identification of lysine at the 13th position, which is characteristic of a kind of basic elicitin isoform (β -elicitin). It also showed that our elicitin is not identical with N-terminal sequences of many elicitins reported from *Phytophthora* spp..

Key words: elicitin, *Phytophthora cambivora*, hypersensitive response

*Corresponding author