

담배식물체에서 스트레스에 따른 Matrix Metalloproteinase의 활성

오인숙, 소상섭*
전북대학교 생물과학부

Stress-induced Activity of Matrix Metalloproteinase in Tobacco Plants

In-Suk Oh, Sang-Sup So*

Division of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

ABSTRACT Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases produced by a variety of cell type, and have a fundamental role in the degradation and remodeling of extracellular matrix. In this study, we screened the secretion of MMPs in leaves of different developmental stages and in response to environmental stress using tobacco. Compare with fully maturing leaves and older leaves, the rate of MMPs activity was high in expanding and younger leaves. It is tempting to speculate that MMPs may be involved in tissue modeling, which must occur during leaf expansion. The MMPs activity in tobacco leaves grown in the presence of stressors showed a significantly increase at salinity treatment and pathogen infection. The MMPs activity in salinity and pathogen treatment increased respectively, by 1.2- and 1.5-fold with respect to the control. These results suggest that MMPs may be involved in plant defence against adverse environment and pathogenic infection.

Key words: Extracellular matrix, MMPs, stress, tobacco

서 론

세포는 세포내의 세포질 함유물질과 체제뿐만 아니라 세포외 기질 (extracellular matrix)이라 불리는 복잡한 혼합물에 의해 특성화된다. 일반적으로 세포외 기질은 조직의 형태형성, 분화, 상처치유와 같은 정상적인 과정뿐만 아니라 종양의 전이 및 침윤 같은 질병과 관련된 비정상적인 과정의 빠른 재구성에도 관여한다. 세포의 생리적인 과정에서 세포외 기질의 분해와 재구성에 중요한 역할을 하는 것은 matrix metalloproteinases (MMPs)이다 (Birkedal-Hansen 1995; Borkakoti 2000). MMPs는 Zn^{2+} -의존성 endopeptidase로서 pre-proenzyme 형태로 분비되며 내재성 억제자인 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)에 의하여 다양한 방법으로 그 활성이 조절된다 (Woessner 1991). 동물에서,

MMPs는 지금까지 20여 종류가 알려져 있으나 세포외 기질의 재구성과정에 중요한 역할을 하는 MMPs로는 gelatinases, collagenases, stromelysins 등 (Matrisian 1992; Frederick and Woessner 1998)이며, 그 기능은 발생, 배발생, 기관형성 및 상처치유에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 암과 관절염 같은 병적인 과정에도 참여한다고 알려져 있다 (Wang et al. 1999).

한편 고등식물의 MMPs에 대한 보고는 Graham 등 (1991)의 콩 유래 MMP인 SMEP1이 최초이다. SMEP1은 성숙한 잎에서 발견되며 다른 조직에서는 발견되지 않는다고 보고되었다 (Pak et al. 1997). 또한 애기장대에서는 조직과 발생 단계에 따라 MMPs 발현양상이 다르며 (Maidment et al. 1999; Gollack et al. 2002), 오이의 자엽으로부터 분리된 MMP (Cs1-MMP)는 엽록소의 분해가 일어나고 있는 노화된 잎에서만 발견되며 노화의 경계에서 세포사멸을 조절하는 것으로 보고하였다 (Delorme et al. 2000). Liu 등 (2001)은 세균에 감염된 콩 배측으로부터 분리한 MMP-2

*Corresponding author Tel 063-270-2786 Fax 063-270-3362
E-mail sso@chonbuk.ac.kr

유전자 (GmMMP2)는 발생, 세포사멸 및 조직노화 과정에 관여하는 것이 아니라 병원균 감염에 대한 방어기작에 중요한 역할을 한다고 제안하였다. 지금까지의 연구결과를 보면 식물에서 MMPs는 식물의 성장과 발생과정, 개화와 노화과정 및 세균에 대한 방어 기능에 중요한 생리적인 역할을 수행하는 것으로 추정되는데 그 정확한 기작은 아직 규명되지 않은 상태이다.

따라서 본 연구에서는 담배 식물체에서 MMPs의 존재를 확인하고 또한 환경적 스트레스에 대한 방어물질로서 MMPs의 발현양상을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 생육조건

담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) 종자를 MS기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 약 2주간 16시간 광, 8시간 암주기의 25°C 조건에서 발아시킨 후 생장이 온전한 유식물체를 선발하여 플라스틱 화분으로 이식하여 온실에서 약 5주 이상 성장시킨 후 실험에 사용하였다.

스트레스 처리

Salicylic acid 처리

7주된 식물체의 잎에 0.5 mM salicylic acid (Sigma, St. Louis, MO)로 스프레이 한 다음 48시간 후에 시료를 채취하였다.

염 및 카드뮴처리

염과 카드뮴 처리를 위해 식물체를 Hoagland 용액으로 옮겨 10일간 수경재배 하였으며, 20 mM NaCl과 150 µM CdCl₂를 각각 처리한 후 48시간 생육시켰다.

세균접종

식물체의 세균접종은 *Pseudomonas syringae* 균주를 NA 배지 (5 g peptone, 3 g beef extract, 2 g yeast extract), 28°C에서 배양 후 원심분리하여 멸균수에 현탁 (OD₆₀₀=0.1) 하고 주사기를 이용하여 잎의 일부분에 침투시켰다. 접종 72시간 후에 효소활성을 비교하였으며, 대조구로는 세균현탁액 대신 멸균수를 이용하였다.

조효소액 추출

식물체의 생중량 0.5 g에 100 mM Tris-HCl 완충액 (pH 6.8) 1 mL를 넣고 얼음 위의 유티에서 마쇄한 후 8,000 g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용

하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다.

MMPs 활성 측정

MMPs 활성은 Graham 등 (1991)의 방법과 Zhou 등 (2004)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 조효소액에 MMPs활성을 억제하는 착화물 (5 mM EDTA)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 전배양 시킨 후, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 1 mL에 0.001% (w/v) Azocoll (Calbiochem, Richmond, CA)이 포함된 반응액을 넣어 4시간 동안 37°C에서 교반시키면서 반응시켰다. 반응혼합물을 원심분리 후 얻은 상등액을 520 nm에서 흡광도 변화를 조사하여 다음식으로 계산하였다.

$$\text{MMP 활성} = \text{OD}_{520 \text{ control}} - \text{OD}_{520 \text{ EDTA}}$$

대조시료는 기질을 분해할 수 있는 모든 단백질분해효소를 포함한다고 가정한다. 반면에 EDTA로 처리한 시료는 기질을 분해할 수 있는 모든 비-MMP 단백질분해효소를 포함한다. Data는 대조 시료와 비교하여 단백질 밀리그램 (mg) 당 흡광도의 변화를 arbitrary units로 표시하였다.

Gelatin zymography

MMPs의 기질분해 활성은 gelatin zymography를 행하여 확인하였다. Gelatin zymography는 MMPs의 기질인 gelatin을 SDS-PAGE의 running gel에 첨가한 후 환원조건에서 전기영동한 다음 1% Triton X-100 완충용액에서 재변성 시킨 후 배양 완충용액 (0.05 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M NaCl, 5 mM CaCl₂와 0.02% Brij-35)에서 16시간 반응시켰다 (37°C). 이후 0.5% Coomassie brilliant blue R250으로 3시간 염색시킨 다음 10% acetic acid, 30% 메탄올에서 투명한 밴드가 나타날 때까지 탈색시켰다.

결과 및 고찰

잎의 MMPs 활성

잎의 MMPs 활성은 잎이 완전히 전개된 12주 식물체를 이용하여 잎의 정상부위에서부터 기부까지의 모든 잎을 채취하여 조사하였다. MMPs의 활성은 정상부위의 아주 어린 잎에서부터 노화된 잎에 이르기까지 모든 잎에서 나타났다. 특히 정상부위의 잎보다는 엽신의 확장이 서서히 일어나고 있는 중간부위의 어린잎에서 활성이 높았으며 기부부위 오래된 잎이나 노화된 잎에서는 감소하였다 (Figure 1). 식물 세포의 경우 세포의 기질은 탄수화물과 단백질이 주된 구성성분으로 주로 세포벽을 구성하고 있으며, 식물의 세포외

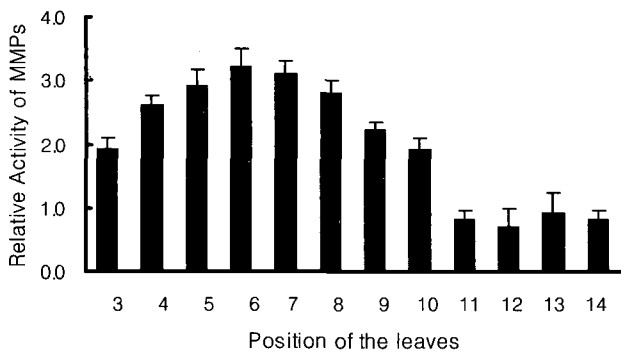


Figure 1. Developmental control of MMPs activity in tobacco. Crude enzyme extract was prepared from very young to old senescent leaves taken from 12 week old tobacco plants. The numbers indicate the position of the leaves as counted from the top to the base of the shoot.

기질에서 일어나는 신호전달과정 및 단백질 가공 현상들은 동물에서 일어나는 현상과 유사하다고 알려져 있다 (Lease et al. 1998; Satterlee et al. 1998). 이는 MMPs가 잎이 확장하는 동안 세포내 공간 형성을 위해 세포벽의 부분적인 분리 및 조직 재구성에 세포의 기질 단백질분해효소로 작용하여 식물체 잎의 신장에 중요한 역할을 한다는 것을 시사하고 있다.

환경 스트레스에 따른 MMPs 활성

Salicylic acid, NaCl 및 cadmium 처리

Salicylic acid는 바이러스, 진균, 세균 등 다양한 병원체의 공격에 대해 광범위한 저항성을 나타내는 전신획득 저항성-유도 신호전달물질이다 (Glazebrook 1999; Shah et al. 1999). 0.5 mM salicylic acid의 처리에 의한 MMPs의 활성은 Figure 2에 나타난 것처럼, 대조군과 비교해 볼 때 유의한 증가를 나타내지 않았다. 한편, 200 mM NaCl를 처리한

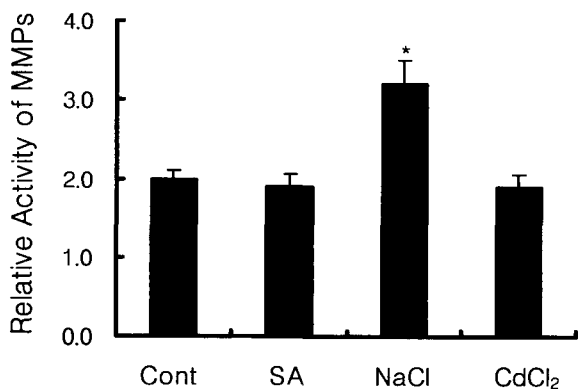


Figure 2. MMPs activity in leaf crude extracts isolated from tobacco grown under various stress conditions. Cont, control; SA, 0.5 mM salicylic acid; NaCl, 200 mM NaCl; CdCl₂, 150 μM CdCl₂. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Student's *t* test. *P<0.05 versus control.

잎의 MMPs 활성은 대조군에 비해 1.2배 높았다 (Figure 2). 염처리 48시간 이후, 식물체는 엽신의 크기가 줄어드는 장애증상이 육안으로 관찰되었다. 잎의 크기가 줄어들어도 불구하고 염처리를 받은 잎의 MMPs의 활성이 높게 측정되었는데 이는 식물체가 불리한 환경에 대한 적응으로 나타난 결과로 사료되었다. 세포외 기질의 단백질 조성은 발생적·환경적 자극에 영향을 받아 어떤 단백질들은 세포외 기질내에 축적되어지고 일부 단백질들은 가공되거나 분해된다. 식물체에 있어서 고농도의 염은 식물에 독성이온의 축적과 수분 스트레스를 포함한 다양한 원인으로 생육에 장애를 주어 세포의 수분흡수와 필수원소의 흡수를 억제하며, 결과적으로 이온결핍 장애를 받게된다. 또한 Na와 Cl 이온의 과잉 흡수도 식물체내에 축적되어 독성을 유발시킨다고 알려져 있다 (Flowers et al. 1985; Greenway and Munns 1980). 카드뮴은 식물의 엽록소 형성 및 CO₂ 고정을 저해하여 광합성을 방해하며 미량원소와 다량원소의 흡수와 분포에 영향을 미쳐 정상적인 성장과 발달을 억제하는 증진속으로 알려져 있다(Somashekaraiyah et al. 1992; Wagner 1993; Gussarson et al. 1996). 따라서 본 연구에서 스트레스 원인으로 카드뮴을 처리하여 단백질 분해효소 활성을 측정된 결과 MMPs의 변화를 유도하지는 않았다 (Figure 2). 본 연구결과 담배 식물체에서 MMPs 활성은 염처리를 제외한 다른 스트레스 반응들에 대해 영향을 받지 않았다.

병원균 접종에 의한 MMPs 활성

식물은 동물에서 볼 수 있는 특별한 면역체계를 가지고 있지 않지만 다양한 병원균 감염에 대해서 생물 및 무생물적 유도인자들에 의해 유발될 수 있는 효과적인 방어기작들을 갖고 있다. 즉, 병원균 침입에 의해 많은 단백질들이

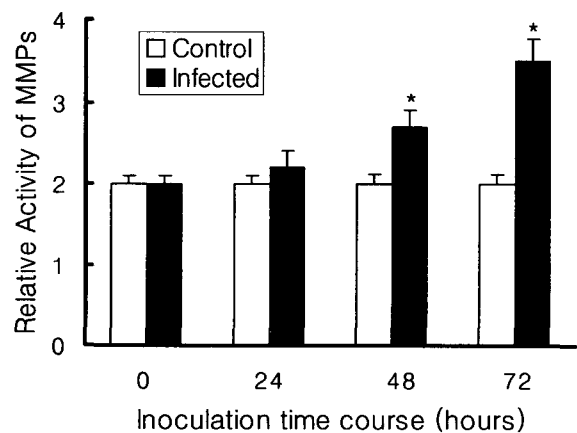


Figure 3. MMPs activity of the tobacco leaves upon infection with *Pseudomonas syringae*. Suspensions of *P. syringae* strains were infiltrated locally in one part of the leaf. Control plants were injected similarly with the sterile water containing no bacteria. Samples were analyzed 24~72 h post-inoculation. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Student's *t* test. *P<0.05 versus control.

유도되거나 혹은 그들의 활성이 현저하게 증가되는 능동적인 방어기작들이 있다 (Ouchi 1983; Sequeira 1983). 병원균 감염에 의한 MMPs 활성을 조사하고자 식물의 일반적인 병원균인 *Pseudomonas syringae* 균주를 잎에 접종하여 72 시간 후에 대조군과 비교하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 접종 48시간 이후부터 대조군에 비해 활성증가를 나타내 72시간 후에는 1.5배의 유의할만한 활성 증가를 나타냈다. MMPs의 활성 증가는 세포가 병원균 감염에 대한 능동적인 방어 결과로 해석된다. 이러한 결과는 Liu 등 (2001)이 콩 배축으로부터 분리한 MMP 유전자 (GmMMP2)가 병원균 감염에 대한 방어기작에 관여한다고 밝힌 사실과 일치되는 것으로 차후에 전사체 및 단백질 수준에서 병원균 접종에 따른 MMPs의 발현변화를 확인하고자 한다.

Gelatin Zymography

MMPs의 활성을 정확히 확인하기 위해서는 gelatin zymography가 요구된다. Gelatin zymography를 이용하여 환경 스트레스에 의한 MMPs의 분비량을 조사한 결과, Figure 4에서 보는 바와 같이 대조군과 비교하여 NaCl 처리시 MMPs의 활성이 약 1.8배 높았으며, 병원균 감염에 의한 MMPs 활성 또한 72시간 후에 약 4.5배 정도 분비량이 증

가하였으며, 흡광도를 이용한 MMPs 정량 자료와 유사하였다 (Figure 2 와 Figure 3). 또한 salicylic acid와 CdCl₂의 처리에 의해서는 유의할만한 활성 변화가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 식물의 MMPs 활성이 환경스트레스 요인에 의해 선택적으로 유도된다는 것을 시사하고 있다.

적 요

MMPs는 Zn²⁺-의존성 endopeptidase로서 세포의 기질을 분해하는 능력을 갖고 있다. 본 연구에서는 담배식물체에서 잎의 발생단계별로 분비되는 MMPs의 활성과 환경 스트레스에 의한 MMPs의 활성을 조사하였다. 그 결과 MMPs의 활성은 기부 부위의 완전히 성숙한 잎보다 엽신의 확장이 일어나고 있는 어린잎에서 높았다. 이는 식물체에서 잎 신장을 위한 세포내 공간 형성 및 조직재구성에 MMPs가 중요한 단백질분해효소로 작용함을 시사하였다. 또한 환경 스트레스에 대한 반응으로서 MMPs의 활성을 조사한 결과 염처리와 병원균 감염에 의해 각각 1.2배와 1.5배의 증가를 보였다. 이러한 결과는 식물체가 발생단계 외에도 불리한 환경에 대한 방어 수단으로 MMPs가 생성 분비함을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 2002년도 전북대학교지원 연구비에 의하여 수행되었음.

인용문헌

Birkedal-Hansen H (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 7: 728-735
 Borkakoti N (2000) Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med* 78: 261-268
 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
 Delorme VG, McCabe PF, Kim DJ, Leaver CJ (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. *Plant Physiol* 123: 917-27
 Flowers TJ, Troke PE, Yeo AR (1985) The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann Rev Plant Physiol* 28: 89-121
 Frederic J and Woessner JF Jr (1998) The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, RP Mecham RP, (eds), *Matrix metalloproteinase*, Academic Press, London, pp

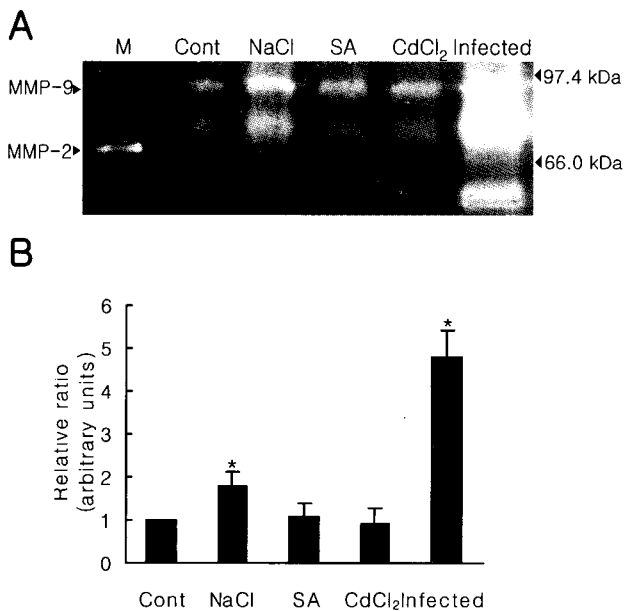


Figure 4. A, Gelatin Zymography of MMPs in leaf crude extracts isolated from tobacco grown under various stress conditions. Equal amounts of proteins (20 µg/lane) from leaf crude extracts were loaded into each lane on 10% SDS-polyacrylamide gel containing gelatin as a substrate. M, Standards of MMPs; Cont, control; NaCl, 200 mM NaCl; SA, 0.5 mM salicylic acid; CdCl₂, 150 µM CdCl₂; Infected, *Pseudomonas syringae*-infected plants. B, The relative densitometry values are shown. Bars represent means ± SD from four independent experiments. Statistical significance was tested using one-way ANOVA followed by the Student's *t* test. *P<0.05 versus control.

1-14

- Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol* 2: 280-286
- Goldack D, Popova OV, Dietz KJ (2002) Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 5541-5547
- Graham JS, Xiong J, Gillikin JW (1991) Purification and developmental analysis of a metalloproteinase from leaves of *Glycine max*. *Plant Physiol* 97: 786-792
- Greenway H, Munns R (1980) Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann Rev Plant Physiol* 31: 149-190
- Gussarson M, H Asp, Adalsteinsson S, Jensen P (1996) Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulphoximine (BSO). *J Exp Bot* 47: 211-215
- Lease K, Ingham E, Walker JC (1998) Challenges in understanding RLK function. *Curr Opin Plant Biol* 1: 388-392
- Liu Y, Dammann C, Bhattacharyya MK (2001) The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiol* 127: 1788-1797
- Maidment JM, Moore D, Murphy GP, Murphy G, Clark IM (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and Activity. *J Biol Chem* 274: 34706-34710
- Matrisian LM (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *BioAssays* 14: 455-463
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ouchi S. (1983) Induction of resistance or susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* 21: 289-315
- Pak JH, Liu CY, Huangpu J, Graham JS (1997) Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. *FEBS Lett* 404: 283-288
- Satterlee JS, Sussman MR (1998) Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *J Membr Biol* 164: 205-213
- Sequeira L (1983) Mechanisms of induced resistance in plants. *Annu Rev Microbiol* 37: 51-79
- Shah J, Kachroo P, Klessig DF (1999) The *Arabidopsis* ssi1 mutation restores pathogenesis-related gene expression in npr1 plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* 11: 191-206
- Somashekaraiah BV, Padmaja K, Prasad ARK (1992) Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipides in chlorophyll degradation. *Physiol Plant* 85: 85-89
- Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv Agron* 51: 173-212
- Wang Y, Johnson AR, Ye QZ, Dyer RD (1999) Catalytic activities and substrate specificity of the human membrane type 4 matrix metalloproteinase catalytic domain. *J Biol Chem* 274: 33043-33049
- Woessner JF Jr (1998) Role of matrix proteases in processing enamel proteins. *Connect Tissue Res* 39: 69-73
- Zhou HE, Zhang X, Nothnick WB (2004) Disruption of the TIMP-1 gene product is associated with accelerated endometrial gland formation during early postnatal uterine development. *Biol Reprod* 71: 534-539

(접수일자 2004년 9월 15일, 수리일자 2004년 11월 17일)