

## *Euphorbia lathyris*에서 분비되는 Latex 65 kD 단백질의 특성규명

박희성\*

대구가톨릭대학교 식물유전공학과

### Characterization of 65 kD Protein in Latex Excreted from *Euphorbia lathyris*

Hee Sung Park\*

Department of Plant Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

**ABSTRACT** Soluble latex protein fraction excreted from *Euphorbia lathyris* laticifer was resolved by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis to identify distinctively displayed latex major protein bands including ELp65, ELp55, ELp43, ELp32 and ELp23. Among them, ELp65 was purified by ammonium sulfate precipitation, gel permeation chromatography and ion exchange chromatography. Its N-terminal amino acid sequencing revealed its homology to the leading region of mature peptide of tomato p69a subtilisin-like protease, suggesting a certain role involved in plant defense system. In the analysis of Southern blot hybridization using PCR-amplified tomato p69a probe DNA, *E. lathyris* genome was suggested to have a gene family consisting of 3-5 gene members putatively encoding subtilisin-like proteases.

**Key words:** *Euphorbia lathyris*, latex, plant defense, tomato subtilisin-like protease

#### 서 론

Resin duct와 laticifer는 식물조직내의 분비관련 구조로서 잘 알려져 있으며 laticifer (유관)의 경우는 latex (유액)을 함유하는 network로서 그 생성요인에 따라 articulated laticifer (유절유관)와 non-articulated laticifer (무절유관)으로 나눌 수 있다. 무절유관의 경우 민들레속이나 양귀비속에서 볼 수 있으며 발생초기에 하나의 세포로서 출현하여 빠르게 성장하고 그 선단은 주위의 세포사이를 뚫고 성장, 분지하여 식물체의 모든 조직에 이르는데 이는 세포간의 격벽일부 또는 전부가 소실되어 일종의 살아있는 세포 channel이 형성되는 것으로서 식물생장과 함께 분화를 계속하여 식물전체에 그 network이 형성되는 것이다. 그 사이에 핵은 분열을 계속하지만 격벽은 형성하지 않기 때문에 전체로서는 많은 핵을 지닌 하나의 세포 (유관세포)로

된다 (Roshchina and Roshchina 1993). Laticifer는 압력상태에 걸려있어 식물에 상처부위가 만들어지면 latex가 쉽게 분출되는데 천연고무 (*cis*-1,4-polyisoprene)를 생산하는 *Hevea brasiliensis* 또는 주변의 식물에서 흔하게 그 현상을 관찰할 수 있다 (Amalou et al. 1992; Cornish 1993). Laticifer cell은 대부분 vacuolar sap으로 채워져 있으며 분화 후기에 이르러 특히 lysosomal activity를 지니는 수많은 액포 (lutoid)는 다양한 효소활성과 또한 항균, 항곰팡이 역할을 나타내는 lysozyme, lectin,  $\beta$ -1,3-glucanase 등이 발견되고 있다. Latex를 생산하는 식물체는 2000 종 이상인 것으로 알려져 있는데 이들 식물이 latex를 함유하고 있는 기능적 이유에 대해서는 분명치 않다. *H. brasiliensis* latex 내 mRNA 및 *in vitro* polypeptide 연구에 의하면 특히 고무 생합성관련 (HMG-CoA reductase, HMG-CoA synthase), 식물방어 관련 (chalcone synthase, chalcone isomerase, phenylalanine ammonia lyase, cinnamyl alcohol dehydrogenase, PR proteins, chitinase), 그리고 laticifer biogenesis와 관련된 가수분해효소 (cellulase, polygalacturonase)

\*Corresponding author Tel 053-850-3245 Fax 053-850-3459  
E-mail hspark@cu.ac.kr

등의 발현이 매우 높은 것으로 보고되었으나 광합성 관련 유전자 발현은 거의 나타나지 않았다 (Broekaert et al 1990; Kush et al. 1990). 이 외에도 Papaya로부터의 lysozyme (chitinase), papain, cysteine proteinase (Buttle et al. 1989; Michaud et al. 1993; Beintema and Terwisscha van Scheltinga 1996), *Jatropha curcas*의 curcain (Nath and Dutta 1991) 등 식물체의 방어관련 단백질 등에 관한 보고가 있다.

*Euphorbia lathyris*는 latex를 풍부하게 분비하는 식물로서 latex단백질에 대한 연구로서는 가령 43,000 Da의 proteinase으로서의 euphorbain이 active center에 serine이 존재할 것이라는 오래된 보고가 있는데 (Lynn and Clevette-Radford 1983) 본 연구에서는 풍부하게 분비되는 *E. lathyris* latex로부터의 단백질에 대한 분리, 분석 및 그 기능에 관련된 예측을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Latex 수집

*E. lathyris*의 종자를 입수하여 이를 3-4월 경 집단으로 파종하여 발아한 유묘를 노지로 이식하여 생육시켰으며 8-9월 경 1 m 정도의 높이로 성장한 *E. lathyris* 식물체로부터 latex를 수집하였다. 즉 3-4 개의 간격으로 위치한 잎의 엽병을 날카롭게 절단하여 분출되는 유액을 1.5 mL tube를 이용하여 수집한 후 단백질분리 때까지 -70°C에 보관하였다.

### Latex 단백질의 분리

수집한 latex와 extraction buffer [50 mM Tris-HCl (PH 7.5), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 10 mM KCl, 1 µL/mL aprotinin, PMSF 2 mM]를 1:3의 비율로 섞은 후 원심분리 (14,000 rpm, 30 min, 4°C) 한 후, 이로부터의 맑은 용액을 다시 syringe filter (0.42 µm pore size)로 통과시켜 rubber 물질을 제거하였다. 이 용액은 70% ammonium sulfate 침전과정을 거쳐 원심분리 (14,000 rpm, 30 min, 4°C)를 실시하였으며 그 침전물을 extraction buffer로 녹이고 계속적으로 Centricon™ 3의 사용으로 desalting과정을 진행하였다. Gel permeation chromatography를 위하여 Sephacryl S-200 HR (equilibration은 aprotinin을 첨가하지 않은 extraction buffer를 이용, flow rate 2 mL/tube)을 이용하였으며 size별로 단백질을 수집하였으며 각 단백질 fraction 별로 cation exchange chromatography (Resource Q, KCl gradient 0.01-1 M, 2 mL/tube)를 사용하여 정제하였다. 분리된 단백질의 N-terminal amino acid 서열분석을 위하여 한국기초과학지원연구원의 프로테옴분석팀에 의뢰하였다.

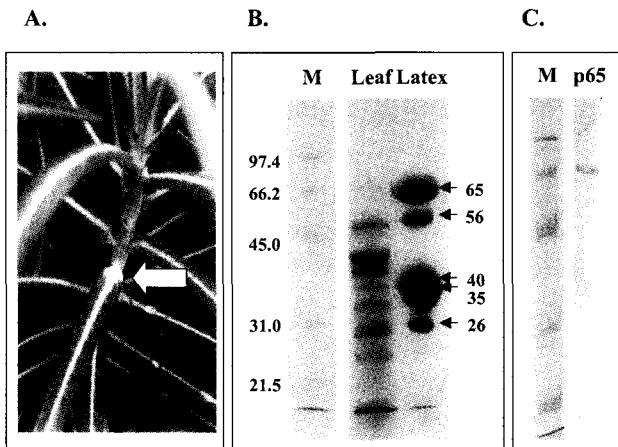
## Southern hybridization

식물재료는 액체질소를 이용하여 갈아서 매우 고운 분말로 준비한 후 이를 CTAB용액과 chloroform:isoamylalcohol을 이용한 추출방법 (Glick and Thomson 1993)으로 genomic DNA를 분리하였다. 제한효소를 처리한 DNA를 0.8% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 alkaline용액 (1 M NaCl, 400 mM NaOH)을 이용한 downward transfer에 의하여 nylon membrane에 부착시키고 UV-crosslinker (CL-1000, UVP Inc. USA)의 auto mode에 의하여 DNA를 고정시켰다. Hybridization [buffer (5XSSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulfate), 50°C, 16 hr]을 위한 probe DNA의 labeling과 autoradiography에 의한 detection을 위하여 Bright Star Psoralen-Biotin nonisotopic labeling kit와 CDP-Star detection system (Ambion Inc. USA)을 각각 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Latex의 단백질 분석

*E. lathyris*로부터의 latex는 식물체의 발달이 완전해질수록 그 수집할 수 있는 양이 많아지는데 따라서 충분히 생육이 이루어진 식물체로부터 또는 집단파종 후 대량의 유묘로부터 충분한 유액을 준비하였다. 가령, 노지에서 충분히 성장한 한 개체의 식물로부터 약 1 mL의 latex를 수집할 수 있었다. *E. lathyris*의 발아는 매우 더디거나 발아율이 매우 떨어지며 기내 무균배양에서도 4-6주 또는 그 이상이 소요되는 경우가 많았으며 발아한 경우에도 일반적인 MS agar배지에서는 뿌리가 비정상적으로 비대해지며 식물체의 모습을 잃는 경우가 많았다. Figure 1은 *E. lathyris* 엽병으로부터 latex가 분리되는 모습 (Figure 1A)을 보여주고 있으며 이들을 수집하여 rubber particle를 제거한 후 clear fraction만을 대상으로 10% SDS-PAGE를 실시한 결과 (Figure 1B)를 보여주고 있다. Latex에서 나타나는 단백질 양상은 잎의 결과와 매우 다른 모습을 보여주고 있는데 특이적으로 5 종류의 단백질이 주로 관찰되고 있다. 본 연구자의 기타 latex를 분리하는 식물들의 분석에서도 latex에 존재하는 단백질들의 양상이 비교적 단순하게 관찰되었다. 이들 *E. lathyris*의 5 종류의 단백질에 대한 분자량을 표준 단백질과의 비교 시 65, 55, 43, 32, 23 kD (각각 ELP65, ELP55, ELP43, ELP32, ELP23로 명명)로 측정되었으며 이들 중에서 ELP65 단백질을 대상으로 그 분리를 수행하였다. 즉 ELP65를 70% ammonium sulfate precipitation과 desalting, Sephacryl S-200 HR을 이용한 gel permeation chromatography, Resource Q FPLC를 이용한 cation exchange chromatography를 통하여 분리하였으며 그 결과는



**Figure 1.** Features of latex and major latex proteins detected from *Euphorbia lathyris*.

A: Latex being excreted from the wounded cut of *E. lathyris* plant petiole. B: 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of soluble fraction of leaf extract and latex. C: The 65 kD protein from the latex purified by ammonium sulfate precipitation, gel permeation and ion exchange.

Figure 1C에 나타나고 있다.

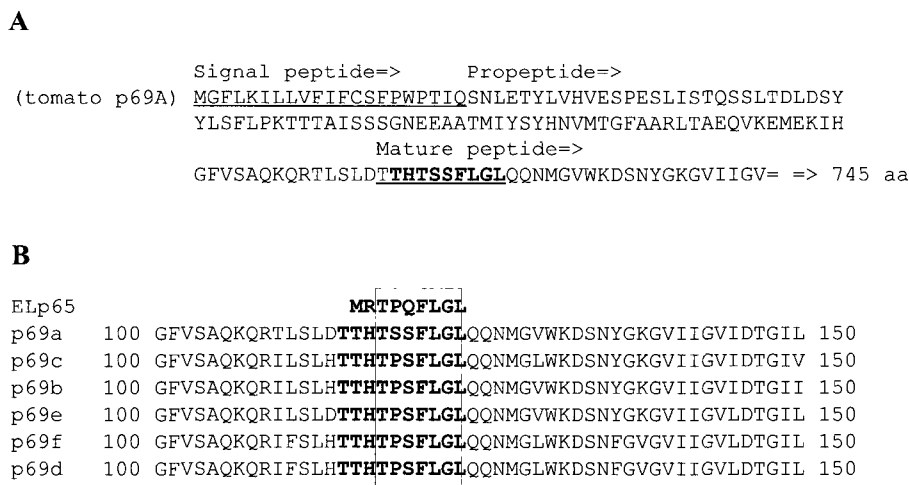
*E. lathyris* 65 kD latex단백질 (ELp65)의 분석

분리한 ELp65에 대한 N-terminal amino acid sequencing 을 실시한 결과 Met-Arg-Thr-Pro-Gln-Phe-Leu-Gly-Leu로 밝혀졌다. ELp65에 대한 amino acid homology 분석은 BLAST를 통하여 실시하였으며 그 결과, 토마토 (*Lycopersicon esculentum* L)의 69 kD (Tom p69) subtilisin-like protease 와 강한 homology를 지니는 것으로 분석되었다. 즉, ELp65 는 일차 분석에서 토마토 p69 family의 하나인 p69a의 preproprotein에서 signal peptide와 propeptide가 제거된

mature polypeptide의 N-terminal sequence와 높은 homology 를 지니는 것으로 나타났으며 그 이후 발표된 p69 family member (b, c, d, e, f)와도 마찬가지로의 homology를 보였다 (Figure 2). p69a protein family에서 가령, 토마토 p69a는 병원체에 의하여 유도생성 및 축적되는 pathogenesis-related (PR) protein의 일종이면서 citrus exocortis viroid에 감염된 토마토 식물체에서 그 mRNA의 발현축적이 이루어지고 그 단백질이 intercellular space에서 축적됨이 보고되었다 (Tornero et al. 1996; Tornero et al. 1997; Jorda et al. 1999). Subtilisin-like protease gene family (p69a-f)의 다양한 역할 중에서 p69a는 특히 식물의 방어system에 관련된 역할이 제시되면서 조직 특이적인 식물체의 발달, 질병발생 및 환경과 관련되어 그 발현조절이 이루어지는 것으로 제안되었다 (Jorda et al. 2000). 따라서 토마토 p69와 amino acid서열의 유사성을 지니는 ELp65 단백질은 이미 발표되어온 여러 *Euphorbia. spp*들의 주요 단백질들 (33,000-117,000 Da)이 protease 관련 효소활성을 보인다는 보고 등을 감안하면 ELp65가 식물방어 및 발달 등과 관련된 protease 유사기능을 갖출 것으로 충분히 예측 된다 (Lynn and Clevette-Radford 1983; Lynn and Clevette-Radford 1985).

ELp65의 gene family

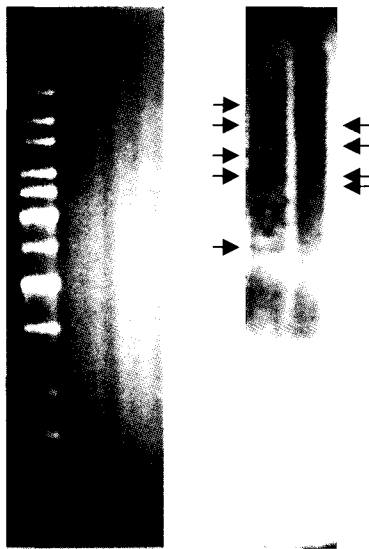
p69a가 ELp65와 유사성을 보이면서 또한 gene family를 구성하고 있다는 점을 배경으로 하여 ELp65가 *E. lathyris*에서도 gene family를 구성하는지에 대하여 Southern hybridization에 의하여 분석하였다. 이 때 probe는 p69a의 genomic DNA를 PCR에 의하여 cloning한 것을 사용하였는데 즉, 토마토 식물체 어린잎으로부터의 DNA를 template로 그리고 primer는 p69a start codon을 포함하는 지역



**Figure 2.** Homology of ELp65 to tomato subtilisin-like protease p69. A: N-terminal part of tomato p69a protein structure is displayed in the order of signal peptide, propeptide and mature peptide. In BLAST search, the underlined bold letters of amino acid from the p69a mature peptide were hit with homology to ELp65. B: The sequenced amino acids of ELp65 were aligned and boxed together with tomato p69 family (a-f) to represent a region of homology.

(5'-gccatgggattcttgaaatcctt-3')과 down stream 지역을 포함하는 지역 (5'-caccaggaccgatta tgtagg-3')을 primer로 한 PCR 반응 (94°C, 1 min; 50°C, 1 min; 72°C 1 min: 30 cycle)으로 1.5 kb DNA fragment를 얻게 되었다. 이는 pSTBlueR에 cloning한 후 DNA sequencing으로 확인하였다. p69a 1.5 kb DNA fragment를 probe로 사용한 Southern hybridization의 결과는 Figure 3에 나타나고 있다. *EcoRI*, *BamHI*으로 처리한 *E. lathyris*의 genomic DNA에 대한 tomato의 p69a probe의 hybridization은 적어도 각기 2.5 kb 이상의 4-5 종류의 DNA band가 나타남으로써 tomato의 subtilisin-like protease gene family와 유사하게 *E. lathyris*의 경우에도 multigene family가 존재함을 시사하고 있다. 식물체에 있어서의 protease에 의한 proteolysis는 식물체의 정상적 생리유지를 위한 매우 기본적인 현상의 하나로서 organellar biogenesis, osmosis의 조절, 발아를 위한 종자 내 저장단백질의 이동, 영양 또는 생식기관의 발달, 노화 또는 apoptosis, zymogen의 활성화나 homeostasis와 같은 housekeeping 기능, 자기방어, 스트레스에 대한 반응, 빛 등의 환경변화에 대한 적응 등등의 매우 다양한 상황에서의 중요한 역할을 보이고 있는데 따라서 이러한 복잡한 기능에 대한 다양한 protease의 multigene family로서의 가능성을 충분히 예측할 수 있다 (Taylor et al. 1997; Tornero et al. 1997).

Latex 단백질은 isoprenoid 화합물 (rubber, dopamine 등)이나 phenylpropanoid 화합물 (phytoalexin 등)의 생합성 관련효소, 또는 lysozyme (Beintema et al. 1996; Cornish



**Figure 3.** Southern hybridization of *Euphorbia lathyris* genomic DNA. 10 µg of *E. lathyris* genomic DNA was digested with *EcoRI* or *BamHI*, resolved in 0.8% agarose gel by electrophoresis (left panel lane 2, 3) and transferred to the nylon membrane for Southern hybridization using the 1.5 kb p69a subtilisin-like protease DNA probe (right panel). Arrows indicate *E. lathyris* DNA bands hybridizing with the probe DNA.

1993), protease 등 식물의 방어 system과 연관되는 것으로 이해되어 왔으나 이와 관련된 분자수준에서의 기능적 연구는 산업적 중요성에 의해 주로 *H. brasiliensis* (Broekaert et al. 1990; Amalou et al. 1992), 양귀비 (Decker et al. 2000), papaya (Buttle et al. 1989; Subroto et al. 1999) 등을 중심으로 이루어져 왔다. 본 연구에 의한 *E. lathyris* latex내 주요단백질의 하나인 ELP65가 p69a와 유사하면서 multigene family로 존재할 가능성이 높다는 것이 제시되면서 *E. lathyris*의 기타 latex protein (55, 43, 32, 23 kD)에 대한 연구가 함께 이루어진다면 풍부하게 분비되는 latex를 이용한 ELPs의 기능분석 및 latex의 기능예측, 그리고 생명공학적으로 용도로서는 분비시스템을 이용한 형질전환 *E. lathyris* latex로부터의 재조합 단백질의 생산도 가능할 것으로 기대할 수 있다.

## 적 요

*Euphorbia lathyris*의 유관세포로부터 분비되는 수용성 latex 단백질 10% SDS-polyacrylamide 전기영동으로 분리하여 특징적으로 잘 나타나고 있는 ELP65, ELP55, ELP43, ELP32 그리고 ELP23 등의 주요단백질을 확인하였다. 이들 latex 주요단백질들 중에서 ELP65는 ammonium sulfate 침전, gel permeation chromatography 그리고 ion exchange chromatography 등의 방법으로 순수 분리하였는데 ELP65의 N-terminal amino acid 서열분석에 의하면 이는 토마토의 p69a subtilisin-like protease의 mature peptide의 앞부분과 강한 유사성을 지니고 있었으며 식물방어와 관련된 기능이 제시되었다. PCR 증폭에 의하여 클로닝된 토마토의 p69a DNA를 probe로 이용하여 Southern blot hybridization을 수행한 결과 *E. lathyris* genome은 토마토의 subtilisin-like proteases와 유사한 정보를 지닐 수도 있는 3-5 유전자들로 구성된 gene family가 분석되었다.

## 인용문헌

- Amalou Z, Bangratz J, Chrestin H (1992) Ethrel (ethylene releaser)-induced increases in the adenylate pool and transtonoplast ΔpH within *Hevea* latex cells. *Plant Physiol* 98: 1270-1276
- Beintema JJ, Terwisscha van Scheltinga AC (1996) Plant lysozymes *EXS* 75: 75-86
- Broekaert I, Lee HI, Kush A, Chua NH, Raikhel N (1990) Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7633-7637
- Buttle DJ, Kembhavi AA, Sharp SL, Shute RE, Rich DH, Barrett AJ (1989) Affinity purification of the novel cysteine

- proteinase papaya proteinase IV, and papain from papaya latex. *Biochem J* 15: 469-476
- Cornish K (1993) The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in c-1,4-polyisoprene biosynthesis. *Eur J Biochem* 15: 267-271
- Decker G, Wanner G, Zenk MH, Lottspeich F (2000) Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional electrophoresis and microsequencing. *J Electrophor* 21: 3500-3516
- Glick BR, Tompson JE (1993) In *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press pp 38-40
- Jorda L, Coego A, Conejero V, Vera P (1999) A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J Biol Chem* 274: 2360-2365
- Jorda L, Coego A, Conejero V, Vera P (2000) Characterization of P69E and P69F, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiol* 122: 67-73
- Kush A, Goyvaerts E, Chye M, Chua N (1990) Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1787-1790
- Lynn KR, Clevette-Radford NA (1983) Isolation and characterization of euphorbain 1, a proteinase from the latex. *Biochim Biophys Acta* 746: 154-159
- Lynn KR, Clevette-Radford NA (1985) Four serine proteases from the latex of *Euphorbia tirucalli*. *Can J Biochem Cell Biol* 63: 1093-1096
- Meichtry J, Amrhein N, Schaller A (1999) Characterization of the subtilase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Mol Biol* 39: 749-760
- Michaud D, Faye L, Yelle S (1993) Electrophoretic analysis of plant cysteine and serine proteinases using gelatin-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. *Electrophoresis* 14: 94-98
- Roshchina W, Roshchina VD (1993) In *The excretory function of higher plants*. Springer-Verlag pp 25-66
- Subroto T, Sufiati S, Beintema JJ (1999) Papaya (*Carica papaya*) lysozyme is a member of the basic class II chitinases. *J Mol Evol* 6: 819-821
- Taylor AA, Horsch A, Rzepczyk A, Hasenkampf CA, Riggs DC (1997) Maturation and secretion of a serine proteinase is associated with events of late microsporogenesis. *Plant J* 12: 1261-1271
- Tornero P, Conejero V, 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
- Tornero P, Conejero V, Vera P (1997) Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. *J Biol Chem* 272: 14412-14419

(접수일자 2004년 11월 2일, 수리일자 2004년 11월 22일)