

식물과 곰팡이 병원균과의 상호작용에 대한 프로테오믹스 최근 연구 동향

김진영 · 이소의 · 오하람 · 최안수 · 김용철 · 김선태

Proteomics of plant-fungal pathogen interaction: an overview

Jin Yeong Kim · So Eui Lee · Ha Ram Oh · In Soo Choi · Yong Chul Kim · Sun Tae Kim

Received: 14 February 2014 / Revised: 16 March 2014 / Accepted: 26 March 2014
© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract So far it has been generally considered that proteomic approaches are very useful for studying plant-microbes interaction. In this review, recent studies based on papers published from 2010 to 2013 have investigated proteomics analysis in various interaction during plant-fungal pathogen infection by means of gel-based proteomics coupled with mass spectrometry (MS)-based analysis. In rice, three papers focused on rice- *Magnaporthe oryzae* interaction were mainly reviewed in this study. Interestingly, another study showed proteomic changes in rice inoculated with *Puccinia triticina*, which is not only a fungal pathogen in wheat and but also results to the disease resistance with non-host defense manner in rice. Additionally, proteomics analysis has been widely subjected to understand defense mechanism during other crops (wheat, tomato, strawberry and mint) and their fungal pathogen interaction. Crops inoculated are analyzed to identify differentially regulated proteins at various tissues such as leaf and apoplast using 2-DE analysis coupled with various MS approaches such as MALDI-TOF MS, nESI-LC-MS/MS and MudPIT, respectively. Taken together, this review article shows that proteomics is applicable to various organisms to understand plant-fungal pathogen interaction and will contribute to provide important information for crop disease diagnosis and crop protection.

Keywords Apoplast, Gel-based proteomics, 2-DE, Plant-microbes interaction

J. Y. Kim[†] · S. E. Lee[†] · H. R. Oh · I. S. Choi
Y. C. Kim · S. T. Kim (✉)
부산대학교 생명자원과학대학 식물생명과학과
(Dept. Plant Bioscience, Pusan National University, Miryang,
627-706, South Korea)

e-mail: stkim5505@gmail.com

[†] These authors contributed equally to this work

서론

최근들어 곰팡이 병원균과 그들 기주 식물의 상호작용에 관련된 연구를 수행하기 위해 접근하는 여러 차원의 'omics' 계열에서 프로테오믹스에 대한 비중과 이해에 대한 요구가 점점 증가하고 있는 중이다. 단백질의 발현이라는 것은 결국 유전자 수준에서 반응에 대한 최종적 산물을 말하는 것이므로 단백질들의 발현 패턴, 구조, 변형 및 상호작용 등의 기능 분석이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 최근 단백질체 연구는 Transcriptomics, 대사체 등을 포함하는 기능 유전체학적 융합 분석 기술들을 이용하여 더욱 진보해 나가고 있다(Tan et al. 2009).

식물과 병원균의 상호작용에 관련한 프로테오믹스는 이차원 전기영동(2-DE)와 MALDI-TOF, ESI-LCMSMS 등 질량 분석기(Mass spectrometry, MS) 기술의 발달과 다양한 분야의 단백질 동정 및 기능을 연구하는 데 적용되고 있다. 최근 이러한 질량분석기 기술은 식물의 환경적 및 생물학적 스트레스에 반응하는 비교 단백질체 분석뿐만 아니라 세포 수준의 세포 소기관 단백질 분석까지도 대량 단백질 동정이 가능해 졌다(Lilley and Dupree 2007). 최근 다양한 질량분석기는 단백질체 연구에 필수적으로 적용되는 기술이며 이를 증명하듯이 지금까지 대부분의 작물 단백질체 연구에서 질량분석기를 이용하여 식물의 다양한 분야에서 포괄적으로 조명한 여러 리뷰 논문들이 있다(Agrawal GK et al. 2006a, 2006b, 2008, 2009, 2011). 하지만 최근에는 질량 분석기를 이용한 단백질 정량분석의 한계를 극복하기 위한 여러 가지 대체 기술(ICAT, SILAC, 2D-LC, ITRAQ)이 개발되고 있으며 또한 점차적으로 식물 및 병원균의 단백질체 연구에 많이 적용되고 있다(Lee and Koh, 2011). 하지만 아직도 고전적인 2-DE를 이용한 단백질체 연구는 꾸준히 지속되고 있다.

비록 비생물학적인 스트레스 및 분화 발달 관련 단백질

질체 연구와 비교하여 아직 그 양적 및 질적 수준은 미흡하지만 작물-곰팡이 병원균에 대한 방어 기작 및 병원균 상호작용을 이해하기 위하여 많은 단백질체 연구접근이 이루어지고 있다. Rampitsch와 Bykova 등은 벼와 애기장대의 두 모델 식물을 중심으로 병원균에 반응하는 식물의 방어기작에 대한 단백질체학적 접근에 대한 포괄적인 리뷰를 다루고 있고(Rampitsch와 Bykova 2012) 또한 벼를 대상으로 최근 3년간(2010년에서 2013년)에 발표한 비생물학적 및 생물학적 스트레스관련 단백질체 분석에 대한 포괄적인 리뷰가 보고되었다(Kim et al. 2014). 본 리뷰에서는 최근 3년간 여러 곰팡이성 병원균과 다양한 기주 혹은 비기주 식물과의 상호작용에 관하여 프로테오믹스적 기법으로 접근한 연구들을 소개하고 있다. 특히 주목할 점은 식물과 미생물의 상호작용 시 서로 직접적인 반응이 일어나는 식물 apoplast에서 분비단백질체(secretome) 분석이 벼 도열병(*Magnaporthe oryzae*, *M. oryzae*) 처리에서 최초로 보고된 사례가 있다(Kim et al. 2013). 따라서 아직 작물과 곰팡이 상호작용에서 단백질체 분석에 대한 포괄적인 리뷰는 아직 정리된 사례가 없어 관련 연구자들에게 본 리뷰 논문이 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

식물- 곰팡이 상호작용에서 단백질 추출 기술

단백질을 용해하거나 추출하는 기술은 그 기술로부터 얻어낸 단백질을 이용하여 검정하고 동정하는 것을 가능하게 한다. 이것은 프로테오믹스에 있어 시료로부터 단백질을 분리해내는 것에 대한 중요성을 말해주며 식물을 재료로 하는 경우에 있어서 더 중요해진다. 식물의 경우 식물의 세포를 보호하기 위해 이루어져 있는 세포벽이라는 견고한 구성부분이 단백질을 추출하는 데 있어서 영향을 주게 된다. 대부분의 연구들은 기계적인 분해로 이 문제를 해결한다. 쌀기나 밀, 벼의 경우 곰팡이에 감염된 잎을 액체 질소 안에서 막자나 막자사발 또는 homogenizer를 이용하여 시료를 분쇄한 후 이를 적절한 완충용액이나 유기용매 등에 침지시켜 단백질을 침전시키는 방법을 사용했다(Fang et al. 2012; Kim et al. 2010; Maytalman et al. 2013; Li et al. 2012). 이 물리적인 파쇄 방법은 잎이 아닌 다른 조직에도 사용될 수 있다. 최근 *Fusarium graminearum* (*F. graminearum*)에 감염된 밀의 잎대를 액체 질소 속에서 물리적인 힘으로 분쇄시켜 단백질을 뽑는 데 사용하였고, 또 다른 연구에서는 *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*)에 감염된 토마토 과실을 액체 질소에 넣고 분쇄시키는 사용 방법을 선택하였다(Gunnaiah et al. 2012; Tzortzakis et al. 2013). *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum*)에 감염된 딸기 뿌리나, *Leptosphaeria maculans*에 감염된 유채의 떡잎 등 대부분의 단백질 추출은 물리적인 힘에 의한 분쇄로부터 시작하는 것으로 보인다(Fang et al. 2013; Marra et al. 2010). 분

쇄가 된 시료들은 적절한 용매에 넣어 한 번 더 균질화시키거나 바로 단백질 침전하여 단백질체 분석을 위하여 단백질을 분리한다. 대체로 식물체 단백질체 분석에서는 Trichloroacetic acid (TCA)/acetone이나 Phenol이 단백질 추출의 유기 용매로 사용된다(Saravanan and Rose 2004). 이러한 방법들은 단백질의 농도나 Isoelectric focusing (IEF) 동안에 문제가 될 수 있는 염이나, 지질, 핵산, 탄수화물, 색소 등의 오염 물질의 제거율을 높여줄 수 있다. 예로 *Puccinia striiformis f. sp. Tritici* (*P. striiformis f. sp. Tritici*)에 감염된 밀 잎은 Mg/NP-40 추출 용액(0.5 M Tris-HCl, pH 8.3, 2% v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, 2% v/v beta-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 1% w/v polyvinylpyrrolidone (PVPP))에 분쇄된 가루를 균질화시킨 뒤 Acetone 침전법 또는 Phenol법을 사용하여 추출하였다(Maytalman et al. 2013; Kim et al. 2001; Kim et al. 2004; Rampitsch et al. 2006). Mg/NP-40 buffer를 이용한 추출 방법은 식물에서 High abundant proteins (HAPs) 중 하나인 Rubisco 제거율을 높여 더 많고 다양한 단백질의 추출을 가능하게 한다(Kim et al. 2001). 또 다른 연구에서는 *M. oryzae*에 감염된 벼 잎을 phosphate buffer (65 mM K₂HPO₄, 2.6 mM KH₂PO₄, 400 mM NaCl, 3 mM NaN₃)에서 균질화를 시킨 후 10% TCA에서 침전을 시켰다(Koga et al. 2012). *B. cinerea*에 감염된 토마토 과실과 *Alternaria alternata* (*A. alternata*)에 감염된 박하 잎에서 단백질을 추출하는 경우에 PVPP를 이용하여 균질화를 시켜 시료의 산화를 방지하기도 하였다. 대부분의 식물 단백질체 분석을 위한 단백질 추출법은 TCA/acetone 또는 phenol법을 이용하는 것으로 조사되었다.

곰팡이 병원균과 식물 사이의 상호작용으로 생성되는 분비 단백질을 다루는 연구에서는 또 다른 특별한 방법이 요구된다. Kim과 연구진은 *M. oryzae*와 벼의 상호작용으로부터 나온 분비 단백체를 얻기 위해 벼 잎의 시료를 CaCl₂ buffer에서 침지하여 그 여액을 phenol 침전법을 이용하여 단백질을 추출하였다(Kim et al. 2013). 또 다른 방법으로 CaCl₂가 아닌 intercellular washing fluids (IWF) 용액(50 mM Na-P buffer pH 7.5, 600 mM NaCl, 0.01% Tween-20, 0.1% beta-mercaptoethanol)에 시료를 넣어 분비 단백질체를 용해시킨 후 TCA/Acetone 법으로 단백질을 추출하였다(Shenton et al. 2012). *B. cinerea*와 토마토의 상호작용에서 분비 단백질체를 다루는 연구에서는 HEPES buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM DTT, 3 mM NaHSO₃, 2 mM EDTA, 1.5 M NaCl)에 과실을 침지시킨 후 Dialysis를 이용하여 단백질을 정제하였다(Shah et al. 2012). 따라서 이들 단백질 추출 방법은 높은 재현성이 요구되며, 분리 시에 단백질의 종류를 높여 주는 동시에 오염 인자들의 수준과 단백질 변성도를 낮춰주는데도 기여를 해야하기 때문에 단백질체 분석에서 아주 중요하다(Medina and Francisco

2008; Harder 2008; Pitarch et al. 2008). 그러나 아직 식물 단백질체 추출방법에 대한 최적화되고, 보편적으로 사용할 수 있는 추출용액은 없는 것으로 조사되지만, 향후 단백질체 분석이 가능한 추출용액의 필요성은 많은 연구자들이 관심을 가지게 될 것이다.

식물-곰팡이 상호작용에서 단백질 분리 기술

이 리뷰에 사용된 13개의 연구는 다양한 방법으로 단백질이 추출 되었음에도 분리하는 기술은 그 중 10개 연구에서 2-DE 기법을 선택하여 단백질 분리에 이용하였다. 2-DE는 거의 대부분의 연구에서 pI 값을 이용하여 분리해내는 기술인 IEF를 일차원 상에서, 분자량을 이용한 SDS-PAGE를 이차원 상에서 분리해내는 두 가지의 전기영동 기술을 이용하여 이루어진다. 2-DE를 통해 단백질들이 분리되어 있을 gel을 염색하는 기술은 Silver staining, Coomassie blue staining 또는 fluorescence detection 등으로 다양하며, 본 리뷰에서 언급한 10개의 연구에서는 Silver Nitrate이나 Coomassie blue을 사용하여 gel을 염색하였다. 2-DE는 사용시 비교 단백질 발현 패턴 연구에 있어서 높은 단백질 정량분석 능력을 보일 뿐 아니라 질량분석기를 이용한 단백질 대량분석보다 상대적으로 비교적 저렴한 비용이 소요되기 때문에 보편적으로 단백질체 분석에 많이 이용되고 있다. 따라서 2-DE는 실험적 전략이 단백질의 확인보다는 양적 패턴을 확인하고자하는 식물과 병원균의 상호작용에 대한 연구 대부분의 목적으로서 쓰이고 있다. 그러나 2-DE는 높은 단백질 분리 기술과 광범위한 단백질 profiling 실험을 수행할 수 있는 이점이 있음에도 재현성과 분리능에 대해서는 여전히 개선해야 될 부분으로 남아 있다(González-Fernández et al. 2010). 더욱이 gel 상에서의 로딩량의 한계와 제한적인 pI나 분자량 범위의 한계로 인해 상대적으로 분자량이 낮은 단백질의 분리가 어려운 점 등과 같이 물리화학적 측면에서의 어려움 등이 2-DE의 단점으로 지적 될 수 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 개발되는 몇몇 분리 기법은 액체 크로마토그래피(Liquid Chromatography, LC)를 기반으로 하고 있다. 일차원 전기영동과 LC-MS/MS를 결합한 기술이 많이 소개되고 있다(Haynes et al. 2007; Edgar et al. 2004.). 본 리뷰에서 성숙도 정도에 따른 각각의 토마토가 *B. cinerea*와의 상호작용에 분비 되는 단백질체에 대한 반응을 알아보기 위한 연구에서는 SDS-PAGE만을 사용하였고 LC-MS/MS를 사용하여 총 588개의 처리구 별로 발현량의 차이나는 spot을 분리 및 동정하였다(Shah et al. 2012). Gel을 기반으로 하는 분리 기법을 사용한 연구 외에도, Maytalman 등(2013)은 *P. striiformis*와 밀의 상호작용이 일어난 밀 잎으로부터 추출한 단백질을 일차원 액체 크로마토그래피(two dimensional liquid chromatography system, 2D-LC)를 사

용하여 분리하였다. 이들은 이차원 액체 크로마토그래피 시스템 중에서도 Beckman Coulter사로부터 개발된Proteome-LaB™ PF2D를 사용하였다Proteome-LaB™ PF2D는 일차원 상에서 단백질을 pI 값에 따라 High performance chromatofocusing (HPCF)을 사용하여 분리한 후 이차원 상에서 소수성에 따라서 High performance liquid chromatography (HPLC)을 이용하여 분리해내는 기술이다(McDonald et al. 2006). Gel-free 기법을 이용한 또 다른 연구는 *F. gramineum*과 상호작용하는 밀의 잎대로부터 추출한 단백질체 연구에서도 보여 준다. 잎대로부터 추출한 단백질을 LC-hybrid MS/MS를 이용하여 총 637개의 단백질을 분리하였다(Gunnaiah et al. 2012).

식물-곰팡이 상호작용에서 동정 기술

단백질 동정을 위한 질량 분석(Mass spectrometry, MS)은 단백질의 양질적 측면에서의 profiling 뿐만 아니라 단백질 종류를 동정하고 변화를 확인할 수 있게 해준다. 단백질체는 효소(트립신 등)나 화학적 처리를 통해 얻어지는 펩티드나 온전한 단백질의 질량 스펙트럼으로부터 동정되며 그 중은 단백질, 유전체, ESTs sequence 또는 MS spectra 데이터베이스로부터 얻은 이론적인 것과 실험적 결과를 대조하여 동정될 수 있다(González-Fernández et al. 2010). 일반적으로 2-DE 후 gel 염색을 통해 드러난 처리구별로 spot들의 양적 분석을 통해 선별된 각기 다르게 발현하는 spot들은 이후에 동정을 위한 질량 분석이 이루어진다. *M. oryzae*와 벼 잎의 상호작용으로부터 분비되는 단백질체가 2-DE를 통해 분리된 후 LC-MS/MS로 동정되기도 하였다(Shenton et al. 2012). 따라서 대부분 단백질체 분석에서 단백질 동정에 사용되는 가장 보편적인 방법은 질량분석기를 이용한 단백질 동정기술이다. 최근 대사체학의 중요성이 강조되면서 단백질뿐만 아니라 대사체 분석에 질량분석기의 정확도와 대량 동정을 위한 데이터베이스 구축은 향후 꾸준히 연구될 것으로 기대된다.

식물-곰팡이 상호작용에서 비교 단백질체 발현 분석

최근 3년간(2010년-2013년) 총 12개의 작물(벼, 보리, 밀, 토마토, 딸기 등)-곰팡이 병원균에 대한 방어 기작 및 병원균 상호작용을 이해하기 위하여 단백질체 연구접근에 대해서 논의 하고자 한다(Table 1). 특히 Figure 1은 식물-곰팡이 상호작용에 관여하는 중요한 단백질들의 발현 양상을 보여 주고 있다.

벼(Rice)

*M. oryzae*는 벼 도열병을 발생시키며 종자의 수확량과 질을 감소시키는 병원균으로 10-30% 까지의 수확량 감소를

Table 1 The proteomics research in crops-fungus interactions published during the 2010 to 2013 review period

Plant	Phenotype	Tissues	Pathogens	Method	Hour inoculation	References
Strawberry	Susceptibility	leaf	<i>Colletotrichum fragariae</i>	2-DE, MALDI-TOF/TOF MS/MS	24, 48 and 72 hpi	Fang et al. (2012)
Strawberry	Resistance, Susceptibility	seedling	<i>Fusarium oxysporum</i>	2-DE, MALDI-TOF/TOF MS/MS	12 hpi	Fang et al. (2013)
Wheat	Resistance, Susceptibility	spikelet	<i>Fusarium graminearum</i>	LC-hybrid MS on MS/MS	72 hpi	Gunnaiah et al. (2012)
Wheat	Susceptibility	leaf	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	2-DE, ESI-q-TOF MS/MS	12, 24 and 36 h after infiltration with Ptr Tox B	Kim et al. (2010)
Wheat	Resistance	leaf	<i>Puccinia striiformis f. sp. tritici</i>	PF2D, nanoLC-ESI-MS/MS	24 hpi	Maytalman et al. (2013)
Rice	Resistance, Susceptibility	leaf	<i>Magnaporthe oryzae</i>	2-DE, MALDI-TOF-MS, nESI-LC-MS/MS, MudPIT	72 hpi	Kim et al. (2013)
Rice	Susceptibility	leaf sheath	<i>Magnaporthe oryzae</i>	2-DE, MALDI-TOF MS	40 hpi	Koga et al. (2012)
Rice	Non-host resistance	leaf	<i>Puccinia. sp. tritici</i>	2-DE, MALDI-TOF MS	3 dpi	Li et al. (2012)
Rice	Resistance, Susceptibility	leaf	<i>Magnaporthe. oryzae</i>	2-DE, LC-MS/MS	12 and 72 hpi	Shenton et al. (2012)
Tomato	Depends on ripening	fruit	<i>Botrytis cinerea</i>	SDS-PAGE, LC-MS/MS	3 dpi	Shah et al. (2012)
Tomato	Susceptibility	fruit	<i>Botrytis cinerea</i>	2-DE, MALDI-TOF MS	exposed ozone for 1 more week following infection	Tzortzakis et al. (2013)
Mint	Susceptibility	leaf	<i>Alternaria alternata</i>	2-DE, MALDI TOF/TOF MS/MS	10 dpi	Sinha et al. (2011)

일으킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Liu et al. 2010; Talbot et al. 2003). 벼 도열병과 벼의 상호작용에서 유도되는 Pathogen-responsive 단백질에 대한 프로테오믹스 연구를 수행하기 위하여 *M. oryzae*를 감염 시킨 지 24 시간, 48 시간 그리고 72 시간 된 벼 잎을 이용하여 probenazol induced protein (PBZ1), Domain unknown protein (DUF26), Peroxidase, Isofalcone reductase 등 병원성에 관련이 있는 단백질을 동정하였다(Kim et al. 2004). 최근 식물과 곰팡이 상호작용에서 세포간극(apoplast)는 기주와 병원균이 직접 서로 상호작용을 하는 장소로 이 apoplast에서 분비되는 기주 및 병원균 유래 분비단백질체(Secretome) 연구의 중요성이 강조되고 있다(Agrawal GK et al. 2010). 따라서 식물 미생물 상호작용 시 미생물 유래 *in-planta* 분비단백질의 정보는 식물 병 저항성 및 이병성 기작을 이해하는 중요한 단서가 된다. 최근 흥미 있게도 벼 도열병에 감염된 벼 잎으로부터 CaCl_2 buffer를 사용하여 분비 단백질을 추출하여 *in-planta* 분비 단백질들을 2-DE, nESI-LC-MS/MS, 그리고 multidimensional protein identification technology (MudPIT)를 이용하여 총 732 개의 단백질을 동정하였다

(Kim et al. 2013). 도열병을 집중한 도열병 저항성품종과 이병성 품종 잎의 *in-planta* 분비단백질에 대해 프로테오믹스의 대규모 조사가 있었다. 2DE와 MudPIT가 MALDI-TOF-MS 및 또는 nESI-LC-MS/MS와 결부된 732개(rice 분비단백질 291개, 도열병 분비단백질 441개)를 동정하였다. 이 중에서 다수의 벼 분비단백질은 방어기작관련 단백질과 관련된 signal peptide를 가지고 있었고 반면, 다수의 벼 도열병 분비단백질은 세포벽 가수분해와 관련된 signal peptide를 가지고 있는 것을 발견 하였다. 벼 도열병 Glycoside hydrolase (GH) 단백질 family의 *In-planta*에서 발현을 Bombardment를 이용한 일시적 발현 시스템에서 GH 단백질들이 Apoplast 내에서 effector로서 작용할 수 있다는 것을 보여주었다. 또한 일부 이들 사이에서 벼 스트레스 반응, Reactive Oxygen Species (ROS) 그리고 에너지 대사에 관련된 단백질들이 분비되는 것으로 확인 되었다. Shenton 2012 등은 *M. oryzae*에 감염된 벼 잎으로부터 apoplast에 위치한 분비 단백질들에 초점을 맞추기 위해 IWF를 위한 방법을 썼다(Shenton et al. 2012). 이 IWF 추출에서 몇 개의 단백질들이 호환적이거나 비호환적 상호작용에



Fig. 1 The number of differentially up-and down-regulated proteins in response to biotic stresses during the reviewed period. R: Resistance, S: Susceptible, ABA: Abscisic acid, MG: Mature green, RR: Red ripe

관련되어 있는 것을 확인했다. DUF26 domain 단백질은 접종 된 지 12시간째에 풍부하게 발현 되는 것을 확인하였으며 *M. oryzae*에 의해 스트레스 반응 단백질들이 유도 된 것을 확인하였다.

*M. oryzae*를 벼의 엽육에 감염시켜 그로부터 나오는 분비단백질체를 동정 및 분석하였다(Koga et al. 2012). 연구진은 감수성 벼 식물의 엽육세포에서 발현되는 whole-plant-specific resistance (WPSR)가 Abscisic acid (ABA)나 저온에 의해 제약을 받는다는 것을 발견했다. 13개의 단백질이 *M. oryzae*를 접종 시킨 후 발현량을 변화하는 것으로 확인 되었으며 이들 단백질의 부분적 아미노산 염기서열 분석 결과 β -1,3-glucanase, thaumatin-like protein 그리고 PR-10 protein 등으로 구성되어 있음을 확인했다. *M. oryzae*에 감염 이후 유도되는 Thaumatin-like protein은 감수성 품종에서 WPSR 발현에 관련이 있을 것으로 보인다.

식물-미생물 상호작용을 주제로 한 연구는 실험 설계에 있어서 병원균을 감염시킨 뒤 진행 된 시간 별로 조건구를 만든다. *Puccinia tritici* f. sp. *Tritici* 를 비기주 식물인 벼 잎에 접종 시켜 식물의 프로테오믹 변화를 관찰하였다(Li et al. 2012). 33개의 단백질이 증가 패턴으로 발현되고 9 개의 단백질이 감소되는 패턴으로 발현되고 있음을 확인하였다. 동정 된 단백질들은 방어/스트레스 반응, 에너지/탄수화물 대사, 산화환원 과정, 단백질의 접합, 전환, 수리, 변성, 신호 전달 그리고 세포 사멸 조절 등에 관련이 있었으며 이러한 결과는 벼에서 보이는 *Pu*에 대한 비기주 식물 저항성(Non-host resistance, NHR)이 에너

지 대사, 항균 활성의 증가, phytoalexin 축적과 세포 벽 강화, 항산화 그리고 식물 세포 사멸의 방지의 강화 등을 포함하고 있는 것으로 보인다. 동정된 단백질 중 증가되는 패턴에 속한 단백질의 절반이 엽록체와 미토콘드리아에 관련이 되어 있으며 이는 NHR이 진행되는 동안에 이들 조직에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

밀(Wheat)

식물의 스트레스 반응은 그 스트레스를 받는 기간과 정도에 의존하는 역동적인 과정이다(Kosová et al. 2011). *F. graminearum*은 밀에 위조병을 일으키는 녹병원균 중 하나이다(Qi et al. 1998). 밀과 *F. graminearum*의 상호작용 연구에서는 2-DE와 LC-MS/MS를 이용하여 다양한 41 개의 단백질들을 동정 및 분석하였다(Zhou et al. 2006). 최근 *F. graminearum*에 대한 저항성에 밀QT (Fhb1)이 기여하는 지를 알아보기 위해 접종한 밀 잎대로부터 단백질을 추출하였다(Gunnaiah et al. 2012). *F. graminearum*을 감염시킨 밀의 잎대로부터 추출한 단백질은 gel-free를 기반으로 LC-hybrid-MS/MS를 통해 17개가 동정되었다(Gunnaiah et al. 2012). 동정된 단백질은 Cinnamyl alcohol dehydrogenase, caffeoyl-CoA O-methyltransferase, caffeic acid O-methyltransferase, flavonoid O-methyltransferase, agmatine coumaroyltransferase 그리고 peroxidase 등과 같은 주로 대사관련 단백질들이 증가하는 패턴을 보였다.

Pyrenophora Tritici-repentis (*P. Tritici*)은 밀에 황갈색반점 병을 일으켜 경제적 손실을 일으킬 수 있는 심각한 병

원균 중 하나로 약 50% 까지의 수확량 손실을 가져올 수 있는 것으로 보고 되고 있다(Wolf et al. 1998). 이 병원균은 기주 특이적 독소인 Ptr Tox A, Ptr Tox B, Ptr Tox C 등의 활성에 의해 병반을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Strelkov et al. 2003). *P. Tritici-repentis*로부터 Ptr ToxB를 추출하여 이를 밀 잎에 접종시켜 프토테오믹스적 변화를 관찰하였다(Kim et al. 2010). *P. tritici-repentis*로부터 뽑아낸 toxin, Ptr ToxB를 접종시킨 밀 잎으로부터 뽑은 단백질은 2-DE를 거쳐 ESI-quadrupole-TOF MS/MS를 통해 47개가 동정되었다. 47 개의 동정된 단백질들은 광합성의 명반응, 캘빈 사이클 그리고 스트레스/방어 반응에 관련되어 있는 단백질들을 포함하고 있었다. 광합성의 감소와 동정된 다양한 단백질들의 종류를 바탕으로 Ptr Tox B가 밀의 광합성 과정을 신속하게 붕괴시키고 산화적 스트레스와 ROS생성을 야기시키는 것으로 이들 연구진은 보고했다. 비록 광보호와 수리 기작이 감염 초기에 기능을 하는 것으로 나타났지만 그것들은 엽록체의 발달 그리고 chlorophyll 광산화를 유도하는 ROS의 지속적인 생성에 따라 제약을 받을 것이다.

*Puccinia striiformis f. sp. Tritici*는 밀에 전세계적으로 확산되어있으며 수확량 감소를 가져오는 맥류줄녹병을 일으키는 심각한 병원균이다(Maytalman et al. 2013). *P. striiformis f. sp. Tritici*에 감염된 밀의 잎에서 gel을 필요로 하지 않는 이차원 액체크로마토그래피를 통해 분리하여 NanoLC-ESI-MS/MS를 통해 33개의 단백질을 동정하였다(Maytalman et al. 2013). 그 중에서 27 개의 단백질들이 기주 식물의 단백질로 동정되었으며 다양한 생물학적 과정을 바탕으로 다섯 개의 그룹으로 나눌 수 있었다. 전신 획득 저항성을 위한 주 요소인 PR-1, PR-4, Glutathione S transferase 등의 방어 관련 단백질들이 동정되었음을 확인했다.

딸기(Strawberry)

*Colletotrichum fragariae*는 딸기에서 탄저병을 일으키는 주요 병원균으로 딸기 재배지에서 50% 까지의 수확 감소를 일으키며 약 80% 까지 딸기 식물을 괴사시킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Sreenivasaprasad et al. 2005). 2-DE와 MALDI-TOF/TOF MS/MS기법을 이용하여 *C. fragariae*를 감염시킨 딸기 잎으로부터 단백질을 추출하여 분석하였다(Fang et al. 2012). 딸기와 *C. fragariae*의 상호작용에서 2-DE 기술을 이용하여 감염된 잎으로부터 총 49개의 spot을 분리해 내었으며 이 연구에서 동정된 많은 캘빈 사이클 관련 단백질 중 72시간째 경과한 딸기 잎에서의 이들 캘빈 사이클 관련 효소들의 발현 감소로 보았을 때 *C. fragariae*에 의해 잎의 광합성 과정이 저해 받는다는 것을 확인할 수 있다. 연구진은 *C. fragariae*-responsive protein 네트워크를 연구에서 동정된 단백질들을 이용하여 제시하였다. 이 네트워크는 ROS 생산과 제거 사이의 조절, HSPs

생합성의 가속화 해당과정 그리고 cell-wall-lignin 형성을 강화시키는 기능적인 구성성분들을 포함하고 있다. heat shock proteins (HSPs), chaperones, peroxidase (POD), Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 그리고 β -1,3-glucanase 등이 이 연구에서 동정 되었다.

*F. oxysporum*는 딸기에 시들음 병을 야기하며 전 세계적으로 딸기 생산 산업을 위협하는 심각한 병원균이다(Fang et al. 2013). *F. oxysporum f. sp. Fragariae*를 접종시킨 딸기 뿌리로부터 2-DE와 MALDI-TOF/TOF-MS/MS를 이용하여 접종 후 시간대별로 다르게 발현하는 단백질 79개를 동정하였다(Fang et al. 2013). 이들 단백질은 이차 대사산물, 단백질 합성 및 변성, 스트레스와 방어 반응, 항산화 물질 등에 관련이 있었다. 이들 사이에서 Pathogen-related protein (PR) protein은 주로 ROS detoxification, ethylene/Jasmonic acid 신호 전달, 이차 대사 생합성, 해당과정 ubiquitin/26S proteasome-단백질 등에 관련이 있었으며 균에 대항하기 위한 딸기의 저항성에 있어 충분한 잠재력을 가지고 있는 것으로 보인다.

Tomato

*B. cinerea*는 식물에 잿빛곰팡이를 일으키는 병으로 토마토를 포함하여 약 200여종의 기주 식물이 있는 것으로 보고 되고 있다(Shah et al. 2012). 토마토 과실에 다양한 네 가지 방법으로 오존을 처리한 후 *B. cinerea* 감염시켜 토마토 과실에서 단백질 변화를 관찰하였다(Tzorzakis et al. 2013). 오존의 농도와 그 시간에 따라 토마토가 *B. cinerea*에 대항하는 반응 기작을 알아보기 위한 연구에서는 2-DE를 통해 처리구 별로 발현량이 다른 18개의 spot을 얻었으며 이것은 Silver-stain을 통해 드러나는 gel 상의 spot을 통해 확인할 수 있었다. Ozone과 병원균의 접종 아래 많은 단백질이 그 영향을 받았으며 이는 세포의 산화적 상태와 관련이 있음을 확인했다. Ozone 노출기간을 포함하여 산화적 스트레스의 유도하에서 thioredoxin peroxidase 같은 단백질들은 더욱 발현이 강화되었으나 'clean air'하에서는 ascorbate peroxidase 등의 단백질이 억제되었다. 성숙에 관련된 ethylene biosynthesis 같은 과정에 관여하는 단백질들은 ozone을 처리한 토마토 과실에서는 감소하는 양상을 보였지만 *B. cinerea*에 감염된 토마토 과실에서는 증가하는 양상을 보였다.

토마토 과실에 성숙도에 따라서 *B. cinerea*의 감염에 대한 반응을 비교하기 위해 접종 후 각각 Mature green (MG), red ripe (RR) wild type, ripening inhibited (*rin*) mutant 토마토 과실로부터 단백질체를 추출하여 동정 및 분석하였다. 186개의 단백질들이 red-ripe와 *rin*으로부터 공통적으로 동정되었으며 mature green 토마토에서 방어 반응 관련 단백질이 red-rin 보다 25-33% 정도 더 많이 나왔다. 이와 대조적으로 분비 단백질체의 분석에서는 큰 변화가 없음

을 확인하였다.

Mint

*A. alternata*는 민트가 기주 식물이 되는 곰팡이성 병원균 중 하나로 잎에 병반을 일으키고 낙엽을 늘리는 등의 민트에 있어서 심각한 경제적 손실을 가져오는 요소 중 하나이다(Kalra et al. 2001). 민트 잎에 *A. alternata*를 접종하여 그 잎으로부터 단백질을 추출 후 분석하였다(Shinha et al. 2011). *A. alternata*와 박하 잎의 상호작용에서 역시 대조구와 감염 후 10 일이 지난 잎의 단백질을 2-DE를 거쳐 MALDI-TOF/TOF-MS/MS/를 수행하여 총 67 개의 단백질을 동정되었다 (Shinha et al. 2011). 이들 결과는 기주 내에 proteomic level에서의 변화를 보이는 45 개의 단백질이 동정되었으며 동정된 단백질 중 56%가 에너지와 대사 과정과 관련있는 반면 29%는 스트레스와 방어에 관련이 있었다. 이 결과는 초기 방어 반응과 병원성을 극복하기 위한 힘이 충분치 않다는 것을 보여준다.

향후 연구 방향

식물 병 저항성과 관련된 새로운 단백질을 찾는 것이 중요한 연구 분야 중에 하나이다. 최근 비약적인 단백질 동정기술(MALDI-TOF MS, nano LC MSMS)의 발달에도 불구하고 지금까지의 식물-미생물 상호작용 단백질체 분석에서 제한된 단백질 그룹(PR, 항산화관련 단백질, 대사 관련 단백질)들이 동정되었다. 그러나 신호 전달과 관련된 단백질체 분석에는 아직도 여전히 한계를 보여 주고 있다. 이는 기존 단백질체 분리, 분석, 검출의 한계성 때문일 것이다. 따라서 새로운 저항성 단백질을 발굴하기 위해서는 감염 부위 특이적인 조직에서 단백질 분석 기술(예, laser microdissection 기술)과 과발현 단백질(예, Rubisco)을 효과적으로 제거 할 수 있는 prefractionation 분석 기술이 개발되어야 될 것이다. 또한 식물-미생물 상호작용시 subcellular proteomics (Apoplast, Mitochondria, ER, Nuclei, Chloroplast)분석으로 병원균의 target site 별 단백질 발현의 차이를 정량분석을 통하여 저항성 단백질 발굴이 필요하며 또한 대량 단백질 단백질 상호작용 단백질체 (interactome) 분석 기술의 개발이 요구 될 것이다. 예로 immunoprecipitation 과 Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) assay을 통한 interactome 및 Bioinformatics 연구 등이 중요한 접근 방법 중의 하나이다. 또한 식물-미생물 상호작용에서 중요한 phosphoproteome 연구 즉 post translational modifications (PTMs)된 단백질의 대량 분석 또한 중요한 병 저항성 관련 단백질체 연구의 한 축이라고 할 수 있다. 따라서 식물-미생물 상호작용을 이해하기 위한 단백질체적 연구에서는 하나의 접근법 보다는 위에서 언급한 다양한 분석

기법과 접근법을 활용한 연구가 병 저항성 기작을 이해하는데 아주 중요한 단서를 제공할 것이다.

결론

지금까지 총 12편의 작물(벼, 보리, 밀, 토마토, 딸기 등)-곰팡이 병원균에 대한 단백질체 연구 결과에서 주로 스트레스 및 방어 관련 단백질들(HSP, PR1, 2, 3, 그리고 5)과 항산화 관련 단백질들(superoxide dismutase, Glutathione-S-transferase, Ascorbate peroxidase, Thioredoxin, Peroxiredoxin) 등이 동정되었다. 결론적으로 작물에서 곰팡이 병원균에 반응하는 중요한 지표로 ROS의 축적도가 변화하는 것을 확인했으며 식물 조직내에서 생산되는 ROS양이 병원균을 죽이기에 충분한지에 대해서는 확인 되지 않는 것으로 보이지만 ROS의 생성과 제거 사이의 균형이 병원균에 대항하기 위한 식물에 저항성에 있어서 부분적으로 중요하다고 볼 수 있겠다. 따라서 프로테오믹스는 다양한 단백질들을 동정하고 그 기능을 이해하며 어떠한 특정 단백질들은 biomarker로서의 활용도 가능하게 만들며 이러한 이점들은 식물 병리학에 있어서 그 기작을 이해하고 더 나아가 신 품종 육성에도 기여를 할 것으로 사료된다.

사사

이 논문은 부산대학교 자유 과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음.

References

- Agrawal GK, Jwa NS, Iwahashi Y, Yonekura M (2006) Rejuvenating rice proteomics: facts, challenges, and visions. *Proteomics* 6:5549-5576
- Agrawal GK, Rakwal R (2006) Rice Proteomics: a cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrom Rev* 25:1-53
- Agrawal GK, Rakwal R (2008) Plant Proteomics: Technologies, Strategies, and Applications (Eds. GK Agrawal and R Rakwal). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp165-178
- Agrawal GK, Jwa NS, Rakwal R (2009) Rice proteomics: ending phase I and the beginning of phase II. *Proteomics* 9:935-963
- Agrawal GK, Jwa NS, Lebrun MH, Job D, Rakwal R (2010) Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics* 10:799-827
- Agrawal GK, Rakwal R (2011) Rice proteomics: a move toward expanded proteome coverage to comparative and functional proteomics uncovers the mysteries of rice and plant biology. *Proteomics* 11:1630-1649

- Edgar N, Vollmer M, Hörth P, Vad C (2004) 2D-LC/MS techniques for the identification of proteins in highly complex mixtures. *Expert Rev Proteomics* 1:37-46
- De Wolf ED, Effertz RJ, Ali S, Francl LJ (1998) Vistas of tan spot research. *Can J Plant Pathol* 20:349-370
- Fang X, Chen W, Xin Y, Zhang H, Yan C, Yu H, Liu H, Xiao W, Wang S, Zheng G, Liu H, Jin L, Ma H, Ruan S (2012) Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletorichum fragariae*. *J Proteomics* 75:4074-4090
- Fang X, Jost R, Finnegan PM, Barbetti MJ (2013) Comparative proteome analysis of the strawberry-*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* pathosystem reveals early activation of defense responses as a crucial determinant of host resistance. *J Proteome Res* 12:1772-1788
- González-Fernández R, Prats E, Jorrin-Novo JV (2010) Proteomics of plant pathogenic fungi. *J Biomed Biotech* 2010:1-36
- Gunnaiyah R, Kushalappa A, Duggavathi R, Fox S, Somers DJ (2012) Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 7:e40695:1-15
- Harder A (2008) Sample preparation procedure for cellular fungi. In *2DPAGE: Sample preparation and fractionation*. *Methods Mol Biol* 425:265-273
- Haynes PA, Roberts TH (2007) Subcellular shotgun proteomics in plants: looking beyond the usual suspects. *Proteomics* 16:2963-2975
- Kalra A, Singh HB, Patra NK, Pandey R, Shukla RS, Kumar S (2001) The effect of leaf spot, rust and powdery mildew on yield components of nine Japanese mint (*Mentha arvensis*) genotypes. *J Hort Sci Biotech* 76:546-548
- Kim ST, Cho KS, Jang YS, Kang KY (2001) Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis* 22:2103-2109
- Kim ST, Kim SG, Hwang du H, Kang SY, Kim HJ, Lee BH, Lee JJ, Kang KY (2004) Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from rice leaves induced by rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Proteomics* 4:3569-3578
- Kim SG, Wang Y, Lee KH, Park ZY, Park J, Wu J, Kwon SJ, Lee YH, Agrawal GK, Rakwal R, Kim ST, Kang KY (2013) In-depth insight into in vivo apoplastic secretome of rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *J Proteomics* 78:58-71
- Kim ST, Kim SG, Agrawal GK, Kikuchi S, Rakwal R (2014) Rice proteomics: A model system for crop improvement and food security. *Proteomics* 14:593-610
- Kim YM, Bouras N, Kav NNV, Strelkov SE (2010) Inhibition of photosynthesis and modification of the wheat leaf proteome by Ptr ToxB: A host-specific toxin from the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Proteomics* 10:2911-2926
- Koga H, Dohi K, Nishiuchi T, Kato T, Takahara H, Mori M, Komatsu S (2012) Proteomic analysis of susceptible rice plants expressing the whole plant-specific resistance against *Magnaporthe oryzae*. Involvement of a thaumatin-like protein. *Physiol Mol Plant Pathol* 77:60-66
- Kosová K, Vitámvás P, Prášil IT, Renaut J (2011) Plant proteome changes under abiotic stress – Contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Proteomics* 74:1301-1322
- Lee J, Koh HJ (2011) A label-free quantitative shotgun proteomics analysis of rice grain development. *Proteome Sci* 9:61
- Li H, Goodwin PH, Han Q, Huang L, Kang Z (2012) Microscopy and proteomic analysis of the non-host resistance of *Oryza sativa* to the wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* f. sp. *tritici*. *Plant Cell Rep* 31:637-650
- Lilley KS, Dupree P (2007) Plant organelle proteomics. *Curr Opin Plant Biol* 10:594-599
- Liu J, Wang X, Mitchell T, Hu Y, Liu X, Dai L (2010) Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Mol Plant Pathol* 11:419-427
- Marra R, Li H, Barbetti MJ, Sivasithamparam K, Vinale F, Cavallo P, Lorito M (2010) Proteomic analysis of the interaction between *Brassica napus* cv. Surpass 400 and virulent or avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. *J Plant Pathol* 92:89-101
- Maytalman D, Mert Z, Baykal AT, Inan C, Günel A, Hasancebi S (2013) Proteomic analysis of early responsive resistance proteins of wheat (*Triticum aestivum*) to yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) using ProteomLab PF2D. *J Plant Omics* 6:24-35
- McDonald T, Sheng S, Stanley B, Chen D, Ko Y, Cole RN, Pedersen P, Van EJE (2006) Expanding the subproteome of the inner mitochondria using protein separation technologies: one- and two-dimensional liquid chromatography and two-dimensional gel electrophoresis. *Mol Cell Proteomics* 5:2392-2411
- Medina ML, Francisco WA (2008) Isolation and enrichment of secreted proteins from filamentous fungi. In *2D PAGE: Sample preparation and fractionation*. *Methods Mol Biol* 425:275-285
- Pitarch A, Nombela C, Gil C (2008) Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. *Method in Molecular Biology* 425:217-239
- Qi X, Niks RE, Stam P, Lindhout P (1998) Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *Theor Appl Genet* 96:1205-1215
- Rampitsch C, Bykova NV, McCallum B, Beimcik (2006) Analysis of the wheat and *Puccinia triticina* (leaf rust) proteomes during a susceptible host-pathogen interaction. *Proteomics* 6:1897-1907
- Rampitsch C, Bykova NV (2012) Proteomics and plant disease: advances in combating a major threat to the global food supply. *Proteomics* 12:673-690
- Saravanan RS, Rose JK (2004) A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4:2522-2532
- Shah P, Powell ALT, Orlando R, Bergmann C, Gutierrez-Sanchez G (2012) Proteomic analysis of ripening tomato fruit infected

- by *Botrytis cinerea*. *J Proteome Res* 11:2178-2192
- Shenton MR, Berberich T, Kamo M, Yamashita T, Taira H, Terauchi R (2012) Use of intercellular washing fluid to investigate the secreted proteome of the rice-*Magnaporthe* interaction. *J Plant Res* 125:311-316
- Sinha R, Chattopadhyay S (2011) Changes in the leaf proteome profile of *Mentha arvensis* in response to *Alternaria alternata* infection. *J Proteomics* 74:327-336
- Sreenivasaprasad S, Talhinhas P. (2005) Genotypic and phenotypic diversity in *Colletotrichum acutatum*, a cosmopolitan pathogen causing anthracnose on a wide range of hosts. *Mol Plant Pathol* 6:361-378
- Strelkov SE, Lamari L (2003) Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. *Can J Plant Pathol* 25:339-349
- Talbot NJ (2003) On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* 57:177-202
- Tan KC, Ipcho SV, Trengove RD, Oliver P, Solomon PS (2009) Assessing the impact of transcriptomics proteomics and metabolomics on fungal phytopathology. *Mol Plant Pathol* 10:703-715
- Tzorzakis N, Taybi T, Antony E, Singleton I, Borland A, Barnes J (2013) Profiling shifts in protein complement in tomato fruit induced by atmospheric ozone-enrichment and/or wound-inoculation with *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biol Tech* 78:67-75
- Zhou W, Eudes F, Laroche A (2006) Identification of differentially regulated proteins in response to a compatible interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Triticum aestivum*. *Proteomics* 6:4599-4609