

강낭콩잎에 Ethylene을 처리하여 유도한 Chitinase의 분리정제와 결정화에 관한 연구

홍 순 강

전북대학교 화학과

The Study of Purification and Crystallization from Ethylene induced Chitinase

Soon-kang Hong

Department of Chemistry, Chonbuk National University

Abstract

Chitinase, a potential pathogenesis-related protein, was induced in the leaves of 30 day-old bean (*Phaseolus vulgaris*) plant with the treatment of $10 \mu \text{M}$ ethylene for 30 hrs.

Chitinase was purified from the mature tissue of bean leaves (*Phaseolus vulgaris*) by ammonium sulfate precipitation followed by affinity chromatography on a regenerated chitin and sephadex G-75 chromatography. The purified chitinase gave a single band SDS-PAGE to be 32,000 Dalton.

In order to elucidate the three-dimensional structure of chitinase and to shed light on the functional mechanism of this class of enzymes, the enzyme was tried to crystallize (Sitting Drop Method).

Crystals grew at room temperature to their final size within two weeks ($0.2 \text{mm} \times 0.2 \text{mm} \times 0.1 \text{mm}$). This enzyme are still continuing to crystallize for the study of X-ray.

I. 서 론

고등식물에서 병원균의 침입에 대하여 방어

기작에 관여하는 효소들의 역할이 연구되고 있는데 이들 가수분해 효소 중 세포벽을 분해하여 활성을 나타내는 chitinase는 최초의 콩

씨앗에서 발견 되었으며⁽¹⁾, 그후 강낭콩 잎⁽²⁾, 밀배젓⁽³⁾, 각종나무들⁽⁴⁾, 담배잎⁽⁵⁾, 토마토잎⁽⁶⁾, 그리고 Hevea brasiliensis Lactex⁽⁷⁾ 등의 많은 식물잎에서 분리정제 되었다.

chitinase 활성은 상처 또는 미생물의 elicitor^(8, 9)에 의해 현저하게 증가하며 chitinase는 미생물 공격에 대한 과민성 저항반응에 관여하고 있다⁽¹⁰⁾. 정제된 식물체의 chitinase는 병원성 진균의 세포벽을 분해시키고 성장을 저해하는것으로 알려져있다^(11, 12). 식물 스트레스 호르몬인 에틸렌은 식물의 병 저항성에 관련이 있어보이는 단백질을 유도하는것으로 알려졌다으며 Boller(1983)등은 chitinase와 b-1,3-glucanase는 식물성 호르몬인 etylene이나 병원균의 반응 혹은 elicitor에 의해 유도된다고 보고하였다.

본 연구에서는 강낭콩 잎에 ethylene을 처리하여 Chitinase를 정제하였으며 Chitinase의 3차원 구조를 규명하기 위하여 결정화를 시켰다.

II. 실험방법과 재료

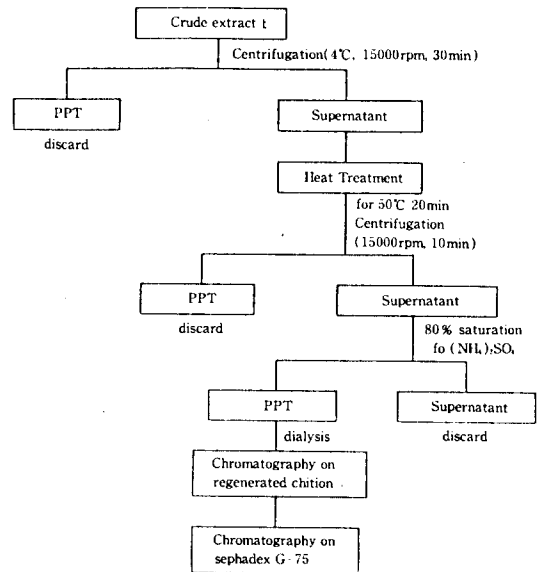
1. 강낭콩 잎에 Ethylene 처리

강낭콩 잎을 일정한 시장에서 구입하여 온실(온도 20~25℃)에서 낮과 밤의 시간을 자연 상태의 조건과 같도록 16: 8의 비로 조절하며 Vermiculite에서 30일 정도 재배한다음 추수하여 시료로 사용하였다. 첫잎이 충분히 팽창했을 때 밀폐 용기 내의 Ethylene의 농도가 10 μℓ/mL정도 되도록 하여 36~48시간 동안 Ethylene으로 처리하였다.

2. 정제방법

모든 실험을 0℃~5℃에서 시행하였으며 Chitinase의 정제는 Boller등(1983)의 방법을 최소한 변형해서 실시하였다.

분리 정제하는 과정을 도표로 표시하면 Tab. 1과 같이 간략할 수 있다.



Tab. 1 Chitinase의 분리정제 과정

효소의 각 단계별 순도의 측정은 전기 영동을 이용하여 조사하였으며 Laemmli(1970)의 방법에 의해 실시하였다. 실험에서 crude extract는 Amicon이나 Speed vac을 사용하여 농축하였으며 1×SDS loading 완충용액에 용해하였다. 1×SDS loading 완충용액(2% SDS, 5% -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue)에 시료를 용해시킨 농축액은 75℃물 중탕에 의해서 5분 동안 열을 가하여 변성시켰다. Molecular Marker로는 Bovine Serume albumin M.W 68000, Ovalbumin M.W. 43,000 RNA polymerase(E,col) A-Subunit M.W. 39000 Carbonic amhydrase M.W. 29,000 그리고

lysozyme M.W. 14300이 사용되었다(Egg White).

3. Chitinase 의 결정화.

Chitinase 의 결정화는 Sitting drop 방법에 의해 행하였으며 결정화조건은 완충용액 A(0.02% NaN_3 를 포함한 20mM HEPES)를 사용하여 만든 1~2%(w/v), 20~30 μl 의 chitinase 용액과 완충용액 A에 같은 양의 2~2.6M NaCl가 들어있는 reservoir 용액을 plastic bridge에 섞은후 petridish 안에 있는 20ml reservoir 용액으로 평형화 시켰다. 2주 안에 상온에서 결정의 최종크기로 생성되었다.

III. 실험결과

1. Chitinase 분리와 정제

chitinase는 Boller(1983) 등의 방법을 변형하여 실시하였으며 30일 정도 성장한 콩잎을 36시간 ethylene(10 $\mu\text{l}/\text{ml}$)에 처리하였으며 한번 실험에 취한 양은 200g 정도 콩잎을 사용하였다.

콩잎과 50mM sodium citrate 완충용액 (pH5.0)를 조금씩 파쇄기(blender)에 첨가하면서 균일하게 파쇄시켰다. 원심분리 후 상등액은 열처리(50°C)에 의해서 열에 약한 단백질을 침전시키고 침전된 단백질을 20mM sodium bicarbonate의 완충용액(pH 8.4)에 녹여 같은 완충용액으로 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 평형시킨 chitin- 친화 컬럼에 loading하여 20mM acetic acid(pH 3.2)를 써서 chitinase를 용출 시켰고 sephadex G-75에서 Gel 여과하였다.

Regenerated Chitin Chromatography

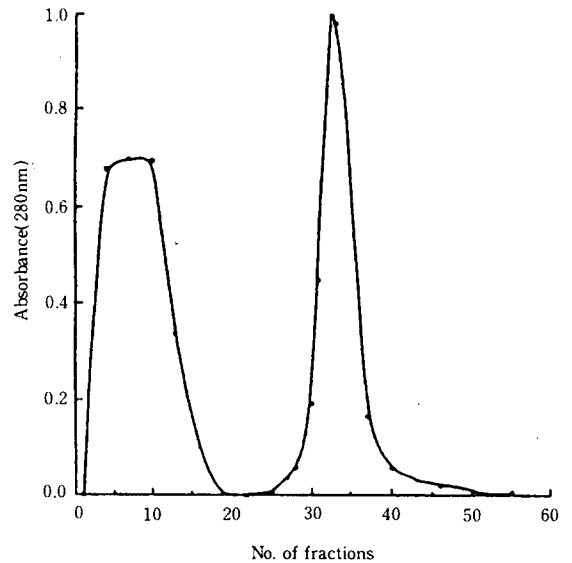


Fig. 1 Regenerated chitin- affinity chromatogram of chitinase

Gel Chromatography(Sephadex G-75)

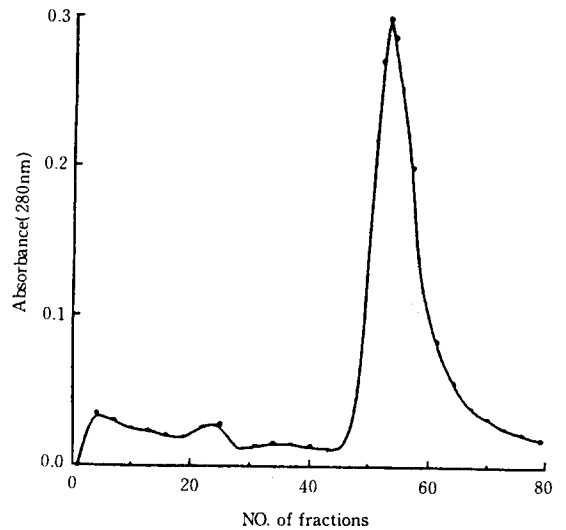


Fig. 2 Gel chromatogram of chitinase.

재생 카이틴- 친화 크로마토그래피는 chitinase의 정제에서 아주 효율이 좋았으며 단일

peak가 280nm파장에서 나타났다. 친화 chitin에 의해서 정제된 효소는 다시 Gel 여과 (sephadex G-75)를 해서 순도를 높였다. (Fig. 1, 2)

냉동 동결건조 방법(Lyophilization)에 의해 고체화된 Chitinase는 SDS-PAGE에 의해 분석되는데 Ethylene에 의해 처리되지 않을 때 보다 분자량 30,000부근에서 선명한 단일 띠를 보였다.(그림3)

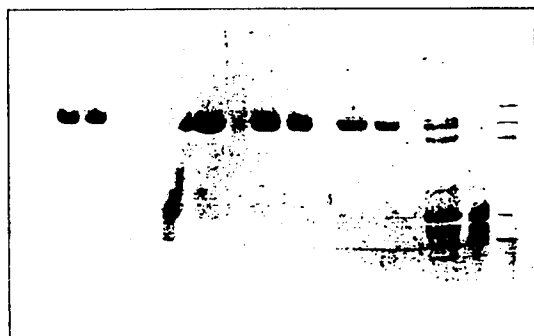


Fig. 3 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of chitinase

이런 결과는 강낭콩일때 ethylene을 처리할 때 chitinase가 유도된다는 것을 제시해 주고 있다. Ethylene에 유도된 chitinase는 20배 정도의 증가를 보였다.

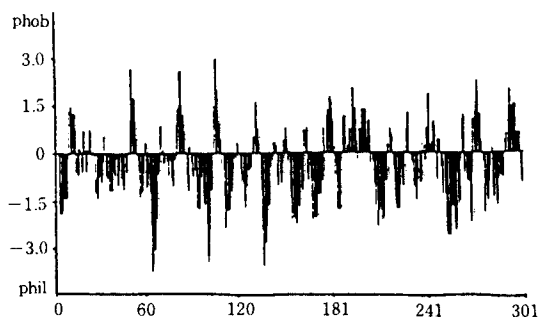


Fig. 4 Hydropathy of Chitinase from *phaseolus Vulgaris*

2. Chitinase의 결정화

결정화 실험에 앞서 Chou와 Fasman⁽¹³⁾의 방법에 따라 chitinase의 아미노산 서열에 따른 2차 구조를 예측하는 결과는 Fig. 4, 5에 나타낸 바와 같다.

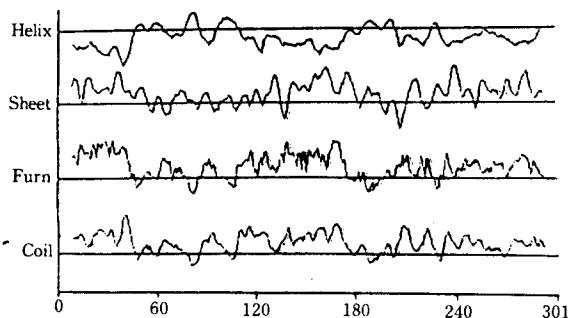


Fig. 5 Folding values for Chitinase from *phaseolus Vulgaris*

이런 결과에 의하면 강낭콩 잎에서 분리 정제한 chitinase는 친수성인 것을 알 수 있으며 비교적 적은 비율의 α -helical 구조와 나머지 대부분은 β -sheet 내지 coil로 구성 되었다는 점을 예측할 수 있었다.

chitinase의 결정화는 sitting drop방법에 의해 결정화 했으며 생성된 결정의 크기는 0.2mm \times 0.2mm \times 0.1mm이었으며 그결과는 Fig. 6과 같다.



Fig. 6 The shape of crystal of chitinase(0.2mm \times 0.2mm \times 0.2mm)

얻어진 결정이 Chitinase의 결정인지를 확인하기 위하여 결정을 녹여 SDS-gel 전기영동을 한 결과 녹인 결정이 Chitinase와 동일한 분자량을 보여 Chitinase의 결정임을 확인하였다.

IV. 고찰

강낭콩(*Phaseolus vulgaris*)에서 ethylene을 처리하여 chitinase를 유도(induction)시켜 이 효소의 유전자(gene)인 cDNA를 찾아 cloning한 것은 1986년 Broglie등에 의해 행하여졌다. 그 유전자를 역으로 읽어 밝혀진 chitinase는 아미노산이 301개로 구성되어 있고 그 서열이 결정되었는데 이를 근거로 Chou P.Y.와 Fasman G.D.(1974)방법에 의해 chitinase의 제 2차구조를 예견한 결과 turn(33.9%), sheet (28.3%), helix(11.0%) 그리고 coil(26.8%)의 형태를 취하리라 예견할 수 있다. 또한 아미노산 서열에 의한 단백질의 용해도의 예견에서는 물에 대단히 잘 녹는다는 것을 알 수 있으며 이런 예측은 결정화 과정의 실험에서 5~6%의 단백질 용액을 만드는데 별 문제가 없는 점으로 미루어서 Chou & Fasman의 예측과 잘 일치함을 알 수 있다. 또한 강낭콩에서 chitinase의 분리.정제 과정에서의 장점은 재생된 chitin을 친화 컬럼에 사용 함으로써 순도높은 (SDS-gel 상에서 단일띠) chitinase를 손쉽게 분리할 수 있다는 이점을 가지고 있다 하겠다.

다음으로 고찰할 점은 chitinase를 결정화시키기 위해 침전제를 변화시켜 가하며 조사한 결과 유기 침전제인 MPD(2-methyl-pentandiol)에서는 침전이 일어나나 침전의 색깔

이 변화되는 점으로 미루어 단백질이 변성되는 것을 고찰할 수 있었으며 염(salt) 으로서는 NaCl과 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에서 단백질이 침전됨을 고찰할수 있었다. 따라서 예비 실험 결과 침전제를 유기 침전제 보다는 무기 침전제가 적합함을 알 수 있었으며 예상한 결과대로 NaCl을 침전제로 사용했을 때 결정을 얻을 수 있었으나 결정의 크기가 아직까지는 X-ray 분석에는 적합하지 않아서 이는 아마도 SDS-gel 상에서는 고찰되지 않으나 몇 개의 이성체(isoform)의 Chitinase가 존재할 가능성은 배제할 수 없겠다.

현재에도 Chitinase의 결정화 작업은 진행 중에 있으며 빠른 시일 내에 결정화가 일어나면 Chou & Fasman의 제 2차구조 예견과 X-ray구조(3차원 구조)의 결과를 비교할 수 있으리라 기대한다.

참고 문헌

1. Powning, R.F., and Irzykiewicz, H., (1965), *Comp. Biochem. Phtol.*, 14; 127-133
2. Abeles, F.B., P.P. Bosshart, L.E. Forrenence and W.E. Habig., (1971) *Plant Physiol.*, 47; 129-134
3. Molano, J., I. Polacheek, A. Duram and e. Cabib, (1979) *J. Biol. Chem.*, 254; 4910-4907
4. Kramer, K.J. and D. Koga, (1986) *Insect Biochem.*, 16; 851-877
5. Legrand, M., S. Kauffman, P. Geoffroy and B. Fritig (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. a.*, 84; 6750-6754
6. Matthien, H.A., J. Joosten, J.G. Pierreand

-
- M.Dewit,(1989),Plant Physiol.89; 945-951
7. Henriette,j.,Rozeboom,Asmini Budiani, Jaap J.Beintema and Bauke,W.,Dijkstra (1990)J.Mol.Biol., 212 ; 441-443
8. Broglie,k.e.,J.J.Gayner and R.M.Brogli, (1986),Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.,83; 6820-6824
9. Boller,T.,Gehri,A.,Mauch,F. and Vogel, U.,(1983) Planta, 157 ; 22-31
10. Netraux,J.p. and Boller,T.,(1986) Physiol.Plant Phthol., 28 ; 161-169
11. Schlumbaum,A.,F.Mauch,U.Vogeli and T.Boller,(1986) Nature 324 ; 356-367
12. Mauch,F.,Mauch-Mani.B,Boller,T., (1988)Plant physiol. 88; 936-942
13. Chou,P.Y and Fasman,G.D.,(1974) Biochemistry 13 ; 211-221