

식물 병원진균 *Botrytis cinerea*가 생산하는 Endo-polygalacturonase의 순수정제와 특성

김병영 · 이태호 · 나유진 · 정영륜 · 이창원 · 김재원*

경상대학교 자연과학부 미생물학전공, 기초과학연구소

Purification and Characterization of Endo-polygalacturonase Produced by Plant Pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*

Byung-Young Kim, Tae-Ho Lee, Eu-Gene Rha, Young-Ryun Chung,
Chang-Won Lee and Jae-Won Kim*

Department of Microbiology, Faculty of Natural Sciences and
Research Institute of Natural Sciences, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Korea

ABSTRACT: *Botrytis cinerea* T91-1 has shown to produce at least four different polygalacturonases in a liquid medium containing citrus pectin as a carbon source. One of the enzymes, its molecular weight was estimated as 37 kDa by denatured polyacrylamide gel electrophoresis, was purified by a series of procedures including acetone precipitation, ion exchange, heparin affinity, and reverse phase column chromatographies. By viscometric analysis, the enzyme was revealed as an endo-polygalacturonase. The enzyme activity was inhibited by divalent cations such as Ca^{2+} , Co^{2+} , and Cu^{2+} . Km and Vmax for polygalacturonic acid hydrolysis were 0.33 mg/ml and 28.6 nM/min, respectively. The optimum temperature for enzymatic activity was 55 °C and the enzyme showed optimal pH values between 4.0 and 4.5. The enzyme was stable up to 12 hours in the range of pH 4 to 7 and at the temperature below 30°C. Amino acid sequence from N-terminal up to 6 amino acids determined by Edman degradation showed little homology with polygalacturonases from fungi and plants.

KEYWORDS: *Botrytis cinerea*, Endo-polygalacturonase, Enzyme production, Purification

*Botrytis cinerea*는 식물 병원진균으로 숙주 식물체에 침입하여 세포벽을 짓무르게 하는 잭빛곰팡이병을 일으켜, 과수, 화훼, 채소 등의 원예작물에 손실을 가져와 경제적으로 많은 피해를 주고 있다 (Coley-Smith 등, 1980). 특히 수분이 많은 과육이나, 습기가 많은 서늘한 기온에서 발병이 심할 뿐만 아니라 (Agrios, 1988; Jarvis, 1977), 실제적인 방제 수단으로 사용되어 오던 benomyl 등의 화학살균제에 대한 저항성균이 출현하여 그 방제 대책이 시급한 실정이다 (Staples와 Mayer, 1995).

일반적으로 식물 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin과 lignin 등으로 구성되어 있고

이들 중 pectin질은 식물체의 middle lamella와 1차 세포벽의 주성분이며 galacturonic acid의 polymer로 구조적 차이에 따라 각각 pectic acid, pectin, protopectin으로 구분된다. *B. cinerea*와 같은 식물 병원성 진균이 식물에 침입하기 위해서는 식물 세포벽을 분해하여야 하는데 대부분의 식물 병원성 진균은 pectin을 분해하는 여러 효소를 분비한다고 알려져 있다 (Agrios, 1988; Jarvis, 1977; Lacks와 Springhorn, 1988). Pectin을 분해하는 효소들은 기질의 선호도와 반응 기작에 따라 polygalacturonases (PGs), exo-poly- α -D-galacturonidase, pectate lyase, pectin lyase, exopolygalacturonate lyase, pectinesterase와 protopectinase 등으로 구분된다 (Staples와 May-

*Corresponding author

er, 1995). 식물의 1차 방어벽인 pectin질 분해에 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 pectin 분해효소는 polygalacturonase와 pectin lyase이지만 (Collmer와 Keen, 1986), 가장 먼저 polygalacturonase를 분비하며 순차적으로 다른 pectin 분해효소를 분비한다고 알려져 있다(Cooper와 Wood, 1975; Jones 등, 1972).

*B. cinerea*가 분비하는 PG는 작용기작에 따라 endo-PG와 exo-PG로 구별된다. *B. cinerea*가 식물체에 침입시 세포벽을 분해하기 위해서는 endo-와 exo-type의 PG가 모두 작용할 것으로 추측되지만, 일반적으로는 endo-type의 PG로 세포벽을 분해하는 것이 균체가 식물체 내로 침입하는데 유리할 것이므로, 감염 초기에는 endo-PG의 작용이 더 중요할 것으로 예측된다(Cooper와 Wood, 1975; Jones 등, 1972). 병원성을 나타내는 분리 균주에서 Heuvel 등(1990)이 endo-type의 constitutive PG를 순수 분리하였고, Johnston과 Williamson (1990)도 분자량이 36 kDa으로 동일한 두 가지의 endo-PG와 분자량이 각각 65 kDa과 70 kDa인 exo-PG를 순수 분리하여 보고하였다. 그러나, *B. cinerea*는 유전적 변이가 심하여 각 분리 균주에 따라 PG의 특성이 다를 뿐 아니라, 배양 조건 및 탄소원의 종류에도 영향을 받으며 isoelectric focusing으로 분리하여 활성 염색을 하면 최대 16종의 효소를 확인 할 수 있다(Errampalli와 Kohn, 1995). 이와 같이 다양한 PG들 중 어느 동위효소가 병원성과 관련되어 있으며, 병원균이 식물체 내로 침입하는데 필수적인가를 알아내기 위하여는 각각의 효소를 정제하고, 그 특성을 이해하는 것이 필요하다. 최근에 식물체 내에서 PG의 활성을 억제하는 단백질이 존재한다는 것이 밝혀졌고, 이것을 토대로 병원균의 식물체내로의 침입을 억제하는 현상을 관찰하였으며, 이를 토대로 PG의 역할이 식물체 침입에 필수적임을 시사하였다. 특히 이 단백질 억제제는 exo-PG의 활성에는 영향이 없으나, endo-PG의 활성을 억제한다고 알려져 있어 endo-PG의 효소학적 연구의 필요성이 요청되고 있다(Staples와 Mayer, 1995).

본 연구에서는 *B. cinerea*가 분비하는 PG 중에서 endo-type의 효소를 순수 정제하여 특성을 조사

하였다.

재료 및 방법

균주의 배양 및 유지

균주는 화학연구소의 농약활성 연구실에서 이병된 토마토로부터 분리한 *Botrytis cinerea* T91-1을 분양받아 사용하였다. 균주의 보관과 배양은 potato dextrose agar(PDA) 배지에서 하였으며, 20°C에서 5일간 배양한 후 실험에 사용하였다. 효소 생산은 citrus pectin(Sigma사)을 탄소원으로 하는 액체 배지(0.5% citrus pectin, 1% NaNO₃, 0.5% KH₂PO₄, 0.25% MgSO₄·7H₂O, 0.1% CaCl₂, 0.05% yeast extract)를 2 L의 Erlenmeyer' flask에 600 ml씩 넣어 멸균하고, 직경 5 mm의 균사 disk를 60개 접종하여 20°C에서 12일간 진탕 배양하였다(Rha 등, 1994).

Polygalacturonase의 효소활성 측정 및 단백질 정량

효소 활성 측정을 위한 반응 혼합액으로는 2 mM EDTA, 20 mM potassium acetate buffer (pH 4.5), 0.5%(w/v) sodium polygalacturonic acid를 사용하였다. 반응 혼합액 1 ml을 40°C에서 미리 10분간 방치한 후 효소액을 가하고 20분간 반응시켰다. 여기에 DNS 용액(7.5 g 3,5-dinitrosalicylic acid, 14 g NaOH, 216.1 g sodium potassium tartrate, 5.9 g Na₂S₂O₅, 5.4 ml phenol/L) 3 ml을 넣고 끓는 물에서 5분간 두었다가 상온에서 식힌 후, 3,000×g로 10분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다(Miller, 1959). 효소 반응의 생성물은 D-galacturonic acid를 표준 물질로 하여 구한 표준곡선으로 정량 하였다. 효소 활성은 위의 반응 조건에서 1분 동안 1 μmol의 galacturonic acid를 생산하는 효소량을 1 unit으로 정의하였다. 단백질 양은 Bradford(1976)의 방법에 따라 측정하였고 표준 단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

Endo-polygalacturonase의 순수분리

*B. cinerea*가 생산하는 endo-PG를 다음의 방법

으로 정제하였으며 모든 과정은 4°C에서 수행하였다. 탄소원으로 citrus pectin을 사용한 배지에서 12일간 배양한 후 cheese cloth로 걸러 균사를 제거하였다. 이 배양여액에 차가운 acetone을 30% (v/v)가 되도록 가하여 주고 30분간 정지한 후 원심 분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액에 다시 acetone을 60%(v/v)가 되도록 가하여 주고 30분간 정지 후 원심분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)에 잘 녹인 후, ammonium sulfate를 1.5 M이 되도록 가하여 주고 원심분리하여 상등액만을 효소원으로 사용하였다. 효소원에 ammonium sulfate 농도가 1.5 M이 되게 가하여 주고 15,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 1.5 M ammonium sulfate를 포함하는 10 mM Hepes buffer (pH 7.0)로 미리 평형화된 Phenyl-Toyopearl column(26 mm×20 cm)에 주입하고 동일 완충용액으로 세척하였고, 흡착된 단백질을 분당 2 ml의 유속으로, ammonium sulfate의 농도를 1.5 M에서 0 M까지 되도록 낮추어 주면서 용출하였다. 효소의 활성이 나타나는 분획을 Centriprep 30(Amicon 사)으로 농축하고 1.5 M ammonium sulfate를 포함하는 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 세척하였다. 분리한 효소 분획을 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 미리 평형화된 HPLC DEAE-5PW column에 주입한 후, KCl의 농도를 0.1 M에서 0.3 M까지 높여 가며 분당 1 ml의 유속으로 단백질을 용출하였다. 효소 활성이 있는 분획만을 모아 같은 방법으로 농축하고 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 세척하였다. 이렇게 준비한 효소 분획을 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 미리 평형화된 Mono Q HR5/5 column에 주입한 후, KCl의 농도를 0.2 M에서 0.5 M까지 높여가며 분당 1 ml의 유속으로 단백질을 용출하였다. 효소 활성이 있는 분획만을 모아 농축하고 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 세척하였다. 이를 10 mM Hepes buffer (pH 7.0)로 미리 평형화된 HPLC Heparin-5PW column에 주입하여 5분간 동일 완충용액으로 세척한 후, column에 흡착된 단백질을 분당 1 ml의 유속으로 0 M에서 0.2 M까지 KCl의 농도를 높여가며 용출하였다.

분자량 결정

분리한 단백질의 순수도와 분자량은 SDS가 포함된 10% polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하여 결정하였다. SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 수행하였으며 표준 단백질로는 phosphorylase B(97 kDa), bovine serum albumin(BSA) (66 kDa), ovalbumin(45 kDa), carbonic anhydrase(31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa)를 사용하였다. 분리한 단백질이 효소의 활성을 가지고 있는지를 알기 위하여는 활성 염색을 실시하였다(Ried와 Collmer, 1985).

면역혈청 블롯

단백질을 SDS-PAGE로 전개한 후, nitrocellulose paper(Schleicher & Schuell)에 전기 이동시킨 후 5%(w/v)의 skim milk 용액으로 전처리 하였다. 여기에 TTBS(50 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20)에 녹인 항체를 12시간 반응시키고 난 후 다시 alkaline phosphatase 가 표지된 goat anti-rabbit IgG를 반응시켰다. 발색은 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate와 nitroblue tetrazolium용액을 사용하여 실행하였다(Harlow와 Lare, 1988).

효소의 특성 조사

순수 정제한 endo-PG의 기질 가수분해 mode를 조사하기 위해, 반응시간에 따른 viscosity의 감소를 측정하였다(Bateman 등, 1976). 0.5%(w/v) sodium polygalacturonic acid를 포함한 0.1 M potassium acetate buffer(pH 4.5)를 0°C 수조에서 미리 방치하고 Cannon-Fenske viscometer (Schott Gerate)에 0.5 unit의 효소액을 가한 후, 시간별로 유출되는 환원당의 viscosity를 측정하였다. 효소의 활성에 미치는 pH의 영향은 0.1 M citrate buffer(pH 3-6), 0.1 M potassium acetate buffer(pH 4-5), 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6-7), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7-9), 0.1 M glycine-NaOH buffer(pH 9-10)를 사용하여 측정하였다. 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향도 각각의 buffer에 효소를 16시간 동안 방치한 후 측정하였다. 효소 활성에 미치는 온도의 영향은 4°C에

서 70°C까지의 임의온도에서 효소 활성을 측정하였고, 효소의 안정성에 미치는 온도의 영향은 효소를 -20°C에서 70°C까지 각각의 온도에 16시간 방치한 후 활성을 측정하였다. 여러 가지 양이온과 reagent가 효소의 활성에 미치는 영향은 농도를 2 mM로 조정하여 여러 가지 양이온과 reagent를 효소액과 섞어 실온에서 10분간 방치한 후, 40°C에서 20분간 기질과 반응시켜 효소 활성을 측정하였다. 효소의 K_m 값과 V_{max} 값은 기질로 사용한 sodium polygalacturonic acid의 농도가 0.1 mg/ml에서 6 mg/ml인 범위에서 효소의 활성을 측정하였고 이 결과를 Lineweaver-Burk plot으로 옮겨 산출하였다.

N-말단 아미노산 서열 결정

정제된 효소의 N-말단 아미노산 서열 결정은 기초 과학 지원 센터에서 행하였다. Edman degradation 방법으로 Applied Biosystems model 473A protein sequencer를 사용하였으며 제작자의 설명서에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

Endo-polygalacturonase의 순수 정제

*Botrytis cinerea*는 현재는 16종류의 polygalacturonase를 생성한다고 보고되어 있다(Magro 등, 1980). 이렇게 다양한 polygalacturonase들이 각각 어떠한 생리적 활성과 효소학적 특징을 가지는 것을 알아내기 위해서 효소를 따로 정제하는 실험이 우선되어야 하나, 아직까지 분리 정제된 효소의 수는 많지 않은 형편이며, 또한 동위 효소들이 각 유전자의 산물인지, 혹은 glycosylation이나 proteolysis에 의한 결과인지는 분명치 않다. 이전의 실험에서 *B. cinerea*가 분비하는 exo-type의 효소인 66 kDa의 단백질에 대한 항체는 이보다 분자량이 작은 37 kDa 효소를 인식하지 못한다는 결과로부터 분자량 37 kDa의 효소는 exo-type의 66 kDa의 효소와 다른 유전자의 산물로 추측된다(Lee 등, 1997).

여러 가지 탄소원에서 *B. cinerea*를 배양하였을 때, polygalacturonase의 총 활성은 탄소원으로

citrus pectin을 사용하고 12일간 배양한 경우에 가장 높았다(Rha 등, 1994). 이와 같은 조건에서 배양액을 활성 염색법으로 조사한 결과 37 kDa, 45 kDa, 66 kDa와 70 kDa 등 최소한 4가지 이상의 PG가 동시에 생성되었고(Lee 등, 1997), 이 중 에서 비교적 안정하고 활성이 높은 것으로 판단되는 37 kDa의 PG를 분리하였다. 효소를 정제하기 위한 첫 번째 단계로 *B. cinerea*를 배양한 후, 배양액을 모아 차가운 acetone을 가하여 단백질을 침전시켰다. 이때 전체 효소 활성의 53%가 회수되었으며 정제 배수는 1.84였다. 단백질을 침전시키기 위하여 ammonium sulfate를 처리할 경우에는 효소의 활성을 가진 단백질은 침전되지 않았으며, acetone을 사용한 경우에 효소의 활성을 가진 단백질의 침전물을 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 얻은 침전물을 10 mM Hepes buffer(pH 7.0)로 녹여 내었는데, 이때 단백질이 쉽게 용해되지 않았고 효소 활성이 많이 소실되었으나, 단백질을 농축할 수 있는 최선의 방법으로 판단하여 사용하였다. 회수한 효소원을 Phenyl-Toyopearl column에 주입하고 단백질을 분리하였다. 대부분의 효소 활성은 Fig. 1A에서와 같이 column에 결합하지 않았으며, 주입한 효소원의 활성을 100%로 보았을 때 4.8%의 효소 활성만이 column에 결합하였고 대부분의 활성은 결합하지 않은 단백질 분획에서 검출되었다. 분리하고자 하는 37 kDa의 효소가 어느 분획에 존재하는가를 알아보기 위하여 column에 결합한 효소 활성 분획만을 모아서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis하여 단백질을 분리하고 활성 염색을 하여 확인한 결과, column에 결합한 효소 분획에서 분자량 37 kDa와 66 kDa인 효소가 검출되었다. 이때 얻은 효소 활성 분획을 Lee 등(1997)이 분리한 분자량이 66 kDa인 exo-PG의 항체로 면역혈청 블롯을 실시해 본 결과, 66 kDa의 단백질은 exo-PG임을 알 수 있었다(미보고). 이 정제 과정에서 효소의 전체 활성중 2.5%만을 회수하였고, 정제도는 0.43배였다. 농축한 단백질을 더 정제하기 위하여 Fig. 1B에서와 같이 HPLC DEAE column chromatography를 실시하였다. 농축한 단백질 분획은 66 kDa의 exo-PG를 포함하고 있는 것으로 판단되었다. Lee 등(1997)의 보

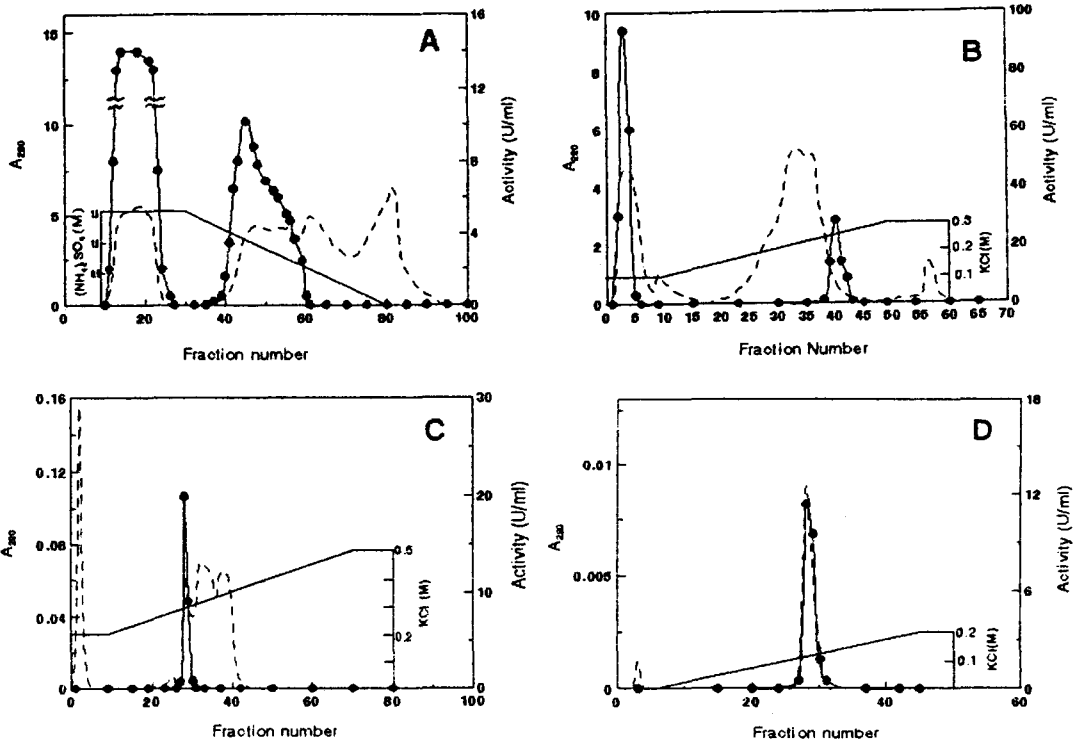


Fig. 1. Purification of endo-polygalacturonase from acetone precipitates of *Botrytis cinerea* T91-1 culture filtrates. (A) Phenyl-Toyopearl chromatography, (B) DEAE chromatography on DEAE-5PW column, (C) ion-exchange chromatography on Mono Q HR5/5 column, and (D) heparin affinity chromatography on Heparin-5PW column. Polygalacturonase activity (—●—) was traced by measuring the amount of reducing sugars and proteins (---) were monitoring by determining the absorbance at 280 nm.

고에 의하면 이와 같은 조건에서 분자량 66 kDa의 exo-PG는 100 mM 이상의 KCl이 존재할 때에 column에 결합하지 않는다고 보고한 결과를 토대로 이를 제거하기 위하여 100 mM의 KCl을 포함하는 buffer를 사용하였다. 예상한 바와 같이 효소의 활성은 column에 결합하지 않는 분획과 250 mM의 KCl 농도에서 용출되는 분획에서 효소의 활성을 관찰할 수 있었다. 각각의 효소 분획을 면역 혈청 블롯과 활성 염색법으로 관찰한 결과, column에 결합하지 못하는 분획에서는 분자량 66 kDa의 exo-PG가 관찰되었고 column에 결합한 분획에서는 활성 염색법으로만 37 kDa의 효소가 관찰되었으며 exo-PG의 항체로는 인식되지 않는 것을 확인하였다. 이 정제 과정으로 효소 활성의 회수율은 0.6%에 지나지 않았으나 정제 배수는 3.79배로 나타났다. 이 결과로부터 본 실험에서 정제

하려는 효소는 분리 균주인 *B. cinerea* T91-1에서 매우 적은 양이 합성되는 것으로 추측되었다. 효소 활성을 가진 분획을 모아 Mono Q HR5/5 column chromatography를 실시한 결과 Fig. 1C에서와 같이 크게 4개의 단백질 peak를 관찰하였으며, 250 mM의 KCl에서 용출되는 단백질 분획에서 효소의 활성을 관찰하였다. 이 정제 과정에서 효소는 22.9배 정제된 것으로 나타났고, 0.18%의 회수율을 보였다. 이렇게 정제한 효소는 아직도 불순하였으므로 HPLC Heparin column chromatography를 행하여 더 정제하였다. 단백질은 Fig. 1D에서 보듯이 2개의 분획으로 나누어졌으며, 100 mM의 KCl 농도에서 용출된 단백질 분획이 효소 활성을 나타내었다. 이렇게 하여 최종적으로 15 L의 배양액 (788 mg protein)에서 68배 정제한 20 µg의 endo-PG를 얻었다(Table 1).

Table 1. Purification of extracellular endo-polygalacturonases produced by *Botrytis cinerea* T91-1

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. activity (U/mg)	Recovery (%)	Folds
Culture filtrate	788	12758	16.1	100	1
Acetone precipitation (30-60%)	229	6783	29.6	53	1.84
Phenyl Toyopearl	46.5	323	7.0	2.5	0.43
DEAE-5PW	1.32	79	60	0.6	3.79
Mono-Q HR5/5	0.065	24	369	0.18	22.9
Heparin-5PW	0.02	21	1089.0	0.17	68.0

정제한 endo-polygalacturonase의 순수도 및 성질

정제한 단백질의 순수를 관찰하기 위하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 정제 단계에서 얻은 단백질 분획과 순수 정제한 효소를 비교하여 본 결과, Fig. 2에서와 같이 마지막 정제 단계인 HPLC Heparin column chromatography로 얻은 단백질은 단일 띠를 나타내었고 상대적 분자량은 37 kDa으로 측정되었다 (lane 5). 정제한 단백질이 효소 활성을 나타내는가를 확인하기 위해서 먼저 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리하여 활성 염색법으로 분석한 결과, Fig. 2에서와 같이 효소 활성의 띠

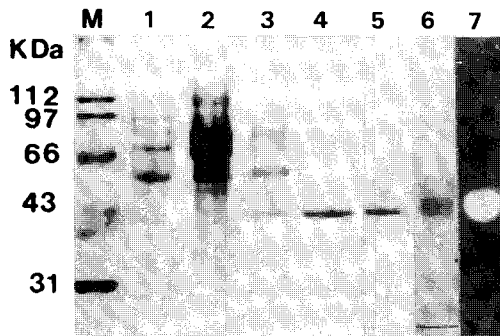


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis and activity staining of polygalacturonase fractions. Acetone precipitates (lane 1), active fraction from Phenyl-Toyopearl (lane 2), DEAE (lane 3), Mono Q (lane 4) and heparin (lane 5) were analyzed in the presence of β -mercaptoethanol. Purified endo-polygalacturonase (lane 6) analysed in the absence of β -mercaptoethanol and activity stained overlay gel (lane 7) were compared. M: Molecular-weight markers.

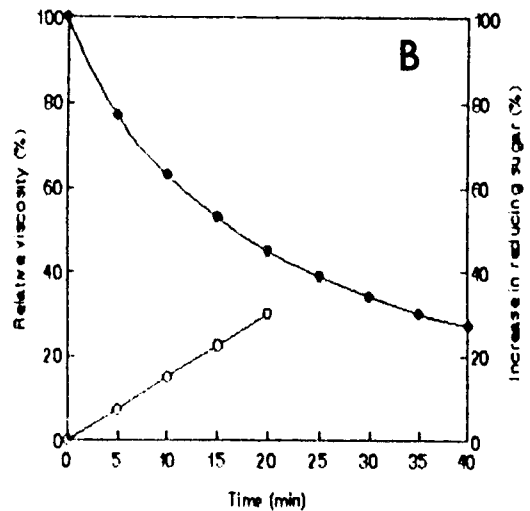
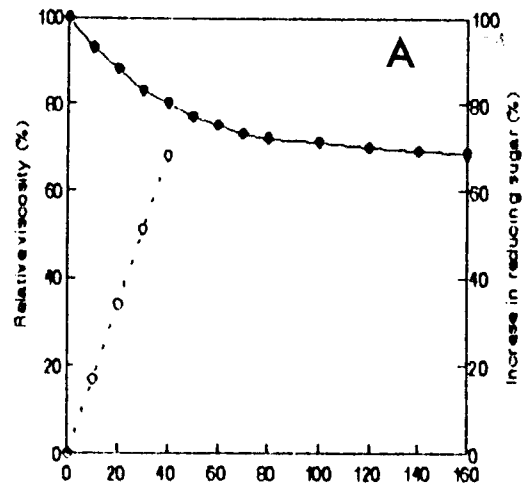


Fig. 3. Mode of cleavage of polygalacturonic acid by purified endo-polygalacturonase (A) and exo-polygalacturonase (B). Reduction in viscosity (\bullet) correlated with increase in reducing sugar (\circ).

(lane 7)와 단백질의 띠(lane 6)가 일치함을 확인할 수 있었다. 따라서 분자량 37 kDa의 PG를 순수 정제하였다고 판단하였다. 정제한 단백질의 작용 방식이 *exo-type*인지, *endo-type*인지를 결정하기 위하여 효소를 가하여 주고 효소 반응액의 *viscosity*의 변화와 생성되는 환원당의 양을 결정하였다. 작용 방식을 순수 정제한 분자량 66 kDa의 *exo-PG* (Lee 등, 1997)와 비교하여 본 결과, Fig. 3에서와

같이 *exo-PG*인 분자량 66 kDa의 효소에서는 *viscosity*가 완전히 감소하는 반면 환원당의 양이 급격히 증가하는 양상을 보이는데 비하여, 본 실험에서 분리한 분자량 37 kDa인 효소의 경우에는 *viscosity*가 급격하게 감소함을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B). 효소액을 가하고 처음 20분간에 생성된 환원당의 상대적인 양은 30% 내외로 비슷하였으나, 그때의 *viscosity*는 각각 8%와 45%로 현저한

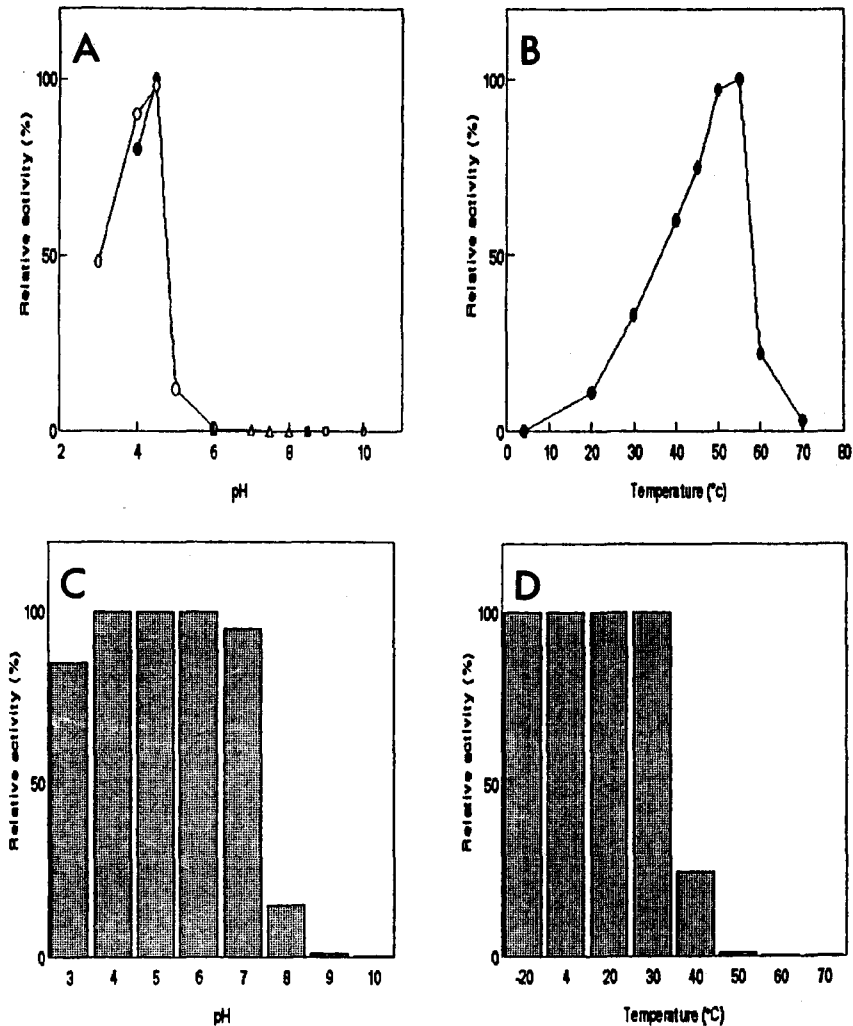


Fig. 4. Effects of pH and temperature on the enzymatic activity and stability of purified endo-polygalacturonase. (A) The effects of pH on endo-polygalacturonase activity were measured using 0.1 M of citrate (○), acetone (●), phosphate (△), Tris-HCl (▲), and Glycine-NaOH (□) buffers, respectively. (B) The effect of temperature on the activity of endo-polygalacturonase. (C) The effect of pH on the stability of endo-polygalacturonase. (D) The effect of temperature on the stability of endo-polygalacturonase.

차이를 보였다. 이 실험으로 본 연구에서 분리한 분자량 37 kDa의 효소는 endo-PG임을 알 수 있었다.

정제한 효소는 Fig. 4A에서와 같이 pH 4.5에서 최고의 활성을 나타내었으며 pH 6.0 이상에서는 효소 활성을 보이지 않았다. 정제한 효소는 비교적 높은 온도인 55°C에서 최고의 활성을 보였으며(Fig. 4B), *B. cinerea*가 배양되는 온도인 20°C에서는 효소 최고 활성의 약 10% 정도를 나타내었다. 일반적으로 polygalacturonase의 효소 활성 측정을 위한 최적 온도는 배양 최적 온도보다 현저히 높게 관찰되었으나, 효소 활성에 미치는 pH와 온도의 영향은 다른 분리 균주나, 동위효소에서와 같은 양상을 보였다. 효소를 여러 가지 pH의 buffer에 방치한 경우 Fig. 4C에서와 같이 정제한 효소는 산성과 중성에서는 매우 안정하였으나, pH 8.0 이상에서는 급격하게 효소 활성을 잃어버렸다. 효소가 최고의 활성을 보이는 50°C 이상에서는 16시간 방치한 경우 효소 활성을 완전히 잃어버렸으나, 30°C 이하의 온도에서는 매우 안정한 것으로 관찰되었다(Fig. 4D). 이러한 pH와 온도에 대한 안정성도 이미 보고된 polygalacturonase의 성질과 매우 유사하였다 (Riou 등, 1992).

Table 2. Effects of cations and reagents on the activity of polygalacturonases purified from *B. cinerea* T91-1

Cations and reagents	Relative activity (%)	
	endoPG	exoPG
Control	100	100
CaCl ₂	71	71
MnCl ₂	-	44
(NH ₄) ₂ SO ₄	94	-
CoCl ₂	33	50
NH ₄ Cl	99	88
FeCl ₃	67	73
MgCl ₂	97	69
CuSO ₄	35	58
ZnSO ₄	74	74
SDS	94	3
EDTA	88	96
PMSF	88	96
DTT	100	96

정제한 endo-PG의 활성에 미치는 여러 가지 양이온과 reagent들의 효과를 분자량 66 kDa의 exo-PG와 비교하여 보았다. Table 2에 나타난 바와 같이, endo-PG는 exo-PG와 마찬가지로 Co²⁺, Cu²⁺와 같은 2가의 양이온이 존재할 때 효소 활성이 50% 내외로 감소하였으나 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)와 dithiothreitol(DTT)에 의하여 활성이 억제되지 않는 비슷한 양상을 보였다. 이러한 결과로부터 exo-PG 뿐만 아니라 endo-PG도 효소의 활성 부위에 serine이나 cysteine과 같은 아미노산 잔기가 포함되어 있지 않음을 알 수 있었다. 특이한 것은 exo-PG는 1 mM 이상의 SDS가 존재할 때에는 효소 활성이 급격하게 억제되는 것으로 나타났으나, 본 연구에서 분리한 endo-PG에서는 효소 활성의 변화가 없었다.

정제한 단백질의 기질인 polygalacturonic acid에 대한 K_m 값과 V_{max} 값은 Fig. 5에서와 같이 기질의 농도에 따라 효소 활성이 증가되다가 포화 상태에 이르는 전형적인 곡선을 얻을 수 있었다. 이를 Lineweaver-Burk plot으로 나타내어 K_m 값과 V_{max} 값을 측정하였는데, 각각 1.1 mg/ml과 250 nmol/min이었다. 본 실험에서 정제한 endo-PG의 K_m 값은 분자량 66 kDa인 exo-PG 보다 3배 정도 높았으나, 인정할 만한 현저한 차이를 관찰할 수 없었다.

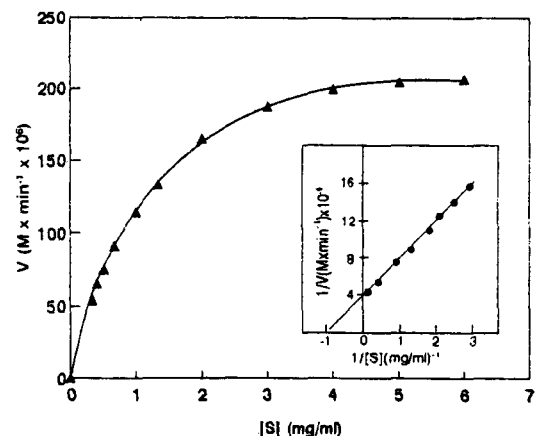


Fig. 5. K_m and V_{max} value of purified endo-polygalacturonase. (Inset: Lineweaver-Burk plot of data)

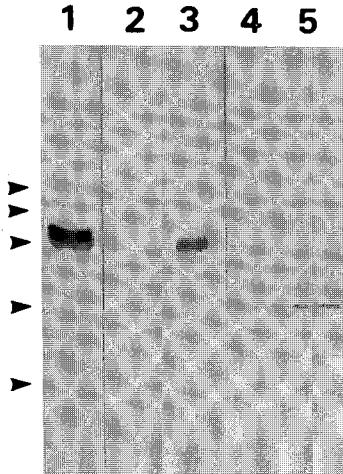


Fig. 6. Immunoblot analysis of polygalacturonases purified from *Botrytis cinerea*. Acetone precipitates (3 µg protein, lane 1), purified endo-polygalacturonase (200 ng protein, lane 2) and exo-polygalacturonase (200 ng protein, lane 3) were analyzed using polyclonal antibody against exo-polygalacturonase. Acetone precipitates (3 µg protein) and purified endo-polygalacturonase (200 ng protein) were blotted using polyclonal antibody against endo-polygalacturonase. Arrow heads indicate the size marker proteins; β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase B (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), respectively.

정제된 Endo-polygalacturonase의 구조 특이성

순수 정제된 endo-PG와 분자량 66 kDa인 exo-PG는 기질인 polygalacturonic acid를 가수분해하는 공통적 성질이 있으므로, 단백질 구조의 유사성이 있는가를 조사하였다. 이를 위하여 분자량 66 kDa인 exo-PG를 토끼에 주사 하여 얻은 항체를 이용하여 면역혈청 블러트를 실시한 결과 Fig. 6에서와 같이, exo-PG를 인식하는 항체는 endo-PG를 인식하지 못하였다(lane 1, 2). 이러한 결과로부터 exo-type과 endo-type의 효소는 단백질의 일차구조에서 상동성이 적은 것으로 판단하였다. 한편 Johnson과 Williamson(1992)이 보고한 36 kDa의 endo-PG를 인식하는 항체는 정제된 효소를 인식하였다(Fig. 6, lane 4, 5). 이로 미루어 보아 본 연구에서 분리한 endo-PG는 exo-PG와는 구조적으로 상

이한 것으로 짐작하였다. 정제된 endo-PG의 N-말단 아미노산 서열을 결정한 결과, Ala-Gly-Val-Ile-Xaa-Phe(Xaa: unknown amino acid)로 구성되어 있음을 알았다. 이 아미노산 서열을 분자량 66 kDa인 exo-PG의 N-말단 아미노산 서열을 포함한 현재까지 알려진 식물 및 진균류 유래 polygalacturonase를 포함한 여러 가지 단백질의 서열과 비교하였을 때 상동성을 발견하지 못하였다(Keon와 Waksman, 1990). *B. cinerea*가 많은 종류의 PG를 분비하므로, 효소의 순수분리가 간헐적으로 보고되어 왔으나, 병원성과의 상관관계는 논란의 여지가 많다(Staples와 Mayer, 1995). *B. cinerea*를 배양하면, PG의 총활성은 감염 말기에 최고치에도 달하므로, 병원성과의 상관관계가 없다는 주장이 있음에도 불구하고, 동위효소들 각각의 생성에 관한 연구가 부족하여 병원성과의 상관관계의 연구가 요구되고 있다. 이러한 연구는 각각의 효소를 정제하고, 유전자의 연구가 병행되어야 밝혀질 과제이나 이에 대한 연구가 미흡하다. 본 연구의 결과를 토대로, 많은 양의 효소를 정제하여 항체를 제조하는 한편, 유전자 수준에서의 연구가 진행된다면 polygalacturonase의 생리학적, 병리학적 역할을 밝힐 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

식물 병원진균 *Botrytis cinerea*가 분비하는 polygalacturonase의 동위효소 중에서 endo-type의 polygalacturonase를 Phenyl-Toyopearl column chromatography와 DEAE-, Mono Q-, heparin-high performance liquid chromatography법으로 약 68배 정제하였고 sodium dodecylsulfate(SDS)를 포함하는 polyacrylamide gel electrophoresis로 분석하여 단일 띠를 확인하였다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel에서 37 kDa로 측정되었으며 약산성인 조건과 30°C 이하에서 안정하였으며 최고 활성은 pH 4.5와 55°C의 온도에서 관찰되었다. 정제된 효소는 polygalacturonic acid를 endo-type으로 가수분해하였고, polygalacturonic acid에 대한 K_m 값과 V_{max} 값은 각각 1.1 mg/ml과 250 nmol/min이었다. N-말단의 아

미노산 서열을 결정하여 본 결과, 식물이나 다른 진균류에서 보고된 아미노산 서열과 유사성이 없었다.

감사의 글

이 연구는 1996년도 교육부 기초과학 육성 연구비(과제 번호: BSRI-96-4405)의 지원에 의한 것임

참고문헌

- Agrios, G. N. 1988. Plant pathology (3rd ed.). Academic press Inc., New York.
- Bateman, D. F. and Basham, H. G. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. in Encyclopedia of plant physiology (Heitefuss, R, and Williams, P. H. Ed.) pp 316-355. Springer-verlag, Berlin.
- Bradford, M. M. 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.
- Coley-Smith, J. R., Verhoeff, K. and Jarvis, W. R. 1980. The biology of *Botrytis*. Academic Press, London.
- Collmer, A. and Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 383-409.
- Cooper, R. M. and Wood, R. K. S. 1975. Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant Pathol.* **5**: 135-156.
- Errampalli, D, and Kohn, L. M. 1995. Comparison of pectic zymograms produced by different clones of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathol.* **85**: 292-298.
- Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Jarvis, W. R. 1977. Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity. Research Branch, Canada Dept. of Agri., Ottawa.
- Johnston, D. J. and Williamson, B. 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* **96**: 343-349.
- Jones, T. M., Anderson, A. J. and Albersheim, P. 1972. Host-pathogen interactions. IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiol. Plant. Pathol.* **2**: 153-166.
- Keon, J. P. R. and Waksman, G. 1990. Common amino acid domain among endopolygalacturonase of ascomycete fungi. *Appl. Env. Microb.* **56**: 2522-2528.
- Lacks, S. A. and Springhorn, S. S. 1980. Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. *J. Biol. Chem.* **255**: 7467-7473.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lee, T. H., Kim, B. Y., Chung, Y. R., Lee, S. Y., Lee, C. W. and Kim, J. W. 1997 Purification and characterization of an Exo-polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Microbiol.* (in press)
- Leone, G., Schoffelmeer, E. A. M. and Heuvel, J. V. D. 1990. Purification and characterization of a constitutive polygalacturonase associated with the infection process of French bean leaves by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* **68**: 1921-1930.
- Magro, P., Di, L., Lenna, P., Marciano, P. and Pallavicini, C. 1980. Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in *Botrytis cinerea* isolates. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 105-109.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 107-124.
- Rha, Y. J., Kim, J. W., Chung, Y. R., Huh, N. E. and Cho, K. Y. 1994. Partial purification and characterization of polygalacturonase produced by *Botrytis cinerea*. *Kor. J. Plant Pathol.* **10**: 215-221.
- Ried, J. L. and Collmer, A. 1985. Activity stain for rapid characterization of pectic enzymes in isoelectric focusing and sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gels. *Appl. Env. Microb.* **50**: 615-622.
- Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M. 1992. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Env. Microb.* **58**: 578-583.
- Staples, R. C. and Mayer, A. M. 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol. Lett.* **134**: 1-7.