



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

碩士學位論文

한국 들잔디로부터 chitinase
유전자들의 클로닝 및 특성분석
Molecular cloning and characterization
of chitinase genes
from *Zoysia japonica* Steud.

濟州大學校 大學院

生命工學科

康志男

2013年 2月

한국 들잔디로부터 chitinase 유전자들의
클로닝 및 특성분석

Molecular cloning and characterization of
chitinase genes from *Zoysia japonica* Steud.

指導教授 李 孝 淵

康 志 男

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2013年 2月

康志男의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____

委 員 _____

委 員 _____

濟州大學校 大學院

2013年 2月

목차

Table list

Figure list

Abstract

I. 서론

II. 재료 및 방법

1. 식물 및 fungi 재료
2. Total RNA의 추출
3. 염색체 DNA의 추출
4. Chitinase 유전자의 cloning
5. Full-length chitinase의 phylogenetic tree 분석
6. Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석
7. GST-chitinase fusion vector의 제작
8. *E. coli*를 이용한 재조합 (r) chitinase의 과발현 및 정제
9. 4MU-(GlcNAc) 기질에 대한 r-chitinase의 chitinolytic 활성 분석
10. 디스크 방산법을 이용한 r-chitinase의 균사신장 억제 분석
11. 병원성 fungi의 균사성장에서 r-chitinase의 농도별 영향 분석
12. r-chitinase에 의하여 성장이 억제된 병원성 fungi의 현미경 분석

III. 결과 및 고찰

1. Chitinase 유전자의 cloning
 - 1.1. Chitinase 유전자의 단편분리를 위한 primer 제작 및 RT-PCR
 - 1.2. Full-length chitinase 유전자의 cloning
2. Chitinase의 구조적 특성 및 발현 분석
 - 2.1. Chitinase의 구조적 특성 분석

- 2.2. Chitinase의 phylogenetic tree 분석
- 2.3. Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석
- 3. *E. coli*를 이용한 chitinase의 과발현 및 정제
- 4. Chitinolytic 및 항균 활성 분석
 - 4.1. r-chitinase의 chitinolytic 활성 분석
 - 4.2. r-chitinase의 균사신장 억제 분석
 - 4.3. r-chitinase 농도에 따른 균사성장 억제 분석
 - 4.4. r-chitinase에 의하여 성장이 억제된 병원성 fungi의 현미경 분석

IV. 종합고찰

V. 결론

VI. 참고문헌

Table list

Table 1. Set of primers used for class I and class II chitinase genes cloning

Table 2. List of PCR conditions using class I and class II chitinase genes cloning

Figure list

Figure 1. Total RNA extraction.

Figure 2. Genomic DNA extraction.

Figure 3. Synthesis of 1st strand cDNA.

Figure 4. Process to obtain cDNA of circularization form on 5' RACE.

Figure 5. Constructions of GST-chitinase fusion vector

Figure 6. Chitinase overexpression in *E. coli* and purification.

Figure 7. Design of degenerate primers for chitinase genes cloning and RT-PCR.

Figure 8. 3' RACE for getting sequence of 3' unknown region.

Figure 9. 5' RACE using cDNA of circularization form.

Figure 10. RT-PCR for full-length chitinase genes.

Figure 11. Nucleotide and amino acid sequence analysis of the full-length chitinase.

Figure 12. Structural property analysis of full-length chitinase including chitin binding domain.

Figure 13. Comparison of amino acid sequence of two chitinases isolated from zoysiagrass.

Figure 14. Phylogenetic tree analysis of *Zjchi1* and *Zjchi2*

Figure 15. Expression analysis of *Zjchi1* and *Zjchi2* from different organs in zoysiagrass.

Figure 16. Overexpression of GST-chitinase fusion protein in *E. coli* and purification.

Figure 17. Chitinolytic activity of purified r-chitinases verified through UV.

Figure 18. Disk diffusion susceptibility test of purified r-chitinases against various pathogenic fungi on PDA.

Figure 19. Inhibition analysis of mycelia growth of various pathogenic fungi according to concentration of purified r-*Zjchi2* on half-strength PDB.

Figure 20. Microscopical analysis of pathogenic fungi affected by purified r- *Zjchi2*.

Abstract

Zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) is the most significant cultivar used in golf courses, athletic fields, commercially. But it is very suffering damage by large patch disease causing *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV), and having physical and economical loss for biocontrol of this disease.

In this study, two full-length chitinase genes that widely known as PR-protein were isolated from zoysiagrass. Further, structural property and expression analysis of these genes was carried out. Consequently, isolated two chitinases classified into class I (Zjchi1) and class II (Zjchi2), in a result of expression analysis showed higher expression in roots than in blade. For functional analysis, two chitinases were overexpressed in *E. coli* and purified using GST-affinity column chromatography.

In chitinolytic activity test using 4MU-(GlcNAc), two purified recombinant chitinases showed chitin hydrolysis activity for 4-Methylumbelliferyl N,N'-diacetylchitobioside hydrate, 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide, and 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose, respectively. Also, antifungal activity against various fungi causing diseases of zoysiagrass and most important crops was investigated in the purified recombinant chitinases. Zjchi2 of the purified recombinant chitinases indicated growth inhibition of mycelia from *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Trichoderma reesei*, whereas not showed antifungal activity from *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV), *Rhizoctonia solani* AG-1 (IA), *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Neurospora crassa*, *Phytophthora capsici*, respectively.

Although both of the purified recombinant chitinases not showed antifungal activity against *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV) causing large patch disease of zoysiagrass, this is the first study for characterization of chitinase genes isolated from zoysiagrass.

I. 서론

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 자연환경에 대한 적응력이 뛰어나 거의 모든 기후와 토양에서 성장할 수 있기에 공원, 골프장, 제방, 운동 경기장에서 폭넓게 사용되는 품종이며 [Toyama et al., 2003; Al-Khayri et al., 1989], 상업적인 측면으로 많이 이용되고 있다.

미국의 잔디시장은 2003년 기준으로 재배면적 약 3,600,000 ha로 연간 30조원에 달하며 국내 잔디시장 또한 2000년에 비해 2012년에는 약 3.5배 성장하였다 [이광수, 2012]. 국내 잔디시장이 성장함에 따라 잔디관리를 위한 제초제, 살충제, 살균제 등 농약 사용량이 매해 증가하고 있으며, 특히 살균제의 경우 국내 골프장에서 잔디관리를 위해 사용되는 120가지의 농약 중에 66품목을 차지하고 있을 정도로 사용빈도가 높다 [Tae, 2008].

국내 골프장에 식재되어 있는 잔디류에 발생하는 병은 갈색퍼짐병 (large patch), 동전마름병 (dollar spot), 피시움마름병 (pythium blight), 갈색마름병 (brown patch), 탄저병 (anthracnose), 황색엽부병 (yellow patch)등 약 10여종이 알려져 있으며, 골프코스 대부분에 식재되어 있는 들잔디의 경우는 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 의하여 발병하는 갈색퍼짐병이 가장 큰 문제가 되고 있다 [Jung et al., 2008].

갈색퍼짐병은 늦봄과 가을에 주로 발생하며, 다른 병에 비해 진전속도가 매우 빠르고, 병반 및 발생 규모가 크다는 점에서 이를 방제하기가 어렵고 경제적 부담도 매우 큰 실정이다. 그 동안 이 병을 방제하기 위하여 주로 화학적 방제를 이용하였지만, 최근 병원균의 저항성 발현과 환경오염 등으로 인하여 많은 부작용을 초래하였다 [Jung et al., 2008]. 따라서 병저항성 잔디의 개발은 반드시 필요하며 경제적, 환경적 잇점을 가져올 것이라고 생각된다.

그 동안 내병성 작물의 개발을 위해 자연적으로 교배가 가능한 종이나 속에 속하는 식물들을 인위적으로 교배시키는 전통육종 방법을 고수해왔다. 그러나 원하는 형질을 선발하기까지의 기간과 비용이 많이 소요되는 단점이 있다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위하여 유전자 재조합기술을 이용한 내병성 작물의 개

발 및 생산이 증가하고 있으며, chitinases, β -1,3-glucanases, ribosome-inactivating proteins 등 내병성 유전자를 식물체 내로 도입하여 병저항성을 증진시킨 사례가 많이 보고되고 있다 [Liu et al., 2009; Yang et al., 2005; Jach et al., 1995].

식물은 많은 방어 관련 유전자들을 가지고 있다. 방어 관련 유전자들의 대부분은 일반적으로 PR (Pathogenesis-related) protein으로 알려져 있으며 fungi, bacteria, virus, 해충의 공격 등에 의하여 PR protein을 암호화 하는 유전자들의 발현이 유도된다고 보고되었다 [Anna. 2003]. 식물 chitinase는 PR protein에 속하는 유전자로, fungi의 세포벽을 이루는 중요한 구성요소인 chitin chain의 β -1,4-glycoside bond의 가수분해를 촉매함으로써 chitin을 분해한다고 알려져 있다 [Zamir et al., 1993]. 또한 chitinase는 chitin-chain의 비환원말단에만 활성을 나타내는 것으로 알려진 exochitinase와 chitin-chain 내부의 β -1, 4-glycoside bond를 무작위로 가수분해하는 endochitinase의 두 가지 메커니즘을 나타내며 [David B. et al., 1993], 아미노산 sequence의 특성에 따라 7개의 class로 구분된다 [Neuhaus et al., 1993]. 대부분의 chitinase는 처음 4개의 class에 속한다.

Class I chitinase는 N-terminal 영역에 leucine 또는 valine이 풍부한 signal peptide를 갖는 leader sequence와, chitin binding site로 예상되는 cysteine-rich domain이 존재하며, 높게 보존된 catalytic domain을 가지고 있다. 그리고 C-terminal extension 부위의 존재여부에 따라 class Ia와 Ib로 다시 한 번 분류된다. Class II chitinase는 class I chitinase와 상동성이 50%이상인 catalytic domain과 유사한 leader sequence를 갖고 있지만 cysteine-rich domain이 결핍되어 있는 것이 특징이다. Class III chitinase는 class I과 class II와 어떠한 sequence 연관성도 없으며, class IV chitinase는 class I chitinase와 immunological 특성이 유사하지만 그 크기가 더 작다 [Patil et al., 2000].

이미 보고된 연구에서 몇몇 식물로부터 정제된 chitinase는 *in vitro*에서 *Rhizoctonia solani*를 비롯한 다양한 병원성 fungi에 대하여 항균 활성을 보여주었으며 [Kirubakaran and Sakthivel. 2007; Toki et al., 2002], chitinase를 도입하여 과발현시킨 식물이 항균 활성을 갖는다는 사실이 알려졌다. 목화, 딸기, 밀 등에서 chitinase의 과발현은 다양한 병원성 fungi의 성장을 억제하는 효과를 나타냈다 [Tohidfar et al., 2008; Khan et al., 2004; Shin et al., 2008].

그러나 잔디의 경우는 내병성 유전자를 도입하여 병저항성 식물체를 생산한 연구가 [Cho et al., 2011] 극히 드물며, 특히 들잔디의 경우에는 내병성 유전자를 도입하여 병저항성 식물을 생산한 사례는 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)로부터 class I chitinase (*Zjchi1*)와 class II chitinase (*Zjchi2*) 유전자를 각각 분리하였으며, 분리한 chitinase 유전자들의 구조적 특성을 분석하였다. 또한 *E. coli*를 이용하여 chitinase의 과발현 및 정제를 수행하였으며, 정제된 재조합 chitinase의 chitinolytic 및 항균 활성을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 식물 및 fungi 재료

Chitinase 유전자의 cloning을 위하여 야외 온실에서 육성된 들잔디 (*Zoysia japonica* S. var 덕창)의 뿌리와 잎을 이용하였다. 그리고 chitinase의 항균 활성 측정을 위하여 농촌진흥청 농업유전자원정보센터 (KACC)로부터 분양받은 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV), *Rhizoctonia solani* AG-1 (IA), *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Neurospora crassa*, *Phytophthora capsici*, *Trichoderma reesei* 등 10개의 균주를 사용하였다. 상기의 균주들은 mycelial plug를 PDA (Potato Dextrose Agar) plate에 계대 배양하여 25 °C, 암조건으로 유지되는 growth chamber에서 약 7일간 배양한 후 본 실험에 이용하였다.

2. Total RNA의 추출

Total RNA는 들잔디의 뿌리로부터 추출하였다. 채취된 뿌리의 표면에 묻은 흙을 깨끗이 씻어낸 후 물기를 제거하여 액체질소에 급속 냉각시킨 다음, 액체질소에 차갑게 얼린 막자사발을 이용하여 완전한 분말이 될 때까지 충분히 마쇄하였다. 마쇄된 시료로부터 total RNA는 Chomczynski P and Sacchi N. 1987의 방법에 따라 trizol reagent (MRC)를 이용하여 추출하였으며, DEPC (Diethylpyrocarbonate)를 처리한 RNase free water에 녹여 RNase 오염을 방지하였다 (Fig. 1).

Total RNA 확인을 위하여 1.2 % agarose gel을 이용하여 전기영동을 수행하였으며, total RNA가 온전하게 추출된 것을 확인하였다. 마지막으로 추출된 total RNA 용액에 남아있는 DNA를 제거하기 위하여, DNA-free™ kit (Ambion)를 사용하여 제공된 protocol에 따라 DNA를 제거하였고, 에탄올 침전을 수행하여 정제 및 농축한 다음 본 실험에 이용하였다.

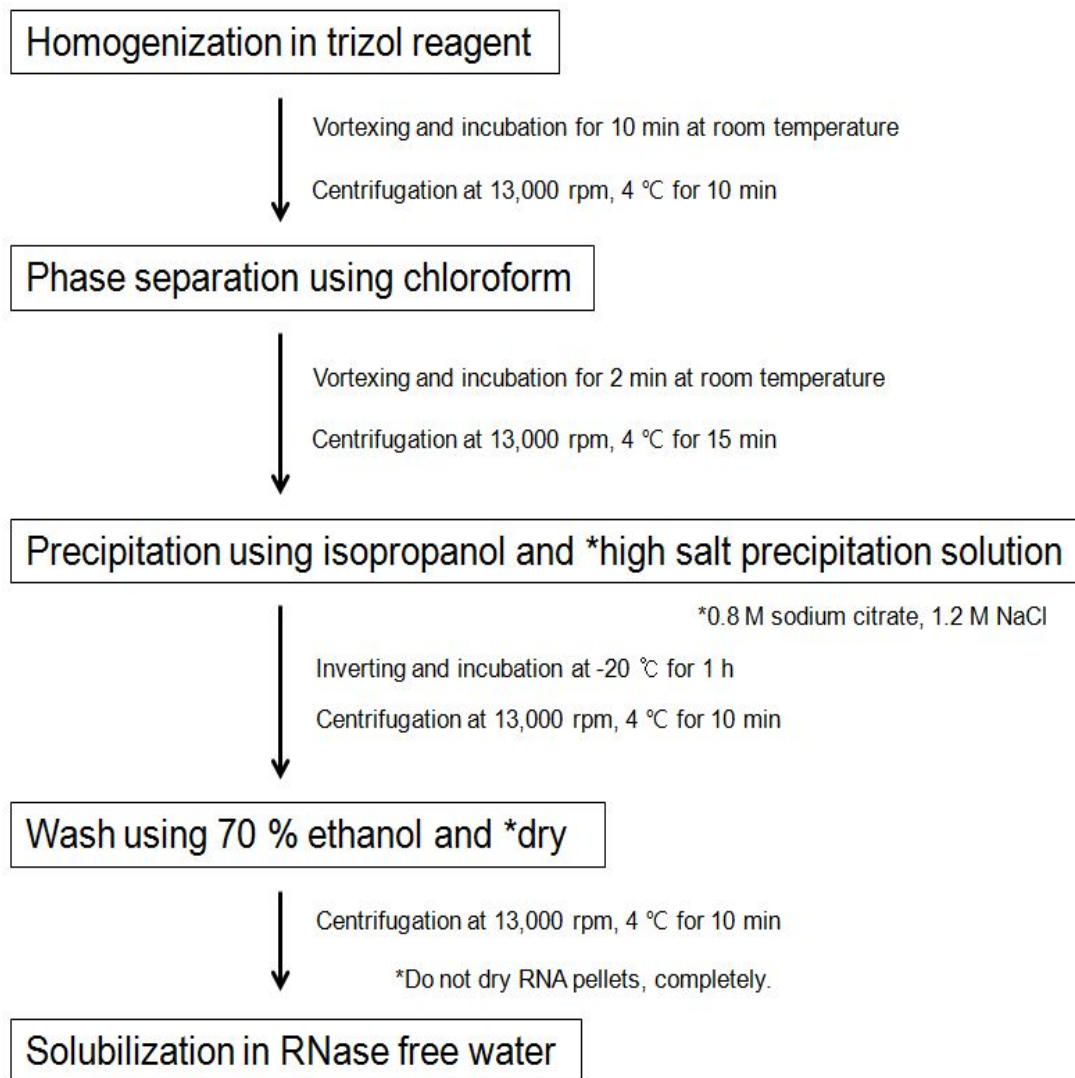


Figure 1. Total RNA extraction. Total RNA for cloning of chitinase genes was isolated roots of zoysiagrass using the trizol reagent and was dissolved in RNase free water treated DEPC (Diethylpyrocarbonate).

3. 염색체 DNA의 추출

들잔디의 어린 잎으로부터 염색체 DNA의 추출은 CTAB 방법을 이용하여 수행하였다. -70 °C에 보관된 잎 sample을 막자사발을 이용하여 완전한 분말이 될 때까지 마쇄한 후, 65 °C에서 미리 데워진 CTAB buffer 600 ul가 담겨있는 1.5

ml tube에 넣고 혼합하였다. 이후의 과정은 Lodhi et al., 1994의 방법을 일부 변형시켜 수행하였다 (Fig. 2).

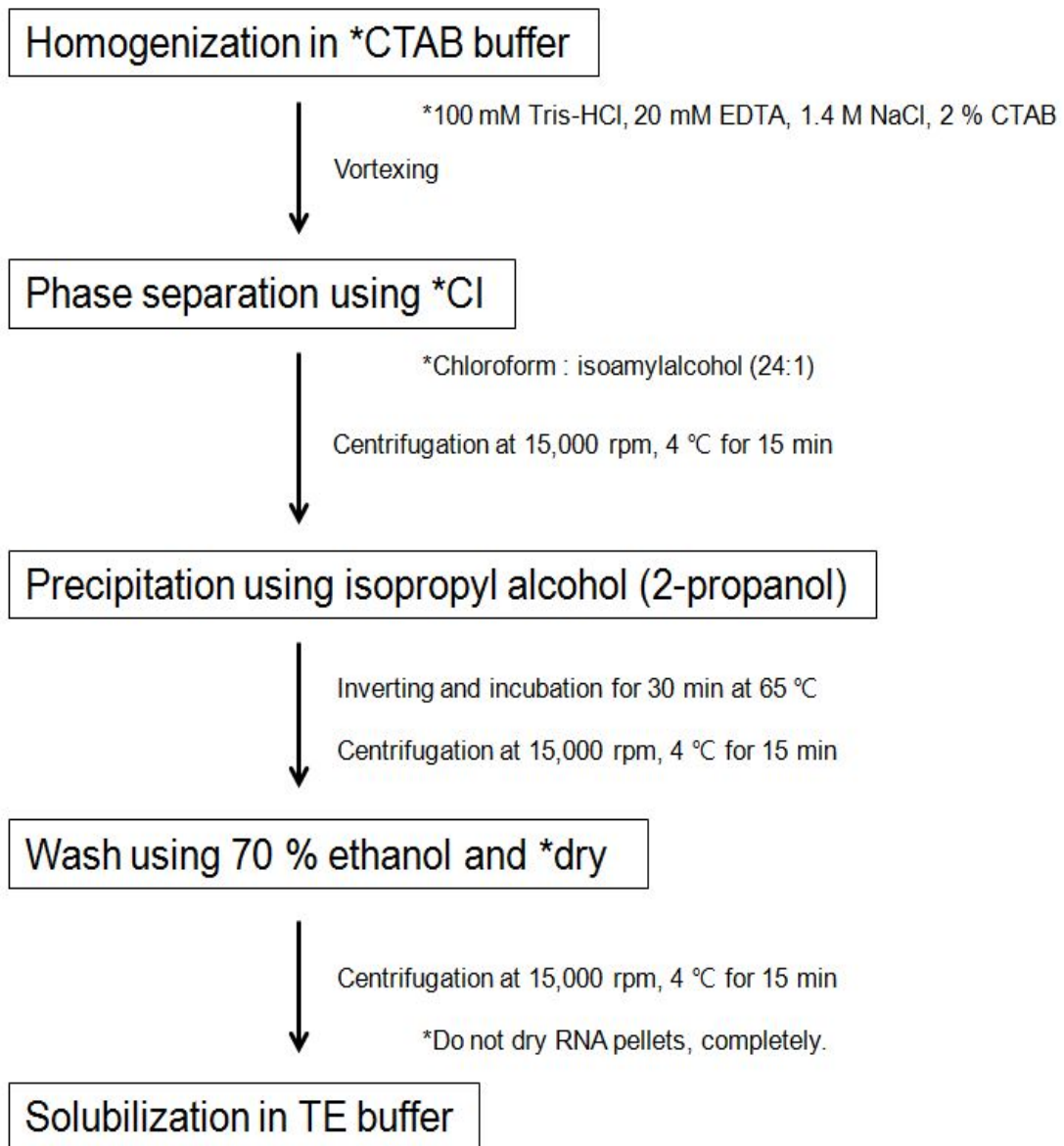


Figure 2. Genomic DNA extraction. DNA from young blade of zoysiagrass was extracted using CTAB method and was dissolved in TE buffer (Tris-HCl, EDTA, pH, 8.0).

추출된 DNA는 장기간 보관을 위하여 TE buffer (Tris-HCl, EDTA, pH, 8.0)에 녹였으며, RNase A를 첨가하여 남아있는 RNA를 제거하였다. 마지막으로 예

탄을 침전을 수행하여 정제 및 농축하여 실험에 이용하였다.

4. Chitinase 유전자의 cloning

들잔디의 뿌리로부터 추출된 total RNA는 chitinase 유전자의 cloning에 사용될 cDNA를 합성하는데 이용되었으며, 합성 과정은 figure. 3에 나타내었다.

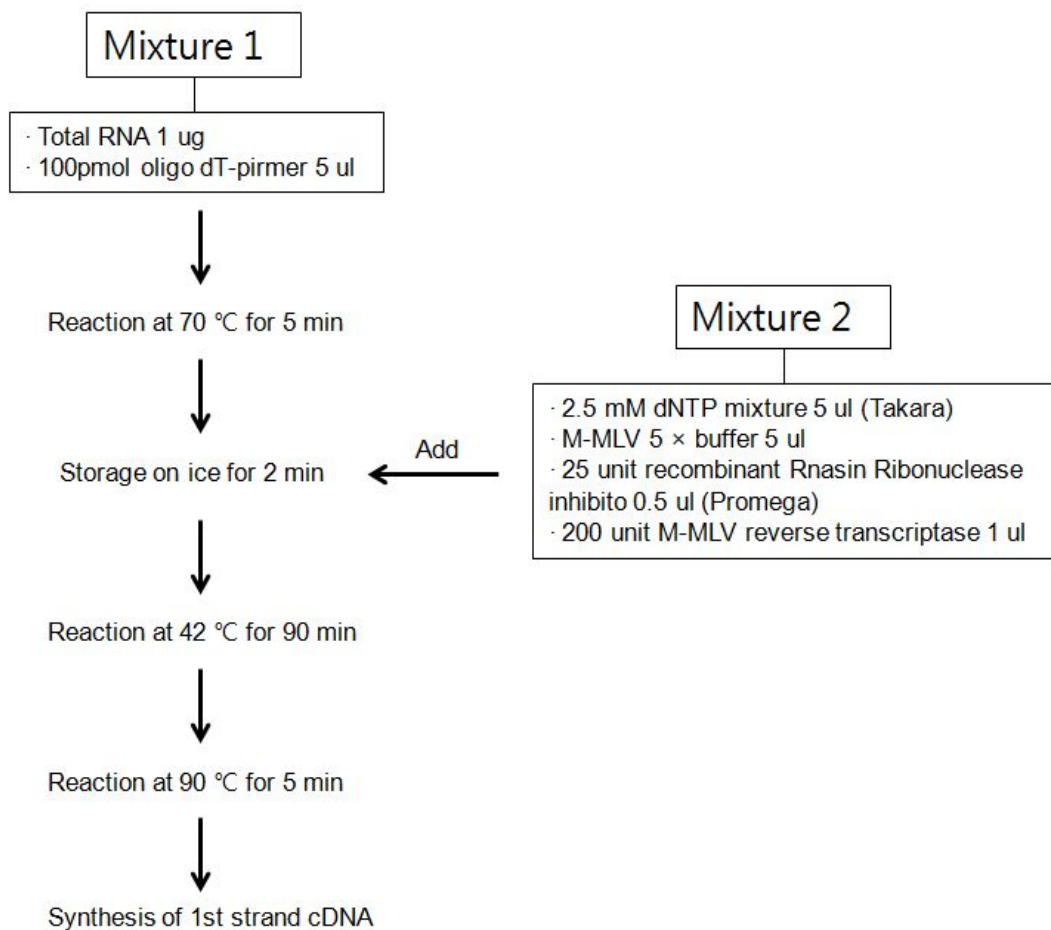


Figure 3. Synthesis of 1st strand cDNA. cDNA for cloning of fragments of chitinase genes was synthesized using total RNA extracted from roots of zoysiagrass.

합성된 cDNA로부터 chitinase 유전자의 단편 분리를 위하여 NCBI (National Center for Biotechnology information) GenBank를 통하여 수집한 *Zea mays* (accession numbers NP 001105314), *Oriza sativa* (CAA82849), *Triticum aestivum* (AAR11388), *Bromus inermis* (BAG12896) chitinase의 아미노산 sequence를 이용하였다. Bioedit program을 이용하여 수집한 sequence를 alignment하였고, 각각의 chitinase에 높게 보존되어 있는 domain을 기반으로 degenerate primer (Table 1, set1/2)를 제작하였다. 제작된 primer는 RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)에 이용되었으며 (Table 2, condition 1), 전기영동과 gel elution을 수행하여 증폭된 band를 정제하였다.

RT-PCR을 통하여 얻어진 band는 pGEM T-easy vector system (Promega)을 이용하여 sequencing을 진행하였으며, sequencing 결과는 3'/5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)에 사용할 primer를 제작하는데 이용되었다.

Chitinase로 예상되는 단편들로부터 3' 영역의 미지서열을 알아내기 위한 3' RACE에는 GeneFishing™ DEG kits (씨젠)을 사용하였다. Kit에 제공된 adaptor 서열이 달린 oligo dT primer (Table 1, set 3)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 첫 번째 RT-PCR에서 확인된 sequence를 바탕으로 제작한 forward primer와, cDNA 합성 시 사용한 primer의 adaptor서열과 상보적인 reverse primer (Table 1, set 4/5)를 이용하여 3' RACE PCR (Table 2, condition 2) 수행하였다.

3' RACE의 결과를 바탕으로, 5' 미지영역의 서열을 확인하기 위한 5' RACE를 진행하였다. 실험은 Takara사의 5'-Full RACE Core Set를 이용하였으며, 실험에 앞서 5' 말단을 phosphorylation 시킨 gene specific RT-primer (Table 1, set 6/7)와 5' 미지서열을 증폭시키기 위한 primer (Table 1, set 8/9*/10/11*)를 제작하였다. 이어서 제작된 gene specific RT-primer를 이용하여 circularization 형태의 cDNA를 합성한 다음 (Fig. 4), 5' RACE PCR (Table 2, condition 3)를 진행하였다. 확실한 단편을 증폭시키기 위하여 추가적으로 nested PCR (Table 2, condition 4)을 수행하였다.

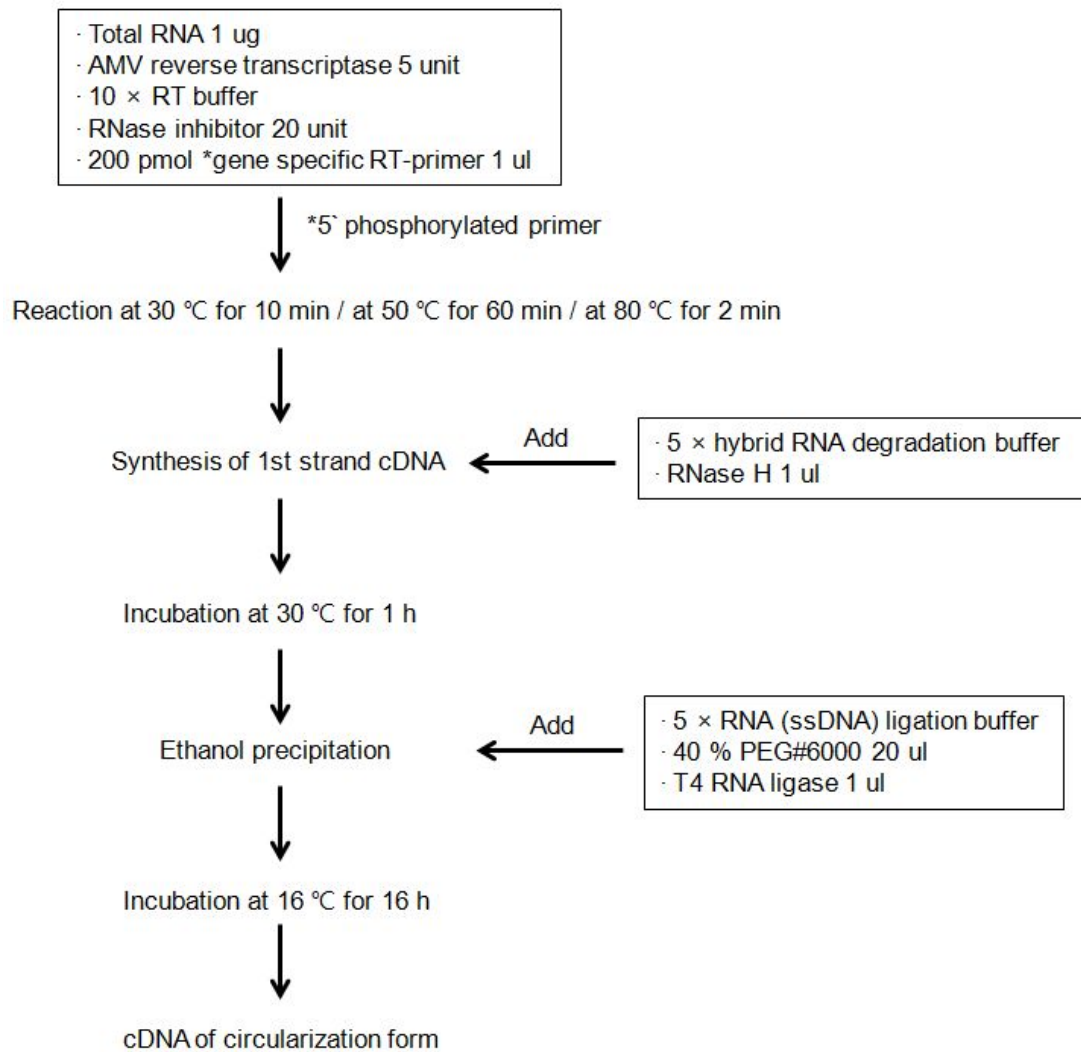


Figure 4. Process to obtain cDNA of circularization form on 5' RACE.

3'/5' RACE PCR에서 형성된 band들은 pGEM T-easy vector system을 이용하여 sequencing하였으며, 확인된 sequence를 바탕으로 chitinase의 full-length cDNA를 분리하기 위한 primer (Table 1, set 12/13)를 제작하였다. 마지막으로 RT-PCR (Table 2, condition 5)을 수행하여 chitinase로 예상되는 full-length cDNA sequence를 얻었다.

Table 1. Set of primers used for class I and class II chitinase genes cloning

Set	PCR types	Genes	Oligo sequences (5' -> 3')
1	1th RT-PCR	<i>Zjchi1</i>	Forward TGC CCC AAC TGC CTS TGC TGC AGC
			Reverse TCC AYG TTG MCG CCG TAG CTG AC
2		<i>Zjchi2</i>	Forward CCC TAC KCS TGG GGC TAC TGC TTC AA Reverse TCC AYG TTG MCG CCG TAG CTG AC
3	cDNA synthesis for 3'-RACE		CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA TXX XXX(T)18
4	3'-RACE	<i>Zjchi1</i>	Forward TGC GGC TCC ACC TCC GAC TA Reverse CTG TGA ATG CTG CGA CTA CGA TXXXXX(T)15
5			<i>Zjchi2</i>
6	cDNA synthesis for 5'-RACE	<i>Zjchi1</i>	@TGG CCA CGC AGT AGT
7		<i>Zjchi2</i>	@CTC TGG TTG TAG CAG
8	5'-RACE	<i>Zjchi1</i>	Forward ACT CGT ACG ACG CCT TCA TC Reverse ACT GCC AGT ACT TGG GCT TG
9*			<i>Zjchi1</i>
10		<i>Zjchi2</i>	Forward CAC CAA CAT CAT CAA CGG CG Reverse GTC CAC TGC CCC GTG ATC AC
11*			<i>Zjchi2</i>
12	Full-length	<i>Zjchi1</i>	Forward CAC CAA CAT CAT CAA CGG CG Reverse GTC CAC TGC CCC GTG ATC AC
13		<i>Zjchi2</i>	Forward ACA CAT TTG CAA GGC GAA GCG Reverse CAG CGC ACA TCT TAT TCG CCA
14	Vector construction	<i>Zjchi1</i>	Forward <u>GGA TCC</u> GAG CAG TAC GGG TCG CGG GCC Reverse <u>CTC GAG</u> TCA GGC GCC GAA TGG CCT CTG
15			<i>Zjchi2</i>

*: Set of primers used nested PCR, @: phosphorylation, underline: restrict enzyme site

Table 2. List of PCR conditions using class I and class II chitinase genes cloning

Conditions	Reaction mixture	Genes	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycle
1	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 μ l, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase (Takara), 50 pmol each primer set 0.4 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 5 min	94 °C 30 sec	55 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	30
		<i>Zjchi2</i>						
2	cDNA 50 ng, 10 × Ex Taq buffer 2 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 2 μ l, 0.5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 10 pmol each primer set 0.5 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 5 min	94 °C 30 sec	60 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	30
		<i>Zjchi2</i>	94 °C 3 min	94 °C 30 sec	65 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	
3	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 μ l, 5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 20 pmol each primer set 0.5 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 3 min	94 °C 30 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	30
		<i>Zjchi2</i>						
4	RT-PCR product 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 5 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 8 μ l, 5 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 20 pmol each primer set 0.5 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 3 min	94 °C 30 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	30
		<i>Zjchi2</i>						
5	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 3 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 3 μ l, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 10 pmol each primer set 0.4 μ l	<i>Zjchi1</i>	94°C 3min	94°C 30sec	65°C 30sec	72°C 30sec	72°C 10min	30
		<i>Zjchi2</i>						
6	cDNA 30 ng, 10 × Ex Taq buffer 3 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 3 μ l, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 10 pmol each primer set 0.4 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 3 min	94 °C 30 sec	65 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 5 min	25
		<i>Zjchi2</i>						
7	pGEM T-easy vector (including chitinases), 10 × Ex Taq buffer 3 μ l, dNTP mixture of each 2.5 mM 3 μ l, 1 unit Ex <i>taq</i> DNA polymerase, 10 pmol each primer set 0.4 μ l	<i>Zjchi1</i>	94 °C 3 min	94 °C 30 sec	58 °C 30 sec	72 °C 30 sec	72 °C 10 min	25
		<i>Zjchi2</i>						

5. Full-length chitinase의 phylogenetic tree 분석

Phylogenetic tree 분석에는 MEGA 4 program을 이용하였다. 이미 보고된 다른 chitinase의 아미노산 sequence를 NCBI GenBank database를 통하여 수집하였고, 들잔디로부터 분리한 두 개의 chitinase 아미노산 sequence를 포함시킨 후 bioedit를 이용하여 alignment하였다. 정렬된 chitinase sequence를 바탕으로 MEGA 4 프로그램의 neighbor joining 방법을 사용하여 phylogenetic tree 분석을 수행하였다.

분석에 이용된 chitinase는 모두 PR-3 group에 속하는 것들로써, *N. tabacum* (CAA01530), *S. tuberosum* (CAA33517), *S. lycopersicum* (CAA78845), *V. vinifera* (CAA90970), *G. hirsutum* (CAA92277), *P. vulgaris* (AAA33756), *Z. mays* (AAA62421), *H. vulgare* (AAA56787), *O. sativa* (BAA03750), *A. thaliana* (AAA32769), *N. tabacum* (AAA34106), *S. lycopersicum* (CAA78844), *P. hybrida* (CAA35791), *C. sinensis* (CAA93847), *A. hypogaea* (CAA57773), *B. vulgaris* (AAA32916), *D. carota* (AAB08468), *Z. mays* (AAA33444), *B. napus* (CAA43708), *P. vulgaris* (CAA40474)로부터 유래된 chitinase를 사용하였다 [John et al., 1997].

6. Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석

들잔디의 blade, sheath, stolon, roots는 chitinase의 기관별 발현분석을 위한 재료로 사용되었다. 각 기관으로부터 total RNA를 추출하였고 이어서 cDNA를 합성하였다. 발현분석에 사용한 primer는 full-length chitinase 유전자를 cloning 할 때 사용한 specific primer (Table 1, set 12/13)를 이용하였으며, 각 기관으로부터 합성된 cDNA를 template로 사용하여 RT-PCR (Table 2, condition 6)을 수행하였다. 전기영동을 통하여 각각의 기관들로부터 chitinase 유전자의 발현량을 확인하였으며, loading control로써 18S ribosomal RNA를 이용하였다.

7. GST-chitinase fusion vector의 제작

Chitinase의 기능분석을 위하여 GST가 포함된 pGEX 4T-1 (GE Healthcare) vector와 (Fig. 5), signal peptide가 제거된 mature form의 chitinase clone을 이용하였다.

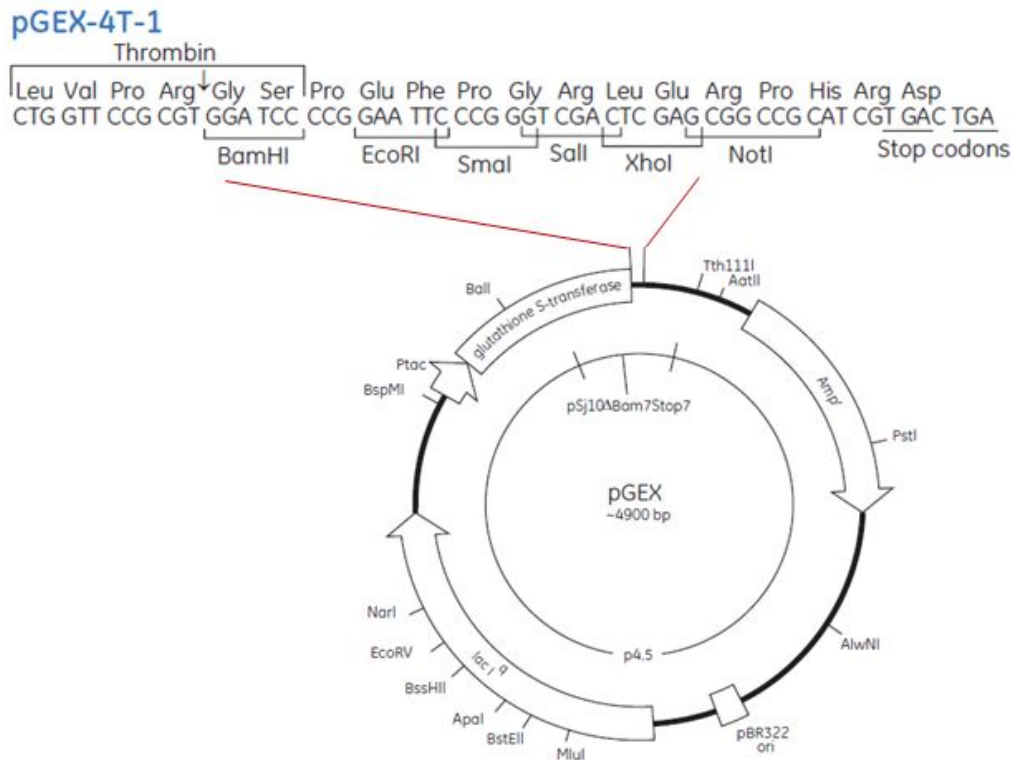


Figure 5. Constructions of GST-chitinase fusion vector. The chitinase genes removed signal peptide sequence were inserted between BamH I and Xho I of pGEX 4T-1 vector for overexpression of chitinase. Thrombin site in the vector then used as protease specific site for cleavage of GST and chitinase. Amp^r: ampicillin resistance gene, pBR322 ori: pBR 322 origin, lac I^q: lac I gene, Ptac : tac promoter. The vector map was derived from GE healthcare.

GST-chitinase fusion vector는 다음과 같은 과정을 통하여 제작되었다. 먼저 mature form의 chitinase clone을 얻기 위하여 5'/'3'말단에 *BamH* I site와 *Xho* I site를 각각 link 시킨 primer (Table 1, set 14/15)를 제작하였다. 이어서

full-length chitinase 유전자가 삽입된 pGEM T-easy vector로부터 PCR (Table 2, condition 7)을 이용하여 chitinase clone을 증폭시켰고, ligation을 위하여 증폭된 chitinase clone과 vector에 *Bam*H I과 *Xho* I (Takara)을 각각 처리하였다. pGEX 4T-1 vector와 증폭된 chitinase clone은 4 °C, overnight 배양을 통하여 ligation 되었으며, ligation product를 얻기 위하여 cloning 균주인 *E. coli* (Top10)안으로 도입하였다. 마지막으로 plasmid extraction을 통하여 GST-chitinase fusion vector를 확보하였고, sequencing을 통하여 frame shift와 PCR error가 없음을 확인하였다.

8. *E. coli*를 이용한 재조합 (r) chitinase의 과발현 및 정제

GST-chitinase fusion protein의 과발현을 위한 균주로서 *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen)를 이용하였다. *E. coli* transformation을 통하여 GST-chitinase fusion vector를 competent cell안으로 도입하였으며, fusion vector를 함유하는 균을 선별하기 위하여 ampicillin을 사용하였다.

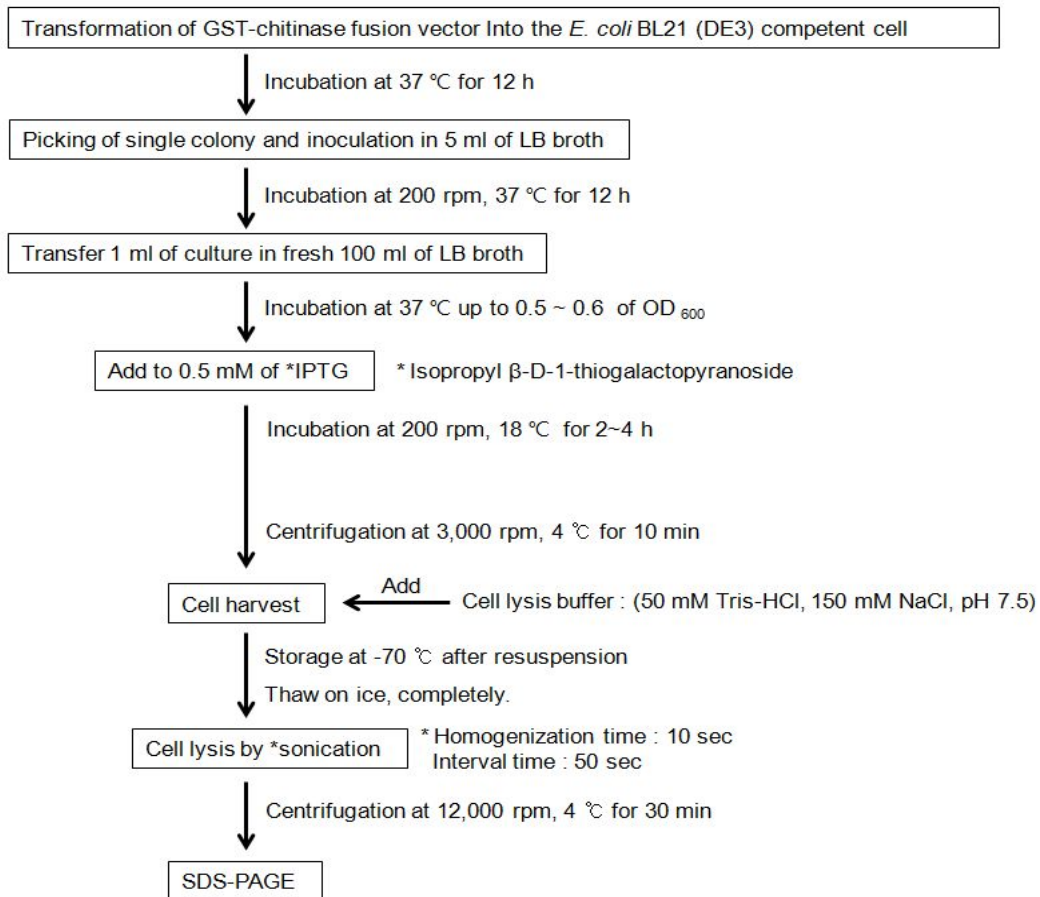
GST-chitinase fusion vector의 과발현은 Iment et al., 2007의 연구에서 보고된 방법을 일부 변형시켜 수행하였으며, SDS-PAGE를 통하여 GST-chitinase fusion protein이 soluble form으로 유도된다는 것을 확인하였다 (Fig. 6A).

Soluble form으로 형성된 GST-chitinase fusion protein의 정제는 Glutathione Sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare)을 이용하였으며, GST-affinity column chromatography 방법을 통하여 수행되었다 (Fig. 6B).

마지막으로 GST와 chitinase 사이에 존재하는 thrombin specific site를 이용하여 chitinase를 GST로부터 분리하였으며, SDS-PAGE를 통하여 정제된 r-chitinase의 존재를 확인하였다.

모든 과정은 4 °C에서 수행되었고, 실험에 앞서 filtration을 수행하여 오염을 방지하였다. 그리고 정제된 r-chitinase 농도는 spectrophotometer (MECASYS)를 이용하여 direct UV 280 파장대로 측정하였다.

(A)



(B)

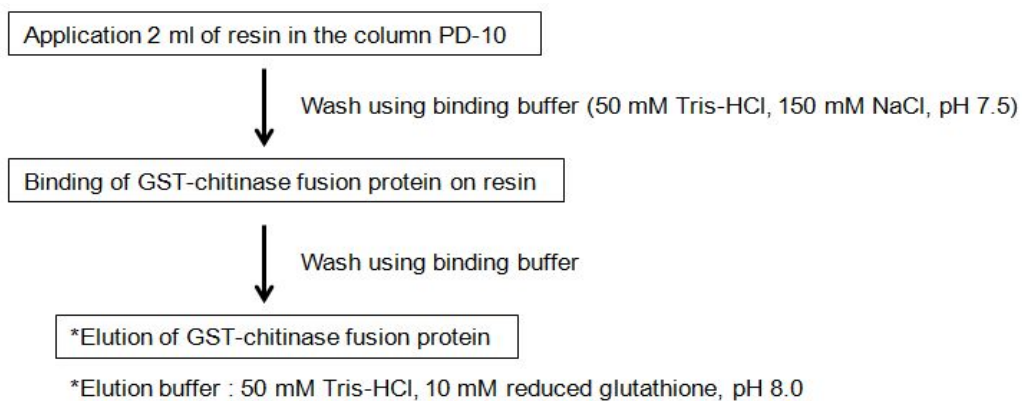


Figure 6. Chitinase overexpression in *E. coli* and purification. (A) GST-chitinase fusion protein was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) and IPTG was used as inducer of tac promoter. (B) Purification of GST-chitinase fusion protein was achieved using GST-affinity column chromatography.

9. 4MU-(GlcNAc) 기질에 대한 r-chitinase의 chitinolytic 활성 분석

r-chitinase의 chitinolytic 활성 분석을 위하여 Fluorimetric chitinase assay kit (SIGMA)를 이용하였다.

Kit에 제공된 4-Methylumbelliferyl N,N'-diacetylchitobioside hydrate, 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide, 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose는 r-chitinase의 chitin 가수분해 활성 측정을 위한 각각의 기질로써 이용되었다.

Kit안에 제공된 protocol에 따라 실험을 수행하였으며, 방출되는 형광은 365 파장대의 UV를 통하여 가시적으로 확인하였다.

10. 디스크 방산법을 이용한 r-chitinase의 균사신장 억제 분석

들잔디 및 중요한 작물에 피해를 입히는 다양한 병원성 fungi에 대하여 r-chitinase의 항균 활성 분석은 Fung et al., 2002에 따라 디스크 방산법을 이용하여 수행되었다. 분석에 사용한 fungi는 앞에 명시된 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IA)외 9개의 균주를 이용하였다.

r-chitinase의 항균 활성 분석을 위하여 배양된 각 fungi의 mycelial plug를 가로 1 cm, 세로 1 cm 크기로 자른 후 PDA (Potato Dextrose Agar) plate의 정중앙에 위치시켰다. 이어서 plug로부터 약 2 cm 떨어진 곳에 r-chitinase를 함유한 디스크와 control buffer (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Sodium Phosphate dibasic, 2 mM Potassium Phosphate monobasic, pH 7.4)를 함유한 디스크를 각각 위치시켰다.

실험에 이용한 plate는 25 °C, 암조건이 유지된 growth chamber에서 3~10일간 배양하였다.

11. 병원성 fungi의 균사 성장에서 r-chitinase의 농도별 영향 분석

병원성 fungi에 대하여 r-chitinase (Zjchi2)의 농도에 따른 균사의 성장 상태를 분석하는 실험은 Yang et al., 2005의 연구에서 이용한 방법을 일부 변형시켜 수행하였다.

먼저 멸균된 1/2 PDB (Potato Dextrose Broth) 배지 약 5 ml이 들어있는 시험관 5개를 준비한 다음, 1번 시험관에는 control buffer를, 2~5번 시험관에는 100, 200, 400, 800 ug/ml의 r-Zjchi2를 순서대로 추가하였다. 마지막으로 fungi 현탁액 100 ul를 각 시험관에 접종한 후, 25 °C에서 1~7일간 200 rpm으로 현탁배양하여 접종원으로부터 fungi의 균사가 성장하는 상태를 관찰하였다.

12. r-chitinase에 의하여 성장이 억제된 병원성 fungi의 현미경 분석

이전 실험에서 r-chitinase (Zjchi2)에 의해 성장이 억제된 *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Trichoderma reesei*와 억제효과가 전혀 나타나지 않은 *Neurospora crassa*는 본 실험에 이용되었다.

Control 배지로부터 균사와 800 ug/ml의 r-Zjchi2를 처리한 배지로부터의 균사는 광학현미경을 이용하여 ×40, ×100 배율로 관찰되었다.

III. 결과 및 고찰

1. Chitinase 유전자의 cloning

1.1. Chitinase 유전자의 단편분리를 위한 primer 제작 및 RT-PCR

Chitinase 유전자의 단편을 cloning하기 위하여 NCBI를 통하여 수집한 옥수수, 벼, 밀, 귀리 chitinase의 아미노산 sequence를 이용하였다. 검색된 단자엽 4종의 아미노산 sequence를 alignment한 결과 N-terminal 영역과 catalytic 영역에서 conserved domain을 확인할 수 있었고, 이 domain들을 기반으로 degenerate primer를 제작하였다 (Fig. 7A).

제작한 primer는 RT-PCR에 이용되었으며, 그 결과 예상된 크기인 약 450 bp 와 850 bp 위치에서 band가 형성되었다 (Fig. 7B, C). 증폭된 각 band는 pGEM T-Easy vector system을 이용하여 sequencing을 진행하였다.

RT-PCR로부터 증폭된 단편의 sequence에 대한 분석은 blast를 이용하였다. 그 결과, catalytic domain만을 기반으로 증폭된 첫 번째 단편은 *Festuca arundinacea* chitinase (*FaChit1*)와 87%의 높은 상동성을 나타냈다. *FaChit1*은 chitin binding domain과 catalytic domain을 포함하는 class I chitinase로 fungi elicitors, ethylene, 상처 등에 의하여 유도되는 PR protein인 것으로 확인되었다 [Wang et al., 2009]. 그리고 N-terminal 영역의 chitin binding domain을 포함하는 두 번째 단편 역시 chitin binding domain과 catalytic domain으로 구성된 *Zea mays* class I chitinase와 약 85%의 상동성을 보였다 [Tiffin, 2004]. 따라서 본 연구에서 분리된 단편을 모두 chitinase로 예상할 수 있었다.

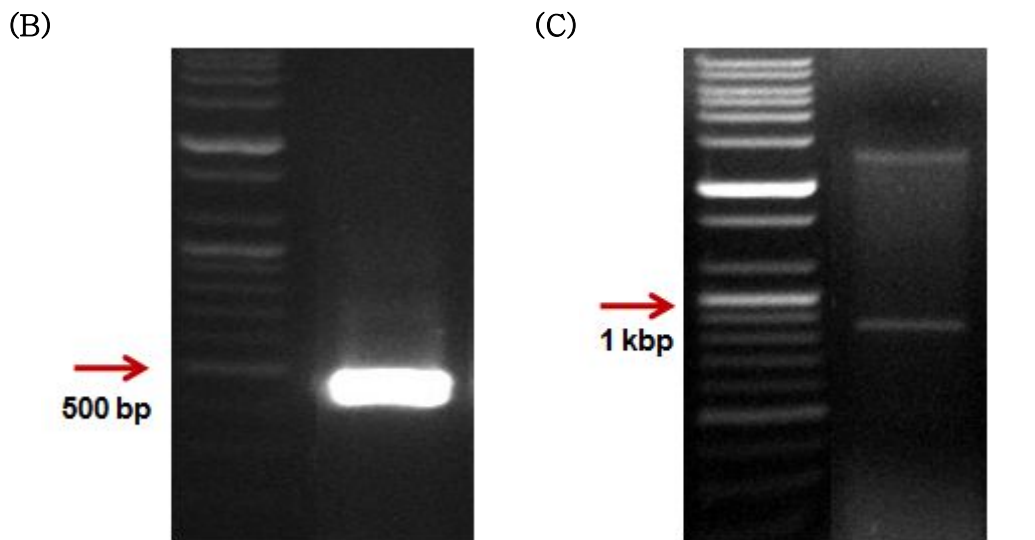
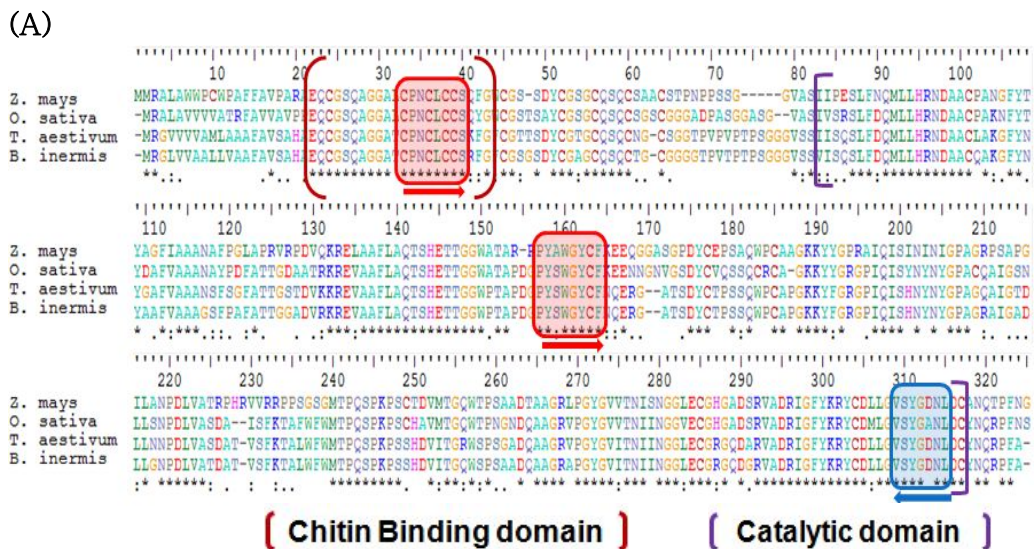


Figure 7. Design of degenerate primers for chitinase genes cloning and RT-PCR. (A) Alignment of the amino acid sequences derived from monocot chitinases in NCBI Genbank. The red boxes appeared forward primer sequence and the blue box is reverse primer sequence to amplify of chitinase fragments. (B) From RT-PCR using the primers designed in catalytic domain amplified band of approximately 450 bp and (C) in RT-PCR using the primers including chitin binding domain produced band of approximately 850 bp.

1.2. Full-length chitinase 유전자의 cloning

RT-PCR로 확인된 각 chitinase 단편들의 sequence를 기반으로 3'/5' RACE에 이용될 primer를 제작하였다. 제작한 primer를 이용하여 각각의 단편으로부터 3' RACE를 진행한 결과, catalytic domain으로부터 증폭된 첫 번째 단편은 약 750 bp에서 band가 확인되었고, chitin binding domain을 포함하는 두 번째 단편으로부터는 약 1.1 kbp에서 band가 형성되었다 (Fig. 8).

3' RACE PCR에서 증폭된 각각의 band는 pGEM T-easy vector system을 통하여 sequencing하였으며, blast를 이용하여 분석하였다. 분석 결과, 증폭된 첫 번째 단편은 *Festuca arundinacea* class I chitinase, *Poa pratensis* chitinase와 86 %의 상동성을 보였으며, 두 번째 단편은 *Zea mays* chitinase와 86 %의 상동성을 나타냈다.

5' RACE는 3' RACE를 통하여 확인된 sequence를 바탕으로 진행하였으며, 그 결과 약 700 bp와 300 bp의 band를 분리해 낼 수 있었다 (Fig. 9). 5' RACE PCR에서 증폭된 band 역시 pGEM T-easy vector system을 이용하여 sequencing을 수행하였고, blast를 통하여 분석하였다. 분석 결과, 증폭된 두 개의 단편 모두 chitinase로 예상할 수 있는 결과를 나타냈다.

3'/5' RACE까지 수행한 결과를 종합하여, 각 유전자들의 full-length sequence를 예상할 수 있었으며, 이 sequence를 기반으로 full-length chitinase 유전자를 cloning하기 위한 primer를 제작하였다. 들잔디의 뿌리로부터 추출한 cDNA와 잎으로부터 추출한 염색체 DNA는 full-length chitinase 유전자를 cloning하기 위하여 사용되었다.

RT-PCR 결과, catalytic domain으로부터 비롯된 첫 번째 full-length clone은 약 900 bp 위치에서 band가 형성되었으며 (Fig. 10A), chitin binding domain을 포함하는 두 번째 full-length clone은 약 1.2 kbp에서 band가 형성되었다 (Fig. 10B).

RT-PCR을 통하여 증폭된 두 개의 full-length clone에 대한 sequence 분석을 수행한 결과, 첫 번째 full-length clone은 *Oriza sativa* chitinase와 80%의 상동성을 나타냈으며, 아직까지 기능이 밝혀지지 않은 class II chitinase로 확인되었다 [Truong et al., 2003]. 그러나 이 chitinase는 fungal elicitors와 glycol chitin에

의하여 유도되는 *Oryza sativa* L. cv. Cheongcheongbyeo class II chitinase (*Rcht2*)와 95 %의 상동성을 나타내었다 [Kim et al., 1997]. 따라서 본 연구에서 분리된 첫 번째 chitinase 또한 *Rcht2*와 유사한 기능을 가지는 class II chitinase 일 것으로 예상하였다.

Chitin binding domain을 포함하여 cloning된 두 번째 full-length chitinase clone은 3'/5' RACE를 수행한 후에도 변함없이 *Zea mays* class I chitinase와 가장 높은 상동성을 보였다.

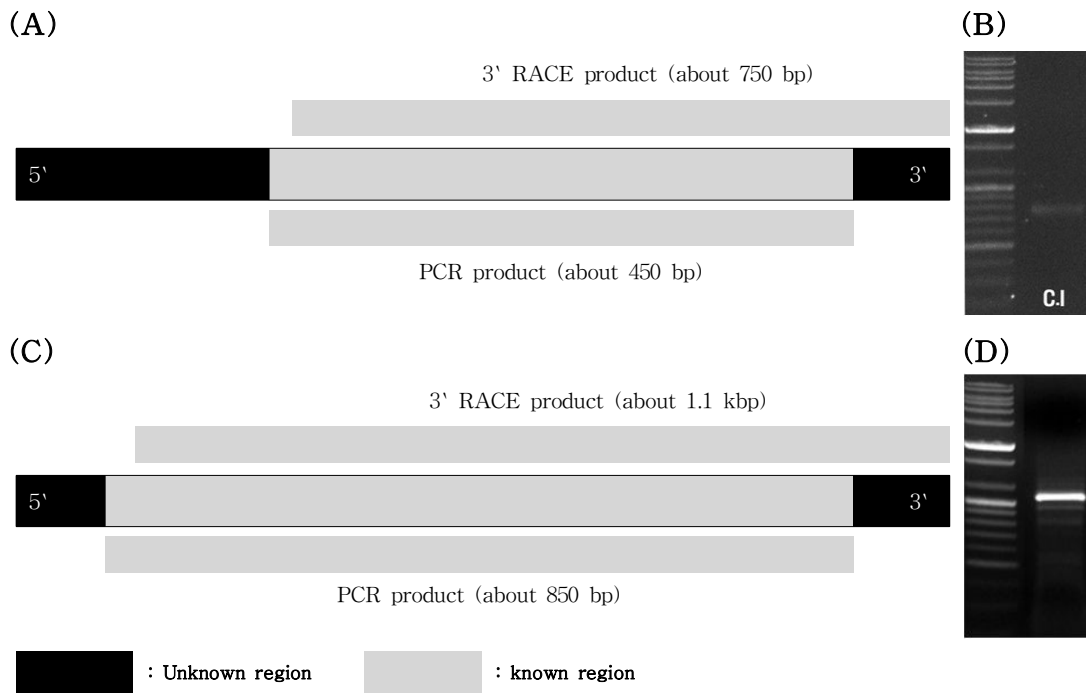


Figure 8. 3' RACE for getting sequences of 3' unknown region. Figure (A) and (C) indicated diagram of 3' RACE from the chitinases fragment, and as a results of 3' RACE PCR produced PCR products of (B) 750 bp and (D) 1.1 kbp, respectively.

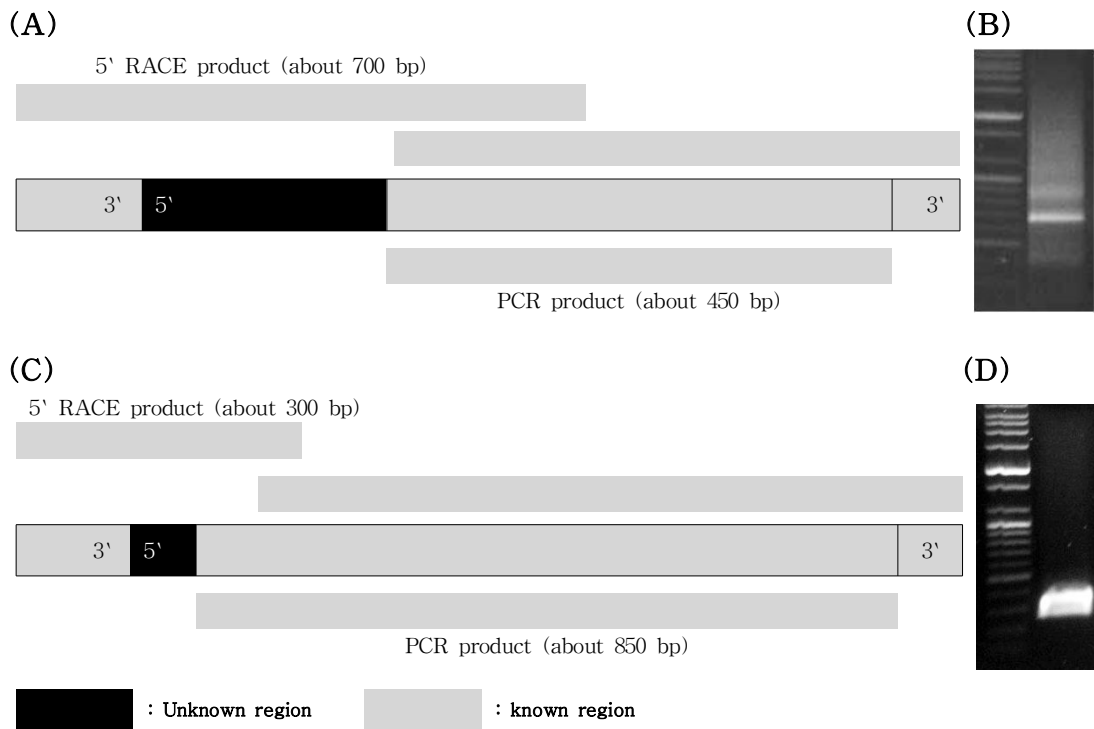


Figure 9. 5' RACE using cDNA of circularization form. Figure (A) and (B) showed diagram of 5' RACE. The final products from 5' RACE PCR were obtained after nested PCR and the band size of PCR products indicated about (B) 700 bp and (D) 300 bp, respectively.

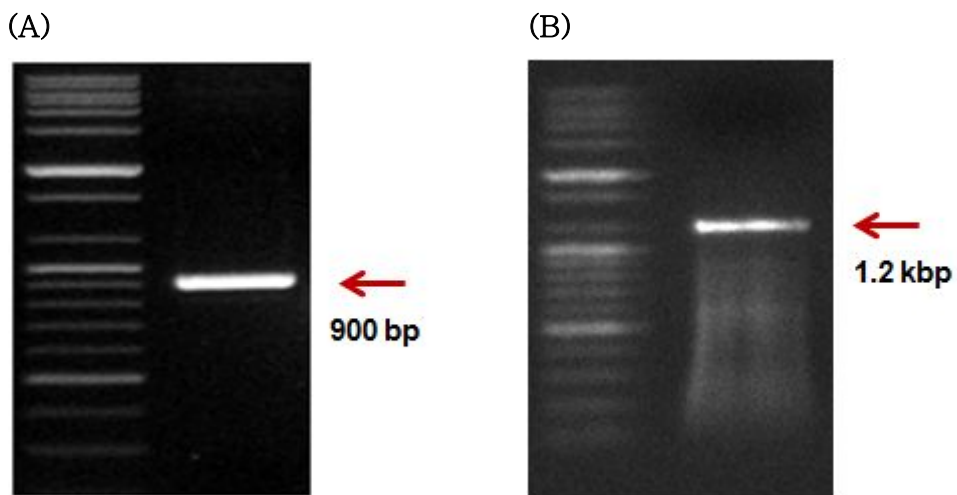


Figure 10. RT-PCR for full-length chitinase genes. For full-length sequence of two chitinase genes performed RT-PCR, and amplified about 900 bp and 1.2 kbp, respectively.

2. Chitinase의 구조적 특성 및 발현 분석

2.1. Chitinase의 구조적 특성 분석

Chitinase로 예상되는 두 개의 full-length sequence를 기존에 알려진 다른 chitinase들과 비교하여 유전자의 구조적 특성을 분석하였다. Catalytic domain만을 기반으로 분리된 첫 번째 full-length clone의 nucleotide 구조적 특성을 분석한 결과 총 1318 bp의 크기로, 220 bp 크기의 5'/3' UTR 영역과 2개의 intron, 3개의 exon으로 구성되어 있음을 알 수 있었다. Intron은 각각 86 bp와 233 bp 크기를 가지며, exon은 각각 293, 108, 373 bp로 확인되었다. 그리고 full-length sequence 내부에 translation start codon (ATG)와 translation stop codon (TAG)가 존재하며, 774 bp의 ORF (Open Reading Frame)로 구성되어 있음을 확인하였다 (Fig. 11A).

ORF를 기반으로 한 protein의 구조적 특성은 아미노산 sequence 분석을 통하여 수행하였다. 그 결과 총 257개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 217개의 아미노산으로 이루어진 catalytic domain과 추정되는 sugar binding site, 활성 catalytic 잔기들이 보존되어 있는 것이 확인되었다. 그리고 N-terminal 영역에 존재하는 leader sequence에 leucine, valine이 풍부한 signal peptide가 존재하는 것을 확인하였으며 (Fig. 11B), blast를 통하여 상동성이 가장 높은 다른 chitinase들과 sequence 특성을 비교한 결과, 분리된 첫 번째 full-length chitinase는 class I과 class II chitinase의 전형적인 특징을 보이지만, class I chitinase의 가장 중요한 특징인 N-terminal 영역에 chitin binding domain이 결핍되어 있는 것을 발견하였다 (Fig. 11C). 따라서 분리된 첫 번째 clone은 class II chitinase로 예상되며 Zjchi2로 명명하였다.

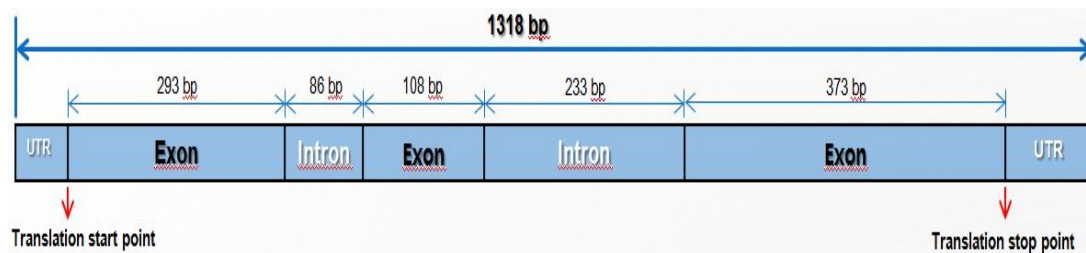
Chitin binding domain을 포함하는, 두 번째로 분리된 full-length clone에 대한 구조적 특성 분석 또한 진행하였다. 그 결과 총 길이가 1188 bp이며, translation start codon (ATG)로부터 translation stop codon (TAA)의 길이가 963 bp로써 intron이 없는 단일 exon으로 이루어진 ORF를 갖는 것으로 확인되었다 (Fig. 12A). 아미노산 sequence 분석을 통하여 총 320개의 아미노산으로 구성되어 있

고, 232개의 아미노산으로 이루어진 catalytic domain이 존재하며, 추정되는 sugar binding site, 활성 catalytic 잔기들이 catalytic domain 내부에 있는 것이 확인되었다. 그리고 N-terminal 영역에서 leucine, valine-rich signal peptide와 chitin binding site로 예상되는 domain의 존재를 확인하였다 (Fig. 12B). 이어서 상동성이 높은 다른 chitinase들과 sequence특성을 비교분석 한 결과, 분리된 두 번째 full-length clone은 전형적인 class I chitinase의 특성을 모두 포함하고 있지만 C-terminal extension 부분이 결핍되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 12C). 따라서 class Ib chitinase로 예상하였으며 Zjchi1로 명명하였다.

마지막으로 두 개의 chitinase (Zjchi1, Zjchi2)에 대하여 alignment 분석을 수행 하였으며, 그 결과 서로 50% 이상 높게 보존된 catalytic domain을 갖는 반면에 N-terminal 영역은 chitin binding domain과 경첩지역의 존재 등으로 매우 다르다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 13).

들잔디로부터 분리된 두 개의 chitinase에 대한 구조적 특성 분석 결과 각각 class Ib chitinase와 class II chitinase로 확인되었다. 예상과 다르게 첫 번째로 분리된 full-length chitinase는 N-terminal 영역의 chitin binding domain이 결핍된 class II chitinase로 확인되었다. 3' RACE까지 수행하였을 때 이 clone은 *Festuca arundinacea* class I chitinase와 높은 상동성을 보였다 [Wang et al., 2009]. 그러나 5' RACE를 수행하여 N-terminal 영역의 서열이 확인된 후에는 class II chitinase와 높은 상동성을 나타냈다 [Truong et al., 2003]. 반면에 처음부터 chitin binding domain을 포함하여 cloning된 두 번째 clone의 경우는 이전과 마찬가지로 class I chitinase로 확인되었다. 이 결과들은 N-terminal 영역에 존재하는 chitin binding domain의 존재가 class I chitinase와 class II chitinase를 구분하는 가장 중요한 기준이 된다는 것을 의미하며 [Neuhaus et al., 1993], class I chitinase와 class II chitinase의 catalytic domain이 서로 높은 상동성을 보인다는 사실을 확인하게 해준다 [Zamir K et al., 1993]. 이미 수행된 많은 연구에서 class Ia chitinase는 주로 액포에 위치하며, basic chitinase로써 endo형의 메커니즘을 갖는다고 보고되었다. 반면에 class Ib chitinase와 대부분의 class II chitinase는 apoplast 발견되며, exo형 메커니즘을 갖는 acidic chitinase로 알려졌다 [Kaprzevska, 2003]. 따라서 본 연구에서 분리된 Zjchi1와 Zjchi2는 모두 exo형의 메커니즘을 보일 것으로 예상된다.

(A)



(B)

MARVAGSFFPMVVCALLLAWAGGAAAGQGVGSIITRSVFDNMMKQRNNGACPAKGFYTYDAFITAARAFPSFGNTGLATRKRLEAA
FFGQTSHETTGGTRGKSDQFQWGYCFKE**EQSKTDPFFYGRGPIQL**Thr**YNYE**AAGKALGLDLVGNPNRVAADPVVAFKTAIFWMT
AQPPKPSPHAVITGQWTPSAADRAAGRSPAGYGVITNI**INGGVECGMGRD**S**GADRIGFYKRYCDMLGVGYGPNLDCYSQRKFG**

(C)

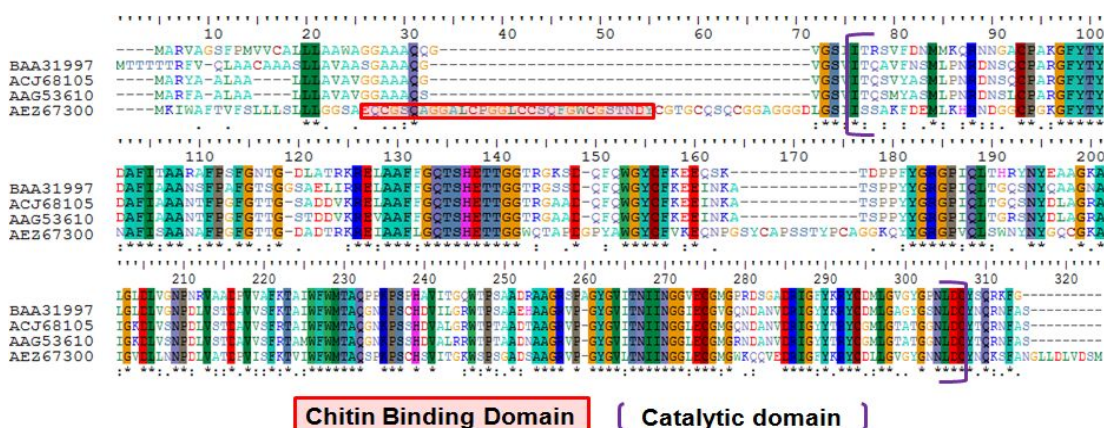


Figure 11. Nucleotide and amino acid sequence analysis of the full-length chitinase. (A) Diagram of chitinase gene. (B) Amino acid sequence base on ORF. The blue color sequence of N-terminal indicated leucine or valine-rich signal peptide and the violet sequence is catalytic domain including putative sugar binding site and active catalytic residues. (C) Alignment of amino acid sequence of the full-length clone with various chitinases indicating high sequence similarity showed to lack the chitin binding domain (red box) of N-terminal region. Thus, this was expected as class II chitinase.

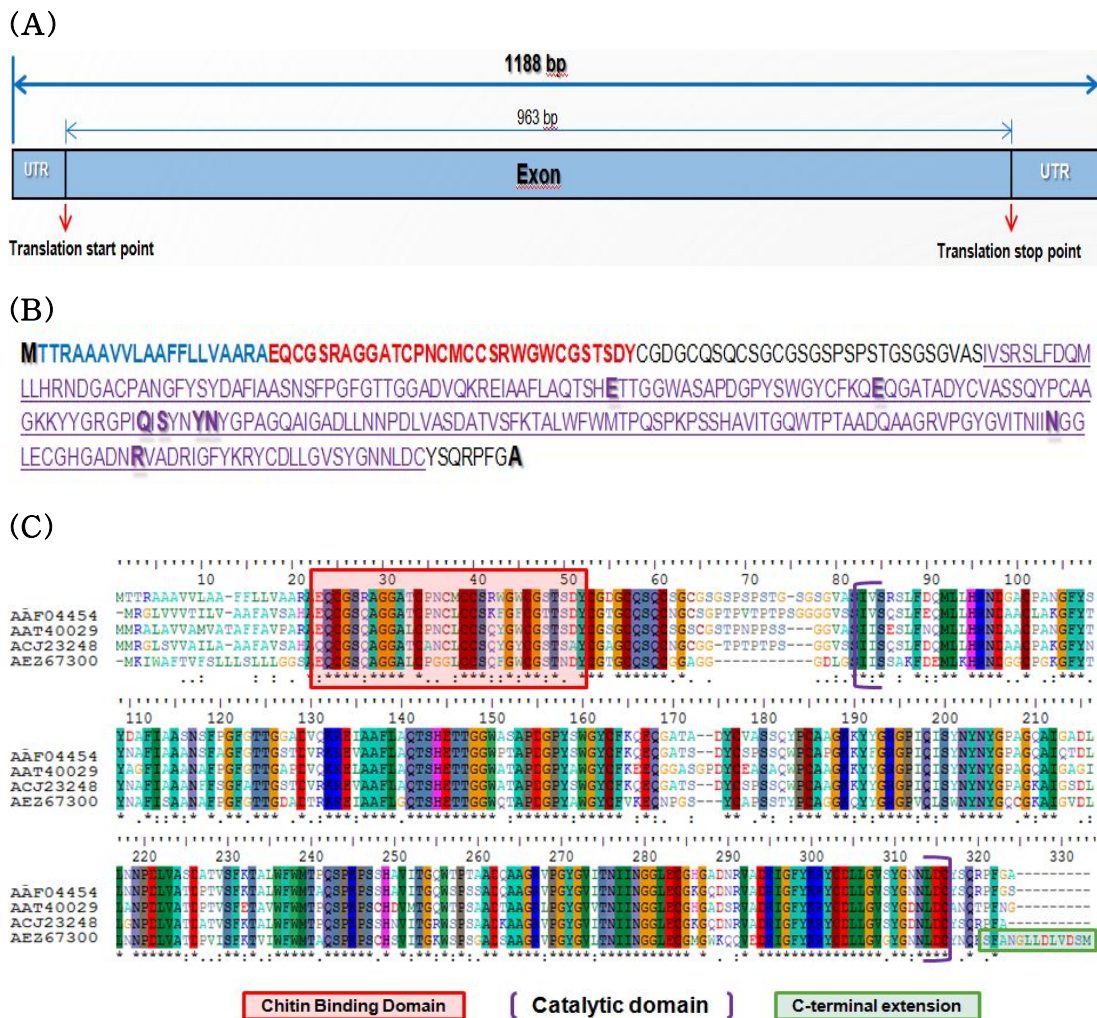


Figure 12. Structural property analysis of full-length chitinase including chitin binding domain. (A) Diagram and chitinases gene. (B) Analysis of amino acid sequence of full-length gene showed leucine or valine-rich signal peptide (blue color sequence) and chitin binding domain (red color sequence) on N-terminal region. Also, in catalytic domain (violet color sequence), contained putative sugar binding site and active catalytic residues. (C) From the results of homology analysis of amino acid sequence with other chitinases exhibiting high similarity sequence found existence of chitin binding domain on N-terminal region and lack of C-terminal extension (green color sequence).

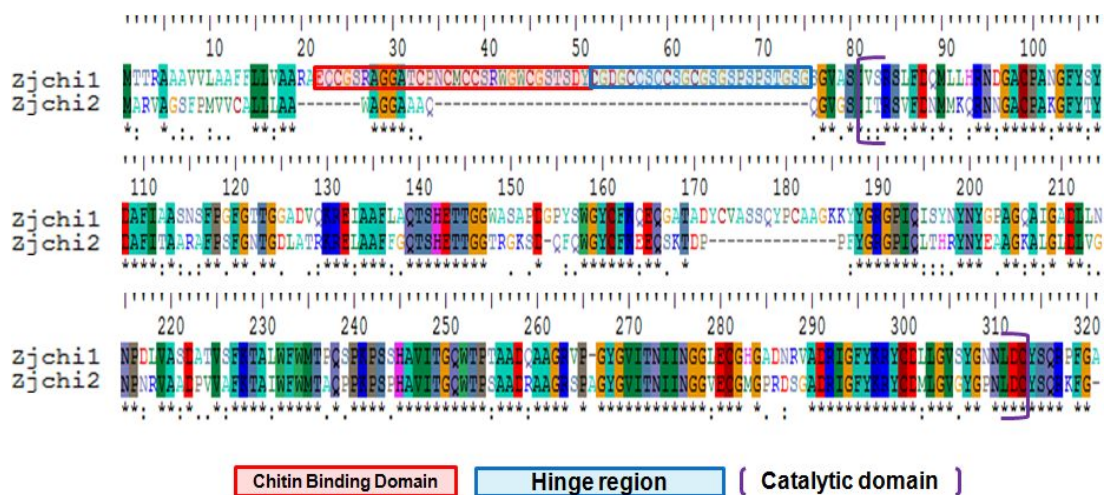


Figure 13. Comparison of amino acid sequence of two chitinases isolated from zoysiagrass. The chitinases (Zjchi1 and Zjchi2) isolated from zoysiagrass revealed existence of highly conserved catalytic domain with putative sugar binding site and active catalytic residues. But on N-terminal region showed to differ sequence similarity because existence of chitin binding domain (red color box) and hinge region (blue color box).

2.2. Chitinase의 phylogenetic tree 분석

Phylogenetic tree 분석은 PR-3 group에 속한 chitinase를 이용하여 수행하였다. 기존에 보고된 다른 chitinase의 sequence를 NCBI GenBank를 통하여 수집한 다음, MEGA4 프로그램을 이용하여 분석하였다.

그 결과 Zjchi1은 *N. tabacum* (CAA01530), *S. tuberosum* (CAA33517), *V. Vinifera* (CAA90970), *G. hirsutum* (CAA92277), *P. vulgaris* (AAA33756), *Z. mays* (AAA62421), *H. vulgare* (AAA56787), *O. sativa* (BAA03750), *A. thaliana* (AAA32769) chitinase와 함께 class I chitinase group에 속하는 것이 확인되었으며, Zjchi2는 *N. tabacum* (AAA34106), *S. lycopersicum* (CAA78844), *P. hybrida* (CAA35791), *C. sinensis* (CAA93847), *A. hypogaea* (CAA57773)와 함께 class II chitinase group에 속하는 것이 확인되었다.

분리된 두 개의 chitinase 모두 *B. vulgaris* (AAA32916), *D. carota* (AAB08468), *Z. mays* (AAA33444), *B. napus* (CAA43708), *P. vulgaris* (CAA40474)가 속한 class IV chitinase group과는 어느 정도 거리가 있는 유연관계를 나타냈다 (Fig. 14).

들잔디로부터 분리된 두 개의 chitinase (Zjchi1, Zjchi2)에 대하여 phylogenetic tree 분석을 수행한 결과, Zjchi1은 단자엽 식물인 *Z. mays*와 *H. vulgare* 그리고 *O. sativa*로부터 유래된 class I chitinase와 유전적으로 가까운 것으로 확인되었다. 특히 가장 가까운 유연관계를 나타낸 *Z. mays* class I chitinase (pCh2)는 acidic chitinase로써 *Aspergillus flavus*에 의해 유도되는 PR protein인 것으로 확인되었다 [Wu et al., 1994]. 그리고 Zjchi2와 가장 가까운 유연관계를 나타낸 *N. tabacum*의 경우 역시 acidic chitinase로 PR protein을 암호화하는 유전자인 것으로 확인되었다 [Payne et al., 1990].

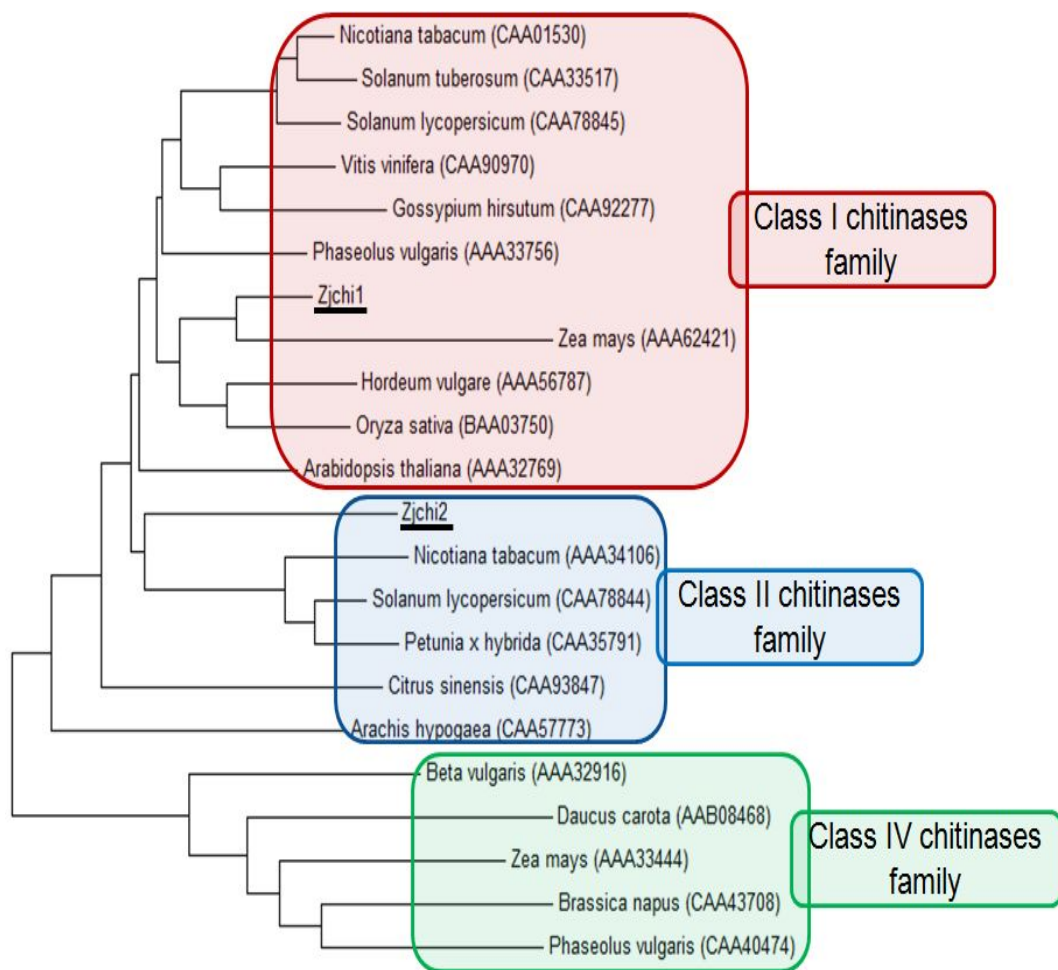


Figure 14. Phylogenetic tree analysis of Zjchi1 and Zjchi2. Phylogenetic relationships using chitinases of PR-3 group showed belong to class I and class II chitinase family, respectively that Zjchi1 and Zjchi2 were isolated from zoysiagrass. Class I, II and IV chitinase family using phylogenetic relationships were collected from NCBI GenBank.

2.3. Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석

Chitinase 유전자의 기관별 발현 분석에는 들잔디의 다양한 부위를 이용하였다. 분석에 사용한 기관은 blade, sheath, stolon, roots이며, 각각의 기관들로부터 total RNA를 추출한 후 본 실험에 이용하였다. 실험의 오차를 최대한 줄이기 위하여 total RNA는 추출 즉시 DNase 처리 및 에탄올 침전과정을 거쳤으며, 전기영동과 spectrophotometer를 이용하여 각 기관의 total RNA 농도를 일정하게 정량화하였다. 정량화된 각 기관의 total로부터 cDNA를 합성하였고 RT-PCR을 수행하였다.

첫 번째 RT-PCR은 cycle수 20에서 이루어졌다. 그 결과 분리된 두 개의 유전자 모두 blade와 sheath에서는 band가 전혀 형성되지 않았지만, stolon과 roots에서는 약한 band를 관찰할 수 있었다. 두 번째 RT-PCR은 25 cycle에서 수행되었다. 실험 결과 두 개의 유전자 모두 blade와 sheath에서 아주 약한 band만을 관찰할 수 있었으며, cycle의 수를 30까지 늘린 이후의 RT-PCR에서도 큰 변화를 보이지 않았다. 반면에 stolon과 roots는 25 cycle에서 눈에 띄게 발현양이 증가하였으며, 30 cycle에서는 매우 두껍고 밝은 band를 관찰할 수 있었다 (Fig. 15). House keeping gene인 18S ribosomal RNA는 loading control로써 사용되었다.

결과적으로 들잔디로부터 분리한 두 개의 chitinase 유전자는 잎 부근에서 보다는 뿌리 부근에서 높은 발현을 보이는 것으로 확인되었다. Chitinase 유전자가 식물의 여러 부위 중에서, 특히 뿌리에서 높은 발현을 보인다는 사실은 이미 몇몇 연구에서 보고되었다. 필드에서 성장된 muskmelon seed로부터 분리된 chitinase를 이용한 연구에서 본 실험과 유사하게 뿌리 부근에서의 높은 발현이 나타났다 [Witmer et al., 2003]. 이 결과들은 아마도 chitinase 유전자들의 PR protein을 암호화 하는 유전자이기 때문에 토양 미생물과 직접적인 접촉이 쉬운 뿌리 부근에서 더 높은 발현을 보이는 것으로 보고되었다 [Sakihito et al., 1999].

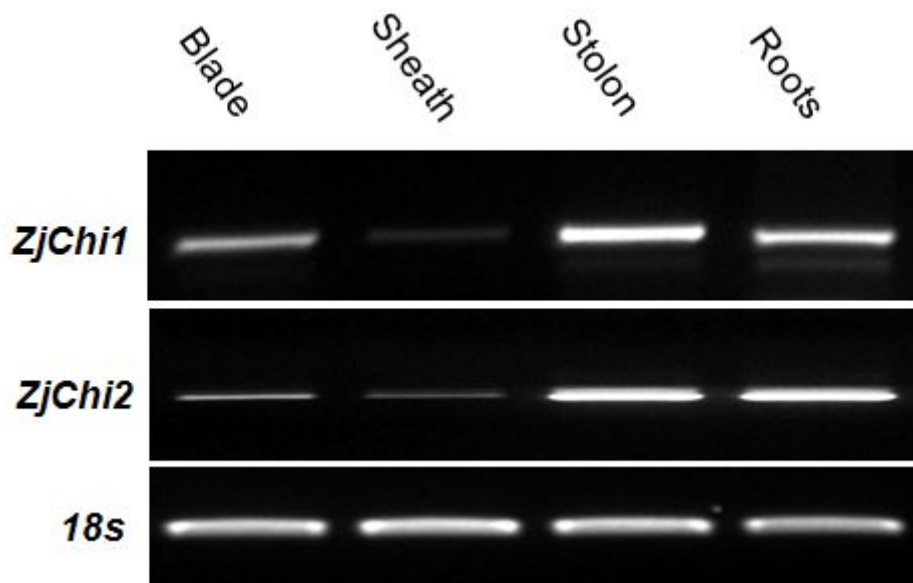


Figure 15. Expression analysis of *Zjchi1* and *Zjchi2* from different organs in zoysiagrass showed higher expression in stolon and roots than blade and sheath both *Zjchi1* and *Zjchi2*. *18S* rRNA was used as loading control.

3. *E. coli*를 이용한 chitinase의 과발현 및 정제

Chitinase의 기능분석을 위하여, signal peptide가 제거된 두 개의 mature form chitinase를 pGEX 4T-1 vector에 각각 cloning하여 GST-chitinase fusion vector를 제작하였다. *E. coli* BL21 (DE3)는 chitinase의 과발현을 위한 균주로 이용되었다.

들잔디로부터 분리된 두 개의 chitinase는 다양한 성장 조건을 검토하여 최적의 발현 조건을 알아낸 후 정제되었다. Chitinase의 정제를 위한 최적의 발현 조건은 재료 및 방법에 나타내었다.

*E. coli*를 이용하여 과발현된 GST-chitinase fusion protein은 SDS-PAGE를 통하여 분석되었다. 그 결과 GST-Zjchi2 fusion protein은 약 80%이상 soluble form 형태로 유도되는 것을 확인할 수 있었고, GST-ZJchi1 fusion protein에서도 소량이지만 soluble form으로 유도되는 protein이 관찰되었다.

Soluble form으로 형성된 fusion protein의 정제는 GST-affinity column chromatography를 이용하였으며, SDS-PAGE를 수행한 결과 예상된 위치에서 정제된 chitinase로 예상되는 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 16A, B).

목적 단백질의 변성을 막기 위하여 모든 과정은 4 °C에서 진행되었으며, 마지막으로 정제한 GST-chitinase fusion protein에서 GST의 영향을 최소화하기 위하여 GST와 chitinase의 사이에 존재하는 thrombin specific site에 thrombin을 처리하여 GST로부터 chitinase를 분리하였다.

많은 연구에서 진핵생물로부터 독성이 강한 protein들은 *E. coli* system을 이용하여 soluble form의 protein을 과발현 시키기가 어려운 것으로 보고되었으며, 특히 chitinase와 같이 chitin 가수분해 효소의 경우에는 더욱 어려운 것으로 알려져 있다 [Huang et al., 2005]. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 soluble form의 chitinase를 과발현 시키는데 성공하였다. 이 결과는 아마도 GST tag를 이용하였기 때문이라고 생각된다. 몇몇 연구에서 N-terminal의 GST tag의 존재가 chitinase를 비롯한 chitin binding protein들의 chitin binding을 방해하여 발현에 사용한 균주의 피해를 최소화시킴으로써, 목적 protein의 soluble form 유도에 도움을 주는 것으로 보고되었다 [Huang et al., 2005].

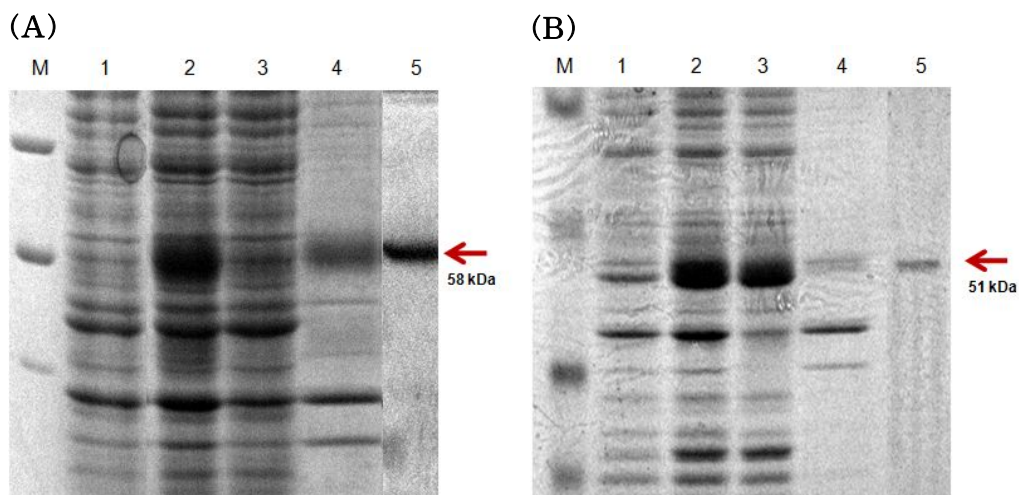


Figure 16. Overexpression of GST-chitinase fusion protein in *E. coli* and purification. Soluble form of GST-chitinase fusion protein (Zjchi1 and Zjchi2) overexpressed in *E. coli* were confirmed from SDS-PAGE and were purified using GST affinity column chromatography. (A) SDS-PAGE analysis of GST-Zjchi1 fusion protein that overexpressed in *E. coli* found weak expression of protein of soluble form. But, (B) in case of GST-Zjchi2 fusion protein showed strong expression of soluble form protein. Lane M, Protein molecular weight marker (Bio-Red); Lane 1, Total protein (- IPTG); Lane 2, Total protein (+ IPTG); Lane 3, Supernatant after centrifugation (+ IPTG); Lane 4, Pellets after centrifugation (+ IPTG); Lane 5, Purified chitinase.

4. Chitinolytic 및 항균 활성 분석

4.1. r-chitinase의 chitinolytic 활성 분석

r-chitinase의 chitinolytic 활성에 대한 분석은 Fluorimetric, chitinase assay kit (SIGMA)를 이용하였으며, UV를 통하여 형광의 강도를 측정하였다.

Kit안에 제공된 각각의 기질은 chitin의 구조를 이루는 glucosamine에 형광기질인 4-Methylumbelliferyl (4MU)를 연결시킨 기질로써, exo형 chitinase의 기질인 4-Methylumbelliferyl N,N'-diacetylchitobioside hydrate, 4-Methylumbelliferyl N-acetyl- β -D-glucosaminide와 그리고 endo형 chitinase의 기질인 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriose를 이용하여 chitin 가수분해 활성을 측정하였다.

실험 결과, r-Zjchi1과 Zjchi2 모두 control과 비교하였을 때, 각 기질에서 형광의 방출량이 더 많은 것이 관찰되었다 (Fig. 17). Control은 기질의 자발적 활성을 위해 추가되었으며, 형광의 강도는 365 파장의 UV를 통하여 가시적으로 확인하였다.

Zjchi1과 Zjchi2의 구조분석에서 두 개 모두 exo형 메커니즘을 갖는 acidic chitinase일 것이라고 예상하였다. 그러나 chitin 가수분해 활성분석을 위한 본 실험에서 r-Zjchi1과 Zjchi2는 제공된 두 개의 exochitinase 기질에서 뿐만 아니라, endochitinase 기질에 대해서도 분명한 활성을 나타내었다. 이 결과는 기질의 농도에 비해 과도하게 처리된 효소의 농도에 의해 기질 특이성을 잃어버렸을 가능성과, 기질의 구조 (Fig. 17C)가 exochitinase가 활성을 가질 수도 있는 구조로 되어 있기 때문이라고 생각된다. 그리고 본 실험결과와 유사한 연구가 baculovirus로부터 분리된 chitinase에서 보고되었다. *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus*로부터 비롯된 exochitinase (EppoNPV)는 4MU-(GlcNAc) 기질을 이용한 실험에서 endochitinase와 exochitinase 메커니즘을 모두 나타냈다 [Young et al. 2005].

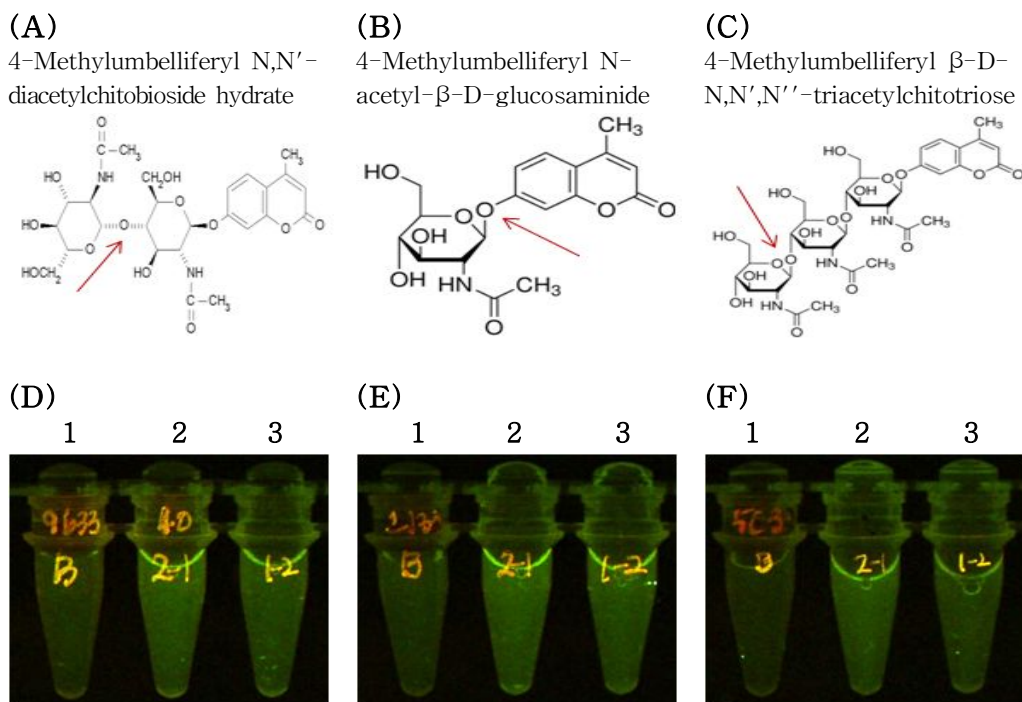


Figure 17. Chitinolytic activity of purified r-chitinases verified through UV. The 4-Methylumbelliferyl (4MU)-(GlcNAc) release 4MU by chitin hydrolysis activity of purified r-chitinases. (A) 4MU-N,N'-diacetylchitobioside hydrate and (B) 4MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide are substrate suitable for exochitinases activity detection. (C) 4MU-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose is a substrate suitable for endochitinases activity detection. The purified r-Zjchi1 and r-Zjchi2 indicated more strong fluorescence against (D) 4MU-N,N'-diacetylchitobioside hydrate, (E) 4MU-N-acetyl-β-D-glucosaminide and (F) 4MU-β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose compared with control.

1, Control (Substrate 50 ul + thrombin solution 50 ul); 2, Purified Zjchi2 (Substrate 50 ul + purified chitinase 50 ul); 3, Purified Zjchi1 (Substrate 50 ul + purified chitinase 50 ul). Concentration of each substrate is 0.5 mg/ml and concentration of purified r-Zjchi1, r-Zjchi2 is 1.5 and 0.2 mg/ml, respectively.

4.2. r-chitinase의 균사신장 억제 분석

들잔디 및 주요 작물에 막대한 영향을 미치는 다양한 병원성 fungi에 대한 r-chitinase의 *in vitro* 항균 활성 측정을 위하여, 농촌진흥청 농업유전자원정보센터로부터 분양받은 균주들을 이용하였다. 실험에 사용된 각 균주들의 목록은 재료 및 방법에 나타내었다.

각 균주에 대한 r-chitinase의 활성은 디스크 확산법을 이용하여 균사 신장의 억제 정도를 PDA 배지에서 관찰하였다.

Rhizoctonia solani AG-2-2 (IV)의 9개의 균주에 대하여 균사 신장의 억제 활성을 측정한 결과 r-Zjchi1은 모든 균주에 대하여 균사 신장을 억제시키지 못하였다. 비록 몇몇 균주에서 아주 약하게 활성을 나타내는 듯 보였지만 control과 비교하였을 때 유의성 있는 결과를 얻지 못하였다. 그러나 r-Zjchi2의 경우 *Rhizoctonia cerealis*에서 약하게 활성이 나타났으며, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Trichoderma reesei*에 대해서는 눈에 띄는 clear zone이 형성되었다 (Fig. 18C, D, E, J).

기존에 수행된 많은 연구에서 class I chitinase의 N-terminal 영역에 존재하는 chitin binding domain은 chitinase의 항균 활성 증진에 기여한다고 알려졌다 [Toki et al., 2002]. 그러나 본 연구에서 들잔디로부터 분리된 class I chitinase (Zjchi1)는 실험에 이용된 모든 fungi에 대하여 항균 활성을 보여주지 못하였다. 아마도 fusion protein으로부터 GST를 효율적으로 제거하지 못하였기 때문에 GST의 존재가 Zjchi1의 항균 활성에 영향을 미쳤을 것이라고 생각된다. GST를 비롯한 affinity tag의 존재가 목적 protein의 활성에 영향을 줄 수도 있다는 사실은 Terpe, 2003의 연구에서 보고되었다.

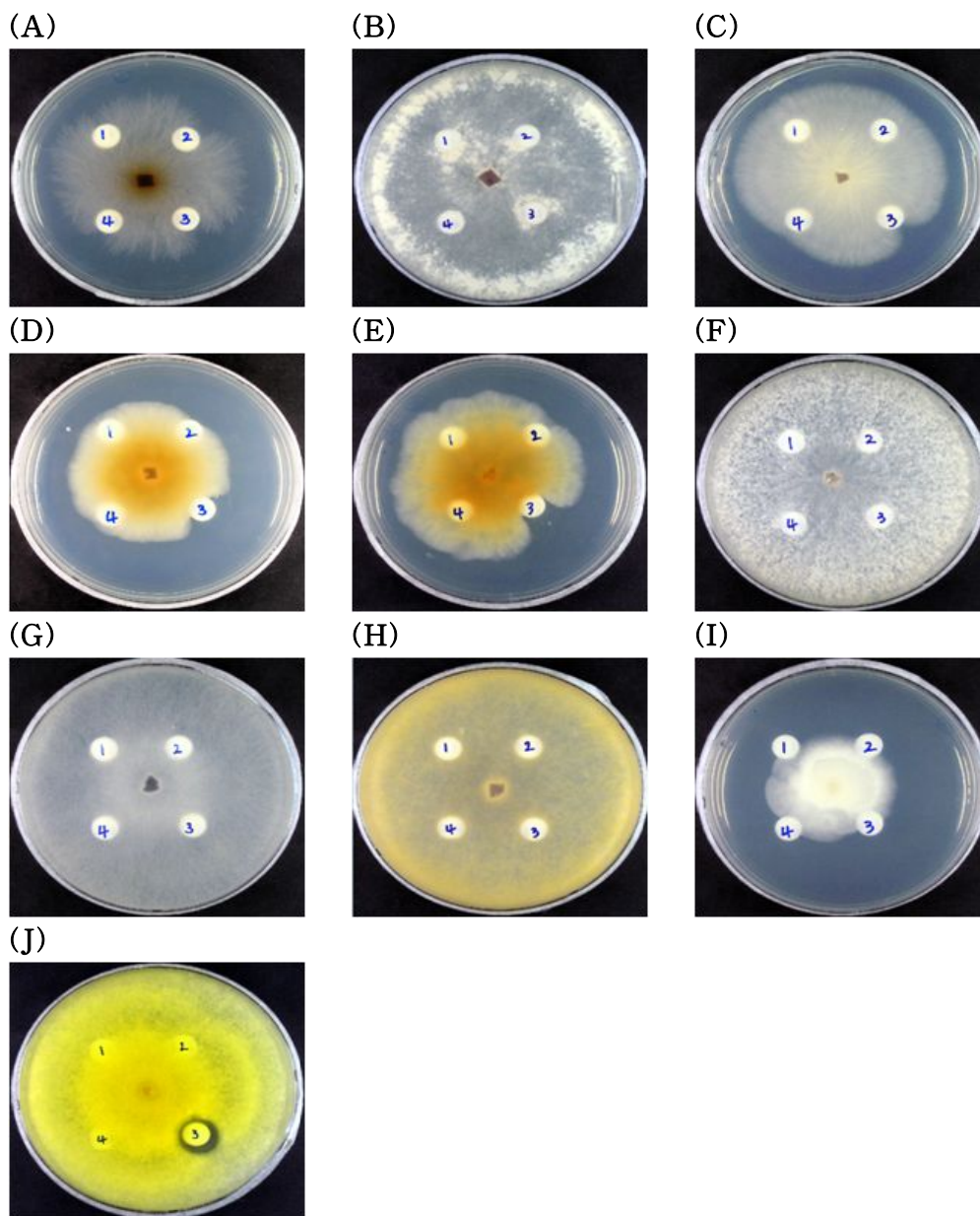


Figure 18. Disk diffusion susceptibility test of purified r-chitinases against various pathogenic fungi on PDA. (A) *R. solani* AG-2-2, (B) *R. solani* AG-1, (C) *R. cerealis*, (D) *F. culmorum*, (E) *F. graminearum*, (F) *S. minor*, (G) *S. sclerotium*, (H) *N. crassa*, (I) *P. capsici*, (J) *T. reesei*. In each of paper disk treated (1) PBS buffer, (2) 150 ug/ml of purified r-Zjchi1, (3) 150 ug/ml of purified r-Zjchi2 and (4) positive control chitinase.

4.3. r-Zjchi2 농도에 따른 균사성장 억제 분석

r-chitinase의 농도에 따른 병원성 fungi의 균사성장 억제 분석은 이전 실험에서 몇 종의 fungi에 대하여 항균 활성을 보인 r-Zjchi2를 이용하여 진행하였다.

1/2 PDB 배지에 r-Zjchi2를 각각 농도별로 추가한 후 각 fungi들의 현탁액을 100 ul씩 접종하여 실험을 수행하였다. 그 결과 이전 실험에서 활성을 보였던 4개의 균주 중에서 *Rhizoctonia cerealis* 경우는 매우 약한 활성을 나타내는데 그쳤지만 두 개의 *Fusarium* sp.와 *T. reesei*의 경우, control 배지에 비해 r-Zjchi2를 처리한 배지에서 접종한 균사들의 성장이 억제되는 것이 확인 되었다. 그리고 두 개의 *Fusarium* sp.는 약 400 ug/ml의 농도에서 균사의 성장이 멈춘 반면에, *T. reesei*의 경우 100 ug/ml 처리구에서도 균사가 거의 성장하지 못하는 결과를 보였다 (Fig. 19).

본 실험에서 사용된 10개의 균주 중에서 *R. cerealis*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *T. reesei*를 제외한 나머지 6개의 균주에서는 유의성 있는 실험결과를 얻지 못하였다. r-chitinase의 농도를 높였을 경우 약한 활성이라도 나타낼 것이라는 예상과 달리 800 ug를 처리한 시험관에서도 항균 활성은 나타나지 않았다. 이와 유사한 실험결과는 몇몇 연구에서 보고되었다. *Brassica juncea*로부터 분리된 class I chitinase (BjCHI1)는 *Ralstonia solanacearum*와 *E. coli*에 대하여 농도가 높아질수록 균사성장이 억제되는 결과를 나타냈지만, 처음부터 활성이 나타나지 않았던 *Bacillus megaterium*와 *Micrococcus luteus*는 처리된 chitinase의 농도와는 상관없이 잘 성장하는 결과를 보여주었다 [Yang et al., 2005].

균사의 성장이 억제된 2개의 *Fusarium* sp.와 *T. reesei*, 그리고 모든 농도에서 균사의 성장이 활발하게 일어난 *N. crassa*는 다음 실험에 이용되었다.

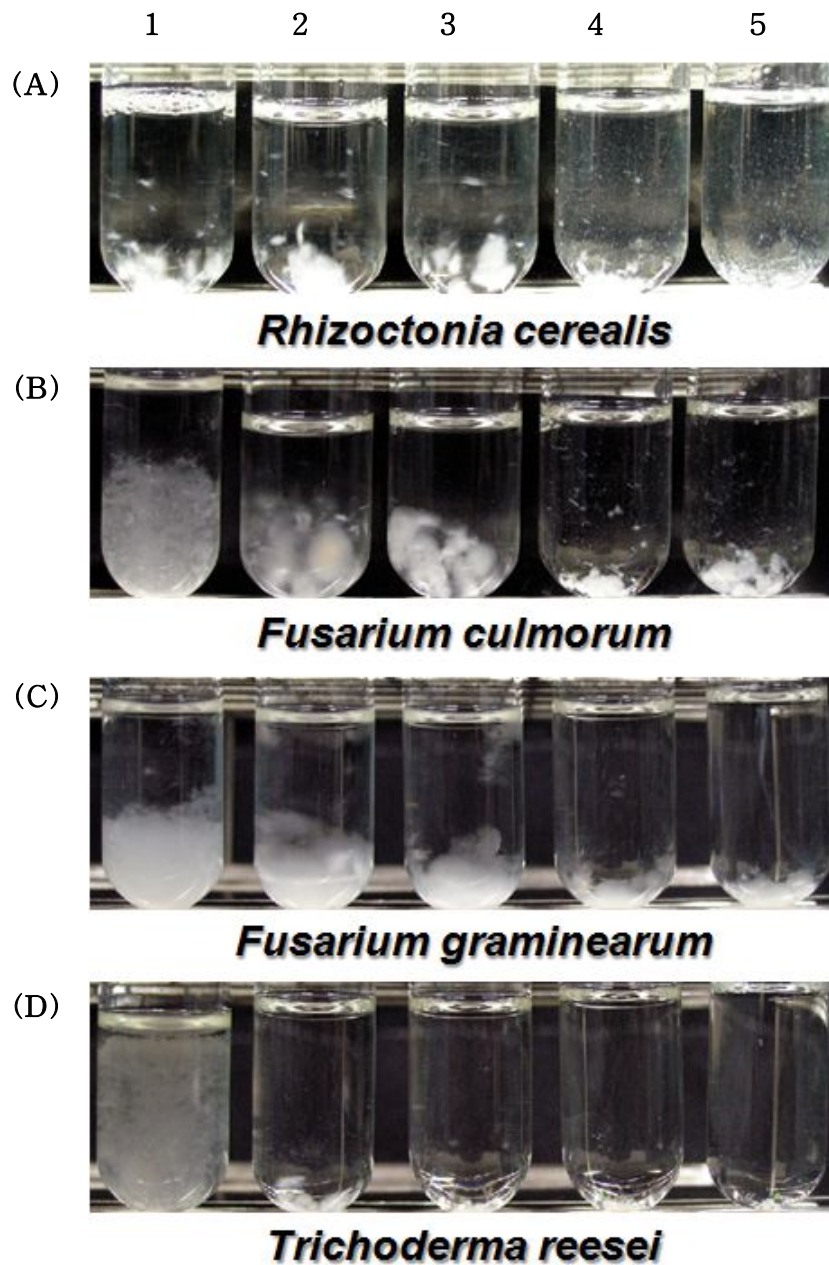


Figure 19. For inhibition analysis of mycelia growth of various pathogenic fungi according to concentration of purified r-Zjchi2 on half-strength PDB used (A) *F. culmorum*, (B) *F. graminearum*, and (C) *T. reesei*. Concentration of purified Zjchi2 is (1) 0 ug/ml, (2) 100 ug/ml, (3) 200 ug/ml, (4) 400 ug/ml and (5) 800 ug/ml.

4.4. r-Zjchi2에 의하여 성장이 억제된 병원성 fungi의 현미경 분석

r-Zjchi2에 의하여 성장이 억제된 각 fungi로부터 균사의 상태는 현미경 분석을 통해 좀 더 세밀히 관찰되었다. 이전 실험에서 control로 이용한 1번 배지와 r-Zjchi2 800 ug/ml을 처리한 배지로부터 균사들은 광학현미경을 통하여 $\times 40$, 그리고 $\times 100$ 배 배율에서 성장패턴이 관찰되었다. 그 결과 성장이 억제된 모든 균주로부터 비슷한 결과를 보였다. 즉, control 배지로부터의 균사들은 집종원으로부터 균사가 branch를 형성하면서 길고 가늘게 잘 뻗어나가는 모습을 보인 반면에, r-Zjchi2 800 ug/ml를 처리한 배지로부터의 균사는 branch형성을 잘 하지 못하였을 뿐만 아니라, 집종원 근처에서만 균사가 자랄 뿐 거의 뻗어나가지 못하는 것을 확인되었다 (Fig. 20A, B, C). 그리고 이전 실험에서 활성을 전혀 나타내지 않았던 *N. crassa*의 경우, control 배지로부터의 균사와 r-Zjchi2를 처리한 배지로부터의 균사가 별다른 차이점 없이 건강하게 잘 뻗어나가는 것이 관찰되었다 (Fig. 20D).

광학 현미경을 통해 r-Zjchi2에 의하여 성장이 억제된 fungi들의 상태를 관찰한 결과 거의 동일한 패턴으로 균사의 성장이 억제되는 모습을 확인할 수 있었으며, 본 실험결과와 유사한 억제패턴이 rye seed로부터 분리된 class II chitinase 이용한 연구에서 확인되었다 [Toki et al., 2002].

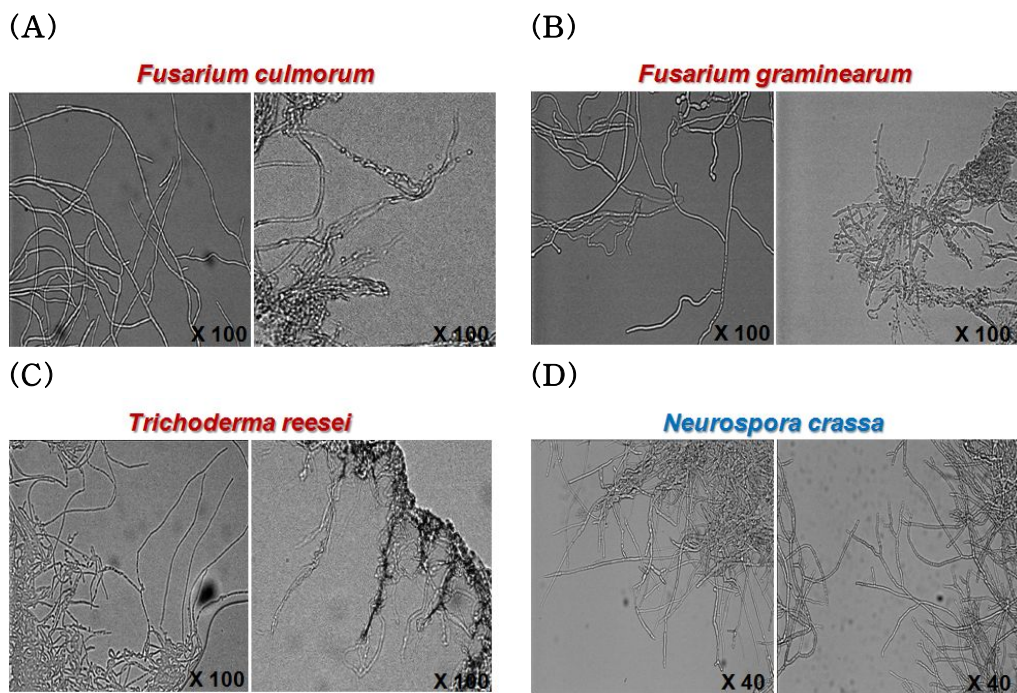


Figure 20. Microscopical analysis of pathogenic fungi affected by purified r-Zjchi2. (A) Condition analysis of hyphal growth from *F. culmorum*, (B) *F. graminearum*, (C) *T. reesei*, and (D) *N. crassa* carried out using an optical microscope. Hyphal from PDB media treated 800 ug/ml of purified r-Zjchi2 (right pictures) showed not normal growth of hyphal from inoculum. On the other hand, hyphal from control media (left pictures) and *N. crassa* that do not affected purified r-Zjchi2 showed normal growth.

IV. 종합고찰

들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)는 국내에서 다양한 용도로 많이 이용되는 품종이다. 그러나 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 의한 갈색 퍼짐병 (large patch disease)에 매우 취약하여 현재 이 병의 방제를 위한 물리적, 경제적 손실이 심각한 상태에 직면해 있다 [Woo et al., 2008]. 본 연구에서는 갈색퍼짐병에 저항성을 갖는 잔디를 개발하기 위하여 들잔디로부터 강력한 PR protein으로 알려진 두 개의 chitinase 분리하였다.

식물 chitinase는 fungi 세포벽의 구조를 이루는 chitin의 가수분해를 촉매하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 병원성 fungi에 대항하여 식물 방어기능을 담당하는 것으로 보고되었다 [Zamir et al., 1993]. 그리고 chitinase를 이용한 몇몇 연구에서 *Rhizoctonia solani*를 비롯한 다양한 병원성 fungi에 대항하는 항균 활성을 보여주었다. 그러나 들잔디로부터 분리되어 기능이 확인된 chitinase는 아직 보고되지 않았으며, 본 연구에서 분리된 두 개의 chitinase 유전자는 들잔디로부터 비롯된 첫 번째와 두 번째 chitinase 유전자로써 구조분석과 기능분석을 수행하였다.

분리된 두 개의 chitinase 유전자에 대한 아미노산 sequence 분석을 수행한 결과, 각각 class I chitinase (Zjchi1)와 class II chitinase (Zjchi2)로 확인되었다. 비록 chitinase 유전자를 cloning하기 위한 primer는 오직 기존에 알려진 class I chitinase의 conserved domain을 기반으로만 제작되었지만, 3'/5' RACE를 수행하여 각각의 full-length chitinase 유전자를 분리한 결과, class I chitinase뿐만 아니라 class II chitinase 또한 분리할 수 있었다. 즉, catalytic domain만을 기반으로 제작된 primer로부터 분리된 full-length chitinase는 예상과 다르게 class II chitinase로 확인되었으며, N-terminal 영역의 chitin binding domain을 포함하여 제작된 primer로부터는 class I chitinase가 분리되었다. 이 결과는 class I과 class II chitinase 사이에 높게 보존된 catalytic domain의 영향으로 보이며, N-terminal의 chitin binding domain의 존재가 class I chitinase를 분류하는 중요한 기준이 된다는 것을 의미한다 [Neuhaus et al., 1993].

기존에 보고된 연구에 의하면 class II chitinase는 오직 chitin chain의 비환원

말단에만 작용하는 exo형의 메커니즘을 가지는 것으로 알려져 있으며, class I chitinase는 chitin chain 내부의 N-acetylglucosamine의 β -1,4-glycoside 결합을 무작위로 절단하는 endo형의 메커니즘을 갖는 것으로 보고되어 있다 [David B. et al., 1993]. 그리고 class I chitinase의 경우 C-terminal extension 부위의 존재 여부에 따라 endo형의 메커니즘을 가지는 것으로 알려진 class Ia chitinase와, exo형의 메커니즘을 가지는 것으로 보고된 class Ib chitinase로 다시 한 번 분류된다. 본 연구에서 들잔디로부터 분리한 class I chitinase는 C-terminal extension 부위가 결핍되어 있는 것이 확인되었다. 이 짧은 C-terminal sequence는 class I chitinase의 localization에 필수적이며 액포 targeting signal peptide로 보고되었다 [Neuhaus et al., 1991]. 따라서 들잔디로부터 분리된 두 개의 chitinase는 각각 class Ib chitinase (Zjchi1)와 class II chitinase (Zjchi2)인 것으로 결론지었다.

들잔디로부터 분리된 full-length chitinase 유전자의 nucleotide sequence 분석에서 Zjchi2가 2개의 intron과 3개의 exon을 갖는 반면에, Zjchi1은 오직 단일 exon으로만 구성되어 있다는 사실이 확인되었다. Class I chitinase group에서의 intron 결핍은 몇몇 연구에서 보고되었다 [Fang et al., 2005].

분리된 2개의 chitinase 유전자들에 대한 부위별 발현 분석결과, 두 유전자 모두 blade, sheath에서보다 stolon과 roots에서 더 높은 발현을 나타냈다. Chitinase 유전자가 뿌리에서 높은 발현을 보이는 경우는 여러 연구에서 확인되었다. 필드에서 성장된 muskmelon class II, III chitinase의 경우 종자로부터 분리된 chitinase 임에도 불구하고 뿌리에서 매우 높은 발현을 나타냈다 [Witmer et al., 2003]. 이 결과들은 chitinase 유전자가 PR protein을 암호화 하는 유전자이기 때문에 토양 미생물과 직접적인 접촉이 쉬운 뿌리 부근에서 더 높은 발현을 보이는 것으로 보고되어 있다 [Sakihito et al., 1999].

본 연구에서 분리된 두 개의 chitinase는 *E. coli*와 GST-affinity column chromatography를 이용하여 과발현 및 정제를 성공적으로 수행하였다. OD₆₀₀ 값 0.5, IPTG 0.5 mM, 18 °C에서 각각 2시간과 4시간 induction하였을 경우 Zjchi1과 Zjchi2는 soluble form 쪽으로 유도되었다. 많은 연구에서 진핵생물로부터 독성이 강한 protein들은 *E. coli* system을 이용하여 soluble form의 protein을 정제가 어려운 것으로 보고되었으며, 특히 chitinase와 같이 chitin 가수분해 효소의

경우에는 과발현된 protein들이 균주에 피해를 주기 때문에 더욱 어려운 것으로 알려져 있다 [Huang et al., 2005]. 실제로 his tag을 이용하여 과발현된 chitinase는 대부분 inclusion body로 유도되었다 [Kirubakaran et al., 2007]. 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구에서는 fusion partner로써 GST tag을 이용하였으며, 성공적으로 chitinase를 과발현 시켰다. GST tag은 몇몇 연구에서 목적 protein의 solubility에 도움을 줄 수 있다고 보고되어 있으며 [Terpe, 2003], 특히 N-terminal 영역에 결합된 GST tag의 존재는 chitinase를 비롯한 몇몇 chitin binding protein들의 chitin binding을 방해하여 발현 균주의 피해를 최소화시킴으로써, 목적 protein의 soluble form 유도에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. [Huang et al., 2005].

본 연구에서 정제된 r-chitinase중에서 class II chitinase (Zjchi2)는 *R. cerealis*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *T. reesei*에 대하여 항균 활성을 나타냈으며, 이중 3개의 균주는 들잔디를 비롯하여 bentgrass, kentucky bluegrass 등에 심각한 피해를 입히는 균주들로 알려져 있다. *R. cerealis*의 경우 들잔디와 bentgrass에서 춘고병을 일으키는 균주이며 [Chung et al., 1991], *F. graminearum*은 대부분의 turfgrass에서 Fusarium crown 병과 root rot 병에 원인이 되는 균주로 알려져 있다 [Humaid et al., 2011]. 그리고 *F. culmorum*의 경우는 kentucky bluegrass에서 Fusarium blight 병을 일으키는 것으로 보고되었다 [Hartin et al., 2011].

그러나 class I chitinase (Zjchi1)에 대해서는 모든 균주에서 항균 활성이 나타나지 않았다. 기존에 보고된 논문에 의하면, class I chitinase의 N-terminal 영역에 존재하는 chitin binding domain은 chitinase의 항균 활성의 증진에 기여한다고 알려져 있다 [Toki et al., 2002]. 그럼에도 불구하고 본 연구에서는 chitin binding domain을 포함하는 r-Zjchi1에서 활성이 전혀 나타나지가 않았다. 이 결과는 아마도 GST의 영향 때문일 것이라고 생각된다. 이전에 수행한 여러 번의 실험에서 GST-chitinase fusion protein의 상태는 Zjchi1과 Zjchi2 모두에서 어떠한 활성도 나타내지 못하였다. GST를 비롯한 affinity tag의 존재가 목적 protein의 활성에 영향을 끼칠 수 있다는 보고는 많다 [Terpe, 2003]. 따라서 본 연구에서는 site-specific protease인 thrombin을 이용하여 GST를 chitinase로부터 분리

하는 과정을 수행하였고, 그 결과 GST-chitinase fusion protein으로부터 GST를 분리해낼 수 있었다. 그러나 이 과정에서 r-Zjchi2가 on-column 및 off-column에서 모두 잘 분리되는 반면에 r-Zjchi1은 어떠한 방법을 이용하여도 거의 잘리지 않는 결과를 보였다. 아마 GST-chitinase fusion protein이 folding과정에서 thrombin cleavage site를 덮어버린 것으로 생각되며, r-Zjchi1이 모든 fungi에 대하여 항균 활성이 나타나지 않은 것은 아마도 thrombin 처리를 할 수 없는 원인에서 비롯된 것 같다. 그러나 fluorimetric chitinase assay kit를 이용한 실험에서, 각 기질에 대하여 r-Zjchi1은 chitinolytic 활성을 분명하게 드러냈다. 이 결과는 실험에 사용한 kit가 매우 민감한 탐지를 할 수 있는 시스템을 제공하는 kit이기에 아주 소량으로 잘린 r-Zjchi1에 대해서도 활성을 나타낸 것으로 예상된다.

r-Zjchi2에 의하여 성장이 억제된 각각의 fungi에 대한 현미경 분석은 chitinase의 항균 활성을 좀 더 자세히 관찰할 수 있게 해주었다. Control 배지에서 자라난 균사들은 branch를 형성하면서 길고 가늘게 잘 뻗어나가는 반면에 정제된 r-Zjchi2 800 ug을 처리한 배지로부터의 균사는 branch 형성을 잘 하지 못하였을 뿐만 아니라 거의 성장하지 못하였다. 그리고 항균 활성을 나타내지 않았던 *Neurospora crassa*의 경우 control buffer와 r-Zjchi2를 처리한 배지에서 모두 균사들이 정상적으로 성장하였다. 광학 현미경을 통하여 관찰된 fungi들의 상태는 다른 연구에서 수행된 실험결과와 매우 유사한 패턴을 나타냈다 [Toki et al., 2002].

들잔디는 국내에서 이용 빈도가 매우 많은 품종이지만 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 의한 갈색 퍼짐병에 그 피해가 매우 심각하다. 이미 수행된 다른 연구들에서 chitinase가 *Rhizoctonia solani*에 저항성을 갖는다는 사실이 알려졌다 [Rangaraj et al., 2002; Benhamou et al., 1993; Toki et al., 2002, Kirubakaran et al., 2007]. 비록 본 연구에서 분리된 두 개의 chitinase 모두 *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IV)에 대하여 *in vitro* 항균 활성을 보이지는 못하였지만, 다른 4개의 균주에 대한 항균 활성은 확실하게 나타났다. 그리고 들잔디로부터 기능을 갖는 chitinase는 아직까지 알려져 있지 않은 바, 본 연구는 기능을 갖는 chitinase 유전자를 들잔디로부터 분리해 낸 첫 번째 연구로서 그 가치가 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

- 들잔디 (*Zoysia japonica* Steud.)로부터 두 개의 full-length chitinase 유전자를 분리하였으며, nucleotide와 아미노산 sequence의 구조적 특성 분석 결과 각각 class Ib chitinase와 class II chitinase인 것으로 확인 되었다.
- 분리된 두 개의 chitinase 유전자에 대하여 들잔디의 blade, sheath, stolon, roots를 이용하여 기관별 발현분석을 수행한 결과 잎 부근에서 보다는 뿌리 부근에서 높은 발현을 보였다.
- *E. coli*와 GST affinity tag를 이용하여 두 개의 chitinase를 과발현 및 정제하는데 성공하였으며, 정제된 r-chitinase의 chitinolytic 활성 측정 결과 각 기질에 대하여 모두 chitinolytic 활성을 나타냈다.
- *R. solani* AG-2-2 (IV)의 9개의 균주를 이용한 *in vitro* 항균 활성 분석결과, r-Zjchi2는 *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Trichoderma reesei* 4개의 균주에 대하여 항균 활성을 나타냈다.

VI. 참고문헌

1. Toyama K, Bae CH, Kang JG, Lim YP, Adachi T, Riu KZ, Song PS, Lee HY (2003) Production of herbicide-tolerant zoysiagrass by Agrobacterium-mediated transformation. *Molecules and cells* 16(1):19-27.
2. 이광수 (2012) 산림 2012년 3월호. 국립산림과학원 남부산림연구소.
3. Tae, Hyun-Sook (2008) Proposals of pesticide management program for golf course. *Korean Journal of Golf Studies* 2(1):37-41.
4. Woo Chul Jung, Taek Su Shin, Bong-Su Kim, Jae-Seong Im, Jae-Ho Lee and Jin-Won Kim (2008) Efficacy of Antagonistic Bacteria for Biological Control of *Rhizoctonia* Blight (Large patch) on Zoysiagrass. *Research in plant disease* 14(1):43-50.
5. Baoye Liu, Yan Lu, Zhiyong Xin, Zengyan Zhang (2009) Identification and antifungal assay of a wheat β -1,3-glucanase. *Biotechnol lett* 31:1005-1010.
6. Guido Jach, Birgit Gornhardt, John Mundy, Jurgen Logemann, Elke Pinsdorf, Robert Leah, Jeff Schell and Christoph Maas (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8(1), 97-109.
7. Anna Kasprzewska (2003) Plant chitinases-regulation and function. *Cellular & molecular biology letters* 8:809-824.
8. Zamir K, Punja, Ye-Yan Zhang (1993) Plant chitinase and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of nematology* 25(4):526-540.
9. David B. collinge, Karsten M. Kragh, Ulla Rasmussen, Knud Vad (1993) Plant chitinases. *The plant journal* 3(1):31-40.
10. J.M. Neuhaus (1999) Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). CRC Press, Boca Raton 77-105.
11. Reetarani S. Patil, Vandana Ghormade, Mukund V. Deshpande (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and Microbial Technology* 26:473-483.
12. S. Isaac Kirubakaran, N. Sakthivel (2007) Cloning and overexpression of antifungal barley chitinase gene in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 52:159 - 166.

13. Toki Taira, Takayuki Ohnuma, Takeshi Yamagami, Yoichi Aso, Masatsune Ishiguro, and Masanobu Ishihara (2002) Antifungal activity of rye (*Secale cereale*) chitinases: the different binding manner of class I and class II chitinases to the fungal cell walls. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 66(5):970-977.
14. Masoud Tohidfar, Mojtaba mohammadi and Behzad Ghareyazie (2005) Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant cell, tissue and organ culture* 83:83-96.
15. Anwar A. Khan, Ding S. Shih (2004) Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant. *Plant science* 166:753-762.
16. Sanghyun Shin¹, Caroline A. Mackintosh, Janet Lewis, Shane J. Heinen, Lorien Radmer, Ruth Dill-Macky, Gerald D. Baldridge, Richard J. Zeyen and Gary J. Muehlbauer (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal of experimental botany* 59(9):2371-2378.
17. K.-C. Cho, Y.-J. Han, S.-J. Kim, S.-S. Lea, O.-J. Hwang, P.-S. Song, Y.-S. Kim and J.-I. Kim (2011) Resistance to *Rhizoctonia solani* AG-2-2 (IIIB) in creeping bentgrass plants transformed with pepper esterase gene PepEST. *Plant Pathology* 60:631-639.
18. A. H. Yang, K. W. Yeh (2005) Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). *Planta* 221:493-501.
19. John Levorson and Caryl A. Chlan (1997) Plant chitinase consensus sequences. *Plant Molecular Biology Reporter* 15(2):122-133.
20. George Payne, Patricia Ahl, Mary Moyer, Andrew happer, James beck, Frederick Meins, JR, and John Ryals (1990) Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:98-102.
21. Weiguo Fang, Bo Leng, Yuehua Xiao, Kai Jin, Jincheng Ma, Yanhua Fan, Jing Feng, Xingyong Yang, Yongjun Zhang, and Yan Pei (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 71:363-370.
22. Jean-Marc Neuhaus, Liliane Sticher, Frederick Meins, Jr., and Thomas Boller (1991) Short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of

chitinases to the plant vacuole. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:10362-10366.

23. X. Witmer, H. Nonogaki, E.P. Beers, K.J. Bradford and G.E. Welbaum (2003) Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. Seed Science Research 13:167-178.

24. Sakihito Kitajima and Fumihiko Sato (1999) Plant Pathogenesis-Related Proteins: Molecular Mechanisms of Gene Expression and Protein Function. The Journal of Biochemistry 125:1-8.

25. Chien-Jui Huang, Chao-Ying Chen (2005) High-level expression and characterization of two chitinases, ChiCH and ChiCW, of *Bacillus cereus* 28-9 in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications 327:8-17.

26. Young Ryun Chung, Heung Tae Kim, Tae Joon Kim and Kwang Yun Cho (1991) Cultural characteristics and pathogenicity of *Rhizoctonia* species isolated from Zoysiagrass and bentgrass Korean J, Plant Pathol 7(4):230-235.

27. A. Al-Humaid, G. H. Ibrahim and M.I. Motawei (2011) Molecular identification of some turfgrass cultivars and their resistance to *Fusarium graminearum*. Australian Journal of Crop Science 5(13):1754-1759.

28. J. Hartin, P. Geisel, M. A. harivandi (2011) Lawn diseases: Prevention and management. Agriculture and Natural Resources Statewide Integrated Pest Management Program.

29. Vivienne L. Young, Robert M. Simpson and Vernon K. Ward (2005) Characterization of an exochitinase from *Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus* (family *Baculoviridae*). Journal of General Virology 86:3253-3261.

30. Rangaraj Nandakumar, Subramanian Babu, Ramalingam Radjacommare, Thiruvengadam Raguchander and Ramasamy Samiyappan (2002) *Pseudomonas fluorescens* mediated antifungal activity against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight in rice. Phytopathol. Mediterr 41:109-119.

31. Benhamou N, Broglie K, Broglie R, Chet I (1993) Antifungal effect of bean endochitinase on *Rhizoctonia solani*: ultrastructural changes and cytochemical aspects of chitin breakdown. Canadian Journal of Microbiol 39(3):318-28.

32. Jian Wang, Na Tian, Xuan Huang, Li Yu Chen, Michael Schläppi, Zi Qin Xu (2009) The Tall Fescue Turf Grass Class I Chitinase Gene *FaChit1* Is Activated by Fungal Elicitors, Dehydration, Ethylene, and Mechanical Wounding. Plant Molecular

Biology Reporter 27(3):305-314.

33. Peter Tiffin (2004) Comparative Evolutionary Histories of Chitinase Genes in the Genus *Zea* and Family Poaceae. Genetics Society of America 167(3):1331-134.

34. Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Thompson, L. F., and King, J. W.(1989) Plant regeneration of zoysiagrass from embryo-derived callus. Crop Sci 29:1324-1325.

35. Muhammad A. Lodhi, Guang-Ning ye, Norman F. Weeden, and Bruce I. Reisch (1994) A Simple and Efficient method for DNA extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* Species. Plant Molecular Biology Reporter 12(1):6-13.

36. Imen Rabhi-Essafi, Amine Sadok, Nouredine Khalaf, and Dahmani M. Fathallah (2007) A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon α as a GST-fusion protein in *E. coli*. Protein Engineering, Design & Selection 20(5):201-209.

37. Nam-Hai Truong, Seung-Moon Park, Yoko Nishizawa, Takeshi watanave, Takuji Sasaki, and Yoshifumi Itoh (2003) Structure, Heterologous Expression, and Properties of Rice (*Oryza sativa* L.) Family 19 Chitinases. Biosci. Biotechnol. Biochem 67(5):1063-1070.

38. Cha Young Kim, Sang Wan Gal, Mi Sook Choe, Sun Yong Jeong, Soo In Lee, Yong Hwa Cheong, Sang Hyoung Lee, Young Ju Choi, Changdeok Han, Kyu Young Kang and Moo Je Cho (1997) New class II rice chitinase, *Rcht2*, whose induction by fungal elicitor is abolished by protein phosphatase 1 and 2A inhibitor. Plant Molecular Biology 37:523-534.

39. Shenchuan Wu, Alan L. Kriz, and Jack M. Widholm (1994) Molecular Analysis of Two cDNA Clones Encoding Acidic Class I Chitinase in Maize. Plant Physiology 105:1097-1105.

40. Yuanfang Guan, Sathishkumar Ramalingam, Dinesh Nagegowda, Paul W. J. Taylor and Mee-Len Chye1 (2008) *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 inhibits growth of fungal phytopathogens and agglutinates Gram-negative bacteria. Journal of Experimental Botany 59(12):3475-3484.

41. Fung K-L., Zhao K-J.2, He Z-M.3, Chye M-L.4 (2002) Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 shows antifungal activity in vitro. Plant Molecular Biology 50(2):283-294.

42. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159.

감사의 글