

Identification of *csp* Homolog in *Bradyrhizobium japonicum*

노재상, 유지철, 소재성

인하대학교 생물공학과, 초정밀 생물분리기술 연구센터

전화 (032) 860-7516, FAX (032)875-0827

Abstract

Low-temperature adaptation and protection for environmental stresses were studied in the gram-negative soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum* 61A101c. *B. japonicum* was more resistant to alcohol, H₂O₂, heat and freezing following a pretreatment at 4°C, resulting in approximately 10 to 1,000 folds increased survival compared to mid-exponential-phase cells grown at an optimal temperature at 28°C. This phenomena relate to the cold shock protein expressed when cells are exposed to a downshift in temperature. To confirm the presence of cold shock protein genes in *B. japonicum*, a PCR strategy was employed using a degenerate primer set, which successfully amplified a putative *csp* gene fragment. Sequence analysis of the PCR product(200bp) revealed *csp*-like sequences that were up to 96% identical to *csp* gene of *S. typhimurium*.

Introduction

질소고정 능력이 있는 rhizobia는 식물의 뿌리에 혹을 생성하여 식물에게 부족한 질소를 공급한다. 최근에는 지하수, 호수, 늪의 부영양화에 의한 환경오염 등의 문제로 화학적 질소비료를 대체할 수 있는 생물학적 질소비료제에 대한 연구가 각광을 받고 있다. 따라서, 이런 rhizobia를 비료제로 사용할 경우 냉장 보관을 하게 되는데 이 때, 냉장 보관에 대한 adaptation 효과가 발생하여 실제 토양에서의 여러 스트레스에 대한 저항성이 증가하게 된다. Cold adaptation 의 결과로 나타나는 현상은 세포막의 구조적인 변화와 CSP(Cold Shock Protein)와 CAP(Cold Acclimation Protein)의 합성이다.^{2), 3)}

본 연구에서는 cold adaptation의 결과로 여러 환경스트레스에 대한 저항성이 증가되는 현상과 이와 관련된 *B. japonicum*의 *csp* 유전자의 존재를 확인하였다.

Materials and methods

Cold adaptation test

B. japonicum 61A101c를 배양하여 냉장 전처리 조건인 4°C와 대조군인 28°C에 각각 16시간동안 정치배양 시킨 후, 3회 세척하고 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.2)

에 O.D.₆₀₀ = 0.5-1.0 이 되도록 재현탁한다.

준비된 현탁액을 에탄올, 과산화수소, 열 그리고 냉동 스트레스에 대해 적용하였다. 특히 냉동 조건에 따른 실험은 Freezing(-20°C)/Thawing(상온)을 10 hr / 2 hr 단위로 반복하였고 Cold adaptation 시, 단백질의 합성 여부를 알아보기 위해 Chloramphenicol(50 µg/ml)를 처리하였다. 스트레스 조건에 노출된 균주들을 각각에 대한 시간 단위로 생균 수 측정을 하였다.

PCR and sequence analysis

냉장 전처리 과정에서 발견되는 Cold shock protein의 유전자를 확인하기 위해 *csp* 유전자를 가지고 있는 균주를 대상으로 CSP1(5'-CCCGATTTCGGTACAGTAAATGGTTCACGC-3'), CSP2(5'-CCCGATTTCGGTTACGTTAGCGCTGGCGGGCC-3') primer를 제작하여 95°C, 15초, 50°C, 30초, 72°C, 30초의 반응 조건에서 30 cycles를 수행했고 PCR product를 sequencing하였다. Sequencing data는 인터넷 상의 데이터 베이스인 NCBI(National Center for Biotechnological Information)와 이미 발표된 논문들에서 다른 균주들의 *csp* 유전자와의 유사도를 비교하였다.

Results and discussion

4°C에서 cold adaptation 후, 각 외부 스트레스에 대해 노출했을 때 그림과 같이 냉동(Fig. 1), 열(Fig. 2), 과산화수소(Fig. 3) 그리고 에탄올(Fig. 4) 처리에 대해서는 그렇지 않은 것 보다 viability가 증가한 것을 확인할 수 있었다. Adaptation 효과는 산과 영양결핍 조건 등에서도 적용이 가능한 것으로 알려져 있다.^{4), 5)} 이런 스트레스에 대한 cold adaptation의 영향은 막 구조의 변화와 Cold Shock Protein(CSP)의 합성으로 설명할 수 있는데, 전자는 저온에서 균주의 성장이 막의 유동성과 지질 조성 및 기능에 의해 유지되는 침투성에 의해 좌우되는데 비포화상태의 지질 비율과 비포화 정도가 증가하고 잔기의 길이가 감소하며 메틸 잔기가 증가되는 것이고²⁾ 후자는 저온에서 살아남기 위해 단백질을 합성하게 되는데 일정시간 동안 저온에서 합성되는 CSP와 저온 배양 동안 합성되는 CAP에 의한 영향으로 볼 수 있다.³⁾ 이러한 단백질은 여러 균주에서 확인할 수 있다. 또한 대부분의 10 kDa 이하이고 특히 뿌리혹 생성 균주인 *Rhizobium leguminosarum*은 6.1 kDa의 CSP를 합성하고 CAP로서 여러 개의 단백질이 합성되는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서도 cold adaptation 시, 단백질 합성을 저해하는 Chloramphenicol를 처리하여 CSP의 존재여부를 간접적으로 확인하였고, PCR과 sequencing을 통해 *csp* gene의 존재를 확인하였다(Fig. 5). Sequencing data를 NCBI에서 다른 균주들의 *csp* gene과의 유사도를 비교하였는데 아주 높은 sequence homology가 존재했다. 특히 *Salmoella typhimurium*과는 아미노산 서열이 96%가 같았고 이런 CSP protein이 갖는 보존적 서열인 RNP1과 RNP2를 갖고 있는 것이 확인되었다. 따라

서, cold adaptation 시 합성되는 CSP protein은 RNA binding protein으로써 RNA chaperone이나 transcriptional regulator로 작용하여 여러 스트레스에 적응할 수 있는 세포 내 환경을 제공하는 것으로 추정된다.⁽⁶⁾(Fig. 6)

결론적으로, 이런 cold adaptation과 *csp* gene에 대한 연구가 진행됨에 따라서 생균제로 토양에 직접 살포되었을 때, 여러 환경스트레스에 대한 저항성을 갖는 우량 균주를 개발할 수 있을 것이라 사료된다.

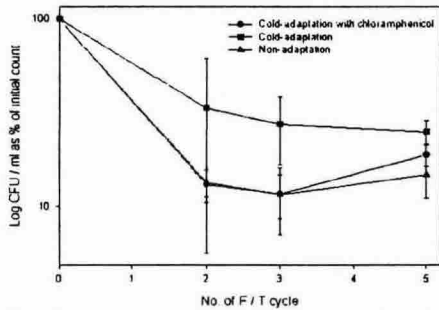


Fig. 1 Survival of cold-adapted, chloramphenicol-treated and non-adapted *B. japonicum* during F/T cycles

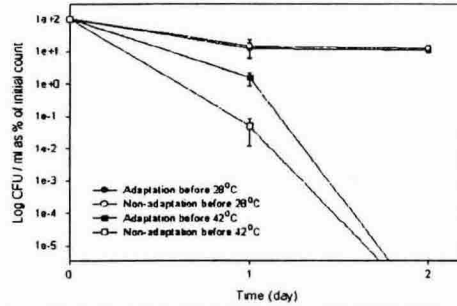


Fig. 2 Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to heat

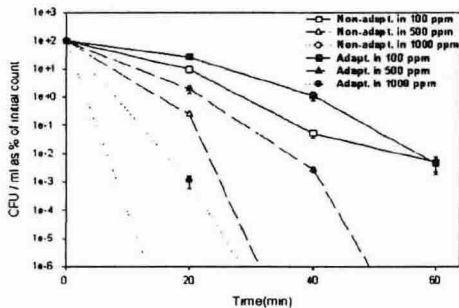


Fig. 3 Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to hydrogen peroxide(H_2O_2)

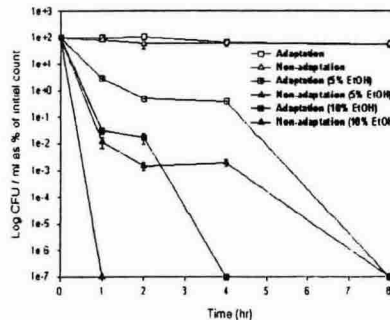


Fig. 4 Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to EtOH

```

ttt ncc ctg caa ggc ttc ggc ttc atc act cct gac gat ggc tct aaa gat gtg ttc gta cac
      L  Q  G  F  G  F  I  T  P  D  D  G  S  K  D  V  E  V  H
ttc tnt get atc cag aac gat ggt tac aaa tct ctg gac gaa ggt cag aaa gtg tcc ttc acc
      F  X  A  I  Q  N  D  G  Y  K  S  L  D  E  G  Q  K  V  S  F  T
atc gaa aac ggc gct aaa ggc ccg gca gct gct aac gta acc gga tcc nqa nnn nnc
      I  E  S  G  A  K  G  P  A  A  A  N  V  T  G  S
    
```



Fig. 5 The *cspA* gene sequence of *B. japonicum* 61A101c

```

B. japonicum  QGEGFETPDDGSKDVEVHTKAIQNDGYKSLDEGQKVSFTTIESGAKGPAAANVT
                +GEGFETPDDGSKDVEVHTAIQNDGYKSLDEGQKVSFTTIESGAKGPAAANVT
S. typhimurium GEGFETPDDGSKDVEVHTSAIQNDGYKSLDEGQKVSFTTIESGAKGPAAANVT
                RNP1          RNP2

```

Fig. 6 Sequence alignment of the *cspA* gene of *B. japonicum* 61A101c

Acknowledgement

This research was supported by the Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University.

References

1. Wouters, J. A., Rombouts, F. M., Vos, W. M., Kuipers, O. P. and Abee, T. 1999. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4436-4442.
2. Drouin, P., D. Prévost, H. Antoun. 2000. *FEMS Microbiol. Ecol.* **32**:111-120.
3. Panoff, J. M., B. Thammavongs, M. Guéguen, and P. Boutibonnes. 1998. *Cryobiol.* **36**:75-83.
4. Park, H. K., J. S. So and T. R. Heo. 1995. *Food and Biotech.* **4**:226-230.
5. Hartke, A., S. Bouche, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3474-3478.
6. Fujii, S., Nakasone, K., Horikoshi, K. 1999. *FEMS Microbiology Letters* **178**:123-128