

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 뿌리혹 특이 단백질

安 泰 仁* · 安 正 善

(서울대학교 자연과학대학 생물학과, *서울대학교 사범대학 생물교육과)

Root Nodule Specific Proteins of *Alnus hirsuta*

Ahn, Tai In* and Chung Sun An

(Department of Biology and *Department of Biology
Education, Seoul National University, Seoul)

ABSTRACT

Root nodule specific proteins of *Alnus hirsuta* were examined. SDS-PAGE pattern of the *Alnus* root nodule was simpler than that of soybean, showing five nodule specific proteins whose molecular weights were 48, 40, 36, 26 and 19 kD, respectively. Among them, 48 kD protein existed most abundantly and were composed of two subunits whose pI value were 4.0 and 4.3, respectively. The 48 kD protein seemed to be a heme containing protein based on reaction with diaminobenzidine. Although 19 kD protein was present in small amount, it was most similar to leghemoglobin in terms of its molecular weight.

서 론

공생적 질소고정은 숙주식물의 뿌리혹에서 일어나며 뿌리혹의 형성 및 유지는 숙주식물과 공생균의 유전자 상호작용에 의해 조절된다(Verma *et al.*, 1983). 식물의 뿌리혹에서만 특이적으로 발현되는 단백질을 뿌리혹 특이 단백질(nodulin)이라 하며 이들은 세포벽 성분으로 알려진 ENOD 12처럼 뿌리혹 형성 초기에 발현되는 초기 nodulin과, leghemoglobin(Lb)이나 nodulin 35(uricase II)처럼 질소고정 시작과 함께 발현되는 후기 nodulin으로 구분하고 있다(Franssen *et al.*, 1992).

뿌리혹 단백질에 대해서는 뿌리혹의 발달단계에 따른 단백질의 양상변화(Sengupta-Gopalan and Pitas, 1986)와 기능이나 세포내 위치에 관한 연구(Thummler and Verma, 1987) 등 단백질 수준의 연구와 함께, hybrid selected translation 방법에 의한 뿌리혹 특이 단백질의 검색(Sengupta-Gopalan and Pitas, 1986), nodulin cDNA의 염기서열의 결정(Franssen *et al.*, 1988), *in situ* hybridization 방법에 의한

식물체에서의 발현 장소 조사(Scheres *et al.*, 1990) 등 유전자의 구조와 발현 수준에서 연구가 이루어지고 있다.

그러나 이러한 연구는 경제적인 이유에서 주로 *Rhizobium*의 숙주인 콩과식물에서 이루어져 왔고 산림생태계에서 이미 중요성이 입증된 *Frankia*와 공생관계를 맺는 목본식물(Torrey, 1978)에 대해서는 연구가 매우 부진한 상태에 있다. 우리나라에서 자생하는 물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 질소고정 공생관계에 대해서는 공생균주 *Frankia* sp. SNU 014201의 분리(Kwon and An, 1989) 및 공생균주의 *nif-H, D, K* 유전자의 클로닝(Kwon *et al.*, 1992) 등의 연구가 수행되었으나 뿌리혹 특이 단백질에 관한 연구는 아직 선례가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 물오리나무와 *Frankia*와의 질소고정 공생관계를 분자생물학적으로 규명하려는 연구의 일환으로 SDS-PAGE 및 non-denaturing PAGE를 사용하여 물오리나무의 뿌리혹 특이 단백질을 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

뿌리혹. 물오리나무(*Alnus hirsuta*) 뿌리혹은 관악산 주변에 자생하는 10~20년생에서 채취하여 증류수로 세척

본 연구는 문교부 유전공학연구비(1986)의 지원에 의해 수행되었음.

한 후 직접 단백질을 추출에 사용하거나, -20°C에 냉동보관하였다. 콩의 경우는 종자를 *Rhizobium japonicum* USDA 110으로 도말하여 사토에 심은 다음 Shive's solution(Salisbury and Ross, 1985)을 1/2로 희석하여 이틀에 한 번씩 주면서 낮에는 평균 26°C, 밤에는 23°C를 유지하는 온실에서 재배하였고 1개월 경과 후 수확하여 2~3 mm 정도 크기의 뿌리혹을 채취하였다.

단백질 추출. 목질을 제거한 물오리나무의 뿌리혹 6.5 g을 0.5 g sea sand와 섞어 막자사발에 넣고 0.2% SDS와 4% polyvinylpyrrolidone(PVP)을 포함하는 0.02 M Mes(N-morpholino ethanesulfonic acid) 완충액(pH 6.0) 10 mL을 첨가하여 4°C에서 마쇄한 후, 14,000 g에서 1시간 원심분리하여 얻은 상침액을 일정 농도의 ammonium sulfate로 염색시키고(Fuchsman and Appleby, 1979) pellet은 1% SDS 또는 1% Triton X-100으로 처리하여 막에 결합된 단백질을 추출하였으며 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다.

전기영동. SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 따랐으며 4%의 평판 spacer 겔과 8~14%의 separating 구배 겔을 사용하였다. Well 당 100~200 µg의 단백질을 적재한 후 tracking dye가 separating gel에 들어갈 때까지는 50 V, 그 후에는 100 V로 4시간 전기영동시켰다. PAGE의 경우 겔의 농도는 SDS와 같게 하였고 heme protein의 활성도를 알아보기 위하여 Ahn과 Hwang(1986)의 완충용액을 적용하였다. 등전점분리는 O'Farrell(1975)의 방법을 따랐으며 pH 3.5~10과 pH 4~6 ampholine(LKB) 겔은 200 V에서 20분, 300 V에서 30분 및 400 V에서 30분 직류전원을 걸어 pH 구배를 형성하였고 600 V에서 15시간, 800 V에서 1시간 전기영동하였다.

겔 염색. 전기영동이 끝난 겔은 0.125%의 brilliant coomassie blue(BCB)로 염색하였으며, diaminobezidine (DAB) 염색은 McDonnell과 Staehelin(1981)의 방법에 따랐고 dimethoxybenzidine(DMB) 염색은 Francis와 Becker (1984)의 방법을 이용하였다.

결과 및 고찰

뿌리혹의 단백질 양상. 오리나무 뿌리혹의 수용성 단백질을 SDS PAGE 및 PAGE로 분석한 결과(Fig. 1) SDS-PAGE로 분석한 오리나무 뿌리혹 단백질 패턴은 콩뿌리혹의 단백질에 비교했을 때 매우 단순하였으며 최소한 5 종류, 즉 48, 40, 36, 26, 19 kD의 단백질들이 뿌리혹에서 검출되었다. 분자량이 48 kD(Fig. 1A의 *) 단백질이 다량으로 존재하였으며 50~60%의 ammonium sulfate에서 최대로 염색되었다. 이 단백질은 적갈색을 띠는 면에서는 콩 뿌리혹의 Lb와 유사해 보이나 분자량에서 현격한 차이가

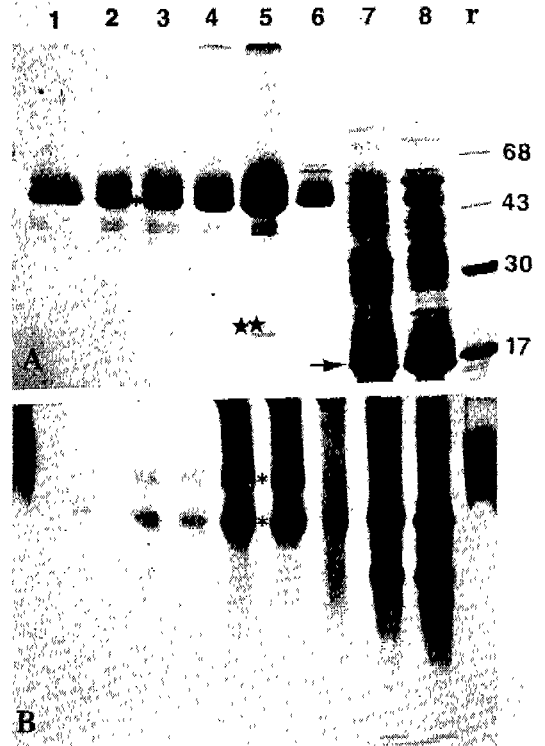


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and non-denaturing PAGE (B) patterns of proteins extracted from root nodules of *Alnus hirsuta* (1-6) and soybean (7-8). 1 and 7, supernatant; 2, pelleted with Triton; 3, pelleted with SDS; 4 and 5, pelleted with 50% ammonium sulfate; 6 and 8, pelleted with 80% ammonium sulfate; r, molecular weight markers.

있었고, 오히려 소량으로 존재하는 19 kD의 단백질(Fig. 1 A의 **)이 Lb와 유사한 분자량을 가지고 있었다. PAGE gel에서 나타난 두 개의 주 단백질(Fig. 1B의 *)은 이차원 전기영동에서 48 kD의 두 밴드로 나타나(자료 미제시) SDS-PAGE의 주 단백질이 두 가지 형태로 존재할 가능성이 높으며, 계면활성제를 처리해도 추출량이 증가하지 않아 특별히 막에 결합된 단백질이라고 생각되지는 않았다(Fig. 1A의 lane 2, 3).

단백질의 소재 및 종류. 이들 단백질들의 소재와 종류를 알아보기 위하여 뿌리혹과 뿌리의 단백질 양상을 비교하였으며, hemoprotein 여부를 조사하였다. 먼저 뿌리혹과 뿌리의 단백질을 SDS-PAGE로 분석한 결과(Fig. 2A), 뿌리혹의 30%, 60%의 ammonium sulfate로 염색된 단백질은 뿌리의 단백질과 일치하는 단백질이 없었으나, 90%로 염색시킨 경우는 뿌리혹과 뿌리에서 모두 나타나는 최소한

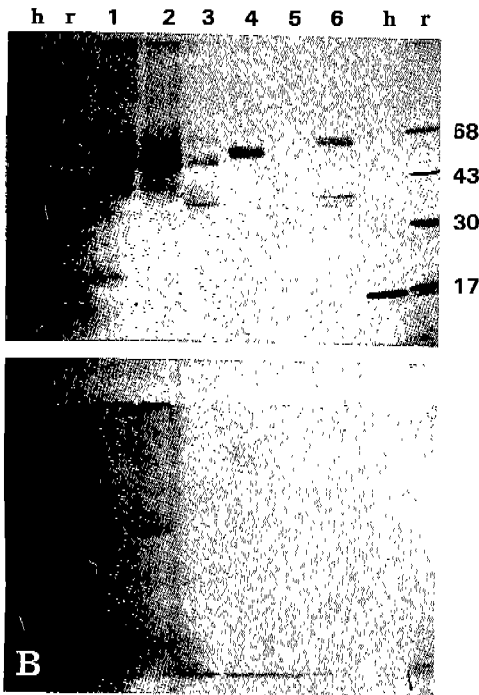


Fig. 2. Profiles of BCB staining (A) and DMB reaction (B) after SDS-PAGE of proteins extracted from nodules (1-3) and roots (4-6) of *Alnus hirsuta*. The proteins in the supernatant were precipitated with 30% (1 and 4), 60% (2 and 5) and 90% (3 and 6) ammonium sulfate. h, human hemoglobin; r, molecular weight markers.

4개의 밴드를 찾을 수 있었다. 그러나 이들은 30%, 60%로 염색시킨 단백질과는 일치하지 않았다. 또한 뿌리혹으로부터 분리한 vesicle cluster와 분리된 공생균주의 단백질을 뿌리혹 단백질과 SDS-PAGE로 비교한 결과(자료 미제시) 모든 뿌리혹 단백질들은 vesicle cluster와 균사에서는 보이지 않아서 Fig. 1A와 Fig. 2A의 lane 1과 2에서 나타난 4개의 단백질은 nodulin인 것으로 판단되었다. 동일한 방법으로 전기영동한 겔을 DMB로 염색한 결과 분자량이 48 kD인 단백질만 반응을 보여(Fig. 2B의 *) 이 단백질이 heme기를 갖고 있음을 알 수 있었다.

한편 뿌리혹과 뿌리의 단백질을 PAGE로 분석한 결과(Fig. 3A), SDS-PAGE의 결과와 유사하여 30%, 60%로 염색시킨 경우는 뿌리혹과 뿌리의 단백질이 일치하지 않았으나, 90%로 염색시킨 경우는 뿌리혹과 뿌리에서 모두 나타나는 밴드를 찾을 수 있었다. 동일한 방법으로 전기영동한 겔을 DAB로 염색한 결과(Fig. 3B) 30%, 60% 염색시킨 뿌리혹의 경우 주 밴드 중 분자량이 적은 밴드에서 반응이 나타났으며 90% 염색시킨 경우 다양한 밴드에서

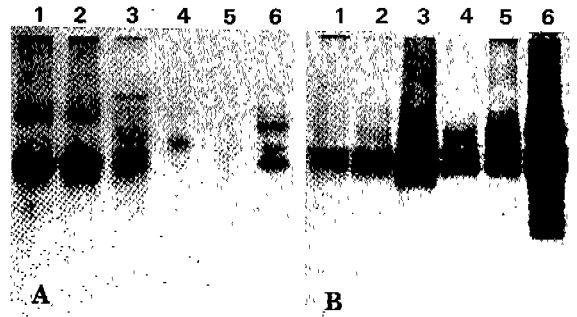


Fig. 3. The non-denaturing PAGE patterns of proteins extracted from *Alnus hirsuta*. Lane designations are the same as in Fig. 2.

반응이 나타났다. 또한 등전점 분리한 뿌리혹의 단백질의 겔을 DAB로 염색한 결과, 90%로 염색시킨 경우 pI 6.3에서 3.7에 이르는 전 구간에서 반응이 나타났으나(Fig. 4B), 30%(Fig. 4A)와 60%(Fig. 4C)로 염색시킨 경우는 pI값이 4.0과 4.3에서만 반응이 나타났다.

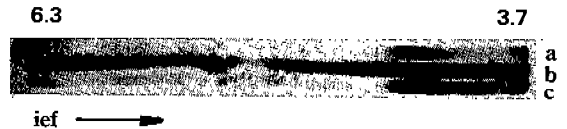


Fig. 4. The DAB reaction profiles of IEF-gels of nodule proteins from *Alnus hirsuta* precipitated with 30% (a), 60% (c) and 90% (b) ammonium sulfate.

이러한 결과는 SDS-PAGE 겔에서 분자량이 48 kD인 단백질은 pI값이 4.0, 4.3인 heme기를 가진 두 밴드로 구성되었으며 이는 PAGE 겔에서는 분자량이 적은 단백질에 해당한다고 판단되었다.

일반적으로 nodulin의 기능은 뿌리혹의 형성과 유지, 내생균주의 기능 보조 외에도 질소동화과정의 효소로 작용한다고 알려져 있다. 오리나무속 식물의 뿌리혹에서는 고정된 질소가 ureide의 일종인 citrulline으로 바뀌어서 물관으로 이동하는 것으로 알려져 있는데(Schubert, 1986) 이같은 관점에서 볼 때 물오리나무 뿌리혹에서 보이는 주 단백질들도 이 생합성 경로에 관여하는 효소 중 하나일 것으로 추측이 가능하다. 그러나 특히 다량으로 존재하는 분자량 48 kD 단백질은 DAB 반응을 보이는 것으로 미루어 hemoglobin, catalase, peroxidase 및 cytochrome c 등으로 대표되는 hemoprotein일 것으로 추측할 수 있어, 이들을 순수분리하여 활성을 분석함으로써만 정체를 확인할 수

있을 것으로 사료된다.

한편 *Frankia*의 숙주식물인 *Casuarina*와 *Myrica*의 뿌리혹에서는 Lb가 다량 존재함이 밝혀졌으나 오리나무속 식물의 경우는 소량의 Lb가 존재한다고 알려져 있다(Silvester *et al.*, 1990). 따라서 물오리나무의 19 kD 단백질이 Lb일 가능성이 있으나 단백질을 순수 분리하여 산소 및 이산화탄소에 대한 반응을 조사해야만 진정한 Lb임을 확인할 수 있을 것이다.

적 요

물오리나무(*Alnus hirsuta*)의 뿌리혹 단백질을 SDS-PAGE 및 PAGE로 조사한 결과, 콩의 뿌리혹에서와는 달리 단순한 단백질 양상을 나타냈으며, 48, 40, 36, 26 및 19 kD 등 5종류의 뿌리혹 특이 단백질이 검출되었다. 이 중에서 분자량이 48 kD인 단백질이 가장 많이 존재하고 있었으며 이 단백질은 pI값이 4.0과 4.3인 2개의 단위체로 구성되어 있었다. 또한 이 단백질은 diaminobenzidine과 반응하는 점으로 보아 heme기를 갖는 hemoprotein으로 판단되며, 소량으로 존재하는 19 kD인 단백질은 분자량 면에서 leghemoglobin과 유사하였다.

참 고 문 헌

- Ahn, T.I. and S.Y. Hwang. 1986. Comparisons of isozyme patterns between the symbiotic and non-symbiotic strain of *Amoeba proteus*. *Korean J. Genetics* **8**: 91-98.
- Fransis, R.T. and R.R. Becker. 1984. Specific indication of hemoprotein in polyacrylamide gels using a double staining process. *Anal. Biochem.* **136**: 509-514.
- Franssen, H.J., B. Scheres, C. van de Wiel and T. Bisseling. 1988. Characterization of soybean (hydroxy) proline-rich early nodulins. In, *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, R. Palacios and D.P.S. Verma (eds.). Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul. pp. 321-326.
- Franssen H.J., J.P. Nap and T. Bisseling. 1992. Nodulins in root nodule development. In, *Biological Nitrogen Fixation*, G. Stacy, R.H. Burris and H. J. Evans (eds.). Chapman and Hall, New York. pp. 598-624.
- Fuchsman, W.H. and G.A. Appleby. 1979. Separation and determination of the relative concentrations of the homogenous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. *Bioch. Biophys. Acta* **579**: 314-324.
- Kwon, S.Y. and C.H. An. 1989. Isolation of symbiotic *Frankia* strain from the root nodule of *Alnus hirsuta*. *Korean J. Bot.* **32**: 1-9.
- Kwon, S.Y., M.S. Kang and C.S. An. 1992. Molecular cloning of *nif-H, D, K* genes from *Frankia* sp. strain SNU 01 4201. *Kor. Jour. Microbiol.* **30**: 30-36.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- McDonnell, A. and A. Staehelin. 1981. Detection of cytochrome f, a c-class cytochrome, with diaminobenzene in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **117**: 40-44.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1985. *Plant Physiology*. 3rd ed., Wadsworth Publ., Belmont. 99 p.
- Scheres B., F. van Engelen, E. van der Knaap, C. van de Wiel, A. van Kammen and T. Bisseling. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**: 687-700.
- Schubert, K.R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 539-574.
- Sengupta-Gopalan, C. and J.W. Pitas. 1986. Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. *Plant Mol. Biol.* **7**: 189-199.
- Silvester, W.B., S.L. Harris and J.D. Tjepkema. 1990. Oxygen regulation of hemoglobin. In, *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, C.R. Schwinzer and J.D. Tjepkema (eds.). Academic Press, San Diego. pp. 157-177.
- Thummler, F. and D.P.S. Verma. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthetase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730-14736.
- Torrey, T.G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *Bioscience* **28**: 596-592.
- Verma, D.P.S., H. Vergmann, F. Fuller and E. Preddie. 1983. The role of plant genes in Soybean-Rhizobium interaction. In, *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, A. Publer (ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 156-163.