

Rhizobium meliloti TAL1372에서 섬유소분해효소 유전자 클로닝

박용우 · 임선택 · 강규영 · 윤한대*

경상대학교 농화학과

초록 : 본 실험은 알팔파(*Medicago sativa*) 근류균인 *Rhizobium meliloti* TAL1372 균주에서 섬유소분해효소의 활성을 확인하고 이 유전자를 크로닝하기 위해 코스미드 벡터인 pLAFR3를 사용하여 유전자 은행을 만들었다. 이 유전자 은행으로부터 분리한 1,000개의 형질 도입체에서 CM-cellulase(carboxymethylcellulase) 활성이 있는 클론(pRC8-71) 하나를 분리하였으며 30 kb 크기의 *R. meliloti* DNA 단편을 함유하고 있는 것을 확인하였다. 이 CM-cellulase 유전자의 발현 산물을 native PAGE 법에 의하여 분자량을 측정된 결과 약 45 kD 정도의 크기로 추정되었으며 pRC8-71로부터 Tn5 변이법에 의해 조사한 결과 30 kb 단편 내에서 CM-cellulase 유전자의 위치는 제한효소 *KpnI*에 의해 절단되는 약 3 kb 단편에 존재하였다. 표시교환 변이법에 의해 야생균주 *R. meliloti* TAL1372로부터 cellulase 무생산 변이체를 얻어 근류형성 정도를 실험한 결과 CM-cellulase 유전자가 근류형성에 관련될 것으로 추정되었다(1995년 5월 9일 접수, 1995년 6월 28일 수리).

서 론

근류균은 두과작물과 공생하여 대기중의 질소를 고정하며 지구상에서 생물적, 비생물적으로 고정되는 총 질소의 약 20%를 차지한다. 생물학적 질소고정 중에서 공생질소 고정균이 농업적으로 중요하다. *Rhizobium meliloti*는 알팔파(*Medicago sativa*)에 근류를 형성하는 세균으로 두과 목초용으로 유용한 근류균이다. 근류균이 근류형성 초기 단계에서 어떻게 식물세포로 침투하는가에 대한 기작은 아직도 정확하게 설명되지 않고 있으나 3가지의 가설이 제기되고 있다.¹⁻³ 그 중 Callahan 등³과 Dazzo 등⁴이 주장한 가설은 근류균이 분비하는 세포벽 분해효소가 근모벽을 단단하게 가로 지르고 있는 부분을 절단시켜 근류균이 직접 식물세포로 침투한다는 것이다. 만약 이 가설이 성립한다면 세포벽분해효소 생성은 매우 느릴 것이며 근모의 손상이 없이 부분적인 침투와 이에 수반하여 일어나는 근류형성과정에서 잘못없이 이루어지도록 엄격하게 제한되어야 할 것이다. 이에 관련된 초기 연구로 McCoy 등⁵은 식물병원균의 세포벽분해효소가 식물에 침투하는 작용과 비슷하게 근류균에서도 세포벽 분해효소가 작용할 것으로 시사한 바가 있다. 그 후 근류균에서 cellulase,⁶⁻⁷ pectinase,⁸⁻¹¹ hemicellulase¹² 생성이 보고되었으며 Mateos 등¹³은 중층평판분석법으로 *in vivo*에서 *Rhizobium*이 carboxymethylcellulose(CMC)와 polypectate를 분해하는 세포벽분해효소를 분비한다는 것을 보고하였다. 근류균에 의해 생성되는 세포벽 분해효소의 양은 극히 적고 근류균과 기주식물의 상호작용과 관련되어 있기 때문에 이 효소의 역할에 대한 생화학적 연구가 진척되지 못한 실정이다. 최근에는 분자생

물학 기법의 발달로 근류형성과정에서 근류균의 세포벽분해효소 역할에 대한 분자생물학적인 접근이 시도되고 있다.^{7,14,15}

근류균에서 세포벽분해효소 유전자산물이 근류형성 초기단계에서의 기능 및 조절기작이 보다 정확히 이해될 때 공생질소고정 효율을 상승시킬 수 있음은 물론 앞으로 질소고정 비두과 작물 개발 가능성까지도 생각해 볼 수 있을 것이며 이러한 근류균과 식물과의 상호관계 모델을 기초로 식물병원균이 식물에 병을 유발하는 과정에서 기주식물과의 병 유발, 선택성, 저항성 등의 초기 침투과정을 분자생물학적 수준에서 구명하는데 응용될 수 있을 것으로 생각되며 나아가서는 식물병 방제 및 내병성 식물 개발에도 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

따라서, 본 실험은 근류형성 초기 근류균의 세포벽 분해효소 기능이 억제되면 결과적으로 근류형성과정이 저해될 수 있다는 가정을 하고 *Rhizobium meliloti* TAL1372 균주에서 섬유소분해효소의 생성을 확인하고 CM-cellulase 유전자를 크로닝하여 그 특성을 조사하였으며 이 유전자를 Tn5 및 표시교환 변이법에 의해 야생균주로부터 섬유소분해효소 무생산 변이체를 얻어 이 유전자가 근류형성과정에서의 관련 여부를 조사하기 위한 기초 실험을 하였다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 프라스미드

본 실험에 사용된 균주 및 프라스미드는 Table 1과 같고 근류균의 배양은 Beringer 방법¹⁶에 준하였으며 대장균은 LB 배지에 적절한 농도의 항생제를 첨가하여

찾는말 : *Rhizobium meliloti*, cellulase, CM-cellulase gene, marker exchange, nodulation

*연락처

Table 1. Bacteria strains and plasmids employed.

Strains/plasmids	Characteristics	Sources
<i>Rhizobium meliloti</i> TAL1372	Nod ⁺ , Fix ⁺ on alfalfa	Nifal
<i>Rhizobium meliloti</i> TAL1372 _{Rif}	Rif-r Nod ⁺ , Fix ⁺ , on alfalfa	This work
<i>E. coli</i> DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15; <i>end</i> A1, <i>rec</i> A1; <i>hsd</i> R17 (r ⁻ , m ⁺), <i>sup</i> E44, <i>thi</i> -1, λ - <i>gyr</i> A, <i>rel</i> A1, F ⁻ , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Stratagene Co.
pLAFR3	Tet-r, cosmid cloning vector	Yun <i>et al</i> (7)
pJB4J1	Tn5, Tn7, Km-r, Gn-r	Ely <i>et al</i> (25)
pRC8-71	30 kb partial <i>Sau</i> 3A fragment of CMCase gene <i>R. meliloti</i> TAL1372 in pLAFE3	This work
pRC8-71 :: Tn5A	<i>cel</i> ⁻ mutant of pRC8-71	This work
pRC8-71 :: Tn5B	<i>cel</i> ⁻ mutant of pRC8-71	This work
pRC8-71 :: Tn5C	<i>cel</i> ⁻ mutant of pRC8-71	This work
pRC8-71 :: Tn5D	<i>cel</i> ⁺ mutant of pRC8-71	This work
pRC8-71 :: Tn5E	<i>cel</i> ⁺ mutant of pRC8-71	This work
<i>R. meliloti</i> TAL1372 :: Tn5A	Rif-r, Tet-r, Km-r, <i>cel</i> :: Tn5 derivative of This work <i>R. meliloti</i> TAL1372	This work
<i>R. meliloti</i> TAL1372 :: Tn5B	Rif-r, Tet-r, Km-r, <i>cel</i> :: Tn5 derivative of This work <i>R. meliloti</i> TAL1372	This work
<i>R. meliloti</i> TAL1372 :: Tn5C	Rif-r, Tet-r, Km-r, <i>cel</i> :: Tn5 derivative of This work <i>R. meliloti</i> TAL1372	This work
<i>R. meliloti</i> TAL1372 :: Tn5D	Rif-r, Tet-r, Km-r, <i>cel</i> ⁺ , Tn5 derivative of This work <i>R. meliloti</i> TAL1372	This work
<i>R. meliloti</i> TAL1372 :: Tn5E	Rif-r, Tet-r, Km-r, <i>cel</i> ⁺ , Tn5 derivative of This work <i>R. meliloti</i> TAL1372	This work

사용하였다.

CM-cellulase 효소액 준비 CMC가 0.5% 함유된 TY 액체배지에 *Rhizobium meliloti* TAL1372를 접종하고 초기 정상기까지 생육시킨 배양액 100 ml(9×10⁸/ml)를 3,500 g에서 30분간 원심분리하여 침전시켰으며 침전된 세포를 다시 0.1 M phosphate-citric acid(PCA) 완충액(pH 6) 1.5 ml에 녹였다. 이 현탁된 세포를 파쇄기(MSE, Soniprep 150)에서 30초간 5회 파쇄시켜 원심분리한 후 여액을 조효소액으로 사용하였다. Activity gel법¹³⁾에 의한 pRC8-71의 섬유소 분해효소 활성 측정을 위해서는 세균 배양액의 상등액을 80% 황산암모니아 포화액으로 침전시킨 후 13,000 g에서 30분간 원심분리하고 PCA 완충액으로 용해시켜 Amicon PM10 membrane(Grace, USA)으로 4°C에서 여과하였다. Membrane상에 남아있는 물질을 역원심분리하여 회수하고 투석하여 염류를 제거한 용액을 native PAGE 분리를 위한 효소액으로 사용하였다.

CM-cellulase 활성 측정법

DNS법에 의한 활성은 1% CMC가 함유된 PCA 완충액의 기질용액 0.5 ml과 상기 방법에 의해 준비된 효소액 0.5 ml를 혼합하여 진탕 수조에서 1시간 반응시킨 후 생성되는 환원당을 550 nm에서 흡광도법으로 측정하였다.¹⁷⁾ 효소 1 단위(U)는 30°C에서 1분당 생성되는 환원당 1 nmol로 계산하였으며 단백질은 Bradford법¹⁸⁾으로 정량하였다. CMC가 함유된 TY 고체배지에서의 활성 측정을 위해 CMC 고체배지 상에 효소액을 처리한 다음 Congo red plate 법으로 15분간 염색시키고 1 M-NaCl 용액으로 처리하여 생성되는 노란색 환의 크기로 활성 정도를 측정하였다.¹⁹⁾

총 DNA 및 플라스미드 DNA 분리

총 DNA는 Hirsch 방법²⁰⁾에 준하였고 플라스미드 DNA는 Holmes와 Quigley 방법²¹⁾에 준하였으며 제한효소 절단 등 일반적인 재조합 DNA 기술은 Sambrook 등²²⁾의 방법에 준하였다.

유전자 은행 제작

R. meliloti TAL1372 균주로 부터 총 DNA를 분리하고 *Sau*3A 제한효소로 부분 절단한 다음 염농도 (1.25 M~5 M NaCl) 밀도구배원심분리에 의해 25~30 kb의 DNA 단편을 분획한 후 이것을 코스미드 벡터인 pLAFR3에 삽입하고 *in vitro*에서 *E. coli* DH5 α 에 형질도입시켰다.⁷⁾ Tetracycline 및 X-gal이 함유된 LB 고체배지 상에서 흰색コロ니를 1차 선별하고 CMC 고체배지 상에서 섬유소분해효소 활성을 가지는 클론을 선별하였다.

Native PAGE법에 의한 CM-cellulase 확인

상기 방법에 의해 분리된 pRC8-71의 세포 체외 cellulase 효소액을 단백질 양으로 20 μ g되게 취하여 SDS를 첨가하지 않는 아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 아크릴아마이드 겔을 CMC가 함유된 1.5% 아가로스 겔로 Southern blotting과 같은 방법으로 전이시켰다.²³⁾ 전이된 CMC 함유 아가로스 겔을 Congo red로 염색시킨 다음 NaCl로 처리하여 효소활성 및 분자량을 조사하였다.²⁴⁾

Tn5 변이 및 표지교환 변이

pJB4J1²⁵⁾은 5.7 kb의 Tn5를 함유하고 kanamycin 저항성이 있는 플라스미드로 CM-cellulase 유전자를 함유한 pRC8-71에 Tn5 삽입을 통해 cellulase 무생산 변이체(*cel*⁻ mutant)를 얻기 위해 사용되었다. 한편 Tn5가 도입된 pRC8-71 :: Tn5를 표지교환 변이(marker-exchange mutagenesis) 법에 의해 야생균주인 *R. meliloti* TAL1372

에 도움 플라스미드 pRK2013을 사용한 3중 접합법으로 cellulase 무생산 *R. meliloti* TAL1372 변이체를 얻었다.²⁶⁾ 이 균주들을 근류형성 비교 실험에 사용하였다.

근류형성실험

상기 실험에서 얻어진 균주들의 근류형성 정도를 관찰하기 위해 알팔파(*Medicago sativa*) 종자를 95% 에탄올에 넣고 15분간 흔든 다음 진한 황산에서 10분간 표면살균 후 살균 증류수로 7회 세척한 다음 발아시켰다. 무질소영양액인 Fahraeus액²⁷⁾에 아가를 1%되게 첨가하고 조직배양병에 넣어 경사지게 굳힌 다음 무균적으로 발아시킨 알팔파를 이식하였다. 뿌리의 크기가 1.5 cm 정도 자랐을 때 근류균 및 변이균(marker-exchanger)을 10⁸ 세균을 접종하여 항온실(상대습도 60%, 광도 17,000 룩스, 25°C)에서 생육시켜 근류형성 정도를 관찰하였다.

결과 및 고찰

근류균의 CM-cellulase 생성

근류균 *R. meliloti* TAL1372이 섬유소분해효소 생성 여부를 조사하기 위해 먼저 TY 배지에 *R. meliloti* TAL1372를 접종하여 대수 증식기 말기까지 배양한 후 원심분리하여 균체를 침전시키고 실험 방법에 따라 세포를 파쇄하여 조효소액으로 조제하였다. 상기 액을 5 µl, 10 µl를 취하여 CMC 고체배지 상에 점적하고 30°C 항온기에서 2시간 반응시킨 후 염색한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 A, B에서 섬유소분해효소의 활성을 관찰할 수 있었으며, C는 대조구로 효소를 10분간 끓인 후 불활성화시킨 것이며, D는 양성 대조구로 시판 섬유소분해효소의 활성을 나타낸 것이다. 근류균의 섬유소분해효소에 대한 연구로 Martinet-Molina 등¹²⁾은 *R. trifolii* BAL 균주에서 cup-plate법에 의해 처음으로 cellulase 및 hemicellulase가 생성됨을 보고하였으며 CMC를 기질로 하여 근류균을 배양하여 점도 측정을 한 결과 점도가 낮아 지는 것을 보고한 바가 있다. Abe 등²⁸⁾도 *R. trifolii* 40S 균주에서 β-glucosidase와 β-galactosidase를 분리하여 효소학적 특성을 보고하였으며 최근에는 Mateos 등¹³⁾은 극미량의 효소활성을 측정할 수 있는 중층 평판분석법으로 *in vivo* 상태에서 근류균의 세포벽분해효소 생성을 확인한 바가 있어 이에 관련된 연구를 촉진시킨 바가 있다. 이와 같이 근류균의 섬유소분해효소 생성에 대한 보고는 있으나 아직까지 그 기능에 대해 정확하게 밝혀지지 않고 있다.

근류균의 CM-cellulase 생성에 있어 기질의 유도효과

TY 기본배지와 0.2% CMC를 첨가한 TY 액체배지에 *R. meliloti* TAL1372를 접종배양하여 실험방법에서와 같이 효소액을 조제하여 DNS 법으로 효소활성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 근류균의 섬유소분해효소 생성은 기질에 대한 유도 효과를 나타내지 않았다. 이러한 사실은 섬유소분해효소가 근류균 내에서 구조적으로

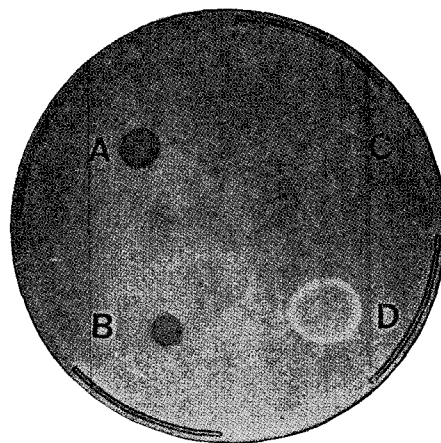


Fig. 1. CM-cellulase activity of sonicated cell extracts from *Rhizobium meliloti* TAL1372 detected by spotting the extract onto plate containing a CMC substrate. The plate was incubated for 2 hrs. at 30°C. A, 10 µl of sonicated cell extracts; B, 5 µl of sonicated cell extracts; C, 5 µl of sonicated cell extracts as a negative control which was inactivated by boiling at 100°C for 10 minutes. D, Positive control of Novo cellulase(0.01 µg in 10 µl H₂O)

Table. 2. CM-cellulase activity of sonicated cell extracts of *R. meliloti* TAL1372 grown under the presence of CMC substrates^a

Supplement to TY medium	CM-cellulase(U) ^b	
	Total	Specific ^c
None	0.54 ± 0.03	0.36 ± 0.02
0.2% CMC	0.67 ± 0.04	0.48 ± 0.02

^aValues reported are the means of triplicate samples derived from equivalent numbers of cells ± standard errors of means. ^bOne unit of enzyme activity is the amount releasing 1nmole of reducing sugar per min at 30°C. ^cSpecific activity is given as the unit of enzyme activity per miligram of total protein.

생성되는 것으로 생각된다. 이와 관련된 연구로 Mateos 등¹³⁾은 *R. trifolii* ANS843 균주를 B-INOS를 기본배지로 하여 0.2% CMC를 첨가 하여 배양하고 효소활성의 유도효과를 관찰한 결과 유의성이 없는 것으로 보고한 바가 있다. 한편 Morales 등은 *R. trifolii* 균주들을 cellobiose, myo-inositol 첨가는 효소 생성을 촉진시켰으며 기본배지에 탄소원으로 mannitol을 0.25% 이상 첨가하였을 때는 효소 생성이 감소된다는 것을 보고한 바가 있다. 또한 효소 생성의 유도효과는 효소를 생성하는 세포의 수와 이 세포의 수를 증가시키는 기본 탄소원 및 유도물질과 밀접한 관계가 있을 것으로 추정하였다.⁹⁾ 근류균의 세포벽분해효소 생성에 있어 유도효과에 대한 연구로 polygalacturonase에 의해 이루어 졌는데 Lillich 등²⁹⁾은 *R. trifolii* C1226 균주 배양에서 pectin을 첨가하여도 근류균에서 polygalacturonase 생성이 증가되지 않았음을 보고한 바가 있으며 Palomares 등⁹⁾은 *R. meliloti* 균주에서 polygalacturonase 생성은 근류균내의 프라스

미드에 의해 조절된다는 것을 보고한 바가 있다. Verma 등³⁰⁾은 근류형성 초기과정에서는 cellulase와 pectinase의 활성이 수 배로 증가되며, 이들 효소 활성 장소가 각각 구획(compartmentation)되어 있다고 보고 하였다. 즉, pectinase는 bacteroid에 존재하며 cellulase는 주로 기주식물의 세포질에 위치하면서 근류형성에 관여한다고 하였다. 따라서 근류균의 세포벽분해효소는 구획되어 있어 고도로 조절되어 작용할 것이며 그 활성의 시작은 기주식물과의 상호관계 및 상이한 세포벽분해효소와의 복합작용으로 이루어 질 것으로 생각되어 그 유도효과를 단면적으로 관찰하여 결론을 얻기는 용이하지 않을 것으로 생각된다.

유전자 은행 제작

R. meliloti TAL1372 균주로부터 총 DNA를 분리하여 pLAFR3를 사용하여 유전자 은행을 만들었다. 조합된 DNA를 *in vitro*에서 대장균에 형질도입시킨 다음 tetracycline 및 X-gal을 함유한 고체배지에서 흰색 균락을 선별하여 *R. meliloti* TAL1372의 유전자 은행으로 하였다. 이 은행으로부터 무작위로 클론을 선정하여 플라스미드 DNA를 분리하여 *Bam*HI 제한효소로 처리하여 전기영동한 결과 25~30 kb 크기의 DNA 단편이 확인되었다.

CM-cellulase 유전자를 함유한 클론 선별 및 제한지도 작성

분리된 클론들이 99% 확률로 게놈 DNA를 대표할 수 있는 클론 수를 계산하는 식 $N = \ln(1-p)/\ln(1-f)$ 에서 $p=0.99(99\%)$ 의 확률로, *R. meliloti*의 게놈 DNA를 약 4,000 kb로 계산하고, 평균 단편 크기를 25 kb로 하여 상기식에 계산한 결과 $N=735$ 로 계산되었다. 상기 유전자 은행 실험결과 *R. meliloti*의 게놈을 대표할 수 있는 1,000 클론을 대상으로 CMC 고체배지법에 의하여 CM-cellulase 활성이 있는 것을 선별하였다. 그 중에서 효소활

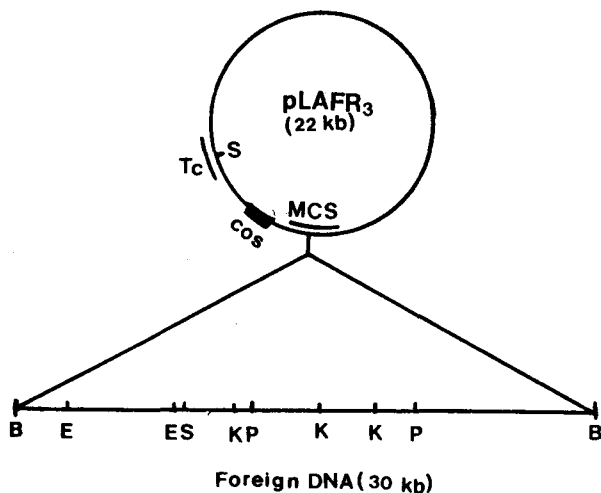


Fig. 2. The restriction map of the pRC8-71. Abbreviations for restriction enzyme sites are as follows: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I.

성을 나타내는 클론 하나를 분리하였으며 이를 pRC8-71로 명명하였다. 이 클론에는 30 kb 크기의 *R. meliloti* 유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다. 이를 *Bam*HI, *Sal*I, *Pst*I, *Hind*III, *Eco*RI 등으로 처리하여 간단한 유전자 지도를 작성한 결과는 Fig. 2와 같다.

Native-PAGE에 의한 CM-cellulase 유전자 산물 확인

pRC8-71 클론의 섬유소분해효소의 분자량 확인을 위해 실험방법에서와 같이 효소액을 조제하고 효소액 100 μ g을 SDS가 없는 native-PAGE에 의해 단백질을 분리하여 Southern hybridization과 같은 방법으로 PCA 완충액(pH 6)에서 단백질을 CMC가 함유된 아가로즈 겔에 전이시켰다. 전이된 아가로즈 겔을 Congo red 용액으로 염색하고 0.1N-HCl로 대비 염색한 결과는 Fig. 3과 같다. Fig. 3에서와 같이 섬유소분해효소는 약 45 kD의 분자량을 가진 단백질이었다. 좌측에 표시된 것은 표준 분자량 단백질(non-denaturated protein)이다. 한편 Mateos 등¹³⁾은 *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 균주의 세포 파쇄액에서 섬유소분해효소를 분리하여 native PAGE와 SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리하고 activity gel 상에서 그 활성 양상을 조사한 결과 근류균 파쇄액에서 3 종류의 isozyme이 존재한다는 것을 보고 한 바가 있다. 따라서 근류균에는 하나 이상의 섬유소분해효소가 존재하는가에 대한 조사가 계속되어야 할 것이며 앞으로 근류형성과정에서 이들의 복합적 작용도 연구되어야 할 것으로 생각된다.

Tn5 및 표지교환 돌연변이

섬유소분해효소 유전자를 함유한 분리 선정균 pRC8-71을 Tn5 공여체인 pJB4J1와 접합 하여 kanamycin 및 tetracycline에 저항성인 코로니 6,000개의 접합체를 분리하여 CMC 고체배지 상에서 활성이 없는 3개를 분

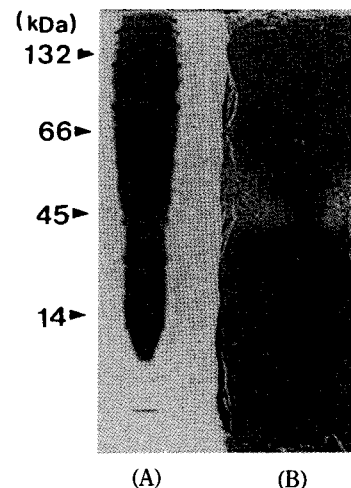


Fig. 3. Activity gel overlay detection of cellulase of pRC8-71 concentrated by ultrafiltration through an Amicon PM10 membrane after separation by native PAGE. The sample contained 20 μ g of total protein. The standard markers of non-denaturated protein(Sigma) are indicated. Lane A, native PAGE; B, Activity gel

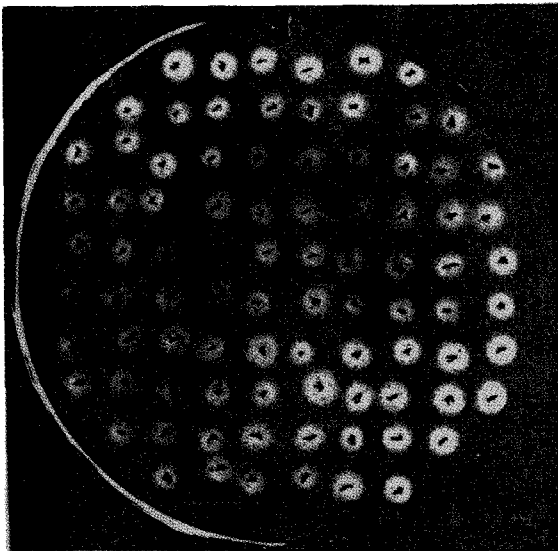


Fig. 4. Selection of *cel*⁻ pRC8-71 by carboxymethylcellulose (CMC) overlay method. The cells were incubated for 4 days at 37°C before stained with Congo red. (-), *cel*⁻ clone; (+) *cel*⁺ control

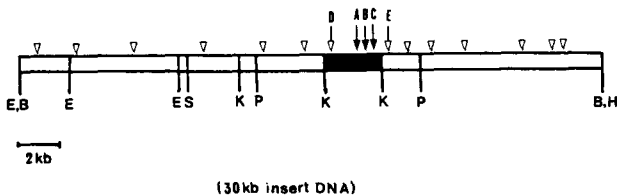


Fig. 5. Restriction map of pRC8-71 showing position of Tn5 insertions. ▽-▽, insertions which did not lead to a loss of cellulase activity; ▼-▼, insertions which led to a loss of cellulase activity. Tn5 insertion mutants of pRC8-71 with the insertion at A, B, C, D, and E were subjected to marker-exchange mutagenesis to generate specific mutants for testing nodulation ability. Restriction sites for *Bam*HI (B), *Eco*R1 (E), *Hind*III (H), *Kpn*I (K), *Pst*I (P), *Sal*I (S).

리하고 이들을 pRC8-71::Tn5A, pRC8-71::Tn5B 및 pRC8-71::Tn5C로 명명하였다(Fig. 4). 이 Tn5 변이체들을 DNS 법에 의한 섬유소분해효소 활성을 조사하여도 활성이 나타나지 않았다. 한편 이들 접합체들로부터 DNA를 분리, 제한효소 *Eco*RI으로 처리하여 Tn5의 삽입위치를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서 CM-cellulase 유전자의 위치는 제한효소 *Kpn*I으로 절단되는 약 3 kb DNA 단편내에 있는 것으로 추측된다. 한편 2개의 다른 Tn5 변이체 pRC8-71::Tn5D 및 pRC8-71::Tn5E는 섬유소분해효소 활성을 가지고 있었으며 이 부위는 CM-cellulase 유전자와 관련이 없는 것으로 생각된다. 근류형성과정에서 근류균의 섬유소분해효소의 역할을 조사하기 위해 표지교환 변이법에 따라 야생 균주인 *R. meliloti* TAL1372를 cellulase 무생산 변이체를 만들었다. 이것은 pRK2013의 도움으로 rifampicin에 자발적 저항성 균주인 *R. meliloti* TAL1372Rif을 만들어 Tn5 변이체인

Table 3. Comparison of the nodulation ability between *Rhizobium meliloti* TAL1372 wild-type and *cel*⁻ mutants

Strains	Root hair curling ^a	No. of nodules/plants ^b
<i>R. meliloti</i> TAL1372	+++	12
<i>R. meliloti</i> TAL1372::Tn5A	++	10
<i>R. meliloti</i> TAL1372::Tn5B	++	11
<i>R. meliloti</i> TAL1372::Tn5C	++	9

^a+++ , extensive root hair curling or shepherd's crook or both.

^bTwenty seedlings of alfalfa were inoculated with each strain.

pRC8-71::Tn5A, pRC8-71::Tn5B 및 pRC8-71::Tn5C 각각과 삼중 접합 법으로 처리 후 rifampicin 및 kanamycin에 저항성인 *R. meliloti*를 분리하여 이들을 각각 *R. meliloti* TAL1372::Tn5A, *R. meliloti* TAL1372::Tn5B 및 *R. meliloti* TAL1372::Tn5C로 명명하였으며 이들을 근류형성실험에 사용하였다.

근류형성실험 근류균의 근류형성과정에서 CM-cellulase 유전자가 근류형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *R. meliloti* TAL1372 야생균주와 *R. meliloti*::Tn5 변이체들을 접종하여 비교 실험한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 처럼 변이주가 야생균주에 비해 근류형성능에 있어 약간의 차이가 있는 것으로 보인다. 근류형성 수가 적었는데 이것은 무균상태에서 근류균 접종실험을 위해 제한된 상태에서 알팔파를 재배하였기 때문인 것으로 생각된다. 앞으로 세포벽분해에 관련되는 polygalacturonase 유전자 등을 분리하여 야생 근류균의 세포벽 분해효소 유전자에 관련되는 다중 변이체를 얻어 근류형성 실험을 하면 보다 뚜렷한 결과를 얻을 것으로 추측된다. 또한 본 실험방법은 앞으로 기주식물과 근류균 사이에서 일어나는 단계적 근류형성과정에서 분자적 역할을 구명하는데 하나의 방법이 될 것으로 기대된다. 지금까지의 결과로 보아 근류균 섬유소분해효소 유전자가 근류형성에 관련되는 것으로 추정되나 주도적으로 관련되지 않을 것으로 생각된다. 왜냐하면 근류형성 초기에는 섬유소분해효소의 단독작용 보다는 일련의 세포벽 분해 효소가 복합적으로 작용하기 때문일 것이다.¹⁴⁾ 또한 식물세포는 근류형성을 위해 근류균에 의해 감염 통로의 형성이 촉진되며 이곳에서 근류균의 증식이 일어난다. 이와같이 초기의 근류균 침입과 침입 후 공생 관계 확립을 위해서는 상호균형을 유지할 것이다. 이때 두 종류의 행동을 조절할 수 있는 하나의 기작은 감염 통로에서의 근류균 밀도와 관계가 있을 것이다. 이 근류균의 수는 근류균 세포벽분해효소의 분비 양과 관련되어 기주식물을 와해시키는 식물 병원균과는 달리 근류균은 기주식물과 공생관계를 유지하기 위해 조절되는 기작을 가지게 될 것이다.³⁰⁾

앞으로 본 연구자들은 전보⁷⁾에서 보고한 *R. fredii*에서 분리한 섬유소 분해효소 유전자의 특성을 조사하여 보고 중에 있으며 본 실험에서 분리한 pRC8-71 클론을 subc-

loning하여 염기서열 및 발현특성을 조사하여 비교 검토하면 근류형성과정에서 근류균 섬유소분해효소 역할에 대해 보다 접근할 수 있을 것으로 생각된다.

한편 근류균의 세포벽분해효소 분비는 기주식물로부터 신호전달에 따라 작용할 것이다. 식물병원균과 기주식물의 상호관계는 신호교환을 통하여 병원균이 일방적으로 작용하여 식물에 침투하여 식물을 와해시키는 결과를 가져오나 근류균과 두과작물은 상호 균형을 이루어 형성되는 과정이기 때문에 이에 관련되는 신호전달 과정이 훨씬 복잡하게 이루어져 있을 것이다. 앞으로 이에 대한 정확한 해답을 얻기 위해서는 기주식물 내의 신호전달 기작이 구명되었을 때 가능할 것이다. 이에 관련하여 앞으로 식물에 대한 신호 인지와 그의 효과 증폭에 책임이 있는 식물의 수용체를 연구하는 것도 근류형성기작을 구명하는 데 중요할 역할을 할 것이다.³¹⁾

사 사

이 논문은 교육부 유전공학연구비(1993) 및 한국과학재단연구비(PMBBRC)에 의하여 연구되었으며, 귀 재단의 연구비 지원에 감사를 드립니다

참 고 문 헌

- Nutman, P. S. (1956) The influence of the legume in root nodule symbiosis. A comparative study of host determinants and function. *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.* **31**, 109-151.
- Ljunggren, H., and G. Fahraeus (1961) The role of polygalacturonase in root-hair invasion by nodule bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **26**, 521-528.
- Callahan, D., and J. Torrey (1981) The structural basis for infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* **59**, 1647-1664.
- Dazzo, F., and D. Hubbell (1982) Control of root hair infection. pp. 274-310. In W. Broughton (ed.), Nitrogen fixation, vol. 2. *Rhizobium*. Clarendon Press, Oxford.
- McCoy, E. (1932) Infection by *Bact. radicola* in relation to the microchemistry of the host's cell walls. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **110**, 514-533.
- Morales, V., E. Martinez-Molina, and D. Hubbell (1984) Cellulase production by *Rhizobium*. *Plant Soil.* **80**, 407-415.
- Yun, H. D., S. T. Lim, and K. Y. Kang (1990) Molecular cloning of the cell-wall degrading enzyme in *Rhizobium*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **18**, 203-208.
- Hubbell, D. H., V. M. Morales, and M. Umali-Garcia (1978) Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 210-214.
- Palomares, A., E. Montoya, and J. Olivers (1978) Induction of polygalacturonase production in legume roots as a consequence of extrachromosomal DNA carried by *Rhizobium meliloti*. *Microbios.* **21**, 33-39.
- Martinez-Molina, E., and J. Olivares (1982) A note on evidence for involvement of pectolytic enzymes in the infection process of *Medicago sativa* by *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 453-455.
- Lim, S. T., M. H. Chung, Y. W. Park, and H. D. Yun (1991) Molecular cloning of the pectate lyase gene from *Rhizobium fredii* USDA193. *Mol. Cells* **1**, 151-156.
- Martinez-Molina, E., V. Morales, and D. Hubbell (1979) Hydrolytic enzyme production of *Rhizobium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1186-1188.
- Mateos, P. F., J. I. Jimenez-Zurdo, J. Chen, A. S. Squartini, S. K. Haack, E. M. Molina, D. H. Hubbell, and F. B. Dazzo (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* Biovar Trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1816-1822.
- Chung, M. H., Y. W. Park, and H. D. Yun (1991) Marker-exchange mutagenesis of pectate lyase gene in *Rhizobium fredii*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 222-227.
- Shantharam, S. H., H. D. Yun, D. Swanlund, and A. Atherly (1988) Identification and cloning of two pectate lyase genes from *Rhizobium fredii* USDA193. pp. 202-203. In R. Palacios and D. Verma (ed.), Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minn. USA.
- Beringer, J. E. (1974) R factor transfer in *R. japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**, 188-198.
- Sumner, J. B., and E. B. Sisler (1944) A simple method for blood sugar. *Arch. Biochem.* **4**, 333-336.
- 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.
- Teather, R., and P. J. Wood (1982) Use of Congo red-poly-saccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 770-780.
- Hirsch, P. R., M. van Montagu, A.W.B. Johnston, N. J. Brewin, and J. Schell (1980) Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **120**, 403-412.
- Holmes, D. S., and M. Quigley (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and M. Maniatis (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 1,2,3. Cold Spring Harbor, New York.
- Park, Y. W. (1992) The Role of cel gene in *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on bacterial leaf blight. M.S. Dissertation, Gyeongsang National University, Korea.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature*, **227**, 680-685.
- Ely, B., and R. H. Croft (1982) Transposon mutagenesis in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **149**, 620-625.
- Roeder, D. L., and A. Collmer (1985) Marker-exchange mutagenesis of a pectate lyase isogene in *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* **164**, 51-56.
- Fahraeus, G. (1957) The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**, 374-381.

28. Abe, M., and S. Higashi (1982) β -glucosidase and β -galactosidase from the periplasmic space of *R. trifolii* cells. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 551-562.
29. Lillich, T. T., and G. H. Elkan (1967) Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by *Rhizobium* spp. *Can. J. Microbiol.* **14**, 617-625.
30. Verma, D., V. Zogbi, and A. Bal (1978) A Cooperative action of plant and *Rhizobium* to dissolve the host cell wall during development of root nodule symbiosis. *Plant Sci. Lett.* **13**, 137-142.
31. Long, S. R., and B. J. Staskawicz (1993) Prokaryotic plant parasites. *Cell* **73**, 921-935.

Cloning of CM-cellulase Gene of *Rhizobium meliloti* TAL1372 in *Escherichia coli*

Yong-Woo Park, Sun-Teak Lim, Kyu-Young Kang, and Han-Dae Yun* (*Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*)

Abstract : The involvement of the cell-wall degrading enzymes in *Rhizobium* has long been an unsolved question about the infection process in the formation of root nodule. To assess the contribution of the cellulase to the nodulation of rhobia, here we report the production of cellulase from *R. meliloti* TAL1372 which degrade carboxymethylcellulose (CMC) model substrate with CMC-plate method. We constructed a genomic library by cloning Sau3A-digested genomic DNA from *R. meliloti* TAL1372 into the *Bam*HI site of the cosmid vector pLAFR3. Out of more than one thousand transductants of *E. coli*, one clone (pRC8-71) had CM-cellulase activity and contained pLAFR3 cosmid with 30 kb insert of *R. meliloti* DNA. The product of CM-cellulase gene was analyzed by native PAGE. About 45 kD protein was considered to be a product of the gene. Tn5 mutagenesis reveals that the structural gene located in a ca. 3 kb *Kpn*I fragment. The cellulase-minus mutants of *R. meliloti* TAL1372 were obtained by Tn5 mutagenesis of pRC8-71 and marker exchange techniques. Analyses of the nodulation ability of these Tn5 mutants showed that the CM-cellulase gene of *R. meliloti* TAL1372 may be involved in early nodulation development on alfalfa (*Medicago sativa*).

*Corresponding author