

대두-근류균의 공생에서 Lectin에 의한 결합특이성

강상재^{1*} · 김진호² · 박우철¹

¹경북대학교 농화학과, ²상주산업대학교 농학과

초 록 : 근류균과 대두의 공생에서 숙주 결합성을 조사하기 위하여 대두종자로 부터 분리한 lectin과 뿌리추출물과의 동일성 여부를 조사한 결과는 다음과 같다. 탈지 대두분으로 부터 분리한 lectin은 크로마토 그래피와 전기영동상 단일물질로 분리되었고 백운 및 팔달로 부터 분리한 lectin은 표준lectin의 항체와 항원-항체 반응을 나타내어 동일한 물질이었다. 종자lectin 및 뿌리추출물 및 뿌리분비물에 대한 화학주성은 RCR 3407, KCTC 2422에서 뿌리분비물에 대한 주성이 가장 높았고 종자 lectin과 뿌리추출물은 비슷한 화학주성을 나타내었다. 대두의 유근으로 부터 분리한 뿌리추출물은 표준 lectin의 항체와 침강선을 형성하여 대두 종자 lectin과 동일한 물질임을 알수 있었으며 뿌리 분비물과는 침강선을 형성치 않았다. 대두와 상호접종균을 형성하는 RCR3407, KCTC2422 및 LPN-101은 대두의 종자 lectin 및 뿌리추출물과 결합하였으나 완두의 lectin과는 결합하지 않았고 대두와 근류형성을 하지않는 LPN-100은 대두의 lectin과 결합하지 않았다.(1997년 12월 5일 접수, 1997년 12월 16일 수리).

서 론

생물학적 질소고정은 고등식물과 미생물간의 공생으로서 공생계의 다양성과 복잡성으로 경제적 중요성이 인정됨에도 불구하고 연구에 많은 제한을 받아온 실정이다.

이 두과작물과 근류균의 공생계에서 질소고정의 기구는 아직 명확하지 않으나 숙주세포와 근류균 양자간의 생리생화학적 특성을 밝힘에 있다고 생각한다.

근류균이 숙주의 뿌리에 부착하여 근류를 형성하는 메커니즘에 의한 결합 특이성이 제안된 이래 형광물질로 표시된 대두 종자 lectin과 근류균의 세포표층과의 결합과 근류균이 숙주식물에 감염되는 작용간에 고도의 상관성이 있음을 실험적으로 증명하였다.³⁾

질소고정균이 숙주세포에 접합하는 것은 자연적 토양환경내에서 이루어지는데 이 과정은 상호가역적인 상태, 즉 근류균이 자체의 운동성과 어떤 물질에 유인되어 숙주식물의 뿌리로 이동하게 된다.

이동한 후 매개물질에 의해 접합된 다음 비가역적인 상태로 숙주세포에 부착되어 초기 숙주 인식 장소인 숙주의 근모세포에 근류균이 결합되는 선택적인 메커니즘(숙주특이성)을 가지게 된다.

본 연구에서는 숙주식물과 근류균의 숙주인식 과정에서 근류균과 숙주식물의 결합특이성에 관계되는 lectin과 근류균과의 결합성을 연구하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 공시재료

찾는말 : nitrogen fixation, lectin, rhizobium
*연락처자

본 연구에 사용된 대두종자는 영남작물시험장에서 분양받았으며 표준 균주는 한국과학기술원 유전자은행에서 분양받아 사용하였고 변이주의 분리는 전보⁹⁾와 같이 하였다.

Lectin의 분리 및 정제

종자lectin과 유근에 존재하는 추출물과의 동일성 여부를 확인하기 위하여 대두 종자 lectin은 Lis와 Sharon의 방법¹¹⁾과 Gordon 등⁹⁾의 방법으로 분리정제 하였다.

숙주식물의 뿌리로부터 lectin을 분리하기 위하여 Gade 등⁶⁾의 방법으로 뿌리 200 g을 채취하여 인산 완충액(10 mM phosphate buffer, 0.15 M NaCl, 1 μM CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂, 0.01% thimerosal, pH 7.0)으로 세척한 후 동일 완충액으로 유발에서 마쇄하여 추출정제하고, 종자lectin의 정제방법과 동일한방법으로 분획하여 수집하고 동결건조시켜 -20°C에서 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

면역 이중 확산법

면역 이중확산은 Baily의 방법¹¹⁾과 Ouchterlony의 방법¹²⁾을 병행하여 barbitone 완충액(barbital sodium 12 g, barbital 4.40 g, merthiolate 0.15 g/l, pH8.6)으로 1% agarose 겔을 조제하여 소형 샤아레에 2 mm의 두께로 겔을 조제하였다. 직경 3 mm의 중앙샘을 만들고 5 mm의 일정한 간격으로 샘을 만들어 중앙샘에는 항체를 주입하고 외부샘에 각각 시료를 주입하여 30°C에서 반응시킨 후 항원-항체 반응 침강선을 CBB액으로 염색하여 확인 하였다.

화학주성 측정

근류균의 화학주성의 측정은 전보⁹⁾와 같은 방법으로 측정하였다.

겔 전기영동

분리한 lectin의 정제정도를 확인하기 위하여 Lotan의 방법¹²⁾과 Bollag와 Edelstein방법⁴⁾을 혼용하여 polyacrylamide 겔 전기영동을 행하였으며 SDS전기영동은 Laemmli의 방법¹⁰⁾으로 행하였다.

FITC-lectin복합체와 근류균의 결합성

Lectin과 근류균의 결합특이성을 알아보기 위하여 fluorescence isothiocyanate (FITC)와 lectin의 복합체를 다음과 같이 제조하였다. 0.5 mg의 FITC를 1 ml의 0.5 M 탄산소다 완충액(pH 9.5)에 녹이고 9배 부피 lectin (10 mg/ml)을 혼합하였다. 이 혼합액을 실온에서 1시간동안 서서히 반응시키고 난 후 4°C에서 12시간 반응시켰다. Lectin-FITC복합체를 분리하기 위하여 Hudson 과 Hay의 방법⁸⁾으로 동일 완충액으로 평형시킨 sephadex G-25로 칼럼 크로마토그래피를 행하여 280 nm와 495 nm에서 흡광도를 동시에 나타내는 분획을 수집하여 F/P비를 계산하여 F/P비가 5.0이상인 분획을 수집하여 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

근류균과 lectin의 결합정도는 Bhuvanewari 등의 방법²⁾을 약간 변형하여 다음과 같이 하였다.

근류균과 lectin-FITC 복합체간의 결합성은 근류균을 YEMG 배지에서 대수말기(OD₆₀₀ = 0.8)까지 배양한 후 배양액 1 ml를 에펜도르프 관(1.5 ml)에 넣고 원심분리하여 집균하였다. 생리식염수로 수회 세척하고 난 후 FITC-Lectin복합체[F/P = 5.29] 100 μl를 첨가하여 30°C에서 1시간동안 반응 시키고 근류균과 FITC-lectin복합체간을 결합시킨 후 결합되지 않은 FITC-lectin복합체를 수회 원심분리하여 제거하였다. 근류균에 결합된 lectin-FITC 복합체를 slide glass에 도말하여 형광현미경으로 결합정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

뿌리 추출물의 분리 및 정제

근류균과 숙주식물과의 결합특이성은 토양 환경내에서 이루어지는 기작이며 숙주식물의 근권에서 발아후 수일내에 근류형성이 되는 것으로 볼때 숙주식물의 유근에 존재하는 물질이 일차적으로 관여할 것이며 뿌리 추출물과 뿌리분비물이 숙주특이성을 형성하는데 관여할 것이라고 생각된다.

뿌리 분비물은 근류균을 유인하는 과정에서만 작용을 하는 것으로 생각되며, 따라서 근류균의 결합성은 숙주식물의 종에 따라 각각 결합성이 다르다는 사실을 확인한 결과는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1의 결과에 의하면 *B. japonicum* KCTC 2422는 대두 뿌리 부분의 근모가 존재하는 부위에 대부분의 근류균

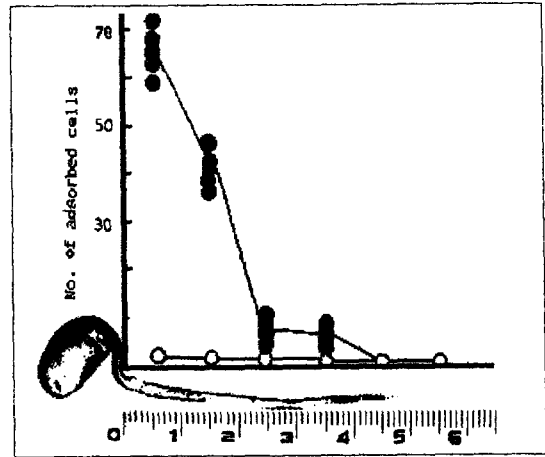


Fig. 1. Adsorption of *Rhizobium* to host plants. Each points was the mean of 10 plants in 5 separate experiments. KCTC2422(●-●) and KCTC1537(○-○).

이 결합하였으며 근모가 없는 뿌리의 아래 부분에는 결합이 되지 않는다는 것을 알수 있으며 이 결과는 근류균과 숙주식물이 결합하는 부위가 있고 여기에 결합작용을 하는 물질이 존재한다는 것을 추정할 수 있다.

Bhuvanewari 등의 보고²⁾에 의하면 *R. japonicum*과 대두의 결합은 주근에서 SERH (smallest emergent root hair)부분에서 감염과 결합이 주로 일어나며 cowpea, clover, alfalfa, peanut등에서도 동일한 결과를 얻었다고 하였다. 이러한 숙주특이성은 숙주식물의 뿌리와 결합하는 근류균의 특성과 숙주식물의 뿌리의 결합중간 매개체의 역할을 알아보는 것이 무엇보다도 중요한 일이라 생각된다. 따라서 숙주식물의 뿌리 조직에 존재하는 lectin의 존재여부를 우선 먼저 확인하는 것이 중요하다고 생각된다.

종자 lectin과의 동일성 여부를 확인하고 근류균과의 결합성을 알아보기 위하여 숙주식물의 종자 lectin과 뿌리 추출물을 분리 정제한 결과는 Fig. 2, 3과 같다.

Fig. 2는 조 lectin을 sepharose-N-ε-amino caproyl-β-D-

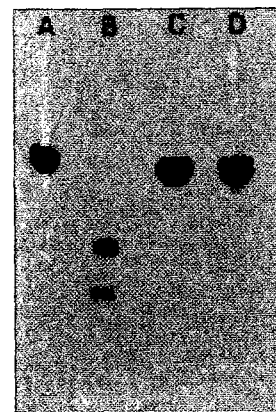


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of purified seed lectins.

Electrophoresis was performed with 50 μg of lectins at pH 8.8 for 4 hrs. A,B,C and D were std. soybean lectin, pea lectin, *palda* lectin and *baekwoon* lectin, respectively.

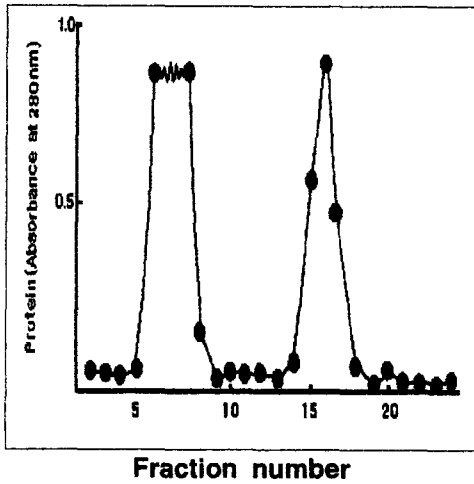


Fig. 3. Affinity chromatography of soybean root extract on a column of Sepharose-ε-aminocaproyl-β-D-galactosamine. The column was washed with 0.15 M PBS (pH 7.2), and root lectin was eluted with 0.5 M D-galactose in PBS. Fractions collected were 4 ml at rate of 24 ml/hr. Arrow denotes application of D-galactose. ●—●, protein (absorbance at 280 nm).

galactopyranosylamine(SAG) 10 ml를 채운 column내에 흡착되어 있는 단백질을 0.5 M D-galactose 용출시켜 혈구 응집반응을 나타내는 분획을 수집하고 투석하여 당을 제거하고 동결건조하여 전기영동한 결과이며, Fig. 3은 뿌리의 근모형성 부위에서 추출한 조 추출물에서도 종자에서와 같이 column내에 흡착되어 있는 단백질을 0.5 M D-galactose로 용출시켰다.

뿌리 추출물과 종자lectin의 동일성

분리정제한 뿌리 추출물을 종자 lectin과의 동일성 여부를 확인하기 위하여 0.4% SDS를 함유하는 polyacrylamide 전기영동을 한 결과는 Fig. 4와 같다.

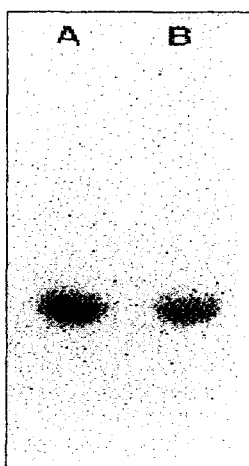


Fig. 4. Gel electrophoresis of purified root extracts from soybean root on 10% polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed with 50 μg of root extracts in 10% polyacrylamide gel in the presence of 0.4% SDS at pH 8.8 at 200 V for 4hrs. A and B were Paldal root extract and baekwoon root extract, respectively.

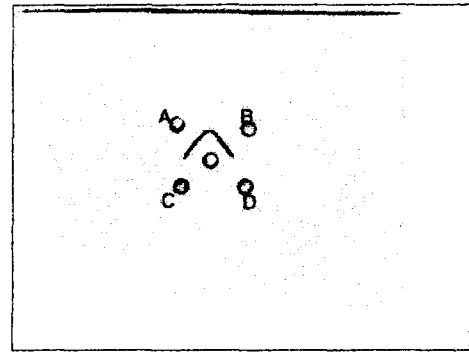


Fig. 5. Ouchterlony double immuno-diffusion patterns of root lectin and root exudate in Paldal and Baekwoon plant. Center well, anti-lectin rabbit IgG. A, B, C and D, were Paldal root lectin, Baekwoon root lectin, Paldal root exudate and Baekwoon root exudate, respectively.

대두 lectin과 동일한 위치의 단백질 띠를 확인하여 대두의 종자 lectin과 동일한 분자량을 가지는 물질임을 확인할 수 있었다.

종자 lectin, 뿌리 lectin 및 뿌리 분비물과의 동일성 여부를 이중 면역 확산법으로 확인한 결과는 Fig. 5와 같다.

이 결과에서 보면 대두의 유근에서 분리 정제한 물질과 종자lectin의 표준 항체와 침강선을 형성하는 것으로 보아 국산 대두 팥달콩 및 백운콩의 뿌리추출물은 대두 종자lectin과 동일한 항원임을 확인할 수 있었다. 한편, 뿌리분비물에도 종자나 뿌리의 조직에 분포하고 있는 lectin과 동일한 물질이 존재하는지를 확인한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 팥달콩 및 백운콩으로부터 수집한 뿌리 분비물은 표준 lectin의 항체와 항원-항체 반응 침강선을 형성하지 않았다. 이 결과는 뿌리 조직에는 대두 lectin과 동일한 물질이 존재하나 뿌리 분비물에는 표준Lectin항체의 항원이 되는 lectin이 존재하지 않음을 시사한다.

이 결과는 두과작물의 뿌리 lectin은 근모세포와 뿌리세포 표면에 존재하는 세포막에 결합된 단백질이며 세포벽 외부로 분비하지 않는다는 보고⁹⁾와 동일한 결과로 생각되며 대두의 유근에서 분리한 추출물이 당 구성성분, 혈구응집반응, 당 특이성, 아미노산 조성등이 종자 lectin과 비슷하다는 보고⁹⁾와 일치함을 알 수 있었다.

화학주성의 비교

전보⁹⁾에서 뿌리 분비물에는 glucose를 비롯한 몇 종류의 단당류와, 유리 아미노산, 유기산등이 존재하고 있으나 뿌리 분비물중에는 lectin과 같은 분자량이 큰 물질은 함유되어 있지 않다는 사실을 확인할 수 있었다.

따라서 초기 단계에서 lectin이 근류균을 유인하는가?를 확인하기 위하여 숙주식물의 종자에서 추출한 lectin과 뿌리에서 추출한 뿌리 추출물에 대하여 각각 근류균의 화학주성을 측정된 결과는 Table 1과 같다.

Table 1은 대두의 lectin, 뿌리lectin, 뿌리분비물에 대한 근류균의 화학주성을 측정된 결과로 종자의 lectin과 뿌리 추출물에 대한 근류균의 화학주성은 팥달, 백운 두 품종간

Table 1. Chemotactic responses of *B. japonicum* on seed lectin, root lectin and root exudate of host plant

STRAINS	Chemotactic Response*					
	Seed Lectin		Root Lectin		Root Exudate	
	<i>Paldal</i>	<i>Baekwoon</i>	<i>Paldal</i>	<i>Baekwoon</i>	<i>Paldal</i>	<i>Baekwoon</i>
RCR 3407	2.5	2.6	2.3	2.7	3.5	3.2
KCTC2422	2.8	2.3	2.5	2.1	2.9	3.0
LPN 100	1.0	1.1	1.2	1.2	1.6	1.4
LPN 101	1.1	1.0	1.1	1.2	1.0	1.1

* Chemotactic response between cells in capillary tube with and without substances.
control : cell count of KCTC2422 in chemotaxis buffer.

에 차이가 없이 비슷한 경향이였다. *R. japonicum* RCR 3407과 *B. japonicum* KCTC 2422는 팔달과 백운에 정상적인 근류형성을 하는 균주로서 종자 lectin에 대한 화학주성비가 2.3~2.8 정도이며 뿌리lectin과 비슷하였다. 뿌리 분비물에 대한 근류균의 화학주성비는 2.9~3.5정도로 높았다. 2 mM Proline에 대한 화학주성을 가지나 근류를 형성하지 않는 변이주 LPN-100도 뿌리 분비물에 대하여 약간의 화학주성을 보였다.

이 결과는 근류균의 화학주성이 근류형성 초기 단계에서 밀접한 연관이 있음을 추론 할 수 있으며 lectin이 숙주세포와의 결합을 형성하는데 결정적인 역할을 하여 숙주특이성을 나타내는 중간 매개물로 작용함을 가정할 수 있었다.

근류균과 lectin의 결합성

근류균과 숙주식물과의 상호 친화성을 확인하기 위하여 실험한 결과는 Table 2 및 Fig. 6과 같다. *R. japonicum* RCR 3407과 *B. japonicum* KCTC 2422는 대두와 *R. viceae* KCTC 1537은 완두와 *R. trifolii* KCTC1536은 클로버와 *R. meliloti* KCTC 2353은 알팔파와 근류를 형성하고 nitrogenase 활성을 나타내었다. 이 결과는 근류균과 숙주식물간의 상호접종균(Cross inoculation)을 형성하여 숙주친화성이 각각 다름을 나타내 보여주고 있다.

이러한 숙주친화성에 근류균의 화학주성만으로는 완전히 설명할 수가 없다고 생각하며 이에 관여하는 물질이 있을 것을 알아보기 위하여 형광물질을 부착한 lectin【F/P =

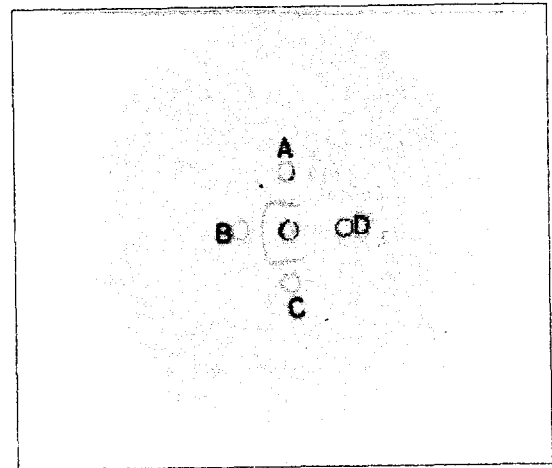


Fig. 6. Ouchterlony double immuno-diffusion patterns of lectin-rhizobia conjugates.

A, B, C and D were extracted solution from lectin- RCR3407, lectin-KCTC2422, lectin-LPN 100 and lectin- LPN 101, respectively. (center well : standard lectin rabbit IgG).

5.29]과 근류균과의 결합을 확인하여 lectin가설에 의한 숙주특이성을 확인하였다.

R. japonicum RCR 3407과 *B. japonicum* KCTC 2422는 대두와 정상적인 근류형성을 하는 균주로서 대두의 lectin과는 특이적 결합을 하였으며 완두의 lectin과는 결합하지 않았다. LPN-100은 화학주성은 약간 있으나 근류를 형성하지 않는 균주로서 숙주식물인 대두의 lectin과 결합하지 않았다.

LPN-101은 화학주성은 낮으며 근류를 형성하는 균주로서 대두 lectin과 특이적으로 결합하였다. 이 결과는 숙주식물의 뿌리세포와 결합특이성에는 lectin이라는 물질에 의하여 형성된다는 것을 추정할 수 있었다.

*R. trifolii*인 KCTC 1536은 클로버와 근류형성을 하는 균주로서 대두의 lectin과도 완두의 lectin과도 결합하지 않았으며 완두와 근류형성을 하는 *R. viceae*인 KCTC 1537은 완두의 lectin과는 결합하나 대두의 lectin과는 결합하지 않았고 알팔파와 근류형성을 하는 *R. meliloti* KCTC 2353은 대두 및 완두의 lectin과 결합하지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 근류균과 숙주식물과는 상호특이성을 가지고 상호접종균을 형성하는데 lectin이 개체 역할을 하여 특이적 결합을 하여 근류형성하는데 결정적인 역할을 한다고 생각된다.

Table 2. Binding of *Rhizobium* strains with lectins and infectivity.

Strains	F-SBL ^a	F-PL ^b	Infectivity ^c			
			Soybean	Pea	Alfalfa	Clover
RCR 3407	+	-	+/3550*	-	-	-
KCTC2422	+	-	+/2360*	-	-	-
LPN-100	-	-	-	-	-	-
LPN-101	+	-	+/1810	-	-	-
KCTC1536	-	-	-	-	-	+/980
KCTC1537	-	+	-	+/1930	-	-
KCTC2353	-	-	-	-	+/1170	-

a, Fluorescence isothiocyanate labelled soybean lectin; b, Fluorescence isothiocyanate labelled pea lectin; c, nodulating activity of bacterial strains; + and -, interact and not interact between bacterial strains and lectin; *, Acetylene reduction activity(nmole/plant/hr).

참고문헌

1. Baily, G.S (1987) Immunodiffusion in gels. In, Method in Molecular Biology, Walker, J.M.ed., Vol.I:Proteins. Humana press Clifton, Newjersey.
2. Bhuvaneswari, T.V., S.G. Pueppke and W.D. Bauer (1977) Role of lectins in plant-microorganism interaction. I. Binding of soybean lectin to rhizobia. Plant Physiol. 60, 486-491.
3. Bohloul, B.B. and E.L. Schmidt (1974) Lectins:a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. science. 185, 269-271.
4. Bollag, D.M. and S.J. Edelman (1991) Gel electrophoresis under denaturing conditions. In, Protein methods. John wiley & Sonc, Inc., publication. pp 131-132
5. Bowles, D.J. (1979) Lectins as membrane components: implication of lectin receptor interaction. FEBS Lett. 102, 1-3.
6. Gade, W., M.A. Jack, J.B. Dahl, E. Schmidt and F. wold (1981) The isolation & characterization of a root lectin from soybean(Glycine max. cultivar Chippewa). J. of Biol. Chem. 256, 12905-12910.
7. Gordon, J.A., S. Blumberg, H. Lis and N. Sharon (1972) Purification of soybean agglutinin by affinity chromatography on sepharose-N-ε- amino caproyl-β -D-galactopyranosylamine. FEMS letters. 24, 193-196.
8. Hudson, L. and F.C. Hay 'Antibody as probe pre-paration of fluorochrome conjugated antisera' In, Practical Immunology 3rd ed. Blackwell Sci. Publishions. pp.34-37
9. Kang, S.J. & W.C. Park (1994) Effect of chemotaxis on nodulation in Bradyrhizobium japonicum-soybean symbiosis. The J. of Kor. Soc. Soil Sci. and Fert., 27, 136-147.
10. Lamml, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
11. Lis, H. and N. Sharon (1974) Soybean(Glycine max) agglutinin. In, Methods in enzymology, Vol.28 part B; complex carbohydrate. 28, 360-368.
12. Lotan, R. H.W. Siegelman, H. Lis and N. Sharon (1973) Subunit structureof soybean agglutinin. J. Biol. Chem. 249, 1219-1224.
13. Ouchterlony, O. (1962) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Prog Allergy 6, 30-154.

Binding Affinity between Lectin and *Rhizobia* in Soybean-*Bradyrhizobium* Symbiosis

Sang-Jae Kang^{1*}, Jin-Ho Kim², Woo-Churl Park¹(¹Dept. of agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 701-702, Korea; ²Dept. of Agronomy, Sangju National Polytechnic University, Sangju 742-170, Korea)

Abstract : This study was carried out to elucidate the biological characteristics of Rhizobia in biological nitrogen fixation system. The results of investigation were as follows; Polyacrylamide gel electrophoresis pattern of root lectin in the presence of SDS was ascertained electrophoretically and chromatographically. The purified root lectin formed immunoprecipitin line with anti lectin rabbit IgG. Root lectin, seed lectin and root exudate were tested for chemotactic ability. Chemotactic responses of RCR3407 and KCTC2422 toward root exudate were stronger than those of seed lectin and root lectin, but there didn't occur chemotactic responses of LPN100, not bound with seed lectin and that of LPN101, bound with seed lectin toward root exudate, root lectin and seed lectin. RCR3407, KCTC2422 and LPN-101, which nodulated with soybean, interacted with soybean lectin, but not with pea lectin. LPN-100, which was not nodulated with soybean, didn't interact with soybean lectin.

Key words : nitrogen fixation, lectin, *rhizobium*

*Corresponding author