

대두 근류균의 리포 다당과 Lectin의 결합성

강상재 · 김진호* · 박우철

경북대학교 농과대학 농화학과
상주산업대학교 농학과*

Binding between Lipopolysaccharide of Rhizobia and Lectins from Soybean

Kang Sang-Jae, Jin-Ho Kim*, Woo-Churl Park

Dept of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University
Dept of Agronomy, Sangju National Polytechnic University*

Abstract

This study was carried out to research the biological characteristics among rhizobia and soybean seed and root lectins, and to obtain a basic information of host specificity in biological nitrogen symbiosis system.

The results obtained were as follows:

Purified seed lectin from soybean varieties of paldal, backwoon and hwangkeum formed immunoprecipitin lines with standard soybean seed lectin and the root lectins from soybean seedlings immunoelectrophoretically.

Soybean seed and root lectins interacted with *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*, but didn't interacted with *Rhizobium. viceae*, whereas pea lectin conjugated with *R. viceae*, but didn't bind with *R. japonicum* and *B. japonicum*.

Lipopolysaccharides of *B. japonicum* and *R. viceae* were fractionated into LPS I and LPS II on the sephadex G-50.

Lipopolysaccharides from *B. japonicum* showed the binding activity both with soybean seed lectin and root lectin, but those from *R. viceae* didn't show it with soybean seed and root lectins.

Key words : immunoprecipitin lines, Lectin, lipopolysaccharide

서 론

그램음성인 근류균의 세포표층 구성 다당은 extracellular polysaccharide (EPSs)와 capsular polysaccharide (CPSs) 그리고 lipopolysaccharide (LPSs)로 구성되어 있으며 이 표층다당이 공생적 감염과정에서 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다. (Carlson 등 1978, 1987, Carlson 1982, Hitchcock와 Brown 1983)

*Rhizobium trifolii*와 *R. leguminosarum*의 표층다당 분자가 특이적으로 숙주의 뿌리에 결합한다는 보고가 있으며 (Dazzo와 Brill 1979, Kato 등 1979, Carlson 1982, Halverson과 Stacey 1986), 또한 Harabak 등(1981)은 *R. trifolii*로 부터 분리한 표층다당인 LPS가 클로버의 lectin인 trifoliin의 수용체로서 작용하며 두가지 형태의 LPS가 존재하고 그중 한가지가 trifoliin에 대한 주 수용체로 작용한다고 보고하였다.

Caetano-Anolles와 Favelkes(1986)의 연구 보고에 의하면 *R. meliloti*와 알팔파가 특이적으로 결합함이 보고되어 Puvanesarajah(1987) 등은 근류형성이 되지 않는 *B. japonicum* 변이주의 표층다당성분을 분석한 결과 친주와 서로 다른 당 구성을 하고 있음을 밝힌 바 있다. 따라서 표층다당은 효과적인 근류형성에 필요하며 O-연쇄다당인 lipopolysaccharide가 결핍된 *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *trifolii*와 *viceae*는 근류형성이 부진하다고 하였다 (Carlson 등 1987, Brink 등 1989, DeMaagd 1989). Carrion 등에 의하면 *B. japonicum*의 Lipopolysaccharide는 고분자인 LPS I 부분과 저분자인 LPS II 부분으로 구성되어 있으며 그 조성이 각각 다

르다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 근류균의 세포 표층구성 성분인 lipo다당을 분리하여 이와 lectin과의 결합성을 조사하여 이들에 의한 숙주친화성을 확인하기 위하여 조사 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주 및 공시재료

본 실험에 사용한 대두종자는 밀양농업시험장으로 부터 분양받은 팔달 및 백운콩을 공시재료로 하였고 표준균주는 경북대학교 식물영양학 연구실에 보존중인 RCR 3407 및 한국과학 기술원 유전자은행에서 분양 받은 KCTC 2422, KCTC 1537을 사용하였다.

2. 종자 lectin 및 뿌리추출물 분리 및 정제

종자 lectin은 Lis와 Sharon(1974), Gordon(1978) 등의 방법을 병용하여 분리 정제 하였고 뿌리 추출물은 Gade (1986) 등의 방법으로 분리하였다.

3. 면역전기영동 및 면역 이중확산법

면역전기영동은 Nowtney의 방법으로 1% 아가로스 겔 상에서 100V의 일정한 전류로 행 하였으며 면역 이중확산은 Baily의 방법과 Ouchterlony의 방법을 병용하여 1% 아가로스 겔 상에서 행 하였고 침강밴드는 CBB액으로 염색하여 확인하였다.

4. 근류균과 lectin의 결합성

lectin과 근류균의 결합성을 확인하기 위하여 근류균을 YEMG배지에서 진탕배양한 후 수회 세척하고 집균하였다. 미리정제된

대두 종자 lectin을 2mg/ml 농도로 용해하여 1시간 동안 반응을 시키고 결합되지 않은 lectin을 수회 세척하여 제거한 후 근류균에 결합된 lectin을 재 추출하여 전기영동 및 이중면역 확산법으로 결합 여부를 확인 하였다.

5. 근류균의 LPS의 분리

근류균의 리포 다당과 lectin의 결합성을 확인하기 위하여 근류균의 세포벽 성분인 표층다당(LPS)을 Tully (1985)의 방법으로 R1 배지에서 배양하여 Westphal과 Jann(1965)의 방법과 Johnson과 Perry (1975)의 방법을 병행하여 다음과 같이 분리하였다.

약 5g정도의 균체를 수집하여 Phosphate buffered saline(PBS, pH6.8)로 수회 세척한 후 50mM 인산 완충액(5mM EDTA, 0.05mM NaN_3 , pH 7.0)에 현탁하여 70°C로 유지된 수조에서 90% 페놀 200ml를 첨가하고 강렬하게 저은후 20분 동안 유지시키고 실온으로 냉각 시켰다.

이 현탁액을 12,000rpm에서 10분간 원심분리하고 수층을 수집 하였으며 페놀층은 다시중류수를 첨가하여 3회 반복 추출하였다. 수용액을 페놀을 완전히 제거한 후 동결 건조하여 근류균의 표층다당으로 하였다. 표층다당으로부터 다당을 다음과 같이 분획 하였다. 조 표층다당을 1%초산에 용해하여 90°C에서 가수분해하고 동결건조하여 농축 하였다.

농축시킨 리포표층 다당을 10mM pyridin-acetate 완충액(pH 4.26)에 현탁시킨 후 불용성의 지질부분을 제거한 상층액을 다시 동결건조하고 5배 부피의 동일 완충액에 재 현탁하고 Sephadex G-50 칼럼크로마토 그래피를 행 하였다. 동일 완충액으로 용출시킨 후 phenol-sulfuric acid

법으로 490nm 의 흡광도를 측정하였다.

6. 리포다당과 lectin의 결합성

근류균의 리포다당과 lectin의 결합성을 다음과 같이 확인하였다. sepharose- ϵ -aminocarproyl- β -D-galactosamine이 채워진 칼럼(1×10cm)에 대두종자 lectin을 일차 결합 시키고 imidazole완충액(20mM imidazole HCl, 0.1mM MgCl_2 , MnCl_2 , CaCl_2 , pH 7.0)으로 평형 시킨후 이차로 분획된 근류균의 리포다당을 1mg/ml의 농도로 용출시켜 유지시킨 후 30분 동안 반응시켜 결합되지 않는 리포다당을 완전히 세척 하였다. Lectin과 결합된 리포다당을 0.05M glycine-HCl 완충액(pH3.0, 0.5M NaCl)으로 시간당 5ml의 유속으로 용출시켜 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 종자 lectin의 분리 및 정제

근류균의 리포다당과 대두의 종자 lectin과의 결합성을 검증하기 위하여 팔달콩으로부터 분리한 종자 lectin의 면역전기영동 결과는 그림 1과 같다.

agarose 겔상의 이동거리가 표준 lectin과 동일하며 동일한 위치에 anti-lectin rabbit IgG와 침강밴드를 형성하여 순수 분리되었음을 확인할 수 있었다.

2. 근류균과 종자 lectin의 결합

전보(Kang과 Park, 1994)에서 근류균과 lectin의 결합성이 확인되었으나 결합성을 좀 더 명확하게 확인하기 위하여 1차적으로 근류균과 lectin을 반응시킨 후 결합된 lectin을 재추출하였다.

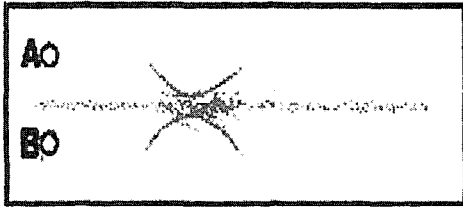


Fig. 1 Immunoelectrophoresis patterns of purified soybean seed lectins.

Immunoelectrophoresis was performed with 20 μ l purified lectins(0.5mg/ml) on 1% agarose gel at 100V for 6hrs. A and B were standard seed lectin and *paldal*, respectively. (central trough : anti lectin rabbit IgG)

이 추출액을 이중 면역확산법 및 전기영동을 행하여 근류균과 특이적으로 결합한 lectin이 존재하는지를 확인해 본 결과 그림 2, 3과 같다.

그림 2에서 보면 대두와 근류형성을 하

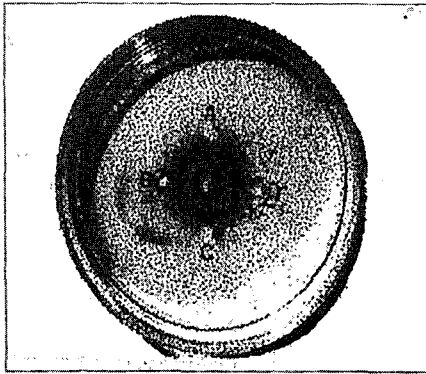


Fig. 2 Ouchterlony double immunodiffusion patterns of rhizobia and soybean seed and root lectins.

A,B,C,D were RCR3407-lectin, KCTC2422-lectin, RCR3407-root extract and KCTC 2422-root extract.

는 *R. japonicum* RCR 3407, *B. japonicum* KCTC 2422는 대두종자 lectin과 뿌리 lectin과 침강선을 형성하여 뿌리의 lectin이 종자 lectin과 같은 항원임을 알수 있다.

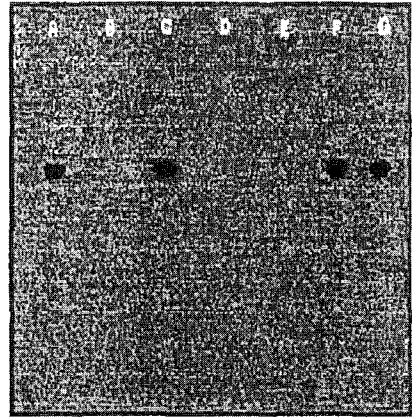


Fig. 3 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of reextracted solution from rhizobia and lectin conjugates.

A:soybean seed lectin(SL)-RCR3407;
B:SL-KCTC1537;
C:SL-KCTC 2422;
D:pea lectin-RCR3407;
E:pea lectin- KCTC 2422;
F:soybean root lectin-KCTC2422;
G:standard lectin-K CTC2422

두과작물과 근류균이 결합하여 근류를 형성하기 위하여는 반드시 초기에 근류균이 숙주세포내로 침투를 하여야 하며, 이를 매개하는 물질이 lectin이라는 것을 추측할 수 있었다.

또한 그림 3에서 보는 바와 같이 전기영동적으로 근류균에 결합된 lectin을 확인해 본 결과 *R. japonicum* RCR 3407과 *B. japonicum* KCTC 2422는 대두의 lectin

과 결합 하였으나 *R. viceae* KCTC1537 은 대두 lectin과 결합하지 않았다. 이 결과로 미루어 숙주와 근류균이 침입하여 근류를 형성하는 균주는 대두종자 lectin과 결합하며 근류를 형성하지 않는 균주와는 결합하지 않아 상호접종균을 형성함을 알 수 있다. 따라서 근권내에서 숙주식물과 근류균의 숙주친화성에 중요한 매개체로 추정할 수 있었고 좀더 구체적인 연구가 수행되어야 할 것으로 사료되었다.

뿌리의 추출물은 종자 lectin과 동일한 결과를 보여 근류형성 특이성에 관여하는 lectin이 뿌리에 존재하며 이 물질에 의해 숙주특이성이 형성되는 것으로 추정할 수 있었다(그림3, C,D).

뿌리의 추출물은 전보에서 종자의 lectin과 동일한 단백질이 존재하며 이 물질은 뿌리의 세포벽에 결합되어 존재하는 단백질이며 근류균과의 결합 매개역할을 하는 것으로 추정되었다.

3. 근류균의 lipopolysaccharide의 분리 및 결합성

그림2, 3의 결과에서 근류균과 lectin과의 결합친화성을 확인하였으나 좀더 구체적으로 근류균의 세포벽 구성성분과의 결합특이성을 살펴보기 위하여 lipopolysaccharide를 分離하였다.

분리된 조LPS를 polysaccharide 부분과 lipid A 부분으로 분리하기 위하여 1% acetic acid로 100°C에서 가수분해하여 침전된 lipid A를 원심분리하여 제거하였다.

Polysaccharide가 용해되어 있는 상등액을 클로로포름으로 잔재의 lipid A를 제거한 후 sephadex G-50이 채워진 칼럼에서 겔 여과한 결과는 그림 5,6과 같으며 저분자의 LPS와 고분자의 LPS 부분으로 나타났다.

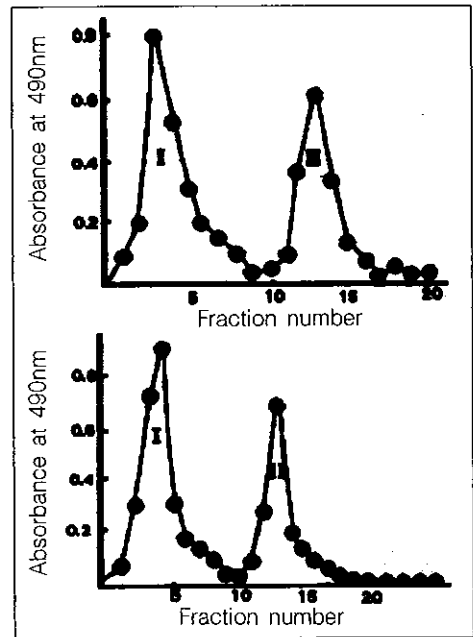


Fig. 4 Column chromatography of LPS released from the KCTC 2422(A) and KCTC 1537(B) lipopolysaccharides by mild acid hydrolysis on sephadex G-50. The lipopolysaccharide was eluted with 0.15M PBS (pH7.2). Each fraction was assayed by phenol sulfuric acid method.

이 결과는 근류균의 lipopolysaccharide는 그 구성성분이 약간씩 차이를 나타내고 있으며 Carlson (1978 등의 보고에 의하면 그램음성인 근류균은 종이나 균주에 따라 LPS의 조성이 약간의 차이와 유사성을 가지고 있으며 *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii* 등의 균주의 LPS 조성이 각각 다르다고 하였다.

Kato(1980) 등은 숙주식물의 Lectin과의 결합 특이성을 보고한 바 있어 근류균의 리포다당이 숙주세포와의 특이적 결합에 결정

적인 역할을 하는것으로 사료된다.

근류균의 근류형성능력과 비교해 볼때 *B. japonicum*은 대두와 *R. viceae*는 완두와 특이적으로 근류를 형성하여 질소고정력을 나타내었다는 결과 (강과 박, 1994)와 같이 추론해 볼때 근류균의 LPS와 숙주식물의 lectin이 상호 결합특이성을 가지고 있어, 숙주식물의 뿌리에 존재하는 lectin과 특이성을 가지고 결합되어 상호접종균을 형성하는 것으로 생각할 수 있었다.

근류균의 polysaccharide와 숙주식물의 Lectin과 상호 특이적 결합성을 확인하기 위하여 Sepharose- ϵ -amino carboxyl-

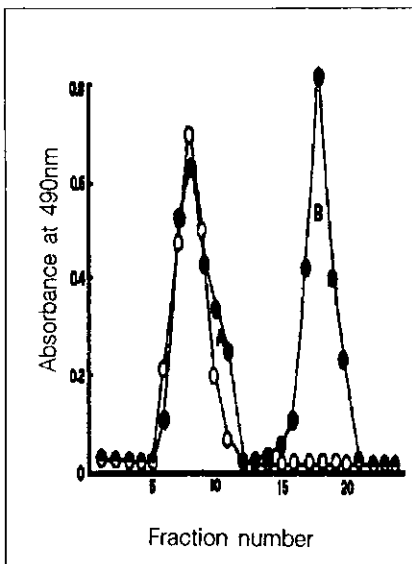


Fig. 5 Chromatography of the LPS from KCTC 2422(●---●) and KCTC 1537(○---○) a sepharose bound soybean lectin column. The LPS was applied to the column in a pH 7.0 imidazole buffer. The column was washed at the point indicated by the arrow with a pH 3.0 Glycine buffer. LPS was determined by

the phenol-sulfuric acid assay. β -D-galactosamine에 대두의 lectin을 미리 conjugation시켜 놓은 상태에서 분리한 근류균의 polysaccharide용액을 가하여 glycine완충액(pH 3.0)으로 용출시킨 결과는 그림 5와 같다. *B. japonicum*의 polysaccharide는 대두의 종자에서 분리한 lectin과 특이적 결합하였고 *R. viceae*는 대두의 lectin과 결합하지 않음을 보이고 있다.

이 결과는 *Rhizobia*의 O-antigen인 lipopolysaccharide와 숙주세포의 lectin 간 특이적인 결합성이 있음을 추정할 수 있으며, lectin과 근류균의 LPS가 상호인지하고 lectin과 표층다당이 결합함을 나타내며 근류균의 종간 항원적 차이가 있음을 나타내고 있다. 따라서 이러한 상호인지 작용은 근류균의 종간 항원적 차이로 인한 숙주 친화성이 결정된다고 추론할 수 있었다.

이상의 결과는 숙주식물의 lectin과 근류균의 polysaccharide (O-antigen)의 상호작용으로 두과작물과 근류균의 종간에 고도의 특이성을 나타낸다는 가설을 뒷받침 할 수 있었다.

이는 두과작물과 성공적인 공생의 확립에 근류균의 세포구성성분이 관여한다는 것의 확인으로서 숙주 인식과정에서 lectin이 관여한다는 사실을 증명할 수 있었다.

적 요

근류균과 두과작물의 공생에서 숙주결합성을 조사하기 위하여 대두 종자 및 밭유근으로부터 분리한 lectin과 근류균의 표층다당과의 결합성을 확인한 결과는 다음과 같다.

팥달, 백운 및 황금으로부터 분리한 종자

선을 형성하였다. 대두 종자 lectin 및 뿌리 추출물은 *R. japonicum* 및 *B. japonicum* 과 결합하였고 *R. viceae*와는 결합 하지 않았으며 완두의 lectin은 *R. viceae*와 결합 하였으나 *R. japonicum* 및 *B. japonicum* 과는 결합 하지 않았다. *B. japonicum* 과 *R. viceae*로 부터 분리한 세포표피 다당의 겔 여과한 결과 두개의 분획으로 각각 나타났다. *B. japonicum*으로 부터 분리한 표피 다당은 대두의 종자 lectin과 결합하였으나 *R. viceae*로 부터 분리한 표피다당은 대두 lectin과 결합하지 않았다. 이상의 결과로 부터 근류균이 숙주세포와 결합할 때 숙주를 인식하는 초기 단계에서 lectin이 관여함을 추론할 수 있고 이것이 상호접종균을 형성하는데 매개역할을 하는 것으로 추정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Baily, G.S.: Immunodiffusion in gels. In, Method in Molecular Biology, Walker, J.M.ed., Vol.I: Proteins. 1984 Humana press Clifton, Newjersey
- 2) Brink, B.A., J. Miller, R.W. Carlson and K.D. Noel:1989, Expression of *R. leguminosarum* CFN42 genes for lipopolysaccharide in strains derived from different *R. leguminosarum* soil bacteria. J. Bacteriol., 172 : 548-555.
- 3) Caetano-Anollés, G. and G. Favelukes : 1986, Host symbiont specificity expressed during early adsorption of *rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa. Appli. Environ. Microbiol., 52 : 377-382.
- 4) Carlson R. W. :1982, Surface chemistry P. 199-234. In W.J. Broughton (ed.), Nitrogen Fixation: *Rhizobium*, Vol. 2 Clarendon press, Oxford.
- 5) Carlson, R. W., R. E. Somders, C. Napoli and P. Albersheim :1978, Host symbiont interactions. III. Purification and Characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. Plant Physiol., 62 : 912-917.
- 6) Carlson, R. W., S. Kalembasa, D. Turowski, P. Pachori and K.D. Noel :1987, Characterization of the lipo polysaccharide from *R. Phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. J. Bacterol. 169 : 4923-4928.
- 7) Carrion, M., U.R.Bhat, B. Beuhs and R.W. Carlson:1990, Isolation and characterization of the lipopoly saccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol., 172 : 1725-1731.
- 8) Dazzo, F. B., and W. J. Brill : 1979, Bacterial polysaccharide which binds *Rhizobium trifolii* to clover root hairs. J. Bacteriol., 137 : 1362-1373.
- 9) DeMaggd, R.A., A.S.Rao, I.H.M. Mulder, L.G. Roo, M.C.M. von Loosdrecht, C.A. Wijffelman and B.J.J. Lugtenberg:1989, Isolation and characterization of mutants of

- R. legu minosarum* bv. *viceae* 218
with altered
- 10) Gade, W., M.A. Jack, J.B. Dahl, E.L. Schmidt and F. wold: 1981, The isolation and characterization of a root lectin from soybean(*Glycine max* , cultivar Chippewa). *J. of Biol. Chem.*, 256 : 12905-12910.
 - 11) 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-galactopyrano-sylamine. *FEMS letters*, 24:193-196
 - 12) Grabar, P., Williams, C.A. Jr : 1953, *Biochim. Biophys. Acta* 10 : 193.
 - 13) Halverson L.J., and G. Stacey : 1986, Effect of lectin on nodulation by wild type *B. japonicum* and nodulation defective mutant. *Appli. and Environ. Microbiol.*, 51 : 753-760.
 - 14) Hitchcock, P.J. and T.M. Brown : 1983, Morphological heterogeneity among *salmonella* lipo polysaccharide chemotypes in silver stained polyacryl amide gels. *J. Bacteriol.*, 154 : 269-277.
 - 15) Hrabak, E.M., M.R. Urbano and F. Dazzo: 1981, Growth phase dependent immuno determinants of *Rhizobium trifolii* lipopolysaccharide which bind Trifoliin A, a white clover lectin. *J. Bacteriol.*, 148 : 697-711.
 - 16) Johnson, K. G. and M. B. Perry : 1975, Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 22 : 29-34.
 - 17) Kato, G., Y. Maruyama and M. Nakamura : 1980, Role of Bacterial polysaccharides in the adsorption process of the *Rhizobium*-pea symbiosis. *Agric. Biol. Chem.*, 44 : 2843 -2855.
 - 18) Lis, H. and N. Sharon: 1974, Soybean(*Glycine max*) agglutinin. In, *Methods in enzymology*, Vol. 28 part B: complex carbohydrate 28 : 360-368.
 - 19) Puvanesarajah, V., F. M. Schell, D. Gerhold and G. Stacey : 1987, Cell surface poly-saccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant. *J. Bacteriol.* 169 : 137-141.
 - 20) Tully, R. E. : 1985, New culture media to suppress exopolysaccharide production by *R. japonicum*. *Appli. Microbiol. Biotechnology*, 21 : 252-254.
 - 21) vanDen Bosch, K.A. N.J. Brewin and E.L. Kannenberg: 1989, Developmental regulation of a *Rhizobium* cell surface antigen during growth of pea nodules. *J. Bacteriol.*, 171 : 4537-4542.
 - 22) Westphal, O. and K. Jann: 1965, Bacterial lipopolysaccharides. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5 : 83-91.