

*Bradyrhizobium japonicum*의 저온 전처리에 의한 환경스트레스 내성 증진에 대한 연구

유지철 · 노재상 · 오은택 · 소재성*

인하대학교 공과대학 생물공학과, 초정밀 생물분리연구센터

*Bradyrhizobium japonicum*은 콩과 식물의 뿌리에 감염하여 뿌리혹을 형성 질소를 고정하는 독특한 능력을 갖는 토양 세균이며 미생물 비료제로 사용되고 있다. 본 연구에서는 저온에서 전처리한 *B. japonicum* 균주를 여러 가지 환경 스트레스 조건에 노출하였을 때 생균수의 변화를 확인하였다. 저온 전처리는 16 시간 동안 4°C의 조건을 유지했다. 다양한 스트레스(알콜, 과산화수소, 고온, 건조)에 노출하였을 때, 저온 전처리한 것이 그렇지 않은 것보다 10~1,000배 정도 높은 생균수를 유지하였다. 이러한 내성증진 현상에 전처리 동안 새로운 단백질 합성이 수반되는 것을 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol을 전처리 과정에 포함하여 확인하였다. 저온 스트레스 내성에 관여하는 유전자를 *B. japonicum* genome으로부터 증폭하였고 염기서열 분석을 실시하였다. 실험에서 확인된 *B. japonicum*의 Csp (Cold shock protein) 단백질의 부분적 아미노산 서열은 이미 확인된 다른 균주의 Csp 단백질과 유사함을 확인하였다.

Key words □ *Bradyrhizobium japonicum*, cold adaptation, csp, stress response

질소고정 균주인 rhizobia는 그람 음성균으로 운동성을 가지고 있으며, 콩과식물이 rhizobia에 의하여 감염되면 뿌리혹(root nodule)을 형성하며, 기체상의 질소(N₂)를 수소와 결합된 상태의 질소(NH₃)로 전환시키는 질소고정(nitrogen fixation)이 이루어지게 된다. 콩과식물-rhizobia의 공생관계에서 이루어지는 질소고정은 농업적으로 대단히 중요한 의미를 가지며 사실상 토양 중에 존재하는 화합물 형태의 질소는 이에 의한 것이다. 시비를 하지 않은 토양의 경우 질소 결핍은 당연한 결과이나 이와 같은 토양 조건하에서 뿌리혹을 가진 콩과식물은 질소결핍의 문제점을 스스로 해결하여 질소가 결핍되어 식물이 생장할 수 없는 토양 조건하에서도 생육이 가능하다(14).

환경내 방출용 미생물의 경우 환경 스트레스와 관련하여 전처리 효과에 대한 많은 연구가 되어왔다(1,12). 37°C에서 배양한 *E. coli*를 6 시간동안 10°C에서 저온 전처리 한 후 냉동시켰을 때, 저온 전처리를 하지 않은 것에 비해 미생물의 활성이 높아진다고 보고된 바 있다(4). 또한 저온 전처리한 *Bacillus subtilis*와 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*에서도 저온 전처리하지 않은 경우보다 냉동 조건에서 훨씬 큰 생균력을 갖는다(11,17). *Enterococcus faecalis*를 저온에서 cryotolerance가 증가된다는 보고도 있다(15). 나아가 회분식 배양에서 회수한 미생물을 저온으로 전처리 하였을 경우, 그렇지 않은 미생물보다 높은 활성을 갖는 것으로 여러 연구에서 확인되었다(6). 그러나, 이러한 현상은 일반적인 것은 아니다. 예를 들어, 다양한 미생물 32속과 135종을 포함하는 259균주중 냉동에 대해 저항력을 갖는 것은 몇 개의 종

과 속에 특이적이고 몇몇 저온성 미생물은 냉동 저장에 오히려 민감한 것으로 알려져 있다(16). 25°C에서 5°C로 저온 전처리한 *Thiobacillus ferrooxidans*는 -15°C의 냉동 조건에 대해 영향을 확인하지 못했으나(8), 유산균에서는 적지 않은 균주가 10°C에서 저온 전처리 효과를 나타낸다(9,10). 따라서, 저온 전처리가 미생물이 스트레스에 대해 어떻게 반응하는지에 대한 기초가 되는 기초를 이해하는 것이 필요하고, 이것은 환경내에서 미생물의 성장과 유지를 성공적으로 조절하는 것에 결과적으로 도움이 된다고 할 수 있다.

미생물은 저온 전처리 하였을 경우 cold shock에 의해 특정반응(방어기작)을 하게 되는데, 크게 나누어 생화학적 반응과 분자수준에서 방어기작을 하게 된다. 일반적인 생화학 반응으로 세포막의 구조적인 변화가 있고 Csp (cold shock protein (3,5,7)와 CAP (cold acclimation protein)같은 특정 단백질을 생산하는 기작이 알려져있다(2).

본 연구에서는 환경 스트레스(고온, 건조, 알콜, 그리고 산화적)에 노출되었을 때 저온 전처리가 미생물의 생장에 어떠한 영향을 주는지 *B. japonicum*을 대상으로 실험을 수행하였다. 또한 저온 전처리 과정에 신규 단백질이 생성되며 이러한 단백질 생성이 환경 스트레스 내성증진에 필수적임을 확인 하였다. 나아가 *B. japonicum*의 저온 충격단백질(Csp) 유전자를 분자수준에서 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

실험에 사용된 균주는 토양 미생물인 *B. japonicum* 61A101c

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 032-860-7516, Fax: 032-875-0827
E-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

를 이용하였다. AMA (mannitol 10 g; yeast extract 1 g; NaCl 0.2 g; K₂HPO₄ 0.5 g; MgSO₄ 0.2 g; FeSO₄ 0.005 g; D.W. 1,000 ml)배지에서 배양하였고 배양조건은 28°C, 150 rpm이었다. 단백질 저해 물질인 chloramphenicol은 최종농도를 50 µg/ml이 되도록 사용하였으며, chloramphenicol은 50S ribosomal unit의 peptidyl-transferase에 비가역적으로 결합하여 단백질 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다(13).

저온 전처리 실험(Cold adaptation test)

B. japonicum 61A101c를 AMA배지에서 후기 성장기나 초기 정제기인 배양액을 저온 전처리 조건인 4°C와 대조군인 28°C에 각각 16 시간(2배수 시간의 2배)동안 정치배양 시킨 후, 원심분리(8,000 rpm, 15 분)로 세포를 얻어낸 후 0.1 M phosphate buffer-ed saline (PBS, pH=7.2)에서 3회 세척한 후 0.1 M PBS를 OD₆₀₀ (Optical density)가 0.5~1.0 (CFU=0.5~1.0×10⁹)이 되도록 재현탁 하였다. 준비된 현탁액은 각각 시험관에 5 ml씩 분주하여 각각의 스트레스 조건은 에탄올(5, 10%), 과산화수소(100, 500, 1000 ppm), 열(42°C) 그리고 건조실험에 적용하였다. 스트레스 조건에 노출된 균주들은 각각에 대한 시간 단위로 생균수 측정을 위하여 colony counting을 실시하였다.

환경 스트레스 노출 실험

저온 전처리한 균주의 여러 스트레스(고온, 알콜, 산화, 건조)에 대하여 어떠한 영향을 갖는지 실험하기 위하여 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 고온 스트레스에 관하여는 배양액을 원심분리(15,000×g, 5 분)하여 세포를 수거한 후 PBS에 현탁한뒤 1.5 ml microtube에 1 ml씩 나누어 분배한 후 28°C와 42°C에서 각각 1 일 단위로 생균수를 측정하였다. 알콜에 대한 스트레스 영향을 확인하기 위하여 균주를 5, 10% 에탄올 용액에 현탁하여 0, 2, 4, 8 시간 동안 노출시킨 후 생균수를 측정하였다. 산화적 스트레스를 확인하기 위하여 현탁된 균주 5 ml에 100, 500, 1000 ppm의 H₂O₂를 첨가하여 각각 0, 20, 40, 60 분

동안 노출한 후 생균수를 측정하였다. 건조 실험은 6 mm의 filter paper (Whatman, England)를 멸균하고 각각에 5 µl씩 현탁액을 점종한 후 1~4 일 동안 건조시킨다. 생균수는 균주가 점종된 filter paper 10개를 1 ml의 증류수를 1.5 ml microtube에서 현탁한 후 측정하였다. 신규 단백질 생성을 확인하기 위해 단백질 저해제인 chloramphenicol (50 µg/ml)을 첨가하였다. Fig. 1은 환경스트레스 실험을 요약한 모식도이다.

csp 분석

Chromosomal DNA분리는 실험서를 참조하였다(13). PCR (Polymerase Chain Reaction)을 수행하기 위해 primer로 Csp1 (5'-CCC GAA TTC GGT ACA GTA AAA TGG TTC AAC GC-3')와 Csp2 (5'-CCC GGA TCC GGT TAC GTT AGC AGC TGG CGG GCC-3')를 사용하였다. 위의 primer는 *csp* 유전자를 가지고 있는 균주에서 보존적 염기서열을 분석하여 제작하였다(12). *csp* 유전자를 cloning하기 위해 각각 5' 양쪽에 *EcoRI*, *BamHI* site를 포함 시켜 제작하였다. *csp* 유전자를 증폭하기 위해 PCR 반응의 총량은 25 µl로, 1 ng template DNA, 10× reaction buffer, 10 mM dNTP mixture, 10 pmol primer (Csp1, Csp2) 그리고 2.5 U *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan)의 농도로 혼합하여 증폭하였다. 또한 대조군으로서 *E. coli* JM109를 포함시켰다. PCR 조건은 다음과 같다; pre-denaturation은 95°C에서 4 분, denaturation은 95°C에서 15 초, annealing은 50°C에서 30 초, elongation은 72°C에서 30 초를 30 cycles 수행했고, post-elongation은 72°C에서 4 분간 실시했다. 증폭된 DNA는 ethidium bromide (0.5 µg/ml)가 포함된 2.0% agarose gel을 사용하여 1×TAE (pH 8.0) buffer에서 전기영동으로 확인하였다. Size marker로는 100 bp DNA ladder (TaKaRa, Japan)를 사용하였다.

염기서열 분석

증폭된 *csp* 유전자의 염기서열을 확인하기 위하여 ABI PRISM 310 analyzer (Applied biosystems, USA)를 사용하였으며 유전자의 염기 서열을 아미노산 서열로 전환하고 상동성을 확인하기 위해 gene DOC program (ImmuneX Corporation, USA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

저온 전처리에 따른 스트레스에 대한 내성증진

외부 스트레스에 대하여 저온 전처리의 영향은 막 구조의 변화와 Csp의 합성으로 설명할 수 있다. 균주의 성장을 막의 유동성과 지질의 조성 및 기능에 의해 유지되는 침투성에 의해 좌우되는데 저온에서는 비포화상태의 지질 비율과 비포화 정도가 증가하고 잔기의 길이가 감소하며 메틸 잔기가 증가되는 것으로 알려져 있다(2). 또한 저온에서 살아남기 위해 신규 단백질을 합성하게 되는데 일정시간동안 저온에서 합성되는 Csp와 저온 배양동안 합성되는 CAP가 알려져 있다(11). 이러한 단백질은 여러

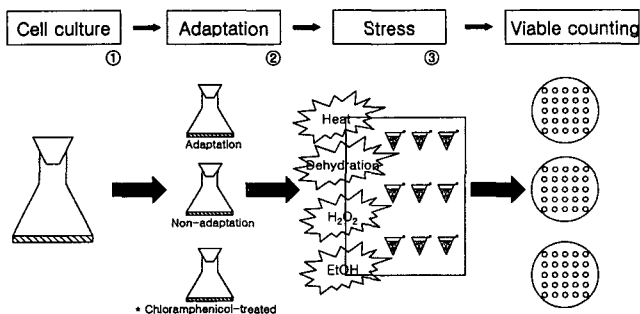


Fig. 1. Schematic drawing of cold adaptation test. ① Culture of cells to the late exponential or early stationary phase before adaptation. ② Adaptation for 16 hrs (ca. two generation times). ③ Heat (28°C, 42°C), H₂O₂ (100 ppm, 500 ppm, 1,000 ppm), ethanol (5%, 10%), and Dehydration. *In order to examine whether protein synthesis is required for the adaptation, chloramphenicol was added during adaptation period.

균주에서 확인할 수 있다(2,3,5,7). 또한 대부분의 Csp의 크기는 10 kDa이하이고 특히 뿌리혹 생성 균주인 *Rhizobium leguminosarum*는 6.1 kDa의 Csp를 합성하고 CAP로서 여러개의 단백질이 합성되는 것으로 알려져 있다(2).

저온 전처리의 고온 스트레스에 대한 내성 증진 효과를 확인한 결과, 42°C에 노출하였을 때 전처리 한 것이 그렇지 않는 것보다 100배이상의 생존력을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 1 일 동안 고온(42°C)에 노출 하였을 때, 전처리한 것은 초기 균체 수보다 100배 이상의 감소율을 보인것에 비해, 그렇지 않은 것은 1,000배 이상 감소한 것을 확인할 수 있다(Fig. 2). 2 일 후, 42°C에서 노출한 것은 생존수를 확인할 수 없었으며, 28°C는 대조군으로 포함시켰다. 알콜 스트레스에 대한 저온 전처리 효과를 확인하기 위하여 균주 현탁액에 에탄올을 농도별로 포함시킨 결과, 저온 전처리 효과로 1,000배 정도의 생존력이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 5% 농도에 노출했을 때 저온 전처리한 것은 4 시간까지 100배 감소하였고 그렇지 않은 것은 10,000배의 감

소를 확인하였으며 8 시간 이후에는 두 경우 모두 사멸하는 것으로 확인하였다. 10% 농도에서는 전처리함으로써 2 시간 이상 생존수를 유지시키는 것을 확인할 수 있다(Fig. 3). 산화적 스트레스에 대한 내성을 확인하기위해 과산화수소를 포함시킨 결과, 각 농도에서 모두 저온 전처리 효과를 확인할 수 있었다. 과산화수소 농도 100 ppm에서는 20 분 동안 처리한 결과 5 배정도, 40 분에서는 50배 이상의 생존수 증가를 확인할 수 있었으나 60 분 후에는 전처리 효과를 확인하지 못하였다. 500 ppm에 노출한 후 40 분 동안은 전처리한 균주가 높은 생존수를 유지함을 확인하였다. 1,000 ppm에서는 저온 전처리하지 않은 것은 급격히 생존력이 감소하였으나 전처리한 균주를 20 분이상 높은 생존력을 유지하였다(Fig. 4). 건조 스트레스에 대해 저온 전처리 효과는 4 일 후 전처리 하지 않은 균주에 비해 전처리 균주의 생존수가 100배정도 높음을 확인하였으며, 저온 전처리 과정에서 신규 단백질 합성 여부를 확인하기 위해 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol 처리한 실험군은 전처리 효과가 없음을 확인하

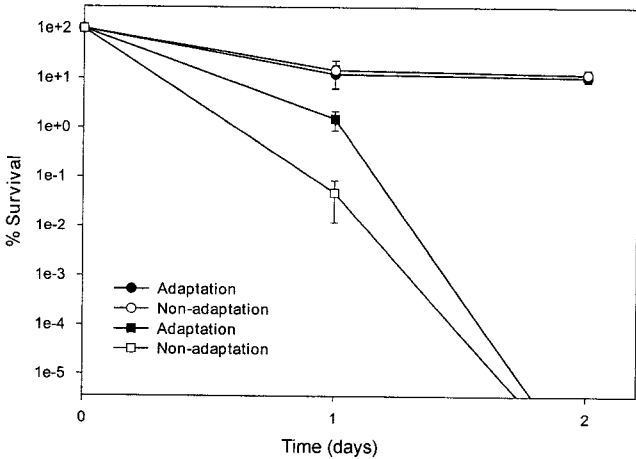


Fig. 2. Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to 28°C (circles) and 42°C (squares).

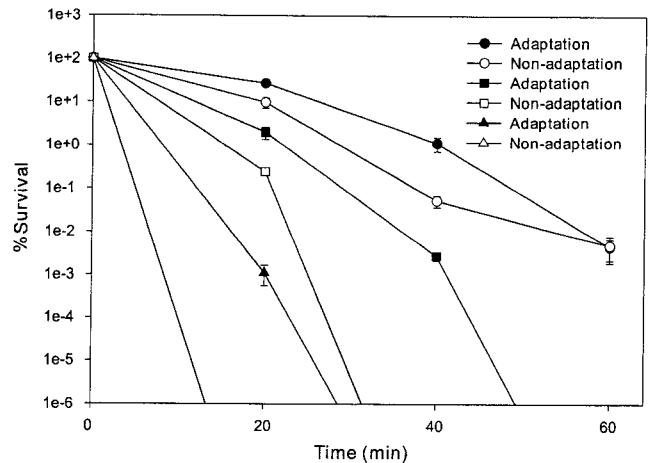


Fig. 4. Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to hydrogen peroxide(H_2O_2) at 100 ppm (circles), 500 ppm (squares), and 1,000 ppm (triangles).

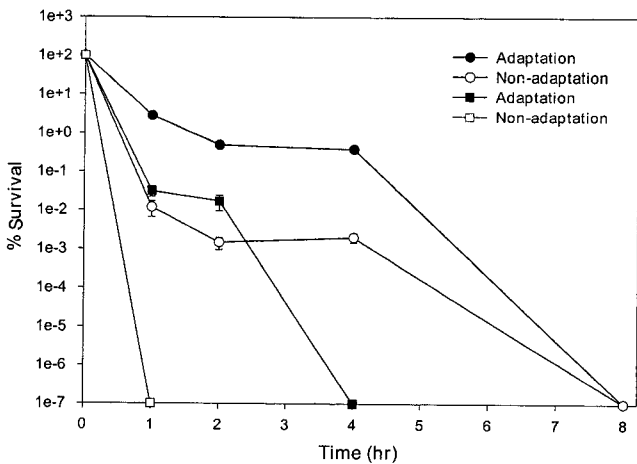


Fig. 3. Survival of cold-adapted and non-adapted *B. japonicum* after exposure to 5% (circles) and 10% (squares) ethanol.

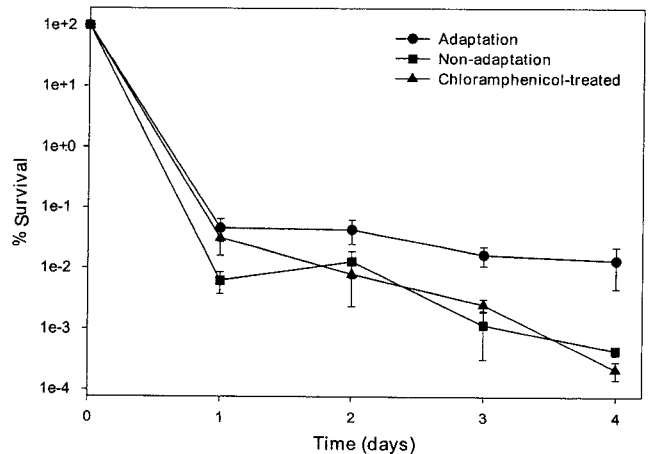


Fig. 5. Survival of cold-adapted (circles), non-adapted (squares) and chloramphenicol-treated (triangles) *B. japonicum* after dehydration.

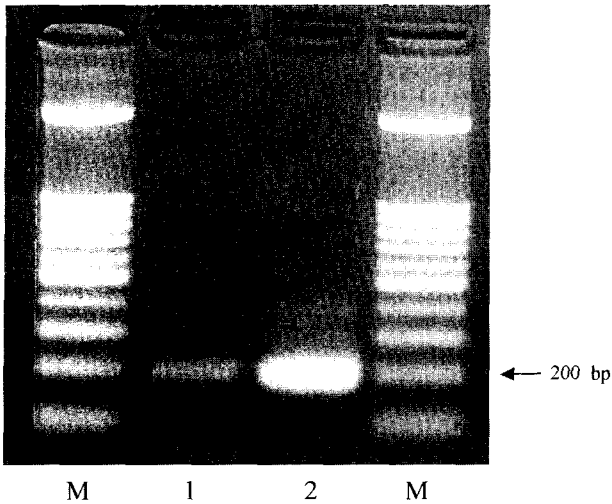


Fig. 6. PCR product of *csp* amplified from total genomic DNA of *B. japonicum* (1) and *E. coli* (2). M, size marker

	20	40
<i>B. japonicum</i>	QGFGFITPDDGSKDVFVHFXAIQNDGYKSLDEGQKVSFTIESGAKGPAANVT	
<i>S. meliloti</i>	GFGFITPDDGSKDVFVHFXAIQNDGYKSLDEGQKVSFTIESGAKGPAANVT	
<i>E. coli</i>	KGFGFITPDDGSKDVFVHFXAIQNDGYKSLDEGQKVSFTIESGAKGPAAGNVT	

Fig. 7. Similarity between the predicted Csp partial amino acid sequence from *B. japonicum* and other bacteria, *Escherichia coli* and *Sinorhizobium meliloti* by using Gene DOC program.

였다(Fig. 5). 따라서 저온 전처리시 내성 증진 효과가 신규 단백질 합성과 관련 있음을 확인하였다.

Csp 유전자 확인

저온 전처리가 주는 균주의 환경스트레스 내성증가는 저온 전처리 과정에서 새롭게 생성되는 단백질의 간접적 영향이 확인되었다(Fig. 5). 따라서 저온충격 관련 유전자인 *csp* 유전자를 확인하기 위하여 PCR 방법을 사용하였다. PCR 방법에서 annealing 온도는 50~55°C에서 heterologous primer를 사용하여 *csp* 유전자 부위를 증폭, 확인할 수 있었다. 대조균으로 저온 전처리 관련 유전자가 확인된 *E. coli*를 사용하였는데 *E. coli*보다 적은 양이긴 하지만 *B. japonicum*의 *csp* 유전자부위가 200 bp의 크기로 증폭되었다(Fig. 6). 증폭된 유전자의 염기서열을 분석하였으며, 이미 밝혀진 *E. coli*와 *Sinorhizobium meliloti*의 *csp* 유전자의 아미노산 서열과 비교한 결과, 본 실험에서 증폭한 *B. japonicum*의 유전자가 위의 균주에서 분리된 유전자 뿐만 아니라 다른 균주에서 분리된 유전자와도 아미노산 서열의 상동성을 보여줌을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

본 연구에서는 *B. japonicum*이 저온 전처리에 의해 일반적으로 균주가 환경에서 접할 수 있는 여러 스트레스에 대하여 내성이 증진되는지 여부를 확인하였다. 그리고 내성증진에 관여할 것으로 예상되는 *csp* 유전자를 분자적 수준에서 확인하였다. 이 균주를 저온 전처리 하여 생균제(질소비료 대체제)로 사용할 경우 환경내에서 생균력 증진 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 인하대학교 생명공학특성화사업단과 초정밀 생물분리연구센터의 지원아래 수행되었습니다.

참고문헌

1. Crist, D.K., R. Wyza, K.K. Mills, W.D. Bauer, and W.R. Evans. 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 895-900.
2. Drouin, P., D. Prévost and H. Antoun. 2000. Physiological adaptation to low temperatures of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* associated with *Lathyrus* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 32, 111-120.
3. Fujii, S., K. Nakasone, and K. Horikoshi. 1999. Cloning of two cold shock genes, *cspA* and *cspG*, from the deep-sea psychrophilic bacterium *Shewanella biolacea* strain DSS12. *FEMS Microbiol. Lett.* 178, 123-128.
4. Goldstein, J.S. Pollitt and M. Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. USA.* 87, 283-287.
5. Graumann, P., K. Schroder, R. Schmid, and M.A. Marahiel. 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178, 4611-4619.
6. Hartke, A., S. Bouche, X. Gansel, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1994. Starvation-induced stress resistance *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3474-3478.
7. Horton, A. J., K.M. Hak, R.J. Steffan, J.W. Foster, and A. K. Bej. 2000. Adaptive response to cold temperatures and characterization of *cspA* in *Salmonella typhimurium* LT2. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 13-20.
8. Hubert, W.A., G.D. Ferroni, and L.G. Leuduc. 1994. Temperature-dependent survival of isolates of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* 28, 179-183
9. Kim, W.S. and N.W. Dunn. 1997. Identification of a cold shock gene in lactic acid bacteria and the effect of cold shock on cryotolerance. *Curr. Microbiol.* 35, 59-83
10. Kim, W.W., N. Khunajkr, and N.W. Dunn. 1998. Effect of cold shock on protein synthesis and on cryotolerance of cells frozen for long periods in *Lactococcus lactis*. *Cryobiol.* 37, 86-91
11. Panoff, J.M., B.T. Vongs, J.M. Laplace, A. Hartke, P. Boutibonnes, and W. Auffray. 1995. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Cryobiol.* 32, 516-520.
12. Panoff, J.M., B. Thammavongs, M. Guéguen, and P. Boutibonnes. 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiol.* 36, 75-83.
13. Sambrook, J., E.F. Laboratory, Fritsch, and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
14. Stacey, G., J.-S. So, L.E. Roth, S.K.B. Lakshmi, and R.W. Carlson. 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples polysaccharides from bacterial differentiation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4, 332-340.
15. Thammavongs, B., D. Corroler, J.M. Panoff, Y. Auffray, and P. Boutibonnes. 1996. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 398-402
16. Wamasato, K., D. Okuno, and T. Ohtomo. 1973. Preservation of bacteria by freezing at moderately low temperatures. *Cryobiol.* 10,

453-463

5593.

17. Willmsky, S.P.A. and F.C. Neidhardt. 1990. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 87, 5589-

(Received November 20, 2001/Accepted December 20, 2001)

ABSTRACT: The Effect of Cold-adaptation on Stress Responses and Identification of a Cold Shock Gene, *cspA* in *Bradyrhizobium japonicum*

Ji-Chul Yoo, Jaesang Noh, Eun-Taex Oh and Jae-Seong So* (Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

Bradyrhizobium japonicum is a soil bacterium with a unique ability to infect the roots of leguminous plants and establish a nitrogen-fixing symbiosis, which has been used as a microbial manure. In this study, we examined the stress response after pretreatment of cells with cold temperature. When pre-treated with cold temperature (4°C) for 16 hr, *B. japonicum* increased the viability in subsequent stress-conditions such as alcohol, H₂O₂, heat, and dehydration. For cold adaptation, cultured *B. japonicum* was exposed to 4°C. Upon subsequent exposure to various conditions, the number of adapted cells pretreated by cold adaptation was 10-1000 fold higher than that of non-adapted ones. It appeared *de novo* protein synthesis occurred during adaptation, because a protein synthesis inhibitor, chloramphenicol abolished the increased stress tolerance. By using a degenerate PCR primer set, a *csp* homolog was amplified from *B. japonicum* genome and sequenced. The deduced partial amino acid sequence of the putative Csp (Cold shock protein) shares a significant similarity with known Csp proteins of other bacteria.