

植物根圈 및 土壤의 窒素固定

宋承達

경북대학교 생물학과

1. 序 論

土壤은 植物의 뿌리를 내리게 하여 수분을 비롯한 각종 大量 및 微量의 무기영양물질을 공급하며 植物의 성장과 생산성을 도모하고 있다. 그리고 土壤生態系는 각종 기능을 갖는 微生物과 植物의 뿌리 및 많은 소동물에 이르기 까지 다양한 生物相과 무기 환경사이에 유기적 관계에 의해 발전하고 있다. 이 土壤生態系에 있어서 가장 중요한 元素는 모든 생명체의 본체인 단백질의 기본요소로 되고 있는 窒素인 것이다. 대기의 3/4을 차지하는 窒素는 不活性의 가스로서 生物體가 전혀 이용하지 못하므로 필요한 화합태의 窒素 즉 암모니아와 窒酸態窒素 등은 반드시 自然상태에서 生物的 또는 인공적으로 固定되어야 하는 것이다. 지구상에 다양하게 존재하는 自然生態系에 있어서 중요한 窒素源이 되고있는 대부분의 窒素화합물은 土壤중에 널리 분포하는 각종 原核 生物에 의해서 生物的으로 窒素固定이란 過程을 이용하여 공급되고 있다. 한편 土壤의 根圈은 微生物에 의해 도전받고 있는 중요한 서식지이다. 土壤은 구조와 무기조성 및 物理化學的 특성과 수분을 유지하며 많은 土壤微生物의 경쟁적 또는 길항적 작용과 균형된 성장에 의해 서식지의 형성 및 발전이 이루어 진다. 이러한 土壤의 여러 환경 조건과 生物반응의 제過程은 土壤生態系에서 植物과 協生的 관계를 갖는 微生物의 窒素固定능을 위해서 대단히 중요한 것이다. 그리고 窒素의 循環過程에는 窒素固定을 비롯하여 각종

生物에 의한 窒素동화와 窒化作用 및 脫窒作用 등이 生態系내에서 균형을 이루어 가게 하고 있다. 본문에서는 植物根圈 및 土壤의 窒素固定에 대하여 최근의 연구성과 특히 각종 窒素固定生物의 窒素固定活性의 調節과 그 分子生物學的 연구 내용을 간단히 기술하고자 한다.

2. 窒素의 循環

窒素는 地球上에 각 종의 형태로 존재하고 있으며 전체 窒素量의 97.8%인 193×10^{15} 톤은 지각의 암석에 포함되어 있고 대기중에는 약 2%인 3.9×10^{15} 톤이 존재하고 있다(그림 1.). 生物圈에서 生物이 이용할 수 있는 <固定된 窒素>는 인공적으로는 Haber-Bosch법에 의한 공업적인 窒素固定이 연간 약 40×10^6 톤이 되고, 그 외에 非生物的 窒素固定으로서는 대기중에서의 번개와 벼락에 의한 방전으로 固定되는 것이 연간 10×10^6 톤, 보이라 및 자동차 등의 기관에 의한 고온연소에서 약 20×10^6 톤, 成層圈에서의 오존작용에 의한 것이 약 15×10^6 톤, 화산이나 온천 등에 의해 방출되는 地球내부에서의 분출물에 약 0.2×10^6 톤 등이 추정되고 있다. 이들 自然현상에 의해 固定되는 窒素는 질산, 아질산 또는 암모니아 등의 형태로서 빗물과 함께 지표 토양에 도달하게 되고 연간의 總量은 약 85×10^6 톤에 달한다.

生物에 의한 窒素固定量은 窒素固定生物의 종류와 分布 및 그 現存量에 따라 변하고 窒素固定活性이 장소, 시기, 시간 및 환경조건 등에 따라 크게 변동하므로 정확한 추정은 어려우나 현재 연간 175×10^6 톤으로 추정되고 있다. 이 값은 人爲的 窒素固定量의 4배 이상으로서 地球生態系의 발전에 큰 역할을 하는 것이다. 한편 농업용지에서의 窒素固定量은 80×10^6 톤으로서 콩과 植物에 의한 것이 약 46%를 차지하며 삼림이나 초지를 비롯하여 사막에 이르기까지 널리 分布하는 비콩과의 근류植物과 남조류 그리고 많은 單生의

窒素固定菌에 의한 生物的 窒素固定의 기여가 높게 평가되고 있다.

生物에 의해 固定되는 窒素의 최초 생산물은 암모니아로서 생체에 유독한 물질이므로 축적되지 않고 곧 아미노산과 단백질의 합성에 이용된다. 즉 암모니아는 GS 酵素에 의해 글루타민을 형성하고 이어서 GOGAT 등의 酵素에 의해 글루타민산 등의 아미노산을 합성하게 된다. 土壤 중에 존재하는 암모니아는 窒化作用(nitrification) 즉 *Nitrosomonas*와 *Nitrobacter*에 의해 산화되어 NO_2 와 NO_3 로 되고 土壤의 窒酸態窒素은 植物에 흡수된 후 NiR 와 NR 에 의하여 암모니아로 還元되어 아미노산을 형성하게 된다. 모든 동물은 植物이나 微生物에 의해 형성된 아미노산과 단백질 및 핵산 등의 유기窒素화합물에 의존하고 있는 것이다.

모든 생명체의 유체는 분해되어 단백질과 아미노산으로 부터 암모니아를 형성하게 되고 土壤生態系에서 각종 微生物의 作用에 의해 代謝循環하게 된다. 그리고 窒素固定과 균형을 이루는 것은 *Pseudomonas denitrificans* 등에 의해 질산태의 窒素를 窒素酸化物(NO , N_2O)이나 分子상의 窒素로 바꾸어 대기중에 되돌리는 脫窒作用(denitrification)이 있다. 또한 극히 일부의 窒素(0.2×10^6 噸/年)는 生物圈의 循環으로 부터 분리되어 지표의 침적물층에 들어가고 있다.

3. 窒素固定 生物

대기중에 있는 不活性의 가스상 窒素分子를 일련의 還元過程에 의해 암모니아로 만들 수 있는 生物種은 모두 原核生物로서 생태학적 분류는 표 1과 같이 극히 제한된 종류에 불과하나 이들은 地球의 각종 生態系에 널리 分布하여 窒素화합물이 결핍된 土壤에서 生物群集의 형성을 가능케 하는 중요한 pioneer

의 역할을 하고 있는 것이다.

Hellriegel과 Wilfarth(1886-8)에 의해 대기窒素의 固定이 처음으로 증명되고 Beijerinck(1888)에 의해 窒素固定菌의 분리가 성공된지 100년이 지난 현재 각종 窒素固定生物의 分布와 單生 및 共生관계 그리고 생리생태와 酵素學的 또는 分子生物學的 연구성과가 많이 축적되고 그 응용면의 활용도 증가하고 있다.

單生窒素固定生物은 다른 生物(植物 또는 微生物)과 共生관계를 갖지 않고 자유생활상태에서 자가영양적 또는 타가영양적으로 窒素固定을 하는 微生物로서 *Azotobacter* 등의 호기성세균을 비롯하여 *Klebsiella* 등의 혐성혐기성세균과 *Clostridium* 등의 혐기성세균, 그리고 *Chromatium*, *Rhodospirillum*, *Chlorobium* 등의 光合成세균 및 *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix* 등의 남조류로 대별되며 세계 각지에 널리 分布하고 있다.

共生的窒素固定生物이란 두 종류의 生物이 서로 共生관계를 갖는 것으로서 窒素固定菌은 宿主로부터 光合成산물의 공급을 받아 에너지源으로 이용하여 窒素固定을 하는 것이다. 예로서 많은 콩과植物과 그 근류균인 *Rhizobium*균의 共生은 근류라는 宿主特異성을 갖는 특수한 조직과 박테로이드를 형성하여 높은 효율의 窒素固定活性을 갖고 있다.

한편 콩과植物은 種子植物중 국화과와 난초과에 다음 가는 세번째로 큰 과이며 실거리나무아과, 자귀나무아과 및 콩아과로 구분되고 약 700 屬, 12000 - 14000 種이 전세계에 分布하고 있으며, 그 형태 및 생태에 있어서 변이가 많아 일부는 水生植物도 있으나, 대부분은 陸上에서 생육하고 열대에서 한대에 이르기 까지 평지나 고산지에서도 널리 分布하여 다양한 환경에 잘 적응하고 있다.

근류의 형성은 실거리나무아과에서는 약 25% 정도이나 자귀나무아과와 콩아과

에서는 90%이상으로 알려지고 있다. 근류군중에는 성장속도가 빠른 *Rhizobium* 속과 성장속도가 느린 *Bradyrhizobium* 속이 있고 각각 宿主特異性에 따라 相互接種群이 형성되고 있다. 이 외에 비콩과植物 가운데서도 오리나무속, 보리수나무속 및 소귀나무속 등에서는 *Frankia*라는 방선균에 의하여 共生근류가 형성되고 窒素固定이 이루어지고 있다. 한편 남조류와 *Azolla*, 지의류 또는 소철 등과의 共生관계에 의한 窒素固定이 열대의 生態系에 있어서 중요한 기여를 하는 것으로 알려지고 있다.

최근에는 벼과植物을 비롯한 각종 高等植物의 根圈에서 協生的관계에 의한 窒素固定의 기여에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. 즉 *Azospirillum* 속과 같은 微好氣的 세균은 高等植物의 뿌리표면에 부착하거나 표피내에 들어가서 뿌리의 배출물 또는 세포간 즙액을 代謝 및 에너지源으로 이용하여 窒素固定을 하는 것이다.

4. 窒素固定酵素와 그 活性

각종 窒素固定生物에 의한 窒素固定機作과 그 活性의 調節에 대한 연구는 1960년 중반부터 無細胞系에서 活性을 유지하는 窒素固定酵素(nitrogenase)의 추출 및 정제가 이루어져서 최근 많은 발전을 보게 되었다. 즉 모든 抽出, 처리 및 분리과정에서 질소 가스를 지속적으로 공급하며 dithionite(2 mM) 처리에 의해 엄격한 嫌氣的條件을 유지하고, lysozyme, DNase 처리 및 초음파처리하여 만든 無細胞抽出物을 초원심분리하여 DEAE-52 셀룰로스칼럼 크로마토그래프에서 250 mM NaCl을 포함한 tris - buffer에 의해 溶出되는 Mo와 Fe를 함유하는 갈색의 단백질 분획 I과 450 mM NaCl을 포함하는 tris - buffer에 의해 溶出되는 Fe를 함유하는 황색의 단백질 분획 II로 구성되어

있다.

분획 I은 MoFe 단백질로서 다시 嫌氣的으로 열처리, 겔 여과, PEG 침전 및 PAGE에 의해 순수분리 정제되고, nitrogenase라고도 부르며, 분자량은 220,000 - 270,000으로서 4개의 서브유닛트를 갖는 산성단백질이고, 분자당 Mo 2, Fe 24-28 및 산불안정 S 24-26 원자를 함유하고 있으며, 2,200 nmole C₂H₄.mg⁻¹min⁻¹의 높은 最大比活性을 나타내었다.

분획 II는 Fe 단백질로서 nitrogenase reductase라고도 하며 역시 嫌氣的으로 열처리, 겔 여과 및 PAGE에 의해 순수분리 정제되고, 분자량 55,000 - 68,000 으로서 2개의 서브유닛트로 구성되는 보다 산성의 단백질이며 분자당 Fe와 산불안정 S을 각각 4원자 갖고, 2,000 nmole C₂H₄.mg⁻¹min⁻¹정도의 最大比活性을 갖고 있다(표 2).

이들 酵素단백질의 아미노산 組成은 균의 종류에 따라 다른 連關度를 나타내고 있다. 酵素活性을 위한 反應혼합액은 DT(1 mM)을 還元劑로 하고 ATP(5uM) 및 그 재생기구를 필요로 하여 40 uM의 인산클레아틴, 14.5unit의 클레아틴산인산酵素및 25uM의 Mg acetate 와 0.5uM 의 MnCl₂ 및 30uM의 MOPS 완충액으로 10%(V/V)로 가하여 30°C의 강한 진탕배양을 하면서 일정한 시간 간격으로 가스량 0.5ml씩 채취하여 GC(FID)에서 還元된 에틸렌량을 검출하여 비활성을 측정한다.

窒素固定의 反應基質은 먼저 炭素源의 산화과정에서 공급되는 전자를 ferredoxin에 전달받아 Fe 단백질이 還元되고, 다음에 MoFe 단백질을 還元시켜 基質인 N₂를 還元하여 암모니아를 생성하는 것이다.



이 還元力은 N₂이외의 基質에 대해서도 反應하며 즉 2 H⁺나 C₂H₂을 還元시켜 H₂나 C₂H₄를 생성하게 되고, 특히 아세틸렌(C₂H₂)의 還元은

가스크로마토그래프에 의해 窒素固定活性의 신속 정확한 측정방법이 발견되어 그 활용성이 매우 큰 것이다. 이들 酵素는 酸素에 대해서 대단히 불안정하여 공기중에서는 수 분 이내에 실활하게 되므로 液體窒素에 보존할 수 있고, pH 중성 및 35 °C전후의 온도에서 最適의 活性을 나타낸다.

5. 窒素固定活性의 調節

1) 窒素固定에 대한 生長物質의 影響

窒素固定生物의 生長 및 窒素固定 酵素活性은 각종 유기 및 무기물질의 환경요인에 의하여 調節되고 있다. 窒素固定菌에 의한 植物細胞 組成의 基質物質, mucilages 및 뿌리 분비물 등의 이용은 근권에서의 성장과 root colonization 및 協生的 窒素固定活性을 위해 필수적인 것이다. *Azospirillum* spp.는 이들 물질이나 뿌리의 分泌物에 대한 chemotaxis 및 유기산이나 당의 이용에 있어서 흥미로운 反應을 보여주고 있다. *A. lipoferum*(Al)은 포도당을 이용할 수 있고, *A. amazonense*(Aa)는 설탕을 이용할 수 있는 균종에 따라 당의 吸收와 이용을 위한 다른 代謝過程이 있음을 시사하는 것이다.

Al와 Aa는 여러가지 아미노산을 炭素원과 窒素원 및 에너지원으로서 이용한다(표 3). 窒素固定은 고濃度の 아미노산에 의해 阻害되었으나, ab에서는 저濃度の 글루타민산으로 窒素固定活性이 약간 촉진되었다(그림 2). 반면에 Ab와 Ah는 아미노산을 炭素원과 窒素원 및 에너지원으로서 거의 이용하지 못하며 고濃度の 글루타민산에서도 窒素固定은 阻害받지 않았다. 글루타민산의 이용效率이 이와 같이 다르게 되는 생리학적 근거는 아마 글루타민산의 吸收에 대한 glutamate dehydrogenase와 글루타민산 아미노전이 酵素의 活性이 다르기 때문일 것이다(Hartmann, 1988).

Polymer물질에 대해서 *Azospirillum* spp.는 짚, xylan 및 hemicellulose를 이용하여 生長하며 窒素固定을 한다(Ladha,1986). 또한 Cellulose 分解 박테리아와 동시배양하면 窒素固定活性이 나타나고 自家영양적인 生長능력이 보다 광범위하게 적응한다 (Tilak,1986). 최근에 분리기제된 Ah를 비롯하여 다른 *Azospirillum* spp.도 methanol이나 다른 C1 化合物을 이용하여 잘 자라고 窒素固定活性을 나타내고 있다. 이들은 또한 細胞壁物質인 pectin의 methyl group을 이용할 수도 있어 細胞壁分解酵素를 낮은 濃度이나마 生産하는 것으로 보고 있다(Tien,1981).

2) 암모니아와 酸素에 의한 窒素固定活性의 調節

窒素固定活性의 發現은 遺傳的 調節에 의하는 것으로서 Ab에서는 아마 窒素制限條件에서 nif gene의 전사를 活性化하는 nif A 형 調節이 작동되고 있을 것이다. 또한 窒素固定活性 자체는 환경요인에 의해 調節되는 것이다.

소량의 암모니아를 첨가한 후 *Azospirillum* spp.의 窒素固定活性은 光合成 細菌인 *Rhodospirillum rubrum*(Rr)에서와 마찬가지로 가역적으로 신속히 억제되었다(Hartmann, 1986). Ab와 Al에서는 암모니아에 의해 Fe단백질의 covalent modification 이 나타나고 있는 것이 금속추출 방법에 의한 면역-브롯팅 법으로서 증명되었다(Hartmann, 1985). nitrogenase活性의 switch off는 Fe-단백질의 ADP-ribosylation에 의한다(Pope, 1985). Aa와 *Herbospirillum seropedice*에는 NH₃ switch off에 대해 covalent modification이 나타나지 않고, 이들 細菌에서는 noncovalent 抑制機構에 의해 불완전한 抑制效率이 있다.

암모니아나 다른 窒素化合物에 의한 窒素固定酵素 活性의 신속한 抑制는 窒素固定細菌에 있어서 널리 알려져 있으나(Yoch,1986), "Switch off" 때의

Fe-단백질의 covalent modification은 몇 종류에서만 증명되고 있다 (Hartmann,1986) (그림 3). Fe-단백질의 調節에 있어서 活性化 및 不活性化 酵素가 관여함으로써 (Loery,1986), 아마 nitrogenase (窒素固定酵素) 調節의 微細調節 및 效率의 촉진을 하게 된다.

Ab와 Al은 活性化 酵素를 갖고 있어 Rr의 변형된 Fe-단백질을 活性化시킬 수 있다. Rr의 窒素固定酵素의 調節시스템은 Ab 및 Al의 것과 유사한 것이다.

嫌氣的 條件으로 배양하면 Ab와 Al의 窒素固定活性은 抑制되고 동시에 Fe-단백질이 變形된다. 그러나, 高濃度の 酵素에 의해서 窒素固定酵素 活性이 신속히 抑制될 때는 covalent 變形은 나타나지 않는다(Hartmann,1987). 嫌氣 條件에서 窒素固定酵素 活性의 減少는 NH₃에 의한 switch off 처럼 글루타민 pool의 증가가 없고, glutamine synthetase 活性의 변화도 없다(Hartmann, 1987). 따라서 窒素代謝의 독립적인 signal이 不活性化 酵素의 trigger로 되어 窒素固定酵素의 covalent modification을 촉진하게 된다. Oxoglutarate 濃度の 減少도 glutamate/oxoglutarate 比를 높이는 signal을 내어 窒素代謝의 調節에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다.

3) *Azospirillum* spp.에 의한 窒素化合物의 分泌

相互共生에 의한 效率的인 窒素固定을 위해서는 炭素/窒素의 교환이 필요 하다. *Peltigera*와 남조류 *Nostoc*의 協生에서는 좋은 예로서 *Sarcosine*이 *Nostoc*의 glutamine synthetase를 抑制하고 窒素固定酵素 活性과 암모니아 分泌를 촉진하는 調節子로서 알려지고 있다(Hallborn, 1984). Ab와 Aa의 窒素固定 배양에서는 저濃度の 글루타민산(Glu)과 아스파라긴산(Asp)으로 배양 하면 소량의 암모니아가 分泌된다(Hartmann, 1988). Glu과 Asp 및 그 유도 물질은 암모니아 合成酵素의 活性과 암모니아 吸收를 減少시키고 암모니아의

分泌를 촉진시키는 것이다.

植物體 유래의 effectors에 대해 窒素固定微生物이 풍부한 양의 암모니아, 아미노산 또는 다른 窒素化合物을 分泌하여 反應하는 것은 대단히 흥미로운 것이나, 이 化合物의 성질과 機作은 불명이며, 어떤 환경조건에서는 *Azotobacter chroococcum*(Ac)의 균주도 암모니아를 放出한다(Narula, 1986). 따라서 效率的 窒素固定菌株의 개발을 위해서는 glutamine synthetase, glutamate synthase와 glutamate dehydrogenase 및 ammonia permease의 調節 특성 등에 관한 많은 연구가 필요하다.

Azospirillum spp.도 에너지 고갈 條件의 배양에서는 ammonium permease 酵素의 不活性和 암모니아 合成酵素의 活性減少에 의해 소량의 암모니아를 放出하고 있다. 말산을 첨가하면 암모니아의 吸收는 빨리 再活性化 된다. 根圈에서 窒素의 分泌機構는 에너지 공급이 植物환경효과에 의하여 일시적으로 減少될 때나 또는 뿌리가 光合成의 minor sink로 되는 후기성장과정에서 나타난다(Curl, 1986).

Glutamine auxotrophic 變異株(Ab)는 glutamine synthetase나 glutamate synthase 缺乏條件의 窒素固定에서는 암모니아를 放出 또는 吸收하는 活性을 갖지 않는다. 최근에는 構成的으로 窒素固定을 하는 Ab의 prototrophic 變異株가 보고되었다. MSX 耐性인 Ab의 prototrophic 變異株에서는 構成的 窒素固定은 있으나 암모니아 放出은 없었다.

그러나 MSX 耐性的 *Anabaena variabilis* 및 *Nostoc muscorum*의 變異株는 窒素固定過程에서 암모니아를 放出하였고, 또한 窒素固定 活性이 촉진된 *Azotobacter* 變異株도 암모니아를 放出하였다. 窒素化合物의 放出機能은 協生的 窒素固定 박테리아에서 나타나고 이는 植物요인의 생리적 調節에 따르는 것으로 생각된다.

4) 酸素에 의한 窒素固定의 抑制와 醱素防禦機構

Azospirillum spp.는 모두 微好氣的 窒素固定菌으로서, 좁은 酸素耐性 범위에 의해 뿌리에서의 協生的 窒素固定에 한정되고 있다(Zuberer, 1986). 溶存酸素와 呼吸活性 및 아세틸렌 還元力을 함께 측정할 수 있는 Hochman 장치로서 窒素固定活性의 酸素耐性を 비교하면 Ab, Al, Aa 순으로 耐성이 증가한다(Hartmann, 1985). 같은 방법으로 암모니아에 전배양하여 窒素固定의 抑制를 여러 가지 酸素濃도에 대해 측정할 때도 酸素耐성의 차이를 보이고 있다(그림 4).

여러가지의 酸素濃도에 대한 窒素固定效率의 증폭이적 변이가 chemostat 배양에 의해 알려지고 있으나(Hurek, 1987), 酸素耐성의 변이에 대한 생리학적 근거는 확실하지 않다. 최근 酸素耐성이 있는 Aa에서는 酸素耐성의 hydrogenase의 活性이 발견되었으나 Ab와 Al에서는 그 活性이 나타나지 않았다(Fu, 1986).

Carotenoids는 독성의 酸素代謝物에 의해 나타나는 라디칼 反應을 抑制하는 능력이 있어 酸素耐성을 나타내며 自家酸化反應을 防禦하는 것으로 알려지고 있다(Burton, 1984). 적색의 Ab군주(Cd)에서는 diphenylamine에 의해 carotenoid의 生合成을 抑制하면 窒素固定活性의 酸素耐성이 減少된다(Nur, 1981). Carotenoids를 과다 生産하는 變異株인 적색의 Ab 야생형은 酸素 stress 條件에서 生長과 窒素固定을 하나 야생형은 생육하지 않았다. 높은 레벨의 carotenoids는 高濃度の 酸素에 대해서 최적의 窒素固定活性을 변화시키지는 못하나 酸素沮害에 대해 制限的 防禦를 하는 것을 알 수 있다.

Azospirillum spp.에서는 酸素에 의해 부분가역적인 窒素固定活性의 신속한 抑制가 나타나고 있다(Hartmann, 1987). 酸素에 의한 窒素固定 醱素活性의 가역적 抑制는 *Azotobacter*, 光合成細菌, 남조류, *Klebsiella pneumoniae* 그리고 嫌氣的 窒素固定菌에서도 유사하게 나타나고 있다(Dingler, 1985). 이 酸素에

의한 switch off는 窒素固定의 일반적인 현상이며 소위 *Azotobacter*에서 볼 수 있는 酸素防禦 단백질의 존재에 의하는 것은 아니라고 할 수 있다. 왜냐하면 순수분리한 *A. vinelandii*의 Fe₂S₂ 단백질(Shetna 단백질)에 대한 antiserum을 이용하여, *Azospirillum* spp., *R. rubrum* 및 *K. pneumoiae*에 대해 免疫-브롯팅법으로 조사한 결과에서, 免疫 cross reactive 단백질이 발견되지 않는다(Hochman, 1987). Goldberg 등(1987)은 높은 酸素濃度에서는 制限된 電子의 푸울이 呼吸으로 전환됨으로서 窒素固定酵素에 충분한 還元力を 제공 하지 못한다고 보고 있다.

好氣的 窒素固定菌인 *A. chroococcum*의 變異株는 구연산 合成酵素의 장애에 의해 呼吸能力이 減少되므로 窒素固定活性은 微好氣的 條件에서만 나타나고, 呼吸防禦는 높은 活性의 TCA cycle이 있을 때만 효과적으로 된다. *Azospirillum* spp.의 citrate synthase와 기타의 TCA cycle의 酵素活性을 *Azotobacter*의 것과 비교하면 *Azospirillum*의 呼吸防禦가 還元力の 公급에 있어서 缺乏되고 있음을 알 수 있다.

따라서 窒素固定活性의 酸素耐性を 개선하려는 시도는 충분한 電子에 의해 높은 呼吸率과 높은 窒素固定酵素 活性을 유지할 수 있는 呼吸能의 개량에 초점을 두고 있으며 이는 부분적으로는 *Azospirillum*에 대해 최적의 Fe를 公급하면 이루어질 수 있다. 왜냐하면 Fe는 많은 酵素의 중요한 구성요인이기 때문이다. 실험실에서 最少培地에 의한 배양을 하면 dihydroxyphenyl의 Fe 결합 化合物을 첨가할 때 Ab의 好氣耐性的 生長이 증가하였다(Das, 1984). 다른 微好氣的 細菌에서도 같은 효과가 발견되고 있다. 窒素固定의 酸素耐性は 細胞代謝의 많은 다른 기작과의 協동적 特性이라고 생각되고 있다(Krieg, 1986).

그러므로 酸素沮害에 대한 防禦는 *Azospirillum*에서 증명된 superoxid dismutase나 peroxidase의 레벨을 증가시키면 개선될 수 있다(Clara, 1985). 최근 酸

stress 하에서 chemostat로 선발된 Ab의 好氣耐性 變異株는 *Azospirillum* spp.에 있어서의 酸素耐性에 대한 개선 가능성을 보여주고 있으나(Del Gallo, 1987), 말산의 소모가 증가되어 窒素固定活性은 기대한 바와 같이 대단히 낮았다.

5) 滲透耐性和 滲透調節의 特性

微生物의 代謝活性은 물의 이용성에 따라 크게 影響을 받고 있다. 土壤 細菌은 鹽類가 침투된 土壤이나 건조한 土壤에서 water stress에 대항해야 한다. 건조지의 氣候에 자라는 植物의 根圈에서는 낮은 water potential이 흔히 나타나고 있다. 왜냐하면 植物의 증산에 많은 물이 필요하기 때문이다. 환경의 water potential의 변화에 적응하고 있는 微生物에서는 아미노산, betaines, 그리고 당과 같은 양면성 용질이 중요한 역할을 하고 있다(Imhoff, 1986). 이들 용질의 細胞내 축적은 細胞로 부터 물의 소실을 방지하고 양면성을 갖고 있으며 또한 酵素機能을 보존하기도 한다. 건조나 滲透 stress 하에서는 초본을 포함한 많은 植物도 betaines나 proline을 축적하고 있고, 이들 物質은 根圈의 微生物에도 이용되고 있다.

Azospirillum spp.에서는 滲透耐性이 種特異的 성질로 나타나고 Ah, Ab, Al, Aa 순으로 減少한다(Hartmann, 1987). 窒素固定酵素 活性은 salt stress에 있어서 窒素化合物에 대한 細胞의 성장反應보다 더 感수성이 크다(Rao, 1985). Aa의 窒素固定酵素 活性은 시험관내에서는 110 mM NaCl에서 50% 阻害되었으며, 細胞 전체의 窒素固定活性도 阻害되었다(Hartmann, 1987). 滲透 stress 상태에서 Ab와 Ah의 성장은 glutamate 또는 proline에 의해 촉진되나 Al과 Aa에서는 影響이 없었다. Al과 Aa는 glutamate와 proline을 炭素源 및 窒素源으로 效率적으로 이용하므로 아미노산을 滲透 stress시에 양면성 용질로 이용할

수 없다.

Betaine glycine(N,N,N-trimethyl glycine)은 Ab와 Ah의 窒素固定을 촉진하나 한편 抑制的 滲透 stress로도 된다(표 4). Glycine betaine은 낮은 濃度(0.1 mM)에서도 滲透耐性を 높이는데 충분하였다. Al은 choline과 glycine betaine을 炭素 및 窒素의 단독 공급원으로 하여 效率的으로 성장하였다. Al은 이들을 滲透保護劑로서 이용할 수 없으나, 대조적으로 Ah는 높은 親化力 ($K_m = 16\mu M$)으로 Choline을 吸收하여 이를 glycine betaine으로 酸化하여 가장 능률적인 osmolyte로 만들게 된다(Imhoff, 1986).

滲透耐性菌株은 proline, betaine 또는 choline과 같은 植物에서 유래하는 滲透保護劑를 除去할 수 있다. 이 관계를 이용하여 植物에 의해 betaine과 proline을 合成하는 能力을 보다 잘 규명하면 개량 재배 작물로서 활용할 수 있을 것이다. 鹽生植物 Kallar grass(*Leptochloa*)에는 Ah가 根圈에 서식하여 염분이 높을 때 고농도의 betaine과 proline을 축적한다. Na가 많은 알칼리 土壤에서 적응한 植物에서는 어떤 아미노산의 수송과 같은 細胞過程은 Na 이온을 필요로 하게 된다.

6) Fe 吸收特性

Fe는 窒素固定酵素와 에너지代謝 또는 酸素反應에 관여하는 많은 酸素의 필수적 구성요소이며 好氣的 생활 및 生物的 窒素固定에 있어서 필수원소이다. 그러나 Fe^{3+} 는 好氣環境에서는 거의 불용성이며 예로서 ferric oxyhydroxy polymers의 용해도상수는 10^{-38} 이다. 그러므로 대부분의 微生物은 效率的으로 Fe를 용해하는 저분자량의 복합물질인 catechols이나 hydroxamates를 생산하여 分泌한다(Neilands, 1984). 이들 chelaters(siderophores)는 微生物 特異的인 높은 친화성이 있는 吸收系에 의해 吸收되며 따라서 Fe를 同化하게 된다(Braun,

1985).

Fe 除去能力이 競爭과 感染에 있어서 절대적이라는 사실은 인체 병원균의 연구에서 명백히 되었다. 또한 根圈에서는 Fe 이용성이 중요한 병원성의 요인이 되므로서 微生物 사회의 구성에 대해 선택적 압력으로 되고 있다(Leong, 1986). Siderophores는 土壤에서 抽出되고 따라서 유효한 Fe에 대한 競爭은 土壤에서 微生物의 성장을 調節하는 요인으로 될 수 있다. 植物의 뿌리는 Fe 제한 상태에서 mugineic acid 또는 avenic acid와 같은 phytosiderophores를 分泌하는 것이 보고되고 있다(Romheld, 1986).

植物 根圈에 *Azospirillum* spp.와 같이 유용성이 있는 微生物이 형성되는 정도는 다른 微生物 및 植物과의 경쟁 또는 협동하는데 있어서 유효한 Fe 공급에 의한 활력에 따라 影響을 받을 것이다. *Azospirillum* spp.이 갖는 높은 친화성의 Fe 吸收力은 Fe 완전 缺乏 상태에서 고농도의 인산을 함유하는 最少培地와 인위적 Fe chelator인 a,a-dipyridil을 공급하여 조사하고 있다. 이 條件에서 *E. coli* K12는 높은 친화성을 갖는 siderophore enterochelin(적색)을 分泌하여 Fe를 除去 또는 同化함으로써 높은 농도의 Fe를 공급한 培地에서와 마찬가지로 성장할 수 있었다(Hider, 1984).

그러나 *Azospirillum* spp.에서는 여러 가지 정도의 抑制가 나타났다(그림 5). Ab에서는 Fe 同化效率이 다른 2가지 group이 있으며, Ab Sp245와 Nig5a는 Fe stress 條件에서 잘 자랐으나, Ab Sp7과 SpCd는 비교적 Fe 除去機能이 불량하였다. 최근에는 Al과 Ab의 siderophores에 대해서 조사되었으며, phenolate siderophores 2,3-dihydroxy benzoic acid와 3,5-dihydroxy benzoic acid의 아미노산 복합 물질임이 알려졌다.

E. coli, *Rhizobium* 및 *Agrobacterium* 등은 Fe 缺乏을 극복하기 위해 다른 微生物이 分泌하는 Fe chelater들을 Fe 운반체로서 유효하게 이용하고 있다

(Page, 1988). 외부 곰팡이나 細菌의 siderophores가 *Azospirillum* spp.의 성장에 미치는 影響을 a,a'-dipyridyl을 함유하는 Fe 缺乏의 最少培地에서 조사되었고, Al, Ab 및 Ab는 微生物 siderophores를 이러한 條件에서 이용할 수 없었으나, 두 종류의 Ab균주(Sp7과 Sp245)에서는 다른 反應을 보였다.

Ab菌株(Sp245)는 *Streptomyces* spp.의 대표적 siderophores인 ferrioxamine B를 이용할 때 *Streptomyces*가 우점인 根圈에서 성공적으로 colonization을 일으켰으며 우수한 Fe의 吸收特性을 갖고 있는 Ab菌(Sp245)은 Sp7에 비해 根圈에서 보다 성공적으로 형성된다는 흥미로운 보고도 있다(Baldani, 1986).

窒素固定細菌 *Azospirillum* spp.가 phytosiderophore인 mugineic acid에 결합된 Fe를 이용할 수 있는지에 대한 연구가 이루어 졌다(그림 6). Mugineic acid는 Fe를 缺乏시킨 보리의 뿌리 分泌物에서 분리되었다(Sagiura, 1984). Ab Sp7과 Sp245 및 Ab. Nig5a의 성장은 mugineic acid에 의해 影響을 받지 않았으나, 根圈細菌이 Fe요구에 대해 phytosiderophores를 이용하는 것은 흥미로운 사실이며, 뿌리 표면과 微生物의 endorhizosphere에 대한 성공적 colonization을 위해 중요하다고 생각된다.

環境條件(氣候 및 土壤型)에 따른 相互作用過程은 微生物 사회구조를 여러 가지로 규정하고 *Azospirillum*/ 植物의 協生을 調節하며 窒素固定活性和 植物 營養에의 기여를 調節하게 된다. 根圈에서 植物/微生物 및 微生物/微生物의 相互作用은 주어진 環境 및 土壤條件에 대해서 적당한 植物/微生物 간의 협조자 선택을 위해 규명되어야 할 과제라고 생각된다.

6. 窒素固定의 分子生物學的 調節

Dixon(1977)의 총설에 의하면 *Klebsiella pneumoniae*에서 窒素固定酵素의 生合成 過程과 그 活性을 지배하는 일련의 遺傳子群인 nif 遺傳子群은 17개의

연속된 遺傳子로 구성되고(그림 7), his 遺傳子 앞에 인접하여 존재하며, *E. coli*에서의 his 전이시에 cotransfer 하는 것이 알려졌다. 이들은 相補性, cloning 및 組成 분석에 의해 遺傳子 mapping 등의 수법이 발달함으로서 완성된 것이다.

이들 nif 遺傳子 중 nif F와 J는 전사 방향이 역방향이고 다른 遺傳子는 his 오페론 과 동일 방향이다. nif에 관한 遺傳子群의 作用機能을 분석하기 위해서는 각 遺傳子가 缺損된 菌株을 선발하여 분석하면 된다. 즉 17개의 nif 遺傳子 菌株의 特性은 다음과 같다.

nif Q는 FeMoco에 이용될 Mo ion을 가용화 상태로 유지하는 作用과 관련되고, nif B는 FeMoco 合成系의 缺損에 관계하며, nif A는 전사 調節을 하는 遺傳子에 관계되고 nif L.는 A에 인접하여 동일 방향으로 전사되어 制御的 機能에 관계한다. nif F는 nitrogenase에의 전자전달에 관계하고, nif M은 Fe 단백질을 완성하는데 관계하며, nif V는 MoFe 단백질의 결합 및 nitrogenase의 活性 부위의 合成에 관계하고, nif S는 Fe 단백질의 완성過程에 관여하며, nif M 및 nif V와 동일 프로모터에서 전사된다. nif N은 nif B에 닮아 FeMoco의 cofactor合成에 필수적이고, nif E는 FeMoco 合成에 관여한다. nif K는 MoFe 단백질의 構造 단백질인 60kd 서브유니트 合成을 지배하고 nif D는 MoFe 단백질의 서브유니트 構造遺傳子이며, nif N은 Fe 단백질의 構造遺傳子이다. nif J는 120kd의 전자 전달계이고 전사는 역방향이다. 이외에 nif U, X, Y 遺傳子가 알려지고 있다.

1) nif 전사

nif 오페론의 전사(transcription)는 종래 negative control의 예로서 생각해 왔으나 최근에는 positive control의 예로 보고, 특히 전형적인 cascade 機作的 현상으로 취급하고 있다. *K. pneumoniae*의 nif gene의 發現調節에는 두가지

레벨 즉 1) *nif* 特異的 制御부위에서 調節과 2) NH_3 와 O_2 존재에 의한 細胞 전체의 制御機構가 있다. Magasanik 등(1977)은 窒素固定菌 중 NH_3 同化的 필수酵素인 glutamine synthetase 缺損菌은 窒素制限 條件에서 窒素固定酵素의 合成이 나타나지 않음을 보았다. *nif* 전사는 NH_3 의 존재에도 影響을 받지 않으므로 NH_3 보다 glutamine synthetase 合成系가 窒素固定酵素 合成에 관계있는 것으로 생각한다.

glutamine synthetase 단백질이 窒素調節 오페론의 positive control에 직접 作用하는지 여부는 현재 알려져 있지 않다. glutamine synthetase의 構造 遺傳子 *gln A*의 發現에는 세가지 調節遺傳子가 관여하고 있다. 즉 *gln F*, *gln L* 및 *gln C*이고 *ntr A*, *ntr B* 및 *ntr C*를 같은 뜻으로 사용하고 있다. *K. pneumoniae*에서는 *ntr B*, *C*는 *gln A* 오페론 상에 link 되어 있으므로 *gln A*의 상류의 강력한 프로모터에서 함께 전사된다 (그림 8).

*gln A*와 *ntr B* 사이에 비교적 약한 중간 프로모터가 존재한다는 보고도 있다. *ntr C* 생산물(*Ntr C* 단백질)은 分子量 54,000으로서 2개의 서브유닛트이고 窒素調節 오페론의 전사活性化를 위해 필요한 것이다.

*ntr A*는 장내세균에서는 *ntr B*, *C*와 link되지 않으나, 窒素調節 오페론의 活性發現에 대한 調節에 관여하고 있다. *E. coli*와 *K. pneumoniae*의 *ntr A*의 생산물(*Ntr A*)은 分子量 75,000-85,000의 서브유닛트를 갖는다. *nif*의 전사에는 *Ntr A*와 *Ntr C*가 절대로 필요하고 *ntr B* gene은 관여하지 않아도 된다. *nif* gene 發現의 제 2단계는 *nif* 전사의 positive control 단계이다. *nif A* 變異株에서 *nif A*L이 窒素固定酵素의 peptide 합성에 관여하며, 즉 *Nif A* 단백질은 *nif* gene 전사의 positive activator로 됨을 볼 수 있다. *nif* 特異的 制御에는 *nif LA*의 산물(*Nif L*, *Nif A*)이 개재된다. *Nif L*은 酸素나 固定된 窒素의 중간대사물이 있을 때 *Nif A*의 活性和 길항적으로 作用한다.

암모니아 기아상태에서는 Ntr C와 Ntr A가 결합하여 Nif LA를 활성화하여 窒素同化에 관계한다. 예를 들면 hut(histidine utilization)나 put(proline utilization)와 같은 遺傳子를 활성화하지만 암모니아 과다 상태에서는 Ntr C 양이 감소하여 不活性的 형태로 된다. Ntr C 없이 Nif A가 충분한 레벨로 있는 경우 nif 프로모타를 자동적으로 활성화할 수 있다. 細胞内の 窒素源과 酸素가 전사活性的에 影響을 미치지 않고 nif gene의 發現을 저지하는 機作에는 두가지 방법이 있다. 첫째는 positive control의 요소를 不活性化 시키는 것이고, 둘째는 종래부터 있던 repressor 分子에 의한 negative control system이 調節 부위에 직접 관여하여 저지하는 것이나, 전자가 타당한 것으로 보고 있다. Nif L은 酸素 존재에 대해 민감하게 反應하여 窒素固定酵素의 合成이 阻害된다.

認識配列이 TGCACY-N₂ -GGTGCA인 Ntr C는 DNA 結合活性的이 Ntr B의 kinase (phosphatase) 作用으로 調節되고, 窒素 제한에서 phosphorylate된다. Ntr C는 nif LA의 전사를 활성화하는 activator site와 gln A와 ntr B에서 전사를 制御하는 repressor site를 갖는다. 19 nif의 프로모타의 상류에 -103과 153 사이의 鹽基배열은 많은 窒素固定菌에 있어서 공통된 組成(TGT-N₁₀-ACA)으로서 Ntr C 結合부위와 닮고 있다. 이들 단백질 結合위치는 nif 전체를 調節하는 Nif A의 인식부위이고, Lac 1, Ara C, Crp, Lex A나 Gal R 등의 結合 부위인 TGTGT-N₆-10-ACACA와도 닮고 있다.

일반적으로 전체 genome 중 필요한 遺傳子의 發現調節機構에는, 1) 전사 制御로서 DNA에서 mRNA가 전사되는 속도를 制御하는 것과 2) 전사된 mRNA에서 polypeptide로의 번역속도를 制御하는 번역 制御가 있다. Nif A와 Ntr C의 發現調節機構에서 번역레벨의 調節은 RNA polymerase의 σ 因子의 생산여부이며, *B. subtilis*에서는 4종의 σ 因子가 있어 포자형성 遺傳子 spo VG, spo IIG의 전사개시에 관한 것이다. 이들 단백질은 α helix에 특징있는 oligomer로서

特異的 DNA 배열부위에 結合하며, DNA의 상태가 supercoil인지 linear인지가 또한 調節의 중요한 열쇠라고 생각된다.

2) nif gene 과 fix gene

nif gene의 構造 및 調節制御機構의 해석은 *K. pneumoniae*의 nif gene 構造 遺傳子를 probe로하여 hybridization에 의해 결정하고 있다. Weber와 Puhler (1982)는 *E. coli*의 minicells를 이용하여 nif H의 發現을 일으켜 그 소재를 확인하며 nif와 fix gene의 위치관계를 밝히고 있다.

Plasmid pACYC 184에 접속한 nif K와 nif D의 생산물은 분자량이 각각 53,000과 56,000이고, fix A, fix B 및 fix C의 생산물은 분자량이 각각 30,000, 37,000 및 43,000이다. Tetracycline 耐性遺傳子(Tc)와 nif H의 프로모타를 trans로 융합시켰을때 nif A 생산물에 의해 Tc gene이 증을 초월하여 活性化되었다. nif A는 fix ABC 오페론의 직접하류에 있고 (그림 9), 그 mRNA의 최소한 50%는 nif A단백질을 生産하여 fix A 프로모타의 活性化를 촉진하는 作用을 갖는다.

암모니아 制限하에서는 어떤 共生 signal이 있어 nif A 活性化를 誘導하고 있다. Ntr C-like gene의 活性化에 의해 fix A와 동시에 nif H 프로모타가 活性化되고 nif A 전사는 nif A 프로모타의 活性化를 誘導한다.

Szeto와 Ausubel(1986)은 *R. meliloti*의 ntr C gene의 鹽基組成을 *E. coli*의 ntr C와의 hybridization에 의해 확정하고, ntr C-Tn 5 mutants를 이용한 窒素制限의 單生生長에서는 nif H, fix A의 프로모타를 活性化시키지 못하였고, 유효근류를 형성함을 보았다. 즉 *R. meliloti*의 Nif A는 共生시에만 nif gene의 活性化에 필요하고 單生에서는 nif 프로모타를 活性化하지 않는 것으로 보고 있다. 活性化에는 어떤 共生 signal이나 酸素공급상태 및 특수한 代謝형태가

필요하다.

Nif A에 의해 nif A 프로모타가 활성화 되고 전사가 시작되며, fix ABC와 nif A는 각각 독립된 프로모타를 갖는 것이 Tn 5 삽입 mutants의 해석에서 알려지고 있다.

Nif gene의 활성誘導와 植物과의 共生상태에서 宿主측의 活性化에 의해 Henneche 등(1987)은 *Bradyrhizobium japonicum*의 nif gene이나 fix gene에 대해서 보고하였다. *B. japonicum*의 nif와 fix 遺傳子 가운데 9개(nif D, K, E, N, T, B, H와 fix B, C)는 cluster I에 있고, nif A 및 fix A는 common nod gene을 포함하는 cluster II에 소재하고 있다(그림 8). nif D, K는 窒素 固定酵素의 FeMoCo 단백질의 α 및 β 서브유닛트를 코드하고 있다. 그 하류의 nif E 는 nif D gene의 프로모타에 의해 調節되고, 그 生産物은 FeMo단백질에 부수된 物質이다.

Nif N gene에서 6kb 하류에 nif S gene이 존재하며, 변이군에서는 30%의 窒素 固定酵素 活性이 있고, 그 product의 소재는 불명이다. nif B gene은 窒素 固定酵素의 FeMoCo合成에 관여하는 것으로 Tn 5를 삽입하면 Nif-, Fix-로 된다. Nif H는 窒素 固定酵素의 Fe단백질의 遺傳子이고, 그 하류 2.5kb에는 fix B, C 오페론이 위치하고 있다.

Fix BC의 프로모타는 fix B의 번역개시부위의 약 1kb 상류에 존재하고 窒素 固定酵素 전자수용체에 관여하며, fix B-, C와 fix A-변이는 共生시에는 Fix-이고, 單生の 호기적 배양에서는 Nif-이다. fix gene은 好氣性 및 微好氣性菌의 *Azotobacter vinelandii*, *A. bransilanse*나 *Rhizobium*속에서는 나타나나, 嫌氣性菌의 *K. pneumoniae* 등에서는 볼 수 없다(Gubler, 1988).

Cluster II 상에는 독자적 프로모타를 갖는 open reading frame(ORF)과 nif A gene이 연결하고 있고, Nif A 단백질은 nif H, nif DKE의 發現을 調節하며 nif,

fix gene 전체를 調節한다. 이 cluster 부분에는 nod ABC 및 역의 전사 방향성을 갖고 있는 nod D가 있다. *B. japonicum*의 chromosome 위에는 nif, fix 및 nod gene이 존재하고 그중 cluster I에는 많은 repeated sequence(RS)가 있는 것이 특징이다.

nif gene과 fix gene의 promotor는 그림 8에 나타낸 바와 같이, nif KDE, nif H, nif AB, gln AII, fix A, fix BC 및 nif A 등이 있고, 이들의 gene이 nif A 단백질에 의해 發現되기 위해 상류에 activator sequence(UAS): TGT-N₄-N₅-ACA를 갖는다. nif A-mutant는 여러가지 결함현상, 즉 근류가 뿌리의 모든 곳에 형성되고, 근류중량이 극단적으로 감소하여, 노화한 근류에 나타나는 암갈색대의 형성과 感染絲에서 放出된 bacteroid의 細胞내에서의 퇴화현상 등 植物 defense reaction에 의해 파괴되는 현상을 볼 수 있다. Nif A 단백질은 酸素에 대하여 대단히 민감하게 응답한다. nif A에는 단일의 調節遺傳子보다도 병행으로 作用하는 遺傳子가 존재할 가능성이 있다.

3) 근류 特異的 단백질 (nodulins)

근류균이 宿主植物의 뿌리에 근류를 형성하면 침입균은 bacteroid(Bd)로 형태 변화를 한다. 植物 細胞측과 Bd 細胞와의 사이에는 활발한 signal의 주고 받음이 있으며 일반적으로 근류균은 근모에서 感染絲를 거쳐 뿌리 조직의 내피에 도달하여 분열을 한다.

근류 細胞는 感染絲에서 放出된 bacteroid를 포함한 感染 細胞와 균이 침입하지 않은 細胞로 되고 있다.

感染絲에서 放出된 bacteroid는 곧 peribacteroid membrane(PBM)에 의해 포위되고, PBM은 Bd를 窒素固定을 위한 細胞내 기관으로서 독립시킨다. Nodulin 가운데 가장 대표적인 단백질은 leghemoglobin(Lb)이다. 근류 중의 단백질의 대

부분은 Lb가 차지하고 結合된 ribosome보다 유리의 polysome에 의해 合成된 Lb가 대부분임이 알려져 있다. Lb는 宿主 細胞의 cytosol 중에 존재하고 직접 9S mRNA에 의해 번역되는 것으로 보여 진다.

Lb 遺傳子는 근접 부분에 gene family를 형성하며 遺傳子 library에 의하면 3개의 Lb sequences를 갖는다.그중 하나는 3개소에 intron을 갖고 11.5Kb Eco R1 fragment 상에 제 2의 Lb gene의 4.2 Kb Eco R1 fragment가 있다. 콩의 Lb는 근류 중의 세포질 가용성 단백질의 20-30 %를 점하고 4가지 주요 Lb(Lba, Lbc 1, c 2, c 3)와 번역 후 수식되는 4종의 minor Lb가 있다. 분자량 35,000의 peptide는 근류군의 感染이 있을 때만 나타나는 peptide이다.Nodulin 24는 콩 근류의 特異的 peptide(mw 20,000)로서 PBM component의 하나로 되고 共生的 窒素固定에 어떤 역할을 하고 있다고 추측되고 있다.

*Phaseolus vulgaris*에서 GS n1, GS n2, GSr (뿌리의 조직에 일반적으로 존재 함)는 nodule specific peptide일 것이다. 최근에 Fortin and Verma(1987)는 콩 근류중의 nodule 23, -24, -26, -26b, -27, -35, -44(Sengupata-Gopalan (1986)의 27과 동일) 및 -100의 분자량(SDS PAGE및 아미노산 분석 결과), 細胞 내의 소재 및 作用에 대해 기재하고 그 가운데 nodulin 100이 sucrose synthetase 活性를 갖는 peptide인 것을 보고하였다.

콩에서는 초기 nodulin으로서 근류군의 感染이나 근류분열조직의 형성에 관여 하는 N-75, N-44, N-41, N-38 등이 근류군 접종후 수일 만에 發現하고 그후 후기 nodulin이라 부르는 근류의 機能에 관여하는 leghemoglobin(Lb), N-20 family(N-20, N-22, N-23, N-44), N-35(근류 特異的 uricase의 subunit), 근류 特異的 GS 등이 각각 고유의 timing으로 나타난다.

Nodulin의 성질이나 機能 및 細胞내에서의 존재양식의 다양성을 종합할 때 근류군의 感染 후 근류내에서 많은 trance-acting factor가 만들어지고 어떤 것

은 bacteroidin bacteria 遺傳子에 code된 근류特異的 단백질이며, 이들의 factor에 의해 nodulin 遺傳子の 發現이 시간적 및 공간적으로 制御되고 근류군과 宿主 植物의 복잡한 상호작용이 이루어져 共生窒素固定이 영위된다고 생각된다.

7. 참고문헌

- Baldani, V. L. D., Aldarez, M. A. de B., Baldani, J. I. and Dobereiner, J. *Plant and Soil* 90: 35-46 (1986).
- Beijerinck, M. W.. *Botan. Zig.* 46: 706-797 (1988).
- Braun, V.. *Trends Biochem. Sci.* 10:75-78(1985).
- Burton, G. W. and Ingold, K. U.. *Science* 224: 569-573(1984).
- Clara, R. W. and Knowles, R.. *Can. J. Microbiol.* 30: 1222-1228 (1985)
- Das, A. and Mishra, A. K.. *Current Microbiol.* 11: 313-316 (1984)
- Del Gallo, M. Gratani, L. and Morpurgo, G.. In "Azospirillum" Springer-Verlag, Berlin IV:75-82(1987).
- Dingler, C.H. and Oelze, J.. *Arch. Microbiol.* 141:80-84 (1985).
- Dixon, R.A., Kennedy, C., Kondorosi, A. Krishnapillai, V. and Merrick, M.. *Mol. Genet.* 157:186-198 (1977).
- Forher, C., Dusha, I., Barbot, P. and Elmerich, C.. *FEMS. Microbiol. Lett.* 30: 245-249 (1985).
- Fortin, M. G., and Verma, D. P. S.. In "Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions." Eds. by D. P. S. Verma and N. Brisson. Martinus Nijhoff Publ. pp.102-107 (1987).
- Fu, C. H. and Knowles, R.. *Can J. Microbiol.* 32:897-900 (1986).
- Goldberg, I., Nadler, N. and Hochman, Aa.. *J. Bacteriol.* 169:894-879 (1987).
- Gubler, M and Hennecke, H.. *J. Bacteriol.* 170:1205-1214. (1988).

- Hallborn, L. FEMS. Microbiol. Lett. 22:119-121. (1984).
- Hartmann, A.. In "*Azospirillum*", Springer-Verlag, Berlin IV:122-130 (1987)
- Hartmann, A., Fu, H and Burris, R.H.. Appl. Environ. Microbiol. (in press) (1988)
- Hartmann, A., Fu, H and Burris, R.H.. J. Bacteriol. 165:864-870 (1986)
- Hellriegel, H., and Wilfarth, H.. Z. Rubenzucker-Industrie Deutschen Reichs (1988)
- Hennecke, H., Fischer, H.M., Ebeling, S., Gubler, M., Thony, B., Gottfert, M., Lamb, J., Ranseier, T., Regensburger, B., Alvarez-Morales, A. and Studer, D.. In "Molecular Genetics of Plant Microbe Interaction", Eds. by D.P.S. Verma and N. Brisson, Martinus Nijhoff Publ. The Netherlands pp.191-196 (1987)
- Hider, R.C.. Structure Bonding 58:26-87 (1984).
- Hochman, A., Goldber, I., Nadler, V. and Hartmann, A., IN "aspects of Nitrogen Metabolism" Eds. Ullrich. Springer Verlag, Berlin pp.173-174 (1987).
- Hunt, T. P., Magasanik, B.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:8453-8457 (1985).
- Hurek, T., Reinhold, B., Fenderik, I. and Niemann, E. G.. Appl. Environ. Microbiol. 53:163-169 (1987).
- Imhoff, J. F. FEMS Microbiol. Rev. 39:57-66 (1986).
- Krieg, N.R. and Hoffman, P.S.. Ann. Rev. Microbiol. 40:107-130 (1986)
- Ladha, J. K., Triol, A. C., Daroy, M. L., Nayak, D. N., Caldo, G. and Watanabe, I.. Proc. 4th Internat. Symp. Microbiol. Ecol. (1986).
- Leong, J.. Ann. Rev. Phytopatol. 24:187-209 (1986).
- Magasanik, B.. TIBS. 2:9-12 (1977).
- Narula, N. and Gupta, K. G.. Plant and Soil 93:205-209 (1986).
- Neilands, J. B.. Structure Bonding 58:1-24 (1984).
- Nu, I., Steinitz, Y. L., Okon, Y. and Henis, Y.. J. Gen. Microbiol. 122: 27-32 (1981)
- Page, W. J and Dale, P. L.. Appl. Environ. Microbiol. 51:451-454 (1986).

- Pope, Mh, Murrel, S.A. and Ludden, P. W.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 3173-3177 (1985)
- Rao, A. V. and Venkateswarlu, B.. Acta Microbiol. Hung. 32: 221-224 (1985)
- Romheld, V. and Marechner, H.. Plant Physiol. 80: 175-180 (1986)
- Sengupata-Gopalan, S., Pitas, J. W., Thompson, D. V. and Hoffman, L. M.. Mol. Gen. Genet. 203: 410-420 (1986)
- Sugiura, Y. and Nomoto, K.. Structure Bonding 58: 107-135 (1984)
- Szeto, W. W. and Ausubel, F. M.. J. Bacteriol. 168: 795-798 (1986)
- Tien, T. M., Diem, H. G. Gaskins, M. H. and Hubbel, D. H.. Can. J. Microbiol. 27: 426-431 (1981)
- Tilak, KVBR., Schneider, K. and Schlegel, H. G.. Current Microbiol. 13: 291-297 (1986)
- Weber, G. and Puhler, A.. Plant Md. Biol. 1: 305-320 (1982)
- Yoch, D. C. and Whiting, G. J.. Appl. Environ. Microbiol. 51: 143-149 (1986)
- Zuberer, D. A. and Alexander, D. B.. Plant and Soil 90: 47-58 (1986)

Table 1. Classification of Nitrogen Fixing Organisms

1. Free living Nitrogen fixers

1) Bacteria (3 Order, 11 Family, 26 Genus)

- (1) Aerobic : Azotobacter, Beijerinckia, Derxia, Azospirillum
Azotococcus, Azotomonas, Mycobacterium
- (2) Facultative anaerobic : Klebsiella pneumoniae, Bacillus polymyxa
Enterobacter aerogenes, Erwinia herbicola
- (3) Anaerobic : Clostridium pasteurianum, Desulfovibrio gigas
Desulfotomaculum orientis,
- (4) Photosynthetic : Chromatium, Rhodospirillum, Chlorobium
Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium

2) Cyanophyceae (2 Order, 6 Family, 23 Genus)

- (1) Heterocystous : Anabaena, Nostoc, Calothrix, Cylandrospermum
Anabaenopsis, Fisherella, Scytonema, Stigonema
- (2) Nonheterocystous : Trichodesmium, Plectonema, Lyngbya, Oscillatoria
- (3) Unicellular : Gloeocapsa

2. Symbiotic Nitrogen Fixers

(1) Leguminosae (700 Genus, 14,000 spp.)

- : Rhizobium japonicum, R. trifolii, R. melilotii
R. leguminosarum, R. lupini, R. phaseoli

(2) Nonlegumes (8 Family, 22 Genus, 200 Species)

- Alnus, Myrica, Elaeagnus, Hippophae, Coriaria, Dryas, casuarina, Datisca
Comptonia, Ceanothus, Colletia, Discaria, Purshia, Rubus, Shepherdia
: Frankia spp.

Cycas(9 Genus,90 spp.): Anabaena, Nostoc

Podocarpus(4 Gen.60sp): Vesicular Arbuscular Mycorrhizae

Azolla, Phycomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Fungi, Anthoceros,

Blasia, Cavicularia, Bowenia, Ceratozamia, Dioon, Staneria, Gunnera

: Anabaena, Nostoc

Digitaria : Azospirillum lipoferum, A. brasilense, A. amazonense

Psychotria : Klebsiella

Aerobic bacteria : Photosynthetic bacteria.

Table 2. Characteristics of nitrogenase components from different N₂-fixers

Bacterial Origin	Mo-Fe Proteins				
	Cp	Av	Ac	Kp	Rj
Molecular weight(x10 ⁻³)	220	270	227	218	220
Subunit No mw(x10 ⁻³)	{2(50) 2(60)}	{2(70) 2}	4(60)	{2(51) 2(60)}	{2(50) 2}
Mo(g atom/mol)	2	2	1.9±0.3	2	1.3
Fe(g atom/mol)	24	34~38	22±2	32.5±3	29
S ²⁻ (g atom/mol)	24	26	20±2		26
Isoelectric point	4.95	5.2			
Specific activity (n mol C ₂ H ₄ /mg/min)	2,250	1,400	2,000	2,150	1,000

Bacterial Origin	Fe Proteins				
	Cp	Av	Ac	Kp	RI
Molecular weight(x10 ⁻³)	55	68	65.4	66.8	65
Subunit No mw(x10 ⁻³)	2 (27.5)	2 (33)	2 (30.8)	2 (34.6)	2 (32)
Mo(g atom/mol)					
Fe(g atom/mol)	4	3.45	4	4	3.1
S ²⁻ (g atom/mol)	4	2.85	3.9	3.85	
Isoelectric point					
Specific activity (n mol C ₂ H ₄ /mg/min)	2,708	1,800	2,000	980	434

* Ac, *Azotobacter chroococcum*; Av, *Azotobacter vinelandii*; Cp, *Clostridium pasteurianum*; Kp, *Klebsiella pneumoniae*; Rj, *Rhizobium japonicum* (bacteroids). RI; *Rhizobium lupini*;

Table 3. Influence of amino acids on growth and nitrogen fixation of Azospirillum spp.

A) Amino acids as sole sources of carbon and nitrogen:

Amino acids (10 mM)	Stimulation of growth			
	<u>A.amazonense</u>	<u>A.lipoferum</u>	<u>A.brasilense</u>	<u>A.halopraeferens</u>
glutamate	19.2	22.3	9.3	3.1
proline	25.7	28.7	9.9	2.2
serine	2.7	10.8	1.6	1.3
alanine	9.5	15.0	8.9	17.6
histidine	3.7	14.2	1.1	1.2

B) Effects of amino acids on nitrogen fixation in the presence of 0.5% malate (Y1: sucrose):

Amino acids (10 mM)	Relative nitrogen fixation activity			
	<u>A.amazonense</u>	<u>A.lipoferum</u>	<u>A.brasilense</u>	<u>A.halopraeferens</u>
glutamate	0.14	0	0.45	0.73
proline	0.01	0.14	0.25	0.86
serine	0.05	0.16	0.73	0.73
alanine	0.15	0.01	0.08	0
histidine	0	0	1.47	0.90

	<u>A. amazonense</u>	<u>A. lipoferum</u>	<u>A. brasilense</u>	<u>A. haloproaferens</u>
	Y1	Sp59b	Sp7	Au4
<u>a/</u> Growth stimulation by betaine glycine choline	0.95	27	0.96	1.1
	0.95	37	0.96	1.0
<u>b/</u> Effect on nitrogen <u>fixation activity</u> of betaine glycine choline	1.02	0	0.97	0.84
	0.91	0.18	0.97	0.98
<u>c/</u> Effect on nitrogen fixation activity at osmotic stress conditions ⁺⁺⁺ without additions with betaine glycine with N,N'-dimethyl- glycine with choline	2.5	2.0	1.5	2.0
	4.0	4.0	73	40
	n.t.	n.t.	1.5	20
	5.0	4.0	26	20

Table 4. Effect of glycine betaine and choline on growth, nitrogen fixation and osmotolerance of Azospirillum spp.

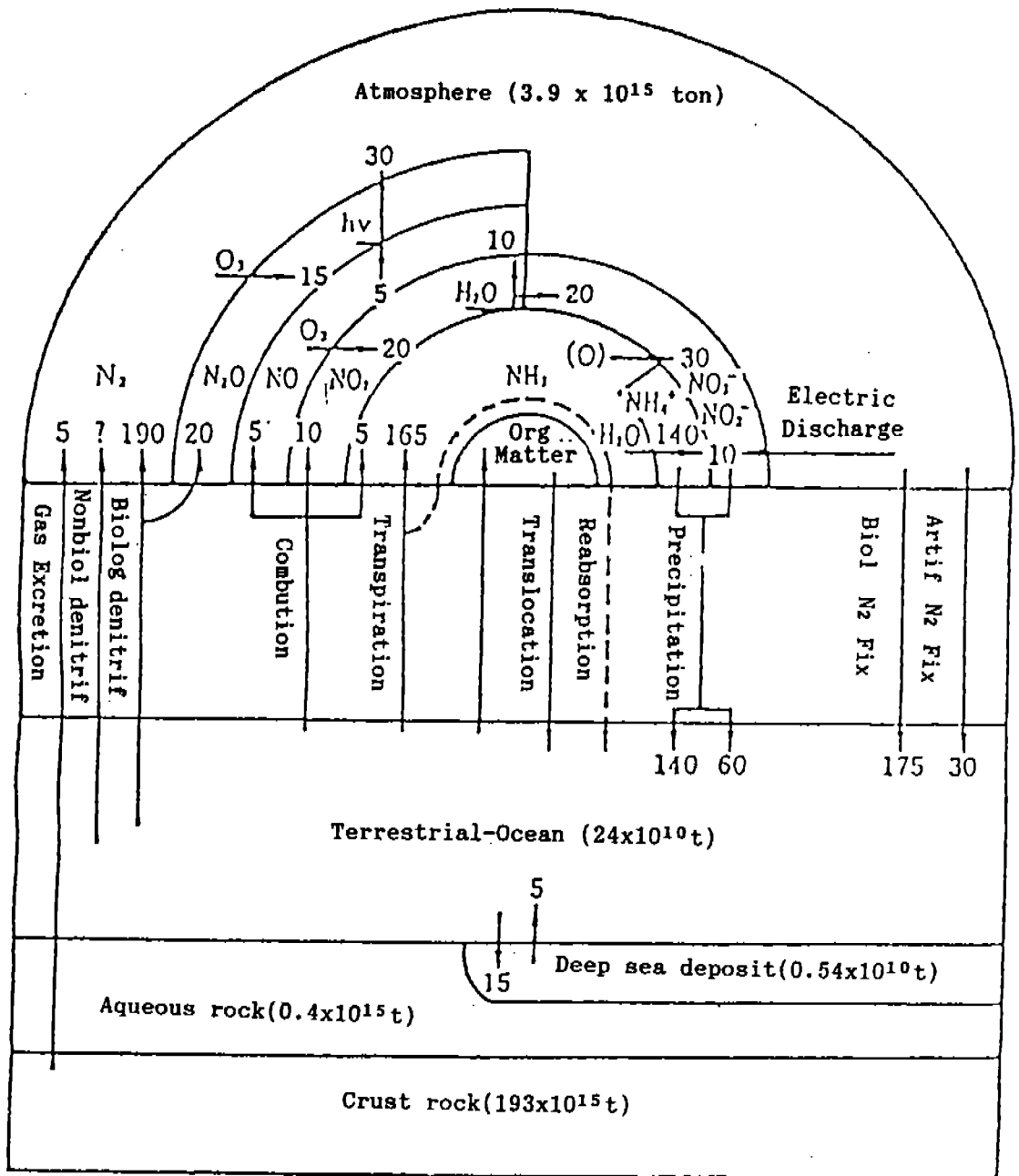


Fig. 1. Nitrogen cycle of the earth

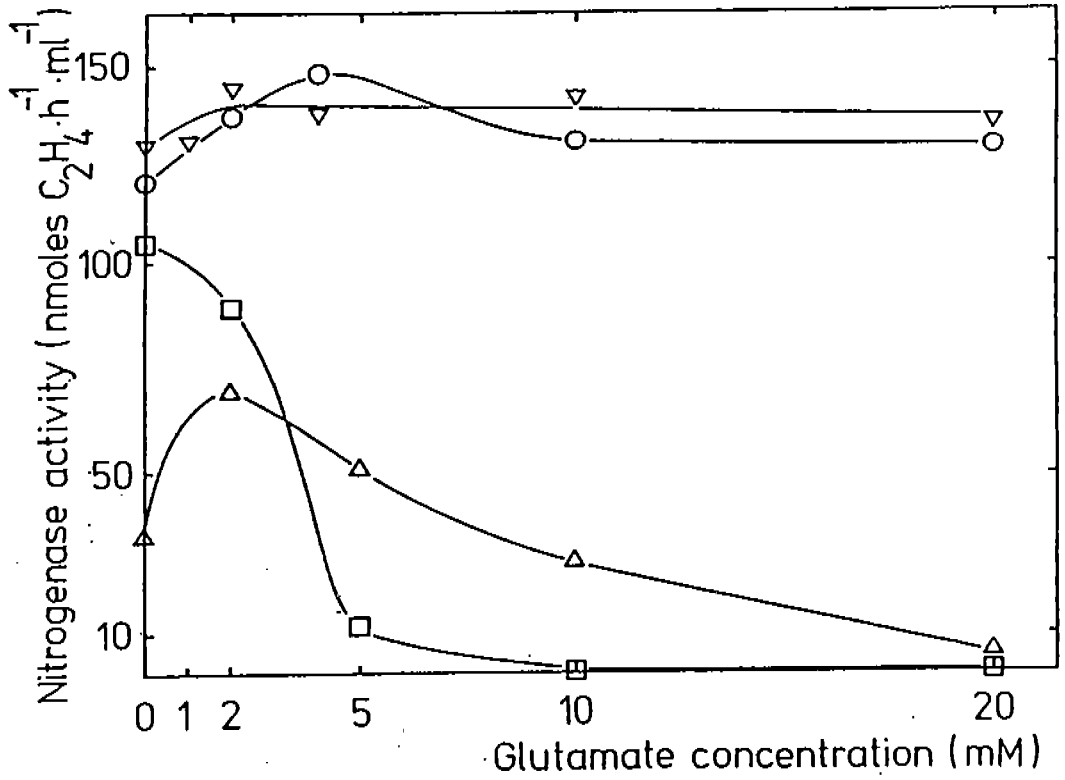
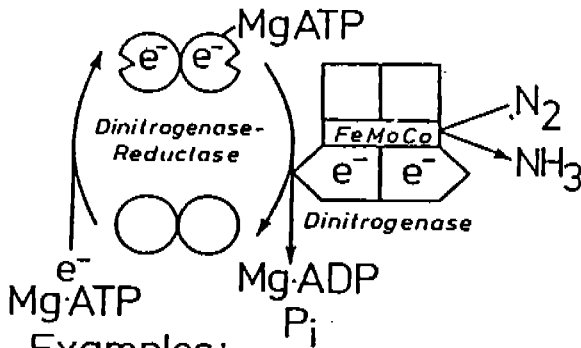


Fig. 2. Effect of different concentrations of glutamate on the total nitrogen fixation activity of *A. amazonense* Y1 (Δ), *A. lipoferum* SpRG20a (\square), *A. brasilense* Sp7 (\circ) and *A. halopraeferens* (∇).

Regulation of nitrogenase activity

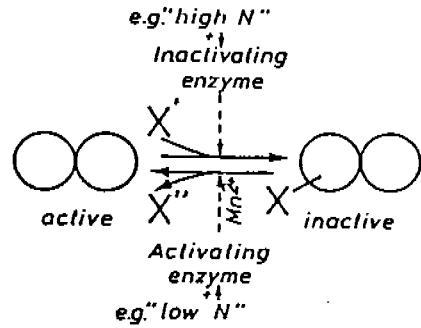
Non-covalent regulation by cosubstrates, effectors (?)



Examples:

Azotobacter
Azospirillum amazonense
Herbaspirillum seropedica
⋮

Covalent modification of nitrogenase reductase



Examples:

Rhodospirillum rubrum
Rhodobacter capsulatus
Chromatium vinosum
Azospirillum brasilense
Azospirillum lipoferum

Fig.3. Covalent and non-covalent regulation of the nitrogenase activity (schematic overview)

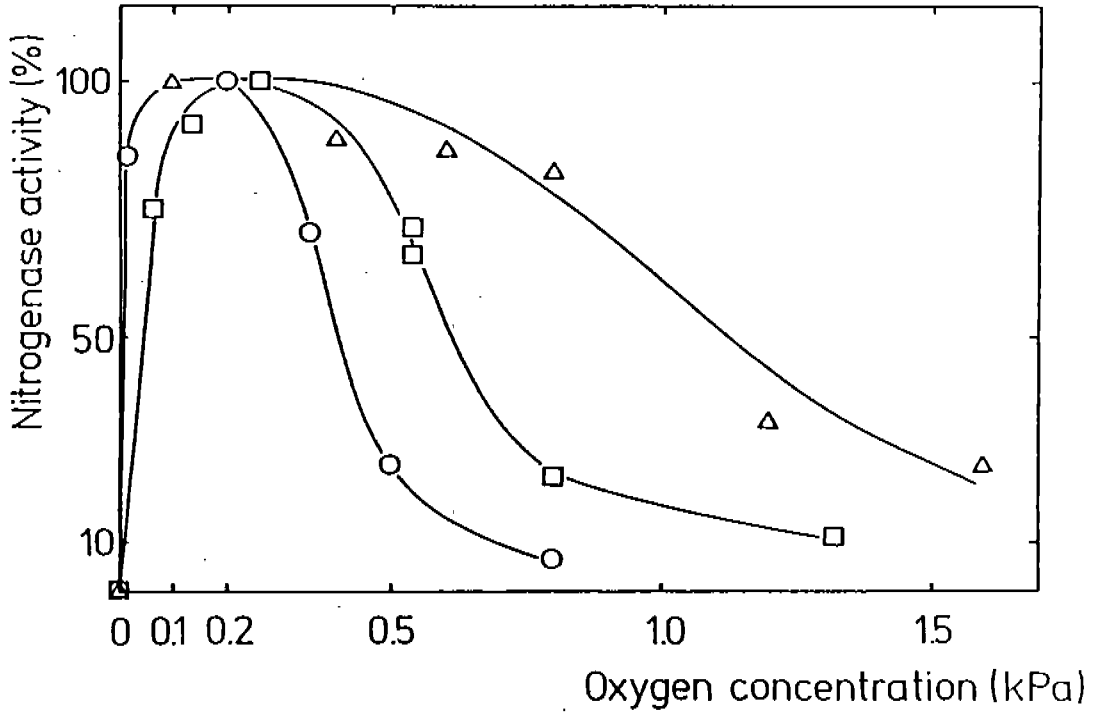


Fig.4. Different oxygen tolerance of nitrogen fixation in *A. brasilense* Sp7 (O), *A. lipoferum* SpRG20a (□) and *A. amazonense* Y1 (Δ).

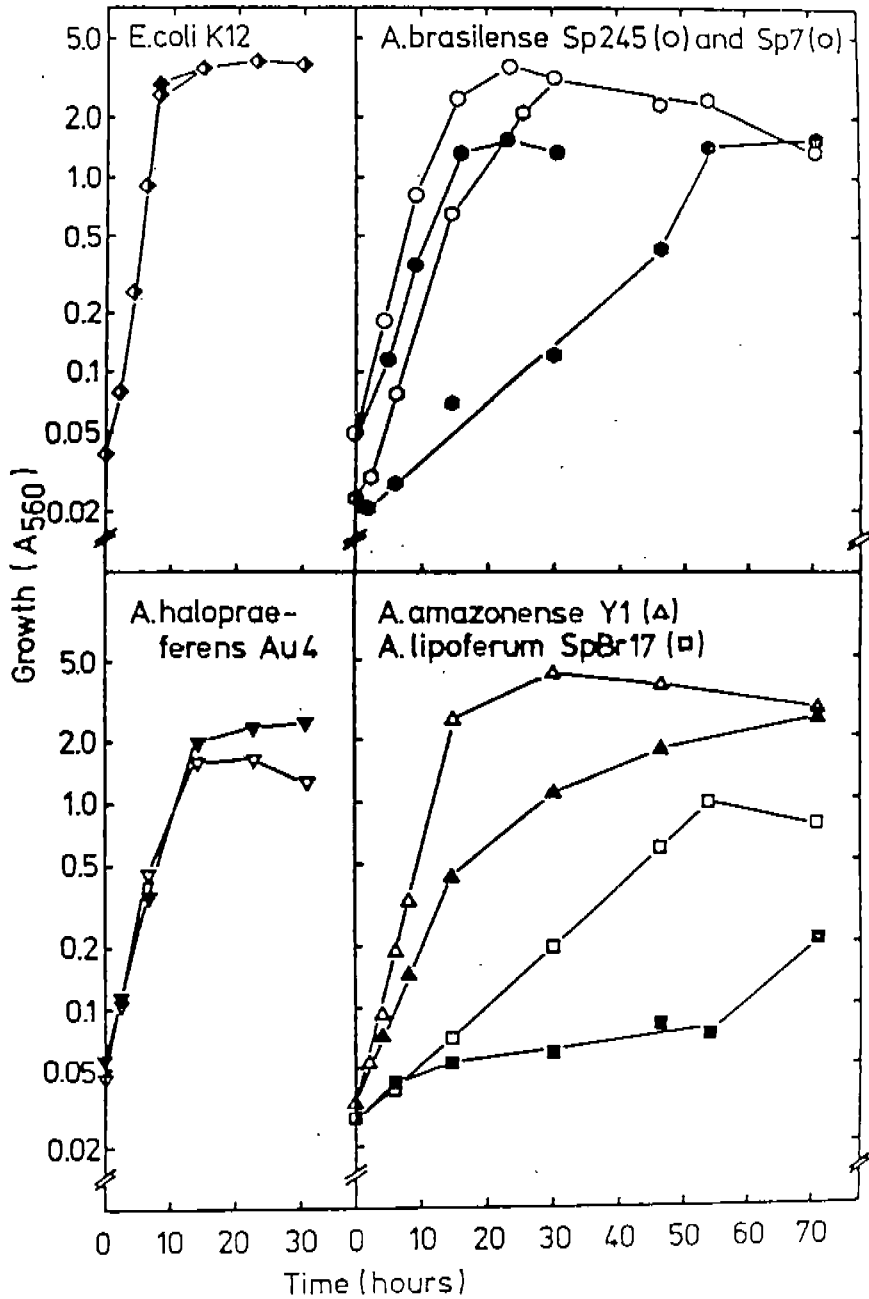


Fig.5. Growth at iron limiting conditions of *E. coli* K12 (\blacklozenge), *A. brasilense* Sp245 (O) and Sp7 (O), *A. halopraeferens* Au4 (∇), *A. lipoferum* SpBr17 (\square) and *A. amazonense* Y1 (Δ).

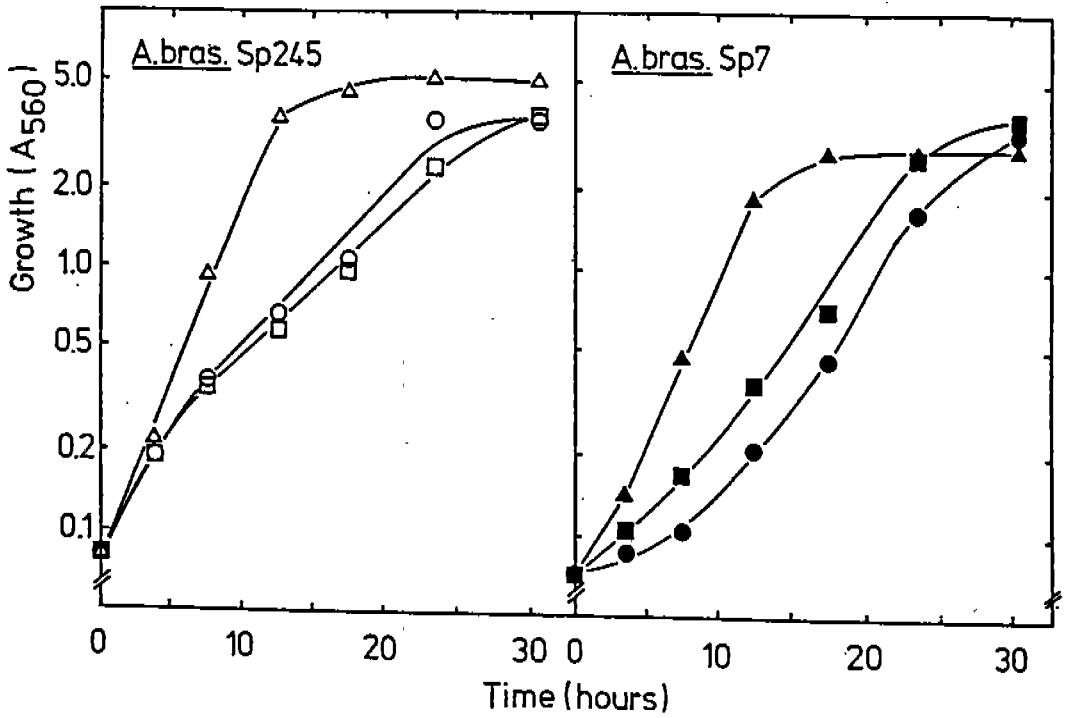
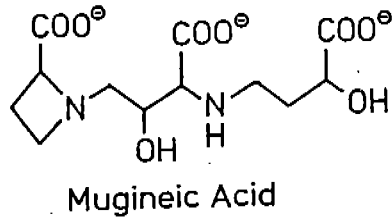


Fig.6. Stimulation of iron-limited growth by mugineic acid in *A. brasilense* Sp245 (open symbols) and *A. brasilense* Sp7 (closed symbols).

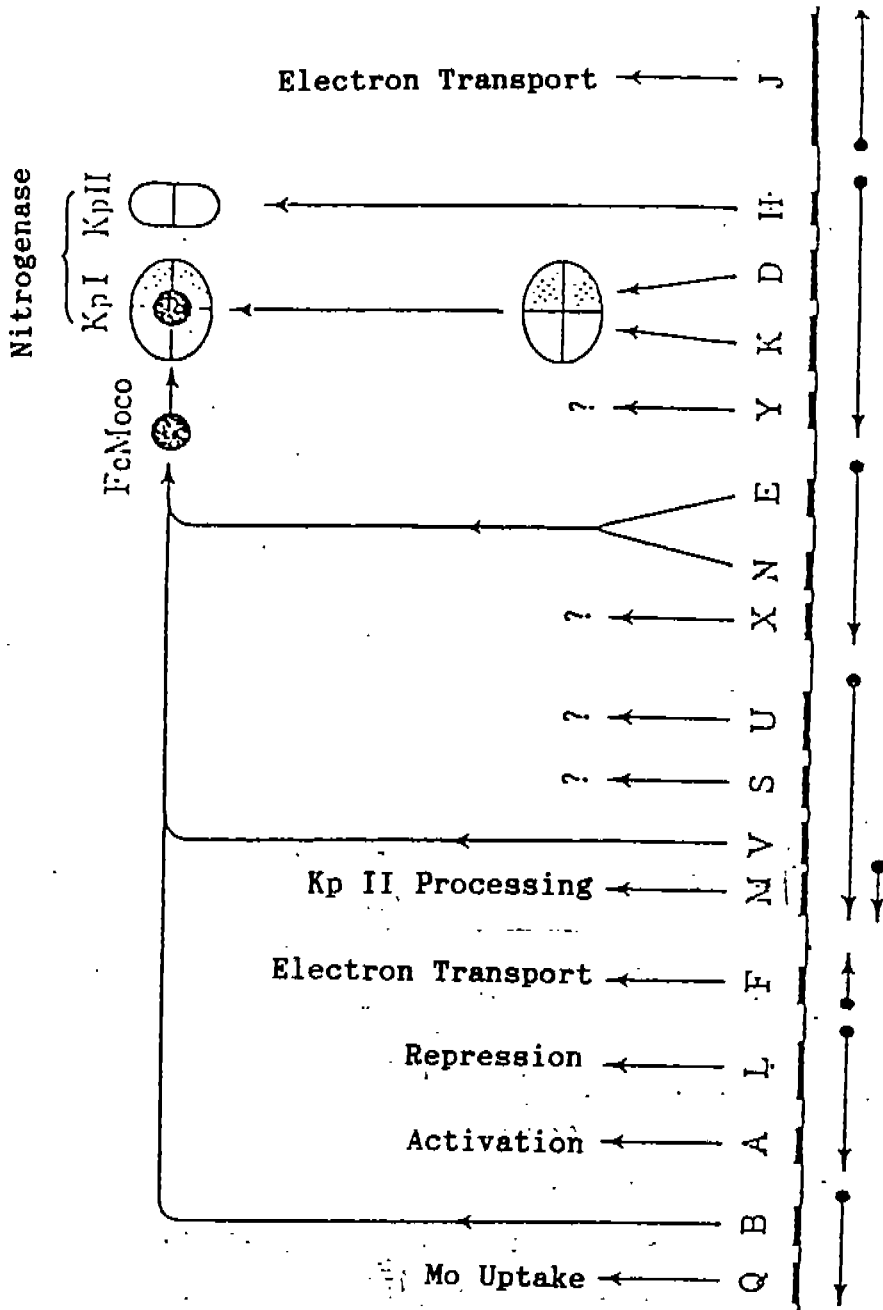


Fig. 7. Arrangement and action of *nif* gene group from *Klebsiella pneumoniae*

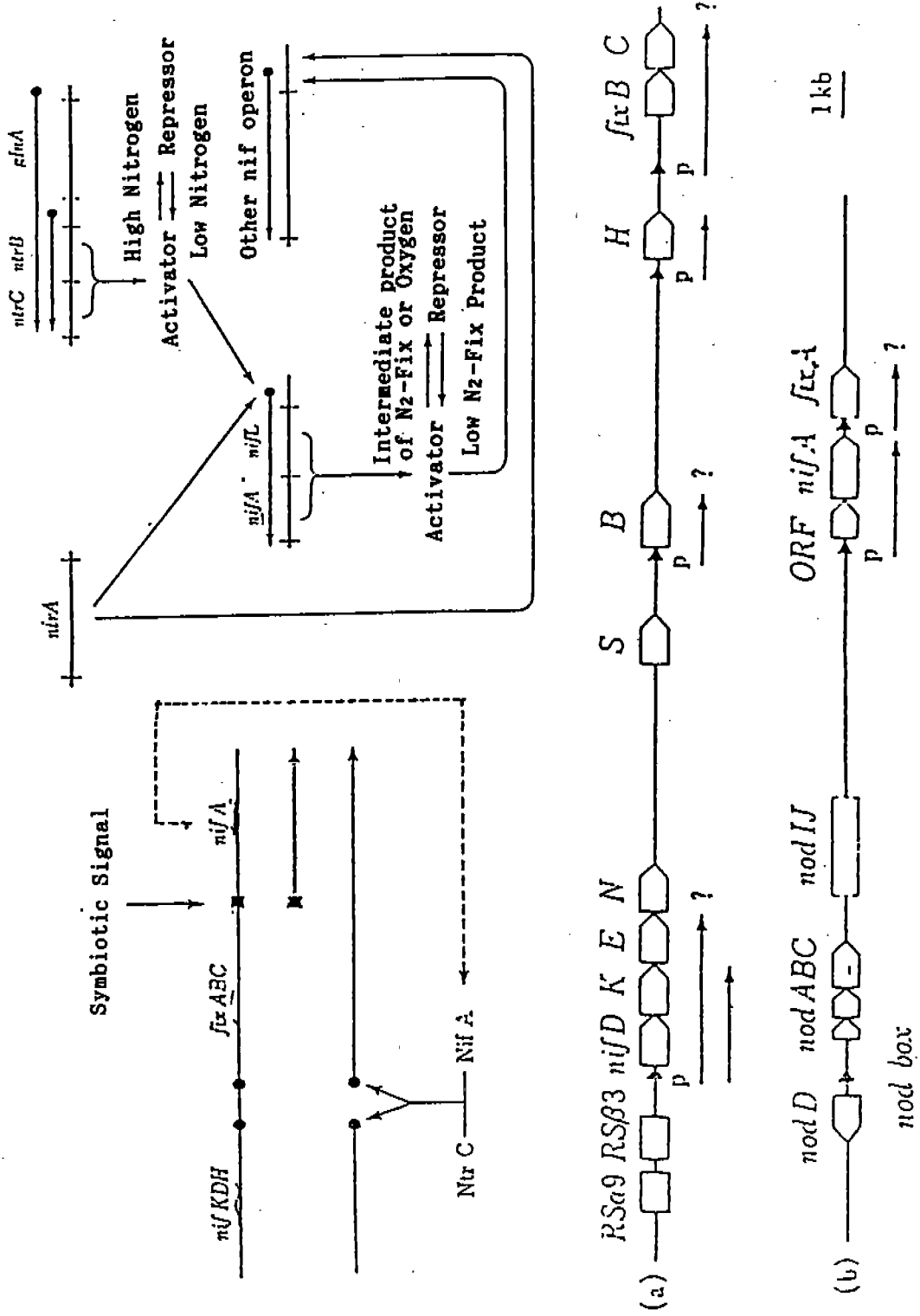


Fig. 8. Expression regulation of *nif* gene group from *Klebsiella pneumoniae*