

(S4-7) *Klebsiella oxytoca* 의 질소고정 유전자 *nif LA* 의 구조 및 기능

김영미, TERUHIKO BEPPU, TAKESHI UOZUMI

(일본동경대학 농학부 응용생명공학)

1. 서론

질소는 질소분자 (N_2) 로써 대기의 약 79% 를 차지하고 있으나, 동,식물은 이를 직접 이용하지 못하고 암모니아나 초산의 형태로 고정되어야 이용할 수 있다. 질소고정에는, 질소고정 미생물에 의한 생물질소고정과 공업적인 암모니아 합성이 있다. 공업적 질소고정에는 많은 화석에너지가 필요하므로 농작물의 생산에 필요한 질소비료의 공급이 불충분한 경우가 많다. 그러므로 생물 질소고정이 유익한 수단으로 판단되어 진다. 질소고정균으로는 두과에 공생하는 근류균이 잘 알려져 있으나 최근에는 벼나 보리 등의 주요작물의 근권에 질소고정균이 생식하여 질소고정을 행하고 있음이 판명되어 주목받고 있다. 그와 관련하여 벼근권에서도, 약한 공생관계를 유지하며 공중질소 고정능을 가지는 질소고정균 *Klebsiella oxytoca* 및 *Azospirillum lipoferum* 등이 분리 동정되었다. 이러한 질소고정균의 질소고정능의 발현기구를 해명하고 강화, 개량하는 일은 화석에너지에 의존하는 화학비료의 절약및 식량 증산을 위해 대단히 중요하다.

본 연구에서는 *Klebsiella oxytoca* NG13 의 질소고정 (*nif*) 유전자 군의 발현을 조절하는 제어유전자 *nif L* 및 *nif A* 에 주목하여 구조를 해석하고, 그 유전자 산물에 의한 질소고정능 발현 제어 기구를 해명함과 동시에 유전자 조작에 의한 질소고정능을 개량하는 일을 최종 목표로 하였다.

2. *nif LA* operon 의 전염기 배열의 결정¹⁾

Klebsiella oxytoca 의 질소고정 유전자군을 포함한 DNA 절편으로 부터 *nif LA* 를 포함하리라 추정되는 *EcoRI-SalI* 절편 4.4 Kb 를 subcloning 하여 M13 dideoxy 법을 이용하여 전염기배열을 결정하였다. 그 결과 Nif L 단백질 (495 아미노산) 을 code하는 1485 bp 의 open reading frame (ORF) 과 *nif L* 의 종지 codon TGA 의 TG 를 개시 codon ATG 의 일부로 이용하여 시작하는 524 아미노산을 code 하는 1572 bp 의 ORF 가 존재함을 확인하였다(Fig. 1). 이는 Nif A 단백질을 code 하고 있음으로 판단되며, Nif A 단백질의 C 말단 영역에는 DNA 결합성 단백질들에 보존되어 있는 consensus sequence Gln (X)₃ Ala (X)₃ Gly (X)₅ Val 이 존재했다. 이는 이후에 발표된 *Klebsiella pneumoniae* 의 *nif LA* 의 염기배열²⁾ 과 96-98% 의 homology 를 가진다.

3. *nif LA* operon 의 promoter 영역의 해석

nif LA operon 의 전사개시점은, 무질소 배지에서 배양한 균체로 부터 조제한 mRNA 와 *nif L* 유전자의 번역개시 codon 부근의 DNA 절편으로 S1 mapping 을 행한결과, *nif L* 의 ATG 개시 codon 으로부터 74 bp 상류의 C임이 결정되었다. *nif LA* operon 의 전사개시점으로 부터 12 base 상류에는 promoter AGGG (N)₈ TTGCA 의배열이 존재했고 *nif LA* 의 상류 및 하류에는 *nif F* 와 *nif B* 의 promoter 로 보여지는 CTGG (N)₈ TTGCA 배열이 존재했다. 이 promoter 들 은 질소대사제어에 관여하는 σ 54 (NtrA) 의 결합부위로 생각할 수 있다.³⁾ 또한 *nif B* 의 promoter 상류영역 (-159 ~ -22) 에는 Nif A 단백질에 의해 활성화되는 *nif* 유전자들의 promoter 상류영역에 보존되어 있는 배열 (UAS : Upstream Activator Sequence) TGTN₁₀ ACA 가 존재했다.⁴⁾

4. *nif LA* 산물에 의한 전사 level 에의 제어

nif LA 의 기능을 검토하기 위해 *nif L* 및 *nif A* 에 대한 여러가지 plasmid 를 만들어 *nif LA* 의 promoter 영역 및 *nif LA* 산물에 의해 발현이 조절되는 *nif B* promoter 영역에 대하여 저분해능 S1 mapping 을 행하여 그 전사제어를 조사하였다.

Klebsiella oxytoca NG13 의 야생주 및 plasmid pNOW7A (*nif A^c*), pNOY7 (*nif L^c*) 또는 pNOY8 (*nif L⁺ A⁺*) 의 형질전환주를, NH₄⁺ 유무의 조건하에 배양하여 mRNA 를 조제하였다. 결과, chromosome 상의 *nif LA* operon 은 NH₄⁺ 의 유무에 관계없이 전사되었다. NH₄⁺ 이 없는 조건하에서의 *nif B* 의 전사는, 야생주와 pNOW7A 의 형질전환주에서 나타나고, pNOY7 또는 pNOY8 의 형질전환주에서는 나타나지 않았다(Fig. 2). 또한 acetylene 환원능을 지표로한 질소고정 활성을 조사한 결과, pNOY7 또는 pNOY8의 형질전환주는 질소고정활성이 없어져 *nif B* 의 S1 mapping 의 결과와 일치하였다. 이상으로 부터 Nif L 단백질이 균체내 일정량 이상이 되면 NH₄⁺ 의 유무에 관계없이 nitrogenase 의 Fe-Mo cofactor 의 생성에 필요한 *nif B* 등의 *nif* 유전자군의 전사가 억제되어 질소 고정능이 없어지는 것으로 생각된다.

5. Nif A 단백질의 동정¹⁾

nif A 로 추정되는 영역 PvuI-SalI 절편 2.5Kb 를 chloramphenicol 내성유전자의 promoter 하류에 연결한 pNOA1 을 만들고, 또 pNOA1 의 *nif A* coding region 내의 deletion 또는 frame shift 시킨 plasmid 3 종류를 만들었다. 이들 plasmid DNA 로 부터 *in vitro* 전사-번역계에 의한 산물을 SDS-PAGE 로 동정한 결과, 염기배열로 부터 추정되는 Nif A 의 분자량과 일치하며, *nif A*

는 *nif L* 의 번역종지 codon 과 개시 codon 이 중복하여 시작되는 ORF 에 의해 code 되는 분자량 58.6 Kd의 단백질임이 확인되었다. 또한 각 plasmid 를 *Klebsiella pneumoniae* 의 *nif A* 변이주에 도입하여 무질소배지에의 생육을 조사한 결과, deletion 또는 frame shift 를 가진 plasmid 의 형질전환주는 생육하지 않고, pNOA1 만이 *nif A* 변이를 상보했다는 것으로 부터 기능면으로도 이 ORF 가 *nif A* 유전자임이 확인되었다.

6. 활성화인자 Nif A 단백질의 작용기구⁵⁾

Klebsiella pneumoniae 에 있어서는, *nif A* 산물이 전 *nif* operon 의 활성화 인자로서 작용하여 각 promoter 상류에는 UAS 가 보존되어 있어 Nif A 와 상호작용한다는 보고가 있다.⁴⁾ 본 연구에서는, *nif B* promoter 상류에 있는 UAS 만을 증폭시킨 효과를 검토하기 위하여, pNOW7A 또는 pNOY7 에 UAS 영역을 삽입한 plasmid pNOW7A-UAS, pNOY7-UAS 로 *Klebsiella oxytoca* 를 형질전환 시켰다. pNOW7A-UAS 의 형질전환주는 pNOW7A 를 가진 균에 비해 질소고정능이 4.3 % 로 감소하여, 과잉의 UAS 에 의한 activator Nif A 의 흡착제거 (titration) 의 효과가 나타난 것으로 생각된다. 한편 NG13 [pNOY7] 과 NG13 [pNOY7-UAS] 에는 질소고정능의 차이가 나타나지 않으므로 Nif L 단백질은 UAS 와는 상호작용하지 않는 다른 기구에 의한 제어작용을 하는 것으로 생각된다 (Fig. 3). Nif A 단백질의 C 말단에는 DNA 결합성 단백질과의 아미노산 homology 가 있음과 상기의 titration 효과로 부터 예상되는 Nif A 단백질의 DNA 와의 상호작용에 대해 검토하기 위하여 gel-retardation assay를 행하였다. *in vitro* 전사-번역계에 의해 조제한 Nif A 단백질과 UAS 를 포함한 DNA 단편 또는 UAS 를 포함하지 않는 영역의 DNA 단편에 대하여 binding assay 를 행한

결과, Nif A 단백질은 UAS 에 특이적으로 결합함이 확인되었다(Fig. 4). 또한 Methylation interference analysis 를 행한 결과로 부터도 Nif A 단백질이 UAS 에 특이적으로 결합함이 확인되었다. 이들 결과로 부터, Nif A 단백질이 *nif* 유전자의 상류에 있는 UAS 에 직접 결합함으로써 전사가 활성화됨을 알수 있다.

7. *Klebsiella oxytoca* 의 질소고정능의 강화⁶⁾

야생주 *Klebsiella oxytoca* NG13 에 *nif A* 를 constitutive 하게 발현하는 highcopy plasmid pNOW7A 를 도입하면, NH_4^+ 의 존재하에도 nitrogenase 계가 derepression 되어 NH_4^+ 비 존재하에서의 약 20% 의 활성을 나타낸다. 이 경우 NG13 [pNOW7A] 에는 constitutive 하게 발현하는 *nif A* 산물에 의해 chromosome 상의 *nif* 유전자군이 활성화되지만 chromosome 유래의 *nif L* 산물에 의해 *nif* 유전자 발현이 어느정도 저해되므로 derepression 이 불완전한 것으로 생각된다. 우선, *nif LA* operon 의 *nif L* 유전자를 tetracyclin 내성유전자의 삽입에 의해 실행시키고 *nif A* 유전자의 상류에 합성 promoter 를 삽입한 pNOY9cm (*nif L-A^c*) 을 NG13 에 형질전환 후 chromosome 상의 *nif LA* 를 homologous recombination 에 의해 *nif L-A^c* 로 치환한 *Klebsiella oxytoca* R16 을 만들었다. 이 변이주는 NH_4^+ 의 존재하에서 NH_4^+ 비존재하의 약 50% 의 활성을 나타냈다(Fig. 5). 또한 R16 에 *nif A*의 high copy plasmid pNOA 102 를 도입하면 NH_4^+ 의 존재하에서도 NH_4^+ 의 비존재하의 활성과 거의 같은 질소고정능을 나타내어 완전한 derepression 을 달성하였다. 또한 균체내의 전 RNA 를 이용한 dot hybridization 를 행한결과, *nif A* 와 *nif B* 유전자가 전사 level에서 derepression 됨이 확인되었다.

8. 질소고정능 개량주 R16 의 벼근권에서의 유효성

상기의 질소고정 개량주 R16 의 벼의 생육에 대한 유효성을 검증하기 위하여 실제 벼근권에의 접종실험을 행하였다. 야생주 NG13, 개량주 R16 과 R16 [pNOA102] 을 pot 내의 토양에 접종하여 2종의 벼 *Oryza sativa indica* C5444 와 *japonica* T65 의 생육에 대한 효과를 공중질소의 고정량 및 식물체내의 질소의 흡수량 등으로 검토했다. 그 결과 *Klebsiella oxytoca* 의 접종에 의해 벼의 질소흡수량이 증가했고, 야생주 NG13 보다 개량주 R16이 더 효과적임이 확인되었다.

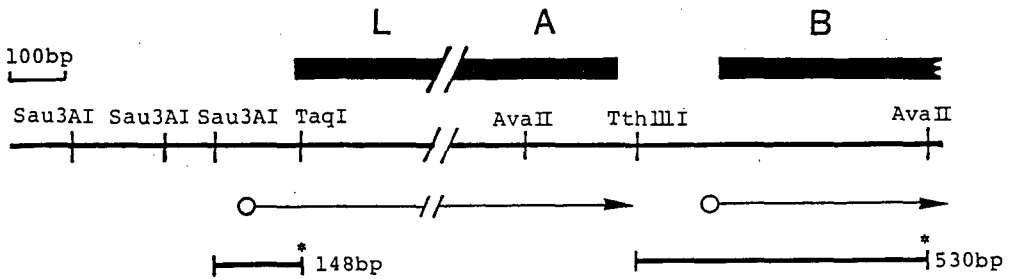
9. 결론

Klebsiella oxytoca 의 *nif LA* 의 구조가 염기배열의 결정에 의해 밝혀졌다. SI mapping에 의해 *nif LA* 의 전사는 NH_4^+ 의 유무에 관계없이 행하여지며 균체내의 Nif L 단백질량에 의해 *nif* 유전자의 억제제의 제어가 행하여 지는것이 확인되었다. Nif A 단백질은 *nif* 유전자의 UAS 에 직접 결합함으로써 전사를 활성화함이 밝혀졌다. Chromosome 상에 *nif L-Ac* 의 변이를 도입하여 NH_4^+ 의 존재하에서도 NH_4^+ 비존재하의 약 50% 의 활성을 나타내는 개량주 R16 을 벼에 접종하였을 경우 벼의생육이 유효하게 증가함을 확인하였다.

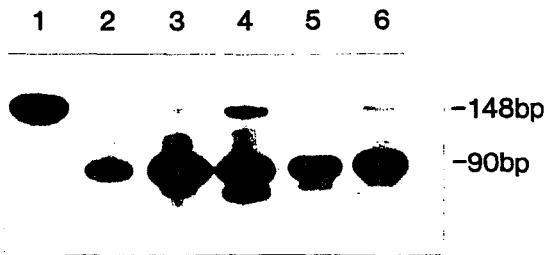
Reference

- 1) Y.-M. Kim et al., Mol.Gen.Genet., 205 : 253 (1986)
- 2) M.Drummond et al., EMBC J., 5 : 441 (1986)
- 3) B.Magasanik, TIBS 13 : 475 (1988)
- 4) M.Buck et al., Nature 320 : 374 (1986)
- 5) Y.-M.Kim et al., Agric. Biol. Chem., in press (1991)
- 6) Y.-M.Kim et al., J.Biotech., 10 : 293 (1989)

Nr1
TCCGACCACAGGAGGACAGCCGCTGTTTCTCCGTTTCCCGTTTAAATACCGTACCGGAGGTGAGCAATGATCCATTAATCCGATTCCGACACCACCGTTCAGAGTTTCGATCTCT 2040
SerArgProGlnGlyIhrSerLeuValLeuArgPheProLeuPheAsnIhrLeuThrGlyGlyGlnIhrM
MetIIeHisLysSerAspSerAspThrIhrValArgArgPheAspLeuSer
CCGAGGAGTTTACCCGCATAGCGGGATAGCGTGGTGCAGAGCCGCCCACCCAGGACGAAACACCCGAGAGGCTTCGAGGAGTCCGACGATGCGTTATGACGACCGCGGA 2160
GInGlnPheIhrAlaMetGlnArgIleSerValValLeuSerArgAlaIhrGlnAlaSerLysIhrLeuGlnGluValLeuSerValLeuHisAsnAspAlaPheMetGlnHisGlyMet
TGATTTCCCTGACGACAGCCAGGAGATCCGTGACATCAAGCCGTGCAAGCAACGAGACGCGGCGTAGTCGCACAAATTCGTACCGCCGGGAGGAGTAGTTCG 2280
IleCysLyuIhrAspSerGInGlnGluIleLeuSerIleGlnAlaLeuGlnIhrLeuAsnGlnIhrLeuProGlySerIhrGlnIleArgIhrArgProGlyGlyValLeuValGly
GTCCGACTGSCCAGGCGCAGTCCTGGTGGTGGGGTCCGACGACCAGGCTTTCTCGATCGGCTGAGCCTGTACGACTAGCTGCCGTTCGCGTTATCCCGTCCGCTGATGG 2400
IhrValLeuAlaGlnGlnIhrSerLeuValLeuProArgValAlaAspAspGlnArgPheLeuAspArgLeuSerLeuIhrAspLeuProPheIleAlaValIProLeuMetGly
GCCCCACTCCGGCCATCGGCTACTGCGGCGAGCGGTGCCTGCGCGCTGCAGCAGCGGTCCGACCGCTTTCGAAACCGTCCCAATCCGATCCGCCAGACGATTC 2520
ProHisSerArgProIleGlyValLeuAlaAlaGlnProMetAlaArgGlnGlnGluArgLeuProAlaCysIhrArgPheLeuGluIhrValAlaAsnLeuIleAlaGlnIhrIleArg
GCCTGATGCTCCGGACCTCCGCGGAGCGCGGAGGAGGACCCAGAGTACAGCGCCGCGGCGGTACCTCTCCGCGGTTTCGGCTTGCAAGAAATATGGTCCGTAAGAGCC 2640
LeuMetIleLeuProIhrSerAlaIleGlnProProGlnIhrSerProArgValGluArgProArgAlaCysIhrSerSerArgGlyPheGlyLeuGluAsnMetValGlyLysSerPro
CAGCGATCCGCCAATATGGATATTCTCGTACGTTTCCCGCTGGATACCGCTGGCTGGTACCCGCGGAGCGGTGGCCGCGCAGCGCGGCTTCGAAACCGTCCCAATCCGATCCGCCAGACGATTC 2760
AlaMetArgGlnIleMetAspIleIleArgGlnValSerArgIrrPaspIhrIhrValLeuValArgGlyIhrGlyLysGlnGluLeuIleAlaAsnAlaIleHisLysSer
CTCCGCGCCCGCCCGCTTCGTCAAATTAACGCGCGGCTGCGGACCACTGCTGAGAGCGGCTGCGGACCGCTTTCGGCTGATGCAAAAGCGCCATTTACCGCGCGCTGCCCGCGGA 2880
ProArgAlaIleAlaPheValLysPheAsnCysAlaAlaIleuProAspAsnLeuLeuGluSerGluLeuPheGlyHisGlyLysGlyValAlaPheIhrGlyValArgGlnArgLys
AAGCGCCTTTGAGCTGGCGGAGCGGACCTTATTCCTCGATGAGATCGCGGAGCGGCTGCTGGTACAGCGGCTGCTGGTACAGCGGCGCTGCTGGTACAGCGGCGGCTGCGCGCGGA 3000
GlyArgPheGluLeuAlaAspGlyIhrLeuPheLeuAspGluIleGluSerAlaSerPheGlnAlaLysLeuLeuArgIleleuGlnIhrGlyLysGlnGluLeuIleAlaAsnAlaIleHisLysSer
GCGGAGCAAAACCTGCGGCTCAACCTGCGCATTATCGCGGCAACCCCATCTGGAAGAGCGCGGCTGCTGTTGGCTGATGCAAAAGCGCCATTTACCGCGCGCTGCCCGCGGA 3120
GlyAspGluIhrLeuArgValAsnValArgIleIleAlaIleAlaIhrAsnArgHisLeuGluGluGluValArgLeuGlyHisPheArgGluAspLeuIhrIhrArgLeuAsnValMetPro
CTATCCGCTGCGCGCGTCCGCAACCCAGGAGGATATCCCGAGCTGCGCAGCTTCGTTGGTGGCAAAATTCGCCACAGCCAGGCGGCGAACGCTGCGCATCAGCGATGGCGCGATTC 3240
IleAlaLeuProLeuArgGluArgGlnGluAspIleAlaGlnLeuAlaHisPheLeuValArgLysIleAlaHisSerGlnIhrGlyIhrLeuArgIleSerAspGlyValAlaIleArg
GCCCTGATGGAGTACAGCTGGCGGGAGACGTGGCGAACCTGCGAACCTTGGCGGTGGTGTGCGGAGCGGCTGATTGACCGGGGCGCTGATTGCTCAACCATC 3360
LeuLeuMetGluIhrSerIrrProGlyAsnValArgGluLeuGluAsnCysLeuGluArgSerAlaValAlaValLeuSerGlyLeuIleAspArgAspValIleLeuPheAsnHisArg
Nr1
CGGATAACCCCGCAAGCGCTCCGACGACCGGTCGCGGAGGACGCGTGGCTTATACACGCTCCGACGAGCGCGCGTGAITCCCGCGCTGGAAAAGCGCGGTTGGTGGCAGG 3480
AspAsnProPolysAlaLeuAlaSerSerGlyProAlaGluAspGlyIhrPleuAspAsnSerLysAspGluArgGlnIhrGlyLysAlaIleHisSerGlnIhrGlyIhrLeuArgIleSerAspGlyValAlaIleArg
CCAAAAGCGCGGCTGCTCGGCATGACCCCGCGAGGTGGCGTATCGATATGATATCACCATGCGCGCCTGAGAGCCCTTACTGGAGCGCTTACGCGCGGTGGCGGCTTGTCCCGCGC 3600
LysAlaIleArgLeuGlyIhrIhrProArgGlnIhrValAlaIhrArgIleIleMetAspIleIhrMetProArgLeuIhrM
GCGCGCAATTCGCAATTCAGGAGCGCGGTTGCGGTAAAAGCTATTTTCATCGGTTGCGAAATTCATCTGGTACAGCATTCGACAGAGATACGCGCAACCCAGCA 3720
MetIhrSerCysSerSerPheSerGlyLysAlaCysArgProAlaAspSerAlaLeuIhrProLeuValAlaAspLysAlaIleAlaHisProCysIhrSerArg
ASGTACGACATGACTCCTCCTCTTTTGGCGCAAGCTGCCCGCGAGATGACAGCGCATTCGACCGCTTGTGGCGATTAACGCTGCCCGCGGCTGCTACTCTCG 3840
CAATGGGCATCACCGTTTCCGGCGATGACCTGCGGCGCGCGCCTGCAATTCGATGCACTACTGTAAACCGCAATTCGATTCGAGCAACAGTCCGCGCGCGGCTGATCGTC 3960
AsnGlyHisLysArgPheAlaArgMetHisLeuProValAlaProAlaCysAsnLeuGlnCysAsnIhrCysAsnArgLysPheAspCysSerAsnGluSerArgProGlyValSerSer
AAGCTGCTGACCGCTGAACAGGCGGTCGTAAAGTCGCTCAGGTCGCGAGGCGGATCCCGCAGCTTCGCTGGTGGGATCCGCGCGCCCGCGGATCCGCTCGCCAAATTCGCGCCCGCAC 4080
IhrLeuLeuIhrProGluGlnAlaValValLysValArgGlnValAlaGlnAlaIleProGlnLeuSerValValGlyIleAlaGlyProGlyLeuAlaAsnIleAlaIhrGthr
CCTTCCCGCCCTGGAGCTGATCCCGCAACAGCTGCGGACCTGAAATATGCCTGCTGf.s
PheArgIhrLeuGluIleArgGluGlnLeuProAspLeuLysLeuCysLeuSer



a) probe DNA : *nifL* (Sau3AI - TaqI)



1, probe DNA

2, probe DNA + NH_4^+

3, probe DNA + NH_4^-

4, probe DNA + NH_4^- / *nifL*⁺*A*⁺

5, probe DNA + NH_4^- / *nifL*^C

6, probe DNA + NH_4^- / *nifA*^C

b) probe DNA : *nifB* (TthIII - AvaII)

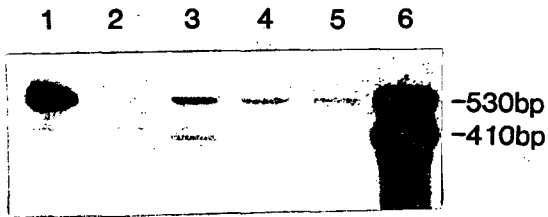
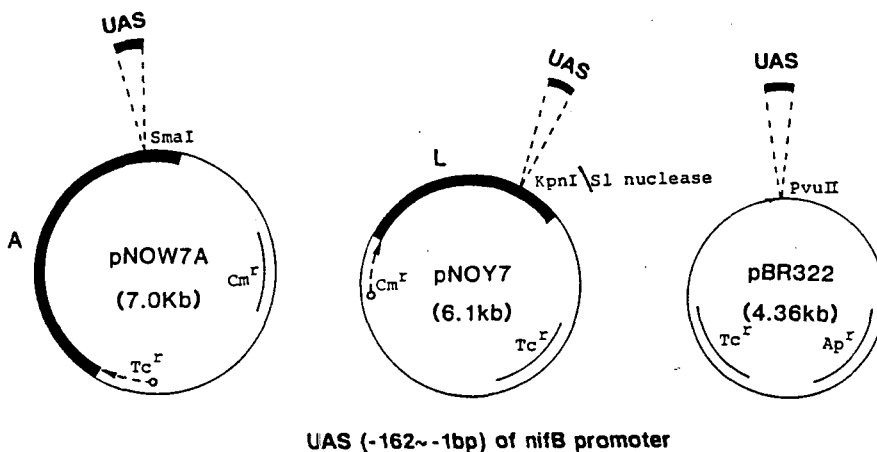


Fig. 2 Effects of NH_4^+ or the *nif LA* products for the transcription of the *nif* gene



strains(plasmids)	genotype of host/plasmids	nitrogenase activity*	
		-NH ₄	+NH ₄
<i>K. oxytoca</i> NG13	<i>nif</i> ⁺	56,352	0
<i>K. oxytoca</i> NG13(pNOW7A)	<i>nif</i> ⁺ / <i>nifA</i> ^c	19,602	3,077
<i>K. oxytoca</i> NG13(pNOW7A-UAS)	<i>nif</i> ⁺ / <i>nifA</i> ^c , UAS	845	847
<i>K. oxytoca</i> NG13(pNOY7)	<i>nif</i> ⁺ / <i>nifL</i> ^c	0	0
<i>K. oxytoca</i> NG13(pNOY7-UAS)	<i>nif</i> ⁺ / <i>nifL</i> ^c , UAS	18	0
<i>K. oxytoca</i> NG13(pBR322-UAS)	<i>nif</i> ⁺ /UAS	368	0
<i>K. pneumoniae</i> UNF714	<i>nifA</i> ⁻	0	N.T.

* nmol C₂H₄ produced per day

N.T.: not tested

Fig. 3 Influence of insertion of upstream activator sequences

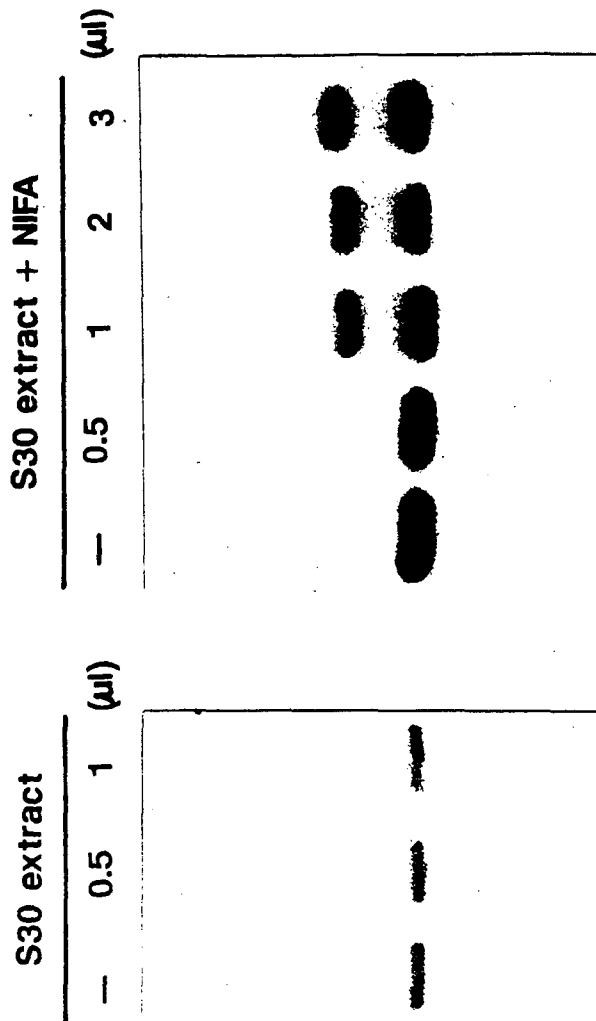
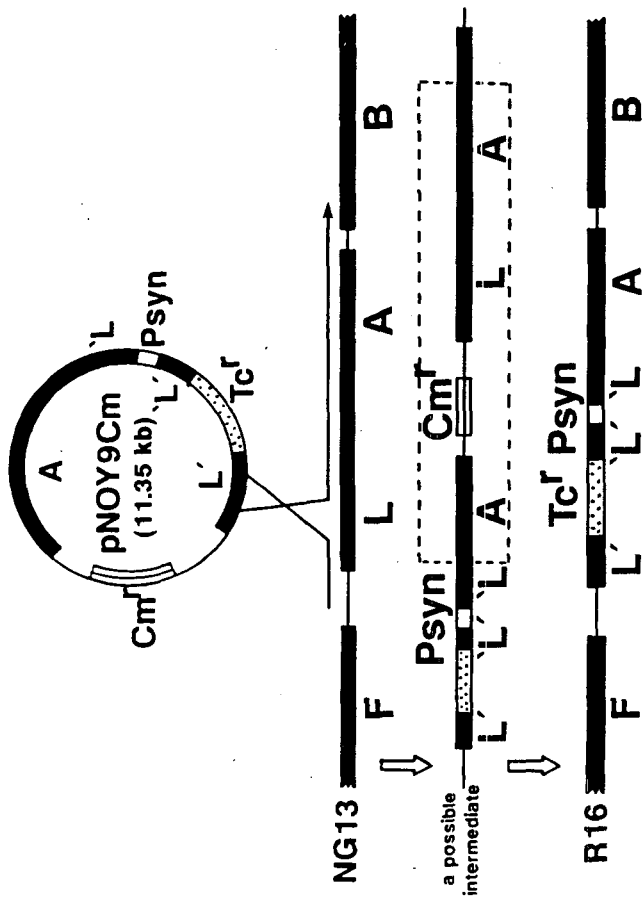


Fig. 4 Binding of NifA protein to the upstream activator sequence in the promoter of *nif B* gene



strains	genotypes of host/plasmid	cell mass O.D. ₅₅₀	Nitrogenase activity*	
			-NH ₄	+NH ₄ / -NH ₄ (%)
<i>K. oxytoca</i> NG13	nif ⁺	0.47	12,127	0
<i>K. oxytoca</i> R16	nifL ⁻ A ^C	0.42	11,828	4,923
<i>K. oxytoca</i> R16(pNOA102)	nifL ⁻ C/nifA ^C	0.40	9,356	8,055
<i>K. pneumoniae</i> UNF714	nif ⁻		0	0

*nmol C₂H₄ produced 20 hours

Fig. 5 (upper panel) A possible scheme of homologous recombination between the host chromosome and plasmid pNOY9Cm, (low panel) Nitrogenase activity of the recombinant R16