

*N. muscorum*과 담배 배양세포의 공생유도에 따른 질소대사에 관여하는 효소활성의 변화

鄭賢淑

조선대학교 자연과학대학 유전공학과

Changes of Enzyme Activity in Nitrogen Metabolism on Induced Association of *N. muscorum* with Cultured Tobacco Cells

Cheong Hyeon Sook

Department of Genetic Engineering
Chosun University, Kwangju

ABSTRACT

Investigations on the liability of nitrogen usage by *Nostoc muscorum* that has nitrogen fixing ability, and cultured tobacco cells as they were associately cultured on nitrogen-free media and effects of polyamine on the associated culture condition were carried out. In addition, measurement on the activity of nitrate reductase, glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase and glutamate synthase that take part in the metabolic pathway of nitrogen fixation product were performed.

Among enzymes participating in the metabolic pathway of nitrogen fixation products, the activity of nitrogen reductase stimulated five times in associated culture, and that of glutamine synthetase of *N. muscorum* increased two times after heterocyst differentiated. Activity of glutamate dehydrogenase increased markedly when cultured tobacco cells were solely incubated on nitrogen-free media, but inhibited when cultured associately. And, glutamate synthase was showed the highest activity in 0.1mM of spermine treated group.

서론

질소고정 미생물은 질소에 의해 생성된 NH_4^+ 를 동화하여 자신의 생장에 사용하며 외부로 분비하지 않지만 공생관계에 있는 질소고정 미생물은 NH_4^+ 대사에 관여하는 효소가 부족하므로 nitrogense에 의해 생산된 NH_4^+ 를 직접 식물 배양세포에 전달하여 효과적으로 동화할 수 있도록 한다고 하는 보고가 있다(Shanmugan *et al.*, 1978). 그러나 공생관계에 있지 않는 *Anabaena variabilis*와 버 배양세포를 인위적으로 공생을 유도하였을 때, nitrogense에 의해 생산된 NH_4^+ 를 버 배양세포에서 이용할 수 있다는 보고가 있다(Latorre *et al.*, 1986).

질소대사에 관여하는 많은 효소중에서 특히 glutamine synthetase는 heterocyst와 일반세포 사이에 그 활성이 약간 다르다고 알려졌으며 생성된 glutamine은 대부분이 일반세포에서 glutamate로 전환된다고 하였다(Bagchi *et al.*, 1987; Rai and Raizada, 1988). 실제로 식물이 질소원으로 이용하려면 N_2 기체는 질산염이나 암모니아로 고정되어야 하며, 질소급원에 따라 질산염의 환원과 암모니아 동화에 미치는 영향이 각각 다르다고 보고되었다(Aslam and Huffaker, 1982; Bekasova *et al.*, 1988; Skill and Smith, 1987). 인위적으로 생물학적 질소고정을 위한 식물 배양세포와 질소고정능을 가진 *Anabaena*의 공생을 유도하여 생성된 암모니아를 식물

배양세포에서 이용할 수 있다는 보고도 있었다(Latorre *et al.*, 1986). 본 실험에서는 아세틸렌 환원력을 이용하여 질소고정능이 확인된 *N. muscorum*과 담배 배양세포를 polyamine을 처리한 무질소배지에서 혼합배양하여 질소고정 산물의 대사에 관여하는 효소인 nitrate reductase, glutamine synthetase, glutamate dehydrogenase, glutamate synthase(Meeks *et al.*, 1985)의 활성의 변화를 조사하여 *N. muscorum*이 고정된 질소원을 식물 배양세포에서 동화할 수 있는지, 그 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

담배 및 세포배양 및 *N. muscorum*의 배양

Cheong *et al.* 방법(1986)에 따라 시행하였고, 혼합배양은 polyamine을 농도별로 처리한 무질소 1-B5 배지에 담배 배양세포를 옮긴 다음 무질소 Arnon 배지에서 배양한 heterocyst가 형성된 *Nostoc*을 접종하였다(Cheong *et al.*, 1987).

조효소액의 조제

Chiu와 Shargool 방법(1979)을 수정하여 실시하였고, 담배 배양세포는 냉각수에 3회 이상 여과 세척하였으며, 혼합 배양세포는 표면의 *N. muscorum*을 떼내고 냉각수로 여러번 세척한 다음 무게를 재고 소량의 석영사와 추출액(200mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol pH 7.5)을 첨가하여 막사발로 마쇄한 후 1,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 그 상정액을 다시 27,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

Nitrate Reductase 활성도 측정

Heimer와 Filner의 방법(1971)을 수정하여 실시하였다. 효소반응액은 인산용액 0.4μM(pH 7.5), 20μM KNO₃, 0.4μM NADH 및 200ul 조효소액을 첨가하여 최종용량이 2.0ml되게 하였으며, 30℃에서 15분간 항온처리한 후 1ml의 Sulfamidamide(1% w/v in 1.5 N HCl)와 1 ml N-(1-naphthyl) ethylene diamine hydrochloride(0.02%)를 첨가한 다음 아질산염의 생성량을 측정하였다. 과다 환원된 pyridine nucleotide에 의한 발색의 장애를 제거하기 위해서 1.0M의 zinc acetate 0.2ml를 첨가하여 30분간 발색시킨 후 1,000×g에서 10분간 원심분리하여 540nm에서 흡광도의 증가를 spectrophotometer로 측정하였다(Roidan *et al.*, 1982). 효소의 1 unit는 1분 동안 단백질 1mg당 흡광도의 변화가 0.01인 것으로 정하였다.

Glutamine synthetase 활성도 측정

Glutamine synthetase의 활성도를 Ahmad(1984) 방법을 변형하여 측정하였다. 효소 반응액은 4mM MnCl₂, 0.2mM EDTA, 0.1ML-glutamine, 0.01M sodium ADP, 1.0M sodium arsenate, 2.0M hydroxylamine-HCl 완충용액(pH 7.0)에 200ul의 조효소액을 첨가하여 전체부피가 1ml 되도록 하여 37℃에서 20분간 항온 처리시킨 후 반응 정지액(10% FeCl₃, 24% trichloroacetic acid, 6N HCl) 2ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 30,000×g에서 원심분리시켜 침전물을 제거한 후 540nm에서 측정하였다.

Glutamate dehydrogenase 활성도 측정

Glutamate dehydrogenase의 활성도를 Kanamori등(1972)과 Takahashi와 Furuhashi (1980)의 방법을 수정하여 340nm에서 흡광도의 변화를 조사하였다. 효소반응은 0.1M α-ketoglutarate, 1.0M NH₄Cl, 3.0mM NADH가 포함된 0.2M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 200ul의 조효소액을 첨가하여 전체 부피가 3ml 되도록 하여 30℃에서 반응시켰다. 반응은 NADH를 첨가함으로써 시작되었으며, 반응 후 3분간의 NADH 산화율을 측정하였다.

Glutamate synthase 활성도 측정

Glutamate synthase 활성도는 Dougall(1974)의 방법을 변형하여 측정하였으며, 효소 반응은 1mM EDTA, 1mM α-ketoglutarate, 2mM L-glutamine, 0.16mM NADH가 포함된 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5)에 200ul의 조효소액을 넣어서 전체 부피가 3ml가 되도록 3분동안 30℃에서 반응시킨 후 NADH의 산화율을 340nm에서 측정하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry등(1951)의 방법으로 정량하였다.

*N. muscorum*의 heterocyst와 일반세포 분리

Telor등(1978)의 방법을 수정하여 시행하였다. 무질소 Arnon 배지에서 공기를 순환하면서 90일간 액체배양한 *N. muscorum*을 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 모은 뒤 30mM Hepes buffer(30mM Hepes-KOH, pH 7.5)로 씻은 후 동일한 완충 용액에 lysozyme을 첨가하여 상온에서 3시간 동안 배양한다. 이때 1,000×g로 5분간 원심분리하여 상정액은 일반세포로 사용하였고 침전된 것을 heterocyst로 사용하였다.

결과 및 고찰

담배 배양세포를 polyamine을 처리한 무질소배지에서 단독 배양하였을 때 nitrate reductase 활성도 변화와 정상적인 담배 배양세포를 비교한 결과는 Fig. 1과 같았다.

무질소배지에서 60일간 배양한 담배 배양세포는 정상적인 담배 배양세포에 비해 nitrate reductase 활성도가 약 57% 정도 감소하였으나 polyamine을 첨가한 경우는 무질소배지의 배양세포보다 활성이 상당히 증가하였고, 특히 10^{-4} M spermine 처리구에서는 약 200% 증가하여 가장 높은 활성을 나타냈으며 정상적인 담배 배양세포보다도 약 16% 증가하였다.

Polyamine을 처리한 무질소배지에서 *N. muscorum*과 담배 배양세포를 혼합배양 하였을 때 nitrate reductase 활성도 변화를 측정하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 무질소배지에서 혼합배양한 담배 세포에서는 단독 배양한 것에 비하여 5배 이상의 높은 활성도를 나타냈으며, 10^{-4} M spermine 첨가구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 NH_4^+ 축적이 nitrate reductase에 영향을 미친다는 Fletcher(1982)의 보고를 근거로 하면 spermine의

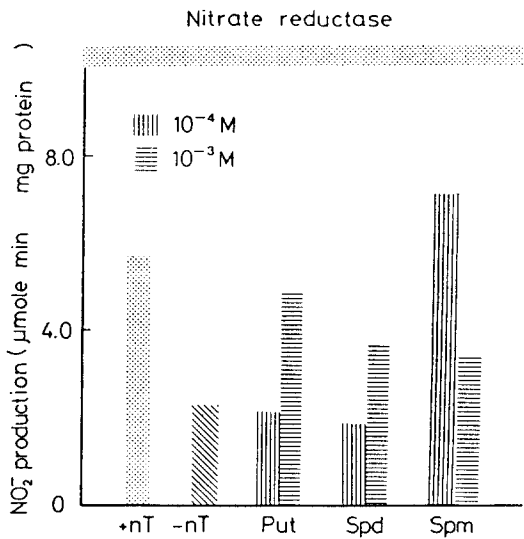


Fig. 1. The changes of nitrate reductase activity in cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. +nT: cultured tobacco cells 1-B5 media -NT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media

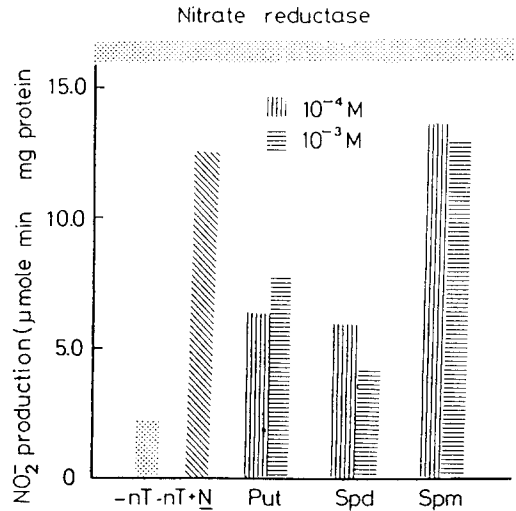


Fig. 2. The changes of nitrate reductase activity in cultured tobacco cells associated with in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. +nT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media -T+N: cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media

처리구에서 단백질의 함량이 증가하여 nitrogenase 활성이 증가되는 것과 관련된다고 할 수 있으며, polyamine 첨가구에서 혼합배양시 특별히 nitrate reductase에 영향을 주지 않는 점으로 미루어 polyamine이 무질소배지에서 배양한 담배 배양세포의 단백질 함량을 높이는 등 생장에 좋은 영향을 주지만 직접적으로 어떤 특정한 효소를 활성화 시키는 것은 아니라고 사료된다.

그리고 polyamine을 첨가한 무질소배지에서 혼합 배양한 담배 배양세포에 내재하는 spermine 함량이 가장 많은 10^{-4} spermine 첨가구는 nitrate reductase 활성이 가장 높은 점을 연관지어 생각해보면 spermine이 담배 배양세포와 *N. muscorum*의 혼합 배양을 가장 유리하게 한다고 생각되어진다.

Fig. 3은 담배 배양세포를 polyamine을 첨가한 무질소배지에서 단독 배양 하였을 때 glutamine synthetase의 활성도를 나타낸 것이다. 정상적인 담배 배양세포에 비하여 무질소배지에서 단독 배양한 담배 배양세포의 glutamine synthetase 활성도는 약 66% 감소하였으며,

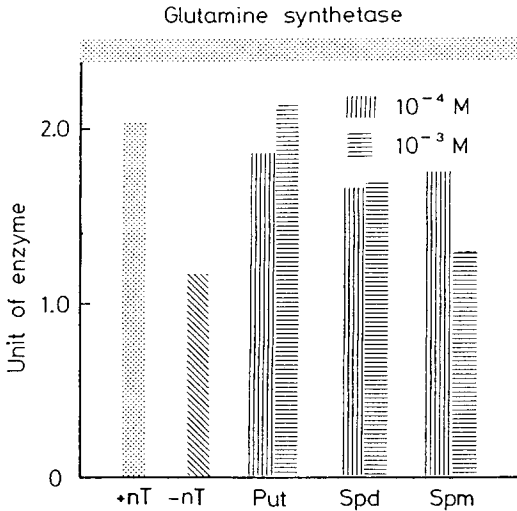


Fig. 3. The changes of glutamine synthetase activity in cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340nm of 0.01 / min. / mg protein.

+nT: cultured tobacco cells 1-B5 media
 -NT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media

polyamine 처리구에서 배양한 담배 배양세포인 경우 모두 polyamine를 첨가하지 않는 무질소배지에서 배양한 담배 배양세포에 비해 효소의 활성이 상당히 증가하였다. 특히 10⁻⁴M과 10⁻³M putrescine 처리구에서는 각각 약 58%, 75%가 증가되었다.

*N. muscorum*이 NH₄⁺가 첨가된 배지에서 자랐을 때 glutamine synthetase는 감소된다고 하였는데(Kashyap and Johar, 1984) 본 실험에서는 heterocyst가 형성된 후 질소 고정에 일어났을 때 glutamine synthetase 활성이 훨씬 높게 나타났다. 또한 배양 세포의 단독 배양과 *N. muscorum*과의 혼합배양시 polyamine 처리한 실험구에서 배양한 것은 polyamine을 첨가하지 않는 무질소 배지에서 배양한 대조구에 비해 모두 nitrogen 활성이 감소하였으며(Cheong *et al.*, 1987), 이 때의 glutamine synthetase 활성이 감소된 점으로 미루어, polyamine의 과다로 인한 nitrogenase 활성의 저해가 *N. muscorum*이 질소 고정된 암모니아의 감소를 가져오며 이로 인해 glutamine synthetase 활성의 감소를 초래한다고 사료된다.

다. 특히 무질소 Arnon 배지에서 계속적인 공기순환을 하면서 액체 배양한 *N. muscorum*의 Heterocyst와 일반세포를 분리시켜 glutamine synthetase 활성을 측정하였을 때(Fig. 4) 일반세포보다 heterocyst에서 약 2배 정도 높은 점은 조류의 일반세포에 비해 heterocyst의 glutamine synthetase 활성이 2배 높다는 보고와 일치한다(Stewart and Pearson, 1970; Stewart *et al.*, 1969). 이같은

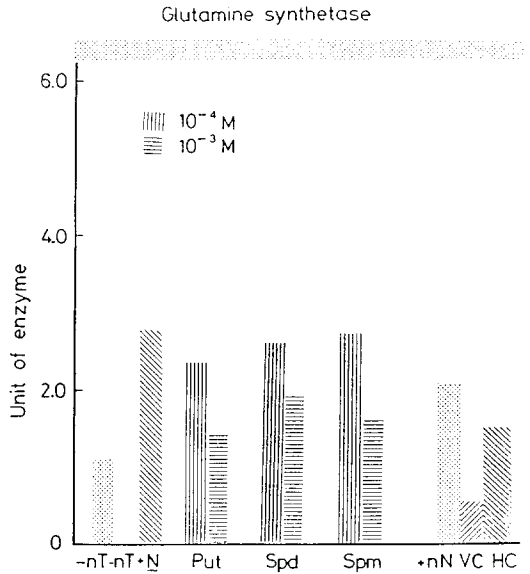


Fig. 4. The changes of glutamine synthetase activity in cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340nm of 0.01 / min. / mg protein.

-NT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media
 -NT+N: cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media
 +nN: *N. muscorum* cultured 90 days in Arnon media with N-source
 VC: vegetative cells of *N. muscorum* cultured for 90 days in N-free Arnon media
 HC: heterocysts of *N. muscorum* cultured for 90 days in N-free Arnon media

결과는 heterocyst에서 고정된 질소고정 산물이 heterocyst 내에서 glutamine으로 전환되어진다고 추정할 수 있다.

Glutamate dehydrogenase의 경우 glutamine synthetase와는 달리 polyamine을 처리하지 않는 무질소배지에서 담배 배양세포를 단독 배양한 것(Fig. 5)이 혼합배양한 것보다 활성이 모두 높았으며 $10^{-3}M$ spermine 첨가구에서도 glutamate dehydrogenase 활성이 높은 점으로 미루어 (Fig. 6) nitrogenase 활성과는 상반되며, Morett 등(1985)이 식물 배양세포와 *Rhizobium phaseoli*의 공생에 있어서 glutamine 합성이 저해될 때 질소 고정능도 감소된다는 보고를 근거로 하면 질소공급원이 적을 때 상대적으로 glutamate dehydrogenase 활성은 증가된다고 사료된다. Bergman 등(1985)도 광합성을 하는 질소 고정균인 *Anabaena*에서 heterocyst와 akinates 그리고 일반 세포등에 glutamine synthetase가 존재함을 시사 하였으며, 이것은 질소 고정 초기 산물인 NH_4^+ 에 중요한 역할을 한다고 하였다. 담배 배양세포를 polyamine을 처리한 실험구

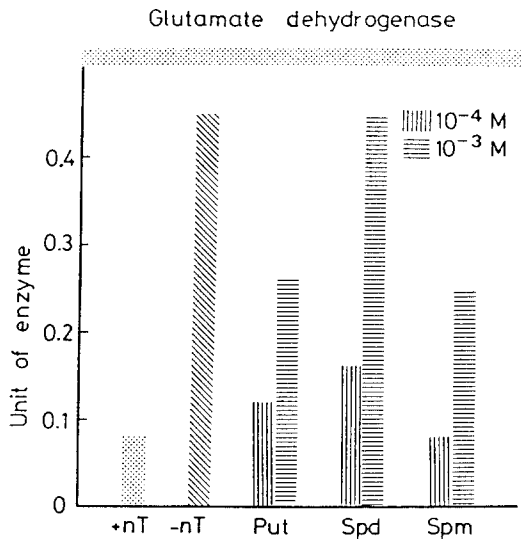


Fig. 5. The changes of glutamate dehydrogenase activity in cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340nm of 0.01 / min. / mg protein.

+nT: cultured tobacco cells 1-B5 media
-NT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media

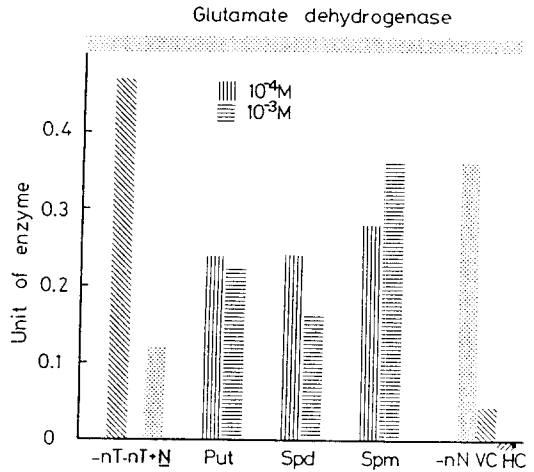


Fig. 6. The changes of glutamate dehydrogenase activity in cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340nm of 0.01 / min. / mg protein.

-nT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media
-NT+N: cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media
+nN: *N. muscorum* cultured for 90 days in Arnon
VC: vegetative cells of *N. muscorum* cultured for 90 days in N free Arnon media
HC: heterocysts of *N. muscorum* cultured for 90 days in N free Arnon media without N-source

에서 단독배양 하였을 때 glutamate synthetase 활성도를 정상적인 담배 배양세포와 비교한 결과 그림 7과 같았다. 정상적인 담배 배양세포에 비하여 무질소배지에서 배양한 것은 활성이 약 50% 감소하였으나 polyamine을 처리하였을 때는 약간 증가하였다. 특히 $10^{-4}M$ spermine 처리구에서는 무질소배지에서 배양한 것보다 약 3배 이상 활성이 높았다.

상기와 같은 조건에서 *N. muscorum*과 혼합배양한 담배 배양세포의 glutamate synthetase 활성은 단독 배양

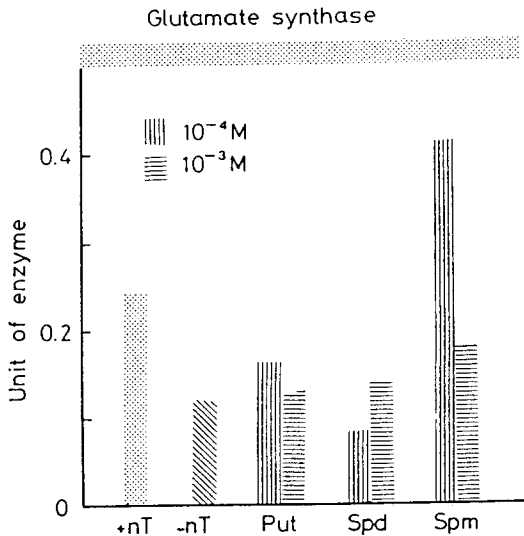


Fig. 7. The changes of glutamate synthase activity in cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340nm of 0.01 / min. / mg protein.

+nT: cultured tobacco cells 1-B5 media
 -NT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media

한 것보다 약 13% 증가하였고 polyamine을 첨가하였을 때는 대부분 훨씬 높은 활성을 나타냈으며 10⁻⁴M spermine 처리구에서 약 3배 이상 증가하여 가장 활성이 높았다.

또한 질소원의 유무에 상관없이 Arnon 배지에서 현탁 배양시킨 *N. muscorum*의 일반 세포에서의 glutamate synthase 활성은 거의 비슷했으나 heterocyst에서는 활성이 나타나지 않았다. 그리고 glutamine synthetas의 활성은 무질소배지에 비해 polyamine을 첨가한 무질소배지에서 혼합 배양한 담배 배양세포에서는 대부분 증가하였으며, 10⁻⁴M spermine의 처리구에서 월등하게 증가하였다 (Fig. 8).

Table 1은 무질소 배지와 polyamine을 첨가한 무질소 배지에서 담배 배양세포와 *N. muscorum*을 혼합배양하여 수용성 단백질 함량변화를 비교한 것이다. 무질소배지에서 배양한 담배 배양세포는 정상적으로 배양한 것에 비하여 약 3% 정도 감소하였으며, polyamine을 첨가한

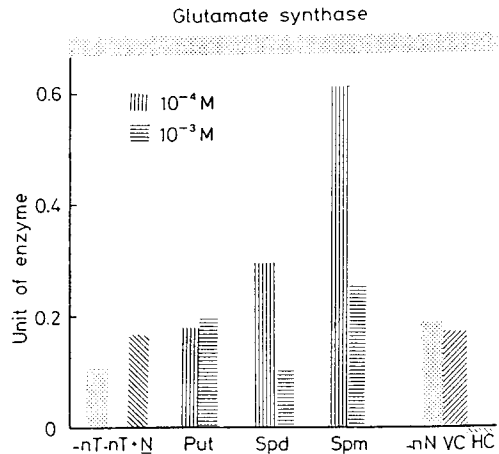


Fig. 8. The changes of glutamate synthase activity in cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media containing polyamines for 60 days. One unit of enzyme is defined as an absorbance at 340 nm of 0.01 / min. / mg protein.

-nT: cultured tobacco cells in N-free 1-B5 media
 -NT+N: cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media
 +nN: *N. muscorum* cultured for 90 days in Arnon media.
 VC: vegetative cells of *N. muscorum* cultured for 90 days in N-free Arnon media
 HC: heterocysts of *N. muscorum* cultured for 90 days in N-free Arnon media

무질소배지에서 배양한 것이 전반적으로 증가하는 경향을 보이고, 특히 spermine 처리구에서는 78% 이상의 단백질 함량이 증가하였다. 10⁻³M spermidine과 spermine 처리구에서는 약 70% 이상 증가하였다. 이러한 결과는 *N. muscorum*과 혼합배양이 담배 배양세포의 질소 고갈을 보증하는 것으로 생각되어진다.

요 약

무질소 1-B5 배지에서 단독 배양한 담배 배양세포의

Table 1. The effects of polyamine on protein contents in cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N free 1-B5 media for 60 days.

(mg / g cultured cells)

Treatment	polyamine						
	Control	Putrescine		Spermidine		Spermine	
Materials		10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻³ M
T*	2.8	3.7	2.9	3.8	4.2	5.2	5.0
T+N**	4.8	3.3	4.6	3.4	5.1	3.5	5.2

T* : cultured tobacco cells

T+N** : cultured tobacco cells associated with *N. muscorum* in N-free 1-B5 media

nitrate reductase 활성은 1-B5 배지에서 배양한 담배 배양세포에 비해 50% 이상 감소되었으나 10⁻⁴M spermine 처리구에서는 그 활성이 가장 증가되었으며, *N. muscorum*과 혼합 배양시 그 활성이 현저히 증가한 반면 polyamine은 거의 영향을 미치지 않았다. Glutamate dehydrogenase 는 혼합 배양시 담배 배양세포를 단독 배양하였을 때보다 약 4배 감소 되었으며, glutamate synthase의 활성은 10⁻⁴M spermine 처리구에서 혼합 배양하였을 때 그 활성이 가장 높았다.

참 고 문 헌

- Ahmad, I., and J. A. Hellebust. 1984. Nitrogen metabolism of the marine *Chlorella autotrophica*. Plant Physiol. **76**: 658~663.
- Aslam, M. and R. C. Huffaker. 1982. *In vivo* nitrate reduction in roots and shoots of barley(*Hordeum vulgare* L.) seeding in light and darkness. Plant Physiol. **70**: 1009~1013.
- Bagchi, S. N., Kaloya, P. and P. S. Bison. 1987. Effect of cyanophage N-1 infection on the synthesis and stability of *Nostoc muscorum* Nitrate Reductase. Current Microbiology. Vol. 15. No. 2.
- Bergman, B., P. Lindblad, A. Pettersson, E. Renstrom and E. Tiberg. 1985. Immunogold localization of glutamine synthetase in a nitrogen-fixing cyanobacterium (*Anabaena cylindrica*). Planta. **166**: 329~334.
- Bekasova, O. D., Sineschekov, V. A. Sineshchev. I 1988. Investigation of the excitation energy transfer pathway from phycobilisomes to chlorophyll B in *Nostoc muscorum* by derivative and selective fluorimetry. Biofizika. Vol. 33. No. 1.
- Cheong, H. S., C. M. Kim, and Y. H. Kang. 1986. Induction of symbiosis between *Nostoc muscorum* and cultured plant cells. I. Effects of polyamines on the association of *N. muscorum* with tobacco and soybean cultured cells. Korean J. Bot. **29**(1): 67~75.
- Cheong, H. S., B. Hwang and Y. H. Kang. 1987. Induction of symbiosis between *Nostoc muscorum* and cultured plant cells. II. Changes of nitrogen fixation ability and morphology by association of *N. muscorum* with cultured tobacco cells. Korean J. Bot. **30**(4): 257~266.
- Chiu, J. Y. and P. D. Shargool. 1979. Importance of glutamate synthesis by soybean cell suspension cultures. Plant. Physiol. **63**:409~415.
- Dougall, D. K. 1974. Evidence for the presence of glutamate synthase in extracts of carrot cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. **58**(3): 639~646.
- Fletcher, J. S. 1982. Control of nitrogen assimilation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. IN Plant Tissue Culture(1982) pp. 229~230.
- Kanamori, T., S. Konishi and E.Takahashi. 1972. Inducible formation of glutamate dehydrogenase in rice plant roots by the addition of ammonia to the media. Physiol. Plant. **26**: 1~6.
- Kashyap, A. K. and G. Johar; 1984. Genetic control of ammonium transport in nitrogen fixing cyanobacterium *Nostoc muscorum*. Mol. Gen. Genet. **197**: 509~512.
- Latorre, C., J. H. Lee, H. Spiller and K. T. Shanmugam. 1986. Ammonium ion-excreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice:

- A feasibility study. *Biotech. lett.* **8**(7): 507~512.
15. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265~275.
 16. Meeks, J. C., C. S. Enderlin, C. M. Joseph, C. M. Joseph, J. S. Chapman and M. W. L. Lollar. 1985. Fixation of [¹⁵N]N₂ and transfer of fixed nitrogen in the *Anathoceros Nostoc* symbiotic association. *Planta*. **164**: 406~414.
 17. Morett, E., S. Moreno, and G. Espin. 1985. Impaired nitrogen fixation and glutamine synthesis in methionine sulfoximine sensitive (MS^s) mutants of *Rhizobium phaseoli*. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 229~234.
 18. Rai, L. C. and M. Raizada. 1988. Impact of chromium and lead on *N. muscorum*: Regulation of toxicity by ascorbic acid glutathion and sulfer-containing amino acid. *The Journal of General Virology*. Vol. 69, part. 3.
 19. Roldan, J. M., J. P. verbelen, W. L. Butler, and K. Tokuyasu. 1982. Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* **70**: 9~11.
 20. Shanmugam, K. T., F. O'Gara, K. Andersen, and R. C. Valentine. 1978. Biological Nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 263~276.
 21. Skill, S. C. and R. J. Smith. 1987. Synchronous akinete germination an hetrocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7937 *Nostoc* PCC 6720. *The Journal of General Microbiology*. Vol. 133, Part. 2.
 22. Stewart, W. D. P., A. Haystead and H. W. Pearson. 1969. Nitrogenase activity in hetrocysts of blue-green algae. *Nature*. London. **224**: 226~228.
 23. Stewart, W. D. P. and H. W. Pearson, 1970. Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth metabolism of blue-green algae. *Proceedings of the Royal Society*. London, Ser. B. **175**: 293~311.
 24. Takahashi, Y. and K. Furuhashi. 1980. Properties of glutamate dehydrogenase purified from green tobacco callus tissue. *Plant Cell Physiol.* **21**(6): 1067~1075.
 25. Telor, E., L. W. Luijk, and Packer. 1978. Hydrogenase in N₂-fixing cyanobacteria. *Archi. Biochem. Biophys.* **185**(1): 185~194.

(Received: August 10, 1990. Accepted: August 30, 1990)