

## 해녀콩(*Canavalia lineata*)의 뿌리혹 발달 단계에 따른 뿌리혹 특이 단백질의 변화 양상

崔 聖 和 · 安 正 善  
(서울대학교 자연과학대학 식물학과)

### Changes in Nodule-Specific Proteins during Nodule Development of *Canavalia lineata*

Choi, Sung Hwa and Chung Sun An  
(Department of Botany, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

Total soluble proteins from three developmental stages of induced root nodules of *Canavalia lineata* were compared with those of non-nodulated roots by SDS-PAGE and two dimensional (2-D) gel electrophoresis. Thirteen nodule-specific protein (nodulin) bands were identified by the former and 30 nodule specific protein spots were detected by the latter method respectively. Some of the nodulins were detected differentially depending on the nodule's developmental stages. For example, only three leghemoglobin (Lb)-like protein spots appeared at stage I ( $d < 2$  mm), but two additional Lb-like protein spots appeared at stage II ( $d < 4-5$  mm). pI value and molecular weight of monomers of Lb-like protein were narrower and greater than those of soybean, ranging from 4.4 to 5.0 and 15.7 kd respectively. Northern blot hybridization of total RNAs from roots and root nodules using soybean Lb cDNA as a probe made it clear that Lb gene was expressed tissue-specifically only in the root nodules.

#### 서 론

*Rhizobium*에 의한 생물학적 질소고정은 공생균주와 콩과식물과의 상호작용에 의해 식물의 뿌리혹 내에서 이루어지며, 뿌리혹 형성과정에서 식물은 자신의 조절 메커니즘에 따라 조직 특이적인 유전자 발현을 개시한다(Verma *et al.*, 1983). 이처럼 뿌리혹에서만 특이적으로 발현되는 단백질을 뿌리혹 특이 단백질(nodulin)이라 하며 이들은 기능과 발현시기에 따라 구분되고 있다(Verma and Nadler, 1984).

뿌리혹 특이 단백질에 관한 현재까지의 연구는 뿌리혹의 발달단계에 따른 단백질의 양상변화(Govers *et al.*, 1985;

Sengupta-Gopalan and Pitas, 1986)와 이들의 기능이나 세포내 위치에 관한 연구(Bergman *et al.*, 1983; Lare *et al.*, 1984; Thummler and Verma, 1987) 등 주로 단백질 수준에서 이루어져 왔으나, 최근에는 hybrid selected translation 방법에 의한 뿌리혹 특이 단백질의 검색(Sengupta-Gopalan and Pitas, 1986), nodulin cDNA의 염기 서열의 결정(Franssen *et al.*, 1988), *in situ* hybridization 방법에 의한 식물체에서의 발현 장소 조사(Scheres *et al.*, 1990) 등 유전자의 구조와 발현 수준에서 연구가 이루어지고 있다. 이와 같은 뿌리혹 특이 단백질에 대한 연구는 궁극적으로 뿌리혹의 형성에서부터 고정된 질소의 대사과정까지를 분자생물학적으로 규명하려는 노력의 일환으로 수행되어지고 있다(Verma and Nadler, 1984).

우리나라 제주도에서 자생하는 해녀콩(*Canavalia lineata*) 뿌리혹의 질소고정 공생관계에 대해서는 공생균주

본 연구는 과학재단 목적기초연구비(870514)의 지원에 의해 수행되었음.

*Rhizobium* sp. SNU003의 분리(Kim and An, 1989), 공생균주의 성장에 미치는 canavanine과 arginine의 역할(Lee and Kwon, 1990) 및 공생균주의 *nif*-H, D, K 유전자의 클로닝(Kang, 1990) 등의 연구가 수행되었으나 해너콩의 뿌리혹 특이 단백질을 관한 연구는 아직 선례가 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 해너콩과 *Rhizobium*과의 질소고정 공생관계를 분자생물학적으로 규명하려는 연구의 일환으로 SDS-PAGE 및 2차원 전기영동법을 사용하여 해너콩의 뿌리혹 특이 단백질을 검색하고 뿌리혹 발달에 따른 이들의 변화양상을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**공생균주 배양.** 해너콩의 공생균주인 *Rhizobium* sp. SNU003을(Kim and An, 1989) YEM 액체배지(Mannitol 10 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, NaCl 0.1 g, Yeast extract 0.4 g per liter, pH 6.8-7.0) 100 ml에 접종시켜 28°C 암소에서 8-12시간 현탁배양하여 600 nm에서의 흡광도가 1이 되도록 한 후 4°C에서 보관하면서 접종에 사용하였다.

**해너콩의 뿌리혹 형성 유도.** 해너콩의 재배 및 뿌리혹 형성 유도는 Lee와 Kwon(1990)의 방법에 따랐다. 종피를 제거하고 암소에서 3일간 발아시킨 해너콩의 하배축이 3 cm 정도 자라던 Hoagland 배양액이든 플라스틱 용기에 옮기고 뿌리부분은 빛을 차단하면서 7,000 lux(16:8)에서 3주간 수경재배하였다. 2엽까지 나온 식물은 Hydraball로 채워진 화분(17×20 cm)에 옮겨 심고 4일 후 질소원이 결핍된 Hoagland 배양액 10 L에 현탁배양한 공생균주 100 ml을 섞어서 화분에 부어주어 접종시켰다.

**뿌리혹의 채취.** 실험 재배 조건하에서 뿌리혹의 한 세대가 끝난다고 생각되는(Kim and An, 1989) 접종 6주 후에 생성된 뿌리혹을 액체질소로 얼린 후 뿌리혹의 크기에 따라 직경 2 mm까지(I 단계), 4-5 mm(II 단계), 10 mm(III 단계)로 구분하여 -40°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 콩의 경우에는 *Rhizobium japonicum* USDA110으로 접종하여 얻은 뿌리혹을 같은 방법으로 보관하면서 단백질 추출의 재료로 사용하였다.

**단백질의 추출.** 뿌리와 뿌리혹을 4°C의 막자사발에서 단백질 추출 완충용액인 50 mM Tris-HCl(pH 6.8)을 최소량 넣고 마쇄한 후 8,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 단백질 분석의 시료로 사용하였으며, Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 정량하였다.

**SDS-PAGE 및 CB 염색.** 분리한 단백질을 분자량의 차이에 따라 분리하기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 준해 SDS-PAGE를 수행하였으며, 이 때 5% acrylamide의 stacking gel과 7.5-15% acrylamide의 선형 구배 separating gel을 사용하였다. 약 120 µg의 단백질 용액을 well에 적

재하고 stacking gel에서 50 V, separating gel에서 100 V로 전기영동한 후 0.125% coomassie brilliant blue로 염색하여 탈색시켰다.

**2차원 전기영동.** 2차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법에 따라 수행하였다. 등전점 분리를 위한 ampholytes (pH 5-7 1.6%, pH 3-10 0.4%) 겔은 200 V에서 20분, 300 V에서 30분 그리고 400 V에서 30분간 직류전원을 걸어 pH 기울기가 형성되도록 하였고, 전기영동은 600 V에서 15시간, 800 V에서 1시간 수행하였다. 등전점에 따라 분리된 단백질을 분자량의 차이에 따라 분리하는 2차원 전기영동은 앞서의 SDS-PAGE와 같은 방법으로 수행하였는데, separating gel의 농도를 10-25%의 선형구배로 바꾸었다. 2차원 전기영동이 끝난 겔은 0.012 N  $AgNO_3$  용액에서 형광등 빛을 쬐어주며 40분간 노출시켜 염색하였다.

**Northern 혼성화반응.** 뿌리혹 및 뿌리의 전체 RNA는 guanidium isothiocyanate 방법으로 분리하였으며, 15-20 µg의 RNA를 1% formaldehyde-agarose 겔(1% agarose, 6.6% formaldehyde, 50 mM MOPS pH 7.0, 1 mM EDTA)에서 전기영동하고 nylon 막으로 옮겼다(Manniat *et al.*, 1982). 탐침 DNA는 대두의 *lb* 유전자로 pLB-23(Sullivan *et al.*, 1981)을 PstI로 절단하여 얻은 0.51 kd 절편을  $\alpha$ - $^{32}P$ -dCTP 및 random primer를 사용하여 표지하였다. Northern 혼성화반응은 50%(v/v) formamide가 포함된 42°C의 전혼성화반응 용액에서 4시간 동안 전혼성화반응을 수행한 후 탐침 DNA를 첨가하고 42°C에서 15시간 수행하였다. 반응이 끝난 nylon 막은 1X SSPE/0.1%(w/v) SDS 용액으로 42°C에서 30분간 세척하여 2장의 Dupont cronox 증폭막과 함께 X-ray film holder에 넣어서 -40°C에서 20시간 동안 자가방사사진법에 따라 노출시켰다.

## 결과 및 고찰

**SDS-PAGE에 의한 뿌리혹 특이 단백질의 검색.** 뿌리와 뿌리혹의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동하고 coomassie brilliant blue로 염색하여 일차적으로 뿌리와 뿌리혹에서 각각 50여개의 단백질 밴드(band)를 확인하였으며, 뿌리에는 존재하지 않는 단백질 중 뿌리혹에서만 나타나는 뿌리혹 특이 단백질 밴드 13개를 검색하였다(Fig. 1). 이들 뿌리혹 특이 단백질의 분자량은 14-130 kd까지의 넓은 범위에 걸쳐 고르게 분포하고 있었다(Table 1). 이들의 상대적인 양은 염색된 단백질 밴드의 굵기로 비교해 볼 때 15.7 kd 밴드가 가장 많은 것으로 나타났으며, 86.8, 58.6 kd 및 41.5 kd 단백질들도 쉽게 식별 가능한 주요 뿌리혹 특이 단백질임을 확인할 수 있었다.

한편, 해너콩과 콩의 뿌리혹의 수용성 단백질을 조사한 결과 해너콩 뿌리혹 특이 단백질로 검색된 6개의 단백질

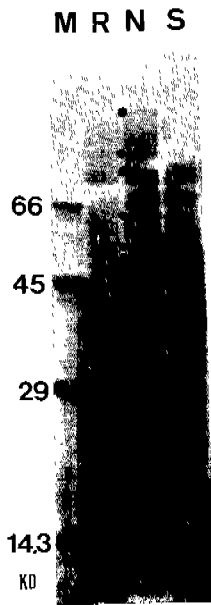


Fig. 1. SDS-PAGE gel of proteins from non-nodulated root (R), root nodule (N) of *C. lineata* and root nodule of soybean (S). Nodulin bands are indicated by closed circle. Arrows represent Lb-like protein from each species.

Table 1. Relative molecular weight ( $M_r$ ) of nodule specific protein bands

Bands from the top	$M_r$ (kd)
1	122.7
2	99.5
3	86.8
4	70.4
5	60.0
6	58.6
7	43.5
8	41.5
9	35.3
10	26.2
11	24.3
12	15.7
13	14.8

들이 콩에서는 존재하지 않았으며, 반대로 콩에서만 나타나는 단백질 밴드도 확인할 수 있었다(Fig.1). 특히 해너 콩과 콩의 leghemoglobin(Lb) 유사 단백질을 보면 그 분자량이 각각 15.7 kd 및 14.1 kd으로 차이를 나타내고 있어 Lb 유사 단백질이 서로 다른 분자량을 보인다는 면에서

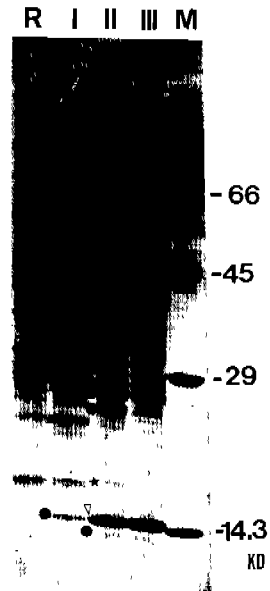


Fig. 2. SDS-PAGE of nodulins at three developmental stages (I, II and III), and non-nodulated root (R) of *C. lineata*. At stage I, nodulin bands and stage I-increased bands were indicated by closed circles and stars respectively. At stage II, new nodulin bands and stage II-decreased bands were also indicated by closed circles and stars. Open arrow represents Lb-like protein band.

종 특이성을 보이고 있었다.

뿌리혹 특이 단백질의 발생단계에 따른 SDS-PAGE 분석. 뿌리혹의 발생 단계에 따른 뿌리혹 특이 단백질의 양상변화를 조사하기 위해 I(뿌리혹의 직경<2 mm), II(직경=4-5 mm) 및 III(직경=10 mm) 단계의 뿌리혹으로부터 전체 수용성 단백질을 추출하여 SDS-PAGE를 수행하였다(Fig.2). 뿌리혹 특이 단백질 밴드들은 발생단계에 따라 그 양이 증가 혹은 감소함을 관찰할 수 있었는데, 이들의 변화양상은 ①뿌리에서는 그 양이 적다가 뿌리혹에서 커지는 종류(Fig.2, I의 별표시), ②뿌리에서는 나타나지 않고 뿌리혹에서만 나타나는 종류(Fig.2, 단힌 원표시), ③뿌리에서 다량으로 존재하다가 뿌리혹이 커짐에 따라 그 양이 줄어드는 단백질 종류(Fig.2, II의 별표시), ④뿌리혹이 커짐에 따라 새롭게 나타나는 단백질 종류(Fig.2, II의 단힌 원표시)로 구분할 수 있었다. 이러한 변화는 뿌리혹 발생 I 단계와 II 단계 사이에서 관찰되었으며, II 단계와 III 단계 사이에서는 관찰할 수 없었다.

이처럼 뿌리혹의 크기에 따라 새롭게 나타나거나 양적으로 증감을 보이는 뿌리혹 특이 단백질들은 뿌리혹의 발생 및 발달에 따라 조직내에서 특정한 역할을 담당할 것이라고

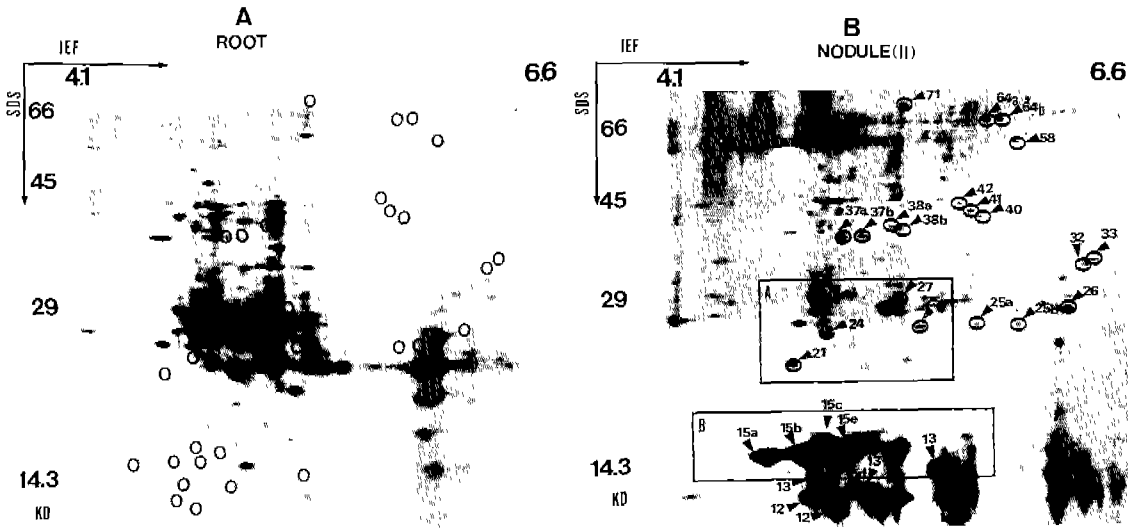


Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoretic pattern of root (A) and nodule of stage II (B) proteins of *C. lineata*. Nodulin spots on panel B are indicated by their molecular weight in kilodalton and corresponding locations (open circle) are indicated on panel A. Boxes A and B indicate the area shown in Figs. 4 and 5.

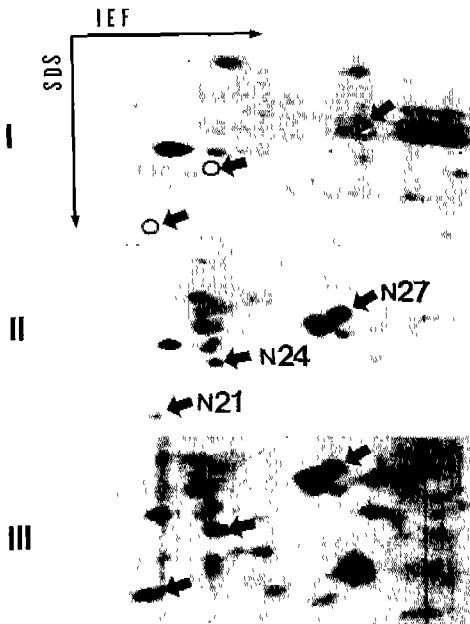


Fig. 4. Two-dimensional gel electrophoretic pattern of nodulins in box A of Fig. 3 at three developmental stages. N24, N21 and N27 nodulins are indicated by arrows and corresponding spots by open circles.

생각되지만(Verma *et al.*, 1986) 본 연구의 결과만으로는 각 단백질의 기능을 확인할 수는 없었다.

2차원 전기영동법에 의한 뿌리혹 특이 단백질의 검색.

약 350  $\mu$ g의 뿌리 및 II 단계 뿌리혹의 단백질을 pI값에 따라 분리하고 이를 분자량의 크기에 따라 2차원 전기영동한 결과 각각의 겔에서 400-500여개의 단백질 spot을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이들을 분자량과 pI값을 고려하여 서로 비교해본 결과 겔의 전 영역에 걸쳐 약 30개의 뿌리혹 특이 단백질들을 가려낼 수 있었다(Fig. 3B).

이들 nodulin들을 분자량에 따라 분류해 볼 때 15 kD까지가 10개로서 그 중 5개는 분자량면에서 Lb 유사 단백질의 단위체로 추정할 수 있었는데, 이는 Lb 단백질이 pI값과 분자량이 약간씩 다른 5개의 단위체의 중합체라는 보고(Appleby, 1983)와 일치하였으며, 나머지 5개의 nodulin들은 SDS-PAGE 겔상에서 희미한 밴드로 존재하던 14.3 kD 이하의 부분이 silver 염색한 2차원 전기영동겔에서는 질계 염색되어 상대적으로 양이 많게 보이는 것인데, 염색용액에 대한 단백질의 민감도 차이가 그 원인이라고 생각되었다(Hames, 1981).

또한 15-30 kD 사이에는 총 7개의 nodulin들이 존재하였으며, 이 중 N24와 N21은 각각 콩의 peribacteroid membrane에 존재하는 N24(Katinakis and Verma, 1985)와 완두콩의 뿌리혹이 발달함에 따라 발현이 증가되는 N21(Govers *et al.*, 1985)과 분자량면에서 유사하였으며, 30-45 kD 사이에는 모두 9개의 nodulin이 검출되었고, 그 중 N37과 N38, 40이 분자량면에서 각각 uricase 및 glutamine synthetase와 비교될 수 있었다(Glourdman *et al.*, 1987). 또 45-60 kD 사이에서 1개, 60-80 kD 구간에서 3개의 nodulin이 검출되었으나, sucrose synthetase(Thummler and Verma, 1987)로 알려진 N100 등 이미 보고된 고분자량의 nodu-

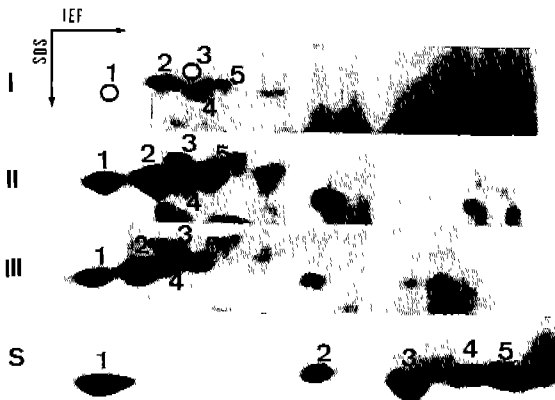


Fig. 5. Two-dimensional gel electrophoretic pattern of Lb-like nodulins (Fig. 3, box B) at three developmental stages. Monomers of Lb-like protein are indicated by 1 to 5 and corresponding spots by open circles.

lin은 본 실험에서 검출할 수 없었다.

2차원 전기영동법에 의한 뿌리혹 특이 단백질의 발생 단계에 따른 변화. 뿌리혹에서만 나타나는 뿌리혹 특이 단백질 spot들 중 비교적 변화가 큰 spot(Fig. 3B, box A, B)을 중심으로 뿌리혹의 발달단계에 따른 양상의 변화를 조사한 결과(Figs. 4, 5) 뿌리혹 특이 단백질들은 전반적으로 뿌리혹이 발달함에 따라 새롭게 합성되거나 또는 양적으로 증감되는 현상을 보였다.

분자량이 20-30 kd인 단백질 중에서는 N21, N24 및 N27 nodulin이 큰 변화를 보였다(Fig. 4). N27은 이미 I 단계 뿌리혹에서 존재하고 있었고 뿌리혹이 커감에 따라 양이 증가하였으며, N21과 N24는 I 단계에서는 존재하지 않다가 II 단계에서부터 새롭게 발현되었는데, 이는 N21이 뿌리혹이 발달함에 따라 발현이 증가된다는 보고(Govers *et al.*, 1985)와 일치하였다. 이들은 모두 Lb가 발현된 I 단계 이후에 발현되었으므로 후기 nodulin이라 판단되었으나 그 기능을 추측하기는 어려웠다.

해너콩의 Lb 유사 단백질의 단위체는 총 5개로 확인되었으며, pI 범위는 4.4-5.0으로 콩의 경우(pI 4.2-5.9: Appleby, 1983)보다 좁은 범위를 보였으며(Fig. 5), 분자량은 15.7 kd으로 콩의 14.1 kd보다 크게 나타났다(Fig. 1). 해너콩 Lb 유사 단백질의 단위체는 뿌리혹의 크기가 비교적 작은 I 단계에서는 2개만 나타났으며 다른 3개는 거의 나타나지 않거나 그 양이 적음을 알 수 있었고, II 단계에서는 5개 모두가 발현되어 III 단계까지 그 양이 지속적으로 유지되었다. 이러한 해너콩 Lb 유사 단백질의 발현양상은 완두콩 및 강낭콩에서의 발현양상과 유사하였다(Govers *et al.*, 1985; Campos *et al.*, 1987).

해너콩과 콩의 Lb 유사 단백질이 분자량과 pI값에서

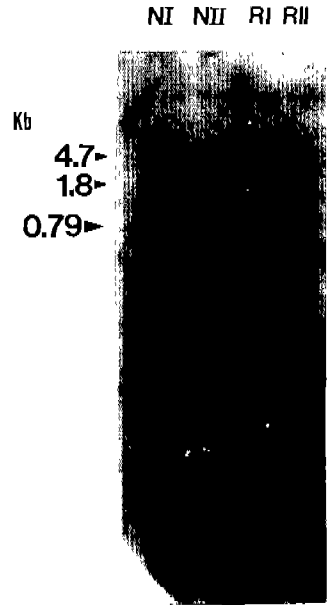


Fig. 6. Northern blot hybridization of nodule (NI, NII) and root (R1, R2) RNA probed with <sup>32</sup>P-labeled cDNA clone of soybean leghemoglobin.

다르게 나타나는 것은 *lb* 유전자 수준에서의 차이점을 반영하고 있는 것으로 생각할 수 있었다. 즉, 콩에서는 4개의 기능적인 유전자(*lba*, *lbc<sub>1</sub>*, *lbc<sub>2</sub>*, *lbc<sub>3</sub>*)가 multigene family로 존재하고 이들은 염색체상의 배열순서와 역방향으로 발달 단계에 따라 순차적으로 발현된다(Marcker *et al.*, 1984). 따라서 해너콩의 Lb 유사 단백질의 경우도 이들 유전자가 염색체의 다른 위치에 존재하여 발달단계에 따라 발현이 조절될 것이라는 가정을 세울 수 있었다.

해너콩 *lb* 유전자의 조직 특이적 발현. 해너콩의 뿌리와 뿌리혹으로부터 분리한 총 RNA의 수율은 1g의 조직 당 각각 0.11 µg과 0.16 µg으로 뿌리혹의 RNA 함량이 더 높은 것으로 나타났고, formaldehyde-agarose 겔에서 전기영동한 결과 2개의 rRNA band가 선명하게 나타나 RNase 등에 의한 파괴가 없는 완전한 RNA로 생각되었다(자료는 제시하지 않았음). 전기영동한 RNA를 nylon 막으로 옮겨 콩의 Lb 유전자를 탐침 DNA로 사용해 northern 혼성화반응을 수행한 결과 뿌리의 RNA에서는 혼성화반응이 나타나지 않았으나 뿌리혹 RNA의 0.79 kd 위치에서만 강한 혼성화반응을 보였다(Fig. 6). 이러한 결과는 콩에서 보고된 결과(Sengupta-Gopalan and Pitas, 1986)와 같으며, 해너콩의 Lb 유전자가 뿌리에서는 발현되지 않고 뿌리혹에서만 특이하게 발현되고 있음을 확인시켜 주는 것이다.

지금까지 본 연구에서 살펴본 대부분의 뿌리혹 특이 단백질은 후기 nodulin으로 판단되는데, 전형적인 후기 no-

dulin은 bacteroid에 의해 질소가 고정되고 고정된 질소를 이용하는 과정에 관여하는 단백질이 주종을 이루며 N35의 uricase, N45의 glutamine synthetase 및 N100의 sucrose synthetase 등이 알려져 있다(Nap and Bisseling, 1990). 그러나 이차원 전기영동에 의해 본 연구에서 조사할 수 있었던 뿌리혹 특이 단백질은 Lb 단백질을 제외하고는 분자량면에서만 이미 보고된 nodulin과의 유사성을 추정 하였기 때문에 이들의 정확한 기능을 확인하기 위해서는 보다 심층적인 면역학적, 생화학적 및 분자생물학적인 실험이 요구된다고 하겠다.

한편, 본 연구에서 발생의 I 단계로 잡은 직경 2 mm까지의 뿌리혹은 이미 뿌리혹 발생이 상당히 진행된 상태로 판단되기 때문에 뿌리혹 형성의 초기단계 특히 균주의 침입과정에 관련된 강남콩의 PsENOD12와 PsENOD5 등의 전형적인 초기 nodulin(Nap and Bisseling, 1990)을 본 연구에서는 검색하지 못하였다. 따라서 해너콩에서도 가시적인 뿌리혹이 생성되기 이전에 발현되는 초기 nodulin을 검색하기 위해서는 뿌리혹 발생의 초기단계에 관한 해부학적 연구와 함께 미세 뿌리혹에서의 조사가 선행되어야 하겠다.

### 적 요

유도된 해너콩(*Canavalia lineata*)의 뿌리혹을 발달 단계별로 구분하여 수용성 단백질을 추출하고 SDS-PAGE 및 2차원 전기영동(2-D) 방법으로 뿌리의 수용성 단백질과 비교 분석하였다. SDS-PAGE에 의해 뿌리혹에서만 나타나는 13개의 뿌리혹 특이 단백질 밴드를 검색하였고, 2-D 방법으로 분석한 결과 30개의 뿌리혹 특이 단백질 spot을 확인하였다. 이들 단백질은 뿌리혹 발달 단계에 따라 질적 및 양적 차이를 보여, leghemoglobin(Lb) 유사 단백질의 경우 I 단계(d<2 mm)에서는 3개, II 단계(d=4-5 mm)부터는 5개의 단위가 차등적으로 검출되었다. 이들은 콩의 경우에 비해 좁은 pI 범위(4.4-5.0)를 갖고 있으나 분자량면에서는 15.7 kd으로 더 크게 나타났다. 또한 콩의 lb 유전자를 탐침으로한 뿌리혹과 뿌리의 전체 RNA에 대한 northern 혼성화반응을 수행한 결과 해너콩의 lb 유전자는 뿌리혹에서만 조직 특이적으로 발현되고 있음이 확인되었다.

### 참 고 문 헌

Appleby, C.A. 1983. Hemoglobin in non-leguminous plant *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. *Science* **220**: 951-953.  
 Bergman, H., E. Preddid and D.P.S. Verma. 1983. Nodulin-35: a subunit of specific uricase (uricase II) induced

and localized in the uninfected cells of soybean nodules. *EMBO J.* **2**: 2333-2339.  
 Campos, F., J. Padilla, M. Vazquez, J.L. Ortega, C. Enriquez and F. Sanchez. 1987. Expression of nodule specific genes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol. Biol.* **9**: 521-532.  
 Franssen, H.J., B. Scheres, C. van de Wiel and T. Bisseling. 1988. Characterization of soybean (hydroxy) proline-rich early nodulins. In, *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, R. Palacios and D.P.S. Verma (eds.). American Phytopathological Society Press, St. Paul. pp. 321-326.  
 Gloude-mans, T., S.D. Vries, H.J. Bussink, N.S.A. Malik, H.J. Franssen, J. Louwerse and T. Bisseling. 1987. Nodulin gene expression during soybean (*Glycine max*) nodule development. *Plant Mol. Biol.* **8**: 395-403.  
 Govers, F., T. Gloude-mans, M. Moerman, A.V. Kammen and T. Bisseling. 1985. Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* **4**: 861-867.  
 Hames, B.D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In, *Gel Electrophoresis of Proteins*, B. D. Hames and D. Rickwood (eds.). IRL Press, Oxford. pp. 1-92.  
 Kang, M.S. 1990. Molecular cloning of *nif*-H, D and K genes from symbiotic *Rhizobium* SNU-003 strain of *Canavalia lineata*. M. SC. Thesis, Seoul National University.  
 Katinakis, P. and D.P.S. Verma. 1985. Nodulin-24 gene of soybean codes for a peptide of the peribacteroid membrane and was generated by tandem duplication of a sequence resembling an insertion element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 4157-4161.  
 Kim, S.C. and C.S. An. 1989. Isolation of symbiotic *Rhizobium* sp. strain from root nodule of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 372-377.  
 Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.  
 Lare, M., H. Porta, J. Padilla, J. Folch and F. Sanchez. 1984. Heterogeneity of glutamine synthetase polypeptides in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **76**: 1019-1023.  
 Lee, J.Y. and Y.M. Kwon. 1990. Effects of canavanine and arginine on the growth of *Rhizobium* sp. SNU003 and properties of arginine deiminase. *Korean Biochem. J.* **23**: 206-213.  
 Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein messurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.  
 Manniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 188-209.  
 Marcker, A., M. Lund, E.O. Jensen and K.A. Marcker. 1984.

- Transcription of the soybean leghemoglobin genes during nodule development. *EMBO J.* **3**: 1691-1695.
- Nap, J.P. and T. Bisseling. 1990. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science* **250**: 948-954.
- O'Farrel, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- Scheres B., F. van Engelen, E. van der Knaap, C. van de Wiel, A. van Kammen and T. Bisseling. 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* **2**: 687-700.
- Sengupta-Gopalan, C. and J.W. Pitas. 1986. Expression of nodule-specific glutamine synthetase genes during nodule development in soybeans. *Plant Mol. Biol.* **7**: 189-199.
- Sullivan, D., N. Brisson, B. Goodchild and D.P.S. Verma. 1981. Molecular cloning and organization of two leghemoglobin genomic sequences of soybean. *Nature* **289**: 516-518.
- Thummler, F. and D.P.S. Verma. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthetase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* **262**: 14730-14736.
- Verma, D.P.S. and K. Nadler. 1984. Legume-*Rhizobium* symbiosis: Host's point of view. In, *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*, D.P.S. Verma and T. Hohn (eds.). Springer-Verlag, New York. pp. 57-93.
- Verma, D.P.S., H. Vergmann, F. Fuller and E. Preddie. 1983. The role of plant genes in Soybean-*Rhizobium* interaction. In, *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, A. Puhler (ed.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 156-163.
- Verma, D.P.S., M.G. Fortin, J. Stanley, V.D. Mauro, S. Purohit and N. Morrison. 1986. Nodulins and nodulin genes of *Glycine max.* *Plant Mol. Biol.* **7**: 51-61.

(1991. 3. 5 接受)