

Rhizobium fredii USDA191의 체외다당류 합성관련 유전자(exo)의 클로닝 및 lacZ와의 융합

정완석 · 고영환*

제주대학교 식품공학과

Rhizobium fredii USDA191은 대기 중의 질소를 환원하여 식물체의 생육에 필요한 질소원을 공급해주는 세균으로 다량의 체외 다당류를 합성한다. 전위요소 Tn5의 삽입에 의한 돌연변이 유도도 다당류결핍 변이주 *R. fredii* YKL293가 분리되었으며 이 변이주로부터 Tn5에 인접한 DNA 단편이 pUC19에 클로닝되었고(pLYK5293), 이 DNA 단편을 탐침으로 하여 λ NM1149에 구성된 USDA191 genomic library로부터 야생형 체외다당류 합성관련 유전자(exo)를 함유한 클론 λ NM1149.22E를 plaque 혼성화에 의하여 분리하였다. 클론 NM1149.22E에 들어있는 *exo* 유전자를 pBR322에 옮겨서 pJW33을 만들고, 재조합체 pJW33을 *Escherichia coli* POI1734에 도입시켜 *lacZ* 구조유전자를 함유한 Mud11734가 *exo* 유전자의 프러모터와 융합되어 *lacZ* 구조유전자의 전사가 이루어지도록 하였다. 위와 같이 만들어진 재조합체 플라스미드 pUM21을 함유한 *E. coli* JM83은 β -galactosidase를 합성하였으며, 야생형 *lacZ* 유전자를 갖고 있는 *E. coli* LE392에 비해서 14~25배 정도 낮은 역가를 보였다.

KEY WORDS □ *Rhizobium fredii*, exopolysaccharide, transcription, gene fusion, promoter

Rhizobium 또는 *Bradyrhizobium*에 속하는 근류균들은 두과식물에 뿌리혹을 유도생성시켜 상호간에 공생관계를 형성하는데 근류균의 체외다당류(exopolysaccharide, EPS)가 뿌리혹 생성과정에 깊이 관련된 것으로 알려져 왔다. 뿌리혹은 특정 두과식물과 근류균간에만 형성되는 바(21), 이러한 숙주특이성 관련인자 및 그 기작에 대해서 지난 10여년간 많은 연구가 이루어졌으나, 식물과 미생물의 다단계 상호작용에 의해서 뿌리혹이 형성되고 관련유전자들이 다양하여 명확한 확설이 정립되지 않은 상태이다(12, 16, 27). 이러한 숙주특이성에 결정적인 역할을 하는 인자로서 근류균이 생산하는 체외다당류가 있다. 체외다당류 결핍변이주는 정상적인 뿌리혹을 유도하지 못했다는데 근거하여 Bohlool 등(4)이 체외다당류가 숙주식물 특유의 lectin을 인식 결합함으로써 숙주특이성이 결정된다고 제안한 이래, 체외다당류의 기능에 대해서 많은 가설이 대두되었다(14, 32, 38). 최근에 Long(27) 등은 *R. meliloti*의 체외다당류를 비롯한 아미노당의 부분적 변화가 숙주식물 알팔파와의 상호작용에 의해서 이루어지며, 이것이 숙주특이성을 결정해준다고 시사한 바 있다. *R. fredii*는 *Bradyrhizobium japonicum*과 같이 대두공생 질소고정균이면서도(1), *Bradyrhizobium*보다 성장속도가 2~3배 빠르며, 대장균처럼 고염농도의 배지에서 자랄 수 있을 뿐만 아니라, 숙주범위가 비교적 광범위하여 그 실용성 및 연구재료로서 매우 유용한 균주이다(40). 그런 측면에서 Ko 등(22)이 *R. fredii*의 체외다당류

결핍변이주를 분리하여 그들의 뿌리혹 형성능에 대해서 연구한 바 있다. 전위요소(transposon) Tn5(33)의 삽입에 의하여 얻어진 *R. fredii*의 다당류 결핍변이주들은 *R. meliloti*의 다당류 결핍변이주와는 달리 야생형보다 효율은 많이 떨어지나 *Glycine soja* 및 *G. max*에 비정상적인 뿌리혹 유사체(pseudonodule) 이외에도 정상적인 뿌리혹을 만들 수 있었다.

세포수준에서의 체외다당류 생성능은 탄소원, 질소원 등의 배지조성(36)과 산소분압(37)에 의하여 영향을 받으며 식물과의 공생상태, 즉 뿌리혹내의 bacteroid 상태에서는 체외다당류를 생성하지 않는다. *Rhizobium*에서는 *Klebsiella*에서와는 달리 공생관련 두 유전자 *nif*와 *fix*의 발현이 산소분압에 의해서 조절된다는 보고(9)가 있다. 이것은 체외다당류의 생합성이 산소분압에 영향을 받는다(37)는 사실에 견주어 볼 때 흥미있는 일이다. 체외다당류 합성을 양적으로 조절하는 유전인자에 대한 연구들이 이루어져 *Rhizobium leguminosarum* bv. *phasecolli*(5, 6)에서는 *psi* (polysaccharide inhibition)와 *psr*(polysaccharide restoration) 유전자가 확인되었고, *Rhizobium* sp. NGR234(13)에서는 *exoX*와 *exoY* 유전자가 체외다당류 합성을 제어하며, *Rhizobium meliloti*에서는 *exoX*와 *exoF*(41) 그리고 *exoR*과 *exoS*(11)가 발견되어 이들 유전자들간에 유사성이 있음이 밝혀졌다. 그러나 아직은 이들 유전인자가 주위환경과 어떻게 상호작용을 하는지는 모른다.

본 연구에서는 체외다당류를 다량으로 생산하는 *R.*

Table 1. Bacterial strains

Strains	Characteristics	References
<i>Escherichia coli</i>		
LE392	<i>hsdR</i> 514 <i>supE</i> 44 <i>supF</i> 58 <i>lacY galK2 galT</i> 22 <i>metB1 tp55</i>	
MM294A	<i>pro</i> -82 <i>thi</i> -1 <i>endoA1 hsdR</i> 17 <i>supE</i> 44, host of pRK602	24
JM83	Δ (<i>lac-proAB</i>) a recipient of Mu transduction	
HB101	<i>pro leu thi lacY</i> <i>rpsL</i> 20(<i>st'</i>) <i>endoI</i> <i>recA hsdS</i> 20(r m) host of pRK2013 and pRK290	10
POI1734	MudII1734 and Mu _{cts} lysogen	8
NM514	<i>hsdR lyc</i> 7, host of λ NM1149 clones	15
SM32	<i>lon galE sulA strA</i> , host of λ NM1149	15
DH5 α	<i>hsdR recA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) UI69 Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, host of pUC19	20
<i>Rhizobium fredii</i>		
USDA191	wild type	3
YKL999	<i>Na'</i> derivative of USDA191	20
YKL293	Tn5 induced mutant of YKL999 <i>Km'</i> <i>Sf'</i>	20

Abbreviations: Km, kanamycin; Na, nalidixic acid; St, streptomycin

fredii USDA191에 전위요소 Tn5를 삽입하여 얻어진 체외다당류 결핍 변이주들 중에서 다형질(pleiotropic) 변이주로 나타난 YKL293(22)을 선택하여 체외다당류 합성관련 유전자 *exo*를 클로닝하고, 이 유전자에 *lacZ* 구조유전자를 융합시켰기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드(plasmid) 및 파아지(phage)

이 연구에 사용된 균주, 플라스미드, 그리고 파아지는 Table 1과 Table 2에 나와 있는 바와 같다. *Escherichia coli*의 배양은 Luria-Bertani(LB)(29)배지를 사용하였고, *Rhizobium fredii*는 mannitol-glutamate(MG)(34) 또는 mannitol-salt-yeast extract (MSY)(26)배지를 사용하였다. 항생제 내성인 균주를 위하여 필요하면 각각 다음과 같은 농도로 첨가하였다. 대장균의 경우 kanamycin, chloramphenicol, streptomycin, carbenicillin(또는 ampicillin)을 각각 20~25 mg/ml 농도로 사용하였고, tetracycline은 10 μ g/ml로 첨가하였다. *Rhizobium*의 경우에는 kana-

Table 2. Plasmids and phages

Plasmids & phages	Characteristics	References
Plasmids		
pRK602	pRK2013 Nm::Tn9 containing Tn5, <i>Km'</i> <i>Cm'</i> helper, <i>Km'</i>	24
pRK2013	ColE1 replicon	10
pSUP2021	pSUP202 Tc::Tn5, <i>Ap'</i> <i>Cm'</i> <i>Km'</i>	35
pSUP202	<i>Ap'</i> <i>Cm'</i> <i>Tc'</i>	35
pUC19	<i>Ap'</i> cloning vector	39
pLYK5293	a derivative of pUC19, <i>Ap'</i> <i>Km'</i>	this study
pRK290	a derivative of RK2 cloning vector, <i>Tc'</i>	10
pEC293	pRK290:: <i>exo</i> from λ NM1149.22E	this study
pBR322	<i>Ap'</i> , <i>Tc'</i>	29
pJW33	pBR322:: <i>exo</i> from λ NM1149.22E	this study
pUM21	pJW33::MudII1734	this study
Phages		
MudII1734	a derivative of Mu, mini-Mu, <i>Km'</i>	8
λ NM1149	a vector for <i>R. fredii</i> gene library	15
λ NM1149.22E	λ NM1149 with <i>exo</i> from <i>R. fredii</i> USDA191	this study

Abbreviations: Km, kanamycin; Cm, chloramphenicol; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Nm, neomycin

mycin의 농도를 50 μ g/ml로 첨가하였고, nalidixic acid는 40 μ g/ml 수준으로 사용하였다. 배양온도는 대장균의 경우 37°C (단, POI1734는 30°C), 근류균은 28°C를 기준으로 하였다.

전위요소 Tn5 삽입에 의한 돌연변이주 분리

*R. fredii*의 체외다당류 합성관련 유전자(*exo*)를 클로닝하기 위한 첫단계로 전위요소 Tn5를 이용하여 체외다당류 결핍변이주를 얻고자 하였다. Hom 등(18)의 여지법(filter mating)을 따르되 *R. fredii*의 다당류가 mating에 지장을 초래함에 따라 0.9% NaCl로 세포를 씻어주는 단계를 추가하였다. *E. coli* MM294 A(pRK602)와 *R. fredii* YKL999의 mating으로 생겨난 transconjugant는 nalidixic acid, kanamycin 그리고 streptomycin이 함유된 MSY한천(26)배지에서 선발 분리하였다. Transconjugant중 육안으로 판별하여 균락의 크기가 작으면서 점액질을 생성하지 않는 균주를 분리하였다.

총 유전자 DNA의 분리

*R. fredii*를 MG 배지, 30°C에서 진탕배양하여 정지기까지 기른 다음, 원심분리하여 균체를 얻고 Tris-EDTA(TE) 완충액에 세포를 현탁시킨 후 sodium-

dodecyl sulfate(0.5%)와 proteinase K(100 µg/ml)를 처리하여 용해시켰다. 균체 용해액에 cetyltrimethylammonium bromide를 가하여 다당류 및 기타 세포 찌꺼기들을 제거하고 난 후 페놀과 클로로포름을 처리하였다. DNA는 에타놀 침전으로 회수하였고 건조후 TE 완충액에 용해시켜서 사용하였다.

플라스미드 DNA의 분리 및 정제

소량의 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Holmes 등(17)에 의한 중탕법, 대량의 플라스미드 DNA를 분리정제하기 위해서는 CsCl-EtBr 밀도균배 원심분리법(29)에 준해서 실시하였다.

파아지 DNA의 정제

λ 파아지 DNA의 분리정제는 Maniatis 등(29)의 방법에 따라서 실시하였다. 파아지를 적절한 숙주세포(Table 1)에 감염 증폭시킨 후 파아지 입자를 먼저 CsCl 밀도균배 초원심분리로 분리정제한 다음, 그로부터 DNA를 추출정제하였다.

아가로스 겔 전기영동

DNA의 전기영동은 0.6~0.7% 아가로스 겔상에서 실시하였으며, 전기영동 후 원하는 DNA 조각만을 분리할 필요가 있을 때는 low melting temperature 아가로스를 사용하였고(29), 순도가 높은 DNA가 필요할 때는 elutip-d column(Schleicher & Schuell)을 사용하여 분리된 DNA를 정제하였다.

Genomic Library 제작

R. fredii USDA191의 유전자를 대표하는 DNA 조각들을 클로닝하여 보관하기 위해서 파아지 λ NM1149를 벡터(vector)로 사용하였다. 먼저 *R. fredii*의 유전자 DNA와 λ NM1149 DNA를 제한효소 EcoRI으로 자른 다음 T₄ DNA ligase로 결합시키고, λ DNA packaging system(Promega)을 사용하여 파아지입자로 시험관 내에서 packaging하였다. *E. coli* SM32와 NM514를 숙주로 하여 파아지 농도를 계산한 결과, 전체 파아지입자의 0.5% 가량이 *R. fredii*의 DNA를 갖고 있었다. 이는 NM514를 숙주로 사용하여 plate당 1000여개의 재조합체 파아지가 자라도록 하는데 충분한 수준이었다.

Triparental Mating

R. fredii YKL293에 *exo* 유전자를 함유한 재조합체 플라스미드 pEC293을 도입하기 위해서 HB101(pRK2013)을 helper cell로 이용하는 여지법(7)에 따랐고, 그로부터 nalidixic acid, kanamycin, tetracycline을 함유한 MSY(26) 한천배지에서 자라는 transconjugant를 분리하였다.

형질전환

대장균의 형질전환은 근본적으로 Mandel과 Higa(28)의 방법에 준하여 실시하였다. MgCl₂와 CaCl₂를 처리하여 competent cell로 만든 다음, DNA와 섞어서 저온 및 고온 충격을 가함으로써 플라스미드 DNA를 세포내로 도입하였다.

Southern blotting과 DNA-DNA 혼성화

전기영동 후 DNA의 조각들은 Southern(29)의 방

법에 따라 nitrocellulose 여지로 옮겨졌다. DNA의 혼성화에 필요한 탐침(probe) DNA들은 biotin-11-dUTP(Bethesda Research Labs, BRL)를 nick translation(31)에 사용함으로써 표지했으며, DNA-DNA 혼성화의 조건, 방법 및 혼성화된 DNA의 탐색은 BRL의 권장방법(23)에 따라 실시하였다.

Plaque 혼성화

파아지 λ NM1149에 만들어진 *R. fredii* USDA191 genomic library로부터 *exo* 유전자를 선별하기 위해서 plaque 혼성화를 실시하였다. 파아지는 *E. coli* NM514를 숙주세포로 하여 plaque을 형성하도록 하였고, 파아지의 nitrocellulose 여지로의 이전 및 파아지 DNA의 고정에는 통상의 방법(29)에 따라서 실시하였고, DNA의 혼성화 조건, 방법, 탐침 DNA의 준비 및 탐색은 전술한 바와 같다.

exo와 lacZ 유전자의 융합

lacZ 구조유전자를 *exo* 유전자의 promoter와 융합시키기 위해서 우선, *exo* 유전자를 함유한 재조합체 플라스미드를 *E. coli* POI1734 세포내로 형질전환에 의해서 도입한 후, Castilho 등(8)의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. *exo* 유전자를 함유한 *E. coli* POI1734 세포를 42°C에서 배양하여 Mu 파아지의 증폭 및 용균을 유도하였고, 파아지 입자를 함유한 용균액으로 *E. coli* JM83를 transduction시켰다. transductant 중 적절한 항생제와 X-gal을 함유한 고체배지 상에서 푸른색을 나타내는 균주들을 1차적으로 분리하였다. 이들 개개의 균주로부터 플라스미드 DNA를 분리정제한 다음, 여러 종류의 제한효소로 절단하고 전기영동을 실시해서 *lacZ* 구조유전자가 *exo* 유전자의 promoter와 융합된 재조합체 플라스미드를 찾아내었다.

β-galactosidase 역가측정

β-galactosidase 역가는 Miller의 방법(30)에 따라서 o-nitrophenyl-galactoside (ONPG)를 기질로 사용하여 측정하였다. 60 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0을 함유한 Z-buffer에 현탁한 세포 1 ml에 40 µl의 chloroform과 20 µl의 0.1% SDS를 가하고 10초간 균질화 시켰다. 28°C에서 5분간 예비배양하여 평형시킨 다음 0.2 ml의 ONPG를 첨가하여 반응을 개시하였고 0.5 ml의 1 M Na₂CO₃를 가함으로써 반응을 중지시켰다. 420 nm와 550 nm에서 흡광도를 측정하여 β-galactosidase역가를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{역가단위(unit)} = 1000 \times \frac{A_{420} - (1.75 \times A_{550})}{t \times 0.1 \times A_{600}}$$

단, A는 흡광도를, t는 발색시간(분)을 각각 나타낸다.

결과 및 고찰

체외다당류 결핍변이주의 분리 및 Tn5 삽입 확인



Fig. 1. Isolation of exopolysaccharide-deficient mutants of *R. fredii* USDA191
 A, YKL999(wild type); B, C, D and E, other exopolysaccharide-deficient mutants; F, YKL 293(*exo*)

R. fredii USDA191의 체외다당류 합성관련 유전자(*exo*)를 클로닝하기 위한 첫단계로 Tn5 삽입에 의해서 체외다당류 합성능이 결핍된 변이주를 분리하고자 하였다. 플라스미드 pRK602가 갖고 있는 전위요소 Tn5를 *R. fredii* YKL999에 도입하기 위하여 *E. coli* MM294A(pRK602)와 YKL999간에 mating을 시도하였고, 그 결과 얻어진 transconjugant 중에서 체외다당류 결핍변이주 YKL293을 분리하였다(Fig. 1). 변이주 YKL293의 체외다당류 결핍특성에 대해서는 Ko 등(22)에 의하여 보고된 바 있다.

Tn5의 삽입여부를 확인하기 위해서, 더 나아가 삽입부위가 염색체인지 또는 내재하고 있는 플라스미드인지를 판별하기 위해서 DNA-DNA 혼성화를 실시하였다. 먼저 in-well lysis 기술(19)에 의하여 플라스미드 DNA와 염색체 DNA를 아가로스 겔상에서 분리하고, nitrocellulose 여지위로 옮긴 다음 바이오틴(biotin)으로 표지된 Tn5를 함유한 pSUP2021을 탐침으로 DNA 혼성화 실험을 실시하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. YKL999는 Tn5를 함유하지 않은 야생형 대조구로서 눈에 필만한 DNA 혼성화를 보이지 않았고, 그와 반면에 YKL293은 염색체 DNA에 상당하는 위치에서 명백한 DNA 혼성화가 일어났음을 보여주었다. 그리고 Tn5 공여체인 MM294A(pRK602)도 DNA 혼성화 양성반응을 나타내고 있다. 따라서, Tn5는 YKL293균주의 염색체내에 삽입되었음을 알 수 있었다. Tn5가 없는 pSUP202(35)를 탐침으로 했을 때는 DNA 혼성화를 감지할 수 없었다(자료제시 생략).

체외다당류 결핍변이주로부터 Tn5 인접부위의 클로닝

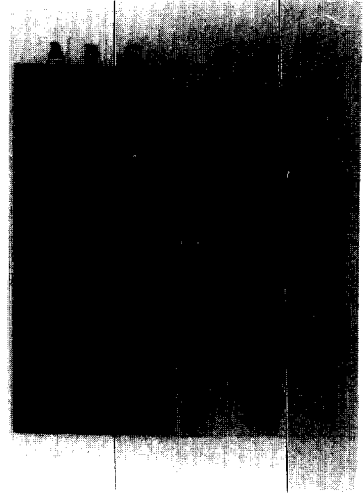


Fig. 2. Plasmid separation by in-well lysis and DNA-DNA hybridization with a probe pSUP2021 containing Tn5
 DNAs were separated on agarose gel by electrophoresis(left side), blotted onto a nitrocellulose filter, and hybridized with pSUP2021 DNA(right side).
 A/a, MM294A/pRK602; B/b, YKL293; C/c, YKL999

야생형 *exo* 유전자의 클로닝에 앞서, Tn5의 삽입으로 인해 활성을 잃어버린 *exo* 유전자를 YKL293 변이주로부터 먼저 획득한 후에 그것을 탐침으로하여 야생형 *exo* 유전자를 찾아내고자 하였다. 먼저 YKL 293 균주로부터 염색체 DNA를 분리하여 제한효소 BamHI으로 완전히 절단하였고, 이것을 동일 효소로 절단된 pUC19과 T₄ DNA ligase로 결합시켰다. 전위요소 Tn5는 BamHI으로 절단되어 두개의 조각으로 나누어지는데, 그 중 하나의 조각은 kanamycin 내성유전자를 갖고 있다. 플라스미드 pUC19은 carbenicillin 내성유전자를 갖고 있으며 클로닝 부위에 외래유전자가 도입되면 β-galactosidase의 α-complementation 능력이 소실된다(20). 이러한 특성을 이용하여 *E. coli* DH5α를 pUC19과 YKL293 염색체 DNA의 ligation 혼합물로 형질전환시켜서 kanamycin과 carbenicillin을 함유한 X-gal 한천배지 상에서 나타나는 흰색의 균락을 얻었다. 위와 같이 얻어진 형질전환체로부터 재조합체 플라스미드 pLYK 5293을 분리하여 여러 종류의 제한효소로 절단하고 아가로스 겔 전기영동으로 분석한 결과(자료제시 생략), Fig. 3과 같은 pLYK5293의 제한효소지도를 얻었다. 재조합체 플라스미드 pLYK5293은 약 3Kb에 상당하는 염색체 DNA를 갖고 있는 것으로 나타났는데, 이 DNA 조각은 YKL293에 삽입된 Tn5의 인접부위로, *exo* 유전자의 일부에 해당되는 것이다.

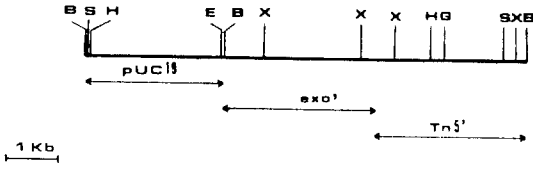


Fig. 3. Restriction enzyme map of recombinant plasmid pLYK5293

B, *Bam*HI; G, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; S, *Sal*I; X, *Xho*I; Tn5', a part of Tn5 containing kanamycin resistance gene; *exo*', genomic DNA flanking Tn5 from YKL293



Fig. 4. Screening of *R. fredii* USDA191 gene library with a probe pLYK5293 by plaque hybridization

Hybridization-positive plaques show dark spots. Arrow head indicates a clone λ NM1149.22E.

USDA191 genomic library로부터 야생형 *exo* 유전자의 선별

λ NM1149에 만들어진 USDA191 genomic library로부터 야생형 *exo* 유전자를 갖고 있는 재조합체 파아지를 찾아내기 위해서 플라스미드 pLYK5293을 탐침으로 하는 plaque 혼성화를 실시하였다. *E. coli* NM514를 숙주세포로 이용하여 양성반응을 나타내는 plaque를 선정하고, 그 중 한 개의 클론(clone) NM1149.22E를 순수분리하였다(Fig. 4). 이 파아지 클론으로부터 DNA를 분리하여 *Eco*RI으로 절단하고, 아가로스 겔로 전기영동 후 Southern blotting으로 nitrocellulose 여지로 옮기고, pLYK5293 DNA를 탐침으로 사용하여 DNA-DNA 혼성화 실험을 실시한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. *Eco*RI으로 NM1149.22E DNA를 절단하면 세개의 조각으로 나누어지고, 그 중 분자량이 비교적 큰 두개의 조각은 λ 파아지의 left arm과 right arm에 상당한다. λ NM1149.22E에 삽입된 3.3 Kb에 상당하는 DNA조각이 탐침 pLYK5293 DNA와 강력한 혼성화를 나타내었다. 따라서 λ NM1149.22E에 야생형 *exo* 유전자가 삽입되어 있다고 추론할 수 있었다.

야생형 *exo* 유전자의 확인

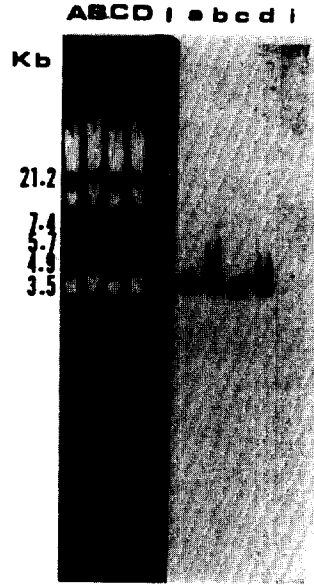


Fig. 5. Hybridization of λ NM1149.22E DNA with a probe pLYK5293 DNA

DNAs of NM1149.22E digested with *Eco*RI were separated on agarose gel by electrophoresis(left side), blotted onto a nitrocellulose filter, and hybridized with pLYK5293 DNA(right side).

A/a-D/d, λ NM1149.22E; I/i, λ DNA standard digested with *Eco*RI

λ NM1149.22E가 갖고있는 3.3 Kb에 상당하는 *Eco*RI 조각이 체외다당류 합성에 관련된 유전자임을 확인하기 위해서는 체외다당류 결핍변이주 YKL293에 이 유전자를 도입했을 때, 체외다당류 결핍성이 보완되어야 한다. 이것을 검증하기 위한 첫단계로 전술한 3.3 Kb *Eco*RI DNA 조각을 숙주범위가 넓은 플라스미드 pRK290으로 옮겨야 할 필요가 있었다. λ NM1149.22E DNA와 pRK290 DNA를 동일 제한 효소 *Eco*RI으로 절단하고 T₄ DNA ligase로 결합시킨 것을 사용하여 *E. coli* HB101을 형질전환시켰고, 그로부터 tetracycline 내성 군락들을 한천배지 상에서 분리하고, 이들 군락으로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 제한효소 *Eco*RI으로 절단 후 아가로스 겔 전기영동에 의하여 3.3 kb *Eco*RI 조각을 함유한 형질전환체를 찾아내었다. 플라스미드 pEC293(Fig. 6)은 이렇게 해서 얻어진 재조합체로 pRK290 DNA 조각과 3.3 Kb *exo* 유전자를 갖고 있음을 알 수 있었다. Fig. 6의 4번과 6번 시료가 pEC293이 *Eco*RI으로 절단되었을 때의 DNA조각이다. 약 3.3 Kb에 상당하는 조각이 λ NM1149.22E의 *exo* 유전자(2번 시료)와 일치함을 보여주고 있다. 플라스미드 pEC293을 YKL293 변이주에 도입하기 위하여 HB101(pEC

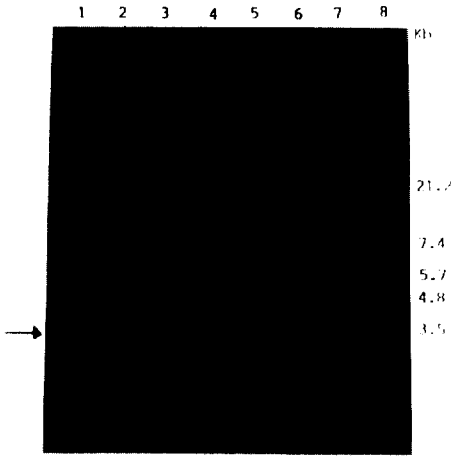


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of pEC293 DNA. Lane 1, pRK290 cut with *EcoRI*; lane 2, λ NM1149.22E DNA cut with *EcoRI*; lanes 3 & 8, λ DNA standards cut with *EcoRI*; lanes 4 & 6, pEC293 cut with *EcoRI*; lanes 5 & 7, pEC293 uncut. Arrow head indicates the position of 3.3 Kb DNA fragments generated by *EcoRI*-digestion

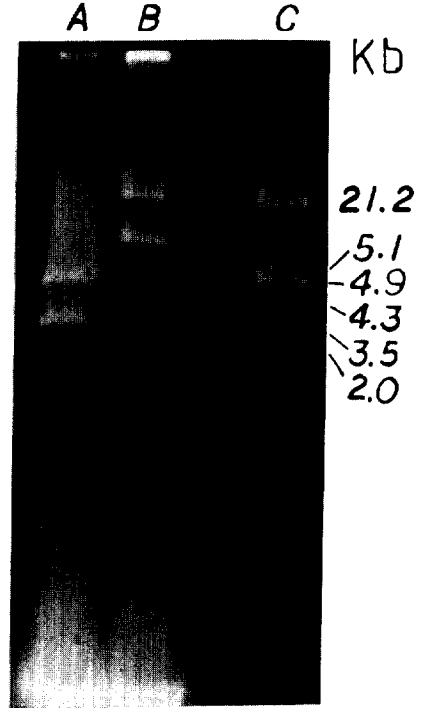


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of pJW33 DNA. A, pJW33 cut with *EcoRI*; B, pJW33 uncut; C, λ DNA standard double-digested with *EcoRI* and *HindIII*

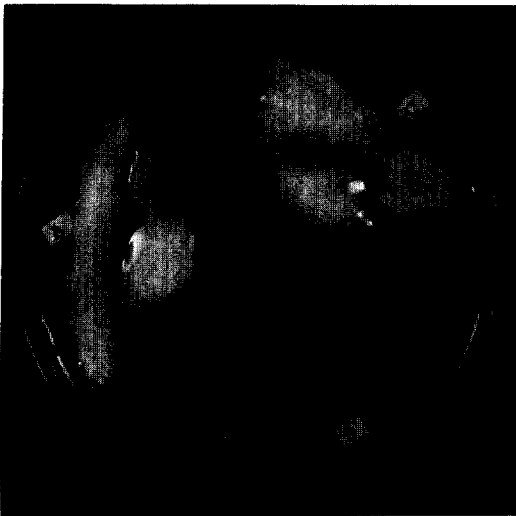


Fig. 7. Complementation of exopolysaccharide deficiency of *R. fredii* YKL293 by introduction of plasmid pEC293. A, YKL999; B, YKL293; C, YKL293/pEC293

293)과 YKL293간의 접합(conjugation)에 helper로 HB101(pRK2013)을 이용하는 triparental mating(7)을 실시하였다. mating 혼합물을 nalidixic acid, kanamycin, streptomycin, tetracycline을 함유한 MSY 한천배지상에 도말했을 때 자라는 균락을 검

색한 결과, 체외다당류 합성능이 야생형과 별다른 차이점이 없음을 알 수 있었다(Fig. 7). 변이주 YKL293(Fig. 7B)은 체외다당류를 거의 생산하지 않았으나, pEC293에 의해서 형질전환 되었을 때(Fig. 7C)는 야생형(Fig. 7A)에 못지않은 양의 체외다당류를 생산하였다. 그로부터 플라스미드 pEC293이 갖고 있는 3.3 Kb *EcoRI* 조각은 변이주 YKL293에서 Tn5에 의하여 삽입실활된 *exo* 유전자라는 결론을 내릴 수 있었다.

exo와 lacZ간의 유전자 융합

exo 유전자의 전사조절을 연구하는 하나의 방법으로 *exo* 유전자의 promoter 제어 아래서 *lacZ* 구조 유전자의 발현을 조사하고자 하였다. β -galactosidase의 역가를 측정함으로써 *exo* 유전자의 전사정도를 측정할 수 있기 때문이다. 그러기 위해서는 파야지 Mu의 무작위 삽입특성을 이용하여 mini-Mu MudI1734가 갖고 있는 *lacZ* 구조유전자를 *exo* 유전자의 promoter와 융합시킬 필요가 있었다. 우선 파야지 NM1149.22E에 클로닝 되어 있는 3.3 Kb에 상당한 *exo* 유전자를 *EcoRI*으로 잘라내어, 동일 효소로 절단된 플라스미드 pBR322에 결합시켜 pJW33을 만들었다(Fig. 8). 재조합체 플라스미드 pJW33은 *EcoRI*으로 절단되었을 때(Fig. 8A), 4.4 Kb에 상당하

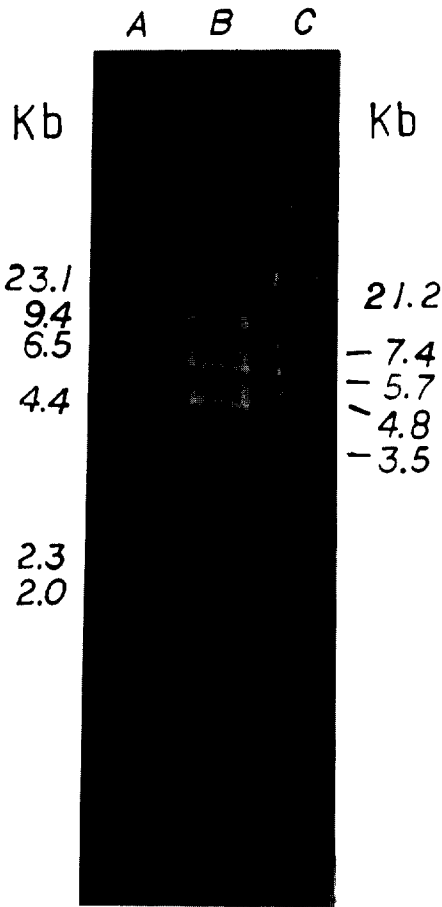


Fig. 9. Agarose gel electrophoresis of *pUM21* DNA. A & C. λ DNA MW standards; B. *pUM21* digested with *EcoRI*

는 pBR322 DNA와 3.3 Kb에 해당하는 *exo* DNA로 나누어졌다. 플라스미드 pJW33을 형질전환에 의하여 *E. coli* POI1734에 도입하고, 내재하고 있는 Mu 파아지에 의하여 생성된 파아지 입자들을 *E. coli* JM83의 transduction에 사용하였다. kanamycin, tetracycline, X-gal, 그리고 IPTG를 함유한 LB 한천배지 상에서 청색을 나타내는 균락을 선발하였고, 그로부터 플라스미드 pUM21을 분리하였다. pUM21의 DNA를 여러가지 제한효소로 절단하고 아가로스 겔 상에서 전개시킨 결과는 Fig. 9와 Fig. 10에 제시하였다. pUM21의 DNA를 *EcoRI*으로 분해시켰을 때(Fig. 9B), 3.3 Kb에 해당하는 *exo* 유전자 DNA를 찾을 수 없는 반면에 4.4 Kb에 해당하는 pBR322 DNA는 온전하게 남아 있었다. 따라서 Mud11734는 pJW33의 *exo* 유전자 부위에 삽입되었다고 결론 내릴 수 있었다. Fig. 10에 나와 있는 바와 같이 pUM21의 DNA를 여러 종류의 제한효소로 분해한 다음 전기영동을 실시하여

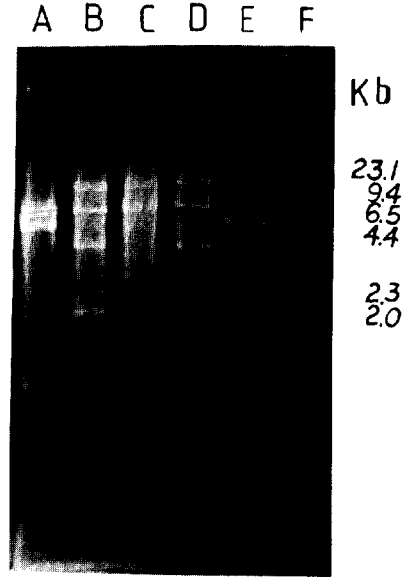


Fig. 10. Agarose gel electrophoresis of *pUM21* DNA. A. double-digested with *EcoRI* & *BamHI*; B. double-digested with *BamHI* & *HindIII*; C. digested with *BamHI*; D. digested with *HindIII*; E. double-digested with *EcoRI* & *HindIII*; F. λ DNA standard digested with *HindIII*

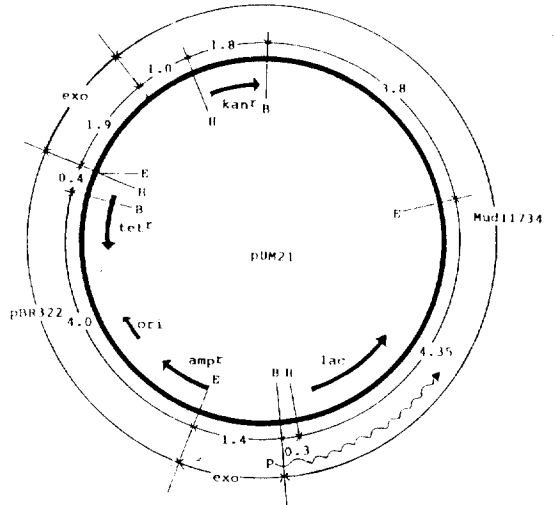


Fig. 11. Restriction enzyme map of plasmid *pUM21*. This map was derived from restriction analyses(Fig. 9 & Fig. 10), map of pBR322, and Mud11734. Numbers indicate the sizes (Kb) of DNA fragments. Abbreviations: kan^r, kanamycin resistance; lac, lac gene; amp^r, ampicillin resistance; ori, origin of replication; tet^r, tetracycline resistance; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; P, promoter

Table 3. α -Galactosidase activity.

Strains	<i>E. coli</i> JM83	<i>E. coli</i> LE392	<i>E. coli</i> JM83/ pUM21
IPTG*	+	-	+
Activity	9	6	1590
			844
			64
			60

*+, added; -, not added to the culture medium.

그 제한효소지도를 작성하고자 하였다. pUM21의 제한효소지도(Fig. 11)는 Fig. 9와 Fig. 10의 실험결과 및 pBR322(29)와 MudI1734(8)의 기존 제한효소지도에 근거하여 작성된 것으로 *lacZ* 구조유전자가 *exo* 유전자의 내부에 삽입되어 있음을 보여주고 있다. 뿐만 아니라, pUM21은 X-gal을 분해하여 청색의 균락을 형성하게 해주었으므로 *lacZ* 유전자가 발현되었음을 의미한다. *exo* 유전자와 *lacZ*의 융합을 보다 더 명백히 하기 위해서는 융합부위에 대한 DNA의 염기서열을 결정할 필요가 있다고 생각한다.

exo 유전자의 promoter 활성 측정

exo 유전자의 promoter 활성은 플라스미드 pUM21이 *lacZ* 구조유전자를 *exo* 유전자의 promoter 제어아래 갖고 있어서, β -galactosidase역가를 측정함으로써 간접적으로 *exo* 유전자의 전사정도를 측정할 수 있다.

플라스미드 pUM21을 함유한 대장균의 β -galactosidase 역가를 측정하여, 대조균주와 비교한 결과를 Table 3에 나타내었다. *exo* 유전자의 promoter(JM83/pUM21)는 야생형 *lacZ*의 promoter(LE392)에 비해서 활성이 14~25배 낮은 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, *exo* 유전자의 promoter 활성은 야생형 *lacZ* promoter와는 달리 β -galactosidase 합성 유도물질인 IPTG에 의해서 영향을 받지 않았다. 균주 JM83도 β -galactosidase 역가를 조금이나마 갖고 있는 것처럼 보이나, 이는 역가측정방법에 따라서 기본적으로 나타나는 현상이라고 생각된다. 실제 이 균주를 X-gal을 함유한 고체배지에서 장시간 배양해도 IPTG의 유무에 관계없이 푸른색을 나타내지 않았다.

Table 3에 나타난 β -galactosidase의 활성으로 볼 때, 근류균 근원의 *exo* 유전자의 프로모터는 대장균에서도 기능을 발휘할 수 있음이 명백하다. 따라서 플라스미드 pUM21을 함유한 *E. coli* JM83의 배양 조건을 달리하면서, β -galactosidase의 활성을 측정한다면 *exo* 유전자의 발현에 관한 흥미있는 결과가 얻어질 것이다. 더 나아가, pUM21에 들어있는 *exo* 유전자의 프로모터와 *lacZ* 구조유전자간에 융합이 일어난 부위(약 6.0 Kb에 상당하는 *EcoRI* 조각)만을 잘라내어 적절한 벡터에 실어서 근류균에 도입한 다음, 배양조건에 따른 β -galactosidase의 활성을 측정한다면 체외다당류 합성에 관해 보다 더 유익한 정보를 얻을 수 있으리라고 기대된다.

YKL293이 다형질(pleiotropic) 변이주(22)인 점으로 볼 때, 그 변이부위가 유전 형질의 발현을 조절하는

물질의 생합성과 관련이 있다고 여겨지며, 어쩌면 대장균이나 고초균에서처럼 sigma factor(25)에 상당하는 유전자일 가능성을 배제하지 못하고 있다. 이는 앞으로 pJW33에 클로닝 되어있는 *exo* 유전자의 산물이나 염기배열을 분석하는 것을 시작으로 하여 차차 밝혀지리라 생각된다.

위와 같은 연구들이 앞으로 공생관련 유전자 *nif*와 *fix*의 발현기작(9)과 비교하는데 도움이 되리라 보며, 한편으로는 다른 근류균들에서 발견된 다당류 합성 조절 유전자 *psi* 등(5, 6, 11, 13, 41)과의 비교연구도 필요하다고 생각한다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 기초연구지원비(1990~1991)로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Appelbaum, E.R., E. Johansen and N. Chatrain, 1985. Symbiotic mutants of USDA191, a fast growing *Rhizobium* that nodulates soybeans. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 454-461.
2. ASM news, 1992. Getting to the roots of a chemical language. **58**(8), 418.
3. Barbour, W.M., J.N. Mathis and G.H. Elkan, 1985. Evidence for plasmid- and chromosome-borne multiple *nif* genes in *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 41-44.
4. Bohlool, B.B. and E.L. Schmidt, 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium-legume* root nodule symbiosis. *Science* **185**, 269-271.
5. Borthakur, D., J.A. Downie, A.W.B. Johnston and J.W. Lamb, 1985. *Psi*, a plasmid-linked *Rhizobium phaseoli* gene that inhibits exopolysaccharide production and which is required for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 278-282.
6. Borthakur, D. and A.W.B. Johnston, 1987. Sequence of *psi*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **207**, 149-154.
7. Cangelosi, G.A., L. Hung, V. Puvanessarajah, G. Stacey, D.A. Ozga, J.A. Leigh and E.W. Nester, 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interaction. *J. Bacteriol.* **169**, 2086-2091.
8. Castilho, B.A., P. Olfson and M.J. Casadaban, 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposon. *J. Bacteriol.* **158**, 488-493.
9. Ditta, G., E. Virts, A. Palomares and C. Kim, 1987. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is

- oxygen regulated. *J. Bacteriol.* **169**, 3217-3223.
10. **Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin and D.R. Helinski**, 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7347-7351.
 11. **Doherty, D., J.A. Leigh, J. Glazebrook and G.C. Walker**, 1988. *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic Calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* **170**, 4249-4256.
 12. **Goodchild, D.J. and F.J. Bergersen**, 1966. Electron microscopy of the infection and subsequent development of soybean nodule cells. *J. Bacteriol.* **92**, 204-213.
 13. **Gray, J.X., M.A. Djordjevic and B.C. Rolfe**, 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *J. Bacteriol.* **172**, 193-203.
 14. **Halverson, L.J. and G. Stacey**, 1985. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis: evidence for the involvement of lectin in nodulation. *Plant. Physiol.* **77**, 621-625.
 15. **Hendrix, R.W., J.W. Roberts, F.W. Stahl and R.A. Weisberg**, 1983. Lambda II. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 16. **Heron, D.S. and S.G. Pueppke**, 1984. Mode of infection, nodulation specificity, and indigenous plasmids of 11 fast-growing *Rhizobium japonicum* strains. *J. Bacteriol.* **160**, 1061-1066.
 17. **Holmes, D.S. and M. Quigley**, 1981. Modified method of the rapid boiling procedure for plasmid preparation. *Analytical Chemistry* **114**, 193-197.
 18. **Hom, S.S.M., S.L. Uratsu and F. Hoang**, 1984. Transposon Tn5-induced mutagenesis of *Rhizobium japonicum* yielding a wide variety of mutants. *J. Bacteriol.* **159**, 335-340.
 19. **Hynes, M.F., R. Siman and A. Puhler**, 1985. The development of plasmid free strains of *Agrobacterium tumefaciens* by using incompatibility with a *Rhizobium meliloti* plasmid to eliminate pATC58. *Plasmid* **13**, 99-105.
 20. **Jesse, J.**, 1986. New subcloning efficiency competent cells: $>1 \times 10^6$ transformants/ μg . *Focus* **8**, 9.
 21. **Keen, N.T. and B. Staskawicz**, 1988. Host range determinants in plant pathogens and symbionts. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**, 421-440.
 22. **Ko, Y.H. and R. Gayda**, 1990. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium fredii* USDA191. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 105-113.
 23. **Leary, J.J., D.J. Brigati and D.C. Waed**, 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4045-4049.
 24. **Leigh, J.A., E.R. Singer and G.C. Walker**, 1985. Exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6231-6235.
 25. **Lewin, B.**, 1987. Genes. 3rd ed., p. 200-206. John Wiley & Sons, Inc., USA.
 26. **Lim, S.T. and K.T. Shanmugam**, 1979. Regulation of hydrogen utilization in *Rhizobium japonicum* by cyclic AMP. *Biochim. Biophys. Acta* **584**, 479-492.
 27. **Long, S.R.**, 1989. *Rhizobium*-Legume nodulation: Life together in the underground (review). *Cell* **56**, 203-214.
 28. **Mandel, M. and A. Higa**, 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
 29. **Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook**, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 30. **Miller, J.H.**, 1972. Experiments in molecular genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 31. **Rigby, P.W.J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg**, 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251.
 32. **Rolfe, B.G. and J. Shine**, 1984. Chapter 4. *Rhizobium*-leguminosae symbiosis: the bacterial point of view, p. 95-128. In D.P.S. Verma and Th. Hohnt(ed.). Genes involved in plant microbe interactions. Springer-Verlag, Wien, N.Y.
 33. **Selvaraj, G. and V.N. Iyer**, 1984. Transposon Tn5 specifies streptomycin resistance in *Rhizobium* spp. *J. Bacteriol.* **158**, 580-589.
 34. **Sherwood, M.T.**, 1970. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 708-713.
 35. **Simon, R., U. Priefer and A. Puhler**, 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, **1**, 784-791.
 36. **Sutherland, I.W.**, 1985. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 243-270.
 37. **Tully, R.E. and M.E. Terry**, 1985. Decreased exopolysaccharide synthesis by anaerobic and symbiotic cells of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant. Physiol.* **79**, 445-450.
 38. **Verma, D.P.S. and K. Nadler**, 1984. Chapter 3. Legume-*Rhizobium* symbiosis: host's point of view, p. 57-93. In D.P.S. Verma and Th. Hohn (ed.). Genes involved in microbe-plant interactions. Springer-Verlag, Wien, N.Y.
 39. **Yanish-Perron, C., J. Viera and J. Messing**, 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
 40. **Yelton, M.M., S.S. Yang, S.A. Edie and S.T. Lim**,

1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1537-1547.
41. Zahn, H. and J.A. Leigh, 1990. Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhi-*

zobium meliloti. *J. Bacteriol.* **172**(9), 5254-5259.

(Received December 2, 1992)

(Accepted January 4, 1993)

ABSTRACT: Cloning and Transcriptional Fusion with *lacZ* of a Gene (*exo*) Required for Exopolysaccharide Synthesis in *Rhizobium fredii* USDA191

Chung, Wan Seok and Young Hwan Ko* (Department of Food Science and Technology, Cheju National University, Cheju, 690-756, Korea)

Rhizobium fredii USDA191 reduces atmospheric nitrogen and supply nitrogen compounds that are necessary for plant growth, and produce extraordinarily large amount of exopolysaccharide (EPS). A EPS-deficient mutant YKL293 was isolated by Tn5-insertion mutagenesis of *R. fredii* USDA191. The Tn5-flanking DNA sequence from YKL293 was cloned in pUC19 (pLYK5293). The recombinant plasmid pLYK5293 was used as a probe DNA to screen USDA191 genomic library constructed in phage λ NM1149. A recombinant clone λ NM1149.22E with a wild type *exo* gene required for EPS synthesis was obtained through plaque hybridization. The plasmid pJW33 was constructed by transferring the 3.3 Kb *exo* from λ NM1149.22E to pBR322. Cells of phage Mu lysogen, *Escherichia coli* PO11734 were transformed by pJW33, and transcriptional fusion of promoterless *lacZ* contained in Mud11734 with the promoter of *exo* was induced. *E. coli* JM83 harboring the resulting recombinant plasmid pUM21 produced β -galactosidase even though its activity was 14~25 fold lower than that of *E. coli* LE392 which had a wild type *lacZ* gene.