

Bradyrhizobium sp. SNU001의 nodD와 nodA의 염기서열나영순 · 심웅섭¹ · 안정선*서울대학교 자연과학대학 생물학과, ¹고려대학교 이과대학 생물학과

대두(*Glycine max*) 뿌리혹의 질소고정 공생균주 *Bradyrhizobium sp. SNU001*의 *nodD*와 *nodA*의 염기서열을 결정하였다. 총 314개의 아미노산을 암호화하는 *nodD*의 open reading frame(ORF)은 942 bp로 *B. japonicum* USDA110의 *nodD1*과 99.4%의 유사성을 보여주었으며, 총 210개의 아미노산을 암호화하고 콩과식물의 *Bradyrhizobium*에서는 처음으로 염기서열이 결정된 *nodA*의 ORF는 630 bp로 *B. sp. (Parasponia)*의 *nodA*와 81.5%의 유사성을 보여주었다. *nodYAB* 오픈론과 *nodD*의 상류에서는 9 bp의 반복서열을 각각 4번, 2번 가지는 보존적인 *nod box*가 발견되었으며 *nodD*의 상류에는 A, T-rich 서열도 존재하였다.

KEY WORDS □ sequencing, *nodD*, *nodA*, *nod box*, *Bradyrhizobium sp. SNU001*

질소고정 능력을 가지는 뿌리혹의 형성은 공생균이 뿌리털에 부착하면 뿌리털이 분지하거나 꼬부라지는 침입 전 과정, 공생균이 침입사를 형성하여 뿌리내부로 침입하고 피층세포가 분열하면서 뿌리혹 형성이 시작되면 침입사로부터 방출된 공생균은 bacteroid로 분화되어 뿌리혹이 형성되는 과정, 뿌리혹 내부에서 bacteroid에 의해서 질소고정이 일어나고 고정된 산물을 이용하면서 뿌리혹이 유지되는 과정으로 나눌 수 있다(23).

이러한 뿌리혹 형성과정은 숙주식물과 질소고정균 유전자의 상호작용에 의해서 결정되며, 특히 초기 뿌리혹 형성단계에서는 숙주식물이 flavone이나 flavanone과 같은 flavonoid를 분비하면(22), 공생균주는 뿌리혹 형성에 관여하는 *nod*-유전자를 발현시키면서 NodRm-IV(S)와 같은 Nod-factor를 분비하여 침입 전 과정과 뿌리혹 형성과정을 유도한다(5).

nod-유전자는 *Rhizobium leguminosarum*이나 *R. trifolii*의 경우는 10~14 kb 부위에 밀집해 있으나 *R. meliloti*의 경우는 약 12 kb 떨어진 두 곳에 밀집해 있고 모든 경우 sym-plasmid에 존재하고 있다(3). 그러나 *Bradyrhizobium*의 경우는 plasmid 상에 존재하지 않고 chromosome 상에 산재해 있다(11). 지금까지 *nod*-유전자는 *nodA*에서 *nodZ*까지 알려져 있는데 뿌리혹 형성에 필수적인 *nodDABC*와 같은 common *nod* 유전자와 *nodE*, *H*, *P*, *Q*와 같이 숙주식물이 달라지면 발현이 중단되는 숙주특이적 유전자(*hsn genes*)로 구분된다(12). *nodAB*는 Nod-factor 생산에 필요하며 *nodC*는 공생균의 외막과 연관이 있으며(13) *nodD*는 *nod*-유전자 유도에 transcriptional activator로 작용하며(29), *nodF*, *nodG*, *nodH*, *nodL*, *nodM*, *nodO*, *nodP*, *nodQ*는 Nod-factor 합성에 관여하는 효소를 암호화한다(5).

*B. japonicum*의 경우 *nodD* 유전자는 *nodYABC-SUIJ* 오픈론의 상류에 2 copy가 존재하는데(7), NodD1과 NodD2 단백질은 62%의 상동성을 보이나, *nodYABC-SUIJ* 오픈론 유도에 NodD1은 필요하나 NodD2는 필요하지 않다(9). *nodD* 산물과 식물요소에 의해서 *nodABC* 뿐만 아니라 *nodFE*도 발현이 촉진되므로 *nodD*를 중심으로 전사시작 부위의 염기서열을 조사한 결과 9 bp의 반복서열로 이루어진(29) *nod box*라고 부르는 보존적 47 bp DNA 서열, A2와 A3의 대칭구조 및 A,T-rich 서열이 존재하고 있음이 밝혀졌다(4). 그러나 *Bradyrhizobium*에서는 *nodD1*, *D2*, *Y*, *V*, *W*만 염기서열이 밝혀졌고(8, 9, 20) common *nod* 유전자인 *nodA*, *B*, *C*의 염기서열은 아직 보고되지 않은 실정이다.

우리나라에서 대두(*Glycine max*)의 질소고정 공생관계에 대한 연구는 공생균주 *Bradyrhizobium sp. SNU001* 분리(17) 등이 있을 뿐 *nod*-유전자에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *Bradyrhizobium sp. SNU001*의 *nod*-유전자에 대한 분자생물학적 연구의 일환으로 계통상에서 *nodD*와 *nodYAB* 유전자의 존재를 확인하고 계통 라이브러리로부터 이들 유전자를 가지고 있는 클론을 선별한 후 이들의 염기서열을 결정하였다.

재료 및 방법**균주 및 시약**

본 실험에서는 대두(*Glycine max*)의 뿌리혹으로부터 분리된 공생균주 *Bradyrhizobium sp. SNU001*을 사용하였다. 여러가지 제한효소는 New England Biolabs에서, DNA ligase, Klenow fragment, deletion series 작성을 위한 Erase-a-Base kit 등은

Promega에서 구입하였고 DNA sequencing kit는 United States Biochemical에서 구입하여 사용하였다. [α - 35 S]-dATP는 Dupont에서, [α - 32 P]-dCTP, DNA 표지를 위한 nick translation kit와 나일론막은 Amersham에서 각각 구입하였다.

탐침 DNA의 분리 및 표지

nod 유전자의 검정에 쓰인 탐침 DNA는 *B. japonicum* USDA110의 1.26 kb *Pst*I 절편인 *nodD*, *Y* 유전자를 pPP375의 *Bam*HI에 삽입한 pZB32를 사용하였다(1). 이 plasmid를 가지고 있는 균주를 tetracycline이 포함된 LB 배지에서 배양한 후 alkaline lysis 방법(19)에 따라 plasmid를 분리한 후, *Pst*I로 절단하여 0.7% agarose 수평 겔에서 전기영동한 후 탐침 DNA로 사용할 1.26 kb 절편을 agarose 겔로부터 수확하여 nick translation에 의거하여 표지하였다(19).

게놈 혼성화반응

Bradyrhizobium sp. SNU001의 genomic DNA가 각각 *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Sal*I로 절단되어 있는 blot(16)을 62°C에서 2시간 동안 전 혼성화반응을 수행한 후 탐침 DNA를 전체 방사능이 2.5×10^6 cpm/ml이 되도록 넣고 62°C에서 12시간 이상 혼성화반응을 수행하였다(19). 반응이 끝난 나일론막은 $2 \times$ SSC 용액으로 62°C에서 15분간 2회 세척하고 $2 \times$ SSC/0.1% SDS 용액과 0.1% SSC 용액으로 각각 15분, 30분간 세척하여 건조시키고 Dupont Cronox 증폭막과 함께 -40°C에서 36시간 방사선 사진법으로 감광시켰다.

nod-유전자가 삽입된 phage 클론 선별 및 혼성화반응

Bradyrhizobium sp. SNU001에서 분리된 DNA를 *Bam*HI로 부분절단한 다음 lambda EMBL3-*Bam*HI arm에 제조된 genomic library(16)로부터 *nod*-유전자를 포함하고 있는 phage plaque를 1차로 선별한 후(2) plaque사이의 간격이 충분히 떨어져 있어 뚜렷이 구분되는 단일 클론을 선별하기 위해 2차 선별작업을 수행하였다(19).

최종적으로 선별된 파아지 클론으로부터 culture extraction법(19)을 사용하여 분리한 DNA를 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III로 절단하고 전기영동한 후 Southern (28)의 방법에 따라 나일론막으로 옮겨 동일 탐침으로 선술한 방법에 따라 혼성화반응을 수행하였다.

4.1 kb *Hind*III 절편의 subcloning

*B. japonicum*의 *nodD*, *Y* 유전자와 강한 혼성화반응을 보이는 4.1 kb *Hind*III 절편을 역시 *Hind*III로 절단한 pUC19에 ligation시켜 CaCl_2 를 처리한(18) *E. coli* 균주 JM101에 형질전환시킨 후 X-gal, IPTG, Amp이 첨가된 배지에서 형성된 흰색 콜로니를 선별하였다.

선별한 클론으로부터 alkaline lysis 방법(19)에 따라 plasmid를 대량 정제한 후, *Hind*III, *Pst*I, *Eco*RI, *Xho*I, *Sal*I, *Sac*I로 절단하고 전기영동한 후 선술한 바와 같이 혼성화반응을 수행하였다.

재조합 plasmid의 deletion

재조합 plasmid에 subcloning된 4.1 kb *Hind*III 절편의 염기서열을 결정하기 위해 Erase-a-Base system을 이용하여 한 방향으로 deletion을 수행하였다(10). Plasmid DNA를 *Kpn*I/*Bam*HI으로 이중 절단한 후 일정한 시간 간격으로 exonuclease III를 처리하여 한쪽방향으로 deletion 시키고 S1 nuclease와 Klenow-enzyme을 사용하여 양끝을 blunt end로 만든 다음 T4 DNA ligase로 ligation하여 *E. coli*를 형질전환 시켰다. 형질전환된 *E. coli*로부터 plasmid를 분리한 후 이를 *Hind*III로 절단한 다음 전기영동하여 약 180 bp씩 차이가 나게 결실된 클론들을 선별하여 염기서열 결정에 이용하였다.

염기서열 결정

염기서열은 dideoxynucleotide chain termination 방법(25)을 사용하여 결정하였는데 primer 부착반응 및 [α - 35 S]-dATP를 이용한 표지반응, 종결반응 등은 sequenase 구입시 첨부된 지시에 따랐으며, primer로는 M13/pUC universal sequencing primer를 사용하였다.

반응이 종결된 후 시료를 70~80°C에서 2분간 가열한 후 곧바로 6% acrylamide, 7 M urea sequencing 겔에서 1,200~1,500 V로 전기영동 하였으며, 전기영동이 끝난 겔을 10% acetic acid, 12% methanol 용액에 15분간 담가 urea를 제거하여, 75°C에서 1.5 시간 건조시킨 다음 X-ray 필름에 48시간 동안 노출시키고 autoradiogram을 얻은 후 판독하였다.

결과 및 고찰

게놈 혼성화반응

정제한 *Bradyrhizobium* sp. SNU001의 genomic blot을 *B. japonicum*의 1.26 kb *nodD*, *Y* 유전자를 탐침으로 사용하여 혼성화반응을 수행한 결과 *Eco*RI의 6.0 kb와 1.6 kb 절편, *Hind*III의 4.1 kb 절편, *Bam*HI의 24 kb 절편, *Pst*I의 1.35 kb 절편, *Sac*I의 2.6 kb와 0.95 kb 절편에서 강한 혼성화반응이 나타났다(Fig. 1). 이러한 결과는 Ko(16)의 결과와 상이하였는데 사용한 탐침이 pRmSL26의 *Eco*RI/*Hind*III 4.5 Kb로 *nodD*, *A*, *B*, *C*를 모두 포함하고 있기 때문으로 판단되었다. 이로부터 *Bradyrhizobium* sp. SNU001균주의 *nodD*, *Y* 유전자가 4.1 kb *Hind*III 절편내에 존재하고 있음을 알 수 있었다.

nod-유전자가 삽입된 phage 클론 선별 및 혼성화반응

Genomic library에서 *nod* 유전자를 가지고 있는 재조합 phage 클론을 얻기 위하여 동일 탐침을 사용하여 1차 및 2차 선별작업을 수행하였다. 1차 선별작업에서는 강한 혼성화반응을 보인 3개의 phage 클론을 선별할 수 있었으며, 이로부터 각각에서 2개씩 분명하고 뚜렷이 구분되는 6개의 클론을 선택하였다(자료미제시).

2차 선별을 통해 얻은 6개의 클론 중에서 A1클론

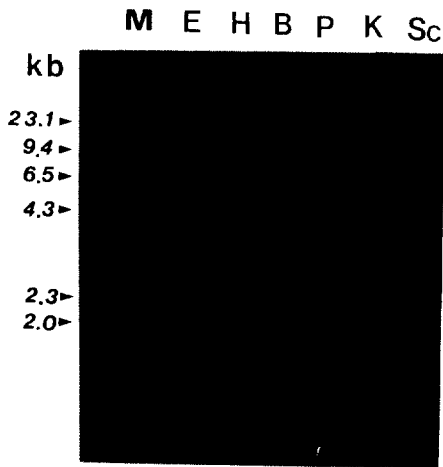


Fig. 1. Genomic hybridization patterns of *Bradyrhizobium* sp. SNU001 DNA with *B. japonicum nodD*, Y probe.
M, Lambda DNA/*Hind*III size marker; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; B, *Bam*HI; P, *Pst*I; K, *Kpn*I; Sc, *Sac*I.

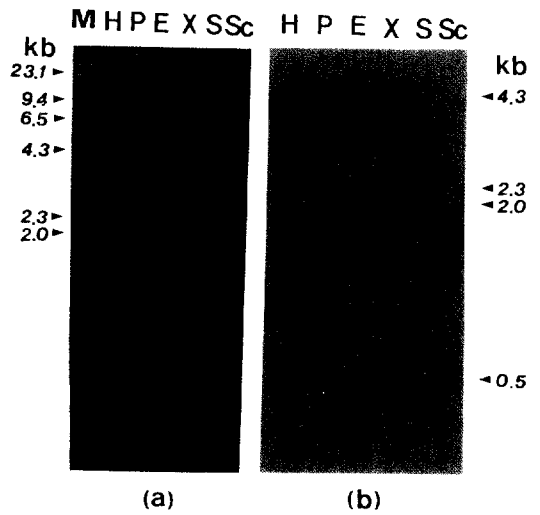


Fig. 3. Restriction enzyme digestion patterns of pBAN 4.1 (a) and corresponding blot hybridized to *B. japonicum nodD*, Y probe (b).
M, Lambda DNA/*Hind*III size marker; H, *Hind*III; P, *Pst*I; E, *Eco*RI; X, *Xho*I; S, *Sall*I; Sc, *Sac*I.

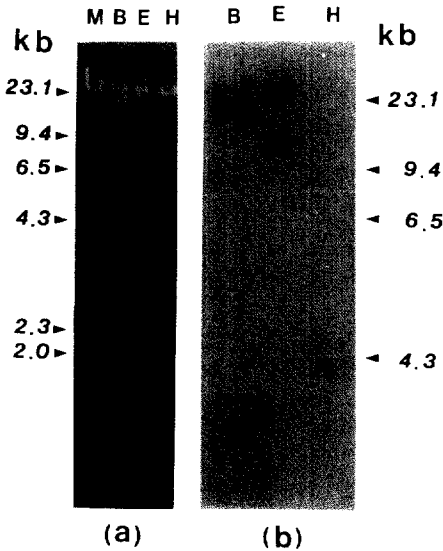


Fig. 2. Restriction enzyme digestion patterns of λ BAN-1 clone (a) and corresponding blot hybridized to *B. japonicum nodD*, Y probe (b).
M, Lambda DNA/*Hind*III size marker; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III.

으로부터 DNA를 분리한 후 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III로 절단하고 전기영동한 후(Fig. 2a) 동일 탐침으로 혼성화반응을 수행한 결과 *Bam*HI의 18 kb, *Eco*RI의 24 kb와 14 kb, *Hind*III의 4.1 kb 절편들에서 강한 혼성화반응이 나타났다(Fig. 2b). 이러한 결과는

계놈 혼성화반응의 결과와 일치하였으며 이 클론을 BAN-1로 명명하고 이후의 실험재료로 사용하였다.

4.1 kb *Hind*III 절편의 subcloning 및 혼성화 반응

λ BAN-1 클론내의 4.1 kb *Hind*III 절편을 pUC19 벡터의 *Hind*III 절편에 subcloning한 후 X-gal/Amp 배지에서 흰 콜로니를 선별하고, mini preparation 방법으로 추출한 DNA를 *Hind*III로 절단하여 원하는 절편이 들어있음을 확인하여(자료미제시) 이를 pBAN 4.1로 명명하였다. 이 재조합 클론의 DNA를 대량으로 분리하고 *Hind*III를 비롯한 다양한 제한효소로 절단한 후 전기영동하고(Fig. 3a), 나일론막으로 옮겨 동일 탐침을 이용하여 혼성화반응을 수행한 결과 *Hind*III의 4.1 kb 절편, *Pst*I의 1.35 kb 절편, *Eco*RI의 1.6 kb 절편에서 혼성화반응이 나타났다(Fig. 3b). 이러한 결과는 4.1 kb *Hind*III 절편이 subcloning되었음을 확인시켜 주었고 또한 genomic DNA에 대한 혼성화반응의 결과와 일치하였다. 그러나 *Sall*으로 절단한 경우 3.6 kb, 3.0 kb에서 *Sac*I으로 절단한 경우는 1.45 kb에서 추가적 혼성화 반응이 나타났는데 이들 효소에 의한 절단이 불완전 하였기 때문으로 판단되었다.

***nod*-유전자의 염기서열 분석**

pBAN4.1의 *nod* 유전자 염기서열 결정을 용이하게 하기 위하여 *Kpn*I과 *Bam*HI으로 이중절단한 후 exonuclease III와 S1 nuclease를 시간별로 처리함으로써 약 180 bp 정도의 차이를 두고 결실이 일어난 deletion series를 얻었으며(자료미제시) 이들의 플라즈미드를 대량 분리하여 dideoxynucleotide chain

1521 GAGGTTGGATAGCAAACCTGAAGTTTGGAAAAACAATTAGACGCCACGATGGTTTCGGTTCGTTCACGTGAGCTAAGA
 CTCCAACCTATCGTTTGACTTCAAACCTTTTTCGTTAATCTGGCGGGTCTACCAAAGGCCAGCAAGTGCCTACTOGATTCT
 ↑
 1601 GAAGAGCTCCAGACGTGGCCAGCACCAATGGCGCGCCGTTGTGTGTTTCTCTTAAGCGTGGCCGTTTCGAACGCCAAGCCG

nodY $\left\{ \begin{array}{l} \longrightarrow \\ \text{M Q I S S V S I F Q V Y P R T I E G A F S} \end{array} \right.$

1681 GTCCCGATAAAACGTTGGTATGCAGATATCATCCGTTTCCATAITTCAGGTTTACCCGCGTACAATTGAGGGCGCGTTCAG

L I L V S K N R G R R L

1761 CCTCATTTCTAGTGTGGAAGAATAGAGGCAGACGCAGGTTTGG

(b)

nodY $\left\{ \begin{array}{l} \longrightarrow \\ \text{S A F I G G S A N S E L T *} \end{array} \right.$

1 TCAGCATTCATCGCCGGTTGGGGAATAGCGAATTGACGTGACCATCCCGCTCTTCATTCCACCGGCCAAGGAAGCTC

nodA $\left\{ \begin{array}{l} \longrightarrow \\ \text{M N I A V S P T A E G S S G R A Q V Q W S L R W E S} \end{array} \right.$

81 GCCATGAACATTCGCGCTCCCGACTCGCGGAAGGATCTTCTGGCGCGCTCAAGTGCAGTGGAGCCTTGGTGGGAAAG

E L Q L A D H A E L A E F F R K S Y G P T G A F N A

161 TGAATGCAGCTCCCGATCATGCCGAGCTCGGGAGTCTTCCGCAAGATTACCGACCGAAGGGTGGTTCGAATGCCG

Q P F E R S R S W A G A R P E L R V I G Y D A R G V A

241 AGCGGTTTGAAGCGGAGCCGAAGTTGGCTGGAGCAAGACCGAGCTCCCGGTAATTGGTTACGACCGCGCGGGTAGCG

A H I G L L R R F I K V G E V D L P V A E L G L Y A V

321 GCTCACATCGCGCTACTCGCCGCTTCATCAAAGTTGGTGAAGTGGATCTCCCTGTGGCCGAAGCTCGGGTGTATGGGT

R P D L E G H G I G H A M R V M Y P A L Q E L G V P

401 GCCCCCGATCTCGAGGGGACCGGATAGCCCAAGCAATGCGGIGATGTATCCGCACTCCAGGAGCTCGCGGTTCCAT

F G F G A V R S A L E K H L T R L V E R Q G L A T L M

481 TCGGATTTGGCGCGGTTGGCTCGCCCTCGAAAAACATTTGACCCGACTGGTTCGAAAGCCAGGGGCTCGCCACCCCTGATG

R G I C V R S T L P D V Y P N L S P T R I E D V I V V

561 CGTGGCATCTGGTCCGCTCCACCTTTGCGGATGTCTATCCAAATTTATCGCCGAAGCCCATCGAAGACGTGATCTGCTGT

nodB $\left\{ \begin{array}{l} \longrightarrow \\ \text{V T E} \end{array} \right.$

V F P V G R S I S E W P A G T V I D R N G P E L *

641 GGTGTTTCCGGTCCGACCGCTOGATAAGCGAATGGCCGCGGACTGTTCATCGATCGTAACGGGCCCTGAGTTGTGACAGA

R S T L S T V R C D Y V D A G G S R A V H L A F D D

721 GCGTCCACCCATCTACTGTCCGCTGGACTAGTTCGACCGCGCGGAAGTCCAGTGTCCATTTGACCTTTGACGATG

```

G P N P F C T P E V L D V L A Q H R V P A T F F V I G
801 GGCCAAATCCAATTTTGTACGCCAGAGGTCTCGATGTCTCGCGCAACATCGGGTCCOOCGACATTCTTGTTCATCGGG
T Y A T E H P E L I R R M I A E G H E V A N H T M T H
881 ACGTACGCGAAGGAGCATCTCTGAACTCATCCGACGAATGATTGCGGAAGGGCATGAGGTTGCGAACCATACGATGACCCA
P D L S R C G L R S Y T T R C C R R A K P S V C G A
961 TCCTGATCTATCCAGATCGGGACTCGCGACTACGACGAGGTGCTGACGGGAGGAGGACATCCGTCCTCGCGTGC
R W P R P G I C E
1041 GCTGGCCTCGCCAGGCATATGCGAGC
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequence of *nodD*, *nodA* from *Bradyrhizobium* sp. SNU001. Predicted amino acids are indicated by the single letter code. Upper or under lined bases indicate the Shine-Dalgarno-like sequence. The stop codons of *nodD*, *Y*, *A* are indicated by an asterisk. Directions of translation are indicated by ← for *nodD* and → for *nodYAB*. Predicted transcriptional start sites are indicated by · for *nodD* and - for *nodYAB* (29). The *nod* box (29) to *nodD* (lower strand) and *nodY* (upper strand) are shaded and A,T-rich sequence is indicated by ... Nucleotide sequences of *Bradyrhizobium* sp. SNU001 *nod* genes different from those of *B. japonicum* USDA110 (a) and *B. sp. (Parasponia)* (b) are represented by outer letter.

termination 방법으로 염기서열을 결정하였다.

그 결과 *nodD* 유전자와 *nodY* 일부인 1802 bp의 염기서열(Fig. 4a)과 *nodA* 유전자와 *nodB*의 5'이라고 판단되는 1067 bp의 염기서열(Fig. 4b)을 결정하였는데, 942 bp open reading frame(ORF)의 *nodD*는 1457 nt의 ATG에서 시작하여 515 nt의 TAG로 종결되었으며(Fig. 4a) 630 bp ORF의 *nodA*는 84 nt의 ATG에서 시작하여 714 nt의 TGA로 종결되었다(Fig. 4b). 또한 *nodA*의 3' 말단에서 ATG의 시작코돈이 발견되지 않으나 *R. meliloti*(4), *R. trifoli*(21), *B. sp. (Parasponia)*(27)의 경우와 비교할 때 713 nt의 GTG 코돈이 *nodB*의 시작코돈이라 판단되나 종결코돈까지의 ORF를 밝혀야 확실해질 것으로 생각되며 *nodA*의 종결코돈과 겹치어 *nodA*와 *nodB*의 translational coupling의 가능성을 제시하고 있다. *nodY*는 유사성이 높은 *B. japonicum* USDA110과 비교시 Fig. 4a에서 1699 NT의 ATG가 시작코돈이라 판단되었으며 Fig. 4b에서 40 nt의 TGA가 종결코돈으로 판단되었다.

*nodD*의 염기서열은 *B. japonicum* USDA110의 *nodD1*과 *nodD2*의 염기서열 중 *nodD1*의 염기서열과 99.4%의 매우 높은 유사성을 나타내어 *nodD1*이라 판단되었다. *nodA*의 염기서열은 콩과식물의 *Bradyrhizobium*에서는 본 연구에 의해서 최초로 밝혀졌으며 비콩과식물의 공생균주인 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) strain ANU289의 염기서열과 81.5%의 높은 유사성을 보였다.

아미노산 서열 분석

염기서열로부터 *nodD*, *A* 유전자에 의하여 암호화된 NodD, A의 아미노산 서열을 추론하였다(Fig. 4). 그 결과 암호화된 부위는 NodD가 총 314개의 아미노

Table 1. Amino acid sequence homologies of NodD and NodA

	<i>Bradyrhizobium</i> sp. SNU001	
	NodD(%)	NodA(%)
^a <i>B. sp. (Parasponia)</i>	87.6	82.9
^b <i>B. japonicum</i> USDA110	98.1	N.D.
^c <i>R. meliloti</i>	67.2	60.2
^d <i>R. trifoli</i>	61.5	60.9
^e <i>R. leguminosarum</i>	N.D.	56.8
^f <i>Azorhizobium caulinodans</i>	N.D.	51.9

N.D., not determined; a. (27); b. (9); c. (4); d. (26); e. (24); f. (7).

산으로 구성된 단백질이며 NodA가 총 210개 아미노산으로 구성된 단백질임을 알 수 있었다. 이들의 아미노산서열 유사성을 조사한 결과(Table 1), NodA는 *B. sp. (Parasponia)*와 82.9%의 유사성을 보였으며 *Rhizobium*과는 50~60%의 낮은 유사성을 보였다. NodD는 *Rhizobium*과는 61~67%의 낮은 유사성을 보였으나 *B. sp.(Parasponia)*와는 87.6%, *B. japonicum*의 NodD1과는 98.1%의 높은 유사성을 보였다.

Promoter 서열 분석

*nodD*는 시작코돈의 5' 상류지역인 1466 nt에서 1472 nt 사이의 GGATAGA 서열이 ribosome 결합 장소인 Shine-Dalgarno(S-D) 서열이라고 생각되며 *nodY*는 1686 nt부터 1691 nt의 GATAAA가, *nodA*는 72 nt부터 77 nt 사이의 AGGAAG가 S-D 서열이라고 생각되었다. *nodB*는, 높은 유사성을 가질 것으로 예

상되는 *B. sp. (Parasponia)*의 *nodB*와 비교시(27). 핵독시작 코돈이라 생각되는 GTG의 상류인 699 nt에서 704 nt에 있는 AACGGG가 S-D 서열이라 판단되었다.

nod-유전자 유도에 필요한 *cis*-acting *nod* box promoter의 보존적 서열이 *nodYAB* 오페론과 *nodD* 유전자의 5'에서 각각 발견되었다(Fig. 4a). 전형적인 *nod* box는 aTC(G)G(C)AT(A)(t)yt(a)의 9 nt의 보존적 서열을 갖는데(29). *Bradyrhizobium sp.* SNU001에서 *nodYAB* 오페론의 *nod* box는 ATCCATCGT GTGGATGTG TTCT ATCGAAACA ATCGA-TTTI ACCAAAC로 9 nt의 보존서열이 4번 반복되며 TTCT의 4 nt에 의해 2쌍으로 분리되어 있다. 이는 앞서 보고된 대부분의 *nod* box의 결과(7, 24, 26)와도 일치하며 4 nt에 의해 분리된 2쌍은 DNA 나선의 반대면에 위치하여 *nod*-유전자 발현에 최대효과를 갖는다고 보고되었다(29). 그러나 *nodD*의 *nod* box는 대부분의 *nod* box와는 달리 TGAACGACC GGA-AACCAT CGTG GCGCGTCTA ATTGCTTTT TCCAAAC로 9 nt의 보존서열이 2번만 반복되었다.

이러한 결과는 이미 보고된 *B. japonicum*의 결과와 일치하는데(29), 9 nt의 2번 반복이 NodD와 *nod* box의 상호작용에 최소한으로 필요한 조건이지만 *nod*-유전자의 최대 발현에는 4번 반복이 필요하다는 보고(7, 29)를 고려하면 본 균주의 경우도 *nodD*가 *nodYABC*보다 낮은 수준으로 발현됨(1)을 시사한다. *nod* box 외에도 *nodD* 상류 35 nt의 TGGTA-AAATCGATTGTTTCGA인 A.T-rich 서열이 발견되었는데 이 서열은 식물에 의해서 매개되는 *nod*-유전자 발현유도에 관계한다고 보고되었다(27).

*nodD*의 염기서열이 *B. japonicum*과 매우 높은 유사성을 갖음을 생각할 때 *nodD*의 전사개시부위는 *nodD nod* box 하류의 44 nt에 위치하며 *nodYAB*의 전사개시부위가 *nodYAB nod* box 하류쪽의 28 nt에 위치(29)할 것으로 생각되나 primer extension 등의 실험을 해야 확실하게 밝혀질 것으로 생각된다. 이와 아울러 *nodD*에 대한 promoter는 *nodYAB* 전사개시부위와 겹치며 *nodYAB* 오페론에 대한 promoter는 *nodD*의 전사개시부위와 겹쳐 *nodD*의 전사개시부위의 위치는 *nodYAB nod* box의 위치에 의해 결정된다(29)고 했는데 이러한 협동적인 조절의 역할도 앞으로 규명해야 할 일이라고 생각된다.

코돈 사용횟수 및 G+C% 비교

Bradyrhizobium sp. SNU001의 *nodD*와 *nodA* ORF의 코돈 사용빈도를 조사한 결과 전체적으로 코돈을 편향적으로 이용하지 않았는데(자료미제시) 이는 코돈 사용빈도가 생체내의 tRNA의 빈도를 반영한다는 점으로 미루어 볼 때(15) 본 균주의 세포내 tRNA 빈도는 편향되지 않은 것으로 판단된다. 또한 ORF의 G+C%를 조사한 결과 *nodD*와 *nodA*에서 각각 59%, 61.1%로 나타나 *Bradyrhizobium* 계통의 G+C%인 61~65%(14) 범위에 속하였고, 코돈의 제

번째 위치에서도 각각 64.5%, 66.4%로 나타나(자료미제시) 염기조성의 편향성을 보이지 않았다.

사 사

본 연구는 교육부의 1991년도 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Banfalvi, Z., A.J. Nieuwkoop, M.G. Schell, L. Besl, and G. Stacey, 1988. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 420-424.
2. Benton, D. and R.W. Davis, 1977. Screening lambda-*gt* recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
3. Downie, J.A. and A.W.B. Johnston, 1986. Nodulation of legumes by *Rhizobium*: The recognized root? *Cell* **47**, 153-154.
4. Egelhoff, T.T., R.F. Fisher, T.W. Jacobs, J.T. Mulligan, and S.R. Long, 1985. Nucleotide sequence of *Rhizobium meliloti* 1021 nodulation genes: *nodD* is read divergently from *nodABC*. *DNA* **4**, 241-248.
5. Fisher, R.F. and S.R. Long, 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**, 655-660.
6. Goethals, K., M. Gao, K. Tomekpe, M.V. Montagu, and M. Holsters, 1989. Common *nodABC* genes in Nod locus I of *Azorhizobium caulinodans*: Nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Mol. Gen. Genet.* **219**, 289-298.
7. Göttfert, M., J.W. Lamb, R. Gasser, J. Semenza, and H. Hennecke, 1989. Mutational analysis of the *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes and further nod box-linked genomic DNA regions. *Mol. Gen. Genet.* **215**, 407-415.
8. Göttfert, M., P. Grob, and H. Hennecke, 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2680-2684.
9. Göttfert, M., D. Holzhäuser, D. Bani, and H. Hennecke, 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Molecular plant-microbe interactions* **5**, 257-265.
10. Henikoff, S., 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 205-211.
11. Hennecke, H., H.M. Fisher, S. Ebeling, M. Gubler, B. Thony, M. Göttfert, J. Lamb, M. Hahn, T. Ramseier, B. Regensburger, A. Alvarez-Morales, and D. Studer, 1987. *nif*, *fix* and *nod* gene clusters in *Bradyrhizobium japonicum* and *nifA*-mediated control of symbiotic nitrogen fixation, p. 191. In D.P.S. Verma and N. Brisson (ed.), *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. Martinus

- Nijhoff, Dordrecht.
12. **Horvath, B., C.W.B. Bachem, J. Schell, and A. Kondorosi**, 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal interaction with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**, 841-848.
 13. **John, M., J. Schmidt, U. Wieneke, H.D. Krüssmann, and J. Shell**, 1988. Transmembrane orientation and receptor-like structure of the *Rhizobium meliloti* common nodulation protein NodC. *EMBO J.* **7**, 583-588.
 14. **Jordan, D.C.**, 1982. Rhizobiaceae. p. 234-256. In N.R. Krieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of systematic bacteriology* Williams and Wilkins, Baltimore.
 15. **Kimura, M.**, 1981. Possibility of extensive neutral evolution under stabilizing selection with special reference to non-random usage of synonymous codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5773-5777.
 16. **Ko, S.**, 1992. Isolation of symbiont from root nodule of soybean (*Glycine max*) and molecular cloning of its *nod* genes. MS Thesis. Seoul National University.
 17. **Ko, S., Y.K. Park, and C.S. An**, 1991. Characteristics of *Bradyrhizobium japonicum* SNU001, a symbiotic strain of *Glycine max*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 143-147.
 18. **Mandel, M. and A. Higa**, 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
 19. **Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook**, 1982. Molecular cloning. pp. 256-294, 368-369, 464-465. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 20. **Nieuwkoop, A.J., Z. Banfalvi, N. Deshmane, D. Grhold, M.G. Schell, K.M. Sirotkin, and G. Stacey**, 1987. A locus encoding host range is linked to the common nodulation genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **169**, 2631-2638.
 21. **Peters, N.K., J.W. Frost, and S.R. Long**, 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**, 977-980.
 22. **Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel, and B.G. Rolfe**, 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**, 632-635.
 23. **Rolfe, B.G. and J. Shine**, 1984. *Rhizobium-leguminosae* symbiosis: The bacterial points of view, p. 95-128. In D.P.S. Verma and T.H. Hohn (ed.), *Gene involved in microbe-plant interaction*. Springer-Verlag, Wein, New York.
 24. **Rossen, L., A.W.B. Johnston, and J.A. Downie**, 1984. DNA sequence of the *Rhizobium leguminosarum* nodulation genes *nodAB* and *C* required for root hair curling. *Nucleic Acids Res.* **12**, 9497-9508.
 25. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson**, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 26. **Schofield, P.R. and J.M. Watson**, 1986. DNA sequence of *Rhizobium trifolii* nodulation genes reveals a reiterated and potentially regulatory sequence preceding *nodABC* and *nodFE*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2891-2903.
 27. **Scott, K.F.**, 1986. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*). *Nucleic Acids Res.* **14**, 2905-2919.
 28. **Southern, E.**, 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-512.
 29. **Wang, S-P. and G. Stacey**, 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod* box. *J. Bacteriol.* **173**, 3356-3365.

(Received April 1, 1993)

(Accepted May 4, 1993)

ABSTRACT: Nucleotide Sequences of *nodD* and *nodA* from *Bradyrhizobium* sp. SNU001

Na, Young Soon, Woong Sup Sim¹ and Chung Sun An* (Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, and ¹Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Nucleotide sequences of *nodD* and *nodA* from *Bradyrhizobium* sp. SNU001 were determined. The open reading frame (ORF) of *nodD* was 942 bp in length and encoded 314 amino acids, while ORF of *nodA*, sequence of which is the first one among legume symbionts *Bradyrhizobium*, was 630 bp and encoded 210 amino acids. The nucleotide sequence of *nodD* showed 99.4% homology with *nodD1* of *B. japonicum* USDA110, while that of *nodA* showed 81.5% with *B. sp.* (*Parasponia*). At the 5' of *nodYAB* operon and *nodD*, consensus *nod* box sequences composed of 9 bp unit repeated four times and two times respectively were found. Also an A,T-rich sequence was found at 5' of *nodD*.