

해녀콩의 後期 뿌리혹에서 發現되는 4개의 cDNA 特性

金 泰 薰 · 安 正 善*
서울대학교 自然科學大學 生物學科

해녀콩(*Canavalia lineata*) 뿌리혹으로부터 만들어진 cDNA library를 뿌리의 총 RNA, leghemoglobin 및 uricaseII cDNA를 competitor로 사용하여 차등 혼성화반응으로 후기 뿌리혹에서 발현되며 Cnod1, Cne2, Cne3, Clb2로 명명된 4개의 cDNA 클론을 얻었다. Cnod1은 벼의 cysteine proteinase를 암호화하는 유전자와 유사한데 1450 nt의 전사체와 혼성화 반응을 보였으며 뿌리혹에서만 발현되고 뿌리혹 발달 후기에서 가장 높은 발현을 보였다. Cne2는 벼의 Expressed Sequence Tag의 한 종류와 유사하고 900 nt의 전사체와 혼성화 반응을 보였으며 뿌리혹에서 주로 발현되었다. Cne2는 접종 후 13일째 발현이 증폭된 후 일정하게 유지되었다. Cne3는 완두의 tonoplast 막 내재 단백질 TRG31을 암호화하는 유전자와 유사하며 뿌리에서 가장 많이 발현되었다. Cne3는 1700 nt와 1400 nt의 전사체와 혼성화반응을 보였으며 뿌리혹의 성장, 발달과 일치하는 발현 양상을 보였다. Clb2는 800 nt의 전사체와 혼성화반응을 보였으며 접종 후 8일째부터 발현이 시작되어 13일째 증폭되고 그 이후 일정한 수준을 유지하였다.

주요어: 해녀콩 후기 뿌리혹, 차등 혼성화반응, competitor, 막 내재 단백질, leghemoglobin

콩과식물과 *Rhizobium* 및 *Bradyrhizobium*의 질소고정 공생 관계는 식물체 뿌리털과 박테리아의 상호작용, 뿌리털의 변형, 감염사의 발달, 피층 세포로의 박테리아 방출, peribacteroid 막(PBM)의 발달, 박테로이드로의 분화, 질소 고정의 개시라는 과정을 거쳐 이루어지며(Fisher and Long, 1992) 이때 양쪽 생물체 모두의 정교한 유전자 발현이 요구된다(Sanchez *et al.*, 1991).

뿌리혹이 형성되는 과정의 뿌리 혹은 발달된 뿌리혹에서만 발현되는 단백질을 nodulin이라고 하는데, 이러한 nodulin을 암호화하는 유전자들이 몇몇 콩과식물에서 분석되었다(Dunn *et al.*, 1988). 지금까지 확인된 대다수의 nodulin은 분화된 뿌리혹에서 질소 고정의 시작부터 발현되는 후기 nodulin으로 박테로이드에 충분한 산소를 공급하는 역할을 하는 leghemoglobin(Lb) (Appelby, 1984), 고정된 질소의 이동에 중요한 효소인 uricase II(Suzuki and Verma, 1991)와 glutamine synthetase(GS) (Cullimore *et al.*, 1988) 등이 있다. 한편 질소 고정의 시작 전에 발현되는 초기 nodulin에는 뿌리혹 유세포에 존재하며 산소 장벽으로 작용하는 ENOD2(Van de Wiel *et al.*, 1990)와 감염 과정시 작용하는 ENOD12, ENOD5(Scheres *et al.*, 1990)가 있다.

초기 nodulin 유전자의 발현은 공생균의 신호, 뿌리혹의 발달 프로그램 및 호르몬에 의해 조절되는 반면, 후기 nodulin 유전자는 중간 대사 물질과 뿌리혹 내의 환경에 의해 발현이 조절된다(Hirel *et al.*, 1987; Delauney and Verma, 1990). 발현 조절은 주로 전사 수준에서 이루어지며, 지금까지 알려진 cis-acting element로는 N-23, N-24, Lbc3 유전자의 프로모터에 존재하는 AT-rich consensus 서열과 Lbc3 유전자에 뿌리혹 특이성을 부여하는 37 bp(Stougaard *et al.*, 1987)가 있고, trans-acting element로는 Lbc3 유전자의 AT-rich 서열에 결합하는 요소와 N-23 유전자의 AT-rich 서열에 결합하는 HMG1 유사 단백질(Jorgensen *et al.*, 1991)이 있다.

다년생 콩과식물인 해녀콩(*Canavalia lineata*)은 공생균주인 *Rhizobium* sp. SNU003(Kim and An, 1989)에 의해 질소 고정을 하며, 이미 뿌리혹의 발달에 따른 단백질의 변화에 대한 연구(Choi and An, 1991)와 뿌리혹의 cDNA library에서 선별한 Clb1(Kim *et al.*, 1994)과 uricaseII(Kim and An, 1993) cDNA의 염기서열이 결정되었다.

뿌리혹 연구의 최근 경향은 효율적인 library screening을 통해 대량의 유전자원을 얻은 후 각각의 클론들에 집중하고 있다(Kouchi and Hata, 1993). 본 연구에서는 해녀콩 뿌리혹 발달 후기에 발현되는 새로운 유전자들을 competitor를 이용한 차등 혼성화반응으로 클로닝하여 그 특성을 살펴보고 기관별 및 뿌리혹 발생 단계별로 발현 양상을 조사하고자 하였다.

*교신저자: Fax (02) 872-6881
© 한국식물학회 [서울] 1995

재료 및 방법

해녀콩의 뿌리혹 형성 유도

해녀콩(*Canavalia lineata*)의 뿌리혹 형성 유도는 Choi와 An (1991)의 방법에 따랐으며, 종피를 제거한 종자를 암조건에서 (25°C) 3일간 발아시킨 후 유식물을 700 lux (16:8)에서 배양하면서 제 2엽이 나올 때 질소원이 결핍된 배양액에 현탁배양한 공생균 *Rhizobium* sp. SNU003(Kim and An, 1989)을 섞어서 화분에 부어줌으로써 접종이 되게하였다. 접종 후 8, 13, 25일 및 한달 후에 뿌리혹, 뿌리 및 잎을 수확하여 액체 질소로 얼려 곧바로 실험에 사용하거나 -70°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

RNA 분리

총 RNA는 Nagy 등(1991)의 방법을 따라 guanidine thiocyanate를 사용하여 분리하였으며, poly(A)⁺ RNA의 분리는 Ausubel 등(1991)의 방법을 따라 oligo(dT)-cellulose column을 사용하여 분리하였다.

차등 혼성화반응

뿌리혹에서 발현이 증가되는 cDNA의 클로닝을 위한 차등 혼성화반응은 감염된지 60일째된 해녀콩의 뿌리혹으로부터 만들어진 cDNA library(Kim *et al.*, 1994)를 이용하여 Mangiarotti 등(1981)의 방법에 따라 수행하였다.

단일가닥 cDNA 탐침은 지침에 따라 합성 키트를 사용하여 준비하였다. 뿌리혹 poly(A)⁺ RNA 용액에 5X enzyme buffer, sodium pyrophosphate 용액, human placental RNase inhibitor, actinomycin D, oligo(dT)₁₂₋₁₈ primer, dNTP, [α -³²P]dCTP를 순서대로 넣고 역전사효소를 첨가한 후 sephadex G-50 column을 통과시켜 동위원소로 표지된 단일가닥 cDNA 탐침을 분리하였다.

Phage DNA blot은 뿌리혹 cDNA library에서 적당량의 phage액을 취하여 plate(80×100 mm) 당 5,000개의 plaque이 형성되도록 하였으며, Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 Hybond N 나일론 막으로 전이시켰다.

차등 혼성화반응을 위해 준비된 9장의 phage DNA blot에 전혼성화 용액(6X SSC, 5X Denhardt's 용액, 0.5% SDS, 100 µg/mL fragmented denatured salmon sperm DNA)을 넣고 68°C에서 2시간 동안 전혼성화를 수행하였다. 혼성화반응에는 [α -³²P]dCTP로 표지된 단일가닥 cDNA 탐침과 3000 µg의

뿌리 RNA, 4 µg씩의 Clb1(Kim *et al.*, 1994)과 uricaseII(Kim and An, 1993) cDNA 삽입절편을 competitor로 첨가하였다. 혼성화는 68°C에서 62시간 동안 수행하였으며 반응이 끝난 후 나일론 막을 꺼내 2X SSC/0.1% SDS 용액으로 10분씩 2회, 0.2X SSC/0.1% SDS 용액으로 15분씩 2회, 0.1X SSC/0.1% SDS 용액으로 10분 동안 모두 63°C에서 세척하고 -70°C에서 2일간 X-ray film에 자동방사시켰다.

1차 선별에서 강한 혼성화반응을 나타낸 phage plaque 부분을 추출해 내어 plate당 200개의 plaque이 생기도록 한 후 전기한 방법과 동일하게 2차 선별을 수행하였다.

cDNA 절편의 subcloning

2차 선별에서 최종적으로 선택된 클론의 phage DNA는 액체 배양 추출 방법(Sambrook *et al.*, 1989)을 사용하여 분리하였으며, pUC19 플라스미드 벡터를 *EcoRI*로 절단한 site에 phage 삽입절편을 ligation시키고 *E. coli* JM109 균주에 도입시켰다. 재조합 플라스미드는 alkaline lysis법(Birboim and Doly, 1979)을 사용하여 분리하였다.

염기서열 결정 및 분석

cDNA 삽입 절편의 염기 서열은 dideoxynucleotide chain termination sequencing 방법(Sanger *et al.*, 1977)으로 Sequenase DNA sequencing kit(USB)를 사용하여 수행하였다. 이때 M13 reverse primer와 forward primer를 사용하였고, 전기영동은 6% acrylamide gel을 사용하였다. 염기서열의 비교 분석은 BLAST search program(NCBI)과 FASTA search program(EBI)으로 하였고 아미노산 서열의 비교 분석은 BLAST search program(NCBI)과 BLITZ search program(EBI), Predict Protein search program(EMBL)으로 하였다. 그밖의 서열 분석은 IntelliGenetics사의 PC Gene program과 Hitachi사의 DNA-SIS program을 이용하여 수행하였다.

RNA gel blot 분석

약 10 µg의 총 RNA를 1.2% agarose/4-morpholinepropane-sulfonic acid/6% formaldehyde gel에서 전기영동한 후 Hybond N 나일론 막으로 전이시켰다. 탐침 DNA는 random priming의 방법(Feinberg and Vogelstein, 1983)으로 준비하였고 50 µCi의 [α -³²P]dCTP를 사용하여 25 ng의 DNA 절편을 표지하였다. RNA gel blot 혼성화는 앞서 기술한 plaquc 혼성화 반응과 동일하게 실시하였다.

결과 및 고찰

뿌리혹 발달 후기에 발현되는 유전자의 클로닝

총 45,000개의 plaque를 screening한 결과 240개의 signal을 얻을 수 있었으며, 이들의 phage stock을 임의로 선택한 파아지에 삽입된 DNA, Clb1 및 uricaseII를 탐침으로 사용한 혼성화반응을 반복적으로 수행하여 그룹으로 나누었다(자료 미제시). 그 결과 78개는 기존에 분리되어 그 서열이 결정된 Clb1과는 다른 종류의 leghemoglobin cDNA 그룹임이 밝혀졌는데, screening 결과 이렇게 많은 수의 leghemoglobin cDNA가 얻어진 것은 뿌리혹에서의 전체 RNA 전사체 중 12-15% 정도가 leghemoglobin 유전자의 산물이라는 기존의 보고와도 부합하는 것이다(Fuller *et al.*, 1983).

이들 2차 선별된 plaque들 중 서로 다른 그룹에서 무작위로 선택한 4개의 삽입 절편을 pUC19 벡터에 subcloning 시켰는데 (Fig. 1), 삽입 절편의 크기는 450, 620, 980, 780 bp였으며, 각각 Cnod1, Cne2, Cne3, Clb2라 명명하였다.

염기서열의 비교 분석

Cnod1, Cne2, Cne3, Clb2가 어떤 유전자의 cDNA인가를 확인하기 위해 pUC19의 reverse, forward primer를 이용하여 부분적인 염기서열을 결정하였고 database내의 다른 염기서열들과 비교 후 아미노산 서열을 추론하였다(Fig. 2).

Cnod1은 벼의 cysteine proteinase 중의 하나인 oryzain γ (Watanabe *et al.*, 1991)와 염기서열은 84%, 추론된 아미노산

서열은 24개중 91%가 일치했으며, 벼와 보리의 경우와 비교하면 5'쪽이 약 1 kb 정도 결실된 클론으로 판단되었다(Fig. 3A). 또한 Cnod1은 보리의 thiol protease와 87%가 일치했으며 애기장대, spring vetch, *Vicia sativa*, *Alnus glutinosa* 등의 다양한 식물체 뿐만 아니라 human, mouse, *Dicystostelium discoideum*의 cysteine preteinase와 아미노산 서열 수준에서 높은 유사성을

(A) Cnod1

```

GGC TAC TTC AAG ATG GAA ATG GGG AAG AAC ATG TCC GGC GTT GCA AC 51
G Y F K M E M G K N N C G V A F 16

TGC GCA TCT TAT CCT ATT GTG GCC TAA ATTGCATAAAATATGGTCCCCCATAGG 106
C A S Y P I V A * 24

CTGCTGCCTGGTACTATCAGTCTCCTCGTCATATTCAGTGTGTAGCCGATGCCAGTATAGAAG 181
ATTAAAGATGAAGTGTCACTGTTGATGATTATCTAGTTGAT 206
    
```

(B) Cne2

```

CCCAAGAGAACCAAGAAAGATTCAACATGGAGGCAATTCATTGTGGGTTTCAAAGCACAAG 63

CTGGCCACAGTAGGGGGACTTTTGGCTCTTGGAAATTGGAAGCACTTCTAGCTTATTCAGG 126

ATCGAGGTCTCCAAT 141
    
```

(C) Cne3

```

TT TTG GCG AGA AAA TTG TCG TTG ACA AGA GCG CTG TTC TAQ ATG GTG 47
L A R K L S L T R A L F Y M V 15

ATG CAG GTG CTG GGT GCT ATC TGT GGT GCC GGT GTG GTG AAA GGT TTT 101
M Q V L G A I C G A G V V K G F 33

GAA GGA AAA CCA AGG TAC GGA 116
E G K P R Y G 38
    
```

(D) Clb2

```

CAGAAAGTAAGTAAATAAATAAATAAAAAAGGTAAT ATG GGT GCT TTG ACT GAG AAA 54
M G A L S E K 7

CAA GAG GCT TTA GTG AAT AGC TCA TGG GAA GCA TTC AAG CAA AAC CTT 102
Q E A L V N S S W E A F L Q N L 23

CCT CAC CAC AGC GCA GTC TTC TAC ACC TTG ATA CTG GAG AAA GCG CCC 150
P H H S A V F Y T L I L E K A P 39

GCA GCA AAG AAC CTG TTC TCA TTT CTA GCT AAT GGA GTG GAT CAG AAC 198
A A K N L P S F L A N G V D Q N 55

AAT CCT AAG CTC AAT GCC CAT GCA GAA AAG GTT TTT GAA ATG ACG CAC 246
N P K L N A H A E K V F E M T H 71

GAC TCA GCC GIT CAA CTT CGA GCA AAG GGA 276
D S A V Q L R A K G 81
    
```

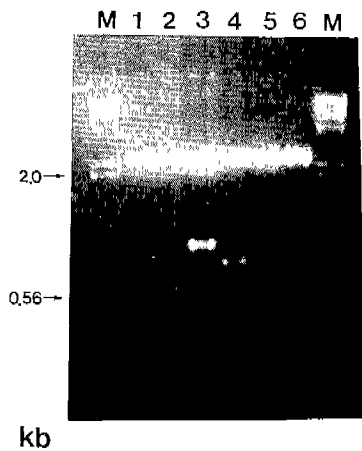


Fig. 1. Subcloning of phage inserts into pUC19 vector. M, λ DNA/*Hind*III cut; 1, Cnod1; 2, Cne2; 3, Cne3; 4, Clb2; 5, deleted Clb2; 6, Clb1.

Fig. 2. Nucleotide sequences of four cDNA clones and the predicted amino acid sequences. The termination codon is marked by asterisk (*).

(A)

Cnod1 :		GYFKMEMGKINMGVATCASYPIVA	
Oryzain γ :	339	---T-----I-----	362
Barley thiol protease :	338	---AI-----V--	361
Human cathepsin H :	196	---LI-R-----CA-----	217
Dictyostelium cysteine proteinase I :	204	--IYLRR---T---SNFV-TS I 226	

(B)

Cne3 :		LARKLSLTRALFYMNQVLGALCGAGVVKGFEGKPRYG	
Pea <i>trg-31</i> :	126	-----I-----Q-F-	163
<i>Arabidopsis</i> PIP1a :	123	-----Y-I--C-----QP-	156
Tomato pTOM75 :	124	-----V-----C-----	154
Frog MIP-26 :	76	IGSQM--F--I--IAA-L---VA--A-LY-	105

(C)

C1b2 :	MGALSEKQELVNSSWEAFLNLPHSAVFYTLILEKAPAAKNLFSFLAN	50
C1b1 :	---F---S--K---K--V-----Q-M--S-	50
Kidney bean <i>1ba</i> :	---FT-----KG-I-QY-V--S-----	50
Alfalfa <i>1b1</i> :	MSFTD-----K---RY-VF--V-----G---K-	50
Soybean <i>1ba</i> :	-V-FT--D--S--F--KA-I-QY-V--S-----D-----	50

C1b2 :	GVDQNNPKLNAHAEKVFMTHDSAVQLRAKG	81
C1b1 :	--P-----K-----K--V-----	81
Kidney bean <i>1ba</i> :	---PT---T---SL-GLVR---A---N-	81
Alfalfa <i>1b1</i> :	SAE-DS-Q-Q-----GLVR-----T-	81
Soybean <i>1ba</i> :	---PT---TG---L-ALVR---G--K-S-	81

Fig. 3. Amino acid sequence alignment of Cnod1 (A), Cne3 (B) and C1b2 (C) with respective homologous genes. Identical residues are indicated by dashes.

보여 cysteine proteinase의 하나일 것으로 판단된다. 뿌리혹에서 발견되는 proteinase 종류의 mRNA에 대한 보고는 최근에 목본 식물인 *Alnus glutinosa*에서만(Berry, 1994) 있을 뿐이며 그 밖에는 뿌리혹 노쇠시 활성이 증가하는 French

bean의 thiol protease에 대한 보고(Manen *et al.*, 1991)와 대두의 serine protease에 대한 보고(Pfeiffer *et al.*, 1983)가 있다.

Cne2는 벼에서 밝혀진 EST(Expressed Sequence Tags; EMBL accession number: D23488, D23372, D28201)들과 염기서열이 61-64%의 일치율을 보였으나 어떠한 기능을 가진 단백질을 암호화하는지는 추정할 수가 없었다.

Cne3는 완두에서 수분 스트레스시 발현되는 tonoplast 막 내재 단백질을 암호화하는 *trg31* 유전자와 염기서열이 88%, 추론된 아미노산 서열은 38개중 92%가 일치했으며, 완두, 애기장대 및 토마토의 경우와 비교할 때 약 0.4 kb 정도 결실된 클론임을 알 수 있었다(Fig. 3B). Cne3는 그 밖의 다른 막 내재 단백질들인 애기장대의 생체막 내재 단백질인 PIP1a, 토마토의 과일 성숙 관련 막 내재 단백질인 pTOM75, African claw frog의 lens major 막 내재 단백질인 MIP-26과 높은 유사성을 보여 MIP(major intrinsic protein) gene family(Fray *et al.*, 1994)에 속할 것이라 생각된다. PBM은 tonoplast와 생체막의 중간적인 성질을 가지는 것으로 알려지며(Verma, 1993) Cne3와 유사한 단백질들이 tonoplast 막이나 생체막에 존재하므로 Cne3는 PBM에 내재되어 기능하는 단백질을 암호화할 것으로 추측된다.

C1b2(*Canavalia lineata* leghemoglobin 2)는 C1b1(Kim *et al.*, 1994)과 염기서열의 경우 85%의 일치율을 보이며 추론된 81개의 아미노산 서열은 92%의 유사성을 보였다(Fig. 3C). 염기서열의 차이로 보아 C1b2는 C1b1과는 다른 유전자의 산물이며, 이는 해너콩에서도 *lb* 유전자가 대두나 다른 콩과식물들처럼 유전자군을 이루고 있으며 또한 이전에 단백질 수준에서 Lb는 5

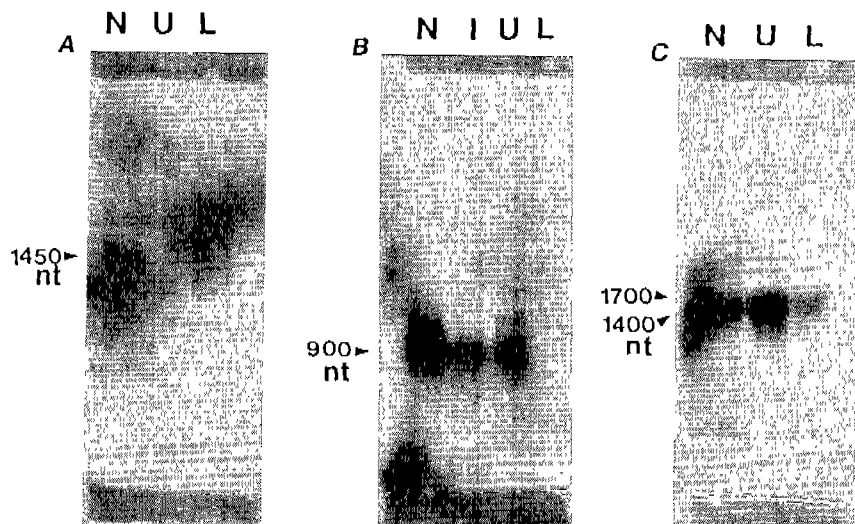


Fig. 4. RNA gel blot analysis of Cnod1 (A), Cne2 (B) and Cne3 (C) with total RNAs from nodules (N), uninfected roots (U), infected roots (I) and leaves (L).

종류의 polypeptides가 존재한다(Choi and An, 1991)는 실험 결과를 일부 증명하는 것이기도 하다.

기관별 발현 양상

Cnod1, Cne2, Cne3 유전자의 기관별 발현 양상을 알아보기 위해 뿌리혹, 뿌리, 잎에 대하여 RNA gel blot 분석을 실시하였다.

Cnod1(*Canavalia lineata* nodule specific 1)은 1450 nt 정도의 mRNA와 혼성화 반응을 보였으며 뿌리혹에서만 발현되고 다른 기관에서는 발현되지 않아(Fig. 4A) 그 유전자 산물은 뿌리혹 특이 단백질인 nodulin이라 볼 수 있다.

Cne2(*Canavalia lineata* nodule enhanced 2)는 900 nt 정도의 mRNA와 혼성화 반응을 보였으며 뿌리혹에서 주로 발현되나 뿌리에서도 약하게 발현되었고 잎에서는 발현되지 않았다. 뿌리에서의 발현은 *Rhizobium*으로 접종시킨 뿌리와 대조구 뿌리 모두에서 비슷하여(Fig. 4B) Cne2는 뿌리 기관에서만 일정하게 발현이 유지되는 유전자의 산물로 보여진다.

Cne3(*Canavalia lineata* nodule enhanced 3)는 양적 차이는 있으나 뿌리혹과 뿌리, 잎 모두에서 발현되었으며, 뿌리와 뿌리혹에서 강하게 잎에서는 약하게 발현되었다. 뿌리에서는 약 1700 nt와 1400 nt가 뿌리혹에서는 1700 nt의 mRNA가 혼성화 반응을 보였다(Fig. 4C). 이러한 2개의 전사체가 존재함은 Cne3가 막 단백질로 서열의 보존성이 높다는 점으로 볼 때 다른 막 단백질의 유전자 산물이 혼성화 반응을 보인 것이라 생각할 수도 있고 또는 동일한 유전자 산물이 posttranscriptional regulation에 의해 다른 크기로 나타나고 각각의 기능을 수행할 수도 있을 것이다(Green, 1993).

뿌리혹 발달 단계에 따른 발현 양상

Cnod1, Cne2, Cne3의 뿌리혹의 발생과 발달에 따른 발현의 양적 차이를 살펴보고 그 기능을 추정하기 위해 RNA gel blot 분석을 실시하였다.

해녀콩 뿌리혹의 발달 단계는 Choi와 An(1991)의 경우 뿌리혹의 크기에 따라 3단계로 나누고 단백질 2-D 분석을 하여 변화를 관찰하였으나, 본 실험에서는 접종 후 8일째 직경 0.2 cm 이하, 13일째 직경 0.3-0.4 cm, 25일째 직경 0.5-0.6 cm 및 한달 이상 방치한 뿌리혹(2 cm 이상의 균상으로 단일 뿌리혹은 0.8 cm 정도)의 4단계로 발달 단계를 설정하였다.

조사한 모든 유전자들이 후기에서 발현이 대폭 증가되는 양상을 보이는 것은(Fig. 5) 사용한 cDNA library가 접종 후 2달이 지난 비교적 오래된 뿌리혹을 재료로 하여 만들어졌다는 사실과도 부합되는 것이다(Kim *et al.*, 1994).

Cnod1은 감염된 후 약 8일째 발현이 시작되며 약 13일째 되는 때부터 발현이 증가되고 후기에서는 발현이 대폭 증가되는데(Fig. 5A), 이는 뿌리혹의 노쇠와 함께 protease들의 활성이 증가한다는 기존의 보고를 유전자 수준에서 증명하는 것이다. 제한적 성장을 하는 해녀콩의 후기 뿌리혹에서 발현이 증폭되는 Cnod1은 French bean에서의 thiol protease처럼 박테로이드 세포벽의 peptidoglycan 또는 다른 단백질을 분해하여 재흡수되도록 하는 단백질을 암호화함을 암시해 준다.

Cne2는 약 8일째부터 발현이 시작되며 13일째 증폭되어 그 이후로 일정한 수준의 발현을 보였다(Fig. 5B). 이러한 발현 양상은 그 유전자 산물이 뿌리혹의 발달에 관여하기 보다는 뿌리혹에서 지속적으로 유지되는 대사와 관련이 있을 것으로 판단된다.

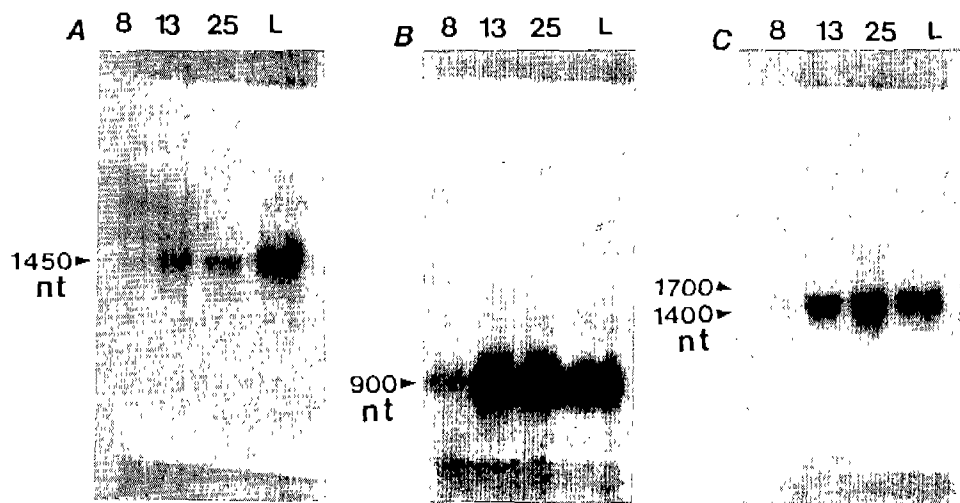


Fig. 5. Expression of Cnod1 (A), Cne2 (B) and Cne3 (C) during nodule development. Lane numerals are days after inoculation and L is more than one month after inoculation.

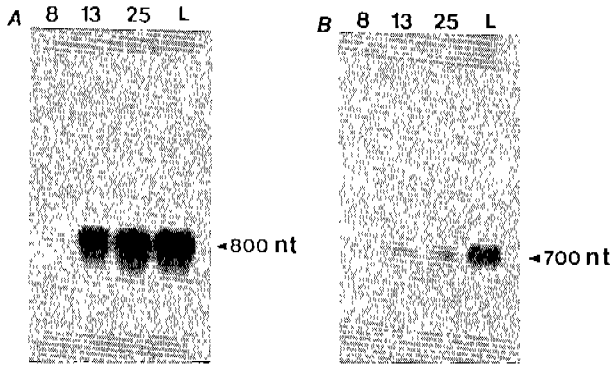


Fig. 6. Expression of Clb2 (A) and Clb1 (B) during nodule development. Lane designations are the same as in Fig. 5.

Cne3는 8일째 아주 약하게 발현이 시작되어 뿌리혹의 발달과 함께 점차 증가하고 25일째 최고조에 이르러 후기에 이르러 약간 줄어드는 패턴을 보였다(Fig. 5C). 이러한 발현 양상은 뿌리혹의 성장 및 노쇠 cycle과 일치하여, 그 산물은 PBM에 존재하면서 뿌리혹의 유지나 질소 고정과 관련이 있는 기능을 수행하거나, 또는 PBM의 단순한 막단백질일 것으로 추측할 수 있다.

해녀콩 *lb* 유전자인 Clb2는 800 nt 정도의 mRNA와 혼성화 반응을 보였으며 8일째 아주 약한 발현을 보이다가 13일째부터 발현이 증폭되어 이후 일정하게 유지되었다(Fig. 6A). Clb1은 700 nt 정도의 mRNA와 혼성화 반응을 보였으며 13일째부터 발현이 시작되며 후기에 가서 증폭이 있으나 전체적으로 Clb2에 비해 소량만이 발현되었다(Fig. 6B). 두 유전자 전사체 크기의 차이는 RNA gel blot 분석시에 Clb2와 Clb1과의 서열 유사성으로 인한 cross-hybridization이 일어나지 않았음을 의미하므로 RNA band 강도를 통해 두 유전자의 발현양의 차이를 추정해 볼 수 있었다. 이전의 단백질 2-D 분석 결과는 (Choi and An, 1991) 8일째에 해당되는 stage I에서 3종류의 Lb 유사 polypeptide가, 13일과 25일째 정도를 포함하는 stage II에서는 5종류의 Lb 유사 polypeptide가 존재하였는데, RNA gel blot 분석 결과로 보아 Clb2는 처음 3종류에 포함되며 Clb1은 stage II에서 새로이 발현이 시작되었던 polypeptide를 암호화하는 유전자일 것으로 여겨진다.

두 개의 *lb* 유전자가 발현의 시기와 양적인 면에서 차이를 보임은 각각이 특징적인 promoter 서열을 가지고 조절되며 그 산물은 alfalfa의 경우처럼 뿌리혹 내의 서로 다른 세포에서 서로 다른 기능을 수행할 것으로 판단된다(DeBilly *et al.*, 1991).

박테로이드에 의한 질소고정과 직접 관련이 있는 *lb* 유전자와 같이 Cnod1, Cne2, Cne3가 모두 뿌리혹의 발달 13일째가 되어서야 발현이 증가함은 이들 유전자의 전사 증폭에 공생관

계의 signal이 요구되거나 다른 후기 nodulin들처럼 대사조절을 받는다는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 교육부의 1992년도 학술연구 조성비 지원에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

- Appelby, C.A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443-478.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1992. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Berry, A.M. 1994. Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant and Soil* **161**: 135-145.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Choi, S.H. and C.S. An. 1991. Changes in nodule-specific proteins during nodule development of *Canavalia lineata*. *Kor. J. Bot.* **34**: 121-127.
- Cullimore, J.V. and M.J. Bennett. 1988. The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. and other legumes. *J. Plant Physiol.* **132**: 387-393.
- DeBilly, F., O.G. Barker, P. Gallusci and G. Truchet. 1991. Leghaemoglobin gene transcription is triggered in a single cell layer in the indeterminate nitrogen fixing root nodule of alfalfa. *Plant J.* **1**: 27-37.
- Delauney, A.J. and D.P.S. Verma. 1990. A soybean gene encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 299-305.
- Dunn, K., R. Dickstein, R. Feinbaum, B.K. Burnett, T.K. Petermann, G. Thoidis, H.M. Goodman and F.M. Ausubel. 1988. Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **1**: 66-74.
- Feinberg, A.P. and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6.
- Fisher, R.F. and S.R. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* **357**: 655-659.
- Fortin, M.G., N.A. Morrison and D.P.S. Verma. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucl. Acids Res.* **15**: 813-824.
- Fray, R.G., A. Wallace, D. Grierson and G.W. Lycett. 1994. Nucleotide sequence and expression of a ripening and water stress-related cDNA from tomato with ho-

- mology to the MIP class of membrane channel proteins. *Plant Mol. Biol.* **24**: 539-543.
- Fuller, F., P.W. Kunster, T. Nguyen and D.P.S. Verma.** 1983. Soybean nodulin genes: analysis of cDNA clones reveals several major tissue-specific sequences in nitrogen-fixing nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 2594-2598.
- Green, P.J.** 1993. Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Physiol.* **102**: 1065-1070.
- Hirel, B., C. Bouet, B. King, D. Layzell, F. Jacobs and D.P.S. Verma.** 1987. Glutamine synthetase genes are regulated by ammonia provided externally or by symbiotic nitrogen fixation. *EMBO J.* **6**: 1167-1171.
- Jorgensen, J.E., J. Stougaard and K.A. Marcker.** 1991. A two-component nodule-specific enhancer in the soybean N23 gene promoter. *Plant Cell* **3**: 85-94.
- Kim, H.B. and C.S. An.** 1993. Nucleotide sequences and expression of cDNA clones encoding uricase II in *Canavalia lineata*. *Kor. J. Bot.* **36**: 415-423.
- Kim, I.S., S.H. Choi and C.S. An.** 1994. Nucleotide sequence of Leghemoglobin cDNA from *Canavalia lineata*. *J. Plant Biol.* **37**: 167-173.
- 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.
- Kouchi, H. and S. Hata.** 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 106-119.
- Manen, J.-F., P. Simon, J.-C. van Slooten, M. Osteras, S. Frutiger and G.J. Hughes.** 1991. A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a proteinase inhibitor. *Plant Cell* **3**: 259-270.
- Mangiarotti, G., S. Chung, C. Zuker and H.F. Lodish.** 1981. Selection and analysis of cloned developmentally-regulated *Dictyostelium discoideum* genes by hybridization-competition. *Nucl. Acids Res.* **9**: 947-963.
- Nagy, F., S.A. Kay and N.-H. Chua.** 1991. Analysis of gene expression in transgenic plants. In *Plant Molecular Biology Manual*. S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort and D.P.S. Verma (eds.). Dordrecht, pp. B4/1-B4/29.
- Pfeiffer, N.E., C.M. Torres and F.W. Wagner.** 1983. Proteolytic activity in soybean root nodules. *Plant Physiol.* **71**: 797-802.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, F., J.E. Padilla, H. Perez and M. Lara.** 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**: 507-528.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- 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.
- Stougaard, J., N.N. Sandal, A. Gron, A. Kuhle and K.A. Marcker.** 1987. 5' analysis of the soybean leghemoglobin *lbc3* gene: regulatory elements required for promoter activity and organ specificity. *EMBO J.* **6**: 3565-3569.
- Suzuki, H. and D.P.S. Verma.** 1991. Soybean nodule-specific uricase (nodulin-35) is expressed and assembled into a functional tetrameric holoenzyme in *Escherichia coli*. *Plant Physiol.* **95**: 384-389.
- Van de Wiel, C., B. Scheres, H. Franssen, M.J. van Lierop, A. van Lammeren, A. van Kammen and T. Bisseling.** 1990. The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. *EMBO J.* **9**: 1-7.
- Verma, D.P.S.** 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* **4**: 373-382.
- Watanabe, H., K. Abe, Y. Emori, H. Hosoyama and S. Arai.** 1991. Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains). *J. Biol. Chem.* **266**: 16897-16902.

(1995. 12. 1 接受)

Characterization of Four cDNA Clones Expressed in Late Root Nodules
of *Canavalia lineata*

Kim, Tae Hoon and Chung Sun An*

Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Four cDNA clones expressed in late root nodules of *Canavalia lineata* were isolated by differential screening using total RNA from uninfected roots, Clb1 and uricase II cDNAs as competitors and named Cnod1, Cne2, Cne3 and Clb2, respectively. Cnod1, hybridized to 1450 nt mRNA, was highly homologous to cysteine proteinase gene from rice and showed nodule-specific expression, especially in late nodules. Cne2, hybridized to 900 nt mRNA, was moderately homologous to Expressed Sequence Tag of rice and expressed mainly in root nodules. Its expression was increased at 13 DAI and subsequently remained at the same level. Cne3, hybridized to 1700 nt and 1400 nt mRNAs, was highly homologous to tonoplast membrane intrinsic protein TRG31 gene from pea and was expressed strongly in roots and nodules, but weakly in leaves. Temporal expression pattern of Cne3 was coincided with the life cycle of root nodules. Clb2, hybridized to 800 nt mRNA, was expressed from 8 DAI, amplified at 13 DAI and remained steady thereafter.

Keywords : *Canavalia lineata*, late root nodules, differential screening, competitor, membrane protein, leghemoglobin

*Corresponding author: Fax +82-2-872-6881