

*Rhizobium meliloti*와 *R. leguminosarum*의 *dctA* 프로모터에서 DctD 및 NtrC가 존재된 *in vitro* 전사활성

최상기* · 이준행¹

순천대학교 생물학과, ¹연세대학교 의과대학 안과

DctD- or NtrC-mediated *in vitro* Transcriptional Activation from *Rhizobium meliloti* and *R. leguminosarum* *dctA* Promoter. Choi, Sang Ki* and Joon Haeng Lee¹. Department of Biological Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ¹Department of Ophthalmology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea – The gene product of *dctD* (DctD) activates transcription from the *dctA* promoter regulatory region by the σ^{54} -holoenzyme form of RNA polymerase ($E\sigma^{54}$) in *Rhizobium meliloti* and *R. leguminosarum*. The *Escherichia coli* integration host factor (IHF) stimulated DctD-mediated activation from the *dctA* promoter regulatory region of *R. leguminosarum* but not *R. meliloti*. In the absence of UAS, IHF inhibited DctD-mediated activation from both of these promoter regulatory regions. IHF also inhibited activation from *R. leguminosarum* *dctA* by nitrogen regulatory protein C (NtrC), another activator of $E\sigma^{54}$ but not by one which lacks a specific binding site in this promoter regulatory region. IHF, however, stimulated NtrC-mediated activation from the *R. meliloti* *dctA* promoter. Upon removal of the UAS, IHF inhibited NtrC-mediated transcription activation from the *R. meliloti* *dctA* promoter regulatory region. These data suggest that IHF likely facilitates productive contacts between the activators NtrC or DctD and $E\sigma^{54}$ to stimulate activation from *dctA* promoter.

Key words: *Rhizobium*, transcription, dicarboxylate transport protein, promoter, σ^{54}

C₄-dicarboxylic acids의 세포내로의 운송은 공생하지 않는 콩과식물에서 발견되는 공생세균과 그렇지 않은 토양 뿌리 세균에서 중요한 역할을 한다[3, 9]. 숙신네이트, 프말레이트와 말레이트는 *Rhizobium leguminosarum*과 *R. meliloti*의 *dctA*에 의해 코딩되는 DctA(C₄-dicarboxylate transport protein A)에 의해 운송된다[2, 9]. *dctA* 프로모터는 σ^{54} 를 σ 인자로 함유한 RNA중합효소($E\sigma^{54}$ 로도 표기됨)에 의해서 인식된다[10]. *dctD* 유전자산물인 DctD(dicarboxylate transport protein D)는 *dctA*에서 전사를 촉진시키며 일단의 σ^{54} 의존성 전사활성자에 속하며 전사개시부위의 전단 약 100 bp에 위치하는 자리에 결합한다[10, 11]. $E\sigma^{54}$ 는 프로모터에 결합하여 닫힌 형태의 인식복합체(closed recognition complex)를 형성한다. 프로모터에 결합된 $E\sigma^{54}$ 는 DNA를 고리모양화(looping)시키면서 전사활성자와 상호 접촉한다[21]. 장내 세균의 *glnA* 프로모터 조절부위에서는 그런 DNA의 고리모양화가 무작위적이고 일시적인 구조적 변화일 것으로 예상되지만, *Klebsiella pneumoniae* *nifH* 프로모터 조절부위에서는 DNA가 integration host factor(IHF)에 의해 안정적으로 일어나는 것 같다[4]. IHF는 그 결합부위에서 DNA를 섬세하게 접하게 유도하는데, 이 부위는 *nifH* 프로모터 조절부위

에서는 NifA 결합자리와 프로모터 사이에 존재한다[6]. IHF 결합자리는 *R. leguminosarum*의 *dctA* 프로모터부위에도 존재한다[11]. 전사활성자와 $E\sigma^{54}$ 의 상호접촉을 통해 DNA의 전사개시자리부위에 부분적으로 변형된 열린 형태의 복합체(open complex)의 형성이 유도된다고 한다[15].

DctD는 3개의 분리된 부위(domain)가 있으며[10], N-말단 부위는 인산화되면 이 인자의 활성이 조절된다. DctB(*dctB*의 유전자 산물: C₄-dicarboxylate transport protein B)는 외부환경에 C₄-dicarboxylic acids가 존재할 때 DctD를 인산화시키는 히스티딘 인산화효소이다. DctB는 스스로 단백질의 C-말단부위 내에 존재하는 특정 히스티딘 잔기를 인산화시킨다. 이렇게 생성된 높은 에너지물질은 DctD N-말단부위 내의 아스파르트산 잔기(Asp55)에 전달되어 DctD에 구조적인 변화를 일으킬 것으로 사료된다[10]. 인산화효소의 DctB 기능은 DctA와의 상호접촉에 의해 조절될 것으로 예상되며[22], 이의 인산화되지 않은 형태에서는 DctD N-말단부위가 전사를 활성화시키는 능력을 명백히 억제된다. DctD의 중간 부위는 전사활성화와 ATP를 가수분해시키는 역할을 한다. 이 부위 내에는 ATP가 결합되는 핵산결합자리(P-loop 혹은 Walker type-A sequence)가 있다[10]. DctD의 C-말단부위는 전사개시자리에서 100 bp 전단에 위치하는 병렬형태의 DctD-결합자리(UAS)를 인식할 뿐만 아니라 결합하는 helix-turn-helix motif이다. 따라서 DctD C-말단부위가 제거하면 *dctA* 프로모터 조절부위의 Upstream Activation

*Corresponding author

Tel: 82-61-750-3619, Fax: 82-61-750-3608

E-mail: sangkic@sunchon.ac.kr

Sequence(UAS)를 더 이상 인식하지 못하게 된다. DctD가 UAS에 결합하면 이중체 DctD의 상호응집이 촉진되는 것으로 보이며 이런 현상이 이 인자의 활성화과정일 것으로 사료된다[16]. 세균에서 발견되는 두 인자에 의한 신호전달시스템에 관여하는 σ^{54} 의존성 전사활성자로서 DctD이외에 nitrogen regulatory protein C(NtrC)가 잘 연구되어있다[1]. 아스파르트산-54 잔기가 인산화되었을 때 NtrC는 σ^{54} 를 함유한 RNA중합효소에 의해 전사활성화 된다. 용액에서 이중체인 NtrC의 인산화는 6 - 10개로 구성된 복합체의 형성이 유도되고 이런 형태가 ATP를 가수분해하여 전사활성화에 필요한 에너지를 공급한다. 전사활성화에 NtrC의 N-말단부위가 필요한데, 전사활성화되기 위해 인산화된 부위가 아마 NtrC의 다른 부위 즉 ATP 가수분해 및 $E\sigma^{54}$ 와 접촉하는 부위와 접촉할 것으로 예상된다. 본 논문에서는 조절 받지 않고 계속적으로 활성화된 변형된 DCTD의 *in vitro* 활성을 검토하기 위하여 전사와 번역이 연결되어 일어나는 시스템(coupled transcription-translation system)을 개발한 것을 보고한다. 이 시스템에서 *dctA* 프로모터조절부위에 DctD가 중재된 전사활성화는 UAS 와 σ^{54} 에 좌우되었다. 게다가, *R. leguminosarum*와 *R. meliloti* *dctA*에서 DctD 및 NtrC에 의해 중재된 전사활성화에 IHF의 영향을 검토함으로써 같은 *Rhizobium*속의 다른 종사이의 전사조절의 차별성을 관찰하였다.

In vitro transcription translation assay를 실행하는데 필요한 구성단백질을 얻기 위하여 Table 1에 기술된 균주와 플라스미드를 이용하여 단백질을 발현시키고 분리정제하였다. Coupled transcription-translation system에서 *R. meliloti* DctD_{L143}에 의한 *dctA* 프로모터 부위에서의 전사활성화를 검토하였을 때 여러 형태의 N-말단부위가 절단된 *R. meliloti* DctD 중 DctD_{L143}이 매우 높은 활성을 보였기 때문에[5], 이 단백질을 이용하여 σ^{54} 의존적인 전사활성의 기작을 좀더 연

구하기 위해 분리 정제하였다. 절단된 형태의 DctD는 *dctD* 내의 특정 코돈을 *lacZ*의 11번째 코돈에 연결시킨 변형된 pUC13에서 제조되었으며 *E. coli* NCM795에서 발현되었다. DctD의 Leu-143이 LacZ단백질에 연결된 DctD_{L143} 단백질을 과 발현하는 플라스미드를 함유한 *E. coli*는 최대유도배지에서 30°C에서 진탕 배양하였다. 배양액이 OD₆₅₀에서 약 0.5에 도달하였을 때 IPTG(isopropyl-D-thiogalacto-pyranoside)를 0.5 mM 농도가 되도록 첨가하였으며 2.5시간 더 배양한 후에 수확하였고 4°C의 완충액 A(20 mM EPPS, pH 8, 5%(w/v) glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 70 mM sodium thiocyanate)로 세척하였다. 세척 후에 균체를 완충액 A에 균질화시킨 후 French pressure cell에서 6000 psi로 분쇄하고 17,000 × g에서 20분간 원심분리시켜 추출액을 얻었다. 이 추출액에서 DctD_{L143} 단백질은 Lee 등이 전에 기술한 방법에 의해 분리 정제하였다[8]. *E. coli* IHF는 K5746 균주에서 전에 기술한 방법에 따라 순수 분리하였으며[13], *S. typhimurium* NtrC와 NtrB는 Dr. T. Hoover(University of Georgia, Athens)로부터 제공받았다. *Salmonella typhimurium* σ^{54} 는 *E. coli* M5219에 함유된 λ P_L 프로모터 하에서 *S. typhimurium* *ntrA*를 운반하는 플라스미드 pJES259 에서 과 발현시켰으며 전에 기술된 방법에 따라 순수 분리하였다[14]. *in vitro* transcription and translation assay를 수행하기 위해 분석 추출액(S30 추출액)을 *E. coli* NCM789 균주에서 전에 기술된 방법에 따라 제조되었다[6]. 이 균주는 σ^{54} , β -galactosidase, IHF와 RNAase III가 결핍되었다. Coupled transcription-translation assay는 전체 50 μ l에서 전에 기술된 방법에 따라 수행하였는데[18], 플라스미드 template는 pRMAZ+UAS, pRLAZ+UAS, pRMAZ-UAS, 혹은 pRLAZ-UAS가 사용되었으며 이들은 *R. leguminosarum* *dctA'*-*lacZ* 혹은 *R. meliloti* *dctA'*-*lacZ* 혼합유전자가 포함됐다(Table 1). 이들 플라스미드는 CsCl 농

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work.

<i>E. coli</i> Strains	Genotype	Source/reference
NCM789	<i>glnF213 lacZ::Tn5 rna19 zbe::Tn10 hip::Cm^r</i>	Hoover <i>et al.</i> (1990)
NCM795	Δ <i>lac hip::Cm^r hsdS gal λDE3:lacI lac UV5-gene 1[T7 RNA polymerase]</i>	Hoover <i>et al.</i> (1990)
K5746	<i>galK ilv his (λcIts857 N7N53 ΔBam ΔHI</i>	Nash <i>et al.</i> (1987)
M5219	M72 <i>lacZ trpA rpsL(λbio252 cI857 ΔH1)</i>	Popbam <i>et al.</i> (1991)
Plasmids	Characteristics	Source/reference
pRMAZ+UAS	pMC1403 bearing ϕ (<i>RmdctA'</i> - <i>lacZ</i>)(Hyb) gene with UAS flanked by <i>PstI</i> and <i>XbaI</i> sites	Ledebur and Nixon (1992)
pRLAZ+UAS	pMC1403 bearing ϕ (<i>RldctA'</i> - <i>lacZ</i>)(Hyb) gene with UAS flanked by <i>PstI</i> and <i>XbaI</i> sites	Sojda <i>et al.</i> (1999)
pRMAZ-UAS	pMC1403 bearing ϕ (<i>RmdctA'</i> - <i>lacZ</i>)(Hyb) gene with <i>PstI</i> and <i>XbaI</i> region bearing UAS removed	Ledebur and Nixon (1992)
pRLAZ-UAS	pMC1403 bearing ϕ (<i>RldctA'</i> - <i>lacZ</i>)(Hyb) gene with <i>PstI</i> and <i>XbaI</i> region bearing UAS removed	Sojda <i>et al.</i> (1999)
pJES259	carrying intact <i>ntrA</i> under control of λ PL and the translational start site form pN53	Popham <i>et al.</i> (1991)
pL24...pP150	pUC13 bearing ϕ (<i>lacZ'</i> - <i>RmdctD</i>)(Hyb) fusion genes, with indicated residue of DctD fused to residue 11 of LacZ	Gu <i>et al.</i> (1992)

도구배 원심분리와 Bio-Gel A 50m(Bio-Rad) column에 통과시켜 순수 분리하였다[7]. 플라스미드는 최종 농도 15 nM, *Salmonella typhimurium* σ^{54} 는 110 nM 그리고 IHF는 25 nM을 첨가하였다. 최종 반응액에는 다음과 같은 구성원을 순서에 따라 첨가하였으며 최종농도는 다음과 같다: 60 mM EPPS(pH 8), 120 mM potassium glutamate(pH 8), 27 mM ammonium acetate, 1 mM dithiothreitol, 전체 아미노산용액(각각 0.4 mM), 11 mM magnesium acetate, 2 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP, 0.5 mM UTP, 20 mM phosphoenolpyruvate, *Escherichia coli* tRNA(0.5 mg/ml), Mr 6000-8000 polyethylene glycol(35 mg/ml), 58 μ M guanosine tetraphosphate, 4.2 mM polyamines, 20 μ g/ml folic acid. DctD 단백질은 부분 정제 혹은 균 추출액상태로 지시된 바에 따라서 첨가되었다. 혼합된 반응액은 30 °C에서 3시간동안 반응시킨 후 β -galactosidase 활성을 o-nitrophenyl- β -D-galactoside(ONPG)를 기질로 사용하여 분당 생성된 ONP의 양(nmoles)을 측정하여 결정하였다[12]. 정제된 단백질을 reporter 플라스미드와 같이 coupled system에 첨가되었으며, β -galactosidase 활성은 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 일어나는 전사 활성수준의 지표로써 측정하였다(Table 2). *dctA'*-*lacZ* reporter 유전자에서의 전사 활성화에는 DctD_{L143}과 σ^{54} 가 필수적이었으며, 효율적인 전사 활성화에는 UAS가 또한 필수적이었다. UAS가 결핍된 *dctA'*-*lacZ* reporter 유전자에서의 전사활성은 UAS를 갖는 reporter 유전자에서보다 10배정도 낮았다(Table 2). UAS가 없어도 DctD가 낮은 활성을 보이는 것은 DctDL₁₄₃이 reporter 플라스미드에 낮은 친화력을 갖는 부위를 인식했거나 전사활성을 위해 E σ^{54} 와 직접 상호 접촉했을 수 있다. DctD는 N-말단조절부위길이가 약 125 아미노산 잔기로 구성되어있으며, 두 구성원에 의한 신호전달(two-component signal transduction) 과정의 반응 조절자와 아미노산서열의 유사성을 보인다[10]. *In vivo* 결과와 일치하여 본 연구에서는 조절부위 즉 N-말단부위가 완전히 상실된 DctD 단백질(DctDL₁₄₃)을 사용한 *in vitro* coupled system에서 *R. leguminosarum*과 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 전사 활성화되었다. 이러한 프로모터 조절부위에서 DctD가 중재된 전사활성화는 σ^{54} 와 *dctA* 프로모터 조절부위에 UAS가 존재하느냐에 좌우된다(Table 2). 본 연구에서 얻어진 결과는 전에 *in vitro*에서 ATP 가수분해되면서 DctDL₁₄₃ 단백질이나 다른 전사활성자가 *R. meliloti* *dctA* promoter의 UAS에 결합하여 전사활성화되는 형태로 전환된다는 결과를 검증할 뿐더러[8, 19], *R. leguminosarum* *dctA* promoter에서도 유사한 전사활성화과정을 예상할 수 있다.

R. leguminosarum *dctA* 프로모터조절부위는 많은 다른 σ^{54} 의존성 프로모터 조절부위와 같이 IHF에 의해 인식된다고 보고되었다[6]. Coupled system을 이용하여 *R. leguminosarum*과 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서

Table 2. Requirement of σ^{54} and UAS for DctD_{L143}-mediated transcriptional activation in the coupled transcription-translation system.

Assay description	β -galactosidase activity (nmoles ONP formed per min)	
	<i>R. meliloti</i> <i>dctA</i>	<i>R. leguminosarum</i> <i>dctA</i>
Complete system ^a	245.6	215.5
- DctDL143	1.7	0.7
- σ^{54}	1.3	0.6
-UAS ^b	22.0	4.6

a) The complete system contained *R. meliloti* DctD_{L143} (2 μ l a partially purified preparation), purified *S. typhimurium* σ^{54} (110 nM final concentration) and ϕ (*dctA'*-*lacZ*) reporter gene borne on either plasmids pRMAZ+UAS and pRLAZ+UAS (~15 nM each)

b) Reporter genes carried on pRMAZ+UAS and pRLAZ+UAS, which lacked the UAS, were used to demonstrate the requirement of these sites for maximal DctD_{L143} activity in the coupled system.

DctD가 중재된 전사활성에 IHF의 역할을 조사하였다. DctD는 IHF가 결핍된 *E. coli*에서 과 발현시켰으며, S-30 추출액은 마찬가지로 같은 *E. coli*에서 제조되었다. 순수 분리된 IHF를 coupled system에 첨가하였을 때 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터조절부위에서 DctD_{L143}에 중재된 전사가 활성화되었다. 대조적으로 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD가 중재된 전사활성은 coupled system에서 IHF에 의해 촉진되지 않았다[20]. 유전학적인 증거에 의하면 *dctB*와 *dctD*는 bacteroid상태에서 *dctA* 발현에 필수적이지 않음을 보여주었는데 이는 다른 활성자가 *dctA* 프로모터에서 전사를 활성화할 수 있음을 나타낸다[17, 22]. 따라서 nitrogen regulatory protein C(NtrC)가 *dctA* 프로모터조절부위에서 전사를 활성화시킬 수 있는지를 연구하였다. Coupled system에서 *S. typhimurium* NtrC는 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD_{L143}에 의해 관찰된 수준과 비교해 NtrC가 중재된 전사활성도가 ~25% 수준으로 효과적으로 활성화시켰다(Table 3). NtrC가 중재된 활성은 UAS를 포함한 부위가 삭제되었을 때 거의 20배정도 감소하였는데, 이는 NtrC가 UAS나 UAS근처의 어느 장소를 인식하는 것을 시사한다. 흥미롭게도 IHF는 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 NtrC에 중재된 전사활성화를 2.5배 촉진시켰지만 이 조절부위에서 DctD에 중재된 전사활성화는 촉진하지 않았다(Table 3). *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터조절부위에서 NtrC에 의해 조절된 전사활성은 coupled system에서 측정된 DctD에 중재된 활성의 2% 이하이었다(Table 3). 이러한 프로모터 조절부위에서 UAS를 포함한 부분의 삭제했을 때 NtrC에 의한 전사활성이 3-4배 감소하였다(Table 3). IHF는 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 NtrC 중재된 전사활성화를 촉진하는 반면 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터 조절부위에서 NtrC 중재된 활성화를 억제하였다(Table 3).

Table 3. Effect of IHF on DctD_{L143}-and NtrC-mediated transcriptional activation from *dctA* promoter regulatory regions that either carry or lack the UAS.

Reporter gene	UAS	β-galactosidase activity (nmoles ONP formed per min)			
		+IHF		-IHF	
		DctDL ₁₄₃	NtrC	DctDL ₁₄₃	NtrC
<i>R. meliloti dctA</i>	+	193.4	55.7	172.1	21.5
<i>R. meliloti dctA</i>	-	15.7	3.4	24.8	12.5
<i>R. leguminosarum dctA</i>	+	250.8	4.8	123.8	12.8
<i>R. leguminosarum dctA</i>	-	9.7	1.3	24.5	8.5

Each reaction contained 2 μl of partially purified preparations of DctD_{L143} or 100 nM *S. typhimurium* NtrC plus 20 nM *S. typhimurium* NtrB. Where indicated, some reaction also contained 25 nM *E. coli* IHF. Reactions contained plasmids that carried a ϕ (*nifA'*-*lacZ*) (Hyb) gene that either had or lacked the UAS. The *dctA* promoter regulatory region in these ϕ (*nifA'*-*lacZ*) (Hyb) genes was from either *R. meliloti* or *R. leguminosarum*. To measure β-galactosidase activity the accumulation of ONP was monitored at 420 nm. The activities were shown as nmoles ONP formed per min for entire 50 μl coupled transcription-translation reaction mix.

IHF는 UAS가 결합된 *R. leguminosarum*과 *R. meliloti* *dctA* 프로모터조절부위에서 NtrC와 DctD에 중재된 전사활성화를 억제하였다.

본 실험에서 전에 Sojda 등이 전에 보고한 결과를 일부 관찰할 수 있었다[20]. IHF는 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD_{L143}이 중재된 전사를 약 2배 촉진시켰지만 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD_{L143}이 중재된 전사에는 거의 효과가 없었다(Table 3)[20]. IHF 결합자리는 가끔 σ^{54} 의존성유전자의 프로모터 조절부위에서 발견된다. IHF는 프로모터와 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터조절부위의 UAS사이에 있는 자리를 인식한다(Table 1)[11]. IHF는 NifA-결합자리와 *K. pneumoniae* *nifH*의 프로모터사이의 자리에 결합하여 이 프로모터 조절부위에서 NifA가 중재된 전사활성화를 coupled system에서 약 20배정도 촉진시켰다[6]. *K. pneumoniae* *nifH* 프로모터는 E σ^{54} 에 대해 약한 결합자리이며, 적절한 활성자인 NifA에 의해 전사활성의 정확도를 증가시킨다. IHF는 NifA와 E σ^{54} 사이의 접촉을 원활하게 하기 위하여 DNA를 구부리게 함으로써 E σ^{54} 의 *nifH* 프로모터에 대한 낮은 친화력을 보상하여 NifA에 중재된 활성을 촉진할 것으로 사료된다. 본 연구자는 IHF는 마찬가지로 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD_{L143}과 E σ^{54} 사이의 접촉을 원활히 함으로써 DctD_{L143}이 중재된 활성화를 촉진할 것이라 주장한다. UAS가 없을 경우 IHF는 *R. leguminosarum*과 *R. meliloti* *dctA* 프로모터조절부위에서 DctD_{L143}이나 NtrC가 중재된 전사활성화를 억제하였다(Table 3). 이런 결과는 IHF 결합자리가 *dctA* 프로모터에 근접해서 IHF가 E σ^{54} 의 프로모터 결합을 방해할 가능

성을 제시한다. 또 다른 가능성으로 IHF가 유도한 DNA의 구부러짐은 활성자가 프로모터에 결합된 E σ^{54} 에 접근하는 것을 방해할지 모른다.

IHF는 *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 DctD_{L143}이 중재된 전사활성화를 촉진하지 못하지만 놀랍게도 이 프로모터 조절부위에서 NtrC가 중재된 활성이 2.5배만큼 촉진되었다(Table 3). *R. meliloti* *dctA* 프로모터조절부위에서 NtrC가 중재된 활성화의 수준은 DctD_{L143}에 중재된 활성의 ~25% 이상이었고 UAS의 제거는 이러한 프로모터 조절부위에서 NtrC가 전사 활성화시키는 능력이 급격히 감소되었다. 이러한 결과는 *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터 조절부위에서 NtrC가 중재된 활성이 IHF에 의해 억제되었고 DctD_{L143}이 중재된 활성보다 훨씬 낮은(약 2%) 현상과 대조를 이룬다. 이러한 결과가 시사하는 것은 *R. meliloti* *dctA* 프로모터조절부위의 UAS 근처 혹은 내부에 특이적인 NtrC 결합자리가 있음을 암시한다. NtrC가 중재된 활성이 DctD_{L143}이 중재된 활성보다 낮다면 NtrC는 아마 이 자리에 낮은 친화력을 갖을지 모른다. *R. meliloti* *dctA* 프로모터 조절부위에서 IHF에 의한 NtrC가 중재된 활성이 촉진됨이 제시하는 것은, IHF가 활성자에 대해 낮은 친화력을 갖는 결합자리를 보상할 수 있거나, E σ^{54} 에 대해 낮은 친화력을 갖는 프로모터를 보상할 수 있기 때문일 것이다. 결론적으로 이상의 결과에서, *R. leguminosarum* *dctA* 프로모터에서 IHF에 의한 전사활성에 σ^{54} 의존성 전사조절자인 NtrC와 DctD가 상호 견제하는 관계에 있는 반면, *R. meliloti*의 경우에는 두 전사조절자가 상호보완관계에 있음을 보여주는 것이다.

REFERENCES

- Arcondeguy, T., R. Jack, and M. Merrick. 2001. P_{II} signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 80-105.
- Engelke, T., D. Jording, D. Kapp, and A. Puhler. 1989. Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* *dctA* gene encoding the C₄-dicarboxylate carrier. *J. Bacteriol.* **171**: 5551-5560.
- Finan, T. M., J. M. Wood, and D. C. Jordan. 1983. Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **154**: 1403-1413.
- Friedman, D. I. 1988. Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**: 545-554.
- Gu, B., J. H. Lee, T. R. Hoover, and B. T. Nixon. 1994. *Rhizobium meliloti* DctD, a 54-dependent transcriptional activator, may be negatively controlled by a subdomain in the C-terminal end of its two-component receiver module. *Mol. Microbiol.* **13**: 51-66.
- Hoover, T. R., E. Santero, S. Porter, and S. Kustu. 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* **63**: 11-22.

7. Huala, E., J. Stigter, and F. M. Ausubel. 1992. The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. *J. Bacteriol.* **174**: 1428-1431.
8. Lee, J. H., D. Scholl, B. T. Nixon, and T. R. Hoover. 1994. Constitutive ATP hydrolysis and transcription activation by a stable, truncated form of *Rhizobium meliloti* DCTD, a sigma 54-dependent transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* **269**: 20401-20409.
9. Jiang, J., B. H. Gu, L. M. Albright, and B. T. Nixon. 1989. Conservation between coding and regulatory elements of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* *dct* genes. *J. Bacteriol.* **171**: 5244-5253.
10. Kustu, S., E. Santero, J. Keener, D. Popham, and D. Weiss. 1989. Expression of sigma 54 (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. *Microbiol. Rev.* **53**: 367-376.
11. Ledebur, H. and B. T. Nixon. 1992. Tandem DctD-binding sites of the *Rhizobium meliloti* *dctA* upstream activating sequence are essential for optimal function despite a 50- to 100-fold difference in affinity for DctD. *Mol. Microbiol.* **6**: 3479-3492.
12. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Nash, H. A. and C. A. Robertson. 1981. Purification and properties of the *Escherichia coli* protein factor required for lambda integrative recombination. *J. Biol. Chem.* **256**: 9246-9253.
14. Popham, D., J. Keener, and S. Kustu. 1991. Purification of the alternative factor, 54, from *Salmonella typhimurium* and characterization of 54-holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **266**: 19510-19518.
15. Popham, D. L., D. Szeto, J. Keener, and S. Kustu. 1989. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. *Science* **243**: 629-635.
16. Porter, S. C., A. K. North, A. B. Wedel, and S. Kustu. 1993. Oligomerization of NTRC at the *glnA* enhancer is required for transcriptional activation. *Genes Dev.* **7**: 2258-73.
17. Ronson, C. W., P. M. Astwood, and J. A. Downie. 1984. Molecular cloning and genetic organization of C₄-dicarboxylate transport genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **160**: 903-909.
18. Santero, E., T. Hoover, J. Keener, and S. Kustu. 1989. *In vitro* activity of the nitrogen fixation regulatory protein NIFA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7346-7350.
19. Scholl, D. and B. T. Nixon. 1996. Cooperative binding of DctD to the *dctA* upstream activation sequence of *Rhizobium meliloti* is enhanced in a constitutively active truncated mutant. *J. Biol. Chem.* **271**: 26435-26442.
20. Sojda, J. 3rd, B. Gu, J. Lee, T. R. Hoover, and B. T. Nixon. 1999. A rhizobial homolog of IHF stimulates transcription of *dctA* in *Rhizobium leguminosarum* but not in *Sinorhizobium meliloti*. *Gene* **238**: 489-500.
21. Wedel, A., D. S. Weiss, D. Popham, P. Droge, and S. Kustu. 1990. A bacterial enhancer functions to tether a transcriptional activator near a promoter. *Science* **248**: 486-490.
22. Yarosh, O. K., T. C. Charles, and T. M. Finan. 1989. Analysis of C₄-dicarboxylate transport genes in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **3**: 813-823.

(Received Feb. 23, 2004/Accepted June 2, 2004)