

Ochrobactrum anthropi JW-2 유래의 Paraquat 내성유전자 *PqrA*의 주변 유전자군 분석

배은경¹ · 이호신¹ · 원성혜² · 이병현^{2*}

경북대학교 동물공학과, ¹국립산림과학원 생물공학과, ²경상대학교 동물자원과학부

Cloning and Characterization of the Paraquat Resistance-Related Genes from *Ochrobactrum anthropi* JW-2. Bae, Eun-Kyung¹, Hyo-Shin Lee¹, Sung-Hye Won², and Byung-Hyun Lee^{2*}. Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ¹Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea, ²Division of Animal Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea – A 4,971 bp chromosomal DNA fragment containing the *pqrA*, paraquat resistance gene, was cloned from *Ochrobactrum anthropi* JW-2, and the complete nucleotide sequence was determined. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the fragment revealed the presence of 4 complete ORFs (*orf2*, *pqrA*, *orf3*, *orf4*) and two incomplete ORFs (*orf1*, *orf5*). *orf1*, *pqrA*, *orf4* and *orf5* exists at the direct strand but *orf2* and *orf3* exists at the reverse complementary strand. *orf1* which of incomplete sequences without start codon shares homology with ATP binding region of the response regulator receiver. *orf2* shares high homology with members of the tetR family of transcriptional repressor which have a helix-turn-helix (H-T-H) motif. Therefore, the *orf2* is predicted as a transcriptional repressor of *pqrA* and is designated as *pqrR2*. *orf3* shares high homology with the members of the lysR family acting as a transcriptional activator which have both of a H-T-H motif at the N-terminal region and substrate binding domain at the C-terminal region. Therefore, the *orf3* is predicted as a transcriptional activator of *pqrA* and is designated as *pqrR1*. *orf4* shows homology with the periplasmic substrate-binding protein of amino acid ABC transporter. *orf5* which of incomplete sequences without stop codon revealed the homology with the permeases protein of amino acid ABC transporter.

Key words: Paraquat, paraquat resistance-related genes, *Ochrobactrum anthropi* JW-2

Paraquat(1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylum)은 비선택성, 접촉형 경엽처리 제초제이다. Paraquat은 식물세포 내에 흡수된 다음 엽록체의 광계 I에서 전자를 탈취하여 환원되어 monocationic paraquat radical이 된다. 그러나 이 radical은 매우 불안정하여 바로 전자를 산소에 주어 superoxide radical(O₂⁻)을 발생시킨다. 이때 과다하게 생성된 O₂⁻이 엽록체의 막단백질과 지질 및 핵산 등에 손상을 일으킬 뿐 아니라 세포막을 파괴하여 식물체는 수분을 손실하고 고사된다 [11]. 우리나라에는 1970년에 도입되어 과수원과 비농경지의 개간 전 잡초 방제와 농경지의 작물 파종이나 이식 전에 이미 발생된 잡초 제거를 위하여 광범위하게 사용되어 왔다.

제초제가 잡초제거에 의한 작물의 생산성 향상을 위하여 주로 사용되는 점을 고려할 때, 잡초만을 선택적으로 제거할 수 있도록 작물에 제초제 저항성 유전자를 도입하는 것은 매우 중요하다. 제초제 저항성 유전자에 관한 연구는 주로 paraquat과 glyphosate 등을 대상으로 식물과 미생물에서

광범위하게 이루어져 왔다[1-3, 7, 14, 24]. 작물의 제초제 저항성 획득에 이용할 수 있는 작용기작으로는 세포막의 변형을 통하여 제초제의 침투를 제한하는 방법, 세포 내로 흡수된 제초제를 액포 등에 격리하는 방법, 제초제에 의해 생성된 활성산소를 제거하는 방어효소의 활성을 증대시키는 방법 그리고 제초제 자체를 불활성화시키는 효소의 유전자를 도입하는 방법 등이 있다[5, 10, 17, 25]. 실제로 미국의 몬산토사는 비선택성 제초제인 glyphosate에 저항성을 부여하는 효소인 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 유전자와 glyphosate를 산화시켜 불활성화시키는 glyphosate oxidase 유전자를 분리한 다음 이를 콩, 키놀라, 목화 및 옥수수 등의 주요 작물에 형질전환함으로써 glyphosate의 선택성 제초제 효과를 얻었으며[1, 3] 이들 형질전환 작물들은 전 세계에서 대규모로 재배되고 있다.

Ochrobactrum anthropi JW-2는 paraquat을 수년간 살포한 경상북도 군위군 일대의 과수원 토양에서 분리되었으며 paraquat에 대한 내성이 확인되었다[22]. Paraquat 내성 유전자 *pqrA*는 *O. anthropi* JW-2의 2.5 kb의 chromosomal DNA 단편(pBpq2.5)으로부터 분리되었으며 multi-drug resistance efflux transporter와 높은 상동성을 나타내었다

*Corresponding author

Tel: 82-55-751-5418, Fax: 82-55-751-5410

E-mail: hyun@gsnu.ac.kr

[23]. *PqrA* 유전자가 도입된 담배는 10 μ M paraquat 처리 시 형질전환하지 않은 담배보다 내성이 5배 이상 증가하는 것으로 나타났다[5]. 그러나 실제 포장에서 사용되는 paraquat의 농도가 2.38 mM 수준임을 감안하면 paraquat에 대한 형질전환 식물체의 저항성을 더 강화할 필요성이 대두되었다.

PqrA 유전자를 포함하고 있는 *O. anthropi* JW-2의 2.5 kb chromosomal DNA 단편에서 *pqrA* 유전자의 5'-상위와 3'-하위에 각각 하나의 불완전한 open reading frame(ORF)이 존재하는 것으로 나타났으며 이들은 각각 transcriptional repressor 및 activator 단백질과 높은 상동성을 나타내었다[23]. 따라서 *pqrA* 유전자의 발현조절 기작을 이해하고, 이의 조절을 통하여 형질전환 식물의 paraquat 저항성을 높이기 위하여 *pqrA*를 포함하는 2.5 kb 단편의 DNA 염기서열에 근거하여 primer를 제작한 다음 미지영역에 대한 PCR 클로닝 방법으로 *pqrA* 유전자를 포함하는 4.97 kb 크기의 DNA 단편을 클로닝하였다. *PqrA* 유전자의 주변에 존재하는 유전자 5개의 정보 분석결과를 본 논문에서 설명하였다.

재료 및 방법

사용균주, 벡터 및 배양

O. anthropi JW-2는 chromosomal DNA 분리에 사용하였다. 클로닝을 위한 숙주균과 벡터로 *E. coli* JM109와 pGEM-T easy vector(Promega, USA)를 사용하였다. *O. anthropi* JW-2와 *E. coli*는 LB 배지에서 30°C와 37°C로 각각 배양하였다. 재조합 벡터의 선발을 위하여 LB 배지에 ampicillin을 최종농도 50 μ g/ml로 첨가하였다.

DNA 분리 및 조작

O. anthropi JW-2로부터 chromosomal DNA 분리는 Won 등의 방법[23]에 따라 실시하였다. DNA의 조작은 Sambrook 등의 방법[12]을 이용하였고, DNA의 제한 효소 처리 및 ligation 등은 제조회사의 지침에 따랐다. *E. coli* JM109의 형질전환은 Hanahan의 방법[4]에 따라 실시하였다. 플라스미드 DNA의 분리에는 Wizard miniprep kit (Promega)를 사용하였다.

PqrA 주변 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

Paraquat 내성 유전자 *pqrA*의 주변 유전자를 클로닝하기 위하여 LA PCR in vitro cloning kit(Takara, Japan)를 사용하였다. PCR 증폭을 위한 primer(Table 1)는 기존에 보고된 2.5 kb DNA 단편의 염기서열에 근거하여 제작하였다. 5 μ g의 chromosomal DNA를 제한효소 *Hind*III 또는 *Sal*I으로 완전히 절단한 다음, phe/chl/iso 추출하고 ethanol 침전하여 10 μ l의 멸균수에 녹였다. 5 μ l의 DNA 용액에 2.5 μ l의 *Hind*III 또는 *Sal*I cassette, 15 μ l의 ligation solution I 및 7.5 μ l의 ligation solution II를 첨가한 다음, 16°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액을 ethanol 침전하여 5 μ l의 멸균수에 용해하였다. 1 μ l를 취하여 멸균수 33.5 μ l를 첨가하고 94°C에서 10분간 가열하였다. 5 μ l의 10 \times LA PCR buffer II, 0.5 μ l의 LA *Taq* polymerase, 8 μ l의 dNTP, 1 μ l의 cassette primer(C1)와 specific primer(S1)를 첨가한 다음, 1차 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 증폭은 94°C에서 30 초, 55°C에서 2분 그리고 72°C에서 1분으로 하여 30 cycle을 실시하였다. 1 μ l의 1차 PCR 반응액을 cassette primer(C2)와 specific primer(S2)가 첨가된 PCR 반응액에 혼합하여 2차 PCR 증폭을 수행하였다. PCR 증폭 조건은 1차 PCR 증폭과 동일하게 실시하였다. PCR 증폭산물을 1.0% agarose gel에 전기영동한 다음 gel로부터 elution하여 pGEM-T easy vector에 클로닝하였다. DNA 염기서열은 ALFexpress AutoRead sequencing kit와 ALFexpress DNA sequencing system (Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하여 dideoxy chain termination 방법[13]으로 결정하였다. 염기서열과 아미노산 서열의 분석은 Genetyx software(SDC Software Development, Japan)와 FGENESB(Softberry, USA)를 사용하여 수행하였다. 상동성 검색은 National Center for Biotechnology Information Server를 통해 BLAST program으로 수행하였고 multiple sequence alignment는 ClustalW program을 사용하였다.

Southern blot 분석

5 μ g의 chromosomal DNA를 제한효소 *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III 및 *Sal*I으로 완전히 분해한 다음, 0.8% agarose gel에 전기영동하고 capillary transfer 방법을 이용하여 nylon

Table 1. List of primers used in this study.

PCR primers	Sequences
Cassette C1	5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3'
Cassette C2	5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATCGGGAGA-3'
P2-S1	5'-GCTCTATCATCATTTTCGGTGACAAGGAAGGG-3'
P2-S2	5'-TGGCAGGGGTTTGTGCAAGAGAATAC-3'
P3-S1	5'-CTTCTCTCGAACCAGTCGAG-3'
P3-S2	5'-CATTGATTGTCAGCGTCGCT-3'
P4-S1	5'-GCAATCACCACAAAAGTCCG-3'
P4-S2	5'-ACAAGAGGAAGTCGGGAACA-3'

membrane으로 옮겼다. 방사능 동위원소로 표지된 probe를 첨가하여 hybridization을 실시하고 X-ray film에 노출시킨 후 현상하였다.

결과 및 고찰

PqrA 주변 유전자의 클로닝

Paraquat 내성 유전자 *pqrA*를 포함하고 있는 2.5 kb DNA 단편에서 *pqrA* 유전자의 5'-상위와 3'-하위에 각각 하나의 불완전한 ORF가 존재하는 것으로 나타났으며 이들은 각각 transcriptional repressor 및 activator 단백질과 높은 상동성을 나타내었다[23]. 본 실험에서는 전사조절 유전자들과 상동성을 나타내는 이들 ORF들의 완전한 DNA 염기서열을 결정하고 그 특성을 밝힘으로서 *pqrA* 유전자의 발현조절 기작을 이해하고자 하였다. 제한효소 *Sall*으로 분해한 *O. anthropi* JW-2의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭을 실시한 결과 *pqrA*의 5'-상위영역을 포함하는 0.8 kb의 PCR 증폭산물을 얻었다. 그리고 제한효소 *HindIII*로 절단한 chromosomal DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭을 실시한 결과 *pqrA*의 3'-하위영역을 포함하는 0.6 및 1.5 kb의 PCR 증폭산물을 얻었다(Fig. 1A).

PCR 증폭산물의 DNA 염기서열을 결정하여 분석한 결과 pBpq2.5의 DNA 염기서열을 포함하는 총 길이 4,971 base pairs(bp)의 chromosomal DNA 단편의 염기서열을 확보하였

다. 결정된 염기서열을 FGENSEB의 bacterial data와 비교하여 ORF의 존재를 확인하였다. 그 결과 총 6개의 ORF를 확인하였으며 *orf1*, *pqrA*, *orf4*, *orf5*는 direct strand에 *orf2*와 *orf3*는 reverse complementary strand에 존재하였다(Fig. 1B). 4.97 kb DNA 단편의 염기서열은 GenBank(accession no. DQ412047)에 등록하였고, Table 2에 유전자의 위치와 특성을 정리하였다.

PqrA 주변 유전자의 분석

*PqrA*의 5'-상위에 해당하는 998 bp 영역에 한 개의 불완전한 ORF(*orf1*)와 한 개의 완전한 ORF(*orf2*)가 존재하는 것으로 나타났다. *Orf1*은 *pqrA*의 coding 방향과 동일한 방향으로 존재하였다. *Orf1*은 개시코돈 영역이 포함되지 않은 불완전한 ORF로서 273번째 nucleotide(nt)에 종결 codon (TGA)이 존재하며, 이로부터 91개의 아미노산으로 구성된 부분적인 서열만이 밝혀졌다. 상동성 검색 결과 ORF1 단백질은 *Polaromonas naphthalenviorans* CJ2의 response regulator receiver의 ATP binding region(ZP_01023108)과 47%의 상동성을 나타내었다.

*Orf2*는 *pqrA*의 coding 방향과 반대 방향으로 존재하며, 876번째 nt에서 개시코돈이 시작하여 280번째 nt에서 종결되며, 198개의 아미노산으로 구성되는 예상 분자량 22 kDa, 등전점(pI) 5.8인 단백질을 암호화하는 것으로 나타났다. 상동성 검색 결과 ORF2 단백질은 조절단백질들과 높은 상동

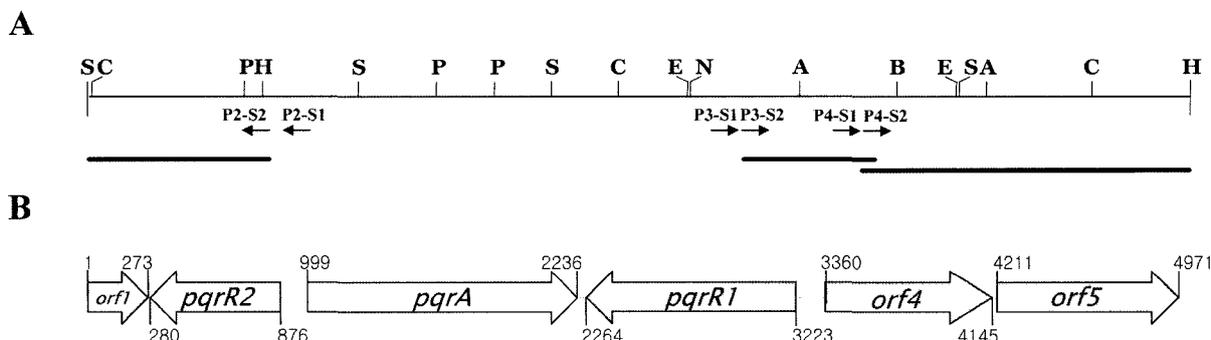


Fig. 1. Structure of the 4.97 kb DNA fragment containing the paraquat resistance-related genes. (A) Restriction map of the 4.97 kb fragment. The arrow indicates PCR primer used in this study. The solid bar indicates PCR amplified DNA fragment. Restriction site abbreviations are: A, *Ava*I; B, *Bam*HI; C, *Cl*aI; E, *Eco*RI; N, *Nco*I; H, *Hind*III; P, *Pst*I; S, *Sal*I. (B) Open reading frames (ORFs) are shown as arrows. The numbers indicate the nucleotide positions on the 4.97 kb chromosomal DNA fragment.

Table 2. Relevant features of the clone containing *pqrA* deduced from DNA sequence.

ORF	*Start/Stop	Residues/MW	Predicted functions
<i>orf1</i>	/TGA ²⁷³	91/10	Response regulator receiver
<i>orf2</i>	280AGT/GTA ⁸⁷⁶	198/21.6	Transcription regulator-TetR family
<i>pqrA</i>	999ATG/TAG ²²³⁶	410/43	Multi-drug resistance efflux transporter
<i>orf3</i>	2264AGT/GTA ³²²³	319/35.6	Transcription regulator-LysR family
<i>orf4</i>	3360ATG/TAA ⁴¹⁴⁵	261/28.3	Bacterial periplasmic substrate-binding protein
<i>orf5</i>	4211ATG/	253/27.2	Amino acid ABC transporter, permease protein

*Numbers indicate the first and last nucleotide of the start and stop codons, respectively.

ORF5	MDFALMQRVLPFFLEAAWVTVQ SALAL LGLAVAA LVAGRLSRSP LRGLAAAYVSF	60
AAY91632	MDLTL QRTPFFLEAAWVTVHVSLLLALLLGLLVA VLVAARLSGFFLLRCLARVY SVF	60
ZP_01056969	MDYALMQRVFPFFLEAAWI T LLSVLTA LGL CAMLGTAAARLSRFRVLRFLGAAAYVSF	60
	** :*:**.:*****:*. : * * : ** * * : .*.*** :** * . :*.***	
ORF5	RGTPCLVQLF LYFGGPQ G NLEPFAAGV GLGLN GAYMSES IRGA QSVDRGQSEAA	120
AAY91632	RGTPCLVQLFLLYFGGPQ GLELEPFSAGV GLGLN AAYMAES IRGA SNVDPGQVEAA	120
ZP_01056969	RGTPAL QLF LYFGGPQ G QLDAFEAGV GLGVNVGAYMTETMRGA SVDKGQGEAA	120
	****. *:***:*****:*. : * * *****:*. :***:*. :***** .** ** **	
	<u>EAA loop</u>	
ORF5	RS GFGRGQTMRFVVLQQAARLM RPLGVNA ALLKGSALVST SVVELTYTAQRF GST	180
AAY91632	RS GFGRGQTLWL TLPQTAKLM RPLGVNAVAL KGSALVST SVVELSYTAQRF SST	180
ZP_01056969	RTLGMKQWQAMRNV LPQAMRLM RPLGVNLNTL KSTALVAA SVVELTYTAQRY GST	180
	:. :. : * : : ***** :* :*. :***:*****:*****:*. **	
ORF5	YKPF FGVAAVLYMI Y VARGVDLLDKASRRSEGLDASSRFQHRHSLYGSASDRPL	240
AAY91632	YKPF FMVSA LY I AMVYTVRLLVDHLDK-----RFAAK-----	215
ZP_01056969	YKPFEMFL AGLLYMI YVVGAVTWADR-----KARLN-----	215
	***** * :. :*: : * * * * * : : : : : : : : : : : : : : .	
ORF5	VDAGSDRRLR LK	253
AAY91632	-----	
ZP_01056969	-----	
	. : . : .	

Fig. 5. Alignment of the deduced amino acid sequences of ORF5 with permease proteins. AAY91632 and ZP_01056969 are permease protein of amino acid ABC transporter from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (AAY91632) and *Roseobacter* sp. MED193 (ZP_01056969), respectively. EAA loop is marked in upline.

*orf5*는 4,211번째 nt에서 시작하여 종결코돈을 포함하지 않는 762 nt 길이로서, 253개의 아미노산으로 구성된 부분적인 단백질 서열을 암호화하는 것으로 나타났다. 상동성 검색 결과 ORF5 단백질은 amino acid ABC transporter의 permease protein과 높은 상동성을 나타내었다. Conserved domain 분석에서도 permease protein인 HisM, ArtM 및 ArtQ에 존재하는 공통서열인 cytoplasmic loop(EAA loop)가 ORF5의 119~140 잔기에 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 5). Kerppola 등[6]은 이 motif가 C-terminal로부터 100 아미노산 정도 떨어진 위치에 존재한다고 보고하였다. 또한 HisM, ArtM 및 ArtQ 단백질의 크기가 대부분 250개에서 274개 정도의 아미노산으로 구성되어 있는 점으로 미루어[6, 19] 본 실험에서 분리한 ORF5의 단편은 3'의 일부 서열만이 결손된 것으로 추정되었다.

O. anthropi JW-2의 chromosomal DNA 내에 존재하는 *orf3(pqrR1)*과 *orf4* 유전자의 copy 수를 확인하기 위하여 Southern blot 분석을 실시하였다. *O. anthropi* JW-2의 chromosomal DNA를 제한효소로 절단한 다음 *orf3* 유전자의 0.6 kb 단편과 *orf4*의 0.6 kb 단편을 각각 probe로 사용하여 hybridization하였다(Fig. 6). 그 결과, *orf3*은 제한효소 *EcoRI*, *Sall* 및 *HindIII*로 절단한 chromosomal DNA에서 각각 2.7 kb, 10 kb 및 4.2 kb 크기에서 하나씩의 positive signal을 나타내었다. 그리고 *orf4*는 제한효소 *HindIII*, *EcoRI*

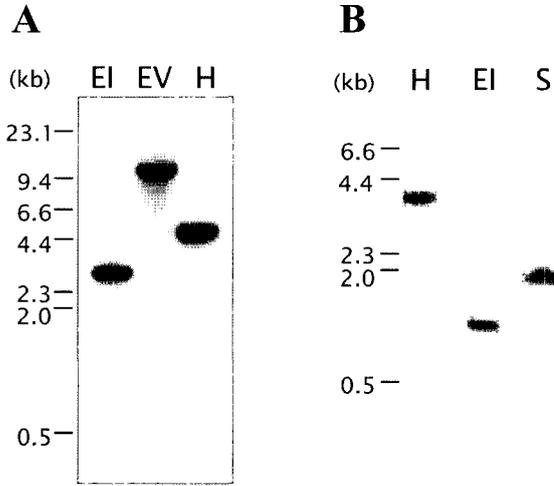


Fig. 6. Southern blot analysis of *orf3* (A) and *orf4* (B) in *O. anthropi* JW-2 chromosomal DNA. Chromosomal DNA (5 µg) was digested with *EcoRI* (EI), *EcoRV* (EV), *HindIII* (H) or *Sall* (S). Numbers on the left are the length in kb of DNA size marker.

및 *Sall*으로 절단한 chromosomal DNA에서 4.2 kb, 1.2 kb 및 1.8 kb의 크기에서 하나씩의 positive signal을 나타내었다. 따라서 *orf3*과 *orf4* 유전자는 *O. anthropi* JW-2의 genome 상에서 각각 single copy로 존재하는 것으로 판단되었다.

이상, *O. anthropi* JW-2에서 분리된 paraquat 내성 유전자인 *pqrA*를 포함하는 4,971 bp의 단편을 클로닝하여 *pqrA* 유전자 주위에 존재하는 5개의 ORF의 기능을 추론하여 보았다. Regulator 단백질로 추정된 *pqrR1*과 *pqrR2* 및 다른 ORF들이 실제로 *pqrA*의 발현조절에 관여하는지를 확인하기 위하여 DNA finger-printing과 형질전환 연구가 수행 중에 있다.

요 약

Ochrobactrum anthropi JW-2의 염색체 DNA로부터 paraquat 내성 유전자 *pqrA*를 포함하는 4,971 bp의 DNA 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석 결과 2개의 불완전한 ORF(*orf1*, *orf5*)와 4개의 완전한 ORF(*orf2*, *pqrA*, *orf3*, *orf4*)가 존재하는 것으로 나타났는데 *orf1*, *pqrA*, *orf4*, *orf5*는 direct strand에 *orf2*와 *orf3*는 reverse complementary strand에 존재하였다. *Orf1*은 개시코돈이 결손된 불완전한 서열로서, response regulator receiver의 ATP binding region과 상동성을 나타내었다. *Orf2*는 tetR family에 속하는 transcription repressor와 높은 상동성을 나타내었고 H-T-H motif가 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 *orf2*가 *pqrA* 유전자의 전사조절에 관여하는 repressor로 추정되어 *pqrR2*로 명명하였다. *Orf3*은 lysR type의 transcription activator와 높은 상동성을 나타내었고 N-terminal 부위에 H-T-H motif와 C-terminal 부위에 substrate binding domain이 존재하는 것으로 나타났다. 따라서 *orf3*은 *pqrA*의 전사조절에 관여하는 transcription activator로 추정되어 *pqrR1*로 명명하였다. *Orf4*는 amino acid ABC transporter의 periplasmic amino acid-binding protein과 상동성을 나타내었으며, *orf5*는 종결 코돈이 없는 불완전한 ORF로서 amino acid ABC transporter의 permease protein과 상동성을 나타내었다. 이와 같은 결과로 미루어 *pqrA* 유전자 주위에 존재하는 전사조절 유전자들이 paraquat 내성유전자인 *pqrA*의 발현조절을 통하여 paraquat에 대한 내성획득에 관여하는 것으로 판단되었다.

REFERENCES

- Barry, G. F., M. L. Taylor, S. R. Padgett, K. H. Kolacz, L. E. Hallas, G. Della-Cioppa, and G. M. Kishore. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glyphosate-to-aminomethyl phosphonic acid degrading activity from *Achromobacter* sp. strain LBAA. *Monsanto Technical Report* MSLB 13245, St. Louis.
- Cho, Y. H., E. J. Kim, H. J. Chung, J. H. Choi, K. F. Chater, B. E. Ahn, J. H. Shin, and J. H. Roe. 2003. The *pqrAB* operon is responsible for paraquat resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **185**: 6756-6763.
- Comai L., D. Facciotti, W. R. Hiatt, G. Thompson, R. E. Rosi, and D. M. Stalker. 1985. Expression in plants of mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**: 741-744.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Jo, J. K., S. H. Won, D. Y. Son, and B. H. Lee. 2004. Paraquat resistance of transgenic tobacco plants overexpressing the *Ochrobactrum anthropi pqrA* gene. *Biotechnol. Lett.* **26**: 1391-1396.
- Kerppola, R. E. and G. Ferro-Luzzi Ames. 1992. Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine preplasmic permease. *J. Biol. Chem.* **267**: 2329-2336.
- Kim, S. E., S. Y. Kim, S. H. Ahn, and J. C. Chun. 2005. Determination of paraquat-resistant biotype on *Conyza canadensis* and the resistant mechanism. *Kor. J. Pesticide Sci.* **9**: 88-96.
- Kowallik, K. V., B. Stoebe, I. Schaffran, P. Kroth-Pancic, and U. Freier. 1995. The chloroplast genome of a chlorophyll a+c-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 336-342.
- Muraoka, S., R. Okumura, N. Ogawa, T. Nonaka, K. Miyashita, and T. Senda. 2003. Crystal structure of a full-length lysR-type transcriptional regulator, CbnR: Unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* **328**: 555-566.
- Murgia, I., D. Tarantino, C. Vannini, M. Bracale, S. Carravieri, and C. Soave. 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* **38**: 940-953.
- Preston, C. 1994. Resistance to photosystem I disrupting herbicide. p. 61-82. In S. B. Powles and A. M. Holtum (eds.), *Herbicide Resistance in plants: Biology and Biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd (eds.), p. 116. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santiviago, C. A., J. A. Fuentes, S. M. Bueno, A. N. Trombert, A. A. Hildago, L. T. Socias, P. Youderian, and G. C. Mora. 2002. The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol. Microbiol.* **46**: 687-698.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan. 2001. Structural mechanisms of *QacR* induction and multidrug recognition. *Science* **294**: 2158-2163.
- Stalker, D. M., K. E. McBride, and L. D. Malyj. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a

- bacterial detoxification gene. *Science* **242**: 419.
17. Stalker, D. M., W. R. Hiatt, and L. Comai. 1985. A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *J. Biol Chem.* **260**: 4724-4728.
 18. Stragier, P., O. Danos, and J. C. Patte. 1983. Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia Coli*. II. Nucleotide sequence of the *lysA* gene and its regulatory region. *J. Mol. Biol.* **168**: 321-331.
 19. Viale, A. M., H. Kobayashi, T. Akazawa, and S. Henikoff. 1991. *RbcR* [correction of *rcbR*], a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **173**: 5224-5229.
 20. Windhovel, U. and B. Bowine. 1991. Identification of *cfxR*, an activator gene of autotrophic CO₂ fixation in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**: 2695-2705.
 21. Wissenbach, U., S. Six, J. Bongaerts, D. Ternes, S. Steinwachs, and G. Uden. 1995. A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the artPIQMJ genes, arginine binding and transport. *Mol. Microbiol.* **17**: 675-686.
 22. Won, S. H., B. H. Lee, and J. K. Jo. 2000. Characterization of a paraquat resistance of *Ochrobactrum anthroi* JW-2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1-7.
 23. Won, S. H., B. H. Lee, H. S. Lee, and J. K. Jo. 2001. An *Ochrobactrum anthropi* gene conferring paraquat resistance to the heterologous host *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **285**: 885-890.
 24. Ye, B. and J. Cressel. 2000. Transient, oxidant-induced antioxidant transcript and enzyme levels correlate with greater oxidant-resistance in paraquat-resistant *Conyza bonariensis*. *Planta* **211**: 50-61.
 25. Yu, T., Y. S. Li, X. F. Chen, J. H. Hu, X. C. Chang, and Y. G. Zhu. 2003. Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. *J. Plant Physiol.* **160**: 1305-1311.

(Received Mar. 3, 2006/Accepted Mar. 14, 2006)