

## *Rhodobacter sphaeroides*의 *nif* 유전자의 발현에 대한 NifA와 PrrA의 작용

손명화 · 김민주 · 이상준\*

부산대학교 미생물학과

(2012년 6월 15일 접수; 2012년 7월 24일 수정; 2012년 8월 27일 채택)

## The Role of NifA and PrrA on the Expression of *nif* Gene in *Rhodobacter sphaeroides*

Myung-Hwa Son, Min-Ju Kim, Sang-Joon Lee\*

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 15 June, 2012; revised 24 July, 2012; accepted 27 August, 2012)

### Abstract

To find out the growth conditions for the maximum activity of nitrogenase which catalyzes nitrogen fixation in *Rhodobacter sphaeroides*, the promoter activities of *nifA* and *nifH* were analyzed and the results indicated that expression of both *nifA* and *nifH* was increased in response to deprivation of both O<sub>2</sub> concentration and nitrogen source. The *nifA* mutant was constructed by deleting the gene to investigate the effect of NifA, the transcriptional regulator, on the *nifH* and *nifA* expression in *R. sphaeroides*. Analysis of expression of *nif* genes using the *nifA::lacZ* and *nifH::lacZ* fusions in the *nifA* mutant revealed that NifA acts as a positive activator for *nifH* and an autoregulator in its own expression. The promoter activities of *nifA* and *nifH* in the *prrA* mutant grown under anaerobic and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free conditions were derepressed, comparing with those of the wild-type grown under the same conditions, indicating that the *prrA* product acts as a positive regulator in expression of *nifA* and *nifH*.

**Key Words** : Nitrogen fixation, *Rhodobacter sphaeroides*, Nitrogenase, *nifH*, *nifA*, PrrBA two-component system

### 1. 서론

Proteobacteria에서 질소 고정화는 nitrogenase 효소 복합체에 의해 촉매 된다. *Rhodobacter sphaeroides*에 존재하는 nitrogenase는 dinitrogenase reductase(Fe protein)와 dinitrogenase(MoFe protein)로 구성되는데 dinitrogenase reductase는 *nifH* 유전자의 산물인  $\alpha_2$  이량체로 dinitrogenase에 전자를 제공하고, dinitrogenase

는 *nifDK* 유전자의 산물인  $\alpha_2\beta_2$  사량체로 N<sub>2</sub>와 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>를 위한 활성부위(FeMo-Co)를 가진다(Masepohl과 Klipp, 1996).

Nitrogenase의 구조 유전자인 *nifHDK*를 비롯한 *nif* 유전자 cluster의 발현은 전사단계에서 *nifA* 유전자와  $\sigma^{54}$  의존 전사 활성자인 NifA 단백질에 의해 조절되며(Halbleib과 Ludden, 2000), NifA에 의한 전사 활성은 산소 농도와 질소원에 따라 현저히 달라진다(Kranz과 Foster-Hartnett, 1990; Oelze과 Klein, 1996). 질소 고정화에 관한 연구가 가장 잘 이루어진 *Klebsiella*와 *Rhizobium*속 세균과 *Rhodobacter capsulatus*에서의 *nif* 유전자의 조절 기작을 토대로 *R. sphaeroides*의

\*Corresponding author : Sang-Joon Lee, Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
Phone: +82-51-510-2268  
E-mail: sangjoon@pusan.ac.kr

*nifHDK*와 그 외 *nif* 유전자들의 발현도 *nifA*에 의해 인코딩되는 NifA 단백질을 중심으로 조절될 것으로 예측할 수 있다.

질소 고정화의 조절 작용에서 세포 내 질소 상태는 Ntr system에 의해 감지된다.  $\text{NH}_4^+$ 가 존재하는 조건에서는 *glnB*와 *glnK*에 의해 인코딩되는 PII 단백질이 NtrB의 활성을 억제하고, NtrB가 phosphatase로 작용함으로써 NtrC의 인산화 반응이 억제되어 *nifA* 발현이 유도되지 않는다. 또  $\text{NH}_4^+$ 이 제한된 조건에서는 PII가 활성화되고 NtrB가 histidine kinase로 작용하여 NtrC를 인산화한다. NtrC~P는 *nifA*의 발현을 활성화하고 NifA는 *nifHDK*를 비롯한 다른 *nif* 오페론을 활성화한다. 따라서 질소 고정화는 NifA-dependent system에서의 *nifA* 유전자의 발현과 NifA 단백질의 활성 조절로 이루어진다(Hübner 등, 1991; Kranz 등, 1990; Merrick과 Edwards, 1995; Merrick, 1983).

PrrBA two-component system은 산화 환원 전위에 따라 다양한 유전자의 발현을 조절하는 총체적 전사 조절계이다(Eraso과 Kaplan, 1994). 처음에는  $\text{O}_2$  분압에 따라 광합성 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려졌으나(Eraso과 Kaplan, 1994; Sganga 과 Bauer, 1992), 최근에는 탄소 고정뿐만 아니라(Qian과 Tabita, 1996) 질소 고정과(Elsen 등, 2000; Qian과 Tabita, 1996) 수소 산화 관련 유전자의 조절과 발현에도(Elsen

등, 2000) 관여하는 것으로 알려져 있다. PrrB/PrrA 신호 경로에서 PrrB는 막에 부착된 histidine kinase로써 자가 인산화를 유발하며(Eraso과 Kaplan, 1996), PrrA는 전사 활성자나 전사 억제자로 작용한다(Eraso 등, 2008).

본 연구에서는 산소의 농도와 질소원의 유무가 *R. sphaeroides*의 *nifH*와 *nifA* 유전자의 프로모터 활성에 어떠한 영향을 주는지를 살펴봄으로써 nitrogenase 활성의 최적 조건을 얻고자 하였다. 또한, *nifA*와 *prrA* 유전자의 돌연변이 균주를 제작하여 돌연변이 균주에서의 *nifA*와 *nifH* 프로모터 활성을 조사하여 NifA 단백질이 질소 고정 관련 유전자들에 영향을 미치는지와 *R. sphaeroides*의 PrrBA system이 nitrogenase 활성에 관여하는지를 알아보려고 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용 균주, 플라스미드 및 배양 조건

본 연구에서 사용된 균주와 플라스미드는 Table 1에 표기하였다. *E. coli*는 LB(Luria-Bertani) 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *R. sphaeroides*의 배양에는 succinate와  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 각각 탄소원과 질소원으로 사용한 Sistrom(SIS) 배지를(Cohen-Bazire 등, 1957) 실험 목적에 따라 적절히 변경하여 사용하였으

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant phenotype or genotype	Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	( $\phi$ 80 $d\text{lacZ}\Delta\text{M15}$ ) $\Delta\text{lacU169}$ <i>recZ1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Jessee(1986)
S17-1	Pro <sup>+</sup> Res <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> <i>recA</i> integrated plasmid RP4-Tc:: Mu-Km::Tn7	Simon et al.(1983)
<i>R. sphaeroides</i>		
2.4.1	Wild-type	van Niel(1944)
NIFA	2.4.1 derivative, $\Delta\text{nifA}$	This study
PrrA2	2.4.1 derivative $\Delta\text{prrA}::\Omega\text{Sp}^+$ ; $\text{St}^+$	Eraso and Kaplan(1995)
Plasmids		
pUC19	Ap <sup>r</sup> , cloning vector	Yanisch-Perron et al.(1985)
pLO1	Km <sup>r</sup> <i>sacB</i> RP4- <i>oriT</i> ColE1- <i>oriV</i>	Lenz et al.(1994)
pCF1010	Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> IncQ	Lee and Kaplan(1995)
pBBR1MCS2	broad host range, mob, Km <sup>r</sup>	Kovach et al.(1995)
pPRonifA	pCF1010 containing a 0.75-kb <i>NotI/XbaI</i> fragment containing <i>nifA</i> promoter region	This study
pPRonifH	pCF1010 containing a 1.2-kb <i>XbaI/PstI</i> fragment containing <i>nifH</i> promoter region	This study
pBNIFA	pBBR1MCS2 containing a 1.1-kb <i>EcoRI/XbaI</i> fragment containing the <i>nifA</i> gene	This study

며, 30 °C를 유지하였다. 항생제로는 필요에 따라 *E. coli*에서는 ampicillin(100 µg/mL), tetracycline(5 µg/mL), streptomycin-spectinomycin(25 µg/mL), 및 kanamycin(50 µg/mL)을 각각 사용하였고, *R. sphaeroides*에서는 tetracycline(1 µg/mL), streptomycin-spectinomycin(50 µg/mL), trimethoprim(50 µg/mL), 및 kanamycin(50 µg/mL)을 사용하였다.

배지를 가득 채운 falcon tube에 전 배양한 균주를 5% 접종하고, 2,500 Lux의 백열등을 쬐어 혐기적으로 배양함으로써 광합성을 유도하였으며, dark-DMSO (dimethyl sulfoxide) 조건을 유지하기 위해 0.1% yeast, 0.5% DMSO을 넣은 SIS 배지를 falcon tube에 가득 채워 혐기적으로 배양하였다. 전사단계에서의 프로모터 활성을 통해 nitrogenase 활성을 측정하는 실험의 경우, 초기에는(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 질소원으로 하는 SIS 배지에서 12~14시간 정도 배양하여 충분한 양의 균체를 얻은 후, 실험에 따라서 이 균체를 질소원이 고갈된 배지나 질소원이 풍부한 배지로 옮겨서 이차적으로 OD<sub>600</sub> 값이 0.5~0.6 정도가 될 때까지 배양한 후 실험을 시행하였다(Fostner-Hartnett과 Kranz, 1992). 질소원이 고갈된 배지로는(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하고 (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O를 1.61×10<sup>-2</sup> mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O로 대치한 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free SIS 배지에 10 mM glutamate를 첨가하여 사용하였다.

## 2.2. DNA 제조 및 conjugation에 의한 형질 전환

재조합 DNA는 표준 프로토콜에 따라서 제작하였다(Sambrook 등, 1989). 재조합 플라스미드 수여체로 *E. coli* DH5α를 이용하였고, conjugation을 위한 plasmid 이동을 위해서는 *E. coli* S17-1을 이용하였다(Davis 등, 1998).

## 2.3. Transcriptional lacZ fusion plasmid 제작법

**nifA::lacZ transcriptional fusion plasmid, pPRONifA :** *R. sphaeroides*의 genomic DNA를 주형으로 하는 PCR을 통해 *nifA* 유전자의 5' 부위와 프로모터 부위를 포함한 734 bp의 DNA 절편을 얻었다. 이 때 사용된 프라이머는 NifAlac-up(atactagcggccgcccgttagagaggatcg)과 NifAlac-down(cacatatctagaagcttg gcgatctcgca)이며, 밑줄 친 부분은 각각 *NotI*과 *XbaI*의 제한 효소 작용

부위를 나타낸다. *NotI/XbaI*로 자른 PCR 산물을 프로모터가 결실된 *lacZ* fusion vector인 pCF1010에 클로닝하였으며, 얻어진 플라스미드를 pPRONifA로 명명하고, *nifA*의 발현 정도를 알아보는 데 이용하였다(Son과 Lee, 2012).

**nifH::lacZ transcriptional fusion plasmid, pPRONifH:** *R. sphaeroides*의 genomic DNA를 주형으로 하여 *nifH* 유전자의 5' 부위 일부와 프로모터 부위를 PCR로 증폭시켜 1.2 kb의 DNA 절편을 얻었다. PCR 과정에 사용된 프라이머는 NifHlac-up(5'-atactcctgcagtcgtagagacgcgc-3')와 NifHlac-down(5'-cacatatctagaccatctcgacc gcgatctcgca-3')이며, 밑줄 친 부분은 각각 *PstI*과 *XbaI*의 제한 효소 작용 부위를 나타낸다. PCR 산물을 *PstI/XbaI* 제한 효소 작용 부위를 가진 *lacZ* fusion vector pCF1010으로 클로닝하여 pPRONifH를 얻었으며, *nifH* 유전자의 발현 정도를 알아보는 데 이용하였다(Son과 Lee, 2012).

## 2.4. *R. sphaeroides*의 *nifA* mutant 제작

*R. sphaeroides* 2.4.1의 genomic DNA를 주형으로 하는 PCR을 실시하여 *nifA* 유전자를 포함하는 2.1 kb의 절편을 얻었다. 이 때 사용된 프라이머는 한쪽 끝에 각각 *EcoRI*(GAATTC)와 *BamHI*(GGATCC) 제한 효소 부위를 가지는 NifA-up(5'-atactcgaattcaccagccctcgagcgc-3')과 NifA-down(5'-cacatagggatccgagggtcgcaaatcg-3')을 사용하였다. PCR 산물을 *EcoRI/BamHI*로 처리하여 pUC19(Amp<sup>r</sup>)에 클로닝한 다음, *nifA* 유전자 내의 *XhoI/XhoI* DNA 부위를 제거한 1.1 kb의 DNA 절편을 *SacI/SacI* 제한 효소 부위로 잘라내어 suicide vector인 pLO1(Km<sup>r</sup>)에 클로닝함으로써 pLOΔnifA를 만들었다. 이 pLOΔnifA를 *E. coli* S17-1에 형질 전환을 시킨 후, conjugation 기법을 이용하여 *R. sphaeroides*의 single crossover를 유도하였다. Single crossover에 의해 형질 전환된 *R. sphaeroides*를 15% sucrose가 포함된 SIS 배지로 만든 평판배지에 도말하여 double crossover된 재조합 균주를 유도하여 최종적으로 *nifA* 유전자 일부가 결실된 *R. sphaeroides nifA* mutant (NIFA strain)를 선별하였다.

## 2.5. *R. sphaeroides nifA* mutant 상보성 실험

위의 실험에서 제작된 pUC19::nifA를 *BamHI/EcoRI*

으로 잘라서 2.1 kb 크기의 DNA 절편을 얻었고, 이를 광범위 숙주 vector인 pBBR1MCS2의 동일한 부위에 클로닝하여 pBNIFA plasmid를 제작하였다. pBNIFA를 포함한 *E. coli* S17-1를 *nifA* 돌연변이 균주에 conjugation시켜 kanamycin을 포함한 SIS 고체 배지에서 *nifA* 유전자의 발현이 회복될 수 있도록 유도된 균주를 선별하였다.

### 2.6. $\beta$ -galactosidase assay와 단백질 결정

$\beta$ -galactosidase activity 측정은 O-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 참고 문헌에서 기술한 것처럼 시행하였고(Miller, 1972), 세포 추출물의 단백질 농도는 표준물질로 bovine serum albumin을 이용한 bicinchoninic acid protein assay agent kit(Pierce, Rockford, IL.)로 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. *nifA*와 *nifH* 유전자의 최적 발현 조건

비유황 홍색 광합성 세균에서 nitrogenase 생합성

에 필요한 *nif* 유전자의 발현에 영향을 준다고 알려진 산소와 질소원의 조건을 달리하면서 pPROnifA를 포함한 *R. sphaeroides* 2.4.1을 이용하여 *nifA* 유전자의  $\beta$ -galactosidase 활성을 비교하였다. Fig. 1에서 보는 것처럼 질소원이 결핍된 조건에서는 산소의 유무와 관계없이 *nifA* 프로모터의 활성이 높게 나타났다. 이는 *nifA* 유전자가 산소의 영향을 받지 않고 항시적으로 발현된다는 것을 의미한다. pCF1010을 포함한 *R. sphaeroides* 2.4.1을 대조균으로 사용한 경우, 어떤 조건에서도 *nifA* 프로모터의 활성은 거의 나타나지 않았다.

한편, 산소와 질소원을 달리한 조건에서 pPROnifH를 가지고 있는 *R. sphaeroides* 2.4.1을 이용하여 *nifH* 유전자의  $\beta$ -galactosidase 활성을 비교해 보았다. Fig. 2에서 보는 것처럼 산소와 질소원이 동시에 제한된 경우에만 *nifH* 유전자의 프로모터 활성이 다른 조건에 비해 거의 4배 정도 더 높게 나타났다. 이는 질소원과 산소가 결핍된 환경 조건에서 *R. sphaeroides*를 배양할 경우, nitrogenase의 활성이 최대화 될 수 있음을 의미한다.

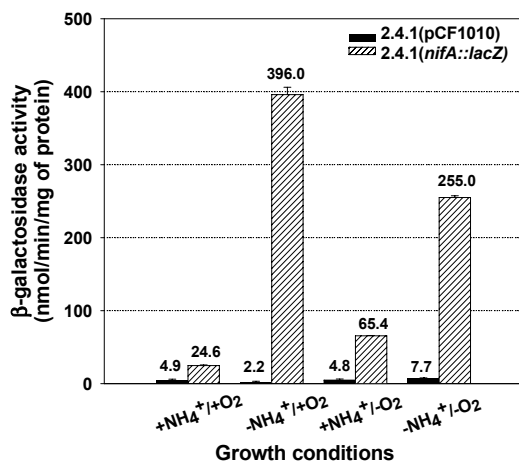


Fig. 1. Expression of a *nifA*::lacZ fusion in *R. sphaeroides* 2.4.1. grown under different growth conditions. Strains were grown in SIS(+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free SIS medium containing glutamate(-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) under aerobically(+O<sub>2</sub>) or photosynthetically(-O<sub>2</sub>). Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

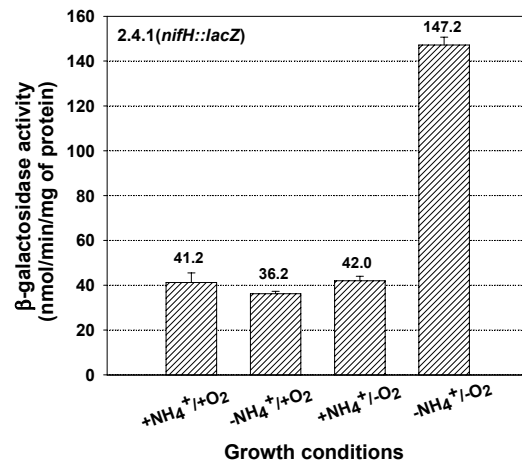


Fig. 2. Expression of a *nifH*::lacZ fusion in *R. sphaeroides* 2.4.1. grown under different growth conditions. Strains were grown in SIS(+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free SIS medium containing glutamate(-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) under aerobically(+O<sub>2</sub>) or photosynthetically(-O<sub>2</sub>). Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

3.2. *R. sphaeroides nifA* mutant 확인을 위한 nested PCR

*R. sphaeroides nifA* mutant에서 *nifA* 유전자 일부가 결실되었음을 확인하기 위해 NifAm-up(5'-CGCGCGATCCCCGCGCAGGTG-3')와 NifAm-down(5'-GTGGCAGGCCAGATCGTCGGC-3')을 프라이머로 사용하여 nested PCR을 실시하였다. PCR로 얻어진 DNA 산물을 전기 영동한 결과 1.1 kb 크기의  $\Delta nifA$ 가 확인되어 결실된 부위가 *nifA* 유전자 일부임이 증명되었다.

3.3. *R. sphaeroides nifA* mutant에서의 *nifA* 및 *nifH*의 *lacZ* fusion 활성과 상보성 실험

NifA 단백질이 *nifA* 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 pPRonifA를 포함한 *R. sphaeroides* wild-type과 *R. sphaeroides nifA* mutant를 dark-DMSO 조건에서 질소원으로 10 mM의 glutamate를 첨가한  $\text{NH}_4^+$ -free SIS 배지에서 배양하였을 때, Fig. 3과 같이 wild-type보다 *R. sphaeroides nifA* mutant에서 *nifA*의 발현이 현저히 감소하였다. 이로 보아 *nifA* 유전자의

upstream에 NifA에 의존하는 프로모터를 가진 조절 부위가 있으며, *nifA* 유전자가 자가조절 유전자임을 알 수 있다. 프로모터 활성이 *nifA* 유전자의 mutation 만으로 나타나는 현상임을 확인하기 위해 pBBRMCS2에 *nif* 유전자 전체를 삽입하여 pBNIFA plasmid를 제작하여 상보성 실험을 하였다. 그 결과 pBNIFA를 포함한 *R. sphaeroides nifA* mutant에서의 *nifA* 프로모터 활성이 wild-type과 거의 같음이 증명되었다(Fig. 3).

NifA 단백질이 *nifH* 유전자의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 광합성 조건에서 pPRonifH를 포함한 wild-type과 *R. sphaeroides nifA* mutant를 배양한 다음 각각의  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 것처럼 *R. sphaeroides nifA* mutant의 *nifH* 프로모터의 활성은 같은 조건에서의 wild-type에 비해 낮은 수치를 나타냈다. 이것으로 NifA가 *nifH* 발현의 양성적 조절자로 작용한다는 것을 알 수 있다.

NifA는 조절 역할을 하는 N 말단 부위와 중앙의 보

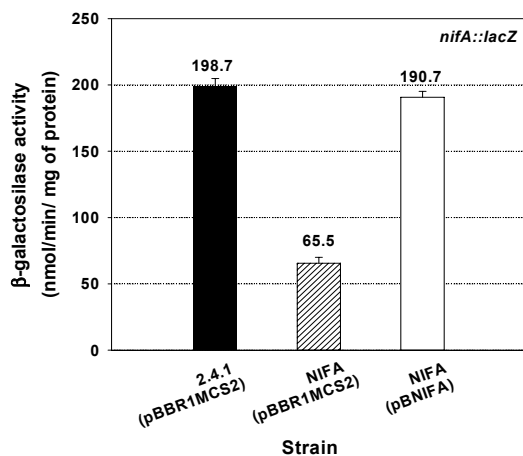


Fig. 3. Expression of a *nifA::lacZ* fusion in *R. sphaeroides* strains and complementation of the NIFA strain using pBNIFA. Strains contain pPRonifA(*nifA::lacZ*) for activity of the *nifA* promoter and carry a second plasmid for \complementation test: vector pBBR1MCS2(black bar and hatch bar); pBNIFA(*nifA::pBBR1MCS2*)(white bar). Strains were grown in  $\text{NH}_4^+$ -free SIS medium containing glutamate(- $\text{NH}_4^+$ ) under dark-DMSO(- $\text{O}_2$ ) conditions. Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

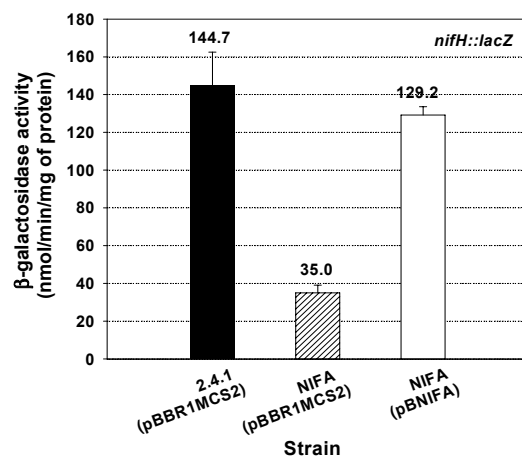


Fig. 4. Expression of the *nifH::lacZ* fusion in *R. sphaeroides* strains and complementation of the NIFA strain using pBNIFA. Strains contain pPRonifH(*nifH::lacZ*) for activity of the *nifH* promoter and carry a second plasmid for \complementation test: vector pBBR1MCS2(black bar and hatch bar); pBNIFA(*nifA::pBBR1MCS2*)(white bar). Strains were grown in  $\text{NH}_4^+$ -free SIS medium containing glutamate(- $\text{NH}_4^+$ ) under photosynthetically(- $\text{O}_2$ ). Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

존된 ATP 결합 활성 부위 및 HTH(helix-turn-helix) motif를 포함한 DNA 결합 부위인 C-말단의 3개의 부위로 구분된다. NifA가 활성인자로 작용할 때 NifA의 HTH C-말단이 *nifA* 프로모터의 upstream에 있는 TGT-N10-ACA 부위에 결합하여 open complex 구조를 형성함으로써 *nifH*나 *nifA*의 전사가 시작된다.

환경 내의 산소와 질소원에 대한 세균들의 반응을 살펴보면, *Klebsiella pneumoniae*나 *Azotobacter vinelandii*의 경우처럼 NifI이 존재하는 경우에는 산소와 질소원에 반응한 NifI이 NifA 중앙의 촉매 부위와 상호 작용하나(Dixon, 1998; Schmitz 등, 2002), *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium meliloti*(현재, *Sinorhizobium meliloti*)의 경우처럼 NifI이 없는 경우에는 NifA의 Cys residues에서 직접 산소에 반응한다(Fischer, 1994; Fischer과 Hennecke, 1987; Paschen 등, 2001).

NifA 간의 alignment를 비교하면, O<sub>2</sub>-sensitive NifA의 Cys cluster(Cys-X<sub>11</sub>-Cys-X<sub>19</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys) 구성이 O<sub>2</sub>-tolerant NifA의 Cys cluster의 구성과 서로 다를 수 있다. *B. japonicum*, *S. meliloti*, *Herbaspirillum*

*seropedicae*, *R. capsulatus*에 존재하는 O<sub>2</sub>-sensitive NifA의 경우에는 네 개의 Cys residues 중에서 두 개는 중앙 부위에 있고, 나머지 두 개는 부위 간 연결 부위에 있는데 비해, *K. pneumoniae*와 *A. vinelandii*에 존재하는 O<sub>2</sub>-tolerant NifA는 부위 간 연결 부위가 없으며 Cys residues도 한 개밖에 없다(Fischer, 1994; Fischer 등, 1998; Michiels 등, 1994). 보존된 Cys cluster는 세포 내 산화 환원 상태를 감지하는 금속 인자와 결합하여 NifA의 구조 변화를 일으켜 활성을 억제한다. NifA의 아미노산 배열을 나타낸 Fig. 5에서 보는 바와 같이 *R. sphaeroides*의 경우에는 4개의 Cys cluster를 포함한 NifA를 가지므로 *K. pneumoniae*와 *A. vinelandii*의 NifA와는 달리 O<sub>2</sub>에 민감하다고 볼 수 있다.

3.4. *R. sphaeroides prrA* mutant에서 *nifA::lacZ* fusion과 *nifH::lacZ* fusion의 활성 비교

PrrA 단백질이 *nifA*의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 재조합 플라스미드인 pPROnifA를 포함하는 wild-type과 *R. sphaeroides prrA* mutant에서 각각

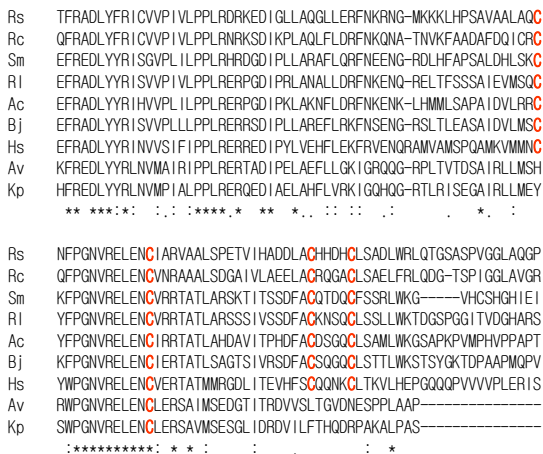


Fig. 5. Expression of the *nifA::lacZ* and *nifH::lacZ* transcriptional fusions in the wild-type(2.4.1) and *prrA* mutant(PrrA2) strains of *R. sphaeroides*. Strains contain pPROnifA(*nifA::lacZ*) and pPROnifH(*nifH::lacZ*) for promoter activity of *nifA* and *nifH*, respectively. Strains were grown under dark-DMSO conditions in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free SIS medium containing glutamate. Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

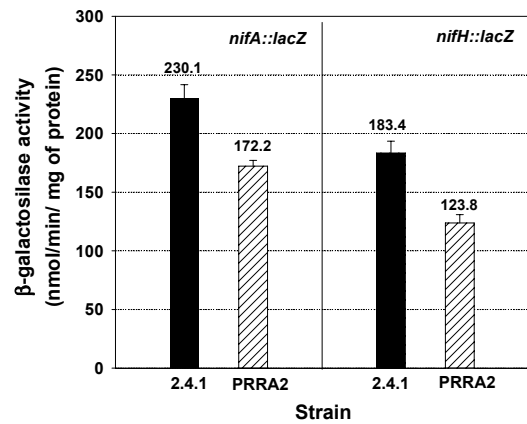


Fig. 6. Expression of the *nifA::lacZ* and *nifH::lacZ* fusion in the PrrA2 strain respectively. Strains contain pPROnifA(*nifA::lacZ*) and pPROnifH(*nifH::lacZ*) for activity of the *nifA* and *nifH* promoter respectively. Strains were grown under dark-DMSO conditions in NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-free SIS medium plus glutamate. Values represent the means and standard deviations of two independent measurements.

$\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. 이 실험에 사용된 모든 균주는 dark-DMSO 조건에서 배양하였으며, 배양액은 10 mM의 glutamate를 질소원으로 첨가한  $\text{NH}_4^+$ -free SIS 배지를 사용하였다. Fig. 6에서 나타난 것처럼 *R. sphaeroides* pRR4 mutant의 *nifA* 프로모터의 활성은 같은 조건에서의 wild-type의 *nifA* 프로모터의 활성에 비해 낮은 수치를 나타냈다. 이것으로 PrrA가 *nifA* 발현의 양성적 조절자로 작용한다는 것을 알 수 있었다.

PrrA가 *nifH*의 발현에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 glutamate를 질소원으로 첨가한  $\text{NH}_4^+$ -free SIS 배지에서 pPROnifH를 포함한 *R. sphaeroides* prrA mutant와 wild-type을 dark-DMSO 조건으로 배양하였을 때, Fig. 6과 같이 *nifH*의  $\beta$ -galactosidase 활성은 wild-type보다 *R. sphaeroides* prrA mutant에서 약 75%로 떨어졌다. 이것은 산화 환원 신호를 감지하는 PrrBA system(*R. capsulatus*의 RegBA system)의 PrrA가 *nifH*의 발현에 양성적 조절자로 작용한다는 것을 증명한 것이다.

질소 고정과 PrrBA two-component system의 관계를 살펴보면 *Rhodospirillum rubrum*과 *R. sphaeroides*의 경우 *regA* 유전자가 제거된 Rubisco knock out 균주의 nitrogenase 활성이 없어졌고(Qian과 Tabita, 1996), *R. capsulatus*의 경우 RegA(*R. sphaeroides*의 PrrA)가 직접 *nifA2*의 프로모터에 결합하여 *nifA*의 발현을 조절하고(Elsen 등, 2000), *B. japonicum*의 경우 PrrB-PrrA와 유사한 RegS-RegR가 있어서 RegR이 *fixR-nifA* 오페론의 발현을 조절한다고 보고되었다(Bauer 등, 1998). 이외에도 고도로 보존된 RegB/RegA homologous가  $\alpha$ -홍색 광합성세균(*R. capsulatus*, *R. sphaeroides*, *Roseobacter denitrificans*, *Rhodovulum sulfidophilum*) 뿐만 아니라(Masuda 등 1999), 비광합성세균(*R. meliloti*, *B. japonicum*)에서도 발견되었다(Bauer 등, 1998; Tiwari 등, 1996)

#### 4. 결론

*R. sphaeroides*의 질소고정화에 관련된 조절유전자인 *nifA*와 구조 유전자인 *nifH*의 발현을 극대화할 수 있는 환경조건을 알아내기 위해 *nifA*와 *nifH*를 각각

*lacZ* fusion vector인 pCF1010에 클로닝하여 얻어진 pPROnifA와 pPROnifH를 이용하여 여러 환경조건에서 *nifA*와 *nifH* 유전자의 프로모터 활성을 측정하였다. *nifA*의 프로모터 활성은 질소원이 결핍된 조건에서는 산소의 영향을 받지 않고 항시적으로 높게 나타났고 *nifA*의 프로모터 활성은 질소원과 산소가 모두 결핍된 조건에서만 높게 나타났다.

산소와 질소가 모두 결핍된 조건에서 pPROnifA와 pPROnifH를 이용하여 *nifA* 돌연변이 균주의 *nifA*와 *nifH* 유전자의 프로모터 활성을 조사한 결과, NifA는 *nifA*의 자가조절자 및 *nifH*의 양성적 조절자로 작용한다는 것을 알아냈다. 질소원이 부족한 dark-DMSO 조건에서 prrA 돌연변이 균주와 wild-type의 *nifA*와 *nifH*의 프로모터 활성을 비교했을 때 prrA 돌연변이 균주에서 프로모터 활성이 더 낮게 나타났고, 이로써 산화 환원 신호를 감지하는 PrrBA system의 PrrA가 *nifA*와 *nifH* 유전자의 발현에 대해 양성적 조절자임을 알 수 있었다.

#### 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었습니다.

#### 참고 문헌

- Bauer, E., Kaspar, T., Fischer, H. M., Hennecke, H., 1998, Expression of the *fixR-nifA* operon in *Bradyrhizobium japonicum* depends on a new response regulator, RegR, J. Bacteriol., 180, 3853-3863.
- Cohen-Bazire, G., Siström, W. R., Stanier, R. Y., 1957, Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria, J. Cell. Physiol., 49, 25-68.
- Davis, J., Donohue, T. J., Kaplan, S., 1988, Construction, characterization, and complementation of a *puf* mutant of *Rhodobacter sphaeroides*, J. Bacteriol., 170, 320-329.
- Dixon, R., 1998, The oxygen-responsive NIFL-NIFA complex: a novel two-component regulatory system controlling nitrogenase synthesis in gamma-proteobacteria, Arch. Microbiol., 169, 371-380.

- Elsen, S., Dischert, W., Colbeau, A., Bauer, C. E., 2000, Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system, *J. Bacteriol.*, 182, 2831-2837.
- Eraso, J. M., Roh, J. H., Zeng, X., Callister, S. J., Lipton, M. S., Kaplan, S., 2008, Role of the global transcriptional regulator PrrA in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: combined transcriptome and proteome analysis, *J. Bacteriol.*, 190, 4831-4848.
- Eraso, J. M., Kaplan, S., 1996, Complex regulatory activities associated with the histidine kinase PrrB in expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1., *J. Bacteriol.*, 178, 7037-7046.
- Eraso, J. M., Kaplan, S., 1995, Oxygen-Insensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase, *J. Bacteriol.*, 177, 2695-2706.
- Eraso, J. M., Kaplan, S., 1994, *prrA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.*, 176, 32-43.
- Fischer, H. M., 1994, Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia, *Microbiol. Rev.*, 58, 352-386.
- Fischer, H. M., Hennecke, H., 1987, Direct response of *Bradyrhizobium japonicum nifA*-mediated *nif* gene regulation to cellular oxygen status, *Mol. Gen. Genet.*, 209, 621-626.
- Fischer, H. M., Bruderer, T., Hennecke, H., 1988, Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum NifA* protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding, *Nucleic Acid Res.*, 16, 2207-2224.
- Foster-Hartnett, D., Kranz, R. G., 1992, Analysis of the promoters and upstream sequences of *nifA1* and *nifA2* in *Rhodobacter capsulatus*: activation requires *ntrC* but not *rpoN*, *Mol. Microbiol.*, 6, 1049-1060.
- Halbleib, C. M., Ludden, P. W., 2000, Regulation of biological nitrogen fixation, *J. Nutr.*, 130, 1081-1084.
- Hübner, P., Willison, J. C., Vignais, P. M., Bickle, T. A., 1991, Expression of Regulatory *nif* Genes in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.*, 173, 2993-2999.
- Jessee, J., 1986, New subcloning efficiency competent cells:  $>1 \times 10^6$  transformants/ $\mu\text{g}$ , *Focus*, 8, 9.
- Joshi, H. M., Tabita, F. R., 1996, A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 14515-14520.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M., Peterson, K. M., 1995, Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, *Gene*, 166, 175-176.
- Kranz, R. G., Foster-Hartnett, D., 1990, Transcriptional regulatory cascade of nitrogen-fixation genes in anoxygenic photosynthetic bacteria: oxygen- and nitrogen-responsive factors, *Mol. Microbiol.*, 4, 1793-1800.
- Kranz, R. G., Pace, V. M., Caldicott, I. M., 1990, Inactivation, sequences, and lacZ fusion analysis of a regulatory locus required for repression of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.*, 172, 53-62.
- Lee, J. K., Kaplan, S., 1995, Transcriptional regulation of *puc* operon expression in *Rhodobacter sphaeroides*. Analysis of the cis-acting downstream regulatory sequence, *J. Biol. Chem.*, 270, 20453-20458.
- Lenz, O., Schwartz, E., Denedde, Eitinger, J., M., Friedrich, B., 1994, The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation, *J. Bacteriol.*, 176, 4385-4393.
- Masepohl, B., Klipp, W., 1996, Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*, *Arch. Microbiol.*, 165, 80-90.
- Masuda, S., Matsumoto, Y., Nagashima, K. V., Shimada, K., Inoue, K., Bauer, C. E., Matsuura, K., 1999, Structural and functional analyses of photosynthetic regulatory genes *regA* and *regB* from *Rhodovulum sulfidophilum*, *Roseobacter denitrificans*, and *Rhodobacter capsulatus*, *J. Bacteriol.*, 181, 4205-4215.
- Merric, M. J., Edwards, R. A., 1995, Nitrogen control in bacteria, *Microbiol. Rev.*, 59, 604-622.
- Merrick, M. J., 1983, Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*, *EMBO J.*, 2, 39-44.



- Michiels, J., D'hooghe, I., Verreth, C., Pelemans, H., Vanderleyden, J., 1994, Characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli nifA* gene, a positive regulator of *nif* gene expression, Arch. Microbiol., 161, 404-408.
- Miller, J. H., 1972, Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Oelze, J., Klein, G., 1996, Control of nitrogen fixation by oxygen in purple nonsulfur bacteria, Arch. Microbiol., 165, 219-225.
- Paschen, A., Drepper, T., Masepohl, B., Klipp, W., 2001, *Rhodobacter capsulatus nifA* mutants mediating *nif* gene expression in the presence of ammonium, FEMS. Microbiol. Lett., 200, 207-213.
- Qian, Y., Tabita, F. R., 1996, A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides*, J. Bacteriol., 178, 12-18.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Schmitz, R. A., Klopprogge, K., Grabbe, R., 2002 Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the *nif* transcriptional activator NifA., J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 4, 235-242.
- Sganga, M. W., Bauer, C. E., 1992, Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*, Cell, 68, 945-954.
- Simon, R., Priefer, U., Puhler, A., 1983, A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria, Bio/Technology, 1, 784-791.
- Son, M. H., Lee, S. J., 2012, Analysis of the *orf 282* Gene and Its Function in *Rhodobacter sphaeroide* 2.4.1, J. Life Sci., 22, 1009-1017.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids. Res., 22, 4673- 4680.
- Tiwari, R. P., Reeve, W. G., Dilworth, M. J., Glenn, A. R., 1996, Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system, Microbiology, 142, 1693-1704.
- van Niel, C. B., 1944, The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria, Bacteriol. Rev., 8, 1-118.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., 1985, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence for the M13 mp18 and pUC19 vectors, Gene, 33, 103-119.