

질소고정 공생관계 관련 유전자

안 정 선
(서울대학교 자연과학대학 식물학과)

Genes Involved in Symbiotic Nitrogen Fixation

An, Chung Sun
(Dept. of Botany, Seoul National University, Seoul)

Abstract

In an attempt to review the informations about genes involved in symbiotic nitrogen fixation, developmental processes in which host plant interact with microbe during nodule formation were introduced first. The structure, function and regulation of the genes discussed were mainly about microbial genes; those involved in the process of nodule formation (nod-genes) and of nitrogen fixation (nif-genes). Informations about the host genes involved in the symbiosis were discussed briefly.

서 론

급격하게 증가하는 세계 인구에게 필요한 식량을 공급하기 위하여 막대한 양의 질소비료가 사용되어 왔고, 질소비료는 전적으로 화석에너지를 사용해서 생산되므로 기존하는 생물학적 질소고정능력 특히 공생관계에 의한 질소고정 능력을 보다 효율적으로 이용하고 나아가서는 새로운 공생관계를 확립시키려는 목적으로 많은 연구들이 진행되어 왔다. 그러나 이러한 목적을 달성하기 위해서는 질소고정 공생관계에 대한 확고한 이해 특히 관련 유전자들에 대한 요구가 필수적이라고 하겠다.

이러한 의미에서 본 소고에서는 숙주식물과 공생균주 사이의 초기 인식과정부터 질소고정능력을 갖는 뿌리혹을 형성하는 과정을 단계별로 살펴보면서 지금까지 알려진 관련 유전자들의 구조, 발현 및 조절기작을 정리해 보고자 하였다.

본 론

1. 질소 고정

질소는 단백질 및 핵산과 같은 생물분자의 구성 원소로서 생물에게 필수적인 요소이다. 질소는 대기 중 약 80%를 차지하고 있지만 이들이 직접 생명체로 유입될 수 있는 방법은 극히 제한되고 있다. 즉 동물은 식물에 질소를 의지 하며, 식물은 매설물이나 유기체의 분해로 얻어지는 nitrate를 토양으로부터 흡수하여 사용할 수 있지만, 자연 생태계에서 대기 질소는 일부 방전에 의한 것을 제외하고는 궁극적으로 원핵 생물에 의해서만 생명체로 유입될 수 있다 (Sprent, 1979; Fig.1). 대기 질소를

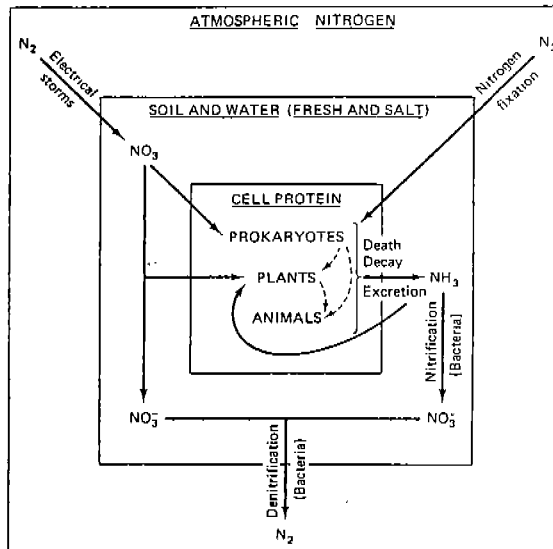


Fig. 1. The principal reactions of the nitrogen cycle.

생물이 이용할 수 있는 ammonia 상태로 바꾸는 작업이 바로 질소고정 과정이며 그러한 능력은 원핵생물에만 제한되어 있는데 그 이유는 질소원자를 결합시키고 있는 강력한 삼중결합을 절단할 수 있는 효소체가 식물이나 동물에는 없기 때문이다.

질소고정능력을 가지는 원핵생물은 *Azotobacter*, *Klebsiella* 및 일부 blue-green algae와 같이 독립생활을 하는 종류와 식물과 관련을 가지는 종류로 나눌 수 있다. 식물과의 관련은 세포내에 공생하는 경우와 세포 밖에서 연관 되어 있는 경우로 나눌 수 있다(Verma and Long, 1983; Fig.2). 세포 밖에서 연관된 경우는 *Azolla-Anabaena*와 같이 식물체의 공간에 존재하거나 혹은 일부 초본식물 *Azospirillum* 과 같이 뿌리 부근에 존재하면서 식물 과 물질을 교환한다. 한편 세포내에 공생하는 경우는 식물구조를 변형시켜서 형성된 뿌리혹이라는 기관내에 공생균주가 존재하지만 이들은 막으로 둘러싸여서 식물세포와는 항상 격리되어 있다.

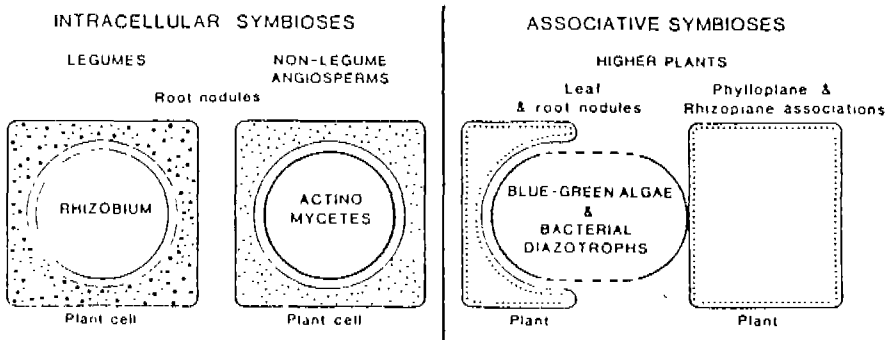


Fig. 2. Various associations between plants and diazotrophs leading to the symbiotic fixation of atmospheric nitrogen.

2. 질소고정 공생관계

질소고정 공생관계는 농경지 생태계에서 중요한 콩과식물-Rhizobium공생 관계와 산림생태계에서 중요한 비콩과 목본식물-Actinomycete 공생관계로 나눌 수 있다. 잘 알려진 콩과식물 공생관계의 숙주식물들은 콩, 땅콩, 알팔파 및 클로버 등 모두 콩과에

속하는 식물이며 지금까지 1300 종 이상의 콩과식물 이 질소고정 뿌리혹을 갖고있는 것으로 알려져 있다. 공생균인 *Rhizobium*은 *E. coli*나 *Agrobacterium*과 유사한 형태를 가지는 그람(-)균으로서 지금까지는 모두 *Rhizobium* 이라는 한 속으로 분류하였으나 성장속도, 독립상태에서의 질소고정능력 및 염에 대한 저항성 등의 차이로 빨리 성장하는 종류를 *R. freidi*로 분류하고 느린 성장을 하는 종류를 *Bradyrhizobium*이라는 새로운 속으로 분류하고 있다(Prakash and Atherly, 1986).

비콩과 목본식물과 공생관계의 숙주식물은 오리나무, 보리수나무 및 소귀나무 등의 8목 200여 종에 달하는 다양한 목본식물이며 공생균은 그람(+)이며 방선균에 속하는 *Frankia*로 알려졌다(Torrey, 1978). *Frankia*는 가늘게 분지하는 균사와 질소 고정장소로 알려진 vesicle, 포자 및 포자낭으로 구성되어 있으며(Pommer, 1959) 이들에 대한 연구는 분리에 따른 어려움때문에 오랫동안 지연되어 왔으나 1978년 균주분리에 성공한 후 부터는 본격적인 연구가 진행되고 있다.

이상의 두 공생관계를 비교해보면 전체적인 질소고정량 면에서는 약 700 Kg/ha로 매우 유사하지만 단위 뿌리혹의 질소고정 능력은 비콩과목본식물의 뿌리혹이 20 $\mu\text{mol/hr}$ 로 콩과식물의 뿌리혹 (12 $\mu\text{mol/hr}$)보다 높다 (Torrey, 1978, Table 1).

Table 1. Comparison of rates of nitrogen fixation by rhizobial-induced nodulation and actinomycete-induced nodulation

Plant	Acetylene-reduction ($\mu\text{ mol/hr/g}$ fr. wt. of nodulo)	Plant	Total N fixed kg/ha/yr
ACTINOMYCETE-INDUCED		ACTINOMYCETE-INDUCED*	
<i>Comptonia peregrina</i> seedlings†	9.6-22.2	<i>Alnus crispa</i> trees	40-362
<i>Elaeagnus angustifolia</i> in H ₂ O culture‡	14.8	<i>Alnus rubra</i> trees	140-300
<i>Alnus rubra</i> ‡	6.9	<i>Hippophaë rhamnoides</i> trees	15-179
<i>Alnus glutinosa</i> seedlings§	9-92.0	<i>Casuarina equisetifolia</i>	58-200
RHIZOBIAL-INDUCED‡		RHIZOBIAL INDUCED¶	
<i>Glycine max</i>	7.3	<i>Glycine max</i>	103 (av.)
<i>Medicago sativa</i>	15.1	<i>Medicago</i> sp.	54-463
<i>Pisum sativum</i>	17.4	<i>Pisum sativum</i>	52-77
<i>Trifolium subterraneum</i>	2.1	<i>Vicia faba</i>	45-552

그러나 콩과식물이 작용식물이라는 경제적인 이유로 콩과식물 공생관계에 대한 연구가 집중적으로 이루어졌고 따라서 앞으로 살펴볼 내용은 주로 콩과식물-Rhizobium 공생관계에 대한 설명이 될 것이다.

3. 뿌리혹 형성과정

질소고정 능력을 가지는 뿌리혹의 형성과정은 크게 세 단계로 나눌 수 있다 (Rolfe and Shine, 1984; Fig. 3). 첫번째 단계는 뿌리부근에서 공생균이 번식하고 뿌리털에 부착하면 뿌리털이 분지하거나 꼬부라지는 과정으로 침입 전 과정이다. 두번째 단계는 공생균이 침입사를 형성하여 뿌리내부로 침입하고 뿌리의 피층세포가 분열하면서 뿌리혹 형성이 시작되면 침입사는 뿌리세포에 침입하여 공생균주를 방출하고 방출된 공생균은 bacteroid 로 분화되어 뿌리혹이라는 새로운 기관이 형성되는 뿌리혹형성 과정이다. 세번째 단계는 형성된 뿌리혹 내부에서 bacteroid에 의해서 질소고정이

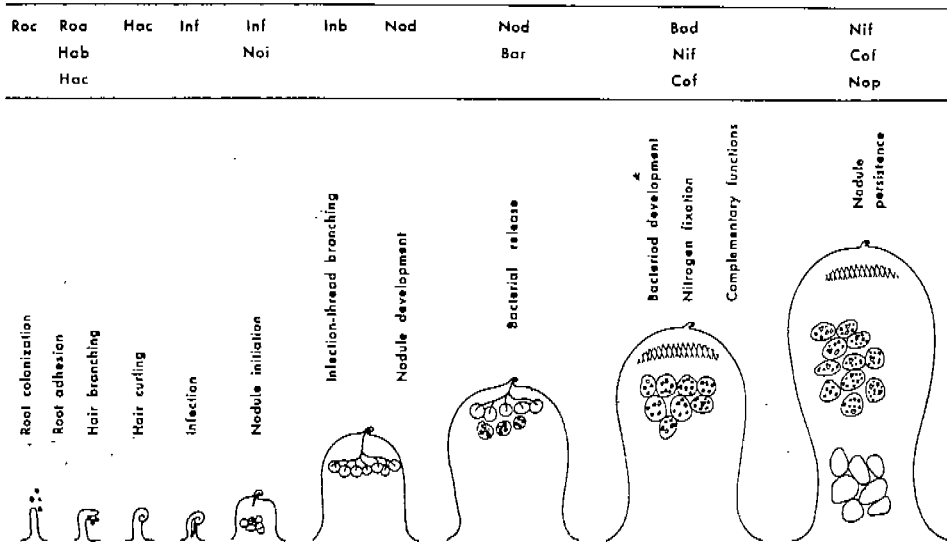


Fig. 3. Development of an indeterminate-type nodule. Steps in the development of nodule showing the phenotype exhibited by bacterial mutants defective in particular stages of the symbiosis.

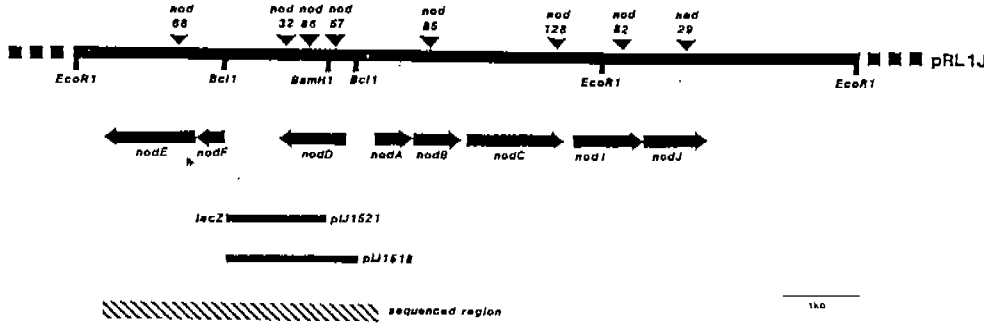


Fig. 4. Nodulation genes of *R. leguminosarum* symbiotic plasmid pRL1J1. The extent of the *nod* gene protein coding regions within the 10-kb nodulation regions is indicated by arrows and representative Tn5 mutations are shown by triangles.

일어나고 고정산물을 식물과 공생균이 이용하면서 뿌리혹이 유지되는 질소고정 과정이다. Fig. 4의 상단에 표시된 유전자는 모두 공생균의 유전자지만 전과정에 걸쳐서 leghemoglobin, nodulin과 같은 식물의 유전자가 관여하며 효율적인 뿌리혹을 형성하기 위해서는 전과정이 모두 성공적으로 이루어져야만 한다. 이러한 뿌리혹형성 과정의 특징을 몇가지 들여보면 매우 복잡하고 연속적인 반응이며, 공생 관계에 따른 특이성이 있으며, 인식과 침입과정에 관여하는 유전자는 일시적으로만 발현되며, 인식 및 침입과정과 질소고정능력은 상호작용에 의해서 결정된다는 점이다.

지금까지 언급된 뿌리혹형성의 각 단계를 좀 더 자세히 살펴보자.

숙주식물의 뿌리가 homoserin과 같은 물질을 분비하면 토양미생물 중에서 공생균만이 뿌리부근에서 번식하게되고 공생균은 chemotaxis에 의해서 뿌리로 접근하여 뿌리털에 부착하게 된다. 이러한 초기 인식단계에 의한 접촉은 숙주식물과 공생균에 따라서 특이하며 lectin이라는 식물단백질에 의해서 cross-bridge를 형성함으로써 이루어진다고 생각하고 있다(Dazzo and Truchet, 1983). 예를들면 크로바의 뿌리에서 생성된 trifolin A라는 multivalent lectin이 식물 뿌리털 표면과 *R. trifolii* 표면 capsule에 모두 존재하는 2-deoxyglucose와 결합하여 특이적인 결합을 중재하고 있다.

인식된 공생균은 pili 혹은 cellulose fiber라고 생각되는 fibrillar material 을 형성하면서 뿌리털에 밀접하게 부착하면 뿌리털은 분지하거나 (branching) 또는 꼬부라지는 반응(curling)을 나타낸다. 꼬부라짐은 생장 호르몬의 분포 차이에서 기인할 것으로 생각되며 공생균이 뿌리털과 밀접한 접촉을 유지하게 하여서 침입을 용이하게 하는 것으로 알려져 있다 (Rolfe and Shine, 1984).

공생균이 뿌리내부로 침입하는 과정은 틈이나 뿌리털을 통해서 일어나는데 뿌리털을 통해서 침입할 경우는 cellulase나 pectinase와 같은 세포막 분해효소가 공생균에 의해서 생성된다. 일단 침입이 성공하면 숙주세포의 방어기작은 억제되면서 cellulose나 hemicellulose와 같은 세포막 물질을 분비하여 들어오는 균을 둘러싸게 되어 (encapsulation) 침입사(infection thread)가 형성된다 (Dazzo and Gardiol, 1984). 침입사 내에서 공생균은 자신이 분비한 matrix에 싸인체로 분열을 계속하면서 침입사가 성장하여 피층세포를 계속 침입하게 된다. 침입된 피층세포가 분열을 시작하면서 prenodule을 형성하고 공생균은 침입사의 끝부분으로부터 unwalled droplet형식으로 방출되면서 peribacterial membrane 이라는 원형질막으로 둘러싸이게 된다. 세포내에 방출되어 숙주세포의 막성분으로 둘러싸인 공생균은 형태적 생리적 변화를 거치면서 bacteroid상태로 분화하게 된다 (Verma and Nadler, 1984).

4. 뿌리혹 형성 관련 유전자 (Nod-genes)

이상 살펴본 초기 인식과정과 침입과정을 비롯한 뿌리혹형성에 관여하는 공생균의 유전자를 Nod-유전자라고 부르며, 이들은 *R. leguminosarium*이나 *R. trifolii*의 경우는 10 - 14Kb부위에 밀집해 있으나 *R. melliloti*의 경우는 약 12Kb 떨어진 두 곳에 밀집해 있고 모든 경우 sym-plasmid에 존재하고 있다 (Kondorosi *et al*, 1984).

Nod-유전자는 지금까지 A부터 J까지 10개가 알려져 있는데 이 중에서 Nod-A,B,C는 뿌리털의 꼬부라짐에 관여하는 유전자들로서 다른 공생균의 상응 유전자와 교환하여도 기능을 갖는 것으로 보아 conserved nod gene 이라고 부르고 있다 (Shearman *et al.*, 1986; Fig. 4). Nod C는 소수성 C-말단을 갖는 단백질로 공생균의 외막과 연관이 있으며 Nod J 역시 소수성 단백질로 공생균의 막내단백질로 추측되며 Nod I는 active-transport에 관여하는 것으로 알려진 ATP-binding 단백질로서 Nod C,I,J 모두는 공생균의 막성분에 관계되는 단백질이다. 한편 Nod F,E,G,H는 모두 숙주특이성에 관계되는 유전자로 알려져 있는데 Nod F는 acyl-carrier 단백질로서 공생균의 lipopolysaccharide나 exopolysaccharide의 생합성에 관여하는 유전자이다(Downie and Johnston, 1986).

이들의 발현기작은 이들의 promotor 부위와 lactose 오페론의 lac Z 유전자를 융합시켜서 β -galactosidase의 발현을 조사함으로써 연구되었는데 Nod-유전자 의 발현은 전사 수준에서 조절되며 Nod D 유전자 산물이 중심적인 역할을 하는 것으로 알려졌다. 즉 Nod D는 항상 발현되지만 이들이 다른 Nod-유전자의 발 현을 촉진시키기 위해서는 식물요소를 반드시 필요로 한다(Downie and Johnston, 1986).

Nod D 산물과 식물요소에 의해서 Nod A,B,C 뿐만아니라 Nod F,E도 발현이 촉진 되므로 Nod D를 중심으로 Nod A와 Nod F의 전사시작 부위의 염기 서열을 조사한 결과, Nod A 의 전사부위로부터 약 250bp 상류와 Nod F의 전사부위로부터 약 180bp 상류에 대칭서열을 갖고 있으며 잘 보존된 Nod box라고 부르는 30bp 정도의 서열이 존재함이 밝혀졌다 (Shearman *et al.*, 1986; Fig. 5). Nod box외에도 Nod A 상류에는 A₂, A₃의 대칭구조와 A.T-rich 서열이 존재하고, Nod F 상류에는 상응하는 위치에 F₂와 A.T-rich 서열이 있고 F₃와 F₄의 대칭서열이 존재하고 있음이 밝혀졌다.

이러한 연구로 Nod box가 조절기작에 관여하는 부위로 추정되므로 Nod D가

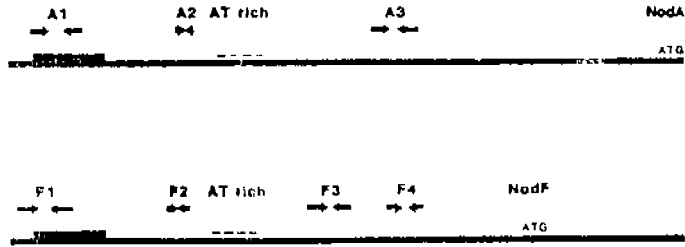


Fig. 5. DNA secondary structure regions. The upper line represents the DNA sequence preceding *nodA* and the lower line the sequence preceding *nodF*, and the diagrams are aligned at the highly conserved regions (heavy line). The regions of dyad symmetry are indicated by convergent arrows and numbered A1-A3 and F1-F4. The AT-rich regions are indicated by broken lines.

Nod-유전자들의 activator로 작용하는 기작을 밝히기 위하여 Nod D의 염기서열로부터 아미노산의 서열을 추정하고 이들을 DNA-binding 단백질인 ara C의 아미노산 서열과 비교하였다. 그 결과 Nod D는 ara C와 동일한 아미노산들을 가지고 있을 뿐만아니라 다른 DNA-binding 단백질에서 공통적으로 발견되는 아미노산을 포함하고 있어서 Nod D가 Nod box에 결합하는 단백질임을 알 수 있다 (Shearman *et al.*, 1986). 일반적으로 activator나 repressor와 같은 조절 단백질이 DNA에 결합할 때는 단백질의 두개의 82df-helix가 DNA 나선의 한 turn에 해당하는 $34A^0$ 떨어져서 결합한다. 그러나 Nod D의 경우는 공통 아미노산이 helix 2 부위에만 존재하므로 한 helix 만이 Nod box와 결합할 것이라는 추측을 할 수 있다.

Nod D가 activator로 작용하기 위해서는 식물요소가 필요한데 이들은 flavone, flavanone과 같은 15개의 탄소가 두개의 고리를 이룬 flavonoid이다 (Redmond *et al.*, 1986; Fig. 6). 이들은 10 nM - 100 nM의 아주 낮은 농도에서 Nod-유전자의 inducer로 작용하는 데 최소한 B-고리에 OH기가 한개 이상 있어야만 활성을 갖는다. 만일 C3 위치가 당이나 페닐기로 대체되면 활성이 없어지며 특히 콩과식물에 많이 존재하여 allelo chemical로 작용하는 isoflavonoid의 경우는 C3에 B-고리가 결합하고 있어서 Nod-유전자의 억제제로 작용한다. 따라서 자연상태에

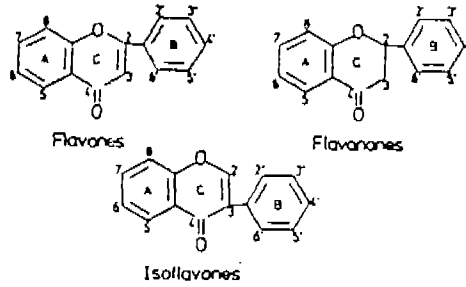


Fig. 6. Skeleton and numbering nomenclature for the flavonoids.

존재하는 많은 flavonoid 화합물 중 일부는 촉진제로 작용하며 다른 일부는 억제제로 작용한다.

이러한 연구로부터 뿌리혹형성의 초기과정에서 일어나는 숙주식물과 공생균의 상호작용을 정리해 보면, 식물의 뿌리에서 flavonoid가 분비되면 공생균의 Nod-유전자들이 발현되면서 공생균의 외막에 형태적 생리적 변화가 일어나고 그 결과 공생균은 호르몬과 효소등의 물질을 방출하여 뿌리털의 분지 혹은 꼬부라짐, 뿌리혹 분열조직의 형성 및 침입사의 형성을 유도하게 된다(Downie and Johnston, 1986; Fig. 7) 따라서 Nod-유전자의 발현은 공생균의 Nod D에 의해서 뿐만아니라 숙주식물의 flavonoid에 의해서 협동적으로 조절되고 있다.

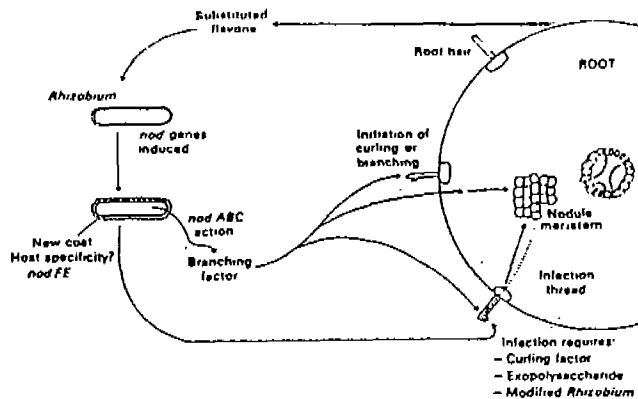


Fig. 7. A model outlining the events of nodulation.

5. 질소고정 효소체

대기질소가 실제로 암모니아로 고정되는 것은 nitrogenase라는 효소체에 의해서 이루어지며 이들의 생성에 관여하는 유전자들을 모두 Nif-gene 이라고 부른다. Nitrogenase 효소체는 Component I와 Component로 구성된 복합단백질 효소이며 Fe-Mo 단백질 혹은 nitrogenase 라고 부르는 Comp. I은 서로 다른 폴리펩티드가 두개씩 모여서 이루어진 사합체이며 대기질소를 결합시켜서 질소원자 사이의 삼중결합을 절단하고 e^- 와 H^+ 를 첨가시켜 암모니아로 고정하는 역할을 담당하고 있다. Fe-단백질 혹은 nitrogenase reductase라고 부르는 Comp. II는 동일한 폴리펩티드가 두개 모여서 이루어진 이합체이며 Mg-ATP 결합에 의해서 활성화되어 e^- 을 nitrogenase의 Fe^{2+} 로 이동해주는 역할을 담당하며 특히 산소에 대한 감수성이 매우 높아 $t_{1/2}$ 은 1분 이내가 된다 (Sprent, 1979; Fig. 8). Comp. I과 Comp. II는

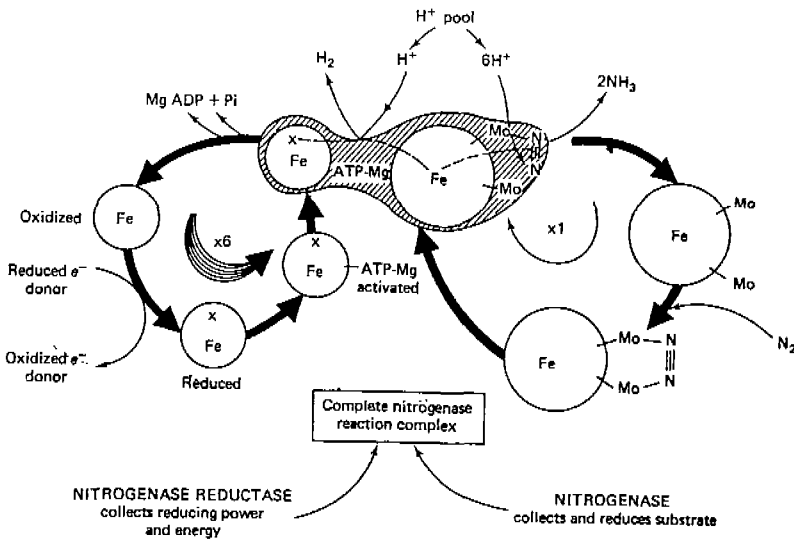


Fig. 8. Two parts of the nitrogenase enzyme complex are necessary in order to reduce atmospheric nitrogen into ammonia.

독립적으로 작용할 수 없으며 질소고정을 위해서는 반드시 두 성분이 공존해야만 한다. 다양한 질소고정균으로부터 분리한 Comp. I 과 Comp. II는 서로 대치될 수 있으며 아미노산서열 역시 매우 유사하여 질소 고정 효소체가 진화하는 동안 매우 안정되게 유지되어 왔음을 알 수 있다.

6. 질소고정 효소체 관련 유전자 (Nif-genes)

Nif-유전자의 구조 및 발현의 조절기작은 독립생활을 하는 *Klebsiella pneumoniae*에서 가장 잘 알려져 있는데 이 경우 17개의 유전자가 일곱개의 오페론을 이루고 있다(Roberts and Brill, 1981; Fig. 9).

Nif H는 nitrogenase reductase의 구조 유전자이며 활성화되기 위해서는 nif M,S 유전자가 필요하며, nif K,D는 nitrogenase의 두개의 폴리펩티드를 지시하는 유전자이며 활성화되기 위해서는 Fe-Mo cofactor를 지시하는 nif Q,B와 함께 nif N,E유전자가 필요하며, nif F,J는 전자이동에 관여하며, nif S,A는 전체 nif-오페론의 조절에 관여한다.

Nif-유전자의 염기서열을 DNA-DNA 혼성화 실험으로 조사한 결과 nif-유전자

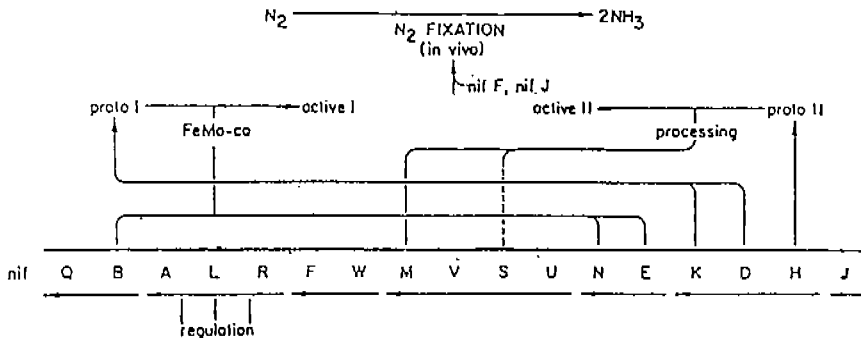


Fig. 9. Nif-genes and their functions in *Klebsiella pneumoniae*. Arrows represent operons based on complementation analysis with polar mutations.

중에서 질소고정효소체의 구조유전자인 *nif* K,D,H 부분만이 잘 보존되었다 (Ruvkan and Ausubel, 1980). 그러나 그들의 구조는 질소고정균에 따라서 다 양하다. 즉 *Klebsiella*나 *R. trifolii* 및 *R. leguminosarium*에서는 이들이 연속적으로 배열되어 있으나 생장속도가 느린 *R. japonicum*이나 *Parasponia rhizobium*인 경우는 *nif* H가 *nif* D,K와 약 21Kb 떨어져서 존재한다 (Weiman *et al.*, 1984). 더우기 남조류인 *Anabaena* 경우는 질소고정을 하지 않는 영양세포에서는 *nif* K가 *nif* D,H와 11Kb 떨어져 존재하지만 질소고정을 하는 heterocyst에서는 11Kb가 절단되고 연속적인 배열을 가지게 되어 세포분화에 따른 DNA 수준에서의 splicing이 일어남을 알 수 있다 (Golden *et al.*, 1985).

Nif K,D,H의 염기성을 조사한 결과 전체적인 유사성에도 불구하고 적어도 다섯 그룹의 질소고정균이 있는 것이 밝혀졌다 (Scott *et al.*, 1983; Fig. 10). 즉 혐기성인 *Clostridium*은 다른 질소고정균과 약 70-80% 분지되었으며 빠른 생장을 하는 *R.*

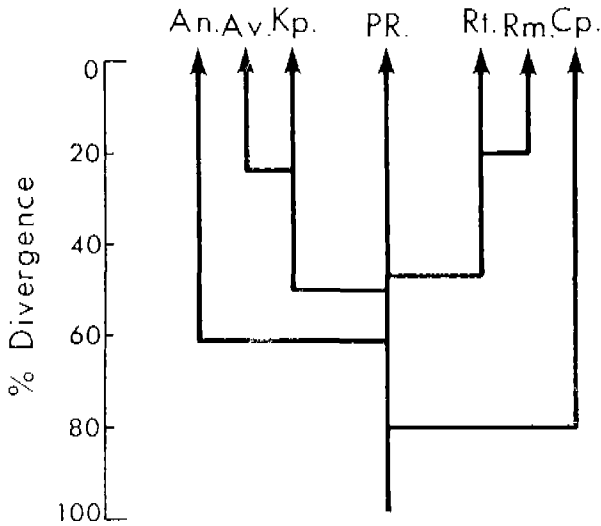


Fig. 10. Divergence of Fe-protein sequences. An, *Anabaena* 7120; Av, *Azotobacter vinelandii*; Kp, *Klebsiella pneumonia*; PR, *Parasponia Rhizobium* sp ANU289; Rt, *Rhizobium trifolii*; Rm, *Rhizobium meliloti*; Cp, *Clostridium pasteurianum*.

*trifolii*와 *R. melliloti*는 한 그룹으로 약 20% 분지되었고 독립생활을 하는 *Klebsiella*와 *Azotobacter*도 한 그룹으로 약 24% 분지하며 *Parasponia rhizobium*은 두 그룹과 약 50% 분지되었다. 이러한 결과는 *Rhizobium*에는 적어도 두 그룹이 존재하며 진화하는 동안에 공생관계가 적어도 두번 일어났을 가능성을 시사해 준다.

Nif-유전자의 위치는 빨리 자라는 *Rhizobium*의 경우는 다른 균으로 이동될 수 있는 plasmid에 존재하는데 이곳에는 nif-유전자 외에도 뿌리털의 꼬부라짐이나 뿌리혹형성에 관여하는 유전자가 위치하고 있어서 이들을 sym(biosis)-plasmid 라고 부른다. 그러나 천천히 자라는 *Rhizobium*이나 빨리 자라는 plasmid가 없는 종류는 nif-유전자가 공생균의 DNA에 존재한다 (Masterson *et al.*, 1982). Sym-plasmid에는 nif-유전자와 nod-유전자 외에도 bacteriocin 생성, 색소생성, 이동성 및 불화합성에 관여하는

Table 2. Biological functions located on sym plasmids in *Rhizobium* strains

Medium bacteriocin production (Mbp ⁺)
Repression of small bacteriocin production (Rsp ⁺)
Repression of bacteriocin production (Rsp ⁺)
Nodulation ability
Root adhesion (Roa ⁺)
Hair curling (Hac ⁺)
Host range specificity
Nodule function (Fix ⁺)
Nitrogenase enzyme complex <i>nif</i> H (Fe-protein)
<i>nif</i> D (-subunit of Mo, Fe-protein)
Hydrogenase (Hub ⁺) production
Genes influencing cell surface polysaccharide synthesis
Pigment production (Pig ⁺)
Transfer functions (Tra ⁺)
Incompatibility
Chromosome mobilization ability (Cma ⁺)

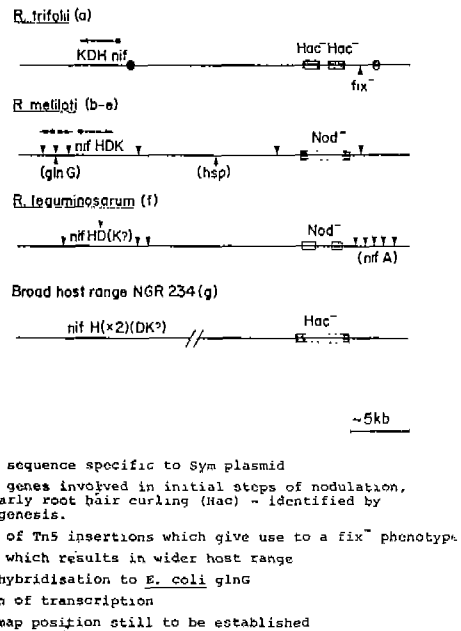


Fig. 11. Molecular anatomy of the Nif-Nod region on sym plasmids of the fast-growing rhizobia.

유전자들이 존재하며 특히 hydrogenase(hup- 유전자 산물)은 기질 특이성이 약한 nitrogenase에 의해서 생성된 수소를 다시 e^- 과 H^+ 으로 분리시켜서 e^- 과 ATP의 소모를 막아주는 역할을 하고 있다 (Rolfe and Shine, 1984; Table 2).

Sym-plasmid에 nif-유전자와 nod-유전자가 함께 존재할 때는 서로 약 20Kb - 30Kb 떨어져 있으며 중간에서 일어나는 돌연변이는 질소고정능력에 큰 변화를 일으키지 않는다 (Rolfe and Shine, 1984; Fig. 11). *R. trifolii*의 경우는 반복서열이 sym-plasmid에 존재하며 자연발생적으로 질소 고정능력이 상실되는 점으로 미루어 이들이 재조합의 과열점으로 작용하며 전체적인 구조는 transposon과 유사함을 알 수 있다. 한편 Gln(G)와 같은 유전자가 *R. melliloti*의 경우 sym-plasmid에 존재하는데 이 유전자는 nif-유전자의 조절기작에 관여한다.

질소고정균에 의해서 암모니아로 고정된 질소는 peribacterial membrane을 통과하여 숙주식물의 세포질로 방출되어 숙주식물의 glutamine synthetase에 의해서 glutamine이나 asparagine과 같은 amide나, allantoin이나 allantoic acid와 같은 ureid로 동화되어 식물체와 공생균이 이용하게 된다(Mifflin and Cullimore, 1984). 그러나 뿌리혹 내의 질소고정능력은 O_2 나 molybdenum의 농도 외에도 고정된 질소 화합물의 농도에 따라서 결정된다. 따라서 nif-유전자의 발현은 nif L,A에 의해서 직접적으로 조절되는 동시에 뿌리혹내의 질소 화합물의 농도에 의해서도 조절된다.

*E. coli*나 *Salmonella*와 같은 세균에서 일반적으로 질소동화에 관여하는 유전자들, 즉 glutamine synthetase 유전자 (gln A) 나 histidine, arginine 및 proline을 이용하는 유전자들은 총괄적으로 ntr A(gln F)와 ntr C(gln G)에 의해서 발현이 억제된다(Mifflin and Cullimore, 1984; Fig. 12-a). 질소고정능력이 있는 *Klebsiella*의 경우도 이들 유전자들의 조절기작은 질소고정능력이 없는 *E. coli*나 *Salmonella*와 유사하며, nif-유전자 역시 ntr-system에 의해서 조절되고 있다 (Mifflin and Cullimore, 1984; Fig. 12-b). 즉 질소화합물이 결여된 상태에서는 ntr A나 ntr C가

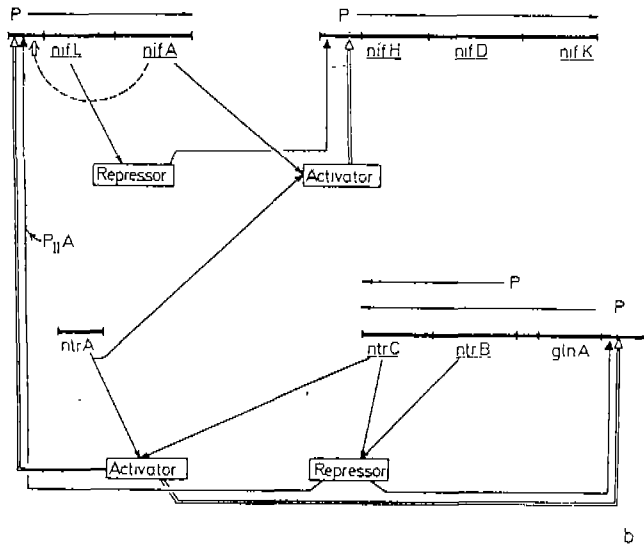


Fig. 12. Regulation of nitrogen metabolism in bacteria. (a). A model for the nitrogen regulatory control system in *E. coli* and *S. typhimurium*. The genes are given both their alternative (*ntr*) and their original nomenclature (*gln*). P indicates promoter regions. (b). Regulatory control for the expression of *nif* genes in *K. pneumoniae*.

activator로 작용하며 *nif L,A*의 발현을 촉진시키면 *nif A*와 *ntr A*가 협동하여 *nif H,D,K*의 발현을 촉진시킨다. 한편 산소의 분압과 암모니아의 농도가 증가하면 *nif L*의 산물이 inhibitor로 작용하여 *nif H,D,K*의 발현을 억제하며, 고정된 질소화합물의 농도가 높아지면 *ntr B*와 *ntr C*가 inhibitor로 작용하여 *nif K,D,H*의 전사를 억제한다. 그러나 공생균인 *Rhizobium*의 경우는 *nif K,D,H*의 구조가 *Klebsiella*와 유사하며 *nif A*에 의해서 다른 *nif*-유전자들의 전사가 촉진되지만 *nif L,A*의 전사가 *ntr A*와 *ntr C*에 의해서 직접 촉진되지는 않으며 낮은 산소의 분압이나 특수한 대사산물과 같은 공생관계의 성립과정에서 나타나는 신호에 의해서 *nif L,A*가 활성화 되는 것으로 알려지고 있다.

Nif-유전자의 발현을 조절하는데 매우 중요한 요소인 *ntr A*는 새로운 sigma factor로 알려져 있으며 *nif A*는 *nif H*, *nif D,K* 및 *nif F*의 *nif*-유전자에 모두


```

5'-TTA G T G C T - C A T G A G A C C C T G G C A T G C C G G T T G C A A A G T C T T G G A T C A A G A G...37bp...ATG.. Rj nifD
   A A G G T G C C G G G T T A G A C C C T T G G C A C G C C T G T T G C T A A A G C G G C A G C A C A C...143bp...ATG.. Rj nifH

T A A T A A G C G C G G A C A G T G T T G G C A T G G C G A T T G C T G T T G A G I T G C A G C A A C A C...142bp...ATG.. Rp nifH
T A G T T T T A T T T C A G A C G G C T G G C A C G A C T T T G C A C G A T C A G C C C I G G G C G C G...62bp...ATG.. Rm nifH
A T A C A T A A A C A G G C A C G G C T G G T A T G T T C C T G C A I C T T C T C T G C T G G C A A A C A...22bp...ATG.. Kp nifH
G C G G T A G T G C A A A G C A A C C T G G C A C A G C C T T C G C A T A C C C C T G G G A G A A C G C...35bp...ATG.. Kp nifF
T C T G C A C A T C A C G C C G T A A G G G C G C A C G G T T T G C A T G G T T A T C A C C G T T C G G A...65bp...ATG.. Kp nifL

```

Fig. 13. Nucleotide sequence of the promoter region of the *R. japonicum* (Rj) *nifDK* operon (top line). The depicted sequence corresponds to the region from positions -89 to -38. The transcription start point as determined by nuclease S1 mapping is indicated by an arrow. The dashed lines enclose the consensus *nif* promoter sequence as proposed by Beynon *et al.* (1983). The other boxes enclose directly homologous nucleotides between the *R. japonicum nifDk* and *nifH* promoters.

activator로 작용하므로 *nif*-유전자들의 promotor 서열을 조사하였다. 그 결과 *R. japonicum*의 *nif D*와 *nif H*의 promotor는 매우 유사하며 다른 *Rhizobium*의 *nif H*나 *Klebsiella*의 *nif H*, *nif L*, 및 *nif F*의 promotor와도 매우 유사한 서열을 갖고 있다 즉 전사시작의 10 - 30bp 상류에 CTGG-86p-TTGCA-3 라는 공통적인 *nif* promotor 서열이 존재하고 있어서 이곳이 *nif A*가 activator로 작용하는 부위임을 알 수 있다 (Kalyza and Hennecke, 1984; Fig.13).

7. 숙주식물 유전자

공생균은 질소고정능력이 있지만 일반적으로 독립생활을 할 경우는 질소고정을 하지 않고 식물체의 내부에서만 질소를 고정하므로 질소고정 공생관계의 전단계에 걸쳐서 숙주식물의 유전자가 관여할 것으로 생각된다. 또한 오랫동안 뿌리혹의 크기, 수효, 출현시기, 형태 및 질소고정능력과 같은 공생관계의 모든 부분에 영향을 미치는 식물의 유전자가 있다는 것이 알려져 왔으나 이들에 대한 연구는 leghemoglobin이나 nodulin을 제외하고는 전혀 이루어지지 않은 실정이다.

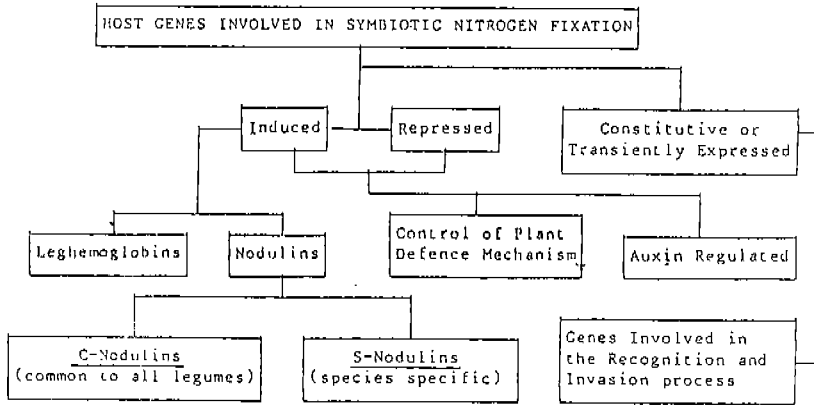


Fig. 14. Various host genes which appear to be involved in symbiotic N₂-fixation.

그러나 전통적인 유전학적 방법과 변종에 대한 연구로 관련 유전자들을 몇가지 group으로 나눌 수 있다(Verma and Nadler, 1984; Fig. 14). 즉 첫번째는 이미 "식물유전자의 특성"에서 언급되었던 leghemoglobin이나 nodulin과 같은이 뿌리혹에서만 발현이 유도되는 유전자, 두번째는 방어가작에 관여되는 유전자와 같이 뿌리혹형성 시 발현이 억제되는 유전자, 세번째는 초기의 인식과 침입에 관여하는 유전자와 같이 공생기간 동안 일시적으로만 발현되는 유전자, 네번째로는 뿌리털의 꼬부라짐이나 뿌리혹 분열조직의 유도에 관여하는 유전자처럼 식물 호르몬에 의해서 영향을 받는 유전자가 있다.

결 론

이상으로 질소고정 공생관계를 단계별로 살펴보면서 관련된 유전자들을 정리하여 보았다. 그러나 질소고정능력을 인간의 복지를 위해 이용하기에는 아직도 해결해야만 할 문제들이 너무도 많이 남아 있다. 특히 숙주식물의 유전자에 대한 연구는 시급한 실정이라고 하겠다.

현 상태에서 질소고정 능력을 효과적으로 이용하기 위한 연구의 방향은 크게 세가지로 나눌 수 있겠다. 첫번째는 *Azolla-Anabaena*나 초본식물-*Azospirillum*과 같이 식물과 연관된 체제를 보다 효율적으로 이용함으로써 필요한 질소비료의 양을 감소시킬 수 있을 것이다. 두번째는 기존의 질소고정 공생관계를 효율적으로 이용하는 방법으로, 질소고정능력이 없는 세균에 질소고정능력을 부여한다든지 hydrogenase나 내병성 및 제초제에 대한 저항성 등에 관여하는 유용한 유전자를 sym-plasmid에 삽입시켜서 질소고정 능력을 향상시키는 외에도 유용한 새로운 형질을 도입할 수 있을 것이다 (De jong *et al.*, 1982; Kondorosi *et al.*, 1982). 세번째는 숙주범위를 확대시켜서 새로운 공생관계를 확립하는 방법으로 이를 위해서는 공생균의 nod-유전자와 식물병균의 vir-유전자 및 식물의 방어기작에 관여하는 유전자들에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

끝으로 장기적인 연구 방향으로는 자체로서 질소를 고정할 수 있는 식물을 개발하는 것이다. 현재로서는 가장 실현 가능성이 낮으며 많은 연구가 이루어져야 하겠지만 가능성을 제시하는 연구자들도 있다. 즉 질소고정에 필요한 nif-유전자들을 식물체에 주입시켜서 식물이 자체적으로 질소를 고정하게 한다는 방법이다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 식물 유전자의 cloning, vector의 개발, 식물세포의 형질전환, 조직배양에 의한 개체분화 및 field-test의 단계가 필요한데 아마도 가장 어려운 문제는 nif-유전자들을 모두 삽입하는 장소가 될 것으로 생각된다. 질소고정의 필수적인 요건을 낮은 산소의 분압과 ATP의 공급이라고 본다면 mitochondria를 적절한 장소로 생각하는 연구자도 있다.

참 고 문 헌

1. Beynon, J., M. Cannon, V. Buchanan-Wollaston and F. Cannon. 1983. The

- nif promoters of *Klebsiella pneumonia* have a characteristic primary structure. Cell 34: 665-671.
2. Dazzo, F.B. and A.E. Gardiol. 1984. Host specificity in *Rhizobium*-legume interaction. In, Plant Gene Research. Genes involved in microbe-plant interaction. D.P.S. Verma and TH. Hohn (eds.), PP.1-32, Springer-Verlag Wein, New York.
 3. Dazzo, F.B. and G.L. Truchet. 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. J. Membrane Biol. 73: 1-6.
 4. Downie, J.A. and A.W.B. Johnston. 1986. Nodulation of legumes by *Rhizobium*: The recognized root ? Cell 47: 153-154.
 5. De jong, T.M., J.J. Brewin, A.W. Johnston and D.A. Phillips. 1982. Improvement of symbiotic properties in *Rhizobium leguminosarium* by plasmid transfer. J. Gen. Microbiol. 128: 1829-1838.
 6. Golden, J.W., S.J. Robinson and R. Haselkorn. 1985. Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. Nature 324: 419-423.
 7. Kaluza, K. and H. Hennecke. 1984. Fine structure analysis of the nif DK operon encoding the subunits of dinitrogenase from *Rhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. 196: 35-42.
 8. Kondorosi, A., W. Kondorosi, C.E. Pankhurst, W.J. Broughton and Z. Banfall. 1982. Mobilization of a *Rhizobium melliloti* megaplasmid carrying nodulation fixation genes into other rhizobia and *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 188: 433-439.
 9. Kondorosi, E., Z. Banfali and A. Kondorosi. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium melliloti* Identification of nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 193: 445-452.
 10. Masterson, R.V., P.R. Russell and A.G. Atherly. 1982. Nitrogen fixation genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 152: 928-931.
 11. Mifflin, B.J. and J.V. Cullimore. 1984. Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: A joint endeavour. In, Genes Involved in Microbe-Plant Interaction D.P.S. Verma and TH. Hohn, pp. 129-178, Springer-Verlag Wein, New York.
 12. Pommer, E.H. 1959. Über die isolierendes endophyten aus den wurzelknöllchen *Alnus glutinosa* Gaertn, und über erfolgreiche reinfektionsversuche. Ber. Bot. Gesell. 72: 138-150.
 13. Prakash, R.K. and A.C. Atherly. 1986. Plasmids on *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. Int. Rev. Cyt. 104: 1-24.
 14. Redmond, J., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.N. Innes, P.L. Innes, P.L. Kuempel and B.G. Rolfe. 1986. Flavones induce expression of nodulation

genes in *Rhizobium*. Nature 323: 632-634.

15. Roberts, G.P. and J. Brill. 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. Ann. Rev. Microbiol. 55: 207-235.
16. Rolfe, B.G. and J. Shine. 1984. *Rhizobium*-leguminosae symbiosis: The bacterial points of view. In, Gene Involved in Microbe-Plant Interaction. D.P.S. Verma and TH. Hohn (eds.), pp. 95-128, Springer-Verlag Wein, New York.
17. Ruvkun, G.B. and F.M. Ausubel. 1980. Interspecies homologies of nitrogenase genes. Proc. Nat'l. Acad. Sci. 77: 191-195.
18. Scott, K. F., B.G. Rolfe and J. Shine. 1983. Nitrogenase structural genes are unlinked in nonlegume symbiont, *Parasponia rhizobium*. DNA 2: 141-148.
19. Searman, C.A., L. Rossen, A.W.B. Johnston and J. A. Downie. 1986. The *Rhizobium leguminosarium* nodulation gene nod F encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nod D plus a factor in pea root exudate. EMBO J. 5: 647-652.
20. Sprent, J. T. 1979. the Biology of Nitrogen-fixing Organisms. pp.13- 25, Mcgraw-Hill Co. (UK) Limited.
21. Torrey, J.G. 1978. Nitrogen fixation by Actinomycete-nodulated angiosperms. BioScience 28: 586-592.
22. Verma, D.P.S. and K. Nadler. 1984. Legume-*Rhizobium* symbiosis. Host's point of view. In, Genes Involved in Microbe-Plant Interaction. D.P.S. Verma and TH. Hohn (eds.), pp. 57-93, Springer-Verlag Wein, New York.
23. Verma, D.P.S. and S.H. Long. 1983. The molecular biology of *Rhizobium*-legume symbiosis. Int. Rev. Cyto. Supp. 14: 211-245.
24. Welnman, J.J., F.F. Fellowa, P.M. Gresshoff, I. Shine and K.F. Scott. 1984. Structural analysis of the genes encoding the molybdenum iron-protein in the *Parasponia rhizobium* strain NAI 1289. Nucl. Acids Res. 12: 8329-8344.

저 자 약 력

안 정 선 (安 正 善) 박사

1949. 4. 17. 생

1971 서울대학교 식물학과 (이학사)

1976 서울대학교 대학원 식물학과 (이학석사)

1982 미국 Tennessee대학교 대학원 식물학과 (Ph. D.)

1978 - 85 미국 Tennessee대학교 연구교수 및 연구조원

1985 - 현재 서울대학교 교수

1985 - 88 미국 Rockefeller재단 연구교수