

## *Rhizobium meliloti*와 *Bradyrhizobium japonicum*의 Ribosomal RNA 유전자에 관한 연구

강홍규\*·김달웅\*·하지홍  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과  
\*경북대학교 농과대학 농학과

## Studies on the Ribosomal RNA genes of *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum*

Kang, Hong-Kyu\*, Kim, Dal-Ung\*, and Ha, Ji-Hong

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

\*Department of Agronomy, College of Agriculture, Kyungpook National University,  
Taegu 702-701, Korea

**ABSTRACT:** The genes for ribosomal RNA in *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* were analyzed by southern hybridization of BamHI, EcoRI, HindIII digested chromosomal DNA with purified 5' <sup>32</sup>P-labeled 16S and 23S rRNA. The big differences in the hybridization pattern of both rhizobia were found. The comparative results were discussed in relation to the copy number and conservativity of restriction sites in the rRNA genes of both rhizobia.

**KEY WORDS** □ *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, Ribosomal RNA gene, Southern hybridization

*E. coli*를 비롯한 많은 박테리아로부터 ribosomal RNA 유전자의 copy 수와 구성에 관한 연구가 보고되어 왔다. *E. coli*의 경우 rRNA 유전자는 7개의 operon으로 구성되어 있고 각각의 operon은 5'-16S·23S·5S-3'순서로 연결되어 있으며 16S와 23S rRNA 유전자 사이에 몇개의 tRNA 유전자를 포함하고 있다(Morgan 등, 1982). *Bacillus subtilis*(Potter 등, 1977; Zingales 등, 1977) *Mycobacterium bovis*(Susuki 등, 1986), *Streptomyces lividans*(Susuki 등, 1988) 등의 rRNA 유전자들도 operon의 copy 수만 서로 다를 뿐 *E. coli*와 동일한 구성을 나타내는 것으로 각각 보고되었다. 그러나 *Beneckea harveyi*의 16S, 23S 및 5S rRNA 유전자는 서로 연결해 있기는 하지만 배열순서에 있어서 *E.*

*coli*와 차이를 보이고 있음이 보고된 바 있다(Lamfrom 등, 1978). 또한 *Mycoplasma capricolum*의 rRNA 유전자는 16S와 23S 유전자 사이에 tRNA 유전자가 없으며(Sawada 등, 1984), archaeobacteria인 *Methanococcus vanniellii*는 *E. coli*와 동일한 배열을 가진 4개의 operon 이외에 5S rRNA 유전자만으로 구성된 operon이 1개 더 존재하는 것으로 각각 보고되었다(Jarsch 등, 1983). Nichols 등(1982)은 cyanobacteria의 rRNA operon copy 수가 종들간에 큰 차이를 보이고 있음을 밝혔는데, 이같은 copy 수의 차이가 염색체 크기와 상관관계가 있음을 보고하였다.

rhizobia는 질소고정세균들 가운데 가장 폭넓게 연구된 미생물중 한 부류로서 *R. meliloti*는 알팔

파에 *B. japonicum*은 대두에 각각 뿌리혹을 형성하여 대기중의 질소를 고정, 식물체에 공급함으로써 (Subba, 1977) 농업경제상 중요한 위치를 차지하고 있는 미생물이다.

이들 rhizobia에 대한 유전학적 연구는 생물학적 질소고정의 경제적 가치로 말미암아 대부분의 연구가 질소고정과 관계된 유전자들, 즉 *nif*, *nod*, *inf* 등의 연구에 집중됨으로서 다른 유전자 또는 다른 방향의 유전학적 연구는 다소 소홀한 경향을 보여왔다. 특히 rhizobia의 ribosomal RNA 유전자의 copy 수와 구성에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없다.

Ribosome의 생합성 속도는 전체세포 중량의 증감과 상관관계가 있으며, rRNA 유전자의 발현은 세포증식 속도의 지표가 될 수 있기 때문에 세포증식 속도가 다른 rhizobia group간의 rRNA operon의 수와 구성에 관한 비교는 매우 가치있는 연구가 될 것으로 믿어진다 (Lindahl 등, 1982). 따라서 본 연구는 fast grower인 *R. meliloti*와 slow grower인 *B. japonicum*의 rRNA operon에 관한 정보를 얻기 위해  $^{32}\text{P}$ 로 labeling된 rRNA 분자를 probe으로 사용하여 몇가지 제한효소에 의해 분해된 *R. meliloti*와 *B. japonicum*의 chromosomal DNA에 Southern hybridization을 행했으며, 이로부터 얻어진 rRNA operon 구성과 copy 수의 차이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

## 실험재료 및 방법

### 균주 및 배지

실험균주로는 fast grower인 *Rhizobium meliloti* 9930과 slow grower인 *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110을 사용하였고, 생육배지로는 YM 배지 (Mannitol 10g, Yeast extract 0.5g, NaCl 0.1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.18g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  4mg/l)를 사용하여 29-30°C에서 배양하였다 (Gerhardt 등, 1981).

### 세포의 Lysis 및 Chromosomal DNA의 분리

YM 배지에서 진탕배양한 세포 (OD=0.6)를 원심분리한 후 Schwinghamer (1980)의 방법을 변

형하여 lysis시키고 pronase (1mg/ml)를 처리한 다음, phenol-chloroform 추출법에 의해 DNA를 정제하였다 (Walker, 1984). 정제된 DNA를 ethanol에 침전시킨후 유리막대로 spool out한 다음 TE buffer (Tris·Cl 10mM, EDTA 1mM, pH 7.4)에 녹여서 사용하였다.

### 제한효소에 의한 Chromosomal DNA의 절단

제한효소 Bam HI (Promega), Eco RI (Biolabs), Hind III (제철화학)가 본 실험에 사용되었고, 각 제조회사에서 제시한 반응조건에 따라 모두 37°C에서 2시간 동안 반응시켜 완전히 절단하였다.

### 절단된 DNA의 전기영동 및 Southern blotting

Bam HI, Eco RI, Hind III로 각각 절단된 chromosomal DNA 10  $\mu\text{g}$ 씩을 Hind III로 분해된  $\lambda$  DNA와 함께 0.8% agarose gel (12×16 cm) 상에서 40 V, 25 mA 조건으로 약 10시간 전개시켰다. 전개된 DNA는 Southern의 방법에 의해 nitrocellulose filter에 전이하여 (Fritsch 등, 1982) 80°C에서 2시간 동안 baking한 후 진공 dessicator에 보관하였다.

### rRNA의 분리정제 및 $^{32}\text{P}$ -end labeling

rRNA의 분리정제는 DNA와 동일한 방법으로 하였으나 RNase에 의한 분해를 방지하기 위해 실험에 사용된 모든 용기 및 용액에 0.1% DEPC를 처리하고 autoclave 하였다. 분리정제된 전체 RNA를 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한 다음, 16S 및 23S rRNA를 투석막을 사용하여 각각 electroelution하였다 (John, 1984). elution한 16S 및 23S rRNA는 phenol-chloroform 혼합액 및 chloroform 용액으로 각각 2회씩 정제하고 ethanol로 침전시켜 건조한 후 증류수에 녹였다. CIP 처리에 의해 5'-phosphate를 제거한 후 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP 및  $\text{T}_4$  polynucleotide kinase를 처리하여 5'- $^{32}\text{P}$ -end labeling하였다. labeling된 각각의 rRNA는 Sephadex G-50 minicolumn을 통과시켜 probe로 사용하였다 (Fritsch 등, 1982).

### Southern hybridization 및 Autoradiography

*R. meliloti* 및 *B. japonicum* DNA의 Bam HI, Eco RI, Hind III 절단단편이 전이된 nitrocellulose filter를 heat-sealable 폴리프로필렌 봉지에

넣은 다음 hybridization solution (50% formamide, 3×SSC, yeast tRNA)과 <sup>32</sup>P-labeling 된 16S 및 23S rRNA probe를 각각 2 μg씩 넣어 완전히 밀봉한 후 42°C water bath에서 20시간 동안 hybridization하였다. hybridization된 filter를 4×SSC 용액으로 68°C에서 30분씩 2회 세척하고 RNase (20 μg/ml)를 처리한 후 2×SSC용액으로 상온에서 10분씩 3회 세척하였다. 세척한 filter는 상온에서 건조시켜 intensifying screen을 사용하여 X-ray film에 autoradiograph 하였다.

**결과 및 고찰**

세포분열 속도가 빠른 *R. meliloti*와 분열속도가 느린 *B. japonicum* 간의 ribosomal RNA operon의 copy 수와 유전자 구성에 있어서의 차이를 알고자 각 rhizobia로부터 16S 및 23S rRNA를 분리하여 (Fig. 1), <sup>32</sup>P로 end labeling한 다음 BamHI, EcoRI, HindIII로 각각 절단된 이들 rhizobia의 chromosomal DNA에 Southern hybridization을 시도하였다.

*R. meliloti* DNA와 16S 및 23S rRNA의 Southern hybridization 결과를 Fig. 2(A)에 제시하고, 이를 도식화하여 Fig. 2(B)에 각각 제시하였다. BamHI 분해의 경우 16S rRNA는 10, 6, 9.5, 6.8, 6.4, 1.2kb의 5개 단편과 hybridization

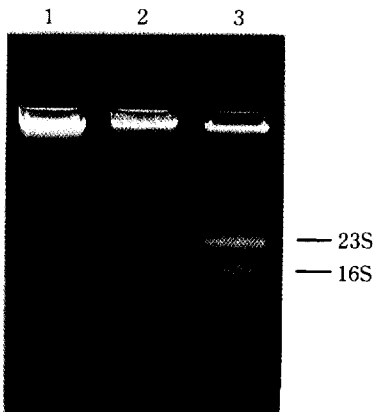


Fig. 1. 1.5% agarose gel electrophoresis of 16S and 23S rRNAs of *B. japonicum* (lane 1), *R. meliloti* (lane 2), and *E. coli* (lane 3).

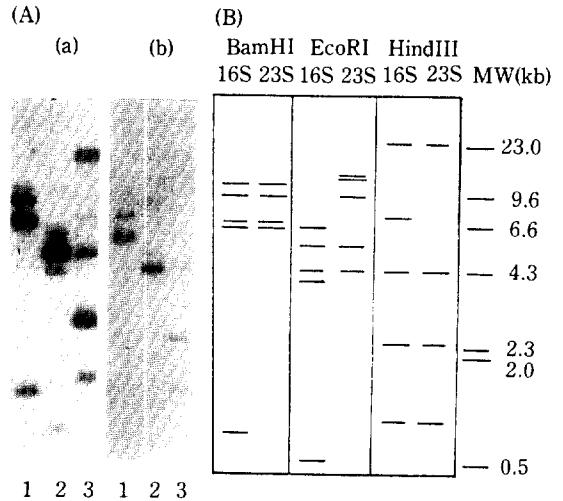


Fig. 2(A) Autoradiographs of corresponding Southern hybridization of *R. meliloti* DNA with [<sup>32</sup>P]-labeled 16S rRNA(a) and 23S rRNA(b). Lane 1,2,3, represent digests with BamHI, EcoRI, HindIII, respectively. (B) Schematic drawing of the hybridization pattern from Fig. 2(A), ordered for the different restriction endonucleases. Location of the HindIII fragments of λ-DNA are given together with the molecular weights in kilobase pairs (kb).

하였고, 23S rRNA는 10, 6, 9.5, 6.8, 6.4 kb의 4개의 단편과 각각 hybridization하였다. 16S와 23S에 동시에 결합한 band의 존재는 분해단편내에 16S와 23S 유전자가 연결해 있음을 뜻하는데 (Jarsh 등, 1983) 분자량이 16S와 23S 유전자를 합친 것 보다 크므로 Fig. 2(A)상의 복잡한 band pattern은 flanking 부위에서의 분해부위가 다름에 기인하는 것으로 사료된다. 이 중 9.5 kb 단편의 경우 signal 강도가 가장 강하게 나타났는데, 이는 여러 copy의 rRNA operon 중에서 9.5 kb 단편으로 분해되는 BamHI 분해부위가 동일한 operon이 다수로 존재함을 시사해 주는 증거로 믿어진다. 마찬가지로 이유로 6.8, 6.4 kb 단편으로 분해되는 rRNA operon도 signal 강도로 판단컨대 복수로 존재하고 있을 것으로 사료된다. signal 강도의 차이가 동일한 크기로 분해되는 operon 수에 비례한다는 가정이 옳다면 *R. meliloti*의 rRNA operon copy 수는 최소한 9개 혹은 그 이상에 이를 것으로 추측된다. 또한 16S rRNA하고만 hybridization한 1.2 kb 단편으로부터 단편의 signal 강도를

고려할 경우 16S 유전자 혹은 interspace 내에 BamHI 분해부위가 존재하는 1개 이상의 operon 이 더 있을 것으로 추측된다(Jarsh 등, 1983). EcoRI 분해 DNA의 경우 16S rRNA는 6.5, 5.4, 4.3, 4.0, 0.7kb의 5개의 단편과, 23S rRNA는 12.3, 12.0, 9.5, 5.4, 4.3kb의 5개의 단편과 각각 hybridization하였으며 5.4, 4.3kb의 단편은 16S 와 23S rRNA가 동시에 hybridization 하였다. 16S하고만 hybridization한 6.5, 4.0, 0.7kb의 단편과 23S하고만 hybridization한 12.3, 12.0, 9.5 kb 단편은 16S와 23S의 interspace 부위에 EcoRI부위가 있음을 뜻하며 16S와 23S rRNA와 동시에 hybridization한 5.4, 4.3kb 단편의 존재는 interspace내에 EcoRI 분해부위가 없는 operon도 다수 존재함을 시사해 주는 증거로서 rRNA operon간의 제한효소 분해부위에 대한 상이성을 보여주고 있다. HindIII 분해단편의 hybridization 양상은 25.0, 4.3, 2.4, 1.5kb의 4개의 단편이 16S 및 23S rRNA에 동시 hybridization하고, 7.7 kb 단편은 16S하고만 hybridization 하였다. 비교적 크기가 작은 2.4, 1.5kb의 단편이 16S 및 23S와 동시에 hybridization 하고 있다는 사실로부터 *R. meliloti*의 16S는 23S rRNA 유전자와 매우 가깝게 연결해 있음을 알 수 있다. 또한 16S rRNA하고만 hybridization한 7.7kb 단편으로부터 16S 유전자 내부 혹은 interspace에 HindIII 분해부위가 있는 operon도 있음을 알 수 있다 (Jarsh 등, 1983).

이상의 결과를 요약하면 *R. meliloti*의 rRNA operon은 band 양상의 복잡성과 signal 강도로 추측컨데 9 copy 혹은 그 이상이 존재할 것으로 믿어지며, 이들간의 제한효소 분해부위에 대한 상당한 정도의 상동성과 상이성이 동시에 확인되었다. 또한 *E. coli* 등의 다른 세균들의 rRNA operon 과 마찬가지로 16S와 23S 유전자는 매우 가깝게 연결해 있음도 확인되었다(Susuki 등, 1986).

BamHI, EcoRI, HindIII로 각각 분해된 *B. japonicum*의 DNA와 <sup>32</sup>P-labeling된 16S 및 23S rRNA와의 hybridization결과는 Fig. 3(A)에 나타내었으며 이를 도식화한 도표는 Fig. 3(B)에 제시하였다. BamHI 분해단편의 경우 16S 및 23S rRNA가 동시에 10kb 분해 단편과만 hybridiza-

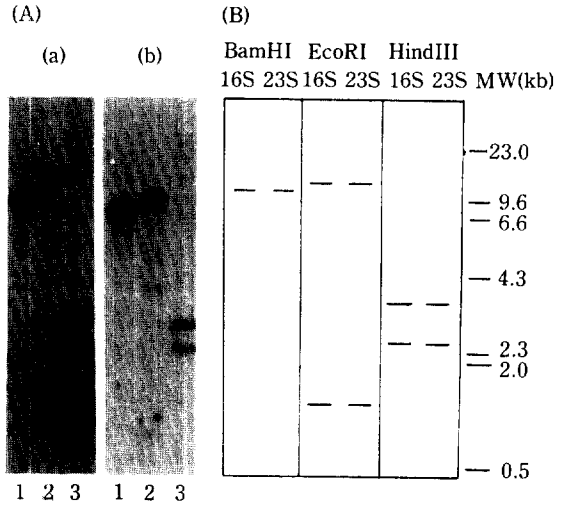


Fig. 3(A) Autoradiographs of corresponding Southern hybridization of *B. japonicum* DNA with [<sup>32</sup>P]-labeled 16S rRNA(a) and 23S rRNA(b). Lane 1,2,3 represent digests with BamHI, EcoRI, HindIII, respectively. (B) Schematic drawing of the hybridization pattern from Fig. 2(A), ordered for the different restriction endonucleases. Location of the HindIII fragments of λ-DNA are given together with the molecular weights in kilobase pairs (kb).

Table 1. Sizes of DNA fragments hybridized by 16S and/or 23S rRNA probes.

Species	Endonuclease	Fragment lengths (kb)					
<i>R. meliloti</i>	<i>Bam</i> HI	16S	10.6	9.5	6.8	6.4	1.2
		23S	10.6	9.5	6.8	6.4	
	<i>Eco</i> RI	16S	6.5	5.4	4.3	4.0	0.7
		23S	12.3	12.0	9.5	5.4	4.3
	<i>Hind</i> III	16S	25.0	7.7	4.3	2.4	1.5
		23S	25.0	4.3	2.4	1.5	
<i>B. japonicum</i>	<i>Bam</i> HI	16S	10.0				
		23S	10.0				
	<i>Eco</i> RI	16S	12.3	1.3			
		23S	12.3	1.3			
	<i>Hind</i> III	16S	3.2	2.6			
		23S	3.2	2.6			

tion하고 있으며, EcoRI의 경우는 signal이 다소 약한 12.3kb와 1.3kb의 2개 단편과 hybridization하고 있다. HindIII 단편의 경우는 16S 및 23S rRNA 모두 3.2, 2.6kb 단편과 동시에

hybridization하고 있으며 signal 강도도 거의 균일하게 나타나 있다.

이상의 결과는 *B. japonicum*의 hybridization 양상이 *R. meliloti*에 비해 band 수와 signal 강도에 있어서 대단히 단순함을 보여주고 있다. BamHI 분해단편의 경우 16S와 23S가 모두 10 kb 단편하고만 결합하고 있는데 이는 이들 operon 내부에 BamHI 분해부위가 전혀 없으며 flanking region의 BamHI 분해부위도 모든 operon에 있어서 동일함을 시사해 주고 있다. HindIII 분해단편의 경우도 signal 강도가 거의 비슷한 2개의 band 즉 3.2, 2.6 kb 단편과만 결합하고 있는데 이들 역시 제한효소 분해부위에 대한 상당한 정도의 상동성을 시사해 주고 있다. 16S와 23S rRNA가 동시에 결합하는 EcoRI 분해의 1.3 kb 단편의 존재는 *R. meliloti*에서와 같이 16S와 23S 유전자의

연접관계를 시사해 주는 것으로 사료되며, 단순한 signal 양상과 band 수로 판단컨대 *R. meliloti* 보다는 rRNA operon의 수가 적을 것으로 믿어진다.

결론적으로 이들 두 rhizobia의 rRNA 유전자 구성은 *E. coli* (Morgan, 1982)나 *B. subtilis* (Potter, 1977) 등의 다른 박테리아에서 처럼 16S와 23S 유전자가 연접해 있는 것으로 추측되나 rRNA 유전자의 DNA sequence에 있어서 *R. meliloti*의 경우는 operon 간에 상당한 정도의 상이성을 보이고 있는 반면에 *B. japonicum*은 이와는 달리 고도의 상동성을 보여주고 있다. 또한 operon의 copy 수에 있어서 fast grower인 *R. meliloti*는 9 copy 혹은 그 이상으로 추측되는 반면 slow grower인 *B. japonicum*은 이에 비해 copy 수가 훨씬 적을 것으로 사료된다.

## 적 요

제한효소 BamHI, EcoRI, HindIII로 각각 분해된 *Rhizobium meliloti*와 *Bradyrhizobium japonicum*의 chromosomal DNA와 <sup>32</sup>P-end labeling된 이들 rhizobia의 16S 및 23S rRNA와의 Southern hybridization을 시도하였다.

실험결과에 의해 얻어진 hybridization 패턴으로부터 이들 두 rhizobia의 ribosomal RNA 유전자의 copy 수와 제한효소 분해부위의 conservativity에 있어서 상당한 차이를 발견하였다.

## 사 사

본 연구는 한국 과학재단연구비로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Fritish, E.F., J. Sambrook, and T. Maniatis, 1982. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor. 383-389, 470.
2. Gerharolt, P., R.G.E. Murray, and P.N. Gostilow, 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. ASM. 140.
3. Jarsh, M., A. Alteubuchner, and A. Bock, 1983. Physical organization of two genes for ribosomal RNA in *Methanococcus vannielii*. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 41-47.
4. Lamfrom, M.A., and J. Abelson, 1978. Cloning of Beneckea genes in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **133**, 354-363.
5. Morgan, A., 1982. Ribosomal RNA genes in *Escherichia coli*. *The Cell Nucleus*, **10**, 1-29.
6. Nichols, J.M., I.J. Foulds, D.H. Grouch, and N.G. Carr, 1982. The diversity of cyanobacterial genomes with respect to ribosomal RNA cistrons. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2739-2746.
7. Potter, S.S. K.F. Bott, and J.E. Newbold, 1977. Two dimensional restriction analysis of two *Bacillus subtilis* genome: gene purification and ribosomal ribonucleic acid gene organization. *J. Bacteriol.*, **129**, 492-500.
8. Sawada, M., A. Muta, M. Iwami, F. Yamado, and S. Osawa, 1984. Organization of ribosomal RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 311-316.
9. Schwinghamer, E.A., 1980. A method for im-

- proved lysis of some gramnegative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **7**, 152-162.
10. Subba Rao, N.S., 1977. Soil microorganisms and plant growth. Oxford and IBM Publishing Co., 3.
  11. Susuki, Y., K. Yoshinaga, Y. Ono, A. Nagata, and T. Yamada, 1986. organization of rRNA gene in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **169**, 839-843.
  12. Susuki, Y., T. Yamada, Y. Ono, A. Nagata, 1988. Molecular cloning and characterization of an rRNA operon in *Streptomyces lividans* TK21. *J. Bacteriol.* **170**, 1631-1636.
  13. Walker, J.M. 1984. Methods in Molecular Biology. Vol. 2, Humana Press. Clifton, New Jersey. 197-199.
  14. Zingales, B., and W. Colli, 1977. Ribosomal RNA genes in *Bacillus subtilis*. Evidence for a contrascriptonal mechanism. *Biochem. Biophys. Acta.* **474**, 562-577.

**(Received Sep. 15, 1988)**