

한국 논에서 분리한 *Azospirillum* 속 균주의 Megaplasmid 분리와 *Rhizobium meliloti nod ABC* 유전자와의 상동성

서 현 창 · 유 익 동*
신구전문대학 식품영양과
한국과학기술연구원 유전공학연구소*

Isolation of Megaplasms from *Azospirillum* spp. Isolated from Korean Paddy Field and Their Homology to *nod ABC* Gene from *Rhizobium meliloti*

Hyun-Chang Seo · Ick-Dong Yoo*
Dept. of Food and Nutrition, Shingu Junior College
Genetic Engineering Research Institute, KIST*

ABSTRACT

Megaplasms of *Azospirillum* strains isolated in the Korean paddy field were identified. Five megaplasms were identified from *Azospirillum lipoferum* AS192. Homology between *nod ABC* gene of *Rhizobium meliloti* and megaplasms of *Azospirillum lipoferum* AS192 and *Azospirillum brasilense* AS112 was found. This observation might have reflected a common mechanism in the early process of soil bacterial association with plants.

서 론

벼는 우리 나라에서 경제적으로 가장 중요한 식량 작물이다. 이러한 벼의 뿌리 주변에 질소고정 미생물이 존재하여 협력적인 관계로 질소를 공급해 준다는 사실이 알려진 이후로 이러한 미생물들에 대해 많은 관심이 모아지게 되었으며¹⁾, 벼 근권에서 질소 고정을 하는 *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Klebsiella* 등의 균주가 분리되었다¹⁻³⁾.

Azospirillum 균주는 Tarrand 등⁴⁾에 의해 동정되었고, 여러 종류의 토양, 기후 환경에 널리 분포함이 발견되었다⁵⁻⁸⁾. 현재까지 분리된 *Azospirillum* 균주는 대부분 *Azospirillum lipoferum*과 *Azospirillum brasilense*의 두 균주에 속하는데 새로운 종인 *Azospirillum amazonense*가 확인되기도 했다⁹⁾.

질소 고정에 관한 분자 유전학적 연구는 이미 *Klebsiella pneumoniae*를 모델로 하여 많은 부분이 밝혀

져 있다. *Azospirillum* 균주에 관한 분자 유전학적 연구는 Gauthier 등¹⁰⁾에 의해 glutamine synthetase mutant가 분리된 이후로 촉진되었다. *Azospirillum brasilense* Sp7의 *nif KDH* 유전자가 cloning되었고¹¹⁾ *Klebsiella pneumoniae*의 *nif A* 유전자와 homology를 갖는 DNA sequence가 발견되었다¹²⁾.

Azospirillum 균주와 식물체와의 관계는 서로 협력적인 관계이며, *Azospirillum* 균주가 병원균처럼 식물체 뿌리에 infection된다는 사실이 확인되면서^{13,14)} 이와 관련된 연구가 관심을 끌게 되었다. *Azospirillum* 균주의 inoculation에 의해 식물체의 lateral root와 root hair의 발육이 상당히 촉진된다는 사실이 알려져 그 원인이 phytohormone 생산 때문이라는 추정이 있고¹⁵⁾ Mohammed 등¹⁶⁾은 Tn5 mutagenesis에 의해 *Azospirillum lipoferum*의 indole acetic acid mutant를 분리하였다.

한편 *Azospirillum* 균주에 존재하는 megaplasmid가

어떤 기능을 하는지, *Azospirillum* 균주와 식물체와의 협력적인 관계에서 이 megaplasmid가 어떤 관련을 갖는지에 관해서는 많은 부분이 밝혀져 있지 않고 있다.

본 연구에서는 우리 나라 논에서 분리된 *Azospirillum* 균주와 식물체와의 관계를 밝히기 위한 기초 연구로 우선 *Azospirillum* 균주에 존재하는 megaplasmid를 분리하였고, *Rhizobium meliloti*의 *nod* ABC유전자와의 homology를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 미생물 균주와 플라스미드는 Table 1과 같았다. *Azospirillum* 균주는 우리 나라 논 토양에서 분리·동정하였으며, *Rhizobium meliloti*의 nodulation관련 유전자를 포함하고 있는 플라스미드인 pRmSL26은 KCTC에서 분양 받았다.

2. 사용 배지 및 효소

Azospirillum 균주의 배양을 위한 완전 배지로는 MPSS(peptone 5g, succinic acid 1g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.002g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.002g, pH 7.0) 배지와 LB배지를 사용했다. Restriction endonuclease와 T_4 DNA ligase 등의 효소는 BRL, Biolabs사 제품을 사용설명서에 따라 사용하였다.

3. Genomic DNA 및 Megaplasmid의 분리

Azospirillum 균주의 megaplasmid는 Kado와 Liu의 방법¹⁷⁾에 의해 분리하였다. Megaplasmid의 분리를 위해 0.8% vertical agarose gel을 사용하였다. Total genomic DNA는 Chesney¹⁸⁾ 등의 방법에 의해 분리하였다.

4. DNA Probe의 제조

pNS3의 *nod* ABC부위를 EcoRI과 BamHI으로 절단한 후 elution하여 random primer를 이용한 labeling방법으로 [α -³²P] dCTP로 labeling하였다. [α -³²P] dCTP는 Amersham사로부터 구입하였으며, 이렇게 labeling된 DNA를 southern blot hybridization의 probe로 사용하였다.

5. Hybridization

Prehybridization용액은 5% formamide, 5×SSC, 50mM sodium phosphate(pH 7.0), 10×Danhart solution, 1% SDS를 사용하였다. Hybridization 용액은 50% formamide, 5×SSC, 50mM sodium phosphate(pH 7.0), 5×Danhart solution, 0.5% SDS, 100 μ g salmon sperm DNA를 사용하였다. Washing 후 nitrocellulose filter를 X-ray film에 exposure시킨 후 현상하였다.

Table 1. List of bacterial strains and plasmids used in this experiment

Strains	Relevant markers	Source
<i>E. coli</i> JM109	F ⁺ , <i>rec</i> A ⁻	KCTC
<i>Azospirillum lipoferum</i> AS192	<i>nif</i> ⁺	This work
<i>Azospirillum lipoferum</i> SW38	<i>nif</i> ⁺	This work
<i>Azospirillum brasilense</i> AS192	<i>nif</i> ⁺	This work
<i>Azospirillum brasilense</i> AS112	<i>nif</i> ⁺	This work
<i>Azospirillum brasilense</i> AS213	<i>nif</i> ⁺	This work
<i>Azospirillum brasilense</i> AS209	<i>nif</i> ⁺	This work
pRmSL 26	<i>nod</i>	KCTC
pBR 322	Ap ^r , Tc ^r	KCTC
pNS 3	<i>nod</i> ABC	This work

결과 및 고찰

1. *Azospirillum*균주로부터 megaplasmid의 분리

한국 논 토양으로부터 분리·동정된 질소고정 능력이 우수한 질소고정 미생물인 *Azospirillum lipoferum*과 *Azospirillum brasilense*의 megaplasmid를 Kado와 Liu¹⁷⁾의 방법에 의해 분리한 결과는 Table 2와 같았다.

Table 2와 같이 *Azospirillum* 균주들은 1~5개의 megaplasmid를 갖고 있었으며 Fig. 1과 같이 대략 100Kb 이상의 크기를 갖고 있었다.

Azospirillum 균주의 경우 이들 megaplasmid가 어떤 기능을 하는지에 대해서는 자세하게 밝혀져 있지 않다. 그러나 이들 megaplasmid의 존재는 식물체와 관련을 맺고 있는 대부분의 토양 미생물의 공통적인 특징으로 *Rhizobium*균주의 경우 질소 고정과 근류 형성에

Table 2. Megaplasmids isolated from *Azospirillum* spp.

Strains	Number of plasmids	Sampling site or reference
<i>Azospirillum lipoferum</i> AS192	5	Asan
<i>Azospirillum lipoferum</i> SW38	1	Suwon
<i>Azospirillum brasilense</i> AS192	3	Asan
<i>Azospirillum brasilense</i> AS112	2	Asanman
<i>Azospirillum brasilense</i> AS213	1	Asan
<i>Azospirillum brasilense</i> AS209	2	Asan
<i>Azospirillum lipoferum</i> BR17	3	Singh, M.
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	5	Elmerich, C.

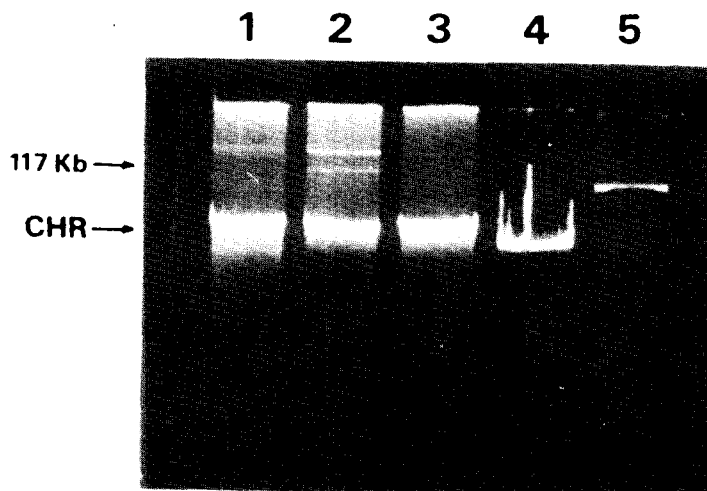


Fig 1. Vertical agarose gel electrophoresis of *Azospirillum* DNA lysates.

Lane 1 : *Azospirillum lipoferum* AS192

Lane 1 : *Azospirillum brasilense* AS112

Lane 1 : *Azospirillum brasilense* AS192, lane 4 : λ -DNA, and lane 5 : pRmSL26

관여하는 유전자가 이러한 megaplasmid 상에 존재한다는 사실이 알려져 있다^{19,20)}.

Azospirillum 균주의 질소고정 유전자와 megaplasmid와의 관련성에 관한 많은 연구자들의 연구 결과 질소 고정 유전자는 megaplasmid가 아닌 chromosome 상에 존재한다는 사실이 밝혀졌으나, Uozumi 등²¹⁾은 *Azospirillum* 균주로부터 DNA를 분리하여 *Klebsiella pneumoniae*의 nif KDH와의 homology를 조사한 결과 megaplasmid에 질소고정 유전자가 존재하는 *Azospirillum* 균주가 있다는 사실을 보고하였다.

두과작물 이외의 다른 작물의 근권에서 협력적인 관

계로 질소 고정을 하는 *Azospirillum*과 *Azotobacter* 균주에서 발견되는 megaplasmid^{22~24)}도 *Rhizobium* 균주의 경우처럼 식물체 뿌리에 부착과 숙주 친화성에 관련이 있는 것으로 추정이 된다. 그러나 이에 관한 뚜렷한 연구 결과는 아직 얻어지지 않고 있다.

2. *Azospirillum* 균주로부터 분리된 megaplasmid와 *Rhizobium meliloti* nod ABC 유전자와의 homology

Azospirillum 균주의 megaplasmid에 존재하는 질소 고정 관련 정보를 찾기 위해 우선 *Rhizobium meliloti*의 nod ABC 유전자를 pRmSL26으로부터 subcloning하

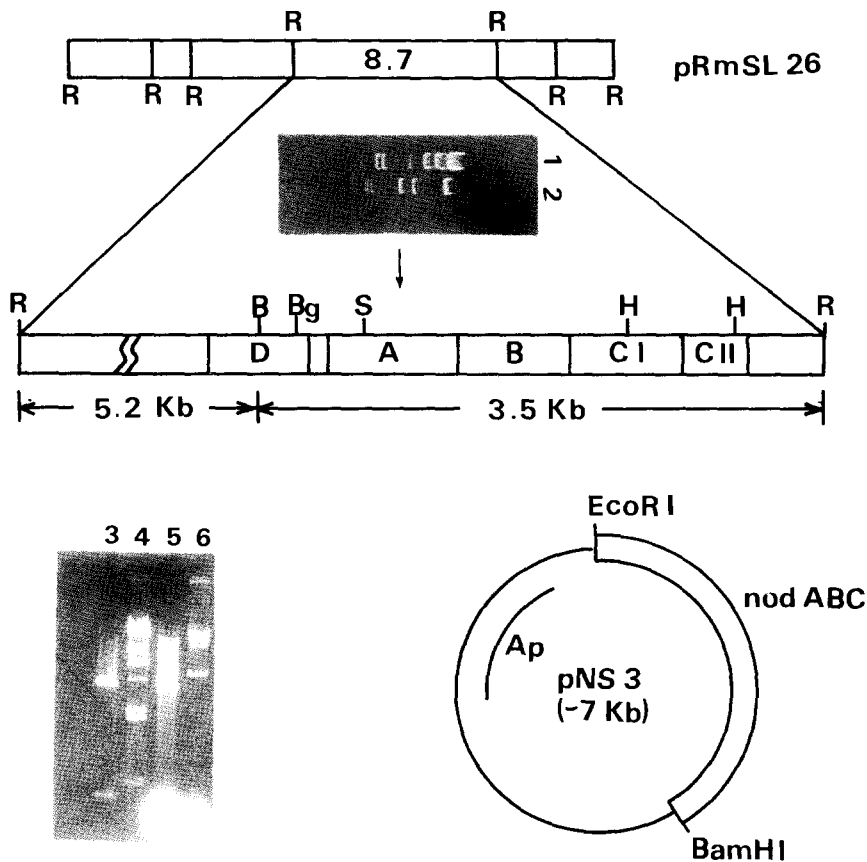


Fig 2. Subcloning of *nod ABC* gene of *R. meliloti* and construction of pNS 3.

Lane 1 and lane 4: λ -DNA digested with HindIII, lane 2: pRmSL 26 digested with EcoRI and BamHI, lane 3: pBR322 digested with EcoRI and BamHI, lane 5: pNS3 digested with EcoRI and BamHI, and lane 6: pNS3.

여 pNS3를 제조하였다. pRmSL26의 EcoRI 절단 단편 중 8.7Kb 크기의 단편을 elution하여, 이중 3.5Kb 크기의 BamHI-EcoRI fragment를 다시 얻었다. 이 부분을 pBR322의 BamHI-EcoRI 부위에 ligation시켜 pNS3를 제조하였다(Fig. 2).

한편 *Azospirillum* 균주의 megaplasmid를 분리한 후(Fig. 1), 앞서 제조된 pNS3의 nod ABC 유전자를 probe로 하여 southern blot hybridization 방법으로 그 유사성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1의 *Azospirillum lipoferum* AS192의 3번째 plasmid와 *Azospirillum brasilense* AS112의 첫째 plasmid에서 *Rhizobium meliloti*의 nod ABC 유전자와의 homology를 찾을 수 있었다(Fig. 3). 이는 *Azospirillum* 균주의 megaplasmid에 *Rhizobium meliloti*의 nod ABC 유전자와 유사성을 갖는 부분이 존재한다는 사실을 증명해주는 결과이다.

Azospirillum 균주의 경우 *Rhizobium meliloti*와 같은 근류 형성을 하지 않으므로, *Azospirillum* 균주 DNA에도 식물체에 부착하여 표면에 침투하는 단계 또는 근류 형성의 초기단계에 관여하는 유전자의 흔적이 남아 있다고 추정할 수 있다.

또한 *Azospirillum* 균주의 전체 DNA를 EcoRI로 절단하여 전기영동한 후 *Rhizobium meliloti*의 nod ABC 유전자와 유사성을 본 결과(Fig. 4)에서도 megaplasmid의 위치에서 유사성을 본 결과(Fig. 4)에서도 megaplasmid의 위치에서 유사성이 발견된 점으로 미루어 보아 위의 추정이 뒷받침된다고 할 수 있다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 근류 형성에 관여하는 nod 유전자의 흔적이 *Azospirillum* 균주에 남아 있다고 볼 수 있으며, 이 유전자는 *Azospirillum* 균주와 식물체 간의 recognition과 infection에 관여하리라 추정된다. Piana 등²⁵⁾은 *Rhizobium meliloti*의 Sym plasmid로부터 nod와 hsn(host-specificity nodulation) 유전자를 cloning하여 *Azospirillum brasilense*에 도입하였으며, 이 균주를 옥수수과 알팔파의 근권에 접종하여 두 작물의 뿌리털에서 근류 형성의 초기단계에서 생기는 뿌리 변형이 유도됨을 밝혀냈다. 이 결과는 *Rhizobium meliloti*의 symbiotic gene이 *Azospirillum brasilense*에서도 발현될 수 있음을 보이는 사실로 Fig. 3과 Fig. 4의 결과와 관련하여 매우 흥미로운 사실이다.

이러한 결과로 볼 때 식물체 뿌리 표면에 *Azospirillum* 균주가 infection되어 증식하는 토양미생

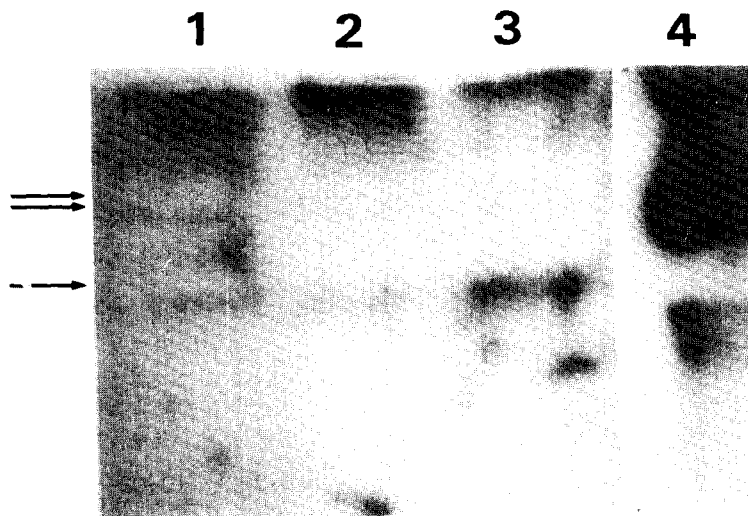


Fig 3. Detection of homologous region to *R. meliloti* nod ABC gene in 3 *Azospirillum* spp.

Lane 1 : megaplasmid of *Azospirillum lipoferum* AS192

Lane 2 : *Azospirillum brasilense* AS112

Lane 3 : *Azospirillum brasilense* AS192, lane 4 : pRmSL26 control

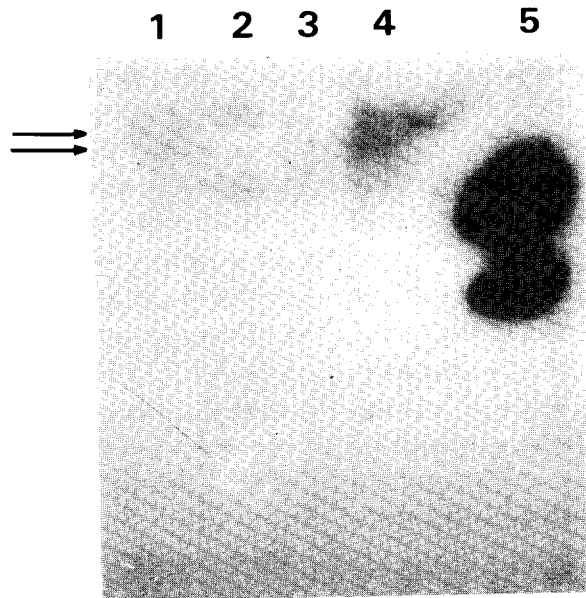


Fig 4. Hybridization of *Azospirillum* DNA with pNS3 *nod* ABC probe.

Lane 1; λ -DNA digested with HindIII, lane 2; *Azospirillum lipoferum* AS192, lane 3; *Azospirillum brasilense* AS192, lane 4; *Azospirillum brasilense* AS112, lane 5; pRmSL26 digested with EcoRI and BamHI.

물-식물체 관계의 초기 과정에 *Azospirillum* 균주의 megaplasmid 상에 존재하는, *Rhizobium meliloti*의 symbiotic gene과 유사한 유전자가 관여하리라 추정된다.

요 약

우리 나라 논에서 분리된 *Azospirillum* 균주로부터 메가플라스미드를 확인한 결과 *Azospirillum lipoferum* AS192로부터 5개의 메가플라스미드를 확인했다. *Azospirillum lipoferum* AS192와 *Azospirillum brasilense* AS112의 메가플라스미드가 *Rhizobium meliloti*의 *nod* ABC와 유사성을 갖고 있다는 사실을 알았으며, 이 결과로부터 토양 미생물과 식물체 간의 관계의 초기 과정에 공통적인 기작이 존재한다고 추정할 수 있었다.

참고문헌

- Hirota, Y., Fujii, T., Sano, Y. and Iyama, S. : *Nature*, **276**, 413(1978)
- Bally, R., Thomas-Bauzon, D., Heulin, T., Balandreau, J., Richard, C. and Deley, J. : *Can. J. Microbiol.*, **29**, 881(1983)
- Barraquio, W.L. and Watanabe, T. : *Soil Sci. Plant Nutr.*, **27**, 121(1981)
- Tarrand, J.J., Kreig, N.R. and Dobereiner, J. : *Can. J. Microbiol.*, **24**, 967(1978)
- Klossak, R.M. and Bohlool, B.B. : *Can. J. Microbiol.*, **29**, 649(1983)
- Nur, I., Okon, Y. and Heniz, Y. : *Can. J. Microbiol.*, **26**, 27(1980)
- Haahtela, K., Wartiovaara, T., Sudman, V. and

- Skujins, J. : *Appl. Environ. Biol.*, **41**, 203 (1981)
8. Lamm, R.B. and Neyra, C.A. : *Can. J. Microbiol.*, **27**, 1320(1981)
9. Magalhaes, F.M., Baldani, J.I., Sauto, S.M., Duykendall, J.R. and Dobereiner, J. : *An. Acad. Brasil. Cienc.*, **55**, 417(1983)
10. Gauthier, D. and Elmerich, C. : *FEMS Microbiol. Lett.*, **2**, 101(1977)
11. Quiviger, B., Franche, C., Lutfalla, G., Haselkorn, R. and Elmerich, C. : *Biochimie.*, **64**, 495(1982)
12. Nair, S.K., Jara, P., Quiviger, B. and Elmerich, C. : in *Azospirillum* II, Klingmuller, W.(ed.), *Experimentia Supplementum*, Vol. 48, Birkhauser-Verlag, Basel, p.29(1983)
13. Schank, S.C., Smith, R.L., Weiser, G.C., Zuberer, D.A., Bouton, J.H., Quesenberry, K. H., Tyler, M.E., Milam, J.R. and Littell, R.C. : *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 287(1979)
14. Tien, T.M., Diem, H.G., Gaskins, M.H. and Hubbell, D.H. : *Can. J. Microbiol.*, **27**, 426 (1981)
15. Lin, W., Okon, Y. and Hardy, R. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1775(1983)
16. Mohammed, S.A. and Walter, K. : *Mol. Gen. Genet.*, **210**, 165(1987)
17. Kado, C.I. and Liu, S.T. : *J. Bacteriol.*, **145**, 1365(1981)
18. Chesney, R.H., Scott, J.R. and Vapnek, D. : *J. Mol. Biol.*, **130**, 161(1979)
19. Nuti, M.P., Lepiti, A.A., Prakash, R.K., Schilperoot, R.A. and Cannon, F.C. : *Nature*, **282**, 533(1979)
20. Prakash, R.K., Schilperoot, R.A. and Nuti, M. P. : *J. Bacteriol.*, **145**, 1129(1981)
21. Uozumi, T., Barraquio, W.L., Wang, P.L., Murai, F., Chung, K.S. and Beppu, T. : in *Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics of Industrial organisms*, Kyoto, p.314(1982)
22. Mauricio, M., Sanchez, J.M. and Vela, G.R. : *J. Bacteriol.*, **170**, 1984(1988)
23. Elmerich, C. : in *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*, Puhler, A.(ed.), Springer-Verlag, Berlin, p.367(1983)
24. Singh, M. and Wenzel, W. : in *Azospirillum Genetics, Physiology, Ecology*, Klingmuller, W. (ed.), *Experimentia Supplementum*, Vol. 42, Birkhauser, Basel, p.44(1982)
25. Piana, L., Delledonne, M., Antonelli, M.N. and Fogher, C. : in *Azospirillum* IV, Klingmuller, W. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, p.83(1988)

(1992년 6월 3일 수리)