

Bradyrhizobium sp.(Cassia) CN9135의 nodD1 유전자의 크로닝과 염기서열 분석

최순용 · 고상균*

대전대학교 이과대학 생명과학부, 전남대학교 이과대학 미생물학과

차풀(*Cassia nomame*)의 뿌리혹 공생세균인 *Bradyrhizobium sp.(Cassia) CN9135*의 *nodD1* 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통해 크로닝하여 그 염기서열을 조사하였다. 염기서열로부터 유추된 NodD1 단백질은 *Bradyrhizobium elkanii*와 가장 높은 95%의 상동성을 나타내었다. 뿐만 아니라 *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space 부위의 염기서열도 *B. japonicum*을 포함한 다른 bradyrhizobia와는 상동성이 거의 없었으나 *B. elkanii*와는 88%의 높은 상동성을 나타내었다. 우리의 실험 결과는 *Bradyrhizobium sp.(Cassia)*가 *B. elkanii*와 매우 근연한 관계임을 보여 주고 있다.

Key words □ *Bradyrhizobium sp.(Cassia)*, *Cassia nomame*, *nodD1*, PCR

리조비아(rhizobia)라 총칭하여 부르는 토양세균 *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*은 콩과식물과 질소고정능을 갖는 상호호혜적인 관계, 즉 공생적 질소고정을 통해 식물의 생산성에 상당히 공헌하고 있다(17). 리조비아 중에서 성장 속도가 느린(slow-growing) bradyrhizobia에는 *B. elkanii*, *B. japonicum* 그리고 *B. liaoningense*(18)의 세 개의 종이 있으며 이들은 모두 대두의 뿌리혹으로부터 분리된 세균이다. 이 이외에도 종까지 동정되지 않은 많은 bradyrhizobia들이 알려져 있다(3,12).

뿌리혹(root nodule)은 식물의 flavonoid와 공생세균의 NodD가 함께 작용하여 *nod* 유전자들이 발현되어, 이들에 의해서 합성된 올리고당의 Nod인자(Nod factor)에 의해 형성된다. 이와 같이 flavonoid와 Nod인자 등과 같은 공생적 신호들이 콩과식물과 리조비아 사이에 교환되어 뿌리혹 형성이 이루어진다(6,11).

*B. japonicum*을 포함한 대부분의 리조비아에서 *nod* 유전자들 중, Nod 인자의 기본골격 합성에 관여하는 공통(common) *nod* 유전자라고 부르는 *nodABC* 유전자와 전사활성자(transcriptional activator)로서의 기능을 가진 *nodD* 유전자는 서로 인접하여(Fig. 1) 있으나 전사는 서로 반대 방향으로 일어난다(1). *nodABC*를 포함하여 다른 여러 *nod* 오페론의 발현은 flavonoid와 LysR 군에 속하는 NodD를 필요로 한다. NodD 단백질은 각 *nod* 오페론의 상부에 있는 47 bp의 DNA motif인 *nod box*라는 보존된 DNA 서열에 결합한다(16). 식물의 신호인 flavonoid가 inducer로 NodD 단백질과 결합하여 형성된 NodD-flavonoid 복합체가 *nod* 오페론들의 전사를 활성화시킨다. 현재까지 조사된 바에 따르면 NodD에 의한 이런 조절시스템은 모든 리조비아에서 나타난다.

하지만 *nodD*의 개수는 종마다 차이가 있어(1), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*는 한 개, *Sinorhizobium meliloti*는 2개, *Rhizobium tropici*의 경우 가장 많은 5개의 *nodD* 유전자를 갖고 있다. Bradyrhizobia에 있어서 *nodD* 유전자는 *B. elkanii*, *B. japonicum*, *Bradyrhizobium sp. (Parasponia)*, *Bradyrhizobium sp. (Arachys)*에서 공히 두 개를, 즉 *nodD1*과 *nodD2*를 가지고 있다. *nodD1*과 *nodD2*는 인접해 있으며 그 사이는 600 bp가 조금 넘는 intergenic space가 존재한다. 또한 *nodD1*과 *nodABC* 사이에는 각기 *nodA*와 *nodD1*의 *nod box*(Fig. 1)가 각각 위치하고 있다(8).

콩과(Legiminosae) 식물은 콩아과(Papilionoideae), 미모사아과(Mimosoideae), 실거리나무아과(Caesalpinioideae)의 세 아과로 나뉘며, 이들 중에서 실거리나무아과의 콩과식물이 가장 덜 진화된 식물이다. 실거리나무아과에 속하는 *Cassia* 속은 600여종의 식물로 이루어져 있으며, 극히 일부만이 뿌리혹을 형성하는데 차풀(*Cassia nomame*)이 그 중 하나이다. 국내에서 서식하는 차풀의 공생균주가 분리되었고 그 특성에 대하여 조사된 바 있는데(2, 10), 이 공생균주의 콜로니의 모양은 *B. japonicum*과 뚜렷하게 다르며, 서로의 식물에 뿌리혹을 형성하지 못하였다.

본 연구에서는 차풀의 공생균주인 *Bradyrhizobium sp.(Cassia)*와 대두의 공생균주인 *B. japonicum*의 *nodD1* 유전자와 차이를 알아보기 위해 *B. japonicum* USDA110의 *nodD1* 부위의 서열을 참고로 하여 *Bradyrhizobium sp. CN9135*의 *nodD1* 유전자를 증

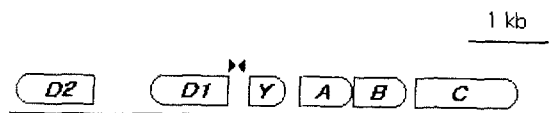


Fig. 1. Common *nod* gene region of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. The filled arrowhead between *nodD1* and *nodYABC* marks the location and orientation of the *nod box*.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-280-2437, Fax: 042-280-2608
E-mail: skkoh@dragon.daejeon.ac.kr

폭하고 크로닝하여 그 염기서열을 조사하고 다른 bradyrhizobia 들과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주

차풀의 공생균주로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(10)를 사용하였으며, 공시균주로는 대두의 공생세균인 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110을 사용하였다. 이 균주들은 YM 액체배지 (15)에 접종하여 28°C에서 5일 배양하였다.

염색체와 플라스미드 DNA분리

*Bradyrhizobia*의 염색체 DNA는 guanidine isothiocyanate cell lysis 방법을 사용하였고(14), 플라스미드 DNA는 Jetstar plasmid miniprep kit(Genomed)를 사용하였다.

Primer의 제작과 PCR

Bradyrhizobium sp. CN9135의 *nodD1* 유전자 부위를 증폭하기 위해 *B. japonicum* USDA110의 서열(8)을 토대로 *B. japonicum*의 *nodA nod box* 내의 22-mer 서열 5'TGGTAAAATCGATTG-TTTCGAT3'와 *B. japonicum*의 *nodD1*과 상동성을 지닌 N말단 부위에 해당하는 *B. japonicum*의 *nodD2*의 염기서열 5'GCGA-CCAGAAGATTTAGATC3'를 선정하여 각각 forward와 reverse primer로 사용하였다(Fig. 3). PCR은 보통의 방법을 사용하였으며 증폭기의 운행조건은 95°C에서 3분 예열 시킨 후, 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 3분 씩 35회 반복하고 마지막에는 72°C에서 3분 처리하여 반응을 완료하였다.

염기서열결정과 자료분석

PCR 산물을 Wizard PCR Preps(Promega)를 사용하여 순수 분리한 후 pGEM-T vector에 크로닝한 후 dideoxy chain termination 방법(13)으로 서열을 조사하였다. 6개의 크론을 무작위로 선별하여 200 bp 정도의 염기서열을 조사하여 그 서열이 동일함을 확인한 후 그중 하나를 택해 약 1.7 kb의 전체 서열을 조사하였다. 또한 *nodA*와 *nodD1* 사이에 위치하고 있는 두 *nod box*의 완전한 서열을 조사하기 위해 *B. japonicum*과 *B. elkanii*의 *nodA*의 보존된 서열(5,8)을 primer로 사용하여 얻은 크론으로부터 약 170 bp 정도의 염기서열을 더 밝혀 총 1,836 bp 염기서열을 결정하였다. 아미노산 서열 비교는 Clustal program을 사용하였으며 Dendrogram은 PAUP*4.02를 사용하여 작성하였다.

결과 및 고찰

nodD1 유전자의 크로닝

*B. japonicum*의 염기서열로부터 결정된 두 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 바, *B. japonicum*에서와 마찬가지로 *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135에서도 약 1.7 kb의 크기의 단일 밴드를 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이것은 *B. japonicum*의 염기 서열로부터 예상되는 크기와 일치하였다(8). *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135의 증



Fig. 2. PCR amplification of *nodD1* gene from bradyrhizobial DNA. lane 1, λ DNA /HindIII size markers(23, 9.4, 6.6, 2.3, 2.0, 0.6 kb); lane 2, *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135; lane 3, *B. japonicum* USDA110.

| | | | |
|------|--|--|------|
| 1 | GCACCTACAAGAGGGCCA | ACTCGCGTGGCGAGAGATAGCCACTTCGCACAGGATTGGG | 60 |
| 61 | CGGCTCGCAGTCCAGGATTTCTTCTCGGAGCCCGGTCCGACCGAAAGCCATCGTGCCA | | 120 |
| 121 | TACCTAAATTCATTTTCCAAACTGATGTTTGGCTATCCAACTTCGCGAGTTTGGTAAATC | | 180 |
| 181 | GATTGTTTCGATAGACACATCCACACGATGGATAGACTCAGCACATCGGTTCAAGGGA | | 240 |
| 1 | | M R F K G | 5 |
| 241 | CTTGATCTAAACCTTCGTTGCGCTCGATGCTCTGATGACGGAGCCGCAACCTTACAGCG | | 300 |
| 6 | L D L N L L V A L D A L M T E R N L T A | | 25 |
| 301 | GGCGCGCGAAAATTAACCTGAGCCAGCCCGCATGAGCGCTGGATCGCGCGGCTGGCG | | 360 |
| 26 | A A R K I N L S Q P A M S A A I A R E R | | 45 |
| 361 | ACCTACTTTCGGGATGAATGTTTACGATGAGAGGTGGCGAAGCTTCGCGACACCGCGC | | 420 |
| 46 | T Y F R D E L F T M R G R E L V I P T P G | | 65 |
| 421 | CGGGAAGTGTGGCGGTCAGTTGCGGAGGCCCTGCTGCATCCAACTCTCGATCATT | | 480 |
| 56 | A E V L A G P V R E A A L L H I Q L S I I | | 85 |
| 481 | TCTGGGATCGGTTGACCGGACCCAGTGGAGCCGCGCTTCAGGGTCATTCTCCGAT | | 540 |
| 86 | S R D A F D P T Q S S R R F R V I L S D | | 105 |
| 541 | ITCATGCAATCGCTTTTTTCGGGAAATGTCGATCGATTGACAGGAGGCCCGCTGG | | 600 |
| 106 | F M T I V F F R R I V D R I A Q E A P A | | 125 |
| 601 | GTCGCTTCGAATGCTGCCAATTTCCGATGACCCGGTGAGCTGCTTCGCGCGCGGAA | | 660 |
| 126 | V R F E L L P P S D E P G E L L R R G E | | 145 |
| 661 | GTGGATTTCTCATTTTCGGGAAATGTCATGTCGAGCGGCGCATCTAAGGGGAGGCTA | | 720 |
| 146 | V D F L I L P E L F N S S G H P K A T L | | 165 |
| 721 | FTCGATGAGACCTCGATTCGCTGGGATGCGCACAAGAGGAGTATTGCGACCACTT | | 780 |
| 166 | F D E T L V C V G C R T N K Q L L R P L | | 185 |
| 781 | ACAITCGATAAATAAATTCGATGGGCGCGTCCCGCAAGTTCGGACGGGCGCTGAGG | | 840 |
| 186 | T F D K Y N S M G H A G R A L R | | 205 |
| 841 | CCCAAGCTCGAGGAGTGGTTCTTCTGCTGGACCGGTTTGAAGGCGGATCGAGGTCGTT | | 900 |
| 206 | P N L E E W F L L E H G L K R I R I E V V | | 225 |
| 901 | GTGACGGGCTTTAGCTGATTCGCGCCATGTTGTTGGAGCGGCGCATAGGAAACATG | | 960 |
| 226 | V Q G F S L I P P M L L E T S R I G T M | | 245 |
| 961 | CCCTACGCTCGCCAGACACTTCGAAAAGCGGATGCCCTGCGGATCGTGAACCA | | 1020 |
| 246 | P L R L A R H F E K R I P L R I V E P P | | 265 |
| 1021 | CTCCACTGCCACATTCACCGAGGCGTGCAGTGGCTGGCTTCGCAATACCGATCCG | | 1080 |
| 266 | L P L P T F T E A A I Q W P A F H N I D P | | 285 |
| 1081 | CGGAGCAITGGATGGCGGATATGTTGGAGGAGCAATCCAACTGGATCTGCACAT | | 1140 |
| 286 | A S I W M R R I L L E E A S N G S A H | | 305 |
| 1141 | CGGAGATCCCAAGCGCGAGGCGCTGCTAGGTTACCACAAGCCGCGGAGGTGCA | | 1200 |
| 306 | R E I P T R R R C * | | 314 |
| 1201 | ATACCCCACTCATTCGACGTGTTGCGCTTGTCATTTAATCTCCCGGACGGCCATGC | | 1260 |
| 1261 | TGTAAAAGCGACGGAGCCCGCCGCTGATGTTGTAAGATTGCGCGCCGCTGCGCTAACG | | 1320 |
| 1321 | ATCAAAGCGTTTAGTGGCTTGTATTGACGGGAAGGTTCAAGCCATCGCGGAAAGACGAG | | 1380 |
| 1381 | AGCTTTCGATTACGATGGATTTGCGAAGCCAAATAATGCTTGAACCCGACACTGGGT | | 1440 |
| 1441 | CAGGTGTAAATTCGCTCTGACCACTCCAGGCGGGCGTCCGATGGGCGACATCGGGTG | | 1500 |
| 1501 | AAITCTGGCTATTGGCGGATAGGCACTAAGGCTGGTTCCCAATGGCGACTGACTAAA | | 1560 |
| 1561 | TCGTGTACGAGAGTGGCGGAAATCGACGAGATCGATGAGTTGGCTCTCCGACGAGCT | | 1620 |
| 1621 | CGAGCGGTAGGTCGTCATCCCGGACGACTGCGCGCAATTCGCGATGTTTCGCGAGCTTC | | 1680 |
| 1681 | TTTGCAAGCGCACGAGATTAACAGAGTTGATTGCGGGGAGCCAATCACACCGCTTCAGA | | 1740 |
| 1741 | TGCAGCGCTGTGCTCATTGTATGCAATGTAAGACGATCGCGTGGGATATAGATAT | | 1800 |
| 1 | | M | 1 |
| 1801 | CGGTTCAACGGCTCGATCAAATGTTGGTGGG | 1836 | |
| 2 | R F N G L D L N L E V | 12 | |

Fig. 3. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of fragment containing the *nodD1* and partial *nodD2* genes. *nodD1* extends from positions 226 to 1,170 and *nodD2* starts from position 1,779. The predicted amino acid sequences are given below the nucleotide sequence. The two PCR primer sequences are indicated by shading. The *nodA* and *nodD1 nod box* is underlined and double-underlined, respectively.

폭된 이 DNA 절편을 크로닝하여 무작위로 선정한 5개의 크론의 첫 200 bp 정도의 염기서열을 조사한 결과 모두 동일함을 확인한 후, 이중 하나의 크론을 택해 전체 서열을 조사하였다.

nodD1 유전자의 염기서열 분석

Bradyrhizobium sp.(*Cassia*) CN9135의 이 DNA 절편은 총 1,666 bp(Fig. 3의 171번부터 1,836번까지)이었으며 예견된 CN9135의 *nodD1*의 ORF는 226번부터 1,170번까지, *nodD2*의 ORF는 1,799번부터 시작되었고, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 inter-

genic space는 628 bp로 이루어져있었다(Fig. 3). CN9135의 NodD1 단백질은 *B. japonicum* USDA110과 *B. elkanii* USDA94와 마찬가지로 314개의 아미노산으로 구성되어 있었다(5, 8). CN9135의 NodD1은 primer 염기서열을 결정하는 근거로 사용했던 *B. japonicum*의 NodD1과는 90%의 상동성을 나타내었다. 그러나 오히려 *B. elkanii*의 NodD1과는 95%로 가장 높은 상동성을 나타내었으며, 그 다음으로는 비콩과식물에서 유일하게 형성된 뿌리혹에서 분리된 *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*) ANU289의 NodD1과는 94%의 상동성을 나타내었다. *Brady-*

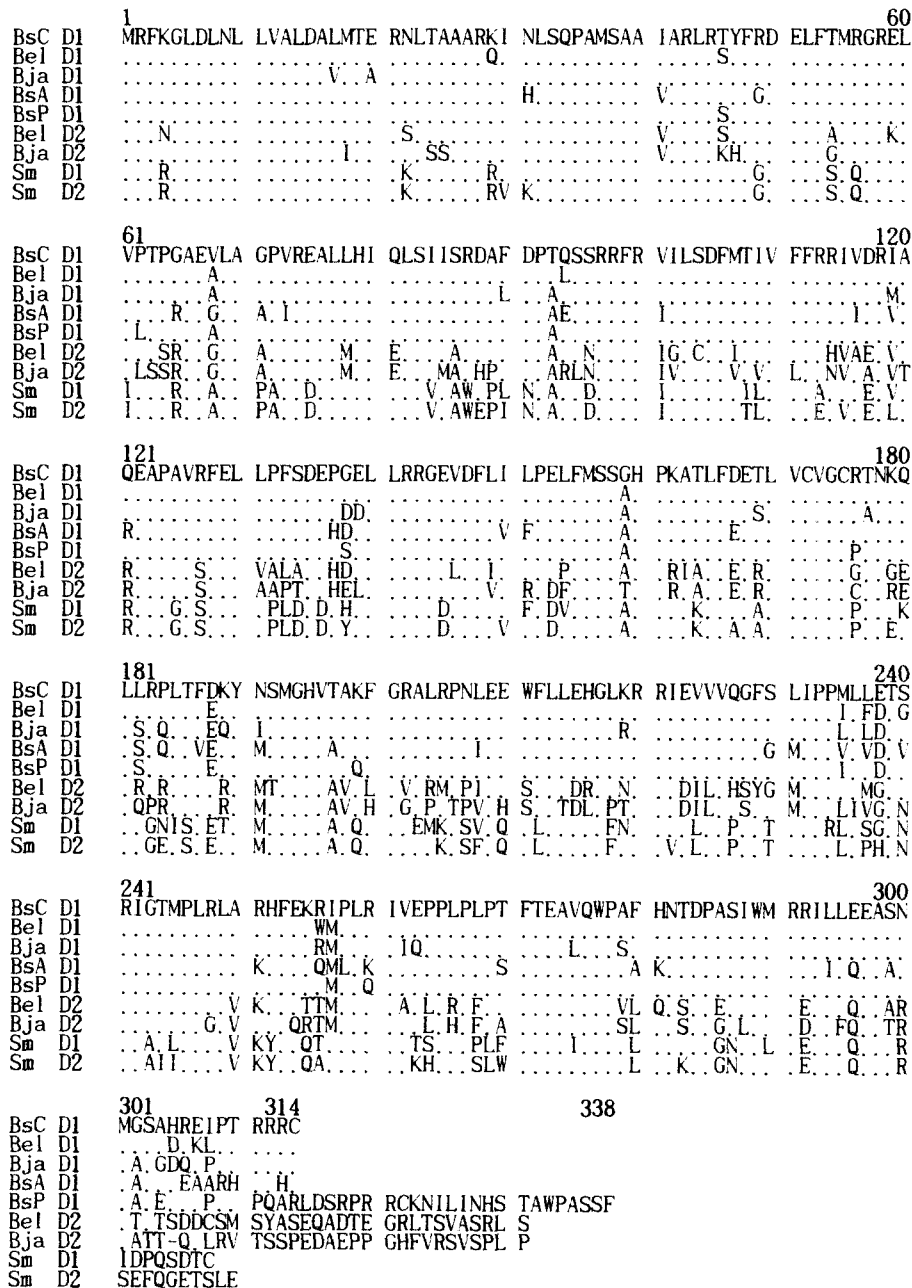


Fig. 4. Amino acid sequence alignment of different NodD proteins of bradyrhizobia. All of these sequences are available in the databases. NodD proteins from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135(Bsc D1), *B. elkanii*(Bel D1, D2), *B. japonicum* USDA110(Bja D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Parasponia*) ANU289(Bsp D1, D2), *Bradyrhizobium* sp.(*Arachis*) NC92(BsA D1, D2), *Sinorhizobium meliloti* 41(Sm D1, D2) are shown.

*japonicum*과 *Bradyrhizobium (Arachis) sp.* NC92와는 상동성이 거의 없었고(<5%), 오직 *B. elkanii*와 만 88%의 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 6).

CN9135의 nod box

CN9135에서도 다른 bradyrhizobia와 마찬가지로 두 nod box의 존재를 확인하였다(Fig. 3). CN9135의 *nodD1*과 *nodA*의 각 nod box의 염기서열은 *nodA* nod box의 경우 *B. elkanii*와 *B. japonicum*와는 100%의 상동성을, *Bradyrhizobium sp. (Arachis)* NC92와 *Bradyrhizobium sp. (Parasponia)* ANU289와는 94%의 상동성을 나타내었다. 반면에 CN9135의 *nodD1* nod box의 경우는 *B. elkanii*와 *Bradyrhizobium sp. (Parasponia)* ANU289와는 각각 96%와 85%의 높은 상동성을 보였으나, *B. japonicum*과 *Bradyrhizobium sp. (Arachis)* NC92와는 각각 37%와 43% 정도의 아주 낮은 상동성을 나타내었다.

NodD1의 아미노산 서열, *nodD1*과 *nodD2* 사이의 intergenic space의 염기서열 그리고 nod box 서열의 상동성 비교를 통해 *Bradyrhizobium sp. (Cassia)* CN9135는 *B. japonicum*보다는 *B. elkanii*와 근연관계를 가짐을 알 수 있었다. 하지만 *Bradyrhizobium sp. (Cassia)* CN9135는 대두에 뿌리혹을 형성하지 못하며(10), 그 반대의 경우도 마찬가지로 *B. elkanii*는 차풀에 뿌리혹을 형성하지 못한다(9). 따라서 rDNA나 *nif* 유전자 등의 다른 유전자의 서열을 폭 넓게 조사해 봄으로써 bradyrhizobia 내에서 *Bradyrhizobium sp. (Cassia)* CN9135의 위치를 보다 명확하게 밝힐 수 있을 것이다.

참고문헌

- 고상균. 1996. Rhizobia 와 식물의 상호작용: nod 유전자와 Nod 인자. 분자생물학뉴스 8, 13-20.
- 고상균. 1999. 시험관내 뿌리혹 생성 실험의 개선된 방법. 한국미생물학회지 35, 169-172.
- Abaidoo, R.C., H.H. Keyser, P.W. Singleton, and D. Borthakur. 2000. *Bradyrhizobium* spp. (TGx) isolates nodulating the new soybean cultivars in Africa are diverse and distinct from bradyrhizobia that nodulate North American soybeans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 225-234.
- Allen, O.N. and E.K. Allen. 1981. The Leguminosae. University of Wisconsin Press, Madison.
- Dobert R.C., B.T. Breil, and E.W. Triplett. 1994. DNA sequence of the common nodulation genes of *Bradyrhizobium elkanii* and their phylogenetic relationship to those of other nodulating bacteria. *MPMI* 7, 564-572.
- Ferro M., J. Lorquin, S. Ba, K. Sanon, J.C. Prome, and C. Boivin. 2000. *Bradyrhizobium* sp. strains that nodulate the leguminous tree *Aacacia albida* produce fucosylated and partially sulfated Nod factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5078-5082.
- Gillette, W.K. and G.H. Elkan. 1996. *Bradyrhizobium (Arachis)* sp. strain NC92 contains two *nodD* genes involved in the repression of *nodA* and a *nolA* gene required for the efficient nodulation of host plants. *J. Bacteriol.* 178, 2757-2766.
- Gotterfert, M., D. Holzhauser, D. Bani, and H. Hennecke. 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *MPMI* 5, 257-265.
- Koh, S.K. 2000. Personal data.
- Lee, K.L. and S. K. Koh. 1997. Isolation and characterization of *Bradyrhizobium* sp. from *Cassia nomame* root nodules. *Natural Science*(Taejon University) 8, 115-124.
- Mergaert, P., M. van Montagu, and M. Holsters. 1997. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* 25, 811-817.
- Parker, M. A. 1999. Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4914-4920.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. Handbook for rhizobia, Springer-Verlag, New York.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wang, S.P. and G. Stacey. 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum nodD1* promoter: a repeated structure for the nod box. *J. Bacteriol.* 173, 3356-3365.
- Werner, D. 1992. Symbiosis of plants and microbes, 1st ed. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 706-711.

(Received November 24, 2000/Accepted December 8, 2000)

ABSTRACT: Cloning and Sequence Analysis of the *nodD1* Gene from *Bradyrhizobium* sp.(*Cassia*) CN9135

Soon-Yong Choi¹ and Sang Kyun Koh*(Division of Life Science, Daejeon University, Daejeon 300-716 and ¹Department of Microbiology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

A 1.7-kb fragment containing the *nodD1* genes of *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 was amplified by PCR with primers based on *B. japonicum* USDA110. This fragment was cloned and sequenced. Analysis of the sequence showed open reading frames highly homologous to *nodD1* from other bradyrhizobial sources. The sequence showed higher homology to *nodD1* gene of *B. elkanii* than to those from *B. japonicum*. Our results suggest that *Bradyrhizobium* sp. (*Cassia*) CN9135 may be more closely related to *B. elkanii* than to *B. japonicum*.