

Rhodospirillum rubrum Plasmid pKY1의 유전정보 분석과 그의 활용에 관한 연구

김복환* · 김정목¹

*한국방송통신대학교 환경보건학과, ¹한양대학교 화학과

광합성 박테리아 *Rhodospirillum rubrum*은 광원의 조건에 따라 균주 내의 신진대사 양상이 변화된다고 보고되어 왔다. 이러한 광조건에 의한 신진대사 변환 과정을 담당하는 유전자에 대한 연구는 광합성 박테리아에 관한 주된 과제 중 하나이다. 근래 이러한 광조건에 의한 균주내 변화 과정이 균주가 지니는 extrachromosomal plasmid와 관련이 있음이 보고되었다. 본 연구는 광합성 박테리아 *R. rubrum*의 extrachromosomal plasmid pKY1을 분리 정제하고 이를 제한효소 *HindIII*로 단편화하여 이들 단편의 일부에 대한 염기서열을 분석하고 이들의 기능을 추론하였다. 본 연구를 통하여 plasmid pKY1에 박테리아의 유전적 재조합 (genetic recombination)에 관여하는 단백질에 대한 정보가 위치하고 있음을 유전자 및 아미노산 상동성 조사를 통하여 알 수 있었다.

Key words □ *Rhodospirillum rubrum*, pKY1, genetic analysis

서 문

광합성 박테리아 (Photosynthetic bacteria)는 광원의 조건에 따라 자신의 신진대사 형태를 변화할 수 있는 기능을 갖는다(6, 17). 이러한 광합성 균체의 신진대사 변화에 대한 유전적 변화에 대한 연구는 이들 균주에 대한 주요 연구 과제 가운데 하나이다. *Rhodospirillum rubrum*은 *Rhodospirillaceae*의 한 형태의 종으로써 유전학적, 생리학적 연구의 대상이 되어 왔다. 본 균주는 널리 분포하는 Gram-positive 종이며 활동성을 지닌 가느다란 막대기 형태를 갖는다. 또한 매우 다양한 조건에서 성장 및 생존을 할 수 있음이 알려져 있다. 즉 호기성, 혐기성 조건 모두에서 활동이 가능하며 특히 혐기성 상태에서의 발효 및 광합성에 의한 에너지 합성 과정은 많은 연구의 초점이 되었다. 더불어 빛에 의한 자가 영양성장(photoautotrophic growth)도 일어난다. 이러한 균주의 특성으로 인하여 N₂ 고정(20), CO 산화(4), CO₂ 고정(5), H₂ 생성(18, 29), photosystem(21), ATP synthase system(19) 등이 주된 연구 과제로 진행되어져 왔다. 그 중 N₂ fixation system이 가장 많은 연구가 진행되어져 있는데 system은 MoFe, Fe nitrogenase로 구성되어 있으며 가역적인 ADP-ribosylation을 통한 system의 조절 기작이 보고되어진바 있으며(13), 이는 질소와 균주의 에너지 상태를 인지하는 것으로 알려져 있다(2). 또한 *R. rubrum*은 CO만을 이용하여 성장할 수 있으며 이에 대한 연구가 다양하게 진행되어지고 있다. 또한 광합성 균체는 다른 미생물과는 달리 여러 조건 하에서 고농도의 유기물을 이용할 수 있어 고농도 유기성 폐수처리에 이용이 가능할 뿐만 아니라,

생성된 슬러지는 사료 및 비료로서의 가치가 높아 사료, 토양 개량제, 유기질 비료 등으로 재활용이 가능한 장점을 가지고 있어 최근 새로운 생물학적 폐수처리 공법으로 주목을 받고 있다(1, 3, 14, 26).

많은 수의 균주는 genomic DNA와 분리된 원형의 plasmid 형태의 유전적 정보를 가지고 있으며 이들에 담겨 있는 정보가 환경에 따른 신진대사 조절에 영향을 준다는 것이 보고된바 있다. 실제로 *Rhodobacteria capulatus*(15), *Rhodobacter spaeroides*(25) 등의 광박테리아에서 이러한 plasmid를 분리하고자 하는 몇몇 연구가 시도된바 있다. Kuhl의 연구진은 다양한 종의 *Rhodospirillum rubrum*으로부터 extrachromosomal plasmid를 분리하였으며(10) 나아가 plasmid를 가지지 않은 돌연변이체(plasmid deficient mutant)가 정상균주와 달리 광원으로부터 광합성을 통한 생존능력을 상실함을 보여주었다(11). 이는 이러한 plasmid가 균주가 광원에 의해 다양한 신진대사 기능이 전환될 때 중요한 기능을 담당함을 제시하는 바이다. 분리한 plasmid 가운데 pKY1은 크기가 가장 작고 다른 plasmid와 유사한 제한효소 절단 지도(restriction mapping)를 가짐으로써 이들의 연구에 대한 좋은 대상이 되어질것임이 제시된바 있다. 본 연구는 *R. rubrum*이 갖는 chromosomal DNA와 분리되어 존재하는 원형 플라스미드(circular plasmid) pYK1의 부분적 염기서열을 밝히고 이를 통하여 플라스미드의 물리적구조(physical structure), assembly, annotation을 하였다. 본 분석을 통하여 8가지의 추정적 단백질의 유전자 지도를 제시하였으며 이들은 유전자 재조합을 통한 유전자 발현양상 조절에 관여하는 단백질임을 알 수 있었다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-3668-4701, Fax: 82-2-741-4701
E-mail: gold@knou.ac.kr

재료 및 방법

Plasmid DNA 분리 및 정제

균주 배양을 위하여 30°C, 4,000 lux 명조건에서 계대 배양 후 원심분리(4°C, 2,700g, 15분)로 균체를 회수하고 이를 최적 생육 조건으로 알려진 초기 pH6.8, 30°C, 조도 2,500 lux의 혐기적 광 조건 하에서 sodium acetate 1g, sodium propionate 1g, sodium-butyrate 1g 이 첨가된 Lascelles의 기본배지에 접종하여 배양하였다(12). 준비된 균체로 부터의 plasmid pKY1의 분리는 kuhl 외(10)의 방법을 이용하였다. 균주에서 DNA를 분리한 뒤 genomic DNA (chromosomal DNA)와 분리하기 위하여 CsCl-ethidium bromide gradient 원심분리법을 이용하여 plasmid pKY1을 분리한 뒤 이를 0.6% agarose gel에서 전기 영동하였다. 전기영동을 통하여 정제도를 확인하고 다시 plasmid pKY1으로 추정되어지는 크기의 DNA를 gel elution을 통하여 순수분리하였다. 정제되어진 plasmid가 pKY1임을 확인하기 위하여 기존의 보고(10, 11)를 바탕으로 BamHI, HindIII, EcoRI, XhoI의 제한효소로 처리하여 나타나는 단편의 크기를 확인하였다.

Plasmid pKY1의 물리적 지도(physical map) 작성

정제되어진 plasmid를 각각의 제한효소로 처리하여 단편화 형성한 뒤 이들 단편가운데 하나를 방사선 동위원소로 표식하여 준비한다. 표식 되어진 단편을 형성한 제한효소와 다른 제한효소로 절단한 조각을 agarose gel에서 전기 영동한다. Agarose gel에서 분리되어진 각 단편의 위치를 ethidium bromide를 이용하여 염색한 뒤 이들의 위치를 nylon membrane 상에 미리 표시하여 둔다. Nylon membrane으로 옮겨진 DNA 단편들을 위에서 준비한 방사선 동위원소로 표식되어진 다른 제한효소의 단편을 이용하여 hybridization buffer 상에서 반응시키고 washing 후 X-ray film에 노출시켜 하여 결합하는 조각의 크기를 확인한다. 이 방법을 이용하여 제한효소 단편사이의 겹쳐지는 부분을 확인하여 이들의 물리적 연결지도(physical map)를 결정하였다.

유전자 서열 분석

분리 정제된 pKY1 plasmid를 제한효소 HindIII를 이용하여 절단한 뒤 이들의 단편을 agarose gel elution 방법을 이용하여 각각을 분리 정제 하였다. 이를 cloning vector, pGEM vector (Promega)에 같은 제한효소로 처리 후 기본적 분자생물학적 기법을 이용하여 삽입하였다(23). 박테리아 (*E. coli* DH5 α)을 이용하여 형질 전환되어진 colony를 얻고 이를 배양하여 각각의 단편의 DNA를 가진 plasmid를 분리 정제하였다. 정제된 plasmid를 alkali solution (2.5M NaOH, 10 mM EDTA)을 이용하여 단일가닥 DNA (single stranded DNA)로 만들고 cloning vector의 T7 promoter를 기준으로 이에 대한 primer를 이용한 Sanger 분석법을 이용한 염기서열 분석을 의뢰하였다(Bioneer Co. Ltd).

염기서열의 기능 및 구조 분석

얻어진 유전자배열을 gene data bank의 BLAST search의 유전

자 상동성 조사를 통해 관련 유전자를 검색하였다. 또한 얻어진 유전자 배열을 BioEdit program의 6 frame translation을 통하여 형성 가능한 open reading frame을 얻고 여기서부터 얻어지는 추정 아미노산 배열의 펩타이드 단편은 Protein data bank Blast search를 통하여 관련 단백질을 찾아 이들의 기능을 유추하였다.

결과 및 고찰

Kuhl의 연구진은 다양한 종의 *Rhodospirillum rubrum* 균주 가운데 plasmid를 가지지 않은 돌연변이체(plasmid deficient mutant)는 정상균주(wild type strain)와 달리 광원으로부터 광합성을 통한 생존능력을 상실함을 보여주었다(11). 이는 *R. rubrum* 균주의 extrachromosomal plasmid 내에 균주가 가지는 광원에 의한 다양한 신진대사 기능 전환에 있어 중요한 기능을 담당하는 단백질에 대한 유전적 정보가 담겨있음을 의미하는 바이다.

본 연구는 균주가 가지는 extrachromosomal plasmid를 분리 정제하여 plasmid의 유전자 서열을 결정하고 이들에 대한 상동성 검색을 통하여 균주의 광원에 의한 신진대사 기능전환에 관여되는 단백질을 제시하고자 한다. 먼저 균주가 가지는 extrachromosomal plasmid (pKY1)의 분리 정제를 위하여 CsCl gradient 초고속 원심분리를 통하여 1차 정제후 agarose 전기영동을 실시하여 이전의 보고(10)와 일치하는 약 55kb의 크기를 가진 DNA (pKY1 plasmid)를 gel elution을 통하여 분리하였다. Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 CsCl 정제를 거쳤을 때는 크기가 작은 DNA 조각을 관찰할 수 있는데 이는 chromosomal DNA의 조각이거나 다른 종의 *R. rubrum*에서 보는 바와 같은

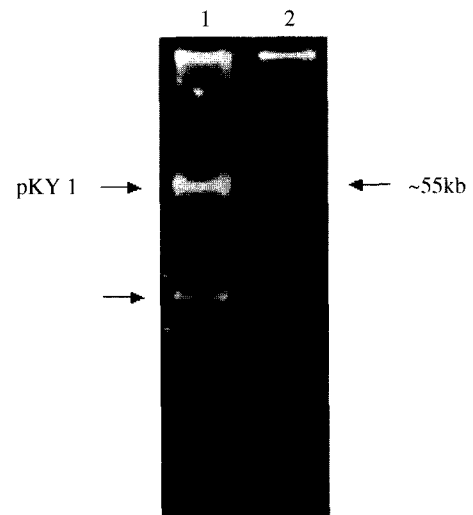


Fig. 1. Purification of *R. rubrum* plasmid pKY1. Total genomic DNA was isolated and the extrachromosomal plasmid pKY1 was separated from chromosomal DNA by ultracentrifugation using CsCl-ethidium bromide gradient. Plasmid pKY1 was further purified by gel elution. DNAs (1. After CsCl ethidium bromide gradient, 2. After gel elution) were identified on 0.6% agarose gel electrophoresis and the size of pKY1 plasmid was estimated by 24 kb fragment of λ HindIII marker.

여러 가지 종류의 extrachromosomal plasmid의 존재로 추정되어진다. 따라서 순수한 pKY1 plasmid의 정제를 위하여 agarose gel에서 해당 크기의 DNA를 절제하여 gel elution을 통해 pKY1 plasmid 만을 정제하여 이를 확인하였다(Fig 1. lane2). 정제되어진 pKY1 plasmid를 확인하기 위하여 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Xho*I을 이용하여 유전자를 절단한 뒤 이들의 단편화 모양을 agarose gel (1%)에서 확인하여본 결과 이전의 보고와 일치하였다(10). 유전자 서열분석을 위한 *Hind*III 단편의 연결순서에 대한 물리적 지도를 확인하고자 서로 다른 제한 효소로 절단한 단편을 방사선 동위원소로 표식된 조각들을 이용한 hybridization을 통하여 절단화 된 단편의 물리적 연결을 결정하였으며 이는 이전의 보고와 일치함을 관찰할 수 있었다(10, 11, 30).

전체적 특성

위에서 분리한 plasmid pKY1을 제한효소 *Hind*III를 이용하여 절단하여 생긴 단편 가운데 Fig. 2에서 표시한 5가지 조각 (크기의 순서에 따라 C, D, E, F, G로 표시하였다) 과 그림에서는 잘 나타나지 않는 작은 조각 (0.7 kb, 조각 I)을 각각 gel elution purification 방법을 통하여 분리 정제한 하여 이들 각 6개 조각을 각각 cloning vector (pGEM)에 삽입하여 이들에 대한 유전자 서열을 결정하였다. *Hind*III에 의한 단편 D, E, F, G, I는 유전자 지도(Fig. 3)에서 보는 바와 같이 연속적인 부분임으로 유전자 분석에 있어 이들을 연결하여 사용하였다 (이들의 연결순서에 의해 F-G로 표기하기로 한다). G+C content는 *Hind*III 조각 C

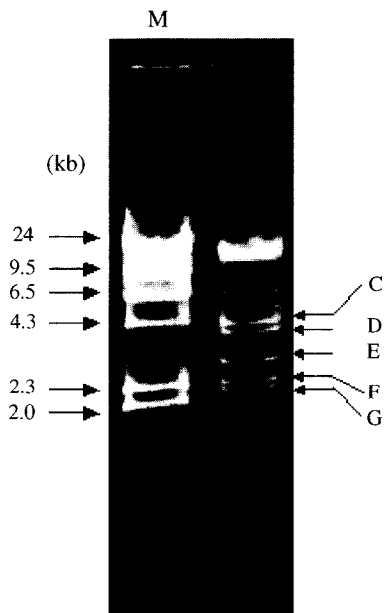


Fig. 2. Digested pattern of plasmid pKY1 with *Bam*HI. Purified plasmid pKY1 was treated with the restriction enzyme, *Hind*III and fragments were separated by 1% agarose gel electrophoresis. Each fragment was isolated and purified by gel elution, and subsequently cloned into pGEM vector for DNA seqencing. (M, DNA size marker, λ *Hind*III)

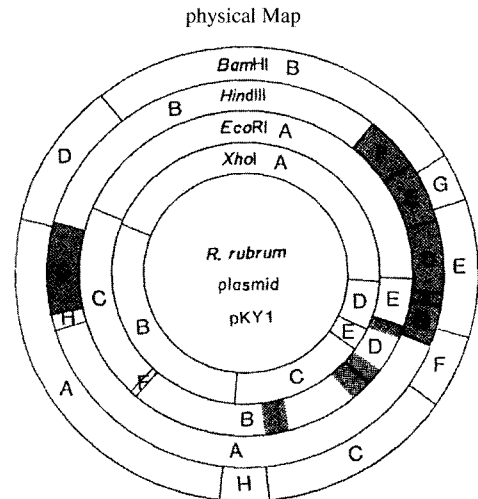


Fig. 3. Physical map of *Rhodospirillum rubrum* plasmid pKY1.

(4430 bp)의 경우 62.48%, *Hind*III 조각 모음 F-G (11819 bp)의 경우는 54.87%를 보여 주었다. 결정된 유전자 배열에 대한 gene identity search 및 유전자를 이용한 6 frame translation을 이용한 아미노산 유사성 비교를 통하여 제한효소 단편의 유전적 정보를 결정하였다.

유사성 유전자 검색

유전자 서열 및 6 frame translation을 통한 추정 아미노산 서열을 이용한 유사성을 분석을 통하여 기존의 단백질과 높은 유사성을 지닌 단백질을 8 개를 유추하였다(Table 1). Fragment C에 위치하는 DNA-invertase와 transposase는 기존 *R. rubrum*에서 밝혀진 단백질의 아미노산 서열과 완전히 일치하였으며 그 외 단편에서 얻어진 유사성 단백질들도 높은 유사성을 보임을 알 수 있다. 이들은 대부분 유전자 재조합 (Recombination) 조절 기작에 관여함을 볼 수 있다. 또한 유전자 배열 분석에서 다른 균주들의 plasmid에서 관찰할 수 있는 유전자 사이의 IS-like sequence가 중간 중간 삽입되어져 있음을 확인하였고 각 단편에서 이들을 조절하는 transposase (Fragment C, 1722-3167; Fragment F-G, 2007-1081)의 존재를 확인하였다. 분석을 통하여 얻어진 유전 정보의 위치를 바탕으로 Fig. 4의 추정적 plasmid pKY1 ORF에 대한 물리적 지도를 작성하였다.

유전자 기능에 대한 유추

유전자 분석을 통해 유추되어진 DNA-invertase 및 transposase는 이미 알려진 바와 같이 유전자 재조합을 통한 유전자 발현 조절에 관여함이 잘 알려져 있다(8, 22, 24). 일부의 박테리아 및 박테리오파지(bacteriophage)에서 이에 대한 연구가 많이 진행되어 이들의 DNA 조각의 inversion을 통한 유전자의 다양한 발현 (alternative gene expression)이 이루어짐이 보고 된바 있다 (7, 9, 16). 더욱이 주변 환경에 따른 균주 내 recombination activable factor의 활성을 통한 DNA-invertase 활성 변화는 이들 균주의

Table 1. Putative and characterized pKY1 genes and their functions

Location of fragment	Location of ORF	Frame translation ¹	Similarity	Identity
Fragment C	2,849-4,430	Direct ³	99%	D17434: <i>Rhodospirillum rubrum</i> DNA invertase
Fragment C	1,832 - 2,875	Frame 2	66%	ZP_00057775: Distinct helicase family with a unique C-terminal domain including a metal-binding cysteine cluster [<i>Thermobifidafusca</i>] ZP_00090217: ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport systems, periplasmic components [<i>Azotobacter vinelandii</i>]
Fragment C	1,722-3,167			Frame 3
Fragment C	621-1	Frame -3	99%	ZP_00016475: Transcriptional regulator [<i>Rhodospirillum rubrum</i>]
Fragment F	1,242-1,769	Direct	81%	AE007244: <i>Sinorhizobium meliloti</i> plasmid pSymA section 50 of 121 of the complete plasmid sequence
Fragment F	1-877	Direct	95%	D17434: <i>Rhodospirillum rubrum</i> DNA-invertase
Fragment collection ⁴	2,007-1,081	Frame 1	66%	ZP_00016443: Transposase and inactivated derivatives [<i>Rhodospirillum rubrum</i>]
Fragment collection	892-1,557	Frame 1	70%	AAG60819: ID263 [<i>Bradyrhizobium japonicum</i>]

¹If there are no significant homology in genes using BLAST search, genes were translated to amino acid according to possible 6 frames, including both sense and antisense direction and then predicted amino acid sequences were subjected to compare the Protein database in BLAST. Indicated ORF covers the location of genes. Positive number means the sense directional translation and negative number is for antisense directional translation.

²Protein identity was represented as one protein with a high homology level in BLAST *p*-value score.

³The result was obtained not from amino acid homology search, but from direct gene homology search.

⁴Because HindIII fragments designated as D, E, F, G, I were continuous connection as shown in physical map of pKY1, it was represented by Fragment collection. Connection order is F-E-D-I-G.

변화된 환경에 대한 적응과 관련이 있음이 보고 된바 있다(27, 28). Gene inversion을 통한 유전자 발현 양상의 변화는 bacteriophage의 세포막 단백질의 변화를 가져오며 이는 phage cycle과 관련이 있다(7, 16, 28). 광합성 균체들이 혐기성 조건 하에서 광원을 이용한 다양한 신진대사 변형 기작을 감안하여 볼 때 본 연구에서 밝힌 DNA-invertase 및 transposase의 존재는 그 의미가 매우 크다고 할 수 있을 것이다. 특히 Kuhl(10)에 의하여 보고된 Plasmid-deficient *R. rubrum* 균주의 광합성에 의

한 성장억제는 본 실험의 결과를 뒷받침하는 것이라 할 수 있을 것이다. 또한 Fragment C에 위치한 유전자 전사 조절인자 (transcriptional factor)는 이러한 gene recombination을 조절하는 단백질의 전사를 조절하는 역할을 할 것으로 추정된다. 전체 genome 상에서 기능 유전자의 위치를 결정하고 이들의 조절위치를 결정하는 일은 유전자 발현 양상을 이해함에 있어 중요한 자료를 제공함과 동시에 gene targeting 등의 유전자 조작을 통한 새로운 균주 개발에 필수적인 요소라 할 수 있을 것이다. 근래 광합성 박테리아 균주가 새로운 생물학적 폐수처리 공법으로써 환경정화에 적용됨을 감안하여 볼 때 이는 산업적으로도 매우 중요한 의미를 가질 것이다. 현재 나머지 조각의 (Fragment B, H, A) 염기서열 분석 중에 있으며 바탕으로 pKY1의 전체 유전자의 유전자 정보 map을 작성하고 이들의 기능을 확인하는 연구를 계속 진행 중에 있다.

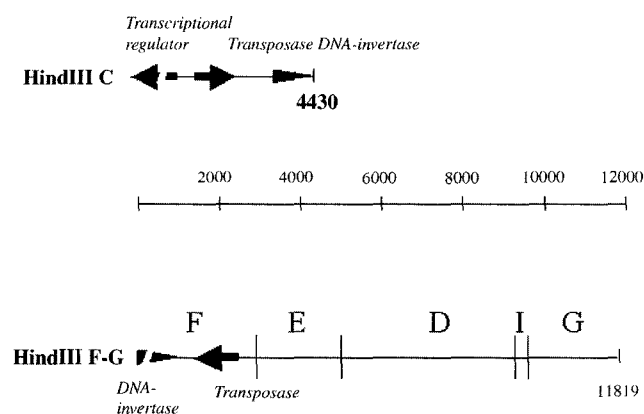


Fig. 4. Predicted ORFs and location of genes for *R. rubrum* pKY1. Based on gene search analysis (BLAST), related proteins were predicted. According to this data, location of putative proteins in Hind III gene fragment were shown. The broken arrow represents that the genes for indicated protein involves some insertion sequences.

감사의 말

이 연구는 한국방송통신대학교 학술진흥재단의 2002 학년도 학술연구비에 의해 수행되었다. 그리고 이 연구에 협조해 주신 일본오사카대학 단백질연구소의 고 호리오켄이치 교수님 그리고 카쿠노도미사부로 교수님 그 외 여러 연구원 여러분들에게도 감사의 뜻을 전한다. 또한 오콜라호마의학연구소의 자유라 디칼 및 노화 생화학연구소의 여러분들에게도 감사의 뜻을 전한다.

참고문헌

1. Choi, K., J. Yang, E. Park, K. Bang, and S. Lee. 1997. Isolation of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and its characteristics for treatment of swine wastewater. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 322-327.
2. Fitzmaurice, W. P., L. L. Saari, R. G. Lowery, P. W. Ludden, and G. P. Roberts. 1989. Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol. Gen. Genet.* 218, 340-347.
3. Hayashi, H., M. Nakano and S. Morita. 1982. Comparative studies of protein properties and bacteriochlorophyll contents of bacteriochlorophyll-protein complex from spectrally different type of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biochem.* 92, 1805.
4. Heo, J., C. M. Halbleib, and P. W. Ludden. 2001. Redox-dependent activation of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7690-7693.
5. Heo, J., C. R. Staples, and P. W. Ludden. 2001. Redox-dependent CO₂ reduction activity of CO dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry.* 40, 7604-7611.
6. Isaacs, N. W., R. J. Cogdell, A. A. Freer, and S. M. Prince. 1995. Light-harvesting mechanisms in purple photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 794-797.
7. Klippel, A., G. Mertens, T. Patschinsky, and R. Kahmann. 1988. The DNA invertase Gin of phage Mu: formation of a covalent complex with DNA via a phosphoserine at amino acid position 9. *EMBO J.* 7, 1229-1237.
8. Klippel, A., K. Cloppenborg, and R. Kahmann. 1988. Isolation and characterization of unusual *gin* mutants. *EMBO J.* 7, 3983-3989.
9. Koch, C., and R. Kahmann. 1986. Purification and properties of the DNA invertase *gin* encoded by bacteriophage Mu. *J. Biol. Chem.* 261, 15668-15672.
10. Kuhl S. A., D. W. Nix, D. C. Yoch. 1983. Characterization of a *Rhodospirillum rubrum* plasmid: loss of photosynthetic growth in plasmidless strains. *J. Bacteriol.* 156, 737-742.
11. Kuhl S. A., L. T. Wimer, and D.C. Yoch. 1984. Plasmidless, photosynthetically incompetent mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 159, 913-918.
12. Lasscelles, J. 1956. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochem. J.* 62, 78-93.
13. Ludden, P. W. 1994. Reversible ADP-ribosylation as a mechanism of enzyme regulation in prokaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* 138, 123-129.
14. Madigan, M. T., J. C. Cox, and H. Gest. 1982. Photopigments in *R. capsulata* cells grown anaerobically in darkness. *J. Bacteriol.* 150, 1422-1429.
15. Marrs, B. 1981. Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodospseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid. *J. Bacteriol.* 146, 1003-1012.
16. Mertens, G., A. Klippel, H. Fuss, H. Blocker, R. Frank, and R. Kahmann. 1988. Site-specific recombination in bacteriophage Mu: characterization of binding sites for the DNA invertase Gin. *EMBO J.* 7, 1219-1227.
17. Montgomery, B.L., and J. C. Lagarias. 2002. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends. Plant Sci.* 7, 357-366.
18. Nandi, R., and S. Sengupta. 1998. Microbial production of hydrogen: an overview. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 61-84.
19. Nathanson, L., and Z. Gromet-Elhanan. 2000. Mutations in the β -subunit Thr(159) and Glu(184) of the *Rhodospirillum rubrum* F(0)F(1) ATP synthase reveal differences in ligands for the coupled Mg²⁺- and decoupled Ca²⁺-dependent F(0)F(1) activities. *J. Biol. Chem.* 275, 901-905.
20. Ormerod, J. G., K. S. Ormerod, and H. Gest. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 449-463.
21. Pairoba, C. F., and R. H. Vallejos. 1989. Protein phosphorylation in purple photosynthetic bacteria. *Biochimie.* 71, 1039-1041.
22. Rowland, S. J., and K. G. Dyke. 1990. The Min DNA inversion enzyme of plasmid p15B of *Escherichia coli* 15T-: a new member of the Din family of site-specific recombinases. *Mol. Microbiol.* 4, 991-997.
23. Sambrook, J., and D. W. Russel 2001. Molecular cloning (a laboratory manual)
24. Sandmeier, H., S. Iida, P. Hubner, R. Hiestand-Nauer, and W. Arber. 1991. Gene organization in the multiple DNA inversion region min of plasmid p15B of *E.coli* 15T-: assemblage of a variable gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 5831-5838.
25. Saunders, V. A., J. R. Saunders, and P. M. Bennett. 1976. Extrachromosomal deoxyribonucleic acid in wild-type and photosynthetically incompetent strains of *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Bacteriol.* 125, 1180-1187.
26. Sawada, H. and P. L. Rogers. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment: Pure culture studies with *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Ferment. Technol.* 55, 297-310.
27. Vaisvila, R., G. Vilkaitis, and A. Janulaitis. 1995. Identification of a gene encoding a DNA invertase-like enzyme adjacent to the PaeR71 restriction-modification system. *Gene* 157, 81-4.
28. van de Putte P, and N. Goosen. 1992. DNA inversions in phages and bacteria. *Trends Genet.* 8, 457-462.
29. Willison, J. C., Y. Jouanneau, A. Colbeau, and P. M. Vignais. 1983. H₂ metabolism in photosynthetic bacteria and relationship to N₂ fixation. *Ann. Microbiol.* 134B, 115-135.
30. Kakuno, T., N. Ichimura, N. Kaino, T. Ideguchi, H. Namikawa, B. Kim, H. Nishise, J. Yamashita, and T. Horio. 1990. Structural comparison between *Rhodospirillum rubrum* plasmid and chloroplast DNA. *Curr. Res. Photosys.* III, 517-520.

(Received March 18, 2004/Accepted April 12, 2004)

ABSTRACT : Genetic Analysis and its Application of *Rhodospirillum rubrum* PKY1 Plasmid**Bok-Hwan Kim*** and **Joungmok Kim¹** (Dept. of Environmental Health, Korea Open Univ., Seoul 110-791, Korea, ¹Dept. of Chemistry, Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea)

Photosynthetic bacteria, *Rhodospirillum rubrum*, have been reported to change their metabolic patterns depending on the light condition. The genetic approach for such a metabolic change is one of main subject in photosynthetic bacteria. It has been reported that the extrachromosomal plasmid might be related to this metabolic regulation. In this study, we have determined the partial sequences of *R. rubrum* plasmid pKY1 with *Hind*III fragments and the predicted pKY1 ORFs and physical map. We found the 8 putative proteins related to the genetic recombination of bacterium, which is reported to the alternative gene expression. Our results suggest that the genes located in pKY1 are possibly involved in the metabolic switch according to the photocondition.