

大腸菌의 *xylR/T* 變異株의 分離 및 그 特性

盧東鉉 · 李麟九

慶北大學校 農科大學 農化學科

Isolation and Characterization of *xylR/T* Mutants in *Escherichia coli*

Dong Hyun ROH · In Koo RHEE

Dept. of Agricultural Chemistry, Coll. of Agriculture,
Kyungpook National University.

Summary

Nine strains of *xyl* mutants that could not utilize xylose as a carbon source were isolated from *E. coli* JM109 by the treatment of NTG in order to investigate the regulation of xylose operon and to use recipient cells for the cloning of *xylR* gene. For the characterization of all isolated mutants, colony colors of all mutants on MacConkey-xylose and MacConkey-xylulose agar plate were observed for the utilization of xylose and xylulose, and the growth level and the activity of xylose isomerase and xylulokinase were determined in need. The isolated *xylR/T* mutants formed the white colony on MacConkey-xylose and MacConkey-xylulose agar plate. They did not detect the activity of xylose isomerase, and the activity of xylose isomerase was not restored in transformants of *xylR/T* mutant with pEX13 which contained *xylA* gene. *xylR* and *xylT* mutants were classified from *xylR/T* mutants depending upon the growth level in minimal medium. *xylT* mutants; DH13, DH121 and DH125 could grow a little in that medium, but *xylR* mutants; DH10, DH53, and DH60 could not grow that medium.

緒 論

大腸菌은 細胞外에 存在하는 xylose가 xylose transport(*xylR/T*) 蛋白質에 의해 細胞內로 移動된 후 xylose isomerase(*xylA*)에 의해 xylulose로 異性化 되어 xylulokinase(*xylB*)에 의해 xylulose-5-phosphate로 磷酸化 된 다음 五炭糖磷酸經路

를 거쳐 代謝된다. 이들 xylose 代謝經路에 關與하는 酵素를 코드하는 4개의 遺傳子는 染色體 地圖의 *glyS*(glycine-tRNA synthetase) 部位 (maleszka, 1982)에 隣接한 80分 位置에 오픈론을 形成하여 存在해 있고, xylose 存在下에서 誘導되며 調節因子(regulatory protein; *xylR*의 產物)에 의해 그림1과 같은 調節을 받는다고 한

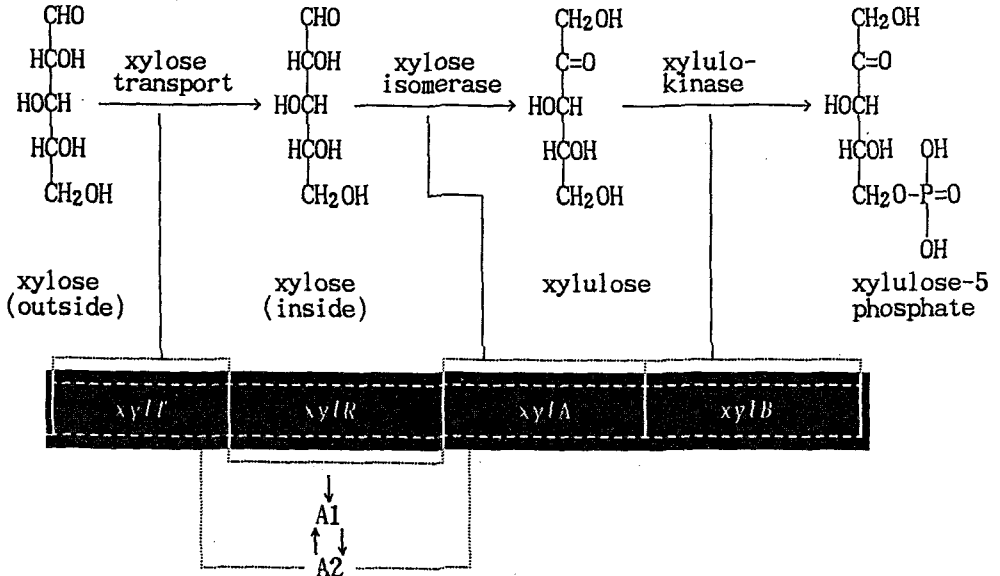


Fig. 1. The pathway for xylose metabolism in *E. coli*. The order of genes on the chromosome is at the bottom but the order of *xylR* and *xylT* is not exact. The gene *xylR* is regulatory, controlling the activity of genes *xylT*, *xylA*, and *xylB* through a postulated activator A1, which converts to the state A2, after interaction with the inducer.

다(David and Wiesmeyer, 1970). 그리고 xylose 운반에는 *xylT* 유전자 외에 91분 위치에 (Bachmann, 1990) *xylE* 유전자가 존재한다(Lam, 1980; Davis, 1984).

Salmonella typhimurium 경우에는葡萄糖에 의해서는異化物抑制를 받으며腸의調節을 받는다는研究가詳細하게 이루어져 있으나大腸菌에서는Rosenfeld(1984)가推定만했을뿐詳細한研究가 이루어져 있지 않다. 그리고그람陽性菌이며陰의調節을 받는*Bacillus subtilis*의xylose 오페론은그調節機構 즉轉寫部位, operator 部位 및 *xylR* 유전자 등에 대한研究가 이루어져 있는(Gatner, 1988; Kruezer, 1989) 반면陽의調節을 받는陰性菌인大腸菌의xylose 오페론은*B. subtilis*와는달리xylose 오페론의調節機構, operator 部位 및 *xylR* 유전자 등에 대하여詳細하게 알려져 있지 않다. 또한xylose代謝의調節을擔當하는 *xylR* 유전자의位置가xylose 오페론 위에서精確하게 알려져 있지 않을뿐 아니라 *xylR*이 어떻게作用하여그調節機能을 나타내는지도 잘 알려져 있지 않다.

그러므로大腸菌을對象으로하여아직까지報告된바없는大腸菌의xylose 오페론의調節機構를 밝히고 *xylR* 유전자의 클로닝을 위한受容細胞로 사용하기 위해서 *E. coli* JM109에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를處理하여 *xylR*과 *xylT* 變異株의分離를 시도하였다.

材料 및 方法

1. 菌株 및 플라스미드

本實驗에 사용된 菌株와 플라스미드는 표 1과 같다. Xylose 代謝經路 유전자를 모두 가진 *E. coli* JM109를 新株로 하여 NTG를處理하여 *xyl* 變異株를 分離하였다. 플라스미드는 *xylA* 유전자만을 가지고 있는 pEX13과 *xyl* 오페론 유전자를 모두 가지는 pBX1, *xylB* 유전자만을 가지는 pXR8, *xylR/T* 유전자만을 가진 pXR10을 사용하였다.

Table 1. Strains and plasmids used

Strains & plasmids	Relevant properties	Reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 the Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacIq lacZAM15]</i>	Yanisch-Perron et al. (1985)
DH 10	<i>xylR</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 13	<i>xylT</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 35	<i>xylR</i> , <i>xylA</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 43	<i>xylB</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 53	<i>xylR</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 60	<i>xylR</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH 77	<i>xylA</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH121	<i>xylT</i> ; NTG mutant from JM109	This study
DH125	<i>xylT</i> ; NTG mutant from JM109	This study
Plasmids		
pEX13	Amp ^r , Tet ^r , <i>xylA</i>	Rhee (1986)
pBX1	Amp ^r , Tet ^r , <i>xylA</i> , <i>xylB</i> , <i>xylR</i> , <i>xylT</i>	Kang (1992)
pXR8	Amp ^r , <i>xylB</i>	Kang (1992)
pXR10	Tet ^r , <i>xylR/T</i>	Kang (1992)

2. 培地 및 大腸菌의 培養

大腸菌의 培養은 完全培地인 Luria-broth 培地(1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl 이하 LB 培地라 稱함; Bertani and Weigle, 1953)를 使用하였고 *xyl* 變異株를 分離하기 위한 最小培地로는 Davis Mingioli (DM) 培地(0.5% K₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.1% (NH₂)SO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.05% Na-citrate·3H₂O; David와 Mingioli, 1950)에 0.5% xylose를 加한 DM-Xyl 培地와 Davis Mingioli 培地에 0.5% glucose를 加한 DM-Glc 培地를 使用하였다. 最小培地에는 營養要求性에 따라 30μg/ml의 proline과 1μg/ml의 thiamin-HCl을 添加하여 使用하였다. *xyl* 變異株의 分離 및 形質轉換 選擇培地로는

MacConkey agar base에 0.5% xylose를 添加한 것(MC-Xyl 寒天平板培地) 또는 0.5% xylulose를 添加한 것(MC-Xylu 寒天平板培地)을 使用하였으며, 抗生劑로는 50μg/ml 또는 100μg/ml의 ampicillin과 25μg/ml의 tetracycline을 必要에 따라 添加하여 使用하였다.

그리고 플라스미드 DNA의 抽出을 위해서는 Terrific broth(1.2% tryptone, 2.4% yeast extract, 0.4% glycerol, 1.25% KH₂PO₄, 0.25% K₂HPO₄, 이하 TB 培地라 稱함; Tartof and Hobbs, 1987)를 使用하였으며 酵素活性 測定을 위해서는 0.2% xylose를 添加한 LB 培地를 使用하였다.

大腸菌의 培養은 LB 培地에서 18時間 以上

培養한 種培養液을 1%(v/v)되게 接種한 後 30°C에서 120 strokes/min의 速度로 진탕하면서 15時間 培養하였다. 菌의 生育度는 Milton Roy 社의 Spectronic 21을 使用하여 600nm에서의 吸光度를 測定하여 나타내었다.

3. xyl 變異株의 分離

變異劑의 處理는 Aldelberg(1965)의 方法을 약간 變形시켜 다음과 같이 行하였다. 種培養液을 LB 培地에 1%되게 接種한 後 30°C에서 中期代數增殖期까지인 4時間 동안 진탕 培養한 다음 遠心集菌하여 100mM citrate buffer(pH 5.5)로 2회 洗滌하고 同一 緩衝液에 懸濁시켰다. 이 菌體懸濁液에 NTG를 最終濃도가 100 μ g/ml되게 添加하여 37°C에서 20分間 處理한 後 遠心分離하여 100mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 洗滌한 다음 DM-Xyl 培地에 懸濁시켜 30°C에서 2時間 진탕 培養하였다. 여기에 screen을 위해 ampicillin을 50 μ g/ml의 濃도로 添加하여 30°C에서 1.5時間 處理시킨 後 遠心分離하여 100mM phosphate buffer(pH 7.0)로 洗滌한 다음 同一緩衝液에 懸濁시킨 것을 0.85% saline 溶液으로 적당히 稀釋하여 MC-Xyl 寒天平板培地에 塗抹하였다. xyl 變異株의 分離는 MC-Xyl 寒天平板培地에서 白色 콜로니를 取하여 3回 繼代하는 동안 계속 白色 콜로니를 維持하는 것 중에서 DM-Glc 培地에서는 生育이 可能하나 DM-Xyl 培地에서는 生育이 不可能한 菌株만을 골라 xyl 變異株로 使用하였다.

4. xyl 變異株의 復歸 突然變異 頻度調查

xyl 變異株로 分離된 菌株를 種培養液을 LB 培地에 1% 接種하여 15時間 培養한 後 saline 溶液으로 適當히 稀釋한 後 MC-Xyl 寒天平板培地에 塗抹하여 赤色 콜로니를 形成하는 것을 復歸 突然變異로 看做하고 復歸 突然變異 頻度を 구하였다.

5. 플라스미드 DNA의 抽出과 大腸菌의 形質轉換

大腸菌의 플라스미드는 Birnboim과 Dolley의 alkaline-SDS 方法(1979)을 이용해 抽出하였으며 大腸菌의 形質轉換은 Mandel과 Higa(1970)의 方法에 따라 염화칼슘으로 처리한 competent 細胞를 使用하였다.

6. Xylose isomerase의 活性測定

酵素의 活性測定을 위하여 0.2% xylose를 添加한 LB 培地에 種培養液을 1%되게 接種하여 30°C에서 15時間 培養한 後 培養液 1ml을 遠心集菌하여 100mM Tris maleate 緩衝液(pH 7.5)으로 2회 洗滌하여 同一 緩衝液에 懸濁시켜 놓고, 培養液의 吸光度를 600nm에서 測定해 두었다. 이 菌體懸濁液에 40 μ l/ml의 濃도로 toluene을 加한 後 25秒間 vortex mixer로 진탕한 것을 toluene 處理菌體로 하여 xylose isomerase 活性의 測定에 使用하였다.

酵素活性測定은 50 μ mol의 Tris maleate 緩衝液(pH 7.5), 1 μ mol의 MnCl₂, 10 μ mol의 xylose 및 1 μ mol의 MgCl₂을 함유한 0.7ml의 反應液에 上記의 toluene 處理菌體懸濁液 0.5ml을 잘 混合하여 37°C에서 30分間 反應시킨 後 100 μ 를 다른 시험관에 옮겨 Dische(1951)의 cysteine-carbazole法으로 生成된 xylulose를 吸光度 540nm에서 定量하였다. 酵素의 活性單位(unit)는 600nm에서 吸光度 1.0인 菌體懸濁液 당 540nm에서의 吸光度 增加로 換算하여 나타내었다.

7. Xylulokinase의 活性測定

Xylulokinase의 活性은 ATP에 의해 磷酸화된 xylulose-5-phosphate를 Ba(OH)₂로 除去하고 남은 xylulose를 定量한 Shamanna와 Sanderson이 使用한 方法(1979)에 따라 다음과 같이 行하였다. 40 μ mol Tris-HCl(pH 7.5), 10 μ mol MgCl₂, 10 μ mol ATP, 4 μ mol cysteine, 5 μ mol xylulose 및 1 μ mol NaF를 함유한 反應液 0.5ml에 toluene 處理 菌體懸濁液 0.1ml을 加하여 37°C에서 酵素反應을 시켰다. 1時間 後 이 酵素 反應液에 ethanol 3ml과 1M Ba(OH)₂ 溶液 0.2ml를 添加하여 反應을 停止시켰다. 이 反應液을 0°C에서 10分間 定置한 後 8,000 \times g

에서 5分間 遠心分離 한 後, 이 上澄液中에서 殘存하는 xylulose를 Dische(1951)의 cysteine-carbazole 法에 의해 測定하였다. 酵素의 活性 單位(unit)은 toluene 處理菌體를 넣지 않고 5 μ mol xylulose만을 넣은 對照區에서 toluene 處理菌體를 加한 實驗區의 540nm에서의 吸光度의 差를 生育度인 600nm에서의 吸光度에 대해 相對的인 量으로 나타내었다.

結果 및 考察

1. xyl 變異株의 分離

E. coli JM109에 NTG로 處理하여 MC-Xyl 寒天平板培地에서 白色 콜로니를 形成하는 xyl 變異株 9株를 分離하였다. 이들 變異株들을 모두 표 2에서와 같이 LB 培地和 DM-Glc 및 DM-Xyl 培地에서 培養했을 때 LB 培地和 DM-Glc 培地에서는 生育이 良好했으나, DM-Xyl 培地에서는 生育이 不可能하였다.

그리고 이들이 xyl 變異株들인가를 確認하기 위해 xyl 오페론의 遺傳子를 모두 含有하는 pBX1으로 形質轉換시킨 結果 표 3과 같이 모두 親株인 *E. coli* JM109와 같이 MC-Xyl 寒天平板培地에서 赤色 콜로니를 形成하였으며,

Table 2. Growth of xyl mutants in *E. coli*

Strains <i>E. coli</i>	Growth ($A_{600\text{ nm}}$)		
	L broth	DM-Glc	DM-Xyl
JM109	1.089	0.967	0.676
DH 10	1.100	0.975	0.034
DH 13	0.945	0.841	0.017
DH 35	1.106	0.939	0.040
DH 43	1.086	0.948	0.029
DH 53	0.571	0.904	0.017
DH 60	0.682	0.938	0.017
DH 77	1.097	0.835	0.035
DH121	1.099	0.972	0.039
DH125	1.103	0.962	0.030

Table 3. Colony colors on MacConkey-Xylose agar and xylose isomerase(XI) activity of transformants by pBX1 in xyl mutants

Strains <i>E. coli</i>	Phenotype	XI Activity (Unit)
	MacConkey-Xylose	
JM109	Red	0.441
DH 10/pBX1	Red	0.428
DH 13/pBX1	Red	0.481
DH 35/pBX1	Red	0.551
DH 43/pBX1	Red	0.644
DH 53/pBX1	Red	0.617
DH 60/pBX1	Red	0.692
DH 77/pBX1	Red	0.613
DH121/pBX1	Red	0.776
DH125/pBX1	Red	0.728

Table 4. The reversion frequency of xyl mutants

Strains <i>E. coli</i>	Reversion Frequency
DH 10	$< 2.13 \times 10^{-11}$
DH 13	$< 1.26 \times 10^{-11}$
DH 35	$< 1.68 \times 10^{-11}$
DH 43	$< 1.09 \times 10^{-11}$
DH 53	$< 4.77 \times 10^{-10}$
DH 60	$< 1.95 \times 10^{-10}$
DH 77	$< 4.75 \times 10^{-11}$
DH121	$< 1.13 \times 10^{-11}$
DH125	$< 2.06 \times 10^{-10}$

xylose isomerase 活性도 親株의 97%~176% 水準으로 回復되었다. 이로부터 이들이 xyl 遺傳子 部位에서 變異가 일어났음을 확인할 수 있었다.

2. xyl 變異株의 復歸 突然變異 頻度

大部分의 xyl 變異株들은 표 4와 같이 約 10^{11}

Table 5. Colony colors on MacConkey agar and xylose isomerase(XI) activity of *xylA* mutant and its transformant with pEX13

Strains <i>E. coli</i>	Phenotype		XI Activity (Unit)
	MacConkey-Xylose	MacConkey-Xylulose	
JM109	Red	Red	0.438
DH 77	White	Red	0.000
DH 77/pEX13	Red	Red	0.561

個의 細胞中 復歸되는 突然變異는 하나도 존재하지 않았다. 그래서 遺傳的 安定性이 높은 이들 變異株들은 *xyl* 遺傳子의 클로닝을 위한 受容細胞로 使用하기에 適當할 것으로 생각된다.

3. *xylA* 變異株의 選別 및 特性

xylA 變異株를 選別하기 위해서 各 變異株들을 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地에서 生育시켜 본 結果 표 5에서와 같이 *xylA* 變異株 DH77는 MC-Xyl 寒天平板培地에서는 白色의 콜로니를 形成했으나 MC-Xylu 寒天平板培地에서는 赤色の 콜로니를 形成하였다. 그리고 xylose isomerase 活性을 測定한 結果는 活性이 觀察되지 않았다. DH77이 *xylA* 變異株인가를 再確認하기 위해 *xylA* 遺傳子를 含有하는 pEX13으로 形質轉換시켰을때 표 5에서와 같이 MC-Xyl 寒天平板培地에서도 赤色 콜로니를 形成하였으며 xylose isomerase 活性도 되살아 났다.

4. *xylB* 變異株의 選別 및 特性

xylB 變異株를 選別하기 위해서 各 變異株들을 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地에서 生育시켜 보았다. 그 結果 표 6에서와 같이 變異株 DH43는 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地 모두에서 白色의 콜로니를 形成하였다. 그리고 xylose isomerase 活性을 測定한 結果 이들은 親株인 *E. coli* JM109과 비슷한 活性을 나타내었다. 그리고 *xylA* 遺傳子를 含有하는 pEX13으로 形質轉換시켰을때 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地 모두에서 역시 白色 콜로니를 形成하였으며, xylose isomerase 活性은 非形質轉換株들보다 形質轉換株들이 더 높게 나타났다. DH43의 xylulokinase 活性은 親株의 14% 정도의 活性을 보였으며 *xylB* 遺傳子를 含有하는 pXR8으로 形質轉換시켰을때 MC-xyl 寒天平板培地에서 이 菌株들은 赤色 콜로니를 形成하였으나 xylulokinase 活性은 親株만큼 되살아나지 않았

Table 6. Colony colors on MacConkey agar and xylose isomerase(XI) and xylulokinase(XK) activity of *xylB* mutant and its transformants with pEX13 and pXR8

Strains <i>E. coli</i>	Phenotype		Enzyme Unit	
	MC-Xyl ^a	MC-Xylu ^b	XI Activity [*]	XK Activity
JM109	Red	Red	0.438	0.449
DH 43	White	White	0.435	0.061
DH 43/pEX13	White	White	0.626	0.067
DH 43/pXR8	Red	Red	0.421	0.282

a MacConkey-xylose agar

b MacConkey-xylulose agar

Table 7. Colony colors on MacConkey agar and xylose isomerase(XI) activity of *xyIR/T* mutants and their transformants with pEX13

Strains <i>E. coli</i>	Phenotype*		XI Activity (Unit)
	MacConkey-Xylose	MacConkey-Xylulose	
JM109	Red	Red	0.438
DH 10	White	White	0.000
DH 10/pEX13	White	White	0.053
DH 13	White	White	0.000
DH 13/pEX13	White	White	0.097
DH 35	White	White	0.000
DH 35/pEX13	White	White	0.035
DH 53	White	White	0.000
DH 53/pEX13	White	White	0.024
DH 60	White	White	0.000
DH 60/pEX13	White	White	0.044
DH121	White	White	0.000
DH121/pEX13	White	White	0.031
DH125	White	White	0.000
DH125/pEX13	White	White	0.000

* represents colony colors on MacConkey-xylose and xylulose agar plate.

다. 이러한 결과는 polycistron 구조를 이루고 있는 대腸菌의 *xyI* 오페론에서 *xyIB* 遺傳子는 *xyIA* 遺傳子의 프로모터에 의해 영향을 받기 때문인 것으로 생각된다.

5. *xyIR/T* 變異株의 選別 및 特性

xyIR/T 變異株를 選別하기 위해서 各 變異株들을 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地에서 生育시켜 보았다. 그 結果 表 7에서 보는바와 같이 이들은 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地 모두에서 白色의 콜로니를 形成하였으며, xylose isomerase 活性도 없었고, *xyIA* 遺傳子를 含有하는 pEX13으로 形質轉換시켰을 때도 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地 모두에서 白色의 콜로니를 形成하였고 xylose isomerase 活性도 아주 낮았다.

xyIR/T 變異株인가를 確認하기 위해 *xyIR/T* 遺傳子를 含有하는 것으로 推定되는 pXR10으

로 形質轉換시켰을 때 表 8에서 보는 바와 같이 DH 35/pXR10을 除外한 모두가 MC-Xyl 寒天平板培地에서 赤色 콜로니를 形成하였고 xylose isomerase 活性도 親株인 *E. coli* JM109 水準으로 되살아 났다.

6. *xyIR*과 *xyIT* 變異株의 分離

大腸菌 細胞內로의 xylose 輸送은 染色體 地圖 80分 位置의 *xyIT* 遺傳子(Ahlem, 1982)와 91分 位置의 *xyIE* 遺傳子(xylose-proton symport; Lam, 1980)의 두 가지 體系가 存在한다. 그러므로 하나의 *xyI* 오페론으로 形成되어 있는 *xyIT* 遺傳子 變異가 생겼을지라도 *xyIE* 遺傳子에 의해 어느 정도의 xylose가 느리게 輸送되어질 것으로 생각하고, *xyIR*과 *xyIT* 變異株를 구별하기 위해 *xyIR/T* 變異株들을 最小培地인 DM-Xyl 培地에서 15時間과 48時間을 培養해 보았다. 이 중 15時間 培養했을 때는 生育하지 않으나 48時間

Table 8. Colony colors on MacConkey-Xylose agar and xylose isomerase(XI) activity of transformants of *xyIR/T* mutants by pXR10

Strains <i>E. coli</i>	Phenotype	XI Activity (Unit)
	macConkey-Xylose	
JM109	Red	0.439
DH 10/pXR10	Red	0.444
DH 13/pXR10	Red	0.373
DH 35/pXR10	White	0.013
DH 53/pXR10	Red	0.571
DH 60/pXR10	Red	0.711
DH121/pXR10	Red	0.576
DH125/pXR10	Red	0.405

Table 9. Growths of *xyIR/T* mutants in minimal medium containing xylose as a carbon source

Strains <i>E. coli</i>	Growth in DM-Xyl(A _{600 nm})	
	15 hrs culture	48 hrs culture
JM109	0.824	0.824
DH 10	0.051	0.053
DH 13	0.051	0.193
DH 35	0.056	0.052
DH 53	0.021	0.034
DH 60	0.023	0.043
DH121	0.080	0.815
DH125	0.052	0.182

培養時는 生育하는 變異株 DH13, DH121 및 DH125를 *xyIT* 遺傳子에 變異가 있는 것으로 推定하고 더 이상 자라지 않는 變異株 DH10, DH35, DH53 및 DH60을 *xyIR* 遺傳子에 變異가 있는 것으로 推定할 수 있었다(표 9). 또 DM-Xyl 培地에 이들 變異株인 DH10, DH13, DH35, DH53, DH60, DH121 및 DH125를 48시간 배양 후 xylose isomerase의 活性을 測定한 結果 *xyIT*

變異株라고 推定했던 DH13, DH121 및 DH125에는 xylose isomerase 活性이 檢出되었다(데이타 미제시). 그러나 이보다 더 精確히 *xyIR*과 *xyIT*를 구별하기 위해서는 ¹⁴C-xylose를 使用하여 xylose 輸送을 測定해야 할 것으로 사료된다.

7. *xyIR/T*변이주에서 xylose isomerase와 xylulokinase의 誘導

xyIR 遺傳子는 *xyIA* 및 *xyIB*, *xyIT*에 發現을 調節하는 調節 遺傳子이므로 *xyIR* 遺傳子에 變異가 일어나면 *xyIA* 및 *xyIB*, *xyIT* 유전자에 變異가 일어나지 않더라도 이들 遺傳子の 發現이 일어나지 않는다. 이와같이 *xyIR* 遺傳子の 變異로 인해 多相遺傳子變異(pleiotrophic mutation)를 誘發하게 되는 것은 *xyIR* 遺傳子가 陽의 調節因子로 作用하기 때문이다(Shamanna and Sanderson, 1979).

xyIR 變異株인 DH10, D53, DH60 및 *xyIT* 變異株인 DH77, *xyI* 變異株는 확실하나 變異部位가 不確實한 DH35에 *xyIR/T* 遺傳子만을 가진 pXR10으로 形質轉換시켜 xylose로 誘導시켰을 때와 誘導하지 않았을 때 xylose isomerase와 xylulokinase의 活性을 測定한 結果 표 10과 같았다. *xyIR* 變異株인 DH10, DH53, DH60과 *xyIT* 變異株인 DH13, DH121, DH125에 pXR10으로 形質轉換시켜 xylose로 誘導시키면 *xyIA*와 *xyIB* 遺傳子の 發現이 誘導되었다. 그러나 *xyIA* 變異株인 DH77/pXR10 形質轉換株는 xylose로 誘導시켜도 xylose isomerase가 誘導되지 않았다. 또 DH35 變異株는 pXR10으로 形質轉換시켰을 때 xylose isomerase는 誘導되지 않았으나 xylulokinase는 誘導되는 것으로 보아 *xyIR*, *xyIA* 變異株인 것으로 推測된다.

xyIR 變異株인 DH10 및 DH53, DH60인 경우는 xylose로 誘導시켜도 xylose isomerase와 xylulokinase를 생산하지 못했으나 *xyIR/T* 遺傳子를 가진 pXR10으로 形質轉換시켰을 때는 두 酵素 모두가 誘導되었다. 이때 pXR10에는 *xyIA* 遺傳子나 *xyIB* 遺傳子를 전혀 가지고 있지 않으므로 DH10 및 DH53, DH60이 가지고 있는 *xyIA* 및 *xyIB* 遺傳子가 pXR10의 *xyIR* 遺傳子の 影響을 받아 發現된 것으로 생각된다. *xyIT* 變

Table 10. Induction of xylose isomerase(XI) and xylulokinase(XK) in *xylR/T* mutants and their transformants with pXR10

Strains <i>E. coli</i>	Inferred defected gene	Induced ^a		Uninduced ^b	
		XI Act. (Unit)	XI Act. (Unit)	XI Act. (Unit)	XI Act. (Unit)
JM109		0.517	0.353	0.060	0.051
DH 77	<i>xylA</i>	0.000	0.411	0.034	0.077
DH 77/pXR10		0.023	0.398	0.004	0.341
DH 35	<i>xylR, xylA</i>	0.030	0.059	0.000	0.094
DH 35/pXR10		0.027	0.416	0.014	0.340
DH 10	<i>xylR</i>	0.030	0.099	0.033	0.077
DH 10/pXR10		0.517	0.387	0.000	0.038
DH 53	<i>xylR</i>	0.029	0.081	0.012	0.097
DH 53/pXR10		0.506	0.387	0.041	0.067
DH 60	<i>xylR</i>	0.000	0.096	0.040	0.037
DH 60/pXR10		0.567	0.418	0.050	0.109
DH 13	<i>xylT</i>	0.106	0.235	0.000	0.027
DH 13/pXR10		0.572	0.518	0.036	0.008
DH121	<i>xylT</i>	0.000	0.053	0.094	0.067
DH121/pXR10		0.519	0.352	0.014	0.061
DH125	<i>xylT</i>	0.044	0.107	0.027	0.190
DH125/pXR10		0.547	0.374	0.032	0.192

The bacteria were cultured for 15 hrs. in LB medium with 0.4% xylose(a) or without xylose(b).

異株인 DH13 및 DH121, DH125도 pXR10으로 形質變換시켰을때 *xylA* 및 *xylB* 遺傳子의 發現 이 誘導되었지만 표 9에서와 같이 DM-Xyl 培地에서 48시간 培養했을 때 xylose를 炭素原으로 이용할 수 있었으므로 이들 變異株은 *xylR* 遺傳子에는 損傷이 없는 것으로 생각된다. 그러나 *xylR* 遺傳子와 *xylT* 遺傳子의 區別을 하기 위해서는 더 많은 實驗이 수반되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

Xylose 오페론의 調節機構를 밝히고 *xyl* 遺傳子를 가진 再組合遺傳子들의 受容細胞로 使用

하기 위해 大腸菌에 NTG를 處理하여 xylose를 利用할 수 없는 *xyl* 變異株을 最終 9株을 選拔 하였다. MC-Xyl 寒天平板培地에서 白色 콜로니로 分離된 *xyl* 變異株들은 모두 LB와 DM-Glc 培地에서는 親株인 *E. coli* JM109와 同一하게 자랐으나, DM-Xyl 培地에서는 生育하지 못했다. 그러나 *xyl* 遺傳子 全體를 가진 pBX1으로 形質變形시킨 結果 모두 MC-Xyl 寒天平板培地에서는 赤色 콜로니를 나타내고 xylose isomerase 活性도 親株과 類似하게 되살아 났다. 이들의 復歸 突然變異頻도는 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ 以下로 遺傳的으로 安定되었다.

分離된 *xyl* 變異株과 그들의 形質轉換株에 대하여 MC-Xyl과 MC-Xylu 寒天平板培地에서 콜

로니의 색을 觀察하였고 xylose isomerase와 xylulokinase의 活性을 測定하여 다시 *xylT* 變異株 3株(DH13, DH121, DH125) *xylA* 變異株 1株(DH77), *xylB* 變異株 1株(DH43) 그리고 xylose 存在下에서 이들 酵素들의 生成을 調節하는 *xylR* 變異株 3株(DH10, DH53, DH60), 마지막으로 *xylR*, *A* 遺傳子部位에 變異가 일어난 것(DH35)으로 最終選別하였다.

參 考 文 獻

1. Adelberg, E. A., M. Mandel, and G. C. C. Chen. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N - methyl - N - nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18 : 788 - 795.
2. Ahlem, C., W. Huisman, G. Neslund, and A. S. Dahms. 1982. Purification and properties of a periplasmic D-xylose-binding protein from *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 257 : 2926-2931.
3. Bachmann, B. J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8 ed. *Microbiol. Rev.* 54 : 130-197.
4. Bertani, G., and J. J. Weigle 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.*, 65 : 113.
5. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513-1523.
6. Briggs, K. A., W. E. Lancashire, and B. E. Hartley. 1984. Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. *EMBO J.* 3 : 611-616.
7. Chiang, L. C., H. Y. Hsiao, P. P. Ueng, and G. T. Tsao. 1981. Enzymatic and microbial preparation of D-xylulose from D-xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 66-69.
8. David, B. D., and E. S. Mingioli. 1950. Mutant of *Escherichia coli* requiring methionine or Vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.* 60 : 17-28.
9. David, J. D. and H. Wiesmeyer. 1970. Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* 201 : 497-499.
10. Davis, E. O., M. C. Jones-Mortimer, and P. J. F. Henderson. 1984. Location of structural gene for xylose-H⁺ symport at 91 min on the linkage map of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 259 : 1520-1525.
11. Dische, Z., and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192 : 583-587.
12. Gartner, D., M. Geissendorfer and W. Hillen. 1988. Expression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J. Bacteriol.* 170 : 3102-3109.
13. Kang, B. T. 1992. Regulation of expression of xylose catabolic genes in *Escherichia coli*. Ph. D. thesis. Kyungpook National University.
14. Kreuer, P., D. Gartner, R. Allmansberg, and W. Hillen. 1989. Identification and sequence analysis of the *Bacillus subtilis* W23 *xylR* gene and *xyl* operator. *J. Bacteriol.* 171 : 3840-3845.
15. Lam, V. M. S., K. R. Daruwalla, P. J. F. Handerson, and M. C. Johns-mortimer. 1980. Proton-linked D-xylose transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 143 : 396-402.
16. Maleszka, R., P. Y. Wang, and H. Schneider. 1982. A ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes complementing D-xylose negative mutants of *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Biochem.* 60 : 144-151.
17. Mendel, M., and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53 : 159-162.
18. Rhee, I. K., H. D. Park, S. C. Bae, W. C. Park. J. K. Jo, and J. H. Seu. 1986. Recent progress in molecular biology and genetics engi-

- neering of Korea. The Institute for Molecular Biology & Genetics. Seoul National University, Seoul. p.139.
19. Rosenfeld, S. A., P. E. Stevis, and N. W. Y. Ho. 1984. Cloning and characterization of *xyl* genes from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 194 : 410-415.
 20. Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson. 1979. Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* 139 : 64-70.
 21. Tartof, K. D., and C. A. Hobbs. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9 : 12.
 22. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains : Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 : 103-119.