

CRP* 의존성 maltose 대사 촉진 유전자 *sfs4*의 클로닝 및 염기배열 결정

정수열² · 조무제³ · 정희태¹ · 최용락^{1*}

¹동아대학교 농과대학 농화학과, ²동주여자전문대학 식품영양학과,
³경상대학교 자연과학대학 생화학과,

초록 : CRP (cAMP receptor protein)은 cAMP와 결합하여 cAMP-CRP 복합체를 형성하여 전사조절의 조절 인자로서 작용한다. *crp* 유전자에 변이를 도입하여 cAMP의 비존재 상태에서 cAMP-CRP와 비슷한 기능을 가진 *crp** 유전자가 도입된 대장균 MK2001 (*crp**, *cya::km*)을 숙주로 사용하여 cAMP 혹은 cGMP의 비존재하에서도 *mal* 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자 *sfs* (sugar fermentation stimulation) 수 종을 클로닝 하였다. 본 실험에서는 이미 밝혀진 *nlp* (Ner like protein) 유전자와 같이, *sfs*의 새로운 유전자를 탐색하여, 그 중 *sfs4*의 2126 bp 전 염기배열을 결정하고, 잠정적인 *sfs4*의 promoter 영역에는 CRP 단백질과의 결합 DNA 공통 염기배열(5' AAT TGTGA ACACCA TCACC CGT 3')이 존재함을 확인했다. *lacZ* 융합 유전자를 작성하여 TP2010R1과 MK2001의 균주에서 cAMP를 첨가할 경우 각각 2.3배, 1.8배의 β -galactosidase 활성이 증가 하는 것으로 보아 *sfs4*는 cAMP-CRP에 의해 발현 조절을 받는 것으로 나타났다(1995년 2월 20일 접수, 1995년 4월 3일 수리).

서 론

CRP (cAMP receptor protein)은 cAMP와 결합하여 cAMP-CRP 복합체를 형성함으로써 positive 혹은 negative한 조절인자로 작용한다. CRP에 의하여 유전자 발현이 제어되거나 촉진되는 것들로서는 당대사계를 비롯하여 아미노산대사계, 핵산대사계 및 막단백질 합성에 관여하는 유전자 수십 여 종이 알려져 있다.^{1,7)}

crp 유전자에 변이를 도입하여 cAMP의 비존재 상태에서 cAMP-CRP와 비슷한 발현 기능을 가진 *crp** 유전자 수 종을 몇몇 연구실에서 얻어냈다.^{8,9)} 즉, 이 변이주(*crp**)를 도입시킨 대장균에서는 cAMP 비존재 상태에서 *gal*, *lac*, *man* 유전자의 발현을 유도할 수 있으나, *mal* 유전자의 발현은 유도되지 않고 cAMP 혹은 cGMP의 존재하에서만 발현 유도가 가능하다. CRP* 변이가 도입된 대장균 MK2001 (*crp**, *cya::km*)을 숙주로 사용하여 cAMP 혹은 cGMP의 비존재하에서도 *mal* 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자 *sfs* (sugar fermentation stimulation) 수 종을 클로닝 하였다.^{10,11)}

sfs 유전자 중 *nlp* (Ner like protein) 유전자에 대하여 염기배열을 결정한 결과, *nlp* 유전자는 91개의 아미노산 잔기를 coding 하며 phage Mu 및 D108의 전사조절 단백질로서 알려져 있는 Ner 단백질과 높은 상동성(62~63%)을 나타냈으며, 전사조절 단백질에 잘 보존되어 있는 DNA와의 결합부위가 존재했으며 MacConkey 배지상에서 maltose, lactose의 이용이 촉진되어졌다.¹⁰⁾ 또한 *sfs1* 유전자도 결정되어진 1차 구조에 DNA와의 결합부

위가 존재하므로 전사 조절 단백질의 기능을 가진 것으로 생각된다.¹¹⁾

본 연구는 대장균에서 *nlp* 및 *sfs1* 같은 당대사 촉진 및 전사조절에 관여하는 새로운 유전자가 더욱 더 존재할 것으로 사료되어져 새로운 당대사 조절계 유전자를 클로닝하여 그들의 분자생물학적 특성과 1차 구조를 해석함으로써 새로운 유전자의 탐색 및 연구를 추진하며, 또 이들은 CRP*를 이용하여 클로닝된 유전자 이므로 대장균의 중요한 전사 조절계 cAMP-CRP 복합체에 의한 발현 조절 관계, *cya* 및 *crp* 발현에 미치는 영향 등을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 균주와 plasmid는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 L-broth와 최소 배지(M9)에서 배양했다. 여러가지 당류의 이용성 측정을 위하여는 MacConkey 배지에 원하는 당류를 1% 첨가하여 사용하였다. 제한효소, Klenow fragment, DNA ligation kit, T₄-DNA ligase 등은 Takara Shuzo사와 Pharmacia사의 제품을 사용하였다. IPTG, X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside), Glucose-B test kit는 Waco사의 제품을, cAMP는 Kojin사의 제품을 사용 하였으며, 그 밖에 사용한 bovine serum albumin, ONPG (O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), β -galactosidase 등의 모든 시약은 Sigma사 또는 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다.

찾는말 : 대장균, 클로닝, *crp**, cAMP-CRP

*연락처자

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain	Genotype	Source
Strains		
MC4100	<i>araD</i> 139, <i>lac</i> (IPOZYA), <i>StrA</i> , <i>thi</i>	(10)
MK1010	W3110, <i>cya::km</i>	(11)
MK2001	W3110, <i>cya::km</i> , <i>crp^{*1}</i>	(11)
TP2010	<i>XY1</i> , <i>cya</i> , <i>argH</i> , <i>lacX74</i> , <i>recA</i> , <i>ilv</i> , <i>Srl::Tn10</i>	(6)
TP2139	<i>xyl</i> , <i>ilvA</i> , <i>argH</i> , <i>lacX74</i> , <i>crp</i>	(6)
TP2010R1	TP2010, <i>crp^{*1}</i>	(11)
JM109	<i>recA</i> , <i>lac-pro</i> , <i>end A</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA</i> , <i>F'traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacIq-ZM15</i>	
Plasmids		
pKK223-4	<i>Amp^r</i> , <i>tacP</i> , <i>Bam</i> HI site (<i>tet</i> region) of pKK223-3 is disrupted	(11)
pMC1403	<i>lacZ</i> , <i>Amp^r</i>	(19)
pMS437C	<i>trpBA</i> , <i>lacZ</i>	(11)
M13 mp18 and mp19		

재조합 DNA techniques

Plasmid DNA의 조제, 제한효소 처리, 형질전환, agarose gel의 전기영동, 융합 유전자의 작성 및 기타 재조합 기술은 표준 방법을 사용하였다.¹²⁾ Plasmid DNA는 CsCl에 의한 초원심분리법으로 정제하여 사용하였다. 특정 DNA 단편의 조제는 제한효소로 절단하여 0.6% low melting agarose 또는 4.5% polyacrylamide gel 전기영동을 하여 원하는 단편을 회수 정제하여 사용하였다.

DNA 염기배열 결정

DNA 염기배열 결정은 bacteriophage M13 mp18과 mp19를 이용하여 dideoxy chain termination 방법¹³⁾과 Applied Biosystems사의 Taq dye primer cycling sequence kit에 의하여 automatic DNA sequencer에서 실시하였다. 짧게 subcloning 시킨 pPCM1의 삽입 단편을 M13 vector에 subcloning 시킨 후 Takara사의 kilo sequencing kit에 의하여 Exonuclease III와 Mung bean nuclease system에 의한 deletion을 실시하여 연속적으로 결손된 clone들을 양쪽 방향으로 전체 염기배열을 결정하였다.

효소활성 측정

β -Galactosidase 활성을 0.2% casamino acids와 50 μ g/ml ampicillin을 첨가한 M9배지에서 배양하여 Miller의 방법¹⁴⁾으로 측정하였다. Amylomaltase (*malQ* product) 효소활성을 측정하기 위하여 세균을 1% maltose, 0.2% casamino acids와 ampicillin (50 μ g/ml)을 첨가한 M9 배지에서 배양 하였으며, amylomaltase는 Wiesmeyer와 Cohen의 방법(1960)¹⁵⁾에 준하여 glucose가 생성되어지는 양을 분광광도계로써 정량하였으며, 조추출물의 glucose 정량은 Sharp의 방법(1972)¹⁶⁾으로 생성되어진 양을 Glucose-B test kit로 측정하였다.

단백질 전기영동

L-Broth에서 배양된 균체를 4°C에서 7000xg로 집균하여 PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄)로 2회 세척하고 차가운 acetone으로 현탁시켜 2분간 냉장 보관시켰다. 이것을 다시 집균하여 1% SDS에 현탁 시킨 뒤 2분간 반응한 다음 원심분리하여 생긴 상등액을 단백질 시료(crude extract)로 사용하였다. 단백질시료에 SDS-sample buffer를 가한 후 100°C에서 5분간 가열하여 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 Laemmli의 방법(1970)¹⁷⁾에 준하여 실시하였다.

cAMP-CRP 복합체에 의한 발현 조절 규명

융합용 vector pMC1403에 단백질 code가 일치하도록 *sfs4* 유전자의 promoter 영역을 삽입시킨 protein fusion plasmid를 작성하여 유전자의 발현을 확인하고, 대장균 TP2010 (Δ *cya*, Δ *lac*), TP2139 (Δ *crp*, Δ *lac*), TP2010R1 (*crp^{*1}*, Δ *lac*) 그리고 MK2001 (*crp^{*1}*, *cya::Km*)에 도입시켜서 cAMP-CRP 복합체에 의한 발현 조절 여부를 배지에 cAMP 첨가, 무첨가 조건에서 배양된 균주에서 β -galactosidase 활성을 측정하여 발현 여부를 규명하였다.

결과 및 고찰

유전자의 클로닝 및 subcloning

대장균 K-12 주를 L-배지에 대량 배양하여 chromosomal DNA 수백 μ g을 분리하였다. Vector인 pKK223-4 DNA는 초원심분리법에 의해 대량 분리하여 정제된 것을 사용 하였다.

*crp^{*1}* 유전자는 cAMP 비존재 하에서도 *lac*, *ara*, *xyl* 등의 당대사 관련 유전자의 발현 기능을 가지고 있으나, *mal* 유전자는 발현시키지 못한다. 따라서 maltose를 이용 못하는 균주인 MK2001 (*crp^{*1}*, *cya::km*)을 작성하여 클로닝을 위한 숙주균으로 사용하여 당대사 촉진 관련 유전자를 클로닝하였다. 상기에서 분리된 DNA를 몇 가지 제한효소로 절단한 염색체 DNA를 강력한 *tac* promoter를 지니고 있는 발현 vector인 pKK223-4의 동일 제한효소 절단 DNA에 ligation 시킨후, 숙주균인 대장균 MK2001에 형질전환 시켰다. 그리고 ampicillin (50 mg/L)과 1% maltose를 함유하고 있는 MacConkey 배지에서 red colony를 1차 선별하여 그들의 DNA를 분리한 후, 다시 2차 형질전환 시켜서 전부가 red colony인 것만을 선별하였다. 즉 이렇게 얻어진 클론은 cAMP 혹은 cGMP가 없어도 대장균 MK2001 균주에서 maltose 유전자의 발현을 촉진시킨다.

클로닝된 새로운 유전자의 DNA를 조제하여 제한효소 지도를 작성하여 기존의 확인된 유전자와 비교해본 결과 *cya* (pHC1), *mel* (pPC3) 및 *mal* (pHC2) 유전자와 동일한 클론이 본 실험에서도 얻어졌다. 또한 미지의 유전자 중 pPC1 (3.5 kb)과 pPC3 및 pHC2의 maltose 대사촉진

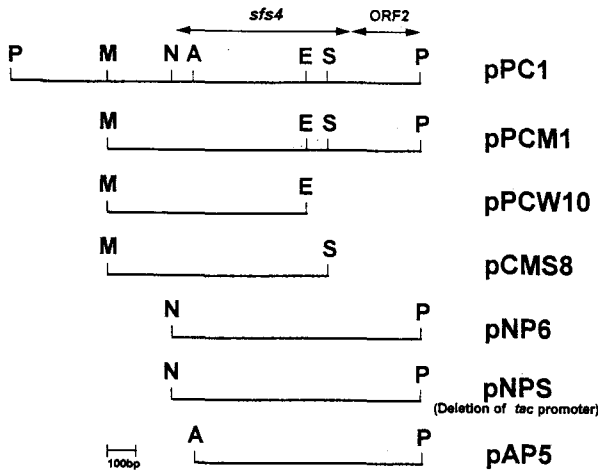


Fig. 1. Restriction maps of the subcloned DNA containing *sfs4* gene. P, *Pst*I; M, *Mlu*I; E, *Eco*RV; S, *Stu*I; A, *Afl*II; N, *Nru*I.

효율을 비교 검토한 결과 amyloamylase (*malQ* gene product)의 활성과 glucose production의 수치가 증가했으며 (결과 미제시), 그중 pPC3과 pHC2의 활성이 가장 높은 것으로 나타나 *mal* 유전자일 가능성이 크며, 이 결과는 제한효소 지도(결과 미제시) 에서도 일치 하였다.

한편 pPC1을 *crp**가 도입된 대장균 MK2001 균주에서 maltose의 이용 촉진과 *tac* promoter의 영향이 크게 나타나도록 짧은 단편의 subcloning을 시도 하였다. Plasmid pPC1의 DNA를 *Mlu*I-*Pst*I로 절단하고, pKK223-4의 vector DNA를 *Sma*I-*Pst*I로 절단한 것을 ligation 한 후, Klenow fragment 처리와 ligation 하여 MK2001 균주에 형질전환 하여 red colony clone을 얻어 plasmid pPCM1을 구축하였다. MacConkey maltose 배지에서 pPC1을 도입한 균주보다 pPCM1이 보다 강력한 red colony를 나타내었다. 한편, Fig. 1에서 보는 바와 같이 하류영역의 *Eco*RV 까지의 0.8 kb를 축소시킨 pPCW10은 white colony를 나타내어 당대사 관련 유전자 촉진 효과가 없었다. 또한 0.2 kb가 더 연장되어진 *Mlu*I-*Stu*I의 단편을 도입시켜 pCMS8을 구축했으나 white colony를 나타내었다(결과 미제시). 상류영역의 subcloning을 시도 하고자 단일 절단 효소인 *Afl*II와 *Nru*I의 존재를 확인 하였으며, 이들의 절단 부위를 이용하여 subcloning을 했다. pPCM1의 DNA를 *Eco*RI-*Nru*I로 절단하여 약 0.6 kb가 떨어져 나간 뒤에 얻어진 6.1 kb의 단편을 blunt end화 시킨 후에 상기의 방법으로 선별해 내어 pAP5를 구축했다. 그리고 같은 방법으로 *Eco*RI-*Nru*I로 절단한 뒤에 약 0.5 kb가 떨어져 나간뒤의 단편을 회수하여 재조합 시켜서 MK2001에서 red colony로 선별된 colony인 pNPS의 DNA를 조제하여 확인해 본 결과 vector인 pKK 223-4에 존재하는 *Nru*I 부위에서 생긴 단편이 결손 되어진 clone 이었다. pNPS는 vector의 *tac* promoter 부위가 결손되어진 재조합 subclone 이지만 pCM1과 같은 정도의 red colony를 나타내는 것으로 보아서 pPC1의 *sfs4* 유전자 자신의 promoter가 강력한 것으로 추정되어 진다.

Table 2. Induction of maltose metabolism in *E. coli* strains harboring the various sizes of *sfs4* genes^a

Host strain	Plasmid	Glucose production ^b (pg)	Efficiency ^c (%)
MK 2001	pKK223-4	9.50	100
	pPC1	18.33	193
	pPCW10	10.12	107
	pPCM1	45.13	475
	pNPS	43.70	460
	pAP5	50.35	530
	pKK223-4	10.20	100
MK 2001/ 1 mM cAMP	pPC1	27.20	267
	pPCM1	100.57	986
	pNPS	88.74	870
	pAP5	108.63	1065

^a*E. coli* strains were grown in L-broth supplemented with 1% maltose and 50 µg/ml ampicillin. ^bGlucose content was shown in pg per µg of protein extract. ^cGlucose production of MK2001 containing the plasmid, pKK223-4 was denoted as 100%.

Table 3. Specific activity of amyloamylase in *E. coli* harboring the various sizes of *sfs4* genes^a

Strain	Plasmid					
	pKK223-4	pPC1	pPCW10	pPCM1	pNPS	pAP5
MK2001	2.318	5.090	2.782	14.603	10.315	13.328
	(100) ^b	(220)	(120)	(630)	(445)	(575)
W3110	4.995	5.136	4.867	7.992	7.243	9.391
	(100)	(103)	(97)	(160)	(145)	(188)

^aAmyloamylase activity was shown in units/µg protein. One unit of amyloamylase activity was defined as the amount of 1 pg glucose produced per min. at 30°C, pH 7.0. *E. coli* strains were grown in L-broth supplemented with 1% glycerol and 50 µg/ml ampicillin. ^bAmyloamylase production of MK2001 and W3110 containing the plasmid, pKK223-4 were denoted as 100%.

따라서 plasmid pPC1 계열의 유전자에 의한 maltose 분해 이용능을 조사하고자 1% maltose 함유 배지에서 배양한 균체에서 분리된 crude extract에 생성된 glucose의 생성량을 Sharp등의 방법에 의하여 측정하였다. Table 2에서 보는 바와같이 pPC1은 2배, pPCM1은 최고 4.75배의 증가 효과를 나타내었다. maltose 이용의 효율은 *tac* promoter와의 짧은 거리에서 조절이 되는 재조합 plasmid가 도입될수록 더욱 더 높은 효과를 나타내어 pAP5의 도입시는 5.8배로서 더욱 증가하는 경향이였다. 그리고 배지에 1 mM cAMP 를 처리하여 측정한 결과는 11배 정도의 높은 당대사 촉진 효과를 나타내었는데, 이는 *sfs4* 유전자가 cAMP-CRP의 복합체에 의하여 발현 조절을 받고 있음을 강력히 시사해주는 결과로 추측된다.

한편 maltose 분해에 직접 관여하는 *malQ* (amyloamylase)가 *sfs4*에 의해 발현이 조절되어짐을 확인하고자 *sfs4* 유전자를 도입시킨 균주에서 효소의 활성을 측정하였다 (Table 3). amyloamylase 활성은 *sfs4* 유전자(pPCM1)가 도입된 균주에서 측정해본 결과 최대 4.3배, 더욱 짧게

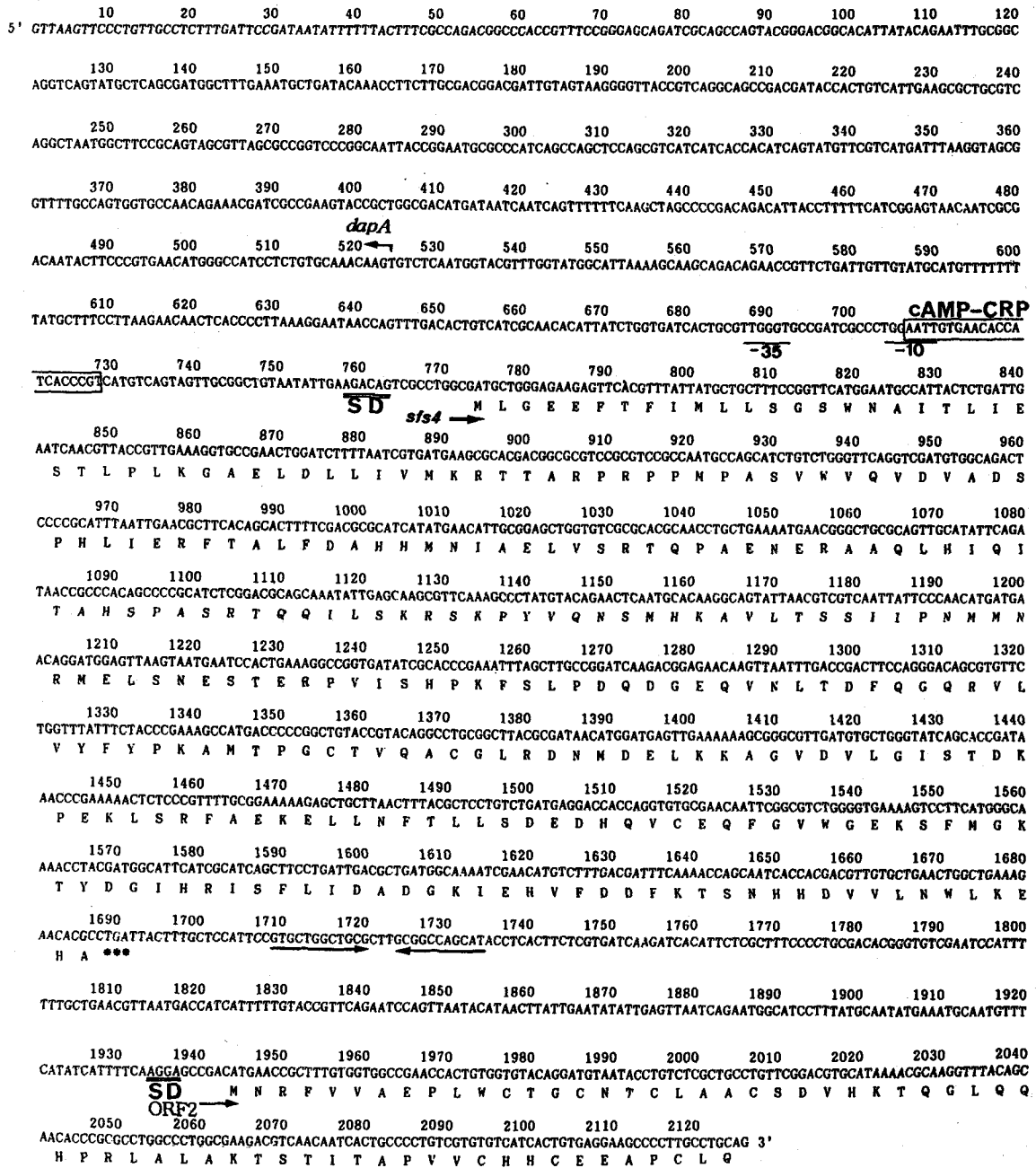


Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 2,126 bp *MluI-PstI* fragment. Putative CRP binding site is boxed, and the Shine-Dalgarno sequences are double underlined. The three dots under the sequence at three positions represent the termination codon. Region of dyad symmetry thought to be involved in the translation is indicated by thick arrows.

subcloning된 pAP5는 5.75배까지 활성의 증가를 보였다. 또한 *tac* promoter의 영향없이 자신의 promoter로서 발현되는 pNPS도 4.3배의 발현 촉진을 나타내는 것으로 보아 *sfs4*의 promoter가 강력할 것으로 생각된다. 그리고 야생주의 대장균인 W3110 균주에 도입했을 경우는 크게 증가하지 않는 경향을 나타내었는데, 이는 *sfs* 유전자가 MK2001의 *crp⁺*의 변이에 의하여 대량 발현 또는 알 수 없는 영향을 받는것으로 추정된다.

유전자의 염기배열 결정

클로닝된 pPC1을 subcloning하여 당대사 촉진 활성을 가진 것으로 생각되는 plasmid pPCM1의 염기배열을 결정하기 위해 M13 mp19 phage vector에 삽입시켜 2,126 bp의 전 염기배열을 결정 하였다. 이것을 컴퓨터 (DNASIS)로 분석해 본 결과 두개의 open reading frame (ORF)이 존재함을 밝혀냈다(Fig. 2). 염기배열 774 bp에서 1686 bp까지의 전체 길이를 가진 ORF는 304개의 아미노산을 coding하고 있으면서 *sfs4*의 산물로서 생각되었던 35,000 dalton의 크기와 거의 일치하는 분자량을 가진 것이었다. 또 하나의 ORF2는 1944 bp에서 2126 bp

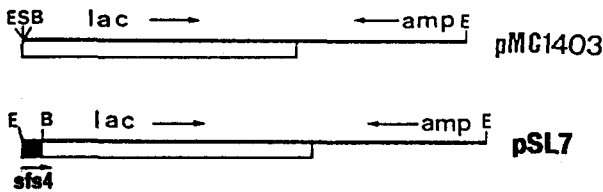


Fig. 3. Map of the plasmid carrying *sfs4-lacZ* fusion protein gene. pSL7, an *EcoRI-SspI* fragment of the *sfs4* regulatory region was isolated from pNPC and was ligated with the *EcoRI-SmaI* digested *lacZ* fusion vector pMC1403. pNPC was constructed that *NruI-PstI* fragment of pPCM1 was ligated with the *SmaI-PstI* site of vector pUC118. B, *BamHI*; E, *EcoRI*; S, *SmaI*. *lac*, lactose operon (promoter and 8 amino acid is disrupted). *amp*, the *bla* gene encoded the β -lactamase.

Table 4. Effect of cAMP on the expression of *sfs4-lacZ* fusion protein

Host strain/Plasmid	-cAMP ^a	+cAMP
TP2010 (Δcya , Δlac)/pSL7	2,260	2,000
TP2139 (Δcrp , Δlac)/pSL7	1,730	1,740
TP2010R1 (<i>crp</i> [*] , Δcya)/pSL7	6,410	14,890
MK2001 (<i>crp</i> [*] , <i>cya::km</i>)/pSL7	5,480	9,880

^a β -Galactosidase activity is expressed as Miller Unit (three independent assay). pSL7: An *EcoRI-SspI* fragment of the *sfs4* regulatory region was isolated from pNPC and was ligated with the *EcoRI-SmaI* digested *lacZ* fusion vector pMC1403. pNPC was constructed that *NruI-PstI* fragment of pPCM1 was ligated with the *SmaI-PstI* site of vector pUC118.

까지로서 N-말단의 61개의 아미노산을 coding하고 있는 truncated protein이다.

Shine-Dalgarno (SD)¹⁸⁾의 염기배열은 *sfs4*와 ORF2의 번역 개시를 위해 ribosomal RNA가 결합하는 곳으로서 개시 codon으로부터 각각 10 bp (AGACA)와 6 bp (AGGA)의 거리를 두고 존재하였다. *sfs4*로부터 stop codon 하류 영역의 구조에는 전사를 종결 지우는 역할을 하는 것으로 추정되어지고 또 stem and loop 구조를 형성할 것으로 보여지는 dyad symmetry를 갖는 영역이 존재 하였다.

한편 DNA 염기배열은 gene bank등과 상동성 조사를 실시해본 결과 1~410 bp까지가 대장균 *dapA* 유전자 (dihydrodipicolinate synthetase를 coding함)의 염기배열과 일치하였으므로, 본 실험에서의 *sfs4* 유전자가 인접하여 존재한다는 것을 확인하였다. Andrews 등¹⁹⁾의 염기배열 결정과 일치하였으나 기능과 ORF의 해석은 다른 측면에서 가능하였다. 아미노산 배열의 상동성 조사도 실시하였으나 Sfs 단백질과는 높은 상동성을 보여주는 것을 찾아 볼 수 없었다. 지금까지 밝혀져 구조 해석이 결정 되어진 *sfs* 유전자(*nlp*, *sfsI*)들은 조절 단백질들이 갖는 helix-turn의 DNA 결합 부위는 가지고 있는 것으로 밝혀졌으나, *sfs4*의 단백질에서는 결합부위의 상동성을 가진 영역을 찾아 볼 수 없어서 기능 해석을 위해서는

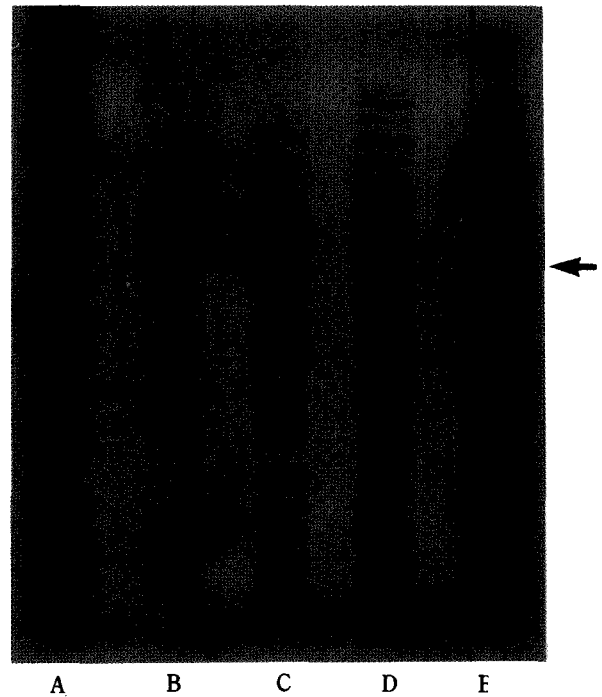


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the *sfs4* gene expression in *E. coli*. The arrow indicates the position of the Sfs protein. Molecular weight marker (lane A) included Bovine albumin (66,000 Da), Egg albumin (45,000 Da), Carbonic anhydrase (29,000 Da), Trypsin inhibitor (20,100 Da) and α -Lactalbumin 14,200 Da). MK2001/pPCM1 (lane B), MK2001/pPCM1/1 mM cAMP (lane C), MK2001/ pPC1 (lane D) and MK2001/pKK223-4 (lane E) were grown in L-broth containing 0.5% maltose.

다른 측면에서의 해석이 있어야 할 것으로 생각된다. 한편, CRP 단백질의 DNA와의 결합공통배열²⁰⁾로 알려져 있는 22 bp인 5' AAT TGTGA NNTANN TCACA TTT 3'의 염기배열로서 17 bp의 높은 상동성을 갖는 배열이 *sfs4* 유전자의 putative promoter 상류영역에 존재하였다. 즉 5' AAT TGTGA ACACCA TCACC CGT 3' (707 bp에서 728 bp까지)의 배열로서 22 bp중 잘 일치하고 있는 17 bp에서 12 bp가 일치한다. 이러한 상동성은 잘 알려져 있는 *lac*, *mal*, *glpD* 등에서의 높은 상동성과 일치하고 있다. 따라서 *sfs4* 유전자가 cAMP-CRP complex에 의하여 어떠한 조절 현상을 받고 있는지를 알아 보고자 융합 유전자를 작성하여 발현 조절 실험을 수행 하였다.

cAMP에 의한 발현조절

결정된 염기배열상에서 putative promoter의 상류영역에 존재하는 CRP 결합부위에 의하여 *sfs4* 유전자가 cAMP-CRP에 의해 발현조절을 받는지를 융합 유전자 작성을 통한 β -galactosidase 활성으로 측정했다. 먼저 *sfs4-lacZ* 융합 유전자를 구축하고자 pPCM1의 *NruI-PstI* (1.6 kb) 단편을 pUC118의 *SmaI-PstI* 부위에 ligation하여 얻어진 plasmid pNPC의 DNA를 분리하여 *sfs4* promoter 영역인 *EcoRI-SspI* (≈270 bp)을 vector인 pMC1403의

EcoRI-SmaI site에 단백질 code가 일치하도록 하여 재조합 pSL7을 얻었다(Fig. 3). Plasmid pSL7은 *sfs4*의 open reading frame과 vector인 *lacZ* 유전자의 code가 일치하여 대장균 TP2010 (Δlac , Δcya)이 MacConkey lactose에서 red colony가 생성되어짐을 확인하고 제한효소 절단으로 클로닝 관련 유무를 확인하였다. 실제로 pSL7은 *sfs4* 유전자 promoter 영역의 90개의 아미노산 codon이 포함된 β -galactosidase의 융합 단백질을 생성하는 plasmid다. 즉, *sfs4* promoter의 조절하에서 *lacZ* 유전자 발현이 조절되어져 산물인 *sfs4-lacZ* 융합 단백질의 생성량이 결정되어지므로 이것을 확인하고자 pSL7을 도입한 대장균 TP2010 (Δlac , Δcya), TP2139 (Δcrp , Δlac), TP2010RI (*crp**, Δcya) 그리고 MK2001 (*crp**, *cya::Km*)에서 조단백질을 추출하여 β -galactosidase 활성을 측정해 *sfs4* 유전자가 cAMP에 의한 발현조절을 확인하였다. Table 4에서 보는 바와같이 TP2010과 TP2139에서는 cAMP를 첨가 할 경우 영향이 없었으나, TP2010RI과 MK2001의 경우는 cAMP를 첨가 할때 각각 2.3배 및 1.8배 가량 β -galactosidase의 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 이는 *sfs4* 유전자가 *crp**과 cAMP의 복합체에 의해 발현 촉진을 받는다는 것을 알 수 있다.

sfs4 유전자의 발현산물

pPCM1이 coding하고 있는 *sfs4* 유전자의 발현산물을 확인하고자 12%의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다(Fig. 4). 당대사 관련 유전자의 발현 촉진이 높게 나타난 plasmid pPCM1이 도입된 MK2001을 1 mM IPTG로 유도시켜 배양한 결과 *tac* promoter의 강력한 발현으로 대량 생산된 35,000 Da과 17,000 Da 크기의 두 개의 band를 확인 할 수 있었는데(lane B), 이 중에서 plasmid pPCW10의 maltose 발현 촉진이 없었던 점을 고려할 때 큰 band인 35,000 Da 크기의 산물이 pPCM1의 발현 산물일 것으로 추정되었고, 이는 염기배열이 완전히 결정되어져서 확인해 본 결과와 잘 일치하였다. 또한 배지에 cAMP 1 mM을 첨가한 처리구에서는 상기의 두 band가 더욱 진하게 나타남으로서(lane C) maltose 분해촉진 효과를 보인 glucose 생산량이 cAMP의 처리구에서 더욱 증가되는 것과 동일한 결과를 보여주었다. 이 결과는 *sfs4* 유전자가 cAMP-CRP 복합체에 의한 발현조절을 받음을 시사한 *sfs4-lacZ*의 융합 유전자의 결과와 일치하며, *sfs4*는 CRP*에 의해 전사촉진 됨을 이해할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(91-1502-023-2) 지원에 의하여 연구된 내용의 일부이며, 연구 지원에 감사합니다.

참고 문헌

1. Aiba, H., and J.S. Krakow (1981) Isolation and characteriza-

- tion of the amino and carboxy proximal fragments of the adenosine cyclic 3', 5'-phosphate receptor protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20**, 4774-4780.
2. Aiba, H., S. Fujimoto, and N. Ozaki (1982) Molecular cloning and sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1345-1362.
3. Adhya, S., and S. Garges (1982) How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell* **29**, 287-289.
4. Cossort, P., and B. Gicquel-Sanzey (1982) Cloning and sequencing of the *crp* gene of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1362-1368.
5. Choi, Y.L., S. Kawase, M. Kawamukai, R. Utsumi, H. Sakai, and T. Komano (1989) Nucleotide sequence of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene of *Escherichia coli* and regulation by the cyclic AMP-CRP complex. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 1135-1143.
6. Ullmann, A., and A. Danchin (1983) Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**, 1-53.
7. Webster, C., K. Gaston, and S. Busby (1988) Transcription from the *Escherichia coli melR* promoter is dependent on the cyclic AMP receptor protein. *Gene* **68**, 297-305.
8. Aiba, H. (1985) Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **260**, 3063-3070.
9. Gorges, S., and S. Adhya (1985) Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein. *Cell* **41**, 745-751.
10. Choi, Y.L., Nishida, T., Kawamukai, M., Utsumi, R., Sakai, H., and T. Komano (1989) Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* gene, *nlp*, highly homologous to the *ner* genes of bacteriophages Mu and D108. *J. Bacteriol.* **171**, 5222-5225.
11. Kawamukai, M., R. Utsumi, A. Higashi, H. Matsuda, Y.L. Choi, and T. Komano (1991) Nucleotide sequence and characterization of the *sfs1* gene: *sfs1* is involved in CRP* dependent *mal* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 2644-2648.
12. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
14. Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
15. Wiesmeyer, H., and M. Cohn (1960) The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. I. purification and physical chemical properties of the enzyme amyloamylase. *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 417-426.
16. Sharp, P. (1972) Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. *Clin. Chim. Acta* **40**, 115-120.
17. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
18. Shine, J., and L. Dalgarno (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosome RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA* **71**, 1342-1346.
19. Andrews, S.C., P.M. Harrison and J.R. Gueest (1991) A molecular analysis of the 53.3 minute region of the *Escherichia coli* linkage map. *J. General Microbiol.* **137**, 361-367.
20. de Crombrughe, B., S. Busby, and H. Buc (1984) Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science*. **224**, 831-838.

Nucleotide Sequence and Cloning of *sfs4*, One of the Genes Involved in the CRP*-Dependent Expression of *E. coli mal* Genes.

Soo-Yeol Chung², Moo-Je Cho³, Hee-Tae Jeong¹ and Yong-Lark Choi^{1*} (¹*Department of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea*, ²*Department of Food Science & Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-715, Korea*, ³*Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*)

Abstract: In *Escherichia coli*, CRP forms a complex with cAMP and acts as a transcriptional regulator of many genes, including sugar metabolism operons. The *E. coli* MK2001, which is introduced the altered *crp**¹, is functional in the expression of *lac*, *ara* and *man*, in the absence of cAMP. However, the expression of *mal* gene is fully activated by the addition of cAMP or cGMP. The object of the study is cloning of the *sfs* (sugar fermentation stimulation) genes, which was involved in regulation of *mal* gene expression with the altered *crp**¹ gene, and structural analysis and characterization of the genes at the molecular level. We have cloned 5 different *E. coli* genes which stimulate the maltose metabolism in a *crp**¹, *cya*::km (MK2001) background. Newly identified genes were designated as *sfs*. One of the *sfs* genes (pPC1), located at the 53.2 min map position on the *E. coli* chromosome, was further analyzed. Expression of the genes, which is involved in maltose metabolism, *malQ* (amylomaltase), was increased to 5.8-fold in the presence of a plasmid, pAP5, containing the subcloned *sfs4* gene. The nucleotide sequence of a common 2,126 bp segment of the pPCM1 was determined and two open reading frames (ORF1 and ORF2) were detected. The ORF1 encodes the *sfs4* gene and ORF2 encodes a truncated protein. Potential CRP binding site is located in the upstream of the putative promoter in the regulatory region. Expression of the cloned *sfs4* gene was positively regulated by the cAMP-CRP complex.

*Corresponding author