

# YEp 13 vector를 이용한 *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene의 cloning

## I. *Escherichia coli*에서의 發現

이창후\* · 서정훈

\*경북대학교 대학원  
경북대학교 자연과학대학 미생물학과  
(1986년 1월 30일 수리)

# Cloning of *Bacillus amyloliquefaciens* amylase gene using YEp13 as a vector

## I. Expression of cloned amylase gene in *Escherichia coli*

Chang Hoo Yi\* and Jung Hwn Seu

\*Graduate School, Kyungpook National University  
Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea  
(Received January 30, 1986)

---

$\alpha$ -Amylase gene of *B. amyloliquefaciens* was cloned to *E. coli*-yeast shuttle vector YEp13 and expressed in *E. coli*. Chromosomal DNA of *B. amyloliquefaciens* was partially digested with *Sau3A*I and YEp13 plasmid was cleaved with *Bam*HI. The hybrid plasmid, pHA28, was constructed by shotgun method and transformed to *E. coli* C600 and HB101. The amount of  $\alpha$ -amylase produced by transformants of *E. coli* was about 20% to 30% of that produced by *B. amyloliquefaciens*. About 65% of  $\alpha$ -amylase produced by transformant was secreted into periplasm and the others were located in cytoplasm.  $\alpha$ -Amylase production was maximal when transformants were cultivated for 15hr to 20hr. As the result of agarose gel electrophoresis, pHA28 plasmid was found to be various in its size. This result suggested that pHA28 plasmid was segregated.

---

전분분해효소  $\alpha$ -amylase (EC 3. 2. 1. 1)는 가장 널리 연구된 효소중의 하나로 최근 세균성 plasmid를 이용하여 *Bacillus* sp.의  $\alpha$ -amylase를 cloning시켜 그 형질발현과 유전자 기능 및 구조에 관한 연구등이 활발히 시도되고 있다<sup>(1, 2)</sup>.

Takikken과 Palva 등의 연구 보고에 의하면 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase gene은 1, 449 bp의 구조유전자와 세포외 분비에 관하여는 93 bp의 signal sequence로 이뤄지며  $\alpha$ -amylase의 분자량은 54, 778로 밝혀져 있다<sup>(3, 4, 5, 6)</sup>.

Yeast-*E. coli* shuttle vector plasmid로는 YIp 계열, YRp 계열, YEp 계열등이 알려져 있으며<sup>(7)</sup> YEp 계열 중 YEp 13 plasmid는 yeast chromosome의 leu

2 gene 부분, yeast 2  $\mu$ m ORI gene 부분과 bacterial plasmid pBR 322로 구성되어 있다. 따라서 *S. cerevisiae*를 숙주세포로 형질을 발현할 경우 YEp 13 plasmid의 leu 2 gene에 의한 영양보완성으로, *E. coli*에서 형질을 발현할 경우에는 pBR 322 부분의 Ap<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup> gene의 insertional inactivation 작용으로 형질전환주를 쉽게 선별할 수 있다.

본 실험에서는 yeast의 형질개량 즉 당화와 발효공정의 단일화를 목적으로 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase gene을 YEp 13 plasmid의 Tc<sup>R</sup> gene 부분에 cloning하여 먼저 *E. coli*를 숙주세포로 하여 형질을 발현시키고 형질전환주의  $\alpha$ -amylase 생성과 plasmid DNA를 확인하였다.

Table 1. Strains and vector used in this work.

Strains & plasmid	Genotype	Comment
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Wild type	$\alpha$ -amylase gene source
<i>E. coli</i> C 600	F <sup>-</sup> , Rec <sup>+</sup> , lac, gal	Recipient cell
<i>E. coli</i> HB 101	F <sup>-</sup> , Rec <sup>-</sup> , lac, gal	"
YEp 13	Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup> , leu2	Vector plasmid

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmid DNA

본 실험에서 사용된 균주는 recipient cell로서 *E. coli* C 600과 *E. coli* HB 101을 사용했으며  $\alpha$ -amylase gene source로 *B. amyloliquefaciens* wild type의 chromosomal DNA를, vector plasmid로는 YEp 13 plasmid를 사용하였다.(Table 1).

### 배지와 균의 배양

균주의 배양은 LB (Luria-Bertani) 배지 (Bacto-yeast extract : 0.5%, Bacto-tryptone : 1%, NaCl : 1%)를 사용하였으며 필요에 따라서 agar (2%), ampicillin (30  $\mu$ g/ml), tetracycline (50  $\mu$ g/ml), soluble starch (1%)를 각각 첨가하고 균을 접종하여 37°C에서 배양하였다.

### YEp13 plasmid DNA의 추출과 정제

Vector plasmid YEp 13의 추출은 Birnboim<sup>(9)</sup> 등의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. Ampicillin (30  $\mu$ g/ml)을 함유한 LB 배지에 균을 접종하여 37°C에서 12시간 정도 진탕배양한 후 집균하여 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 세척하였다. 균체를 GTE buffer (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose, pH 8.0)에 현탁하여 lysozyme (5 mg/ml)으로 4°C에서 약 1시간 용균시키고 NaOH-SDS 용액(0.2 N NaOH, 1% SDS), 5 M K-acetate (pH 4.8)을 첨가하여 얻은 cleared

Table 2. Composition of reaction mixture for restriction of plasmid DNA and chromosomal DNA.

<i>B. amyloliquefaciens</i> DNA (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
<i>Sau</i> 3 AI endonuclease (8 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Digestion buffer ( $\times 10$ )*	4 $\mu$ l
YEp 13 plasmid DNA (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	21 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l
<i>Bam</i> HI endonuclease (10 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Digestion buffer ( $\times 10$ )*	4 $\mu$ l

\*; Digestion buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl.

lysate를 원심분리하여 상등액에 cold ethanol을 섞어서 plasmid DNA를 회수하고 적량의 TE buffer에 용해시켰다. Plasmid의 정제는 0.7% agarose gel 전기영동으로 electroelution하여 얻은 plasmid 용액에 phenol, chloroform, ether<sup>(10)</sup>를 각각 3회 이상 처리하여 정제한 후 최종적으로 적량의 TE buffer에 녹여서 사용하였다.

### chromosomal DNA의 추출 및 정제

*B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA 추출은 Saito & Miura<sup>(11)</sup>의 방법에 준하였다. 균을 LB 배지에 접종하여 약 18시간 진탕배양한 후 얻은 균체를 STE buffer (Sucrose 20%, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 7.6)에 현탁하여 lysozyme (5 mg/ml)으로 37°C에서 약 30분간 용균시켜 TEN buffer (30 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 7.6) 동일량을 섞어 25% SDS 용액, 5 M NaCl, buffer saturated phenol (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl)을 차례로 처리한 후 원심분리하여 상층의 핵산층을 회수하고 cold ethanol을 첨가하여 얻은 DNA 침전을 적당량의 TEN buffer에 용해시켜 plasmid 추출시와 같은 요령으로 phenol, chloroform, ether를 처리하여 chromosomal DNA를 정제하였다.

### Hybrid plasmid DNA의 제작

#### ① DNA digestion

전술한 방법으로 정제된 *B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA와 plasmid DNA YEp 13을 *Sau* 3 AI과 *Bam* HI를 사용하여 digestion시켰다.

먼저 *B. amyloliquefaciens*의 chromosomal DNA의 경우 Table 2와 같은 반응조성으로 37°C에서 partial digestion 하였으며 plasmid DNA 역시 Table 2와 같은 반응조성으로 37°C에서 약 30분간 반응시킨 후 70°C에서 약 5분간의 열처리로 반응을 정지시킨 다음 phenol, chloroform, ether를 사용하여 정제하고 1/10배 부피의 3 M Na-acetate (pH 5.2)와 co-

Table 3. Ligation mixture of cleaved YEp 13 plasmid and *B. amyloliquefaciens* chromosomal DNA.

Cleaved YEp 13 plasmid DNA (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
Digested <i>B. amyloliquefaciens</i> chromosomal DNA (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
Ligation buffer ( $\times 10$ )*	10 $\mu$ l
ATP (100 mM)	10 $\mu$ l
T <sub>4</sub> ligase (3 units/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	30 $\mu$ l

\*; Ligation buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Dithiothreitol.

ld ethanol 2 배 부피를 첨가하여 DNA 를 침전시켜 회수하고 TE buffer 적당량에 녹여 DNA ligation 에 사용하였다.

② Cleaved DNA ligation

제한효소로 digestion한 *B. amyloliquefaciens* 의 chromosomal DNA와 vector plasmid YEp 13을 Table 3 과 같이 조제하여 4°C 에서 24시간 ligation 시켜 transformation에 사용하였다.

Hybrid plasmid DNA에 의한 형질전환

*E. coli* C 600 과 *E. coli* HB 101을 숙주세포로 한 형질전환은 Mandel & Higa<sup>(12)</sup>와 Darget<sup>(13)</sup>등의 방법을 일부 수정하여 사용하였다.

*E. coli*를 LB배지에 접종하여 10 ml의 초기대수 증식기의 균을 4°C 에서 10분간 냉각하여 0.9% saline 용액으로 2 회 세척 후 집균하였다. 균체를 10 ml의 50 mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 재 현탁하여 4°C 에서 20 시간 동안 competence화 하였다.

형질전환은 competence cell 10 μl와 DNA 용액 50 μl (1 μg/50 μl)를 혼합하여 4°C 에서 30분간 반응시키고 42°C 에서 2분간 열처리한 뒤 1 ml의 LB 배지를 첨가하여 37°C 에서 1 시간 동안 incubation 하고 0.1 ml씩 LB 배지와 ampicillin (30 μg/ml) 을 함유한 LB 배지에 도말하여 37°C 에서 12시간 배양 하였다. Cloning 된 transformant는 ampicillin resistance (Ap<sup>R</sup>), tetracycline sensitive (Tc<sup>S</sup>)인 colony 를 선별하였다.

α-amylase 활성측정

α-Amylase 활성측정 방법은 Ando, E<sup>(8)</sup>등의 Somogyi-Nelson 방법을 사용하였다. 반응액을 Table 4 와 같이 조성하여 37°C 에서 1 시간 반응시킨 후 100°C 에서 15분간 열처리하여 반응을 정지시키고 Somogyi-Nelson reagent로 발색시켜 흡광도를 측정하였다.

형질전환의 결과 Ap<sup>R</sup>, Tc<sup>S</sup>로 확인된 colony 를 soluble starch (1%), ampicillin (30 μg/ml) 을 함유한 LB 배지 10 ml에 접종하여 37°C 에서 48시간 동안 진탕배양한 뒤 집균하여 lysis buffer (lysozyme:0.5 mg/ml, M/15 Macllvaine buffer pH 6.5) 1.2 ml에

Table 4. Composition of reaction mixture for the measurement of α-amylase activity.

	Control (ml)	Sample (ml)
M/15 Macllvaine buffer (pH 6.5)	0.5	0.5
H <sub>2</sub> O	0.5	0
Enzyme solution	0	0.5
1 % Soluble starch	0.5	0.5

Table 5. Transformation frequency of *E. coli* HB 101 by the hybrid plasmid obtained from *E. coli* C 600 transformants.

Strain	No. of colonies on LB med.	No. of colonies on ALB med.	Transformation frequency*
<i>E. coli</i> TCA28	9.1×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>2</sup>	1.2×10 <sup>-4</sup>
<i>E. coli</i> TCA37	3.3×10 <sup>6</sup>	2.3×10 <sup>2</sup>	6.9×10 <sup>-5</sup>
<i>E. coli</i> TCA48	1.5×10 <sup>6</sup>	6.1×10 <sup>1</sup>	4.0×10 <sup>-5</sup>

\* ;  $\frac{\text{No. of colonies on ALB med.}}{\text{No. of colonies on LB med.}}$

현탁하고 37°C 에서 1 시간 반응시켜 원심분리한 상등액을 효소용액으로 사용하였으며 *B. amyloliquefaciens* 의 효소용액은 배양상등액을 사용하였다.

효소활성은 효소반응액 1 ml가 1 시간 동안에 환원당 1 μg을 생성할 때 1 unit로 표시하였다.

결과 및 고찰

형질전환빈도

Hybrid plasmid를 *E. coli* C 600으로 형질전환시킨 결과 그 빈도는 4.2×10<sup>-4</sup>였으며 형질전환주 중에서 α-amylase 활성이 비교적 높은 균주 *E. coli* T-CA 28, TCA 37, TCA 48을 택하여 그 plasmid (p-CA 28, pCA 37, pCA 48)를 추출하여 *E. coli* HB 101로 다시 형질전환시킨 결과는 Table 5와 같다.

형질전환주의 α-amylase 활성

*E. coli* C 600 형질전환주 *E. coli* TCA 28, TCA48, 그들 plasmid pCA 28, pCA 48에 의한 *E. coli* HB

Table 6. α-Amylase activity of *E. coli* transformants.

strain	α-amylase activity (Unit)
<i>E. coli</i> C 600	0
<i>E. coli</i> HB 101	0
<i>E. coli</i> TCA 28 <sup>a</sup>	416
<i>E. coli</i> THA 28 <sup>b</sup>	432
<i>E. coli</i> TCA 48 <sup>c</sup>	320
<i>E. coli</i> THA 48 <sup>d</sup>	336
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1456

<sup>a</sup>; Transformant of *E. coli* C 600 which was transformed with ligated DNA

<sup>b</sup>; Transformant of *E. coli* HB 101 which was transformed with *E. coli* TCA 28 plasmid.

<sup>c</sup>; Transformant of *E. coli* C 600 which was transformed with ligated DNA

<sup>d</sup>; Transformant of *E. coli* HB 101 which was transformed with *E. coli* TCA 48 plasmid.

**Table 7. Localization of the  $\alpha$ -amylase produced by transformant and *B. amyloliquefaciens*.**

Strain	Extra-cellular	Pepi-plasmic	Cellular	Total
<i>E. coli</i> C 600	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HB 101	0	0	0	0
<i>E. coli</i> TCA 28 <sup>a</sup>	0	216	112	328
<i>E. coli</i> THA 28 <sup>b</sup>	0	248	136	424
<i>B. amyloliquefaciens</i>	768	96	464	1,368

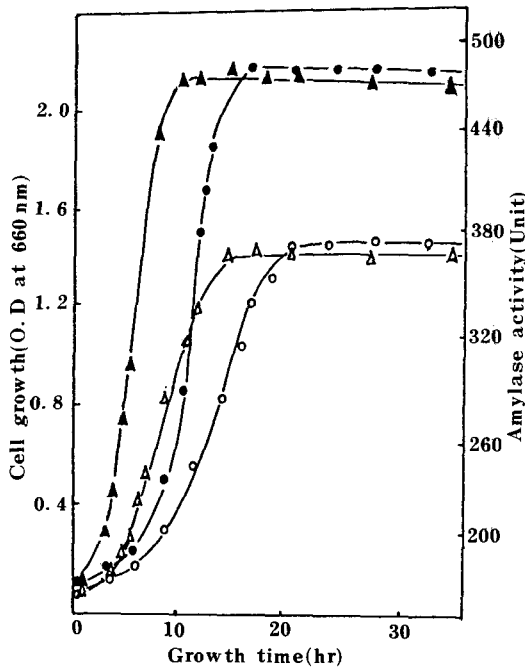
<sup>a</sup>; Transformant of *E. coli* C 600 which was transformed with ligated DNA

<sup>b</sup>; Transformant of *E. coli* HB 101 which was transformed with *E. coli* TCA 28 plasmid.

101 형질전환주 *E. coli* THA 28, THA 48의  $\alpha$ -amylase 활성을 측정한 결과는 Table 6 과 같았으며 이는 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase에 대한 상대 활성도로 22~30% 정도였다.

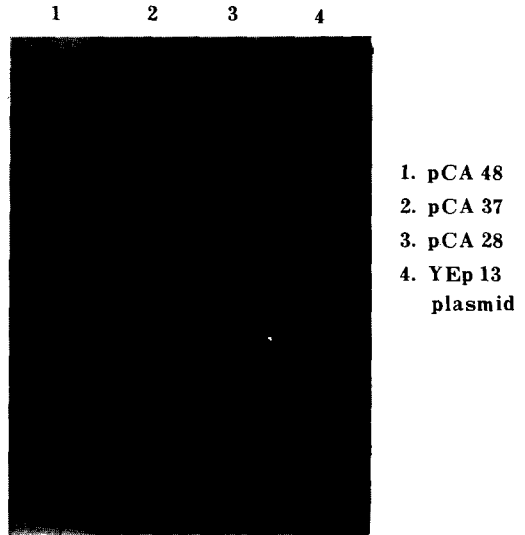
**형질전환주의  $\alpha$ -amylase localization**

형질전환주의  $\alpha$ -amylase localization을 조사하기 위하여 <sup>(14)</sup> LB 배지 10 ml에 soluble starch를 1% 첨가하고 균을 접종하여 37°C에서 48시간 진탕배양



**Fig. 1. Time courses of growth and  $\alpha$ -amylase production.**

Cell growth: ○-○; *E. coli* TCA 28, ●-●; *E. coli* THA 28  
 $\alpha$ -amylase activity: △-△; *E. coli* TCA 28, ▲-▲; *E. coli* THA 28



**Fig. 2. Electrophoretic identification of hybrid DNA of *E. coli* C 600 transformant.**

한 뒤 원심집균하여 배양상등액을 extracellular enzyme 용액으로 사용했으며 균체를 lysis buffer (lysozyme : 0.5 mg/ml, 0.5 M sucrose, M/15 Macclvaine buffer pH 6.5) 1.2 ml에 현탁하여 37°C에서 1시간 반응 후 원심분리한 상등액을 periplasmic enzyme 용액으로 사용하였다.

Lysis 결과 남은 protoplast에 0.9% saline 용액을 1.2 ml 첨가하여 cell을 파쇄한 후 원심분리한 상등액을 cellular enzyme 용액으로 사용하였다. Total enzyme 용액은 균체를 M/15 Macclvaine buffer 1.2 ml에 현탁한 후 20 k×0.7 KHz에서 3회 3분간 sonication하고 원심분리한 상등액을 사용하였다.

$\alpha$ -amylase 활성 측정 결과 Table 7에 나타난 바와 같이 Gram 양성균인 *B. amyloliquefaciens*의 경우 생성된 total enzyme의 54%가 세포외부로 분비되었으나 Gram 음성균인 형질전환주의 경우 생성된  $\alpha$ -amylase는 세포외부로의 분비는 없었으나 total enzyme의 60~65%가 periplasmic space에 존재하였다. 이는 대체로 Tsukagoshi 등의 실험 결과와 비슷한 것으로 생각되었다.

**균의 생육과  $\alpha$ -amylase 생성**

형질전환주의 생육과  $\alpha$ -amylase 생성을 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다. 형질전환주 *E. coli* THA 28은 접종 후 약 10시간, *E. coli* TCA 28은 약 15시간부터 생육정지기에 도달했으며  $\alpha$ -amylase 생성은 이보다 약간 늦게 *E. coli* THA 28의 경우 접종 후 15시간, *E. coli* TCA 28은 약 20시간부터  $\alpha$ -amylase 생성은 최고에 도달하였다.

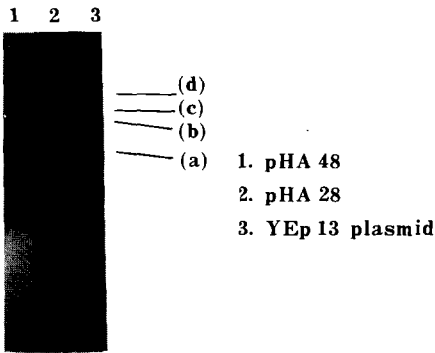


Fig. 3. Electrophoretic identification of hybrid plasmid DNA of *E. coli* HB 101 transformant.

전기영동에 의한 hybrid DNA의 확인

형질전환주의 plasmid DNA를 추출하여 0.7% agarose-gel을 사용하여 전기영동한 결과 *E. coli* C 600 형질전환주의 경우 Fig. 2에서와 같이 각각 다수의 hybrid plasmid DNA를 확인할 수 있었으며 *E. coli* HB 101 형질전환주 *E. coli* THA 28과 THA 48의 경우 역시 *E. coli* C 600 형질전환주와 비슷한 양상의 hybrid plasmid DNA를 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

형질전환주 *E. coli* THA 28의 hybrid plasmid 중  $\alpha$ -amylase 활성의 확인

형질전환주 *E. coli* THA 28의 hybrid plasmid 중  $\alpha$ -amylase 활성을 가진 hybrid plasmid를 확인하기 위하여 Fig. 3에서 나타난 hybrid plasmid pHA 28의 (a), (b), (c), (d)를 각각 electroelution하여 *E. coli* HB 101로 형질전환시킨 결과 pHA 28의 (a)에서만 형질전환주를 얻을 수 있었으며 이들 형질전환주 *E. coli* THA 28-a-3과 THA 28-a-11의 plasmid pHA 28-a-3, pHA 28-a-11을 추출하여 전기영동한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 그 이동도에

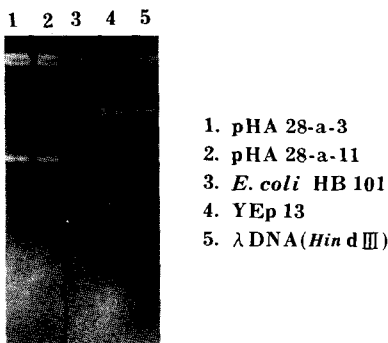


Fig. 4. Electrophoretic identification of *E. coli* HB 101 retransformant.

Table 8.  $\alpha$ -Amylase activity of *E. coli* HB 101 retransformants.

	$\alpha$ -amylase activity (unit)
<i>E. coli</i> THA 28-a-3	304
<i>E. coli</i> THA 28-a-11	368
<i>E. coli</i> HB 101	0
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1,264

있어서 *E. coli* THA 28의 plasmid pHA 28의 plasmid(a)와 같은 하나의 단일 plasmid를 확인할 수 있었으며 pHA 28-a-3과 pHA 28-a-11은 *S. cerevisiae* MC 16 (leu 2, his 4, ade 2, lys 1)에 형질전환되지 않았다. 따라서 pHA 28의 plasmid(a)는 ampicillin에 대한 내성은 가지나 그 크기가 YEp 13 vector plasmid보다 작은 것으로 보아  $\alpha$ -amylase gene hybrid YEp 13 plasmid가 segregation된 결과로 생긴, pBR 322 부분이 추가된 hybrid plasmid로 추측되었다.

또한 *E. coli* THA 28-a-3과 THA 28-a-11의  $\alpha$ -amylase 활성을 측정한 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 *E. coli* THA 28과 비슷한 정도의 활성을 보였다.

요 약

*E. coli*-Yeast shuttle vector YEp 13에 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase gene을 cloning하여 얻은 hybrid plasmid를 *E. coli*를 숙주세포로 하여 형질을 발현시켰다.

형질전환주의  $\alpha$ -amylase 활성 측정 결과, *B. amyloliquefaciens*에 대해 20~30%의 상대활성도를 나타내었다. 형질전환주의 경우 생성된  $\alpha$ -amylase의 60~65%가 periplasm에 축적되었으며 세포 외 부로의 분비는 없었다. Hybrid DNA를 agarose-gel 전기영동으로 조사한 결과 그 크기가 다른 다수의 hybrid DNA가 확인되었으며 pHA 28의 plasmid (a) (Fig. 3)에서만  $\alpha$ -amylase 활성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. pHA 28의 plasmid(a)의 크기가 YEp 13 plasmid DNA보다 작은 것은 YEp 13 plasmid에서 yeast gene 부분이 deletion된 결과로 추측되었다.

사 사

본 연구는 1984년도 한국과학재단 차관연구비 (amylase 유전자를 cloning한 효모분비 vector의 개발 및 응용)에 의해서 수행된 연구의 일부이며 관계하신 여러분께 깊은 감사를 드리는 바입니다.

## 참고문헌

1. Taikeichi, Y., K. Ohmura, A. Nakayama, K. Otozai and K. Yamane: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 159 (1983)
2. Tsukagoshi, N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udaka: *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 58 (1983)
3. Takkinen, K., R.F. Pettersson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Söderlund and L. Kääriäinen: *J. Biol. Chem.* **258**, 1007 (1983)
4. Palva, I.: *Gene*, **19**, 81 (1982)
5. Chung, H. and F. Friedberg: *Biochem. J.*, **185**, 387 (1980)
6. Shruhl, K., D.T. Stinchomb, S. Scherer and R.W. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 1035 (1979)
7. Broach, J.R., J.N. Strathern and J.B. Hicks: *Gene*, **8**, 121 (1979)
8. Ando, E., H. Terayama, K. Nishizawa and T. Yamakawa: *Biochemical Research Methods*, Vol. 1, Asakura press, Tokyo, 126 (1967)
9. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1973)
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
11. Saito, H. and K. Miura: *Biochim. Biophys. Acta.*, **72**, 629 (1963)
12. Mandel, M. and A. Higa: *J. Mol. Biol.*, **53**, 159 (1970)
13. Darget, M. and S.D. Ehrlich: *Gene*, **6**, 23 (1979)
14. Tsukagoshi, N., H. Ihara, H. Yamagata and S. Udaka: *Mol. Gen. Genet.* **193**, 58 (1984)