

***Klebsiella pneumoniae* 에서 트립토판 생산증대를 위한  
숙주개발 및 재조합 *trp* plasmid 의 발현**

지연태 · 홍광원 · 박장현 · 이세영

고려대학교 농과대학 농화학과

**Modification of host cells and Expression of Recombinant  
*E. coli trp* plasmids for the increased Production of  
Tryptophan in *Klebsiella pneumoniae***

Chi, Y.T., K.W. Hong, J.H. Park, and S.Y. Lee

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture  
Korea University, Seoul, Korea

**ABSTRACT:** In order to increase the production of tryptophan by maximizing expression of recombinant *trp* plasmid, *Klebsiella pneumoniae* KC 105(*pheA tyrA trpE trpR tyrR*) was genetically modified.

KC 107, inosine monophosphate(IMP) auxotroph from KC 105 and KC 108, histidine(His) auxotroph from KC 107 were also derived respectively to increase phosphoribosylpyrophosphate(PRPP) production which is required for tryptophan biosynthesis. From KC 107 phosphoribosylpyrophosphate consumption which is required for tryptophan biosynthesis. From KC 107 and KC 108, KC 109 and KC 110, both arginine auxotrophs were derived respectively.

To investigate the expression of recombinant *trp* plasmid in the selected *K. pneumoniae* mutants, the auxotrophic mutants were transformed with recombinant *trp* plasmids pSC 101-*trpE*<sup>F<sup>BR</sup></sup>, pSC 101-*trpL*( $\Delta att$ ) *trpE*<sup>F<sup>BR</sup></sup> (pSC 101-*trp*-AF). Amount of tryptophan produced and activities of tryptophan synthase of *trpR*<sup>-</sup>mutant(KC 100) and *tyrR*<sup>-</sup>mutant(KC 105) containing recombinant-plasmid pSC 101-*trp* operon were increased by 30-40% as compared with KC 99(*pheA tyrA trpE*) containing recombinant plasmid pSC 101-*trp* operon. Activities of tryptophan synthase and production of tryptophan of KC 108 (His<sup>-</sup>) and KC 109(Arg<sup>-</sup>) containing recombinant plasmid pSC 101-*trp* operon were increase by two-fold as compared with KC 107 containing pSC 101-*trp* operon.

**KEY WORDS** □ Recombinant *trp* plasmid, tryptophan production *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* 는 *Escherichia coli* 와 같은 enteric group 에 속하는 장내세균으로 유전적 특성이 여러가지 면에서 *E. coli* 와 유사하고 그외 트립토판 생합성과 조절기작도 잘 밝혀져 있다(Gibson 등, 1968 : Yanofsky 등, 1976 1982). 그리고 *K. pneumoniae* 의 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신 triple auxotroph 는 방향족

아미노산의 중요한 전구물질인 chorismate 를 배지중에 상당량 축적하므로 chorismate 생산균주로 이용되고 있다(Gibson 등, 1970). 또한 *K. pneumoniae* 는 트립토판을 분해하는 주효소 중의 하나인 tryptophanase 가 결여되어 있어(Parris 등, 1981) 트립토판 생산균주 개발에 많은 장점을 갖고 있다.

한편 트립토판 생산성 증대를 위한 균주를 개발하기 위해서는 방향족 아미노산의 공통경로의 첫 번째 반응에 관여하는 효소인 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate(DAHP) synthase가 방향족 아미노산에 의해서 repression과 feedback inhibition을 받지 않아야 하며, chorismate로부터 페닐알라닌과 타이로신으로 가는 분지경로를 차단시켜 chorismate 소모를 줄이고, *trp* operon의 산물들이 최종산물인 트립토판에 의해서 repression과 attenuation, feedback inhibition의 조절을 받지 않아야 한다 (Crawford 등, 1980; Yanofsky, 1978; Platt 등, 1982). 그리고 *trp* operon을 최대로 발현시키고, 생성된 트립토판의 분해를 방지하여야 한다 (Tribe 등, 1979; Aiba 등, 1980, 1982).

본 연구에서는 트립토판 생산증대를 위한 숙주 개발의 일환으로 *K. pneumoniae* ATCC 25306(*pheA tyrA trpE*)의 변이주인 *trpR<sup>-</sup> tyrR<sup>-</sup>* 변이주로부터 inosine monophosphate (IMP), histidine, arginine 영양요구주들을 얻고 이들 변이주들을 재조합 pSC101-*trp* plasmid DNA들로 형질전환하여 형질전환체들의 *trp* operon 발현과 트립토판 생산성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주와 plasmid

본 연구에서 사용한 균주와 plasmid의 종류 및 그 특성은 Table 1과 같다.

### 배 지

완전배지로는 Luria 배지를 사용하였고, 최소배지로는 Vogel-Bonner 배지에 변이주의 요구도에 따라 L-phenylalanine, L-tyrosine, L-tryptophan, IMP는 각각 20 µg/ml, L-histidine과 L-arginine은 22 µg/ml씩을 첨가하여 사용하였다. 트립토판 생산용 배지는 Aiba 등(1980)의 배지를 사용하였다.

### 시 약

사용된 모든 아미노산, 핵산, anthranilate, indole, pyridoxal phosphate, phosphoenolpyruvate, erythrose-4-phosphate, aromatic amino acid analog 등은 Sigma 제를 사용하였

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Strain	Genotype and properties	Source
<i>K. pneumoniae</i>		
KC 99	<i>pheA<sup>-</sup> tyrA<sup>-</sup> trpE<sup>-</sup></i>	ATCC 25306
KC 100	KC 99 <i>trpR<sup>-</sup></i>	In this lab
KC 105	KC 100 <i>tyrR<sup>-</sup></i>	In this lab
KC 107	KC 105 IMP <sup>-</sup>	In this study
KC 108	KC 107 His <sup>-</sup>	In this study
KC 109	KC 107 Arg <sup>-</sup>	In this study
KC 110	KC 108 Arg <sup>-</sup>	In this study
Plasmids		
pSC 101- <i>trp</i>	JA221/pSC101- <i>trpE<sup>FBR</sup></i>	In this lab
pSC 101- <i>trp</i> -AF	JA221/pSC101- - <i>trpL</i> ( $\Delta att$ ) <i>trpE<sup>FBR</sup></i>	In this lab

*trpR*: Regulatory gene of *trp* operon

*tyrR*: Regulatory gene of *tyrA* gene

*trpE<sup>FBR</sup>*: Feedback inhibition resistant by tryptophan

*trpL* ( $\Delta att$ ): Deletion of attenuator region in *trp* operon

고, tryptone, yeast extract 등은 Difco 제를 사용하였으며, chorismate는 Gibson 등(1970)의 방법에 따라 재조하여 사용하였다.

### 돌연변이 유발

영양요구주들을 얻기 위한 돌연변이 유발은 Miller 등(1972)의 방법에 따라 nitrosoguanidine을 사용하였고 영양요구주 선별의 빈도를 높이기 위하여 D-cycloserine( $2 \times 10^{-3}$  M) 농축법을 사용하였다.

### 형질전환

형질전환은 Nocard 등(1978)의 방법에 따라 수행하였으며 형질전환체의 선별은 최소 한천평판 배지에 트립토판의 유사체인 5-methyltryptophan이 200 µg/ml 첨가된 선별배지에서 자란 colony들을 선별하였다.

### 효소활성 측정

Anthranilate synthase와 tryptophan synthase의 활성은 천보(Chi 등, 1984)에 따랐다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법에 따라서 행하였다.

### 트립토판의 정량

형질전환체들을 트립토판 생산용 배지에 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 Sidney Udenfriend(1962) 방법에 따라 트립토판의 양을 정량하였다.

### Plasmid DNA의 분리

재조합 *trp* plasmid DNA의 확인을 위한 plasmid DNA의 분리는 Ish-Horowicz 등(1981)의 방법에 따랐다.

## 결과 및 고찰

### 영양요구주들의 분리

트립토판 생합성 과정중 2 번째 반응에 관여하는 phosphoribosyl pyrophosphate의 공급을 증대시키기 위하여 *K. pneumoniae* KC 105(*pheA tyrA trpE trpR tyrR*) 균주에 돌연변이원으로 MNNG를 처리하고 D-cycloserine 농축법에 의해 3 주의 inosine monophosphate(IMP) 영양요구주를 얻고, 이들 IMP 영양요구주를 재조합 pSC 101-*trp* plasmid DNA로 형질전환한 후 이중 트립토판 생성량이 많은 IMP 영양요구주들 KC 107이라 명명하였다. PRPP의 소모를 더욱 방지하기 위하여 KC 107 균주에 다시 MNNG 처리 및 D-cycloserine 농축법으로 5 주의 his-

tidine 영양요구주를 얻고, 이들 영양요구주들을 재조합 pSC 101-*trp* plasmid DNA로 형질전환한 후 트립토판 생성량이 많은 His 영양요구주들 KC 108로 명명하였다.

트립토판 생합성 경로에 필요로 하는 amino기의 공급을 증가시킬 목적으로 IMP 영양요구주인 KC 107과 His 영양요구주인 KC 108에 다시 MNNG를 처리하여 arginine 영양요구주들 KC 107에서 7 주, KC 108로부터 1 주씩 얻었다. 얻어진 Arg<sup>-</sup>들을 arginine 생합성 중간대사 산물들이 첨가된 최소배지에서 확인한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 KC 107 Arg<sup>-</sup>-1,3,4,5,7과 KC 108 Arg<sup>-</sup>는 같은 생합성 단계에 돌연변이가 일어난 것으로 생각된다. 위의 KC 107 유래의 Arg 영양요구주들을 재조합 pSC 101-*trp* plasmid DNA로 형질전환시킨 후 트립토판 생산량이 가장 높은 KC 107 Arg<sup>-</sup>-2를 KC 109로 명명하였고 KC 108 Arg<sup>-</sup>는 KC 110으로 명명하였다.

*trpR*<sup>-</sup>와 *tyrR*<sup>-</sup> 변이가 재조합 *trp* plasmid의 발현에 미치는 영향

*K. pneumoniae* KC 99, KC 100, KC 105를 재조합 *trp* plasmid DNA들로 형질전환시킨 후 *trpR*<sup>-</sup>, *tyrR*<sup>-</sup> 변이가 재조합 *trp* operon plasmid의 발현에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다. 이때 사용된 재조합 *trp* plasmid는 plasmid

Table 2. Requirement of arginine intermediates for growth in VB minimal medium in arginine auxotrophs.

Strain	KC 107							KC 108	
	Arg <sup>-</sup> -1	Arg <sup>-</sup> -2	Arg <sup>-</sup> -3	Arg <sup>-</sup> -4	Arg <sup>-</sup> -5	Arg <sup>-</sup> -6	Arg <sup>-</sup> -7	Arg <sup>-</sup>	
L-glutamate									
N-acetylglutamate									
N-acetyl- -glutamyl phosphate									
N-acetylglutamine- -semialdehyde									
N-acetylornithine		*					*		
L-ornithine		0					0		
L-citrulline		0					0		
arginosuccinate	*	0		*	*	0		*	
L-arginine	0	0	0	0	0	0	0	0	

0 : Grow

\* : Leaky grow

All strains were grown in Vogel-Bonner minimal agar plate supplemented with required arginine intermediates at 37°C for 24 hrs.

**Table 3.** Specific activity of tryptophan synthase in various *K. pneumoniae* auxotrophic regulatory mutants containing recombinant *trp* plasmids.

Strain	Characteristics	Specific activity of T. Sase (U/mg protein)
KC99 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	<i>pheA tyrA</i>	64
(pSC101- <i>trp</i> -AF*)	<i>trpE</i>	70
KC100 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC99 <i>trpR</i>	98
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		96
KC105 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC100 <i>tyrR</i>	95
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		100

\* AF: Attenuator deletion and feedback inhibition resistant

All strains were grown in Vogel-Bonner minimal medium supplemented with required amino acid at 37°C for 36 hrs.

vector (5.6 copy/염색체, Cohen 등: 1977)에 *trp* 유전자원이 feedback inhibition이 해제된 (Chi 등, 1983) *E. coli* 염색체 DNA로 재조합된 pSC 101-*trpE*<sup>FBR</sup>과 feedback inhibition과 attenuation 조절이 해제된 (Chi 등: 1983) *E. coli* 염색체 DNA로 재조합된 pSC101-*trp*-AF였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 변이주들에 재조합된 *trp* plasmid가 도입되었을 때, 숙주 박테리아의 유전적 특성이 *trpR*<sup>-</sup>일때 *trpR*<sup>-</sup>에 비해서 tryptophan synthase의 활성이 30% 증가하였다. 이러한 결과는 숙주 박테리아의 *trp* 조절유전자에 돌연변이가 일어나 aporepressor를 만들지 못하므로 *trpR*<sup>-</sup> 변이주에서는 repression을 받지 않기때문인 것으로 생각된다.

*tyrR*<sup>-</sup> 변이주인 KC 105에 재조합 pSC101-*trp*-AF plasmid가 도입되었을 때 모균인 KC 100 (pSC 101-*trp*-AF)에 비해서 tryptophan synthase 활성이 약간 증가하였다.

IMP, His, Arg 영양요구주들에서 재조합 *trp* plasmid들의 발현

KC 105 유래의 IMP<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup> 변이주들에서 재조합 *trp* plasmid의 발현을 조사하기 위하여 이들 변이주들에 pSC 101-*trpE*<sup>FBR</sup>과 pSC 101-*trp*-AF plasmid DNA를 도입하였고

**Table 4.** Specific activity of tryptophan synthase in various *K. pneumoniae* auxotrophic regulatory mutants containing recombinant *trp* plasmids

Strain	Characteristics	Specific activity of T. Sase (U/mg protein)
KC107 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC105 IMP <sup>-</sup>	91
(pSC101- <i>trp</i> -AF*)		98
KC108 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC107 His <sup>-</sup>	180
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		211
KC109 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC107 Arg <sup>-</sup>	330
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		380
KC110 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC108 Arg <sup>-</sup>	260
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		291

\* AF: Attenuator deletion and feedback inhibition resistant

All strains were grown in Vogel-Bonner minimal medium supplemented with mum required amino acid and IMP at 37°C for 36 hrs.

이들 형질전환체들의 tryptophan synthase 활성을 측정하였다. Table 4에서 보여주는 바와같이 IMP 영양요구주인 KC 107(pSC 101-*trpE*<sup>FBR</sup>)의 tryptophan synthase 활성은 모균 KC 105 (pSC 101-*trpE*<sup>FBR</sup>)과 비슷하였다. 그러나 histidine 영양요구주인 KC 108(pSC 101-*trpE*<sup>FBR</sup>)과 KC 108 (pSC 101-*trp* AF)은 KC 107의 형질전환체보다 tryptophan synthase 활성이 2배 증가하였다. 이러한 결과는 histidine 영양요구주가됨으로써 *trp* operon 발현의 중간물질인 N-5'-phosphoribosyl anthranilate를 합성하는데 사용되는 PRPP의 양이 증대되기 때문인 것으로 생각된다. 그리고 arginine 영양요구주인 KC 109에 재조합 pSC 101-*trp* plasmid들이 도입되었을 때도 모균에 재조합 *trp* plasmid가 도입되었을 때보다 tryptophan synthase 활성이 3배나 증가되었다. 그러나 KC 108 유래의 arginine 영양요구주인 KC 110에 재조합 pSC 101-*trp* plasmid들이 도입되었을 때는 모균에 비해서 tryptophan synthase 활성이 40% 증가되었다. 또한 Table 3, 4의 결과에서 재조합 *trp* plasmid의 유전자원의 특성에 따른 효과는 *trp* 유전자가 attenuator 부위가 결실된 pSC 101-*trp*-AF일때

**Table 5.** The production of tryptophan by various *K. pneumoniae* auxotrophic regulatory mutants containing recombinant *trp* plasmids.

Strain	Characteristics	Amount of Tr (mg/l)
KC99 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	<i>pheA</i> <i>tyrA</i>	99
(pSC101- <i>trp</i> -AF)	<i>trpE</i>	98
KC100 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC99 <i>trpR</i>	131
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		133
KC105 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC100 <i>trpR</i>	148
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		155

*trp* operon의 발현이 더 높았다.

영양요구성 조절변이주의 형질전환체들에서 트립토판 생산

*K. pneumoniae*의 영양요구성 조절변이주의 유전적 특성이 트립토판 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 이들 변이주들에 재조합 pSC101-*trpE*<sup>FBR</sup>과 pSC101-*trp*-AF plasmid DNA를 도입하여 트립토판 생산량을 비교하였다.

Table 5에서 보는 바와 같이 *trpR*<sup>-</sup> 변이주인 KC100의 형질전환체들은 모균인 KC99의 형질전환체들보다 트립토판 생성량이 30% 증가하였다. 또한 *tyrR*<sup>-</sup>인 KC105의 형질전환체들도 모균 KC100의 형질전환체들보다 트립토판 생성량이 약간씩 증가하였다. 그리고 Table 6에서 보는 바와 같이 IMP 영양요구인 KC107의 재조합 pSC101-*trp* plasmid들의 형질전환체들의 트립토판 생성량은 모균 KC105의 형질전환체들과 비슷하였다. 그러나 KC107의 histidine 영양요구주와 arginine 영양요구주의 재조합 *trp* plasmids의 형질전환체들은 모균 KC107의 형질전환체들에 비해서 트립토판 생성량이 2 배 이상 증가하였다. 그러나 KC108의 arginine 영양요구주의 형질전환체의 트립토판 생성량은 모균 KC107의 형질전

**Table 6.** The production of tryptophan by various *K. pneumoniae* auxotrophic regulatory mutants containing recombinant *trp* plasmids.

Strain	Characteristics	Amount of Trp (mg/l)
KC107 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC105 IMP <sup>-</sup>	145
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		150
KC108 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC107 His <sup>-</sup>	178
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		256
KC109 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC107 Arg <sup>-</sup>	229
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		230
KC110 (pSC101- <i>trpE</i> <sup>FBR</sup> )	KC108 Arg <sup>-</sup>	230
(pSC101- <i>trp</i> -AF)		233

환체와 비슷하였다.

Table 3, 4, 5, 6의 결과로부터 트립토판 생산성은 *trp* operon의 발현이 증대됨에 따라 트립토판 생산성도 증대됨을 보여주고 있다. 그리고 *trp* 유전자원에 따른 *trp* operon의 발현과 트립토판 생성량은 pSC101-*trpE*<sup>FBR</sup>보다는 pSC101-*trp*-AF에서 약간 증대되었음을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 *K. pneumoniae*에서 재조합 *trp* plasmid를 이용하여 트립토판 생산성을 증대시키기 위한 숙주는 *pheA*<sup>-</sup>, *tyrA*<sup>-</sup>, *trpR*<sup>-</sup>, *tyrR*<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Arg<sup>-</sup> 특성을 갖는 영양요구성 조절변이주가 바람직하다고 생각된다. 그리고 *K. pneumoniae*에는 트립토판을 분해하는 효소인 tryptophanase가 결여되어 있으나, 트립토판을 분해하여 유일한 질소원으로 사용할 수 있는 tryptophan aminotransferase가 존재하므로 (Parris 등, 1981; Chi 등, 1985) 이효소를 실험시켜야 하며, 또한 *trp* operon의 최종단계에 중간물질로 필요로 하는 L-serine의 공급을 증대시켜야 되리라 생각된다.

## 적 요

*Klebsiella pneumoniae*에서 재조합 *trp* plasmid의 발현을 극대화하여 트립토판 생산성을 증대시킬 수 있는 숙주를 개발하기 위하여 KC105(*pheA* *tyrA* *trpE* *trpR* *tyrR*)를 모균으로 하여 PRPP의 소모를 방지하기 위하여 IMP 영양요구주 KC107을 얻고, KC107로부터 His 영양요구주 KC108을 얻었다. 그리고 KC107과 KC108로부터 Arg 영양요구주들을 얻었다. 이들 영양요구성 조절변이주들과 KC99(*pheA* *tyrA* *trpE*), KC100(*pheA* *tyrA* *trpE* *trpR*)에 재조합 pSC101-*trpE*<sup>FBR</sup>과

pSC101-*trpL*( $\Delta att$ )*trpE*<sup>FBR</sup> (pSC101-*trp*-AF) plasmid 들을 도입하여 *trp* operon 의 발현과 트립토판 생산성을 조사하였을 때 숙주의 유전적 특성이 *trpR*<sup>-</sup>인 KC100과 *tyrR*<sup>-</sup>인 KC105는 모균들에 비해서 tryptophan synthase 활성과 트립토판 생성량이 30-40% 증가되었다. 또한 His<sup>-</sup>인 KC108과 Arg<sup>-</sup>인 KC109에 재조합 *trp* plasmid 가 도입되었을 때 모균 KC107에 비해서 tryptophan synthase 활성과 트립토판 생성량이 2 배 증가하였다.

## REFERENCES

1. Aiba, *et al.*, 1980. Enhancement of tryptophan production by *E. coli* as an application of genetic engineering. *Biotechnol. Lett.* **2**, 525-530.
2. Aiba, *et al.*, 1982. New Approach to tryptophan production by *E. coli*; Genetic manipulation of composite plasmid *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 289-297.
3. Blumenberg, M., and C. Yanofsky, 1982. Regulatory region of the *Klebsiella aerogenes* tryptophan operon. *J. Bacteriol.* **152**, 49-56.
4. Chi, Y.T., and S.Y. Lee, 1983. Construction of *Escherichia coli* K-12 *trpL*( $\Delta att$ )*trpE*<sup>FBR</sup> mutant and its characteristics. *Korean Biochem. J.* **16**, 246-251.
5. Chi, Y.T., and I.Y. Kim and S.Y. Lee, 1984. Cloning and expression of *E. coli* K-12 *trpL*( $\Delta att$ )*trpE*<sup>FBR</sup> gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Kor. Jour. Microbiol.* **22**, 229-234.
6. Chi, Y.T., I.C. Kim and S.Y. Lee, 1985. Effects of *tat* and *ssd* mutation on the expression of a recombinant *trp* plasmid and tryptophan production in *K. pneumoniae*. *Korean Biochem. J.* **18**, 103-107.
7. Cohen, S.N., and A.C.Y. Chang, 1977. Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J. Bacteriol.* **132**, 734.
8. Crawford, I.P., 1975. Gene rearrangements in the evolution of the tryptophan synthetic pathway. *Bacteriol. Review.* **39**, 87-120.
9. Gibson, F., and J. Pittard, 1968. Pathway of biosynthesis of aromatic amino acids and vitamins and their control in micro organization. *Bacteriol. Reviews.* **32**, 465-492.
10. Gibson, F., in "Methods in Enzymology" 1970, **17**, 362-364. Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke, 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2989.
11. Manson, M.M., and C. Yanofsky, 1976. Tryptophan operon regulation in interspecific hybrids of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **126**, 679-689.
12. Miller, J.H., in "Experiment in molecular genetics" 1972, p.125-129, Cold Spring Harbor.
13. Miozzari, G.F., and C. Yanofsky, 1978. Translation of leader region of the *E. coli* tryptophan operon. *J. Bacteriol.* **133**, 1457-1466.
14. Nogard, M.V., K. Kim, and J.J. Monohan, 1978. Factors affecting the transformation of *E. coli* Strain 1776 by pBR322 plasmid DNA. *Gene.* **3**, 279-292.
15. Parris, C.G., and B. Magasavik, 1981. Tryptophan metabolism in *Klebsiella aerogenes*: Regulation of the utilization of aromatic amino acids as of nitrogen. *J. Bacteriol.* **146**, 257-265.
16. Tribe, D., and J. Pittard, 1979. Hyperproduction of tryptophan by *Escherichia coli*: Genetic manipulation of the pathways leading to tryptophan formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 181-190.
17. Udenfriend, S. and R.E. Peterson, 1962. in "Method in Enzymology", **3**, 613.

(Received Feb. 12, 1987)