

## *Agrobacterium tumefaciens* A348에서 *virE* 프로모터의 활성

陰眞星·鄭勝太·安正善\*·沈雄燮

(고려대학교 이과대학 생물학과, \*서울대학교 자연과학대학 생물학과)

### Activity of *virE* Promoter in *Agrobacterium tumefaciens* A348

Eum, Jin Seong, Seung Tae Chung, Chung Sun An\* and Woong Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul and

\*Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

To elucidate the regulatory mechanism of *virE* operon from *vir* regions (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virG*, *virE*) of pTiA6 which have been known to be essential for efficient crown gall tumorigenesis in plants, the activity of the truncated *virE* promoter was analyzed.

pSM358cd, a recombinant plasmid in which *virE* :: Tn3-HoHo1 (Tn3-promoterless *lacZ*) was cloned into *Sal*I site of pVK102, was digested with *Sal*I and *virE* :: Tn3-HoHo1 was separated from pVK102. To construct the truncated *virE* recombinant plasmids (pJS031, pJS051, pJS102, pJS201, pJS301), 5'-end of *virE* promoter was deleted with BAL31 and cloned into pVK102 and then transferred into *A. tumefaciens* A348 (pTiA6).

According to the activity of the truncated *virE* promoter in recombinant plasmids, they were classified into two groups, pJS031, pJS051, pJS101 and pJS201 belong to a functional group and pJS301 is a non-functional. The size of deleted nucleotides of pJS201 and pJS301 seemed to be about 130 nucleotides and about 250 nucleotides from 5'-end of *virE* promoter, respectively. Hence it was thought that the essential site of the *virE* promoter was located between about 130th nucleotide and 250th nucleotide from 5'-end of the *virE* promoter.

#### 서론

*Agrobacterium tumefaciens*는 병원성의 Gram negative soil bacteria이며 대부분의 쌍자엽 식물과 소수의 단자엽 식물의 상처난 부위에서 crown gall tumor를 유발한다(Hernalsteens *et al.*, 1984). 이러한 병원성은 *Agrobacterium tumefaciens*가 갖고 있는 분자량이 매우 큰 Tumor-inducing (Ti) plasmid에 기인한다(Watson *et al.*, 1975). Ti plasmid내 두 부위가 crown gall tumor 형성에 관여한다. 첫 번째 부위는 T-DNA(transferred DNA)로서 식물세포의 핵 계층에 안정하게 삽입된 후 tumor를 유발시킨다(Chilton *et al.*, 1980). 두번째 부위는 Ti plasmid내에서 약 35 kb를 차지하고 있는 virulence(*vir*) region으로 crown gall tumor 세포내에는 존재하지 않으면서 T-DNA transfer에 관여하는 부위로서 virulence에 매우 중요한 기능을 갖고

있다(Garfinkel and Nester, 1980; Hagiya *et al.*, 1985).

T-DNA processing과 세균-식물간의 상호작용에 관여하는 *vir* region에는 6개의 뚜렷한 *vir* operons(*virA*, *virG*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*)이 존재하고 있는데, *virA*, *virB*, *virD*, *virG* 유전자에 돌연변이가 일어나면 그 T-DNA는 식물세포를 형질전환시키는 능력을 완전히 상실하나, *virC*와 *virE* 유전자에 돌연변이가 일어나면 형질전환시키는 능력이 크게 감소된다(Stachel and Nester, 1986).

현재까지 알려진 Ti plasmid의 *vir* region에 의해서 T-DNA가 *A. tumefaciens*로부터 식물세포로 전달되는 과정은 다음과 같이 추측하고 있다. 먼저 *A. tumefaciens*의 열색체 *vir* 유전자(*chuA*, *chuB*, *exoC*)에 의해서 *A. tumefaciens*가 상처난 식물세포에 부착하게 되면 상처난 식물세포에서는 페놀성 화합물의 일종인 acetosyringone을 분비하여 *vir* 유전자들의 발현이 유도된다(Stachel *et al.*, 1985; John and

Amasio, 1988). *virA* 유전자는 내막 단백질을 생성하여 acetosyringone과 상호작용한 후 *virG* 산물을 활성화시키며 (Leroux *et al.*, 1987), 활성화된 *virG* 산물은 나머지 *virB*, *virC*, *virD*, *virE* 유전자의 전사를 촉진시켜 준다(Stachel and Zambryski, 1986a, 1986b). 활성화된 *virD* 산물 중 2개의 open reading frame에서 발현되는 protein은 부위 특이성 endonuclease 기능을 갖고 있어서 T-DNA를 둘러싸고 있는 25 base pair로 구성된 반복서열내의 특정 부위를 절단시켜 준다(Albright *et al.*, 1987; Stachel *et al.*, 1987; Durrenberger *et al.*, 1989). *VirC* 산물은 T-DNA right border 근접 부위에 위치하고 있는 overdrive 부위에 결합하여 T-DNA processing을 촉진시켜 주는 것으로 추측된다(Toro *et al.*, 1988). *VirB* operon으로부터 만들어진 11개의 단백질들은 bacterial membrane에 존재하고 있는 것으로 보아서(Engstrom *et al.*, 1987) T-DNA가 식물세포로 전달되도록 막투과복합체를 형성하는 것으로 생각하고 있다(Thompson *et al.*, 1988). *VirE* 유전자는 단일 가닥 DNA-binding protein을 생성하여 T-DNA에 결합함으로써 bacteria나 식물세포에 존재하고 있는 nuclease로부터 T-DNA를 보호하며 T-DNA가 식물세포의 염색체에 안정하게 삽입된 후 발현되도록 하는데 중요한 역할을 하고 있을 것이라고 추측하고 있다(Citovsky *et al.*, 1989; Das, 1988; Gardner and Knauf, 1986). 현재 *virE* promoter의 염기서열은 Winans 등(1987)의 연구에서 밝혀졌으나, *virE* promoter의 조절부위에 대해서는 밝혀져 있지 않다. 따라서, 본 연구에서는 Ti plasmid의 T-DNA transfer에 관여하는 *vir* gene promoter의 발현 조절기작을 규명하기 위한 연구의 일환으로서 *virE* promoter내 cis-acting element 부위를 규명하였다.

## 재료 및 방법

**균주와 플라스미드.** 본 연구에 사용된 균주와 플라스미드의 종류 및 특징은 Table 1에 표시하였다.

**배지 및 효소.** *A. tumefaciens*는 MG/L 또는 AB 최소배지에서 28°C로 배양하였으며, *E. coli*는 LB 배지에서 37°C로 배양하였다.

제한효소(*SalI*, *HindIII*, *KpnI*), DNA 증합효소 I large fragment(Klenow fragment), BAL31, T4 DNA ligase는 New England Biolabs 제품을 사용하였으며 Calf intestinal phosphatase는 Boehringer Mannheim 제품을 사용하였다. Cesium chloride, octopine, ethidium bromide, Sephadex G-50, morpholinoethanesulfonic acid(MES), dATP, dCTP, dGTP, TTP, ATP, ampicillin, carbenicillin, kanamycin, rifampicin, spectinomycin, RNAase, bovine serum albumin, lysozyme들은 Sigma제품을 사용하였으며, acetosyringone

은 Aldrich제품을 사용하였고, phenol은 Merk회사로부터 구입하였다.

**플라스미드 DNA의 분리.** 플라스미드 DNA의 대량 분리는 Marco 등(1989)의 방법을 변형시켜 사용하였으며, 형질전환체 및 클로닝 여부를 확인하기 위한 소량분리는 Birnboim과 Doly(1979)의 방법을 사용하였다.

**Truncated *virE* 재조합 플라스미드의 제조.** *virE* promoter의 5'말단 일부가 제거된 truncated *virE* 재조합플라스미드는 *A. tumefaciens* pTiA6의 *virE* 부위에 Tn3-HoHo1(Stachel *et al.*, 1985)이 삽입된 pSM358cd(Stachel *et al.*, 1986)와 pVK102(Knauf and Nester, 1982)를 이용하여 제조하였다. pVK102는 *E. coli*와 *A. tumefaciens*에서 성장할 수 있는 복제기원을 모두 가지고 있는 플라스미드로서 크기는 23 kb이고, kanamycin과 tetracycline 내성유전자가 있으며 tetracycline 내성유전자에 *SalI* 단일절단부위가 존재하고 있다. pSM358cd는 pVK102의 *SalI* 단일절단부위에 *virE* :: Tn3-HoHo1(*virE* :: promoterless *lacZ*)이 재조합된 플라스미드로서, Tn3-HoHo1(promoterless *lacZ*)은 *virE2* open reading frame에 삽입되어 *virE* promoter에 의해서 발현된다. 본 연구에서는 pSM358cd를 제한효소 *SalI*으로 절단시켜서 pVK102와 *virE* :: Tn3-HoHo1을 분리시켰다. 분리된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편은 BAL31에 의하여 시간(3, 5, 10, 20, 30분)에 따라서 *virE* promoter를 부분적으로 제거시켰으며 제거된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편의 양쪽말단을 단편말단 형태로 하기 위하여 Klenow fragment를 사용하여 end-filling시켰다. 한편 pVK102를 제한효소 *SalI*으로 절단시키고 Klenow fragment로 end-filling시켜서 양쪽말단을 단편말단 형태로 전환시킨 후에 self ligation을 방지하기 위하여 alkaline phosphatase를 사용하여 5'-말단인산기를 제거시켰다. 이와 같이 처리된 pVK102를 vector로 사용하여, *virE* promoter가 BAL31에 의해서 시간에 따라 부분적으로 제거된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편을 클로닝시켰다(Fig. 1).

**형질전환 및 형질전환체 선별.** 형질전환은 Sambrook 등(1989)의 방법을 이용하였으며, 숙주세포는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. 형질전환된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)와 carbenicillin(100  $\mu$ g/ml)이 함유된 항생제 배지에서 선별하였다.

**재조합플라스미드의 이동과 형질전환된 *A. tumefaciens*의 선별.** 재조합플라스미드들은 triparental mating(Ditta *et al.*, 1980; Garfinkel and Nester, 1980)의 방법에 따라 helper 플라스미드인 pRK2073을 이용하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ 로부터 *A. tumefaciens* A348로 이동시켰다. Truncated *virE* 재조합플라스미드들이 존재하는 형질전환체 *E. coli* DH5 $\alpha$ 들을 kanamycin 50  $\mu$ g/ml과 carbenicillin 100  $\mu$ g/ml이 함유된 LB에서 37°C로 배양하였으며, helper strain인 HB

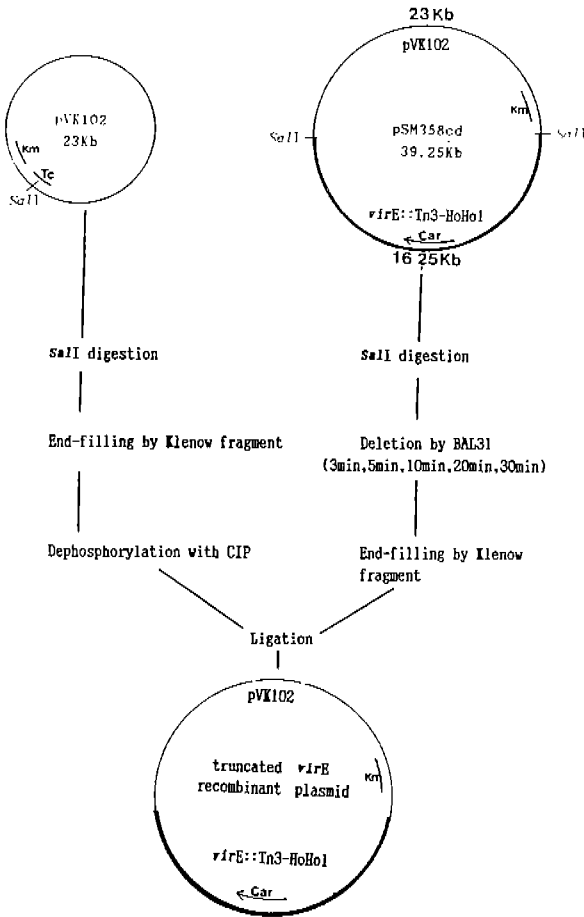


Fig. 1. Scheme for the construction of truncated *virE* recombinant plasmid. The symbols used are: Km, Kanamycin resistance; Tc, Tetracycline resistance; Car, carbenicillin resistance.

알아보기 위하여, Winans 등(1988)의 방법과 Vernade 등(1988)의 방법을 참고로 하여 페놀성화합물의 일종인 acetosyringone으로 *vir* 유전자들의 발현을 유도시켰다. 제조 합플라스미드가 존재하는 *A. tumefaciens* A348을 3 ml의 AB 최소배지에 접종한 후 28°C에서 배양하였다. 하룻밤 동안 배양한 후 원심분리하여 균체를 수확하고, *vir* 유전자 유도배지(20×AB salt 5 ml, 400 mM MES, pH 5.45, 5 ml, 25% glucose 2 ml, D.W 88 ml, 20×AB buffer 100 µl, 0.1 M acetosyringone 200 µl/100 ml)에 optical density가 600 nm에서 0.1이 되도록 접종하고 28°C에서 18시간 진탕배양하였다. 유도배지는 acetosyringone의 최종농도가 200 µM 함유되고 morpholinoethanesulfonic acid(MES)가 20 mM 함유된 AB 최소배지(pH 5.4)로써, *vir* 유전자들의 발현을 유도시켰다.

**β-Galactosidase 활성 측정.** 정상적인 *virE* promoter를 함유한 pSM358cd와 truncated *virE* promoter를 함유한 재조합플라스미드(truncated *virE* :: Tn3-HoHo1)에서 발현되는 β-galactosidase 측정방법은 Miller(1972)의 방법과 Vernade 등(1988)의 방법을 참고로 하였으며, β-galactosidase에 대한 기질로서 o-nitrophenyl-β-D-galactosidase (ONPG)를 넣어주고 ONPG가 분해되는 정도를 측정하여 β-galactosidase의 활성을 조사하였다. *Vir* 유전자 유도배지에서 18시간 진탕배양하여 600 nm에서의 optical density를 측정하고, 배양액 0.5 ml과 Z완충용액(0.06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05 M β-mercaptoethanol) 0.5 ml을 섞은 후 chloroform 40 µl과 0.1% SDS 20 µl를 첨가하여 28°C에서 10분간 보관하였다. o-Nitrophenyl-β-D-galactoside(4 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) 200 µl를 첨가하여 각각 30분과 2시간 반응시킨 후, 1 M sodium carbonate 500 µl를 첨가하여 반응을 중단시켜서 420 nm와 550 nm에서 optical density를 측정하여 β-galactosidase의 활성으로 환산하였다.

$$\text{Miller units} = 1000 \times \frac{\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}}{T \times V \times \text{OD}_{600}}$$

T: 반응시간(분), V: 반응액 사용된 배양액(0.5 ml).

### 결과 및 고찰

**Truncated *virE* 재조합 플라스미드의 제조 및 유전적 분석.** Fig. 1의 방법으로 얻은 truncated *virE* 재조합플라스미드들은 Table 2에 표시하였다. 한편 pSM358cd(Table 1)로부터 분리된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편을 BAL 31을 이용하여 시간(0, 5, 10, 15, 20, 25, 40분)에 따라서 *virE* promoter를 제거시킨 후, 제한효소 *Kpn*I으로 처리하

101(pRK2073)은 spectinomycin 50 µg/ml이 함유된 LB에서 37°C로 배양하였고, 수용균인 *A. tumefaciens* A348은 rifampicin 10 µg/ml이 함유된 MG/L에서 28°C로 진탕배양하였다. 다음날 3 가지 세균을 모두 섞어서 항생제가 없는 MG/L 한천배지에 도달하여 28°C에서 하룻밤 배양시킨 후 배양된 세균을 kanamycin 100 µg/ml, carbenicillin 100 µg/ml, rifampicin 10 µg/ml이 함유된 AB 최소배지에 접종하여 28°C에서 2일간 배양하여 항생제 배지에서 성장하는 transconjugant colony를 선별하였다.

***Vir* 유전자들의 발현 유도.** *A. tumefaciens* Ti plasmid의 *vir* 유전자들은 식물세포와 같이 배양될 때 식물세포에서 분비되는 페놀성화합물에 의해서 발현이 유도된다고 하였다(Stachel *et al.*, 1986). 본 연구에서는 *A. tumefaciens* A 348로 옮겨진 truncated *virE* promoter에 의한 발현 정도를

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/Plasmid	Genotype or Characteristics	Source or Reference
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacV169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsd17 recA1 gyrA96 thi-1 rel1</i>	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( $r_{15}$ $m_{15}$ ) <i>recAB ara 14</i> <i>proA2 lacY1 galK2 rpsL20 Xyl-5 mtl-1</i>	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
<i>A. tumefaciens</i>		
A136	Rif <sup>r</sup>	Knauf and Nester (1982)
A348	pTiA6/A136	Knauf and Nester (1982)
Plasmid		
pVK102	Km <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Knauf and Nester (1982)
pRK2073	Sp <sup>r</sup>	Better and Heliski (1983)
pSM243cd	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> <i>virB</i> :: Tn3-HoHo1	Stachel and Zambryski (1986)
pSM358cd	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	Stachel and Zambryski (1986)
pJS001	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study
pJS031	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study
pJS051	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study
pJS101	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study
pJS201	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study
pJS301	Km <sup>r</sup> Car <sup>r</sup> truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHo1	in this study

Table 2. Recombinant plasmids obtained in this study and the estimated number of deleted base pairs from *virE* promoter by BAL31

Recombinant plasmids of truncated <i>virE</i> operon	Reaction time with BAL31 (min)	Estimated number of deleted base pairs
pJS001	0	0
pJS031	3	15
pJS051	5	30
pJS101	10	60
pJS201	20	130
pJS301	30	250

The estimated number of deleted base pairs from *virE* promoter was based on the result of Fig. 2.

여 *virE* promoter가 부분적으로 제거된 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이를 근거로 하여 BAL31에 의해서 *virE* promoter의 염기들이 시간에 따라 제거된 정도를 전기영동법을 이용하여 측정한 결과, BAL31으로 3, 5, 10, 20, 30분 처리하였을 때 *virE* promoter의 5'말단으로부터 각각 약 15, 30, 60, 130, 250 bp 정도가 제거되었다(Table 2). Winans 등(1987)은 완전한 *virE* promoter의 염기서열을 밝혔으며, *virE* promoter의 5'말단으로부터 *virE1* open reading frame의 ATG codon까지 387 bp로 되어 있다고 하였다. 따라서 본 연구에서 제조한 재조합플라스미드들은 종류에

따라서, *virE* promoter 5'말단의 최초염기(G)로부터 *virE1* open reading frame의 ATG 방향으로 각각 약 15 bp에서 약 250 bp가 제거된 것을 의미한다. 한편 pVK102의 *SalI* 단일절단부위에 BAL31에 의해서 *virE* promoter가 부분적으로 제거된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편이 클로닝될 때, pSM38cd와 같이 올바른 방향으로 삽입되었는지 또는 반대방향으로 삽입되었는지의 여부를 알아보기 위하여 재조합플라스미드를 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 처리하였다. pSM358cd와 같은 방향으로 삽입되었을 경우에는 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단시켰을 때 21.8, 7.4, 7, 3.2 kb DNA 절편들이 존재하는 반면, 반대방향으로 삽입되었을 경우에는 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단시켰을 때 22.8, 7.4, 7, 2.2 kb DNA 절편들이 존재하게 된다. 따라서 pSM358cd와 같은 방향으로 삽입되었는가 또는 반대방향으로 삽입되었는가에 대한 여부는, 가장 작은 DNA 절편의 크기가 3.2 kb인가 또는 2.2 kb인가로 구별하였다. 본 연구에서 제조한 플라스미드들 중, pJS001은 완전한 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편을 pVK102의 *SalI* 단일절단부위에 클로닝한 재조합플라스미드로서 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단시켰을 때 21.8, 7.4, 7, 3.2 kb DNA 절편들이 존재하는 결과로부터 pJS001은 pSM358cd와 같은 방향으로 삽입되었음을 알 수 있었다(Fig. 3, lane 3과 lane 4). pJS301과 pJS051은 BAL31으로 각각 3분과 5분 처리하여 일부 제거된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편이 클로닝된 재조합플라스미드이며, 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절

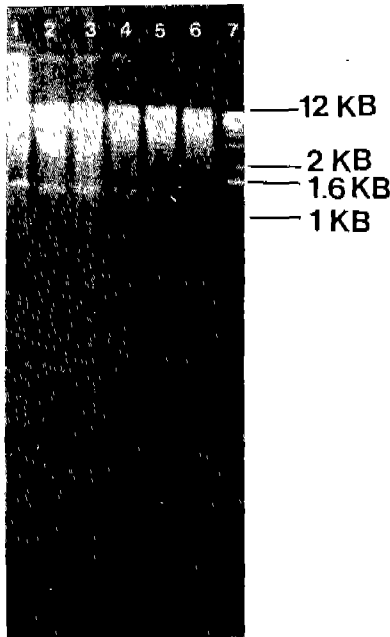


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *virE* promoter deleted by BAL31.

Lane 1: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 0 min and digested with *KpnI*.

Lane 2: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 10 min and digested with *KpnI*.

Lane 3: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 15 min and digested with *KpnI*.

Lane 4: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 20 min and digested with *KpnI*.

Lane 5: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 25 min and digested with *KpnI*.

Lane 6: *SalI*-pSM358cd deleted by BAL31 during 40 min and digested with *KpnI*.

The DNA fragments between 1.6 kb and 1 kb contain truncated *virE* promoter.

단하였을 때 가장 작은 DNA 절편의 크기는 약 3.2 kb로서 pSM358cd와 같은 방향으로 삽입되었다(Fig. 4, lane 3과 lane 4). pJS101(Fig. 5, lane 4), pJS201(Fig. 6, lane 3), pJS301(Fig. 7, lane 4)들은 BAL31으로 각각 10, 20, 30분 처리하여 일부 제거된 *virE* :: Tn3-HoHo1 DNA 절편을 클로닝시킨 truncated *virE* 재조합플라스미드들이며, 이들 재조합플라스미드들을 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단한 경우 모두 21.8, 7.4, 7, 약 3.1 kb-2.95 kb DNA 절편들이 존재하였다. 가장 작은 DNA 절편은 일부 제거된 *virE* promoter가 존재하는 부위로서, BAL31으로 제거된 염기수에 따라서 DNA 절편의 크기에 차이가 나타났다. 따라서 pSM

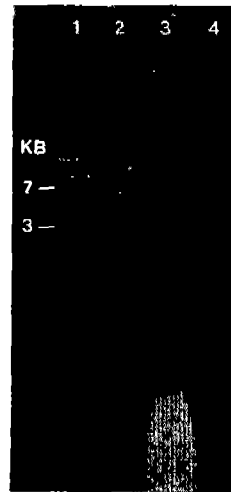


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of pJS001 and pSM358cd digested with *HindIII* and *KpnI*.

Lane 1:  $\lambda$ -DNA digested with *HindIII*

Lane 2: 1 Kb ladder

Lane 3: pJS001 digested with *HindIII* and *KpnI*

Lane 4: pSM358cd digested with *HindIII* and *KpnI*

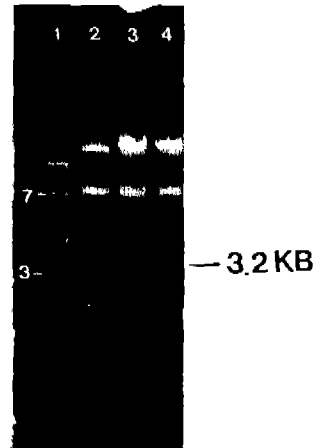


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pJS031, pJS051 and pSM358cd digested with *HindIII* and *KpnI*.

Lane 1: 1 Kb ladder

Lane 2: pSM358cd digested with *HindIII* and *KpnI*

Lane 3: pJS031 digested with *HindIII* and *KpnI*

Lane 4: pJS051 digested with *HindIII* and *KpnI*

358cd와 반대방향으로 삽입되었을 경우 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단시켰을 때 가장 작은 DNA 절편의 크기는 2.2 kb인 반면에, pJS101, pJS201, pJS301에서 가장 작은 DNA 절편의 크기가 약 3.1-2.95 kb인 결과로부터,

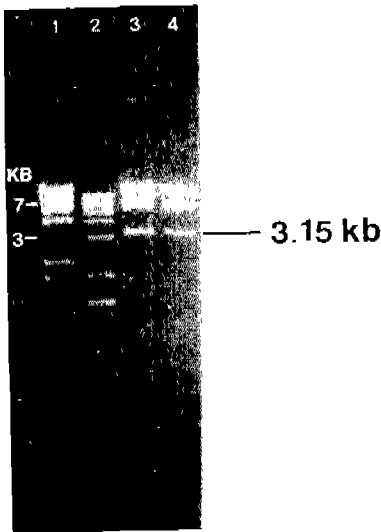


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of pJS101 and pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: λ-DNA digested with *Hind*III Lane 2: 1 Kb ladder Lane 3: pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I Lane 4: pJS101 digested with *Hind*III and *Kpn*I



Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of pJS201 and pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: 1 kb ladder Lane 2: pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I Lane 3: pJS201 digested with *Hind*III and *Kpn*I

상기 재조합플라스미드들은 모두 pSM358과 같은 방향으로 삽입되었음을 알 수 있었다. 이는 재조합플라스미드에 의한 발현이 pVK102에 존재하고 있는 tetracycline 내성유전자의

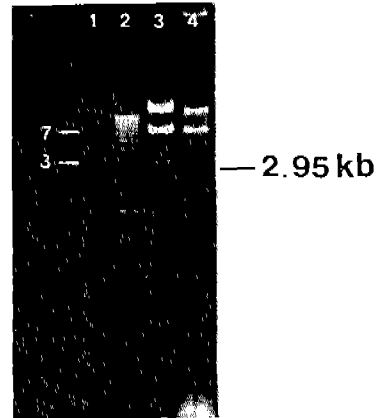


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of pJS301 and pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: λ-DNA digested with *Hind*III Lane 2: 1 Kb ladder Lane 3: pSM358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I Lane 4: pJS301 digested with *Hind*III and *Kpn*I

promoter에 영향을 받지 않고 일부제거된 *virE* promoter에 의해서 발현된다는 것을 의미한다.

**Truncated *virE* promoter의 활성.** Truncated *virE* 재조합플라스미드를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens*들은 acetosyringone을 사용하여 *vir* 유전자를 발현시킨 다음, β-galactosidase의 활성을 측정함으로써 *virE* promoter의 활성을 측정하였다. *virB* 유전자에 Tn3-HoHoI이 삽입된 pSM243cd와 *virE* 유전자에 Tn3-HoHoI이 삽입된 pSM358cd를 사용하여 acetosyringone이 존재하는 유도배지와 acetosyringone이 결여된 배지에서 *vir* 유전자들의 발현여부를 측정할 결과, acetosyringone이 존재하는 유도배지에서 배양된 pSM243cd와 pSM358cd는 모두 높은 β-galactosidase의 활성을 보였으며, acetosyringone이 결여된 배지에서 배양된 pSM243cd와 pSM358cd는 낮은 β-galactosidase의 활성을 보였다(Table 3). 이상의 결과로부터 본 연구에서 사용한 방법으로 유도배지에 acetosyringone을 사용하면 *vir* 유전자들의 발현이 유도된다는 것을 입증하였다. 또한 pTiA6만 존재하는 A348, Ti 플라스미드가 존재하지 않는 A136, pSM358cd가 존재하는 A136(-pTiA6)과 *E. coli* DH5α에서 acetosyringone에 의한 유도여부를 측정할 결과, Table 4에서와 같이 β-galactosidase의 활성은 거의 없거나 낮은 활성을 보였다. Table 3과 4의 결과로부터 *virE* 유전자의 발현은 pTiA6의 존재하에 acetosyringone에 의해서 유도된다는 사실을 알 수 있다.

Veluthambi 등(1989)의 연구에서 acetosyringone의 농도를 30 μM로 하여 *vir* 유전자들의 발현을 유도시킨 것을 근거로 하여, 유도배지에서 acetosyringone의 농도를 각각

Table 3.  $\beta$ -Galactosidase activity of *virB::lacZ* fusion (pSM243cd) and *virE::lacZ* fusion (pSM358cd)

Strain (A348)	Medium	OD <sub>600</sub>	OD <sub>420</sub>	OD <sub>550</sub>	$\beta$ -galactosidase activity (Miller units)
pSM243cd ( <i>virB</i> )	Induction medium (+AS)	0.57	7.8	0.18	438
	AB medium (-AS)	1.56	0.78	0.39	2
pSM358cd ( <i>virE</i> )	Induction medium (+AS)	0.4	7.26	0.18	579
	AB medium (-AS)	1.68	4.14	0.57	62

Reaction time: 60 min. AS is acetosyringone (200  $\mu$ M). OD<sub>600</sub>: absorbance at the cell density just before assay. OD<sub>420</sub>: absorbance at o-nitrophenol and light scattering by the cell debris. OD<sub>550</sub>: absorbance at light scattering by the cell debris (no contribution from o-nitrophenol).

Table 4. Effect of *vir* gene induction against non-induced strains (-pTiA6)

Strain	Medium	OD <sub>600</sub>	OD <sub>420</sub>	OD <sub>550</sub>	$\beta$ -galactosidase activity (Miller units)
A136	Induction medium (+AS)	1.02	0.36	0.2	4
A348	Induction medium (+AS)	0.27	0.16	0.015	4
pSM358cd/A136	Induction medium (+AS)	0.6	2.24	0.1	57
pSM358cd/DH5 $\alpha$	LB (+AS)	1.5	7.8	0.51	77
DH5 $\alpha$	LB (+AS)	0.66	0.3	0.1	3

AS is acetosyringone (200  $\mu$ M).

Table 5.  $\beta$ -Galactosidase activity of *virE-lacZ* fusion (pSM358cd) at different acetosyringone concentration and effects of octopine

Strain	Induction medium	OD <sub>600</sub>	OD <sub>420</sub>	OD <sub>550</sub>	$\beta$ -galactosidase activity (Miller units)
pSM358cd/A348 ( <i>virE</i> )	AS 200 $\mu$ M	0.31	5.76	0.08	302
	AS 30 $\mu$ M	0.32	5.28	0.02	273
	AS 30 $\mu$ M + octopine 10 mM	0.32	5.3	0.02	274
	octopine 10 mM	0.52	2.16	0.08	65
	No added	0.5	2.08	0.08	65

\*Reaction time : 120 min.

200  $\mu$ M과 30  $\mu$ M을 첨가하여 pSM358cd/A348의 발현을 유도시켜서  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정할 결과는 acetosyringone의 농도가 30  $\mu$ M인 경우에도 200  $\mu$ M인 경우에서와 같이 높은  $\beta$ -galactosidase의 활성이 측정되었다(Table 5). 이와 같은 acetosyringone의 최종농도가 30  $\mu$ M인 경우에도 *vir* 유전자의 발현은 충분히 유도될 수 있다고 생각되어진다. 이와 같은 방법으로 본 연구에서 제조한 truncated *virE* 재조합플라스미드에 의해서 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 활성을 근거로하여, *virE* promoter의 기능을 상실한 truncated *virE* 재조합플라스미드와 상실하지 않은

truncated *virE* 재조합플라스미드를 구분할 수 있었다(Table 6). 즉 pJS001, pJS031, pJS051, pJS101, pJS201은  $\beta$ -galactosidase의 활성이 매우 높기 때문에 그들의 *virE* promoter가 활성상태를 유지하고 있는 것이며, pJS301의  $\beta$ -galactosidase의 활성은 매우 낮기 때문에 그의 *virE* promoter 기능은 상실되었다고 생각되어진다. 따라서 완전한 *virE* promoter의 염기서열을 밝힌 Winans 등(1987)의 연구결과를 근거로 하여, *virE* promoter의 5'말단으로부터 *virE1* open reading frame의 해독 시작부위인 ATG codon 방향으로 약 130번째 염기부터 약 250번째 염기부위가 *virE*

Table 6.  $\beta$ -Galactosidase activity of recombinant plasmids of truncated *virE* operon

Strain (A348)	$\beta$ -galactosidase activity (Miller units)	
	reaction time (30 min)	reaction time (120 min)
pSM358cd	1194	302
pJS001	NT	292
pJS031	1024	260
pJS051	845	231
pJS101	831	209
pJS201	779	196
pJS301	18	19
A348	2	4

Used acetosyringone was 200  $\mu$ M, NT: Not test.

유전자 발현의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

### 적 요

식물세포에 tumor를 유발하는 pTiA6 plasmid의 *vir* 유전자들(*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virG*, *virE*) 중에서 *virE* 유전자의 발현조절기작을 분자적수준에서 규명하기 위하여 truncated *virE* 재조합플라스미드들의 활성을 조사 연구하였다.

pVK102의 *SalI* 부위에 *virE* :: Tn3-HoHo1(Tn3-promoterless *lacZ*)이 클로닝된 pSM358cd로부터 *SalI*을 처리하여 *virE* :: Tn3-HoHo1(17 kb)과 pVK102(23 kb)를 각각 분리하였다. *VirE* promoter를 BAL31으로 처리하여 *virE* promoter의 5'말단으로부터 일정길이를 제거한 다음 pVK102의 *SalI* 부위에 다시 삽입하여 *virE* promoter가 일부 제거된 재조합플라스미드 pJS031, pJS051, pJS101, pJS201 및 pJS301을 제조하여 pTiA6가 함유된 *A. tumefaciens* A348를 형질전환시켰다.

재조합플라스미드들내의 truncated *virE* promoter의 활성을 조사한 결과, 2개의 groups으로 구분되었다. pJS031, pJS051, pJS101 및 pJS201들은 promoter가 활성상태로 존재하였으나, pJS301내의 promoter는 활성을 상실하였다. 그런데 pJS201과 pJS301의 *virE* promoter는 5'말단으로부터 각각 약 130개의 염기와 약 250개의 염기가 제거된 것으로 추측되기 때문에, 5'말단으로부터 약 130번째의 염기에서부터 약 250번째 염기부위가 *virE* operon의 발현에 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.

### 사 사

본 논문은 1990년도 교육부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

### 참 고 문 헌

Albright, L.M., M.F. Yanofsky, B. Leroux, D. Ma and E.W. Nester. 1987. Processing of the T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* generates border nicks and linear, single strand T-DNA. *J. Bacteriol.* **169**: 1014-1055.

Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA plasmid. *Nucl. Acid. Res.* **7**: 1513-1516.

Chilton, M.D., R.K. Saiki, N. Yadav, M.P. Gordon and F. Quetier. 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **77**: 2693-2697.

Citovsky, V., M.L. Wong and P. Zambryski. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium virE2* protein with single stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1193-1197.

Das, A. 1988. *Agrobacterium tumefaciens virE* operon encodes a single-stranded DNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2909-2913.

Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin and D.R. Helinski. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7347-7351.

Durrenberger, F., A. Crammeri, B. Hohn and Z. Koukolilova-Nicola. 1989. Covalently bound *virD2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleolytic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9154-9158.

Engstrom, P., P. Zambryski, M. Van Montagu and S.E. Stachel. 1987. Characterization of *Agrobacterium tumefaciens* virulence proteins induced by the plant factor acetosyringone. *J. Mol. Biol.* **197**: 635-645.

Gardner, R.C. and V.C. Knauf. 1986. Transfer of *Agrobacterium* DNA to plants requires a T-DNA border but not the *virE* locus. *Science* **231**: 725-727.

Garfinkel, D.J. and E.W. Nester. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *J. Bacteriol.* **144**: 732-743.

Gelvin, S.B. and L.L. Habek. 1990. *Vir* genes influence conjugal transfer of the Ti-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **172**: 1600-1608.

Hagiya, M., T.J. Close, R.C. Tait and C.I. Kado. 1985. Identification of the virulence in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2669-2673.

Hernalsteens, J.P., L. Thia-Toong, J. Schell and M. Van Montagu. 1984. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.* **3**: 3039-3041.

John, M.C. and R.M. Amasino. 1988. Expression of an *Agrobacterium* Ti plasmid gene involved in cytokinin biosynthesis is regulated by virulence loci and induced by



- plant phenolic compounds. *J. Bacteriol.* **170**: 790-795.
- Knäuf, V.C. and E.W. Nester. 1982. Wide host range cloning vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* **8**: 45-54.
- Leroux, B., M.F. Yanofsky, S.C. Winans, J.E. Ward, S.F. Ziegler and E.W. Nester. 1987. Characterization of the *virA* locus of *Agrobacterium tumefaciens*: a transcriptional regulator and host range determinant. *EMBO J.* **6**: 849-856.
- Marco, M.A., R. Chipperfield and H.C. Birnboim. 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* **121**: 382-387.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. In, Assay of  $\beta$ -galactosidase. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. pp. 352-355.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Stachel, S.E., B. Timmerman and P. Zambryski. 1987. Activation of *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression generates multiple single-stranded T-strand molecules from the pTiA6 T-region: requirement for 5 *virD* gene products. *EMBO J.* 857-863.
- Stachel, S.E., E. Messens, M. Van Montagu and P.C. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**: 624-629.
- Stachel, S.E. and E.W. Nester. 1986. The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the pTiA6 plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* **5**: 1445-1454.
- Stachel, S.E. and P.C. Zambryski. 1986a. *VirA* and *virG* control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *Agrobacterium tumefaciens*. *Cell* **46**: 325-333.
- Stachel, S.E. and P.C. Zambryski. 1986b. *Agrobacterium tumefaciens* and the susceptible plant cell: A novel adaptation of extracellular recognition and DNA conjugation. *Cell* **47**: 155-157.
- Thompson, D.V., L.S. Melchers, K.B. Idler, R.A. Schilperoot and P.J.J. Hooykaas. 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens virB* operon. *Nucl. Acid. Res.* **16**: 4621-4636.
- Toro, N., A. Datta, M. Yanofsky and E.W. Nester. 1988. Role of the overdrive sequence in T-DNA border cleavage in *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1881-1885.
- Vernade, D., A. Herrera-Estrella, K. Wang and M. Van Montagu. 1988. Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *J. Bacteriol.* **170**: 5822-5829.
- Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton and E.W. Nester. 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**: 225-264.
- Winans, S.C., P. Allenza, S.E. Stachel, K.E. McBride and E.W. Nester. 1987. Characterization of the *virE* operon of the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6. *Nucl. Acid. Res.* **15**: 825-837.
- Winans, S.C., R.A. Kerstetter and E.W. Nester. 1988. Transcriptional regulation of the *virA* and *virG* genes of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**: 4047-4054.

(1991. 12. 2 接受)