

## Runaway Replication Plasmid를 이용한 $\lambda$ Phage $cI_{857}$ Repressor 단백질의 생산 및 정제

강상모\* · 박인숙<sup>1</sup>

건국대학교 공과대학 미생물공학과, <sup>1</sup>배화여자전문대학 식품영양과

### Production and Purification of $\lambda$ Phage $cI_{857}$ Repressor Protein by the Use of a Runaway Replication Plasmid Vector

Kang, Sang-Mo\* and In-Sook Park<sup>1</sup>

Department of Microbial Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Baewha Women's Junior College, Seoul 110-735, Korea

**Abstract** — Runaway replication plasmid pSY35AT was used for the production of  $cI_{857}$  repressor protein. *E. coli* MC1065 having plasmid pSY35AT was shifted from 30°C to 37°C.  $cI_{857}$  repressor protein produced was purified by a modification of the purification method of wild type  $cI$  repressor. The concentration of purified  $cI_{857}$  repressor protein was 0.11 mg/ml. The binding assay of  $cI_{857}$  repressor and right promoter - right operator ( $P_{RO}$ ) labeled with <sup>3</sup>H-CTP was done. Relative activity of purified  $cI_{857}$  repressor was higher about 23 times than that of cell free extract. A higher value of the temperature in the binding assay led to a lower value of the binding activity.

원핵생물에 있어 유전자 발현량은 m-RNA량과 번역효율에 의하여 정해진다. 지금까지 cloning한 유전자를 고 빈도로 발현시키기 위해 많은 연구가 이루어져 왔으나, 통상 연속적으로 고 빈도의 유전자 발현은 cell에 유해할 뿐 아니라 많은 산물을 얻기 위해서 전사의 제어는 대단히 중요한 문제이다. *Escherichia coli*에서는 이 제어를 위하여 *lac* promoter(1-3), *trp* promoter(4-6), *tac* promoter(7, 8),  $\lambda$  phage left promoter( $P_L$ ) 혹은 right promoter( $P_R$ )(9, 10)가 많이 이용되고 있다.

$\lambda$  phage의  $P_L$ 과  $P_R$ 는  $\lambda$  phage의  $cI$  repressor가 결합할 수 있는 operator를 가지고 있으며, 이 operator에 결합할 수 있는 것으로  $cI$  repressor와 이의 변이체인 온도감수성  $cI_{857}$  repressor(11, 12)가 있다.  $cI_{857}$  repressor는 37°C에서 실활이 시작되어 42°C에선 단시간에 완전히 실활되는 것 같다고 한다(13). 이

러한 특성을 이용하여  $cI_{857}$  repressor는  $P_L$  및  $P_R$ 와 함께 배양온도를 37°C 이상으로 상승시켜 유전자 발현을 유도하는 system으로 많이 이용되고 있다(14-18). 또, Ogawa 등(17)은  $cI_{857}$  repressor의 37°C 이상에서의 열 실활은 가역적이라고 생각하였으며, Sugimoto 등의 보고(17)에 의하면 고온(42°C)에서 저온(36°C)으로 온도를 내릴 때 바로 mRNA의 생산이 멈추는 것으로 보아  $cI_{857}$  repressor는 가역적으로 작용하고 있는 것을 알 수 있다. 그러나, 이 온도상승에 의한 유전자 발현은 경험적으로 이용되고 있으며 각 온도에 대한 실활 등  $cI_{857}$  repressor에 대한 상세한 성질은 거의 조사되어 있지 않으며  $cI_{857}$  repressor의 정제도 되어 있지 않다.

Uhlin 등(19, 20), Larsen 등(21), Kundu 등(22)은 plasmid의 copy수 증가를 유도하는 것에 의하여 mRNA의 증가를 유도할 수 있는 runaway replication plasmid를 작성하였다. 이와같이 runaway replication plasmid의 copy수는 배양온도를 상승시킴으로 수 배 혹은 수 백 배로 증가하며, copy수 증가의 초기 단백질

**Key words:**  $cI_{857}$  repressor,  $\lambda$  phage promoter and operator, binding assay, binding activity

\*Corresponding author

합성은 저해를 받지 않는다(23).

본 논문에서는 Kundu 등이 작성한 runaway replication plasmid pSY35AT(22)를 사용하여 plasmid 증폭을 확인 후, 이 plasmid에 실려있는 *cI*<sub>857</sub> repressor protein를 정제하고 이의 결합 활성을 조사하였다.

**재료 및 방법**

**사용균주**

실험에 사용한 균주로는 plasmid pSY35AT의 숙주인 *Escherichia coli* MC1065, plasmid pSY10과 pSY11의 숙주인 *E. coli* RRI이며 이들의 특징은 Table 1에 있다. 그리고 plasmid pSY35AT(22)의 유전자 지도는 Fig. 1에 있다.

**배지 및 배양**

LB배지(1% bacto tryptone, 0.5% bacto-yeast extract, 1% NaCl, pH 7.5)를 모든 실험에 사용하였으며, 전배양에서 plasmid pSY35AT를 갖는 cell은 24시간, 30°C 진탕배양하였다. 본 배양은 100 ml 배지가 든 500 ml용 Sakaguchi flask에 혹은 10l jar 발효조에 1% 접종하고 30°C에서 배양하였다. 이때 O.D.<sub>660</sub> = 0.12~0.15에서 37°C로 온도를 올리고 배양을 6~7시간 계속하였다. 경우에 따라서는 6시간 배양 후 1시

간은 42°C로 다시 온도를 올리고 1시간 배양하였다. 필요시 항생물질은 tetracycline(12.5 µg/ml), kanamycin(30 µg/ml)를 첨가하였다.

***cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 분리 및 정제**

*cI*<sub>857</sub> repressor protein의 정제는 wild type *cI* repressor 정제법(27, 28)을 참고로 수정하여 사용하였다.

**초음파 처리 :** Wet cell을 1.7배 무게의 lysis buffer {100 ml Tris-HCl(pH 8), 200 mM KCl, 1 mM EDTA, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 5% glycerol}에 현탁시키고, 0.001%가 되도록 phenylmethyl sulfonyl fluoride를 첨가하여 초음파 처리를 하였다. 이때 pH 8.0, 온도는 8°C 이하로 유지하였다. 초음파 처리 후 같은 양의 200 mM KCl이 든 standard buffer(SB){10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 5% glycerol}을 첨가하고 13,000×g, 45분간 원심분리한 후 상등액을 얻었다.

**Polyethyleneimine 처리 :** 시료에 10%의 polyethyleneimine(pH 8.0)(29)을 0.6%되도록 천천히 교반하면서 첨가 후, 다시 10분 더 교반하고 6,000×g, 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 침전물을 200 mM KCl이 든 SB에 세정하고, 600 mM KCl이 든 SB를 첨가하여 10분간 교반 후 원심분리하고 상등액을 얻었다.

**Ammonium sulfate 처리 :** 粗 단백질 상등액에 65%가 되도록 ammonium sulfate를 천천히 교반하면서 첨가하였다. 이때 1 N NaOH를 사용하여 pH 8.0으로 유지시켰다. Ammonium sulfate 첨가 후 다시 30분간 교반하고 13,000×g, 45분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 침전물을 50 mM KCl이 든 SB에 녹이고 50 mM

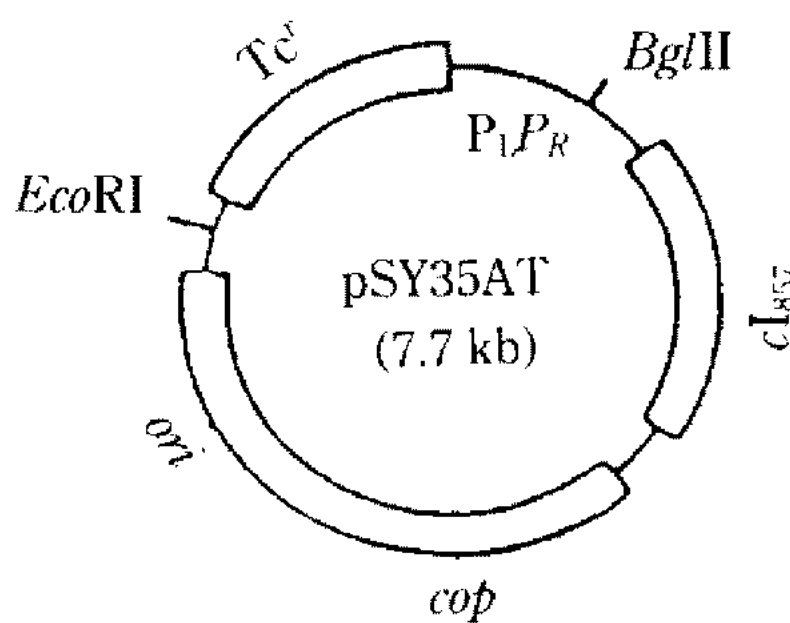


Fig. 1. A map of plasmid pSY35AT.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in the study

Strains/plasmids	Genotypes and characteristics	Sources
MC1065	<i>leuB6, lac74, trpC9830, strA</i>	P.N. Kundu <i>et al.</i> (22)
RRI	<i>hsdS20(r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>), ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44</i>	F. Boliver <i>et al.</i> (24)
pSY35AT	<i>cI</i> <sub>857</sub> , P <sub>L</sub> P <sub>R</sub> , <i>cop</i> , Tc <sup>r</sup>	P.N. Kundu <i>et al.</i> (22)
pSY10	<i>cI</i> <sub>857</sub> , P <sub>R</sub> P <sub>L</sub> - <i>cro-lacZ-cro</i> , Km <sup>r</sup>	S. Sugimoto <i>et al.</i> (17)
pSY11	<i>cI</i> <sub>857</sub> , P <sub>R</sub> , Km <sup>r</sup>	This work

Tc<sup>r</sup> and Km<sup>r</sup> indicate the phenotype of tetracycline and kanamycin resistance, respectively.

KCl이 든 SB에 투석하였다.

**CM-Toyo pearl column chromatography** : 직경 22 mm, 높이 15 mm인 plastic column에 CM-Toyo pearl을 20 ml 채우고 50 mM KCl이 포함된 SB로 평형을 유지시키고, 시료를 넣고 50 mM KCl이 든 SB로 세정하였다. 다음 KCl의 농도를 단계적으로 높은 SB로 용출시켰다. 용출액은 plastic tube에 받았다.

**Hydroxyapatite column chromatography** : 직경 15 mm, 높이 10 mm인 plastic column에 10 ml의 hydroxyapatite를 채우고 0.1 M potassium phosphate (KP) buffer(0.1 M KP, 1.5 mM mercaptoethanol)로 column은 평형을 유지시키고, 시료를 넣고 이 buffer로 세정하였다. 그리고 KP의 농도를 변화시킨 KP buffer로 단계적 용출을 하였다. 얻은 단백질 용액은 200 mM KCl이 든 SB에 투석 후 액체질소에서 동결시켜  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

**단백질 정량** : Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry(30)의 방법에 따라 정량하였다.

**SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)** : Weber와 Osborn(31)의 방법에 따라 실시하였다. 10% gel을 사용하였으며 전기영동 후 CBBR 250으로 염색한 후 7% acetic acid로 탈색하였다. 분자량 marker는  $\alpha$ -lactalbumin(MW : 14,200), soybean trypsin inhibitor(MW : 20,100), trypsinogen(MW : 24,000), bovine erythrocytes carbonic anhydrase(MW : 29,000), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(MW : 36,000), egg albumin(MW : 45,000), bovine albumin(MW : 66,000)를 표준단백질로 사용하였다.

#### Plasmid DNA 분리

Plasmid DNA 분리는 Holmes와 Quiley 방법(25)에 준하였으며, 제한효소에 의한 절단, ligation, 전기영동 등 일반적인 recombinant DNA 조작은 Maniatis 등의 방법(26)에 준하였다. DNA 단편은 agarose gel 전기영동에 의하여 정제하였다.

#### DNA의 end labeling

DNA 단편의 5'말단을 Klenow fragment을 이용, 2분쇄 DNA의 cohesive end에 상보 nucleotide를 첨가하는 방법(26, 27, 32)에 의해 dNTP와  $^3\text{H}$ -CTP로

방사능 labeling을 하였다. 그리고, labeling한 DNA는 phenol 용액으로 추출하였다.

#### Binding assay(28, 33)

$cI_{857}$  repressor를 포함하는 용액을 wash buffer{10 mM Tris-HCl(pH 7), 50 mM KCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 mM EDTA, 5% dimethyl sulfoxide(DMSO)}에 투석하고, 여기에 100  $\mu\text{g/ml}$  되도록 bovine serum albumin, chick blood DNA를 각각 첨가하였다. 이 단백질 용액 200  $\mu\text{l}$ 를 각 온도(30, 35, 37,  $42^{\circ}\text{C}$ )에서 5분간 보온하고  $^3\text{H}$ -CTP로 labeling한 DNA를 assay buffer(wash buffer에 각각 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 bovine serum albumin과 chick blood DNA가 들어있는 용액)로 희석하여 20  $\mu\text{l}$ 의 DNA 용액을 첨가하여 다시 10분간 각 온도에서 보온하고 BA85 nitrocellulose filter(직경 25 mm, Schleicher and Schuell)상에 여과하였다. 같은 온도의 wash buffer로 2회 nitrocellulose filter를 세정하고 filter를 건조 후, toluene-2,5-diphenyloxazole(5 g/l toluene) 용액 중에서 scintillation counter에 의해 filter 위의 방사능을 측정하였다.

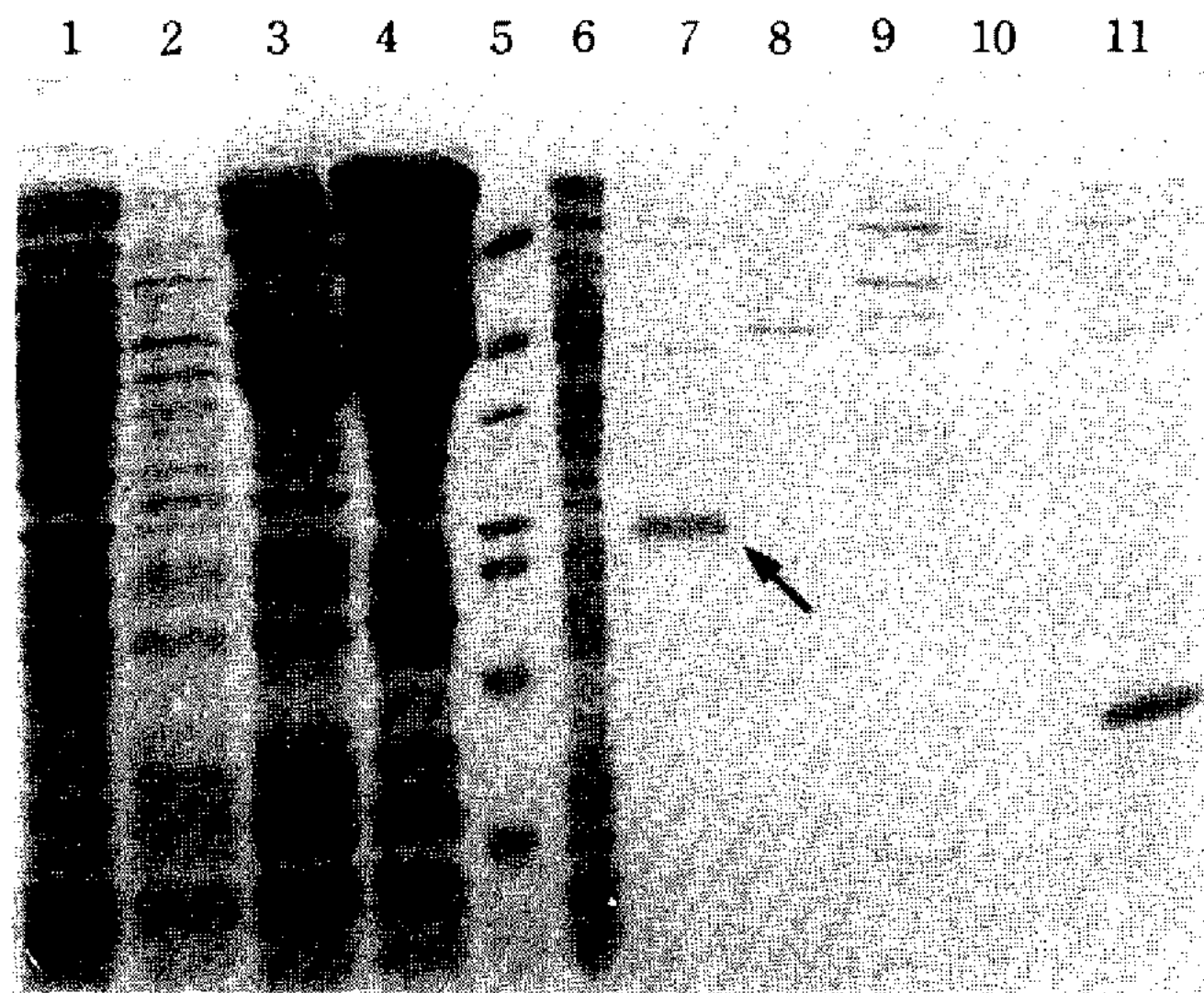
## 결과 및 고찰

#### Plasmid pSY35AT의 amplification

Fig. 1에 있는 plasmid pSY35AT(22)가 runaway replication plasmid로 배양온도를 올리는 것에 의해 plasmid가 수 배로 늘어나는지 확인하였다. pSY35AT를 갖는 MC1065의 cell 증식은  $30^{\circ}\text{C}$ 와  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양온도에 차이없이 같은 속도로 증식하였다. 또한, 배양 중  $\text{O.D.}_{660}=1$ 에서 1 ml을 기준으로 sampling을 하고 plasmid를 추출하여 전기 영동한 결과,  $30^{\circ}\text{C}$  배양시보다  $37^{\circ}\text{C}$  배양에서 cell당 plasmid량이 많은 것을 알았다. 즉,  $37^{\circ}\text{C}$ 에서는 시간에 따라 조금씩 많아지며  $42^{\circ}\text{C}$ 에선  $30^{\circ}\text{C}$ 의 약 5배,  $37^{\circ}\text{C}$ 의 1.5시간 배양한 것에 비하여 약 3배,  $37^{\circ}\text{C}$ 의 6시간 배양한 것에 비하여 약 1.5배로 plasmid량이 늘어난 것을 알 수 있었다.

#### $cI_{857}$ repressor 단백질의 정제

Plasmid pSY35AT를 갖는 MC1065를 7시간 배양 후, 배양액에 얼음을 넣고 온도를 내려 원심분리하고 침전균체를 wild type  $cI$  repressor 단백질 정제법(27,

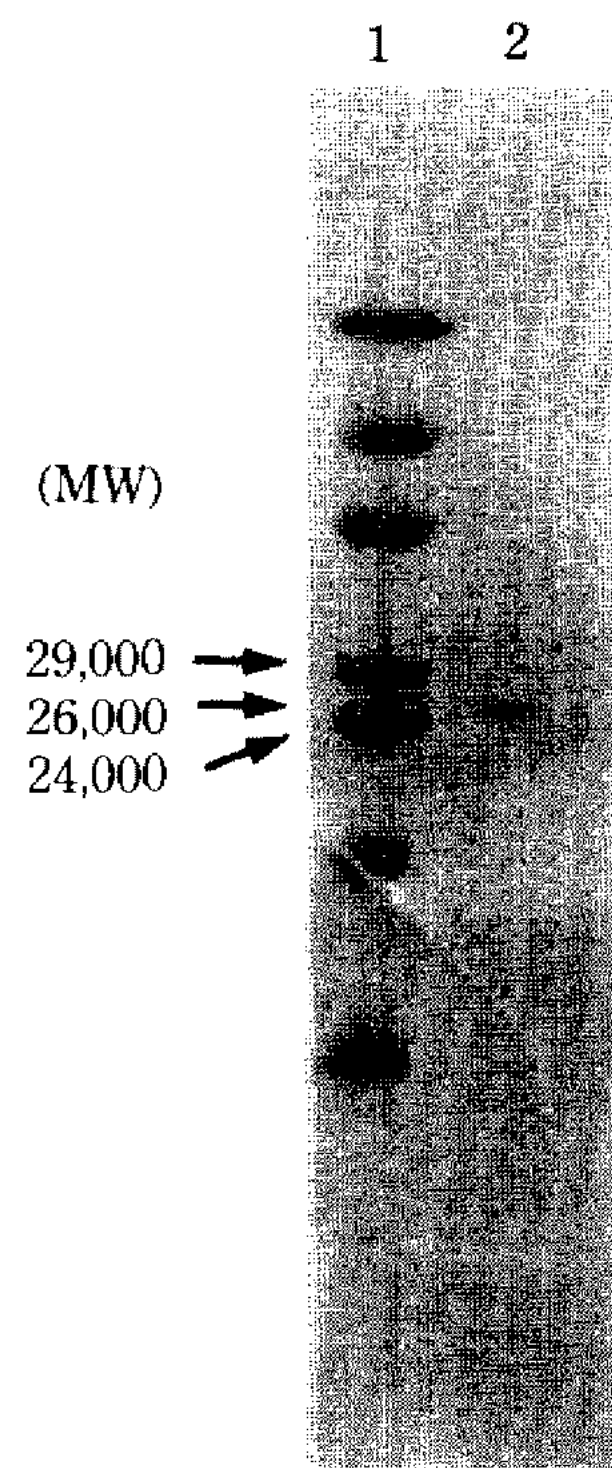


**Fig. 2. SDS-PAGE of the proteins in the purification steps of  $cI_{857}$  repressor protein using *E. coli* MC1065 harbouring plasmid pSY35AT.**

Lane 1: supernatant from the precipitation by polyethyleneimine, lane 2: solution washed with SB plus 0.2 M KCl (the polyethyleneimine pellet), lane 3: supernatant eluted with SB plus 0.6 M KCl (the polyethyleneimine pellet), lane 4: solution after the dialysis of the precipitate by ammonium sulfate, lane 5: markers, lane 6: cell free extract. CM-Toyo pearl column by using SB plus 0.35 M KCl(lane 7), 0.05 M KCl(lane 8), 0.1 M KCl(lane 9), 0.5 M KCl(lane 10) and 0.25 M KCl(lane 11) was eluted.

28)을 수정하여 정제하였다. Wet cell 40g을 초음파 처리하고 원심분리하여 61 mg-protein/ml의 세포질 용액을 약 65 ml 얻었다. 이 용액에 polyethyleneimine을 넣고 600 mM KCl이 든 SB로 polyethyleneimine과 영겨 침전된 침전물로부터 단백질을 녹여 냈다. 여기에 65% ammonium sulfate 처리를 하고 침전물을 투석하였다. 얻어진 粗 단백질 용액을 CM-Toyo pearl column을 이용하여 KCl이 0.05, 0.1, 0.25, 0.35, 0.5 M 각각 든 SB로 단계 용출을 하였다. 각 단계에서 얻은 시료를 KCl을 제거하기 위해 투석하고 SDS-PAGE에 걸어 단백질의 거동을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 0.35 M KCl이 든 SB로 용출시킨 용출액에  $cI_{857}$  repressor에 해당되는 분자량을 가진 단백질이 존재하였으며, 10 ml(0.22 mg protein/ml)의 용출액을 얻었다. 그리고 이 용출액의 일부를 방사능으로 labeling한 DNA와 binding assay를 하는데 사용하였다(Table 2).

한편, polyethyleneimine 처리에서 ammonium sulfate의 처리시까지의 단계에서  $cI_{857}$  repressor 단백



**Fig. 3. SDS-PAGE of purified  $cI_{857}$  repressor protein.** Lane 1: markers, lane 2:  $cI_{857}$  repressor protein

질은 SDS-PAGE에서는 Fig. 2와 같이 알기 어려웠다. 그리고 이들의 sample들과 labeling한 DNA과의 binding assay에서도 시약 등 다른 단백질의 방해로 재현성이 불충분하였다.

CM-Toyo pearl column chromatography로부터 얻은 粗 단백질을 hydroxyapatite column을 이용하여 0.3 M KP buffer로 씻고 0.6 M KP buffer로 용출시켰다. 이때 용출액을 SDS-PAGE에서 본 결과 Fig. 3과 같이 단일 band로 나타나  $cI_{857}$  repressor protein은 정제가 되었다고 판단하였다.  $cI_{857}$  repressor 용출액을 200 mM KCl이 든 SB buffer에 투석하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 정제된  $cI_{857}$  repressor protein은 5 ml(0.11 mg/ml) 얻었다.

**Right promoter-right operator( $P_{RO_R}$ ) DNA 단편 조제**

Plasmid pSY10(17)을 *Bam*HI과 *Bgl*II로 절단 후 3.75 kb의 단편을 agarose gel로부터 분리하고 self ligation하여 얻은 plasmid를 pSY11이라 하였다(Fig. 4). *E. coli* RRI 숙주를 이용 pSY11을 amplification시키고 초원심분리하여 대량으로 얻었다. 정제된 pSY11은 *Hind*III로 절단 후  $P_{RO_R}$ 을 포함하는 0.96 kb



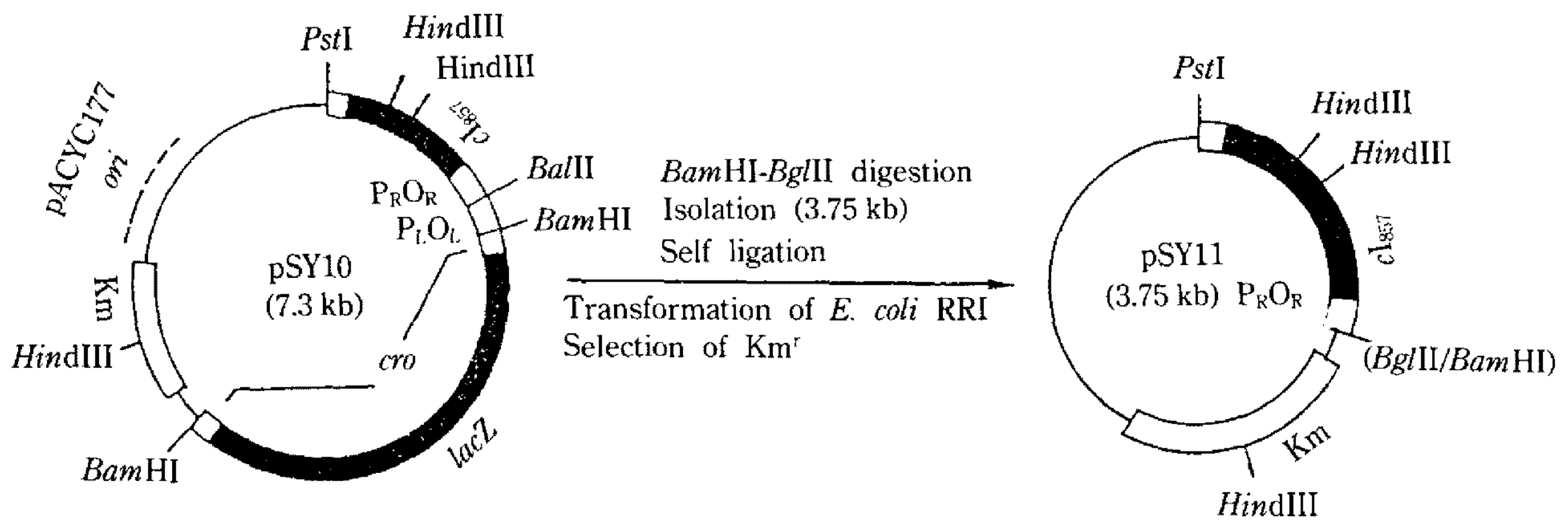


Fig. 4. Construction of plasmid pSY11 harbouring P<sub>R</sub>O<sub>R</sub>.

Table 2. Relative activity of cI<sub>857</sub> repressor during purification steps

Sample	Repressor binding (cpm/mg-protein)
Cell free extract	250
CM-Toyo pearl column chromatography	4,800
Hydroxyapatite column chromatography	5,800

Temperature: 30°C

DNA 단편을 agarose gel로부터 분리하였다. 분리한 DNA 단편의 5'말단을 <sup>3</sup>H-CTP로 방사능 labeling하였다.

#### Binding assay

<sup>3</sup>H-CTP로 방사능 labeling한 P<sub>R</sub>O<sub>R</sub>을 포함하는 0.96 kb의 DNA 단편 20 μl (1 × 10<sup>-11</sup> M, 2 × 10<sup>4</sup> cpm)와 粗 단백질 혹은 정제된 cI<sub>857</sub> repressor 단백질 시료 200 μl (정제된 경우 0.11 mg-protein/ml, repressor 농도, 2 × 10<sup>-7</sup> M)를 혼합하고 30°C, 10분간 보온 후 nitrocellulose filter위의 방사활성을 측정하여 Table 2에 나타내었다. Table 2에 의하면 CM-Toyo pearl column chromatography로부터의 용출액의 repressor 결합력은 cell free extract보다 약 19배, hydroxyapatite column chromatography에 의하여 정제된 repressor 단백질의 결합력은 cell free extract보다 약 23배 높았다.

그리고, 정제된 cI<sub>857</sub> repressor 단백질과 labeling한 DNA 단편과의 binding assay를 각 온도에서 조사하여 Table 3에 나타내었다. Table 3에 의하면 온도가 올라갈수록 결합활성이 떨어지나 37°C 이상에서도 활성을 나타내고 있다. 이것은 *in vitro*계 실험이므로

Table 3. Equilibrium binding of cI<sub>857</sub> repressor to P<sub>R</sub>O<sub>R</sub> at various temperatures

Temperature (°C)	Repressor binding (cpm/mg-protein)
30	5,800
35	2,530
37	1,870
42	310

실제 cell안에서와 같다고는 할 수 없으나, 37°C부터 용균되기 시작하여 42°C에서는 완전히 용균되는 것 같다고 하는 λ phage의 용균실험(13)과 유사성을 나타내고 있다.

Plasmid pSY35AT와 같은 runaway replication plasmid를 이용하여 cell내에서 생산되는 단백질은 SDS-PAGE에서 쉽게 구별할 수 있는 정도로 다량 만들어지는 것 같지는 않다. 이 plasmid pSY35를 이용하여서는 고농도의 cI<sub>857</sub> repressor를 얻을 수 없어 cI<sub>857</sub> repressor의 농도와 온도에 따른 활성을 보기는 어려웠다. 따라서 runaway replication plasmid 보다 강한 promoter, Shine-Dalgarno, cI<sub>857</sub> 구조 유전자를 적당히 배치할 수 있으면 훨씬 더 고농도로 cI<sub>857</sub> repressor를 얻을 수 있으리라 본다.

그 예로 Ptashne 등은 wild type cI repressor 구조유전자를 *tac* promoter에 하류에 붙여 고농도로 생산할 수 있는 plasmid를 만들었다(8).

#### 요 약

Runaway replication plasmid pSY35AT를 이용하

여 이 plasmid가 가지고 있는  $cI_{857}$  repressor를 숙주 MC1065를 이용하여 30°C에서 37°C로 온도를 올려 shift-up법으로 생산하였다.  $cI_{857}$ 은 wild type  $cI$  repressor 정제법을 수정하여 사용하였으며 정제된  $cI_{857}$  repressor 농도는 0.11 mg/ml이었다. 그리고 정제된  $cI_{857}$  repressor와  $^3H$ -CTP로 labeling한  $P_{ROR}$ 과의 결합활성은 cell 파쇄액보다 약 23배 높았으며, 온도가 올라갈수록 결합활성은 떨어졌다.

### 참고문헌

1. Backman, K. and M. Ptashne. 1978. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination *in vitro*. *Cell* **13**: 65-71.
2. Dickson, R.C., J. Abelson, W.M. Barnes and W.S. Reznikoff. 1975. Genetic regulation: the *lac* control region. *Science* **187**: 27-35.
3. Mariani, K.J., R. Wu, J. Stawinski, T. Hozumi and S. Narang. 1976. Cloned synthetic *lac* operator DNA is biologically active. *Nature* **263**: 744-748.
4. Morse, D., R. Mosteller and C. Yanofsky. 1969. Dynamics of synthesis, translation, and degradation of *trp* operon mRNA in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **34**: 725-740.
5. Russell, D.R. and G.N. Bennett. 1982b. Cloning of small DNA fragments containing the *E. coli* tryptophan operon promoter and operator. *Gene* **17**: 9-18.
6. Tacon, W., N. Carey and S. Emtage. 1980. Construction and characterization of plasmid vectors suitable for the expression of all DNA phases under the control of *E. coli trp* promoter. *Mol. Gen. Genet.* **177**: 427-439.
7. Russell, D.R. and G.N. Bennett. 1982. Construction and analysis of *in vivo* activity of *E. coli* promoter hybrids and promoter mutants that alter the -35 to -10 spacing. *Gene* **20**: 231-243.
8. Amann, E., J. Brosius and M. Ptashne. 1983. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**: 167-178.
9. Johnson, A.D., B.J. Meyer and M. Ptashne. 1979. Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the  $\lambda$  phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 5061-5065.
10. Backman, K., M. Ptashne and W. Gilbert. 1976. Construction of plasmids carrying the  $cI$  gene of bacteriophage  $\lambda$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 4174-4178.
11. Attardi, G., S. Naono, J. Rouvière, F. Jacob and F. Gros. 1963. Production of messenger RNA and regulation of protein synthesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**: 363-372.
12. Hecht, M.H., C.M. Helson and R.T. Sauer. 1983. Mutations in  $\lambda$  repressor's amino-terminal domain: implications for protein stability and DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 2676-2680.
13. Sussman, R. and F. Jacob. 1962. Sur un système de répression of thermosensible chez le bactériophage  $\lambda$  d'*Escherichia coli*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris.* **254**: 1517-1519.
14. Tsurimoto, T., T. Hase, H. Matsubara and K. Matsubara. 1982. Bacteriophage lambda initiators: preparation from a strain that overproduces the O and P proteins. *Mol. Gen. Genet.* **187**: 79-86.
15. Remaut, E., P. Stanssens and W. Fiers. 1981. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the  $P_L$  promoter of coliphage lambda. *Gene* **15**: 81-93.
16. Sugimoto, S., M. Yabuta, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi. 1985. Expression of *pheA* gene using  $P_R$ - $P_L$  tandem promoter of bacteriophage lambda. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 336-342.
17. Sugimoto, S., T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi. 1986. Intentional control of gene expression by temperature using the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. *Chem. Eng. Commun.* **45**: 241-253.
18. Sugimoto, S., M. Yabuta, N. Kato, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi. 1987. Hyperproduction of phenylalanine by: application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda. *J. Biotechnol.* **5**: 237-253.
19. Uhlin, B.E., S. Molin, P. Gufstafsson and K. Nordstöm. 1979. Plasmid with temperature-dependent copy number for: amplification of cloned genes and their gene products. *Gene* **6**: 91-106.
20. Uhlin, B.E., V. Schweickart and A.J. Clark. 1983. New runaway-replication-plasmid cloning vectors and suppression of runaway replication by novobiocin. *Gene* **22**: 255-265.
21. Larsen, J.E.L., K. Gerdes, J. Light and S. Molin. 1984. Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* **28**: 45-54.
22. Kundu, P.N., M. Yabuta, S. Sugimoto and H. Taguchi. 1984. Hyperproduction of lambda phage  $cI_{857}$  repressor protein by the use of a runaway-

- replication plasmid vector. *ICME*(Osaka university). **7**: 217-227.
23. Remaut, E., H. Tsao and W. Fiers. 1983. Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. *Gene* **22**: 103-113
  24. Boliver, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
  25. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
  26. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
  27. Nelson, H.C.M. and R.T. Sauer. 1985. Lambda repressor mutations that increase the affinity and specificity of operator binding. *Cell* **42**: 549-558.
  28. Johnson, A.D., C.O. Pabo and R.T. Sauer. 1980. Bacteriophage  $\lambda$  repressor and cro protein: interactions with operator DNA. *Methods Enzymol.* **65**: 844-856.
  29. Sauer, R.T. and R. Anderegg. 1978. Primary structure of the  $\lambda$  repressor. *Biochemistry* **17**: 1093-1100.
  30. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.S. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  31. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
  32. Jacobson, H., H. Klenow and K. Overgaard-Hansen. 1974. The N-terminal amino-acid sequences of DNA polymerase I from *Escherichia coli* and of the large and small fragments obtained by a limited proteolysis. *Eur. J. Biochem.* **45**: 623-627.
  33. Diffley, J.F.X. and B. Stillman. 1988. Purification of a cellular, double-stranded DNA-binding protein required for initiation of adenovirus DNA replication by using a rapid filter-binding assay. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 1363-1373.

(Received November 21, 1991)