

## *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 플라스미드의 *virE* 프로모터내 조절부위의 구조적 특성

陰 眞 星\*·李 在 善·沈 雄 磊

(고려대학교 생물학과, \*목원대학교 미생물학과)

### Structural Characterization of the Regulatory Site in *virE* Promoter of *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 Plasmid

Eum, Jin Seong\*, Jae Seon Lee and Woong Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul and

\*Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon)

#### ABSTRACT

To elucidate the regulatory mechanism of *virE* operon in *Agrobacterium tumefaciens* pTiA6 plasmid at the molecular level, the regulatory site of *virE* promoter was determined using truncated *virE* recombinant plasmids obtained by 5' deletion analysis of *virE* promoter. The size of deleted nucleotides of pJS201, a functional recombinant plasmid, was found to be about 130 nucleotides from 5'-end of *virE* promoter. On the other hand the size of deleted nucleotides of pJS301, non-functional recombinant plasmid, was identified 263 nucleotides by DNA sequencing. Hence it was thought that the essential site of *virE* promoter was located between about 130th nucleotide and 263th nucleotide. Since the inverted repeat sequence (AACTTTGCGCTATAGGCAAAGTT) is included in this essential site of *virE* promoter, it could be the first recognition site of the RNA polymerase in *virE* promoter.

#### 서 론

*Agrobacterium tumefaciens*는 Rhizobiaceae과에 속하는 *Agrobacterium*속내의 4가지 종의 하나로서 병원성의 그람 음성 토양세균이며 대부분의 쌍자엽 식물과 소수의 단자엽 식물의 상처난 부위에서 crown gall tumor를 유발한다(Hernalsteens *et al.*, 1984). 병원성을 나타는 *Agrobacterium tumefaciens*는 분자량이 150 kb~250 kb에 해당하는 매우 큰 Tumor-inducing(Ti) plasmid를 갖는데(Watson *et al.*, 1975), 이 Ti plasmid는 *A. tumefaciens*가 crown gall tumor를 일으키는데 필수적인 역할을 한다(Nester *et al.*, 1984). Crown gall tumor 형성에 있어서 Ti plasmid에는

크게 두 부위가 관여하고 있다. 첫번째 부위는 T-DNA(transferred DNA)로 식물세포의 nuclear genome에 안정하게 삽입되는 부위로서(Chilton *et al.*, 1980) 식물세포내에서 속주 RNA polymerase II를 이용하여 전사 발현될으로써 tumor를 형성한다(Gelvin *et al.*, 1981). T-DNA의 내부에 존재하고 있는 종양유전자는 indoleacetic acid(IAA)와 cytokinin 같은 phytohormone들의 합성에 관여하는 효소들을 생성하기 때문에, *Agrobacterium*에 감염된 식물세포는 어떤 phytohormone들의 첨가 없이도 *in vitro*에서 생장할 수 있는 것이다. 모든 T-DNA는 진핵세포의 것과 유사한 promoter와 polyadenylation site를 갖고 있어서(Gielene *et al.*, 1984) 진핵세포인 식물세포내에서 발현될 수 있다. 즉 원핵세포에 존재하고 있는 T-DNA는 진핵세포로 안정하게 전달되어 발현될 수 있는 부위이다. 또한 모든 T-DNA 양쪽 말단에는 25-base pair로 이루어진 반복서열이 존재하고

있는데, 이는 T-DNA가 식물세포로 전달되는데 중요한 역할을 하고 있다(Slightom *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1984). 최근에는 T-DNA가 염록체 게놈으로 삽입된다는 보고도 있다(De Block *et al.*, 1985). 비록 T-DNA는 식물세포의 게놈내로 안정하게 삽입되어 발현되는 부위이지만 T-DNA의 전달과 식물게놈내로의 통합에는 관여하지 않는다(Leemans *et al.*, 1982). 두번째 부위는 Ti-plasmid내에서 약 35 kb를 차지하고 있는 virulence(*vir*) 지역으로 crown gall tumor 세포내에는 존재하지 않으면서 T-DNA 전달에 관여하는 부위로서 virulence에 매우 중요한 기능을 갖고 있다(Hagiya *et al.*, 1985; Iyer *et al.*, 1982). *vir* 지역에는 6개의 뚜렷한 *vir* operon(*virA*, *virG*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*)이 존재하고 있는데, *virA*, *virB*, *virD*, *virG*의 유전자에 돌연변이가 일어나면 *Agrobacterium*이 식물세포에 형질전환되는 능력이 상실되는 반면 *virC*와 *virE*유전자에 돌연변이가 일어나면 형질전환되는 능력이 크게 제한을 받는다(Stachel and Nester, 1986). 또한 *A. tumefaciens*의 염색체에는 virulence에 관여하는 유전자들이 존재하며(*chvA*, *chvB*, *exoC*) 이들 유전자들은 *Agrobacterium*이 식물세포에 부착하는데 관여한다(Thomashow *et al.*, 1987; Sim *et al.*, 1990). 현재까지 알려진 Ti-plasmid의 *vir* 지역에 의해서 T-DNA가 *A. tumefaciens*로부터 식물세포로 전달되는 과정은 다음과 같이 추측하고 있다. 먼저 *A. tumefaciens*의 염색체 *vir* 유전자(*chvA*, *chvB*, *exoC*)에 의해서 *A. tumefaciens*가 상처난 식물세포에 부착하게 되면 상처난 식물세포에서는 폐활성화합물의 일종인 acetosyringone을 분비하여 *vir* 유전자들의 발현이 유도된다(Stachel *et al.*, 1985). *virA* 유전자는 내막 단백질을 생성하여 acetosyringone을 인지하고 *virG* 산물을 활성화시키며(Leroux *et al.*, 1987) 활성화된 *virG* 산물을 나머지 *virB*, *virC*, *virD*, *virE* 오페론의 전사를 촉진시켜준다(Stachel and Zambryski, 1986a, 1986b). 활성화된 *virD* 산물 중 2개의 open reading frame에서 발현되는 단백질은 부위-특이성 endonuclease 기능을 갖고 있어서 T-DNA를 둘러싸고 있는 25-bp로 이루어진 반복서열내의 특정 부위를 절단시켜 준다(Young and Nester, 1988; Durrenberger *et al.*, 1989). *virC* 산물은 T-DNA의 오른쪽 가장자리 근접 부위에 위치하고 있는 overdrive 부위에 결합하여 T-DNA processing을 촉진시켜 주는 것으로 추측된다(Toro *et al.*, 1988). *virB* 오페론은 11개의 단백질을 생성하며 여러 단백질들이 세균의 막에 존재하고 있는 사실을 근거로 하여(Engstrom *et al.*, 1987), T-DNA가 식물세포로 전달되도록 transmembrane complex를 형성하는 것으로 생각하고 있다(Thompson *et al.*, 1988). *virE* 오페론은 단일가닥 DNA-결합단백질을 생성하여 T-DNA에 결합함으로써 세균이나 식물세포에 존재하고 있는 nuclease로부터 T-DNA를 보호하여, T-DNA가 식물

세포의 염색체에 안정하게 삽입되어서 발현하는데 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추측하고 있다(Zambryski, 1989). Octopine type pTiA6에 존재하는 *virE* 오페론에는 2개의 open reading frame(*virE1*, *virE2*)이 있으며, 각각 7 kDa (*virE1*)과 60.5 kDa(*virE2*)의 단백질을 발현시키는 반면에, nopaline type pTiC58에 존재하는 *virE* 오페론에는 3개의 open reading frame이 있으며, 각각 7.1 kDa, 63.5 kDa, 9 kDa의 단백질을 발현시킨다(Christie *et al.*, 1988; Winans *et al.* 1987; Hirooka *et al.*, 1987).

이와같이 *A. tumefaciens*와 식물세포<sup>외</sup>의 상관관계는 오래전부터 관심의 대상이 되어 왔으며, *vir* 유전자들에 의하여 T-DNA가 식물세포 염색체에 안정하게 삽입되어 발현되는 특성을 이용하여 다른 이질 유전자를 식물체에 형질전환시킬 수 있는 plant vector system을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 *vir* 지역내에 존재하고 있는 각 *vir* 유전자들의 분자적 발현 조절기작에 대해서는 많이 밝혀지고 있으나, *virE* 유전자에 대해서는 밝혀진 것이 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 *virE* promoter의 조절부위에 대하여 연구하였다.

## 재료 및 방법

**균주와 플라스미드.** 본 연구에 사용된 균주와 플라스미드의 종류 및 특성은 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(*Sall*, *HindIII*, *KpnI*, *SphI*), T4 DNA ligase는 New England Biolabs 제품을 사용하였고, cesium chloride, octopine, ethidium bromide, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside(X-Gal), o-nitrophenyl-β-d-galactopyranoside (ONPG), dATP, dCTP, dGTP, dITP, ATP, ampicillin, carbenicillin, rifampicin, RNAase, bovine serum albumin, lysozyme들은 Sigma제품을 사용하였다. Agarose는 BRL 회사제품인 Ultrapure를 사용하였고 DNA sequencing kit는 United States Biochemical 회사제품인 DNA sequencing version 2.0을 사용하였으며, <sup>35</sup>S-dATP는 Amersham 회사로부터 구입하였다.**

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

**재조합 플라스미드 pSE301의 제조.** pJS301을 분리하여 제한효소 *HindIII*와 *KpnI*으로 절단시키고 agarose gel 전기영동을 하여, 약 2.9 kb DNA 절편을 회수하였다. 회수한 DNA를 다시 제한효소 *SphI*으로 처리하고 agarose

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain/Plasmid	Genotype or Characteristics	Source or Reference
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17</i> <i>gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)</i>	Sambrook et al. (1989)
<i>A. tumefaciens</i>		
A136	Rif <sup>r</sup>	Knauf and Nester (1982)
A348	pTiA6/A136	Knauf and Nester (1982)
Plasmid		
pBluescriptSK+	Ap <sup>r</sup>	Sambrook et al. (1989)
pTZ18R	Ap <sup>r</sup>	Winans et al. (1988)
pSM358cd	Km'Car' <i>virB</i> :: Tn3-HoHoI (β-galactosidase activity: 298 U)	Starchel and Zambryski (1986)
pJS201	Km'Car' truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHoI (β-galactosidase activity: 192 U)	Eum et al. (1991)
pJS301	Km'Car' truncated <i>virE</i> :: Tn3-HoHoI (β-galactosidase activity: 15 U)	Eum et al. (1991)
pSE301	Ap <sup>r</sup> pTZ18R into which the truncated <i>virE</i> promoter is inserted	in this study
pHK301	Ap <sup>r</sup> pBluescriptSK into which the truncated <i>virE</i> promoter is inserted	in this study
pHK358cd	Ap <sup>r</sup> pBluescriptSK into which the intact <i>virE</i> promoter is inserted	in this study

gel 전기영동을 하여, 약 1.7 kb DNA 절편을 회수하였다. 회수한 DNA를 제한효소 *Hind*III와 *Sph*I으로 절단한 pTZ18R에 클로닝시켰으며 이를 pSE301로 명명하였다(Fig. 1). 위의 실험을 Sambrook 등(1989)의 방법으로 수행하였다.

재조합 플라스미드 pHK301의 제조. pSE301를 분리하여 재한효소 *Kpn*I과 *Hind*III로 절단시키고 agarose gel 전기영동을 하여, 약 1.7 kb DNA 절편을 agarose gel로부터 회수하였다. 회수한 DNA를 제한효소 *Hind*III와 *Kpn*I으로 절단한 pBluescriptSK+에 클로닝시켰으며 이를 pHK358cd로 명명하였다(Fig. 5).

형질전환 및 형질전환체의 선별. 형질전환은 Hanahan(1985)의 방법을 사용하였으며, 숙주세포로는 *E. coli* JM109를 사용하였다. 형질전환체의 선별방법은 ampicillin(100 µg/ml)이 함유된 LB 배지에 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside(X-Gal)와 Isopropylthio-β-D-galactoside(IPTG)를 도말하여 건조시키고, 형질전환시킨 *E. coli* JM109를 도말하여 12시간 성장시킨 후 생성된 흰색 쿨로니를 선별하였다.

염기서열 결정. DNA 염기서열 결정은 Sanger 등(1977)의 방법을 이용하였다. pHK301에 의해 형질전환된 *E. coli* JM109를 ampicillin 150 µg/ml이 함유된 2×YT 배지 3 ml에 접종하여 660 nm에서 흡광도가 0.5~0.8될 때까지 진탕배양하였다. 진탕배양한 균 2 ml에 helper phage M13

K07(2×10<sup>11</sup> pfu/ml) 100 µl를 접종하여 37°C에서 1시간동안 활발하게 진탕배양(×300 rpm)시키고, 이 배양액 2 ml를 kanamycin 70 µg/ml이 함유된 50 ml 2×YT 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 활발하게 진탕배양(×300 rpm)시켰다. 12,000×g에서 20분간 원심분리하여 균체를 완전히 제거시키고 상등액에 PEG 용액(20% polyethyleneglycol 6000 in 3.5 M NaCl)을 1/4 volume 첨가하여 잘 섞어주고 0°C에서 12시간 보관하였다. 11,000×g에서 30분간 원심분리하여 DNA를 침전시키고 TES 완충용액(20 mM Tris·Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl)으로 용해시켰다. 용해된 DNA 용액을 phenol/chloroform(1:1)으로 2번 처리하고 chloroform/isoamylalcohol(24:1)로 처리한 후 1/10 volume의 3 M sodium acetate(pH 7.0)와 2 volume의 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 단일가닥 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70% 에탄올로 3번 세척하여 냉동전조시킨 다음, 다시 TE 완충용액(10 mM Tris·Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA) 15 µl로 용해시킨 후 spectrophotometer를 사용하여 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하고 정제된 단일가닥 DNA의 농도와 순도를 계산하였다. DNA 염기서열 결정을 위한 반응에 사용되는 효소와 용액은 Unites States Biochemical 회사 제품인 DNA sequenase version 2.0 kit를 사용하였으며 primer는 17개의 염기로 된 M13 universal primer(5'-GTAAACGACCACT-3')를 사용하였다. 단일가

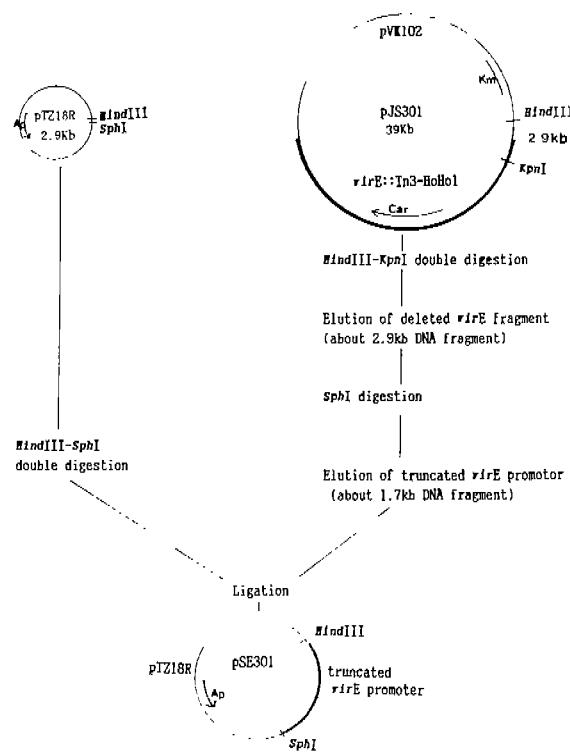


Fig. 1. Scheme for the construction of recombinant plasmid pSE301. The symbols used are: Ap, Ampicillin resistance; Km, Kanamycin resistance; Car, Carbenicillin resistance.

약 DNA 2  $\mu$ g, M13 universal primer 1.5  $\mu$ l, sequencing buffer 2  $\mu$ l를 첨가하고 distilled water를 사용하여 최종 10  $\mu$ l로 되게 하고 65°C에서 2분간 가열한 후 35°C로 천천히 식히면서 annealing 시켰다. Annealing된 DNA 혼합물에 0.1 M DTT, labeling mixture, [ $^{35}$ S] dATP, sequenase를 섞어 32°C에서 5분간 반응시켰다. Labeling 반응이 끝난 후, 먼저 준비해 둔 각각의 termination mixture가 들어가 있는 4종류의 eppendorf tube(G, A, T, C)에 반응물을 혼합하고 37°C에서 5분간 반응시켜서 염기종결(chain termination)을 유도하였으며 stop solution를 각각 첨가하여 반응을 중지시켰다. 염기서열 결정을 위한 전기영동 gel은 8% acrylamide-urea gel(15 cm  $\times$  60 cm)을 사용하였으며, labeling시킨 반응물들을 75°C에서 2분간 가열하고 즉시 염기 T, C, G, A순으로 loading하여 40 mA로 6시간 전기 영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 30분간 전기영동 gel을 식혀준 후 Whatman 3 MM filter paper 위에 polyacrylamide gel을 놓고 gel dryer(Bio-Rad)로 70°C에서 1시간 진공건조시켰다. 건조된 gel 위에 X-ray film(Agfa)을 올려 놓고 cassette에 넣어서 실온에서 4일동안 autoradiography

하였다.

## 결과 및 고찰

염기서열 결정을 위한 virE promoter의 클로닝. pJS 301(Table 1)은 BAL31으로 30분 동안 처리하여 일부분 제거된 truncated virE : Tn3-HoHo1(Stachel et al., 1985) 절편을 pVK102의 SalI 부위에 클로닝시킨 플라스미드로서, truncated virE promoter에 의해서 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 활성도는 15 unit이며 이는 virE promoter의 활성이 상실된 truncated virE 재조합 플라스미드이다. pJS301을 전기영동법을 이용하여 조사한 결과 약 250개의 염기들이 제거된 것으로 측정되었다(Eum et al., 1991). 따라서 pJS 301에서 제거된 virE promoter 부위가 virE 오퍼론의 기능에 중요한 역할을 하는 부위로 사료되어 정확하게 몇개의 염기들이 제거되었는지를 알아보기 위하여 DNA 염기서열을 결정하였다. pJS301에서 truncated virE promoter가 존재하는 부위의 양쪽 제한효소 부위는 HindIII와 SphI이지만 sequencing vector로 사용하는 pBluescriptSK+에는 제한효소 SphI 부위가 없기 때문에, 먼저 pTZ18R을 vector로 사용하여 HindIII와 SphI 제한효소부위에 truncated virE promoter DNA 절편을 클로닝시켰다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 pJS301을 제한효소 HindIII와 KpnI으로 절단시켰을 때, 분리되는 약 2.9 kb DNA 절편에는 truncated virE promoter와 virE 구조유전자가 포함되어 있다. 따라서 virE promoter 부위만을 분리하기 위하여, 약 2.9 kb DNA 절편을 다시 제한효소 SphI으로 절단하여 전기영동하였다 (Fig. 3, Lane 2). SphI으로 절단된 DNA 절편중, 약 1.2 kb DNA 절편은 virE 구조유전자가 존재하는 부위이며, 약 1.7 kb DNA 절편은 pVK102 일부와 truncated virE promoter가 존재하고 있는 부위로서 양쪽 말단의 제한효소 부위는 HindIII와 SphI이다. 따라서 약 1.7 kb DNA 절편을 agarose gel로부터 회수하였으며 제한효소 HindIII와 SphI으로 절단한 pTZ18R에 클로닝하여 pSE301로 명명하였다(Fig. 4). pSE301에는 M13 universal primer(5'-GTAAAACGACGGCCGT-3')와 annealing 되는 부위가 존재하지 않기 때문에 pSE301로부터 truncated virE promoter를 다시 분리하여 pBluescriptSK+에 클로닝하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 pSE301을 제한효소 KpnI과 HindIII로 절단하였을 때, 분리되는 약 1.7 kb DNA 절편은 pVK102 일부와 truncated virE promoter가 존재하는 부위이며, 이 1.7 kb DNA 절편을 제한효소 HindIII와 KpnI으로 절단한 pBluescriptSK+에 클로닝하여 pHK301로 명명하였다(Fig. 7, Lane 1). 또한 pSM358cd로부터 이와 같은 방법으로 완전한 virE promoter DNA 절편을 제한효소 KpnI과 HindIII로 절단된 pBluescriptSK+에 클로-

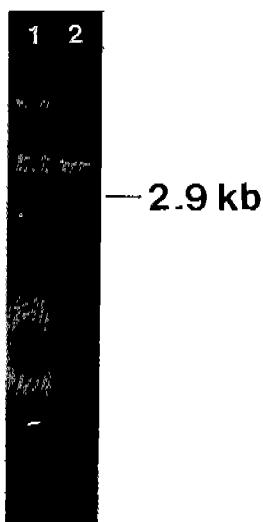


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pSE301 digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: pJS301 digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 2: 1 kb ladder. The DNA fragment of about 2.9 kb contains truncated *virE* promoter.

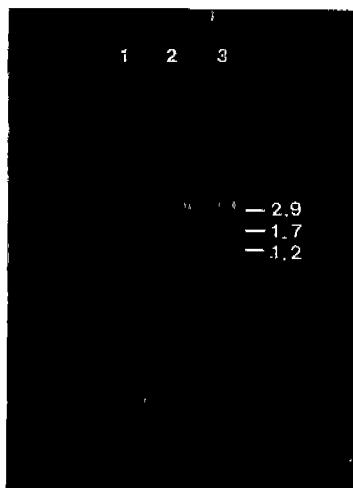


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of deleted *virE* fragment (which is from pSE301 digested with *Hind*III and *Kpn*I) digested with *Sph*I. Lane 1: 1 kb ladder. Lane 2: deleted *virE* fragment digested with *Sph*I. Lane 3: undigested deleted *virE* fragment.

넣시킨 재조합 플라스미드를 pHK358cd로 명명하였다(Fig. 7, Lane 2).

pJS301내 *virE* promoter의 염기서열 결정. Truncated *virE* promoter DNA 절편을 블로넣시킨 pHK301과 대조구로서 완전한 *virE* promoter DNA 절편을 블로넣시킨

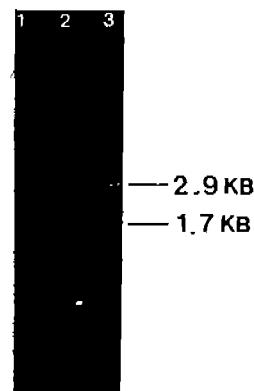


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pSE301 digested with *Hind*III and *Sph*I. Lane 1: 1 kb ladder. Lane 2: undigested pSE301. Lane 3: pSE301 digested with *Hind*III and *Sph*I.

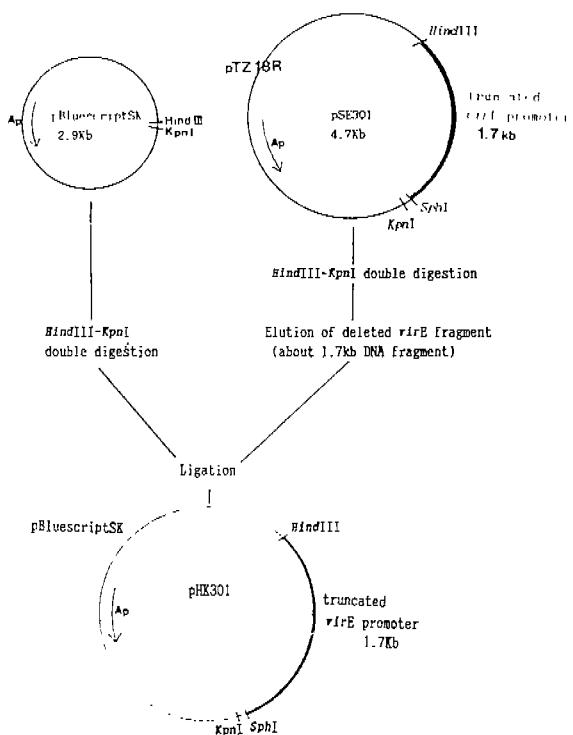


Fig. 5. Scheme for the construction of recombinant plasmid pHK301. The symbol used is: Ap, Ampicillin resistance.

pHK358cd의 염기서열을 같이 분석하였다(Fig. 8). Fig. 8의 결과를 근거로 하여 Fig. 9에서 보는 바와 같이 pHK301의 경우, *virE1* open reading frame의 해독 시작부위인 ATG에서 시작하여 *virE* promoter의 5'-말단 방향으로 120

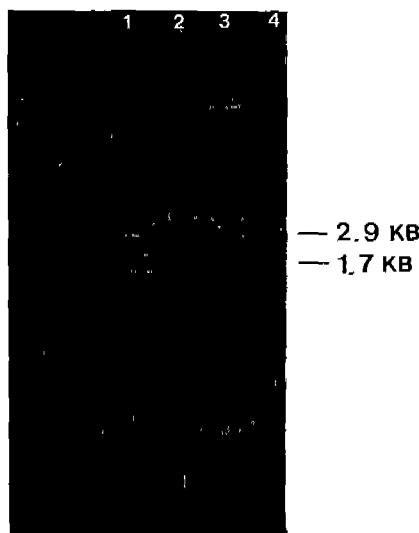


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pSE301 digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: 1 kb ladder. Lane 2: undigested pSE301. Lane 3: pJE301 digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 4: 1 kb ladder.



Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pHK301 and pHK358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 1: pHK301 digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 2: pHK358cd digested with *Hind*III and *Kpn*I. Lane 3: 1 kb ladder.

변째부터 129번쨰 까지의 염기서열은 CGACCCGGCCCC인 반면에 pHK358cd의 경우에는 CGACCCCACTT이다. 즉 ATG에서부터 124번쨰 까지는 동질성을 보이다가 125번쨰 염기부터는 서로 다른 염기서열을 보였고, 이를 근거로 하여 pHK301은 *virE1* open reading frame의 해독 시작 부위(ATG)에서 시작하여 125번쨰부터 그 이후에 존재하는 *virE* promoter 5'-말단방향의 염기들이 모두 제거된 것을 알 수 있었다. 또한 Winans 등(1987)의 연구에서는 *virE* promoter의 염기서열에 있어서 다른 *vir* 유전자와 promoter에는 존재하지 않는 23개의 염기들로 구성된 역반복서열이 존재하고 있다고 밝혔으며, 본 연구에서 제조합풀라스미드인 pHK358cd의 염기서열에서도 이 역반복서열이 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 8).

*virE* promoter의 구조적 특징. Winans 등(1987)의 연구에서 밝혀진 완전한 *virE* promoter의 염기서열을 Fig. 9에 표시하였다. *virE1* open reading frame의 해독 시작 부위인 ATG에서부터 *virE* promoter의 5'-말단 방향으로 125번쨰의 염기(C)는 *virE* promoter의 5'-말단 최초염기(G)부터 시작하여 3'-말단 방향으로 263번쨰의 염기에 해당된다. 따라서 pHK301은 *virE* promoter의 5'-말단에서부터 시작하여 263개의 염기들이 제거된 제조합풀라스미드임을 알 수 있었다. 한편 pJS201(Table 1)은 BAL31으로 20분 동안 처리하여 일부분 제거된 truncated *virE* :: Tn3-HoHoI (Stachel et al., 1985) 절편을 pVK102의 *Sal*I부위에 클로닝 시킨 풀라스미드이다. Table 1에서 보는 바와 같이 pJS201

에 존재하는 truncated *virE* promoter에 의해서 발현되는  $\beta$ -galactosidase의 활성도는 192 unit로서, pJS201은 *virE* promoter의 활성이 존재하는 truncated *virE* 재조합풀라스미드이다. pJS201은 전기영동법을 이용하여 조사한 결과, *virE* promoter의 5'-말단에서부터 약 130개의 염기들이 제거된 것으로 측정되었다(Eum et al., 1991). 그러므로 *virE* promoter의 활성이 존재하는 pJS201과 그 활성을 상실한 pJS301은 완전한 *virE* promoter의 5'-말단으로부터 각각 약 130 bp와 263 bp가 제거되었기 때문에, 약 130번쨰의 염기부터 263번쨰의 염기까지가 *virE* promoter의 활성에 있어서 중요한 조절부위로 사료된다. 한편 완전한 *virE* promoter DNA 절편이 클로닝된 pHK358cd의 염기서열은 Winans 등(1987)의 연구에서 밝혀진 *virE* promoter의 염기서열과 동일한 양상을 나타냈으며, *virE* promoter의 5'-말단에서 시작하여 135번쨰 염기부터 157번쨰 염기까지 23개의 염기들이 역반복서열(AACTTTGCCCTATAGGCA-AAGTT)로 존재하는 것을 확인하였다. 본 연구에서 *virE* promoter의 기능에 있어서 중요한 조절부위라고 생각되어 어지는 부위내에 역반복서열들이 포함되어 있는 사실로 비추어 볼 때, 23개의 염기로 이루어진 역반복서열부위가 *virE* operon의 발현에 있어서 RNA polymerase의 최초 인식부위(recognition site)일 것으로 사료된다.

## 적  요

식물세포에 tumor를 유발하는 *Agrobacterium tumefaciens*

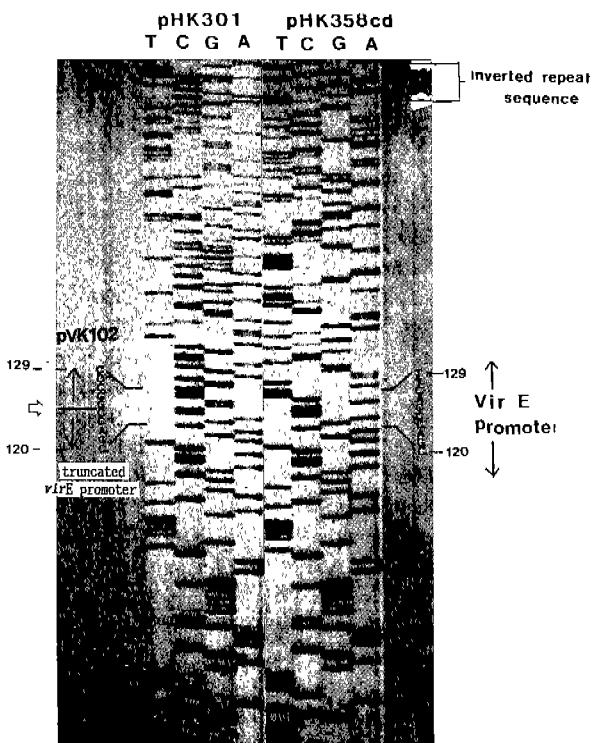


Fig. 8. Autoradiogram of sequencing gel showing the truncated *virE* promoter in pHK301 and intact *virE* in pHK358cd. An arrow ( $\Rightarrow$ ) indicates the deletion-point of the truncated *virE* promoter in pHK301 as compared with the nucleotide sequence of intact *virE* promoter in pHK358cd. The number was indicated from the translational initiation codon (ATG) of *virE1* open reading frame. Inverted repeat sequence in pHK358cd was identified.

*cians* pTiA6 plasmid에서 *virE* 유전자의 발현조절기작을 분자적수준에서 규명하기 위하여 *virE* promoter의 5'-말단을 제거하여 얻은 truncated *virE* 재조합플라스미드를 이용하여 *virE* promoter의 조절부위에 대하여 연구하였다.

*virE* promoter의 기능이 존재하는 truncated *virE* 재조합플라스미드인 pJS201은 전기영동에 의하여 *virE* promoter의 5'-말단으로부터 약 130개의 염기가 제거된 것으로 측정되었다. 한편 *virE* promoter의 기능을 상실한 pJS301에서 dideoxy chain termination방법으로 truncated *virE* promoter 염기서열을 결정한 결과 263개의 염기가 제거된 것으로 확인되었다. 따라서 *virE* promoter의 조절부위는 *virE* promoter의 5'-말단으로부터 약 130번째의 염기에서 263번째의 염기사이에 존재하는 것으로 사료되며, 이 사이에 23개의 염기로 이루어진 역반복서열(AACTTTGCGC-TATAGGCAAAGTT)이 존재하고 있는데, 이 부위가 *virE*



Fig. 9. Nucleotide sequence of *virE* promoter (Winans et al., 1987). The size of deleted nucleotides of truncated *virE* promoter in pHK301 was 263 nucleotides from 5'-end *virE* promoter. Inverted repeat sequence (135~157) and translation initiation codon (ATG) were indicated by box. *SphI* site used for the construction of truncated *virE* recombinant plasmid was underlined.

operon의 발현에 있어서 RNA polymerase의 최초 인식부위(recognition site)일 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA plasmid. *Nucl. Acids 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. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2693-2697.
- Christie, P.J., J.E. Ward, S.C. Winan and F.W. Nester. 1988. The *Agrobacterium tumefaciens* *virE2* gene product is a single-stranded-DNA-binding protein that associated with T-DNA. *J. Bacterial.* 170: 2659-2667.
- De Block, M., J. Schell and M. Van Montagu. 1985. Chloroplast transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 4: 1367-1372.

- Durrenberger, F., A. Crammeri, B. Hohn and Z. Koukolilova-Nicola. 1989. Covalently bound *virD2* protein of *Agrobacterium tumefaciens* protects the T-DNA from exonucleaseolytic 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.
- Eum, J.S., S.T. Chung, C.S. An and W.S. Sim. 1991. Activity of *virE* promoter in *Agrobacterium tumefaciens* A348. *Korean J. Bot.* **34**: 331-339.
- Gelvin, S.B., M.P. Gordon, E.W. Nester and A.I. Aronson. 1981. Transcription of *Agrobacterium* Ti plasmid in the bacterium and in crown gall tumors. *Plasmid* **6**: 17-29.
- Gielien, J., M. De Beukelaer, J. Seurinck, F. De boeck, H. De Greve, M. Lemmers, M. Van Montagu and J. Schell. 1984. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* **3**: 838-846.
- 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.
- Hanahan, D. 1985. Technique for transformation of *E. coli*. In, DNA Cloning: A practical approach, D.M. Glover (ed.), Vol. 1, IRL Press, Oxford. 109 pp.
- Hernalsteens, J.P., L. Thia-Toong, J. Schell, M. Van Montagu. 1984. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis*. *EMBO J.* **3**: 3039-3041.
- Hirooka, T., P.M. Rogowsky and C.I. Kado. 1987. Characterization of the *virE* locus of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* **168**: 1529-1536.
- Iyer, V.N., H.J. Klee and E.W. Nester. 1982. Units of genetic expression in the virulence region of a plant tumor-inducing plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **188**: 418-424.
- Leemans, J., R. Deblaere, L. Willmitzer, H. De Greve and J. P. Hernalsteens. 1982. Genetic identification of functions of TL-DNA transcripts in octopine crown gall. *EMBO J.* **1**: 147-152.
- 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.
- Nester, E.W., M.P. Gordon, R.M. Amasino and M.F. Yanofsky. 1984. Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 387-413.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd). Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Sim, W.S., G.A. Cangeli and E.W. Nester. 1990. The study on the transformation and growth regulation of higher plants: cloning of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Kor. J. Bacteriol.* **28**: 104-108.
- Slightom, J.L., M. Durand-Tardif, L. Jouanin and D. Tepfer. 1986. Nucleotide sequence analysis of TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open-reading frames. *J. Biol. Chem.* **261**: 108-121.
- 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., E.W. Nester and P.C. Zambryski. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 379-383.
- Stachel, S.E., G. An, C. Flores and E.W. Nester. 1985. A *Tn3 lacZ* transposon for the random generation  $\beta$ -galactosidase gene fusions: application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *EMBO J.* **4**: 891-898.
- 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.
- Thomashow, M.F., J.E. Karlensey, J.R. Marks and R.E. Hurlbert. 1987. Identification of a new virulence locus in *Agrobacterium tumefaciens* that affects polysaccharide composition and plant cell attachment. *J. Bacteriol.* **169**: 3209-3216.
- Thompson, D.V., L.S. Melchers, K.B. Idler, R.A. Schiperoort and P.J.J. Hooykaas. 1988. Analysis of the complete nucleotide sequence of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon. *Nucl. Acids 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.
- Wang, K., L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu and P. Zambryski. 1984. Right 25bp terminus sequence of the no-

- paline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* **38**: 455-462.
- 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. Acids Res.* **15**: 825-837.
- Young, C. and E.W. Nester. 1988. Association of the *virD2* protein with the 5'-end of T strands in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**: 3367-3374.
- Zambryski, P. 1989. *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer. In, Mobile DNA, D. Berg and M. Howe (ed.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 309-333.  
(1992. 5. 4 接受)