Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 3, 229-238 (1993)

대장균의 전사조절 유전자 *nlp*의 분자기구 해석

최용락* · 정수열[1] · 정영기[2] · 정정한
동아대학교 농화학과, [1]동주여자전문대학 식품영양학과,
[2]동의대학교 미생물학과

Analysis of the Molecular Mechanism of *nlp* Gene Involved in Transcriptional Regulation in *Escherichia coli*

Choi, Yong-Lark*, Soo-Yeol Chung[1], Yong-Kee Jeong[2] and Chung-Han Chung
Department of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
[1]Department of Food Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-080, Korea
[2]Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract — An *nlp* (Ner like protein) gene from *E. coli* was previously cloned and sequenced. Here we show that expression of the sugar metabolism related genes, *lacZ*, *malQ* and *malP*, increased 2.5- to 8.3-fold in the presence of a plasmid containing the *nlp* gene. This suggested that the *nlp* gene could induce maltose- and lactose-metabolism coordinately with *crp*1* in the absence of cAMP. Using the *nlp-lacZ* fusion gene, it was possible to show the promoter of *nlp* was active *in vivo*. The overexpressed *nlp* gene product, a polypeptide of 10,000 daltons, was confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The band shift assay revealed that the partially purified Nlp protein bound a specific DNA of the regulatory region of the *nlp* gene.

대장균의 전사조절에 관여하는 인자로는 promoter를 인식하여 결합하는 RNA polymerase의 Sigma 인자, *lac* repressor(1), phage repressors(2), LexA 단백질(3) 등의 특정 DNA 영역을 인식하여 결합하는 것들이 잘 알려져 있다. 최근 대장균의 당대사계에 관여하는 수많은 유전자의 전사를 조절하는 단백질인 Crp에 변이가 도입된 *crp** 유전자가 얻어졌는데, 이는 cAMP의 비존재상태에서 몇몇 당대사의 촉진및 발현 유도가 특이하다(4-8).

한편, 최 등은 *crp** 변이를 이용하여 얻어낸 유전자중 *sfs1*과 *nlp*의 구조해석을 하였으며(9, 10), *nlp* 유전자는 박테리오파지 Mu와 D108의 전사조절 유전자로 알려진 *ner* 유전자와는 단백질 수준에서 61% 정도의 높은 상동성을 가지며 대장균 염색체상의 69.3분에 위치한다(9).

Phage Mu는 용원성 phage로서 transposon에 필수적인 *A*와 *B* 유전자가 존재한다. 이들 유전자의 발현정도에 따라 용원화가 제어되어지며, 이 두 유전자는 전사 조절 단백질의 억제인자에 의하여 발현이 조절되어진다. 그런데 억제인자를 생산하는 *C* 유전자는 Ner 단백질에 의하여 전사제어가 일어난다(11, 12). 또한 이들 두 조절 단백질은 자기 유전자의 전사제어도 행하는 것으로 알려져 있다(13). *nlp* 유전자의 1차 구조를 해석한 결과, 91개의 아미노산 잔기를 coding하며(약 10 Kda) 전사조절 단백질에 잘 보존되어 있는 DNA와의 결합 영역이 C-말단 부위에 존재하여 전사 조절기능을 보유할 것으로 보였으나, 주된 기능은 아직 명확히 밝혀지지 않았다. 그렇지만 *nlp* 유전자가 몇종의 당 이용 촉진에 관여함은 분명하다.

Kukoli 등(14)은 정제된 Ner 단백질이 특이한 12 bp의 DNA영역(5'-ANPyTAPuCTAAGT-3')에 결합함으로서 전사조절에 관여한다는 것을 DNase I foot printing 방법으로 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 *nlp* 유전자가 어떠한 당대사 관련 유전자의 발현조절에 관여함을 조사하여 그들

Key words: *nlp* gene, *nlp-lacZ* fusion plasmid, gene expression, DNA-binding protein, *Escherichia coli*
*Corresponding Author

유전자의 발현조절 기능을 밝혀보고 *nlp* 유전자의 기능을 밝혀보고자 대량 발현 조건을 확립하여 단백질을 정제하여 조절영역의 DNA와의 결합성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 플라스미드

본 실험에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 최소 배지(M9)와 LB배지에서 호기적 조건으로 배양하였다. 플라스미드가 도입된 균주는 Ampicillin(50 μg/ml)를 첨가하여 배양하였다.

사용 시약

제한효소, Klenow fragment, DNA ligation kit, T_4 DNA ligase 등은 Takara shuzo사와 Pharmacia사의 제품을 사용하였다. Anti-β-galactosidase 와 Horseradish peroxidase(HRPO)는 Promega사 제품을, IPTG, X-gal, glucose-B test kit는 Wako사 제품을, Shephadex G-75는 Pharmacia사의 제품을 사용하였으며, 그 밖에 사용한 모든 시약은 Sigma사 또는 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다.

재조합 DNA techniques

Plasmid DNA 조제, 제한효소 처리, 형질 전환, agarose gel의 전기영동 및 기타 재조합 DNA technique는 표준 방법을 사용하였다(19). Plasmid DNA는 CsCl에 의한 초원심 분리법으로 정제하여 사용하였다. 특정 DNA의 단편의 조제는 제한효소로 절단하여서 0.6% Low melting agarose 또는 4.5% Polyacrylamide gel 전기영동을 하여 원하는 단편을 회수 정제하여 사용하였다.

효소 활성 측정

β-galactosidase 활성은 0.2% casamino acids와 50 μg/ml Ampicillin을 첨가한 M9 배지에서 배양된 균주에서 조단백을 추출하여 Miller의 방법(20)으로 측정하였다.

Amylomaltase와 maltodextrin phosphorylase 측정을 위하여 세균을 1% maltose와 0.2% casamino acids와 50 μg/ml의 Ampicillin을 첨가한 M9 배지에서 배양하였으며, Amylomaltase는 Wiesmeyer와 Cohn의 방법(21), maltodextrin phosphorylase는 Helmreich와 Cori의 방법(22)에 준하여 각각 glucose와 glucose-1-P가 생성되어지는 양을 spectrophotometer로서 정량하였으며, crude extract에서 glucose의 정량은 Sharp의 방법(23)에 의하여 생성된 양을 Wako사의 glucose-B-test kit을 사용하여 측정하였다.

Immunoblot analysis

LB 배지에서 배양된 균체를 0.5% Triton X-100을 함유한 25 mM sodium phosphate buffer(pH 7.5)로 세척한 후, 4℃에서 30초씩 3회 sonication시켰다. 35,000×g에서 20분간 원심분리하여 cell debris를

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strains	Genotype	Source
Strains		
MC4100	*araD 139, lac(IPOZYA), StrA, thi*	(15)
MK1010	W3110, *cya::km*	(10)
MK2001	W3110, *cya::km, crp*1*	(10)
TP2010	*xyl, cya, argH, lacX74, recA, ilv, Srl::Tn10*	(6)
TP2139	*xyl, ilvA, argH, lacX74, crp*	(6)
JM109	*recA1, lac-pro, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17 supE44, relA1, F'traD36, proAB, lacIq-ZM15*	(16)
Plasmids		
pKK223-4	Amp^r, *tacP*, *Bam*HI site (*tet* region) of pKK223-3 is disrupted	(17)
pMC1403	*lacZ* (8 amino acids and promoter region is disrupted), Amp^r	(18)
pPC23	*nlp*, Amp^r	(9)

제거시킨 상등액을 단백질 시료로 사용하였다. 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동의 Laemmli의 방법(24)으로 하여, Tobwin등의 방법(25)으로 Biodyne A nylon membrane 필터에 blotting 하였다. 1차 antibody 인 anti-β-galactosidase(0.2～1 μg/ml)를 반응시킨 후, 2차 antibody인 HRPO-IgG conjugate(0.2～1 μg/ml)를 반응시켜서 PBS(10 mM KH_2PO_4, 150 mM NaCl, pH 7.2)로서 세척한 후 발색시켰다.

Nlp 단백질의 정제

단백질의 정제를 위한 조단백질의 추출은 plasmid pXA5를 도입한 *E. coli* MK2001 균주에서 *tac* promoter의 조절과 IPTG의 유도하에서 대량 발현시킨 후 sample로서 사용하였다. 모든 정제 과정은 별도 언급이 없는 한 4℃에서 멸균된 buffer와 기구를 사용하였다. LB broth에서 1 mM IPTG와 Ampicillin(50 μg/ml)를 넣고 배양한 균을 4℃에서 15분간 4000×g의 조건으로 원심분리하여 집균하였다. 집균된 세포는 buffer A[10 mM Tris-HCl(pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM 2-mercaptoethanol]로서 1회 세척한 후 현탁시켜서 4℃로 20분간 원심분리하여 상등액을 crude extract로서 사용하였다. Crude extract를 40% 유안 침전을 하여 상등액을 투석시킨 후 그대로 Sephadex G-75 column(1.5×40 cm column)에 loading하여 동일 buffer로서 용출하였다. 계속하여 300 ml 정도의 동일 buffer로서 용출하면서 2 ml씩의 분획을 수집하여 각 분획을 SPS-polyacrylamide gel 전기영동을 하여 대량 발현된 band 부근의 분획을 확인하고 다시 Sephadex G-75 column으로 정제를 반복하여 얻어진 분획중 전기 영동상 Nlp와 크기가 같은 분획을 DNA와의 결합용 단백질로 사용하였다.

조절 영역 DNA와 단백질과의 결합

단백질과의 결합 시험에 사용한 buffer 조성액은 Tolias와 DuBow의 방법 (13)과 Garner와 Revzin(26)의 방법을 약간 수정하였으며 다음과 같다 : 0.02 M Tris(pH 8 at 22℃), 0.003 M $MgCl_2$, 0.0001 M Na_2 EGTA, 0.0001 M dithiothreitol, 0.1 M KCl and 5% glycerol. *nlp* 유전자 조절 영역을 포함하는 DNA 단편은 plasmid pX1의 *Mlu*I-*Afl*II 334 bp 단편을 4.5% polyacrylamide gel 전기영동에 의한 회수 방법으로 준비하였다. DNA와 단백질과의 결합에 의한 band shift assay를 위하여는 0.25 μM의 조절영역 등의 DNA와 0.75 μM의 NlP 단백질을 섞은 다음 상기의 4× buffer를 섞어서 20 μl가 되게 조정한 다음 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 복합체는 즉시 4.5% polyacrylamide gel에서 4℃로 유지하면서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 사진 촬영하여 고찰하였다.

결과 및 고찰

nlp 유전자의 subcloning 및 당대사 변화

CRP*를 도입한 균주인 MK2001에서 당대사를 촉진하는 clone 중 pX1과 pPC23(*nlp* 유전자 영역의 9.2 kb 단편이 삽입된 clone)을 Southern hybridization 방법으로 분석한 결과 동일한 *nlp* gene을 coding하고 있음이 밝혀졌다(10). 이들의 당대사 촉진 기능의 해석과 대량발현 유도를 위하여 subcloning을 시도하여 2종의 clone을 얻었다. pPC23의 *Pst*I-*Bgl*II의 제한효소 절단영역인 3.5 Kb의 단편을 pKK223-4의 *Pst*I-*Bam*HI 부위에 삽입시켜 pPCD28을 구축하였으며, pXA5로부터 *nlp*를 포함하는 영역인 *Eco*RI-*Ssp*I의 0.4 Kb의 단편을 pKK223-4의 *Sma*I에 삽입시킨 plasmid인 pXS8을 구축하였다. pPC23의 *Hin*dIII-*Pst*I의 1.7 kb 단편이 subcloning되어진 plasmid pPC123도 당대사 발현조절 연구에 사용하였다(Fig. 1).

nlp gene을 포함하는 재조합 plasmid를 *E. coli* MK2001에 도입시켜 여러 종류의 탄소원을 달리하는 MacConkey 배지에서의 당 이용능력을 비교한 것을 Table 2에 나타냈다. 각각의 재조합 plasmid를 도입시킨 대장균 MK2001 균주의 7종의 당 이용능력 시험

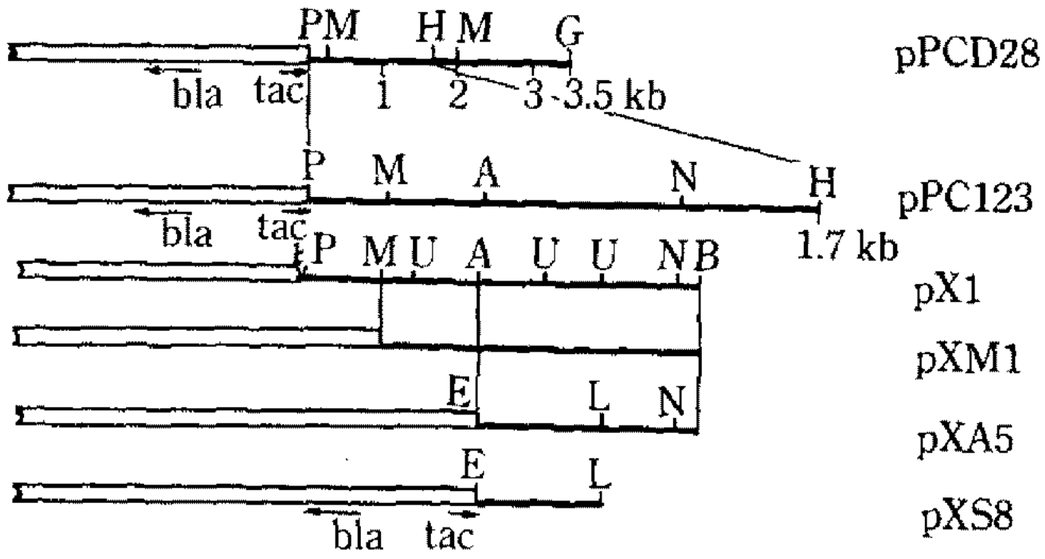

Fig. 1. Restriction map of the subcloned genes.
The *Pst*I-*Bgl*II fragment of pPC23 was subcloned to pKK223-4, constructing plasmid pPCD28. The *Eco*RI-*Ssp*I fragment of pXA5 was subcloned to pKK223-4, constructing plasmid pXS8.
Abbreviations: A; *Afl*I, B; *Bam*HI, E; *Eco*RI, G; *Bgl*II, H; *Hin*dIII, L; *Ssp*I, M; *Mlu*I, N; *Hin*cII, P; *Pst*I, U; *Sau*3AI, *tac*; *tac* promoter.

결과는 maltose의 이용만이 증가되어졌으며, 다른 종류는 vector를 도입한 균주와 비슷하게 당을 이용하는 경향을 나타내었다. 동일 재조합 plasmid 전부를 도입한 대장균 MK1010(cya::km) 균주에서는 시험된 종류의 당은 거의 이용이 불가능하여서 배지상에서 white colony를 나타내었다. 그런데 MK2001에 vector만을 도입시킨 균주가 MacConkey-lactose 배지에서 red colony를 나타내어 lactose의 이용 확인이 어려웠으나, MK1010에서 vector만을 도입한 대조구가 white colony인데 비하여 *nlp*가 포함된 재조합 plasmid가 도입된 MK2001은 red colony를 나타내어 lactose의 이용이 *nlp* 유전자에 의하여 증가되어짐을 알 수 있었다(data not shown).

Table 2. Changes in sugar metabolism of *E. coli* MK 2001 harboring the *nlp* gene

Sugars \ Plasmid	pKK223-4[a]	pPC123	pX1	pXS8
lactose	++	++	++[b]	++
maltose	−	+	++	++
meliobiose	+	+	+	+
sorbitol	−	−	−	−
rhamnose	+	+	+	+
robose	+	+	+	+
glycerol	+	+	+	+

E. coli MK2001 containing *nlp* gene was plated on MacConkey agar plates carrying different kind of sugars as carbon sources.
[a]*E. coli* MK2001 containing pKK223-4 was used as a control.
[b]Color intensity was expressed as follows; −, white colonies; +, red colonies; ++, strongly red colonies.

*nlp*의 lactose 대사 관련 유전자의 발현조절

nlp 유전자의 *tac* promoter에 의한 대량발현으로 lactose의 이용이 증가되는 현상이 lactose 관련 어떠한 유전자의 발현에 영향을 나타내는지를 알아보기 위하여 유전자를 도입시킨 대장균에서 조단백을 추출하여 β-galactosidase의 활성 변화를 측정해 본 결과, *nlp* gene이 tac promoter에 가까와져서 Nlp가 대량발현이 유도될수록 활성이 증가하는 경향으로 1.5배에서 최대 3.5배까지의 증가를 보였다. 탄소원의 변화에 의한 영향을 보기 위하여 glucose 또는 glycerol을 사용하여 배양한 균주에서의 활성을 비교해 본 결과는 별다른 차이를 보이지 않았다(Table 3).

이들 유전자를 야생균주인 W3110에 도입시켜 측정해 본 결과로는 2.5배까지의 활성 증가를 보였는데, 이는 *crp** 변이주에 도입된 것이 *nlp* 유전자에 의한 β-galactosidase(*lacZ* 산물)의 발현 촉진 영향을 더욱 많이 받았음을 시사해 주는 결과이다.

Δcya 균주인 MK1010에 도입시켜 β-galactosidase를 측정한 결과 W3110이나 MK2001보다 약 1/10 정도의 낮은 활성을 나타내었고, 활성 증가치도 감소하는 경향이었다. 이는 당대사 관련유전자의 발현 기능에 미치는 NlP의 기능이 cAMP-CRP 복합체를 가진 대장균에서 더욱 양성적임을 시사해 준다.

*nlp*의 maltose 대사 관련 유전자의 발현 조절

Table 2의 결과에서 *nlp* 유전자를 도입시킨 대장균 MK2001은 대조구인 vector를 도입시킨 균주보다 maltose 첨가 배지에서 보다 강한 red colony를 나타내어 maltose 대사 관련 유전자 발현이 촉진될 것이 사료되어졌다.

따라서 Nlp에 의한 maltose 분해 이용능을 조사

Table 3. β-galactosidase activity in *E. coli* cells harboring the *nlp* gene[a]

Host	Carbon source	Plasmids					
		pKK224-4[b]	pPC123	pX1	pXM1	pXA5	pXS8
MK2001 (*crp*1*, *Δcya*)	glu	1.52	3.41	3.50	4.35	5.12	5.30
	gly	1.31	3.42	3.24	4.16	5.01	5.16
W3110 (wild)	glu	2.26	4.25	4.16	—[c]	5.00	5.75
MK1010 (*Δcya*)	glu	0.16	0.17	0.20	0.25	0.30	0.33
PP47 (*crp*⁻)	glu	0.17	0.19	0.19	—	—	—

[a]β-galactosidase activity was expressed as units. One unit of the enzyme hydrolyzes 1.0 micromole of o-nitrophenyl-β-D-galactoside to o-nitrophenol and galactose per minute at pH 7.3 at 28℃.
[b]A plasmid vector, pKK223-4, was used as a control. [c]—, not tested.

하고자 1% maltose 함유 배지에서 배양한 균체에 분해된 glucose의 생성량을 측정하였다. *nlp* 유전자가 도입된 균주에서 2.8배에서 최고 8.3배의 증가를 나타냈으며, 이는 lactose 이용보다 높은 효율이었다(Table 4). 이들 maltose 이용의 유도 효율은 *tac* promoter와의 짧은 거리에서 조절이 되는 재조합 plasmid가 도입될수록 보다 더 높은 효과를 나타냈으며, pXA5와 pXS8의 재조합 plasmid가 최대 효율을 나타냈다.

Table 4. Induction of maltose metabolism in *E. coli* strains harboring the *nlp* gene[a]

Host Strain	Plasmids	Glucose production[b] (pg)	Efficiency[c] (%)
MK2001	pKK223-4	10.07	100
	pPCD28	28.60	273
	pPC123	65.23	623
	pX1	65.96	630
	pXA5	85.85	820
	pXS8	87.41	835
W3110	pKK223-4	27.84	100
	pPCD28	43.50	159
	pPC123	77.84	280
	pX1	75.89	273
	pXA5	95.12	342
	pXS8	97.44	350

[a] *E. coli* strains were grown in M9 medium supplemented with 1% maltose and 0.2% casamino acids. [b] Amounts of glucose was shown in pg per μg of protein extract. [c] Relative value with that in the presence of plasmid pKK223-4 taken as 100.

따라서 maltose 분해에 직접 관여하는 두 유전자 *malP*(maltodextrin phosphorylase)와 *MalQ*(amylomaltase 생산) 유전자가 *nlp*에 의해 발현이 조절되어지는지를 확인하기 위하여 *nlp* 유전자를 도입시킨 균주에서 이들 두 유전자의 발현산물의 양을 효소활성으로 측정하였다.

Amylomaltase의 활성을 *nlp*가 도입된 균주에서 측정해 본 결과 최대 2.5배까지 증가하였다(Table 5). Maltodextrin phosphorylase의 활성은 대장균 MK2001에서 최대 3배 정도까지 증가하였으며, 탄소원을 달리하여 glucose 또는 glycerol을 사용하여도 별다른 효과의 차이점은 볼 수 없었다(Table 6).

Table 4에서 *nlp* 유전자를 대장균 Wild 3110에 도입했을 경우는 3배 정도의 maltose 이용이 증가되었는데, 이는 MK2001보다 낮은 효과이다. 그런데, 대장균 W3110에서의 amylomaltase와 maltodextrin phosphorylase 활성은 뚜렷한 증가현상을 볼 수 없었는데, 이 결과는 *nlp*의 유전자 산물에 의하여 maltose 대사관여 유전자가 발현이 촉진되어 지는데는 CRP*의 변이가 이들의 조절에 관여하는 것으로 사료되어진다. 따라서 *sfs* 유전자 대부분의 당대사 촉진 기능 뿐 아니라 Nlp와 CRP와의 알려지지 않은 상호조절 작용에 의하여 당대사 관련 유전자의 발현 촉

Table 5. Specific activity of amylomaltase in *E. coli* harboring the *nlp* gene[a]

Strains	Plasmids						
	pKK223-4	pPCD28	pPC123	pX1	pXM1	pXA5	pXS8
MK2001	2.53	3.12	4.64	4.15	5.21	6.27	6.47
W3110	6.87	6.73	6.90	7.60	6.84	8.06	8.17

[a] Amylomaltase activity was shown in units/μg protein. One unit of amylomaltase activity was defined as the amount of pg of glucose produced per min. at 30℃ at pH 7.0. *E. coli* strains were grown in M9 medium supplemented with 1% glycerol, 0.2% casamino acids, and 50 μg/ml ampicillin.

Table 6. Specific activity of maltodextrin phosphorylase in *E. coli* harboring the *nlp* gene[a]

Strains	Sugars	Plasmids						
		pKK223-4	pPCD28	pPC123	pX1	pXM1	pXA5	pXS8
MK2001	Maltose	0.07	0.09	0.16	0.15	0.19	0.22	0.24
	Glycerol	0.06	0.07	0.09	0.11	0.12	0.14	0.16
W3110	Maltose	0.10	0.12	0.14	0.14	0.15	0.19	0.21

[a] *E. coli* strain was grown in M9 medium supplemented with 1% maltose or glycerol, 0.2% casamino acids and 50 μg/ml ampicillin. Specific activity was defined as μM of D-glucose-1-P produced per μg of protein per min.

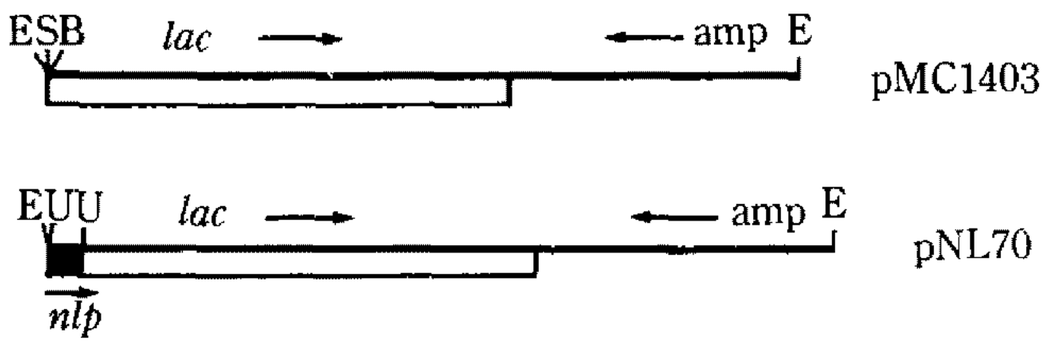

Fig. 2. Map of the plasmid carrying *nlp-lacZ* fusion plasmid.
The *Sau*3AI fragment, 449bp of pX1 was cloned to pMC1403, constructing plasmid pNL70.
Abbreviation: B; *Bam*HI, E; *Eco*RI, S; *Sma*I, U; *Sau*3 AI, *lac*; lactose operon (promoter and 8 amino acids are disrupted), *amp*; the *bla* gene encoded the β-lactamase.

진에 관여함은 앞으로 해결해야 할 흥미있는 과제중의 하나일 것이다.

nlp-lacZ 융합 유전자 작성 및 발현 조절

nlp 유전자의 *in vivo*상에서 발현을 조사하고자 *nlp-lacZ* fusion plasmid를 구축하였다. pX1에서 Nlp 단백질의 70 amino acid 잔기와 promoter 영역을 포함하는 449 bp Sau 3A1 단편을 pMC1403 vector의 *Bam*HI 부위에 삽입시킨 pNL70을 구축하였다(Fig. 2). Plasmid pNL70은 *nlp*의 open reading frame과 vector인 *lacZ* 유전자의 code가 일치하여 *Δlac*인 대장균 TP2010에서 red colony가 생성되어짐을 확인하고 융합 plasmid를 분리하여 *Eco*RI-*Afl*II의 제한효소로 절단하여 생긴 약 240 bp 단편의 존재 확인으로 cloning되어졌음을 재확인하였다. 따라서 pNL70이 도입된 대장균 TP2010(*Δlac*, *Δcya*)과 TP2139(*Δlac*, *Δcrp*)을 가지고 *nlp*의 promoter의 조절하에서 *lacZ* 유전자의 발현량의 조절을 확인하도록 하였다. *Nlp-lacZ* 융합 단백질을 확인하고자, pNL70이 도입된 대장균에서 조단백질을 추출하여 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 하여 Western blotting의 immunoblot 분석을 실시하여 *nlp-lacZ* 융합 유전자에 의해 TP2010과 TP2139에서 생성된 융합 단백질의 생성 결과를 Fig. 3에 나타냈다.

두 균주에서 공히 *in vivo* 상태에서 *nlp*가 발현되어짐을 융합 단백질 생성으로 확인하였으며, TP2139에서 더욱 발현량이 높았다. 즉, *Δcya*, *Δcrp* 균주(TP 2139)에서는 당대사 이용이 미약하며, 저자 등이 이미 발표한(10) 당대사 촉진관련 유전자(*sfs1*)도 cAMP-CRP 복합체에 의한 발현조절을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 *nlp* 유전자의 발현이 cAMP와 관계하

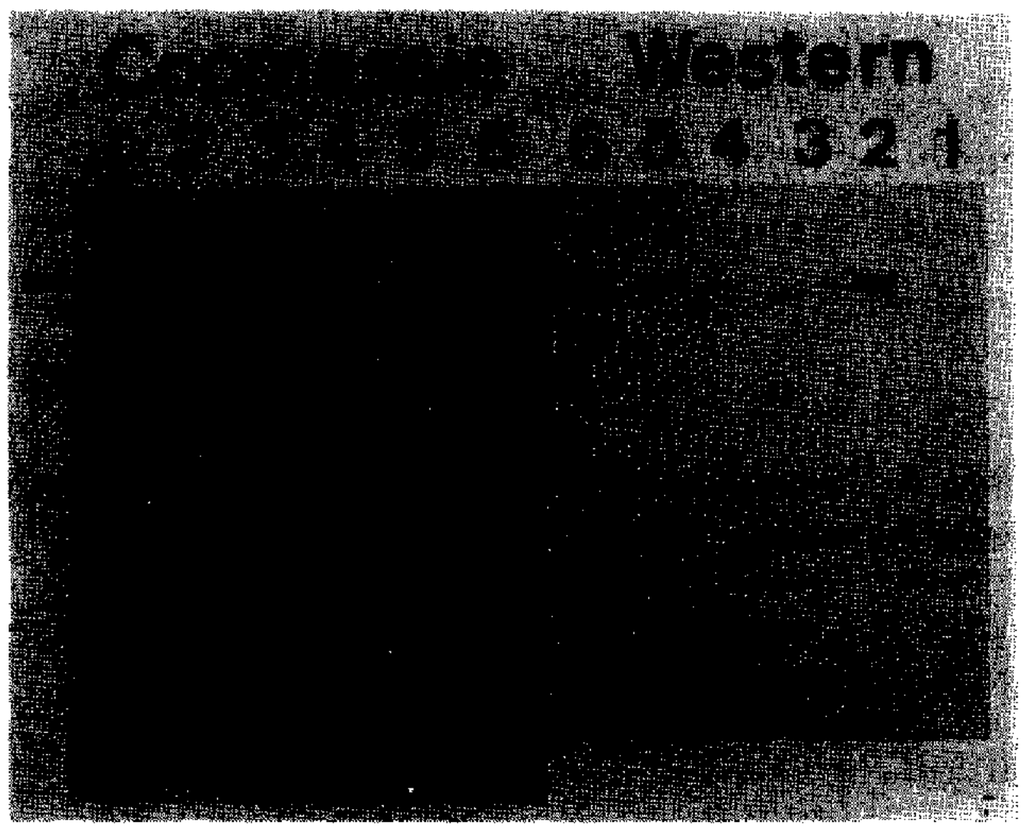

Fig. 3 Expression of the *nlp-lacZ* protein fusion gene.
Duplicate 12.5% SDS-polyacrylamide gels were stained with Coomassie blue (left panel) or Western blotting (right panel). All lanes contained 5 μg of total protein. The blot was incubated with monoclonal anti-rabbit β-galactosidase from *E. coli*. Lane 1; pMC1403 in TP2010, lane 2; Molecular mass marker included β-galactosidase (M, 116,000), Phosphorylase b (M, 94,000), Bovine serum albumin (M, 67,000), Ovalbumin (M, 43,000), Carbonic anhydrase (M, 30,000). lane 3; pNL70 (TP2010), lane 4; pNL70 (TP2010+1 mM cAMP), lane 5; pNL70 (TP 2139), lane 6; pNL70 (TP2139+1 mM cAMP). The arrow indicate the positions of the fused proteins.

는지를 알아보고자 *nlp-lac* 융합 단백질의 발현에 cAMP-CRP 복합체가 미치는 영향을 간접적으로 조사하였다. cAMP를 생성 못하는 균주인 TP2010을 M9 배지상에서 1 mM의 cAMP 첨가 또는 미첨가한 처리하에서 생성되는 융합 단백질의 양을 조사하여 cAMP 조절하의 유전자일 경우에는 첨가구에서 다량의 융합단백질이 생성되어질 것이다.

본 실험에서 cAMP 첨가에 의한 *nlp-lac* 융합 단백질 생성량(Fig. 3의 lane 4와 6)은 증감의 변화를 보여주지 않음으로서 *nlp* 유전자는 cAMP에 의한 발현조절을 받지 않는 것으로 나타났다. 그런데 CRP 단백질의 결합영역의 공통 배열로 알려져 있는 5′AANTGTGANNTANNTCACATTT3′의 배열과는 상동성이 약간 낮은 정도의 50%가 일치하는 영역이 *nlp* 유전자의 상류 조절영역에 존재(5′GGATGTGCATCTTTATATATTC3′)함으로써 cAMP-CRP에 의한 발현조절의 가능성이 시사되어지므로, CRP 단백질의 이 영역에의 DNA와 결합 가능성 및 전사수준에서의 조절 확인 등의 계속적인 검토가 요구되어진다.

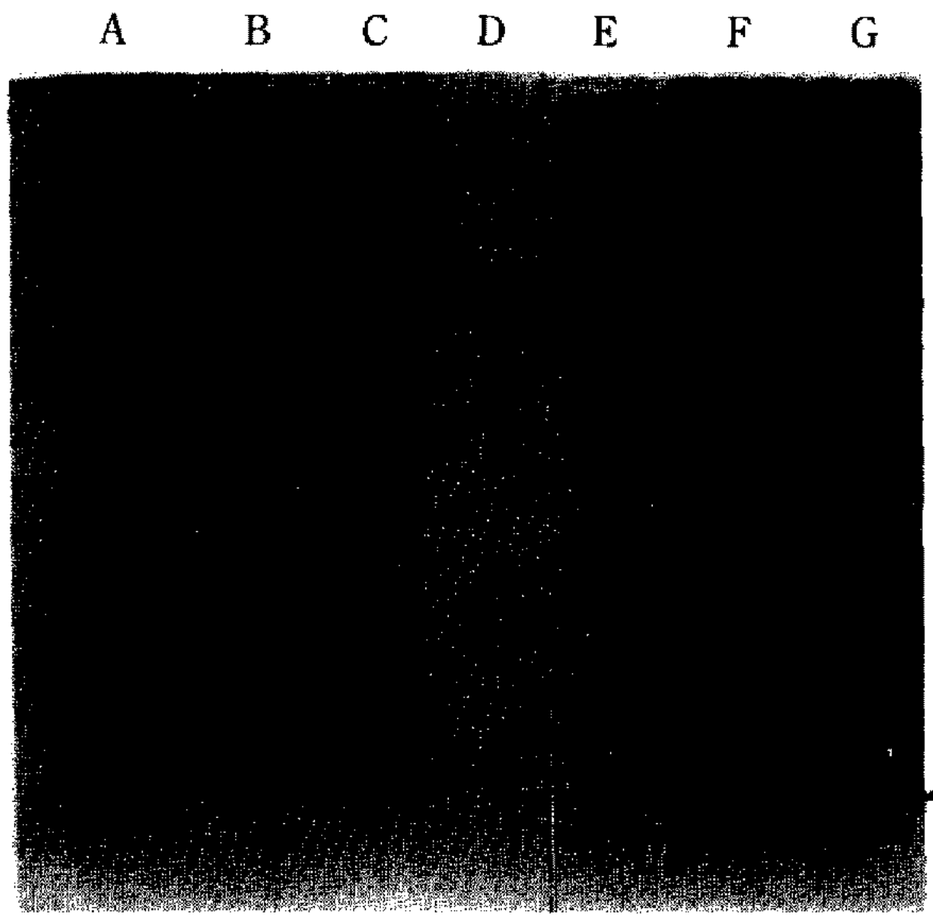

Fig. 4 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns showing expression of the *E. coli nlp* gene.
The thick arrow indicates the position of the Nlp. Molecular mass marker included Phosphorylase b (M, 94,000), Bovine serum albumin (M, 67,000), Ovalbumin (M, 43,000), Carbonic anhydrase (M, 30,000) and α-lactoalbumin (M, 14,000).
MK2001/pKK223-4 (lanes A and B), MK2001/pXA5 (lanes C, F and G), and MK2001/pX1 (lane E) were grown in LB broth containing 0.5% glucose (lanes A, C, E, and F) or 0.5% maltose (lanes B and G) in the presence of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside 1 mM.

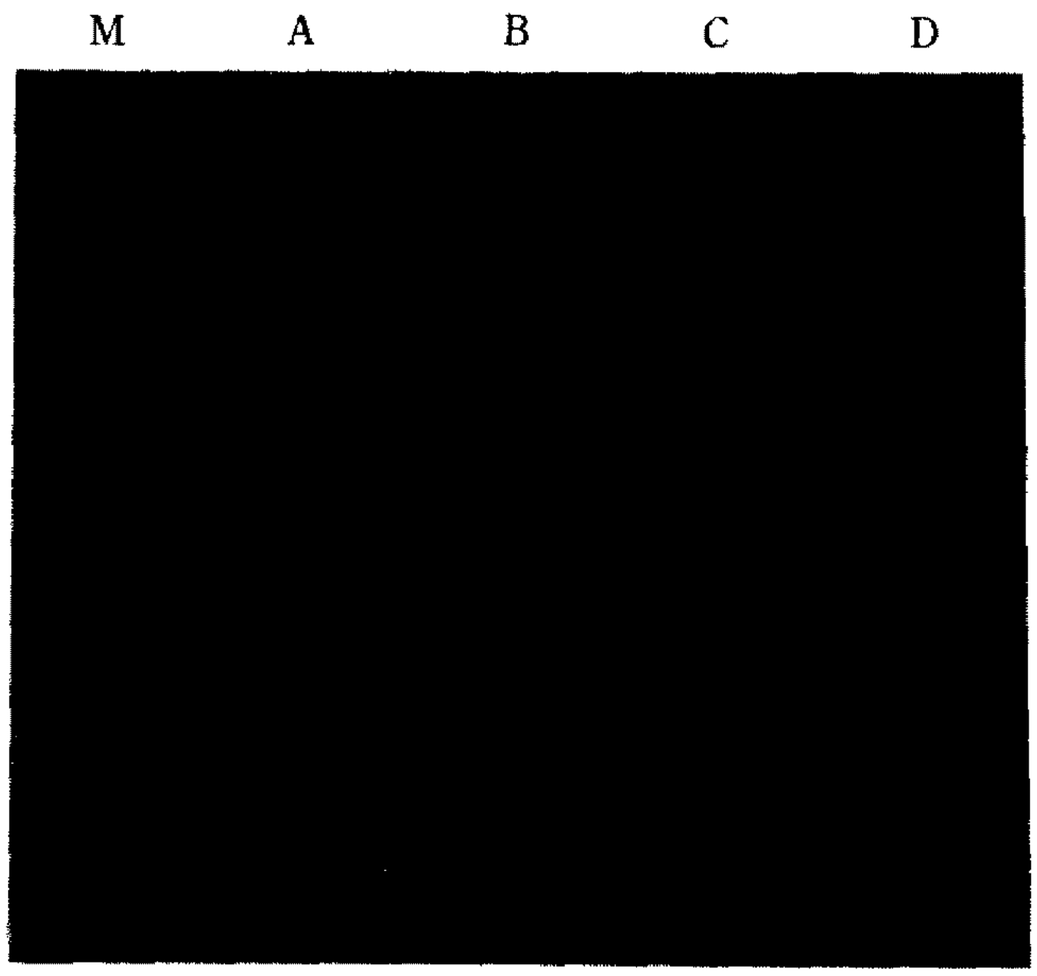

Fig. 5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the fractions from the Nlp protein purification.
Electrophoresis was done with 15% polyacrylamide in the resolving gel. Lanes: B; crude extract from strain MK2001, C; Ammonium sulfate 40% fraction, A and D; Sephadex G-75 gel filtration fraction, M; size marker. The molecular mass marker shown are those of Bovine albumin (66,000 Da), Egg albumin (45,000 Da), Carbonic anhydrase (29,000 Da), Trypsin inhibitor (20,100 Da) and α-Lactoalbumin (14,200 Da).

nlp 유전자 산물의 대량 발현

nlp 유전자의 염기 배열 결정으로 추정된 아미노산 배열로부터 계산된 분자량(M, 10,306)을 가진 *nlp* 유전자의 발현산물을 확인하고자 실시한 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 당대사 관련 유전자의 발현촉진이 높게 나타난 plasmid PXA5가 도입된 MK2001을 1 mM IPTG로 유도시켜 배양한 결과 tac promoter의 강력한 발현으로 대량 생산된 10,000 Da 정도의 band를 확인할 수 있었으며(lanes C, F and G), 이는 염기 배열결정에 의하여 추정된 분자량과 일치하는 결과를 나타내었다. 0.5% maltose를 탄소원으로 하여 대량발현을 유도한 결과는 같은 경향의 band를 나타내어 maltose에 의한 발현 촉진은 분명하게 보여지지 않았다. 또한 당대사 촉진기능이 미약했던 pX1(lane E), pPC123(data not shown) 등의 plasmid가 도입된 MK2001에서의 Nlp의 생성은 대량 발현된 band에 비하여 약하게 나타났다.

Nlp 단백질의 정제

대량발현이 되어지는 plasmid, pXA5를 도입한 *E. coli* MK2001 균주에서는 total protein의 약 5% 이상의 Nlp 생성이 가능하였다. 조단백질의 원심분리(35,000×g)에 의한 결과 soluble cellular fraction에 Nlp가 존재하였다. 이것을 ammonium sulfate 40% 농도에 침전시킨 후, 10 mM sodium acetate buffer (pH 6.5)에 용해시킨 다음 투석시킨 용액을 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 생긴 분획을 15% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 확인한 결과 약 70% 정도의 Nlp 단백질이 상등액에 존재하였다. Sephadex G-75 column(1.5 cm×40 cm column)을 buffer (10 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 5%(v/v) glycerol, 10 mM 2-mercaptoethanol)에 equilibration시킨 후, 유안 침전 분획을 loading하여 동일 buffer로서 용출시킨 각 분획을 전기영동으로 확인하여 10 KDa 정도의 크기를 가진 분획을 전기영동으로 확인하여 수집하였다(Fig. 5의 lane D). 전기영동상 단일 band를 얻을 수는 없었으나, *nlp* 유전자 조절 영역 DNA와 결합 실험을 한 결과 결합력을 가지고 있는 것으로 확인되어져서 동일 column으로 반복하여 정제시킨

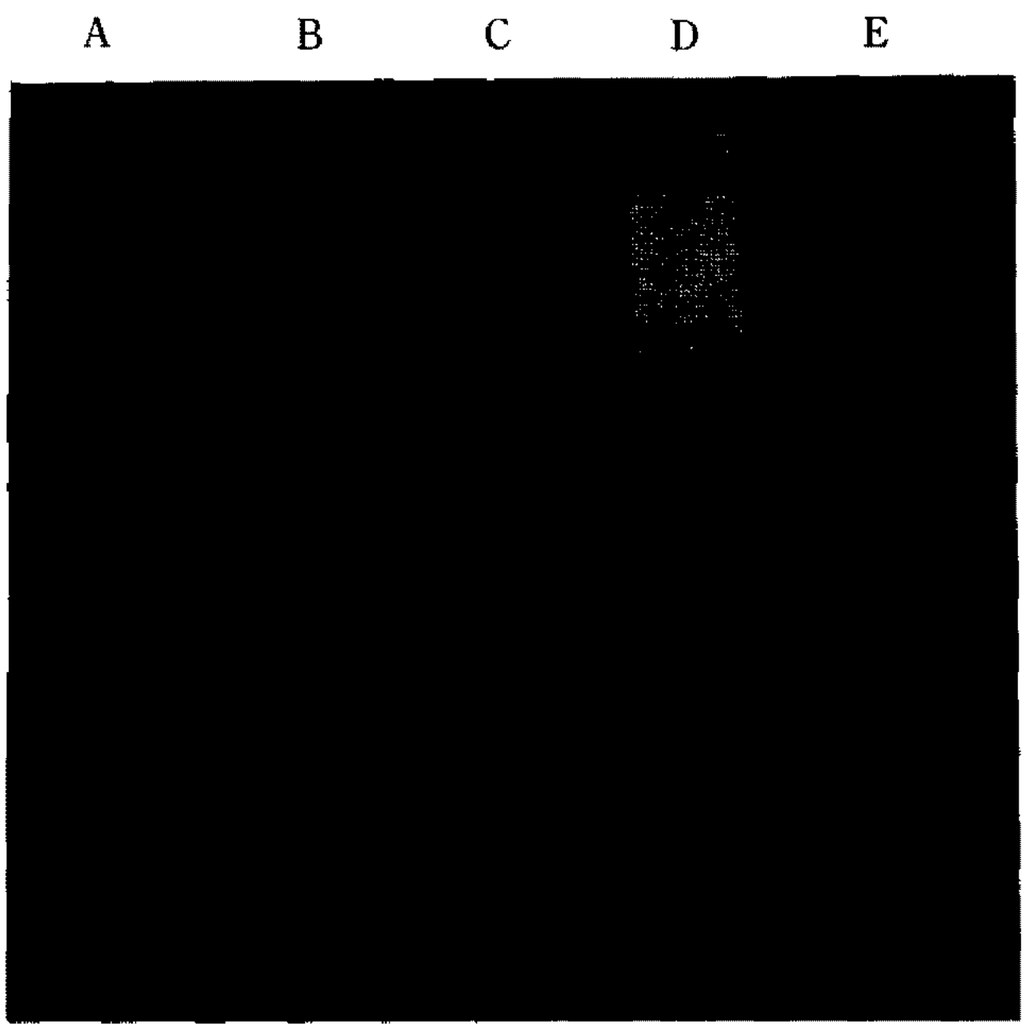

Fig. 6 Detection of specific DNA-binding activity with partially purified Nlp protein.
The band competition assay was performed as described in the Materials and Methods. The DNA segment used for the complex formation: lanes; non specific DNA region, the 275 bp *Eco*RI-*Mlu*I fragment of the pX1 (nucleotide No. 1-275 in Fig. 2 of Reference 9), lanes C-E; the regulatory region of the *nlp* gene (nucleotide No. 276-610 in Fig. 2 of reference 9). [DNA]= 2.5×10^{-7} M, [Nlp]=7.5×10^{-7} M (lanes B and E) and 1.5×10^{-6}M (lane D).

결과, Fig. 5의 lane A에서 보는 바와 같이 부분 정제된 band의 분획을 얻을 수 있었으므로 조절 영역 DNA와의 결합 실험에 사용하였다.

조절 영역 DNA와 Nlp와의 결합

nlp 유전자의 기능과 특성을 밝혀보고자 연구한 결과 몇 종의 당대사 관련 유전자의 발현 촉진을 가지는 것은 전술한 바와 같은 결과를 얻었다. 또한 *nlp*의 구조해석으로 본 단백질의 1차 구조인 아미노산 배열은 *nlp*가 전사조절 단백질로서의 기능을 가지고 있음을 시사해 주었다 . 따라서 본 실험은 우선 Nlp가 조절 영역의 DNA와 결합하는지를 밝혀내어 결합 특성 및 결합 부위를 알아내는 조절기작을 밝혀 보는 연구에 접근 하고자 하였다.

Fig. 6에 나타낸 것과 같이 *nlp* 유전자의 조절 영역 DNA 2.5 μM와 Nlp가 1 : 3의 비율로 반응시킨 결과 complex 형성에 의하여 Nlp를 넣지 않는 lane C에 비하여 lane E에서 band shift 현상이 나타남을 확인하였다. DNA와 Nlp 단백질과의 반응 비율은 1 : 6의 높은 비율에서 DNA와 완전히 결합하여 complex형성이 더욱 강력하여 진한 band로써 나타났다 (lane D). 그런데 *nlp* 유전자의 상류영역의 truncated protein을 coding하고 있는 non-specific DNA 영역을 대조구로 하여 실험한 결과로는 Nlp와 결합하지 않았다(compare lanes A and B).

한편 *nlp*와 유사한 전사조절 기능을 가질 것으로 예상되어졌던 *ner* 유전자의 경우는 상류조절영역에서 12 bp의 역방향 구조를 가진 2개의 DNA 결합영역이 존재하였다(14). 이들 결합 영역 DNA와 상동성을 가진 부위는 *nlp* 유전자의 조절영역에서는 찾아 볼 수 없었으나, 역방향 구조를 가진 영역으로서 Nlp와 결합이 예상되는 2개 영역의 부위가 존재 하였다(459-TTATTCAGCTCT-ACACCTGAAAAA-485 또는 498-CTTTATATATTC-GAATATTCACAC at Fig. 2 in Refernce 9). 이들 영역은 promoter 영역으로 생각되는 −10(TATAGT)보다 상류 영역으로서 Nlp가 결합되면 operator로서 가능할 것으로 생각되어지나, 구체적인 것은 DNase 1 foot printing등의 실험으로 정확한 결합 부위의 결정과 전사 수준에서의 조절등을 계속하여 검토하여야 확인이 가능할 것으로 사료되어지며, 이들의 문제가 해결되면 *npl* 유전자에 의하여 직접적으로 전사조절을 받을 것으로 생각되어지는 새로운 유전자의 cloning과 해석 등의 계속적인 연구도 가능해 지리라고 예상되어진다. 또한 Raibaud 등은(27) *mal* 유전자의 보다 완전한 발현을 위하여는 그들의 promoter 영역에 DNA의 왜곡현상(bending)이 일어난다고 하였는데, 아직 기능이 확실치 않은 *sfs1*이나 *nlp*의 산물이 이들 *mal* 유전자들(*malQ* and *malP*)의 조절영역에 결합함으로서 발현조절에 관여할 가능성 등을 계속하여 연구 검토함은 *nlp* 유전자 기능 해석에 접근할 수 있을 것으로 보아진다.

요 약

대장균의 *nlp*(Ner like protein) 유전자를 클로닝하여 구조해석을 한 결과 전사조절 단백질인 Ner와는 61%의 높은 상동성을 가지고 있음을 이미 보고한 바 있다 . 본 연구는 당 대사 관련 유전자의 발현 조절을 보고자 *nlp* 유전자를 도입시켜 *tac* promoter에 의해 대량 발현시킴으로서 lactose 대사 관련 유전자 *lacZ*와 maltose 대사 관련 유전자인 *malQ*, *malP*의 유전자 발현이 2.5배에서 최고 8.3배 정도까지 증가됨을 확인하였다. 이는 *nlp* 유전자가 cAMP 비존재하에 *crp*1*

와 상호작용하여 maltose 및 lactose 대사를 촉진시킴을 시사한다.

nlp-lacZ 융합 유전자 산물을 Immunoblotting하여 분석한 결과 *nlp*의 promoter가 *in vivo* 상태에서 발현되어짐을 확인하였다.

tac promoter와 IPTG에 의하여 *nlp* 유전자 산물을 대량 발현시킨 결과 약 10,000 Da의 산물을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로서 확인하였으며, 부분 정제된 Nlp 단백질을 조절 영역의 DNA 단편에 결합함으로서 전사조절에 관여하는 것으로 사료되어졌다.

감사의 말

본 연구는 1991년도 교육부의 유전공학 연구비 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. Gilbert, W. and B. Muller-Hill. 1966. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **56**: 1891-1898.
2. Pabo, C. and M. Lewis. 1982. The operator binding domain of Lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature.* **298**: 443-447.
3. Sancar, G., A. Sancar, J. Little and C. Rupp. 1982. The *uvrB* gene of *Escherichia coli* has both *lexA*-repressor and *lexA*-independent promoters. *Cell* **28**: 520-530.
4. De Crombrugghe, B., S. Bushy and H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein: role in transcriptional activation. *Science* **224**: 831-838.
5. Bubsy, S. 1986. In *Regulation of Gene Expression* pp. 51-. ed. by I. Booth and H. Higgies, Cambridge University Press, Cambridge.
6. Ullmann, A. and A. Danchin. 1983. Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**: 1-53.
7. Adhya, S. and G. Garges. 1982. How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell* **29**: 287-289.
8. Aiba, H., T. Nakamura, H. Mitani and H. Mori. 1985. Mutations that alter the allosteric nature of cAMP receptor protein of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **4**: 3329-3332.
9. Choi, Y.L., T. Nishida, M. Kawamukai, R. Utsumi, H. Sakai and T. Komano. 1989. Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* gene, *nlp*, highly homologous to the ner genes of bacteriophages Mu and D108. *J. Bacteriol.* **171**: 5222-5225.
10. Kawamukai, M., R. Utsumi, K. Takeda, A. Higashi, H. Matsuda, Y.L. Choi and T. Komano. 1991. Nucleotide sequence and characterization of the sfs1 gene: *sfs1* is involved in CRP* dependent *mal* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2644-2648.
11. van Leerdam, R., C. Karreman and P. van de Putte. 1982. Ner a Cro-like function of bacteriophage Mu. *Virology* **123**: 1928.
12. Goosen, N., M. van Heuvel, G.F. Moolenaar and P. van de Putte. 1984. Regulation of Mu transposition. II.The *Escherichia coli* HimD protein positively controls two repressor promoters and the early promoter of bacteriophage Mu. *Gene* **32**: 419-426.
13. Tolias, P.P. and M.S. Dubow. 1986. The overproduction and characterization of the bacteriophage Mu regulatory DNA-binding protein *Ner*. *Virology* **148**: 298-311.
14. Goerge, K., P.P. Tolias and M.S. Dubow. 1989. Purification and characterization of the Ner repressor of bacteriophage Mu. *FEBS Letters* **244**: 369-375.
15. Casadaban, M.J., J. Chou and S.N. Cohen. 1980. *In vitro* gene fusion that join an enzymatically active β-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* **143**: 971-980.
16. Yanisch-Perron, C., J. Viera and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**: 103-119.
17. De Boer, H.A., L.J. Comstock and M. Vasser. 1983. The tac promoter: functional hybrid from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **80**: 21-25.
18. Kawamukai, M., J. Kishimoto, R. Utsumi, M. Himeno, T. Komano and H. Aiba. 1985. Negative regulation of adenylate cyclase gene (*cya*) expression by cAMP-cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: studies with *cya*-lac protein and operon fusion plasmids. *J. Bacteriol.* **164**: 872-877.
19. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
20. Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory.

Cold Spring Harbor, N.Y.
21. Wiesmeyer, H. and M. Cohn. 1960. The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. 1. Purification and physical chemical properties of the enzyme amylomaltase. *Biochim. Biophys. Acta.* **39**: 417-426.
22. Helmreich, E. and C.F. Cori. 1964. The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **51**: 131-138.
23. Sharp, P. 1972. Interference in glucose oxidase-peroxidase blood glucose methods. *Clin. Chim. Acta* **40**: 115-120.
24. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
25. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **76**: 4350-4354.
26. Garner, M.M. and A. Revzin. 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.* **9**: 3047-3060.
27. Raibaud, O., D. Vidal-Ingigliardi and E. Richet. 1989. A complex nucleoprotein structure involved in activation of transcription of two divergent *Escherichia coli* promoters. *J. Mol. Biol.* **205**: 471-485.

(Received April 8, 1993)