

## 방향족 아미노산에 의한 대장균 *serC-aroA* Operon의 발현 억제

황우길 · 사재훈 · 김경훈<sup>1</sup> · \*임창진

강원대학교 자연과학대학 생화학과, <sup>1</sup>생물학과

대장균에서 두 가지 다른 아미노산의 생합성에 관여하는 *serC* 유전자와 *aroA* 유전자는 혼합 operon을 이루고 있다. *serC-aroA* 혼합 operon의 발현 조절 현상을 *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid pWH2를 이용하여 측정하였다. *serC-aroA* 혼합 operon의 발현은 L-tyrosine, L-phenylalanine 및 L-tryptophan 등 방향족 아미노산들에 의하여 억제되었다. 방향족 아미노산에 의한 억제 효과는 *tyrR*<sup>-</sup> 균주 혹은 *trpR*<sup>-</sup> 균주에서는 감소하였다. 또한, 방향족 아미노산은 cyclic AMP에 의한 이 operon의 발현 상승 효과를 감소시키기도 하였다. 이들 결과로부터 대장균 *serC-aroA* 혼합 operon의 발현은 방향족 아미노산들에 의해 억제된다고 추정하였다.

KEY WORDS □ *Escherichia coli*, *serC-aroA* operon, aromatic amino acid, repression

대장균 *aroA* 유전자는 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSP synthase, EC 2.5.1.19)를 암호화한다. 이 효소는 chorismate 합성 과정의 중간 단계에 관여하여 shikimate-3-phosphate와 phosphoenolpyruvate (PEP)를 기질로 하여 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate를 합성한다. 이 화합물에서 탈인산되어 형성되는 chorismate는 tyrosine, phenylalanine, tryptophan, ubiquinone, menaquinone, folic acid, p-aminobenzoic acid 등 여러 화합물들로 전환되며, 이러한 전환은 세균, 진균류 및 식물 등에서 이들 화합물들이 합성되는 유일한 방법이다. *aroA* 유전자는 *Escherichia coli* (6, 7), *Salmonella typhimurium* (13), *Salmonella gallinarum* (11), *Mycobacterium tuberculosis* (9), *Bordetella pertussis* (17), *Aspergillus nidulans* (4), *Yersinia enterocolitica* (19), *Saccharomyces cerevisiae* (8) 및 고등식물인 *petunia* 와 토마토 (10)에서 분리된 바 있다. *aroA* 유전자는 *Mycobacterium* 과 *Bordetella*에 기인하는 질환에 대한 생 vaccine 제조에 이용되는 auxotrophic mutant의 조성에 이용되기도 하였으며, 이 유전자의 산물인 EPSP synthase는 비선택적 제초제인 glyphosate의 표적효소로 알려져 있다. 대장균 (7)과 *S. typhimurium* (13)의 *aroA* 유전자는 *serC* 유전자와 혼합 operon을 이루어 polycistronic mRNA로 co-transcription된다 (7, 13). *serC* 유전자는 serine 합성에 관여하는 효소인 3-phosphoserine aminotransferase (PSAT, EC 2.6.1.52)를 암호화하며, PSAT는 3-phosphopyruvate와 glutamate로부터 o-phospho-L-serine을 합성한다. 이와 같이 두 개의 다른 아미노산 합성에 관여하는 *aroA* 유전자와 *serC* 유전자가 하나의 혼합 operon에 공존하는 생리적 의미는 현재까지

불분명하나 두 경로의 산물인 chorismate와 serine이 외부에서 철이온을 흡수하는데 관여하는 siderophore인 enterochelin 합성의 전구체라는 점이 흥미롭다.

대장균 *serC-aroA* operon의 상부조절부위에는 cAMP-CRP complex의 binding site와 유사한 염기서열이 존재한다 (7). 이는 *serC-aroA* operon이 cyclic AMP (cAMP)에 의하여 조절된다는 것을 암시하며 실제로 본인 등은 *serC-aroA* operon의 발현이 cAMP에 의하여 증가된다는 사실을 밝힌 바 있다 (15). 본 연구에서는 *serC-aroA* operon의 발현이 방향족 아미노산에 의하여 억제되며 이 억제에는 TrpR과 TyrR repressor 단백질이 관여한다는 사실을 규명하였다.

### 재료 및 방법

#### 필요 균주의 조성

본 연구에 사용된 균주 및 plasmid는 Table 1과 같다. *cya lac* 균주는 TD1287 (F<sup>-</sup>, *cya*-854)를 SL10 (Hfr,  $\Delta$ *proAB-lacIOPZY*)과 mating시켜 5-fluorocytosine (18)에 저항성 있는 colony를 취한 후 Lac<sup>-</sup>를 확인하여 조성되었다. 그 외 *crp lac*, *tyrR*, *trpR*, *tyrR trpR* 등 여러 필요 균주들은 미국 또는 호주 소재 대학들로부터 입수되었다.

#### 효소 및 시약

*Sau*3A1, *Bgl*II, *Bam*HI, *Eco*RI 등의 제한효소와 T4 DNA ligase는 Boehringer Mannheim에서 구입하여 공급자의 지침에 따라서 사용되었다. O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (ONPG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) 등의 기타 시

Table 1. *E. coli* strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
JM103	$\Delta(lac\ pro)\ endA\ thi\ hsdR\ strA\ supE\ sbcBC$ $F'(traD36\ lac^F\ lacZ\ \Delta M15\ proA^+B^+)$	This laboratory
MC1061	$hsdR\ mcrB\ araD139\ \Delta(araABC-leu)$ $\Delta lacX74\ galU$	This laboratory
CL100	$cya\ thi\ pro\ his\ leu\ lacZ$	This work
SP1312	$tyrR^+\ trpR^+\ lacZ$	Somerville(12)
SP1313	$tyrR\ trpR^+\ lacZ$	Somerville(12)
SP1322	$tyrR^+\ trpR\ lacZ$	Somerville(12)
SP1323	$tyrR\ trpR\ lacZ$	Somerville(12)
Plasmids		
pMC1403	$amp^r$ , promoterless $\beta$ -galactosidase	This laboratory
pWH2	$amp^r$ , $serC$ - $aroA$ - $lacZ$ fusion	This work

약은 Sigma로부터 구입되었다.

#### 배지 및 배양조건

대장균은 Luria-Bertani broth (LB broth; 1/당 Bacto tryptone 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10 g) 또는 M9 최소배지 (1/당  $Na_2HPO_4$  7 g,  $KH_2PO_4$  3 g, NaCl 0.5 g,  $NH_4Cl$  1 g, 20% glucose 20 ml, 0.01 M  $CaCl_2$  10 ml, 0.1 M  $MgSO_4$  10 ml)를 사용하여 37°C에서 배양되었으며 필요에 따라 요구되는 아미노산이 함유된 M9 최소배지에서도 배양되었다. Plasmid를 보유한 대장균의 배양에는 ampicillin (50  $\mu g/ml$ ), tetracycline (25  $\mu g/ml$ ) 혹은 kanamycin (5  $\mu g/ml$ )이 첨가된 배지가 사용되었다.

#### $\beta$ -Galactosidase의 활성 측정

대장균을 원하는 조건에서 배양한 후, 적당한 수의 세포들로부터 sonication에 의하여 제조한 세포 추출물을 효소원으로 사용하고, ONPG를 기질로 하여 Miller(18)에 따른 분광 광학적인 방법으로  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry 방법 (16)으로 시행되었다.

#### 재조합 DNA 조작

DNA 조작은 Sambrook (20) 등에 의하여 제시된 방법들에 따라 시행되었으며 경우에 따라서 약간 변조된 방법들이 사용되기도 하였다. Plasmid DNA는 주로 alkaline lysis 방법에 의해 분리되었고 대장균은  $CaCl_2$  방법에 의하여 형질전환되었다 (20).

#### 배지내 방향족 아미노산의 효과

$serC$ - $aroA$ - $lacZ$  fusion plasmid pWH2가 함유된 대장균 MC1061을 방향족 아미노산이 결여된 최소 배지에서 대수증식기까지 성장시키다가 여러 농도의 방향족 아미노산을 단독 또는 복합으로 첨가하여 배양하였다. 아미노산 첨가 전후의 배양액으로부터 준비한 세포추출물의  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정함으로써 방향족 아미노산이  $serC$ - $aroA$  operon의 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

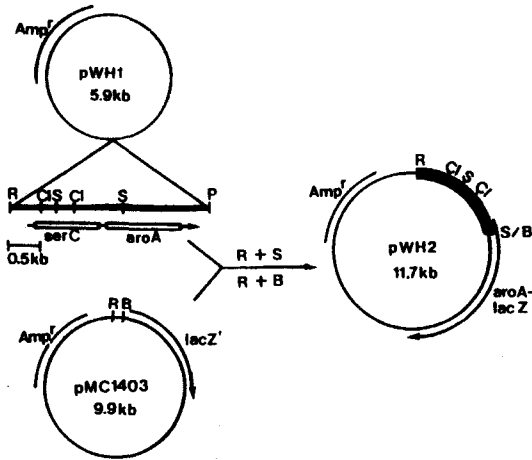
#### cAMP의 positive regulation에 대한 방향족 아미노산의 효과

Fusion plasmid pWH2가 함유된  $cya\ lac$  균주 혹은  $crp\ lac$  균주를 최소 배지에서 대수증식기까지 키운 후 culture를 분리하여 cAMP 단독 또는 cAMP와 방향족 아미노산을 함께 배지에 첨가하여 배양하였다. 배양액으로부터 준비한 세포추출물의  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정함으로써 cAMP의  $\beta$ -galactosidase 활성 증가에 대한 방향족 아미노산의 효과를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### Fusion plasmid의 제조

대장균  $serC$ - $aroA$  operon의 발현을 용이하게 측정하기 위하여, pMC1403 vector (3)를 사용하여  $serC$ - $aroA$ - $lac$  fusion plasmid가 제조되었다. Vector plasmid pMC1403은 promoter와 N-말단의 8개 codon이 결여된  $\beta$ -galactosidase 유전자를 함유하고 있다. 대장균  $serC$ - $aroA$  operon을 함유한 pWH1 (14) DNA를  $EcoRI$ 으로 완전히 절단한 후  $Sau3AI$ 으로 부분 절단하여 얻은  $EcoRI$ - $Sau3AI$  분획들을  $EcoRI$ - $BamHI$ 으로 절단된 pMC1403과 혼합하여 T4 DNA ligase로 처리하였다. 이 ligation 혼합물을 사용하여  $lacZ$  균주인 대장균 JM103를 형질전환하여 얻은 ampicillin 저항성 colony들 중에서 X-gal을 포함하는 LB 고체배지에서 파란색으로 자라는 형질전환체들을 선별하였다. 이들 중 하나로부터 plasmid DNA를 분리하여 JM103를 다시 형질전환하여 얻은 ampicillin 저항성 colony들은 모두 X-gal 배지에서 파란색을 띠었으며 lactose를 유일한 탄소원으로 하여 매우 잘 자랐다(자료 미제시). 따라서 이 형질전환체가  $\beta$ -galactosidase 활성을 보이는 것은 형질전환체에 도입된 재조합 plasmid가  $serC$ - $aroA$ - $lacZ$  fusion 유전자를 보유하기 때문이라고 추정하였으며 이 재조합 fusion plasmid를 pWH2로 명명하였다 (Fig. 1). Plasmid pWH2를 여러 제한효소로 분석하여  $serC$ - $aroA$  유전자 DNA의 알려진 염기서열 (7)과 비교한 결과, 1.8 Kb  $EcoRI$ - $Sau3AI$  절편이 pMC1403에 삽입

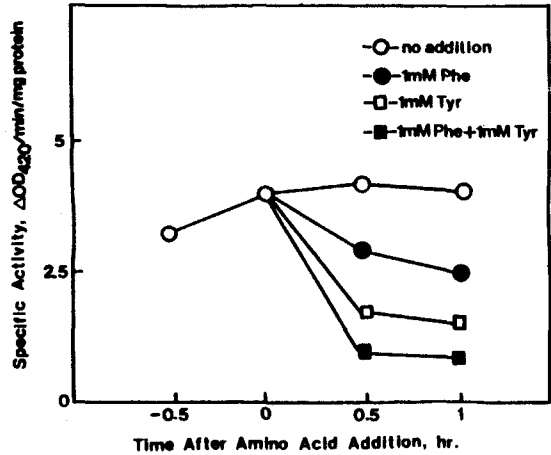


**Fig. 1.** Construction of *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid pWH2. Abbreviations used are: R, *EcoRI*; Cl, *ClaI*; P, *PstI*; B, *BamHI*; S, *Sau3AI*. Thicker lines represent *serC-aroA* DNA, and thin lines vector DNA.

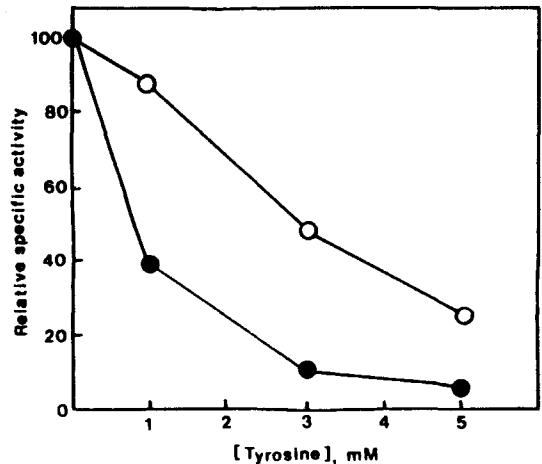
되었음이 확인되었다(자료 미제시). 따라서 pWH2는 *serC-aroA* operon의 promoter, *serC* 유전자의 전 coding 부위 및 *aroA* 유전자의 N-말단 69개 아미노산의 coding 부위가 *lacZ* 구조유전자의 N-말단에 올바른 해독틀로 융합된 *serC-aroA-lacZ* 유전자를 보유한다.

**배지내 방향족 아미노산의 효과**

융합유전자 *serC-aroA-lacZ*를 함유한 pWH2를 Lac<sup>-</sup> 대장균 균주에 도입하여 방향족 아미노산이 결여된 최소 배지에서 대수증식기까지 키운 후 방향족 아미노산 (1 mM)을 배지에 첨가하여 1시간 동안 더 배양하였다. 아미노산 첨가 전후에 취한 세포들의 β-galactosidase 활성을 측정함으로써 방향족 아미노산이 *serC-aroA* operon의 발현에 미치는 효과를 측정하였다(Figs. 2와 3). Fig. 2는 MC1061/pWH2에 대한 방향족 아미노산의 효과를 나타내고 있다. Phenylalanine에 비하여 tyrosine이 *serC-aroA* operon의 발현을 더 억제하였고, 두 아미노산의 동시 첨가의 경우에는 억제효과가 더욱 현저하였다(Fig. 2). Tryptophan도 tyrosine과 비슷한 억제효과를 보였으나 alanine, lysine, glycine 등의 다른 아미노산은 억제 효과를 보이지 않았다(자료 미제시). Plasmid pWH2를 함유한 SP1312 (*tyrR*<sup>+</sup> *trpR*<sup>+</sup>)의 배양액에 방향족 아미노산을 첨가하였을 때 MC1061/pWH2의 경우와 유사한 *serC-aroA* operon의 억제효과가 관측되었다(Table 2). 억제 효과는 L-tryptophan의 경우가 가장 크고 그 다음 L-phenylalanine, L-tyrosine 순으로 약간 감소하였다(Table 2). SP1312와 isogenic strain인 SP1313 (*tyrR*<sup>-</sup>), SP1322 (*trpR*<sup>-</sup>), SP1323 (*tyrR*<sup>-</sup> *trpR*<sup>-</sup>)균주에 pWH2를 도입하였을 때는 방



**Fig. 2.** Repressive effects of phenylalanine and tyrosine on the β-galactosidase activity expressed from *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid. The *E. coli* MC1061/pWH2 cells were exponentially grown in M9 minimal media, and β-galactosidase activity was measured after the addition of appropriate aromatic amino acid.



**Fig. 3.** Concentration dependence of repressive effect of L-tyrosine on the synthesis of β-galactosidase from *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid. β-Galactosidase activity was determined after adding various amounts of L-tyrosine to *tyrR*<sup>+</sup> *trpR*<sup>+</sup> strain SP1312 (●) or *tyrR*<sup>-</sup> *trpR*<sup>+</sup> strain SP1312 (○) harboring a *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid.

향족 아미노산의 억제효과가 SP1312 (*tyrR*<sup>+</sup> *trpR*<sup>+</sup>)의 경우에 비해 현저하게 감소하였다(Table 2). 이는 *serC-aroA* 혼합 operon의 방향족 아미노산에 의한 억제기작에 TyrR repressor와 TrpR repressor가 개

**Table 2.** Repression of  $\beta$ -galactosidase synthesis in strains carrying the *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid<sup>a</sup>.

Strain	Relevant genotype	Relative $\beta$ -galactosidase level in cells grown in			
		MM	MM+F	MM+Y	MM+W
SP1312		100	36.9	39.5	20.2
SP1313	<i>tyrR</i>	100	92.5	87.5	41.6
SP1322	<i>trpR</i>	100	46.7	—	58.4
SP1323	<i>tyrR trpR</i>	100	114.9	—	83.9

<sup>a</sup>  $\beta$ -Galactosidase activity was determined in the exponential phase after the addition of each aromatic amino acid (1 mM). MM, minimal media; F, phenylalanine; Y, tyrosine; W, tryptophan.

**Table 3.** Effect of L-tyrosine on the induction by cyclic AMP of the  $\beta$ -galactosidase synthesis from *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid in *E. coli* SP 1312.

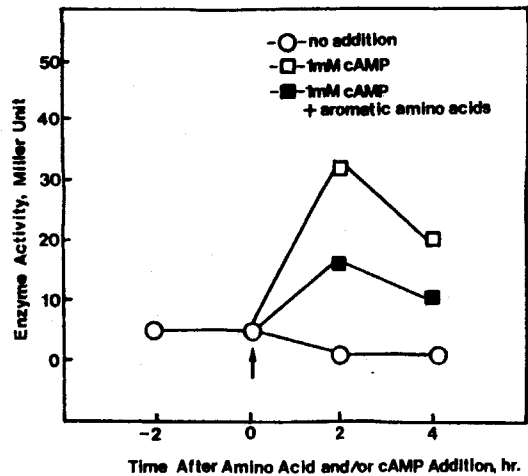
	$\beta$ -Galactosidase activity <sup>a</sup>	Relative activity
Minimal medium	2849	100
+ 1 mM tyrosine	1122	39.5
+ 1 mM tyrosine & 1 mM cAMP	1668	58.5
+ 1 mM cAMP	3066	107.6

<sup>a</sup> Results of  $\beta$ -galactosidase assays are described in Miller's units(18).

입되어 있음을 시사하고 있다. 특히 *tyrR*<sup>-</sup> *trpR*<sup>-</sup> 균주에서 억제효과가 거의 나타나지 않는 것으로 보아 이 추정은 매우 유력하다고 하겠다. 둘 혹은 세개의 방향족 아미노산을 위 네개의 isogenic strain의 배양액에 동시에 첨가한 경우에도 Table 2와 유사한 결과를 얻을 수 있었다(자료 미제시). L-tyrosine에 의한 억제에 TyrR repressor가 개입되고 있는지 여부를 보다 자세히 점검하기 위하여 pWH2를 함유한 SP1312(*tyrR*<sup>+</sup> *trpR*<sup>+</sup>) 또는 SP1313(*tyrR*<sup>-</sup> *trpR*<sup>+</sup>) 배양액에 L-tyrosine의 농도를 5 mM까지 다양하게 첨가하여 억제효과를 측정하였다(Fig. 3). *tyrR*<sup>-</sup> 균주에 비하여 *tyrR*<sup>+</sup> 균주에서 억제 효과가 뚜렷한 것으로 보아 TyrR repressor의 억제개입은 확실하다고 할 수 있다. *tyrR*<sup>-</sup> 균주에서도 어느정도 억제 효과가 나타나고 있는 것은 TrpR repressor에 의한 것으로 추정된다.

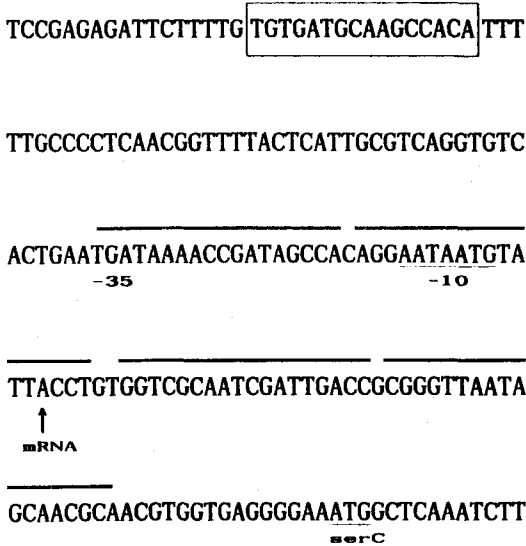
#### cAMP의 positive regulation에 대한 방향족 아미노산의 효과

본인 등은 *serC-aroA* operon의 발현이 cAMP에 의하여 증가된다는 사실을 밝힌 바 있다(15). 이와 같은 cAMP의 positive regulation에 대해 방향족 아미노산이 어떤 영향을 미치는가 알아보았다. 본 연구에서 조성된 *cya lac* 균주인 CL100에 fusion plasmid pWH2를 도입하여, 최소 배지에서 대수증식기까지 키운 다음 cAMP를 단독 혹은 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp)과 병용 첨가하여 배양된 세



**Fig. 4.** The induction of  $\beta$ -galactosidase synthesis by cAMP addition in the  $\beta$ -galactosidase-deficient *cya* strain (CL100) carrying a *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid grown in M9 minimal medium. During exponential growth, the culture was split(marked by an arrow), and cAMP(1 mM) and/or aromatic amino acids(Phe, Trp, Tyr) were added.

포들의  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정된 결과, 방향족 아미노산은 cAMP에 의한 *serC-aroA* operon의 발현 상승 효과를 현저하게 감소시키고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). *cya*<sup>+</sup> *tyrR*<sup>+</sup> *trpR*<sup>+</sup> *lac*<sup>-</sup> 균주인 SP1312에 pWH2를 도입하여 대수 증식기까지 키운 배양액에 cAMP를 단독 혹은 L-tyrosine과 병용 첨가하여  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다(Table 3). 이 경우에도 역시 L-tyrosine은 cAMP에 의한 상승 효과를 억제하였다. CL100/pWH2의 경우, SP1312/pWH2 균주에 비해  $\beta$ -galactosidase 활성의 basal level이 매우 낮았으며 cAMP 첨가에 의한  $\beta$ -galactosidase 활성의 상대적 증가는 현저하였다(Fig. 4, Table 3). CL100/pWH2가 낮은  $\beta$ -galactosidase 수준을 보이는 것은 CL100이 cAMP의 합성이 저해되는 *cya*<sup>-</sup> 균주이기 때문에 pWH2로부터 *aroA-lacZ* 융합유전자의 발현이 매우 낮게 일어난 결과(15)라고 여겨지며,



**Fig. 5.** The nucleotide sequence(7) of the promoter-regulatory region of the *E. coli* mixed-function *serC-aroA* operon. The transcriptional initiation site is indicated by an arrow, and the corresponding -10 and -35 regions are underlined. The location of potential binding site for cAMP-CRP complex is marked by a box. The plausible TyrR boxes are marked by double lines on the upper side.

cAMP가 첨가된 경우에는 cAMP가 융합유전자의 발현을 증가(15)시켜 cAMP가 첨가되지 않은 경우에 비해 상대적으로 발현이 뚜렷하게 증가되었다고 볼 수 있다. 한편, SP1312/pWH2는 *cya*<sup>+</sup>이기 때문에 세포질내에 이미 충분한 양의 cAMP가 존재하여 β-galactosidase 활성이 CL100/pWH2보다 높았으나, cAMP의 첨가는 세포내에 이미 cAMP의 양이 충분하기 때문에 cAMP가 첨가되지 않은 경우에 비해 융합유전자의 발현에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 보인다.

**TyrR box의 추정**

본 연구에서 *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid로부터의 β-galactosidase 합성이 방향족 아미노산인 phenylalanine, tyrosine 및 tryptophan의 첨가로 억제됨이 밝혀졌다. 이 억제 효과는 *tyrR* 균주나 *trpR* 균주에서 감소하여, 억제 기전에 TyrR이나 TrpR 단백질이 관여됨이 시사되었다. 방향족 아미노산의 합성과 흡수에 관여하는 효소와 단백질들을 encoding하는 많은 유전자들의 발현이 *tyrR* 유전자 산물인 TyrR 단백질에 의하여 조절된다고 알려지고 있다(1, 5, 12, 21, 22). 예를 들면, *aroG*의 전사는 과잉의 phenylalanine과 tryptophan의 존재하에서 TyrR 단백질에 의하여 억제된다(2). 이와 관련하여 *serC-aroA* operon의 pro-

oter region에는 가능한 4개의 TyrR box가 존재하고 있음이 확인되었다(Fig 5). 이 4개의 box는 promoter와 중첩되거나 mRNA의 전사시작부위에 존재하며 TyrR box의 consensus sequence인 TGTA-AAN<sub>6</sub>TTTACA와 약 70%의 homology를 보이고 있다. 따라서 이들은 방향족 아미노산에 의한 작용 기작에 개입되어 이 operon에 억제 효과를 나타내는 것 같다고 사료된다. 본 연구에서 밝혀진 방향족 아미노산에 의한 *serC-aroA* operon의 발현 억제 효과의 명확한 기전은 파악하기 위해서는 footprinting, gel mobility assay, site-directed mutagenesis 등 여러 가지 실험들이 수행되어야 할 것이다.

**감사의 말**

이 연구는 1992년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 수행되었음.

**참 고 문 헌**

1. Anderews, A.E., B. Dickson, B. Lawley, C. Cobbett, and A.J. Pittard, 1991. Importance of the position of TYR R boxes for repression and activation of the *tyrP* and *aroF* genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 5079-5085.
2. Baseggio, N., W.D. Davies, and B.E. Davidson, 1990. Identification of the promoter, operator, and 5' and 3' ends of the mRNA of the *Escherichia coli* K-12 gene *aroG*. *J. Bacteriol.* **172**, 2547-2557.
3. Casadaban, M.J., A. Martinez-Arias, S.K. Shapira, and J. Chou, 1983. β-Galactosidase gene fusions for analyzing gene expression in *Escherichia coli* and yeast. *Methods Enzymol.* **100**, 293-308.
4. Charles, I.G., J.W. Keyte, W.J. Brammar, M. Smith, and A.R. Hawkins, 1986. The isolation and nucleotide sequence of the complex AROM locus of *Aspergillus nidulans*. *Nucl. Acids Res.* **14**, 2201-2213.
5. Cui, J. and R.L. Somerville, 1993. A mutational analysis of the structural basis for transcriptional activation and monomer-monomer interaction in the TyrR system of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**, 1777-1784.
6. Duncan, K., A. Lewendon, and J.R. Coggins, 1984. The purification of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **165**, 121-127.
7. Duncan, K. and J.R. Coggins, 1986. The *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*: A mixed function operon encoding enzymes from two different amino acid biosynthetic pathways. *Biochem. J.* **234**, 49-57.
8. Duncan, K., R.M. Edwards, and J.R. Coggins, 1987. The penta-functional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of mono-functional domains. *Biochem. J.* **246**, 375-386.
9. Garbe, T., C. Jones, I. Charles, G. Dougan, and

- D. Young, 1990. Cloning and characterization of the *aroA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **172**, 6774-6782.
10. Grasser, C.S., J.A. Winter, C.M. Hironaka, and D.M. Shah, 1988. Structure, expression and evolution of the 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase genes of petunia and tomato. *J. Biol. Chem.* **263**, 4280-4289.
11. Griffin, H.G. and A.M. Griffin, 1991. Cloning and DNA sequence analysis of the *serC-aroA* operon from *Salmonella gallinarum*: Evolutionary relationships between the prokaryotic and eukaryotic *aroA*-encoded enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 113-121.
12. Heatwole, V.M. and R.L. Somerville, 1992. Synergism between the Trp repressor in repression of the *aroL* promoter of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **174**, 331-335.
13. Hoiseth, S.K. and B.A.D. Stocker, 1985. Genes *aroA* and *serC* of *Salmonella typhimurium* constitute an operon. *J. Bacteriol.* **163**, 355-361.
14. Lim, C.-J. and W. Hwang, 1990. Cloning, expression, and fusion of the *serC-aroA* operon of *Escherichia coli*. *J. Sci. & Technol. (KNU)* **29**, 62-71.
15. Lim, C.-J., W. Hwang, E.-H. Park, and J.A. Fuchs, 1993. Cyclic AMP-dependent expression of *Escherichia coli serC-aroA* operon. *Biochim. Biophys. Acta* (submitted).
16. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
17. Maskell, D.J., P. Morrissey, and G. Dougan, 1988. Cloning and nucleotide sequence of the *aroA* gene of *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **170**, 2467-2471.
18. Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics, p.352-355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
19. O'Gaora, P., D. Maskell, D. Coleman, M. Cafferkey, and G. Dougan, 1989. Cloning and characterization of the *serC* and *aroA* genes of *Yersinia enterocolitica*, and construction of an *aroA* mutant. *Gene* **84**, 23-30.
20. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor.
21. Sarsero, J.P., P.J. Wookey, and A.J. Pittard, 1991. Regulation of expression of the *Escherichia coli* K-12 *mtr* gene by TyrR protein and Trp repressor. *J. Bacteriol.* **173**, 4133-4143.
22. Yang, J., S. Ganesan, J. Sarsero, and A.J. Pittard, 1993. A genetic analysis of various functions of the TyrR protein of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 1767-1776.

(Received December 23, 1993)

(Accepted January 28, 1994)

---

**ABSTRACT: Repression of *Escherichia coli serC-aroA* Operon by Aromatic Amino Acids**

Hwang, Woogil, Jae Hoon Sa, Kyunghoon Kim<sup>1\*</sup>, and Chang-Jin Lim  
(Department of Biochemistry and <sup>1</sup>Department of Biology, College of Natural Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea)

The *Escherichia coli aroA* and *serC* genes constitute a mixed-function operon which involves in two different amino acid biosynthetic pathways. The regulation of expression of *serC-aroA* operon was evaluated through the use of a *serC-aroA-lacZ* fusion plasmid pWH2. The expression of the *serC-aroA* operon was decreased by aromatic amino acids such as tyrosine, tryptophan, and phenylalanine. The repressible effects were diminished in *E. coli tyrR* or *trpR* strain, indicating the involvement of TyrR or TrpR protein in the repression. Tyrosine was competitive with cAMP in the influence on the expression of the *serC-aroA* operon. From these data, it was suggested that the *serC-aroA* operon is controlled by aromatic amino acids in a negative manner.