

*Kluyveromyces fragilis*의 Alkaline Phosphatase 유전자의 *E. coli* 및 *S. cerevisiae*에서의 발현

박수영 · 황선갑 · 이동선 · 김종국 · 남주현¹ · 홍순덕*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과

¹대구공업전문대학 식품공업과

Expression of Alkaline Phosphatase Gene from *Kluyveromyces fragilis* in *E. coli* and *S. cerevisiae*

Soo-Young Park, Seon-Kap Hwang, Dong-Sun Lee, Jong-Guk Kim,
Joo-Hyun Nam¹ and Soon-Duck Hong*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,

Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

¹Taegu Technical Junior College, Taegu, Korea

Abstract — The alkaline phosphatase (K-ALPase) gene of *Kluyveromyces fragilis* has been cloned (1) and determined its base sequences (2) previously in our laboratory. When the K-ALPase gene was expressed in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, it showed a constitutive activity in *E. coli*, and a derepressed activity in *S. cerevisiae* in phosphate-limited medium. Northern hybridization experiment was performed to elucidate the transcription level of the K-ALPase gene. Northern experiment showed that transcription level of K-ALPase gene in *S. cerevisiae* was higher in phosphate depletion, but it was higher in high phosphate medium than in phosphate limited medium in *K. fragilis*. The transcription initiation site of the K-ALPase gene was determined by primer extension analysis. It matched nucleotide position -169 in relation to the putative translational start site.

Phosphatase는 인산 ester 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로서 이들은 작용 최적 pH에 따라 acid phosphatase와 alkaline phosphatase로 분류되며, alkaline phosphatase(ALPase)는 여러가지 생물의 다양한 조직에 존재한다는 사실이 알려져 있다. 효모에서 acid phosphatase(EC 3.1.3.2)는 세포내 periplasm에 존재하는 glycosylation 된 형태의 효소이고(3), 이에 반해 ALPase(EC 3.1.3.1)는 주로 vacuole과 cytoplasm에서 발견되며(4), 당사는 asparagine(Asn)에 N-acetylglucosamine(GlcNac) 두 분자가 결합되고 이어서 복수개의 mannose가 결합된 형태의 glycoprotein으로 알려져 있다(5). *S. cerevisiae*의 세포추출물에서는 두 종류의 ALPase가 발견되었는데, 하나는 *PHO13*에 의해 코드되는 p-nitrophenyl phosphatase이고, 다른 한가지는 무기인산염에 의해 억제를 받는

non-specific phosphatase이다(6, 7). 이러한 non-specific ALPase는 분자량 약 90,000 dalton 정도의 glycoprotein이며, 4번 염색체상의 *PHO8* 유전자에 의해 코드되어진다. Oshima 그룹에 의해 *S. cerevisiae*의 ALPase 전사조절 유전자가 연구되어 졌고(7) 그 염기배열이 밝혀진 바 있다(8). 한편, *E. coli*의 ALPase는 단일의 *phoA* 구조유전자에 의해 코드되며 mature 형태로 periplasmic space에 존재한다(9).

E. coli 및 *S. cerevisiae*에서는 ALPase에 관하여 많은 연구가 수행되어 왔으며, 최근에 와서는 *E. coli*의 ALPase 유전자(*phoA*)가 expression vector의 융합 유전자로 사용되고 있다. 또한, 그 유전자는 분비성 단백질과 융합되어 단백질의 sorting 및 분비기작 연구에도 이용되고 있다(10).

본 연구에서는 효모이면서도 단백질의 세포외 분비능이 우수하다고 보고되어 있는 *Kluyveromyces fragilis*의 인산대사에서의 ALPase의 기능 및 조절기구를 밝히기 위한 기초자료를 얻기 위하여 이미 clon-

Key words: *K. fragilis*, alkaline phosphatase, gene expression

*Corresponding author

ing 되어(1) 그 염기배열이 모두 밝혀져 있는(2) *K. fragilis*의 ALPase(K-ALPase) 유전자에 대한 발현양상을 연구하고 전사개시점에 대한 검색과 *S. cerevisiae*에서와 *E. coli*에서의 발현수준을 밝히는 실험을 행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용된 균주로는 ALPase를 생산하는 효모 *K. fragilis* Y610과 형질전환 host로서 *E. coli* YK537과 효모 *S. cerevisiae* NA79-10C를 사용하였으며, pSKH201과 pSKH101(1)을 plasmid DNA로 사용하였다. Table 1은 본 실험에 사용된 균주와 plasmid를 나타낸다.

배지

효모 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae* 균주의 일반적인 배양에는 YEPD(2.0% Bacto-tryptone, 1.0% Bacto-yeast extract, 2.0% Dextrose) 배지를, *E. coli*의 배양에는 Luria Broth(LB ; 1.0% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1.0% NaCl) 배지를 이용하였다. *E. coli* YK537 형질전환체에 대한 선택배지로는 ampicillin 함유 LB 배지(ALB + 100 µg/ml ampicillin)가 사용되었고, 효모 *S. cerevisiae* 형질전환체의 선택배지로는 Yeast Minimal Medium(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2.0% glucose, 2.0% agar, 50 µg/ml의 요구 아미노산 ; histidine, tryptopan 및 leucine) 배지를 사용하였다. *E. coli* YK537은 MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid) 배지(11)에

서 배양하였는데 MOPS buffer에 최소배지(0.2% glucose, 최소염 용액) 및 0.1% amino acid mixture를 넣고, 인산염은 KH_2PO_4 로서 10 mM 및 0.1 mM 두가지 농도를 사용하였다. 효모용 최소배지로는 Burkholder(BK) 배지(12)에 KH_2PO_4 가 각각 15 mM 및 0.15 mM 되도록 첨가하여 사용하였다.

효소 및 시약

대부분의 제한효소 및 AMV Reverse transcriptase, RNase A, Alkaline phosphatase, Zymolyase 등은 KOSCO biotech 또는 Boehringer-Mannheim 사로부터 구입하였으며, X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), IPTG(isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside), MOPS(4-morpholine propane sulfonic acid) 및 Tricine 등은 Sigma 또는 Merck 사로부터 구입하였다.

Primer extension에서의 염기배열결정에는 T₇ Sequencing™ Kit(Pharmacia 사)를 사용하였으며, Random primed labelling kit는 Boehringer-Mannheim 사의 제품을 사용하였다. 방사선 동위원소(α -[³⁵S]-dATP, α -[³⁵S]-dCTP, α -[³²P]-dCTP, γ -[³²P]-dATP)와 autoradiography film(Hyperfilm-³H)은 Amersham 사로부터 구입하여 사용하였다. 기타의 시약 및 효소류는 일반 시약상으로부터 구입한 reagent grade를 이용하였다.

DNA 조작 및 형질전환

*E. coli*로부터 plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 법(13)에 따라 행하였으며, *E. coli*의 형질전환은 Maniatis 등의 CaCl_2 방법(13)으로 행하였다. 효모의 형

Table 1. List of strains and plasmids used in this study

Strains	Genotypes or Phenotypes	Sources
<i>E. coli</i> JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ (lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al. (1985)
YK537	<i>F⁻ supE44 hsdR hsdM recA1 phoA8 leuB6 thi lacY rpsL20 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 endI⁻</i>	K. Yoda (1988)
<i>K. fragilis</i> Y610	wild type	K. Yoda (1988)
<i>S. cerevisiae</i> NA79-10C	α <i>pho8-2 leu2 trp1 his3</i>	K. Yoda (1988)
Plasmids		
pSKH101	Ap ^r 3.2 Kb ALPase/pHN114	Hwang et al (1990)
pSKH201	Ap ^r 3.2 Kb ALPase/pUC19	Hwang et al (1990)

질전환은 Das(14) 법으로 행하였으며 plasmid는 Cr-
yer 등(15)의 방법으로 분리하였다.

배양 및 효소활성 측정

E. coli YK537은 MOPS 배지(인산농도 각각 10 mM, 0.1 mM)에서 12시간 배양 후 TM buffer(10 mM Tris pH 8.6, 1 mM MgCl₂)로 세척하고 초음파 처리로 세포를 파쇄하여 10,000×g에서 10분간 원심분리한 후 그 상등액을 효소액으로 사용하였다. *K. fragilis*와 *S. cerevisiae* NA79-10C는 Burkholder 배지(인산농도 각각 15 mM, 0.15 mM)에 14시간 배양 후 TM buffer로 씻고 zymolyase와 glass bead를 이용해 파쇄한 다음 그 상등액을 효소액으로 사용하였다.

배지내 인산농도는 ascorbic acid 환원법을 이용하여 측정하였다. 반응에 사용된 reagent는 6 N sulfuric acid, ddH₂O, 10% ascorbic acid 용액 및 2.5% ammonium molybdate 용액을 1:2:1:1 비율로 섞어 조제하였고, 37°C에서 2시간 sample과 반응시킨 후 820 nm에서 흡광도로써 정량하였다.

ALPase의 활성측정법은 Onish 등(5)의 방법을 약간 변형시켜 측정하였다. 효소반응 buffer로는 8 ml의 0.1 M Tris-Cl(pH 8.6)에 0.1 ml의 기질 10 mM p-nitrophenyl phosphate(PNPP)를 사용하였고 여기에 효소액 0.1 ml를 넣고 50°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N NaOH 0.5 ml로 반응을 종결시켰다. 반응 종결된 sample은 410 nm에서의 흡광도로 정량하였고 활성 1 unit는 50°C에서 1분간 반응시켰을 때 1 µg PNPP를 분해시키는데 필요한 효소량으로 정의하였다. 단백질의 농도는 Lowry 등(16)의 방법에 따라 bovine serum albumin을 기준으로 하여 결정하였다.

효소 localization

효소의 localization은 Manfred(17)의 방법으로 행하였다. 세균 집균 후 상등액은 extracellular type sample로 취해 두고, 집균된 세포는 protoplast buffer (25% sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0)에 현탁한 후 lysozyme과 EDTA를 처리하여 protoplast화 시켰다. 이의 상등액은 periplasmic fraction으로 두고, 나머지 protoplast화 된 세포들은 sonication으로 파쇄한 뒤 상등액을 cytoplasmic sample로 모아 이 3 종류의 효소액에 대해 활성측정을 행하였다.

RNA 조제

효모의 RNA 추출은 Trumppower 방법(18)의 변형으로 행하였다. 각 배지에서 배양한 균체를 diethylpyrocarbonate(DEPC)로 처리한 물로 씻고 AE buffer

(50 mM Na-acetate, pH 5.3, 10 mM EDTA)에 현탁하여 여기에 10% SDS를 첨가한 후 AE-saturated phenol로 65°C에서 4분간 처리를 한 다음 급냉시켜 세포를 파쇄하였다. 파쇄액의 상등액을 ethanol로 침전시켜 total RNA를 얻을 수 있었고 최종적으로 260 nm에서의 흡광도로써 정량하였다.

Northern Hybridization

*K. fragilis*와 *S. cerevisiae*로부터 추출한 RNA 10 µg을 2.2 M formamide를 함유하는 1.0% agarose gel을 사용하여 4°C에서 3시간 동안 전기영동한 후 nylon membrane에 transfer 하였다(19). Alkaline phosphatase DNA 단편과의 hybridization solution(5×SSPE, 5×Dehnhart's solution, 50 µg/ml denatured herring sperm DNA, 0.1% SDS, 50% formamide)으로 42°C에서 행하였고, 2×SSC를 함유한 0.1% SDS에서 15분씩 2회 세척한 후 0.25×SSC를 함유한 0.1% SDS에서 15분씩 2회 세척한 후 autoradiography를 행하였다.

Primer extension

mRNA의 전사개시부위를 결정하기 위해 primer extension 실험을 행하였다(19). K-ALPase 염기배열 124-140에 상응하는 합성 oligomer primer(Fig. 2)의 labelling에는 γ-[³²P]-dATP와 T4 polynucleotide kinase를 이용하였고, *K. fragilis* total RNA 30 µg을 ³²P-labelled oligonucleotide primer와 95°C에서 30초간 denaturation 시킨 후 30°C에서 14시간 동안 annealing 시켰다. 여기에 reverse transcriptase와 4종류의 dNTP를 넣고 cDNA를 형성시킨 다음, 37°C에서 RNase A를 30분간 처리하고 sequencing gel에서 전기영동하여 autoradiography로 확인하였다.

결과 및 고찰

K-ALPase 유전자의 대장균에서의 발현

대장균에서의 K-ALPase 유전자의 발현이 배지내의 무기인산에 의해 영향을 받는 지를 조사하기 위해 *E. coli* YK537에 pSKH201(K-ALPase 유전자/pUC19)로 형질전환시키고, 형질전환체를 10 mM과 0.1 mM 인산 MOPS 배지에서 14시간 배양 후 집균, 파쇄하여 효소활성을 410 nm에서의 흡광도로 측정하였다. Table 2는 K-ALPase의 대장균 YK537에서의 효소활성을 나타내고 있다. 원래 대장균 ALPase 활성은 인산 결핍배지에서 유도적으로 증폭되는 것으로 알려져 있으나(20), 이 실험의 경우 형질전환된 대장균에서는

Table 2. Activity of ALPase expressed in *E. coli*

Pi*	Specific activity (units/mg)	
	YK537	YK537/pSKH201
0 mM	0	10.7×10^{-2}
10 mM	0	11.74×10^{-2}

*Concentrations of Pi from above cultures were not varied after 14 hours cultivation.

ALPase 효소가 배지내의 인산이 고갈된 후에도 구성적으로 발현됨을 알 수 있다(Table 2). 이상에서 K-ALPase 유전자는 대장균내에서 발현될 때 대장균의 ALPase 유전자의 발현과는 다른 양상을 보이고 있다. 즉 대장균내에서는 ALPase가 합성되기 위해서 PhoR과 PhoB가 활성화되어야 하는데, PhoR은 transmembrane sensor인 동시에 인산이 생육제한인자일 때 합성되며 PhoB를 인산화시킨다. 이와같이 인산화된 형태의 PhoB는 *pho* box를 인식하여 ALPase 유전자의 전사를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 여기서 K-ALPase 유전자가 인산농도에 대응하는 발현 양상의 차이점은 대장균의 ALPase 유전자의 *pho* box 구조와 상이한 구조를 가졌기 때문에 대장균의 PhoB가 K-ALPase 유전자의 *pho* box를 인산결핍시에도 효과적으로 인식할 수 없었기 때문이거나 *pho* box가 존재하지 않기 때문인 것으로 여겨진다.

K-ALPase 유전자의 *S. cerevisiae*에서의 발현

*S. cerevisiae*는 배지내 인산결핍에 따라 ALPase의 활성이 derepression 되는 현상을 보이는데 K-ALPase 유전자를 도입시킨 ALPase 결손주 *S. cerevisiae* NA79-10C에서의 발현 양상을 보기 위해 pSKH101(K-ALPase 유전자/pHN114)을 도입시켰다. 형질전환체는 Burkholder 배지에서 배양 후 집균 파쇄시켜 효소활성을 측정하였고, Table 3은 *S. cerevisiae* NA79-10C에서의 효소활성을 나타낸다. 형질전환된 *S. cerevisiae*에서는 배지내 인산농도가 감소함에 따라 ALPase의 활성이 derepression 됨을 볼 수 있었다. *S. cerevisiae*의 ALPase 유전자는 인산 고농도 배지에서는 *pho85*가 코딩하는 protein kinase의 homolog인 Pho85 단백질이 negative regulator인 Pho80p를 활성화시키면 활성화된 Pho80p는 Pho4p(positive factor)와 작용하여 그 기능을 저해하므로 Pho4p는 ALPase 유전자의 발현을 활성화시킬 수 없다. 반면에 인산의 농도가 충분히 낮을 때는 Pho81p(mediator)는 Pho80p의 기능을 저해하거나 Pho80p 또는 Pho85p를 활성화시키는 인산 혹은 인산유도체를 제거시켜 Pho4

Table 3. Activity of enzyme expressed in *S. cerevisiae*

Pi*	Specific activity (units/mg)		
	NA79-10C	NA79-10C/ pSKH101	<i>K. fragilis</i>
Low (0.22 mM)	0	25.55×10^{-3}	11.05×10^{-2}
High (11 mM)	0	30.05×10^{-4}	43.02×10^{-2}

*When the strains were cultured in low Pi medium for 16 hours, final concentrations of Pi were decreased to 0.006 mM by NA79-10C containing K-ALPase gene and 0 mM by *K. fragilis*.

In the case of high Pi medium in the same conditions, final concentrations of Pi were decreased to 9.38 mM by NA79-10C, 9.19 mM by NA79-10C containing K-ALPase gene and 9.28 mM by *K. fragilis*.

p로 하여금 ALPase 유전자의 전사를 수행하게 하며, *pho4*, *pho80* 및 *pho85*는 낮은 수준으로 구성적으로 전사된다는 사실이 알려져 있지만 주된 전사는 Pho4의 조절하에 있다는 사실이 보고되어 있다(21). 여기서 K-ALPase 유전자가 *S. cerevisiae*의 ALPase 유전자의 발현과 비슷한 양상을 나타내고 있는 사실로 미루어 볼 때, K-ALPase의 유전자에는 Pho4p가 결합할 수 있는 부위가 있을 것으로 생각되나 *S. cerevisiae*의 Pho4p 결합부위와 유사한 염기배열은 발견되지 않았다. 그러므로 보다 자세한 정보를 얻기 위해서는 K-ALPase 유전자의 발현시 Pho4p가 결합하는 부위를 검토할 필요가 있다고 생각된다. 한편 ALPase 유전자의 공여균주인 *K. fragilis*는 배지내 인산 고갈에 상관없이 ALPase 활성을 보이는데 오히려 고농도의 인산 존재시 조금 더 높은 효소활성을 보였다(Table 3). 이러한 사실로 미루어 볼 때 *K. fragilis* 내에서의 ALPase의 발현조절 양상은 인산농도의 변화에 대한 활성과 관련해서는 *S. cerevisiae*와는 상당히 다른 특징을 가지고 있음을 알 수 있다.

효소의 localization 결정

대장균의 repressible ALPase는 periplasm에 존재하는 효소인데, *K. fragilis*의 ALPase를 도입한 *E. coli* YK537/pSKH201을 인산결핍배지에서 배양 후 extracellular, periplasmic 그리고 cytoplasmic sample을 얻어 활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 전체 활성의 약 70%가 cytoplasmic 분획에서 나타났으며 나머지는 periplasm과 세포외의 분획에서 나타났다. Pho8에 의해 코딩되는 *S. cerevisiae*의 ALPase는 cytoplasm 내 vacuole의 효소임이 밝혀져 있는데, 실험

Table 4. Enzyme localization

Pi	strains	Activity (units/ml)		
		supernatant	periplasm	cytoplasm
0 mM	YK537/pSKH201	4.14×10^{-3} (14%)	5.5×10^{-3} (18%)	1.99×10^{-2} (67%)
10 mM	YK537/pSKH201	3.99×10^{-3} (9%)	7.61×10^{-3} (17%)	3.18×10^{-2} (73%)
0.22 mM	<i>K. fragilis</i>	7.4×10^{-3}	0.7×10^{-2}	2.9×10^{-2}

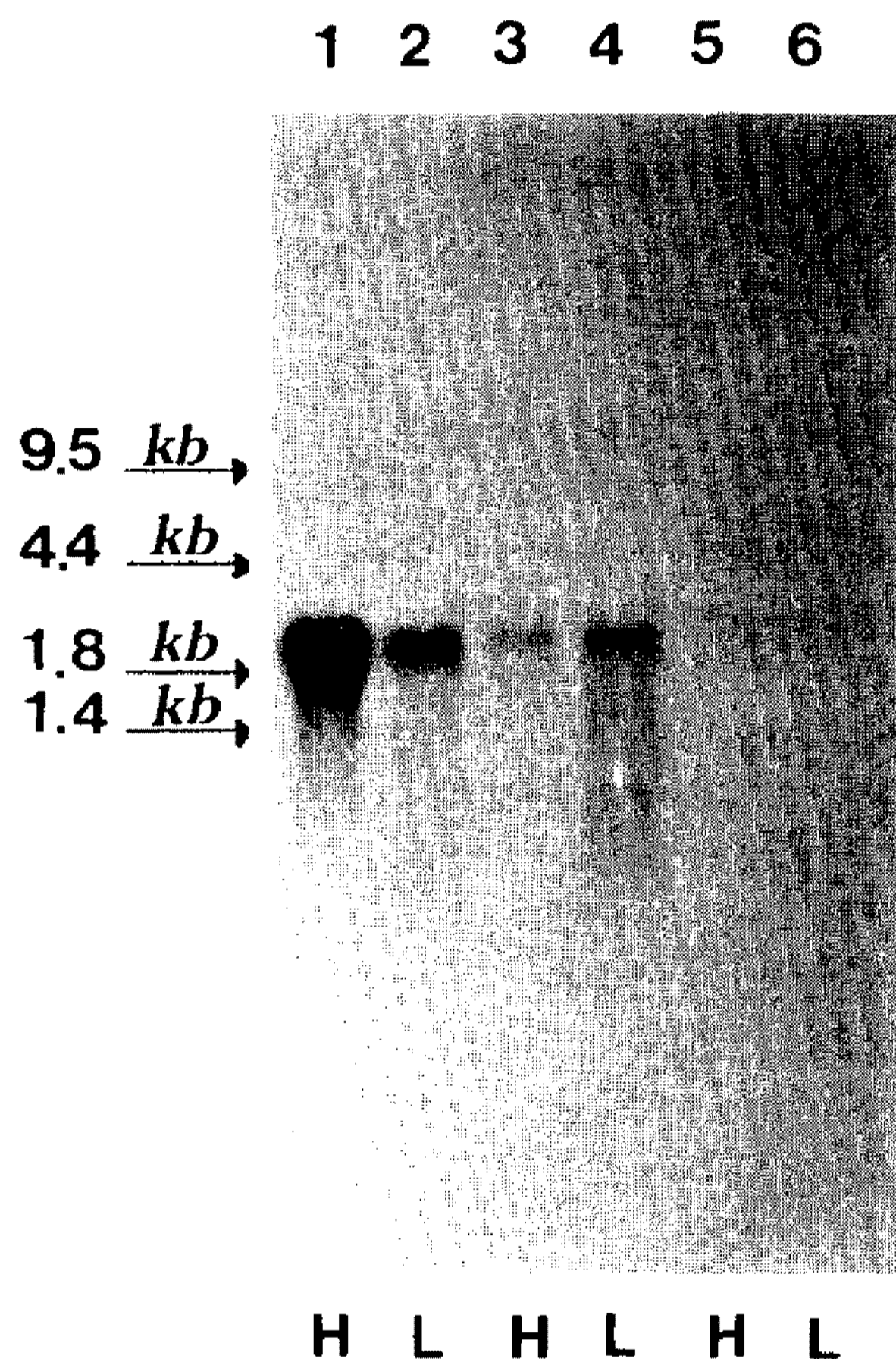


Fig. 1. Northern blot analysis of various yeast cells. Cellular RNAs from several sources were fractionated by electrophoresis on a 1.2% agarose gel containing 2.2 M formaldehyde, transferred to nylon membrane and hybridized to 32 P-labeled DNA probe (1.5 kb EcoRI-XbaI fragment of K-ALPase gene).

Lane 1 and 2 contain 10 μ g total cellular RNA prepared from *K. fragilis*. Lane 3 and 4 contain 10 μ g total cellular RNA from *S. cerevisiae* NA79-10C/pSKH102. Lane 5 and 6 contain total cellular RNA from *S. cerevisiae* NA79-10C. Lane 1, 3 and 5 contain RNAs prepared from the cells cultured in 15 mM-phosphate medium (H) and lane 2, 4 and 6 contain RNAs prepared from the cells cultured in 0.15 mM phosphate medium. Molecular weight of RNA was determined with commercial RNA size marker.

결과 *K. fragilis*의 ALPase 활성은 대부분 cytoplasm에서 나타나고 있다.

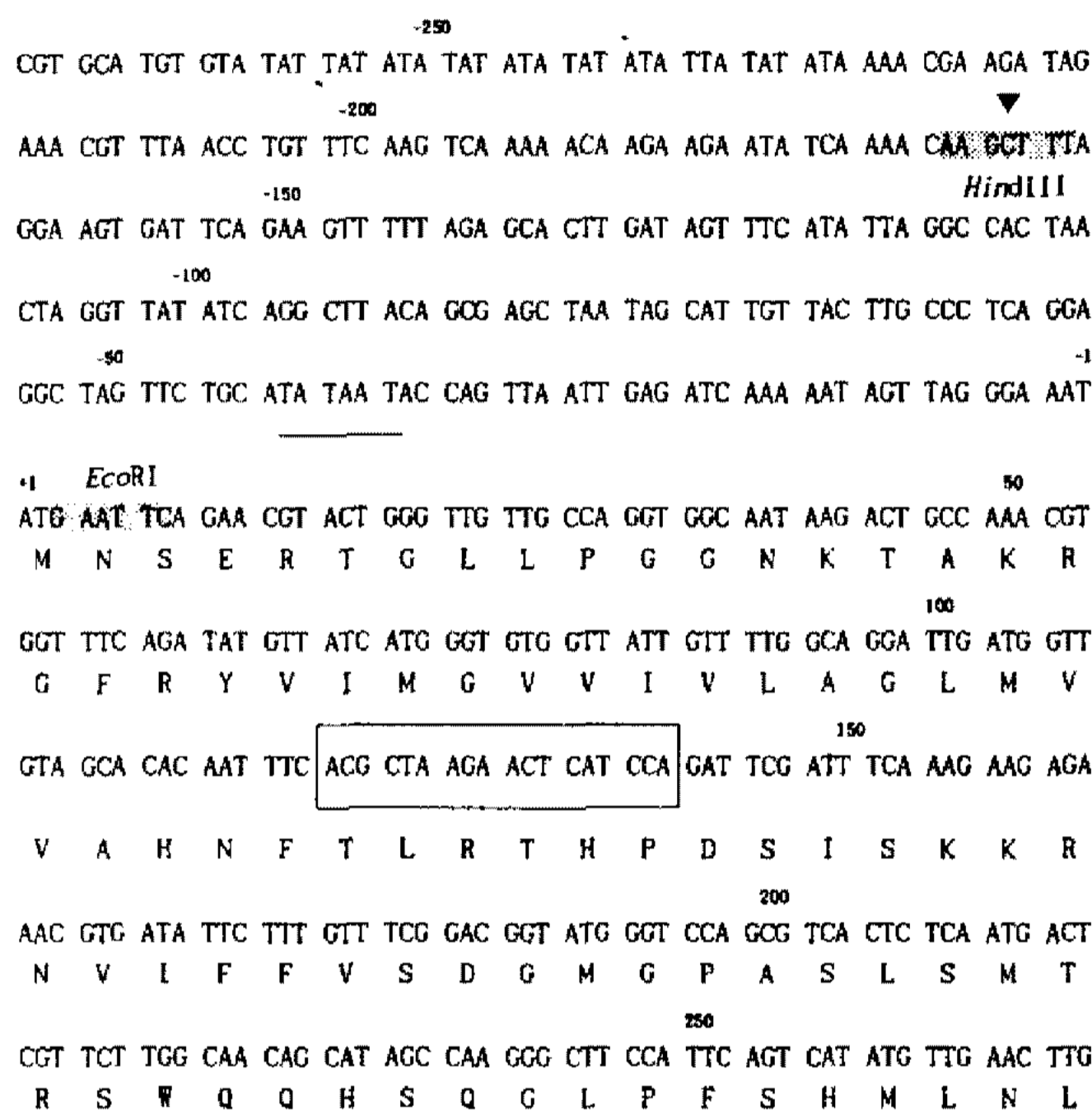


Fig. 2. Nucleotide sequence of the oligonucleotide primer used for primer extension in K-ALPase gene of *K. fragilis*.

TATA-like sequence is underlined. Oligonucleotide primer complementary to nucleotide position from +124 to +140 are shown with bold nucleotides. Arrowhead denotes the position of transcription start site. The location of the deduced translation start site is denoted as +1.

Northern Hybridization

K-ALPase 유전자의 발현양상 검색을 위해 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae*로부터 추출한 RNA 10 μ g과 K-ALPase 유전자의 제한효소 단편(EcoRI-XbaI, 1.45 Kb)을 probe로써서 northern hybridization 실험을 행하였다. 각각 15 mM과 0.15 mM의 인산염을 함유한 BK 배지에서 자란 *K. fragilis*와 *S. cerevisiae* NA79-10C/pSKH101, *S. cerevisiae* NA79-10C 세 균으로부터 K-ALPase mRNA 전사 level을 확인한 결과, 각 mRNA level은 Table 2와 Table 3에서 나타난 것과 같이 각 효소활성 level과 부합함을 보였다. *K. fragilis*는 고농도 인산배지에서 좀 더 높은 전사양상을

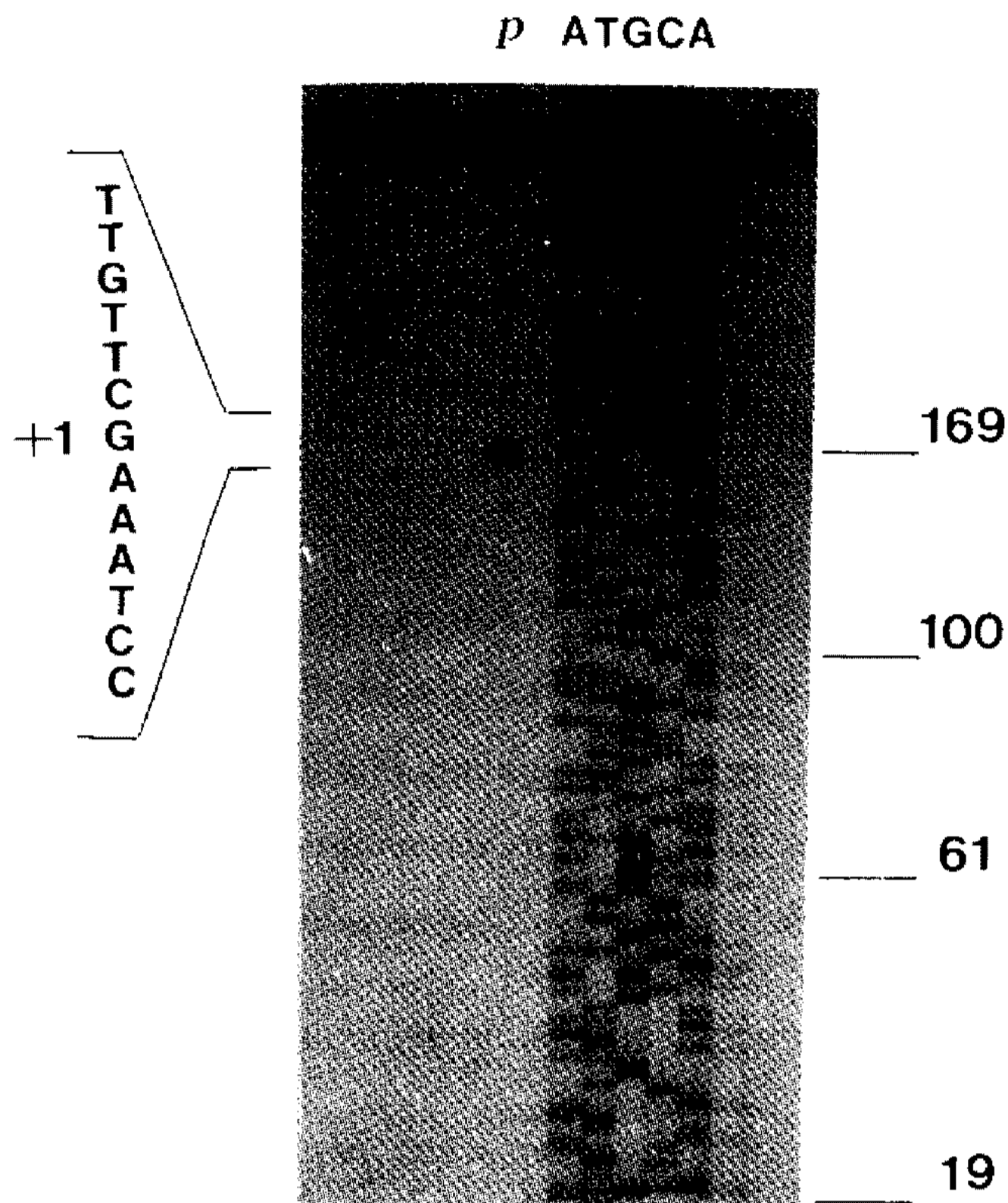


Fig. 3. Transcription initiation site mapping of the ALPase gene transcript by primer extension.

Synthetic oligonucleotide primer which was complementary to nucleotide position from 124 to 140 (Fig. 2) was annealed to 30 μ g total RNA of *K. fragilis* and polymerization reaction was carried out with dATP, dCTP, dGTP, dTTP and reverse transcriptase. The same primer was used to determine the nucleotide sequence by Sanger's dideoxy chain termination method in a recombinant single-stranded DNA of M13 phage including the putative promoter region. The arrowhead indicates the transcriptional start site at 169bp upstream of the AUG translational initiation codon. The numbers indicates position of nucleotide residue in concordance with Fig. 2.

보이고, *S. cerevisiae* NA79-10C/pSKH101 형질전환체는 인산 고갈시 derepression 되어 더 높은 mRNA level을 보였다. Control인 *S. cerevisiae* NA79-10C에서는 signal이 나타나지 않았다(Fig. 1). 그리고 각 균주의 전사 수준은 다르지만 모두 동일한 크기의 mRNA(약 2.0 kb)로 전사됨을 알 수 있었다.

Primer extension

K-ALPase 유전자의 전사 개시점을 검색하기 위해 mRNA에 대한 primer extension 실험을 행하였다. *K. fragilis*로부터 추출한 total RNA 30 μ g에 염기배열이 밝혀져 있는(2) K-ALPase 유전자의 ATG 개시 codon 하류 124-140번 염기서열에 상응하는 17-mer 합성 oligonucleotide를 primer로 써서 anneal한 후

5'-전사개시점까지 reverse transcriptase를 이용하여 역전사를 수행하였다. Fig. 2에서 보이는 것같이, ALPase 유전자의 primer에 의한 reverse transcript는 ATG 개시 codon으로부터 상류 -169번 염기인 C-residue에서 우세하게 종결됨을 알 수 있다(Fig. 3). 염기배열결정 gel 상에서는 mRNA의 상보적인 strand의 배열이 나타나 있으므로 +1 G로 표시된 부분은 실제 mRNA 상에서는 C 잔기임을 알 수 있다(나머지는 실험상의 비특이적인 band로 보인다). *S. cerevisiae*에서 *pho8*에 의해 코드되는 repressible ALPase 유전자는 인산 고갈시 주요 전사 개시점이 번역 개시 codon ATG 상류 -32번 염기로 밝혀져 있고 나머지 몇 개의 minor 한 전사 개시점도 그 주변에 존재하는 것으로 알려져 있다.

요 약

본 연구실에서 이미 클로닝하여 염기배열을 결정한 바 있는 *Kluyveromyces fragilis*의 ALPase 유전자의 발현연구를 위해 이 유전자를 *E. coli* YK537과 *S. cerevisiae* NA79-10C에 형질전환시켜 인산염이 고갈된 배지에서 그 발현을 관찰하였다. 그 결과 *E. coli*에서는 구성적인 효소활성을 나타내었고, *S. cerevisiae*에서는 효소활성이 derepression 됨을 관찰하였다. 한편, ALPase 유전자의 전사수준을 규명하기 위해 Northern hybridization 실험을 행하였으며, 전사개시부위를 알기 위해서 primer extension 분석을 행하였다. Northern hybridization 결과, K-ALPase 유전자의 전사는 *K. fragilis* 자신에서는 인산 고갈에 상관없이 구성적인 발현양상을 보였고 K-ALPase 유전자를 도입한 *S. cerevisiae*는 인산 고갈시 유전자 발현이 derepression 되는 양상을 보였으며, 이들 모두는 효소 활성 측정 결과와도 부합하였다. Primer extension 실험결과, K-ALPase 유전자의 전사는 최초의 ATG codon으로부터 상류 -169번 염기인 C residue에서 시작됨이 밝혀졌다.

감사의 글

본 연구는 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술 연구조성비에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hwang, S.K., T.K. Kwon, J.G. Kim, J.H. Nam, S.D. Hong, and J.H. Seu. 1992. Cloning of the

- alkaline phosphatase gene from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**(4): 237-242.
2. Park, S.Y., J.G. Kim, and S.D. Hong. 1994. Structural analysis of Alkaline phosphatase gene from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 31-36.
 3. Arnold, W.L. 1972. Location of alkaline phosphatase and β -fructofuranosidase within yeast cell envelope. *J. Bacteriol.* **112**: 1346-1352.
 4. Wiemken, A., M. Schellenberg, and K. Ureck. 1979. Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*S. cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* **123**: 23-35.
 5. Onishi, H.R., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase: formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* **254**: 11943-11952.
 6. Attias, J. and J.L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphatase activity from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**: 422-430.
 7. Toh-E, A., H. Nakamura, and Y. Oshima. 1976. A gene controlling the synthesis of non-specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **428**: 182-192.
 8. Yoshinobu, K., H. Nayashi, T. Akio, B. Isao, and Y. Oshima. 1987. Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *S. cerevisiae*. *Gene* **58**: 137-148.
 9. Malamy, M. and B. Horecker. 1961. The localization of alkaline phosphatase in *E. coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**: 104-108.
 10. Wongi, S. and A.J. Shatkin. 1993. Membrane topology model of *E. coli* α -ketoglutarate permease by *phoA* fusion analysis. *J. Bacteriol.* **175**: 565-567.
 11. Neidhardt, F.C., P.L. Bloch, and D.F. Smith. 1974. Culture medium for *Enterobacteria*. *J. Bacteriol.* **119**: 736.
 12. Oshima, Y., J.N. Strathern, E.W. Jone, and J.R. Broach. 1982. The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Metabolism and Gene Expression. Cold spring Harbor, NY, Pp. 117-147.
 13. Maniatis, M., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
 14. Das, S., E. Kellermann, and C.P. Hollenberg. 1984. Transformation of *K. fragilis*. *J. Bacteriol.* **158**: 1165-1167.
 15. Cryer, D.R., R. Eccleshall, and J. Marrnur. 1975. In D.M. Prescott, Methods in Cell Biology, vol. 12, Academic Press, New York, 39-49.
 16. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 17. Manfred, A. and B. Winfried. 1980. Co-regulation in *E. coli* of a novel transport system for sn-Glycerol-3-phosphate and membrane protein. *J. Bacteriol.* **143**: 142-150.
 18. Trumppower, B.L., E.S. Mark, and A.B. Timothy. 1990. A rapid and simple method of preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic. Acid. Res.* **18**: 3091-3092.
 19. Fredrick, M.A., B. Roper, and S. Kevin. 1989. Current protocols in Molecular Biology. Unit 13-12.
 20. Torriani-Gorini, A. 1994. The Pho regulon of *Escherichia coli*. In Phosphate in Microorganisms. ASM press, Pp. 1-4.
 21. Ogawa, N., N. Hayashi, H. Saito, K.-E. Noguchi, Y. Yamashita, and Y. Oshima. 1994. Regulatory Circuit for Phosphatase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Specific *cis*-Acting Sites in *PHO* Promoters for Binding the Positive Regulator Pho4p. In Phosphate in Microorganisms. ASM press, Pp. 56-62.

(Received 18 March 1994)