

병원성장내세균에서 *phoP-phoQ* operon의 지배를 받는 *phoA* 유전자의 cloning 및 염기서열결정

영남대학교 의과대학 미생물학교실

김성광 · 이태운

서 론

Regulon이란 보존된 특이한 DNA sequence를 promoter에 가지고 있어 전사촉진인자인 동일한 조절 단백질에 의하여 그 전사가 조절되는 일련의 유전자군을 일컫는다. 이러한 regulon의 핵심적인 유전자산물들 중의 하나가 환경자극을 인지하는 sensor 단백질과 그 자극을 받아들여 휘하의 유전자들의 발현을 조절하는 regulator 단백질이다. 대부분의 경우 이들 sensor/regulator 짝은 regulator 유전자가 5'에 위치하고 약간의 spacer sequence를 두고 바로 3'쪽에 sensor 유전자가 위치하는 하나의 operon으로 구성되어 있으며 이 operon의 promoter 역시 regulator 단백질의 조절을 받는 자가조절(autoregulation)의 특징을 가지고 있다. Sensor 단백질은 환경변화를 인지하여 그 신호를 regulator 단백질에 전달하는데 대부분의 경우 인산화과정을 통하여 이 신호전달이 이루어짐이 보고되었다. 이와같이 환경변화를 인지하는 sensor군과 이 sensor의 정보를 받아서 하위의 유전자군들에 전달하는 regulator군으로 구성되어

환경변화에 대처하는 system을 two-component regulatory system이라고 부른다.

인간에게 typhoid fever, 위장관염 등을 일으키는 *Salmonella typhi* 병원성 연구의 model로 사용되는 *Salmonella typhimurium*은 쥐에서 이러한 질병을 일으키는 세균으로 인산결핍을 포함한 환경자극에 의하여 그 발현이 촉진되는 two-component regulatory system인 *phoQ/phoP*를 가지고 있다.^{1,2,3)} 이 *phoQ/phoP*가 세균의 intracellular survival에 공헌하여 세균의 병원성을 갖게 하는 유전자임이 알려짐에 따라 two-component regulatory system은 병원성 세균에서는 그 병원성을 발현시키는 조절유전자로서 숙주의 면역방어체계라는 환경에 대응하여 싸우고 있음이 밝혀졌다. 또한 *phoP*가 지배하는 유전자중의 하나가 *phoA*로서 본 연구에서는 이와 같이 병원성에 관여하는 two-component regulatory systems에 의해 조절되는 *Klebsiella pneumoniae*의 *phoA* 유전자의 염기서열을 결정하여 이를 *Escherichia coli*의 *phoA*와 비교하여 보았다.

본 연구는 1994년도 천마의학연구재단 학술연구조성비 지원에 의해 이루어졌음.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 균주: Transformation을 위하여 *Escherichia coli* MC1066균주를, *phoA* 유전자의 클로닝을 위하여 *Klebsiella pneumoniae* 균주를 사용하였다.

(2) Plasmids: probe로 사용할 *phoA*를 포함하는 plasmid는 일본 오오사카대학 미생물병연구소의 Hideo Shinagawa교수로부터 분양받아 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 염색체 DNA의 분리: 각 세균은 30 ml의 Luria-Bertani(LB)배지에서 37°C로 하루밤 진탕배양한 후 4°C에서 7,000 rpm으로 10분간 원침하여 세포를 수집하였다. 세척완충액(30mM Tris, 10mM NaCl)으로 세척한 후 다시 원침하였다. Proteinase K digestion buffer(0.1M NaCl, 0.2M EDTA, pH 8.5)에 부유시킨 후 10mg의 proteinase K를 가하여 잘 섞어준 다음 37°C 수조에서 30분간 방치하였다. 1M Tris(pH 9.0) 1.1 ml과 10% SDS 1.1 ml을 가한 후 부드럽게 섞어 주었다. 42°C 수조에 1시간 동안 방치하면서 가끔 도립혼합하여 내용물을 섞어 주었다. 실온에서 미리 가온한 Tris-saturated phenol을 동량 가하고 부드럽게 도립혼합하여 잘 섞어준 후 60°C 수조에 1시간동안 방치하면서 가끔 부드럽게 도립진탕하여 내용물을 섞어주었다. 10,000 rpm으로 10분간 원침하여 상청액을 다시 새 시험관에 옮긴 후 상기한 phenol처리를 protein interphase가 사라질 때까지 반복하였다. 상청액을 새 시험관에 옮긴 후 0.1배 용적의 3M sodium acetate를 가하고 2배 용적의 100% ethanol을 가한 후 침전되는 DNA를 hooked pasteur pipette을 사용하여 회수하였다. 80% ethanol로 DNA를 세척한 후 건조시켰

다. 적정량 (1 내지 2 ml)의 TE(pH 7.4) 완충액을 가한 후 4°C에 방치하여 DNA를 용해시켰다.

(2) *phoA* probe의 준비: *phoA* 유전자를 포함하는 pSN310 plasmid를 사용하여 400 bp의 EcoRI 단편을 polyacrylamide gel electrophoresis 후 gel로부터 잘라내어 "crush and soak"법⁴⁾으로 DNA를 용출하여 probe로 사용하였다.

(3) *Klebsiella pneumoniae*에서 *phoA* 유전자와 유사한 DNA배열의 클로닝: *Klebsiella pneumoniae*의 염색체 DNA를 *Bam*HI으로 소화시킨 후 pACYC184에 ligation시킨 후 *phoA* probe를 enhanced chemiluminescence kit (Amersham International plc., UK)로 표식하여 colony hybridization법에 의하여 *Klebsiella pneumoniae*의 *phoA* 유전자를 클로닝하였다. 각 colony들은 nitrocellulose membrane에 옮겨 3MM 여과지에 포화시킨 denaturation buffer에 10분간 처리하고 neutralization buffer에서 다시 10분간 처리한 후, 2배 농도의 sodium salt citrate (SSC)에서 5분간 처리하였다. DNA가 transfer된 membrane은 3MM paper상에서 30분간 실온건조시킨 후 양쪽에 3장씩의 3MM 여과지를 대고 80°C 건조기내에 2시간 동안 방치하였다. Prehybridization buffer에 담구어서 vinyl bag속에 넣어 42°C 수조에 2시간 내지 3시간 동안 방치하였다. Peroxidase로 표식된 probe DNA를 넣고 37°C 수조에 18시간내지 20시간동안 방치하였다. Probe DNA가 함유된 hybridization buffer를 제거하고 6X SSC로 실온에서 3회 세척한 후 chemiluminescence signal generation반응을 진행하였다. 반응용액을 제거한 후 즉시 saran wrap으로 싸서 -70°C에서 X-ray film에 노출시켰다. 45분 후 현상하여 hybridization여부를 관찰함으로써 *phoA* 유전자를 함유하는 DNA를 클로닝하였다.

(4) DNA 염기서열결정 및 homology search:

염색체 DNA를 *Sau3AI* 제한효소로 소화시킨 후 이를 pUC18에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. DNA sequencing은 Sanger의 dideoxy chain termination법⁵⁾에 의거하여 subcloning된 이중나선 plasmid DNA를 주형으로하여 시행하였다.

우선 plasmid DNA를 변성시키기 전에 RNA를 제거하기 위하여 다음과 같은 과정을 거치었다. 3 µg의 DNA를 215 µl의 TE(pH 8.0)에 용해시켜 RNA를 제거하기 위하여 350 µl의 4M LiCl을 가한 후 얼음위에서 20분간 방치하였다. 혼합액을 원침하여 상층액에 존재하는 DNA를 phenol-chloroform-isoamyl alcohol(25 : 24 : 1, v : v)로 추출하고 isopropanol로 침전시킨 다음 18 µl의 TE (pH 7.5)에 용해시켜 DNA변성에 사용하였다. RNA를 제거한 DNA용액에 2 µl의 2M NaOH/2mM EDTA를 가한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 얼음위에 옮긴 후 10 µl의 1M sodium acetate(pH 4.5)를 가하여 혼합액을 중화시키고 4배용적의 ethanol을 가하여 DNA를 침전시켰다. 진공건조후에 7 µl의 TE(pH 7.5)에 용해시킨 후 [α -³²P]dATP 및 Sequenase kit ver 2.0 (USB, Cleveland, Oh, USA)을 사용하여 sequencing reaction을 진행하였고, BioRad(Hercules, Ca, USA)의 sequencing gel box 및 power supply를 사용하여 전기영동을 시행한 후 autoradiography를 시행하였다.

(5) DNA 염기서열 분석: 결정된 DNA 염기서열은 Macintosh 컴퓨터로 DNASTar software를 사

용하여 대장균의 염기서열과의 서열 유사성을 분석하였다.

성 적

1. 균주의 배양 및 염색체 DNA의 분리

분리된 각 염색체 DNA는 agarose gel전기영동을 통하여 고분자량의 DNA가 분리되었는지 또한 DNA의 파괴로 인한 smear등이 나타나지 않는지를 검사하였다. 그 결과 각 염색체 DNA는 모두 고분자량으로서 smear도 없어 nuclease에 의한 DNA파괴의 가능성을 배제할 수 있었다.

2. *Klebsiella pneumoniae phoA* 유전자함유 plasmid의 제한효소지도작성

pACYC184에 클로닝 된 *Klebsiella pneumoniae phoA* 유전자함유단편의 크기는 4.0 kb이었다. 그 *Pst*I, *Eco*RI, *Sal*I, 및 *Hind*III등을 사용한 제한효소지도가 그림 1에 제시되어 있다.

3. *Klebsiella pneumoniae*의 *phoA* 유전자의 염기서열과 대장균의 *phoA*서열과의 비교

*K. pneumoniae*의 *phoA* 염기서열은 그림 2에 있는 바와 같다. 이를 대장균의 *phoA* 염기서열과 비교하여 본 결과 80%의 매우 높은 homology를 나타내었다 (그림 3). 일치하는 염기서열은 제일 하단에 consensus로 표시되어 있다.

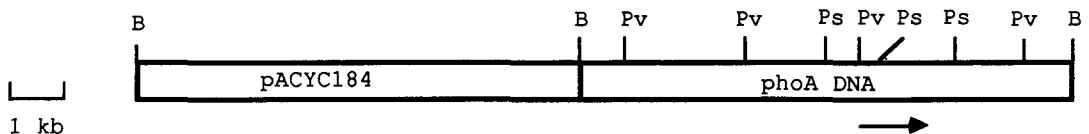


Fig. 1. Physical map of the *phoA*-containing recombinant plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. The sequenced region and sequencing direction are indicated by an arrow.(Abbreviations, B, BamH I ; Pv, Pvu II ; and Ps, Pst I)

5'-GAAATTACCTCAAATATCCAGGCGGCTTTTTTAAAGGTATATATCTTACCGTTTA
 ACCGGCAATACACGCACTATTCGCTGAATAAAAAAACCGGCAAACCGGACTACG
 TGACCGAGCGTCGGCCGTCCGCCACTGCCTGGACCACCGGCGTCAAGACCTA
 TAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTCGCCCTGCTCAATTCATAACCATCCTCG
 AGCTGGCGAAAGGCGGGCGGGCTGGCCACCGGCAACGTTTCCACCGCCGAGCT
 GCAGGATGCCACCCCGCAACGCTGGTGGCGCATGTGACATCGCGTAAATGTT
 ACGGCCCCACGGTCACCAGTGAAAAATGCCCCAGCAATGCGCTGGAGAAAGG
 GGGCAAAGGCTCCATTACCGAACAG-3'

Fig. 2. Nucleotide sequence of the *phoA* gene of *Klebsiella pneumoniae*

<p><u>KphoA</u> <u>EphoA</u> consensus</p>	<p>GAAATTACCTCAAATATCCAGGCGGCTTTTTTAAAGGTATATATCCCTTA <u>GTAATTATGCCGAAGGTGCGGGCGGCTTTTTTAAAGGTATAGATGCCTTA</u> GwAATTAsyCrAAkrTsCrGGCGGCTTTTTTAAAGGTATAKATsCCTTA</p>	<p>50</p>
<p><u>KphoA</u> <u>EphoA</u> consensus</p>	<p>CCGTTTAACCGGCAATACACGCACTATTCGCTGAATAAAAAAACCGGCAA <u>CCGCTTACCGGCAATACACTCACTATGCGCTGAATAAAAAAACCGGCAA</u> CCgyTTAmCsGGCAATACACKCACTATkCGCTGAATAAAAAAACCGGCAA</p>	<p>100</p>
<p><u>KphoA</u> <u>EphoA</u> consensus</p>	<p>ACCGGACTACGTGACCGAGCGTCGGCCG--TCCGCCACTGCCTGGACCAC <u>ACCGGACTACGTCAACGA-C-TCGGCTGCATCAGCAACCGCTGGTCAAC</u> ACCGGACTACGTsACCGAgCgTCGGCyGcaTCmGcmACyGCCTGGwCmAC</p>	<p>150</p>
<p><u>KphoA</u> <u>EphoA</u> consensus</p>	<p>CGGCGTCAAGACCTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTCGCCCTGCTC <u>CCCTGTAAAACTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTC-AC--GAAA</u> CssyGTyAArACCTATAACGGCGCGCTGGGCGTCGATATTCgmCctGmwm</p>	<p>200</p>

<u>KphoA</u>	AAT-TCAT--AACCATCCTCGAGCTGGCGAAAGGCGGGCTGGCCACC	250
<u>EphoA</u>	AAGATCACCCAACGATTCTGGAAATGGCAAAGCCGAGGTCTGGCGACC	
consensus	AAkaTCAyccAACsATyCTsGARmTGGCrAAAGsCGsmGgkCTGGCsACC	
<u>KphoA</u>	GGCAACGTTTTCCACCGCCGAGCTGCAGGATGCCACCCCCGCAACGCTGGT	300
<u>EphoA</u>	GGTAACGTTTTCTACCGCAGAGTTGCAGGATGCCACGCCCGCTGCGCTGGT	
consensus	GGyAACGTTTTCyACCGCmGAGyTGCAGGATGCCACsCCCCGwrCGCTGGT	
<u>KphoA</u>	GGCGCATGTGACATCGCGTAAATGTTACGGCCCCA-CG-GTCACCAGTGA	350
<u>EphoA</u>	GGCACATGTGACCTCGCGCAAATGCTACGGTCCGAGCGCG--ACCAGTGA	
consensus	GGCrCATGTGACmTCCGyAAATGyTACGGyCCsAgCGcGtcACCAGTGA	
<u>KphoA</u>	AAAAATGCCCGCAATGCGCTGGAGAAAAGGGGCAAAGGCTCCATTACCG	400
<u>EphoA</u>	AAAAATGTCCGGGTAAACGCTCTGGAAAAAGGCGGAAAAGGATCGATTACCG	
consensus	AAAAATGyCCsrGyAAyGckCTGGArAAAGGsGGmAAAGGmTCsATTACCG	
<u>KphoA</u>	AACAG	
<u>EphoA</u>	AACAGCTGCTTAACGCTCGTGCCGACGTTACG	430
consensus	AACAGCTGCTTAACGCTCGTGCCGACGTTACG	

Fig. 3. Comparison of the nucleotide sequences of the *phoA* genes of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*.

고 찰

세균은 성장 및 증식에 어려운 상황에 직면하면 이에 따라 적절히 대응하는데 필요한 물질들을 만들어 냄으로서 환경에 대응하여 자신을 보호하는 기구들을 가지고 있다. 이를 위하여 세균은 특정상황을 인지하는 단백질인 sensor를 표면에 가지고 있어 환경변화에 적응하기 위한 행동(예를 들면 편모운동)이나 환경에 적응하기 위해 필요한 단백질을 만드는 유전자의 발현을 조절하게 된다.^{6,7)} 세균이 인지해서 유전자발현으로 반응을 보이는 자극으로는 인산농도,^{8,9,10)} 삼

투압,^{11,12)} 화학주성인자,^{13,14)} 암모니아의 농도,¹⁵⁾ DNA알킬화, 혐기성 조건 및 과산화수소의 농도²⁾ 등이 알려져 있다. 이러한 자극에 반응하여 수십개의 새로운 단백질의 생산이 유도되며 stress에 의하여 유도되는 각각의 단백질의 기능은 불명확하나 궁극적으로는 stress에 대한 생체방어의 기능을 가지고 있다고 생각되고 있다.

세포내 기생세균에서 병원성에 중요한 역할을 담당하는 유전자인 *phoP* 및 *phoQ*는 *S. typhimurium*에서 처음으로 보고되었다.^{1,2,16)} *S. typhimurium*는 소장점막을 통하여 혈류내에 침입하여 마우스의 비장, 간, 및 골수 등에서 증식

하는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 *S. typhimurium*이 여러 다른 환경에 처해지는 동안 세균은 생존을 방해하는 복잡한 환경에 노출되게 된다. 이러한 환경에 의한 자극은 세균으로 하여금 여러 유전자들을 발현시켜 단백질을 생성함으로써 숙주와의 공존을 가능하게 한다. 세균의 병원성인자들 중 상당부분은 이와 같이 환경자극에 반응하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 즉, 한 쌍의 유전자들로 구성된 two-component regulatory system이 특정 환경자극들에 대해 존재하고 있어 이 중 하나는 환경자극을 감지하는 sensor의 역할을 담당하고, 다른 하나는 sensor로부터 전달되는 신호를 받아 휘하의 유전자들의 전사를 활성화시키는 transcriptional activator의 역할을 담당하고 있다.⁶⁾ 또한 sensor가 감지한 환경자극은 sensor단백질을 자가인산화시키고 sensor단백질은 이를 즉시 activator단백질에 전달하는 phosphorylation과정을 통하여 환경자극에 의한 신호를 전달함이 알려졌다.^{10,11,13-15,17-20)} *S. typhimurium*에서 *phoP*는 activator에 해당하고 *phoQ*는 sensor에 해당하는 유전자들로서 대식세포에 탐식되었을 때 세포내 환경자극에 의해 그 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 이들 유전자의 발현유도에 의해 여러 단백질이 생성되어 결국 *S. typhimurium*는 대식세포내에서 생존하게 되고 이에 따라 병원성을 발휘하게 된다. 이 *phoP* 및 *phoQ*유전자는 하나의 operon으로 구성되어 있어 *phoP* 상류에 있는 promoter의 지배를 받게 되며¹²⁾ 이 promoter는 *phoP*단백질 자체에 의해 발현유도가 일어나는 자가조절의 현상을 보인다. 이러한 *phoP* 유전자와 유사하게 인산결핍에 의하여 유도되는 two-component regulatory system이 *phoB-phoR* system이다. 이 system에서 *phoB*가 지배하는 휘하의 유전자중에는 *phoA*라는 alkaline phosphatase를 만드는 유전

자가 있다.

본 연구에서는 *K. pneumoniae*의 *phoA* 유전자를 클로닝하기 위하여 대장균의 *phoA*를 probe로 하여 colony hybridization법을 시행하였다. 양성반응을 보이는 집락을 대량배양하여 재조합 plasmid를 분리하고 그 제한 효소지도를 작성하였다. 총 4 kb의 *K. pneumoniae* DNA중 398 bp부위의 염기서열을 결정하였다.

*K. pneumoniae*의 *phoA* 유전자는 대장균의 염기서열과 매우 높은 서열유사성을 보여 이들 두 균종은 서로 유전적으로 매우 가까운 관계에 있음을 확인하였다.

요 약

*Klebsiella pneumoniae*의 *phoA* 유전자를 함유하는 DNA를 plasmid pACYC184에 클로닝하였다. 클로닝된 DNA의 크기는 4.0 kb이었으며 제한효소지도를 작성한 결과 3개의 *Pst*I 절단부위와 4개의 *Pvu*II 절단부위가 발견되었다. *Klebsiella pneumoniae*의 *phoA* 유전자의 염기서열은 *Escherichia coli*와 매우 유사하여 80%의 유사성을 보였으며 이는 이 두 균종이 서로 유전적으로 매우 가까운 관계에 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

1. Groisman EA, Chiao E, Lipps CJ, Hefferon F: *Salmonella typhimurium phoP* virulence gene is a transcriptional regulator. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7077-7081, 1989.
2. Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ: A two

- component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. Proc Natl Acad Sci USA 86: 5054-5058, 1989.
3. Miller SI, Pulkkinen WS, Selsted ME, Mekalanos JJ: Characterization of defensin resistance phenotypes associated with mutations in the *phoP* virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. Infect Immun 58: 3706-3710, 1990.
 4. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982, pp139-150.
 5. Sanger F, Nickelen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. J Mol Biol 74: 5463-5467, 1977.
 6. Igo MM, Ninfa AJ, Silhavy TJ: A bacterial environmental sensor that functions as a protein kinase and stimulates transcriptional activation. Genes Dev 3: 598-605, 1989.
 7. Ronson CW, Nixon BT, Ausubel FM: Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. Cell 49: 579-581, 1987.
 8. Lee TY, Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A: Phosphate regulon in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the *phoB-phoR* operons of *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, and *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 171: 6593-6599, 1989.
 9. Lee TY, Makino K, Shinagawa H, Nakata A: Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *Escherichia coli*. J Bacteriol 172: 2245-2249, 1990.
 10. Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A: Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. J Mol Biol 210: 551-559, 1989.
 11. Aiba H, Mizuno S, Mizushima T: Transfer of phosphoryl group between two regulatory proteins involved in osmoregulatory expression of the *ompF* and *ompC* genes in *Escherichia coli*. J Biol Chem 264: 8563-8567, 1989.
 12. Igo MM, Silhavy TJ: *EnvZ*, a transmembrane environmental sensor of *Escherichia coli* K-12, is phosphorylated in vitro. J Bacteriol 170: 5971-5973, 1988.
 13. Hess JF, Oosawa K, Kaplan N, Simon MI: Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. Cell 53: 79-87, 1988.
 14. Hess JF, Bourret RB, Simon MI: Histidine phosphorylation and phosphoryl group transfer in bacterial chemotaxis. Nature (London) 336: 139-143, 1988.
 15. Keener J, Kustu S: Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4976-4980, 1988.
 16. Miller JF, Mekalanos JJ, and Falkow S: Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. Science 243: 916-922, 1989.
 17. Ninfa AJ, Magasanik B: Covalent modification of the *glnG* product, NR_i, by the *glnL* product, NR_{ii}, regulates the transcription of the *glnALG*

- operon in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 83: 5909-5913, 1986.
18. Ninfa AJ, Ninfa EG, Lupas AN, Stock A, Magasanik B, Stock J: Crosstalk between bacterial chemotaxis signal transduction proteins and regulators of transcription of the Ntr regulon: evidence that nitrogen assimilation and chemotaxis are controlled by a common phosphotransfer mechanism. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5492-5496. 1988.
19. Weiss V, Magasanik B: 1988. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NR_I) of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 85: 8919-8923, 1988.
20. Wylie D, Stock A, Wong CY, Stock J: Sensory transduction in bacterial chemotaxis involves phosphotransfer between Che proteins. Biochem Biophys Res Commun 151: 891-896, 1988.

-Abstract -

Cloning and Sequencing of the *phoA* Gene which is
Regulated by the *phoP-phoQ* Operon in Pathogenic
Enteric Bacteria

Sung Kwang Kim, Tae Yoon Lee

Department of Microbiology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea

The DNA fragment containing the *phoA* of *Klebsiella pneumoniae* was cloned into pACYC184. The size of the insert was 4.0 kb and the restriction map showed it contained 3 *PstI* sites and 4 *PvuII* sites. The nucleotide sequence of the *phoA* region was determined, which showed strong (80 %) sequence similarity with that of *Escherichia coli*. This suggested that these two species are phylogenetically very close to each other.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, *phoA* gene, Cloning, Sequencing, Sequence similarity