

## *sfs1* 유전자의 cAMP-CRP receptor protein에 의한 발현 조절

최용락\* · 유주순 · 이승진 · 이희영 · 정수열<sup>1</sup>

동아대학교 생명자원과학대학 농화학과, <sup>1</sup>동주여자전문대학 식품영양과

**초록 :** *crp\** 유전자가 도입된 대장균 MK2001(*crp\**, *cya::km*)을 숙주로 사용하여 *mal* 유전자 발현을 촉진시키는 유전자의 하나인 *sfsI*(sugar fermentation stimulation)의 구조해석 결과에 의하면, 잠정적인 *sfsI*의 promoter 영역에는 CRP 단백질과의 결합영역으로 보이는 염기배열이 존재하였다. 본 실험에서는 *sfsI* 유전자의 cAMP-CRP에 의한 발현 조절을 확인하고자, *lacZ* 와의 융합 유전자를 작성하였다. 작성된 융합 유전자는 *cya* 결손주인 TP2010에서 cAMP의 첨가에 의해  $\beta$ -galactosidase 활성이 크게 증가하였으며, Western blotting의 실험에서도 같은 결과를 나타냈다. *in vivo*에서 발현이 확인된 전사산물은 cAMP에 의해 전사 촉진이 일어났으며, CRP의 결합부위로 예상되는 DNA 영역은 cAMP가 존재하면 CRP 단백질과 결합하는 특성을 나타내었다. 이상의 결과로 보아, *sfsI* 유전자의 발현은 cAMP-CRP에 의한 전사촉진 현상을 받는 것으로 나타났다.(1996년 3월 25일 접수, 1996년 5월 21일 수리)

### 서 론

CRP\*는 cAMP와 결합하지 않고도 유전자의 발현을 촉진시키는 변이주로서 몇몇 연구자들이 분리하였다.<sup>1-4</sup> 즉, 이 변이주를 도입시킨 대장균은 cAMP 혹은 cGMP의 존재하에서만 발현이 가능하던 유전자들이 cAMP나 cGMP가 없어도 발현이 가능한 것이다. 최 등<sup>5-7</sup>은 *crp\** 변이가 도입된 대장균 MK2001을 숙주로 사용하여 *mal* 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자 *sfs*(sugar fermentation stimulation) 수종을 클로닝 하였다. 이들 *sfs* 유전자는 CRP\*를 이용한 당대사 관련 유전자의 발현촉진을 나타낸 것이므로 cAMP-CRP에 의한 발현조절이 예상되어지는데, 그중에서 *sfs4* 유전자는 cAMP에 의한 발현조절 현상을 받고 있는 것이 실험적으로 증명된 보고가 있다.<sup>8</sup>

일반적으로 catabolite 억제 또는 glucose effect의 핵심적인 전사조절물질로 잘 알려져있는 CRP<sup>9,10</sup>에 의하여 당대사 관련 유전자 및 operon 등<sup>11,12</sup>은 대부분이 발현 조절을 받고 있다. 또한, 당대사 관련 유전자의 발현조절에 관여하는 *sfs* 유전자들도 cAMP-CRP에 의한 발현 조절을 받는지를 확인하는 것은 흥미로운 과제로 사료된다.

*sfsI* 유전자는 234개의 아미노산을 coding하고 있으며, 조절영역 DNA에서 promoter의 consensus sequence와 상동성이 높아서 promoter로 예상되는 영역의 상류에는 CRP 결합부위로 알려진 공통배열과 상동성이 높은 영역이 존재하고, 조절단백질에서 잘보존되어지는 helix-turn-helix구조를 나타내어 DNA와 결합하는 영역도 존재한다는 것이 구조해석 결과로 밝혀졌다.<sup>6</sup> 단백질의 분석 결과로는 26 kDa의 산물을 확인하였으나, Sfs1의

정확한 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다.

따라서, 본 연구는 cAMP-CRP 복합체가 *sfs* 유전자 발현에 미치는 현상을 밝혀냄으로서, *sfs*의 당대사 발현 촉진 기구를 밝혀내는 기초자료로 활용하고자 하였다. 융합 유전자 작성 및 전사수준의 발현산물까지를 실험해 본 결과, *sfsI* 유전자는 cAMP에 의한 발현촉진 현상을 받고 있음을 밝혀내었다. 이러한 결과는 두개의 promoter가 존재하며, 두개의 promoter가 CRP 결합부위의 상류영역 과 하류영역에 위치하므로써 각각이 전사촉진 및 전사억제를 받는 *sfs4* 유전자의 cAMP에 의한 발현 조절 현상<sup>8</sup>과는 조금 다른 양상을 보여준 것이다.

### 재료 및 방법

#### 재료

본 실험에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 L-broth와 최소배지(M9)에서 배양하였으며, 플라스미드가 도입된 균주는 ampicillin (50  $\mu$ g/ml)을 첨가하고 배양하였다. 제한효소, Klenow fragment, T4-DNA ligase, calf intestine phosphatase 등은 Takara shuzo 사와 Promega 사의 제품을 사용하였다. Anti- $\beta$ -galactosidase 항체와 HRPO-IgG 복합체는 Promega 사의 제품을 사용하였다. 방사능이 표지된 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP는 Amersham의 제품을, bovine serum albumin, ONPG (O- nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside),  $\beta$ -galactosidase, cAMP 등의 모든 시약은 Sigma사 또는 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다.

#### 재조합 DNA techniques

플라스미드 DNA의 조제, 제한효소 처리, 형질전환,

찾는말 : *sfs* 유전자, cAMP-CRP, 발현조절, 융합 유전자  
\*연락처자

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strain	Genotype	Source
Plasmids		
pPVC2	Amp <sup>r</sup> , <i>sfs1</i> gene	(6)
pMC1403	<i>lacZ</i> , Amp <sup>r</sup>	(20)
pKK223-4	Amp <sup>r</sup> , <i>tacP</i> , <i>Bam</i> HI site ( <i>tet</i> region) of pKK223-3 is disrupted	(6)
pPS1	<i>sfs1-lacZ</i> fusion gene	This study
Strains		
MK2001	W3110, <i>cya::km</i> , <i>crp</i> *1	(6)
TP2010	<i>xyl</i> , <i>cya</i> , <i>argH</i> , <i>lacX74</i> , <i>recA</i> , <i>ilv</i> , <i>Srl::Tn10</i>	A. Danchin
MC4100	<i>araD 139</i> , <i>lac(IPOXYA)</i> , <i>StrA</i> , <i>thi</i>	M.J. Casadaban
TP2010R1	TP2010, <i>crp</i> *1	(6)

agarose 및 polyacrylamide gel의 전기영동 및 기타 재조합 DNA 기술은 표준방법을 사용하였다.<sup>13)</sup> 특정 DNA 단편의 조제는 제한효소로 절단하여 0.6% Metaphor agarose gel 또는 5% polyacrylamide gel 전기영동을 하여 원하는 단편을 회수 정제하여 사용하였다.

**Immunoblot analysis**

L-배지에서 배양된 균체를 0.5% Triton X-100을 함유한 25 mM 인산 완충액(pH 7.5)으로 세척한 후, 4°C에서 30초씩 4회 sonication 하였다. 35,000 x g에서 20분간 원심분리하여 세포 잔사를 제거시킨 상등액을 단백질 시료로 사용하였다. 단백질은 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 Laemmli의 방법<sup>14)</sup>으로 전기영동하고, Towbin 등의 방법<sup>15)</sup>으로 nylon membrane에 blotting 하였다. 1차 antibody인 anti-β-galactosidase (0.2~1 μg/ml)를 반응시킨 후, 2차 antibody인 HRPO-IgG conjugate (0.2~1 μg/ml)를 반응시켜 PBS (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.2)로 세척한 후 발색시켰다.

**Northern hybridization**

*sfs* 유전자가 subcloning된 플라스미드 pPVC2를 대장균 TP2010에 도입시킨 균주를 LB 배지에 배양시킨다. 배양 도중 OD<sub>610</sub>이 0.1이 될 때 각 샘플 당 하나에 cAMP를 100 mM씩 가한 후, OD<sub>610</sub>이 0.7~0.8 정도가 될 때까지 배양한다. 배양액에서 total RNA를 분리하여 Northern hybridization의 시료로 사용하였다. 그리고 Northern blotting은 Thomas<sup>16)</sup> 방법에 준해서 실시하였다. 15~20 μg 정도의 RNA를 formaldehyde gel에 전기영동하여 membrane에 하룻밤 동안 transfer하였다. Transfer된 membrane은 80°C에서 2시간 동안 baking하였다. 이 baking 시킨 membrane은 2시간 동안 prehybridization 시키고, plasmid pPVC2를 *Bam*HI - *Eco*RI으로 절단하여 회수한 DNA 단편을 [<sup>32</sup>P]CTP로 random labelling한 probe를 사용하여 42°C에서 16~18시간 hybridization하였다. Hybridization한 membrane을 2 x SSC로 1회(실온,

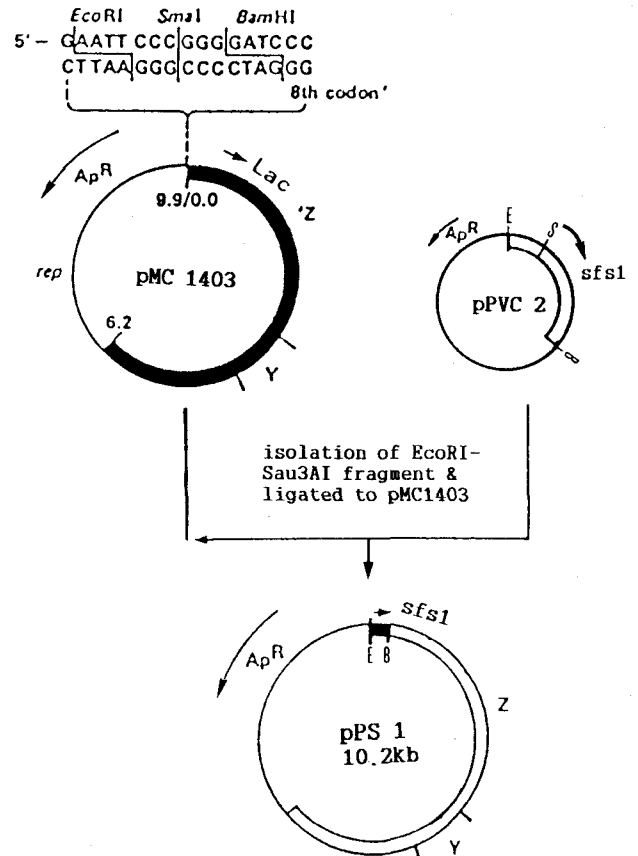


Fig. 1. Schematic drawing for the construction of the plasmid carrying *sfs1-lacZ* fusion protein gene. pPS1, an *Eco*RI-*Sau*3AI fragment of the *sfs1* regulatory region was isolated from pPVC2<sup>20)</sup> and was ligated with the *Eco*RI-*Bam*HI digested *lacZ* fusion vector pMC1403. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; S, *Sma*I; lac, lactose operon (promoter and 8 amino acid is disrupted); *amp*, the *bla* gene encoded the β-lactamase.

20분), 2 x SSC-1% SDS로 20분간 2회(42°C), 그리고 0.2 x SSC-1% SDS로 20분간 2회(42°C) 동안 washing한 후에 autoradiography하여 *sfs*의 전사산물을 확인하였다.

**Gel retardation assay**

DNA binding assay를 위한 반응액은 Abeles<sup>17)</sup>에 의한 mixture로서 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 10 μg/ml poly(dI-dC) 그리고 0.1 mM EDTA가 함유된 용액을 사용하였다. 그리고 *sfs1* 조절영역을 *Eco*RI-*Sau*3AI (308 bp) 단편을 조제하여 10 pmol이 되게 [<sup>32</sup>P] dATP로서 labeling 하였다. Labeling된 DNA 단편을 CRP (0.4 또는 0.8 pM)과 0.4 pM cAMP를 첨가하여 반응액이 20 μl가 되게 하며, 30°C에서 30분 동안 DNA와 단백질을 반응시켰다. 반응액을 5% polyacrylamide gel에 전기영동한 후에 gel을 autoradiography하였다. *crp* 유전자를 coding하는 plasmid pHA5가 도입된 대장균에서 분리 정제한 CRP를 사용하였다.

Table 2. Effects of cAMP on the expression of *sfs1-lacZ* fusion gene

Strain/Plasmid	-cAMP	+cAMP <sup>b</sup>	Efficiency <sup>c</sup>
TP2010 ( $\Delta cya$ , $\Delta lac$ )/pPS1	212 <sup>a</sup>	1,230	586
TP2139 ( $\Delta crp$ , $\Delta lac$ )/pPS1	190	198	104
TP2010R1 ( <i>crp</i> <sup>*</sup> , $\Delta cya$ )/pPS1	370	3,120	843

<sup>a</sup> $\beta$ -galactosidase activity is expressed as Miller Unit (three independent assay). <sup>b</sup>Each of the strains containing *sfs1-lacZ* fusion gene was incubated at 37°C until the OD<sub>610</sub> nm reached 0.1~0.2, and then 1 mM cAMP was added to each sample. Each sample was further incubated until the OD<sub>610</sub> was 0.5, and  $\beta$ -galactosidase activity was measured. <sup>c</sup>Relative enzyme activity with that in the absence of cAMP taken as 100.

### 결과 및 고찰

#### *sfs1-lacZ* 융합 유전자 작성과 cAMP 에 의한 발현 조절

*sfs1* 유전자의 해석된 1차 구조의 조절영역에는 putative CRP 결합 부위(5'TGCGGTGACGCAGTTCACCCTT 3')가 putative promoter의 상류영역에 존재하였다.<sup>6)</sup> 이 잠정적인 CRP 결합 부위에 의하여 *sfs1* 유전자가 발현 조절을 받는지 확인하고자 *sfs1*의 promoter 영역을 단리하여 *sfs1-lacZ* 융합 플라스미드를 작성하였다. 플라스미드 pPVC2에서 *EcoRI-Sau3AI*의 0.31 kb 단편을 조제하여 *lacZ* 융합 벡터인 pMC1403의 *EcoRI-BamHI* 부위에 연결시킨 후에, 대장균 MC4100 ( $\Delta lac$ ) 균주에 형질전환시켰다. MacConkey-lactose 배지에서 적색을 나타내는 콜로니를 선별하고, 플라스미드를 분리하여 *sfs1*의 조절영역이 삽입된 클론을 확인하여 *sfs1-lacZ* 융합 플라스미드로 작성된 것을 pPS1이라 하였다(그림 1). 얻어진 융합 plasmid를 이용하여 cAMP-CRP 복합체에 의한 *sfs1* 유전자의 발현조절 여부를 다음과 같은 실험으로 확인하였다. pPS1을 genetic background가 다른 균주 TP2010 ( $\Delta cya$ ,  $\Delta lac$ )에 도입시킨 뒤에 1 mM의 cAMP를 첨가하여 배양한 균주에서  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정하였다. Table 2에 나타낸 바와 같이 TP2010 균주에서 cAMP의 처리에 의하여  $\beta$ -galactosidase의 활성이 6배 정도 증가하는 발현촉진 현상을 나타내었다. 반면에 이러한 발현촉진 현상은 CRP 유전자가 결손된 TP2139 균주에서는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *sfs1* 유전자가 cAMP-CRP 복합체에 의하여 발현촉진 현상이 나타남을 보여주는 것이다. *crp*<sup>\*</sup>이 치환된 TP2010R1에서는 cAMP 처리에 의하여 발현촉진 현상이 9배 정도로 증가하였으나, cAMP 미처리구에서는 TP2010에서와 비슷한  $\beta$ -galactosidase 활성을 나타냈다. CRP\*는 cAMP가 없을 경우에도 몇몇 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로 알려져있는데, 본 실험의 결과에서는 cAMP를 존재시키면 발현이 더욱더 촉진되어지는 현상을 볼 수 있었지만, cAMP 미처리시에는 CRP\*이 *sfs1* 유전자의 발현에는 별다른 영향을 미치지 못함을 나타낸다. Kang과

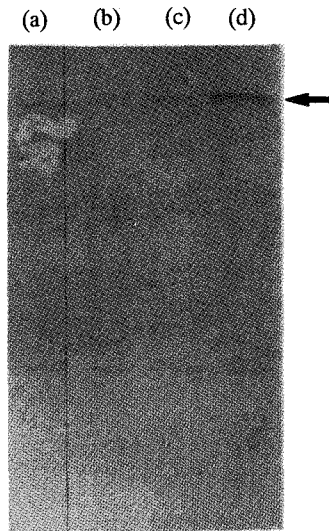


Fig. 2. Immunoblot analysis of the *sfs1-lacZ* fused protein. SDS polyacrylamide gel was transferred to nylon filters by Western blotting and reacted with antibody to the fused protein. Lane a, TP2139/pPS1; lane b, TP2139/pPS1+1 mM cAMP; lane c, TP2010/pPS1; lane d, TP2010/pPS1+1 mM cAMP.

Harmam(1994)은<sup>18)</sup> CRP\*의 하나인 91 CRP와 222 CRP를 가지고 lactose promoter 영역의 DNA와의 결합을 실험한 연구에서는 cAMP 없이도 222 CRP는 결합되어짐을 보여준 결과로 미루어보아, CRP\*가 *sfs1*의 조절영역에 결합할 것으로 사료된다. 이러한 결과들이 cAMP가 플라스미드 복제수의 증가등에 의존되는 발현조절인지의 여부는 Kawamukai 등<sup>19)</sup>의 연구 결과에서 보여준 바와 같이 cAMP는 플라스미드 복제수에 별다른 영향을 미치지 못하는 것으로 알려져있다.

한편, *sfs1-lacZ* 융합단백질의 생성에 의한 *sfs1* 유전자의 발현조절 결과를 그림 2에 나타내었다. Western blotting에 의한 융합단백질의 생성은 융합 플라스미드 pPS1이 도입된  $\Delta cya$  균주인 TP2010에서 cAMP 첨가 또는 미첨가된 균주에서 단백질을 분리하여 실험한 결과, cAMP의 처리구에서 훨씬 증가된 융합 단백질의 생성을 보여주어 (그림 2의 lane d) 효소활성 측정에서와 같이 cAMP에 의한 발현 촉진 현상의 결과를 나타내었다. 이상의 결과로 보아 *sfs1* 유전자의 발현은 cAMP-CRP 에 의해 발현조절 받음을 확인하였다.

#### *sfs1* 유전자의 전사산물 확인

*sfs1*의 전사산물을 확인하고자 *sfs1* 유전자를 coding 하는 플라스미드인 pPVC2가 도입된 TP2010과 동일 균주에 1 mM cAMP를 첨가하여 배양한 균주에서 total RNA를 분리하여 <sup>32</sup>P-말단 표식 probe와 hybridization시켰다. 그림 3에서 보는 바와 같이 염기배열 결과<sup>6)</sup>의 크기와 거의 일치하는 것으로 보여지는 0.8 kb의 RNA 산물의 band를 확인할 수 있었다. 이 전사산물은 *sfs1* 유전자가 발현벡터인 pKK223-4의 강력한 promoter(*tac*)에 의해 대량발현된 것이며, 벡터만이 도입된 균주에서

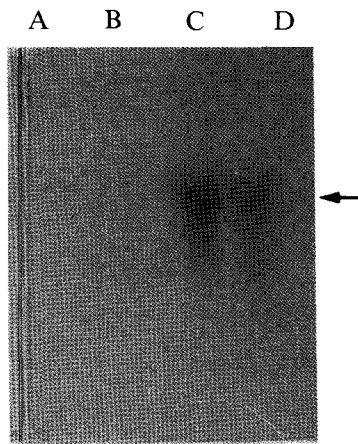


Fig. 3. Northern blot analysis of *sfs1* mRNA levels. Total RNA was isolated from the strain TP2010, denatured with formaldehyde, fractionated on a 1.2% agarose gel and transferred to a nylon filter before hybridization as described in Materials and Methods. Position of the hybridizable bands are indicated by arrow. To each lane was applied 25  $\mu$ g of total RNA from *E. coli*. Lane a, pKK223-4/TP2010+1 mM cAMP; lane b, pKK223-4/TP2010; lane c, pPVC2/TP2010+1 mM cAMP; lane d, pPVC2/TP2010.

는 cAMP를 처리하여도 발현 정도가 낮아서 산물이 정확하게 확인되지 않았다. *sfs1*의 전사산물은 cAMP를 처리한 균주에서 높은 생산량을 보여주었으며(그림 3의 lane c), 이는 *sfs1*의 발현이 cAMP-CRP 복합체에 의하여 전사조절을 받고 있음을 확인해 주는 것이다.

#### *sfs1* 조절영역과 CRP와의 결합

*sfs1*의 CRP 결합부위로 생각되어지는 영역을 보존도가 높은 5'TGTGA3' motif가 양쪽 다 거의 보존되어 있으며, 전체 공통배열 22 염기 중에서 잘 일치하는 17 염기 중<sup>12)</sup>에서 13 염기가 일치하여 높은 상동성을 나타냈다. 이는 cAMP의 발현조절 하에 있는 것으로 알려져 있는 *lac* 유전자(13 염기)나 *mal* 유전자(14 염기)의 상동성과 비슷한 염기배열을 나타낸 것이다. 또한 전사산물의 확인에서 보여준 바와같이 *sfs1* 유전자는 cAMP에 의한 전사조절을 확인한 바 있다. 따라서 이 영역이 CRP와 결합하여 전사촉진에 관여함을 구명하고자 gel retardation assay를 실시하였다. *sfs1*의 조절영역인 *EcoRI-Sau3AI*의 308 bp DNA 단편을 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP로서 labeling하여 CRP 단백질과의 결합반응을 시킨 결과, CRP 결합에 의한 gel retardation이 일어남을 확인하였다(그림 4의 lane A). 또한 cAMP를 첨가하지 않을 경우는 gel retardation이 일어나지 않고 DNA만의 경우인 lane C와 동일한 이동도를 보여 주었으며(lane B와 C), CRP의 증가로 인한 DNA와의 결합은 증가하였다(lane D). Labeling 하지 않은 동일 영역의 DNA 단편을 수배에서 수십배까지 첨가한 경우에는 이 competitor 양의 증가함에 따라 gel retardation이 일어난 양이 감소함을 확인할 수 있었다(data not shown). 최근의 다방면적인 실험적 접근으로 인하여 CRP와 DNA의 결

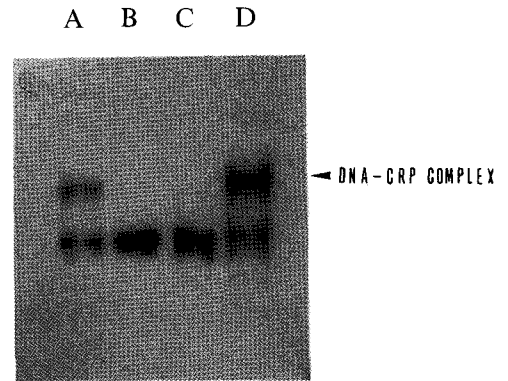


Fig. 4. Gel retardation assay for CRP binding to the *sfs1* regulatory region.

The *EcoRI-Sau3AI* fragment of *sfs1* promoter region (nt. No 1-308 in Reference 6) was used for the complex formation. The mixture was separated on a 5% polyacrylamide gel. The DNA-CRP complex was assayed by autoradiography. Lane A, 0.4 pmol CRP+0.4 pmol cAMP; lane B, 0.4 pmol CRP; lane C, control DNA; lane D, 0.8 pmol CRP+0.4 pmol cAMP

합에 의한 전사조절의 중요인자로는 세가지가 제시되어지고 있다. 즉, cAMP-CRP에 의한 promoter 또는 유전자의 발현조절(촉진 또는 저해) 현상에는 결합에 직접 영향을 미치는 CRP 결합부위에서의 DNA 염기배열 특성, 유전자의 조절영역 내에서 CRP 결합부위의 위치 및 단백질과 단백질간(CRP와 RNA polymerase)의 상호작용 등이 주된 영향을 미치는 것으로 보고되어지고 있다.<sup>21)</sup> *sfs1*이 cAMP에 의한 전사촉진을 받는 것으로 미루어보아, 정확한 전사개시점이 밝혀지면 *sfs1* 유전자의 CRP 결합부위는 *lac*, *glpD*, *melR*, *mal* 유전자에서와 같이 전사개시점의 상류지점에 존재할 것이며, 전사개시점과 CRP 결합부위의 중앙지점과의 거리가 DNA의 helix-turn의 정배수 회전을 하여 CRP가 잘 결합할 수 있는 위치에 존재할 것으로 사료되어진다.

#### 감사의 글

본 연구는 동아대학교 교내연구비에 의하여 연구된 내용이며, 연구지원에 감사드립니다.

#### 참고 문헌

1. Aiba, H (1985) Transcription of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene is negatively regulated by cAMP-cAMP receptor protein. *J. of Biol. Chem.* **260**, 3063-3070.
2. Gorges, S., and S. Adhya (1985) Sites of allosteric shift in the structure of the cyclic AMP receptor protein. *Cell* **41**, 745-751.
3. Gronenborn, A. H., R. Sandulache, S. Gartner and G.M. Clore (1988) Mutation in the cyclic AMP binding site of the cyclic AMP receptor protein of *E. coli*. *Biochem. J.* **253**, 801-807.

4. Harman, J. G., A. Peterkofsky, and K. Mckenney (1988) Arginine substituted for leucine at position 195 produces a cyclic AMP-independent form of the *E. coli* cyclic AMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 8072-8077.
5. 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.
6. 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.
7. 정수열, 조무제, 정희태, 최용락 (1995) CRP\* 의존성 maltose 대사 촉진유전자 *sfs4*의 클로닝 및 염기배열 결정. *한국농화학회지* **38**, 111-117.
8. Chung, S. Y., Y. L. Choi, M. J. Cho, H. Yoshisue, M. Kawamukai, H. Sakai and T. Komano (1995) Transcription of *sfs4*, one of the genetic elements related to CRP\*-dependent expression of *Escherichia coli mal* genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**, 257-262.
9. Aiba, H., and J. S. Krakow (1981) Isolation and characterization of the amino and carboxy terminal fragments of the adenosine cyclic 3',5'-phosphate receptor protein of *E. coli*. *Biochemistry* **20**, 4774-4780.
10. Aiba, H., S. Fujimoto, and N. Ozaki (1982) Molecular cloning and sequencing of the gene for *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* **10**, 1345-1362.
11. Adhya, S., and G. Garges (1982) How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell* **29**, 287-289.
12. de Crombrughe, B., S. Bushy, and H. Buc (1984) Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* **224**, 831-838.
13. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor N.Y.*
14. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
15. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Nat. I. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
16. Thomas, P. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol* **100**, 255-264.
17. Abeles, A. L. (1986) P1 plasmid replication. *J. Biol. Chem.* **261**, 3548-3555.
18. Kang, J. B. and J. G. Harman (1994) The characteristic binding of mutant cyclic AMP receptor protein(CRP\*) to lactose promoter in *Escherichia coli*. *Mol. and Cells*, **4**, 167-170.
19. Kawamukai, M., J. Kishimoto, R. Utsumi, M. Himeno, T. Komano, and H. Aiba (1985) Negative regulation of adenylate cyclase gene(*cya*) expression by cyclic AMP-cyclic AMP receptor protein in *Escherichia coli*: studies with *cya-lac* protein and operon fusion plasmids. *J. Bacteriol.* **164**, 872-877.
20. Andrews, S. C., P. M. Harrison and J. R. Guest (1991) A molecular analysis of the 53.3 minute region of the *Escherichia coli* linkage map. *J. General Microbiol.* **137**, 361-367.
21. Botsford, J. L. and J. G. Harman (1992) Cyclic AMP in Prokaryotes. *Microbiological Rev.* **56(1)**, 100-122.

#### Regulation of *sfs1* gene expression by the cAMP-cAMP receptor protein

Yong-Lark Choi\*, Ju-Soon Yoo, Seung-Jin Lee, Hee-Young Lee and Soo-Yeol Chung<sup>1</sup> (*Department of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea; <sup>1</sup>Department of Food Science & Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-715, Korea*)

**Abstract:** We have cloned several *E. coli sfs* genes which stimulate *mal* gene expression with *crp*\*<sup>1</sup>. One the *sfs* genes (pPVC2) was sequenced and potential CRP binding site is located in the upstream of the putative promoter in the regulatory region.<sup>6)</sup> In order to investigate the regulation of the *sfs1* gene by the cAMP-CRP complex, we have constructed the *sfs-lacZ* fusion gene in this research. The overall transcriptional stimulations of *sfs1* gene in the presence cAMP were confirmed by  $\beta$ -galactosidase activity and Western blot analysis of *sfs1-lacZ* fusion gene. Transcriptional regulation by cAMP-CRP was also confirmed by Northern blot analysis. End-labelled DNA of the DNA fragment in *sfs1* regulatory region were used for gel retardation assay to examine the CRP-DNA complex in the presence of cAMP. Results here indicate that CRP binding site in the regulatory region of *sfs1* gene is positive regulator for the expression of *sfs1* gene.

\*Corresponding author