

대장균에서 *xylA* 유전자의 발현조절

강지희 · 노동현 · 강병태 · 이인구*

경북대학교 농화학과

초록 : 대장균에서 xylose isomerase(XI) 생산의 조절양상을 밝히기 위한 연구의 일환으로 유도물질인 xylose에 의한 XI 생산유도 및 glucose에 의한 이화물 억제 양상을 조사하였다. XI 생산 유전자인 *xylA* 유전자의 발현을 조절하는 *xylR* 유전자가 염색체에 존재하는 상태에서 *xylA* 유전자가 고복제수 유래의 플라스미드에 존재하는 경우(pEX202/DH77)와 저복제수 유래의 플라스미드에 존재하는 경우(pEX102/DH77)에는 염색체에 존재하는 경우(JM109) 보다 0.4% xylose 첨가에 의한 XI의 유도생산이 각각 1.9 및 1.7배 정도 증가하였다. 염색체에 존재하는 *xylR* 유전자에 의해 생산된 *xylR* 유전자 산물이 *xylA* 유전자가 플라스미드에 존재할 경우에도 염색체에 존재할 때와 마찬가지로 작용하는 것으로 나타났다. 형질전환주 pEX202/DH77과 pEX102/DH77 및 친주 JM109에서 다 같이 0.2% glucose 첨가에 의해 완전히 XI 유도생산이 억제되었으며 이와같은 glucose에 의한 이화물 억제는 1 mM cAMP의 첨가로 해제되었다. DM 최소배지에서 xylose에 의한 XI 유도시 1 mM cAMP를 첨가하면 0.4% xylose만 첨가했을 때 보다 XI 생산이 1.7 내지 2배 정도 증가하였다. Xylose isomerase와 cAMP 생산 변이주(*xyl*, *cya*; TP 2010)에 *xylA* 유전자를 형질전환시킨 pEX13/TP2010은 xylose 첨가로 XI가 유도생산되지 않았고 cAMP를 함께 첨가해야만 XI가 유도되었다. 이와같이 대장균의 *xylA* 유전자에서 XI의 생산조절에는 xylose 이외에 cAMP도 필수적인 효과물질임을 알 수 있었다.(1996년 8월 22일 접수, 1996년 9월 23일 수리)

서 론

Xylose isomerase(XI)는 xylose를 xylulose로 이성화시킬 수 있을 뿐 아니라 glucose를 fructose로 전환시킬 수 있다는 성질을 이용하여 공업적으로 과당시럽 제조에 널리 사용되고 있다.¹⁾ XI는 생체내에서 xylose의 분해대사에 관여하는 효소로써 xylose를 이용할 수 있는 많은 미생물에서 보고되고 있다.²⁾ Xylose는 xylose transport(*xylT*)에 의해 세포내로 수송되어 XI(*xylA*)에 의해 xylulose로 전환된다. 이 xylulose는 xylulokinase(*xylB*)에 의해 xylulose-5-phosphate로 인산화되어 오타당 인산경로를 거쳐 대사된다.

*Salmonella typhimurium*에서 xylose 대사에 관여하는 효소 단백질을 코딩하는 유전자 *xylT*, *xylA* 및 *xylB*는 조절 유전자인 *xylR*의 산물에 의해 그 발현이 조절되며 오페론의 형태로 구성되어 있다는 사실이 유전학적으로 증명된 바 있으며 *xylR* 유전자 산물은 *xylA*, *xylB* 및 *xylT*의 발현에 있어서 xylose가 존재할 때 activator로 작용하는 양(陽)의 조절인자로 추정하였다.³⁾

David와 Wiesmeyer⁴⁾는 대장균에서 *xylA*, *xylB* 및 *xylT* 유전자의 발현이 xylose에 의해서만 유도되며 glucose에 의해 이화물 억제를 받는다는 것을 보고한 바 있으며, 이들 유전자들이 공통의 조절인자에 의해 조절을 받을 것이라고 추정하였다. Maleszka 등⁵⁾은 대장균의 *xylA* 유전자를 *S. typhimurium*의 *xyl* 변이주에 conjugation시켜 상보성을 확인함으로써 대장균의 *xylA* 발현이 *S. typhimurium*과 같이 *xylR* 유전자 산물에 의해 양(陽)의 조절을 받을 것으로 추

측하였다.

대장균의 *xylA* 유전자는 Rosenfeld,⁶⁾ Briggs,⁷⁾ Lawlis,⁸⁾ Schellenberg⁹⁾ 및 Rhee¹⁰⁾ 등에 의해 클로닝되어 유전자 구조에 대해서는 상세히 알려져 있으나 이 유전자의 발현유도 및 억제 등의 조절양상에 대해서는 상세히 보고되어 있지 않다.

본 연구에서 *xylA* 유전자는 *xylR* 유전자가 존재하지 않으면 발현하지 않으므로¹¹⁾ *xylR*과 *xylA*가 함께 염색체에 존재하는 경우와 *xylR* 유전자는 염색체에 존재하고 *xylA* 유전자가 플라스미드에 존재하는 경우에 *xylA* 유전자 발현의 조절양상을 비교검토 하고자 한다. 그래서 염색체에 *xylA*, *xylB* 및 *xylR/T* 유전자를 가지고 있는 대장균 JM109와 *xylA* 변이주인 DH77에 저복제수의 복제기점을 가진 pLG339 유래의 플라스미드에 *xylA* 유전자를 가진 것(pEX102)과 고복제수의 복제기점을 가진 pBR322 유래의 플라스미드에 *xylA* 유전자를 가진 플라스미드(pEX202)를 각각 형질전환시킨 균주를 대상으로 XI의 유도생산 및 억제현상을 조사하였다. 그리고 *xylA* 유전자의 발현유도 및 억제현상과 아울러 *xylA*의 조절에 미치는 cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cAMP)의 영향을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 실험에 사용한 균주 및 플라스미드는 Table 1과 같다. 대장균 중 XI를 생산할 수 있는 균주로는 염색체에 *xylA*, *xylB*, *xylT* 및 *xylR* 유전자를 모두 가지고 있는 JM109를 사

찾는말: xylose isomerase, *xylA* gene, induction, catabolite repression, derepression, *E. coli*

*연락처

용하였으며 XI를 생산할 수 없는 균주는 JM109에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 처리하여 얻은 *xyIA* 변이주 DH77를 사용하였다. 그리고 플라스미드는 *xyIA* 유전자를 가지는 고복제수 유래의 pEX202와 저복제수 유래의 pEX102를 제작하였으며 pEX13은 *xyIA* 유전자를 가지는 효모-대장균 셔틀벡터인 YEp13 유래¹⁶⁾의 9.5 kb의 플라스미드이다.

배지 및 균의 배양

대장균의 배양은 완전배지인 Luria-Bertani(LB) 배지¹⁷⁾와 최소배지인 Davis Mingioli(DM) 배지¹⁸⁾에 탄소원으로 glucose 대신에 0.4% glycerol, 50 µg/ml 아미노산 및 2 µg/ml thiamine-HCl을 첨가하여 사용하였다.

XI를 유도하기 위해 LB 혹은 DM 배지에 0.4% xylose를 첨가한 배지를 사용하였고, 배지에 glucose를 0.1% 내지 0.5% 농도로 첨가하여 XI 생산 억제현상을 조사하는데 이용하였다.

형질전환주의 선별을 위한 배지로는 MacConkey agar base(Difco)에 0.2% xylose를 첨가한 배지(MacConkey-*xyl* 한천배지)를 사용하였으며, 항생제로는 100 µg/ml의 ampicillin(Ap)과 20 µg/ml의 kanamycin(Km)을 필요에 따라 첨가하여 사용하였다. 대장균의 배양은 LB 배지에서 하룻밤 배양한 종배양액을 2%되게 접종하여 LB 배지에서는 3시간, DM 배지에서는 8시간 동안 37°C의 진탕수조에서 배양하였다. 균의 증식도는 광전 비색계로 600 nm에서 측정하였으며 흡광도 1.0이 건조 균체량 0.15 mg/ml에 상당하였다.

플라스미드 DNA의 추출 및 조작

대장균으로부터 플라스미드 DNA의 추출은 Birnboim과 Doly의 방법¹⁹⁾을 사용하였고 형질전환은 Mandel과 Higa의 방법²⁰⁾에 따라 행하였으며 제한효소, 알카리성 phosphatase 및 T₄ DNA ligase의 처리조건은 공급사가 추천하는 조건에서 실시하였다.

Xylose isomerase 활성 측정

XI의 활성은 toluene 처리균체 현탁액을 사용하여 측정하였다. 즉, 배양액 0.5 ml를 원심분리하여 얻은 균체를 100 mM tris-maleate/10 mM MgCl₂(pH 7.5) 완충액으로 2회 세척한 후 같은 완충액 0.1 ml에 현탁시켜 10 µl의 toluene을 가하여 voltex 믹서로 10초간 혼합한 것을 toluene 처리균체 현탁액으로 하여 XI 활성의 측정에 사용하였다.

상기 toluene 처리 균체 현탁액 0.1 ml에 0.4 ml의 100 mM tris-maleate/10 mM MgCl₂(pH 7.5), 0.1 ml의 10 mM MnCl₂ 및 0.1 ml의 100 mM xylose를 가하여 잘 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 이 반응액 0.1 ml를 냉각한 70% 황산 3 ml가 들어있는 시험관에 옮겨 생성된 xylulose를 cysteine-carbazole법²¹⁾으로 540 nm에서 정량하였다. 효소활성의 단위는 상기의 조건에서 1분간 균체 mg당 1 µmol의 xylulose를 생성시킬 수 있는 효소량으로 나타내었다.

시약

본 실험에 사용한 xylose, cAMP는 Sigma사 제품을, MacConkey agar base는 Difco사, 제한효소, T₄ DNA ligase, 송아지 췌장의 알카리성 phosphatase는 Poscochem사의 것을 사용하였으며 그외 시약은 시판특급을 사용하였다.

결 과

***xyIA* 유전자의 투여량 효과**

xyIA 유전자의 발현에 있어서 유전자 투여량의 효과를 보기 위해 *xyIA* 유전자를 가진 pEX13¹³⁾을 BglIII로 처리하여 1.6 kb 크기의 *xyIA* 유전자 단편을 분리하였다. 이 단편을 BamHI으로 처리한 pMB1의 고복제수 복제기점을 가진 pBR322(15~20 복제/염색체) 벡터^{14,17)}에 삽입시켜 pEX202 플라스미드를 만들고 역시 BamHI으로 절단한 pSC101의 저복제수 복제기점을 가진 pLG339(6~8 복제/염색체) 벡터^{15,17)}에 삽입시켜 pEX102 플라스미드를 제작하였다(Fig. 1). *xyIA* 유전자를 클로닝시킨 상기 플라스미드들을 *xyIA* 변이주인 DH77에 형질전환시켜 MacConkey-*xyl* 한천배지에서 분홍색 콜로니를 생성하고 pEX202의 경우 Ap 내성으

Table 1. Strains and plasmids used

Strains	Genotype or phenotype	Reference
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F' [traD36 proAB' lac^r lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> ¹²⁾
DH77	<i>xyIA</i> ; NTG mutant from JM109	Roh and Rhee ¹¹⁾
TP2010	<i>xyl cya argH lacΔ X74 recA ilvA srl::Tn10</i>	Roy and Danchin ¹³⁾
Plasmids		
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	Bolivar <i>et al.</i> ¹⁴⁾
pLG339	Km ^r , Tc ^r	Stocker <i>et al.</i> ¹⁵⁾
pEX13	Ap ^r , Tc ^r , <i>xyIA</i>	Rhee <i>et al.</i> ¹⁰⁾
pEX202	Ap ^r , <i>xyIA</i>	This study
pEX102	Km ^r , <i>xyIA</i>	This study

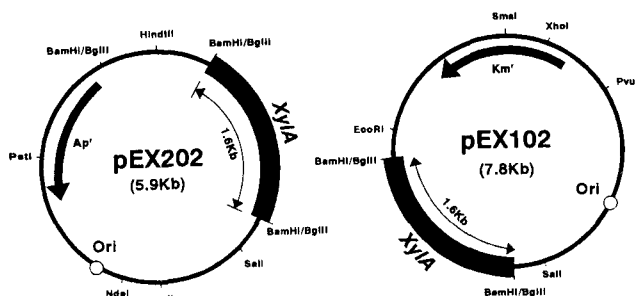


Fig. 1. Schematic diagrams of recombinant plasmids pEX202 and pEX102 harbored *xyIA* gene with high and low copy numbered replication origin(○), which were originated from pBR322 and pLG339, respectively.

Table 2. Effect of gene dosage on the expression of *xyIA* gene

Strains	Xylose isomerase, $\mu\text{mol}/\text{mg}$	
	Uninduced	Induced
JM109	0.1	3.2
DH77	0.0	0.0
pEX202/DH77	0.3	6.1
pEX102/DH77	0.2	5.3

After bacteria were grown in DM minimal medium for 8 hrs, 0.4% xylose as an inducer was added to the culture broth and then the bacteria were incubated for additional 2 hrs at 37°C.

로, pEX102의 경우 Km 내성으로 형질전환주를 선별하였다. 고복제수 유래의 플라스미드인 pEX202와 저복제수 유래의 플라스미드인 pEX102에 각각 *xyIA* 유전자를 가진 것과 염색체에 *xyIA* 유전자를 가진 JM109에서 xylose에 의한 XI의 활성 유도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. *xyIA* 유전자의 발현정도가 염색체내에 *xyIA* 유전자가 존재할 때 보다 고복제수 유래의 플라스미드내에 존재할 경우 1.9배, 저복제수 유래의 플라스미드내에 존재할 경우 1.7배 정도 강하게 나타났으나 플라스미드 상호간에는 복제수가 2~3배 높음에도 불구하고 발현정도에는 차이를 보이지 않았다.

Xylose 농도에 따른 xylose isomerase의 유도

Xylose 농도별 XI의 유도 효과를 보기 위하여 pEX202/DH77, pEX102/DH77 및 JM109를 LB 배지에 접종하여 xylose를 0.05%에서 0.5%까지 첨가하였고 37°C에서 3시간 배양한 후 XI의 생산량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.1%까지는 세 균주 공히 직선적으로 유도되다가 그 이후 증가 속도가 둔화되었다. 형질전환주에서 효소활성이 친주에 비해 약 2.0배 정도 증가하였으며 *xyIA* 변이주인 DH77의 경우 xylose를 첨가해도 XI가 전혀 유도되지 않았다.

균의 증식에 따른 xylose isomerase의 유도

균의 증식 기간별 XI의 유도 정도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같았다. LB 배지에 종배양액을 2% 되게 접종하고 0.4% xylose를 첨가하여 30분 간격으로 XI 활성과 균의 증식을 조사하였다. LB 배지에서 균의 증식은 모두가 같았으며 효소활성은 대수증식기의 말기인 3.5시간까지는 효소활성이 증가하였으나 그 이후 부터는 활성이 급격히 낮아졌다. 이러한 현상은 JM109, pEX102/DH77 및 pEX202/DH77 모두에서 같은 경향을 나타내었다.

Glucose에 의한 xylose isomerase의 생산억제

대장균에서 대사되기 쉬운 이화물인 glucose를 배지중에 첨가하면 xylose에 의한 XI의 유도가 억제되는지 조사하기 위하여 0.4% xylose가 들어있는 LB 배지에서 glucose를 0.5%까지 농도를 달리하여 첨가하여 37°C에서 3시간 배양한 후 XI의 생산량을 조사하였다(Fig. 4). Glucose의 농도가 0.1% 일때는 플라스미드에 *xyIA* 유전자를 가진 형질전

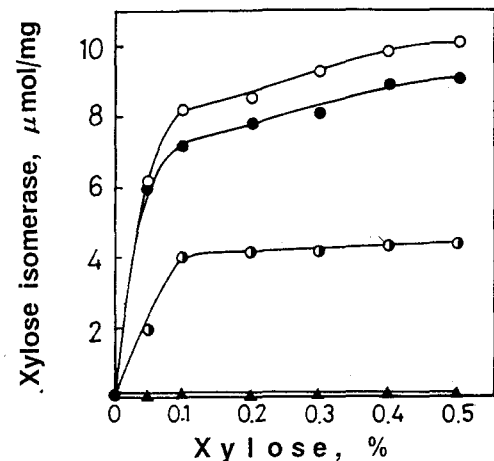


Fig. 2. Induction of xylose isomerase by xylose in *xyIA* gene of chromosome (JM109, ●-●), low copy numbered plasmid(pEX102/DH77, ●-●), high copy numbered plasmid(pEX202/DH77, ○-○) and *xyIA* mutant of *E. coli*(DH77, ▲-▲). Bacteria were grown in LB media containing xylose as an inducer at 37°C for 3 hrs.

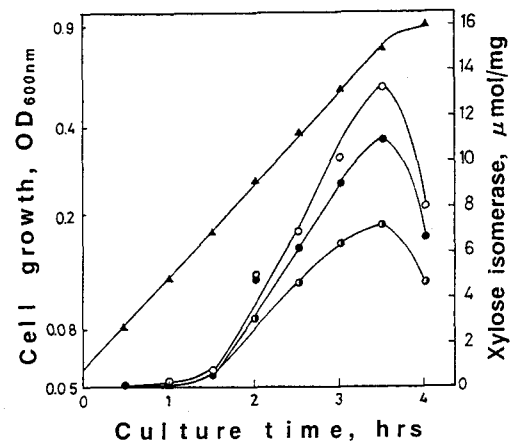


Fig. 3. Cell growth and induction of xylose isomerase by xylose. Bacteria were grown in LB media containing 0.4% xylose as an inducer at 37°C. The growth rates of pEX202/DH77, pEX102/DH77 and JM109 were similar in LB media. ○-○, Xylose isomerase activity of pEX202/DH77; ●-●, activity of pEX102/DH77; ●-●, activity of JM109; ▲-▲, cell growth.

환주들은 염색체에 *xyIA* 유전자를 가진 JM109 보다 XI 생산이 높았으나, glucose의 농도가 0.2% 이상에서는 *xyIA* 유전자의 수에 관계없이 세 균주 공히 XI가 생산되지 않았다. 즉 glucose는 xylose에 의한 XI의 유도를 억제하였다.

Xylose를 첨가하여 XI를 유도시키는 도중에 glucose를 첨가하여 XI의 생산이 억제되는 현상을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 0.4% xylose를 첨가한 LB 배지 100 ml에 세 균주 pEX202/DH77, pEX102/DH77 및 JM109를 1시간 30분 배양한 후 이 배양액 50 ml를 새 플라스크에 옮겨 0.2% glucose를 첨가하여 배양시간이 경과함에 따라 생성되는 XI 활성을 조사하였다. 유도물질인 0.4% xylose만 있는 배지에서는 효소활성이 계속 증가하는 반면에 0.2% glucose가 배지중에 가해지면 세 균주 모두 효소활성이 30분 정도 증가하다가 점차로 감소하였다.

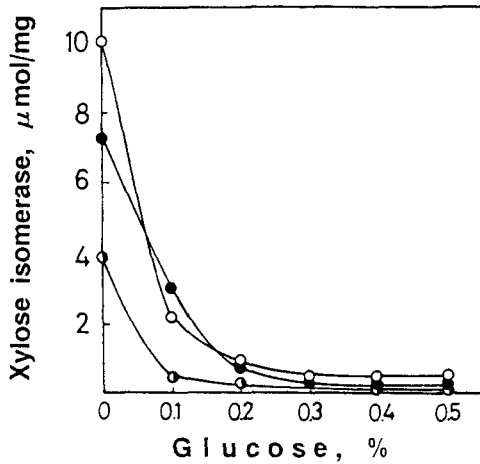


Fig. 4. Effect of glucose on the induction of xylose isomerase. Bacteria were grown in LB media containing 0.4% xylose with or without glucose at 37°C for 3 hrs. Symbols were the same as in Fig. 3.

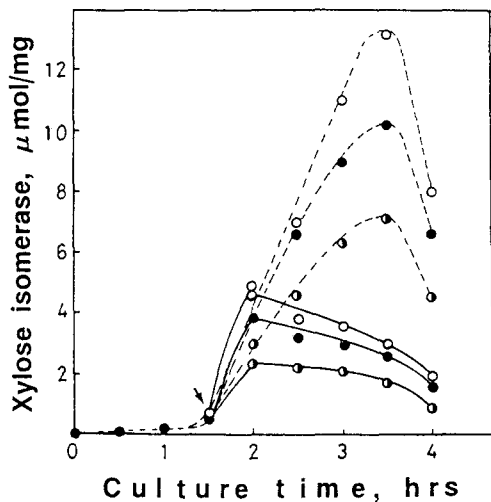


Fig. 5. The repression with glucose on induction of xylose isomerase. Bacteria were grown in LB media containing 0.4% xylose(---) and 0.2% glucose(—) were added to the media after induction for 1.5 hrs (arrow pointed). Other symbols were the same as in Fig. 3.

Glucose에 의한 xylose isomerase 생산억제에 미치는 cAMP의 영향

이화물 억제(catabolite repression)는 cAMP의 농도가 증가하면 해제(derepression)된다는 사실²⁹⁾이 알려져 있기 때문에 본 연구에서도 cAMP 첨가에 의해 XI의 생산억제가 해제되는지 조사하였다(Table 3).

배지중에 cAMP와 xylose를 함께 넣어 *xylA* 유전자를 가지고 있는 대장균을 배양하면 cAMP에 의해 xylose 대사의 초기단계가 촉진되어 세포에 유독한 대사산물인 methylglyoxal을 축적시켜 균체성장을 억제하게 된다.²⁹⁾ 그래서 본 실험에서는 LB 배지에 JM109, pEX102/DH77 및 pEX202/DH77을 1.5시간 배양한 후 탄소원 및 cAMP를 첨가하여 1.5시간 더 배양하여 이때 유도되거나 혹은 억제된 XI의 활성을 조사하였다. Glucose, glycerol 혹은 cAMP를 단독으로 첨가했을 경우에는 XI가 유도되지 않았다. Xylose와

Table 3. Effect of cyclic AMP on the induction and repression of xylose isomerase production in LB media and DM minimal media

Used medium	Treatments	Xylose isomerase, μmol/mg		
		pEX202/DH77	pEX102/DH77	JM109
LB medium	0.4% Xylose	8.0	6.8	3.8
	0.2% Glucose	0.2	0.2	0.2
	0.4% Glycerol	0.2	0.2	0.2
	1 mM cAMP	0.2	0.2	0.2
	0.4% Xylose+0.2% Glucose	0.6	0.5	0.2
	0.4% Xylose+0.2% Glucose +1 mM cAMP	4.5	2.9	1.3
	0.4% Xylose+1 mM cAMP	9.3	8.2	4.3
DM medium	0.4% Xylose	6.1	5.3	3.2
	0.2% Glucose	0.5	0.4	0.2
	0.4% Glycerol	0.5	0.4	0.0
	1 mM cAMP	0.5	0.4	0.2
	0.4% Xylose+0.2% Glucose	0.8	0.8	0.6
	0.4% Xylose+0.2% Glucose +1 mM cAMP	4.3	4.9	3.2
	0.4% Xylose+1 mM cAMP	12.9	9.2	6.4

After bacteria were grown at 37°C for 1.5 hrs in LB media and for 8.0 hrs in DM media, sugars and/or cAMP were added to the culture broth and then the bacteria in LB and DM media were incubated for additional 1.5 and 2.0 hrs, respectively.

glucose를 함께 첨가했을 경우에는 glucose에 의해 XI의 유도가 억제되었지만 여기에 1 mM cAMP를 첨가했을 경우에는 glucose에 의한 억제가 해제되었다. 0.4% xylose 단독으로 유도했을때의 효소생산과 비교해 보면 cAMP에 의해 pEX202/DH77에서는 56%, pEX102/DH77에서는 43%, JM109에는 34% 정도로 glucose에 의한 효소생산의 억제가 해제(derepression)되었다. DM 최소배지에서도 glucose에 의해 XI의 유도생산이 억제되는 조건에서 cAMP를 첨가했을 경우 xylose만 첨가한 실험에 비해 70% 내지 100% 정도로 효소생산의 억제가 해제되었다. Table 3에서 보는 바와 같이 cAMP 단독으로는 *xylA* 유전자의 발현을 유도할 수 없었으나 xylose와 cAMP를 동시에 첨가했을때 LB 배지에서는 xylose 단독첨가시의 110 내지 120%, DM 최소배지에서는 177 내지 210%의 효소를 유도 생산하였다.

대장균에서 *xylA* 유전자의 발현유도에서 cAMP의 존재가 필수적인지를 알아보기 위하여 cAMP의 생산이 불가능한 *cya*⁻ 변이주이면서 *xyl*⁻ 변이주인 대장균 TP2010과 *xylA* 유전자를 가진 pEX13으로 형질전환시킨 형질전환주 pEX13/TP2010에서 XI의 유도 및 억제효과에 대하여 조사하였다(Table 4). TP2010은 *cya*⁻ 및 *xyl*⁻ 변이주이므로 어떤 조건에서도 효소생산이 유도되지 않았으나 형질전환주 pEX13/TP2010은 xylose와 함께 cAMP를 첨가해 준 조건에서만 효소생산이 유도되었다. 또 glucose에 의해 효소의 유도생산이 억제되는 조건에서도 cAMP를 첨가해 줄 경우 전자의 50% 정도의 효소가 생산되었다. 이상의 결과에서 볼때 대장균에서 XI의 유도생산 및 억제해제에는 xylose와 cAMP가 필수적인 효과물질(effector)임을 추측할 수 있었다.

Table 4. Effect of cyclic AMP on the induction and repression of xylose isomerase by the addition of xylose and/or glucose in *cya*⁻ mutant of *E. coli*(TP2010)

Treatments	Xylose isomerase, $\mu\text{mol}/\text{mg}$		
	JM109	TP2010	pEX13/TP2010
0.4% Xylose	3.8	0.3	0.4
0.2% Glucose	0.2	0.2	0.3
0.4% Xylose+0.2% Glucose	0.2	0.2	0.4
0.4% Xylose+0.2% Glucose +1 mM cAMP	1.3	0.2	1.9
0.4% Xylose+1 mM cAMP	4.3	0.2	3.8

After bacteria were grown in LB medium for 1.5 hrs, sugars and/or cAMP were added to the culture broth and then the bacteria were incubated for additional 1.5 hrs at 37°C.

고 찰

고복제수 유래의 *xyIA* 유전자를 가진 pEX202를 제작할 때 *xyIA* 유전자를 분리한 pEX13은 YEp13¹⁶⁾ 유래의 효모-대장균 셔틀벡터이다. 이 pEX13은 pBR322와 같은 복제기점을 가지고 있지만 대장균 세포내에서 안정성이 떨어지기 때문에¹⁶⁾ 비교적 안정성이 높고 pMB1 유래의 고복제수 복제기점을 가진 pBR322^{14,17)}에 1.6 kb의 *xyIA* 단편을 삽입하여 서브 클로닝하였다. 저복제수 유래의 복제기점을 가진 pEX102는 pSC101의 복제기점을 가진 pLG339¹⁵⁾에 1.6 kb의 *xyIA* 단편을 삽입한 것이다. 복제기점의 차이로 인해 대장균 세포내에서 pEX202의 복제수가 pEX102보다 2~3배 많으므로^{14,15,17)} 전자의 *xyIA* 유전자의 복제수가 후자보다 약 2배 이상 많을 것으로 추측된다. 즉 pEX202/DH77에서 *xyIA* 유전자의 복제수는 pEX102/DH77이나 JM109보다 많겠지만 발현을 조절하는 *xyIR* 유전자는 3주가 다 같이 염색체상에 존재하기 때문에 *xyIR* 유전자의 수 및 그 산물의 생산수준은 동일할 것이다. 이들 형질전환주에서 XI의 발현 정도는 *xyIA* 유전자의 복제수에 의존하지 않고 *xyIR* 유전자 산물의 생산수준에 의해 조절되기 때문에 유전자 투여량의 효과가 현저하게 나타나지 않는 것으로 생각된다(Table 2). Rosenfeld 등¹⁸⁾도 *xyIA* 유전자를 클로닝하여 *xyIA* 변이주에 형질전환시켰을 때 MacConkey-xylose 한천평판에서 분홍색 콜로니가 생성되지 않는 현상을 보고 *xyIR* 유전자 산물의 적정(titration) 효과 때문이라고 추정한 바 있다. 본 연구에서 유전자 투여량 효과가 나타나지 않는 것도 같은 현상에서 기인된 것으로 생각된다. 형질전환주 pEX202/DH77 및 pEX101/DH77에 0.4% xylose를 첨가하여 유도하였을 때 친주인 JM109에 비해 약 2배 정도 효소활성이 증가하였으며 이때 형질전환주의 세포내에 불용성의 봉입체(inclusion body)의 생성은 관찰되지 않았으므로 불활성의 효소가 다량생산 되었다고는 생각되지 않는다(데이터 미제시).

본 실험에 사용한 대장균 JM109는 염색체에 *xyIR*, *xyIA*와 *xyIB* 유전자를 함께 가지고 있으며 형질전환주 pEX102/DH77 및 pEX202/DH77은 *xyIR*, *xyIB* 유전자는 염색체에 존재하고 *xyIA* 유전자는 플라스미드에 보유하고 있다. 플라스

미드상의 *xyIA* 유전자가 염색체상에 결손된 *xyIA* 유전자에 상보적으로 작용하여 xylose를 탄소원으로 이용할 수 있으며, xylose에 의해 *xyIA* 유전자의 발현이 유도되는 것은 염색체상의 *xyIR* 유전자의 산물이 플라스미드상의 *xyIA* 유전자에 대해 작용한 것임을 알 수 있었다.

대장균의 *xyIR*, *xyIA* 및 *xyIB* 유전자는 79.7분대에 cluster로 존재^{24,25)}하고 있지만 본 연구 결과로 볼 때 *xyIR* 유전자 산물은 *xyIA* 유전자의 발현에 trans-acting 인자로 작용하는 것으로 추측된다. 대장균에서 *xyIR* 유전자가 결손되면 xylose를 이용할 수 없을 뿐만 아니라 XI가 생산되지 않고 xylulokinase 활성도 매우 낮다.^{4,11)} *xyIR* 유전자는 *xyIA* 및 *xyIB* 유전자의 발현에 필수적이며, 즉 *xyIR* 유전자의 결손은 *xyIA*, *xyIB* 및 *xyIT*의 발현을 못하게 하는 다상유전자 변이(pleiotropic mutation)를 야기시킨다.^{34,11)}

균의 증식에 따른 XI의 유도효과를 보면 효소생산은 대수증식기의 말기까지 증가하고 그 이후에는 급격히 감소하였다(Fig. 3). 대수증식기의 말기에는 배지내에 탄소원이며 유도물질인 xylose가 고갈되어 더이상 XI의 생산이 유도되지 않고 세포내에서 분해 또는 파괴만 일어나기 때문에 이러한 현상이 일어나는 것으로 생각된다. 배지에 유도물질인 xylose를 첨가하면 XI의 생산이 유도되며(Fig. 2) glucose를 첨가하면 억제되었고(Fig. 4) 배지중의 glucose를 제거하면 즉시 효소생산이 재개되었다(데이터 미제시).

Glucose가 존재하는 배지에서 자란 세포에서는 cAMP 농도가 매우 낮으며 glycerol이나 해당과정으로 들어갈 수 없는 탄소원으로 자란 균체의 세포내 cAMP의 농도가 높다고 한다.^{26,27)} 본 실험에서 xylose를 첨가하여 효소를 유도시키는 도중에 glucose를 첨가했을 때 효소생산이 어느 정도 일어난 후에 차차 감소하였다(Fig. 5). 이것은 xylose만 있는 배지에 자란 균들의 세포내에는 cAMP의 농도가 높기 때문에 glucose가 첨가되어도 당분간 XI 생산이 유도되었으나 glucose 첨가로 세포내 cAMP의 농도가 감소하기 때문에 효소생산이 점차로 억제되는 것으로 추정된다. *S. typhimurium*의 xylose 대사관련 효소가 유도효소이며 이화물 억제를 받으며 이 이화물 억제가 cAMP의 첨가로 해제되었다.²⁸⁾ 본 연구에서도 이와 같은 이화물 억제가 cAMP 첨가로 해제되었다. cAMP의 첨가는 이화물 억제현상을 해제할 뿐만 아니라 xylose에 의한 XI 유도생산도 촉진하였다(Table 3). 이와같은 cAMP의 효과가 LB 배지에서 보다 DM 최소배지에서 더 현저하게 나타나는 현상에 대해서는 명확하게 설명할 수 없다.

TP2010은 *cya*⁻ 및 *xyl*⁻ 변이주이다.¹³⁾ *xyIA* 유전자를 가진 플라스미드 pEX13을 TP2010에 형질전환시킨 pEX202/TP2010에 xylose만 첨가해 주면 효소생산이 유도되지 않고 xylose와 함께 cAMP를 첨가해야만 효소생산이 유도되는 현상(Table 4)과 pEX102/DH77, pEX202/DH77 및 JM109에서 xylose로 유도시 cAMP를 첨가하면 효소생산이 xylose 단독으로 유도했을 때 보다 촉진되는 현상(Table 3)으로 볼 때 cAMP는 이화물 억제의 해제 뿐만 아니라 효소생산 유도에도 필수적인 효과물질(effector)일 것으로 추측된다. 현재 *xyIA* 유전자의 발현조절에 있어서 *xyIA* 프로모

터 상에서 *xylR* 유전자, xylose 및 cAMP의 영향 등을 계속 조사중에 있다.

감사의 글

본 연구는 교육부 유전공학 연구비에 의해 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다. 대장균 TP2010 및 pLG339를 각각 분양해 주신 동아대학교 최용락 교수님과 경북대학교 박완 교수님께 감사를 드립니다.

참고 문헌

- Bhosale, S. H., M. B. Rao, and V. V. Deshpande (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol. Rev.* **60**, 280-300.
- Rosenberg, S. L. (1980) Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enzyme Microbiol. Technol.* **2**, 185-193.
- Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson (1979) Genetics and regulation of D-xylose utilization in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* **139**, 71-79.
- David, J. D., and H. Wiesmeyer (1970) Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **201**, 497-499.
- Maleszka, R., P. Y. Wang, and H. Schneider (1982) A ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes complementing D-xylose negative mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Biochem.* **60**, 144-151.
- Rosenfeld, S. A., P. E. Stevis and N. W. Y. Ho (1984) Cloning and characterization of the *xyl* genes from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 410-415.
- Briggs, K. A., W. E. Lancashire., and B. E. Hartley (1984) Molecular cloning, DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. *EMBO J.* **3**, 611-616.
- Lawlis, V. B., M. S. Dennis, E. Y. Chen, D. H. Smith, and D. J. Henner (1984) Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 15-21.
- Schellenberg, G. D., A. Sarthy, A. E. Larson, M. P. Backer, J. W. Crabb, M. Lidstrom, B. D. Hall, and C. E. Furlong (1983) Xylose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 6826-6832.
- Rhee, I. K., H. D. Park, S. C. Bae, W. C. Park, J. K. Jo, and J. H. Seu (1986) Development of alcohol-fermenting yeasts from D-xylose by the cloning of D-xylose isomerase gene: cloning of D-xylose isomerase gene in *Escherichia coli*. *Bull. of Institute of the Gen. Eng.* Kyungpook National University **1**, 65-72.
- 노동현, 이인구 (1992) 대장균의 *xylR/T* 변이주의 분리 및 그 특성. 경북대농학지 **10**, 125-135.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Roy, A., and A. Danchin (1982) The *cya* locus of *Escherichia coli* K12: organization and gene products. *Mol. Gen. Genet.* **188**, 465-471.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, and H. L. Heyneker (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II: a multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Stocker, N. G., N. F. Fairweather, and B. G. Spratt (1982) Versatile low copy number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* **18**, 335-341.
- Broach, J. R., J. N. Strathern, and J. B. Hicks (1979) Transformation in yeast: development of hybrid cloning vector and isolation of the *can1* gene. *Gene* **8**, 121-133.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Davis, B. D., and E. S. Mingioli (1950) Mutant of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* **60**, 17-28.
- Birnboim, H. C., and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Mandel, M., and A. Higa (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
- Dische, Z., and E. Borenfreund (1951) A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* **192**, 583-587.
- Ullmann, A., and A. Danchin (1982) Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **15**, 1-54.
- Ackerman, R. S., N. R. Cozzarelli, and W. Epstein (1974) Accumulation of toxic concentrations of methylglyoxal by wild-type *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **119**, 357-362.
- Bachmann, B. J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, 8ed. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.
- Kröger, M., R. Wahl and P. Rice (1991) Compilation of DNA sequences of *Escherichia*(update 1991). *Nucleic Acids Res.* **19**, 2023-2043.
- Botsford, J. L., and J. G. Harman (1992) Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**, 100-122.
- Freifelder, D. (1987) In 'Molecular Biology' 2nd ed., pp 465-467. Jones and Bartlett Pub. Inc.
- Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson (1979) Uptake and catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacteriol.* **139**, 64-70.

Regulation of *xylA* Gene Expression in *Escherichia coli*

Ghang, G-Hee, Dong-Hyun Roh, Byung-Tae Kang and In-Koo Rhee* (*Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea*)

Abstract : The induction by xylose and repression by glucose of xylose isomerase(XI) were investigated to elucidate the regulation for production of XI in *Escherichia coli*. Regulation for expression of *xylA* gene which codes XI is under control of *xylR*, which is a regulatory gene for xylose catabolism. When *xylR* gene was resided in chromosome, the inductions of XI by the addition of 0.4% xylose were increased to 1.9 and 1.7-fold in case of locating on multicopy(pEX202/DH77) and low copy plasmid(pEX102/DH77), respectively, as compared with that of *xylA* gene which was resided in chromosome(JM109). *xylR* gene product derived from *xylR* gene on chromosome might react to *xylA* gene on the plasmid as same as *xylA* gene on chromosome. In JM109 and *xylA* transformant; pEX202/DH77 and pEX102/DH77, the inductions of XI were completely repressed by the addition of 0.2% glucose and these catabolite repressions were derepressed by the addition of 1 mM cAMP. In comparison with the addition of 0.4% xylose only for the induction XI was inductively produced 1.7 to 2-fold with the addition of xylose plus 1 mM cAMP in DM minimal media. pEX13/TP2010, *xylA* transformant of the deficient mutant(*xyl⁻*, *cya⁻*; TP2010) of XI and cAMP production, did not induce XI by the addition of xylose only but induced in case of simultaneous addition of xylose and cAMP. These results show that cAMP and xylose are the indispensable effectors for the induction and derepression of XI in *E. coli*.

*Corresponding author