

대장균의 *xylA* 프로모터 영역의 조절 특성

강병태 · 노동현 · 주길재 · 이인구*

경북대학교 농화학과

초록 : *xylA* 유전자의 프로모터상에서 조절양상을 조사하기 위하여 *xylA* 유전자의 프로모터(*Pxyl*)와 *lacZ* 유전자를 연결한 *Pxyl-lacZ* 융합 유전자를 제작하여 xylose에 의한 β -galactosidase 생산의 조절양상을 조사하였다. *xylA* 프로모터 부위를 분리하여 *lac* 프로모터가 없는 고복제수의 *lac* 오페론 벡터인 pMC1403에 클로닝시켜 pMCX191을 제작하여 reading frame에 변화가 없는 *Pxyl-lacZ* 융합 유전자를 만들었으며 이 벡터에서 *Pxyl-lacZ* 단편을 분리한 후 저복제수 벡터인 pLG339에 클로닝시켜 pLGX191을 제작하였다. 상기 플라스미드들을 *xylA* 변이주인 DH77에 형질전환시켜 *Pxyl-lacZ* 융합 유전자에서 β -galactosidase의 발현조절을 조사한 결과 xylose 농도에 따른 유도, glucose에 의한 발현억제 및 cAMP에 의한 억제해제 양상 등이 염색체상의 *xylA* 유전자의 발현조절과 같은 경향을 나타내었다. pMCX191과 pLGX191을 이용하여 유전자 투여량 효과를 본 결과도 복제수에 따른 차이가 크지 않았다. *xylA* 프로모터 부위내 조절영역을 추정하기 위해 구조유전자 상류 -209 bp를 포함한 *xylA* 유전자를 pUC19에 클로닝시킨 pUX30에서 프로모터 부위가 부분결손된 벡터들을 제작하여 결손부위의 염기서열을 확인하였다. 이들 부분결손 *xylA* 프로모터를 가진 *xylA* 유전자에서 xylose isomerase의 발현을 조사한 결과, 번역 개시점에서 -166 bp 이상의 영역을 결손시킨 pUX31과 pUX32의 경우 pUX30과 비슷한 발현 양상을 보인 반면 -120 bp 이상의 영역을 결손시킨 pUX33과 pUX34에서는 모벡터에 비해 약 30% 수준의 발현을 보였다. 또한 pUX33과 pUX34에서는 xylose 유도에 cAMP에 의한 발현 촉진효과도 볼 수 없었다. -59 bp 이상의 부위가 결손된 pUX35의 경우에는 전혀 *xylA* 유전자의 발현이 일어나지 않았다. 이러한 결과로 볼때 *xylA* 프로모터내의 조절부위는 -165 bp에서 -59 bp 사이에 존재하는 것으로 추정되었다.(1996년 8월 22일 접수, 1996년 10월 5일 수리)

서 론

장내세균에서 xylose의 대사경로를 보면 세포막에 존재하는 xylose permease (*xylT*)에 의해 세포외의 xylose가 세포내로 수송되어 xylose isomerase(*xylA*)에 의해 xylulose로 이성화 된다. Xylulose는 xylulokinase(*xylB*)와 ATP에 의해 xylulose-5-phosphate로 인산화되어 오탄당 회로를 거쳐 대사된다.

*Salmonella typhimurium*에서 xylose의 대사에 관여하는 효소 단백질을 코딩하는 유전자들은 *xylT*, *xylA* 및 *xylB*이며 이들 유전자의 발현을 조절하는 *xylR*(regulatory element)이 함께 오페론으로 구성되어 있다.¹⁾ David 등²⁾은 *xylA*, *B* 및 *T*의 3중 변이주가 일시에 친주형으로 복귀하는 현상을 발견하고 이들 유전자들이 공통의 조절인자에 의해 조절을 받을 것이라고 추정하였다. Shamanna와 Sanderson은 *S. typhimurium*의 *xyl* 변이주군을 분리하여 F' *xyl* 플라스미드를 이용한 상보성 실험으로 *xylA*, *B* 및 *T*가 *xylR* 산물에 의해 양의 조절을 받는다는 사실을 보고³⁾한 바 있으며 Maleszka 등³⁾에 의해 대장균 *xylA* 유전자가 *S. typhimurium*의 *xyl* 변이주에 conjugation 시켜 상보성을 확인함으로써 대장균이 *S. typhimurium*과 같은 양의 조절을 받을 것으로 추측하였다.

전보⁴⁾에서 *xylA* 유전자의 발현조절에 미치는 *xylR*의 영향

을 간접적으로 조사하였으며 *xylA* 유전자의 발현에는 유도물질인 xylose와 함께 cAMP가 필수적인 효과물질임을 확인한 바 있다. 본 연구에서는 대장균의 *xylA* 유전자 발현에 있어서 *xylA* 프로모터 영역에서의 영향을 조사하기 위하여 *xylA* 프로모터(*Pxyl*) 하류에 *lacZ* 구조유전자를 삽입시켜 *Pxyl-lacZ* 융합 유전자를 제작하여 xylose에 의한 *lacZ* 유전자의 발현정도를 조사하였으며 *xylA* 프로모터 부위를 부분결손시켜 *xylA* 유전자의 발현여부를 조사하여 프로모터상에서 조절부위의 위치를 추정하기 위하여 본 실험을 행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주 및 플라스미드는 Table 1과 같다. 대장균중 친주로는 JM109를 사용하였으며 *xylA* 변이주로는 DH77을 사용하였다.

대장균의 배양은 완전배지인 Luria-Bertani(LB) 배지,¹⁰⁾ 플라스미드 추출에는 LB 또는 Terrific broth¹⁰⁾를 사용하였다. 형질전환주 선별을 위해서는 MacConkey agar(Difco Co.)에 0.4% xylose를 첨가한 MacConkey-xylose/lactose 한천평판배지를 사용하였다. 효소 활성측정을 위해서는 0.4% xylose를 첨가한 LB 배지 혹은 최소배지인 Davis Mingioli(DM) 배지¹¹⁾에 탄소원으로 glucose 대신에 0.4%

찾는말 : *E. coli*, *xylA* promoter, *xylA* promoter-*lacZ* fusion gene, xylose isomerase, *xylA* gene

*연락처

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⁺ lacI^r lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> ⁵⁾
DH77	<i>xyIA</i> ; NTG mutant from JM109	Roh and Rhee ⁶⁾
Plasmids		
pMC1403	Ap ^r , Δ <i>Plac</i> , <i>lacZ</i> , <i>lacY</i> , <i>lacA</i>	Casadaban <i>et al.</i> ⁷⁾
pLG339	Km ^r , Tc ^r	Stocker <i>et al.</i> ⁸⁾
pEX11	Ap ^r , <i>leu2</i> , <i>xyIA</i>	Rhee <i>et al.</i> ⁹⁾
pUCX191	Ap ^r , <i>PxyI-lacZ</i>	This study
pMCX191	Ap ^r , <i>PxyI-lacZ-lacY-lacA</i>	This study
pLGX191	Km ^r , <i>PxyI-lacZ-lacY-lacA</i>	This study
pUX30	Ap ^r , <i>xyIA</i> , <i>lacZ</i>	This study
pUX31~35	deletion series from pUX30	This study

glycerol, 아미노산 50 μg/ml 및 thiamine-HCl 2 μg/ml을 첨가하여 사용하였다. 플라스미드의 선별 및 유지를 위하여 100 μg/ml의 ampicillin(Ap), 20 μg/ml kanamycin(Km) 및 10 μg/ml tetracycline(Tc)을 필요에 따라 배지에 첨가하여 사용하였다.

DNA의 분리 및 형질전환

대장균으로부터 플라스미드 DNA의 추출은 Birnboim과 Doly의 방법¹²⁾에 준하여 시행하였으며 플라스미드 DNA의 확인과 조작을 위해서는 40 mM Tris · acetate-1 mM EDTA(TAE) 완충액을 사용하여 1% agarose gel로 30 mA에서 전기영동 하였으며 짧은 DNA 단편의 확인을 위해서는 45 mM Tris · borate(pH 8.0)-1 mM EDTA(TBE) 완충액을 사용하여 10% acrylamide gel로 40 mA에서 전기영동하였다.

대장균의 형질전환은 Mendel과 Higa의 방법¹³⁾에 따라 행하였으며 제한효소, T₄ DNA polymerase, T₄ DNA ligase 처리는 공급사가 추천하는 조건에서 처리하였다.

프로모터 부분결손 벡터의 제작 및 염기서열 분석

xyIA 프로모터의 부분결손 벡터 제작을 위해서는 Henik-off 법¹⁴⁾에 준해 시행하였다. pEX13⁹⁾에서 *xyIA* 유전자를 가진 BglIII 단편을 분리하여 pUC19 벡터의 BamHI 부위에 삽입시켜 플라스미드 pUX30(Fig. 1)을 제작하였다. 먼저 플라스미드 pUX30을 CsCl 밀도 기울기 초원심 분리로 정제하여 pUX30내 *xyIA* 프로모터 상류의 multicloning 부위를 SmaI과 SstI으로 절단하여 5'측이 평활말단이 되고, 3'측이 돌출말단이 되도록 만들었다. 절단한 플라스미드 단편 5 μg을 exonuclease III 2.5 μl(450U)로 25°C에서 처리하면서 30초 간격으로 반응액 5 μl씩을 취하여 mung bean nuclease 반응액(30 mM NaAc, pH 4.6-50 mM NaCl-1 mM ZnCl₂-5% glycerol-4 U mung bean nuclease) 15 μl에 혼합한 후 25°C에서 30분간 반응시켰다. 상기 반응액을 75°C에서 10분간 처리하여 반응을 정지시킨 후 T₄ DNA polymerase 처리로 평활 말단을 만든 다음 T₄ DNA ligase로

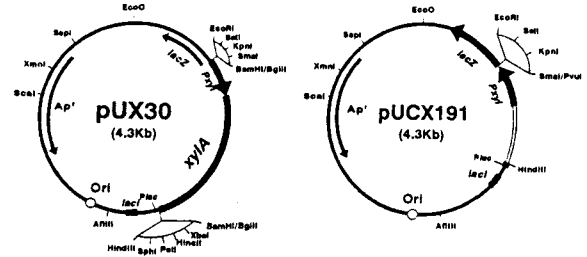


Fig. 1. Map of pUX30 for the construction of *xyIA* genes partially deleted promoter and pUCX191 containing *PxyI-lacZ* fusion gene.

연결 시켰다. 이렇게 제작된 프로모터 부분결손 벡터를 *xyIA* 변이주인 DH77에 형질전환시켜 결손정도가 다른 플라스미드를 선별하였으며 이들 플라스미드에서 *xyIA* 프로모터의 결손정도는 dideoxy chain termination 방법¹⁵⁾에 따라 DNA 염기서열을 분석하여 확인하였다.

효소의 활성 측정

Xylose isomerase 활성은 전보⁴⁾에서와 같이 생성된 xylose를 cysteine-carbazole법¹⁶⁾에 의해 540 nm에서 측정하였다. 효소의 활성단위는 본 실험 조건에서 1분간 건조 균체 mg당 1 μmol의 xylose를 xylulose로 이성화시킬 수 있는 효소량으로 나타내었다.

β-Galactosidase 활성은 Miller의 방법¹⁷⁾에 준하여 다음과 같이 시행하였다. 균체 배양액 500 μl를 원심집중하고 탄소원이 첨가되지 않은 DM 배지로 1회 세척하여 여액을 완전히 제거한 다음 같은 배지 1 ml에 현탁시켜 그 중 20 μl을 취하여 Z buffer(0.06 M Na₂HPO₄ · 7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄ · H₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄ · 7H₂O, 0.05 M β-mercaptoethanol, pH 7.0) 980 μl와 toluene 20 μl를 혼합하였다. 이 혼합액을 10초간 vortex 믹서로 교반한 다음 28°C에서 10분간 예열시킨후 기질로써 10 mM O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG) 200 μl를 가하여 28°C에서 15분간 반응시켰다. 이 반응액에 0.5 M Na₂CO₃ 1 ml을 가하여 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 Miller 단위로 환산하여 표시하였다.

시약

본 실험에 사용한 exonuclease III 및 mung bean nuclease, α-³⁵S-dATP는 Amersham 사 제품을, ONPG와 isopropyl-1-thio-β-D-galactoside(IPTG)는 Boehringer-Mannheim 사, DNA sequencing kit은 United States Biochemical 사의 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

PxyI-lacZ 융합 유전자를 가진 pMCX191과 pLGX191의 제작

xyIA 유전자를 가지고 있는 pEX11⁹⁾을 PvuI로 절단하고 T₄ DNA polymerase를 처리하여 *xyIA* 구조 유전자내의 +25 bp까지를 평활말단으로 만든 다음 *xyIA* 프로모터 상류

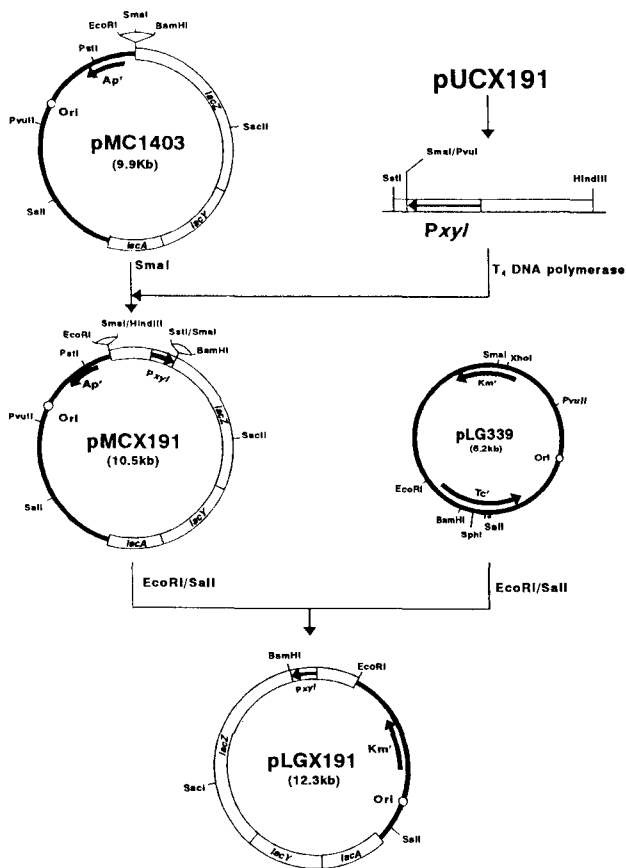


Fig. 2. Construction and physical map of plasmid pMCX191 and pLGX191 which contained *PxyI-lacZ* fusion gene.

의 벡터내 위치한 *HindIII* 부위를 절단하여 *xyIA* 프로모터 (*PxyI*)를 가진 0.6 kb 단편을 분리하였다. pUC19의 multicloning 부위내 *SmaI*과 *HindIII* 부위를 절단하여 *xyIA* 프로모터 단편과 연결시켜 *xyIA* 프로모터-*lacZ* (*PxyI-lacZ*) 융합 유전자를 제작하였으며 이 융합 유전자를 가진 플라스미드를 pUCX191이라 하였다(Fig. 1). 이때 *SmaI*과 *PvuI* 부위간의 연결에서는 frame shift에 의한 변이가 일어나지 않도록 제작되었음에도 불구하고 xylose에 의해 β -galactosidase가 유도되지 않았다(데이터 미제시). 그래서 또 다른 *PxyI-lacZ* 융합 유전자의 제작을 시도하였다. pUCX191의 *xyIA* 프로모터 하류 multicloning 부위 중에 *SstI* 부위와 *xyIA* 프로모터 상류의 *HindIII* 부위를 절단하여 0.6 kb의 *xyIA* 프로모터를 분리시켜 T₄ DNA polymerase로 평활말단으로 만들었다. 한편 *lac* 오픈론에서 *lac* 프로모터 부위에서 N 말단 7번째 코돈까지 제거된 프로모터 검색벡터 pMC1403²⁷의 *lacZ* 구조 유전자 앞에 위치한 *SmaI* 부위를 절단하여 상기 0.6 kb의 *xyIA* 프로모터를 연결시켜 *xyIA* 프로모터가 *lacZ*의 전사방향과 같은 위치로 향한 pMCX191를 제작하였다(Fig. 2). 이 플라스미드를 *xyIA* 변이주인 DH77에 형질전환시켜 MacConkey-xylose/lactose 평판 배지에서 분홍색 콜로니의 형성 유무로 형질전환주를 선별하고 플라스미드를 추출하여 전기영동으로 확인하였다. 이때 만들어진 pMCX191는 고복제수의 복제기점을 가

Table 2. Expression of *lacZ* gene on *PxyI-lacZ* fusion gene in pMCX191 and pLGX191

Strains	β -Galactosidase, Unit		
	Uninduced	Induced	
		Xylose	IPTG
JM109	48(\pm 21)	45(\pm 17)	68(\pm 09)
pMC1403/DH77	81(\pm 10)	55(\pm 21)	69(\pm 16)
pMCX191/DH77	96(\pm 09)	5756(\pm 15)	92(\pm 11)
pLG339/DH77	114(\pm 29)	53(\pm 32)	55(\pm 20)
pLGX191/DH77	104(\pm 18)	4881(\pm 23)	141(\pm 30)

Strains were grown in DM minimal medium for 8 hours and xylose or IPTG were added to the culture broth. The culture broth was incubated at 37°C for additional 2.0 hours. The concentration of xylose and IPTG were 0.4% and 1 mM, respectively. Each value represents the mean \pm S.E. of triplicate determinations.

진 플라스미드이다. 저복제수의 복제기점을 가진 벡터에 *PxyI-lacZ* 융합 유전자를 클로닝하기 위하여 pMCX191의 *EcoRI*과 *SalI* 부위를 절단하여 저복제수 벡터인 pLG339⁸⁾의 Tc 내성 유전자 부위내의 *EcoRI-SalI*부위와 연결시켜 pLGX191를 제작하였다(Fig. 2).

PxyI-lacZ 융합 유전자 발현에 미치는 유전자 투여량의 효과

PxyI-lacZ 융합 유전자를 가진 pMCX191 및 pLGX191을 *xyIA* 변이주(DH77)에 형질전환시킨 형질전환주 pMCX191/DH77 및 pLGX191/DH77은 xylose 첨가에 의해 β -galactosidase가 유도되었다. *PxyI-lacZ* 융합 유전자에 있어서 복제수에 따른 β -galactosidase 발현정도를 조사한 결과는 Table 2와 같다. 0.4%의 xylose로 유도시켰을때 고복제수 플라스미드를 가진 pMCX191/DH77이 저복제수 플라스미드를 가진 pLGX191/DH77보다 β -galactosidase 활성이 18% 정도 더 높은 값을 보여주었으나 복제수의 차이만큼 활성의 차이는 보여주지 않았다. 친주인 JM109의 경우 *lacZ* 변이주이기 때문에 xylose나 1 mM IPTG에 의해 활성이 유도되지 않았다. 두 플라스미드 모두 *lac* 프로모터 부위가 배제되었기 때문에 IPTG에 의한 β -galactosidase 활성 유도는 일어나지 않았다.

PxyI-lacZ 융합 유전자의 복제수에 따른 β -galactosidase의 발현수준이 현저히 증가하지 않는 것은 *PxyI-lacZ*의 발현이 염색체에 존재하는 조절 유전자인 *xyIR*에 지배를 받기 때문인 것으로 생각된다. 즉 플라스미드상에 여러 복제수의 *PxyI-lacZ*가 존재하더라도 염색체상의 *xyIR* 유전자로 부터 생산된 *xyIR* 산물의 수준에 지배를 받기 때문에 유전자 투여량 효과가 현저하게 나타나지 않은 것 같다. 이러한 현상은 전보⁴⁾에 밝힌 바와 같이 원래의 *xyIA* 유전자에서도 관찰되었다. 염색체의 *xyIR* 유전자가 플라스미드상의 *PxyI-lacZ* 융합 유전자에 작용하여 β -galactosidase를 유도하는 사실과 *xyIR* 변이주에 pMCX191 및 pLGX191를 형질전환시킨 경우에는 β -galactosidase를 생산하지 않는 사실(미발표) 등으로 볼때 *xyIR* 유전자 산물이 *xyIA* 유전자의 프로모

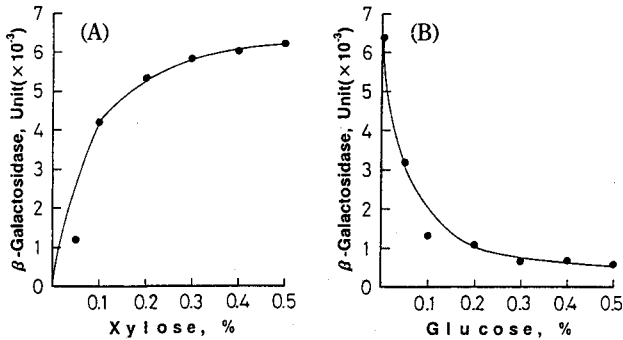


Fig. 3. Expression of β -galactosidase in *PxyI-lacZ* fusion gene (pMCX191/DH77). (A) Induction by xylose; (B) repression by glucose. After bacteria were cultured in DM minimal medium containing 0.4% glycerol for 8 hrs, xylose or xylose/glucose were added to the culture broth. The bacteria were incubated for additional 2.0 hrs at 37°C.

터 부위에 작용한다는 사실을 추측할 수 있다.

***PxyI-lacZ* 융합 유전자에서 xylose에 의한 *lacZ* 유전자의 발현유도와 glucose에 의한 발현억제 효과**

고복제수 유래의 *PxyI-lacZ* 융합 유전자를 가진 형질전환주 pMCX191/DH77을 이용하여 xylose 농도별로 β -galactosidase의 발현유도와 glucose에 의한 발현억제를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. Xylose 농도가 0.1%까지는 β -galactosidase 활성이 급격히 증가하다가 그 이후 완만한 활성 증가를 보여주었다(Fig. 3, A). DM 배지에 형질전환주를 접종하여 8시간 배양한 후 0.4% xylose와 glucose를 농도별로 첨가하여 2시간 더 배양한 다음 β -galactosidase 활성을 측정된 결과 glucose 농도가 0.2% 이상일 경우 xylose에 의한 β -galactosidase의 활성 유도가 약 20% 수준으로 억제되었다(Fig. 3, B). 이는 원래의 *xylA* 유전자 조절⁴⁾과 마찬가지로 glucose에 의해 이화물 억제를 받는 것으로 생각된다.

***PxyI-lacZ* 융합 유전자에서 glucose에 의한 *lacZ* 발현억제에 미치는 cAMP의 영향**

PxyI-lacZ 융합 유전자에서 glucose에 의한 β -galactosidase의 활성억제 양상은 Table 3에서 볼 수 있듯이 0.4% xylose를 첨가한 상태에서 0.2% glucose 첨가에 의해 β -galactosidase 활성이 xylose 단독 첨가에 비해 pMCX191/DH77에서는 20%, pLGX191/DH77에서는 15% 수준으로 발현 억제 효과를 나타내었다. 여기에 1 mM cAMP를 첨가한 경우 β -galactosidase 활성이 pMCX191/DH77에서는 77%, pLGX191/DH77에서는 52% 수준으로 억제가 해제(derepression)되었다.

Xylose와 cAMP를 동시에 첨가한 경우에는 xylose 단독 첨가시에 비해 pMCX191/DH77의 경우 134%, pLGX191/DH77의 경우 145%로 유도촉진 효과를 보여주었다. 그러나 cAMP 단독 첨가시에는 β -galactosidase 생산의 유도가 일어나지 않았다.

이러한 결과는 융합 유전자가 아닌 염색체에 존재하는

Table 3. Effect of cAMP on the repression of β -galactosidase with glucose on *PxyI-lacZ* fusion gene

Treatments	β -Galactosidase, Unit		
	JM109	pMCX191/DH77	pLGX191/DH77
None	61(±13)	83(± 11)	92(±18)
1 mM cAMP	57(±20)	80(± 24)	87(±23)
0.4% Xylose	65(±17)	8238(±105)	6930(±45)
+1 mM cAMP			
0.4% Xylose	55(±31)	6155(± 50)	4778(±35)
0.4% Xylose	63(±17)	1256(± 33)	709(±21)
+0.2% Glucose			
0.4% Xylose	79(±22)	4747(± 45)	2519(±75)
+0.2% Glucose			
+1 mM cAMP			

After bacteria were grown in DM medium for 8 hrs, sugar and/or cAMP were added to the culture broth at a final concentration shown in table. The culture broth was further incubated for additional 2.0 hrs at 37°C. Each value represents the mean±S.E. of triplicate determinations.

원래의 *xylA* 유전자는 물론 플라스미드상의 *xylA* 유전자에도 같은 경향을 나타내었다.⁴⁾ Xylose에 의한 유도, cAMP에 의한 이화물 억제의 해제 및 xylose 유도시 cAMP에 의한 유도 촉진효과 등이 *xylA* 유전자에서와 마찬가지로 *PxyI-lacZ* 융합 유전자에서도 일어나므로 cAMP, xylose 및 *xylR* 유전자 산물의 작용부위가 *xylA* 유전자의 프로모터 부위인 것으로 생각된다. cAMP는 xylose와 함께 *xylA* 유전자의 조절에 있어서 *xylR* 유전자의 존재하에 중요한 효과물질(effector)로 작용함을 알 수 있다. 또 효소의 유도합성에서 cAMP 자체가 *xylA* 유전자의 프로모터상에서 직접 activator로써 역할을 하지 못하고 xylose를 필요로 하므로 *xylR* 산물에 의한 조절에 있어 부수적인 coactivator로써 작용할 것으로 생각된다.

부분결손된 *xylA* 프로모터의 특성

xylR 유전자 산물의 존재하에서 xylose의 유도와 cAMP에 의한 이화물 억제해제 및 유도촉진 등의 조절기능이 *xylA* 프로모터 상에서 일어나므로 이 프로모터의 어느 부위에서 작용을 받는지 조사하기 위하여 *xylA* 프로모터를 부분적으로 결손시킨 벡터 pUX31, 32, 33, 34 및 35를 제작하였다. 각 *xylA* 프로모터 부분결손 벡터내 결손부위를 염기서열 분석으로 확인한 결과 Fig. 4와 같았으며 부분결손 벡터를 *xylA* 변이주인 DH77에 형질전환시켜 *xylA* 유전자의 발현 정도를 조사한 결과는 Table 4와 같았다.

Schellenberg¹⁸⁾에 의해 결정된 *xylA* 염기서열 분석 및 N-말단 아미노산 서열분석에서 번역 개시기점을 기준으로 -166 bp 이상의 상류부분을 결손시켰을 때(pUX31, pUX32) xylose isomerase 활성 조절이 모벡터인 pUX30과 같은 경향을 보여 주므로 상류 -209~-166 bp 부위는 프로모터 영역에서 조절 부위에 포함되지 않는 것으로 생각된다. -125 및 -120 bp 이상의 상류부분이 결손되었을 때(pUX33, pUX34) xylose에 의한 xylose isomerase 활성 유

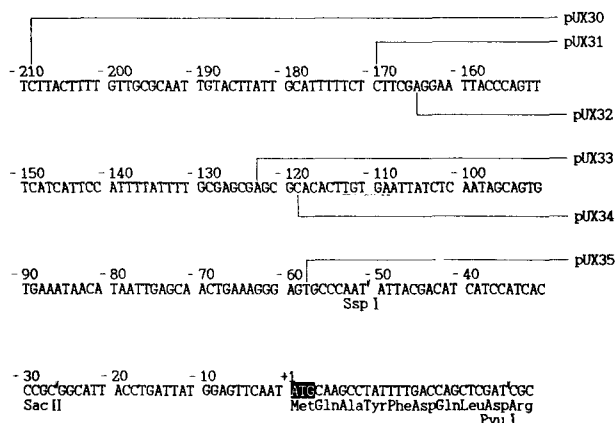


Fig. 4. The DNA sequences of *xyIA* promoter in plasmid pUX30 and its partial deletion plasmids. In plasmid pUX31, pUX32, pUX33, pUX34, and pUX35 *xyIA* promoter regions were deleted to -171, -166, -124, -120, and -59 bp from translational initiation codon, respectively. The number at the top indicates the nucleotide position. The translated amino acid sequence is shown beneath the nucleotide sequence in three-letter code. Start codon is shown in black and consensus sequence of cAMP-CRP complex binding site is underlined. Restriction endonuclease recognition sites are given below the nucleotide sequence.

Table 4. The expression of xylose isomerase on *xyIA* genes containing the partially deleted promoters

Strains	Xylose isomerase, $\mu\text{mol}/\text{mg}$			
	Xylose	Xylose+ Glucose	Xylose+ Glucose+cAMP	Xylose+ cAMP
pUX30/DH77	6.4	2.3	4.2	8.9
pUX31/DH77	5.5	2.8	5.1	9.8
pUX32/DH77	5.6	2.3	4.5	9.1
pUX33/DH77	2.1	1.2	1.1	2.0
pUX34/DH77	2.4	1.3	1.0	1.5
pUX35/DH77	0.3	0.1	0.2	0.2

The culture conditions and concentrations of sugars and cAMP were the same as described in Table 3.

도가 모벡터인 pUX30의 유도치에 비해 약 30% 정도의 낮은 활성을 나타내었다. 또한 glucose에 의한 효소생산 억제에 대해 cAMP의 회복 효과가 나타나지 않았으며 xylose와 cAMP의 동시첨가에 의한 유도촉진 효과도 보이지 않았다. 번역 개시기점에서 -59 bp 상류부분이 결손되었을 때 (pUX35)는 xylose에 의한 활성 유도가 전혀 일어나지 않으므로써 *xyIA* 프로모터의 조절부위가 -165 bp에서 -59 bp 사이에 존재하는 것으로 생각된다.

xyIA 프로모터부위의 염기서열에는 -113 bp에서 -98 bp 걸쳐 CRP 결합 부위의 consensus 염기 배열(TGTGA)¹⁹과 상동성이 높은 염기서열이 존재하는 것을 확인하였다. 모벡터인 pUX30의 *xyIA* 프로모터내 RNA polymerase 결합 부위인 Pribnow box 영역²⁰과 상동성이 있는 영역에 SspI 부위가 있으며 *xyIA* 프로모터에서 -35~-10 영역의 간격이 19 bp로 일반적인 것의 17 bp와 차이가 났다. *xyIA* 프로모터에서 추정되는 -10 영역이 TATTA로 보통의 Pribnow box인 TATAAT와 상동성이 약간 낮은 것으로 보아

cAMP와 같은 coactivator없이 RNA polymerase와 결합할 수 있는 능력이 부족한 것으로 생각된다.

또한 cAMP-CRP 복합체와 프로모터의 결합은 DNA의 bending을 유도시켜 단백질과 DNA 또는 단백질-단백질 간의 상호접촉을 용이하게 하여 RNA polymerase에 의한 전사 개시를 촉진시켜 주는 것으로 알려져 있다.^{21,22} *xyIA* 프로모터에서 *xyIA* 발현의 조절은 cAMP-CRP 복합체의 결합에 의해 *xyIR* 단백질의 결합을 촉진하고 나아가서 -35와 -10 영역에서 RNA polymerase의 결합을 촉진시킬 것으로 추정된다. CRP 결합부위 상류염기가 결손된 pUX33과 pUX34에서 *xyIA*의 발현이 떨어지는 것은 *xyIR* 산물의 결합이 불안정하여 RNA polymerase와 DNA 결합에 장애를 받아 전사개시가 부분적으로 저해를 받기 때문인 것으로 생각된다. 이에 대한 기능을 밝히기 위한 연구는 계속 진행 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 교육부 유전공학 연구비에 의해 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- 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. Weismeyer (1970) Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **201**, 497-499.
- Maleszka, T., P. Y. T. Wang, and H. Schneider (1982) A ColE1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Biochem.* **60**, 144-151.
- 강지희, 노동현, 강병태, 이인구. (1996) 대장균에서 *xyIA* 유전자의 발현조절. *한국 농화학회지* **36**, 430-436.
- 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.
- 노동현, 이인구 (1992) 대장균의 *xyIR/T* 변이주의 분리 및 그 특성. *경북대농학지* **10**, 125-135.
- Casadaban, M., J. Chou, and S. Cohen (1980) In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to aminoterminal fragments of exogenous proteins: *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J. Bacteriol.* **143**, 971-980.
- Stoker, 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.
- 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 *Escher-*

- ichia coli*. *Bull. of Institute of Gen. Eng.* Kyungpook National University **1**, 65-72.
10. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
 11. Davis, B. D. and E. S. Mingioli (1950) Mutant of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bacteriol.* **60**, 17-28.
 12. Birnboim, H. C., and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**, 1513-1523.
 13. Mandel, M., and A. Higa (1970) Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
 14. Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.
 15. Sanger, F. S., S. Nicklen, and A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 16. 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.
 17. Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. 2nd ed., pp125-129. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 18. Schellenberg, G. D., A. Sarthy, A. E. Larson, M. P. Backer, J. W. Crabb, M. Lidstrom, B. D. Hall, and C. E. Furlong (1984) Xylose isomerase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **259**, 6826-6832.
 19. Berg, O. G., and P. H. von Hippel (1988) Selection of DNA binding sites by regulatory proteins II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *J. Mol. Biol.* **200**, 709-723.
 20. Hawley, D. K., and W. R. McClure (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acid Res.* **11**, 2237-2255.
 21. Kolb, A., A. Spassky, C. Chapon, B. Blazy, and H. Buc (1983) On the different binding affinities of CRP at the *lac*, *gal* and *malT* promoter regions. *Nucleic acids Res.* **11**, 7833-7852.
 22. Adhya, S., and S. Garges (1990) Positive control. *J. Biol. Chem.* **265**, 10797-10800.

Regulatory Characterization of *xylA* Promoter Region in *Escherichia coli*

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

Abstract : In order to investigate the function of *xylA* promoter (*P_{xyl}*) as regulatory region *P_{xyl}-lacZ* fusion gene was constructed by the insertion of *xylA* promoter to the multiple cloning site of upstream of *lacZ* gene in a multicopy numbered plasmid pMC1403 containing promoterless *lac* operon, which was designated pMCX191, and *P_{xyl}-lacZ* fragment from pMCX191 was inserted to low copy numbered plasmid pLG339, designated pLGX191. The expressions of β -galactosidase in these recombinant plasmids containing *P_{xyl}-lacZ* fusion gene were induced strongly by the addition of xylose, repressed by the addition of 0.2% glucose in the presence of xylose. The catabolite repressions were derepressed by the addition of 1 mM cAMP as same as native *xylA* gene. The fragment of *xylA* promoter was partially deleted from the upstream of *xylA* promoter by exonuclease III to investigate the regulation site of *xylA* promoter and the degrees of deletion derivatives of *xylA* promoter were analyzed by the DNA base sequencing. By the investigations of the induction by xylose, repression by glucose and derepression by cAMP on xylose isomerase production, the regulation site of *xylA* promoter may be located in segment between -165 and -59 bp upstream from the initiation site of *xylA* translation.

*Corresponding author