

*Serratia marcescens*에서 cAMP receptor protein(CRP) 유전자의 클로닝 및 해석

유주순 · 김혜선 · 문종환 · 정수열* · 최용락†

동아대학교 생명자원과학부
*동주대학 식영과

Analysis and cloning of cAMP receptor protein(CRP) gene in *Serratia marcescens*

Ju-soon Yoo, Hae-Sun Kim, Jong-Hwan Moon, Soo-Yeol Chung and Yong-Lark Choi†

Division of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan, 604-714,
*Dept. of Food Science & Nutrition, Donju College, Pusan, 604-715, Korea

Abstract

One of the better-characterized transcription factor of *E. coli* is the cAMP receptor protein(CRP) and the CRP binds cAMP and DNA. The cAMP-CRP complex is involved in regulation of many genes at bacteria. The cAMP-CRP regulatory element represents, in some respects, a global regulatory network. The aim of this work was to study the structure and the mechanisms controlling the expression of CRP in *Serratia marcescens*. We have been get 5 different clones from *Serratia* which stimulated the cells to use maltose as a sole carbon source in *E. coli* TP2139. The *crp* gene clone, pCKB12, was confirmed by Southern hybridization with *E. coli crp* gene. The location of the *crp* gene was determined by constructing subclones carrying various portions of pCKB12. To investigate the potential role of CRP in *E. coli*, *lacZ* fused plasmids were constructed and investigated the β -galactosidase activity of the fused plasmid. The *Serratia marcescens* cAMP receptor protein can substitute the *E. coli* CRP in transcriptional activation at the *lacZ* gene. These results suggest that *Serratia marcescens* cAMP receptor protein complex functions to regulate several promoters in *E. coli*.

Key words : *Serratia marcescens*, *crp* gene, gene expression and regulation

서 론

cAMP receptor protein(CRP)은 대장균의 전사조절인자로 잘 알려져 있는 것 중의 하나이며, CRP의 일차구조는 클로닝 되어진 *crp* 유전자의 DNA 염기 배열 결과로서 알

려져 있다.¹⁻³⁾ 현재까지 장내 세균에서는 대장균 이외에, *S. typhimurium*과 *Shigella flexneri*의 *crp* 유전자가 밝혀졌는데 전자는 대장균과 1개만이 다른 아미노산을 가진 단백질이 밝혀졌다³⁻⁷⁾ 정제하여 만든 CRP 결정체의 X-선 해석을 통하여 3차구조가 밝혀졌으며, 해석된 결과를 보면

† Corresponding author

N- 말단 영역은 β -sheet 구조가 발달된 cAMP 결합 능력을 가지며, C-말단 영역은 α -helix 구조로 이루어져 있으며 DNA와 결합하는 영역이다. 즉, CRP 는 cAMP와 결합하여 cAMP-CRP와 복합체를 형성함으로써 DNA에 결합할 수 있고, 그로 인하여 positive 또는 negative한 전사 조절인자로서 작용한다. 대장균의 전체 유전자의 5% 이상이 이 조절인자의 제어하에 있을 것으로 추정되어지며, 주로 당대사계를 비롯하여 아미노산 대사계, 핵산 대사계 및 막 단백질 합성 등에 관여하는 많은 유전자의 cAMP-CRP 복합체 형성에 의한 발현조절 현상이 잘 알려져 있다.^{8~11)} 이와 같이 CRP 의존성 유전자의 promoter가 cAMP-CRP 복합체에 의해 촉진 또는 억제되는 발현조절 현상에 관한 많은 연구가 이루어져 있다.^{12~19)} 또한 CRP 변이가 도입된 대장균 MK2001 (*crp**, *cya :: km*)를 숙주로 사용하여 cAMP 또는 cGMP가 없어도 *mal* 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자 즉, *sfs*(sugar fermentation stimulation) 수종을 클로닝하였고, 이중 *sfsI*과 *sfs4* 유전자의 CRP와의 결합 능력 및 cAMP-CRP에 의한 전사 조절을 확인한 결과 cAMP-CRP에 의한 전사조절을 받는 현상이 알려져 있다.²⁰⁻²¹⁾

*Serratia*는 gram-negative enteric soil bacterium으로서, chitinase를 생성하여 식물체에 병해를 제공하는 fungal pathogen이나 plant parasitic nematodes의 세포벽 구성물질인 chitin을 분해시켜 plant disease의 발생을 감소시켜 주거나, chitin을 분해하여 키토산과 같은 의약품을 만드는 산업적인 유용균으로 잘 알려져있고, 이러한 점을 이용하고자 하는 유전공학 및 생물공학 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다.^{22~25)} 또한 다양한 색소의 생성이나, biosurfactants, fatty acid 및 flavors 등의 여러가지 물질을 생성하는 것으로 알려져 있는데 이들을 대량 생산체제가 가능한 조건만 확립되면 산업적으로 매우 유용한 균주가 될 것이다. 이처럼 산업적으로 유용한 물질 생산에 이용 될 수 있는 *Serratia*에서 대장균의 전사조절 유전자인 *crp* 처럼 하나의 조절 단백질에 의한 수 많은 유전자의 발현조절 양상을 보여주는 유전자의 존재를 분자생물학적으로 연구하며, 이러한 전사조절에 의한 유용물질의 생산 조절 system을 밝혀 내는 것은 유용물질의 대량 생산체제의 확립에 커다란 영향을 미칠 것으로 사료되며, CRP와 같은 전사조절 단백질을 다양한 species에서 연구해 볼 필요성이 절실하다.

따라서 본 연구는, 세균에서 중요한 조절인자로서 작용하

는 *crp* 유전자가 일부 몇 종의 균주에서만 밝혀져 있으므로, 새로운 species인 *Serratia*에서 *crp* 유전자를 클로닝하여 cAMP-CRP에 의한 발현조절 현상을 분자적인 수준에서 밝혀 보고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 plasmid는 Table 1에 나타나 있다. 균주의 일반적 증식을 위하여는 LB를 사용하였으며, plasmid가 도입된 균주는 해당 항생제의 농도를 첨가하고 배양하였다.

2. 사용시약 및 재료

제한효소, T4 DNA ligase, LA PCR kit, Ladderman deoxy sequencing kit는 Takara 사의 제품을, Prime-a-gene-labelling system과 방사능이 표지된 [α -³²P] dCTP, Jet sorb는 Genomed에서, C.I.P(alkaline phosphatase), IPTG, Wizard Miniprep DNA purification system은 Promega에서 구입하였고, Genomic-tip100/G와 Genomic DNA buffer set는 Qiagen에서, cAMP, ONPG, Ampicillin, X-gal, X-ray film 등 기타 여러 시약들은 Sigma 사 혹은

Table 1. Bacterial strains and plasmid.

strans & plasmid	genotype
STRAINS	
W3110	wild type
TP2010	Δcya , Δlac
TP2139	Δcrp , Δlac
<i>Serratia marcescens</i>	
KTCC 2172	
PLASMIDS	
pBluescript KS(+)	Amp ^r
pMS437C	<i>lacZ</i> , Amp ^r
pLDC6	<i>glpD-lacZ</i> fused plasmid
pLDC6A	<i>crp</i> , <i>glpD-lacZ</i> fused plasmid
pLDC6-Scrp	<i>crp</i> , <i>glpD-lacZ</i> fused plasmid
pCKB12	<i>crp</i> , Amp ^r

시중에서 구입한 특급품을 사용하였다. 단백질 정량을 위하여는 Bio-rad 사의 protein assay kit를 사용하였다.

3. *crp* 유전자의 존재 확인 및 클로닝

대장균에서 클로닝 되어져 있는 *crp* 유전자를 probe로 사용하였다. probe 작성을 위하여는 염기서열이 알려져 있는 *crp*가 유전자 구조영역¹⁾ 중에서 930bp를 얻을 수 있는 PCR용 primer를 다음과 같이 합성하여 사용하였다.

P1 ; 5'-TGCTACTCCA CTGCGTCAAT TTTCCTGACA 3'

P2 ; 5'-TAACGAGTGC CGTAAACGAC GATGGTT-TTA CCG3'

PCR 반응은 LA PCR kit를 사용하여 94°C에서 30초 변성, 54°C에서 30초간 연결 및 72°C에서 1분간 합성시키는 반응을 30회 반복하였다. *Serratia marcescens* 균주로 부터 분리정제한 chromosomal DNA를 제한효소로 절단한 DNA를 전기영동하여 Southern transfer 시킨 filter를 Southern hybridization 방법을 이용하여 존재유무를 확인하고 적당한 크기의 제한효소 단편을 얻어 낸다. 다시 동일 제한효소로 다량의 genomic DNA를 절단하여 같은 크기 주변의 아래 위 영역까지를 포함한 DNA band를 회수하여 정제한다. 회수 정제된 DNA는 pBluescript KS(+) vector에, 같은 제한효소로 절단시켜서 C.I.P 처리하여 ligation 시킨 후, genomic library를 *crp* 균주인 대장균 TP2139의 숙주에 도입한다. 대장균 TP2139는 MacConkey 배지의 maltose를 충분히 이용하지 못하여 white 콜로니를 생성시킨다. 따라서 *crp* 유전자의 발현에 의한 maltose 이용으로 나타나는 적색 콜로니를 선별한다. 생성된 적색 콜로니에는 maltose 대사관련 유전자도 존재할 것이므로 얻어진 적색 콜로니에서 플라스미드 DNA를 분리하여 동일한 probe DNA로서 Southern hybridization을 실시하여 양성으로 나타나는 플라스미드를 얻어 내고 크기 등을 조사하여 클로닝 유무를 확인한다.

4. Genome 및 plasmid DNA의 분리정제

*Serratia marcescens*에서 genomic DNA 분리는 Qiagen의 kit를 사용하여 분리 정제하였다. 즉, 배양균을 원심분리하여 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0에 현탁하고, 액체질소 또는 -80°C에서 30분간 동결 후 lysozyme 용액을

4ml가한 후 얼음에 45분간 방치한 세포에서 kit의 지침에 준하여 비교적 높은 순도의 DNA를 정제하였다.

Sequencing 및 기타 유전자 재조합 실험을 위한 plasmid DNA 분리는 Promega의 Wizard miniprep 정제 kit로 분리하여 준비하였다.

5. 효소활성 측정

β -galactosidase 활성은 0.2% casamino acids와 ampicillin(50 μ g/ml)을 첨가 한 M9 배지에서 Miller의 방법²⁶⁾으로 측정하였다. Amylomaltase와 maltodextrin phosphorylase의 효소활성을 측정하기 위하여 1% maltose, 0.2% casamino acids와 ampicillin(50 μ g/ml)을 첨가한 배지에서 균주를 배양하였다. Amylomaltase는 Wiesmeyer와 Cohen의 방법²⁷⁾, maltodextrin phosphorylase는 Helmreich와 Cori의 방법²⁸⁾에 준하여 각각 glucose와 glucose-1-phosphate가 생성되는 양을 spectrophotometer로서 정량하였다.

6. Southern hybridization

분리 정제된 염색체 DNA를 0.7% agarose gel에 전기영동하여 염색체 DNA를 확인한 후 6염기 인식 제한효소를 사용하여 완전분해 하였다. 분해된 DNA를 0.7% agarose gel 전기영동으로 분리한 뒤에 변성과 중화 과정을 거친 뒤에 nylon membrane에 하룻밤 동안 Southern transfer하였다.²⁹⁾ Probe DNA는 클로닝 되어져 있는 대장균의 *crp* 유전자의 염기배열을 이용한 primer를 합성하여 PCR로 증폭시킨 DNA를 사용하였다.

7. 융합 유전자 작성 및 *crp* 유전자 발현 조절 확인

Operon fusion vector pMS437C에 *gfpD*의 조절영역을 삽입시킨 fusion plasmid를 Δ lac 균주인 대장균 TP2010에 도입하여 MacConkey, lactose 배지에서 생성된 red colony를 선별하고 DNA를 분리하여 삽입단편의 존재유무로서 fusion plasmid의 작성 여부를 확인한다.³⁰⁾ Fusion plasmid가 작성되면 클로닝된 *crp* 유전자 영역을 삽입시킨 재조합 plasmid를 작성하여 TP2010(Δ cya, Δ lac), TP2139(Δ crp)등의 genetic background가 다른 여러 균주에 도입시켜 cAMP 처리시와 미처리시의 조건으로 cAMP-CRP에 의한 발현 조절을 받는지 여부를 β -galactosidase 활성 및

단백질 생성으로 확인한다.

8. Western blotting

lacZ 융합플라스미드가 도입된 균주를 LB 배지에 배양하여 집균하여 얻은 pellet를 TME buffer(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA)에 현탁시켜, 4°C, 30 초간 5회 sonication하여 11,000×g, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 상등액을 crude extract로서 얻었다. 얻어진 crude extract에 SDS sample buffer를 가하여 100°C 에서 5 분간 가열한 sample을 10% SDS-polyacrylamide gel로서 Laemmli의 방법³¹⁾으로 전기영동하였다.

Immunoblot analysis는 상기의 방법으로 SDS-PAGE를 실시하여 Towbin의 방법³²⁾으로 Nylon membrane 필터에 blotting하였다. 0.5% BSA로서 blocking 시킨 후, 1차 항체인 anti-β-galactosidase를 반응시킨 후 5회 세척하고, 2차 항체인 HRPO-IgG conjugate를 반응시켜서 5회 세척한 뒤에 발색 시켰다. 상기에서 서술되지 않은 기타의 유전자 재조합 실험법은 Sambrook *et al* 등의 표준실험 방법²⁹⁾에 준하였다.

결 과 및 고 찰

1. *crp* 유전자의 클로닝

*Serratia marcescens*를 배양하여 염색체 DNA를 대량분리하여 정제하였다. 분리정제된 DNA를 6염기 인식 제한효소 5~6종을 선택하여 염색체 DNA를 분해하여 transfer 시킨 membrane과 대장균 *crp* 유전자 영역을 PCR법으로 증폭시켜서 얻어낸 probe DNA를 동위원소로 labelling한 것으로 hybridization을 실시하였다(Fig. 1). 그 결과 강한 signal을 가진 band가 전 처 리구에서 나타났고, 그 중에서 단일 밴드로서 *crp* 유전자 전체영역을 포함시킬 정도로 충분한 크기로 예상되며(3kb 정도), 단일 밴드로된 signal을 가진 autoradiogram 결과를 보여주는 *BamH* I 제한 효소의 처리 결과(lane 1)를 클로닝에 이용하여 genome library를 작성하였다. 다시 제한효소 *BamH* I으로 다량의 genomic DNA를 절단하여 3kb 크기 주변의 아래 위 영역까지를 포함한 DNA band를 회수하여 정제된 DNA를 pBluescript KS(+) 클로닝 벡터에 같은 제한효소로 절단시켜서 C.I.P 처리한 DNA와 ligation 시킨 용액을 *Acrp* 균주인 대장균 TP2139 숙주에 도입한다.

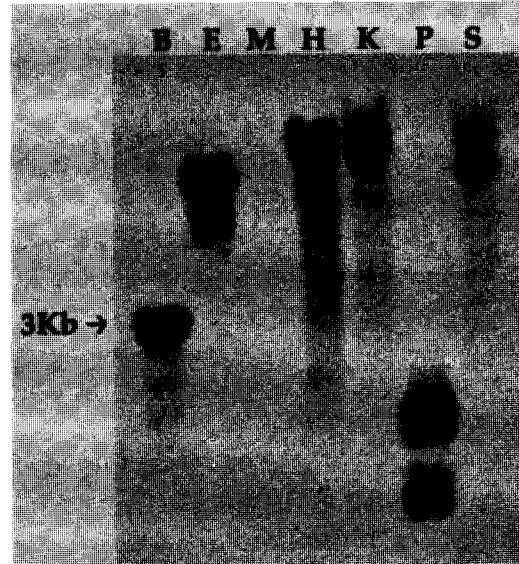


Fig. 1. Southern blot hybridization of enzyme-digested total DNA.

Lanes : B ; *Bam*HI, E ; *Eco*RI, M ; size marker, H ; *Hind*III, K ; *Kpn*I, P ; *Pst*I, S ; *Sac*I.

대장균 TP2139(*Acrp*, Δ lac)는 MacConkey 배지에서 maltose를 탄소원으로 충분히 이용하지 못하여 white colony를 생성하나, *crp* 유전자 또는 maltose 대사관련 유전자를 도입시키면 red colony가 생성되어진다. 상기의 방법으로 작성된 형질전환체 약 일만개 정도의 colony에서 5종의 red colony를 얻었다 (Table. 2). 따라서 얻어진 클론들에는 maltose 대사관련 유전자 및 *crp* 유전자가 들어졌을 것으로 예상되어지므로 계속적인 실험을 통하여 확인하였다. 각 클론에서 miniprep으로 분리한 DNA를 전기영동하여 transfer한 후, 대장균 *crp* 유전자 영역을 probe로 하여 hybridization을 실시하였다(Fig. 2). 그 결과 pCKB12로 명명된 클론만이 강한 signal을 나타내어 *Serratia* sp.의 *crp* 유전자 클론으로 생각하고 계속적인 확인실험을 하였다. 한편, 나머지 4개의 클론 중에서 pCKB 13, 15 및 17은 maltose 이용이 매우 강하여 진한 red colony를 보였으나, pCKB 11은 약한 편이었다. 이들 중에는 maltose 대사관련 유전자인 *malP*(maltodextrin phosphorylase) 및 *malQ*(amylomaltase) 등의 효소를 코딩하는 유전자 및 maltose 대사관련 유전자일 가능성이 높아서 계속적인 확인 실험이 요망된다.

Table 2. The recombinant plasmids containing cloned genes

Plasmids	Insert (kb)	Cloning site	TP2139 (Δ lac, Δ crp)	Gene Name
pBlue script(KS+)			Mal-	
pCKB12	2.9	<i>Bam</i> HI	Mal++	<i>crp</i>
pCKB11	3.0	<i>Bam</i> HI	Mal+	?
pCKB13	2.0	<i>Bam</i> HI	Mal++	?
pCKB15	2.9	<i>Bam</i> HI	Mal++	?
pCKB17	2.7	<i>Bam</i> HI	Mal++	?

Fermentation response were observed on MacConkey agar plates containing 1% of maltose, after 20 hrs incubation at 37°C.

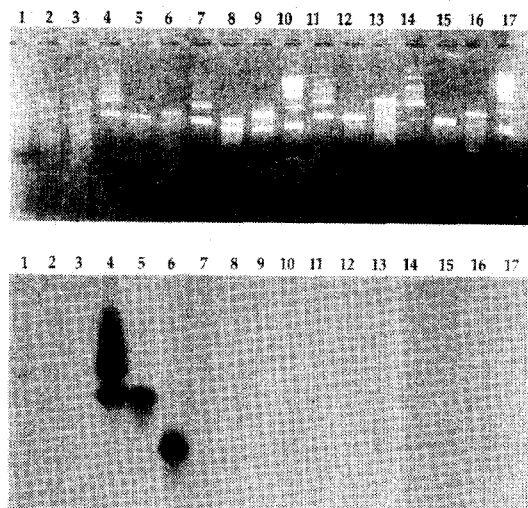


Fig. 2. Southern blot hybridization of plasmid DNA from the *Serratia marcescens*.

Samples were digested with *Bam*HI(B) and *Pst*I(P). The digested DNA were separated on 0.7% agarose gel and transferred cellulonitrate membrane. The DNA was hybridized with probe DNA labeled by α - P^{32} dCTP. Lanes : 1 ; pCKB11, 2 ; pCKB11/B, 3 ; pCKB11/P, 4 ; pCKB12, 5 ; pCKB12/B, 6 ; pCKB12/P, 7 ; pCKB13, 8 ; pCKB13/B, 9 ; pCKB13/P, 10, 17 ; size marker, 11 ; pCKB15, 12 ; pCKB15/B, 13 ; pCKB15/P, 14 ; pCKB17, 15 ; pCKB17/B, 16 ; pCKB17/P.

2. 유전자의 subcloning

클로닝된 *crp* 유전자 영역을 코딩하는 플라스미드 pCKB 12의 DNA를 분리하여 제한효소 지도를 작성하여 Fig. 3에 나타내었다. 유전자의 구조해석이나 발현조절 확인을 위하여 좀더 짧은 단편을 갖는 클론으로 subcloning을 시도하였다. 제한효소 *Sac*I-*Bam*HI 영역의 1.5kb를 결손시켜서 재조합 DNA pCKB12S를 작성하여 대장균 TP2139에 도입시킨 결과 MacConkey, maltose 배지에서 white 콜로니를 생성하여서 이 영역은 *crp* 유전자의 일부가 결손되었음을 확인하였다. 따라서 상류영역의 *Hinc*II 영역을 결손시킨 재조합 DNA pCKB12H를 작성하여 동일 방법으로 형질전환 시켜 생성된 colony는 강한 red 콜로니를 생성하여, *crp* 유전자의 구조유전자 전부가 존재하는 위치를 확인하였으며, 약 1kb를 축소시킨 subclone을 얻었다.

3. lacZ와의 융합 유전자 작성

crp 유전자가 cAMP-CRP에 의해 어떠한 발현조절을 받는지, CRP가 *in vivo* 상에서 어떻게 발현 되는지를 조사하고자 융합 유전자 작성을 통한 확인 실험을 하였다.

우선 *lacZ*와의 융합 유전자를 구축하고자 *glpD*의 조절영역이 포함된 pHKC9¹⁷⁾에서 0.3kb의 *Bam*HI-*Bgl*II 단편을 회수하여 융합용 벡터인 pMS437C의 *Bam*HI site에 삽입시켜 *glpD-lacZ* 융합 플라스미드 pLDC6을 작성하였다. *crp* 유전자의 발현을 확인하고자 대장균과 *Serratia marcescens*의 *crp* 유전자 영역이 포함된 플라스미드인 pHA5 및 pCKB 12에서 *Bam*HI 단편인 3.9kb, 3.0kb의 DNA를 각각 회수하여 pLDC6에 삽입시켜 재조합시킨 플라스미드 pLDC6 A 및 pLDC6-Scrp를 작성하였다. 또한 제한효소의 절단으로 cloning 관련 유무를 확인하고(Fig. 4), 염기배열을 결정하여 정확히 삽입되었는지를 재확인 하였다.

4. crp 유전자의 발현 및 cAMP에 의한 발현조절

*Serratia marcescens*의 *crp* 유전자가 대장균에서 cAMP-CRP 복합체를 형성 하여 전사조절에 관여하는지를 확인하고자, Δ crp 균주 및 Δ cya 균주인 대장균 TP2139와 TP 2010 속주에 *crp* 유전자가 발현되게 재조합시킨 pLDC6A 및 pLDC6-Scrp를 도입하였다. 플라스미드가 도입된 균주를 cAMP 처리 및 미처리 조건에서 배양하여 β -galactosidase 활성을 측정하고, *crp* 유전자가 cAMP에 의한 어떠한 발현

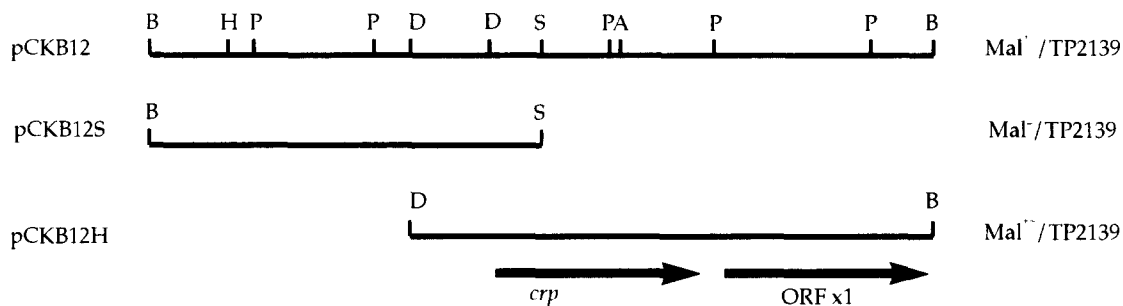


Fig. 3. Physical map of DNA fragments from *Serratia marcescens* cloned in plasmid.

The initiation site and translation of *crp* is indicated by the thick arrow. Maltose fermentation response were observed on MacConkey agar plates containing 1% of maltose, after 20 hrs incubation at 37°C.

Abbreviations : B ; *Bam*H I, E ; *Eco*R I, H ; *Hind*III, P ; *Pst* I, S ; *Sac* I, A ; *Acc* I, D ; *Hinc* II

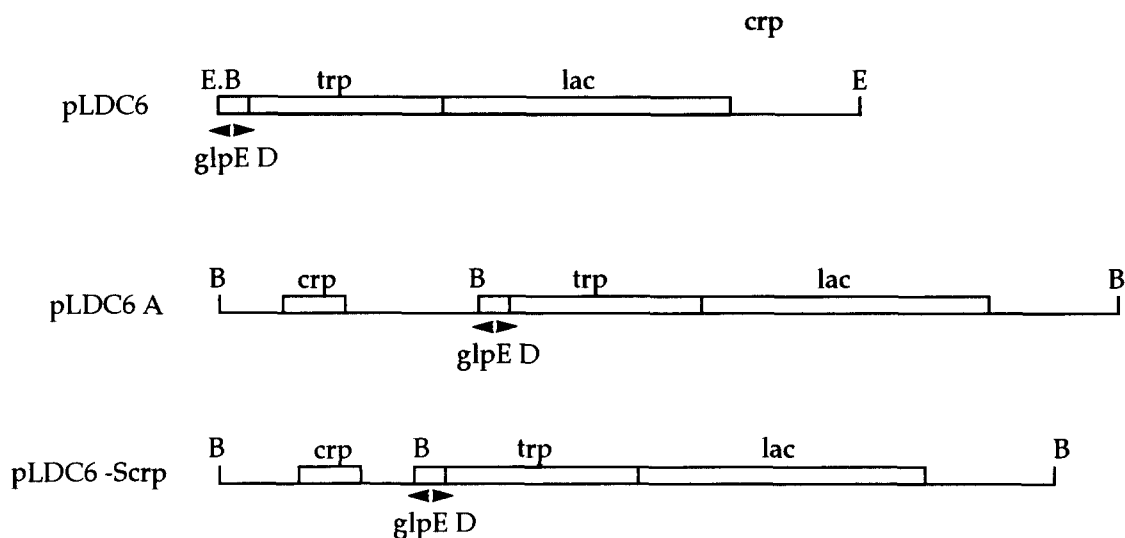


Fig. 4. Map of the plasmid carrying *glpD-lacZ* fusion.

Abbreviations : B ; *Bam*H I, E ; *Eco*R I, S ; *Sma* I, D ; *Hinc* II

조절을 받는지를 확인 하였다(Table 3). 그 결과 *Serratia* 및 대장균의 *crp* 유전자가 발현 된 균주에서는 비슷한 수준의 β -galactosidase 활성을 나타냈다. *Acryp* 균주 TP2139 에 pLDC6-Scrp가 도입된 균에서는 pLDC6 보다 4배 정도의 β -galactosidase 활성이 높았고, cAMP 1mM을 처리하면 2배 이상의 활성 증가를 나타냈다. 또한 TP2010 균주에서는 pLDC6의 도입보다 *crp* 유전자가 발현되게 재조합시킨 pLDC6A 및 pLDC6-Scrp를 도입한 균주에

cAMP를 처리한 구에서 cAMP 처리효과가 높게 나타났는데, 이는 *crp* 유전자가 발현에 의하여 cAMP의 전사 촉진 효과가 높게 나타 났음을 보여준 결과이다. cAMP가 처리 되지 않았을때 보다 cAMP가 처리되었을때 β -galactosidase 활성이 1mM에서보다 그 이상으로 처리 되어짐으로서 더욱더 높은 활성의 차이를 보여주었다. 이상의 결과로 보아 *Serratia*의 *crp* 유전자는 대장균에서 발현됨으로서 대장균 자체의 유전자와 비슷한 수준의 발현 효과를 보여주었고,

Table. 3. Effects of *crp* gene on expression of *glpD-lacZ* fused gene

Host Strain	Plasmids	β -gal activity(Unit) ^a			Efficiency ^b (%)	
		0	1	2	1	2
		(mM cAMP)			(mM cAMP)	
TP2139(Δ <i>crp</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6	560	1606	580	119	104
TP2139(Δ <i>crp</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6-Scrp	2110	4380	5423	208	257
TP2139(Δ <i>crp</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6-A	2160	4680	5610	217	260
TP2010(Δ <i>cya</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6	590	2240	2890	380	490
TP2010(Δ <i>cya</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6-Scrp	640	2670	3580	417	560
TP2010(Δ <i>cya</i> , Δ <i>lac</i>)	pLDC6-A	650	2780	3760	430	578

a. One unit is defined as $103 \times OD_{420} / [0.5(OD_{610}) \times \text{reaction time}(\text{min}) \times \text{sample vol.}(\text{ml})]$.

b. Relative enzyme activity with that in the absence of cAMP taken as 100.

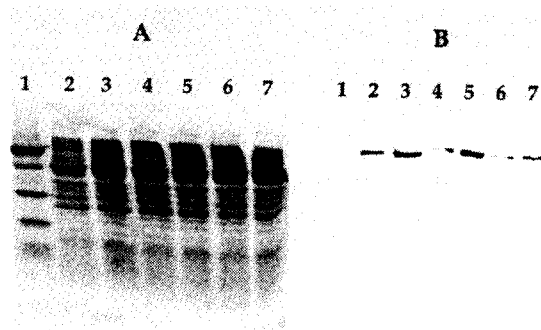


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns showing expression of *glpD-lacZ* fusion by *crp* gene in *E. coli*.

12.5% SDS polyacrylamide gel was stained with Coomassie blue(A) and Western blot(B). Lanes : 1 ; size marker(bovine albumin ; 66,000 Da, egg albumin ; 45,000 Da, carbonic anhydrase ; 29,000 Da, trypsin inhibitor ; 20,100 Da and lactoalbumin ; 14,200 Da), 2 ; pLDC6A, 3 ; pLDC6A/1mM cAMP, 4 ; pLDC6-Scrp, 5 ; pLDC6-Scrp/1 mM cAMP, 6 ; pLDC6, 7 ; pLDC6/1 mM cAMP.

발현조절 가능성도 매우 비슷한 것을 알 수 있었다.

또한 생성된 *lacZ* 유전자 산물의 생성량을 확인 해 보고자 추출한 조단백질을 12.5% SDS-polyacrylamide gel 전기영동하여 Western blotting에 의한 단백질 생성 확인을 시도한 결과를 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 pLDC6이 도입된 TP2139에서는 cAMP 처리에의 한 β -galactosidase의 생성조절을 볼 수 없었으며, pLDC6-Scrp이 도입된 TP2139에서는 cAMP가 첨가된 처리구가 미처리구에서보다 매우 많은 생성량을 보여주는 β -galactosidase의 band를 볼 수 있었으며, 이는 효소활성의 결과와 잘 일치하였다. 또한 대장균의 *crp* 유전자가 발현되게 작성한 pLDC6A 재조합 플라스미드에서도 비슷한 cAMP의 효과가 나타났다. 이상의 실험 결과에서 클로닝 된 *crp* 유전자의 발현에 의하여 *lacZ* 유전자의 발현이 cAMP에 의하여 발현 조절을 받고 있는 것을 확인하였다.

이와 같이 cAMP-CRP에 의한 발현 조절 양상을 더욱 확인하기 위하여 클로닝한 유전자의 1차구조 해석, 조절영역에 존재하는 CRP 결합부위의 확인 및 *crp* 유전자 autoregulation 및 cAMP에 의한 발현조절의 분자적 전사조절기구가 해명되어야 할 것이다.

요 약

전사조절인자로서 잘 알려져 있는 cAMP receptor protein(CRP)은 cAMP 와 DNA에 결합하는 특별한 활성을 가지고 있으며, cAMP-CRP complex를 형성하여 수많은 유전자의 발현조절에 관여한다. 이러한 측면에서 cAMP-CRP의 조절은 어떤 면에서 총체적 조절체제라고까지 한다. 본 연구는 *Serratia* 균주에서 *crp* 유전자의 분자적 특성 및 cAMP에 의한 발현조절을 받는 분자기구를 해석하고자 유

전자를 클로닝하고 발현을 확인하였다.

MacConkey 배지에서 maltose를 탄소원으로 충분히 이용하지 못하는 대장균 TP2139(*Δcrp*, *Δlac*)를 숙주로 이용하고, 염색체 DNA를 library로 작성하여 얻은 형질전환체 약 일만개의 콜로니에서 red colony를 나타내는 5종류의 양성 클론을 얻었다. 이들 클론을 Southern 방법으로 확인한 결과 3kb의 단편을 가진 pCKB12클론이 *crp* 유전자를 coding하고 있음을 확인하였다.

glpD-lacZ 융합 plasmid인 pLDC6의 *Bam*HI부위에 pCKB12의 3kb 단편을 삽입시킨 재조합 plasmid pLDC6-Scrp를 작성하여, 클로닝된 *Serratia*의 *crp* 유전자가 대장균에서 유전자 전사조절에 미치는 영향을 확인한 결과 cAMP-CRP 복합체 형성에 의한 전사조절 기능이 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비의 일부에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Aiba, H., Fujimoto, S. and Ozaki, N. : Molecular cloning and sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res.* 10, 1345-1362 (1982).
2. West, S. E., Sample, A. K. and Runyen-Janecky, L. Y. : The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J. Bacteriol.* 176(24), 7532-7542(1994).
3. Cossart, P., Croismen, E. A., Serre, M. C., Casadaban, M. J. and Gicquel-Sanzey, B. : *crp* genes of *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167(2), 639-646(1986).
4. Chandler M. S. : The gene encoding cAMP receptor protein is required for competence development in *Hamophilus influenzae* Rd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(5), 1626-1630(1992).
5. Dong, Q. and Ebricht, R. H. : DNA binding specificity and sequence of *Xanthomonas campestris* catabolite gene activator protein-like protein. *J. Bacteriol.* 174(16), 5457-5461(1992).

6. Weber, I. T. and Steitz, T. A. : Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5A resolution. *J. Mol. Biol.* 198(2), 311-326(1987).
7. Osuna, R. and Bender, R. A. : *Klebsiella aerogenes* catabolite gene activator protein and the gene encoding it(*crp*). *J. Bacteriol.* 173(20) : 6626-6631(1991).
8. de Crombrugge, B., Bushy, S. and Buc, H. : Cyclic AMP receptor protein : role in transcriptional activation. *Science* 224, 831-838(1984).
9. Mckay, D. B., and Steitz, T. A. : Structure of catabolite gene activator protein at 2.9A resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* 290, 744-749(1981).
10. zUllmann, A. and Danchin, A. : Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 15, 1-53(1983).
11. Webster, C., Gaston, K. and Bussy, S. : Transcription from the *Escherichia coli melR* promoter is dependent on the cyclic AMP receptor protein. *Gene* 68, 297-305(1988).
12. Aiba, H. : Autoregulation of the *Escherichia coli crp* gene : *crp* is transcriptional receptor of its own gene. *Cell* 32, 141-149(1983).
13. Karen, S. and Ronald, K. T. : Cyclic AMP and receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 265-270(1997).
14. Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. and Aiba, H. : cAMP receptor protein- cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 12914-12919(1997).
15. Chung, S. Y., Choi, Y. L., Kawamukai, M., Yosisue, H., Sakai, H. and Komano, T. : Transcription of *sfs 4*, one of the genetic elements related to CRP⁺-dependent expression of *Escherichia coli mal* genes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41, 257-262(1995).
16. Wang, Y. P., Kolb, A., Buck, M., Wen, J., O'Gara, F. and Buc H. : CRP interacts with promoter-bound RNA polymerase and blocks transcriptional activation of the *dctA* promoter. *The EMBO J.* 17, 786-796(1998).
17. Choi, Y. L., Kawase, S., Kawamukai, M., Utsumi, R., Sakai, H. and Komano, T. : Nucleotide sequence of the glycerol-3-P dehydrogenase gene of *Escherichia*

- coli* and regulation by the cyclic AMP-CRP complex. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1135-1141(1989).
18. Choi, Y. L., Kawase, S., Kawamukai, M., Sakai, H. and Kamano, T. : Regulation of *glpD* and *glpE* gene expression by a cyclic AMP-CRP complex in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophysica Acta.* 088 : 31-35(1991).
 19. Choi, Y. L., Chung, S. Y. and Chung, C. H. : Mutational analysis of CRP binding site in the regulatory region *glpD* and *glpE* genes from *E. coli*. *Molecules & Cells.* 4, 51-56(1994).
 20. Kawamukai, M., Utsumi, R., Takeda, K., Higashi, A., Matsuda, H., Choi, Y. L. and Komano, T. : Nucleotide sequence and characterization of the *sfsI* gene : *sfsI* gene is involved in CRP' dependent *mal* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173, 2644-2648(1991).
 21. Choi, Y. L., Nishida, T., Kawamukai, M., Utsumi, R., Sakai, H. and Komano, T. : 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(1989).
 22. Rid out, C. J., J. R. Coley-Smith, and J. M. Lynch. 1986. *J. Gen. Microbiol.* 132 : 2345-2352. .
 23. Roberts, R. L. and Cabib, E. : *Serratia marcescens* chitinase : one-step purification and use for the determination of chitin. *Anal. Biochem.* 127, 402-412 (1982).
 24. Matsumoto, H., Noguchi, H. and Hayakawa, Y. : Primary cause of mortality in the armyworm larvae simultaneously parasitized by parasitic wasp and infected with bacteria. *Eur. J. Biochem.* 252(2), 299-304(1998).
 25. Gal, S. W., Choi, J. Y., Kim, C. Y., Cheong Y. H., Choi, Y. J., Lee, S. Y., Bahk, J. D. and Cho, M. J. : Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* 60(1), 151-158(1998).
 26. Miller, J. H. *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1972).
 27. Wiesmeyer, H. and Cohn, M. : The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli*. 1. purification and physical chemical properties of the enzyme amyloamylase. *Biochim. Biophys. Acta* 39, 417-426(1960).
 28. Helmreich, E. and Cori, C. F. : The role of adenylic acid in the activation of phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 131-138(1964).
 29. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. : *Molecular Cloning A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, NY(1989).
 30. Kawamukai, M., Kishimoto, J., Utsumi, R., Himeno, M., Komano, T. and Aiba, H. : Negative regulation of adenylate cyclase gene(*cya*) expression by cAMP-cAMP receptor protein in *Escherichia coli* : studies with *cya-lac* protein and operon fusion plasmids. *J. Bacteriol.* 164, 872-877(1985).
 31. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685(1970).
 32. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354(1979).