

Carbon Source의 변화에 의한 대장균의 *pts* Promoter 전사 조절 기작

김순영 · 권혁란¹ · 신동우 · 유상렬*

서울대학교 식품공학과, ¹충북대학교 의과대학 미생물학교실

초 록 : *Escherichia coli*의 중요한 sugar 흡수 system인 phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase system(PTS)의 주요 구성 enzyme을 만드는 *pts* operon에는 여러 개의 promoter가 존재하여 어느 환경에서도 적절한 정도의 PTS 활성을 유지하도록 한다. *E. coli pts* operon의 *P1* promoter transcription이 *in vitro*와 *in vivo*에서 차이가 나는 원인을 밝히기 위하여 *pts* promoter의 activity에 영향을 줄 수도 있는 *pts P0* promoter의 1 kbp upstream에서부터 *P0*와 *P1* promoter까지 transcription vector에 cloning하여 *in vitro* transcription assay를 한 결과, *pts* promoter의 upstream DNA가 *pts P1* promoter의 *in vitro* transcription에 미치는 영향이 없음을 알 수 있었다. 여러 가지 PTS sugar들을 이용하여 *in vivo*에서 이들 sugar 들이 *pts* transcription에 미치는 영향을 cAMP 농도 변화와 비교 조사한 바, glucose 존재 하에 자랄 때보다 cAMP 농도가 높은 mannose나 mannitol 존재 하에 bacteria가 자랄 때 *P1b* transcription은 증가하나 *P0* transcription은 glucose 존재 하에 자랄 때 더 높은 결과를 보였다. 이 결과는 *P0*에 glucose에 의해 induction되는 repressor가 존재하고, *P1*에는 glucose, mannose, mannitol에 의해 공통적으로 induction되는 제 2의 repressor가 존재할 것이라는 가능성을 보여주는 것이다. (1999년 9월 29일, 1999년 10월 26일)

서 론

Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems (PTS)은 세균이 당을 phosphorylation하면서 흡수하는 효율적인 system으로 세균의 중요한 신호 전달 체계로도 작용한다.^{1,2} 이 PTS는 또한 PTS를 이용하지 않고 흡수되는 여러 가지 당의 흡수와 대사, 그리고 cAMP를 만드는 adenylate cyclase의 활성도 조절하는 중요한 작용을 한다.^{2,3} *E. coli*에서는 PTS의 처음 두 단계 반응은 *ptsI* 라고 하는 유전자에 의해 만들어지는 Enzyme I과 *ptsH* 라고 하는 유전자에 의해 만들어지는 HPr에 의해 일어난다. 이 이후의 반응은 각각의 당에 따라 존재하는 독특한 membrane complex에 의해 일어나는데, 이들 중 포도당을 흡수하는데 필요한 Enzyme IIA^{Glc}는 *crr*이라고 하는 유전자에 의해 만들어진다. 이들 *ptsI*, *ptsH*, *crr* 유전자들은 *E. coli* chromosome의 52 min에 존재하는 *pts* operon을 이루고있다.^{4,6}

이 *pts* operon은 *P1*과 *P0*의 두개의 군으로 나뉘어 존재하는 적어도 4개의 promoter(*P1a*, *P1b*, *P0a*, *P0b*)에 의해 조절된다.^{7,8} 이들 promoter 부위에는 cAMP receptor protein (CRP)^{9,10}과 FruR¹¹이라고 하는 transcription factor가 결합하는 자리들이 존재하여 아주 복잡한 조절 양상을 보이고 있다. *P1a*와 *P1b* promoter는 부분적으로 겹쳐 있어서(*P1a*의 transcription 시작점을 +1으로 하면 *P1b*의 transcription 시작점을 +8, 이후 모든 transcription 시작점은 *P1a*의 transcription 시작점을 +1으로 하여 계산함), CRP와 cAMP의 복합체(CRP·cAMP)에 의해 서로 반대로 조절이 된다. 즉, CRP·cAMP가

P1a promoter의 활성을 저해하는 반면 *P1b* promoter는 활성화시킨다. *P1a* promoter는 DNA template가 supercoil 상태일 때만 활성이 있다. *P0a* promoter는 -100 위치에서 transcription을 시작하며 역시 supercoiled DNA template일 때만 활성이 있다. *P0b* promoter의 transcription은 template DNA가 linear일 때 *P0a*의 transcription 시작점에서 3 base 위에서(-103) 시작되는데, *P0a* promoter는 CRP·cAMP에 의해 그 활성이 미량 증가하지만 *P0b* promoter 활성은 CRP·cAMP에 의해 많이 증가한다. 또한 promoter *P0*의 발현에는 Eo³²가 관여한다는 것이 알려져서 상당히 복잡한 transcription 조절 기작을 갖고 있다.¹² 하지만 이렇게 *in vitro* transcription에서 나타나는 현상이 *in vivo*에서 똑같이 일어나지는 않는다.^{7,8,13} 즉 *in vivo*에서는 *P1a*에서 만들어지는 mRNA가 주요 transcript로서, CRP·cAMP에 의해 transcription이 증가하는 *P1b*가 *in vivo*에서 발현되는 조건은 아직 알려지지 않은 실정이다. 이러한 사실은 아직 우리가 모르는 *pts* operon 발현 조절기작이 bacteria내에서 일어난다고 있는 것을 시사하는 것이다. *E. coli* 세포 내에서 *pts* operon의 발현은 주위 환경의 변화에 따라 약 2~3배 정도 조절된다.^{1,2,7,14} PTS는 세포가 에너지를 확보하는데 중요한 system이므로 어떠한 조건에서도 어느 정도는 기본적으로 발현이 되어야 하므로 PTS에 관련된 여러 개의 promoter가 복잡한 조절기작을 갖는 것은 당연한 것이라고도 하겠다.

PTS protein들 중에서 Enzyme IIA^{Glc}의 phosphorylation 상태에 따라 bacteria내의 cAMP 농도가 변한다는 사실이 알려져 있다. 즉, glucose 존재 하에 bacteria가 자랄 때는 Enzyme IIA^{Glc}가 unphosphorylated 상태로 되어 cAMP를 만드는 adenylate cyclase의 활성을 낮추어 bacteria내 cAMP 농도가 떨어진다고 알려져 있다.² 이와 같은 사실은 glucose 이외의 PTS

찾는말 : *E. coli*, *pts* promoter, cyclic AMP, *in vitro* transcription
*연락처

sugar가 bacteria내로 흡수될 때 cAMP 농도의 변화가 glucose와는 다른 양상을 보일 가능성을 제시하는 것이므로 본 연구에서는 glucose, mannose와 mannitol의 존재 하에 bacteria가 자랄 경우 cAMP의 bacteria내 농도 변화를 측정하여 당의 종류에 따른 cAMP 농도 변화가 transcription 단계에서 *pts* operon의 발현에 미치는 영향을 연구함으로써, *in vivo*에서 *P1b* promoter가 발현되는 조건을 찾아보았다.

재료 및 방법

균주와 배양조건

SR702(MC4100, *suhXI*)는 MC4100 [*F*⁻ *araD* Δ (*argF-lac*) *U169 rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR*]의 *groE* 유전자의 upstream에 *IS1*이 들어가서 GroEL이 많이 생성되는 균주이다. 이 균주는 KY1603¹⁵⁾으로부터 *P1* transduction으로 만들었다. GroEL이 RNA를 nucleases로부터 보호하므로¹⁶⁾ *suhXI* mutation이 있는 균주에서는 *P0* promoter에서 만들어지는 불안정한 mRNA가¹⁴⁾ 안정화되어 primer extension에 의한 mRNA 분석을 정확하게 할 수 있다. SR702에 Δ *crr* mutation을 갖는 균주인 SR705는 TP2865으로부터 *P1* transduction으로 만들었다.

Plasmid Cloning

Polymerase chain reaction을 이용하여 *in vitro* transcription 용 vector인 pSA600⁸⁾에 *pts* promoter와 이의 upstream 1 kbp를 포함하는 DNA를 cloning하고 promoter 염기서열을 확인하였다. Plasmid pHX는 앞서 발표⁹⁾한 바와 같이 *P0*의 transcription 시작점에서 140 bp upstream 으로부터 *P0*와 *P1* promoter를 포함하는 DNA를 pSA600의 *rpoC* terminator 앞에 cloning한 것이고, pHXK는 *P0*의 upstream 1 kbp 에서부터 *P0*와 *P1* promoter를 포함하는 DNA를 cloning 한 것이다.

In Vitro Transcription

Ryu 등¹³⁾의 방법대로 다음과 같은 조성을 갖는 용액 25 μ l에서 반응을 하였다: 20 mM Tris acetate, pH 8.0, 3 mM magnesium acetate, 200 mM potassium glutamate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 0.2 mM GTP, 0.2 mM CTP, 0.02 mM UTP, 10 μ Ci [α -³²P]UTP(800 Ci/mmol), 2 nM DNA template, 20 nM RNA polymerase, 5% glycerol. Nucleotides 이외의 것들을 혼합하여 37°C에서 10분 반응한 후 nucleotides를 가하여 10분 더 반응시키고 25 μ l의 formamide loading buffer(80% formamide, 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol)를 가하여 반응을 종료하였다. 생성된 RNA들은 8% sequencing gel에 전기 영동하여 분리한 후 분석하였다.

Primer extension assay

균체는 tryptone broth(TB, 1% Bactotryptone, 0.8% NaCl)에 배양하거나 TB에 0.2%의 glucose나 0.2% mannose, 0.2% mannitol을 가하여 배양하였다.¹³⁾ RNA는 Tri reagent

(Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA)를 이용하여 분리하였다. 30 μ g의 total cell RNA와 ³²P-end-labeled primer P11 (5'-GCCAGTTTTTAACAGACGCGACGCACGAAG-3')을 섞어서 같이 침전시킨 후, 이를 20 μ l의 250 mM KCl, 2 mM Tris, pH 7.9, 0.2 mM EDTA에 용해하였다. 이것을 60°C로 가열한 후 1시간에 걸쳐 천천히 상온으로 냉각시켰다. 이러한 annealing 과정 후 5 μ g actinomycin D, 700 μ M dNTPs, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 20 mM Tris, pH 8.7, 150 unit의 Superscript reverse-transcriptase(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)로 이루어진 반응액 50 μ l를 가하고 40°C에서 1시간 반응 후 ribonuclease T1(Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, USA)을 처리하였다. DNA를 침전시키고 70% ethanol로 세척한 후 8 M urea, 8% polyacrylamide gel에서 DNA를 분리하였다. 같은 primer로 SequiTherm Excel DNA sequencing kit(Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)를 이용하여 sequencing을 하였다.

cAMP 농도 측정

균을 여러 가지 sugar 0.2% 존재 하에 TB에 OD₆₀₀=0.5까지 배양하여 3 ml의 culture를 Whatman GF/F glass fibre filter에 여과하였다. 이 filter와 균체를 같이 유리 vial에 넣고 2.5 ml의 0.2 M hot formic acid를 넣고 끓였다. 이것을 microcentrifuge에 5분 원심분리하고 상등액 1.5 ml를 말린 후 95 μ l의 증류수에 녹였다. 여기에 2.5 μ l의 2 M potassium phosphate buffer(pH 7.0)을 가한 후 Biotrak cAMP EIA kit (Amersham)을 이용하여 cAMP 농도를 측정하였다.¹⁷⁾

결 과

pts operon의 upstream에 존재하는 염기서열이 *pts* promoter의 활성에 미치는 영향

pts promoter의 transcription 양상이 *in vivo*와 *in vitro*에서 달리 나타나는 현상이 *in vitro* transcription 조건이 *in vivo* 조건과 다를 가능성을 시사하는 것이므로 기존의 *in vitro* transcription에 사용한 DNA template⁸⁾를 보다 *in vivo* 조건에 가깝도록 새로운 DNA template를 cloning 하였다. 즉, Fig. 1

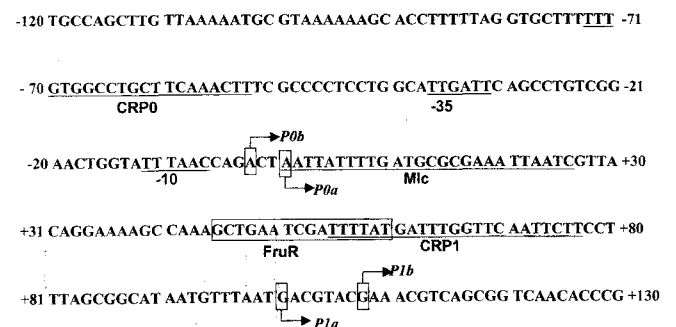


Fig. 1. A nucleotide sequence of the promoter region of the *pts* operon. The transcription start site of each promoter is boxed with an arrow. The CRP0, CRP1 and Mlc sites are underlined and labeled. The FruR-binding site is labeled as FruR box.

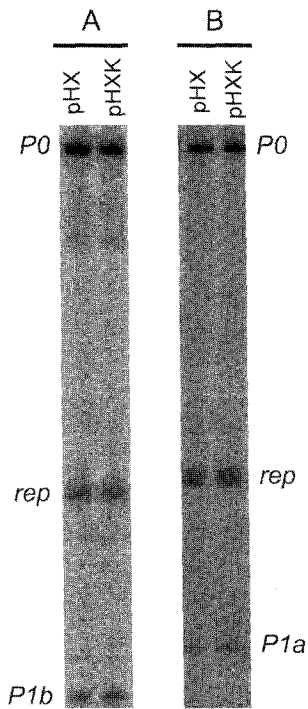


Fig. 2. *In vitro* transcription assay of *pts* promoters. Reactions contain CRP·cAMP are shown on panel A and those contain no CRP·cAMP are shown on panel B. The transcripts from plasmid origin of replication(106/107 base) are marked as *rep*. Both plasmids, pHX and pHXX, contain the *P0* and *P1* promoter and only the pHXX contains 1kbp DNA upstream of the *pts P0* promoter.

에서 보는 바와 같이 *pts P0* promoter의 upstream에는 A와 T가 많은 염기 서열이 존재하여 이 DNA가 꺾어진 구조를 만들어 *pts* promoter의 활성화에 영향을 미칠 가능성이 많으므로, 이 DNA의 upstream DNA 1 kbp를 포함하는 새로운 DNA를 cloning하여 *in vitro* transcription assay를 하였으나, 이들 upstream DNA가 없는 DNA template를 썼을 때와 비교하여 거의 차이가 없었다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 *pts* promoter의 발현 조절에 우리가 아직 알아내지 못한 새로운 factor가 *in vivo*에서 작용한다는 가능성을 시사하는 것이었다.

당의 종류에 따른 bacteria 균체 내의 cAMP 농도 변화

PTS의 Enzyme IIA^{Glc} 의 phosphorylation 상태에 따라 bacteria 내의 cAMP 농도가 변한다는 사실이 알려져 있다.²⁾ 본 연구에서는 glucose, mannose와 mannitol의 존재 하에 *E. coli*가 자랄 경우 cAMP의 bacteria 내 농도 변화를 연구하였다. 실험 방법에서 언급한대로 Amersham사의 Biotrak cAMP EIA

Table 1. Concentration of cAMP in the wild type and the *crr*-negative mutant grown on various sugars

	Wild type (fmol)	Δcrr (fmol)
No sugar	443	272
Glucose	239	245
Mannose	301	220
Mannitol	276	232

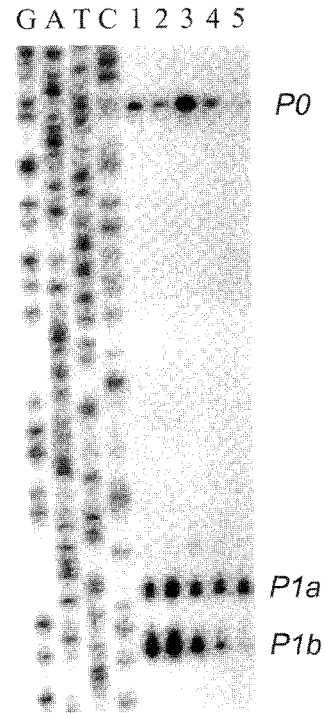


Fig. 3. Transcription from the *pts* promoters. Total RNA was isolated from cells grown in Tryptone broth in the presence of various sugars. Primer Extension analysis of 30 μ g of total RNA/reaction was done as described in the Materials and Methods. Lane 1; 0.2% mannose, lane 2; 0.2% mannitol, lane 3; 0.2% glucose, lane 4; 0.02% glucose, lane 5; no sugar added.

kit을 이용하여 cAMP 농도를 측정하여 Table 1의 결과를 얻었다. 즉, bacteria내 cAMP 농도는 sugar가 없는 TB에서 자랄 때 가장 높았으며, glucose를 넣어주면 반 정도로 감소하지만, mannose나 mannitol의 존재 하에서는 glucose 존재할 때보다 약간 cAMP 농도가 올라가는 것을 알 수 있었다. 이러한 sugar의 종류에 따른 *E. coli*내의 cAMP 농도 변화현상은 Δcrr mutant에서는 나타나지 않아서 *crr* 유전자가 만드는 Enzyme IIA^{Glc} 가 cAMP를 합성하는 adenylate cyclase의 활성화에 많은 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다. 다음으로는 이러한 sugar 종류에 따른 cAMP 농도 변화가 *pts P1* promoter의 transcription 시작점 변화에 미치는 영향을 알아보았다.

당의 종류에 따라 변하는 cAMP의 농도에 따른 *P1b* transcription의 변화

*E. coli*를 glucose, mannose, mannitol 존재 하에 배양하면서 RNA를 추출하여 *pts* promoter의 발현을 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 glucose의 경우 그 농도가 증가함에 따라 *P0*와 *P1b*의 발현이 증가하였다. 이것은 *P0*와 *P1b*의 발현이 *in vitro*에서 CRP·cAMP에 의해 증가하는 것을 고려하면 glucose가 증가함에 따라 *E. coli*내의 cAMP 농도가 감소하는 것과는 반대의 현상으로, *E. coli*내에 glucose에 의해 induction되는 repressor가 있다는 가능성을 제시하는 결과이었다. Mannose와 mannitol의 경우 glucose보다는 덜하지만 *E. coli*내의 cAMP 농도를 감소시켰다(Table 1). 하지만, 이들 존재 하에 *E. coli*가

자랄 때 glucose 존재 하에 자랄 때보다 cAMP 농도가 높는데도 *P0* 발현을 증가시키는 작용이 glucose보다 적은 것으로 보아 *P0*에 작용하는 repressor가 glucose에 특이적으로 induction 되는 것이라는 사실을 알 수 있었다. 반면에 mannose와 mannitol에 의한 *P1b*의 transcription 증가 작용은 glucose보다 훨씬 높은 것으로 보아 *P1*에 작용하는 repressor가 존재한다면, 이 repressor는 이들에 의해서도 induction되는 repressor라는 것을 추측할 수 있었다.

고 찰

*E. coli*의 중요한 sugar 흡수 system인 phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system(PTS)의 주요구성 enzyme을 만드는 *pts* operon에는 여러 개의 promoter가 존재하여 어느 환경에서도 적절한 정도의 PTS 발현을 유지하도록 한다. 복잡한 조절기작을 갖고 있는 *pts* promoter의 *P1* promoter를 이용하여 carbon source의 종류에 따라 그 양과 activity가 변화하는 cAMP receptor protein(CRP)이 transcription initiation site 변경에 미치는 영향을 *in vitro*와 *in vivo*에서 비교 연구하여 transcription initiation 조절기작에 대한 이해를 증진하고, carbon source의 변화에 따라 bacteria내의 CRP와 cAMP 양과 활성이 변화하는 기작에 PTS가 어떻게 관련되는지를 밝혀 *in vivo*에서 *pts* 발현이 조절되는 정확한 기작을 transcription 단계에서 이해하고자 본 연구를 계획하였다.

우선 *in vivo* 조건에서 DNA topology가 *in vitro* transcription assay에 이용한 DNA template와 달라서 생기는 차이점을 최소화하기 위하여 새로운 DNA template를 cloning 하였다. *pts P0* promoter의 upstream에는 A와 T가 많은 염기 서열이 존재하여 이 DNA가 꺾어진 구조를 만들어 *pts* promoter의 활성에 영향을 미칠 가능성이 많으므로, 이 DNA의 upstream 1kbp를 포함하는 새로운 DNA를 cloning하여 *in vitro* transcription을 하였으나, upstream DNA가 없는 DNA template를 썼을 때와 비교하여 거의 차이가 없었다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 *pts* promoter의 발현 조절에 우리가 아직 알아내지 못한 새로운 factor가 *in vivo*에서 작용한다는 가능성을 시사하는 것이다. 이 새로운 factor의 존재를 확인하기 위하여 *pts* promoter가 여러 가지 PTS sugar에 의해 *in vivo*에서 조절되는 기작을 연구하였다.

PTS sugar인 glucose, mannose, mannitol이 *E. coli*내의 cAMP 농도 변화에 미치는 영향을 연구한 바, glucose의 존재 하에 *E. coli*가 자랄 때는 sugar가 없을 때에 비해 약 반 정도의 cAMP 농도를 보였고, mannose와 mannitol 존재 하에서는 glucose 존재 하에서보다 약간 많은 cAMP 농도를 보였다. 이와 같은 차이는 Enzyme IIA^{Glc}를 만들지 못하는 Δcrr mutant에서는 나타나지 않으므로 Enzyme IIA^{Glc}가 cAMP 농도 조절에 중요한 역할을 한다는 사실을 알 수 있었다. 하지만, *in vivo*에서 *P1*과 *P0* promoter의 발현은 cAMP 농도에 따라 비례적으로 조절되지는 않았다. *P0*의 경우 cAMP 농도가 가장 낮은 glucose에 의해 가장 많은 activation을 보였고, 이보다 cAMP 농도가 높은 mannitol과 mannose 존재 하에서는

glucose보다 약한 activation을 보였다. 이것은 *P0* promoter에 glucose에 의해 induction되는 repressor가 존재한다는 가능성을 제시하는 결과로서, 본 연구팀은 최근 Mlc라고 하는 transcription regulator가 *P0*의 repressor 역할을 한다는 사실을 밝힌 바 있다.¹⁸⁾ *P1* promoter의 경우, cAMP의 농도가 가장 높은 조건인 sugar가 존재하지 않은 경우 *P1b*의 발현은 거의 일어나지 않는 것으로 보아 이곳에도 repressor가 존재할 가능성을 보여주었다. *P1b*는 glucose보다 cAMP 농도가 높은 조건인 mannose나 mannitol이 존재할 때 더 많은 transcription이 되는 것으로 보아 이곳에 작용하는 repressor는 glucose, mannose, mannitol에 의해 공통적으로 induction이 된다는 것을 알 수 있었다. 위에 언급한 Mlc는 *P1* promoter의 transcription에 전혀 영향을 미치지 않았고, FruR¹¹⁾이라는 regulator가 결합하는 자리가 *P1*에 존재하지만, 이미 FruR은 *P1*의 repressor는 아니라는 사실이 알려졌으므로,¹³⁾ *P1* promoter에 FruR이나 Mlc 이외의 새로운 repressor가 존재할 가능성이 높다고 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Meadow, N. D., Fox, D. K. and Roseman, S. (1990) The bacterial phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 497-542.
2. Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1993) Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 543-594.
3. Crasnier, M., Dumay, V. and Danchin, A. (1994) The catalytic domain of *Escherichia coli* K-12 adenylate cyclase as revealed by deletion analysis of the *cya* gene. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 409-416.
4. Cordano, J. C. and Roseman, S. (1972) Deletion mapping of the genes coding for HPr and enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **112**, 17-29.
5. De Reuse, H. and Danchin, A. (1988) The *ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *J. Bacteriol.* **170**, 3827-3837.
6. Saffen, D. W., Presper, K. A., Doering, T. L. and Roseman, S. (1987) Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Molecular cloning and structural analysis of the *Escherichia coli ptsH*, *ptsI*, and *crr* genes. *J. Biol. Chem.* **262**, 16241-16253.
7. De Reuse, H., Kolb, A. and Danchin, A. (1992) Positive regulation of the expression of the *Escherichia coli pts* operon. *J. Mol. Biol.* **226**, 623-635.
8. Ryu, S. and Garges, S. (1994) Promoter switch in the *Escherichia coli pts* operon. *J. Biol. Chem.* **269**, 4767-4772.

9. De Crombrughe, B., Busby, S. and Bug, H. (1984) Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. *Science* **224**, 831-838.
10. Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. and Adhya, S. (1993) Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.
11. Ramsier, T. M., Bledig, S., Michotey, V., Feghali, R. and Saier, M. H. Jr. (1995) The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**, 1157-1169.
12. Ryu, S. (1998) CRP · cAMP-dependent transcription activation of the *Escherichia coli pts P0* promoter by the Heat Shock RNA Polymerase ($E\sigma^{32}$) *in vitro*. *Molecules Cells* **8**, 614-617.
13. Ryu, S., Ramsier, T. M., Michotey, V., Saier, M. H. and Garges, S. (1995) Effect of the FruR regulator on transcription of the *pts* operon in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**, 2489-2496.
14. Ryu, S. (1995) Gene expression and mRNA. *Nature* **376**, 560
15. Kusakawa, N. and Yura, T. (1988) Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* **2**, 874-882.
16. Georgellis, D., Sohlberg, B., Hartl, F. U. and von Gabain, A. (1995) Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **16**, 1259-1268.
17. Hogema, B. M., Arents, J. C., Inada, T., Aiba, H., van Dam, K. and Postma, P. W. (1997) Catabolite repression by glucose-6-phosphate, gluconate and lactose in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **24**, 857-867.
18. Kim, S., Nam, T., Shin, D., Koo, B., Seok, Y. and Ryu, S. (1999) Purification of Mlc and analysis of its effects on the *pts* expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 25398-25402.

Mechanism of Regulation of the *pts* Promoter Transcription Initiation by Carbon Sources in *Escherichia coli*

Soon-Young Kim, Hyukran Kwon¹, Dongwoo Shin and Sangryeol Ryu*(Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea; ¹Department of Microbiology, College of Medicine, Chungbuk National University, Chongju, 361-763, Korea)

Abstract: The *pts* operon, which encodes several factors in the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) of *Escherichia coli*, has multiple promoters which respond to different signals to facilitate quick adaptation to changes in growth conditions. The influence of an 1 kbp DNA region upstream of the *pts P0* promoter on *pts* expression was studied *in vitro* by employing the DNA templates containing both *P0* and *P1* promoter with or without the 1 kbp upstream DNA region for *in vitro* transcription assay. The 1 kbp DNA region upstream of the *pts P0* promoter, however, had no effect on *pts* transcription *in vitro*. The intracellular concentration of cAMP was measured when cells were grown in the presence of glucose, mannose, or mannitol. The transcription of *P0* was increased maximally in the presence of glucose even though the concentration of cAMP in the condition was lowest while the transcription from the *P1b* was highest when cells were grown in the presence of mannose or mannitol even though the intracellular concentration of cAMP was lower than cells grown in the absence of the sugar. These results suggest the possibility of the existence of a glucose inducible repressor specific for the *P0* promoter and a second repressor that is inducible by glucose, mannose and mannitol specific for the *P1* promoter

Key words: *E. coli*, *pts* promoter, cyclic AMP, *in vitro* transcription

*Corresponding author