

Bacillus stearothermophilus No. 236 β -xylosidase 유전자 변이 Promoter의 Strength 분석

김미동 · 최용진*

고려대학교 생명공학원 생명과학과

Strength of the Mutant Promoters for the β -xylosidase gene of *Bacillus stearothermophilus* No. 236.
Kim, Mi-Dong and Yong-Jin Choi*. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea – The *xylA* gene of *Bacillus stearothermophilus* No. 236 encoding β -xylosidase was cloned and sequenced previously. The transcriptional start site of the *xylA* gene cloned in *E. coli* was identified to be the guanine (G) by primer extension analysis. This supports that the expression of *xylA* gene is also directed in the *E. coli* cells by the previously determined transcription initiation signals, -10 sequence (CATAAT) and -35 sequence (TTGTTA) separated by 12 bp. To increase the expression of β -xylosidase, firstly the spacer region of *xylA* promoter was extended from 12 to 17 bp, and then the -10 and -35 elements were converted into their respective consensus sequences. The mutant promoters thus obtained were tested for their activities in both the *E. coli* and *B. subtilis* host cells. The change of the length of the spacer region from 12 to 17 bp resulted in a 1.6- and 2.5-fold increase in promoter strength in comparison with the wild type promoter in *E. coli* and *B. subtilis* cells, respectively. Also, strength of the promoter with the fourth T to A transversion on its -35 element increased in the transcription level by about 35 times compared with that of wild-type promoter. However, surprisingly the 5' end C-to-T transition of the -10 hexamer showed a 5- to 15-fold reduction in β -xylosidase activity in both *E. coli* and *B. subtilis*. Together, the present data demonstrated that the 5' end nucleotide C of the -10 sequence CATAAT and the fourth nucleotide A of the -35 hexamer are two most critical nucleotides for the promoter activity in the context of the *xylA* promoter.

Key words: Promoter strength, β -xylosidase, *Bacillus stearothermophilus*

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 자연계에서 cellulose 다음을 차지하고 있는 막대한 분포량을 가진 biomass이면서 cellulose에 비해 비교적 용이하게 효소 분해될 수 있는 구조적 특징 뿐만 아니라 효소 분해에 의해 고가의 다양한 용도를 지닌 xylose를 최종 분해 산물로 다량 생산할 수 있는 등의 잇점을 가지고 있는 효용 가치가 매우 높은 다당류라고 평가된다[5].

이전의 보고에서는 상기 xylan biomass의 적극적 활용을 위한 집중적 연구의 일환으로 토양으로부터 각종 xylan 분해 효소 모두를 세포 내외로 다량 생산하는 강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus* No. 236 균주를 분리[16]하고 관계 효소의 생산, 정제 및 정제 효소의 효소적 특성 규명[2, 12, 17, 18]은 물론이고 효소 생산 유전자의 분리, 클로닝[3, 4, 6, 8, 9, 14] 및 분자 수준의 유전자 특성을 분석[1, 10, 13] 하고 그 결과를 보고한 바 있다.

특히 *B. stearothermophilus* No. 236이 생산하는 β -

xylosidase는 xylan 기질에도 직접 효과적으로 작용하여 다량의 xylose를 생산하는, 세균의 경우 그 예가 아직 보고되고 있지 않은, 극히 드문 일종의 Exo-xylanase로 확인되었다[12]. 한편 *B. stearothermophilus* No. 236 균주의 β -xylosidase 생산 유전자인 *xylA*는 1830 bp의 ORF로 구성되어 609개의 아미노산을 지시하고 있으며 *xylA* 유전자는 매우 특이하게 이용 빈도가 극히 낮은 뿐만 아니라 비효율적인 initiation codon으로 알려진 UUG codon에서부터 translation이 시작되는 것으로 확인되고 있다[13]. 또한 UUG initiation codon 15 bp 윗쪽에는 promoter로 추정되는 염기 서열이 위치하고 있는 것으로 분석되었다. Promoter의 -10 element에 해당되는 염기 서열은 CATAAT로서 6개의 염기 중 5개가 그리고 -35 element로 추정되는 부분의 경우는 TTGTTA로서 6개의 염기 중 4개가 consensus sequence[7, 11, 19, 21]와 일치되어 비교적 높은 활성을 나타낼 수 있는 promoter sequence로 예상되나, 이에 반해 두 hexamer 사이의 거리가 최적 거리에서 크게 벗어난 12 bp로서 promoter 활성을 크게 떨어뜨릴 것으로 판단되는 구조를 가지고 있었다. 따라서 본 연구에서는 *B. stearothermophilus* No. 236 균주의 *xylA* 유전자의 발현을 증대를 위한 우선적 방안의 하

*Corresponding author

Tel. 82-2-3290-3417, Fax: 82-2-923-9923

E-mail: choiyj@kucenx.korea.ac.kr

나로 site-directed mutagenesis 법을 활용하여 *xylA* 유전자 promoter 구조를 체계적으로 변화시킨 각종 promoter 변이를 얻고 이들 promoter 변이들의 promoter strength에 미치는 효과를 *E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포에서 비교, 분석하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

형질 전환 숙주로는 *E. coli* XL1-Blue(*recA1 endA1 gyrA46 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' [proAB lac⁺ZΔM15 Tn10(Tet^r)]^c*) (Stratagene, La Jolla, USA)와 extracellular alkaline, neutral proteases, carboxymethyl-cellulase, β -1,3[4]-glucanase 및 xylanase가 결손된 변이 균주인 *B. subtilis* MW15(*his nprR2 nprE18 ΔaprA3 ΔeglS102 ΔbglT bglSRV ΔxynA Cm^r*) [20]를 사용하였다. 그리고 *B. stearothermophilus* No. 236 *xylA* 유전자는 앞 연구에서 얻은 재조합 플라스미드인 pMG1으로부터 분리하여 사용하였으며[12] *xylA* 유전자 발현을 비교 분석을 위해 사용한 vector는 *E. coli* - *B. subtilis* shuttle vector (S. S. Park, Korea University)인 pWPBR을 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

xylA 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드 pWPBR-1을 가지고 있는 *E. coli* XL1-Blue와 *B. subtilis* MW15 균주 배양은 *E. coli*는 50 μ g/ml의 ampicillin, *B. subtilis* 경우는 10 μ g/ml의 kanamycin을 첨가한 Luria-Bertani(LB) 배지 (0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone)를 사용하여 37°C에서 진탕배양하였다.

사용 시약 및 효소

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 비롯한 일반 시약류는 Sigma Chemical Co.(New York, USA)에서, 그리고 일반 효소는 New England Biolabs(Beverly, USA), Promega(Madison, USA), United States of Biochemicals (Warrenale, USA)와 Boehringer Mannheim(Indianapolis, USA)에서 구입 사용하였다. 각종 제한 효소와 T4 DNA ligase는 TAKARA(Shiga, Japan)에서, 그리고 *pfu* polymerase 와 *Dpn* I 은 Stratagene(La Jolla, USA)에서 구입해서 사용하였다.

효소 활성 측정

β -Xylosidase 활성 측정은 일정량의 효소 용액과 동일량의 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside(PNPX)를 45°C에서 15분 동안 반응시킨 후, 1 ml 0.4 M Na₂CO₃을 첨가하여 반응을 정지시키고, 생성된 *p*-nitrophenol 양을 A₄₀₅에서 측정하였다[2]. 1분당 1 μ mole의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소

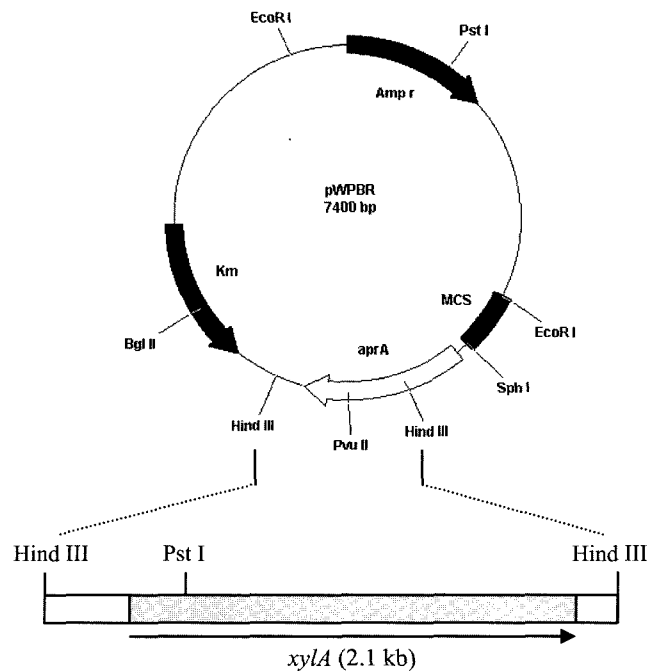


Fig. 1. Construction of the pWPBR-1. Plasmid pWPBR is a *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector containing a promoterless subtilisin gene (*aprA*). Plasmid construction of the pWPBR-1 was described in Materials and Methods. The 2.8 kb fragment which contain complete *xylA* gene was inserted into a pWPBR that was digested by *Hind* III. Amp^R means ampicillin-resistance gene. Km denotes the gene encoding the kanamycin nucleotidyltransferase.

의 양을 1 unit 효소로 정의하였다.

xylA promoter의 변이

모든 promoter 변이는 QuickChange™ site-directed mutagenesis kit(Stratagene)을 사용하여 얻었으며 염기 서열 결정을 통해 변이를 확인한 다음 pWPBR에 도입하였다.

pWPBR-1 재조합 플라스미드

*E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포에서 promoter 활성을 분석, 비교하고자 pWPBR에 *xylA* 유전자를 subcloning하였다. 즉 pMG1[12] DNA를 *Hind*III로 처리, *xylA* 유전자를 포함하고 있는 2.8 kb DNA 단편을 분리하여 calf intestine alkaline phosphatase로 처리한 pWPBR vector에 cloning하여 pWPBR-1 재조합 플라스미드를 얻었다(Fig. 1). pWPBR-1 재조합 플라스미드는 ampicillin을 선택 표지로 이용, *E. coli* XL1-Blue에 형질전환시켰으며, *B. subtilis*의 경우는 kanamycin이 첨가된 선택 배지를 이용하여 *B. subtilis*에 형질전환시켰다.

RNA 분리와 Northern Blot Analysis

RNA 분리와 Northern blot analysis는 상법에 따라 수행하였다[15]. 분리 RNA는 A₂₆₀에서 흡광도를 측정하여 농도

를 환산하였고, ^{32}P -labeled DNA probe로는 primer NorF (5'-TACGATGGAATCGAT-3')과 primer NorR (5'-AAA TTGCGCTAACGC-3')를 사용하여 PCR하여 얻었다.

Primer Extension

Probe는 T4 DNA polynucleotide kinase를 사용하여 γ - ^{32}P -ATP (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)로 primer Ext (5'-GTCTGAAGCCGCCGCTTTGGCCGGGATAAC-3')를 labeling 하였다. 즉 *E. coli* 세포로부터 얻어진 RNA를 10 μl labeled primer와 혼합한 후 0.1 배의 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5배의 100% ethanol를 첨가하고 -20°C에서 30분 동안 정치한 다음 원심분리하여 pellet을 얻은 뒤 15 μl hybridization buffer(50 mM KCl, 25 mM Tris-HCl(pH 8.3))에 녹였다. 그리고 70°C에서 1분 동안 끓인 후, 45°C까지 천천히 식힌 뒤 reverse transcription reaction mixture(1.5 μl 0.1 M DTT, 5 μl 2.5 mM dNTP, 6 μl 5 \times M-MLV buffer, 1.2 μl M-NLV (Promega))를 첨가하였다. 42°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1 μl 0.5 M EDTA로 반응을 정지시키고 1 μl 의 pancreatic RNase A를 첨가하여 남은 RNA를 분해, 제거하였다. 그 후 반응물을 phenol과 ethanol로 침전시키고 loading buffer(80% formamide, 10 mM EDTA(pH 8.0), 1 mg/ml bromo-phenol blue)에 녹인 뒤 8% acrylamide gel에 loading하였다. DNA 단편은 α - ^{35}S -dATP로 labeling하고 X-ray film으로 노출시켰다[15].

결과 및 고찰

***xylA*의 transcription initiation site 확인**

B. stearothermophilus No. 236 세포에서의 *xylA*의 transcriptional start site 결정과 *xylA* 염기 서열을 결정한 이전 연구에서 transcriptional start site는 translational start codon으로부터 15 bp 위쪽에 위치한 guanine(G)인 것으로 분석되었으며 *xylA* promoter의 -35 element는 TTGTTA이고 -10 element는 CATAAT인 것으로 추정하였다[13]. 본 연구에서도 *xylA* 유전자를 가지고 있는 재조합 플라스미드를 이용하여 *E. coli*에서 transcription start site를 결정하였다. *xylA* 유전자를 포함하고 있는 pMG1[12] 재조합 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli* XL1-Blue 세포로부터 RNA를 추출하여 radiolabeling 한 primer Ext (5'-GTCTGAAGCCGCCGCTTTGGCCGGGATAAC-3')로 hybridization하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *xylA* transcription start site는 *B. stearothermophilus* No. 236 세포에서 결정하였던 같은 위치의 guanine nucleotide(G)으로 확인되었다. 따라서 상기 추정 promoter의 구조를 토대로하여 *xylA* promoter 변이들을 분리 확인한 다음 각각의 promoter 변이들의 promoter strength를 *E. coli*-*B. subtilis* shuttle vector (pWPBR)를 이용하여 *E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포에

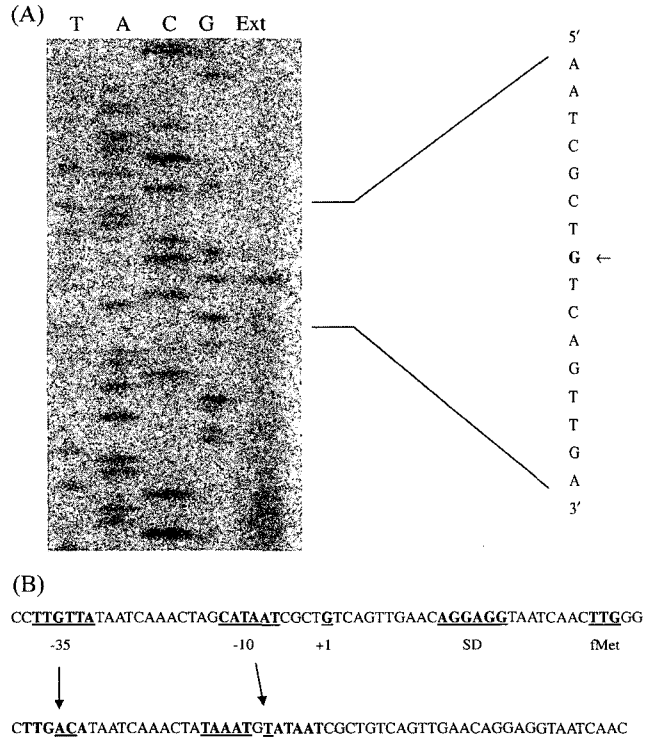


Fig. 2. Identification of the transcription start site of *xylA* by primer extension. (A) *E. coli* XL1-Blue containing recombinant plasmid pMG1 carrying *xylA* was grown in LB media supplemented with ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The cells were harvested when the cell reached to the early mid-log phase and total RNAs were prepared as described in Materials and Methods. The arrow indicates the transcription start site. (B) Nucleotide sequence of transcription and translation initiation site of *xylA*. The transcriptional start site of *xylA* (+1) was determined to be guanine (G) located at 24 bp upstream from the translational initiation codon (UUG). To increase the expression of β -xylosidase, the sequences of *xylA* promoter were converted into their respective consensus sequences and the length of the spacer region was changed from 12 to 17 bp using a QuickChange™ site-directed mutagenesis kit.

서 비교 분석하였다.

Promoter spacer region 거리 변화의 효과

xylA 유전자 promoter의 -35와 -10 element 사이의 거리는 12 bp로 promoter 활성화에 있어서 최적 거리인 것으로 알려져 있는 17 bp에 비해 훨씬 짧은 것으로 분석되었다(Fig. 2B). 따라서 본 실험에서는 site-directed mutagenesis 방법을 활용한 insertion mutation을 실시하여 Figure 2에 표시되어 있는 바와 같이 두 hexamer 사이에 TAAAT의 5개 nucleotide를 삽입하여 거리를 17 bp로 연장시키고 promoter strength에 미치는 효과를 효소 활성 측정을 통해 비교 분석하였다. 그 결과 spacer region의 길이를 17 bp로 변화시켰을 때 *xylA* promoter strength에 미치는 효과는 wild-type에 비해 *E. coli* 세포에서는 약 1.6배 그리고 *B. subtilis*에서는

Table 1. β -Xylosidase activity assay of spacer region mutants.

Clone	Promoter		Specific activity ^a		
	-35	bp*	-10		
<i>xylA</i>	TTGTTA	12	CATAAT	1.57±0.14	6.91±3.61
12SR17	TTGTTA	17	CATAAT	2.75±0.28	15.77±2.01

^aOne unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to release 1 (mole of p-nitrophenol per min. The values shown are the averages (±standard deviation) of three independent experiments.

bp* : length between spacer regions.

약 2.5배 증가되었다(Table 1). 따라서 prokaryotic organisms의 경우 promoter를 구성하는 두 hexamer 사이의 거리가 promoter strength에 큰 영향을 미치며 그 거리가 17 bp 일 때 promoter DNA와 primary sigma factor가 가장 효율적인 작용을 할 수 있다[7, 19]는 것을 재확인할 수 있었다.

상기 spacer region의 변화에 의한 효소활성 증가가 예상대로 transcription level 증가에 기인된 결과인지를 확인하기 위해 Northern blot 실험을 실시하여 mutant promoter에서의 mRNA 생산량을 측정해 보았다(Fig. 3). Spacer region의 거리를 12 bp에서 17 bp로 연장시켰을 때 wild-type *xylA* promoter에 비해 *E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포 모두 (β -xylosidase 활성 증가폭에 비례적으로 mRNA 생산량이 증가됨을 볼 수 있었다. 따라서 transcription level에 있어서도 두 hexamer 사이의 거리가 17 bp 일 때 promoter strength에 있어 가장 효율적임을 알 수 있었다.

Promoter sequence의 변이 효과

xylA 유전자의 transcription start site (+1) 왼쪽 -10에서

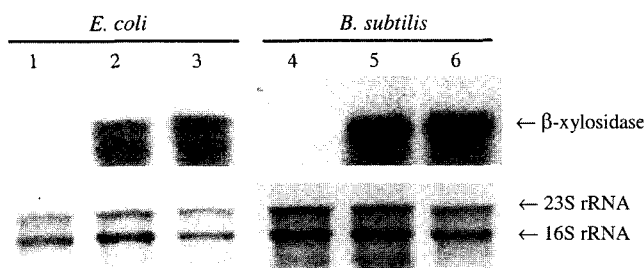


Fig. 3. Northern blot analysis of the 12→17 bp mutation of spacer region. Northern blot analysis in *E. coli* and *B. subtilis*. Total RNAs were prepared from cells grown in LB containing ampicillin and kanamycin, respectively, for 10 h at 37°C. 10 µg of RNAs was loaded onto 1% formaldehyde-agarose gel. After capillary blotting, the membrane was hybridized with radiolabeled probe and exposed to X-ray film. Lane 1, *E. coli* XL1-Blue; lane 2, *xylA*; lane 3, 12SR17; lane 4, *B. subtilis* MW15; lane 5, *xylA*; lane 6, 12SR17. The upper panel indicates the position of full-length *xylA* mRNA and the lower panel indicates positions of the 23S and 16S rRNAs as pointed.

Table 2. β -Xylosidase activity assay of promoter sequence mutants.

clone	promoter		Specific activity ^a	
	-35	-10	<i>E. coli</i> (unit/mg)	<i>B. subtilis</i> (10 ⁻³ unit/mg)
<i>xylA</i>	TTGTTA	CATAAT	2.61±1.70	10.11±22
C10T	-----	T-----	0.18±0.09	2.42±1.00
T35A	--A--	-----	5.98±1.24	346.80±145
T35C	---C-	-----	0.57±0.05	315.62±89
TT35AC	---AC-	-----	0.47±0.03	250.82±64
TTC17ACT	---AC-	T-----	0.30±0.06	1.67±2.00

^aOne unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmole of p-nitrophenol per min. The values shown are the averages (±standard deviation) of three independent experiments.

-5 사이에 위치하고 있는 -10 element로 추정되는 hexamer의 염기 서열은 CATAAT로서 첫번째 염기인 C 염기만이 consensus sequence (TATAAT)와 일치되지 않고 있다(Fig. 2B). 따라서 첫번째 염기 C를 매우 높은 빈도를 나타내는 T로 변이시켜 consensus sequence와 완전 일치되는 변이 promoter를 구하고 *xylA* 발현율에 미치는 영향을 분석해 본 결과, Table 2에 표시되어 있는 바와 같이 예상외로 *E. coli*의 경우는 약 15배 그리고 *B. subtilis* 세포에서는 약 5배 정도 효소 활성이 감소되는 특이한 현상을 나타내었다. 이와 같은 결과는 현재로서는 타당성 있는 설명을 할 수 없으나 *B. stearothermophilus* No. 236 균주의 *xylA* 유전자 경우는 극히 예외적으로 -10 hexamer의 5' 쪽 첫번째 염기가 consensus sequence와 다른 C 염기일 때 *xylA* 유전자 발현에 있어 더 유리한 promoter 구조라고 할 수 있는 실험 결과를 얻었다.

다음은 -35 element의 5'에서 4번째 염기 T를 consensus sequence (TTGACA)와 같이 A 염기로 변이시켜 본 결과 *xylA* 유전자 발현율이 *E. coli*에서는 wild-type에 비해 약 2.3배 증가한 반면 *B. subtilis* 세포에서는 약 34배 정도 높아지는 결과를 얻었다. 또한 5'에서 5번째 염기인 T를 C로 변이시켰을 때에는 *E. coli*에서는 발현율 감소를 보였으나 *B. subtilis*에서는 반대로 약 31배 증가된 효과를 나타냄으로서 두 숙주 세포간 변이 효과의 뚜렷한 차이를 보였다(Table 2).

한편 두 숙주 세포에서 *xylA* 유전자 발현율을 약 1.5~5배 정도 감소시키는 효과를 보였던 -10 element의 첫번째 염기를 C→T로의 변이와 발현율의 가장 큰 증가폭을 나타내었던 -35 element의 T→A변이를 동시에 가지고 있는 이중 변이 promoter의 경우, -35 element의 T→A 변이에 의한 발현율 증가 효과가 -10 element의 C→T 변이로 그 효과가 상쇄되는 흥미로운 결과를 얻었다. 다시 말해 두 hexamer의 염기 서열이 consensus sequence에 가까울수록 발현율이 증가될 것이라고 보였으나 상기 실험의 결과를 통해 유전자의

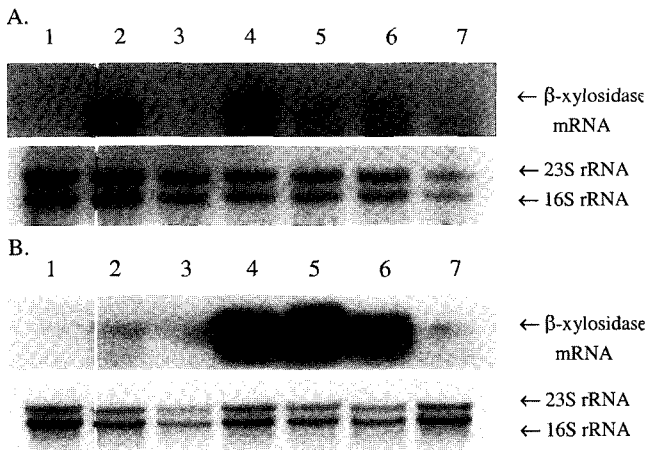


Fig. 4. Northern blot analysis of the change of promoter sequence. Lane 1, *E. coli* XL1-Blue(A) and *B. subtilis* MW15(B); lane 2, *xylA*; lane 3, C10T; lane 4, T35A; lane 5, T35C; lane 6, TT35AC; lane 7, TTC12ACT. The upper panel indicates the position of full-length *xylA* mRNA and the lower panel indicates positions of the 23S and 16S rRNAs as pointed.

종류에 따라 promoter strength가 차이가 날 수 있다는 것을 알 수 있었다.

이상의 *xylA* promoter sequence의 변이 효과를 종합해 본 결과, 두 promoter elements 사이의 거리를 17 bp로 연장시킴과 동시에 -35 element의 5' 쪽에 4번째 염기인 T를 A로 변이시킨 mutant promoter가 가장 높은 promoter strength를 나타내는 가장 효율적인 *xylA* promoter라는 결론을 얻을 수 있었다.

다음은 상기 *xylA* 유전자의 promoter sequence를 변화시킨 각종 promoter 변이가 transcription 단계에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Northern blot 실험을 실시하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 예상했던 바와 같이 *xylA*의 전사체량은 β -xylosidase 활성 측정에 의한 발현량의 변화(Table 2)와 완전 일치되는 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 *E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포에서 다같이 -10 element와 -35 element 사이의 거리를 17 bp로 늘리고 -35 element의 5' 쪽에서 네번째 염기인 T를 A로 치환한 mutant promoter가 가장 효율적인 *xylA* promoter라는 것을 재확인시켜 주었다고 하겠다.

이상 본 연구에서의 실험 결과를 종합·분석해 보면 prokaryotic organisms에서 어떤 특정 promoter의 promoter strength는 세균의 속에 따라서 차이가 나는 것은 물론이고 경우에 따라서는 같은 세포에서도 유전자의 종류에 따라 크게 다를 수 있다는 매우 중요한 지식을 얻을 수 있었다.

요 약

Xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus* No. 236

분리균의 β -xylosidase 생산 유전자(*xylA*)의 염기 서열 및 transcription start site를 결정한 이전 연구 결과에 의하면 *xylA* 유전자는 매우 특이하게 UUG codon에서 translation이 시작되며 initiation codon 15bp 뒤편에는 promoter로 추정되는 염기 서열을 가지고 있는 것으로 분석되었다. 이와 같은 *xylA* 유전자 promoter region의 구조는 *E. coli*에 클로닝된 *xylA* 유전자를 이용한 실험 결과로도 확인되었다. *xylA* promoter의 -10 element는 CATAAT로서 6개의 염기 중 5개가 그리고 -35 element의 경우는 TTGTTA로서 6개의 염기 중 4개가 consensus sequence와 일치되었으나 두 hexamer 사이의 거리가 최적 거리에서 크게 벗어난 12 bp인 것으로 분석되었다. 본 연구에서는 β -xylosidase의 대량 생산을 위한 연구의 일환으로 *xylA* promoter sequence의 체계적 구조 변화에 의한 promoter strength에 미치는 효과를 *E. coli*와 *B. subtilis* 두 숙주 세포에서 조사 분석해 본 결과, 첫째로 두 promoter elements 사이의 거리를 최적거리인 17 bp로 바꾸었을 때 *xylA*의 발현율은 *E. coli*에서는 1.6배, *B. subtilis*에서는 2.5배 정도 증가함을 보여주었다. 그리고 -35 element는 consensus sequence와 같이 5' 쪽에서 네번째 위치에 있는 T→A로 변이시켰을 때 *E. coli* 경우 2.3배, 특히 *B. subtilis*에서는 35배나 되는 가장 높은 promoter 활성의 증가를 보였다. 그러나 -10 sequence의 경우 consensus sequence와 같이 5' 쪽에서 첫번째 위치에 있는 C→T로 transition시켰을 때 예상외로 오히려 발현율이 5~15 배까지 낮아지는 특이한 결과를 얻었다. 따라서 본 연구 결과 *xylA* promoter의 경우 -10 sequence인 CATAAT의 C와 -35 element의 A의 두 염기가 promoter 활성에 있어 가장 중요한 염기임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 고려대학교 특별연구비에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cho, S. G. and Y. J. Choi. 1995. Nucleotide sequence analysis of endo-xylanase gene (*xynA*) from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 117-124.
2. Cho, S. G. and Y. J. Choi. 1998. Regulation of β -xylosidase (*XylA*) synthesis in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 14-20.
3. Cho, S. G., S. S. Park, Y. I. Park, and Y. J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 271-279.
4. Choi, I. D., H. Y. Kim, and Y. J. Choi. 2000. Gene cloning and characterization of α -glucuronidase of *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**:

- 2530-2537.
5. Dekker, R.F.H. 1985. Biodegradation of hemicelluloses. pp. 505-533. In T. Higuchi (ed.), *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press. Inc., Orlando, Fla.
 6. Eom, S. J., H. S. Kim, S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1994. Molecular cloning and expression of the (-arabinofuranosidase gene of *Bacillus stearothersophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 608-613.
 7. Fournier, B., A. Gravel, D. C. Hooper, and P. H. Roy. 1999. Strength and regulation of the different promoters for chromosomal β -lactamases of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 850-855.
 8. Kim, H. S., S. J. Eom, S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1994. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene (*est II*) of *Bacillus stearothersophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 599-606.
 9. Kim, I. S., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1993. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene of *Bacillus stearothersophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 542-538.
 10. Lee, J. S. and Y. J. Choi. 1997. Nucleotide sequence of the *est I* gene coding for *Bacillus stearothersophilus* acetylxylan esterase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 23-29.
 11. Lissner, S. and H. Margalit. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1507-1516.
 12. Mun, A. R. and Y. J. Choi. 1992. Purification and characterization of exo-xylanase from *Escherichia coli* cells harboring the recombinant plasmid pMG1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 574-582.
 13. Oh, H. J. and Y. J. Choi. 1995. Sequence analysis of β -xylosidase gene from *Bacillus stearothersophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 134-142.
 14. Oh, S. W., S. S. Park, Y. I. Park, and Y. J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothersophilus* β -D-xylosidase gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 136-142.
 15. Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch. 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, New York.
 16. Song, H. S. and Y. J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothersophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
 17. Suh, J. H., S. G. Cho, and Y. J. Choi. 1996. Synergic effect among endo-xylanase, β -xylosidase, and α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothersophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 179-183.
 18. Suh, J. H. and Y. J. Choi. 1996. Synergism among endo-xylanase, β -xylosidase, and acetyl xylan esterase from *Bacillus stearothersophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 173-178.
 19. Walker, K. A., C. L. Atkins, and R. Osuna. 1999. Functional determinants of the *Escherichia coli* *fis* promoter: Roles of -35, -10, and transcription initiation regions in the response to stringent control and growth phase-dependent regulation. *J. Bacteriol.* **181**: 1269-1280.
 20. Wolf, M., A. Geczi, O. Simom, and R. Borriss. 1995. Genes encoding xylan and β -glucan hydrolyzing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase. *Microbiology* **141**: 281-290.
 21. Xu, J., B. C. McCabe, and G. B. Koudelka. 2001. Function-based selection and characterization of base-pair polymorphisms in a promoter of *Escherichia coli* RNA polymerase- σ^{70} . *J. Bacteriol.* **183**: 2866-2873.

(Received Dec. 16, 2002/Accepted Apr. 21, 2003)