

## Saccharomyces cerevisiae 세포 표면에 leucocin A 유전자의 발현에 의한 항균활성 효모의 개발

이 상 현\*

신라대학교 생명공학과

Received October 25, 2005 / Accepted November 29, 2005

**Development of Bactericidal Yeast Strain by Expressing the Leucocin A Gene on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae*.** Sang-Hyeon Lee\*. Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, San 1-1, Kwaebop-dong, Sasang-gu, Busan, 617-736 KOREA – In order to develop yeast cells that produce a bacteriocin on their cell surfaces, the 114 bp Leucocin A gene with stop codon was ligated into pYD1, an yeast vector. The recombinant DNA, pYD1-LeucoA was used to transform yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells. Yeast cells harboring pYD1-LeucoA showed antibacterial activity against *Bacillus subtilis*. To confirm these bacteriocidal yeast cells possess the Leucocin A gene, PCR was performed with plasmid prepared from transformed yeast cells as a template and two Leucocin A-specific primers. In this study, bacteriocidal yeast cells that can be used as an antibiotic or a food preservative were developed.

**Key words** – yeast, Leucocin A, bacteriocin, *Saccharomyces cerevisiae*

제조된 식품을 시중에서 장기간 보존하기 위하여 식품보존료를 사용하고 있는데, 일반적으로 사용하고 있는 식품보존료로는 안식향산나트륨(sodium benzoate)과 소르빈산칼륨(potassium sorbate) 등이 현재 다양한 식품의 보존료로 사용되고 있다. 하지만, 최근 생활수준의 향상으로 식품에 대하여 이들 본래의 역할인 영양공급 뿐 만 아니라 그 기능성에도 관심이 고조되고 있어 소비자들이 화학물질이 첨가되어 있지 않고 천연원료만으로 제조된 식품을 선호하는 경향이 강해지고 있어 이러한 화학합성 보존료가 첨가된 식품은 일반 소비자들의 선호도가 저하되고 있다.

유산균(lactic acid bacteria)은 식품의 발효에 관여하는 중요한 세균이며 우리 조상들은 오래 전부터 야채의 장기보존을 위하여 유산균을 이용하여 야채를 발효시켜 김치를 만들어 먹었는데, 김치의 발효에 있어서도 *Leuconostoc mesenteroides*라는 유산균이 관여한다. 또한, 우유를 원료로 이를 발효하여 저장성과 풍미를 개선한 제품이 유산균 음료인 요구르트이다. 이러한 발효식품들의 발효후의 저장성 개선효과의 원인을 조사한 결과, 유산발효에 의한 식품내 산농도의 증가로 병원성 혹은 부패성 미생물이 생육하기에 부적합한 환경을 만드는 효과와 함께 이들 유산균이 생산하는 항균물질(antibacterial substance)에 의한 잡균생육 저해효과를 확인할 수 있었다[9]. 이들 세균이 생산하는 항균물질을 총칭하여 박테리옌(bacteriocin)이라 한다. 지금까지 다양한 종류의 생물들로부터 많은 종류의 항균성 펩티드들이 발견되었는

데, 이들은 다시 일차구조(아미노산 배열), 합성경향(리보솜성과 비리보솜성), 합성 후의 수식양상, 입체구조(선상, 원형,  $\alpha$ -나선,  $\beta$ -시트) 등의 특징에 따라 6종류의 그룹으로 나누고 있다[1,6,7,10-12].

이들 중, *Lactobacillus lactis*와 이들이 생산하는 박테리옌인 nisin은 오랜 기간동안 식품, 특히 유제품의 보존에 응용해 왔으며[4,8,11], 미국의 FDA로부터 식품첨가물로서의 안정성을 인정받았다[2]. 박테리옌의 이러한 유용성 때문에 현재까지 많은 종류의 미생물들로부터 다양한 종류의 박테리옌들이 발견되고 연구되어져 왔다[5]. 식품에 대한 보존력이 뛰어나고 안정성 또한 확인된 박테리옌을 실제로 식품을 보존하는데 사용하려면 낮은 단가로 대량공급이 가능해야 한다. 하지만 이들 박테리옌 중 제품화되어있는 것은 nisin 한 종류 뿐이다. 이러한 nisin 조차도 연구를 목적으로 하는 시약급으로 공급되고 있어 매우 고가이기 때문에 식품에 응용하기가 불가능하다. 또한 박테리옌을 생산하는 균주는 대부분이 유산균으로 이를 직접 사용할 경우 박테리옌 이외에 부산물로 생성되는 젖산이 제품에 산미를 부여하기 때문에 제품의 풍미를 변화시키는 악영향을 미친다. 또한 유전공학적 방법으로 박테리옌 유전자를 클로닝하고 이를 이용하여 박테리옌을 생산할 경우, 생산 산물 자체가 항균성을 나타내기 때문에 대장균과 같은 원핵생물을 생산숙주로 사용할 경우 숙주의 생장을 저해하기 때문에 대량생산이 힘들어진다.

식품에 응용 가능한 박테리옌은 크게 2 종류로 나눌 수 있는데, nisin과 같이 펩티드가 합성된 후 구성 아미노산에 수식이 일어나 lantionine이라는 특수한 아미노산을 가지는

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

lantibiotic과 pediocin과 같이 합성 후 아미노산에 수식이 일어나지 않는 non-lantionine-containing bacteriocin으로 구성되어 있다. 이들 중, lantibiotic은 이를 생산하는 원래의 미생물인 유산균이 아닌 효모에 그 유전자를 도입하여 생산할 경우 합성 후 아미노산의 수식이 일어나지 않아 제 기능을 할 수 없는 펩티드만 생산하게 된다. Leucocin A와 같이 합성된 후 아미노산의 수식을 필요로 하지 않는 bacteriocin은 이들 유전자를 효모에 도입하여 항균활성을 가지는 효모균을 제작하려는 본 실험의 목적에 적합한 대상이다. 또한 Leucocin A의 특징과 일차구조 및 유전자의 염기배열에 관해서는 이미 상세히 연구되어 있다[3,5].

본 연구에서는 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육저해를 위한 항생제로 사용하기 위해 유전공학적인 기법을 동원하여 효모로 하여금 세포 표면에서 Leucocin A를 생산하게 하여 이를 산업적 생산 공정에 적용할 수 있도록 하려한다.

**재료 및 방법**

**시약 및 배지**

제한효소, T4 polynucleotide kinase, DNA ligation kit ver. 2, Taq DNA polymerase는 Takara Korea (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

유전자 클로닝을 위한 숙주로는 *E. coli* DH5a를 사용하였다. 대장균은 LB 배지(1% bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 이용하여 37°C에서 배양하였다. 대장균 형질 전환체의 선별을 위해서는 LB 배지에 ampicillin이 최종농도 100 µg/ml가 되게 첨가하여 사용하였다. 고체배지는 LB 배지에 한천(agar)을 1.5%가 되도록 첨가하여 제작하였다.

발현에 사용된 효모(EYB100(+Ura), Invitrogen, USA)의 배양에는 SD-Ura 배지(Bio 101, USA)를 사용하였다. 효모의 발현 플라스미드는 GAL1 promoter에 의해 발현이 유도되는

pYD1(Invitrogen, USA)을 사용하였다. 형질전환된 효모의 선별에는 SD-Ura-Trp 배지(Bio 101, USA)를 사용하였고, 유전자의 발현에는 SD-Ura-Trp(2% galactose) 배지(Bio 101, USA)를 사용하였다.

**박테리오신 유전자의 클로닝**

114 bp 길이의 Leucocin A 유전자의 클로닝을 위해 Leucocin A 유전자의 상류부위와 하류부위에 해당하는 oligo DNA를 각각 제작하였다[3]. Leucocin A 유전자의 용이한 클로닝을 위하여 Leucocin A 유전자의 5' 부위에 해당하는 합성 oligo DNA에는 제한효소 *XhoI* 부위를, 3' 부위에 해당하는 합성 oligo DNA에는 종지코돈인 TAA와 제한효소 *ApaI* 부위를 도입하여 제작하였다(Table 1). 합성된 두 가닥의 oligo DNA들을 서로 annealing하여 이중쇄 DNA를 만들고 이를 인산화시켰다. 각각 절반씩 제작된 Leucocin A를 코딩하는 이중쇄 유전자 단편들을 효모발현 벡터인 pYD1의 *XhoI* 부위와 *ApaI* 부위에 연결하였다. 이렇게 제작된 재조합 DNA를 대장균(DH5a)에 형질전환시킨 후, 이로부터 플라스미드 DNA를 분리하고 제한효소를 이용하여 재조합 DNA를 확인하였다. 이렇게 제작된 Leucocin A를 발현하는 효모용 플라스미드는 pYD1-LeucoA라고 명명하였다.

**Leucocin A 유전자를 도입시킨 효모세포의 제조 및 유전자의 발현**

Leucocin A 유전자의 발현 플라스미드 pYD1-LeucoA 및 운반체 pYD1을 Cell-Porator Electrophoration system (Life Technologies, USA)을 이용하여 각각 효모(EYB100(+Ura))세포에 형질전환(transformation)시켰다. 형질전환이 이루어진 효모세포는 SD-Ura-Trp (1 M Sorbitol)배지에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하여 형질전환된 효모의 콜로니를 생성시켰다.

Leucocin A 유전자의 발현을 위하여 pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모의 콜로니(colony) 하나를 SD-Ura-Trp배지 10 ml

Table 1. 클로닝에 사용한 Leucocin A의 유전자 및 아미노산 배열

5' -TC GAG AAG TAT TAT GGT AAC GGA GTT CAT TGC ACA AAA AGT	41
3' - C TTC ATA TAT CCA TTG CCT CAA GTA ACG TGT TTT TCA	
Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val His Cys Thr Lys Ser	13
GGT TGT TCT GTA AAC TGG GGA GAA GCC TTT TCA GCT GGA GTA	83
CCA ACA AGA CAT TTG ACC CCT CTT CGG AAA AGT CGA CCT CAT	
Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Glu Ala Phe Ser Ala Gly Val	27
CAT CGT TTA GCA AAT GGT GGA AAT GGT TTC TGG TAA GGG CC-3'	124
GTA GCA AAT CGT TTA CCA CCT TTA CCA AAG ACC ATT C -5'	
His Arg Leu Ala Asn Gly Gly Asn Gly Phe Trp Trm	38

Leucocin A 유전자를 효모 운반체에 클로닝하기 위하여 111 bp로 구성된 Leucocin A 유전자의 5' 부분에는 제한효소 *XhoI* 부위를, 3' 부분에는 종지코돈(TAA)과 제한효소 *ApaI* 부위를 도입하였다. 59~62 번째 뉴클레오티드 사이의 경계표시는 이 유전자의 클로닝을 위해 상류부분과 하류부분으로 나누어 합성된 oligo DNA의 경계를 나타낸다.

에 접종하여 30°C에서 600 nm에서 OD 2-5가 될 때까지 진탕 배양(250 rpm)하였다. 이 배양액을 실온에서 5-10분간 원심분리(3000-5000 xg)하고 SD-Ura-Trp(2% galactose) 배지 20-40 ml에 600 nm에서 OD 0.5-1이 되도록 현탁한 후, 20°C에서 48 시간 배양하였다. 운반체 pYD1이 형질전환된 효모도 같은 방법으로 발현을 유도하여 negative control로 사용하였다.

**Leucocin A를 생산하는 형질전환 효모세포의 항균활성 측정**

고초균(*Bacillus subtilis*)을 LB 배지를 이용하여 30°C에서 하룻밤 배양하고 사용직전에 이를 100배로 희석하였다. 이 균의 희석액을 YPD 고체(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% D-glucose, 1.5% agar)배지에 도말하였다. 여기에 paper disc를 놓고 pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모의 발현 배양액과 운반체 pYD1이 형질전환된 효모의 발현 배양액 100 µl씩을 paper disc에 접종하였다. 이를 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후 항균작용에 의해 형성된 생육억제환(clear zone)을 비교·관찰하였다.

**pYD1-LeucoA 형질전환 효모로부터 플라스미드 DNA의 분리 및 Leucocin A 유전자의 확인**

pYD1-LeucoA 형질전환 효모를 SD-Ura-Trp배지 4 ml에 접종하여 30°C에서 하룻밤 동안 배양한 후, 원심분리(14,000 xg, 5분)하여 균체를 회수하였다. 여기에 yeast lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM tris-HCl (pH 8.0) buffer, 1 mM EDTA) 200 µl을 넣어 균체를 현탁한 후, acid-washed glass beads (425-600 m, Sigma #G-8772, USA) 0.3 g과 phenol/CHCl<sub>3</sub> 용액 200 µl를 넣고 2분간 vortex하였다. 이것을

원심분리(14,000 xg, 10분)하여 상청액을 새로운 tube에 옮기고, 여기에 glycogen 1 µl, 5 M LiCl 용액 20 µl, 차가운 에탄올 500 µl를 넣은 후, 원심분리(14,000 xg, 10분)하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 차가운 70% 에탄올로 세정한 후 건조시키고, 탈이온수(ddH<sub>2</sub>O) 20 µl에 녹였다.

효모로부터 회수된 플라스미드 DNA의 확인은 Leucocin A에 특이적인 primer를 이용한 PCR (polymerase chain reaction)법으로 행하였다. 회수된 플라스미드 DNA 50 ng과 Leucocin A에 특이적인 primer인 Leuco4-F (23 mer, 5'-CTCGAGAAGTATTATGGTAACGG-3')와 Leuco5-R (26 mer, 5'-GGGCCCTTACCAGAAACCATTTCAC-3')을 각각 10 pmol 씩 사용하여 PCR 반응을 행하였다. PCR 반응산물은 2%의 agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**Leucocin A 유전자의 클로닝**

Leucocin A는 38개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드로 유전자의 일차구조가 이미 보고되어 있다[3]. 111 bp의 짧은 길이의 Leucocin A 유전자를 클로닝하기 위하여 Leucocin A 유전자의 전후 부위를 55 bp 정도씩 나누어서 합성한 후, 이들을 서로 DNA 연결효소(ligase)로 연결하여 이 유전자를 클로닝하였다. 합성된 oligo DNA를 서로 annealing하여 얻어진 이중체 DNA를 효모 발현 벡터(vector)인 pYD1의 제한효소 *XhoI*-*ApaI* 부위에 삽입하여 효모 발현 플라스미드를 얻었다(Fig. 1). 이러한 방법으로 유산균의 일종인 *Leuconostoc gelidium* UAL 187 유래의 leucocin A 유전자의 클로닝에 성

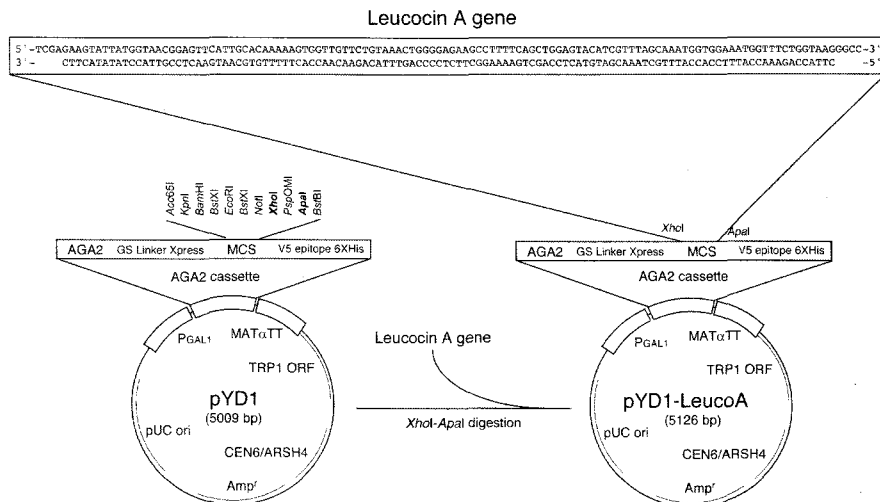


Fig. 1. Leucocin A 유전자의 클로닝. Oligo DNA 형태로 합성된 Leucocin A 유전자를 annealing하여 이중체 DNA로 만든 후, 효모 발현벡터인 pYD1의 제한효소 *XhoI*과 *ApaI* 부위 사이에 삽입하였다. 삽입된 Leucocin A 유전자의 염기배열과 삽입방향을 상단에 나타내었다. TRP1 ORF; *S. cerevisiae*의 트립토판 합성 유전자, PGAL1; *S. cerevisiae*의 GAL1 유전자의 프로모터, AGA2 cassette; AGA2 유전자를 포함하는 클로닝 카세트, MATαTT; *S. cerevisiae*의 MATa 유전자의 전사종결신호, CEN/ARSH4; *S. cerevisiae*의 복제기점, Amp<sup>r</sup>; *E. coli*의 엠피실린(ampicillin) 내성유전자, pUC ori; *E. coli*의 복제기점.

공하였다. 클로닝에 사용한 Leucocin A 유전자의 염기서열과 아미노산 서열을 Table 1에 나타내었다.

**Leucocin A를 생산하는 형질전환 효모의 제작 및 유전자의 발현**

발현 플라스미드 pYD1-LeucoA를 효모(EYB100(+Ura))세포에 형질전환하기 위하여 electrophoration 방법을 이용하였다. 이 방법을 이용한 결과, lithium acetate 법을 이용한 방법보다 10배 이상의 콜로니(colony)를 확보할 수 있었다. 형질전환 효모의 선별을 위하여 효모의 일반적인 선택마커인 영양요구성 마커를 이용하였으며, 형질전환이 이루어진 효모세포는 SD-Ura-Trp배지에서 배양 3일 후 콜로니를 형성하였다.

pYD1-LeucoA 형질전환 효모를 이용한 Leucocin A의 생산을 위하여 pYD1 운반체의 유전자 발현에 관여하는 GAL1 promoter를 galactose를 이용하여 발현을 유도하였다. pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모를 glucose가 함유된 SD-Ura-Trp 배지에서 배양한 후 회수된 균체를 galactose가 함유된 SD-Ura-Trp (2% galactose)배지에 접종하여 배양하는 방법으로 Leucocin A의 발현을 유도할 수 있었다. 발현 플라스미드 pYD1-LeucoA은 Leucocin A 유전자를 pYD1운반체의 AGA2 카세트 상에 존재하는 AGA2 유전자 산물과 융합 단백질을 생산할 수 있도록 삽입하였다. 그 결과, 발현유도에 의해 생산된 AGA2-Leucocin A 단백질은 숙주(host)세포로 사용된 효모인 EYB100의 세포벽을 통과하여 세포 표면에 부착되어 존재하는 AGA1 단백질과 결합하여 세포표면에 고정된 상태로 존재하게 된다.

**형질전환 효모의 Leucocin A 생산능의 확인**

고초균(*Bacillus subtilis*)을 액체배지에 배양한 후, 이를 YPD 고체배지 전체에 접종하였다. 여기에 pYD1 형질전환 효모와 Leucocin A의 발현이 유도된 pYD1-LeucoA 형질전환 효모를 일정부위에 접종하여 항균활성에 의해 생성된 생육억제환(clear zone)을 비교·분석한 결과(Fig. 2), pYD1-LeucoA 플라스미드가 도입된 효모만이 고초균의 생육을 효과적으로 억제하는 것이 확인되었다(Fig. 2).

**pYD1-LeucoA 형질전환 효모로부터 분리된 플라스미드로부터 Leucocin A 유전자의 확인**

pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모로부터 Leucocin A 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA를 분리하였고, 이를 이용하여 Leucocin A 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 행한 결과, Leucocin A 유전자에 해당하는 약 120 bp의 유전자 단편이 확인되었다(Fig. 3). 이 결과로 형질전환 효모가 나타내는 고초균에 대한 항균활성이 형질전환에 의해 도입된 Leucocin A 발현 플라스미드에 의한 것이라는 사실

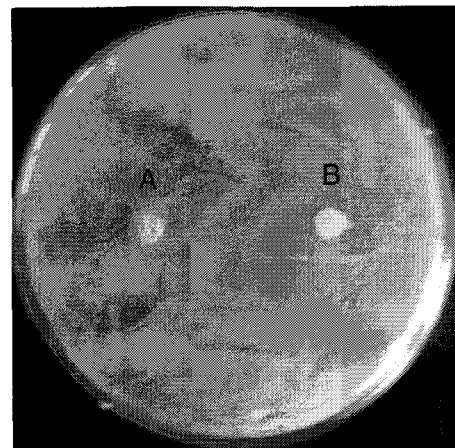


Fig. 2. *B. subtilis*에 대한 항균활성의 확인. A; 운반체인 pYD1이 형질전환된 효모. B: Leucocin A의 발현 플라스미드인 pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모.

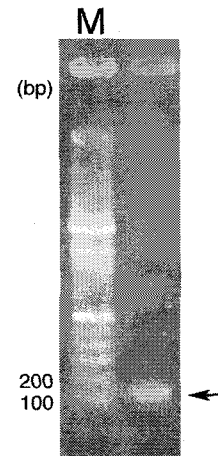


Fig. 3. 항균활성을 나타내는 pYD1-LeucoA가 형질전환된 효모로부터의 Leucocin A 유전자의 확인. M; size marker, PCR 법에 의해 증폭된 114 bp의 Leucocin A의 유전자의 위치를 화살표로 나타내었다. DNA의 전기영동에는 2% agarose gel을 사용하였다.

을 확인할 수 있었다.

이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제로 사용할 수 있는 박테리오파지를 산업적으로 대량생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다. 재조합 DNA 기술을 이용하여 유용 유전자 산물의 효율적인 생산을 위해서는 대상 유전자 산물인 단백질의 특성에 따라 사용하는 숙주(host)를 잘 선택해야 한다. 이 연구의 대상인 Leucocin A는 세균의 생육을 억제하는 항균활성을 가지는 단백질이기 때문에 대장균과 같은 세균세포를 생산숙주로 이용할 경우 생산이 불가능한 경우가 많다. 이 연구에서 사용한 생산숙주인 효모의 경우는 박테리오파지에 의해 생육 저해를 받는 원핵생물과는 달리 진핵생물이지만 배양이 용이하며 생육속도가 비교적

빠르기 때문에 특수한 유전자 산물을 생산하는데 자주 사용되는 숙주세포이다.

## 요 약

박테리오신의 일종인 Leucocin A를 생산하는 효모의 제작을 위하여 114 bp 길이의 종지코돈을 포함하는 Leucocin A 유전자를 합성하여 효모운반체인 pYD1에 클로닝하였다. 이렇게 제작된 재조합 DNA를 효모세포에 형질전환시켜 Leucocin A를 생산하는 형질전환 효모세포를 제작하였다. 형질전환 효모는 고초균(*Bacillus subtilis*)에 대해 항균활성을 나타냈다. 형질전환 효모로부터 분리한 플라스미드를 주형(template)으로 하고 Leucocin A에 특이적인 primer들을 이용하여 PCR 반응을 행한 결과, 효모에 도입된 Leucocin A 유전자를 확인할 수 있었다. 이 연구의 결과로 부패하기 쉬운 식품들의 보존성을 향상시키거나, 내성이 생긴 병원균의 생육을 저해하기 위한 항생제로 사용할 수 있는 박테리오신을 산업적으로 대량생산할 수 있는 효모세포를 제작하였다.

## 참 고 문 헌

- Dempsey, C. E. 1990. The actions of melittin on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 143-161.
- Federal register. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Fed. Regist.* **54**, 11247-11251.
- Hastings, J. W., M., Saiter, K., Johnson, K. L., Ray, J. C., Vederas and M. E., Stiles. 1994. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J. Bacteriol.* **173**, 7491-7500.
- Hugenholtz, J. and G. J. C. M., de Veer. 1991. Application of nisin A and Z in dairy technology, p. 440-447, *Nisin and novel lantibiotics*. (Jung, G. and Sahl, H.-G. eds), Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Jack, R. W., J. R., Tagg and B., Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**, 171-200.
- Maloy, W. L. and U. P., Kari. 1995. Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122.
- Mellor, I. R., D. H., Thomas and M. S. P., Samson. 1988. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **942**, 280-294.
- Molitor, E. and H.-G., Sahl. 1991. Application of nisin: a literature survey. p. 434-439. *Nisin and novel lantibiotics*. Escon Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Ray, B and M, Daeschel. 1992. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla; Stiles, M. E. and Hastings, J. W. (1991) Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* **2**, 247-251.
- Ray B, R, Schamber and K. W. Miller. 1999. The pediocin AcH precursor is biologically active. *Appl Environ Microbiol.* **65**, 2281-2286.
- Wiedemann I, E, Breukink, C, van Kraaij, O. P., Kuipers, G., Bierbaum, B., de Kruijff and H. G., Sahl. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J Biol Chem.* **276**, 1772-1779.
- Zuber, P., M. M., Nakano and M. A., Marahiel. 1992. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. *Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R., eds) pp. 897-916, American Society for Microbiology, Washington D. C.