Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 35, No. 3, 177–183(2007)

Methylovorus sp. Strain SS1 DSM11726으로부터 *rpoH* 유전자의 클로닝과 염기서열 분석

엄치용 · 송승은 · 박미화 · 김영민[1]*
한국기초과학지원연구원 서울센터 메타볼롬분석연구팀, [1]연세대학교 이과대학 생물학과

Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the *rpoH* Gene from *Methylovorus* sp. Strain SS1 DSM11726. Eom, Chi-Yong, Seung Eun Song, Mi-Hwa Park, and Young Min Kim[1]*. *Metabolome Analysis Team, Korea Basic Science Institute (KBSI), Seoul 136-173, Korea, [1]Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea* – Using complementation of RpoH deficient *E. coli* strain A7448, the *rpoH* gene encoding heat shock sigma factor 32 (σ^{32}) from *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726 was cloned and sequenced. Sequence analysis of a stretch of 1,796-bp revealed existence of an open reading frame encoding a polypeptide of 284 amino acid (32,006 dalton). Deduced amino acid sequence of the *Methylovorus* sp. strain SS1 RpoH showed that 59.6%, 39.1% and 51.4% identities with those of *Nitrosomonas europaea* (β-proteobacteria), *Agrobacterium tumefaciens* (α-proteobacteria) and *E. coli* (γ-proteobacteria). The expression level of the functional ortholog of RpoH of *Methylovorus* sp. strain SS1 was increased transiently after heat induction, further indicating that it functions as a heat shock sigma factor.

Key words: *rpoH*, *Methylovorus*, heat shock, sigma factor

서 론

세균이 고온의 환경에 노출된다거나 혹은 다양한 종류의 스트레스를 받게 되면 이에 대응하여 세균에서는 일련의 열충격 단백질이 빠른 시간 내에 일시적으로 합성된다. 열충격 단백질에는 세포 내 단백질의 올바른 folding을 유도하는 molecular chaperone과 잘못된 3차 구조를 지닌 단백질을 분해시키는 단백질가수분해효소 등이 포함된다. 대장균에서 열충격 유전자의 발현은 전사적 수준에서 조절 받으며[15], 이러한 열충격 유전자의 발현 조절에는 RNA 중합효소의 특이한 sigma factor(σ^{32})가 관여하는 것으로 알려져 있다[3, 8, 26].

대장균의 경우 30°C에서 42°C로 옮겨 열충격을 주게 되면 최소한 30개 이상의 열충격 유전자의 전사가 σ^{32}를 포함한 RNA 중합효소에 의해 유도 된다[19].

rpoH 유전자는 σ^{32}를 암호화하며 σ^{32}의 세포 내 수준은 세균 성장과 밀접한 관계를 보인다. 세포 내 σ^{32}의 수준이 높아질수록 더 많은 열충격 단백질이 합성되는데 이는 보다 높은 온도에서의 세균 성장과 관련이 있다[25]. 또한 *rpoH* 유전자의 돌연변이체는 20°C 이상의 온도에서는 성장할 수 없는 결과로부터[28] σ^{32} regulon에 의해 암호화 되는 단백질이 세균의 고온 성장에 필수적 임을 알게 되었다. 세균이 steady-state 성장하는 동안 σ^{32}의 양은 세포 한 개당 10-30개 정도로 매우 적다. 이것은 σ^{32}의 half-life가 약 1분 정도밖에 되지 않는 매우 불안정한 분자인 동시에 σ^{32}의 합성이 번역 수준에서 억제를 받기 때문인 것으로 알려져 있다[16, 22-23]. 그러나 대장균이 30°C에서 42°C로 열충격을 받은 직후 대장균의 세포 내에서는 약 5분 이내에 σ^{32}의 양이 10배 이상 증가 한다[11, 21]. 이 때 σ^{32}의 증가는 번역 과 단백질의 안정성의 증가 때문인 것으로 밝혀졌다[16, 21]. 그러나, σ^{32} 의 전사적 수준에서의 조절 또한 중요하다. 이것은 다양한 steady-state 조건하에서의 σ^{32}의 basal level을 결정할 뿐 아니라, 세포가 극한 조건에 놓였을 때 *rpoH* mRNA의 critical level을 유지하는데 중요하기 때문이다[3, 8, 10, 26]. 그리고 온도를 낮추는 충격을 주는 경우에 열충격 유전자의 전사가 빠르게 감소하는 이유는 σ^{32}의 수준 감소보다는 σ^{32}의 활성 감소 결과가 주원인인 것으로 밝혀졌다[22]. 따라서 열충격 유전자의 전사 조절은 σ^{32}의 합성, 분해 및 활성이라는 세 가지 수준에서 이루어진다고 할 수 있다.

대장균의 *rpoH* mRNA에서, 번역 시작 부위로부터 +6 ~ +20 위치에 16S rRNA의 염기서열과 상보적인 염기서열을 갖는 15개 염기부위를 "downstream box"라 하며[20], 이 downstream box는 translational enhancer로 작용하는 positive element이다[16, 27].

σ^{32}를 암호화하는 *rpoH* 유전자는 현재까지 그람 음성세균

*Corresponding author
Tel: 82-2-2123-2658, Fax: 82-2-312-5657
Email: young547@yonsei.ac.kr

에서만 클로닝 되었으며, 현재까지 β-proteobacteria에 속하는 세균에서는 *Burkholderia, Ralstonia, Neisseria*등에서만 *rpoH* 유전자가 확인되었다.

본 실험 균주인 *Methylovorus* sp. strain SS1은 β-proteobacteria에 속하는 메탄올자화세균으로 이들 균주는 일탄소화합물을 이용해 성장하면서 산업적으로 유용한 다탄소화합물을 만들 수 있는 능력 때문에 산업적으로 많은 주목을 받아 왔다[14]. 우리는 이 전에 *Methylovorus* sp. strain SS1에서 대표적인 열충격 유전자인 *dnaK*와 *groE* 오페론 유전자를 클로닝 하여 이들의 프로모터 부분을 살펴본 결과 이 세균의 프로모터 영역이 대장균의 σ^{32}가 결합할 수 있는 부위와 많은 상동성을 지니고 있음을 알게 되었고[5, 6], 이 세균에서도 역시 σ^{32} homolog에 의한 열충격 반응의 조절가능성을 생각하게 되었다. 본 논문에서는 σ^{32}를 암호화하는 *rpoH* 유전자를 클로닝 하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험균주, 플라스미드 및 배양조건

E. coli DH5α는 genomic library 구축을 위한 host로 사용하였다. RpoH가 결여된 *E. coli* strain A7448(KY1612Δ *rpoH*[λPFλ3-P*groE*-LacZ]Km^r)[1]은 Israel Hebrew 대학의 A. Oppenheim 박사로부터 분양 받았으며, *rpoH* 유전자를 찾기 위한 균주로 사용하였다. 대장균은 Luria-Bertani 배지를 이용하여 37°C에서 배양하였고 필요에 따라 적절한 항생제를 첨가하였다. Genomic library 제조를 위한 플라스미드로 pBluescript II KS+(Stratagene, USA)를 사용하였다.

효소 및 시약

제한효소와 T4 DNA ligase는 GIBCO BRL(Gaithersburg, MD)에서 구입하였다. 제한효소의 사용, DNA ligation 및 기타 DNA 재조합 방법은 Sambrook 등[18]과 시료 제공자의 지시에 따라 수행하였다. 그 외의 시약들은 Sigma 제품 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 사용하였다.

Chromosomal DNA 추출

Chromosomal DNA의 분리는 Goldberg와 Ohman[9]의 방법을 변형하여 수행하였다. 50 mL의 기본염류배지에 0.5% (vol/vol) methanol이 첨가된 액체배지에서 *Methylovorus* sp. strain SS1 균주를 지수성장기까지 배양하여 균체를 모은 뒤 (6,000×*g*, 15분, 4°C), 균체는 0.9%(wt/vol) 식염수로 두 번 씻고 10 mL의 ET buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA)에 현탁하였다. 여기에 1 mL의 lysozyme 용액(10 mg/mL 농도로 ET buffer에 녹임)을 첨가하여 37°C에서 15분간 방치한 다음 1.2 mL의 lysing solution(10% SDS와 5 mg의 pronase를 1 mL의 ET buffer에 녹임)을 첨가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 반응액에 동일 양의 phenol: chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1, vol/vol) 용액을 첨가하고 원심분리하여(15,000×*g*, 5분, 4°C), 상등액을 취하고, 동일과정을 3회 반복 하였다. 이렇게 얻은 상등액에 상등액의 세 배 부피로 차가운 ethanol을 더하여 엉기는 chromosomal DNA를 유리막대를 이용하여 건져낸 후, 70% ethanol로 세척한 다음 2 mL의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 실험에 사용하였다.

Genomic library 제조

Methylovorus sp. strain SS1의 genomic DNA를 제한효소 *Sal*I으로 완전 소화하여, agarose 전기영동을 실시하여 약 3~15 kb 크기의 DNA 절편을 분리하여 미리 동일한 효소로 잘라 놓은 pBluescript II KS+에 ligation시켜 genomic library를 구축하였다.

형질전환

형질전환은 electroporation[4] 또는 $CaCl_2$ 방법[12]을 병행하여 실시하였다. Electroporation은 Bio-Rad사의 Gene Pulser^{TM}와 Pulse Controller를 사용하였다.

Complementation을 이용한 *rpoH* 유전자의 클로닝

Methylovorus sp. strain SS1 phagemid library를 대장균 strain A7448에 도입시킨 뒤 X-gal과 IPTG를 넣어준 LB-plate상에 도말하고 30°C에서 배양하였다. 이렇게 해서 선별한 콜로니로부터 플라스미드를 추출하고, 이를 다시 *E. coli* DH5α로 옮긴 다음 플라스미드를 추출하여 앞의 과정을 한 번 더 반복하여 확인 과정을 거친 뒤 염기서열을 결정하였다.

DNA 염기서열결정 및 분석

DNA sequencing은 자동염기서열분석기인 377 automated DNA sequencer(Perkin-Elmer, Norwalk, CT)를 이용하였다. 염기서열분석은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Logical Alignment Search Tool (BLAST)을 통해 수행하였다.

Immunoblot analysis

RpoH의 발현정도를 알아 보기 위하여 열충격 전후의 *Methylovorus* sp. strain SS1의 세포 추출액을 만들어 denaturing 조건하에서[13], 12.5% polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 nylon membrane (Schleicher and Schuell)으로 transfer하였다. Immunoblot을 위한 σ^{32}의 항체는 *Xanthomonas campestris*의 σ^{32}에 대해 만든 토끼의 혈청 내에 존재하는 polyclonal antibody(대만 National Chung Hsing University의 Ming-Te Yang 박사로부터 분양 받음)를 사용하였으며, detection을 위한 2차 항체는 anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase(Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

rpoH 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

대장균 strain A7448은 kanamycin 내성 유전자가 *rpoH* 유전자에 insertion되어 있어서 기능적인 σ^{32}가 합성되지 못하기 때문에 23°C 이상의 온도에서는 성장할 수 없는 특성을 보이며[1], *groE* 프로모터에 *lacZ* reporter 유전자가 fusion된 형태를 (P*groE-lacZ*) 염색체 상에 지니고 있다. 그런데 *groE* 프로모터는 σ^{32}가 있어야만 작동하므로 외부에서 넣어준 유전자 산물이 *in trans*로 작용하여 σ^{32}의 기능을 회복시키는 경우에는 23°C 온도 이상에서의 *E. coli* strain A7448의 성장을 가능케 함은 물론, β-galactosidase가 합성되어 X-gal과 IPTG를 넣어준 plate상에서 파란색 콜로니를 형성하게 된다. pBluescript II KS+에 구축한 *Methylovorus* sp. strain SS1의 library를 가지고 competent *E. coli* strain A7448을 형질전환 시켜 X-gal과 IPTG가 함유된 배지에서 30°C 조건에서 배양하였을 때 10개의 파란색을 띄는 콜로니를 선별하였다. 이들 colony로부터 각각의 DNA를 추출하여 전기영동을 실시하였을 때 모든 콜로니에서 약 5.3 kb 크기의 *Methylovorus* sp. strain SS1 genomic DNA가 들어가 있음을 확인하였다. 이 가운데 하나의 클론을 선택하여 pSS32로 명명하고(Fig. 1), 양쪽 방향에서 염기서열을 읽기

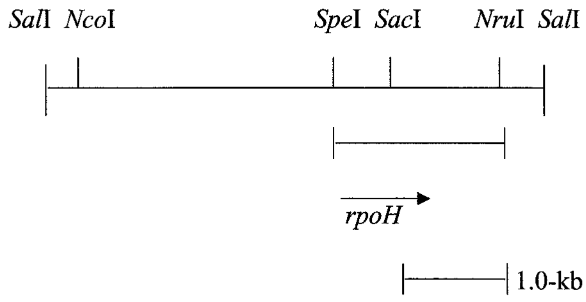

Fig. 1. Restriction map of pSS32.

```
SpeI
   1 ACTAGTTTTATAAGAGCCTTATTAATCAACGGCCGATATTCCCACCACCAGCTTCTTTACCTCGTGTATCGCAGCGTGCGTTCTCCAAAAACAATCCATA
                                                                           RBS           db box
 101 TAAATAAGGAAACTTTTCACTACTAGCACTCTCAAAGAGGGAGTGCTAAAATCAATTTCATGAGTGAGATGAATCCTATGACAAATGCCCTGACGATTCC
   1           -35(σE)             -10(σE)                                                M  T  N  A  L  T  I  P
 201 GTCTGTGTCTTCACTGGACAGCCTGGATCAGTACCTGCGTACGATCAAGGCGTTTCCGGTATTGAGCGTTGAGGAAGAGTACGATCTGGCAACGCGCTTG
   9 S  V  S  S  L  D  S  L  D  Q  Y  L  R  T  I  K  A  F  P  V  L  S  V  E  E  E  Y  D  L  A  T  R  L
 301 CGCAAAGGCACCGACATTGAGGCAGCCAAAGGCCTCATCGTCTCGCACTTGCGCCTGGTCGCCAGCATCGCCCGCGGCTACTCCGGTTATGGCCTGCCCC
  42 R  K  G  T  D  I  E  A  A  K  G  L  I  V  S  H  L  R  L  V  A  S  I  A  R  G  Y  S  G  Y  G  L  P  Q
 401 AAGCTGATTTGATTCAGGAAGGCAACGTCGGCCTGATGAAGGCTGTGCGTCGCTTCGATCCTGACCGCGGTGTGCGCCTGGTATCGTTTGCCATGCATTG
  76  A  D  L  I  Q  E  G  N  V  G  L  M  K  A  V  R  R  F  D  P  D  R  G  V  R  L  V  S  F  A  M  H  W
 501 GATCAAGGCTGAGATCCACGAATACATTGTGCGCAACTGGCGTCTGGTGAAAGTGGCGACCACCAAGGCGCAACGCAAACTATTCTTCAACCTGCGTAGC
 109 I  K  A  E  I  H  E  Y  I  V  R  N  W  R  L  V  K  V  A  T  T  K  A  Q  R  K  L  F  F  N  L  R  S
 601 ATGAAAAAGAATAGTCACACGCTAAGCCCTGCCGAAGTGGCGGATATTGCCCGTGAGCTCAGGGTCAAGCCAGAAGAAGTCGTGGAGATGGAATCCCGCA
 142 M  K  K  N  S  H  T  L  S  P  A  E  V  A  D  I  A  R  E  L  R  V  K  P  E  E  V  V  E  M  E  S  R  M
 701 TGGGCGGCCACGAGATTTCGCTGGAAGGTAATAGCGATGACGATACTGAAGACAACTTCAGTCCGATTGCCTACCTGGAAGATCAGCAACCTGAGCCTTC
 176  G  G  H  E  I  S  L  E  G  N  S  D  D  D  T  E  D  N  F  S  P  I  A  Y  L  E  D  Q  Q  P  E  P  S
 801 TGAACTACTGGCCGAACGCGAGGCGGAGCATAATCAGACCGTAGGTCTGGCGCATGCCTTGGAAAGCCTGGATGAGCGCAGCCGTCGTATTGTGCAGGCG
 209 E  L  L  A  E  R  E  A  E  H  N  Q  T  V  G  L  A  H  A  L  E  S  L  D  E  R  S  R  R  I  V  Q  A
 901 CGCTGGTTGCAGGAAAACAATAGCGCCACCCTGCATGATCTTGCCGCGGAGTTTGGCGTATCGGCAGAACGTATCCGCCAGATCGAGCAGAAAGCCATGC
 242 R  W  L  Q  E  N  N  S  A  T  L  H  D  L  A  A  E  F  G  V  S  A  E  R  I  R  Q  I  E  Q  K  A  M  Q
1001 AAAAAATGAAGGGCATGCTGAGCGCAGCTTAAAAACTAGCTTGACGCATCCCCATTAAAAAACCCGGCCGAGTGCCGGGTTTTTAATGGTCAGGACAAA
 276  K  M  K  G  M  L  S  A  A  *
1101 TAGTCGCATTCCCGACACCCCGCTCTCACGATGCACCGGGCAATAAAAAAGCTGCCTCAAGGCAGCTTTTTGTATGCAGACATTCAGCGCAGTCTTAGC
1201 CGAAAATCATCACTGACAATGCGCTCATCCAGGACCAGGTAATGAGCAAGACCACAATGGTCAGCGGCAGATTGGCAAAAGTGAACCAGGACTTGTAATC
1301 CTTCATTTCAAAAACCTCACACGTTGTAATGTTATTCGTCGATTTTAGTATTTTTAGGCGCTTGCTTCAAGCGATTAAATGGAATCATAGGATCATCATC
1401 GTCCATGAGGATACGCTGAGCAGGCCCTTCCATGTCATCGTATTGACCGCTTTTGATCGCCCATAGGATGCCAAACGCGGCAATCACGATAAATACCACG
1501 GTCATTCCCAGCAGGAAAAGAAGTGTCGTGACGTTCATGCGGCTTGCGTCAGAGGAGCATCCGTTCGGAGGCGAGCGCAGCATACATCCTGTTGCCGCAG
1601 GTTTTCCAGATCGGCCAATTGCTTGCGAATACCGCTTTCAATACTTTCCAGTTCGCCAATGCGGTCTTCCAGGGTATCGGTCGCCTTGTAAATGCGCTTA
1701 ATGCTTTCAAGCCGGCGTTTGAGCTGCAACTGGTGCTCGCGGACTTGCGATTCCATGGGCGCAATCACTGCCTTCAGCCAATTCTCCACATCGCGA
                                                                                                NruI
```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the 1,796 bp *Spe*I-*Nru*I fragment containing *rpoH* gene. The deduced amino acids are represented by one-letter codes. The -10 and -35 sequences for the potential σ^E-type promoter are underlined. A potential ribosome-binding site (RBS) and the putative downstream box (db box) are boxed. The conserved nine-amino acid RpoH box is boldfaced. The inverted repeat sequences behind the termination codon are indicated by horizontal arrows.

시작하여 이로부터 대장균의 *rpoH* 유전자 염기서열과 상동성이 높은 부위인 1,793 bp *Spe*I-*Nru*I DNA 절편에 대한 염기서열을 결정하였다(Fig. 2). 염기서열 분석 결과 178번째 nucleotide AUG로 시작하여 1,032번째 UAA로 끝나는 총 855개로 구성된 1개의 open reading frame이 존재하였다. 이 ORF는 284개의 아미노산을 암호화하며, 예상된 분

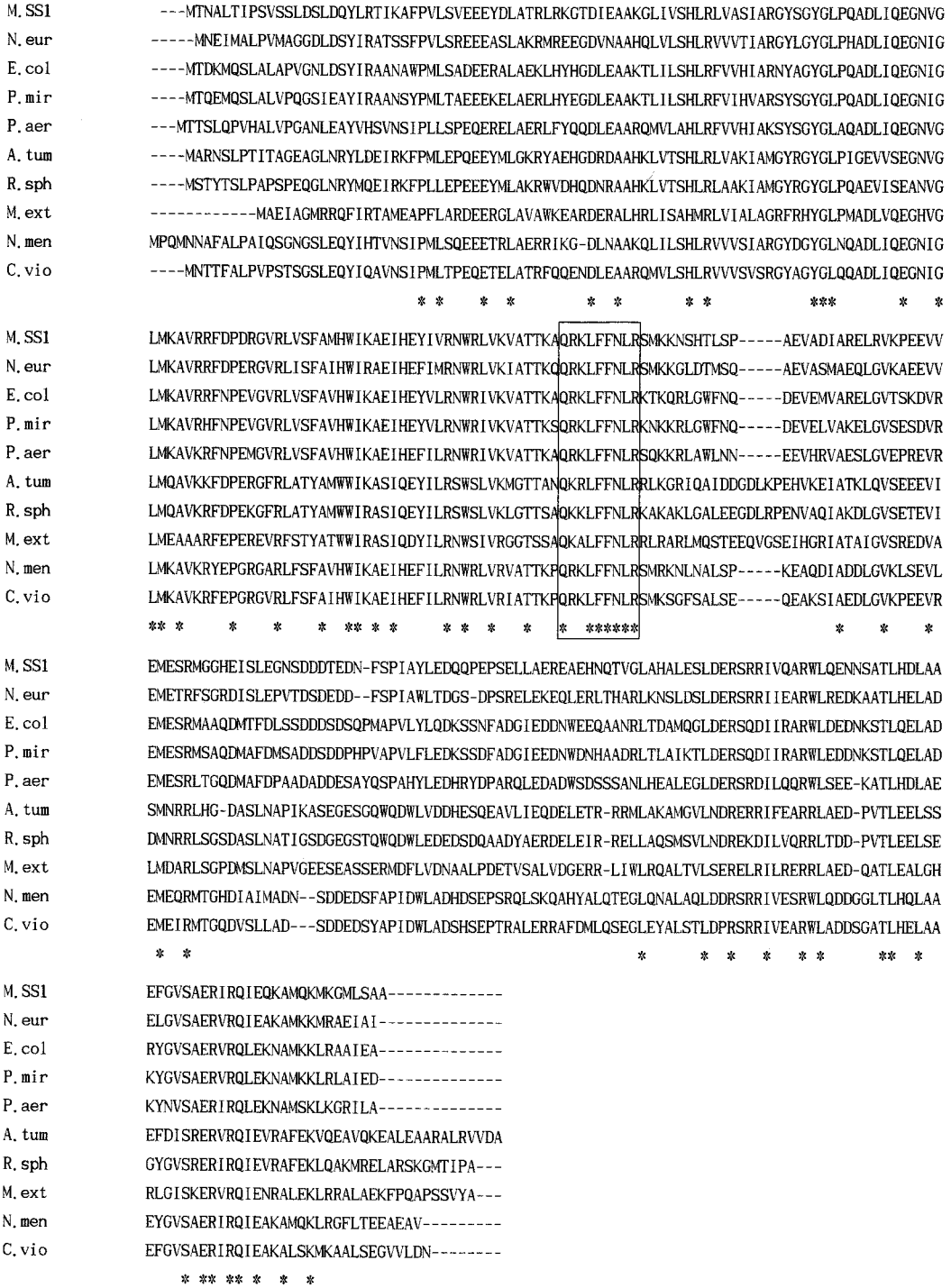

Fig. 3. Alignment of different RpoH-homologous proteins. Amino acids are given in the single letter code. Gaps, indicated by dot, are introduced in order to obtain a maximum fit. Identical amino acids are indicated by asterisks. The RpoH box is boxed. The accession numbers are as follows: *Methylovorus* sp. strain SS1 (NCBI, AAD55771); *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 (NCBI, CAD84495); *Escherichia coli* (NCBI, AAZ80075); *Proteus mirabilis* (NCBI, BAA09441); *Pseudomonas aeruginosa* (NCBI, AAB33935); *Agrobacterium tumefaciens* (NCBI, BAA09439); *Rhodobacter sphaeroides* (NCBI, AAC46050); *Methylobacterium extorquens* PA1 (NCBI, ZP_02021556); *Neisseria meningitidis* FAM18 (NCBI, YP_974754); *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 (NCBI, NP_903876).

자량은 32,006 dalton, pI값은 5.79로 계산되었다. 다른 세균과의 homology를 비교하여(Fig. 3) *rpoH* 유전자로 명명하였다.

한 생명체가 암호화하는 염기서열 중의 G+C composition은 그 생명체가 만들어내는 아미노산 조성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 위 ORF의 G+C content를 조사해 본 결과 55.7%로 나타났으며, 이러한 빈도는 *Methylovorus* sp. strain SS1의 전체 G+C molar ratio 55%와 비교하면 근사한 비율임을 알 수 있다.

ORF 앞에는 putative한 ribosome 결합부위(RBS)가 존재하였고 (GATGAA), RBS upstream에는 σ^E 형태의 프로모터와 유사한 -35(5'-GAAACT-3') 및 -10 (5'-TCAAA-3') 염기서열이 한 개 존재하였으나, σ^{70} 형태의 프로모터와 유사한 염기서열은 찾을 수 없었다.

rpoH 구조유전자의 번역 종결코돈으로부터 20 nucleotide downstream쪽으로 inverted repeat 구조가 발견되었으며 이 구조가 만드는 stem-loop 2차 구조의 자유에너지는 -156.5 kJ/mol로 비교적 높은 수치를 나타내었다. 이러한 사실은 *rpoH* 유전자 다음에서 rho-independent한 전사 종결이 일어남을 말해 준다.

세균의 σ^{32} 단백질에는 다른 sigma factor에서는 전혀 발견되지 않은 9개의 아미노산으로 이루어진 "RpoH box"가 존재한다[24]. RpoH box는 DnaK/DnaJ가 중재된 열충격 반응의 negative regulation에 관여하는 부위로 *Methylovorus* sp. strain SS1의 경우에도 132-140번째의 9개의 아미노산 (QRKLFFNLR)이 RpoH box를 구성하고 있었다(Fig. 3).

RpoH homolog의 비교 및 생물간 근연관계

Proteobacteria의 RpoH 아미노산 서열을 *Methylovorus* sp. strain SS1이 암호화하는 RpoH 아미노산 서열과 비교하였다. 실험균주의 RpoH는 동일 계열의 β-proteobacteria에 속하는 *Nitrosomonas europaea*, *Neisseria meningitidis*, 및 *Chromobacterium violaceum*과 각각 59.6%, 58.8% 및 57.7%의 identity를 나타냈다. 그리고 α-proteobacteria에 속하는 *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Methylobacterium extorquens PA1*과는 39.1%, 41.5% 및 33.4%의 identity를 보여주었다. 한편 γ-proteobacteria에 속하는 *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* 및 *Proteus mirabilis*와는 51.7%, 51.4% 및 49.3%의 identity를 보여주었다.

반면, RpoH의 아미노산 서열을 기준으로 계통도를 그려보면 오히려 γ-proteobacteria보다는 α-proteobacteria와 가까운 phylogenetic distance를 보여 주었다(Fig. 4).

Immunoblot analysis

대장균이나 몇 몇 다른 세균에서 열충격 동안에 σ^{32}의 일시적 증가가 보고되었다[3, 26]. 따라서 본 실험 균주의 경우에서도 열충격 동안의 σ^{32} 수준을 immunoblot을 통해 조사하였다. 30°C의 열충격 전 조건에서는 거의 확인할 수 없었던 σ^{32} 수준은 열충격 5분 후부터 확인 되었으며 약 15분간 지속되다가 떨어지는 양상을 나타내었다(Fig. 5). 이러한 양상은 다른 세균에서 보고된 바와 마찬가지로 열충격 후에 σ^{32}의 일시적 증가가 수반되었음을 보여주는 결과이다.

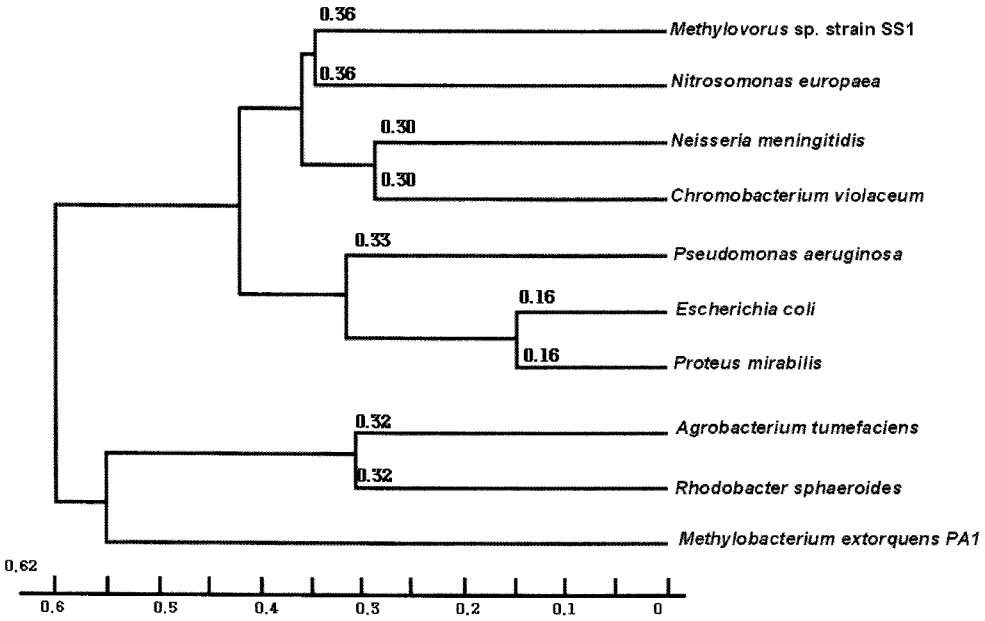

Fig. 4. Dendrogram showing the relationship of *Methylovorus* sp. strain SS1 RpoH sequences to RpoH homologs from other organisms. The dendrogram shown here was constructed employing the DNASTAR program using the entire sequence lengths and default parameters for similarity computation and sequence alignments.

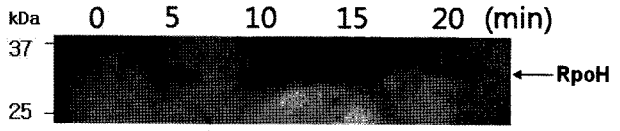

Fig. 5. Expression of the *Methylovorus* sp. strain SS1 *rpoH* gene product during heat shock treatments. Western blot analysis with anti-RpoH antibody against the purified *Xanthomonas campestris* σ^{32} protein was carried out. Cells were harvested before (0 min) or at 5, 10, 15, and 20 min after heat shock (42°C).

요 약

열충격 시그마인자를 코딩하는 유전자 *rpoH* 가 결여된 돌연변이체 대장균(*Escherichia coli* strain A7448)을, 메탄올자화세균인 *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726의 phagemid library로 형질전환 시켜서 30°C에서 성장하는 *Escherichia coli* strain A7448 로부터 *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726의 *rpoH* 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 분석하였다. 1,793-bp 염기서열 분석 결과 *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726의 RpoH는 284개의 아미노산으로 이루어져 있었으며 예상된 분자량은 32,006, pI값은 5.79로 나타났으며, 동일계열의 β-proteobacteria에 속하는 세균들의 RpoH와 높은 상동성을 보여주었다. *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726의 RpoH는 대장균의 RpoH의 기능을 대신할 수 있음을 보여주었다. 열충격 후 RpoH 양은 15분까지 지속적으로 증가하다 20분 뒤 양이 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM11726의 RpoH 단백질 역시 열에 의해 유도됨을 말해 준다.

감사의 글

본 연구를 위해 2007년 한국기초과학지원연구원의 연구비 (N27077) 중 일부가 지원되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Benvenisti, L., S. Koby, A. Rutman, H. Giladi, T. Yura, and A. B. Oppenheim. 1995. Cloning and primary sequence of the *rpoH* gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **155**: 73-76.
2. Bibb, M. J., P. R. Findlay, and M. W. Johnson. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene* **30**: 157-166.
3. Bukau, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* **9**: 671-680.
4. Dower, W. J., J. F. Miller, and C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
5. Eom, C. Y., S. T. Park, E. Kim, Y. T. Ro, S. W. Kim and Y. M. Kim. 2002. Cloning, molecular characterization, and transcriptional analysis of *dnaK* operon in a methylotrophic bacterium *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM 11726. *Mol. Cells.* **14**: 245-254.
6. Eom, C. Y., E. Kim, Y. T. Ro, S. W. Kim, and Y. M. Kim. 2005. Cloning and molecular characterization of *groESL* heat-shock operon in a methylotrophic bacterium *Methylovorus* sp. strain SS1 DSM 11726. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**: 695-702.
7. Gamer, J., G. Multhaup, T. Tomoyasu, J. S. McCarty, S. Rudiger, H. J. Schonfeld, C. Schirra, H. Bujard, and B. Bukau. 1996. A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32}. *EMBO J.* **15**: 607-617.
8. Georgopoulos, C., K. Liberek, M. Zylicz, and D. Ang. 1994. Properties of heat shock proteins of *Escherichia coli.* and the autoregulation of the heat shock response. *In*: Morimoto, R. I., A. Tissires and C. Georgopoulos (eds): The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 209-249.
9. Goldberg, J. B., and D. E. Ohman. 1984. Cloning and expression in *Pseudomonas aeruginosa* of a gene involved in the production of alginate. *J. Bacteriol.* **158**: 1115-1121.
10. Gross, C. A., D. B. Straus, J. W. Erickson, and T. Yura. 1990. The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli. In:* Morimoto, R. I, A. Tissires and C. Georgopoulos (eds): Stress proteins in biology and medicine, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 167-189.
11. Grossman, A. D., D. B. Strauss, W. A. Walter, and C. A. Gross. 1987. σ^{32} synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli. Genes Dev.* **1**: 179-184.
12. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
14. Lidstrom, M. E. and Stirling, D, I. 1990. Methylotrophs: genetics and commercial applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 27-58
15. Morimoto, R. I., A. Tissires, and C. Georgopoulos. 1994. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Cold Spring Harbor. pp 610.
16. Nagai, H., H. Yuzawa, and T. Yura. 1991. Interplay of two *cis*-acting mRNA regions in translational control of σ^{32} synthesis during the heat shock response of *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10515-10519.
17. Nagai, H., H. Yuzawa, M. Kanemori, and T. Yura. 1994. A distinct segment of the σ^{32} polypeptide is involved in DnaK-mediated negative control of the heat shock response in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10280-

10284.
18. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring harbour. NY.
19. Schumann, W. 1996. Regulation of the heat shock response in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biosci.* **21**: 133-148.
20. Sprengart, M. L., H. P. Fatscher, and E. Fuchs. 1990. The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1719-1723.
21. Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. 1987. The heat shock response of *E. coli* is regulated by changes in the concentration of σ^{32}. *Nature* **329**: 348-351.
22. Straus, D. B., W. A. Walter, and C. A. Gross. 1989. The activity of σ^{32} is reduced under conditions of excess heat shock protein production in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**: 2003-2010.
23. Tilly, K., J. Spence, and C. Georgopoulos. 1989. Modulation of stability of the *Escherichia coli* heat shock regulatory factor σ^{32}. *J. Bacteriol.* **171**: 1585-1589.
24. Wsten, M. M. 1998. Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127-150.
25. Yamamori, T., and T. Yura. 1982. Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 860-864.
26. Yura, T., H. Nagai, and H. Mori. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 321-350.
27. Yuzawa, H., H. Nagai, H. Mori, and T. Yura. 1993. Heat induction of sigma 32 synthesis mediated by mRNA secondary structure: a primary step of the heat shock response in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5449-5455.
28. Zhou, Y. -N., N. Kusukawa, J. W. Erickson, C. A. Gross, and T. Yura. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32}. *J. Bacteriol.* **170**: 3640-3649.

(Received Aug. 3, 2007/Accepted Sep. 7, 2007)