

*Salmonella typhimurium*에서 *Mu dJ(Km lac)* Operon Fusion을 이용한 산소, 무산소 유도 유전자에 관한 연구

김종선* · 우영대* · 박종희* · 김영권* · 이인수* · 박용근**

* 한남대학교 이공대학 생물학과

** 고려대학교 이과대학 생물학과

A Study of Aerobic and Anaerobic Inducible Genes Using *Mu dJ(Km lac)* Operon Fusion in *Salmonella typhimurium*

Kim Jong-Sun*, Young-Dae Woo*, Jong-Hee Park*,
Young-Kwon Kim* In-Soo Lee* and Yong-Keun Park**

* Department of Biology, Hannam University, Daejeon, Korea

** Department of Biology, Korea University, Seoul, Korea

ABSTRACT: Using *Mu dJ(Km lac)* operon fusion, several oxygen-regulated genetic loci were identified in *Salmonella typhimurium*. Nine aerobically inducible(*oxi*) and thirteen anaerobically inducible(*ani*) operon fusions were newly identified. Based on the control by *oxrA* regulatory locus, the *ani-lacZ* fusions were grouped into two classes: class I loci were regulated by *oxrA* regulatory locus; class II genes were not affected by this locus. Some of the *ani-lacZ* fusions had required growth in CAA and LB before they exhibited the inducible phenotype. Most of all *ani-lacZ* fusions were repressed by nitrate and fumarate. Three of the *ani* loci were mapped into 59 ± 0.14 map unit(YK114), 64 ± 0.2 map unit(YK120), and 93 ± 0.29 map unit(YK112) by testing the cotransduction frequency, respectively.

KEY WORDS □ Operonfusion, oxygen-regulated genetic loci, map unit. *Salmonella typhimurium*.

세균은 일반적으로 heat shock, 자외선 조사, 영양분, 결핍, pH의 변화, 그리고 산소가 있는 조건에서 산소가 없는 조건으로의 이동과 같은 외부 환경요인의 변화에 적응하여 살아갈 수 있는데, 이들 외부환경의 stress에 대한 세균의 유전, 생리적 변화는 최근에 *E. Coli*를 중심으로 연구가 시작되었다(Smith et al., 1983). 환경적 자극에 영향을 받는 일련의 유전자군을 regulon(공통의 조절인자를 가지며 유전자 지도상 다른 위치에 존재하는 operon들)과 stimulon(하나의 환경적 자극요인에 따라 발현되는 한 set의 operon 혹은 regulon들)이란 용어를 도입하여 그 조절관계를 설명하였고 Gottesman (1984)은 환경적 자극에 대해 하나의 세포가 가지는 여러종류의 specific system들을 그 조절관계와 함께 개략적으로 언급하였다.

또한 Taylor(1963)가 transposable genetic element로서 작용하는 파아지 Mu를 보고한 이래 Casadaban과 Cohen(1979)은 촉진자가 없는 젓당 구조유

전자를 Mu에 통합시킨 특이화된 형질도입 파아지를 만들어 한 유전자의 전사 및 조절관계에 대한 기능적인 돌연변이 연구를 가능케 하였고, 이를 이용하여 현재까지 *E. Coli*에 DNA 손상 stimulon 등 global regulatory network과 관련된 다수의 stimulon에 관한 연구가 보고되었다(Neidhardt et al., 1984; Smith & Neidhardt, 1983; Wanner & McSharry, 1982; Slonczewski et al., 1987; etc).

*Salmonella*는 *E. Coli*와 마찬가지로 같은 장내세균에 속하며, 무산소 상태에서 병독성 물질을 생산하므로 이 균주의 산소가 있는 상태에서 산소가 없는 상태로의 이동시 일어나는 변화에 대해서 더 많은 이해를 필요로 하게 되었다.

최근 *Salmonella*에서 Ames등(1985)과 Foster등(1986)에 의해 산소 및 무산소 유도 유전자들이 보고되었고, 이들의 2-D gel을 통한 실험결과에서와 같이 산소 및 무산소 유도 단백질이 50가지가 넘는 것으로 보아 아직 많은 수의 산소조절 유전자들이

완전히 밝혀지지 않은 상태이다.

본 연구에서는 유전적으로 안정된 Mini-Mu 인 Mu dJ(Beatriz et al., 1984)를 사용하여 새로운 산소조절 유전자를 분리 검증하였고, 검증된 균주들은 이미 Tn10 삽입부위가 밝혀진 몇몇 균주들(Foster 제공)과의 상호형질도입 빈도에 따라 연관지도를 작성했으며, 외부 pH의 변화에 따른 유도비 및 이미 확인된 조절부위(Strauch et al., 1985)와의 관계도 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 파아지 전이

본 실험에서 사용한 균주는 Table 1과 같다.

파아지 p22HT 105/l-int를 이용한 형질도입과 Mu 파아지 전이를 위해서는 Holly(1982)의 방법을 따랐다.

배지 및 반응 시약

세균의 배양배지로는 Luria 배지와 50E Salt

Table 1. Strains used isolated in this study.

Strain(source strain)	Genotype	Source
JF1101	<i>aniF1068</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	J. W. Foster
JF1102	<i>aniF1069</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF1103	<i>aniF1070</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF1104	<i>aniF1071</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF1105	<i>aniF1072</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF1106	<i>aniF1073</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF1107	<i>aniE(phas)</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF556	<i>ani-2</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF895	<i>aniD1047</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF900	<i>aniC1052</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF926	<i>aniB1054</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
JF927	<i>aniA1055</i> :: Mu dl-8 <i>supD10</i>	"
SF261	<i>hisD9953</i> :: Mu dJ	"
	<i>his-9941</i> :: Mu dl	Roth via Maloy
YK112	<i>ani2004</i> :: Mu dJ	Our Lab.
YK130	<i>ani2009</i> :: Mu dJ	"
YK114	<i>ani2007</i> :: Mu dJ	"
YK119	<i>ani2010</i> :: Mu dJ	"
YK109	<i>ani2001</i> :: Mu dJ	"
YK204	<i>oxi3004</i> :: Mu dJ	"
YK011	<i>oxi3004</i> :: Mu dJ	"
YK219	<i>oxi3019</i> :: Mu dJ	"
YK215	<i>oxi3015</i> :: Mu dJ	"
YK218	<i>oxi3018</i> :: Mj dJ	"
YK221	<i>oxi3021</i> :: Mu dJ	"
LT-2	Wild type	"
YK124	<i>ani2002</i> :: Mu dJ	J. W. Foster
YK125	<i>ani2003</i> :: Mu dJ	Our Lab.
YK126	<i>ani2005</i> :: Mu dJ	"
YK127	<i>ani2006</i> :: Mu dJ	"
YK128	<i>ani2008</i> :: Mu dJ	Our Lab.
YK120	<i>ani2011</i> :: Mu dJ	"
YK131	<i>ani2012</i> :: Mu dJ	"
YK132	<i>ani2013</i> :: Mu dJ	"
SF36	<i>recAlrpsLsr1-202</i> :: Tn10	J. W. Foster
SF143	<i>putA810</i> :: Tn10	"
SF201	<i>zec-2</i> :: Tn10	"
SF202	<i>proAB47put9639proP678 zid-27</i> :: Tn10	"
SF240	<i>metC870</i> :: Tn10	"
SF165	<i>leu-485pepT7</i> :: Mu dl	"
	<i>oxrAlzda-888</i> :: Tn10	"

Glucose 배지를 사용하였고 파아지 감수성 식별 배지로는 Green Indicator Agar 배지를, 그리고 젓당 분해효소의 발현을 보기위한 배지로는 MacConkey 배지를 사용하였다.

형질도입 확인배지는 Luria 배지에 Mu dJ의 경우 Kanamycin, Mud1 혹은 Mud1-8의 경우 Ampicillin, 그리고 Tn10의 경우 Tetracycline이 첨가된 배지를 각기 사용하였으며 Ampicillin, Kanamycin은 각각 20 μ g/ml를 Tetracycline은 LB에서 20 μ g/ml, 최소배지에서는 10 μ g/ml를 각각 사용하였다.

배양 조건

Mud1 균주나 Mud1-8 균주는 공히 30 $^{\circ}$ C에서 배양하였고 Mu dJ 균주는 35 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 또한 배양시 무산소 조건은 Gas Pak Anaerobic Jar (BBL Microbiology System, Cockeysville, Md.)를 이용하거나 또는 파라핀 오일을 중층하였다.

생장량 측정

4ml의 Minimal Salt Glucose (MSG배지) 혹은 Luria 배지에 세균을 접종하고 30 $^{\circ}$ C 또는 35 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 전배양하여 세포배양액의 농도를 O.D.600nm=0.6 혹은 1.3으로 조정한다 다음 이 배양액을 4ml의 동일 배지에 1/100 단위로 접종하고 시간별로 성장량을 측정하였다.

생장량은 Spectrophotometer (BAUSCH & LOMB)로 600nm 파장에서 Optical Density를 측정하였다.

Operon fusion을 이용한 산소 유도유전자의 분리

Salmonella 고빈도 형질도입 파아지 P22 lysate (Foster 제공)와 Mu dJ(Km lac) donor lysogen(SF 261) 전 배양액을 4ml Broth에 각각 40 μ l 씩 접종하여 O.D.600nm=0.6이 되도록 배양한 후 Schmieger (1972)의 방법에 따라 파아지 lysate를 만들고 이것을 정지기에 이른 야생형 LT-2 수용세포 배양액과 함께 Kanamycin이 첨가된 선택배지(LB)에 각각 50 μ l씩 넣어 도말후 35 $^{\circ}$ C에서 하룻밤동안 배양기에서 배양하였다.

형성된 Km colony들은 MacConkey Agar 배지(Km25r)에 각기 duplicate scoring하여 이들 배지를 각기 산소가 있는 조건과 없는 조건으로 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다.

각기 다른 조건에서 형성된 MacConkey 배지상의 colony들 중 산소가 없는 조건에서 보다 많은 β -galactosidase를 발현하는 것(무산소 조건의 colony; 적색, 산소가 있는 조건의 colony; 흰색)을 선별하여 anaerobically inducible(ani) 유전자로 표시했고, 반면에 산소가 있는 조건하에서 보다 많은 β -galactosidase를 발현하는 것(무산소 조건의 colony

; 흰색, 산소가 있는 조건의 colony; 적색)은 oxygen inducible (oxi) 유전자로 표시하였다. 또한 선별된 균주들은 p22 돌연변이 파아지 H5(Foster 제공)를 이용하여 Green Indicator Agar 배지상에서 파아지 감수성(용균성)을 나타내는 균주만을 분리해냈고, 기존의 밝혀진 ani 유전자와 각각 상호 형질도입시켜 연관여부를 판정한 후 연관되지 않은 것만을 택하였다.

생장곡선에 따른 β -galactosidase 분석

ani-lac 혹은 oxi-lac 유전자로 판정된 균주의 β -galactosidase 분석은 MSG 배지에 접종 후 배양액이 O.D.600nm=0.2에 이르면 aerobic과 anaerobic 조건으로 옮겼다. aerobic 조건은 진탕배양기에서 진탕배양(200rpm/min)하였으며, anaerobic 조건은 파라핀 오일을 중층한 후 정지배양하여 얻었다.

시간대비에 따른 생장곡선 및 각 생장밀도 마다의 β -galactosidase 활성도는 Miller(1972)의 방법에 따라 측정하였고 또한 선별된 모든 균주는 산소가 없는 조건과 있는 조건에서 생장밀도 O.D.600nm=0.9~0.4에 이른 배양액을 취하여 β -galactosidase 활성도를 측정하였다.

ani gene에 대한 nitrate 및 fumarate 효과

선별된 ani 균주들은 MSG 배지에 전배양하고 배양액을 각기 4ml씩의 MSG배지, 20mM의 nitrate가 함유된 MSG배지, 그리고 동일농도의 fumarate가 들어있는 MSG배지에 O.D.600nm=0.02가 되도록 접종하고 35 $^{\circ}$ C에서 진탕배양한 후 앞서 행한 방법으로 일정생장밀도 (O.D.600nm=0.9~0.4)에서 β -galactosidase 활성도를 측정하였다.

ani gene에 대한 nitrate 및 CAA의 효과

선별한 ani gene 가운데 aerobic, anaerobic 조건하의 MSG배지에서 β -galactosidase 활성도를 보이지 않는 균주들을 MSG 배지에 전배양하여 4ml의 MSG배지, 20mM의 nitrate가 함유된 MSG배지, 1%의 CAA가 함유된 MSG배지, nitrate 및 CAA가 첨가된 MSG배지, LB, 그리고 20mM nitrate가 첨가된 LB에 각각 접종하여 산소가 있는 조건과 없는 조건에서 배양시킨 후 일정 생장밀도(O.D.600nm=1.3~0.4)에서 β -galactosidase 활성도를 측정하였다.

조절부의 돌연변이체가 ani-lacZ 유전자에 미치는 효과

이미 선별한 ani 균주를 LB 및 MSG(Km25r)배지에 하룻밤 전배양한 후 이것을 다시 O.D.600nm=0.6이 되도록 배양하고, 조절부위 돌연변이 균주(SF165)의 파아지 lysate와 각각 동량을 LB(Tc20r+Km25r)에 도말하여 35 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였

다. 형질도입의 결과로 형성된 colony들 중 LB(Ap-25r) agar 배지에서 자라지 못하는 균주를 택해 산소가 있는 조건과 없는 조건에서 β -galactosidase 활성도를 측정하였다.

새로 밝혀진 *ani* 균주와 이미 Tn10 삽입부위가 밝혀진 균주들 간의 상호형질도입 빈도검사와 이를 이용한 연관지도 작성

유전자 지도에 Tn10 위치에 확인된 균주들(Foster 제공)을 고빈도 형질도입 파아지 P22를 이용하여 파아지 lysate를 만들고, 이것을 새로운 *ani* 균주들의 배양액과 함께 선택배지(LB, Tc20r)에 도말하여 형질도입 시킨 뒤 나타난 colony들을 다시 선택배지 (LB, Tc20r+Km25r)에 score하여 상호형질도입 빈도를 구하였다.

외부 pH변화에 따른 유도비의 변화

각단위 pH별로 완충된 L broth(Fisher pH meter 630으로 측정)에 균을 접종하여 동일한 단위 pH에서 전배양 및 본배양을 하였으며 각기 일정한 성장밀도(0.D.600nm=1.3~0.4)에서 β -galactosidase

활성도를 조사하였다.

결 과

산소조절 유전자의 operon fusion

고빈도 형질도입 파아지 P22와 Mu dJ(Km lac) donor lysogen인 SF261균주를LB에 접종하여 파아지 lysate를 만들었고, 이것을 선택배지 LB(Km 25r) 상에서 야생형 LT-2 수용세포에 형질도입시켜 나타난 colony 중 2×10^4 개 정도를 MacConkey Agar 배지에서 색발현을 조사하여 1차 선별했고, 이어 β -galactosidase 활성도를 측정하여 2차 선별한 결과 13개의 anaerobic inducible 유전자와 6개의 oxygen inducible 유전자를 각각 얻었다.

Table 2에서와 같이 무산소상태하의 *ani* 유전자들은 산소가 있는 조건의 것 보다 2.4~77배 정도 발현율이 증가되었고, *oxi* 유전자들은 산소가 있는 상태에서 무산소 상태의 것 보다 2~4배 정도 증가를 나타내었다.

Table 2. β -Galactosidase activities of anaerobically and aerobically inducible gene fusions.

Strain	Fusion	β -Galactosidase activity ^a		
		Aerobic	Anaerobic	Fold
YK112	<i>ani</i> 2004::Mu dJ	8	210	26
YK130	<i>ani</i> 2009::Mu dJ	11	83	8
YK114	<i>ani</i> 2007::Mu dJ	25	189	8
YK119	<i>ani</i> 2010::Mu dJ	21	92	4
YK109	<i>ani</i> 2001::Mu dJ	10	54	5
YK124	<i>ani</i> 2002::Mu dJ	1	9	9
YK125	<i>ani</i> 2003::Mu dJ	4	24	6
YK126	<i>ani</i> 2005::Mu dJ	7	264	38
YK127	<i>ani</i> 2006::Mu dJ	6	463	77
YK128	<i>ani</i> 2008::Mu dJ	10	214	21
YK120	<i>ani</i> 2011::Mu dJ	81	200	2.4
YK131 ^b	<i>ani</i> 2012::Mu dJ	124	1910	15.4
YK132 ^b	<i>ani</i> 2013::Mu dJ	7	45	6.4
YK211 ^b	<i>oxi</i> 3011::Mu dJ	151	76	2
YK219 ^b	<i>oxi</i> 3019::Mu dJ	52	21	2.5
YK215 ^b	<i>oxi</i> 3015::Mu dJ	118	29	4
YK218 ^b	<i>oxi</i> 3018::Mu dJ	116	61	2
YK221 ^b	<i>oxi</i> 3021::Mu dJ	241	127	2

^aActivity is in Miller units.

^bRegulation was only observed in complex media(LB)

생장곡선에 따른 β -galactosidase 분석

YK 112 (*ani* 2004::Mu dJ) 균주를 산소, 무산소 상태하에서 성장정도와 그에 따른 *ani* 유전자 발현관계를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *ani* 균주가 aerobic 상태에서 anaerobic 상태로

이동될 때 성장량은 감소를 보이거나 β -galactosidase 활성도는 anaerobic 상태에서 현저하게 증가함을 볼 수 있다. 또한 *oxi* 균주는 anaerobic 상태보다 aerobic 상태로 이동시 β -galactosidase 활성도가 증가함을 보였다.

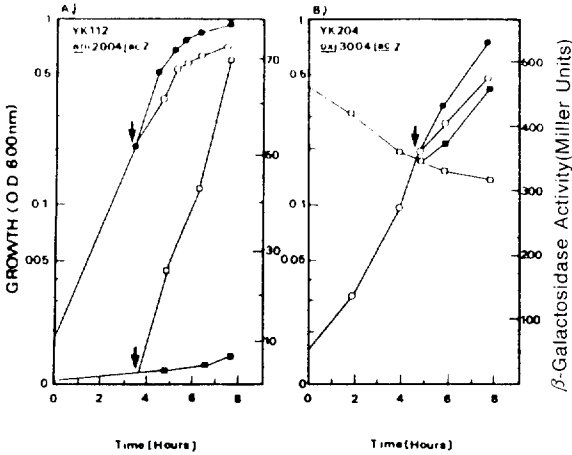


Fig. 1. Kinetics of *ani-lacZ* and *oxi-lacZ* induction. Circles represent *ani-lacZ* growth, squares represent β -galactosidase activities, open symbols represent anaerobic conditions, and closed symbols represent aerobic conditions. Optical Density at 600nm O.D. 600. The arrow indicates the point at which the culture was split.

***ani* gene에 대한 nitrate 및 fumarate 효과**
 최종전자 수용체인 nitrate 또는 fumarate가 *ani-lacZ* 균주에 미치는 효과는 Table 3과 같다.

YK112, YK114, YK126, YK128, 그리고 YK119 등은 anaerobic 조건에서 fumarate와 nitrate에 의해 β -galactosidase 발현이 감소하였고, YK130, YK127 은 fumarate에 의해 발현이 현저히 감소한 반면 nitrate에 대해서는 약간의 감소만을 보이는 것으로 나타났다. 또한 YK109는 nitrate에서 약간의 발현증가를 가져왔고, YK125와 YK120의 경우 fumarate에서는 약간의 발현감소를 보인 반면 nitrate 에서는 완전히 발현이 억제되었다.

***ani* gene에 대한 nitrate 및 CAA의 효과**

MSG 배지상에서 β -galactosidase 활성을 보이지 않는 균주들에 대해 nitrate 및 CAA (LB)의 효과를 관찰한 결과는 Table 4와 같다.

YK131, YK132 균주는 산소가 없는 조건의 MSG 배지에서 β -galactosidase 발현이 nitrate에 의해 거의 영향을 받지 않았고 CAA (LB)가 첨가된 배지에서는 현저한 발현증가를 보였다.

Table 3. Effect of nitrate and fumarate on *ani-lac* expression.

Strain	Genotype	Aerobic	β -Galactosidase activity		
			No additional nutrients	Anaerobic ^a	
				With fumarate	With nitrat
YK112	<i>ani2004</i> :: Mu dJ	6	119	4	5
YK130	<i>ani2009</i> :: Mu dJ	13	86	11	49
YK114	<i>ani2007</i> :: Mu dJ	29	200	21	11
YK109	<i>ani2001</i> :: Mu dJ	12	50	2	71
YK124	<i>ani2002</i> :: Mu dJ	1	9	3	1
YK125	<i>ani2003</i> :: Mu dJ	4	24	17	1
YK126	<i>ani2005</i> :: Mu dJ	7	264	12	15
YK127	<i>ani2006</i> :: Mu dJ	6	463	97	212
YK128	<i>ani2008</i> :: Mu dJ	10	214	18	49
YK119	<i>ani2010</i> :: Mu dJ	44	100	34	32
YK120	<i>ani2011</i> :: Mu dJ	81	200	167	1

^aNitrate was added to 20mM ; fumarate was added to 20mM.

Table 4. Effect of nitrate and CAA on β -galactosidase activity.

Strain	Effect of O ₂ on the following media with the indicated additions :											
	Minimal						LB					
	None		NO ₃ ^a		CAA		NO ₃ +CAA		None		NO ₃	
	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂	+O ₂	-O ₂
YK132	8	12	10	9	5	67	6	56	7	45	15	104
YK131	21	34	186	217	108	608	20	145	127	1910	94	1159

^aNitrate was added at 20mM ; CAA(vitamin-free CAA) was added at 1%

조절부위 돌연변이체가 *ani-lacZ* 유전자에 미치는 효과

선별한 *ani-alc* 유전자에 조절부위 돌연변이 유전자 *oxrA* 부위를 형질도입 시킨후 형질도입된 *ani* 균주들이 갖는 aerobic, anaerobic 조건하에서의 β -galactosidase 활성도를 조사하였다.(Table 5)

Table 5에서 YK130과 YK114는 anaerobic 조건에서 β -galactosidase 활성도가 현저히 감소하였고, 나머지 균주는 별다른 영향을 받지 않았다.

새로 밝혀진 *ani* 균주와 이미 Tn10 삽입부위가 밝혀진 균주들간의 상호형질도입 빈도조사와 이를 이용한 연관지도 작성

모든 분리균주와 Tn10 위치가 확인된 균주들의 lysate를 crossing over 시킨뒤 상호형질도입 빈도를 조사한 결과 분리균주 YK114는 *srl-202::Tn10*에 58% 연관되어 있는 것으로 나타났으며, YK120은 *mer::Tn10*과 48%, 그리고 YK112는 *zid-27::Tn10*에 34% 연관된 것으로 나타났다. 이러한 결과에 근거하여 이들 gene들의 linkage map상의 위치는 Figure 2에서와 같다.

외부 pH의 변화에 따른 유도비의 측정

분리균주들의 외부 pH의 변화에 따른 β -galactosidase의 유도비(anaerobic/aerobic)는 Figure 3과 Table 6에 보인 바와 같다. 모든 균주들은 pH5.8~6.8 사이에서 최고의 유도비를 보였고, 그밖의 영역에서는 비교적 낮은 유도비를 보였다.

고 찰

*Salmonella typhimurium*에서 Mu Mutagenesis를 통한 유전자 융합체의 분리는 박테리오파이지 P22를 Vector로 이용함으로써 용이하게 수행될 수 있고(Holly & Foster, 1982) 또한 이동성 유전인자 Mud1이나 Mud1-8 유전자가 불안정하여(Hughes,

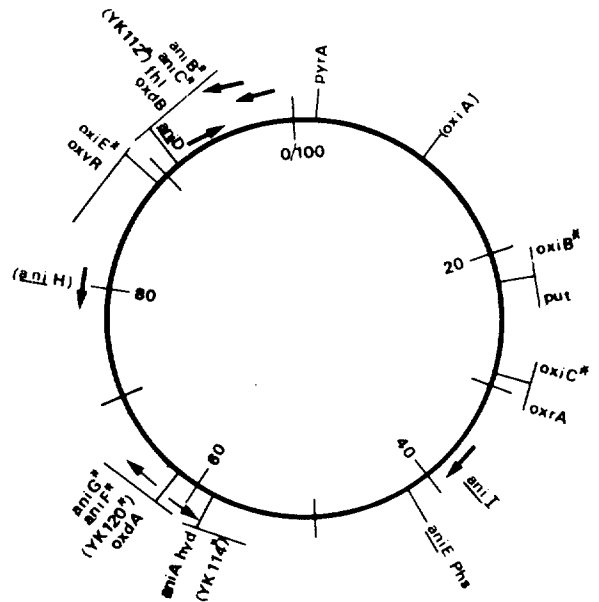


Fig. 2. Linkage map of oxygen regulated loci in *S. typhimurium*. the relationship of loci marked with an asterisk to adjacent markers is not known. Map locations of loci in parentheses are approximate.

1984) Mini-Mu인 Mu dJ(11.3Kb)를 이용함이 바람직한 것으로 알려져 있다(Beartriz et al., 1984).

본 연구에서는 P22와 Mu dJ(Km lac)을 이용하여 Foster 등(1986)이 밝힌 18개의 oxygen-regulated gene 이외에 염색체상의 다른 부위에 존재하는 새로운 oxygen-regulated gene(*ani*, 13; *oxi*, 6) 19개를

Table 5. Effect of *oxrA1* on the expression of *ani-lacZ* fusions.

Strain	Genotype	β -Galactosidase activity ^a		
		+O ₂	-O ₂	Fold induction
YK130	<i>ani2009::Mu dJ</i>	11	82	8
YK140	<i>ani2009::Mu dJ oxrA1Tn10</i>	53	95	1.7
YK109	<i>ani2001::Mu dJ</i>	10	54	5
YK141	<i>ani2001::Mu dJ oxrA1Tn10</i>	30	110	3.6
YK120	<i>ani2011::Mu dJ</i>	81	200	2.4
YK142	<i>ani2011::Mu dJ oxrA1Tn10</i>	35	114	3
YK119	<i>ani2010::Mu dJ</i>	21	92	4
YK143	<i>ani2010::Mu dJ oxrA1Tn10</i>	50	144	3
YK114	<i>ani2007::Mu dJ</i>	25	189	8
YK144	<i>ani2007::Mu dJ oxrA1Tn10</i>	16	45	3

^aActivity is in Miller units.

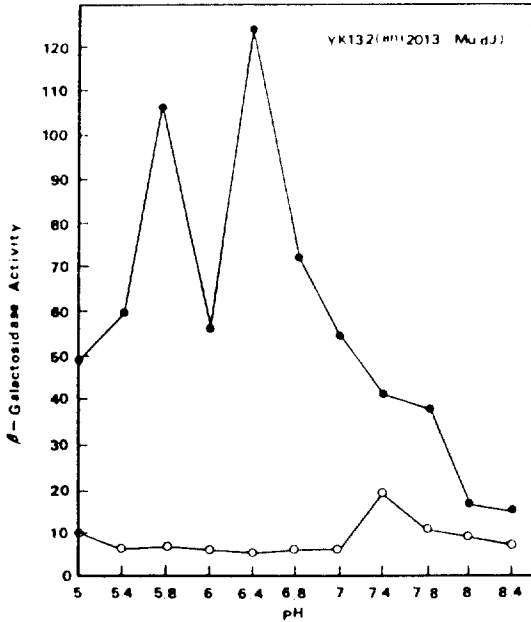


Fig. 3. Transcriptional control of YK132(*ani2013::Mu dJ*) by external pH.

Cells were grown to equivalent densities under aerobic (open symbols) or anaerobic (closed symbols) conditions in LB buffered to the pH indicated. Samples were washed and suspended in assay buffer to avoid pH effects on the enzymatic activity. β -Galactosidase activities are in Miller units.

분리해 냈다.

이들 유전자들은 Table 2에서의 결과와 같이 활성유도비(산소가 있는 조건 혹은 산소가 없는 조건에서의 β -galactosidase 활성도/산소가 없는 조건 혹은 산소가 있는 조건에서의 β -galactosidase 활성도)에 있어 Foster 등(1986)이 보고한 것과 비슷하게 나타났다.

분리한 *ami* 균주에 대해 최종전자수용체로 쓰이는 nitrate 및 fumarate의 효과는 Table 3에 보인바와 같다. YK109, YK125, 그리고 YK120을 제외한 모든 균주의 활성은 nitrate와 fumarate에 의해 현저히 감소하였으나 YK109는 nitrate에 대해 약간의 활성증가를 나타낸 반면 fumarate에서는 감소를 보였다. 또한 YK125 및 YK120 균주는 nitrate에 의해 활성이 억제되었고 fumarate에서는 거의 변화가 없었다. 이러한 결과는 Foster 등 (1986)의 분리한 균주들의 실험결과와의 다소 차이를 보이는 것이었다.

CAA (LB) 및 nitrate가 MSG배지에서 거의 활성유도비를 보이지 않는 균주에 미치는 효과를 관찰한 결과는 Table 4에서와 같이 CAA와 LB가 이들 균주의 활성유도에 필요한 것으로 나타났고, nitrate에 의해 그 활성이 증가하지 않는 것으로 미루어 볼 때 Jamieson과 Higgins(1984) 및 Strauch 등(1985)이 보고한 유전자와 동일부류의 유전으로 생각할 수 있겠으나, 이들 유전자들은 활성유도비를 보이기 위해 CAA를 필요로 하지 않기 때문에

Table 6. Induction of *ami* strains in various external pH.

Strain	pH 5	pH 5.4	pH 5.8	pH 6	pH 6.4	pH 6.8	pH 7	pH 7.4	pH 7.8	pH 8	pH 8.3	Condition
YK125	3	14	23	30	29	256	40	22	27	109	15	A
	68	88	852	802	475	429	969	601	238	475	83	AN
YK127	16	348	340	330	202	333	430	730	893	608	298	A
	50	370	1598	548	1880	771	556	99	1042	1272	1243	AN
YK130	13	91	224	113	224	162	305	283	158	440	18	A
	12	92	626	265	333	189	425	423	187	502	27	AN
YK124	1	4	9	54	69	30	85	18	123	164	137	A
	88	62	818	1061	166	317	986	839	178	173	130	AN
YK114	4	6	40	1	4	45	39	73	28	61	32	A
	113	257	286	761	356	108	621	284	40	74	45	AN
YK131	64	48	243	274	252	9	96	23	18	23	30	A
	78	263	405	1199	5781	596	560	181	52	64	96	AN
YK132	9	1	1	1	1	1	1	60	5	29	16	A
	47	375	802	190	1305	430	288	126	20	36	38	AN
YK112	26	25	40	75	55	26	192	66	43	90	33	A
	269	347	1086	1246	3381	414	1644	222	98	419	224	AN

Thick-lined squares represent highest induction frequency.

Assay was done with the same procedures as Fig. 3.

A and AN mean aerobic, anaerobic growth condition respectively.

Foster 등(1986)이 보고한 *ani* 유전자들 중 JF900 및 JF1106과 비슷한 기능을 수행하는 유전자로 사료된다.

Jamieson와 Higgins (1984), Yerkes 등(1984), Strauch등(1985), 그리고 Foster등(1986)은 Tn10 또는 Tn5를 이용하여 조절부위 돌연변이체를 만들어 *Salmonella typhimurium*의 anaerobic stimulon을 조절하는 조절자 복합단의 존재를 보고하였다.

본 실험에서는 Strauch 등(1985)이 밝힌 조절부위 돌연변이 유전자좌 *oxrA1*을 가진 균주를 이용하여 새로 찾아낸 *ani-lac* 균주에 형질도입시켰는데, 그 활성유도비를 측정된 Table 5와 같은 결과로 미루어 보아 YK130, 그리고 YK114 균주는 *oxrA1* 부위의 조절을 받고 있음을 알 수 있으며(class I) 이것들은 Foster 등(1986)이 보고한 class I 혹은 class II에 속하는 *ani* 유전자임을 알 수 있다.

또한 YK120, YK109, 그리고 YK119 균주는 *oxrA1* 조절부위 돌연변이체의 형질도입후에도 활성유도비에 있어 별다른 변화를 보이지 않았는데 이것은 이 유전자가 *oxrA1* 조절부위에 의해 조절되지 않음이 확실한 것이고, 따라서 이 유전자들은 Foster 등이 발표한 class III 유전자에 속하는 것으로 생각된다.

이미 Tn10 삽입부위가 밝혀진 균주들과 상호형질도입 빈도의 결과는 Kemper(1974)의 공식 $C=1$

$-t+(t \times \text{Int})-$ 여기에서 C는 상호형질도입 빈도, 그리고 t는 형질도입부위의 DNA 절편의 크기로 측정된 유전자간의 선상거리에 근거하여 YK114 (*ani* 2007::Mu dJ)가 *srl-202::Tn10*과 58%로 *hyd* 유전자좌 부위인 59 map unit로부터 ± 0.2 부위에, YK112(*ani* 2004::Mu dJ)는 *zid-27::Tn10*과 34% 연관되어 Foster 등(1986)의 *aniB* 유전자좌가 위치하는 93map unit로부터 ± 0.29 부위에, 그리고 YK120 (*ani* 2011::Mu dJ)는 *metC::Tn10*과 48%의 빈도로 Foster 등(1986)의 *aniF* 유전자좌가 위치하는 64map unit로부터 ± 0.2 의 유전자상의 거리를 두고 위치하는 것으로 나타났다.

최근 *Salmonella*와 *E. Coli*를 사용하여 Slonczewski 등(1987)과 Aliabadi 등(1988)은 anaerobiosis와 external acidification에 의해 조절되는 *exa* 유전자와 *ear* 유전자를 보고한바 있는데, 이와 유사한 조건하에서 행한 *ani* 유전자들의 실험결과는 YK127, YK130을 제외한 모든 균주들이 pH 5.8~6.8 사이에서 보인 유도비로 보아 이들 유전자와 유사성을 보이는 유전자가 아닌가 생각한다.

사 사

본 논문은 1987년도 문교부 학술연구조성비에 의한 자유공모과제로 선정되어 연구되었음.

적 요

Mu dJ(Km *lac*) operon 융합을 이용하여 *Salmonella typhimurium*에서 산소에 의해 조절되는 여러개의 새로운 유전자좌를 확인하였다. 산소가 있는 조건에서 유도된 9개의 유전자와 무산소조건에서 유도된 13개의 유전자가 분리되었다. 유전자 융합체들은 조절유전자 *oxrA*의 control에 근거하여 2class로 구분되었는데, class I 유전자들은 *oxrA*에 의해 조절되고, class II 유전자들은 이 조절 유전자에 의해 영향을 받지 않았다. 몇몇 *ani-lacZ* 유전자 융합체들은 최소배지에서 발현되지 않았고, LB상에서나 혹은 CAA 첨가배지에서 그 활성을 나타내었다. 대부분의 유전자 융합체들은 nitrate와 fumarate에서 발현이 억제되었다. *ani* 유전자 가운데 3개의 유전자는 상호형질도입 빈도에 의해 각각 59 ± 0.14 map unit(YK114), 64 ± 0.2 map unit(YK120), 그리고 93 ± 0.29 map unit(Yk112)로 결정되었다.

REFERENCES

1. Aliabadi, Z., Y.K. Park, J.L. Slonczewski, J.W. Foster, 1988. Novel regulatory loci controlling oxygen and pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*. J. bacteriol. **170**: 842-851.
2. Ames, B.N., M.F. Christman, R.W. Morgan and F.S. Jacobson, 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat shock proteins in *Salmonella typhimurium*. Cell. **41**: 753-762.
3. Beatriz, A.C., Olsson, P., and Casadaban, M.J., 1984. Plasmid insertion mutagenesis and *lac* gene fusion with mini-mu bacteriophage transposons. J. Bacteriol. **158**: 488-495.
4. Casadaban, M.J., S.N. Cohen, 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 4530-4533.
5. Foster, J.W. Z.J. Aliabadi and S. Mya, F. Warren, 1986. Oxygen regulated stimulons of *Salmonella typhimurium* identified by Mu d (*Ap lac*) operon fusions. J. Bacteriol. **165**: 780-786.
6. Gottesman, S., 1984. Bacterial regulation: Global regulatory networks Ann. Rev. Genet. **18**: 415-441.
7. Holly, E.A., J.W. Foster, 1982. Bacteriophage P22 as a vector for Mu mutagenesis in *Salmonella typhi-*

- murium* : Isolation of *nad-lac* and *pnc-lac* gene fusions. J. Bacteriol. **152** : 959-962.
8. **Hughes, K.T., J.R. Roth**, 1984. Conditionally transposition-defective Derivative of Mu dl(Amp *Lac*). J. Bacteriol. **159** : 130-137.
 9. **Jamieson, D.J., C.F. Higgins**. 1984. Anaerobic and leucine-dependent expression of a peptide transport gene in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **160** : 131-136.
 10. **Kemper, J.** 1974. Gene order and cotransduction in the *leu-ara-fol-ptrA* region of the *Salmonella typhimurium* linkage map. J. Bacteriol. **117** : 94-99.
 11. **Miller, J.H.**, 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 352-355.
 12. **Neidhardt, F.C., R.A. Vanbogelen and V. Vaughn**. 1984. The genetics and regulation of heat shock proteins. Ann. Rev. Genet. **18** : 295-329.
 13. **Schmieger, H.**, 1972. Phage p22 mutant with increased or decreased transduction abilities. Mol. Gen.Genet. **119** : 75.
 14. **Slonczewski, J.L., T.N. Gonzalez, F.M. Bartholomew, and N.J. Holt**. 1987. Mu d-directed *lacZ* fusions regulated by low pH in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169** : 3001-3006.
 15. **Smith, M.W., and F.C. Neidhardt**, 1983. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia Coli*. J. Bacteriol. **154** : 336-343.
 16. **Smith, M.W., and F.C. Neidhardt**, 1983. Proteins induced by aerobiosis in *Escherichia Coli*. J. Bacteriol. **154** : 344-350.
 17. **Strauch, K.L., J.B. Lenk, B.L. Gamble, and C.G. Miller**, 1985. Oxygen regulation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **162** : 673-680.
 18. **Taylor, A.I.** 1963. Bacteriophage induced mutation in *E. Coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **50** : 1043-1051.
 19. **Wanner, B.L., and McSharry**. 1982. Phosphate-controlled gene expression in *Escherichia Coli* K-12 using Mu dl-directed *lacZ* fusions. J. Mol. Biol. **158** : 347-363.
 20. **Yerkes, J.H., L.P. Casson, A.K. Honkanen, and G.C. Walker**. 1984. Anaerobiosis induces expression of *ant*, a new *Escherichia Coli* locus with a role in an aerobic electron transport. J. Bacteriol. **158** : 180-186.

(Received Aug. 22, 1989).