

Salmonella typhimurium에서 MudJ(Km.lac) 오페론 융합을 이용한 삼투유도유전자의 발현

주성관 · 우영대¹ · 허연주 · 안정선² · 박용근

고려대학교 이과대학 생물학과

¹한남대학교 이과대학 생물학과

²서울대학교 자연과학대학 생물학과

Osmotic-inducible Gene Expression using MudJ(Km.lac) Operon Fusion in *Salmonella typhimurium*

Joo, Sung-kwan, Yung-Dae Woo¹, Yeon-Joo Huh, Jung-Sun An² and Yung-Keun Park

Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

¹Department of Biology, Hannam University, Deajon 300-200, Korea

²Department of Biology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT: MudJ(Km.lac) operon fusions were used in the identification of osmotic-inducible genetic(*osi*) loci in *Salmonella typhimurium*. Expression of *osi::lacZ*(*osi5001*, *5027*) genes were dramatically induced 39-189 fold when the osmolarity was increased. Seven *osm::lacZ* genes were constitutively expressed under both low and high osmotic strength. The *osi5001::lacZ* fusion strains showed the enhanced osmotolerance and the reduced expression of the *osi5001::lacZ* in the presence of 1 mM proline or betaine as osmoprotectants. Four osmotic inducible genetic loci were mapped into 36 (YK531), 44 (YK504), 57 (YK501) and 84 (YK528) map unit by testing the cotransduction frequency.

KEY WORDS □ MudJ operon fusion, osmotic-inducible genetic loci, *Salmonella typhimurium*, osmoprotectants, linkage mapping.

세균과 효모, 그리고 동·식물 조직세포는 여러가지 환경자극(예; 열자극, 영양결핍, 자외선과 산소자극)을 인식하고 이들이 극도의 환경적 stress로 작용시 antistress기작을 유발한다. 장내세균인 *Salmonella typhimurium*과 *Escherichia. coli* 역시 환경변화에 대응하여 여러가지 복잡한 조절기작을 가지며 전체적으로 global regulatory network를 형성한다(Gottesman, 1984). 특히 여러 환경적 stress중 삼투압(osmotic strength)의 변화는 세포막의 안정성과 효소의 활성도 감소를 유발하여 세포대사율에 직접적으로 영향을 주며, 고등 동물조직에서는 여러가지 병리적원인(예; cystic fibrosis(CF), 심장 질환등)으로 간주되어왔다(Flowers등, 1977; Barron등, 1986;). 그러나 세균과 동·식물세포는 여러가지 기작을 통해 삼투 충격에 대응하여 성장할수 있는 삼투 내성을 보이는데 이를 삼투조절이라 한다(Le Rudlier등, 1984). 삼투 조절에 필수적인 삼투내성물질(osmoprotectants)은 일차적 삼투조절이온인 K⁺ (Gow-

rishanker, 1985; Sutherland등, 1986) 와는 달리 급격한 삼투압 변화 상태에서 세포내부의 이온세기, pH등 단백질의 3차원적 구조불안정 요인과, 활성도(Km) 저하요인에 변화를 주지않고 단지 외부와의 삼투압 균형을 유지하는 물질로써는 아미노산 유도체인 proline, betaine, taurine등이 대표적이다(Yancy등, 1982). 이들은 *proU*, *bet*, *proP*등의 유전자에 의해서 합성과 수송이 유전적 조절을 받으며, *ompC*와 *ompF*역시 삼투 조절유전자(Mizuno등, 1983)로 보고되고 있는데 이는 식물유전공학적 응용과 동물병리학적 이해를 뒷받침하는것으로 시사된다. 본 실험에서는 삼투압에 반응하여 발현이 유도되는 새로운 유전자를 MudJ 오페론 융합기술을 이용하여 확인하고(Davis등, 1980), 고행질도입 파아지 P22 HT를 이용한 일반형질도입과 Tn10전이(Kukral등, 1987)를 이용한 *in vivo* 유전자 조작을 통해 삼투압과 삼투내성물과의 관계와, 유전자의 염색체상 위치를 알아보고자 하였다.

Table 1. Bacterial strains and bacteriophages.

Strain	Relevant Genotype	Source
SF261	<i>hisD9953::MudJ</i> <i>his-9941::Mud1</i>	Roth via Maloy
LT-2	Wilde type	J.W. Foster
AK3063	<i>zdg-3063::Tn10</i> , linked 90% to <i>dadB</i>	K.E. Sanderson
AK3061	<i>zee-3061::Tn10</i> , linked 6% <i>metG</i>	"
AK3145	<i>zie-3145::Th10</i> , linked 89% <i>pepQ</i> , 33% <i>ihvC</i>	"
TL188	<i>proU1655::Tn10</i>	"
SH7241	<i>ompC396::Tn10</i> <i>his-6165</i> <i>galE-496</i>	"
CH1351	<i>ompR1009::Tn10</i>	"
TT946	<i>putA810::Tn10</i>	"
YK501	<i>osiH5001::MudJ(Km.lac)</i>	This study
YK502	<i>osi02::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK527	<i>osiH5027::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK530	<i>osiH5030::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK503	<i>osmC5003::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK504	<i>osmC5004::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK510	<i>osmC5018::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK519	<i>osmC5019::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK528	<i>osmC5028::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK531	<i>osmC5031::MudJ(Km.lac)</i>	"
YK532	<i>osmC5032::MudJ(Km.lac)</i>	"
Bacteriophage		
P22	HT 105\1-int	J.W. Foster
H5	Derivative of P22	"

재료 및 방법

사용 균주 및 파아지(Phage)

본 실험에 사용한 균주 및 파아지는 Table 1에 명시하였다. *MudJ(Km.lac)* 공여세포는 *S. typhimurium* SF261, 연관지도 작성을 위해서는 AK series (::Tn10)를 사용하였다. 일반형질도입을 위해서는 P22HT 105/1-int 파아지, nonlysogen 확인에는 H5 파아지를 이용하였다.

배지 및 항생제

배양 배지로 Luria배지, 형질도입균주의 Lac^{-} 발현은 MacConkey 배지(Difco), 파아지 감수성 실험에는 Green indicator plate, β -galactosidase 활성 측정에는 MSG배지를 사용하였다. 배지의 삼투압 변화는 NaCl 농도로 조절하였고, 0.084 M NaCl (정상배지의 염농도)를 낮은 삼투압, 0.3 M NaCl이 첨가된 배지를 높은 삼투압 조건으로 하였다. 항생제 농도는 *MudJ* 확인을 위해 *Km*은 35 μ g/ml, Tn10 삽입확인을 위해 Tc는 30 μ g/ml를 사용하였다.

***MudJ(Km.lac)* lysate 획득과 형질도입**

SF261 균주를 LB 5ml 액체배지에 12시간 배양시킨 후 파아지 P22HT 용액과 함께 각각 50 μ l씩 LB 5 ml 배지에 접종후 10-12시간 정도 배양시킨다. 이들을 3,000rpm(20 min)에서 원심분리후 상층액을

수거하여 다시 $CHCl_3$ 0.3ml를 첨가하여 *MudJ* lysate를 얻었다(Davis등, 1980). 파아지 P22HT 105/1-int 를 이용한 형질도입과 Mu파아지 전이를 위한 방법은 Schmieger(1972)의 방법에 따랐다. *osi::MudJ* 및 *osm::MudJ* operon fusion 균주의 선별

야생형 LT-2와 *MudJ(Km.lac)*를 50 μ l씩 LBKm agar 배지에 도말하여 12시간 배양후 형성된 Km colony 들은 저삼투압과 고삼투압(0.3 M NaCl)으로 조성된 MacConkey Km 배지에 각각 duplicating score하여 37 $^{\circ}$ C 에서 12시간 배양하였다.

이들 colony들중 서로 다른 삼투압 조건에서 뚜렷이 다른 색변화(적색에서 흰색 혹은 흰색에서 적색)을 나타내는 균주를 일차적으로 선별한후, nonlysogen 확인을 위해서 H5 phage 와 cross-streaking 를 하여 파아지 감수성을 나타내는 균주를 *osi::MudJ* 균주로 최종선별하였다.

β -galactosidase 활성측정

세포과열은 SDS(0.1%)/ $CHCl_3$ 로 처리하였으며, Miller (1972)의 방법을 이용하였다.

삼투압 변화에 따른 *osi::lacZ* 유전자 발현

YK501, YK527등의 균주를 MSG배지에 전배양하고 이 배양액을 0.1 M에서 0.6 M의 각 NaCl 농도 별로 조성된 배지에 접종하여 O.D₆₀₀=0.5 에서 β -galactosidase 활성을 측정하여 염농도에 따른 유전자 발현정도를 결정하였다.

***osi::lacZ* 유전자의 발현에 대한 삼투내성물질과 osmolytes의 효과**

osi-lacZ 균주들은 MSG배지에 전배양후, 1 mM betaine 혹은 proline 이 첨가된 염 농도별의 MSG 배지에 접종후 37 $^{\circ}$ C 에서 배양하여 O.D₆₀₀ = 500에서 β -galactosidase를 측정 하였다. 또한 MSG배지에 삼투압 변화를 NaCl, KCl과 sucrose 와 choline-Cl등으로 조절하여 *osi-lac* 균주에 미치는 삼투압적 효과를 측정하였다.

삼투유도유전자의 연관지도 작성

S. typhimurium 염색체의 알려진 위치에 Tn10(Tc) 이 삽입된 균주의 전배양액 50 μ l과 *MudJ* lysate 50 μ l를 LBKm agar 배지에 도말후 37 $^{\circ}$ C 에서 배양한다. 형성된 Km^r colony는 LBTC배지에 replica하여 Km^rTc^r colony 수를 통해 상호형질도입빈도(cotransduction frequency) 를 구하였다. 이는 Kemper(1974)의 공식인 $C = 1 - t + (t \times Int)$, C = 상호형질도입빈도, t = 형질도입된 DNA 절편 크기를 이용하여, 알려진 map unit로 부터 유전자사이의 선상거리를 구하였다.

결 과

***osi::MudJ* 및 *osm::MudJ* operon fusion 균주의 선별**

야생형 LT-2에 *MudJ(Km.lac)*를 P22 파아지를 통해 일반 형질도입시켜 삼투유도유전자를 분리한 결과 삼투압의 세기와 Lac^+ 발현의 정도에 따라서 2가지 유전자군으로 나타났다.(1) 낮은 삼투압에서는 Lac^- 를 나타내고, 높은 삼투압(0.3 M NaCl)에서 유도되어 Lac^+ 로 발현되는 유전자를 고삼투유도유전자, *osiH*(high osmotic-inducible gene)로 표기하였다(Table 2).(2) 낮은 삼투압과 높은 삼투압에서 크게 Lac 발현의 차이가 없지만, *MudJ*삽입 돌연변이

Table 2. Effect of osmotic stress on the β -galactosidase activity in *osiH::MudJ* and *osmC::MudJ* strains.

Strain	Genotype	β -Galactosidase activity ^a		
		- NaCl	+ NaCl ^b	Increase of induction
YK501	<i>osiH5001L::MudJ</i>	7	1326	189
YK502	<i>osiH5002::MudJ</i>	337	834	2.4
YK527	<i>osiH5027::MudJ</i>	19	745	39
YK530	<i>osiH5030::MudJ</i>	86	188	2.1
YK503	<i>osmC5003::MudJ</i>	369	493	1.3
YK504	<i>osmC5004::MudJ</i>	146	211	1.4
YK518	<i>osmC5018::MudJ</i>	429	832	1.9
YK519	<i>osmC5019::MudJ</i>	623	810	1.3
TK528	<i>osmC5128::MudJ</i>	207	254	1.2
YK531	<i>osmC5031::MudJ</i>	108	149	1.3
YK532	<i>osmC5032::MudJ</i>	406	604	1.4

^aActivity is in Miller unit.
^bNaCl was added at 0.3 M

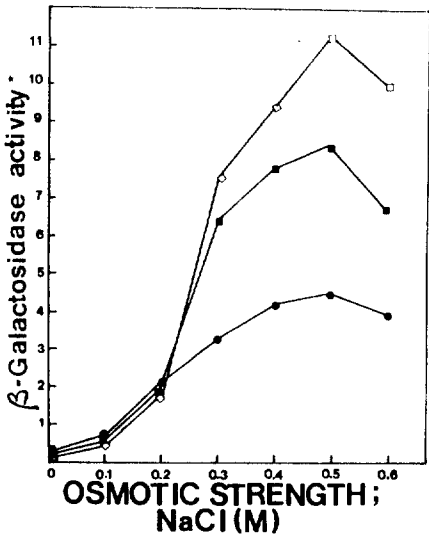


Fig. 1. Expression of *osiH5001-lacZ* gene in the presence of osmoprotectants. Concentration of osmoprotectants; 1 mM betaine(●), 1 mM proline(■), no addition(□), respectively. *Activity is in Miller unit (× 100).

효과로 인해 균주가 삼투압 변화시 성장률과 삼투적응성이 변화하여 삼투압과 유전자의 기능이 서로 관련성이 있는것으로 보이는 유전자를 삼투유전자, *osmC*(osmotic-constitutive gene)로 표기하였다 (Table 2).

삼투압 변화에 따른 *osi::lacZ* 유전자의 발현
*osiH*군의 유전자는 삼투압 증가에 따라서 유전자

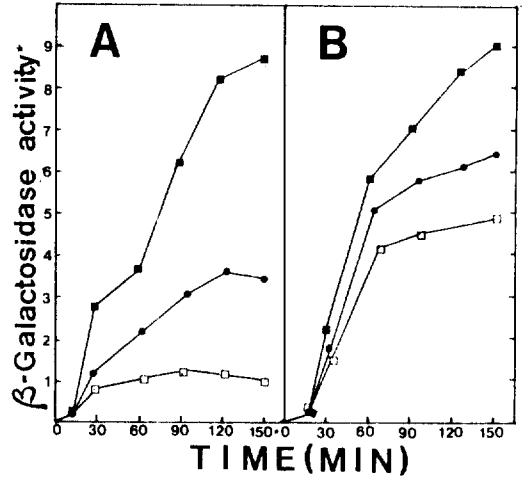


Fig. 2A. Induction of *osiH5001::lacZ* gene expression. Samples; 0.3 M NaCl(■), 0.16 M NaCl(●), 0.06 M NaCl(□).
B. Reduction of *YK501(osiH5001::lacZ)* expression by proline and betaine. Samples were supplemented with 0.3 M NaCl(■), 0.3 M NaCl+1 mM proline(●), 0.3 M NaCl+1 mM betaine(■). *Activity is in Miller unit(×100).

발현이 증가 하였는데, YK501 (*osiH01::MudJ*) 균주는 0.5 M NaCl농도에서 최고의 발현을 나타내었으나, 0.5 M 이상의 염농도에서는 오히려 감소하였다 (Figure 1). YK501과 유사하게 YK527 (*osiH5027*)은 고염농도(0.3 M NaCl)/저염농도에서의 Lac발현비가 39배의 높은 발현유도비를 보였으며, *osiH5002*와 *osiH5030*등의 유전자는 비교적 낮은 유도비를 보였나 (Table 2). *osiH* 유전자는 삼투충격에 대해 두가지 특징적 양상을 보였는데 첫째로, 낮은 염농도 보다는 높은 염농도에서 β -galactosidase의 발현량(U)이 단위시간당 높은점(Fig. 2-A)이고 삼투충격이 주어지후 약 20분부터 *Lac* 발현이 시작되어 반응시작에 시간적 지체가 있었다(Fig 2-B). 특히, 반응시작의 시간적 지체는 삼투내성물이 존재하는 경우에서도 동일함것으로 나타났다.

osi::lacZ 유전자 발현에 미치는 삼투내성물과 osmolytes의 효과

대부분의 *osi-lacZ* 균주들은 betaine과 proline에 의해 β -galactosidase의 발현이 감소되었으며 (Table 3), 이는 *osiH* 유전자군과 *osmC* 유전자군 모두 공통적 양상으로 나타났다. YK501은 염농도가 높아지더라도 삼투내성물이 첨가된 경우에는 Lac 발현이 감소되었는데 betaine과 proline에 의해 각각 52%와 42% 정도로 발현이 억제되었고 betaine첨가시 더욱 많은 감소를 보였다.(Figure 2). 삼투내성물이 첨가된 배지에서 β -galactosidase 활성도는 처음에는 같은 비율이지만 60분 부터는 최대로 발현된것의 1/2정도로 억제되었다(Figure 2-B). 한편, 삼투내성물이 첨가된 경우 YK501은 첨가되지 않은 경우보다 현저한 성장속도의 증가를 보이며 삼투내성이 증가됨을 보였다(Figure 3-A,B). 또한 *osmC* 유전자군인 YK519

Table 3. Effect of the osmoprotectants, betaine and proline on steady-state expression of *osiH::lac* and *osmC::lac* fusions.

Strain	Genotype	β-Galactosidase activity ^a		
		No addition	+ Betaine	+ Proline
YK501	<i>osiH5001L::MudJ</i>	1326	628	724
YK502	<i>osiH5002::MudJ</i>	834	553	704
YK527	<i>osiH5027::MudJ</i>	745	493	592
YK530	<i>osiH5030::MudJ</i>	288	189	207
YK503	<i>osmC5003::MudJ</i>	493	480	484
YK504	<i>osmC5004::MudJ</i>	211	151	176
YK519	<i>osmC5019::MudJ</i>	810	410	466
TK528	<i>osmC5128::MudJ</i>	354	301	332
YK531	<i>osmC5031::MudJ</i>	249	153	185
YK532	<i>osmC5032::MudJ</i>	604	456	585

^aCells were grown to the mid-exponential phase in medium MSG containing 0.3 M NaCl and 1 mM concentration of osmoprotectant at 37°C, and β-galactosidase activity was assayed.

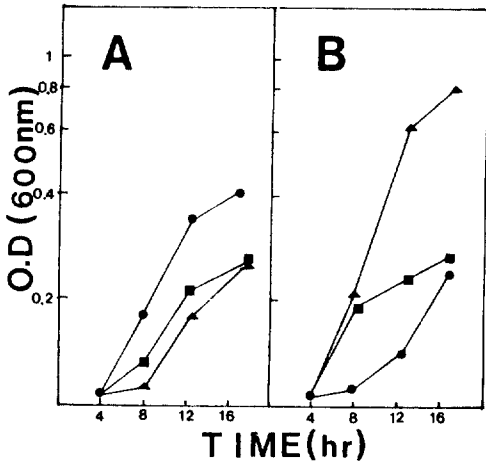


Fig. 3. Growth of YK501 and YK519 in the presence of osmoprotectants. All cells were grown in MSG medium containing 0.65 M NaCl. Cells were grown in the absence of osmoprotectants (A): with 1 mM proline (B). The strains used were LT-2(□), YK501(▲), and YK519(●).

도 삼투내성물이 첨가된 경우 Figure 3의 경우처럼 성장속도의 변화를 나타내었다. 각종 osmolytes로 삼투압을 변화 시켜본 결과 0.44 M sucrose에서 β-galactosidase활성도가 가장 크게 증가됨을 보였다 (Table 4). 본 실험에서는 온도(37°C와 16°C), 산소와 무산소 조건, pH(3.5-10)의 조건에서 *osiH* 유전자의 발현차이를 측정하였으나(unpublished data) 이들 환경인자는 유전자발현에 큰 영향을 주지 못하였고 단지 pH 6.5에서 최고의 유도비를 보이며 알칼리 상태에서 약간높은 유도비를 보였다.

Table 4. Effects of different osmolytes on the *osi::lac* genes expression.

osmolyte	Medium additives*	β-galactosidase (U)	
		YK501	YK527
None		7	19
None	1 mM betaine	21	11
None	1 mM proline	31	15
0.3 M NaCl		1326	753
0.3 M NaCl	1 mM betaine	476	303
0.3 M NaCl	1 mM proline	631	586
0.3 M NaCl	1 mM proline +1 mM betaine	799	404
0.3 M KCl		841	519
0.3 M KCl	1 mM betaine	612	194
0.3 M KCl	1 mM proline	770	384
0.3 M KCl	1 mM proline +1 mM betaine	713	254
0.44 M sucrose		1389	1215
0.44 M sucrose	1 mM betaine	717	589
0.44 M sucrose	1 mM proline	1100	759
0.44 M sucrose	1 mM proline +1 mM betaine	739	669

*The cells were grown in MSG medium with additives as indicated.

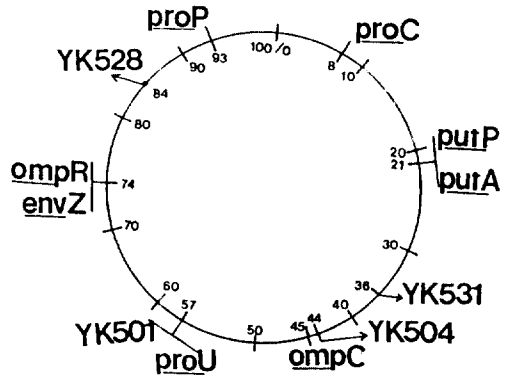


Fig. 4. Linkage map of osmotic inducible genetic loci in *S. typhimurium*.

삼투유도유전자의 연관지도

*osiH5001*는 염색체상 57 min 위치의 *proU1655::Tn10*과 28% 연관률 보였고, *osmC5031*는 AK3063과 10% 연관률 보여 36 min 위치로 확인되었다. YK504의 *osmC5004*는 AK3063과 역시 10% 연관률 나타내어 44 min 위치에 있음을 확인하였고, *osmC5028*는 AK3145와 8% 연관률 보여 84 min에 위치하는 것으로 나타났다(Figure 4).

고 찰

본 실험에서는 osmotic shock에 반응하는 삼투조절 유전자의 promoter부위에 lac 유전자를 오픈된 용

합시키기 위해서 *MudJ*를 이용하였는데 이는 전이기능이 결여되어 유전적으로 안정된 11.3 kb의 mini Mu이고, *MudJ*의 전이를 위해 helper Mu로 *MudI*를 이용하였다(Puhler와 Tinnis, 1984). *S. typhimurium*에서 삼투적응작용의 하나인 osmotaxis(Alder등, 1988)는 삼투조절에 관여하는 삼투유도유전자와 중복성이 없는것으로 보여지고 있으며, 이들의 세포적 적응방식 역시 다르다. 본 실험에서 고삼투유도유전자로 확인된 *osiH5001*과 *osiH5027* 유전자는 이들이 삼투내성에 관여하는지 혹은 다른대사적기능에(예; 병독유전자:*algD*) 관여하는지는 생화학적 검증을 통해서 확인되어야 할것으로 보이지만, 삼투내성물이 첨가된 배지에서 *osiH-lac* 발현이 감소되고, 높은염농도에서 야생형 LT-2보다 좀더 느린성장속도는 이들 유전자가 삼투내성에 관여하는것으로 추측된다. 특히, *osiH5001* 유전자는 삼투내성유전자중의 하나인 *proU*(proline/betaine permease)일 가능성을 두가지 점에서 나타낸다(Cairney등, 1985;

Dunlap과 Csconka, 1985). 첫째, *osiH5001*는 *proU* 유전자와 유사한 양상으로 고삼투압에서 높은 β -galactosidase 발현유도비를 보이며(Figure 1), 둘째로 *osiH5001*는 연관검사결과 *proU*와 28% 연관을 보여서 Kemper(1974)공식에 의해서 약 57 ± 0.4 min인 부위(Sanderson과 Roth, 1988)에 매우 근접하게 위치하고 있다는 점이다(Figure 4). 또한, 삼투압의 변화에서 지속적 발현을 보이는 *osmC* 유전자는 이들 유전자에 *MudJ*의 삽입돌연변이로 인해 기능이 상실되는 경우 야생형보다 고삼투압 최소 배지에서 삼투내성의 장애로 보이는 성장속도의 현격한 변화가 확인되었다(Figure 3). 이는 Jovanovich등(1988)이 보고한 *proP* 유전자들의 경우처럼 전사후조절이나 이차적 활성화, 조절유전자로써 삼투내성을 보이는 삼투유전자일 가능성을 배제할수없다. 따라서 삼투압에 세포기능적 변화를 보이는 유전자군인 *osmC* 역시 기존의 *ProP*와 *OmpR*, *ProU* 등의 단백질과 유사성이 검증되어야 할것으로 본다.

적 요

*Salmonella typhimurium*에서 *MudJ(Km.lac)* 오페론 융합을 이용하여 삼투압에 의해 발현되는 삼투 유도(*osi*) 유전자좌를 확인하였다. 그중 두 *osi::lacZ*(*osi5001*, *osi5027*) 유전자는 삼투압이 증가시 39-189배의 매우높은 유도를 보였다. 또한 7개의 *osm::lacZ* 오페론 융합균주는 낮은삼투압과 높은삼투압에서 계속 발현하였다. *osi5001::lacZ* 오페론 융합균주는 삼투내성물(중복성물)로써 1 mM proline 혹은 betaine의 존재에서 삼투내성이 증가되었고, *osi5001::lacZ* 유전자의 발현은 감소되었다. 그리고, 4개의 삼투유도유전자는 상호형질도입빈도 검사를 통해 36(YK531), 44(YK504), 57(YK501), 84(YK528) map unit로 결정되었다.

사 사

이 논문은 1989년도 문교부 기초과학 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 본 연구를 위해 친절히 균주를 제공하신 미국 South Alabama 대학 Dr. Foster와 Canada Calgary 대학 Dr. Sanderson에게 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

- Adler, J., C. Li, A.J. Boileau, Y. Qi, C. Kung, 1988. Osmotaxis in *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Volume LIII: 19-22.
- Barron, A., G. May, E. Bremer, and M. Villarejo, 1986. Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **167**, 433-438.
- Cairney, J., C.F. Higgins, and I.R. Brooth, 1985. Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* encodes an osmotically induced betaine transport system. *J. Bacteriol.* **164**, 1224-1232.
- Davis, R.W., D. Bostein, J.R. Roth, 1980. Advanced bacterial genetics. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York.
- Dunlap, V.J., and L.N. Csconka, 1985. Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **163**, 296-304.
- Flowers, R.J., P.F. Troke, and A.R. Yeo, 1977. The mechanism of salt tolerance in halophiles. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 89-121.
- Gottesman, S., 1984. Bacterial regulatory networks. *Ann. Rev. Genet.* **18**, 415-441.
- Gowrishankar, J., 1985. Identification of osmoreponsive genes in *Escherichia coli* evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **164**, 434-445.
- Jovanovich, S.B., M. Martinell, M.T. Record, J.R., and R.R. Burgess, 1988. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**, 534-539.
- Kemper, J., 1974. Gene order and cotransduction in the leu-ara-fol-ptrA region of the *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **160**, 131-136.
- Kukral, A.M.K.L. Stranch, R.A. Maurer and E.G. Miller, 1987. Genetic analysis in *Salmonella typhimurium* with a small collection of randomly spaced insertions of transposon Tn Δ 16 Δ 17. *J. Bacteriol.* **169**, 1787-1793.
- Le Rudlier, D., A.R. Storm, A.M. Dantekar, L.T. Smith, and R.C. Valentine, 1984. Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224**, 1064-1068.
- Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold

- Spring Harbor, N.Y. 352-355.
14. Mizuno, T., M.Y. Chou, and M. Inouye, 1983. A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.*, **258**, 6932-6940.
 15. Puhler, A. and K.N. Tinnis, 1984. *Advanced Molecular Genetics*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
 16. Sanderson, K.E and J.R. Roth, 1988. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Edition VII. *Micro. Rev.*, **52**, 485-532.
 17. Schmieger, H., 1972. Phage P22 mutant with increased or decreased transduction abilities. *Mol. Gen. Genet.* **119**, 75-88.
 18. Sutherland, L.S., J. Cairney, M.J. Elmore, I.R. Booth, and C.F. Higgins, 1986. Osmotic regulation of transcription: Induction of the pro U betain transport gene is dependent on an accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriology*. **168**, 805-814.
 19. Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, and G.N. Somero, 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. **217**, 1214-1222.

(Received March 6, 1991)

(Accepted March 22, 1991)