

## N4에 대해 내성을 나타내는데 필요한 *rtn* 유전자의 부위

이동환 · 유선미 · 황의욱 · 이영훈<sup>1</sup> · 채건상\*

전북대학교 분자생물학과, <sup>1</sup>한국과학기술원 화학과

### The DNA Region of *rtn* Gene Essential for Resistance against N4 Infection

Lee, Dong Whan, Seon Mi Yoo, Ui Uk Hwang, Younghoon Lee<sup>1</sup> and Keon-Sang Chae\*

Department of Molecular Biology, Chonbuk National University, Chonbuk, 560-756, Korea

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701, Korea

**ABSTRACT:** N4 phage, which infects *E. coli* K-12 strains, could not infect *E. coli* K-12 strains containing *rtn*(resistant to N4) gene on plasmids, which was isolated from *Proteus vulgaris* ATCC 13315. The region of *rtn* gene for Rtn phenotype was reduced to the 1.7 kb *HincII*-*AccI* fragment, and *rtn* gene seemed to have its own promoter. This putative promoter was present in 107 bp *HincII*-*DraI* fragment, and known to be functional in *E. coli* K-12, which is supported by the fact that phenotype of a subclone, pRMG103A1B which does not contain the 107 bp fragment, was dependent on the existence of a functional promoter in the upstream of *rtn* gene, and that the 107 bp fragment had promoter activity when located in the upstream of structural gene of galactokinase of *E. coli*. The promoter-bearing fragment contains two overlapping putative promoter sequences, both of which show a fit in eight of twelve nucleotides with consensus sequences of *E. coli* promoters at the -35 and -10 regions.

**KEY WORDS** □ *rtn* gene, N4 resistance, *rtn* promoter, N4 phage

어떤 박테리아의 제한-변형 효소의 유전자가 대장균에 도입되면 그 대장균은 원래 대장균에 감염할 수 있던 파아지에 대해 내성을 갖게 되는 것으로 알려져 있다(Krüger and Bickle, 1983). 그 이유는 다음과 같이 생각할 수 있다. 대장균에 감염하는 파아지의 DNA에서 다른 박테리아의 제한-변형 효소가 인식할 수 있는 부위는 변형되어 있지 않을 것이다. 이런 상태의 파아지 DNA가 대장균내로 삽입되면 대장균내로 도입된 다른 박테리아의 제한-변형효소 유전자에서 만들어진 제한효소에 의하여 파아지의 DNA는 절단될 것이다. 그 결과 파아지는 대장균내에서 정상적으로 증식을 하지 못하게 되고, 따라서 대장균은 내성을 갖게 된다. 실제로 이러한 원리를 이용하여 *PstI*과 *HhaI* 등의 제 II형의 제한-변형효소의 유전자가 분리되었다(Mann *et al.*, 1978; Walder *et al.*, 1981). 이때 사용된 파아지는  $\lambda_{vir}$ , P1, BF23, T5 들

인데 최근 대장균 K-12 균주에 감염하는 N4 파아지가 사용되었을 때 같은 원리에 의해서도 제한-변형효소의 유전자가 아닌 새로운 *rtn*(resistant to N4) 유전자가 *Proteus vulgaris*로부터 분리되었다(Chae and Yoo, 1986).

*P. vulgaris*로부터 분리된 *rtn* 유전자는 대장균에 도입되면 정상적으로 대장균에 감염할 수 있었던 N4 파아지의 감염을 방해하여 내성을 갖게 한다. 그러나  $\lambda_{vir}$ ,  $\Phi 80_{vir}$ , T4, T7 파아지의 감염에는 영향을 주지 못하고 N4 파아지에 특이하게 작용하는 것으로 생각되고 있다(Chae, 1987). 이 *rtn* 유전자 분리시의 원리가 제한-변형효소의 유전자 분리의 원리와 같아 *rtn* 유전자가 제한-변형효소의 유전자인지를 검증해 본 결과 *rtn* 유전자는 *P. vulgaris*의 제한-변형효소 유전자는 아님이 밝혀졌다(Chae, 1987). 또한 N4 파아지의 DNA를 형질전환의 방법으로 *rtn* 유전자를 갖고 있는 대장균에 도입시켰을 때 정상적인 N4 파아지입자가 만들어져 나오는 것을 확인하였는데, 이는

\*To whom all correspondences should be addressed.

*rtn* 유전자 또는 유전자의 산물이 적어도 세포내에서 N4의 감염을 방해하는 것은 아니라는 것을 암시한다 (Chae, 1987). 그러나 *rtn* 유전자에 의해 대장균이 N4에 대해 내성을 나타내는 기작에 대한 연구는 구체적으로 보고된 바 없다.

본 연구에서는 *rtn* 유전자가 기능을 나타내는데 필요한 부위를 알아내고 *rtn* 유전자의 가능한 promoter 부위를 찾아 대장균내에서 promoter로서의 기능을 수행할 수 있는지의 여부를 확인하고자 하였다.

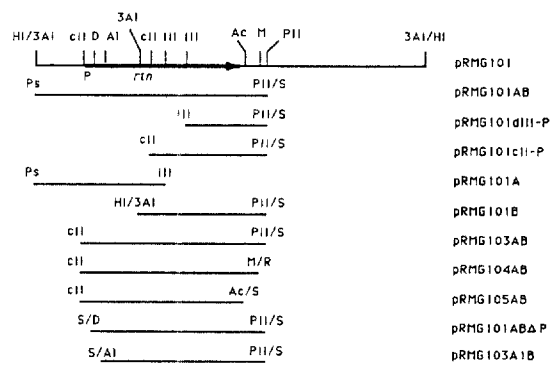
**재료 및 방법**

**균주, 배지, 플라스미드 및 파아지**

본 연구에서 사용된 *P. vulgaris*, *E. coli* HB101, *E. coli* JM83에 대해서는 이미 언급한 바 있다(Chae and Yoo, 1986). *E. coli* N100균주는 전북대학교 화학과와 박충웅 교수로 부터 구하였다. M9 최소배지에 단일 탄소원으로 glucose 또는 glycerol을 사용하였다. 사용된 배지는 LB와 M9 최소 배지이고 또 필요에 따라 30 µg/ml의 ampicillin과 2mM의 IPTG를 첨가하였다. 대장균의 galactokinase 융합벡터인 pKO-100과 pKO-100에 대장균의 galactokinase의 promoter가 들어있는 플라스미드 pKG-1800은 Schmit 박사로부터 얻었고, pYLP1P2P3은 pKO-100에 *mnpB* 유전자의 promoter가 들어있는 플라스미드이다.(Lee, 1984). N4 파아지는 한국과학기술원의 유육준 박사로부터 분양받아 Falco등 (1980)의 방법에 따라 증식 분리하여 사용하였다.

**유전자 조작 및 재조합 플라스미드**

모든 유전자의 조작은 Maniatis등 (1982)의 방법에 따라 수행하였다. 분리된 *rtn* 유전자의 일부 또는 전부를 포함하고 있는 재조합 플라스미드의 유전자 지도는 Fig. 1에 나타나 있다. pRMG101AB를 PstI과 HindIII로 완전히 절단하여 약 1.4 kb의 유전자 절편을 전기영동 겔에서 분리하여 같은 제한 효소로 절단한 pUC18과 재조합시켜 pRMG101A를 얻었다. 또한 pRMG101AB를 PstI과 EcoRI으로 절단하여 *rtn* 유전자를 갖고 있는 2.4 kb의 유전자 절편을 분리하여 Sau3AI으로 부분절단하고 이로부터 1.5 kb의 유전자 절편을 분리하여 BamHI과 EcoRI으로 절단한 pUC19과 재조합시켜 pRMG101B를 얻었다. *rtn* promoter가 없는 *rtn* 유전자의 표현형질을 관찰하기 위하여 pRMG101ABΔP를 제조하였다. pRMG101AB를 PstI과 EcoRI으로 절단하여 2.4 kb의 DNA 절편을 분리하고 이를 DraI으로 부분절단하여 promoter 부위를 제외한 *rtn* 유전자를 포함하고 있는 약 1.9 kb의 DNA 절편을 분리하였다. 이 절편을 SmaI과 EcoRI으로 절단한 pUC19과 재조합시켜 pRMG101ABΔP를 만들었다. pRMG101AB를 EcoRI으로 완전히 절단하여 선형 DNA를 만든 다음 HincII로 부분절단하여 2.0 kb의 DNA 절편을 분리하였다. 이 DNA 절편을 HincII와 EcoRI으로 완전히 절단한 pUC19에 재조합시켜 pRMG103AB를



**Fig. 1.** Subcloning of parts of *rtn* gene. All subcloned fragments except that in pRMG101A were inserted into multicloning sites of pUC19, and that in pRMG101A into pUC18 (see text) Restriction enzymes at both ends of fragments represented junctions between *P. vulgaris* DNA and vectors. P, promoter; III, HindIII; 3AI, Sau3AI; AI, AluI; Ac, AccI; cII, HincII; D, DraI; HI, BamHI; M, MluI; PII, PvuII; Ps, PstI; R, EcoRI; S, SmaI.

얻었다. pRMG103AB를 MluI과 EcoRI으로 완전히 절단하여 MluI-EcoRI 전편을 없애고 endfilling하여 4.6 kb의 pRMG104AB를 만들었다. pRMG103AB를 AccI과 SmaI으로 완전히 절단하여 AccI-SmaI 절편을 제거함으로써 4.4 kb의 pMG105AB를 얻었다. pRMG103AB를 HincII로 완전히 절단하여 약 760 bp의 DNA 절편을 얻고 이를 다시 AluI으로 부분 절단하여 580 bp의 DNA 절편을 분리한 다음 SmaI과 HincII로 완전히 절단한 선형 pUC19과 재조합하여 pRMG103A1을 얻었다. 이 pRMG103A1을 HincII로 완전히 절단하여 얻은 선형 DNA와 pRMG101B를 HincII와 PuvII로 완전히 절단하여 얻은 1.5 kb의 선형 DNA를 재조합시켜 pRMG103A1B를 만들었다. pRMG101AB를 HindIII와 EcoRI, 또는 HincII와 EcoRI으로 완전히 절단하여 약 1.2 kb와 약 1.7 kb의 DNA 절편을 분리한 후 같은 제한효소로 절단한 pUC19과 재조합시켜 pRMG101dIII-P와 pRMG101cII-P를 얻었다. pRMG101AB를 EcoRI과 PstI으로 절단하여 *rtn* 유전자를 포함하는 약 2.4 kb의 DNA 절편을 분리하여 pBR322를 같은 제한 효소로 절단하여 얻은 3.6 kb의 DNA 절편과 재조합하여 pBR322AB를 만들었다. 이 플라스미드의 *rtn* 유전자의 앞쪽(upstream)에는 대장균에서 활성을 나타낼 수 있는 promoter가 없다.

*rtn* promoter의 활성을 측정하기 위하여 pRTN-P1과 pRTN-P2의 제조는 다음과 같이 수행하였다. pRMG103AB를 HincII로 절단하여 *rtn* promoter를 포함하는 760 bp의 DNA 절편을 SmaI으로 절단한 pKO-100과 재조합시켜 pRTN-P1를 얻었다. 그리고

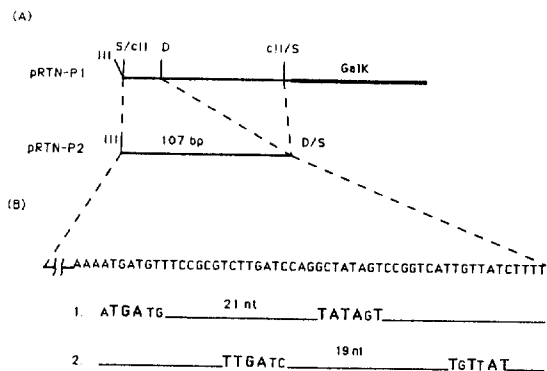


Fig. 2. Structures of DNA fragments having putative promoter sequences.

(A) restriction map of inserts in pRTN-P1 and pRTN-P2. (B) sequences of DNA fragments of 107 bp including putative promoters. Each of promoter sequences was indicated below the sequences. Capital letters of bold phase matched to consensus sequences of *E. coli* promoters. Symbols for restriction enzymes were same as those in Fig. 1.

pRMG103AB를 HindIII와 DraI으로 절단하여 *rn* promoter를 포함하는 107 bp의 DNA 절편을 분리하여 HindIII와 SmaI으로 절단한 pKO-100과 재조합시켜, pRTN-P2를 얻었다. pRNT-P1과 pRTN-P2 유전자 지도는 Fig. 2에 있다.

#### Promoter 활성의 측정

*rn* 유전자의 promoter 활성은 galactokinase 유전자가 결실된 대장균 N100과 promoter 없이 galactokinase의 구조 유전자 부분만을 갖고 있는 플라스미드 pKO-100 및 pKO-100의 유도체인면서 *rn* 유전자의 promoter 부위를 포함하는 플라스미드 pRTN-P1과 pRTN-P2를 이용하여 Lee 등에 의해 기술된 방법(1989)에 따라 측정하였다.

#### DNA 염기서열 결정

DNA염기 서열 결정은 dideoxynucleotide를 이용한 chain termination 방법(Sanger *et al.*, 1977)에 따라 수행하였다.

### 결과 및 고찰

#### Rtn 표현 형질에 필요한 부위

*rn* 유전자가 그 기능을 나타내는데 있어 필요한 부위를 최소화하기 위하여 분리된 *P. vulgaris*의 유전자 일부를 갖는 subclone을 만들어 각 subclone을 갖는 대장균의 N4 파아지에 대한 표현형질을 관찰하고자 하였다. pRMG101A, pRMG101B, 또는 pRMG101AB(Fig. 1)를 대장균에 도입시킨 후 이들 대장균에 대해 N4 파아지가 감염하는지의 여부를

관찰하였다. 위 각 플라스미드의 5' 앞쪽에는 *lac* promoter가 있으나 pRMG101ABΔP와 pRMG101B의 경우에는 *rn* promoter가 없어 *rn* 유전자를 발현시키기 위해서는 *lac* promoter가 유도(induce)되어야 한다. Table 1에서 보듯 pRMG101A 혹은 pRMG101B를 갖고 있을 경우에는 *lac* promoter로부터 유전자 발현을 유도하는 것과는 무관하게 N4 파아지가 감염할 수 있었다. 그러나 *rn* promoter를 포함하여 *rn* 유전자 전부를 갖고 있는 pRMG101AB의 경우에는 *rn* 유전자의 방향과 *lac* promoter의 상대적 방향과 무관하게, *lac* promoter로부터의 유전자 발현의 유도와 무관하게 N4가 감염하지 못하였다. 또한 *rn* promoter를 포함하여 *rn* 유전자 전부를 갖고 있는 경우(pRMG101AB와 pRMG101ABR, pRMG101ABR은 *rn* 유전자의 방향만 반대이고 그 외에는 pRMG101AB와 같음)에는 *lac* promoter에 대한 방향과 무관하게 N4가 감염하지 못하였는데 이러한 결과는 *rn* promoter가 대장균내에서 promoter로서의 활성을 갖는다는 것을 암시한다. 뿐만 아니라 *E. coli* JM83(pRMG101ABΔP)가 LB 배지에서 IPTG와 같은 유도물질(inducer)의 존재와 무관하게 N4에 대해 내성을 갖는 것으로 보아 *rn* promoter 만이 반드시 필요한 것으로 생각되지 않는다. LB 배지에서 자란 이 균주에서 *lac* promoter를 유도하지 않아도 N4에 대해 내성을 나타내는 것은 아마도 LB 배지에서 *lac* promoter로부터의 basal level의 유전자 발현이 유도하지 않았을 경우에도 최소배지에서의 유전자 발현보다 높기 때문으로 생각된다. *E. coli* JM83(pRMG101B)를 LB 배지에서 키우면서 *lac* promoter를 유도하였을 때와 하지 않았을 때 발견되는 Rtn' 단백질의 양이 큰 차이가 없다는 결과(미발표)와 최소배지에서 *lac* promoter를 유도하였을 때와 하지 않았을 때 Rtn' 단백질의 양이 큰 차이가 있다는 결과(미발표)가 이러한 가능성을 뒷받침한다. 그리고 최소 배지에서 pRMG103A1B가 *rn* 유전자 앞쪽에 발현되는 promoter가 있을 경우 N4에 대해 내성을 나타낸다는 결과와 앞쪽에 발현되는 promoter가 없을 경우 N4에 대해 민감하다는 결과로 미루어 *rn* 유전자의 promoter는 DraI 자리부터 또는 그 보다 앞쪽에 존재할 것이라는 짐작을 할 수 있다. 결국 *rn* 유전자가 독립적으로 형질을 나타내는데 필요한 부위는 앞의 HincII 자리부터 AccI 자리까지임을 알 수 있다.

#### *rn* promoter 기능부위의 promoter활성 측정

*rn* 유전자의 염기서열로 볼 때 대장균내에서 활성을 나타낼 수 있는 promoter가능 부위가 있는데 이 부분에서 대장균 promoter의 consensus sequence (Hawley and McClure, 1983)와 유사한 부분이 Fig. 2(B)에 나타나있다. 전체적으로 -35, -10부위에 해당될 수 있는 서열이 그림의 1, 2 두 가지 조합으로 나타나는데 두 가지 조합으로 나타나는데 두 가지 조합에서 -35, -10 부위사이의 spacer의 거리는 대장균 promoter의 consensus sequence의

**Table 1.** Phenotypes of various subclones against N4 phage.

Subclone	Phenotype <sup>a</sup>			
	LB medium		Minimal medium <sup>b</sup>	
	Uninduced	Induced <sup>c</sup>	Uninduced	Induced
<i>E. coli</i> JM83				
pUC19	1.00±0.01	1.15±0.10	S <sup>d</sup>	S
pRMG101A	0.86±0.03	0.83±0.01	N.D. <sup>e</sup>	N.D.
pRMG101B	0.66±0.15	0.63±0.02	S	S
pRMG101AB	0.00	0.00	N.D.	N.D.
pRMG101ABR <sup>f</sup>	0.00	0.00	N.D.	N.D.
pRMG101ABΔP	0.00	0.00	S	?
pRMG103A1B	N.D.	N.D.	S	R <sup>h</sup>
pRMG101dIII-P	S	S	N.D.	N.D.
pRMG101cII-P	S	S	N.D.	N.D.

<sup>a</sup>Phenotypes were represented by relative efficiency of plating(e.o.p.), or sensitive or resistant. All experiments were done at least three times.

<sup>b</sup>The minimal medium used was M9 medium with glucose as a carbon source. When induction was necessary, glycerol was used as a carbon source.

<sup>c</sup>Induction was done by addition of 2 mM IPTG into medium.

<sup>d</sup>S indicated sensitive to N4 phage with e.o.p. of larger than 0.1.

<sup>e</sup>not determined.

<sup>f</sup>That was constructed according to the same procedures as pRMG101AB except using pUC18 instead of pUC19. Thus orientation of *rim* gene is reverse to *lac* gene.

<sup>g</sup>Phenotype could not be determined because the subclone did not grow in that condition.

<sup>h</sup>R indicated resistant to N4 phage with no detectable e.o.p. when several hundreds of P.F.U. of N4 particles were infected.

spacer인 15-21 nucleotide(Hawley and McClure, 1983)와 일치하게 각각 21, 19 nucleotide이다. 또한 -35, -10 부위의 여섯 nucleotide의 서열 중 각각 3-4 nucleotide가 consensus sequence와 일치하고 그 중 보다 conserve된 -35 부위의 TTG-, -10 부위의 TA-T(McClure, 1985)와 2-3 nucleotide가 일치하고 있다. 따라서 두 조합 모두 promoter로서의 기능을 수행할 수 있다고 생각되는데 두 가지 조합 모두 혹은 어느 한 가지 조합이 실제 promoter로서 역할을 하는지 아직 확실하지 않다. 이 두 조합의 염기서열은 대장균 promoter의 consensus sequence와 완전하게는 일치하지 않는다. 그렇지만 대장균 promoter로 알려진 것 중 염기서열이 consensus sequence와 완전하게 일치하는 promoter가 거의 없다는 사실로 볼 때 위 두 조합이 *rim* promoter로서의 기능을 수행할 수 있을 것이라는 짐작을 가능하게 한다. 대장균 promoter의 consensus sequence와 같은 염기서열을 갖는 semisynthetic promoter는 promoter의 활성으로 최대치를 나타내어 *in vitro*와 *in vivo*에서 transcription initiation 빈도가 매우 높다는 것이 확인되어 있고(Amann *et al.*, 1983; DeBoer *et al.*, 1983; Rossi *et al.*, 1983; Mulligan *et al.*, 1984; Brosius *et al.*, 1985). 또한 어떤 promoter에서 돌연변이가 일어나 그 염기서열이 consensus sequence에 가깝게 바뀌면 그 돌연변이는 promoter로 볼 때 up mutation이고 반대로

**Table 2.** Determination of e.o.p. of phages on the lawns of four bacterial clones.

Clones	N4 phage		Φ80 <sub>vir</sub>	
	No. of plaque	e.o.p.	No. of plaque	e.o.p.
<i>E. coli</i> HB101				
none	255	1.00	287	1.00
pBR322	233	0.93	261	0.91
pBR322AB	98	0.41	252	0.87
pRMG101AB	0	0.00	246	0.85

consensus sequence와 달라지는 방향으로 돌연변이가 일어나면 그 돌연변이는 down mutation이라는 보고도 있다(Raiboud and Schwartz, 1984; McClure, 1985). 따라서 *rim* 유전자의 putative promoter들은 그 세기가 매우 강할 것으로 생각되는지는 않는다.

*rim* 유전자에 자신의 promoter가 있는가를 다시 확인하기 위하여 pUC19 보다 copy 수가 적다고 알려져 있는 pBR322에 *rim* promoter를 포함하는 *rim* 유전자가 들어있는 pBR322AB를 제조하였다. 이 경우에는 Table 2에서 보듯 pBR322에 비해 약 0.4의 efficiency of plating(e.o.p.)를 나타낸다는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 *rim* 유전자의 앞쪽에 다른

**Table 3.** Comparison of strengths between *rtm* promoter and other promoters

Experiments	Galactokinase activity <sup>a</sup> of <i>E. coli</i> N100 having				
	pKO-100	pKG-1800	pYLP1P2P3	pRTN-P1	pRTN-P2
1.	26.8	892.3	615.1	85.3	N.D. <sup>b</sup>
2.	24.6	1038.2	847.4	92.9	N.D.
3.	33.9	951.8	681.4	69.3	220.7
4.	10.3	752.4	775.0	80.9	178.6
average	23.9	908.7	729.7	82.1	199.7

<sup>a</sup>Galactokinase activity was represented by nanomole of galactose-1-phosphate per min per cell mass.

<sup>b</sup>not determined.

promoter가 없을 뿐만아니라 *rtm* promoter가 약하고 *rtm* 유전자를 갖고 있는 재조합 플라스미드의 copy 수가 적어서 나타날 수 있는 것으로 생각된다. 그러나 pBR322의 특정 염기서열 또는 pBR322의 유전자 산물이 영향을 미쳐 위와 같은 결과가 나타났을 가능성을 완전히 배제할 수는 없다.

실제로 위의 promoter 가능부위가 promoter 활성이 있는가를 측정하였다. 이 promoter 가능부위가 galactokinase의 구조유전자 앞에 재조합되어 있는 플라스미드 pRTN-P1과 pRTN-P2를 galactokinase의 구조유전자가 결실된 대장균 N100에 도입시킨 후 galactokinase의 활성을 측정함으로써 pRTN-P1과 pRTN-P2에 재조합되어 있는 DNA 절편의 promo-

ter 활성을 알 수 있었다. Table 3에 그 결과가 나타나 있는데 원래 대장균의 galactokinase promoter와 대장균 *rnpB* promoter 절편이 각각 들어 있는 플라스미드 pKG-1800과 pYLP1P2P3에 비하여 promoter로서의 활성은 떨어지나 promoter가 galactokinase 구조 유전자 앞에 들어있지 않는 플라스미드 pKO-100과 비교할 때 확실한 promoter로서의 활성을 보이고 있었다. pRTN-P1과 pRTN-P2 사이에도 약 2.5 배의 promoter 활성의 차이가 나는 것은 Fig. 2(B)에서 보듯 pRTN-P1의 promoter 가능부위와 galactokinase 구조유전자 사이에 pRTN-P2 보다 653 pb에 해당하는 염기서열을 더 가지고 있기 때문으로 생각된다.

## 적 요

*Proteus vulgaris*로 부터 분리된 *rtm*(resistant to N4) 유전자가 대장균 K-12 균주에 들어 있으면, 원래 대장균 K-12 균주에 정상적으로 감염하던 N4 파아지가 감염을 하지 못하였다. 이러한 표현형질을 나타내는데 있어 필요한 *rtm* 유전자의 부위를 결정할 결과 앞쪽의 HincII 부터 AccII 자리까지의 DNA 절편으로 최소화하였다. 또한 *rtm* 유전자는 자신의 promoter를 갖고 있는 것으로 생각되는데 이는 HincII-DraI의 107 bp의 DNA 절편에 있었다. 이 107 bp DNA 절편을 갖고 있지 않은 pRMG103A1B의 표현형질이 앞쪽에 있는 발현가능한 promoter에 따르면 107 bp 절편에 대장균의 galactokinase 구조유전자의 발현을 시킬 수 있는 능력이 있음을 관찰하였는데 이러한 결과는 107 bp에 promoter가 있음을 뒷받침한다. 이 절편에는 promoter가 가능한 두 가지 조합의 염기 서열이 있는데 그 각각은 대장균 promoter의 consensus sequence의 -35, -10 부위와 8개 염기 서열이 일치하였다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단 연구 지원(893-0401-014-2)에 의하여 수행되었음.

## 참 고 문 헌

1. Amann, E., J. Brosius and M. Ptashne, 1983. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**, 167-181.
2. Brosius, J., M. Erfle and J. Storella, 1985. Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. *J. Biol. Chem.* **260**, 3539-3541.
3. Chae, K.S., 1987. Studies on the lambda resistant genes isolated from *Brevibacterium albidum* and *Proteus vulgaris*. Ph.D. dissertation of KAIST, Korea.
4. Chae, K.S. and O.J. Yoo, 1986. Cloning of the lambda resistant genes from *Brevibacterium albidum* and *Proteus vulgaris* into *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **140**, 1101-1105.
5. DeBoer, H.A., L.J. Comstock and M. Vasser, 1983. The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 21-25.
6. Falco, S.C., W. Zehring and L.B. Rothman-Denes, 1980. DNA-dependent RNA polymerase from bacteriophage N4 virions. *J. Biol. Chem.* **255**, 4339-4347.
7. Hawley, D.K. and W.R. McClure, 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**,

- 2237-2255.
8. **Krüger, D.H. and T.A. Bickle**, 1983. Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev.*, **47**, 345-360.
  9. **Lee, Y.**, 1984. Complex promoters in *Escherichia coli*. Ph.D. dissertation of Univ. Missouri-Columbia.
  10. **Lee, Y.M., Y. Lee and C. Park**, 1989. Transcription termination in the M1 RNA gene of *Escherichia coli*. *Kor. Biochem. J.*, **22**, 276-281.
  11. **Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook**, 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
  12. **Mann, M.B., R.N. Rao and H.O. Smith**, 1978. Cloning of restriction and modification genes in *E. coli*: The HhaII system from *Haemophilus haemolyticus*. *Gene* **3**, 97-112.
  13. **McClure, W.R.**, 1985. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 171-204.
  14. **Mulligan, M.E., J. Brosius and W.R. McClure**, 1985. Characterization *in vitro* of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the *TAC* promoter. *J. Biol. Chem.*, **260**, 3529-3538.
  15. **Raiboud, O. and M. Schwartz**, 1984. Positive control of transcription initiation in bacteria. *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 173-206.
  16. **Rossi, J.J., X. Soberon, Y. Marumoto, J. McMahon and K. Itakura**, 1983. Biological expression of an *Escherichia coli* consensus sequence promoter and some mutant derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3203-3207.
  17. **Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson**, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
  18. **Walder, R.Y., J.L. Hartley, J.E. Donelson and J.A. Walder**, 1981. Cloning and expression of the PstI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 1503-1507.

(Received September 2, 1991)

(Accepted September 30, 1991)