

## 일반 *E. coli*에서 *tac* Promoter에 의한 온도감수성 $cI_{857}$ Repressor의 대량생산

강상모\* · 권태종 · 정호권  
건국대학교 공과대학 미생물공학과

### Thermosensitive $cI_{857}$ Repressor Overproduction by *tac* Promoter in General *E. coli*

Kang, Sang-Mo\*, Tae-Jong Kwon and Ho-Kwon Chung

Department of Microbiological Engineering, College of Engineering,  
Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea

**Abstract**—Inserting the  $cI_{857}$  structural gene in the downstream of the *tac* promoter for the overproduction of  $cI_{857}$  repressor protein was studied. DNA fragment containing  $cI_{857}$  repressor gene was amplified by using plasmid pUC12, and partially digested with *Hph*I. Only the  $cI_{857}$  structural gene isolated was inserted in the downstream of the *tac* promoter. Plasmid pDR540- $cI_{857}$  having the *tac* promoter- $cI_{857}$  structural gene insert could be isolated by the immunity of cells resistant at 30°C and cell lysis at 42°C to  $\lambda$  phage  $cI_{90}$ . The amount of  $cI_{857}$  repressor as 17% of total cellular protein were produced by using general *E. coli* as well as *lacI<sup>h</sup>* JM103 having this plasmid.

$\lambda$  phage *cI* repressor는 *cro* repressor와는 반대로  $\lambda$  phage가 *E. coli*에 감염되었을 때 용원균으로 유도하는 repressor이다(1, 2). 이 repressor는  $\lambda$  phage의 operator와 결합할 때 온도에 대한 감수성은 없으나, 온도감수성인  $cI_{857}$  repressor는 operator와의 상호작용이 온도에 의해 크게 변한다(3). 즉 Sussman과 Jacob(4)는  $\lambda$  phage 온도감수성 변이주를 분리하고, 32°C에서 배양한  $\lambda$   $cI_{85}$  용원균(*E. coli* K12 ( $\lambda$  *ind-cI<sub>857</sub>*))의 유발을 각 온도(35~41°C)에서 조사하였다. 이것에 의하면 phage 생산은 37°C 이상의 온도에서 일어났고, 38.5°C 이상에서는 단시간에 속주균이 완전히 사멸되었다. 현재 *cI* repressor는 236개의 아미노산으로 구성된 분자량 26,200의 단백질 이고(5),  $cI_{857}$  repressor는 *cI* repressor의 N 말단으로부터 66번째의 아미노산인 alanine이 threonine으로 바뀐 온도감수성 성질을 갖고 있는 것으로 알려져

있다(6).  $cI_{857}$  repressor 단백질은 2량체(dimer)로서 repressor 활성을 가지며(1, 7, 8), 30°C에서는 operator에 결합하는 정상적인 repressor와 동일한 활성을 보이나 37°C에서는 실활되는 것 같다고 한다(3). 이 때문에 온도감수성  $cI_{857}$  repressor는 right promoter ( $P_R$ ) 및 left promoter( $P_L$ )와 함께 배양온도를 37°C 이상으로 상승시켜서 유전자의 발현을 유도하는 system으로 이용되고 있다(9-13).

*lac* operator 부위를 갖고 있는 *tac* promoter는 *lac* repressor를 과잉 생산하는 *E. coli* 균주에 의해 발현이 repression될 수 있다. 이 repression 능력은 *E. coli*에 유독한 단백질 생산 능력을 조절할 수 있는데 중요한 역할을 한다(14-17). Amann 등(16), Nelson 등(17)은 *tac* promoter에 의한 *cI* repressor 및 그의 변이 repressor의 대량생산은 *lacI<sup>h</sup>* 균주들에 의해서만 가능하다고 보고하고 있다.

여기에서는 *tac* promoter를 이용하여 온도감수성  $cI_{857}$  repressor 단백질을 대량생산하기 위한 plas-

Key words:  $\lambda$  phage, *tac* promoter,  $cI_{857}$  repressor  
\*Corresponding author

mid를 작성하였다. 이 plasmid를 이용한  $cI_{857}$  repressor 단백질 대량생산은  $lacI^o$  균주들에서는 물론 isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside(IPTG) 첨가를 필요로 하지 않는 다른 균주들에서도 가능하기에 온도에 대한 특성과 함께 보고한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

*E. coli* 균주는 LB 배지에 적절한 항생제 농도를 첨가하여 사용하였으며, 본 실험에 사용한 균주, plasmid 및  $\lambda$  phage는 Table 1과 같다.

### Plasmid DNA 분리

Plasmid DNA 분리는 Holmes와 Quiley 방법(25)에 준하였으며 제한효소에 의한 절단, ligation, 전기영동 등 일반적인 recombinant DNA 조작은 Maniatis 등의 방법(19)에 준하였다. DNA 단편은 agarose 혹은 polyacrylamide gel 전기영동에 의해 정제하였다.

### Phage 배양 및 용균성 시험(6, 19, 26)

Maltose가 함유된 LB 배지에 JM103을 접종, 배양한 후 원심분리하여 균체를 10 mM  $MgSO_4$  용액에 현탁한 후 4°C에 보관하였다. 이 용액 적당량에 보관 phage 용액을 혼합하고 37°C, 20분간 항온조에 담근 후, 상층 한천배지(LB+0.7% agar)를 3 ml 첨가한 후,  $\lambda$  한천배지(pepton 1%, NaCl 0.25%(pH 7.0)) 위에 도포하고 37°C에서 배양하였다. 용균된 plaque를 SM용액(NaCl 0.58%,  $MgSO_4$  0.2%, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.01% gelatin)으로 모아 원심분리한 후 상등액에 chloroform을 첨가하여 용균성 시험용으로 4°C에 보관하였다.

용균성은  $\lambda$  phage  $cI_{90}$  용액을  $\lambda$  한천배지에 직선을 긋는 요령으로 도말하고 그 위에 균주의 배양액을 교차시키는 방법으로 도말한 후, 필요 온도에 따라 배양하여 균의 용균, 용원성을 조사하였다.

## 결 과

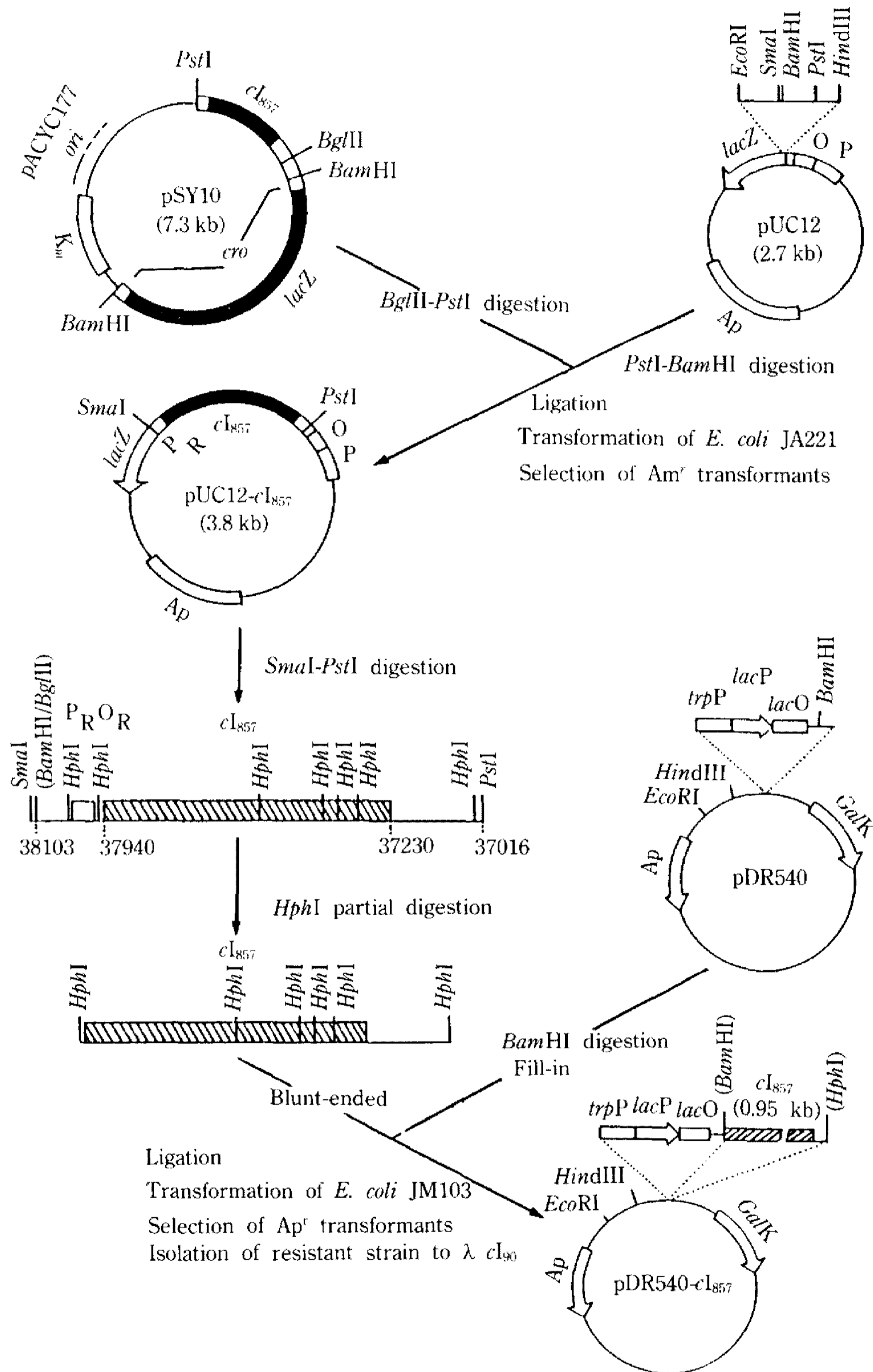
### $cI_{857}$ repressor 구조 유전자의 분리

Amann 등(16)은 *tac* promoter를 이용한  $cI$  repressor 단백질 생산은  $lacI^o$  균주에 의해서만 대량으로

Table 1. Bacterial strains, plasmids and  $\lambda$  phage employed

Strains/plasmids $\lambda$ phage	Genotype and characteristics	Source
AT2471	<i>tyrA4, thi-1, relA1, spoT1</i>	A.L. Taylor <i>et al.</i> (18)
C600	<i>thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, hsdR</i>	J. Sambrook <i>et al.</i> (19)
DH1	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1</i>	J. Sambrook <i>et al.</i> (19)
JA221	<i>leuB6, trp<math>\Delta</math>E5, lacY, hsdR, recA</i>	A.E. Martine-Aris <i>et al.</i> (20)
JM103	<i>thi<math>\Delta</math> (lac-proAB), strA, supE, endA, sbcB, hsdR<sup>-</sup>, F'[traD36, proAB, lacI<sup>o</sup>, lacZ<math>\Delta</math>M15]</i>	J. Felton <i>et al.</i> (21)
RR1	<i>hsdS20 (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44</i>	F. Boliver <i>et al.</i> (22)
pSY10	$cI_{857}$ , p <sub>R<sub>PL</sub></sub> - <i>cro-lacZ-cro</i> , Km <sup>r</sup>	S. Sugimoto <i>et al.</i> (12)
pUC12	Ap <sup>r</sup> , containing the aminotermious of modified $\beta$ -galactosidase gene	J. Vieira <i>et al.</i> (23)
pDR540	Ap <sup>r</sup> , <i>tac, galK</i>	Takara
pUC12- $cI_{857}$	1.1 kb <i>BglII-PstI</i> fragment of pSY10 carrying the $cI_{857}$ gene in pUC12	This work
pDR540- $cI_{857}$	0.95 kb <i>HphI</i> fragment of pUC12- $cI_{857}$ carrying the $cI_{857}$ gnen in pDR540	This work
$\lambda$ $cI_{90}$	$cI^-$	F.W. Pons (24)

Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup> and Km<sup>r</sup> indicate the phenotypes of ampicillin, tetracycline and kanamycin resistance, respectively.

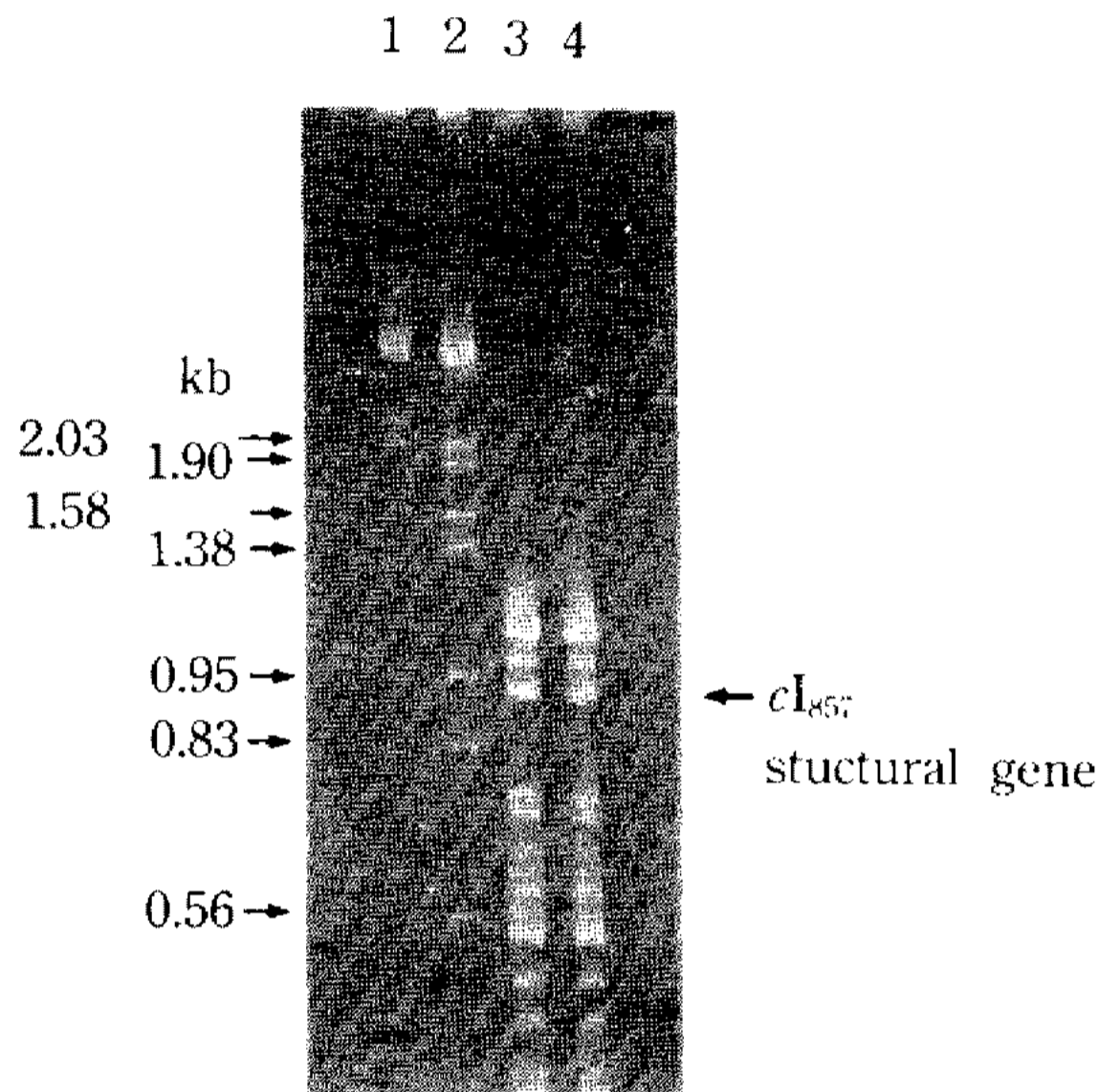


**Fig. 1. Construction of plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub> harbouring the *cI*<sub>857</sub> structural gene in the downstream of the *tac* promoter.**

To construct pUC12-*cI*<sub>857</sub>, the small *Bgl*II-*Pst*I fragment of pSY10 was inserted into the *Pst*I-*Bam*HI site of pUC12. The lots *Sma*I-*Pst*I fragment containing *cI*<sub>857</sub> repressor gene from pUC12-*cI*<sub>857</sub> was extracted from a agarose gel electrophoresis and digested partially with *Hph*I. Only the *Hph*I fragment carrying *cI*<sub>857</sub> structural gene isolated by polyacrylamid gel electrophoresis(PAGE) was blunt ended with T<sub>4</sub> DNA polymerase. Plasmid pDR540 opened with *Bam*HI was filled in with Klenow fragment. To isolate pDR540-*cI*<sub>857</sub>, *E. coli* JM103 transformed by the ligation mixture was selected on LB agar plates containing ampicillin, and the resistant strains to λ phage *cI*<sub>90</sub> were selected.

생산될 수 있다는 것을 보고하였다. 여기서는  $cI_{857}$  repressor 단백질의 대량생산을 위한  $cI_{857}$  repressor 구조 유전자만을 분리할 목적으로  $cI_{857}$  repressor 유전자를 포함하여, DNA 단편을 대량으로 얻어 부분 분해시키는 것을 검토하였다. 먼저  $cI_{857}$  repressor 유전자를 포함하는 pSY10(12)의 1.1 kb *Bgl*II-*Pst*I의 DNA 단편을 분리하고 *Pst*I과 *Bam*HI으로 처리한

pUC12와 ligation하여 얻어진 plasmid를 pUC12- $cI_{857}$ 이라 하였다(Fig. 1). 이 plasmid로부터  $cI_{857}$  repressor 유전자를 포함하는 1.1 kb의 *Pst*I-*Sma*I의 DNA 단편을 분리하였다(Fig. 1). 이 DNA 단편에는  $cI_{857}$  repressor 구조 유전자로부터 3개 임기 앞에 *Hph*I 부위가 있으며, 단편 전체에는 7개의 *Hph*I 부위가 존재한다(27, 28). 그러므로  $cI_{857}$  repressor 유전자를 완전히 포함 하면서 구조 유전자의 최초의 *Hph*I 부위까지를 포함하는 DNA 단편을 얻기 위해 *Hph*I으로 1.1 kb의 DNA 단편을 부분 분해시키고, 3.85%의 polyacrylamide gel에서  $cI_{857}$  구조 유전자만을 분리하였다(Fig. 2).

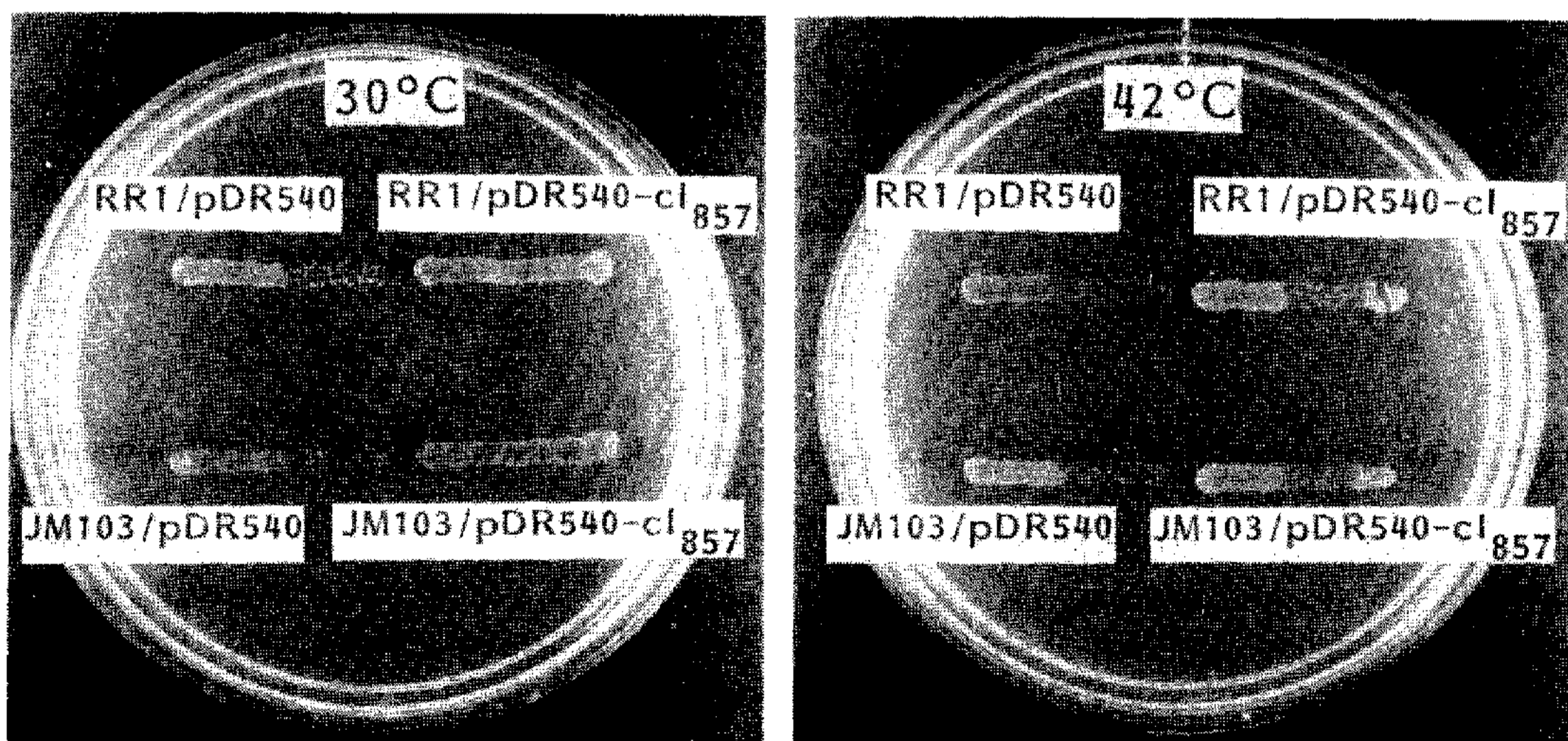


**Fig. 2. Partial digestion of DNA fragments carrying the  $cI_{857}$  repressor gene.**

Line 1,  $\lambda$  phage DNA digested with *Hind*III; Line 2,  $\lambda$  phage DNA digested with *Hind*III and *Eco*RI; Line 3 and Line 4, partial digestion of DNA fragments (*Sma*I-*Pst*I) containing the  $cI_{857}$  repressor gene with *Hph*I. The first bands of the lane 3 and lane 4 are samples of DNA fragments undigested with *Hph*I. Samples were analyzed on a 3.85% PAGE

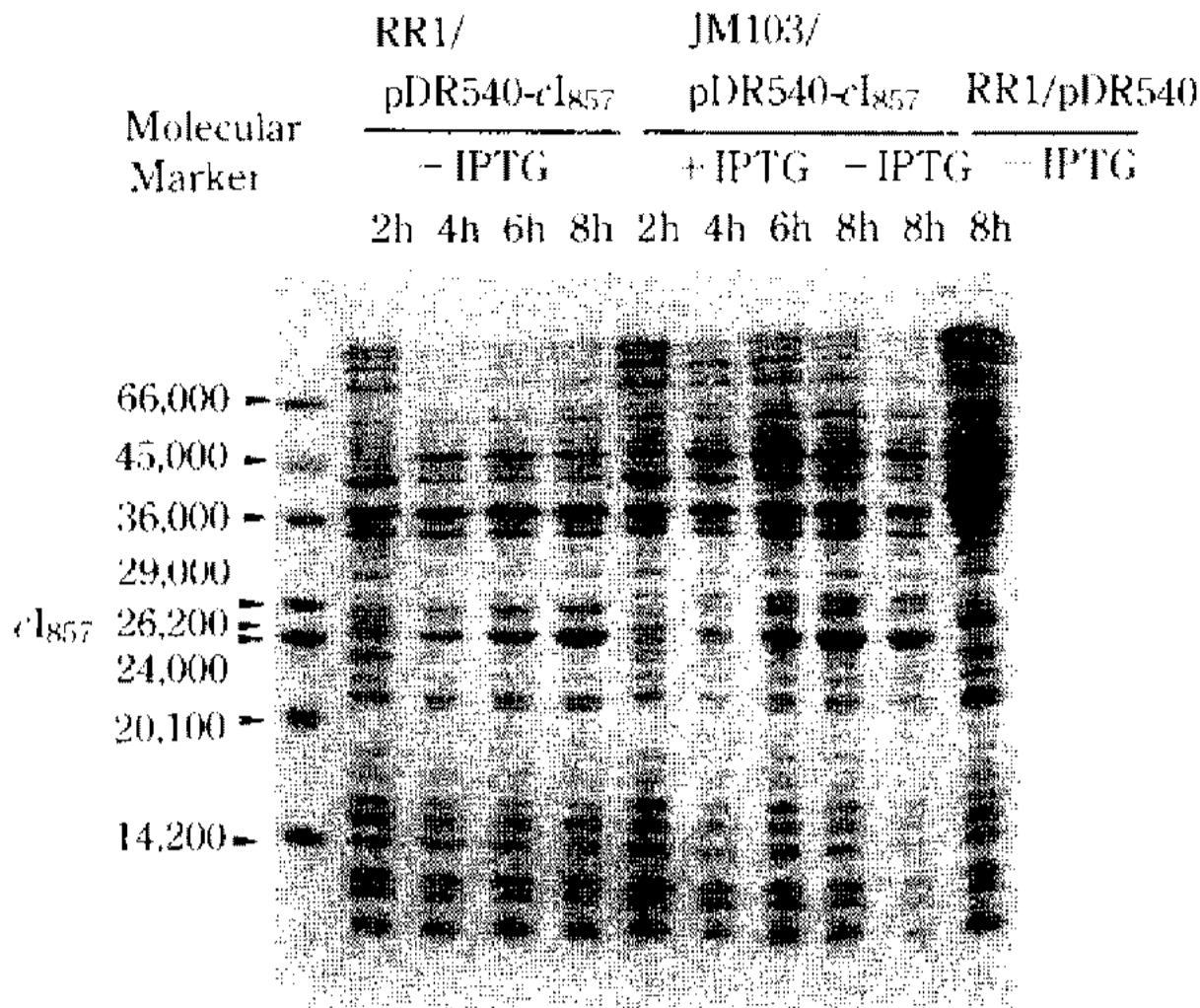
**$cI_{857}$  repressor 구조 유전자의 *tac* promoter 하류에 삽입**

분리한  $cI_{857}$  repressor 구조 유전자를 blunt end로 만들고, 또한 plasmid pDR540은 *tac* promoter 하류의 2번째의 Shine-Dalgarno(SD) 배열 중에 존재하는 *Bam*HI 부위를 절단하고 fill in하였다. 양 DNA 단편을 ligation하고 pDR540의 숙주인 JM103 균주를 형질전환시켰다(Fig. 1). 선택된 형질전환 균주로부터  $\lambda$  phage  $cI_{90}$ 에 대한 감수성 실험에 의해  $cI_{857}$  repressor 구조 유전자가 cloning되어 있는 균주를 선택하였다. 즉,  $\lambda$  phage  $cI_{90}$ 은 *cI* repressor 단백질이 생산되지 않기 때문에(24) *cI* repressor 단백질을 생산하지 못하는 균주는  $\lambda$  phage 감수성 균주로 용균된다. 형질전환된 JM103 균주에  $\lambda$  phage  $cI_{90}$ 을 감염시켜 30°C에서 배양하여 용균되지 않는 균주 3주를 얻었다.



**Fig. 3. Infection of  $\lambda$  phage  $cI_{90}$  to strain JM103 or RR1 harbouring plasmid pDR540 or pDR540- $cI_{857}$  at 30°C or 42°C.**





**Fig. 4. SDS-PAGE of the *cI*<sub>857</sub> repressor protein synthesized with the *tac* promoter in strains RR1 and JM 103.**

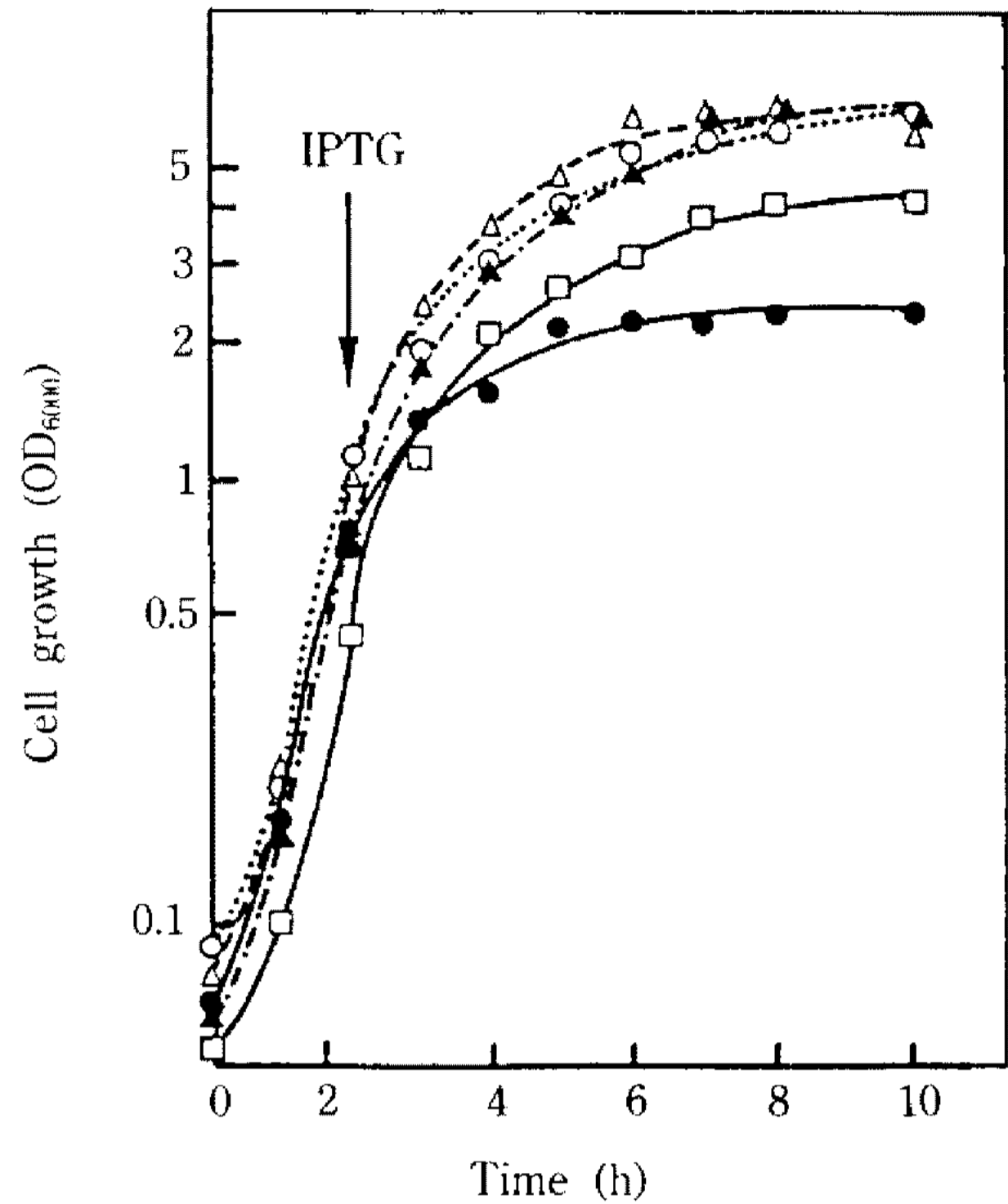
Strain JM103 was induced with 1 mM IPTG at the cell concentration of OD<sub>600</sub>=0.7 (after almost 2 hours from the start of cultivation). Strain RR1 was not induced with IPTG. The indicated times were after the start of cultivation. Adjusted samples of 100 μl at the cell concentration of OD<sub>600</sub>=0.7 were withdrawn and analysed on a 15% SDS-PAGE.

이들 3주를 λ phage *cI*<sub>90</sub>에 감염시켜 42°C에서 조사한 결과 전부 용균되었다(Fig. 3). 이로 인하여 *cI*<sub>857</sub> repressor 구조 유전자가 cloning된 것을 알 수 있었으며, 여기서 얻어진 plasmid를 pDR540-*cI*<sub>857</sub>이라 하였다. Plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>은 *tac* promoter의 첫번째 SD로부터 9 bp, 2번째로부터는 6 pb 떨어져 *cI*<sub>857</sub> repressor 구조 유전자가 cloning된 것이다.

Amann 등(16), Nelson 등(17)은 *tac* promoter에 의한 *cI* repressor와 *cI* 유래 변이 repressor 단백질 생산은 *lacI*<sup>q</sup>의 균주에서만 가능하다고 보고하고 있다. 그러나 plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 사용하여 *E. coli* RR1을 형질전환하고 λ 한천배지상에서 λ phage *cI*<sub>90</sub>을 감염시킨 결과, Fig. 3과 같이 30°C에서는 용균되지 않고 42°C에서는 용균되는 것을 알았다. 그러나 pDR 540만을 갖는 RR1은 30°C에서도 용균되었다.

**Plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>에 의한 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 증폭**

Plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 갖는 JM103, RR1 균주의 전배양액을 1% ampicillin+LB 배지에 접종하고 30°C에서 배양하면서 2시간 간격으로 같은 OD값이 되도록

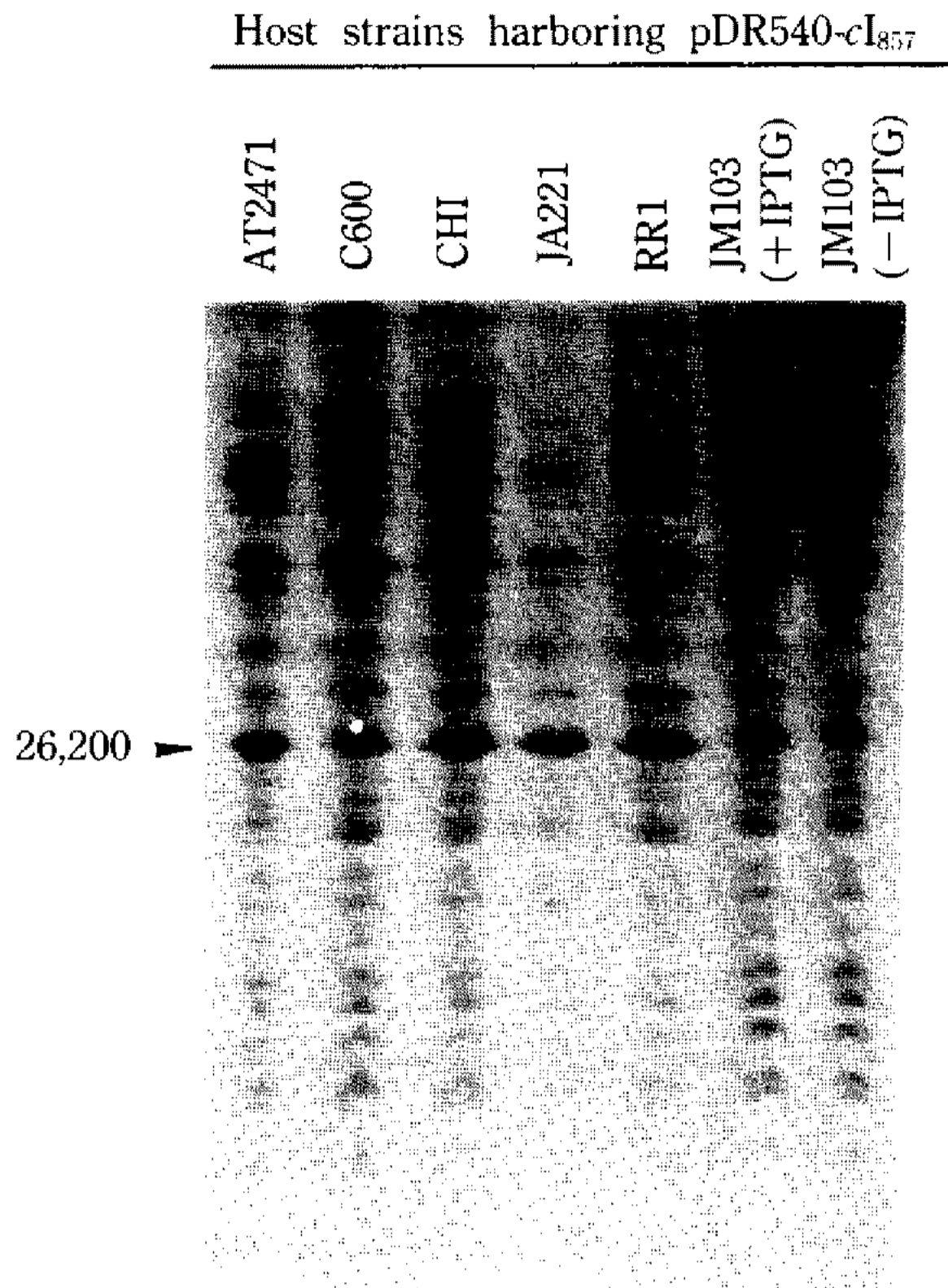


**Fig. 5. Cell growth of *E. coli* strains harbouring plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>.**

Adding IPTG on strain JM103 was the same as Fig. 4. Cells grown at LB mediums. Ampicillin was added to a final concentration of 40 μg/ml. Strains used were (●) JM103+IPTG, (□) RR1, DH1, (△) C600, (▲) AT 2471.

록 배양액을 취하여 균체 단백질을 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 검토하였다(Fig. 4). 그 결과 RR1 균주와 IPTG 첨가한 JM 103 균주에서는 *cI*<sub>857</sub> repressor에 해당되는 단백질이 배양시간과 더불어 증폭됨을 알 수 있었다. IPTG 비존재하의 JM103 균주는 존재하의 균주보다 약 절반 이하의 단백질이 증폭되었으며, vector만 갖고 있는 RR1에서는 repressor 단백질 생산이 없는 것을 알 수 있었다. 이로 인하여 RR1에서도 *tac* promoter에 의해 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 증폭시킬 수가 있었다.

Plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 가지고 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 효율적으로 생산하기 위해 각종의 *E. coli*를 형질전환시켜 균체 증식을 조사하였다(Fig. 5). Fig. 5에 의하면 plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 갖는 JM103은 IPTG 첨가 후 균체 증식에 저해가 일어났다. 각 균주를 10시간 배양 후 SDS-PAGE에서 *tac* promoter에 의해 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 생산량을 검토한 결과, IPTG 비존재하에서의 JM103 균주(전 단백질의 약 7%)를 제외하고는 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질이 같은 정



**Fig. 6. SDS-PAGE of host strains harbouring plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>.**

Adjusted samples of 100  $\mu$ l at the cell concentration of OD<sub>600</sub>=0.7 were withdrawn after 10 hours and analysed on a 15% SDS-PAGE.

도로 증폭(전 단백질의 약 17%)된 것을 알았다(Fig. 6).

이들의 결과로부터 온도감수성 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 경우 *lacI*<sup>q</sup> 이외의 *E. coli*에서도 *tac* promoter에 의해 대량생산이 가능한 것을 알았다.

## 고 찰

Plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>은 *tac* promoter의 첫번째 SD로부터 9 bp, 2번째로부터는 6 bp 떨어져 *cI*<sub>857</sub> 구조 유전자를 갖는 것으로 균체 단백질당 17% 정도 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 생산하였다.

한편, Amann 등(16)이 만든 plasmid pEA302T 및 pEA305는 *tac* promoter로부터 8 bp 떨어져 *cI* 구조 유전자를 가지며 IPTG 비존재시는 각각 1%씩, 존재시는 18, 26%씩 균체당 *cI* repressor 단백질을 생산하였다고 보고하였다. 여기서 JM103/pDR540-*cI*<sub>857</sub> 경우, IPTG 비존재시 약 7%의 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질 생산을 보이는 것에 비해, pEA302T 및 pEA305의

경우는 1% 정도 밖에 *cI* repressor를 생산하지 않는 이유는 이 때 사용한 숙주가 같은 *lacI*<sup>q</sup>이지만 JM103과는 달리 고농도로 *lac* repressor를 생산하는 W3110 *lacI*<sup>q</sup>L8을 사용하였기 때문으로 생각된다(29). 그리고 plasmid pEA302T, pEA305에는 pDR540-*cI*<sub>857</sub>과는 달리 전사 terminator가 들어 있는데, *cI* repressor 단백질의 생산량이 각각 18, 26%로 차이를 나타내는 이유는 이들이 들어 있는 위치가 틀리기 때문으로 생각되며, *tac* promoter에 의한 *cI*과 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 생산량이 3개의 plasmid 모두 틀리는 이유는 SD의 차도 있지만, 전사 terminator의 존재와 위치에 의한 차로 생각된다.

*tac* promoter에 의한 *cI* repressor 단백질의 생산에는 *cI* repressor 단백질의 비특이적 DNA에 대한 결합력이 높아 *lacI*<sup>q</sup> 균주 이외는 숙주가 사멸한다고 한다(12). 그러나 plasmid pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 가지고 있는 숙주가 온도감수성인 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 대량으로 생산함에도 불구하고 균주가 정상적으로 생육할 수 있는 것으로 보아 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질은 균체내에서 적어도 *cI* repressor 단백질보다 DNA와의 결합력에 있어서 비특이성이 낮다고 생각된다.

현재 이 plasmid에 의해 대량으로 얻어진 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 정제하여 operator와의 온도에 따른 binding assay를 하고 있는데, 결합 활성 결과에 의해 비특이적 결합 정도와 온도 shift-up법으로 물질생산에 사용되고 있는 *cI*<sub>857</sub> repressor 단백질의 온도에 따른 특성을 정확히 알 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

*cI*<sub>857</sub> repressor 단백질을 대량으로 얻기 위해 *tac* promoter 하류에 *cI*<sub>857</sub> 구조 유전자를 삽입하는 것을 검토하였다. *cI*<sub>857</sub> 유전자를 포함하는 DNA 단편을 plasmid PUC12를 이용하여 대량생산 후, *Hph*I으로 부분 분해하여 *cI*<sub>857</sub> 구조 유전자만을 취하고, *tac* promoter 하류에 삽입시켰다. 그리고  $\lambda$  phage *cI*<sub>90</sub>에 의해 30°C에서는 용원성을, 42°C에서는 용균성을 보이는 균주를 선택함으로써 *tac* promoter 하류에 *cI*<sub>857</sub> 구조 유전자가 삽입된 pDR540-*cI*<sub>857</sub>을 선택할 수가 있었다. 이 plasmid는 *lacI*<sup>q</sup> JM103 뿐만 아니라 각종 *E. coli*에서 *cI*<sub>857</sub>-repressor 단백질을 균체 단백질당 약 17%까지 생산하였다.

## 참고문헌

1. Ptashne, M., A.D. Johnson and C.O. Pabo: *Scientific American*, **247**, 106 (1982).
2. 品川日出夫: 蛋白質 核酸 酵素, **22**, 1271 (1977).
3. Attardi, G., S. Naono, J. Rouviere, F. Jacob and F. Gros: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 363 (1963).
4. Sussman, R. and F. Jacob: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, **254**, 1517 (1962).
5. Sauer, R.T. and R. Anderegg: *Biochemistry*, **17**, 1092 (1978).
6. Hecht, M.H., H.C.M. Nelson and R.T. Sauer: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2676 (1983).
7. Johnson, A.D., A.R. Potete, G. Lauer, R.T. Sauer, G.K. Ackers and M. Ptashne: *Nature*, **294**, 217 (1981).
8. Pabo, C.O., W. Krovatin, A. Jeffrey and R.T. Sauer: *Nature*, **298**, 441 (1982).
9. Hedgpeth, J., M. Ballivet and H. Eisen: *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 197 (1978).
10. Shimatake, H. and M. Rosenberg: *Nature*, **292**, 128 (1981).
11. Sugimoto, S., M. Yabuta, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 336 (1985).
12. Sugimoto, S., T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *Chem. Eng. Commun.*, **45**, 241 (1986).
13. Sugimoto, S., M. Yabuta, N. Kato, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *J. Biotechnol.*, **5**, 237 (1987).
14. Russell, D.R. and G.N. Bennett: *Gene*, **20**, 231 (1982).
15. de Boer, H.A., L.J. Comstock and M. Vasser: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 21 (1983).
16. Amann, E., J. Brosius and M. Ptashne: *Gene*, **25**, 167 (1983).
17. Nelson, H.C.M. and R.T. Sauer: *Cell*, **42**, 549 (1985).
18. Taylor, A.L. and C.D. Trotter: *Bacteriol. Rev.*, **31**, 332 (1967).
19. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold spring harbor, New York (1982).
20. Martinez-Aris, A.E. and M.J. Casadaban: *Mol. Cellular Biol.*, **3**, 580 (1983).
21. Felton, J.: *Biotechniques*, **1**, 42 (1983).
22. Boliver, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa and S. Falkow: *Gene*, **2**, 95 (1977).
23. Vieira, J. and J. Messing: *J. Gene*, **19**, 259 (1982).
24. Pons, F.W.: *Mutation Res.*, **129**, 311 (1984).
25. Holmes, D.S. and M. Quiley: *Anal. Biochem.*, **114**, 193 (1981).
26. 富沢純 : バクテリオファージの實驗, 岩波書店 (1970).
27. Sanger, F., A.R. Coulson, G.F. Hong, D.F. Hill and G.B. Petersen: *J. Mol. Biol.*, **162**, 729 (1982).
28. Meyer, B.J., D.G. Kleid and M. Ptashne: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4785 (1975).
29. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis: *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd), Cold spring harbor, New York, p.A.9 (1989).

(Received January 17, 1991)