

## 대장균에서 Superoxide 라디칼에 의하여 유도되는 프로모터의 탐색 및 특성 분석

고영상 · 노정혜\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과 서울대학교 분자미생물학연구센터

*Escherichia coli*의 superoxide 라디칼 유도발현성 유전자의 탐색을 위하여 먼저 superoxide 라디칼에 의하여 발현이 유도되는 프로모터를 탐색하였다. 이를 위하여, 프로모터 탐색벡터인 pJAC4를 이용하여 *E. coli* MG1655 균주로부터 프로모터 library를 구성하였다. Ampicillin 농도구배평판법을 이용하여 프로모터 세기가 다른 클론들을 구별하여 프로모터 세기가 약한 것부터 중간정도까지 383개의 클론을 선별하였다. 이들 프로모터 클론들의 superoxide 라디칼 유도발현성을 paraquat를 첨가한 ampicillin 농도구배평판에서 조사하였다. 이중 3개의 클론이 paraquat에 의하여 유도됨을 확인하였고, 유도배율은 1.4~4배 정도이었다. 이들 프로모터의 염기서열을 결정한 결과 기존의 database에 등록되어 있는 *E. coli* 염기서열들과는 다른 새로운 유전자들을 알았다. 이들 프로모터에 대하여 primer 연장법과 S1 뉴클리아제 분석을 통하여 전사개시 자리를 결정하였고, paraquat 처리시 mRNA의 양이 증가함을 관찰하였다. 특히 클론 5의 경우는 두 개의 전사개시 위치를 가지고 있으며, paraquat 처리시 상위 부분의 전사개시 자리가 선택적으로 사용됨을 알 수 있었다. 프로모터 서열을 검색한 결과, RNA 중합효소( $E\sigma^{70}$ )에 의하여 인지되는 -10과 -35 부위를 가진 클론은 클론 5 뿐이었고, 나머지는 보존된 염기서열을 찾을 수 없었다. 이는 이들 프로모터들이 독특한 부류에 속하는 종류들로서, 새로운 전사조절 인자를 요구할 가능성을 시사한다.

**KEY WORDS** □ *E. coli* promoter library, ampicillin gradient plate assay, superoxide-inducible promoters, paraquat.

산소는 호흡에서 최종 전자수용체로 모든 호기성 생물체의 성장에 필수적 인자인 반면, 세포 내 산소의 존재는 활성산소속에 의한 산화·환원 반응을 일으켜 단백질, 지질, 핵산 등 중요한 생체 고분자에 손상을 입히며 관절염, 백내장, 암 등을 포함한 다양한 질병과 노화를 야기한다(8). 산화적 스트레스는 높은 분압의 산소 뿐 아니라  $\gamma$ 선 조사, 근자외선 조사, 과산화수소, 산화환원 회전성(redox-cycling) 물질에 의하여 유발될 수 있으며 여러 종류의 자유 라디칼이 관여한다(8, 10).

산화적 스트레스에 대응하는 방어 기작은 *E. coli*와 *Salmonella typhimurium*에서 많이 연구되었고 보호 작용을 하는 몇 가지의 단백질과 그 유전자가 밝혀졌다(6). Superoxide dismutase(*sodA*, *sodB*), catalase(*katG*, *katE*), alkyhydroperoxide reductase(*ahpC*, *ahpF*), glutathione reductase(*gorA*) 등과 같이 라디칼을 제거하는 효소와 exonucleaseIII(*xthA*), endonucleaseIV(*nfo*) 등과 같은 DNA 수선효소, 그리고 NADH dehydrogenase(*ndh*)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase(*zwf*)와 같은 대사과정의 효소들이 산화적 스트레스에 대한 방어 기작에 관여되어 있음이 보고되었다(6).

방어 기능을 하는 이들 유전자의 발현은 특정 조절

단백질에 의하여 조절된다. Paraquat, plumbagin, menadione 등 superoxide 라디칼( $O_2^{\cdot -}$ )을 발생시키는 물질에 의하여 *sodA*, *nfo*, *zwf*, *micF* antisense RNA 등의 발현이 유도되고 이들은 SoxR과 SoxS 단백질에 의하여 조절된다(3, 16, 18). 또한 과산화수소에 의하여 *katG*, *ahpC*, *ahpF*, *gorA* 등이 유도되고 이들은 OxyR 단백질에 의하여 발현이 조절된다(4, 5).

특히 superoxide 라디칼을 발생시키는 paraquat, plumbagin, menadione 같은 산화환원 회전성(redox-cycling) 물질을 *E. coli* 나 *S. typhimurium*에 처리할 경우 30가지 이상의 단백질이 특이적으로 유도됨이 이차원 전기영동을 통하여 확인되었다(7, 17). 이 중에는 Mn-superoxide dismutase, endonuclease-IV, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADH dehydrogenase 등 기능이 알려진 효소와 기능이 밝혀지지 않은 Soi-28, Soi-17/19 등이 포함된다(7, 17). 그 이외의 단백질의 기능이나 그 유전자 구조와 조절 등에 대하여 아직까지 분자적 수준의 연구가 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 *E. coli*의 프로모터 library를 구성하여 superoxide 라디칼에 의하여 유도되는 프로모터를 탐색하였다. 이 library는 프로모터 세기에 따라

$\beta$ -lactamase의 발현양이 조절되므로 유도발현성 프로모터를 찾기에 편리하다.

## 재료 및 방법

### 프로모터 library의 구성

*E. coli* MG1655(T. Yura 박사 제공)에서 염색체 DNA를 추출한 후 *Sau3AI* 제한효소로 절단하였다. DNA 절편을 1.5% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여, 100~500 bp 길이의 절편들을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, NA45)을 이용하여 전기용출하였다. 프로모터 탐색용 벡터로 사용한 pJAC4는 일본 국립유전학연구소(N.I.G.)의 A. Ishihama 박사로부터 제공받았다(Fig. 1). *Bam*HI과 alkaline phosphatase를 처리한 pJAC4 플라스미드와 염색체 절편을 ligation 하여서 *E. coli* DH1 균주를 형질전환하였다. Kanamycin(50  $\mu$ g/ml)과 ampicillin(8  $\mu$ g/ml)이 포함된 LB 평판배지에서 형질전환체를 선별하였다.

### Ampicillin 농도구배평판 분석법(ampicillin gradient plate assay)

Ampicillin 농도구배평판은 Bryson과 Szybalsky (2)의 방법에 따라 만들었다. 평판을 기울인 상태에서 아래층에 고농도의 ampicillin을 첨가한 배지를 붓고 굳힌 후, 위층에 저농도의 ampicillin을 첨가한 배지를 부었다. 상온에서 1시간 방치하여 농도구배가 형성되도록 하고 필요에 따라 paraquat을 첨가하였다. 평판배지에서 분리된 각각의 형질전환체를 LB 0.5 ml에 현탁한 후 37°C에서 2~3시간 배양하였다. 멸균된 이쭉시개를 이용하여 배양액을 농도구배를 따라 일렬로 도말하였다. 37°C에서 하룻동안 배양한 후 농도구배를 따라 자란 길이로서 ampicillin 내성 정도를 측정하였다.

### 세균배양 및 세포 추출물의 제조

*E. coli* MG1655 또는 프로모터를 함유하는 재조합 pJAC4 플라스미드를 지닌 DH1을 각각 LB 또는 kanamycin(50  $\mu$ g/ml)이 있는 배양액에서 지수성장기(OD<sub>600</sub>=0.3)까지 진탕배양한 후 동량으로 나누어 한 쪽에는 paraquat을 100  $\mu$ M 되게 처리하고, paraquat을 처리하지 않은 대조구와 동일조건으로 37°C에서 1시간 더 배양하였다. 세균 배양액 10 ml을 원심분리하여 세포를 수확한 후 0.1 M 인산 완충용액 1 ml로 세척하고 위 완충용액 0.5 ml에 재현탁한 다음 -70°C에 한시간 내지 두시간 방치하였다. 얼린 세포를 녹인 후 glass bead(직경 0.1 mm)를 넣고 mini bead-beater(Biospec)로 세포를 파쇄한 후 4°C에서 원심분리하여(12,000 rpm, 20분) 상층액을 얻었다. 이렇게 얻어진 세포 추출물을 여러 개의 tube에 소량씩 나누어 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

### $\beta$ -Lactamase 활성도 측정

Sawai 등(15)의 방법을 따랐다. 세포 추출물을 0.1 M 인산 완충용액(pH 7.0)으로 적당히 희석하여 그

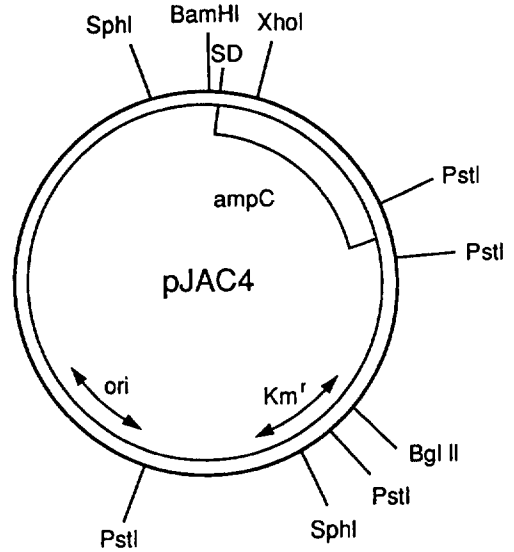


Fig. 1. Genetic map of promoter-probing plasmid, pJAC4.

*Sau3AI* fragments of total *E. coli* chromosomal DNA ranging from 100 to 500 base pairs were cloned into the *Bam*HI site. SD, ribosome binding site; *ampC*, gene for  $\beta$ -lactamase; *Km<sup>r</sup>*, kanamycin resistance gene; *ori*, origin of DNA replication.

중 1 ml을 시험관에 넣고 30°C 수조에 5분간 방치한 후 20 mM benzyl penicillin(Na-salt, Sigma) 0.2 ml을 재빨리 섞어줌으로써 반응을 시작하였다. 20분 후 요오드 시약을 넣어서 반응을 중지시키고 상온에 10분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 측정법에 의하여 흡광도 변화량과 효소량의 상관관계를 살펴본 결과, 넣어준 총 benzyl penicillin 중 80% 이하가 가수분해되는 구간에서 비례 관계가 성립하였다. 효소 활성도 1 unit는 30°C에서 분당 benzyl penicillin 1  $\mu$ mol을 가수분해할 수 있는 효소량으로 정의하였으며 specific activity는 단백질 mg당 활성도(units/mg protein)로 계산하였다.

### DNA 염기서열 결정

프로모터 염기서열 분석은 [<sup>35</sup>S]dATP와 Sequenase(United States Biochemicals)를 이용하여 Sanger의 dideoxy 사슬 종결 방법으로 결정하였다(14). 이때 사용한 primer로는 pJAC4 플라스미드의 multicloning site에 상보적인 염기서열(5'-GGGATCTAGA TATCGATGAATTCG-3')을 가지는 24 mer 길이의 oligonucleotide를 합성하여 사용하였다.

### RNA의 분리 및 정제

*E. coli* 균체를 수확하여 TE 완충용액으로 세척한 후 lysozyme(5 mg/ml)이 포함된 용액(50 mM glucose, 25 mM Tris·Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA) 200

$\mu$ 에 현탁하여 얼음에 5분간 방치하였다. 이 현탁액에 RNAzol B(Biotech Laboratories, Inc.) 200  $\mu$ 를 섞고 클로로포름 40  $\mu$ 를 첨가하여 15초간 vortexing한 후 얼음에 5분간 방치하였다. 15분간 원심분리(12,000  $\times$ g, 4°C)하여 상층액을 수거한 다음 동량의 isopropanol로 침전시켰다. 얼은 침전물을 75% 에탄올로 세척한 후 diethyl pyrocarbonate를 처리한 증류수에 녹여 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

#### Primer 연장법

Sambrook 등(13)의 표준방법을 따랐다. DNA 염기서열 결정에 사용한 primer를 T4 polynucleotide kinase와 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP를 써서 방사성 표지하여 역전사반응의 primer로 사용하였다. 프로모터가 클론된 pJAC4 플라스미드를 지닌 형질전환체에서 추출한 전체 세포질 RNA를 주형으로 사용하였다. RNA 100  $\mu$ g을 표지된 primer( $10^4 \sim 10^5$  cpm)와 섞어 말린 후, 30  $\mu$ l의 hybridization 용액(80% formamide, 40 mM PIPES, pH 6.8, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 녹였다. 85°C에서 10분간 방치하여 변성시킨 후, 30°C에서 12~16시간 hybridization하였다. 에탄올 침전 후 50 mM Tris-HCl(pH 7.6), 60 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 각 1 mM, 1 mM DTT, 1 unit/ $\mu$ l RNasin(Promega), 50  $\mu$ g/ml actinomycin D 등이 포함된 완충용액에 침전물을 녹이고 AMV 역전사효소(제철화학) 20 unit를 첨가하여 42°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 산물을 7 M urea가 포함된 8% polyacrylamide 겔 상에서 전기영동한 후 autoradiography를 수행하였다.

#### S1 뉴클리아제를 이용한 RNA의 분석

S1 뉴클리아제 분석용 핵산 탐침을 만들기 위하여, 프로모터가 클로닝된 pJAC4 플라스미드를 BamHI (또는 XhoI)으로 절단한 후 calf intestine alkaline phosphatase를 처리하여 탈인산화 반응을 하였다. T4 polynucleotide kinase와 [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP를 이용하여 5' 말단표지한 후 SphI으로 절단하여 아가로스 겔 상에 전기영동한 후 표지된 프로모터 절편을 nitrocellulose membrane(Schleicher & Schuell, NA45) 또는 Gene clean kit(Bio101)를 이용하여 회수하였다.

각 RNA 시료(100  $\mu$ g)와 5' 말단이 방사성 표지된 탐침  $10^4 \sim 10^5$  cpm을 섞어 말린 후, 30  $\mu$ l의 hybridization 용액(80% formamide, 40 mM PIPES, pH 6.8, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA)에 녹였다. 85°C에서 10분간 방치하여 변성시킨 후, 52.5°C에서 12~16시간 hybridization하였다. 300  $\mu$ l의 완충용액에서 S1 뉴클리아제를 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다(0.28 M NaCl, 0.05 M sodium acetate, pH 4.5, 4.5 mM ZnSO<sub>4</sub>, 20  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA, 500 units/ml S1 nuclease). 여기에 S1 반응중지용액(4 M ammonium acetate, 50 mM EDTA, pH 8.0, 50  $\mu$ g/ml tRNA) 80  $\mu$ l를 넣어 에탄올 침전시켰다. 침전물을 TE 4  $\mu$ l에 녹인 후 formamide loading 용액(80% formamide, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1 mg/ml xylene

cyanol FF, 1 mg/ml bromophenol blue) 6  $\mu$ l를 첨가하여 100°C에서 5분간 가열하였다. 7 M urea가 들어있는 5% polyacrylamide 겔에서 전기영동한 후 autoradiography를 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 프로모터 library의 구성과 그 특성

*E. coli* 프로모터 library를 만들기 위하여 *E. coli* MG1655의 염색체 DNA를 Sau3AI으로 절단한 후 100~500 bp 길이의 DNA 절편을 분리하여 프로모터 탐색 플라스미드인 pJAC4의 BamHI 자리에 삽입하였다(Fig. 1). pJAC4 플라스미드는 자체 프로모터가 결손되어 있고 ampicillin 내성 구조유전자(*ampC*)상단에 리보솜 결합서열이 있기 때문에 이 플라스미드에 프로모터 DNA 절편이 삽입된 재조합 형질전환체는 kanamycin과 ampicillin에 내성을 지니게 된다(11). 음성 대조구로 pJAC4 플라스미드만을 지닌 형질전환체가 성장하지 못하는 ampicillin 최저 농도를 결정한 결과 8  $\mu$ g/ml이었다. 그러므로 이 농도 이상에서 성장하는 형질전환체는 프로모터 DNA 절편을 함유한 재조합 균주라 판단할 수 있다. 위에서 정한 ampicillin 농도(8  $\mu$ g/ml)로 형질전환체를 선별한 결과 약 1,200개의 독립적인 형질전환체를 얻었고, *E. coli* DNA 절편을 가진 전체 재조합체(kanamycin 내성 형질전환체)에 대하여 프로모터를 함유한 재조합체의 비율은 약 3% 정도이었다.

### 프로모터 세기에 따른 형질전환체의 분류

660개의 ampicillin 내성 형질전환체들에 대하여

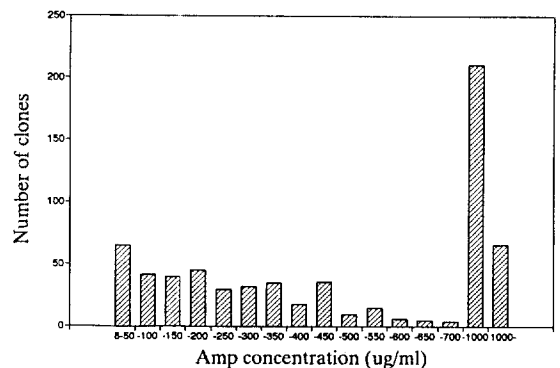


Fig. 2. Distribution of different levels of ampicillin resistance among transformants.

Six hundred and sixty transformants which were resistant to 8  $\mu$ g/ml ampicillin were isolated. Each transformant was then grown in LB ampicillin gradient plates containing various concentrations of ampicillin ranging from 8 to 1000  $\mu$ g/ml, and the maximum ampicillin concentration that allowed cell growth was determined.

ampicillin 농도구배평판을 이용하여 내성 정도를 결정하였다. 형성된  $\beta$ -lactamase 양과 ampicillin 내성 정도는 비례 관계가 있기 때문에(11), 프로모터 세기는 각각의 형질전환체가 성장할 수 있는 ampicillin 최대농도를 실험적으로 구함으로써 결정할 수 있다. 그 결과 전체 형질전환체의 58%가 ampicillin 농도 8~700  $\mu\text{g/ml}$  범위에서 내성을 가지고 있었고, 1,000  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 자라는 클론도 전체의 10%를 차지하였다(Fig. 2). 동일한 벡터를 이용하여 A. Ishihama 박사가 구성한 프로모터 library의 내성 분포를 살펴보면 전자가 약 88%이고 후자가 약 5% 정도이었다(12). 이로 미루어 볼 때 본 연구에서 작성한 프로모터 library는 Ishihama 연구실의 library에 비하여, 프로모터 세기가 큰 클론들이 상대적으로 높은 비율을 차지하는 분포를 이룬다는 것을 알 수 있었다.

### Superoxide 라디칼에 의하여 유도되는 프로모터의 탐색

Ampicillin 농도 8~700  $\mu\text{g/ml}$ 에서 자라는 형질전환체 383개를 선택하여 superoxide 라디칼에 의한 유도발현 여부를 조사하였다. 형질전환체들을 superoxide 라디칼을 발생시키는 paraquat(5  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리한 농도구배평판과 paraquat가 없는 동일한 농도구배평판에 각각 도말하여 paraquat가 있을 때 특이적으로 ampicillin 내성이 증가하는 세개의 클론을 선별해 내었다. 클론 5는 paraquat 처리시 ampicillin 내성 최대농도가 대략 16에서 68  $\mu\text{g/ml}$ 로 증가하였고, 클론 15는 86에서 128  $\mu\text{g/ml}$ 로, 클론 34는 136에서 190  $\mu\text{g/ml}$ 로 변화하였다. 프로모터 세기가 paraquat에 의하여 특이적으로 증가하는지 확인하기 위하여 ampicillin 내성 유전자 산물인  $\beta$ -lactamase 활성도를 세포 추출물로 부터 측정할 결과, 클론 5는 4배, 클론 15는 1.5배, 그리고 클론 34는 1.4배로 활성이 유도됨을 관찰하였다(Fig. 3). 이로 볼 때 농도구배평판에 의한 최대 내성농도의 결정이나 세포 추출물로부터의  $\beta$ -lactamase 활성도의 측정이 거의 유사한 유도배율을 보여줌을 알 수 있었다. Paraquat에 의하여 발현이 유도되는 *nfo*, *zwf*, *sodA*, *micF* 등의 유도배율은 단일 copy 수준에서 대략 10배 정도로 보고되었다(3, 16). 위에서 선별한 프로모터 클론들의 유도배율은 이에 비하여 현저히 낮았다. 그러나, 이 프로모터 클론들의 경우 multicopy 플라스미드 상에서 유도배율을 측정하였기 때문에, 정확한 비교를 위하여 단일 copy 수준에서 그 유도배율을 측정하는 실험이 필요하다.

### 프로모터 절편의 염기서열 결정

Paraquat에 의하여 발현이 유도되는 클론 5, 15, 34로부터 재조합 플라스미드 DNA를 얻어서 삽입된 프로모터 절편의 크기를 결정한 결과 대략 560 bp, 460 bp, 330 bp로 확인되었다. pJAC4 플라스미드의 클로닝 자리에 인접한 염기서열과 상보적인 oligonucleotide를 합성하여 염기서열 결정 반응의 primer로

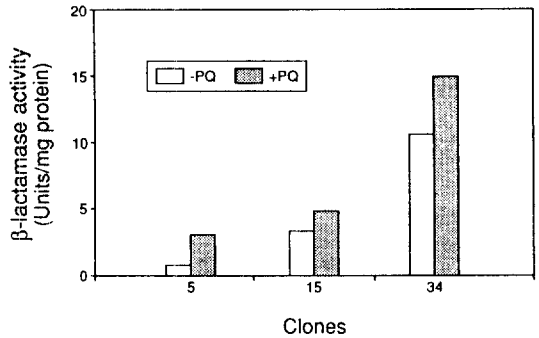


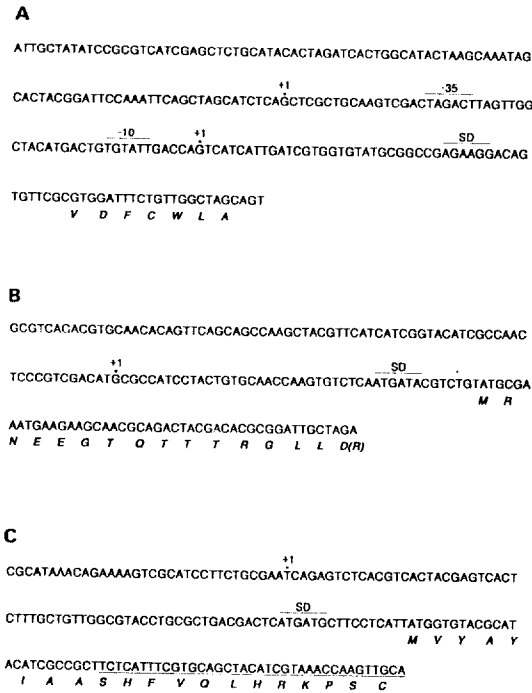
Fig. 3. Induction of  $\beta$ -lactamase by paraquat in transformants containing pJAC4 with inserted promoters.

Exponentially grown *E. coli* cultures were divided into two parts, to one of which paraquat (40  $\mu\text{M}$ ) was added. After 1 hr, cells were harvested to prepare extracts and measured for  $\beta$ -lactamase activity as described in Materials and Methods.

사용하였다. 부분적으로 결정된 염기서열은 Fig. 4와 같다. BLAST 프로그램(1)을 이용하여 DNA database(GENBANK, EMBL)를 탐색한 결과, 각각의 클론들은 *E. coli*에서 아직 보고되지 않은 염기서열을 가지고 있음을 알 수 있었고, 이중 클론 34의 경우에는 식물체 catalase(cotton seed catalase subunit 2)와 70% 이상의 상동성을 지닌 유사한 아미노산 서열이 부분적으로 발견되었다(Fig. 4C).

### mRNA 5' 말단의 결정

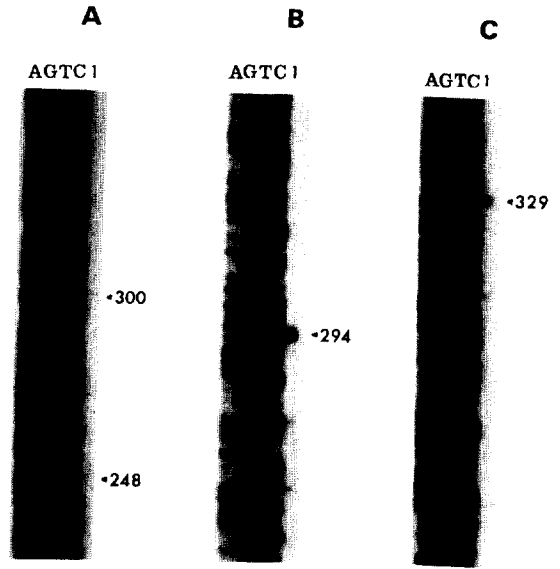
각각의 프로모터 클론들에서 전사개시 위치를 결정하기 위하여 프로모터 플라스미드를 함유한 *E. coli*에서 전체 RNA를 추출하여 primer 연장 실험을 수행하였다. Primer로는 염기서열 결정시 사용한 oligonucleotide를 이용하였으며 이 primer의 5' 말단은 pJAC4 플라스미드의 *Bam*HI 자리로부터 40 nt 하위에 위치한다. 그 결과, 클론 5의 경우 300 nt, 248 nt의 두 종류 cDNA 산물이, 클론 15는 294 nt, 클론 34는 329 nt의 cDNA 산물이 확인되었다. 동일한 DNA 주형으로부터 얻은 sequence ladder와 이 cDNA들을 비교함으로써 mRNA의 5' 말단의 위치를 결정할 수 있었다(Fig. 5). Paraquat 처리시 mRNA 양의 변화를 추적하고, 위에서 결정한 전사개시 위치가 AMV 역전사효소의 비특이적 정지에 의한 artifact가 아니라는 것을 증명하기 위하여 S1 뉴클리아제 분석을 시도하였다(Fig. 6). 클론 5에 대한 S1 probe로는 *Bam*HI의 5' 말단이 방사성 표지된 800 nt 길이의 *Sph*I-*Bam*HI 절편을 이용하였으며, 클론 15에 대한 S1 probe로 *Xho*I의 5' 말단이 표지된 910 nt 길이의 *Sph*I-*Xho*I 절편을 이용하였다(Fig. 6A). Primer 연장 실험의 결과로부터 예측되는 보호된 probe 절편의 길이는, 클론 5의 경우 260 nt와 208 nt, 클론



**Fig. 4.** Nucleotide sequences of promoter containing fragments from clone 5 (panel A), 15 (B) and 34 (C).

Also shown below the sequence are the deduced peptide sequences of putative gene products. The location of transcription start site determined by S1 and primer extension analysis (Fig. 5 and 6) were marked as +1. Putative Shine-Dalgarno sequence (SD) and -35 and -10 promoter elements recognized by  $E\sigma^{70}$  RNA polymerase were indicated by a line drawn above the relevant nucleotides. Underlined region in panel C is homologous to cotton seed catalase subunit 2.

15의 경우 464 nt이다. 클론 5와 15에서 primer 연장 방법에 의하여 결정된 전사개시 위치에 해당하는 보호된 probe 절편이 확인되었다. 클론 34의 경우에는 primer 연장 실험과는 대조적으로 보호된 probe 절편을 관찰할 수 없었다(결과 미제시). 클론 5의 경우에는 약 265 nt와 215 nt 길이의 보호된 probe 절편이 확인되었는데 이로 부터 전사개시 위치가 두군데 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 6B, lane 2와 3). 세포 내에 superoxide 라디칼이 형성되도록 paraquat를 처리한 후 RNA를 추출하여 S1 뉴클리아제 보호 실험을 분석한 결과, 대조구에 비하여 클론 15는 paraquat 처리시 mRNA 양이 약간 증가하였다(Fig. 6B, lane 4와 5). 클론 5의 경우 두 종류의 mRNA 중 긴 mRNA의 양이 상당히 증가하였고, paraquat를 처리한 경우 상위부분의 전사개시 자리(265 nt 길이의



**Fig. 5.** Mapping 5' ends of mRNAs by primer extension analysis.

Radiolabeled primer (24 mer) which is complementary to the downstream region of *Bam*HI cloning site in pJAC4 was extended on the RNA samples obtained from the three promoter-containing clones; clone 5 (panel A, lane 1), 15 (panel B, lane 1) and 34 (panel C, lane 1). DNA sequencing ladders were generated from the purified recombinant plasmids using the same primer (lanes AGTC). Extended cDNAs are shown by numbered arrows indicating the lengths of the extended cDNAs.

보호된 probe 절편에 해당)가 하위의 전사개시 자리(215 nt 길이의 보호된 probe 절편에 해당)보다 선택적으로 사용됨을 관찰하였다(Fig. 6B, lane 2와 3). 또한 paraquat 처리시 상위부분의 전사개시 자리가 대조구에 비하여 하위부분으로 약간 이동하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 6B, lane 2와 3). 이 결과가 S1 뉴클리아제에 의한 artifact가 아니라는 것을 증명하기 위하여 paraquat 처리시 추출한 RNA와 대조구 RNA에 대하여 primer 연장 실험을 수행하여 그 5' 말단이 동일한 지를 확인할 필요가 있다. 전사개시 자리로부터 상위부분의 염기서열을 기존의 보존된 프로모터 서열과 비교할 경우(9), RNA 중합효소  $E\sigma^{70}$ 에 의하여 인지되는 -10과 -35 부위를 가진 클론은 클론 5 뿐이었고, 나머지는 보존된 염기서열을 찾을 수 없었다(Fig. 4) 이는 이들 프로모터들이 독특한 부류에 속하는 종류들로서, 새로운 전사조절인자를 요구할 가능성을 시사한다.

본 연구의 결과 superoxide 라디칼에 의하여 유도되는 프로모터를 3종 분리하였으며 이 프로모터에

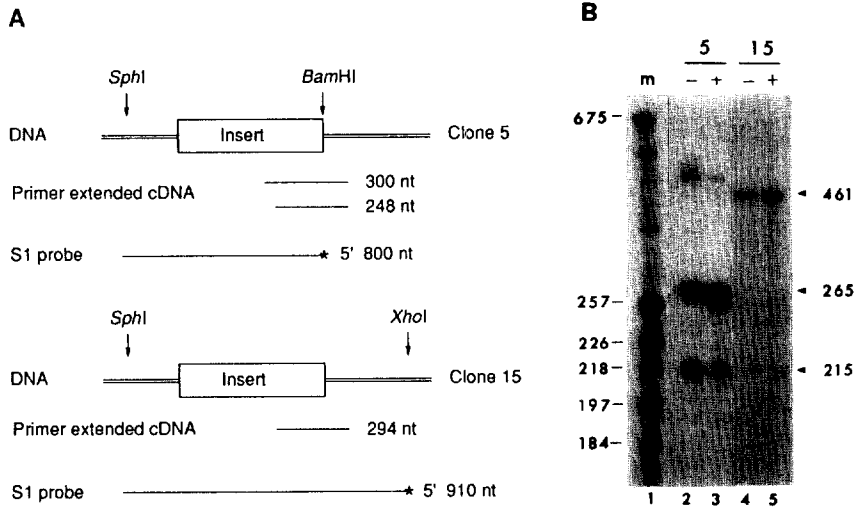


Fig. 6. Mapping 5' ends of mRNAs by S1 nuclease protection analysis.

Panel A: Strategy for mapping. S1 probe used for clone 5 was 800 nt long *SphI*-*Bam*HI fragment of recombinant plasmid from clone 5 and was 5' end-labeled at *Bam*HI end. S1 probe for clone 15 was 910 nt long *SphI*-*Xho*I fragment of recombinant plasmid from clone 15 and was 5' end-labeled at *Xho*I end. *Xho*I site is located 210 nt downstream of the *Bam*HI site. 5' end of oligonucleotide primer used in primer extension analysis is located 40 nt downstream of the *Bam*HI site. Panel B: Patterns of S1 protected probes for clones 5 and 15. Total RNA was isolated from cells treated with 100  $\mu$ M paraquat(+) or plain buffer(-) and hybridized with the 5' end-labeled S1 probes described in panel A. Following S1 digestion, the protected probe fragments were electrophoresed on 5% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The labeled size markers are *Alu*I fragments of pGEM7zf(+) (lane 1). The approximate lengths of the protected probe DNA were indicated on the right.

대하여 primer 연장법과 S1 뉴클리아제 분석을 통하여 전사개시 위치를 결정하였고, 염기서열 결정 결과 클로닝한 절편은 대장균에서 아직 보고되지 않은 새로운 유전자임을 알 수 있었다. 또한  $\beta$ -lactamase를 reporter로 이용하는 프로모터 탐색 벡터가 유도발현성 프로모터들을 손쉽게 탐색하는데 유용함을 확인하였다. 이 프로모터 클론들을 이용함으로써 superoxide 라디칼에 의하여 발현이 유도되는 새로운 유전자들을 대장균 염색체 상에 mapping하고 클로닝하여 그들 유전자의 구조와 superoxide 라디칼에 의한 유전자 발현 조절 기작을 분자적 수준에서 이해할 수 있는 기초가 마련되었다.

## 사 사

본 연구는 1992년도 교육부 유전공학연구비 지원을 받아 수행되었다.

## 참 고 문 헌

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tools. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Bryson, V. and W. Szybalski, 1952. Microbial selection. *Science* **116**, 45-51.
- Chou, J.H., J.T. Greenberg, and B. Demple, 1993. Post-transcriptional repression of *Escherichia coli* *OmpF* protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* **175**, 1026-1031.
- Christman, M.F., G. Storz, and B.N. Ames, 1989. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3484-3488.
- Christman, M.F., R.W. Morgan, F.S. Jacobson, and B.N. Ames, 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-762.
- Farr, B.S. and T. Kogoma, 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561-585.
- Greenberg, J.T. and B. Demple, 1989. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* **171**, 3933-3939.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, 1989. Free radicals in biology and medicine, p. 86-187. Clarendon Press, Oxford.

9. Harley, C.B. and R.P. Reynolds, 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**, 2343-2361.
10. Imlay, J.A. and S. Linn, 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**, 1302-1309.
11. Jaurin, B., 1987. A promoter probe vector (pJAC4) that utilizes the *ampC*  $\beta$ -lactamase gene of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8567.
12. Kubota, M., Y. Yamazaki, and A. Ishihama, 1991. Random screening of promoters from *Escherichia coli* and classification based on the promoter strength. *Jpn. J. Genet.* **66**, 399-409.
13. Sambrook, J., T. Maniatis, and E.F. Fritsch, 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
14. Sanger, F., S. Nicklen, and A.L. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
15. Sawai, T., I. Takahashi, and S. Yamagishi, 1978. Iodometric assay method for  $\beta$ -lactamase with various  $\beta$ -lactam antibiotics as substrates. *Antimicro. Agents Chemoth.* **13**, 910-913.
16. Tsaneva, I.R. and B. Weiss, 1990. *soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 4197-4205.
17. Walkup, L.K. and T. Kogoma, 1989. *E. coli* proteins inducible by oxidative stress mediated by the superoxide radical. *J. Bacteriol.* **171**, 1476-1484.
18. Wu, J. and B. Weiss, 1991. Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 2864-2871.

(Received July 9, 1993)

(Accepted July 23, 1993)

---

**ABSTRACT: The Screening and Characterization of Promoters Inducible by Superoxide Radical in *Escherichia coli***

**Young-Sang Koh and Jung-Hye Roe\*** (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

We screened promoters inducible by superoxide radical from *Escherichia coli*. For this, we constructed random promoter library from *E. coli* MG1655 using a promoter-probing plasmid, pJAC4. Six hundred and sixty clones in this library were classified based on their promoter strength by ampicillin gradient plate assay. Three hundred and eighty three clones with relatively weak to medium promoter strength were selected and then screened for their inducibility by superoxide radical on ampicillin gradient plate containing paraquat. Three clones (clones 5, 15 and 34) were detected to be induced by paraquat treatment and the level of induction were between 1.4 and 4 folds. Comparison of nucleotide sequences of the cloned promoter fragment with registered sequences in GENBANK and EMBL databases suggests that the cloned DNA fragments have not been yet characterized in *E. coli*. Transcription start sites in these clones were determined by primer extension and S1 nuclease protection analysis. S1 analysis of clones 5 and 15 indicated that the mRNA levels were increased by paraquat treatment. Especially, clone 5 was found to have two transcription start sites, the upstream start site of which was selectively used by paraquat treatment. Searching for promoter elements, we found that only the downstream promoter of clone 5 has -10 and -35 promoter elements recognized by RNA polymerase ( $E\sigma^{70}$ ) and the others have no conserved promoter elements. This suggests that these superoxide-inducible promoters may require transcription initiation protein(s) other than  $E\sigma^{70}$ .