

*glpD*와 *glpE* 유전자의 조절영역 결손변이주가 전사조절에 미치는 영향

정희태 · 최용락[†] · 정수열*

동아대학교 농과대학 농화학과, 동주여자전문대학 식품영양과*

Effects of deletion mutants in the regulatory region of transcriptional regulation of *glpD* and *glpE* genes

Hee-Tae Jeong, Yong-Lark Choi[†] and Soo-Yeol Chung*

Dept. of Agricultural Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
Dept. of Food Science & Nutrition, Dong-Ju Women's Junior College, Pusan 604-714, Korea*

Abstract

The *glpD* gene encoding gly-3-p dehydrogenase is essential for the aerobic growth of *E. coli* on glycerol or gly-3-p. The *glpE* gene, the function of which is unknown, is transcribed divergently with respect to *glpD* gene. Expression of the adjacent but divergently transcribed *glpD* and *glpE* genes is positively regulated by the cAMP-CRP complex.

In this study, for a precise investigation of the functional elements in the regulatory region for transcription activation by cAMP-CRP, deletion mutation have been introduced into the regulatory region.

The effect of the deletion mutant on transcriptional regulation was tested *in vivo* by β -galactosidase activity. Deletion mutants in the regulatory region of *glpD* demonstrated that the presence of the CRP-binding site resulted in an sixfold increase in promoter activity. And also deletion mutants of *glpE* gene demonstrated that the presence of the CRP-binding site resulted in an eightfold increase in promoter activity.

Insertion of 22 bp oligomer in the deletion mutants has shown that the CRP binding site is need for maximal expression of *glpD* and *glpE* genes.

Key words : *glpD* and *glpE* gene, cAMP-CRP complex, deletion mutant, transcriptional regulation

서 론

대장균의 유전자 지도상 75분대에 위치하는 *glpD* 유전자는 glycerol-3-p dehydrogenase를 coding 하고 있으며,

glycerol 또는 glycerol-3-p의 탄소원 존재하에서 대장균의 호기적 성장에 필수적이다. 또한 이 유전자의 발현 수준은 catabolite 조절현상을 받는 것으로 알려져 있다¹⁾.

[†] Corresponding author

*glpD*와 *glpE* 유전자의 조절영역 결손변이주가 전사조절에 미치는 영향

최근에 *glpD*와 *glpE* 영역이 clone화 되어져서 1차구조가 밝혀졌으며, 유전자의 조절영역이 해석되어졌다. *glpD*와 *glpE* 두 유전자의 조절영역은 121bp의 간격을 두고 인접해 있으면서 역방향으로 전사되어지며 이들 유전자 상류의 조절영역에는 상동성이 높은 CRP 결합부위가 존재하는데 이는 gel shift assay와 DNase I foot printing 실험법에 의하여 해석되어졌고, 따라서 cAMP-CRP 복합체가 이들 두 유전자의 조절영역에 결합하는 부위를 한 곳만 가짐을 확인한 바 있다. 또한 이 유일한 CRP 결합부위가 *glpD*와 *glpE* 유전자의 전사를 촉진하는 발현 조절 현상도 밝혀냈다^{2~4)}.

Cyclic AMP receptor protein(CRP)는 cAMP와 결합하여 cAMP-CRP 복합체의 형성으로 전사활성 또는 전사억제의 기능을 가진 조절인자로서 작용한다. 이 조절인자의 제어 하에는 당대사계를 비롯하여 아미노산 대사계, 막단백질 합성 및 핵산 대사계 등에 관여하는 수많은 유전자가 전사 촉진 또는 제어에 관여하는 것으로 알려져 있고, 대장균의 전체 유전자의 5% 이상이 존재하는 것으로 추정되어지고 있으나 cAMP의 조절을 받고 있는 것으로 지금까지 밝혀진 전사조절유전자는 극히 일부이다^{5~8)}.

*glpD*와 *glpE* 유전자의 조절 영역에 존재하는 CRP 결합 영역의 구조를 변이시켜 motif를 중심으로 한 결합부위가 전사조절에 미치는 영향을 보았으며, 또한 cAMP에 의한 전사 조절영향을 조사함으로써 1개소의 CRP 결합영역에 의해 역방향으로 전사되는 두 유전자가 동시에 전사 조절을 받는 특이한 조절 형태에 의한 전사 조절기구를 이해하고

자 결합영역에 역방향 구조로 존재하는 5'TGTGA 3'의 구조 변화에 의한 발현 조절 변화의 영향을 CRP 결합 영역의 구조변화 변이주를 작성하여 조사함으로써 이 motif의 중요성 및 CRP에 의한 전사 조절에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났다^{2,10)}. 또한, *glpD*의 전사 개시점과 CRP 결합부위 사이에 oligomer 삽입에 의한 다수의 변이를 도입한 결과는 거리 변경에 의한 DNA의 helix-turn의 완전한 회전이 cAMP에 의한 발현조절에 커다란 영향을 미치는 것으로 나타났다¹¹⁾.

따라서 본 연구는 *glpD*와 *glpE*의 조절 영역의 결손 변이주를 작성하여 각각의 promoter 활성에 미치는 중요한 조절 영역 부위를 결정하고, 합성된 CRP 결합 부위의 공통 배열을 삽입시켜 *glpD*와 *glpE* 유전자의 전사 조절에 관여하는 CRP의 역할을 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1에 나타내었다. 모든 균주는 최소배지(M9)와 LB 배지에서 호기적 조건으로 배양하였다. 플라스미드가 도입된 균주는 Ampicillin(50µg/ml)를 첨가하여 배양하였다.

재조합 DNA techniques

Plasmid DNA는 Birnboim and Doly의 방법¹²⁾에 의하

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Strains	Genotype	Source
Strains		
MC 4100	<i>araD 139, lac(IPOZYA), StrA, thi</i>	Casadaban
TP 2010	<i>xyl, cya, argH, lacX 74, recA, ilv, Srl : Tn10</i>	Danchin
JM 109	<i>recA1, lac-pro, endA1, gyrA 96, thi1, hsdR17 supE44, relA1, F'traD36, proAB, lacIq-ZM15</i>	Yanish-Perron
Plasmids		
pMS437C	<i>trpBA, lacZ</i>	(15)
pHKC9	<i>glpD, E, Amp'</i>	(13)
pUC18	<i>Amp'</i>	Yanish-Perron

여 분리하였으며, 제한 효소 처리, 형질 전환, agarose gel의 전기 영동 및 기타 재조합 DNA technique는 표준방법을 사용하였다¹³⁾. Plasmid DNA는 CsCl에 의한 초원심 분리법으로 정제하여 사용하였다. 특정 DNA의 단편의 조제는 제한 효소로 절단하여서 0.6% low melting agarose gel 전기 영동을 하여 원하는 단편을 회수 정제하여 사용하였다.

돌연변이주의 작성

*glpD*와 *glpE*의 promoter 영역을 포함한 조절영역을 단리하고자 *glpD*와 *glpE* 유전자가 cloning 되어져 있는 plasmid pHKC9⁴⁾로부터 순수 DNA를 CsCl 초원심 분리 방법으로 분리하고 이로부터 조절영역이 존재하는 *Bam*HI-*Bgl*II의 312 bp의 단편을 단리 정제한다. 단리된 조절영역의 DNA를 pUC18에 cloning하여 삽입 단편의 확인 및 양쪽 방향이 달리 삽입된 clone을 제한효소 절단 등으로 확인하여 결손 변이주의 재료로 사용하였다.

조절 영역이 결손된 변이의 작성은 *Pst*I과 *Xba*I의 제한 효소로 절단된 선형 DNA를 Takara사의 deletion kit를 사용하여 *Exo*III-Mungbean nuclease에 의한 결손변이를 유도한다. 변이된 각 clone은 염기배열의 결정에 의하여 결손된 정확한 위치를 확인한다. 결손된 변이주는 CRP 결합부위가 *glpD* 및 E의 양쪽에서 보게 되는, 5'TGTGA3' motif가 한쪽 또는 양쪽 모두가 결손된 다양한 변이주, promoter의 일부 영역의 결손, operator 지역 결손 변이주 등의 여러 종류의 변이를 유도하였다. 또한 CRP 결합부위의 일부 또는 전부가 결손되어진 다수의 변이주에 CRP 공통 배열의 oligomer(5'-AAA TGTGA TCTAGA TCACA TTT-3') 22 bp를 삽입시켰다.

변이주의 염기 배열 결정

상기에서의 deletion mutants 및 CRP 결합 공통 배열의 삽입 변이주 등은 Dideoxy chain termination 방법¹⁴⁾에 의하여 변이가 일어난 부분을 염기 배열 결정으로서 확인하였다.

변이주와 Lac Z융합 plasmid 작성 및 발현 조절

작성되어진 변이주에서 *LacZ* 유전자와의 융합 plasmid를 작성하고자 DNA를 대량 분리한다. 조절 영역의 약 0.3kb의 단편을 *Sma*I-*Hind*III로 절단하고 blunt end화 시켜서

*lacZ*와의 융합용 vector인 pMS437C¹⁵⁾에 ligation 시킨 후 Δ lac 균주인 대장균 MC4100, TP2010 등에 형질 전환 시킨 후 MacConkey 배지에서 Lac⁺의 red colony를 선별한다. 선별된 clone으로부터 DNA를 분리하여 제한효소로 절단 및 전기영동을 실시하여 *glpE-lacZ* 또는 *glpD-lacZ* fusion plasmid가 작성된 것을 확인하였다.

작성된 *lacZ* 융합 plasmid는 Δ cya의 균주인 TP2010에 도입시켜 cAMP를 배지에 첨가 또는 미첨가시켜 배양한 균주에서 β -galactosidase를 측정함으로써 cAMP-CRP의 조절을 받는 유전자의 발현조절을 측정하였다. Miller 등의 방법¹⁶⁾으로 β -galactosidase 활성을 측정하였으며, β -galactosidase 활성은 0.2% casamino acids와 50 μ g/ml ampicillin을 첨가한 M9 배지에서 측정하였다.

결과 및 고찰

*glpD*의 조절 영역 결손 및 CRP 공통 배열 삽입

*glpD*와 E 유전자의 조절 영역에는 1개의 CRP 결합영역이 존재하며 이들 두 유전자는 역방향으로 전사되어지고, 두 유전자 모두가 cAMP-CRP 복합체에 의하여 동시에 전사가 촉진되어진다^{2,10,11)}. 유전자의 전사 조절에 미치는 영향을 검토하기 위한 조절영역 결손 변이주 작성은 *glpE*와 D의 promoter를 포함한 조절 영역 DNA를 CsCl 원심분리 방법으로 순수 분리하고 이로부터 *Bam*HI-*Bgl*II의 312 bp의 단편을 4.5% polyacrylamide gel 전기 영동한 후, 단리 정제하여 실시하였다. 이 조절 영역을 pUC18 plasmid에 cloning하여 promoter 영역 결손 변이주 작성의 재료로 사용하였다.

*glpD*와 *glpE*의 조절영역이 pUC18에 cloning된 plasmid DNA를 대량정제하여 Takara사의 DNA deletion Kit에 의한 *Exo*III-Mungbean nuclease system의 deletion 변이주 작성법으로 삽입단편 길이를 축소시켜서 CRP 결합부위 및 promoter 영역까지 결손되어진 다수의 변이주를 작성하였다. 얻어진 변이주에서 DNA를 분리하여 일차적으로 *Sma*I-*Hind*III의 절단으로 선별되어진 적당한 크기의 결손 변이주를 가지고 염기 배열 결정을 하여 정확하게 결손이 일어난 부위를 확정지었다(그림 1).

결손 변이주 중에서 CRP 결합 부위의 일부가 결손되어진 변이주인 DM126 promoter의 -35 영역까지 결손이 일어난 DM90의 변이주에 cAMP-CRP에 의한 전사 조절 효

*glpD*와 *glpE* 유전자의 조절영역 결손변이주가 전사조절에 미치는 영향

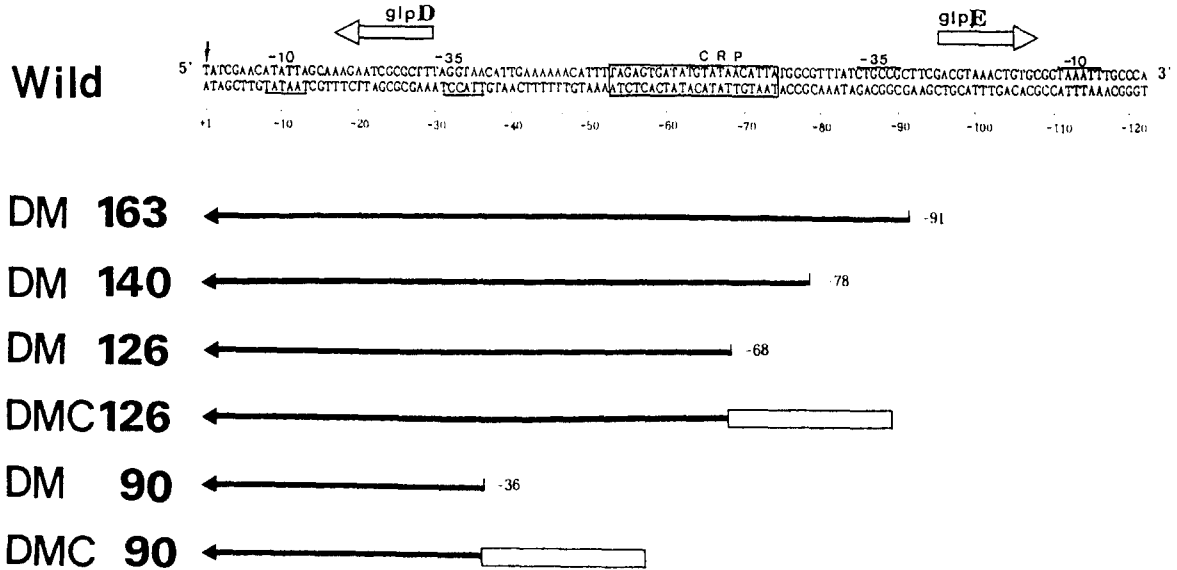


Fig. 1. Deletion and oligomer insertion mutations in the *glpD* promoter. The nucleotide sequence of the *glpD* and *glpE* promoters are shown on the top lines. The lower sections define the exact of sequences retained in deletion mutations that remove portions of the *glpD* promoter from the 5' direction. The boxes of DMC 126 and DMC 90 were inserted the consensus sequence of CRP binding site(22 base pairs).

과를 보고자 CRP 결합 공통 배열의 22 bp(5'-AAATG-TGA TCTAGA ACACTTTT-3')가 삽입된 변이주인 DMC 126 및 DMC90을 작성하였다.

각 변이주의 *glpD-lacZ*와 *glpE-lacZ* 융합 plasmid 작성 각 변이주의 RF DNA 및 plasmid DNA를 대량 분리 정제한다. *lacZ*와의 융합 plasmid 작성은 먼저, *glpE*의 promoter 영역이 결손된 변이주는 pUC18에서 다양한 크기의 염기가 결손되어져 있으므로 결손된 각 변이주의 *EcoRI-BamHI*으로 절단된 DNA 단편과 *lacZ*와의 융합용 vector인 pMS437C의 동일 site에 ligation 시킨 것을 Δlac 균주(MC 4100과 TP2010)에 형질 전환시킨 후에 MacConkey 배지에서 Lac⁺ 콜로니인 red colony를 선별하여 확인한다. *glpD*의 promoter 영역이 결손된 변이주는 *SmaI-HindIII*로 절단된 DNA 단편을 Klenow로 처리하여 blunt-end화 시킨 후에 pMS437C의 *Sma I* site에 ligation 시킨 후에 상기와 동일하게 *glpD-lacZ* fusion plasmid를 작성 확인하였다. 상기에서 red colony로 선별되어진 clone으로부터 DNA를 분리하여 *EcoRI-BamHI*으로 절단된 단편을 agarose gel 전기

영동으로 확인한 후에 결손된 DNA 단편이 삽입되어졌는지를 확정하였다.

*glpD*의 조절 영역 결손 변이주의 발현 조절

*glpD*의 promoter 및 CRP 결합 부위의 결손 및 CRP 공통 배열의 삽입 변이주가 *glpD* 유전자의 발현 조절에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 각 변이주의 융합 유전자를 도입한 TP2010(Δcya , Δlac) 균주를 2 mM cAMP 첨가 또는 비첨가한 최소 배지에서 배양한 cell에서 β -galactosidase 활성을 측정하였다. CRP 결합 부위의 직전까지 결손이 일어난 변이주는 wild와 비교하여 promoter의 활성변화가 일어나지 않았으며, CRP-cAMP에 의한 전사 촉진도 거의 같은 수준으로 촉진 되어져서 역방향으로 전사되는 *glpE*의 promoter와는 상호간 영향이 없는 것으로 사료된다. promoter의 -35 영역의 일부까지 결손이 되어져서 CRP 결합부위가 없어진 변이주는 promoter 활성이 6배 정도까지 크게 감소하였으며, cAMP의 발현촉진 효과는 나타나지 않았다. 여기에 CRP 공통배열을 삽입하여 적게나마 cAMP의 전사촉진 효과가 회복되리라 예상하였으나 회복

Table 2. Effects of cAMP on expression of the *glpD-lacZ* fusion genes

Plasmids	β -galactosidase activity ^a			
	-cAMP	+cAMP	Effect ^b	Index ^c
LDC6	1525	4148	2.72	100
DM 163	1655	4452	2.69	99
DM 140	1698	4856	2.86	105
DM 126	1567	3239	2.06	76
DMC126	1506	5301	3.52	129
DM 90	281	290	1.03	—
DMC 90	335	299	0.89	—

The *EcoRI-BamHI* fragment containing deletion mutants was ligated to the same site of pMS437C and constructed *glpD-lacZ* fusion plasmids.

a, β -galactosidase activities are given in Miller Units and are the mean of three independent measurements. Each of the strains containing *glpD-lacZ* fusion genes was incubated at 37°C until the OD_{610nm} reached 0.1-0.2, and then 2mM cAMP was added to each sample. Each sample was further incubated until the OD₆₁₀ was 0.5 and β -galactosidase activity was measured.

b, Relative efficiency with that in the absence of cAMP taken as 1. c, Relative efficiency with that in the wild type taken as 100.

되지 않았는데, 이는 DNA helix 구조에 결합되는 위치의 변화 및 promoter 영역의 결손에 의한 것으로 사료된다. 이는 공통배열의 상동성이 wild보다 높은 oligomer를 삽입 하였으나 wild보다 전사촉진 효과가 비슷한 것은 CRP 결합 부위의 위치가 조절의 영향인자로 작용하는 것으로 사료된다. 또한 *glpD*의 cAMP에 의한 발현조절에 CRP 결합부위의 필수성을 보여준 결과이다. CRP 결합부위가 일부 결손된 DM126에 CRP의 공통배열(22 mer)을 삽입한 변이주는 cAMP에 의한 전사촉진 효과가 wild와 비슷하게 회복되는 경향이였다.

*glpE*의 조절 영역 결손 및 CRP 공통 배열의 삽입

*glpD*의 조절 영역의 결손 변이주 작성과 같은 방법으로 조절 영역이 삽입된 plasmid DNA를 *PstI-XbaI*으로 절단하여 *glpE* 조절 영역의 5'-말단 부분에서 deletion이 실행되는 변이주 작성 방법을 실행하였다. 결손이 일어난 clone에서 DNA를 분리하여 일차적으로 *EcoRI-BamHI*으로 절단하여 생성된 단편을 전기 영동으로 적당한 크기까지 결손된 것을 선별하여서 염기배열로서 정확하게 확인하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이, CRP 결합 부위 직전까지의 결손, CRP

결합 부위의 대부분이 결손되어진 변이주(EM185) 및 promoter의 일부 영역이 결손되어진 변이주를 얻었다. 또한 CRP 결합 부위가 결손되어진 EM185와 EM153의 변이주에는 CRP의 전사 조절 효과를 규명하고자 합성된 CRP 공통 배열인 22 mer를 삽입시켜서 EMC185와 EMC153을 작성하여 *lacZ*와의 융합 plasmid를 재조합하였다.

glpE 조절 영역 결손 변이주의 발현 조절

*glpE*의 promoter 영역 및 CRP 결합 영역의 결손이 *glpE*의 promoter 활성과 cAMP에 의한 효과에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 3에 나타냈다. *glpE-lacZ*의 융합 유전자가 도입된 균주의 β -galactosidase 활성을 측정하였다. CRP 결합부위의 직전까지 결손이 일어난 변이주는 wild와 비슷한 promoter의 활성을 가졌고, cAMP에 의한 발현조절도 같은 수준으로 촉진되어져서 CRP 결합부위의 상류에는 발현조절에 미치는 영향인자가 존재하지 않는 것으로 사료되며, 이는 *glpD*의 경우와 같은 경향이였다. *AccI*까지의 단편이 삽입되어져서 CRP 결합부위가 거의 결손되어지게 한 변이주는 cAMP에 의한 전사조절이 거의 없었으며 promoter의 활성도 8배 정도로 크게 감소하였다. 이

*glpD*와 *glpE* 유전자의 조절영역 결손변이주가 전사조절에 미치는 영향

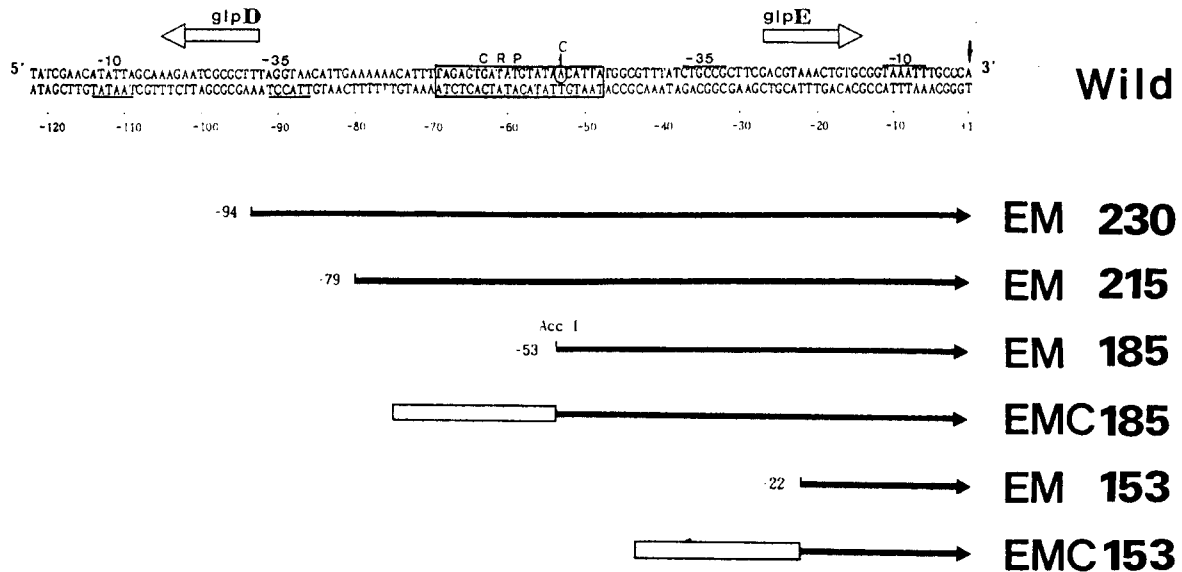


Fig. 2. Deletion and oligomer insertion mutations in the *glpE* promoter. The nucleotide sequence of the *glpD* and *glpE* promoters are shown on the top lines. The lower sections define the exact of sequences retained in deletion mutations that remove portions of the *glpE* promoter from the 5' direction. The boxes of EMC 185 and EMC 153 were inserted the consensus sequence of CRP binding site(22 base pairs).

Table 3. Effects of cAMP on expression of the *glpE-lacZ* fused genes

Plasmids	β-galactosidase activity ^a			
	-cAMP	+cAMP	Effect ^b	Index ^c
LEC5	1425	2936	2.06	100
EM 215	1853	4187	2.26	110
EM 185	1532	2175	1.42	69
EMC183	1621	5122	3.16	153
EM 153	153	174	1.14	55
EMC153	203	146	0.72	—

The *EcoRI-BamHI* fragment containing deletion mutants was ligated to the same site of pMS437C and constructed *glpE-lacZ* fusion plasmids.

a, β-galactosidase activities are given in Miller Units and are the mean of three independent measurements. Each of the strains containing *glpE-lacZ* fusion genes was incubated at 37°C until the OD_{610nm} reached 0.1-0.2, and then 2mM cAMP was added to each sample. Each sample was further incubated until the OD₆₁₀ was 0.5 and β-galactosidase activity was measured.

b, Relative efficiency with that in the absence of cAMP taken as 1. c, Relative efficiency with that in the wild type taken as 100.

는 Merkel 등이¹⁷⁾ *uhpT*의 promoter에 존재하는 CRP 결합부위 주변영역을 결손시킨 변이주에서 cAMP-CRP에 의한 전사촉진 효과가 감소되어진 결과에서 뿐 아니라 Manddecki와 Crauthers 등¹⁸⁾이 *lac* promoter의 결손 변이주를 가지고 연구한 결과 등에서도 *glpD*와 *glpE* 유전자의 경우와 일치하는 결과를 보여준 것이다. 여기에 CRP 공통배열을 삽입시킨 변이주에서는 wild보다도 약간 증가된 전사촉진 현상을 나타냈다. 이 변이주는 CRP 결합부위가 -64의 위치가 되어 *glpD*의 야생주와 비슷한 위치에 존재하는 관계로 DNA의 helix-turn의 구조변화가 초래되지 않아서 증가된 것으로 사료되며, *glpE*의 cAMP에 의한 발현조절에도 CRP의 결합부위가 필수적이라는 것을 잘 보여주는 결과이다.

요 약

*glpD*와 *glpE*는 같은 조절 영역 하에서 121 bp 간격을 두고 역방향으로 전사되어지며, 이들 유전자 상류영역에 존재하는 하나의 CRP binding site가 두 유전자의 전사 조절에 관여함을 이미 여러 연구를 통하여 확인되어졌다.

본 연구에서는 *glpD*와 *glpE*의 조절영역이 다양한 크기로 결손된 변이주를 작성하였다. 각 변이된 promoter의 발현조절 영향을 보고자 *LacZ*와의 융합 plasmid를 작성하였고, β -galactosidase 활성을 측정하여 cAMP에 의한 발현조절을 검토하였다.

발현조절 특성을 확인한 결과 CRP binding site 전까지 결손이 된 변이주는 wild와 비슷한 활성이지만 CRP binding site가 없어진 변이주의 경우는 promoter 활성이 크게 감소했고 cAMP에 의한 발현조절은 나타내지 않았다. 한편 CRP의 공통배열을 삽입시키면 회복이 가능하였다. *glpE*의 조절영역도 *glpD*와 마찬가지로 다양하게 결손시킨 변이주를 작성하여 promoter 조절활성을 확인한 결과 CRP binding site가 없어진 변이주의 경우는 promoter 활성이 크게 감소하였으며, 결손된 CRP 결합영역을 삽입시키니 cAMP에 의한 전사촉진이 거의 회복되어졌다.

감사의 글

이 연구는 교육부의 유전공학연구비의 일부 지원에 의해 이루어졌으며 이를 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Lin, E. C. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 30, 535(1976)
2. Choi, Y. L., Kawamukai, M., Sakai, H., and Komano, T. Regulation of *glpD* and *glpE* gene expression by a cyclic AMP-cAMP receptor protein(cAMP-CRP) complex in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1088, 31(1991)
3. Te, S., and Larson, T. J. Structure of the promoter and operator of the *glpD* gene encoding aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 170, 4209(1988)
4. Choi, Y. L., Kawase, S., Kawamukai, M., Utsumi, R., Sakai, H., and Komano, T. Nucleotide sequence of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene of *Escherichia coli* and regulation by the cyclic AMP-CRP complex. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 1135(1989)
5. Ullmann, A., and Danchin, A. Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 15, 1(1983)
6. Webster, C., Gaston, K., and Bubsy, S. Transcription from *Escherichia coli melR* promoter is dependent on the cyclic AMP receptor protein. *Gene*, 68, 297(1988)
7. Adhya, S., and Garges, G. How cyclic AMP and its receptor protein act in *Escherichia coli*. *Cell*, 29, 287(1982)
8. Aiba, H., Kawamukai, M., and Ishihama, A. Cloning an promoter analysis of the *Escherichia coli* adenylate cyclase gene. *Nucleic Acids Res.*, 11, 3451(1983)
9. De Crombrugge, B., Bushy, S., and Buc, H. Cyclic AMP receptor protein: role in transcriptional activation. *Science*, 224, 831(1984)
10. Choi, Y. L., Chung, S. Y., and Chung, C. H. Mutational analysis of CRP binding site in the regulatory region of *glpD* and *glpE* genes from *E. coli*. *Molecules and Cells*, 4, 51(1994)
11. Jeong, H. T., Choi, Y. L., Chung, S. Y., and Chung, C. H. Effects of mutations in the regulatory region on transcriptional regulation of *glpD* gene. *J. Microbiology and Biotechnology*, 5(5), 245(1995)
12. Birnboim, H. C., and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513(1979)
13. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.(1989)

14. Sanger, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Biosci. Repts.*, 1, 3(1981)
15. Kawamukai, M., Kishimoto, J., Utsumi, R., Himeno, M., Komano, T., and Aiba, H. Negative regulation of adenylate cyclase gene(*cya*) expression by cAMP-cAMP receptor protein in *Escherichia coli*: studies with *cya-lac* protein and operon fusion plasmids. *J. Bacteriol.*, 164, 872(1985)
16. Miller, J. H. *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352-355 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.(1972)
17. Merkel, T. J., Nelson, D. M., Brauer, C. L., and Kadner, R. J. Promoter elements required for positive control of transcription of the *E. coli uhpT* gene. *J. Bacteriol.*, 174, 2763(1992)
18. Mandeck, W., and Crauthers, M. H. Mutants of the *lac* promoter with large insertion and deletions between the CAP binding site and the -35 region. *Gene*, 31, 263(1984)