

미생물의 당전달과 대사에 관련된  
효소계에 관한 연구

A Study on the Sugar Transport and  
Metabolism in Bacteria

1993. 2

한국과학기술연구원  
부설유전공학연구소



T  
KRIB  
93-  
89

GERI

## 제 출 문

한국과학기술연구원

부설 유전공학연구소 소장 귀하

본 보고서를 “미생물의 당전달과 대사에 관련된 효소계에 관한 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1993 . 2 .

연구책임자 : 성 문 회 ( 부설유전공학연구소 선임연구원 )

연 구 원 : 오 태 광 ( 부설유전공학연구소 책임연구원 )

윤기홍 ( " 선임연구원 )

이정기 ( " 연 구 원 )

김영권 ( " " )

태동년 ( " " )

반재구 ( " 선임연구원 )

안종석 ( " " )

윤병대 ( " " )

이현선 ( " " )

권기석 ( " " )

민태익 ( " 책임연구원 )



# 요 약 문

## I. 제 목

미생물의 당전달과 대사에 관련된 효소계에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

발효미생물은 유기산, 아미노산, 비타민 등과 같은 대사산물의 생산이나 산업적으로 유용한 효소(amylose, cellulase, protease 등)의 생산을 위해 오랫동안 사용되어 왔다. 그러나, 미생물이 여러 유용물질을 생산하는데 필수적인 탄소원인 당성분이 배지에서 세포내로 유입되는 과정에 관여하는 효소와 그 작용기작등이 아직 확실하게 밝혀져 있지 않는 것이 많다. 발효에 이용되는 당 중에서 phosphoenolpyruvate : sugar phosphotransferase system(PTS)에 의해서 미생물 세포내로 유입되는 당이 먼저 선택적으로 이용되며, 배지내에 PTS에 의해서 이용될 수 없는 당과 같이 존재할 경우에는 미생물은 PTS sugar를 먼저 이용하여 소모될 때까지 대수기적 성장을 한 후, non-PTS sugars를 이용하는데 관련된 transport systems을 합성하는 동안 정지기를 가진 후, 다시 대수기적 성장을 보이는 diauxie effect가 나타난다. 최근의 연구결과에 의하면 diauxie effect는 non-PTS sugar를 이용하는데 관여하는 효소의 유전자가 PTS에 의해서 transcriptional regulation을 받는 결과라고 밝혀졌다. 그러므로, non-PTS sugar를 이용하는데 관여하는 유용한 효소를 생산하거나, 또는 PTS sugar의 이용성을 증가시켜 유용대사산물의 생산을 증대시키기 위해서 당의 세포내 전달에 관련된 효소들의 특성연구와 유전자의 gene cloning을 통하여 그 작용기작을 밝히면 미생물의 일차 및 이차 대사산물의 획기적 생산이 가능할 뿐만 아니라, 발효미생물의 발효조절이 가

능하여 발효산업 육성을 위한 근간이 되는 연구가 될 것이다.

특히 *Corynebacterium glutamicum*의 경우 *E. coli*에 비해서 PTS에 관한 분자수준에서의 연구가 전무한 실정이다. 산업적으로 유용한 *Corynebacterium glutamicum*의 당 전달계에 관한 연구는 산업미생물의 응용면에서 중요한 의의를 가지고 있다.

### III. 연구의 내용 및 범위

*C. glutamicum*의 당 전달계의 연구를 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. PTS를 이용하여 glucose와 mannose를 발효시키는 *C. glutamicum*으로부터 clone한 mannose enzyme II 유전자를 함유한 2177 bp의 염기서열 및 1,245bp의 Open reading frame 확인
2. ORF의 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열을 이용하여 mannose EII의 hydropathy 분석
3. 추론된 mannose EII의 아미노산 서열과 다른 PTS enzyme IIs와의 상동성 비교, 분석
4. 추론된 mannose EII에서의 catalytic conserved region의 확인 및 다른 PTS enzyme IIs의 conserved region과 비교, 분석

### IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의사항

1. PEP 의존성 당 전달계 효소기작에 관련된 유전자중 본 연구실에서 이미 *C. glutamicum*으로부터 분리한 mannose EII 유전자의 구조를 밝히기 위해서 2,177 bp의 염기서열을 결정하여 분석한 결과, mannose EII 유전자는 총 1,245bp의 염기로 구성되어 있었고, 그로부

터 추론된 효소는 415개의 아미노산으로 이루어진 분자량 약 45,000 dalton의 hydrophobic한 단백질이었다.

2. 밝혀진 EII 유전자의 염기서열을 근거로 추론한 mannose EII의 아미노산 서열을 이용하여 hydrophathy 분석을 행한 결과, hydrophobic과 hydrophilic한 부위가 교대로 나타나는 transmembrane protein의 특징적인 hydrophathy pattern을 나타내었다.
3. 추론된 mannose EII의 아미노산 서열과 기존에 발표된 *E. coli* 등 다른 미생물 유래의 여러가지 당에 대한 EII 유전자와의 상동성을 비교 분석한 결과, hydrophilic한 N-말단부위(12~78 amino acid)는 *E. coli* 유래 glucose EII의 hydrophilic한 C-말단 부위와 약 40%의 상동성을 나타냈으며, 또한 hydrophobic한 C-말단 부위는 *Salmonella typhimurium* 유래 sucrose EII의 hydrophobic한 부위와 약 27%의 상동성을 나타내었다.
4. Mannose EII 유전자의 염기서열로 부터 예상되는 mannose EII와 기존에 발표된 다른 미생물 유래 EII와의 상동성을 조사한 결과, phosphorylation site라고 추정되는 histidine과 cysteine을 함유하며, 다른 EII와의 유사성이 매우 높은 두곳의 conserved region이 존재하였다.

이상의 결과로 부터 본 실험실에서 분리한 *C. glutamicum*의 mannose EII 유전자에 의해 coding된 mannose EII는 기존에 보고된 다른 EII들과 비교했을 때 functional domain 및 catalytic phosphorylation site의 conserved region등은 상당한 상동성을 보이지만 전체적인 분자구조나 아미노산 배열에 있어서는 서로 많은 차이를 보이고 있다. 따라서 결정된 mannose EII 유전자의 염기서열과 이를 바탕으로 추론

한 mannose EII 단백질의 아미노산 서열은 앞으로 EII 단백질의 생합성 조절과 생화학적 연구를 진행시키는데 많은 정보를 제공할 수 있으므로 더욱 많은 연구가 계속 되어질 것을 건의함.



# **S u m m a r y**

## **I. Project Title**

A study on the sugar transport and metabolism in bacteria

## **II. Objectives and Importance of the project**

The bacterial phosphoenolpyruvate (PEP) dependent : carbohydrate phosphotransferase system (PTS) plays central role in the uptake of a number of carbohydrate in both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The PTS catalyzes the translocation of carbohydrate across the bacterial membrane and their concomitant phosphorylation. In addition, the PTS regulates other metabolic and genetic pathway. Diauxie is also regulated by the result of PTS. As long as the PTS sugar is present in the medium, PTS inhibits both adenylate cyclase and permease activity required for uptake of inducer. After the PTS sugar is completely consumed, the cells enter stationary phase, PTS-mediated repression is relieved, induction of the operon takes place, and growth in the second sugar begins. PTS is the signal transduction system the major one in the bacterial cell; it was the first recognized procaryotic signalling system with functioning via protein phosphorylation. The uptake of the PTS

and non-PTS sugar appears to be the rate-limiting step in the growth of the cell. Therefore it is necessary to understand sugar transport mechanism and regulation of and by the PTS exactly.

*Corynebacterium glutamicum* has long been used industrially for the large scale production of amino acids, mainly L-glutamic acid and L-lysine. But not many studies about sugar uptake system of *C. glutamicum* have been done.

The objectives of the project are to understand sugar transport mechanism and to enhance the production of useful metabolites from *C. glutamicum*. The nucleotide sequence of structural gene for EII<sup>Man</sup> and amino acid sequence for the EII<sup>Man</sup> deduced from it could have informed us about glucose and mannose PTS of *C. glutamicum*.

### III. Content and Scope of the Project

The scopes of the project are summarized as follows ;

1. Subcloning of mannose EII gene for nucleotide sequencing.
2. Nucleotide sequence determination of the mannose EII gene
3. Analysis of amino acid sequence for the EII<sup>Man</sup> deduced from nucleotide sequence of mannose EII gene
4. Hydropathy analysis of deduced Mannose EII
5. Comparison of the amino acid sequence with various

enzyme  $\beta$ s.

#### IV. Results and proposal for their application

1. The 2,177 bp nucleotides of the cloned gene and its flanking regions were sequenced. The open reading frame defined by the nucleotide sequence was 1,245 nucleotide long.
2. The 415 amino acid sequence of mannose  $\beta$ , deduced from the DNA sequence of the mannose  $\beta$  gene, was determined and the size of this protein was about 45,000 dalton
3. The hypothetical protein encoded by mannose  $\beta$  gene showed a hydropathy pattern characteristic of trans-membrane protein (potential spanning the membrane several times) Over the most of the length of the molecule. It contained 62% hydrophobic, 18% hydrophilic, and 20% neutral amino acid residues.
4. The deduced amino acid sequence of mannose  $\beta$  was compared with various  $\beta$ s of bacteria. The N-terminal hydrophilic portion (12~78 amino acid) Showed 40% homology with C-terminal hydrophilic region (405~465 amino acid) of *E.coli*  $\beta^{Glc}$ , and the hydrophobic C-terminal region (88~404 amino acid) Showed 27% homology with hydrophobic region (76~388 amino acid) of

*Salmonella typhimurium* EII<sup>scr</sup>.

5. The conserved two regions which were concerned with the transfer of phosphate were found in mannose EII. Amino acids sequences around probable catalytic cysteyle residue in mannose EII were identified and compared it with the phosphorylation domain of 6 EIIs. Residues surrounding this cysteyle residue are well conserved with those surrounding the identified or suspected essential cysteyle residues of other PTS permeases. Another possible active histidyle residue was found in relatively hydrophobic environment. The region surrounding His<sup>318</sup> of mannose EII also exhibits this conservation of amino acid sequence.

From this results, it was concluded that the first nucleotide sequence, to our knowledge, of the gene for a sugar specific enzyme II from a *C. glutamicum* is reported and the deduced amino acid sequence is presented.

Nucleotide sequene of mannose EII gene and amino acid sequence of mannose EII deduced from it should provide the information for biochemical work and transcriptional and translational regulation of the synthesis of mannose EII. We suggest that the isolated mannose EII gene from *C. glutamicun* will provide the opportunity for studying the PTS of *C. glutamicum*

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	15
제 2 장 실험재료 및 방법 .....	20
1. 재 료 .....	20
가. 사용균주 및 plasmids .....	20
나. 배 지 .....	20
다. 제한효소 및 시약 .....	21
2. 방 법 .....	21
가. plasmid DNA의 분리 및 정제 .....	21
나. Enzyme II 유전자의 nucleotide sequencing을 위한 subcloning .....	21
다. Single strand DNA의 분리 및 정제 .....	22
라. Nucleotide sequencing .....	22
마. Computer analysis .....	22
제 3 장 결과 및 고찰 .....	23
1. Mannose enzyme II 유전자의 염기서열과 이로부터 추론된 mannose enzyme II의 아미노산 서열 .....	23
2. Mannose EII의 hydropathy 분석 .....	23
3. Mannose EII와 다른 여러가지 EII와의 비교분석 .....	28
4. Mannose EII의 phosphorylation에 관계된 conserved region의 확인 및 다른 EII와의 비교 분석 .....	30

제 4 장 결 론	34
참 고 문 헌	35

# C O N T E N T S

<b>Chapter 1. Introduction</b>	15
<b>Chapter 2. Materials and Methods</b>	20
1. Materials	20
A. Bacterial strains and plasmids	20
B. Media	20
C. Restriction enzymes and reagents	21
2. Methods	21
A. Isolation and purification of plasmid DNA	21
B. Subcloning of mannose EII gene for nucleotide Sequencing	21
C. Preparation of single strand DNA	22
D. Nucleotide sequencing	22
E. Computer analysis	22
<b>Chapter 3. Results and Discussions</b>	23
1. Nucleotide sequence for structural gene encoding mannose EII and amino acid sequence for the mannose EII deduced from it.	23
2. Hydropathy analysis of mannose EII	23
3. Comparison of the amino acid sequence with various EIIS	28

4. conserved phosphorcylation region of mannose	
EII .....	30
<b>Chapter 4. Conclusion</b> .....	<b>34</b>
<b>Reference</b> .....	<b>35</b>



## 제 1 장 서 론

박테리아는 원형질막에 존재하는 여러가지의 특정한 수송 체계를 이용하여 당, 아미노산, 비타민등을 비롯한 여러가지 영양물질을 받아들인다. 이러한 수송체계중 대부분의 통성혐기성 및 편성혐기성 세균들은 여러가지 당류를 이용하는데 있어서 phosphoenolpyruvate에 의존적인 phosphotransferase system (PTS)을 통해 당을 세포막을 통해서 세포내로 운반시키는 동시에 인산화를 수행한다.<sup>1 2 3)</sup> 이때 세포내로 운반된 인산화된 당은 계속 이어지는 세포대사의 첫 중간물질로서 당의 유입과 대사 사이를 긴밀하게 연결함으로써, 주변의 대사경로에 대한 조절인자로 작용할 수 있기 때문에, 세포내에서 이러한 PTS는 매우 중요한 역할을 하고있다. PTS는 모든 PTS 당의 인산화에 필요하며 원형질에 존재하는 enzyme I과 HPr이 있고, 막에 결합된 당 특이적인 enzyme II 또는 역시 당 특이적 단백질인 enzyme III와의 결합체 (EII/EIII pair)가 존재한다. 일단 당이 PTS를 통해 세포내로 운반되면서 인산화 될 때 인산기 부분은 PEP에서 오게되며 enzyme I, HPr, enzyme II (혹은 EII/EIII pair)를 통해 단계적으로 인산기가 전달되어 최종적으로 당을 인산화 한다.<sup>4)</sup>

또한 이러한 당의 운반과 인산화 뿐만 아니라 PTS를 통하지 않고 유입되는 당의 이용에 관계된 유전자의 전사를 조절하며, 다른 많은 대사경로의 조절에 관계가 되어있는 복잡하고 중요한 당 전달체계이다.<sup>5)</sup>

Abbreviation : PTS, phosphoenolpyruvate : glyucose phosphotransferase system ; PEP, phosphoenolpyruvate ; EI, enzyme I of the PTS, HPr, histidine-containing phosphocarrier protein ; EII, enzyme II of the PTS, EII<sup>Man</sup>, mannose enzyme II of the PTS ; EIII, enzyme III of the PTS ; EIII<sup>Glc</sup>, membrane-associated subunit of the glucose permease ; II-B<sup>Glc</sup>, glucose-specific integral membrane protein of the PTS ; EII-P<sup>Man</sup> and EII-B<sup>Man</sup>, membrane-linked subunit of the mannose permease ; EIII<sup>Man</sup>, membrane associate subunit of the mannose permease

## 1. Mannose와 glucose PTS

가장 많은 연구가 이루어진 PTS 중의 하나가 enteric bacteria의  $\text{II}^{\text{Glc}}$  complex이다.<sup>6,7)</sup> 두 단백질은 *E. coli*와 *S. typhimurium*에서 완전 정제되었고, 두 균주의  $\text{III}^{\text{Glc}}$ 의 경우에 있어서 단지 3개의 잔기만이 다른 것으로 나타났다.<sup>8)</sup> 이러한  $\text{III}^{\text{Glc}}/\text{EII}^{\text{Glc}}$  complex와는 다르게 membrane에 대칭적인 형태로 존재하는 *E. coli*의  $\text{EII}^{\text{Man}}$  complex는 glucose와 mannose를 같은 효율로 인산화 시킨다.  $\text{III}^{\text{Man}}$ 은 dimer로서 아미노산 분석을 행한 결과 EII와는 달리 커다란 hydrophobic한 부분을 가지고 있지 않고, 상당한 양이 cytoplasmic fraction에 존재한다. 또한 Mannose의 transport 이외에도  $\text{III}^{\text{Man}}$ 은  $\lambda$ phage와 coliphage N4가 cytoplasmic membrane를 통과할 때 필요한 것으로도 알려지고 있다.<sup>9, 10)</sup> EII-P<sup>Man</sup>은 매우 hydrophobic한 단백질인 반면 EII-B<sup>Man</sup>의 hydrophobicity는 N-말단에서는 낮은 반면 C-말단으로는 증가한다. 으로는 증가한다. 유산균의 lactose 전달 및 이용에 관한 연구를 제외하고는 Gram 양성세균의 sugar specific protein에 대한 생화학적 연구가 enteric bacteria의 것들 만큼 많이 연구되어 있지 않지만, 많은 Gram 양성세균의 기질특이성은 enteric bacteria에서의 기질특이성과 비슷하다. 따라서 여러종의 Gram 양성세균들은 enteric bacteria의 glucose (Glc,  $\alpha$ -MG)나 mannose (Glc, Man, 2-DG) PT system에 상응하는 기질특이성을 갖는  $\text{III}^{\text{Glc}}/\text{EII}^{\text{Glc}}$ 나 혹은  $\text{EII}^{\text{Man}}$  complex와 유사한 두개의 PT system을 갖고 있다. Enterobacteriaceae에 속하는 세균 97종의 glucose와 mannose PTS활성에 관한 연구결과 세가지의 group으로 나눌 수 있는데, 72종은 두가지의 system을 모두 갖고 있었고 mannose PTS가 없는 것이 9종, glucose PTS

가 없는 것이 13종으로 나타났다.<sup>3)</sup>

## 2. Sugar specific protein

PTS에 대한 연구에서 최근에 주요한 관심의 대상이 되고있는 sugar specific Enzyme II complex는 PTS protein중 가장 다양하게 존재하는데 1-3개의 polypeptide chain(class 1~ class 3)으로 이루어져 있다.<sup>3,11)</sup> 현재까지 밝혀진 24종류의 EII complex는 화학적, 물리적 성질에서 매우 다양함을 보이고 있지만, 서로 다른 EII complex를 조사해 보았을 때 서로간에는 상당한 기능상의 공통점이 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>4,12)</sup> D-mannose와 L-sorbose PTS를 제외하고는, DNA 염기배열로부터 생각할 수 있는 여러가지 EII들의 일차구조는 다음과 같은 공통점을 갖고 있다. 첫째, 크기에 있어서 fructose PTS를 제외하고 EII나 EII/EIII complex가 모두 거의 동일하게 625-675개의 아미노산으로 이루어져 있고, 둘째는 hydropathy plot에 근거한 이차구조의 분석결과 서로가 유사하게도 약 370개의 소수성 아미노산 부분과 250~305개의 친수성 아미노산 부분으로 이루어져 있다. 셋째는 소수성 아미노산 중에서 약 250개의 절대 소수성 아미노산들은 대부분 12회까지 가능한 transmembrane helices를 이룰 수 있으며, 나머지 120여개의 친수성이거나 중성아미노산들은 아마도 transmembrane helices를 연결하는 여러 크기의 loop을 형성하거나, 막에 단백질 분자를 고정시키는 단일의 amphipathic helix를 형성하기 위해 모여있는 것으로 생각된다. 마지막으로 소수성이나 친수성 아미노산들이 확실히 서로 cluster를 이루고 있는 경향이 있으며, 종종 polypeptide의 한쪽 끝에서 이러한 경향을 나타낸다. 단백질의 아미노산 sequence 수준에서 비교했을 때 각각의 EII들은 유사성이 아주

적거나 전혀없는 것처럼 보이지만, 위와같은 공통적인 특징은 기질 특이성이나 hydrophathy plot에 의해 추론될 수 있는 transmembrane channel 을 형성하는 것과 같은 3차구조의 공통성을 가지고 있다고 생각된다.<sup>4,13)</sup> 가장 유사한 단백질로서는 *E. coli* 의 EII<sup>Na<sup>+</sup></sup> 와 III<sup>Glc</sup>/EII<sup>B<sup>Glc</sup></sup> complex 로서 44%의 상동성을 나타내며, 20% 정도의 conservative substitution을 나타내고 있다.<sup>14,27)</sup> 또다른 밀접한 관계에 있는 단백질은 *E. coli* 와 *B. subtilis* 의 EII<sup>B<sup>Scr</sup></sup>, *S. mutans* 의 EII<sup>Scr</sup>, *E. coli* 의 EII<sup>B<sup>Gal</sup></sup>로서 약 27% 정도의 상동성을 가지고 있으며,<sup>15,18)</sup> 특히 sucrose specific protein 들은 상호간에 약 40%의 상동성을 나타낸다.<sup>15,30)</sup> sugar specific protein 사이에 서로 유사성이 있는 반면, 또한 일부의 단백질들은 아미노산 서열에 있어서 서로 연관성을 갖고있지 않다. 예로서 EII<sup>Man</sup> complex 경우 세계의 polypeptide로 이루어진 유일한 EII이며 EII-B<sup>Man</sup> 과 EII-P<sup>Man</sup> 을 다른 PTS 의 EII 단백질과 비교했을때 유사성이 거의 없었다.<sup>12,16)</sup> 역시 *S. aureus* 와 *L. casei* 의 Lactose PTS를 비롯해 *E. coli* 의 fructose PTS에 대한 EII 단백질은 다른 PTS의 EII 단백질과 유사성을 보이고 있지 않다.<sup>12,29)</sup>

이상에서 언급한 바와같이 PTS는 많은 당의 운반과 인산화 뿐만 아니라 inducer exclusion, catabolite repression을 비롯한 많은 대사 경로의 조절에도 관계되어 있는 복잡하고 중요한 uptake system이다. 세포는 PTS를 통해서 세포외에서 빈번하게 일어나는 다양한 signal을 감지하고 전달하여 반응을 하여야 하기 때문에, PTS는 복잡성, 다양성, 유연성을 나타내고 있다. 그러므로 많은 연구에도 불구하고 아직까지 당이 운반되고 인산화 되는 정확한 기작이 알려져 있지 않으며, PTS가 어떻게 조절을 받고 또한 그것이 다른 system을 어떻게 조절하는지, *pts operon*이 어떻게 조절받는지, PTS가 다른 network의 단백질이나 유전자와 어떻게 작용

하는지 등에 대해서도 아직 정확하게 알려져 있지 않다. PTS와 non-PTS 당의 uptake rate는 세포의 성장에 있어서 rate-limiting step이 될 수 있으므로 좀 더 정확한 조절기작을 밝힐 수 있다면 PTS당의 이용성을 증가시키거나 non-PTS당을 이용하는데 관여하는 유용한 효소를 생산할 수 있다. 이와 같은 목적을 위해서 당의 세포내 전달에 관련된 효소와 유전자 등을 분리하고 그 작용기작과 조절에 관한 연구가 필요하다. PTS에 의해서 glucose와 Mannose을 이용하는 *Corynebacterium glutamicum*은 아미노산의 생산을 위해 산업적으로 오랫동안 사용되어져 왔으나 *E. coli*나 *B. subtilis*<sup>17,18,19)</sup> 등의 균주에 비하여 sugar uptake system에 관한 유전적인 연구가 거의 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구에서는 *C. glutamicum*으로 부터 분리한 mannose enzyme II 유전자의 DNA 염기 서열을 결정하였고, 이를 바탕으로 mannose enzyme II의 아미노산 서열을 추론하여 기존에 발표된 여러 다른 PTS의 enzyme II와 비교, 분석을 행하였다. 이러한 결과를 바탕으로 *C. glutamicum*의 mannose PTS에 대해 좀 더 정확한 기작을 알아낼 수 있다면, PTS에 의해 조절받는 여러 대사경로를 파악함으로써 유용대사 산물의 생산을 조절할 수 있고, 또한 PTS당의 이용성을 증가시켜 유용대사 산물의 생산을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 가. 사용균주 및 plasmids

본 실험에 사용한 균주와 plasmids는 Table 1과 같다. glucose와 mannose PTS중 EII 변이주인 *E. coli* ZSC113은 재조합 plasmid를 선별하기 위한 숙주로 사용하였다. Template DNA를 제조하기 위해 M13 mp 18과 M13mp19 phage vector를 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in experiment

Strains/plasmids	Relevant properties	Reference or source
<i>C. glutamicum</i> KCTC 1445		
<i>E. coli</i> JM 109		20
<i>E. coli</i> ZSC113	<i>ptsG</i> , <i>ptsM</i> , <i>glK</i>	21
M13mp 18, M13mp 19		20
pCTS 3	Glc <sup>+</sup> , Man <sup>+</sup>	22

#### 나. 배 지

실험에 사용한 균주들을 배양하기 위해 사용한 배지는 LB배지이고, 형질전환시 형질전환체 선별 배지로서 항생물질 Ampicillin (50 $\mu$ g/ml)과 탄소원으로 glucose를 1% 첨가한 MacConkey agar base를 사용하였다.

다. 제한효소 및 시약

시약은 모두 일급시약을 사용하였으며, 제한효소는 Boehringer Mannheim과 KOSCO에서 구입하여 최적조건에서 사용하였다. T4 DNA ligase와 Alkaline phosphatase는 BRL과 Promega에서 각각 구입하였다.

Sequencing을 위해 USB에서 구입한 Sequenase(modified T7 DNA polymerase)와 Takara의 7-DEAZA Sequencing kit(ver 2.0)을 사용하였다. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP와 [ $\alpha$ - $^{36}$ S]dATP는 모두 Amersham에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 방 법

가. Plasmid DNA의 분리 및 정제

Plasmid DNA는 cesium chloride-ethidium bromide equilibrium density gradient centrifugation 으로 정제하였다. plasmid DNA와 M13 RF DNA를 신속 분리하기 위해 Birnboim과 Doly<sup>23)</sup>의 Alkaline lysis 방법을 사용하였다. DNA 절단 단편의 순수 분리를 위해서 electroelution을 사용하여 정제하였다.

나. Enzyme II 유전자의 nucleotide sequencing을 위한 subcloning

Mannose EII 유전자를 가지고 있는 재조합 plasmid pCTS3를 *Hind*III로 처리하여 2.2kb의 삽입 DNA 단편을 electroelution으로 정제한 후 2.2 kb의 *Hind*III 절단 단편내에 단일인식 부위로서 비교적 고르게 위치해 있는 *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI으로 각각 절단한 후 동일한 제한효소로 절단한 M13 vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 연결하였다. *E. coli* JM109에 형질전환하여 1 ml의 LB에 현탁한 후 1시간 배양하여 이 형

절전환된 세포현탁액 50 ~ 400  $\mu\text{l}$ 와 25  $\mu\text{l}$ 의 X-gal과 IPTG의 혼합 stock액 (X-gal (50mg), IPTG (20mg) / 1ml (DMF)), 200  $\mu\text{l}$ 의 *E. coli* JM 109 indicator cell (OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.8)을 섞은 후 soft agar overlay 하여 하룻밤 배양하여 생성되는 White plaque를 선별하였다.

#### 다. Single strand DNA의 정제

하룻밤 배양한 40  $\mu\text{l}$ 의 *E. coli* JM109와 white plaque를 함께 접종하여 37 °C에서 5시간 배양한 후 원심분리하여 분리한 1.2ml의 상층액에 250  $\mu\text{l}$ 의 20% PEG / 2.5 M NaCl 용액을 넣은 후 잘 섞는다. ice bath에서 1시간 방치한 후 원심분리하여 생성된 침전물을 300  $\mu\text{l}$ 의 TE에 녹여 2회의 phenol과 Chloroform처리를 하였다. 원심분리하여 분리한 상층액에 2.5 vol의 cold-ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 1/5 TE buffer에 현탁하여 sequencing을 위한 template DNA로 사용하였다.

#### 라. Nucleotide Sequencing

제조함 plasmid pCTS3에 함유된 2.2 kb의 *Hind* III 절단 단편의 염기서열을 결정하기 위해 Sanger 등<sup>24)</sup>의 dideoxy 방법에 따라 sequenase를 이용하여 Sequencing 하였으며, 일부의 염기서열은 7-DEAZA Sequencing kit를 사용하여 결정하였다. 염기서열의 중복확인을 위해 두 종류의 Synthetic primer (P1, 5' - AATGCAACTGCGATACC - 3'; P2, 5' - TTCCAGAATATGTTGCG - 3')를 사용하여 분석하였다.

#### 마. Computer analysis

염기서열 data는 GENETYX Gene Treatment System (software Development)을 이용하여 분석하였다.



## 제 3 장 결과 및 고찰

### 1. Mannose enzyme II 유전자의 염기서열과 이로부터 추론된 mannose enzyme II의 아미노산 서열

제조합 plasmid pCTS3 내에 mannose E II 유전자를 code 하고 있는 2.2 kb *Hind* III 절단 단편 DNA의 염기서열을 결정하기 위해서, Fig.1과 같은 방법으로 sequencing하였다. 2.2kb의 *Hind* III 절단 단편 내에 비교적 고르게 단일제한 효소인식 부위로 존재하는 *Bgl* II, *Bam* HI, *Eco* RI을 이용하여 절단한 후 각각의 절단 단편을 M13mp 18과 M13mp19 phage vector에 삽입하여 여러가지의 작은 DNA 절단 단편을 가진 subclone을 제조한 후 template로서 각각의 single strand DNA를 분리, 정제하여 Sequencing하였다. 또한 DNA Sequence의 중복 확인을 위해서 두 종류의 synthetic primer를 사용하여 분석하였다. Fig.1과 같은 방법으로 총 2,177bp의 DNA 염기서열을 결정한 결과, 1,245 bp의 open reading frame을 확인하였으며 이러한 ORF는 분자량 약 45,000 dalton으로 추정되는 415개의 아미노산으로 이루어진 polypeptide를 code하고 있는 것으로 생각되었다. 이와같은 ORF의 DNA 염기서열과 그로부터 추정되는 415개의 아미노산 서열을 Fig.2에 나타내었다.

### 2. Mannose enzyme II의 hydropathy 분석

kyte와 Doolittle의 방법<sup>25)</sup>에 따라 DNA 염기서열에 의해 추론된 mannose E II의 hydropathy 분석을 행하였다. Fig.3에 나타낸 바와 같이 clone한 mannose E II 유전자에 의해 coding된 단백질은 membrane을 여러차례 가로 질러서 존재하는 transmembrane

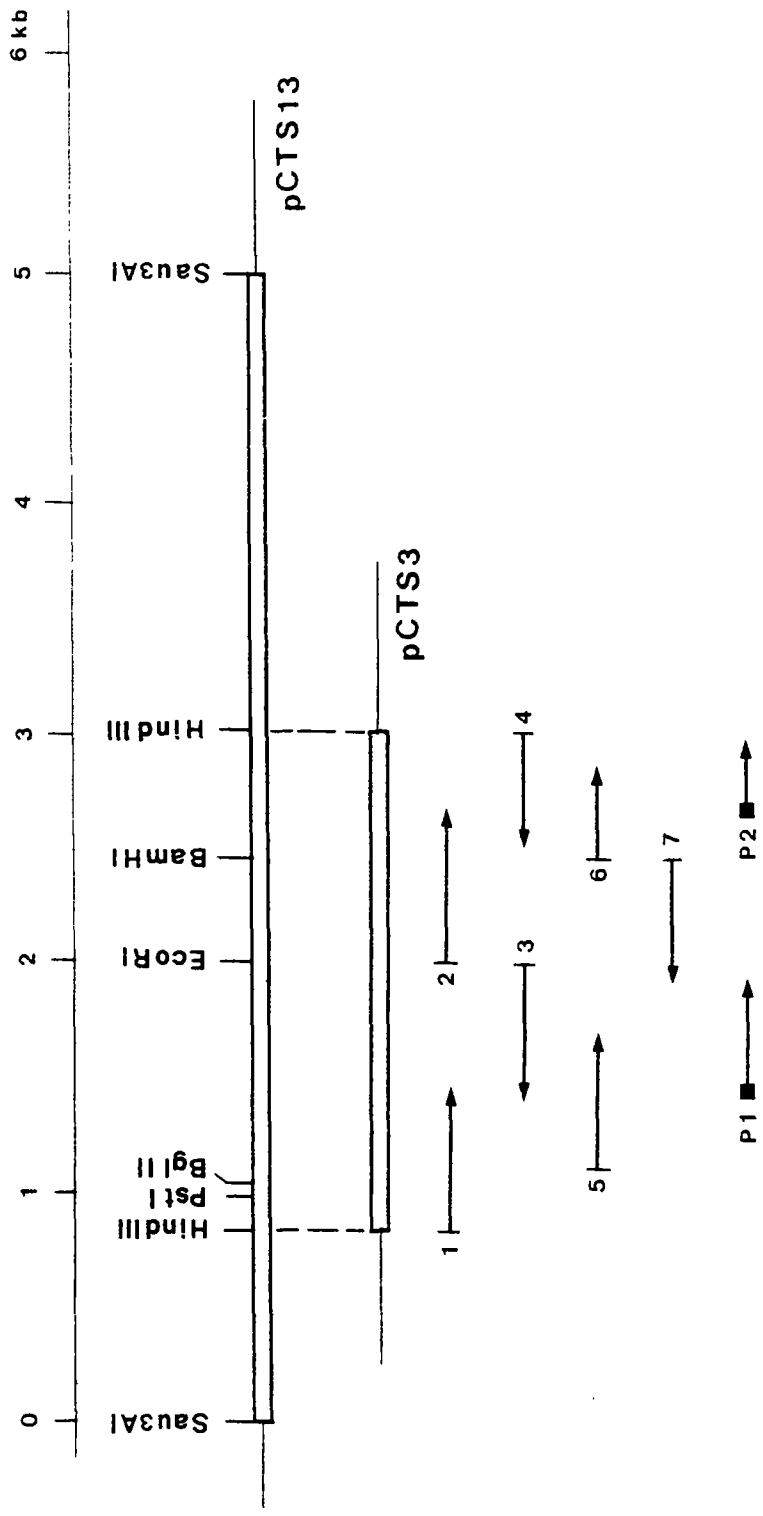


Fig. 1. Restriction endonuclease map of pCTS3 and sequencing strategy for the mannose enzyme II gene. The thin line represents the plasmid vector pBR322 and rectangle represents chromosomal DNA corresponding to mannose enzyme II gene derived from *C. glutamicum*. Arrows at the bottom denote the direction and extent of dideoxy chine termination sequencing<sup>24</sup>. The sequencing strategies employed are the use of universal primer and gap filling with synthetic primers.

1	ATG GCG TCC AAA CTG ACG ACG ACA TCG CAA CAT ATT CTG GAA MEI Ala Ser Lys Leu Thr Thr Thr Ser Gln His Ile Leu Glu	42
43	AAC CTT GGT GGA CCA GAC AAT ATT ACT TCG ATG ACT CAC TGT Asn Leu Gly Gly pro Asp Asn Ile Thr Ser MET Thr His Cys	84
85	GCG ACT CGC CTT CGC TTC CAA GTG AAG GAT CAA TCC ATT GTT Ala Thr Arg Leu Arg Phe Gln Val Lys Asp Gln Ser Ile Val	126
127	GAT CAA CAA GAA ATT GAC TCC GAC CCA TCA GTT CTT GGC GTA Asp Gln Gln Glu Ile Asp Ser Asp Pro Ser Val Leu Gly Val	168
169	GTA CCC CAA GGA TCC ACC GGT ATG CAG GTG GTG ATG GGT GGA Val Pro Gln Gly Ser Thr Gly MET Gln Val Val MET Gly Gly	210
211	TCT GTT GCA AAC TAT TAC CAA GAA ATC CTC AAA CTT GAT GGA Ser Val Ala Asn Tyr Tyr Gln Glu Ile Leu Lys Leu Asp Gly	252
253	ATG AAG CAC TTC GCC GAC GGT GAA GCT ACA GAG AGT TCA TCC MET Lys His Phe Ala Asp Gly Glu Ala Thr Glu Ser Ser Ser	294
295	AAG AAG GAA TAC GGC GGA GTC CGT GGC AAG TAC TCG TGG ATT Lys Lys Glu Tyr Gly Gly Val Arg Gly Lys Tyr Ser Trp Ile	336
337	GAC TAC GCC TTC GAG TTC TTG TCT GAT ACT TTC CGA CCA ATC Asp Tyr Ala Phe Glu Phe Leu Ser Asp Thr Phe Arg Pro Ile	378
379	CTG TGG GCC CTG CTT GGT GCC TCA CTG ATT ATT ACC TTG TTG Leu Trp Ala Leu Leu Gly Ala Ser Leu Ile Ile Thr Leu Leu	420
421	GTT CTT GCG GAT ACT TTC GGT TTG CAA GAC TTC CGC GCT CCA Val Leu Ala Asp Thr Phe Gly Leu Gln Asp Phe Arg Ala Pro	462
463	ATG GAT GAG CAG CCT GAT ACT TAT GAA TTC CTG CAC TCC ATG MET Asp Glu Gln Pro Asp Thr Tyr Val Phe Leu His Ser MET	504
505	TGG CGC TCG GTC TTC TAC TTC CTG CCA ATT ATG GTT GGT GCC Trp Arg Ser Val Phe Tyr Phe Leu Pro Ile MET Val Gly Ala	546
547	ACC GCA GCT CGA AAG CTC GGC GCA AAC GAG TGG ATT GGT GCA Thr Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ala Asn Glu Trp Ile Gly Ala	588
589	GCT ATT CCA GCC GCA CTT CTT ACT CCA GAA TTC TTG GCA CTG Ala Ile Pro Ala Ala Leu Leu Thr Pro Glu Phe Leu Ala Leu	630
631	GGT TCT GCC GGC GAT ACC GTC ACA GTC TTT GGC CTG CCA ATG Gly Ser Ala Gly Asp Thr Val Thr Val Phe Gly Leu Pro MET	672
673	GTT CTG AAT GAC TAC TCC GGA CAG GTA TTC CCA CCG CTG ATT Val Leu Asn Asp Tyr Ser Gly Gln Val Phe Pro Pro Leu Ile	714
715	GCA GCA ATT GGT CTG TAC TGG GTG GAA AAG GGA CTG AAG AAG Ala Ala Ile Gly Leu Tyr Trp Val Glu Lys Gly Leu Lys Lys	756

757	ATC ATC CCT GAA GCA GTC CAA ATG GTG TTC GTC CCA TTC TTC	798
	Ile Ile Pro Glu Ala Val Gln MET Val Phe Val Pro Phe Phe	
	C	
799	TCC CTG CTG ATT ATG ATC) CCA GCG ACC GCA TTC CTG CTT GGA	840
	Ser Leu Leu Ile MET Ile Pro Ala Thr Ala Phe Leu Leu Gly	
841	CCT TTC GGC ATC GGT GTT GGT AAC GGA ATT TCC AAC CTG CTT	882
	Pro Phe Gly Ile Gly Val Gly Asn Gly Ile Ser Asn Leu Leu	
883	GAA GCG ATT AAC) AAC TTC AGC CCA TTT ATT CTT TCC ATC GTT	924
	Glu Ala Ile Asn Asn Phe Ser Pro Phe Ile Leu Ser Ile Val	
925	ATC CCA TTG CTC TAC CCA TTC TTG GTT CCA CTT GGA TTG CAC	966
	Ile Pro Leu Leu Tyr Pro Phe Leu Val Pro Leu Gly Leu His	
967	TGG CCA CTA AAC GCC ATC ATG ATC CAG AAC ATC AAC ACC CTG	1008
	Trp Pro Leu Asn Ala Ile MET Ile Gln Asn Ile Asn Thr Leu	
1009	GGT TAC GAC TTC ATT CAG GGA CCA ATG GGT GCC TGG AAC TTC	1050
	Gly Tyr Asp Phe Ile Gln Gly Pro MET Gly Ala Trp Asn Phe	
1051	GCC TGC TTC GGC CTG GTC ACC GGC GTG TTC TTG CTC TCC ATT	1092
	Ala Cys Phe Gly Leu Val Thr Gly Val Phe Leu Leu Ser Ile	
1093	AAG GAA CGA AAC AAG GCC ATG CGT CAG GTT TCC CTG GGT GGC	1134
	Lys Glu Arg Asn Lys Ala MET Arg Gln Val Ser Leu Gly Gly	
1135	ATG TTG GCT GGT TTG CTC GGC GGC ATT TCC GAG CCT TCC CTC	1176
	MET Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gly Ile Ser Glu Pro Ser Leu	
1177	TAC GGT GTT CTG CTC CGA TTC AAG AAG ACC TAC TTC CGC CTC	1218
	Tyr Gly Val Leu Leu Arg Phe Lys Lys Thr Tyr Phe Arg Leu	
1219	TGC CGG GTT GTT TGG CAG GCG GTA TCG 1245	
	Cys Arg Val Val Trp Gln Ala Val Ser	

Fig. 2. Nucleotide sequence of the mannose enzyme II gene of *C. glutamicum* and the deduced amino acid sequence of the encoded mannose enzyme II of the PTS.

5.00000

0.00000

-5.00000

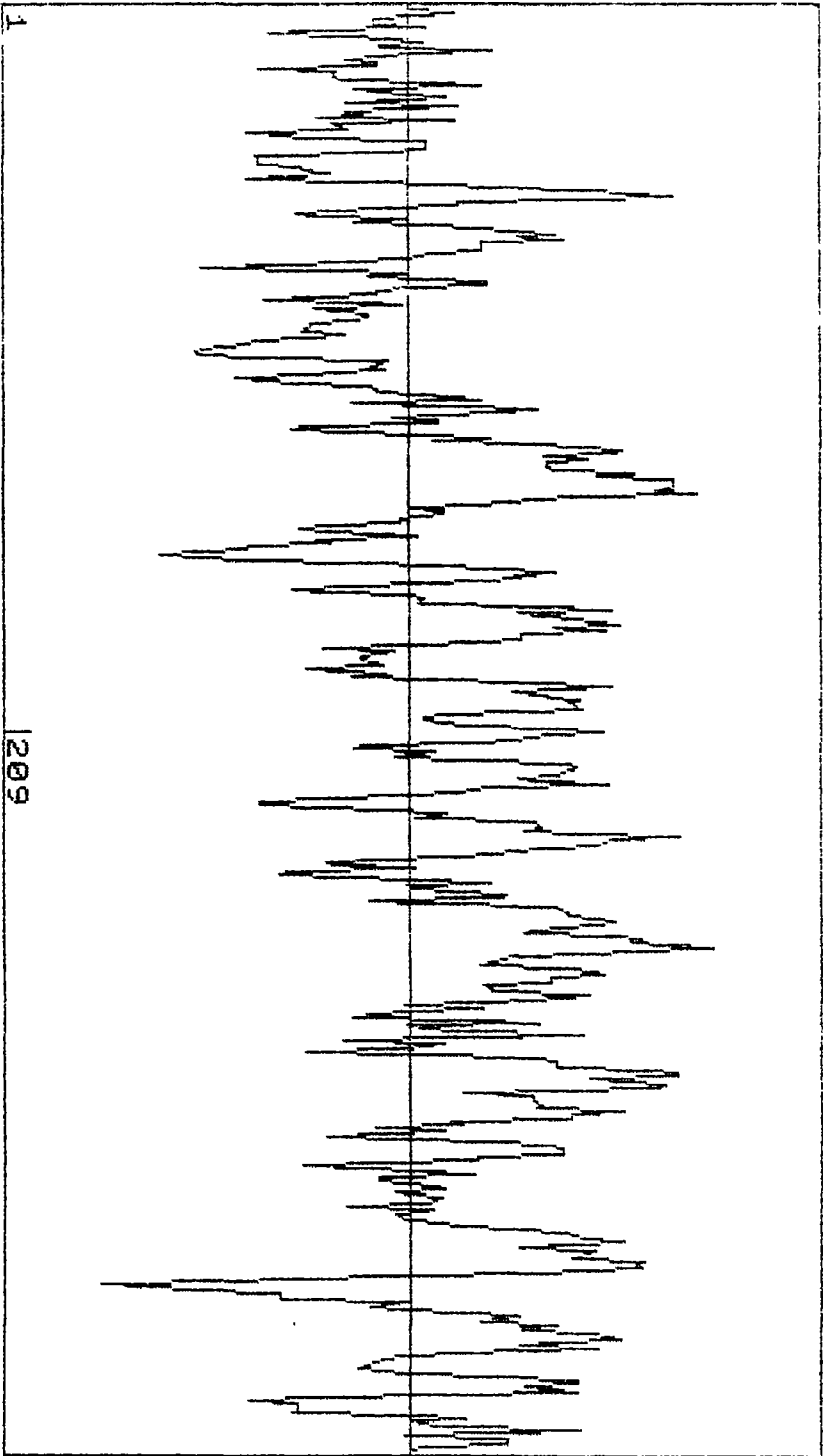


Fig. 3. Hydropathy plot of the amino acid sequences of the mannose enzyme II. The plot was generated according to the method of Kyte and Doolittle<sup>28)</sup>. The window size was 5 amino acids.

protein의 특징적인 hydrophathy pattern을 나타내었다. 추정된 EII 단백질은 전체적으로 약간 hydrophobic(62%)한 단백질로서, 친수성 아미노산은 주로 단백질의 가장 hydrophilic한 부위인 80-N-말단부위에 존재하며, 90에서 415사이의 아미노산 부위는 주로 hydrophobic한 부분으로서 이 부위에서는 소수성 아미노산과 친수성 아미노산이 교대로 존재하는 것으로 나타났다. 이러한 구조는 아마도 단백질이 membrane에 반복적으로 가로질러서 존재하기 때문일 것으로 생각된다.

C-말단의 hydrophobic한 부위는 당의 transport 기능을 하는 부위인 반면, N-말단 부위는 원형질에 존재하는 단백질과 반응하며 에너지 소모와 당의 축적을 연결하는 기능을 하는 것으로 생각된다. 이러한 구조는 대장균의 Glucose EII나 N-acetylglucosamine의 EII와는 다른 구조로서 이러한 단백질에서는 N-말단 부위가 membrane spanning 부위를 이루고 있는 것으로 보고되어져 있다.<sup>28)</sup>

### 3. mannose enzyme II와 다른 여러가지 enzyme II의 비교 및 분석

PTS의 많은 EII들은 gene duplication과 mutation에 의해 오래 동안 진화되고 다양화 되어져 왔다고 보고되어져 있다.<sup>26)</sup> 따라서 추론된 mannose EII 단백질과 기존에 발표된 다른 bacteria의 여러 EII와의 아미노산 서열을 비교, 조사하였다. 분석결과 Fig. 4에서 나타낸 바와같이 *E. coli*의 glucose<sup>6)</sup>, N-acetylglucosamine<sup>14,27)</sup>, sucrose<sup>29,30)</sup>,  $\beta$ -glucoside<sup>31,32,33)</sup> EII와 아미노산 서열을 비교하여 보았을 때 분자 전체적으로는 특별한 상동성을 보이고 있지 않지만, hydrophilic한 N-말단부위(12-78 아미노산)는 *E. coli* 유래 glucose EII의 hydrophilic한 C-말단 부위와 약 40%의 높은 상동성을 나타내었고, 또한 man-

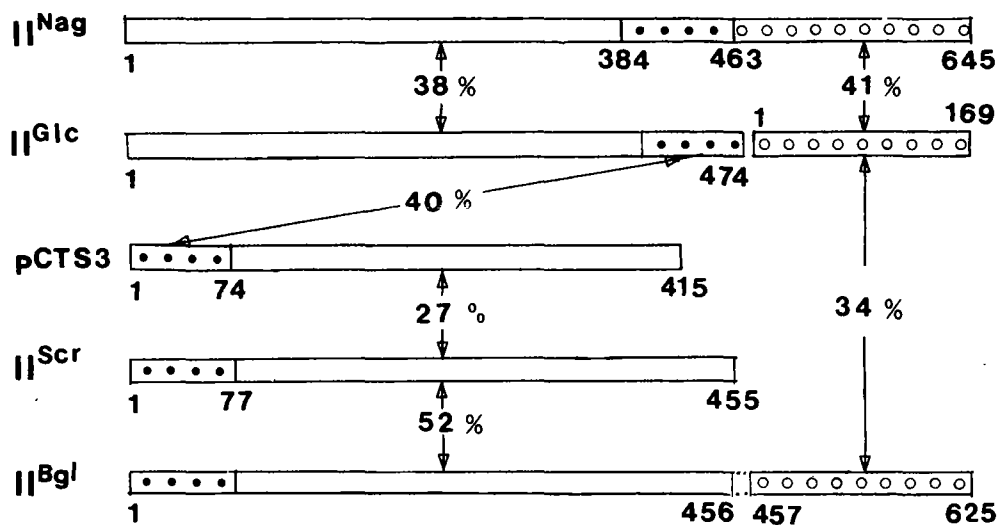


Fig.4. Relationships between pCTS3 and several Enzyme IIs. The white area represent the hydrophobic domains and the closed round areas represent hydrophilic domains of the Enzyme II. The open circle areas of II<sup>Nag</sup> and II<sup>Bgl</sup> represent the domains that show homology with II<sup>Glc</sup>. Homology is given as a percentage.

nose EII의 hydrophobic한 C-말단부위(88-404 아미노산)은 *S.ty-phimurium* 유래 sucrose EII의 hydrophobic한 부위와 약 27%의 상동성을 나타내었다.

#### 4. mannose enzyme II의 phosphorylation에 관계된 conserved region 확인 및 다른 enzyme II와 비교 분석

분자 전체적으로는 많은 상동성을 보이고 있지 않은 것 같으나, 모든 PTS EII의 공통적인 기능인 phosphate의 전달에 관련된 부위는 아미노산 서열에 있어서 매우 유사한 상동성을 나타내었다. 대부분의 EII에서 발견되는 두곳의 conserved region이 추정된 mannose EII의 아미노산 서열에서 밝혀졌다. Fig.5는 mannose EII 단백질의 catalytic site라 추정되는 cystein 잔기와 그 주변의 아미노산 서열을 기존에 발표된 여러 EII의 phosphorylation domain과 비교하여 나타내었다. Fig.5에서 보는바와 같이 mannose enzyme II의 cystein 잔기 주위의 아미노산들은 이미 알려진 다른 PTS EII의 필수적인 cystein 잔기 주변의 아미노산과 잘 일치하였다. 이러한 conserved region은 glucose EIII나 혹은 glucose EIII-like domain과 반응하여 인산화가 일어나는 부위로 보고되어져 있다. 이러한 conserved region의 특징은 cystein 잔기의 오른쪽에서 더욱 높은 상동성을 나타내며, 주로 단백질의 hydrophilic한 부위에 존재하는 것으로 나타났다. 하지만 *E.coli*의 mannitol<sup>34, 35</sup>, fructose<sup>36</sup> mannose EII<sup>16, 37</sup>와는 이와같은 높은 정도의 상동성이 나타나지 않았다.

Fig.6은 phosphorylation의 기능에 중요하다고 생각되어지는 histidine 잔기 주위의 12개 아미노산 sequence를 나타내었다. 이러한



histidine 잔기는 주로 hydrophobic한 부위에 존재하며 enzymeⅢ  
나 enzymeⅢ와 유사한 기능을 하는 domain으로 부터 phosphate를  
받아 유입되는 당에게 최종전달 하는 부위로 보고되어져 있다. Fig. 6에  
나타난 바와같이 mannose EⅡ의 histidine 잔기와 그 주변의 아미노산은 다  
른 여러 EⅡ의 histidine 주변의 아미노산들과 높은 상동성을 나타내었다

Gut-Ec	254	A V I D C G G T L R
Nag-Ec	408	A I D A C I T R L R
Glc-Ec	417	N L D A C I T R L R
Bgl-Ec	24	S L M H C A T R L R
Scr-Bs	26	S A A H C A T R L R
Scr-Sm	25	A A A H C A T R L R
Man-Cg	24	S M T H C A T R L R

Fig. 5. Alignment of the conserved cystein region which may be Enzyme III<sup>Glc</sup> or EIII<sup>Glc</sup>-like binding domain in six Enzyme II's and mannose enzyme II of *C. glutamicum*. Essential conserved cysteyl residues are boxed. Additional abbreviations : Ec, *E. coli* ; Bs, *B. subtilis*<sup>29)</sup> ; Sm, *S. mutans*<sup>30)</sup> ; Cg, *C. glutamicum* ; Gut, glucitol ; Glc, Glucose ; Nag, N-acetylglucosamine ; Scr, sucrose ; Bgl,  $\beta$ -glucoside.

Gut-Ec	R S N I M T <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> I R I E K	195
Scr-St	I V I T G I <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> H S F H A	313
Nag-Ec	L I P T G L <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> Q V L N T	195
Glc-Ec	L V P F G L <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> H I W N V	216
Bgl-Ec	F V M F G L <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> W G L V P	311
Man-Cg	L V P L G L <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">H</span> W P L N A	327

Fig.6. Alignment of the conserved histidine region which is potential phosphorylation sites in five Enzyme [I]s and mannose enzyme [II] of *C. glutamicum*. Residues showing identity are boxed. Abbreviations: Ec, *E. coli*; St, *S. typhimurium*; Cg, *C. glutamicum*; Gut<sup>38)</sup>, glucitol; Glc, Glucose; Nag, N-acetylglucosamine; Scr, sucrose; Bgl,  $\beta$ -glucoside.

## 제 4 장 결 론

1. PEP 의존성 당 전달계 효소기작에 관련된 유전자중 본 연구실에서 *C. glutamicum* 으로부터 분리한 mannose EII 유전자의 구조를 밝히기 위해서, 2177 bp의 염기서열을 결정하여 분석한 결과 mannose EII 유전자는 총 1245 bp의 염기로 구성되어 있었고, 그로부터 추론된 효소는 415개의 아미노산으로 이루어진 분자량 약 45,000 dalton의 hydrophobic한 단백질 이었다.
2. 밝혀진 mannose EII 유전자의 염기서열을 근거로 추론한 mannose EII의 아미노산 서열을 이용하여 hydropathy 분석을 행한 결과 hydrophilic 한 부위가 교대로 나타나는 transmembrane protein의 특징적 hydropathy Pattern을 나타내었다.
3. 추론된 mannose EII 단백질의 아미노산 서열과 기존에 발표된 *E. coli* 등 다른 미생물 유래의 여러가지 당에 대한 EII 유전자와의 상동성을 비교, 분석한 결과 hydrophilic한 N-말단 부위 (12-78 amino acid)는 *E. coli* 유래 sucrose EII의 hydrophilic한 C-말단 부위와 약 40%의 상동성을 나타냈으며, 또한 hydrophilic한 C-말단 부위는 *Salmonella typhimurium* 유래 sucrose EII의 hydrophilic한 부위와 약 27%의 상동성을 나타내었다.
4. Mannose EII 유전자로부터 예상되는 mannose EII와 기존에 발표된 다른 미생물 유래의 EII와의 상동성을 조사한 결과, phosphorylation 부위라고 생각되는 histidine과 cysteine을 함유하며, 다른 EII와의 유사성이 매우 높은 두곳의 conserved region이 존재하였다.

## REFERENCES

1. Saier, M.H., Jr., in "Mechanisms and regulation of carbohydrate transport in bacteria" Ed., ed. by M.H. Saier, Academic press, New York, 1985, pp. 49-79.
2. Reizer, J., M.H. Saier, Jr., J. Deutcher, F. Grenier, J. Thompson and W. Hengstenberg, 1988, *Crit Rev. Microbiol.* 15:297-338.
3. N.D. Meadow, D.K. Fox and S. Roseman, 1990, *Annu. Rev. Biochem.* 59:497-54.
4. Lengeler, J.W., 1990, *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1018:155-159.
5. Saier, M.H., Jr., 1989, *Microbiol. Rev.*, 53:109-120.
6. Erni, B. and B. Zanolari, 1986, *J. Biol. Chem.* 261:16398 ~ 16403.
7. Meadow, N.D., D.W. Saffen, R.P. Dottin and S. Roseman, 1982 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79:2528 ~ 2532.
8. Nelson, S.O., A.R.J. Schuitema, R. Benne, Lex H.T. vander Ploeg, J.S. Plijter, F. Aan and P.W. Postma, 1984, *EMBO. J.*, 3:1587 ~ 1593.
9. Erni, B., Zanolari, B. Zanolari, 1985, *J Biol Chem*, 260:15495 ~ 15503
10. Kim, K., O.J. Yoo, 1989, *Biochem. Int.*, 18:545 ~ 549

11. Robillard, G.T and J.S. Lolkema, 1988, *Biochimica et Biophysica Acta*, 947:493 ~ 519.
12. Saier, Jr. M.H., M. Yamada, B. Erni, K. Suda, J. Lengeler, R. Ebner, P. Argos, B. Rak, K. Schetz, C.A. Lee, G.C. St and R.F. Doolittle, 1988, *FASEB. J.*, 2:199 ~ 208.
13. Lengeler, I.W., F. Titgemeyer, A.P. Voger and B.M. Wohrl 1990, *Phil. Trans. R.Soc. Lond. B.*, 326:489 ~ 504.
14. Roger, M.J., T. Ohgi, J. Plumbridge, and D. Söll, 1988, *Gene*, 62:197 ~ 207
15. Ebner, R., J.W. Lengeler, 1988, *Mol. Microbiol.*, 2:9 ~ 17.
16. Erni, B., B. Zanolari and H.P. Kocher, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:5238 ~ 5247.
17. Steinmetz, M. and G. Gonzy-Treboul, 1987, *J. Bacteriol.*, 169:2287 ~ 2290.
18. Postma, P.W., G. Gonzy-Treboul, J.H. de Waard and M. Zagorec, 1991, *Mol. Microbiol.*, 5:1241 ~ 1249.
19. Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier and G. Rapoport, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:8773 ~ 8777.
20. Sambrook, Fritsch, Maniatis. 1989. In: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual (Second edit.)*, Cold Spring Harbor
21. Bouma, C.L., N.D. Meadow, E.W. Stover, and S. Roseman, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84:930 ~ 934.

22. Lee, J.K., M.H. Sung, K.H. Yoon, J.G. Pan, J.H. Yu, and T.K. Oh, 1993, *J. Microbiol. Biotechnol.* 3: In Press
23. Birnboim, H.C., and J. Doly, 1979, *Nucleic Acid Res.*, 7: 1513 ~ 1523
24. Sanger, F., A.R. Coulson, B.G. Ballel, A.J.H. Smith, and B.A. Roe, 1980, *J. Mol. Biol.*, 143: 161 ~ 178.
25. Kite, J., and R.F. Doolittle, 1982, *J. Mol. Biol.*, 157: 105 ~ 132
26. Saier, Milton H., Jr. and Mamoru Yamada, in "Sugar transport and metabolism in Gram-positive bacteria," Ed., ed. by J. Reizer and A. Peterkofsky, Ellis Horwood Limited, West Sussex, 1987, pp. 196-214.
27. Peri, K.G., and E.B. Waygood, 1988, *Biochemistry*, 2: 6054 ~ 6061
28. Postma, P.W., C.P. Broekhuizen, and R.H. Geerse, 1989, *FEMS, Microbiol. Rev.*, 63: 69 ~ 80.
29. Geerse, R.M., F. Izzo, and P.W. Postma, 1989, *Mol. Gen. Genet.*, 216: 517 ~ 525.
30. Sato, Y., F. Poy, G.R. Jacobson, and H.K. Kuramitsu. 1989, *J. Bacteriol.*, 171: 263 ~ 271.
31. Bramley, H.F., and H.L. Kornberg, 1987, *J. Gen. Microbiol.*, 133: 563 ~ 573
32. Schnetz, K., C. toloczyki and B. Rak, 1987, *J. Bacteriol.*, 169: 2579 ~ 2590.

33. Schnetz, K., S.L. Sutrina, M.H. Saier, Jr. and B. Rak  
1990, *J. Biol. Chem.*, 265:13464 ~ 13471.
34. Lee, C.A., and M.H. Saier, Jr., 1983, *J. Biol. Chem.*,  
258:10761 ~ 10767.
35. Pas, H.H , and G.T. Robillard, 1988, *Biochemistry*,  
27:5515 ~ 5519.
36. Kornberg, H.L. and T.I. Prior, 1989, *FEMS Microbiol.*  
*Rev.*, 63:193 ~ 200 .
37. Erni, B., B, Zanolari, P. Graff and H.P. Kocher, 1989  
*J. Biol. Chem.*, 264:18733 ~ 18741.
38. Yamada, M. and M.H. Saier., 1987, *J. Biol. Chem.*,  
262:5455 ~ 5463.