

제 1999 연도  
기관고유사업  
보 고 서

BSKG1341-1999064-3

*Bacillus*균의 분화관련 분자조절연구

Studies on the regulation of sporulation  
initiation

2000. 1.

생 명 공 학 연구 소

# 제 출 문

생명공학연구소장 귀하

본 보고서를 “*Bacillus*균의 분화관련 분자조절연구”에 관한 연구과제의 기  
관고유  
사업보고서로 제출합니다.

2000. 1.

연구부서명 : 환경생물소재연구실 및 미생물공  
정연구실

과제책임자 : 박 승 환 (책임연구원)

연구원 : 윤 병 대 (책임연구원)

오 희 목 (책임연구원)

신 병 식 (선임연구원)

최 수 근 (선임연구원)

김 희 식 (선임연구원)

김 성 빈 (연수연구원)

# 요 약 문

## I. 제 목 : *Bacillus*균의 분화관련 분자조절연구

## II. 사업(연구개발)의 목적 및 필요성

*Bacillus*는 외부환경이 성장하기에 좋지 않을 때 포자를 형성할수 있는 특징을 가지고 있으며 이러한 특징 때문에 cell differentiation의 model system으로 많은 연구를 해왔다. 또한 많은 단백질을 세포외로 분비할수 있는 능력이 있기 때문에 여러 가지 유용한 물질을 생산하는 산업균주로서도 많이 이용하고 있다.

포자형성과정은 그 초기단계에서 세포생리에 영향을 미칠수 있는 다양한 정보를 취합하고 분석하게 되는데 그 결과에 따라 포자형성에 들어갈 것인지를 판단하게 된다. 따라서 포자형성과정의 초기에서 이러한 정보를 처리하는 기작을 정확하게 이해하는 것은 학문적으로도 가치가 있을뿐만 아니라 외부유전자를 잘 발현시킬수 있는 산업균주의 개발이라는 점에서도 매우 중요하다.

본 연구에서는 포자형성과정의 catabolite repression이 해제된 mutant를 연구함으로써 어떠한 기작으로 catabolite-resistant sporulation (CRS) phenotype을 가지게 되었는지 살펴보았다. 또한 competency pathway의 초기단계를 조절하는 ComP-ComA two-component signal transduction system에서 ComA를 activation 시킬수 있는 다른 factor를 알아보았다. 이러한 연구는 포자형성과정의 초기단계를 좀더 정확하게 이해하는데 도움이 될것으로 생각되며 좀더 유용한 산업균주를 디자인 하는데 기초자료로서 사용될 것이다.

## III. 사업(연구개발)의 내용 및 범위

## 1. *tnrA*의 C-terminal region을 deletion 시킨 여러 가지 mutant 제작

CRS mutant가 보이는 phenotype을 좀더 자세히 관찰하기 위해서 *tnrA* gene의 C-terminal region을 차례로 deletion 시킨 mutant와 *tnrA* gene의 전체를 deletion 시킨 mutant를 제작하였다.

## 2. *tnrA* mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사

제작된 mutant를 이용하여 nitrogen regulation 및 CRS phenotype을 wild type과 비교분석 하였다.

## 3. *pta* mutant에서의 *srf-lacZ* expression 조사

*comP* mutant에서 acetyl phosphate가 실제로 *comA*를 activation 시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 *pta* mutant를 이용하여 *srf-lacZ* expression을 조사하였다.

## 4. *comA* gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사

*comA*의 phosphorylation site인 55번째 aspartate를 alanine으로 바꾼 후에 *srf-lacZ*를 이용하여 *comA*(D57A)의 activity가 남아있는지를 조사해 보았다.

## IV. 사업수행(연구개발)결과

### 1. *tnrA* mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사

*tnrA*를 완전히 deletion시킨 null mutant인 경우에는 CRS phenotype을 보이지 않았으며 C-terminal의 amino acid를 일부만 deletion 시킨 mutant에서만 CRS phenotype을 보였다. 또한 CRS mutant의 경우에는 과량의

nitrogen하에서도 *nrg-lacZ*와 *nasB-lacZ*를 activation 하는 것으로 보아 glutamine synthetase로부터 nitrogen signal을 받지 못하는 것으로 보여진다.

## 2. *pta* mutant에서의 *srf-lacZ* expression 조사

*comP* mutant에서 acetyl phosphate가 실지로 *comA*를 activation 시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 *pta* mutant를 이용하여 *srf-lacZ* expression을 조사하였다. *comP* mutant에서의 *srf-lacZ* expression보다 *comP pta* double mutant 에서의 *srf-lacZ* expression이 훨씬 감소되는 것을 관찰할수 있었으며 따라서 acetyl phosphate가 *comA*의 phosphoryl donor로서 작용할수 있다는 것을 알게 되었다.

## 3 *comA* gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사

*comA*가 phosphorylation 되지 않더라도 activation 기능이 남아 있는지를 알아보기 위해서 *comA*의 phosphorylation site인 55번째 aspartate를 alanine으로 바꾼후에 *srf-lacZ*를 이용하여 *comA*(D55A)의 activity가 남아있는지를 조사해 보았다.

## V. 사업수행(연구개발)결과의 활용계획

*Bacillus*의 포자형성과정에서 그 초기단계는 전체분화과정의 시작을 조절한다는 의미에서 매우 중요한 스텝이라고 말할수 있다. 비교적 많은 연구가 있었고 어느정도까지는 분자적인 수준까지 설명할수 있을 정도로 자세한 기작이 밝혀져 있다. 그러나 아직까지 포자형성과정이 보여주는 catabolite repression은 그 기작이 전혀 밝혀지지 않은 상태이다. 본 연구에서 수행한 *ttrA* 유전자의 mutant study는 포자형성과정의 catabolite repression 기작을 정확히 이해하는데 많은 도움이 될것으로 여겨진다. 또한 competency의 시작과

정에서 중요한 역할을 하고있는 ComP-ComA의 signal transduction pathway는 포자형성과정과 밀접한 관계를 가지면서 조절되는 pathway로서 ComA의 activation 기작을 정확하게 이해하기 위해 수행된 이번 연구는 *tnrA* study와 함께 포자형성과정의 초기단계를 조절하는 기작을 밝혀내는데 많은 도움이 될 것으로 여겨진다. 산업적으로 유용한 많은 단백질들의 합성과 조절은 대부분 포자형성과정의 초기단계와 밀접하게 연결되어 조절되기 때문에 본 연구에서 수행된 실험결과들은 산업균주의 개발에도 기초적인 자원으로서 이용될 것이다.

# 목 차

제 1 장	서 론	1
제 2 장	국내의 기술개발 현황	1
제 3 장	연구개발 수행내용 및 결과	6
제 1 절	실험재료 및 방법	6
1.	균주 및 plasmid	6
2.	배지 및 배양조건	8
3.	시약 및 재료	8
4.	Chromosomal DNA 및 Plasmid DNA 의 분리	9
5.	일반적인 DNA 조작	10
6.	<i>E.coli</i> 와 <i>Bacillus</i> 균주의 transformation	10
7.	$\beta$ -galactosidase 의 assay 방법	10
8.	Site-directed mutagenesis	10
제 2 절	연구수행 내용 및 결과	11
가.	연구내용	11
1.	<i>tnrA</i> 의 C-terminal region을 deletion 시킨 여러 가지 mutant 제작	11
2.	<i>tnrA</i> mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사	11
3.	<i>pta</i> mutant에서의 <i>srf-lacZ</i> expression 조사	11
4.	<i>comA</i> gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사	12
나.	연구결과	12
1.	<i>tnrA</i> mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사	12
A.	<i>tnrA</i> gene의 null mutation 제작 및 CRS phenotype 조사	12
B.	<i>tnrA</i> gene의 deletion mutant 제작 및 phenotype 조사	12
C.	<i>tnrA</i> mutant의 nitrogen regulation 조사	14
2.	<i>pta</i> mutant에서의 <i>srf-lacZ</i> expression 조사	17
3.	<i>comA</i> gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사	19
제 4 장	연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	22
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	22
제 6 장	참고문헌	24

## 제 1 장 서론

*Bacillus*균주는 외부의 영양분이 고갈될 때 포자를 형성하는 독특한 분화과정을 가지고 있다. 또한 효소분비시스템이 잘 발달되어 있으며 대부분 비병원성으로 다루기가 용이하다. 이 외에도 *Bacillus*균주는 각종 특성을 지닌 다양한 *Bacillus* species가 존재하기 때문에 산업적 이용 측면에서도 매우 큰 가치를 지니고 있다. 근래에 와서는 환경친화형 농업 및 환경복원을 위한 소재로서도 이용되고 있다.

이러한 많은 장점 때문에 분화과정의 모델시스템으로서 뿐만 아니라 산업적 응용을 위한 대상으로서도 많은 연구대상이 되어왔다. 그러나 많은 연구가 진행되면서 *Bacillus*의 분화과정이 예상했던 것보다 훨씬 복잡한 기작에 의해서 조절되고 있음을 알게 되었다. 즉 stationary phase에서 나타나는 여러 가지 현상들, 예를 들면 운동성증가, 분해성 효소의 분비, 항생제분비, competency의 발달 등이 각각 독립적인 현상이 아니고 모두 밀접한 관계를 가지면서 조절됨을 알게 되었다. 그뿐 아니라 최근에 발표되고 있는 일련의 보고들을 보면 TCA cycle같은 main metabolic pathway에서도 분화과정의 조절과 매우 밀접한 관계를 가지고 있음이 밝혀지고 있다. 정상적인 포자를 만들기 위해서는 많은 에너지와 여러 가지 생체분자가 필요한데 이런것들을 원활하게 공급하기 위해서는 물질대사가 정상적으로 가동될수 있는지 점검해야 하는 것이다. 이러한 관찰들은 물질대사 및 stationary phase에서의 유전자조절이 분화과정과 밀접하게 연관되어 있음을 보여주고 있다. 결국 *Bacillus*의 분화과정을 정확하게 이해하기 위해서는 catabolite repression이나 competence처럼 포자형성 초기과정에 영향을 줄 수 있는 여러 가지 요소들을 전체적으로 파악할 수 있어야 할 것이다.

## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

*Bacillus*속의 균주들중 type species인 *B. subtilis*는 대장균 다음으로 유전



학적 및 생리학적 기초연구가 많이 이루어진 세균이다. 대장균에서는 볼 수 없는 포자형성, competence 발현과 같은 흥미있는 생물학적 현상과 함께 배양이 용이하고 병원성이 없어 오래전부터 그람양성균의 대표적인 연구모델로서 이용되어 왔을 뿐 아니라 산업미생물로서도 중요한 위치를 차지해왔다.

*Bacillus*의 연구에 있어서 가장 많은 연구가 이루어진 분야는 역시 분화과정에 관련된 것이다. *Bacillus*균은 영양원의 고갈 등 환경악화에 따라 대수증식기에서 정지기로 옮겨가면서 정교한 적응변화, 즉 세포외로 고분자물질 분해효소 및 항생물질의 생산분비, competence 발현, 운동성의 발달 및 마지막 단계로 포자형성에 이르는 분화를 하게된다. 이러한 분화과정을 이해하고 나아가 이를 제어하는 일은 균주를 육종하는데 있어서 매우 중요하다.

*Bacillus*균이 환경조건의 변화에 적응하기 위해 반응을 나타내는 과정에서 환경의 변화를 감지하고 이를 세포내로 전달하여 적절한 대응을 할 수 있도록 하는 소위 signal transduction이 이루어지는데 그 기작을 밝히기 위해 많은 연구가 이루어졌다. 신호전달기작 그 자체를 밝히는 일도 의미가 크지만 이는 곧 균주육종을 위한 요소가 될 수 있으므로 더욱 중요하다. 현재까지 알려진 가장 보편적인 신호전달기작은 two-component system, 즉 두가지 조절단백질이 쌍을 이루어 한 단백질이 다른 단백질의 활성을 제어하는 방식으로 이루어져 있다. *Bacillus* 세포가 대수증식기에서 정지기로 옮겨가면서 signal transduction network이 가동되고 이들이 어떤 경로를 통해서든 종합되어 어떤 분화과정에 들어갈 것인지 소위 'decision-making'이 이루어 질 것이다. 즉 amylase, protease 등의 분해효소를 생산하여 분비할 것인지, 항생물질을 생산할 것인지, 운동성이나 competence를 발현시킬 것인지 아니면 최후의 수단으로 sporulation을 할 것인지를 결정해야 할 것이며 이는 *Bacillus*의 생존경쟁에 있어서 매우 중요하기때문에 신중히 하지 않으면 안될 것이다. Late-growth development에 관여하는 많은 종류의 regulatory protein 및 이들을 coding하는 유전자들이 밝혀졌다. 잘 알려진 것들로는 *abrB*, *comA*, *degQ*, *degR*, *degT*, *hpr*, *sinR*(and *sinI*), *spo0A* 등이 있다. 이들중 일부는 mutation에 의해서 pleiotropic effects를 나타내는데 catabolite resistant sporulation도 그중 하나이다. 실제로 지금까지 많은 종류의 mutant가 CRS phenotype을 보이는 것으로

밝혀 졌지만 아직도 모든 CRS mutant를 설명할수 있는 그 정확한 기작은 아직도 밝혀지지 않은 상태이다. 한가지 가능성 있는 설명은 sporulation의 positive 혹은 negative regulator들을 각각 activation 혹은 inhibition 시켜서 CRS phenotype을 보인다는 것인데 물론 이러한 가정으로 모든 CRS mutant가 설명되는 것은 아니다. 본 연구에서 수행된 *tnrA* gene도 원래는 nitrogen이 부족할 때 필요한 유전자들을 activation 시키는 positive regulator로서 알려진 것이므로 (1) 이 *tnrA* mutant가 어떠한 기작으로 CRS phenotype을 보이는지를 알아낸다는 것은 매우 흥미로운 일이 아닐수 없다.

Competence pathway를 구성하는 유전자의 구조 및 합성에 관련된 신호 전달체계는 다른 유사한 시스템에 비하여 비교적 잘 알려져 있는 편이다. 단순히 competence의 development 뿐만 아니라 포자형성을 포함하여 post-exponential phase에 나타나는 많은 현상과도 긴밀한 관계를 갖고있기 때문이다. 그중에서도 sporulation의 초기과정과 직접적인 관련이 있는데 현재까지 알려진 competence pathway를 담당하고있는 유전자의 구조 및 이 유전자들의 조절에 관여하고 있는 신호전달에 대하여 간략히 기술하기로 한다.

*B. subtilis* cell의 competence는 대수기가 지난 다음부터 나타나기 시작하는데 물론 배지에 적당한 성분이 있어야 한다 (2). Competence development에서 가장 중요한 역할을 하고 있는것은 ComP와 ComA로 이어지는 signal transduction pathway이다. 이 system은 모든 bacteria가 가지고 있는 기본적인 것으로서 통칭하여 two-component signal transduction system이라고 부른다. 이렇게 부르는 것은 signal transduction이 두 개의 component에 의해서 주로 이루어지기 때문이다 (3). 이 두 개의 요소중의 하나는 histidine kinase인데 스스로 histidine residue에 ATP를 이용하여 kination할수 있다. 대부분의 histidine kinase는 membrane protein으로서 외부로부터의 특정환경을 인식한 다음 cell 내부로 그 signal을 보내주는 역할을 하고 있다. ComP 가 histidine kinase인데 7개의 transmembrane segment를 가지고 있는 membrane protein이다 (4). 또 하나의 compnent는 response regulator인데 ComA가 여기에 해당한다. Response regulator는 대부분이 DNA-binding protein으로서 histidine kinase로부터 오는 signal에 따라 특정 유전자를 activation 혹은 repression하

면서 그 기능을 수행하게 된다.

ComP가 인식하는 signal은 A. Grossman에 의해서 밝혀졌는데 *comX*라는 유전자로부터 만들어지는 작은 peptide가 ComQ에 의해서 processing되어 signal molecule이 만들어 진다 (5). Competency는 대체로 cell density에 비례하게 되며 이는 ComX molecule이 세포바깥으로 분비된후에 ComP에 의해서 감지되기 때문이다. Competence의 형성에는 ComX외에 또하나의 세포의 small molecule이 필요하다. CSF (competence stimulation factor) 라고 불리우는 이 분자는 ComX처럼 peptide molecule로서 *phrC*라는 유전자에 의해서 합성된후 processing되어 역시 세포바깥으로 분비된다 (6). 분비된 CSF는 ComX와는 달리 Spo0K라는 oligopeptide permease를 통과하여 세포내부로 들어오게 된다. CSF가 competency에 영향을 미치는 기작은 ComX와는 다르다. ComP에 의해서 phosphorylation된 ComA-P는 RapC라는 phosphatase에 의해서 또다른 regulation을 받게되는데 CSF가 바로 이 RapC의 inhibitor로 작용한다. 결국 CSF는 negative regulation에 의해서 ComA의 activity를 조절한다. 흥미로운 사실은 *phrC* 유전자가 *rapC* 유전자 바로 다음에 온다는 것이다. *phrC* 유전자의 sigmaH-dependent promoter가 따로 존재하기는 하지만 이러한 식으로 *rapC*와 *phrC*가 나란히 연결되어 있는 것은 이런 regulation system이 하나의 molecule로부터 출발되어 진화되었다는 증거일수도 있는 것이다. 최근에는 이러한 *rapC-phrC* pair처럼 되어있는 구조가 *Bacillus*의 total genome에 여러개 존재하고 있다는 것이 보고되었다 (7). Spo0F-P의 phosphatase인 RapA와 이 RapA의 inhibitor인 PhrA가 그중 한 예이다 (8).

일단 ComX나 CSF에 의해서 ComA가 phosphorylation되면 ComA-P는 *srf* operon의 transcription을 activation하게 된다 (9). *srf* operon의 transcription이 activation됨에따라 surfactin 합성이 증가되는데 이와 함께 *srfAB*의 subdomain에 숨어있는 *comS* 유전자가 같이 activation된다. 이 *comS*의 product인 ComS는 아주 작은 protein으로서 ComK의 activation에 결정적인 역할을 하게 되는데 일단 ComK가 activation되면 competence를 develop하는데 충분한 여건이 완성되는 것이다. 이처럼 *srf* operon의 activation은 단순히 surfactin의 합성을 위한 것은 아니며 competency로 가는데 매우 중요한 ComS

를 만들기 위함임을 알아야 한다. 그렇다면 이처럼 *comS*가 *srf* gene 내부에 있는 생물학적 의미는 무엇일까? 몇몇 학자들이 생각하고 있는 것을 종합해 본다면 surfactin에 의해서 외부의 다른 bacteria가 lysis 된다면 DNA source가 많아지게 되며 이 DNA source를 잘 받아들이기 위해서는 competency도 동시에 형성해야 할 것이라는 추측이다.

위에서 설명한것처럼 ComP-ComA로 이어지는 signal transduction pathway는 competency로 가기위해 필요한 pathway이지만 sporulation과도 밀접하게 연결되어 regulation되고 있어서 더욱 복잡한 양상을 보여주고 있다. Competence와 sporulation과의 cross-regulation은 크게 4가지 다른 방법으로 조절되고 있다. 첫째로는 앞서 기술했던 CSF와 PhrC가 어느정도 redundancy를 보여주고 있다는 사실이다. 즉 CSF는 농도에 따라 RapC 뿐만 아니라 RapA도 어느정도 inhibition 한다고 보고되고 있다 (10). Competency를 위한 CSF가 sporulation을 activation 시킬수도 있는 것이다. Cross-regulation의 두 번째 경우는 ComA-P가 RapA의 transcription도 activation한다는 사실이다 (9). RapA는 Spo0F-P specific phosphatase 이기 때문에 ComA-P 에 의해서 sporulation이 저해된다고 볼수 있다. 그 외에도 competence pathway와 sporulation과의 직접적인 cross-regulation으로 들수 있는 것은 SinI와 SinR로 연결되는 regulation 이 있고 (11) global한 transition regulator인 AbrB에 의해서도 양쪽 pathway 모두 영향을 받는다.

ComP-ComA로 연결되는 signal transduction pathway에서 흥미로운면서도 아직 밝혀지지 않는 부분이 더 있다. Histidine kinase인 ComP가 세포내에 없어도 어느정도 ComA가 계속 phosphorylation이 된다는 사실이다. 이런 결과는 *comP* knockout mutant에서도 *srf-lacZ* 가 어느정도 expression 된다는 것을 관찰한 다음부터 알게 되었다 (12). 이러한 사실이 암시하는 것은 세포내에 ComP 외에도 ComA를 phosphorylation 시킬수 있는 존재가 더 있다는 것을 암시하고 있다. *E. coli* 에서도 몇가지 two-component system에서 비슷한 현상이 관찰되고 있는데 가장 대표적인 예로는 PhoR-PhoB로 이루어 지는 *pho* regulon에서 관찰되며 (13) 이외에도 nitrogen의 regulation을 담당하는 NtrB-NtrC (14) 그리고 osmoregulation을 담당하는 EnvZ-OmpF system (15)

에서도 histidine kinase 없이 response regulator가 phosphorylation 되는 현상이 관찰되었다. 몇가지 유전학적 그리고 생화학적 결과를 종합해보면 histidine kinase 없이 response regulator를 phosphorylation 시키고 있는 물질은 acetyl phosphate가 확실한 듯 하다. Acetyl phosphate는 acetyl-CoA로부터 acetate가 만들어 질 때 중간산물로 만들어지는 고에너지 물질로서 phosphotransacetylase (*pta*) 에 의해서 촉매되어 만들어 진다 (Fig. 1). 외부로부터 다량의 당이 존재할 때 해당과정을 통하여 acetate로 신속하게 excretion 되게 되는데 이때 중간산물로서 acetyl phosphate와 ATP가 만들어지는 것이다. 만약 acetyl phosphate가 ComA와 같은 response regulator를 activation할 수 있다면 가장 기본적인 metabolism이 two-component signal transduction system과 연결되어 있는 상태가 되며 결국 기본적인 carbon flow와 signal transduction과의 cross regulation이 될 수 있는 것이다.

본 연구는 acetyl phosphate가 실제로 *in vivo* 내에서 ComA와 같은 response regulator를 activation을 할 수 있고 이로 인하여 signal transduction과의 cross regulation에서 중요한 역할을 할수 있는지를 알아보기 위한 기초적인 실험으로서 수행되었다. Sporulation의 초기과정에 영향을 주는 또다른 factor로서 CRS phenotype을 보이는 *tnrA* 연구와 함께 이러한 실험결과들은 세포내의 signal transduction system이 어떠한 식으로 조절되고 처리되는지를 정확하게 이해하는데 큰도움이 될것이며 더 나아가 *Bacillus* 산업균주를 개발하는데 있어서 중요한 기초자료가 될 것이다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 실험재료 및 방법

##### 1. 균주 및 Plasmid

본 실험에서 사용한 모든 *Bacillus* 균주는 wild type인 JH642 균주로부터 유래한 것으로서 Table 1에 나타내었다. *lacZ* fusion을 위한 pDG1728

및 pDG1661 plasmid는 P. Stragier로부터 얻어서 사용하였다 (16). DNA manipulation에는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다.

## 2. 배지 및 배양조건

*E. coli*의 배양을 위해서는 LB broth 또는 LB plate를 사용하였다. *Bacillus* 균주의 배양을 위해서는 LB를 주로 사용하였고 *lacZ* fusion assay를 위해서는 DSM을 주로 사용하였다. Competent cell을 만들때는 Spizizen broth를 사용하였고 minimal media로는 TSS media (0.05 M Tris pH 7.5, 40 mg/l FeCl<sub>3</sub>-Na<sub>3</sub> citrate, 2.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (17)를 사용하였다. TSS media를 사용할 때 기본적인 carbon source로는 0.5% glucose를 사용하였으며 nitrogen source로는 0.2% glutamate 혹은 0.2% glutamine을 사용하였다. *Bacillus* 균주의 보존을 위한 고체배양을 위해서는 DSM agar를 사용하였다. 필요시 항생제를 다음의 농도로 사용하였다. *E. coli*의 경우, ampicillin(Ap); 100 $\mu$ g/ml, chloramphenicol(Cm); 20-30 $\mu$ g/ml 을 사용하였고 *B. subtilis*의 경우, chloramphenicol (Cm); 5 $\mu$ g/ml, kanamycin (Km); 5  $\mu$ g/ml, erythromycin (Em); 1 $\mu$ g/ml, lincomycin (Lm); 25  $\mu$ g/ml, spectinomycin (Sp); 100  $\mu$ g/ml을 사용 하였다.

## 3. 시약 및 재료

제한효소, T4 DNA ligase등은 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. Ampicillin, chloramphenicol, spectinomycin, erythromycin, lincomycin등의 항생제와 X-gal, ONPG등은 Sigma Chemical 사 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그외 PCR에 사용한 시약은 Bioneer corporation (충북 청원)에서 구입하였으며 DNA oligocleotide의 합성과 정제는 제노텍 (대전시 송강동)에서 하였다.

Table 1. *Bacillus* strains used in this study

Strains	Genotype	Source
BS9836	JH642 <i>amyE::srf-lacZ spc</i>	This study
BS9909	JH642 $\Delta$ <i>tnrA::erm</i>	This study
BS9844	JH642 $\Delta$ <i>pta::erm</i>	This study
BS9912	JH642 <i>tnrA2 erm</i> (Wild type control)	This study
BS9913	JH642 $\Delta$ <i>tnrA19 erm</i>	This study
BS9914	JH642 $\Delta$ <i>tnrA20 erm</i>	This study
BS9915	JH642 $\Delta$ <i>comP::cat</i>	This study
BS9916	JH642 $\Delta$ <i>comA::cat</i>	This study
BS9932	JH642 $\Delta$ <i>tnrA32 erm</i>	This study
BS9933	JH642 $\Delta$ <i>tnrA::erm amyE::nrg-lacZ cat</i>	This study
BS9934	JH642 <i>tnrA2 erm amyE::nrg-lacZ cat</i>	This study
BS9935	JH642 $\Delta$ <i>tnrA19 erm amyE::nrg-lacZ cat</i>	This study
BS9936	JH642 $\Delta$ <i>tnrA20 erm amyE::nrg-lacZ cat</i>	This study
BS9937	JH642 $\Delta$ <i>tnrA28 erm amyE::nrg-lacZ cat</i>	This study
BS9938	JH642 $\Delta$ <i>tnrA::erm amyE::nasB-lacZ cat</i>	This study
BS9939	JH642 <i>tnrA2 erm amyE::nasB-lacZ cat</i>	This study
BS9940	JH642 $\Delta$ <i>tnrA19 erm amyE::nasB-lacZ cat</i>	This study
BS9941	JH642 $\Delta$ <i>tnrA20 erm amyE::nasB-lacZ cat</i>	This study
BS9942	JH642 $\Delta$ <i>tnrA28 erm amyE::nasB-lacZ cat</i>	This study

#### 4. Chromosomal DNA 및 Plasmid DNA 의 분리

*B. subtilis* 의 chromosomal DNA 는 Doi의 방법(18)에 따라 분리 하였  
고, *E.coli* 및 *B. subtilis* 로부터의 plasmid분리는 Birnboim 과 Doly(19) 에  
의하여 서술된 alkaline lysis method를 일부 변형하여 이용하였다.

## 5. 일반적인 DNA 조작

제한효소에 의한 DNA절단, ligation, polymerase chain reaction는 시약공급원이 제공하는 방법을 따라 수행하였다. DNA 및 DNA조작과정은 0.8% agarose gel electrophoresis를 이용하여 분석하였다.

## 6. *E.coli* 와 *Bacillus* 균주의 transformation

*E.coli* 의 competent cell 준비와 transformation은 H. Inoue등(20)의 방법을 이용하였고 *B. subtilis* 의 competent cell 준비와 transformation은 Anagnostopoulos 와 Spizizen(2)의 방법을 이용하였다.

## 7. $\beta$ -galactosidase 의 assay 방법

$\beta$ -galactosidase activity 측정을 위한 sampling은 다음과 같이 하였다. 먼저 실험하고자 하는 균주를 항생제가 들어있는 DSM agar에서 30 °C로 밤새 키운후에 아침에 DSM broth를 1 ml 배지위에 떨어뜨려 cell을 suspension 한다. 현탁한 cell을  $A_{600} = 0.01$  정도되게 20 ml의 DSM broth에 접종하였다.  $A_{600}$  이 0.1 정도 되면서부터 sampling을 시작 하였으며  $T_0$  point까지는 30분 간격으로 그리고  $T_0$ 가 지난 후부터는 1시간 간격으로 sampling을 하였다. 수확한 cell pellet을 0.8 ml의 Z buffer (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and 50 mM  $\beta$ -mercaptoethanol)에 현탁시키고 1 drop의 toluene을 넣어 cell을 permeabilization 하였다.  $\beta$ -galactosidase의 활성측정은 o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside의 분해에 따른  $A_{420}$ 의 흡광도의 증가를 측정하여 결정하였다. Miller unit의 계산은 ref. 21에 따랐다.

## 8. Site-directed mutagenesis

*comA* 유전자의 phosphorylation site의 mutagenesis는 Promega의 Altered Sites-II in vitro Mutagenesis System을 사용하였으며 product manual에 따라서 실험하였다. Mutation 된 site 근처는 제작전후로 DNA sequencing을 통해 반드시 확인 하였다.



## 제 2 절 연구수행 내용 및 결과

### 가. 연구 내용

#### 1. *tnrA*의 C-terminal region을 deletion 시킨 여러 가지 mutant 제작

CRS phenotype을 보이는 mutant의 mutation site를 mapping한 결과 *tnrA* gene의 C-terminal region에 Tn10이 들어가 있었는데 이 mutant를 좀더 자세히 분석하기 위해서 *tnrA* gene의 C-terminal region을 차례로 deletion 시킨 mutant와 *tnrA* gene의 전체를 deletion 시킨 mutant를 제작하였다.

#### 2. *tnrA* mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사

제작된 mutant를 이용하여 CRS phenotype을 wild type과 비교분석 하였으며, mutant들의 nitrogen regulation이 정상적인지를 관찰하였다. *tnrA*의 nitrogen regulation을 monitoring하기 위해서는 *nrg-lacZ*와 *nasB-lacZ*를 이용하였다.

#### 3. *pta* mutant에서의 *srf-lacZ* expression 조사

*comP* mutant에서 acetyl phosphate가 실지로 *comA*를 activation 시킬 수 있는지를 조사하기 위하여 *pta* mutant를 이용하여 *srf-lacZ* expression을 조사하였다.

#### 4. *comA* gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사

ComA가 phosphorylation 되지 않더라도 *srf-lacZ*를 activation할수 있는지를 알아보기 위해서 *comA*의 phosphorylation site인 55번째 aspartate를 alanine으로 바꾸는 site-directed mutagenesis를 수행하였다. ComA(D55A)의

activity는 *srf-lacZ*를 이용하여 조사하였다.

## 나. 연구 결과

### 1. *tnrA* mutant의 function과 CRS phenotype과의 연관성 조사

#### A. *tnrA* gene의 null mutation 제작 및 CRS phenotype 조사

이전 보고서에서 기술한바와 같이 sporulation의 catabolite repression이 해제된 mutant를 찾아내기 위해서 Tn10 mutagenesis를 수행하였으며 이중 재현성이 가장 뛰어난 mutant 하나를 골라 Tn10 site를 mapping한 결과 *tnrA* gene의 C-terminal region이 mutation 되었음을 확인할 수 있었다. Mutation site가 *tnrA* 유전자의 뒤쪽인 것으로 보아 CRS phenotype이 *tnrA*의 null mutation에 의한 것이 아닐 가능성이 크므로 이를 확인하기 위하여 *tnrA*의 null mutant를 제작하였다. *tnrA* gene의 대부분을 deletion 시킨 후에 *erm* gene을 insertion 시켜서 만들었으며 BS9909라고 명명하였다. BS9909 cell을 glucose가 2% 첨가된 DSM media에 배양시킨 후 sporulation efficiency를 관찰하였는데 예상외로 wild type과 똑같이 sporulation이 repression되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 Wray et al. (22) 의 논문에서도 보고된 바 있다. 결국 원래의 CRS mutant가 보여준 phenotype은 *tnrA*의 null mutation 때문에 생긴 것이 아니라 C-terminal이 변형된 *tnrA* protein에 의한 것이라고 추정되었다. 실제로 Tn10이 integration 된 site의 DNA sequence를 자세히 검토한 결과 *tnrA*의 open reading frame이 Tn10의 sequence와 계속 연결되어서 원래의 *tnrA*의 ORF보다 오히려 더 긴 chimeric ORF를 형성하고 있었다.

#### B. *tnrA* gene의 deletion mutant 제작 및 phenotype 조사

Tn10 mutation에 의한 CRS phenotype을 좀더 자세히 알아보기 위하여 *tnrA* gene의 C-terminal region을 차례로 deletion 시킨 일련의 mutant 들을 제작하였다 (Fig. 2). Wild type의 control을 위해서 *erm* gene을 mutant와

똑같이 배열시킨 균주도 제작하였다. 이들 mutant 들이 가지고 있는 변형된 *tnrA* gene은 double cross-over에 의해서 원래의 *tnrA* gene site에 integration 시켰으며 PCR 및 Southern hybridization으로 확인하였다. 먼저 mutant 들의 CRS phenotype을 조사해 보기 위해서 과량의 glucose 혹은 glutamine이 첨가된 DSM media에서 배양시킨후 sporulation efficiency를 관찰해 보았다. Table 2에서 보듯이 wild type control (BS9912)을 비롯한 null mutant (BS9909) 와 BS9914 mutant 에서는 glucose와 glutamine에 의해서 sporulation이 억제되는 현상을 관찰할수 있었다. 하지만 BS9913 그리고 BS9932 균주에서는 다소 차이는 있으나 과량의 glucose에 의해서도 sporulation이 repression 되지 않음을 관찰할수 있었다. 이러한 실험결과로부터 유추한다면 *tnrA* protein의 C-terminal region이 7개(BS9912) 로부터 21개(BS9932) 까지 deletion 되면 CRS phenotype을 보이며 그 이상 deletion 되면 (BS9914) null phenotype이 되어 wild type과 똑같이 catabolite repression 된다는 사실을 알수 있었다.

### C. *tnrA* mutant의 nitrogen regulation 조사

원래 *tnrA* gene의 function은 배지내에 nitrogen source가 고갈될 때 필요한 유전자들을 발현시키는 transcriptional activator이다 (Fig. 3). *tnrA*에 의해서 activation 되는 유전자에는 nitrate를 assimilation 시킬 때 필요한 *nasA* 와 *nasB* operon (23) 이 있고 gamma -aminobutyrate를 사용하기 위한 *gabP* (22), urea의 이용에 필요한 *ure* (24), 그리고 ammonium ion의 transporter로 추정되는 *nrg* (22) 등이 있다. *tnrA* gene의 default state는 이들 유전자의 activation이며 만일 배지내에 nitrogen source가 충분하다면 *tnrA*의 활성이 inhibition 된다. 아직 *tnrA*의 활성을 inhibition 시키는 nitrogen signal이 무엇 인지는 밝혀지지 않고 있으나 이 signal은 glutamine synthetase (GS)로부터 유래할 것이라고 믿고 있다. 왜냐하면 GS를 coding하는 *glnA* gene을 inactivation 시키면 *tnrA*가 activation 되어 *nrg*나 *nasB* 같은 유전자들이 nitrogen source의 존재유무와는 상관없이 항상 발현되기 때문이다. 그렇다면 *tnrA*의 CRS phenotype을 관찰하기 위해 construction된 deletion mutant들은 nitrogen regulation을 정상적으로 수행할 수 있을 것인가? 이를 확인하기 위해

Table 2. Sporulation efficiency of *tnrA* deletion mutant

Strains	Genotype	DSM	DSM + 2% glucose
JH642	Wild	54	1
BS9909	$\Delta tnrA$	78	3
BS9912	<i>tnrA2</i>	58	3
BS9913	$\Delta tnrA19$	32	21
BS9914	$\Delta tnrA20$	60	9
BS9932	$\Delta tnrA28$	56	43

서 *tnrA*에 의해서 activation되는 유전자중의 하나인 *nrg*와 *nasB*의 promoter region을 *lacZ* gene에 transcriptional fusion 시킨 후 이들의 expression 정도를 분석하여 *tnrA*의 function을 관찰하기로 하였다. *nrg-lacZ*와 *nasB-lacZ*는 pDG1661을 이용하여 제작되었으며 *amyE* locus에 integration 시킨 균주를 이용하였다. LacZ assay를 위해서는 TSS minimal media를 사용하였으며 minimal nitrogen source로는 0.2% glutamate를 그리고 excess nitrogen source로는 0.2% glutamine을 따로 더 첨가하였다. Table 3에서 보듯이 wild type control (BS9934 for *nrg-lacZ* and BS9938 for *nasB-lacZ*) 에서는 예상대로 glutamate만 있는 배지에서는 *nrg-lacZ*와 *nasB-lacZ* 모두 강하게 발현되었으며 glutamine까지 있는 excess nitrogen condition에서는 *lacZ* expression 이 inhibition 되었다. *tnrA*의 null phenotype을 보이는 균주들은 (BS9933 and BS9936 for *nrg-lacZ*; BS9938 and BS9941 for *nasB-lacZ*) 배지조건에는 상관없이 *nrg-lacZ*와 *nasB-lacZ* 발현이 되지 않았다. 이와는 반대로 CRS phenotype을 보이는 BS9935와 BS9937 (for *nrg-lacZ*), BS9940과 BS9942 (for *nasB-lacZ*)의 경우에는 배지의 조건에는 상관없이 constitutive하게 발현되는 것을 관찰할 수가 있었다. 이러한 현상은 DSM media에서도 같은 결과를 보였다. 결국 이러한 실험결과로부터 유추할 수 있는 것은 *tnrA* gene의 C-terminal

region을 일부 (여기에서는 7개로부터 21개 까지) deletion 시키면 GS로부터 nitrogen signal을 받지 못하며 *nrg*와 *nasB* 처럼 *tnrA*에 의해서 activation되는 gene들을 배지조건에 상관없이 항상 activation 시킨다는 것을 의미한다. 결국 배지의 nitrogen source의 availability에 반응하지 못하고 항상 active 상태인 *tnrA*의 constitutive allele에 의해서 CRS phenotype이 나타난다는 것을 알 수 있다.

## 2. *pta* mutant에서의 *srf-lacZ* expression 조사

ComA는 competence development에 필요한 comS를 activation하기 위해서 필요한 response regulator인데 ComA의 histidine kinase인 ComP로부터 signal을 전달받는다. 그런데 ComA는 *comP* mutant background에서도 어느 정도 activation 기능이 살아있다. 즉 ComA를 phosphorylation 시킬 수 있는 phosphoryl donor가 ComP 외에도 더 있다는 의미인 것이다. 이러한 현상은 ComP-ComA signal transduction system 외에도 PhoR-PhoB, NtrB-NtrC 등의 다른 two-component signal transduction system에서도 많이 보고된 현상이다. 현재까지 histidine kinase 외에도 phosphorylation 시킬수 있는 molecule로서는 acetyl phosphate가 가장 가능성이 높다는 몇가지 유전학적 그리고 생화학적 실험에 의한 결과가 보고 되었다.

보통 acetyl phosphate는 acetyl CoA로부터 생성되는데 phosphotransacetylase에 의해서 촉매된다. Acetyl phosphate는 다시 acetate kinase에 의해서 acetate로 된다. 이 두 스텝을 반응시키는 효소는 각각 *pta*와 *ackA*에 의해서 coding되며 glucose에 의해서 activation되는 특징을 가지고 있다. *comP* mutant에서 acetyl phosphate가 실지로 *comA*를 activation 시킬수 있는지를 조사하기 위하여 *pta* mutant를 제작하였다. Mutant의 제작 및 확인은 앞선 보고서에서 기술하였다. 또한 *comP*와 *comA*의 deletion mutant도 제작하였는데 mutation에 사용한 site 및 항생제 marker의 방향을Fig. 4에 나타내었다. ComA의 activity를 측정하기 위해서는 *srf-lacZ*를 *amyE* locus에 integration 시킨다음 beta-galactosidase를 이용하여 분석하였다. Fig.

Table 3. Expression of *nrg-lacZ* and *nasB-lacZ* fusion in the *tnrA* mutants

Strains	Genotype	<i>nrg-lacZ</i> <sup>a</sup>		<i>nasB-lacZ</i>	
		TSSE <sup>b</sup>	TSSEQ	TSSE	TSSEQ
BS9909	$\Delta tnrA$	0.5	0.1	0.5	0.2
BS9912	<i>tnrA2</i>	586.8	0.3	16.9	0.2
BS9913	$\Delta tnrA19$	507.8	115.5	45.2	48.7
BS9914	$\Delta tnrA20$	0.6	0.2	0.3	0.2
BS9932	$\Delta tnrA28$	349.4	450.5	27.0	55.8

<sup>a</sup>Miller unit

<sup>b</sup>TSSE, TSS + 0.5% glucose + 0.2% glutamate; TSSEQ, TSSE + 0.2% glutamine

5에서 보듯이 *comA* mutant에서는 *srf-lacZ*의 activity가 거의 없지만 *comP* mutant에서는 *srf-lacZ*의 activity가 어느정도 남아있는 것을 알 수 있다. 그런데 *comP pta* double mutant에서는 *comP* 단독으로 있을때와 비교하여 *srf-lacZ* activity가 많이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 acetyl phosphate가 *comA*의 phosphoryl donor로서 작용할수도 있다는 가능성을 보여주는 것이다. *pta* single mutant에서의 *srf-lacZ* activity는 wild type의 activity와 거의 비슷하였다.

### 3. *comA* gene의 phosphorylation site를 mutation 시킨 D55A mutant 제작 및 조사

*comP* mutant에서도 *srf-lacZ*의 activity가 어느정도 남아있다는 것은

*comP* 외에도 다른 phosphoryl donor가 있다는 점을 암시할수도 있지만 ComA가 phosphorylation 되지 않더라도 activation 기능이 남아 있을 수도 있다. 실제로 *degU*의 경우에는 phosphorylation되지 않더라도 활성이 있다는 것이 보고되었다. Phosphorylation 되지 않은 ComA도 *srf-lacZ*를 activation 할수 있는지를 알아보기 위해서 *comA*의 phosphorylation site인 55번째 aspartate를 alanine으로 바꾸는 site-directed mutagenesis를 수행하였다. Mutation 시킨 *comA*(D55A) gene은 *erm* gene을 이용하여 원래의 *comA* region에 integration 시켰다. ComA(D57A) mutant는 TSS minimal plate에서 조사해본 결과 *comP* single mutant 보다는 약했지만 *comA* mutant에 비하여 x-gal에 의한 파란색이 훨씬 진하게 나타남을 관찰할수 있었다. 이러한 결과는 ComA가 phosphorylation되지 않더라도 *srf-lacZ*를 activation 시킬수 있다는 점을 보여주는 것이다. 이러한 관찰은 이전의 보고에서도 어느정도 예측되었다. Dubau (25) 등에 의하면 phosphorylation 되지 않은 ComA protein도 *srf* promoter를 포함하는 DNA fragment와 약하게 binding 한다는 점이 관찰된 것이다. 이번 연구를 통하여 phosphorylation 되지 않은 ComA도 *srf-lacZ*를 activation 시킬수 있다는 사실이 유전학적으로도 증명된 셈이다.

위에서 설명한 결과들을 종합해 본다면 다음과 같이 요약될수 있다. *comP* mutant background에서 보이는 *srf-lacZ*의 activity는 크게 두가지에 의해서 이루어 진다. 하나는 acetyl phosphate에 의한 ComA의 phosphorylation이고 다른 하나는 phosphorylation 되지않은 ComA에 의한 activity이다. 이 두가지 factor에 의해서 *comP* 유전자가 없더라도 *srf* operon이 약하게 발현되는 것이다. 이러한 결론은 실험적으로 증명될 수 있다고 하지만 한가지 의문점은 남아있다. *comP* 유전자가 정상적인 wild type에서도 acetyl phosphate가 ComA의 phosphorylation에 영향을 줄수 있을 것인가? Phosphorylation 되지않은 ComA에 의한 *srf* operon의 미약한 발현이 실제로 cell 내에서 어떠한 function이 있는 것인가? 이러한 의문점들을 해결하기 위해서는 *comA*에 대한 좀더 깊이있는 연구가 필요할 것이다.

## 제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여

포자형성과정은 그 초기단계에서 세포생리에 영향을 미칠수 있는 다양한 정보를 취합하고 분석하게 되는데 그 결과에 따라 포자형성에 들어갈 것인지를 판단하게 된다. 따라서 포자형성과정의 초기에서 이러한 정보를 처리하는 기작을 정확하게 이해하는 것은 세포분화를 근본적으로 이해할수 있어서 학문적으로도 가치가 있을뿐만 아니라 외부유전자를 잘 발현시킬수 있는 산업균주의 개발이라는 점에서도 매우 중요하다.

본 연구를 통해 밝혀진 *tnrA* gene의 nitrogen regulation과 sporulation의 catabolite repression과의 관계는 nitrogen regulator인 *tnrA*가 cell 내에서 가질수 있는 여러가지 중요한 기능과 그리고 포자형성과정에 어떤 영향을 미칠수 있는지를 보여주고 있다. 또한 competence에서 중요한 역할을 하고 있는 ComA의 function을 정확히 분석하는 것은 competence 뿐만 아니라 sporulation의 phosphorelay에도 영향을 미치기 때문에 stationary phase에서의 physiology를 전반적으로 이해하는데 많은 도움이 될것으로 여겨진다. 이번 연구를 통해서 얻어진 여러가지 유전자 발현조절을 효율적으로 관찰하기 위한 monitoring system과 다양한 mutant들은 Bacillus균주의 전반적인 대사와 생리를 연구하는데도 매우 유용할것으로 기대되며 산업균주를 개발하려는 여러분야의 연구에 중요한 기반이 될것으로 여겨진다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

*Bacillus*의 포자형성과정에서 그 초기단계는 전체분화과정의 시작을 조절한다는 의미에서 매우 중요한 스텝이라고 말할 수 있다. 비교적 많은 연구가 있었고 어느정도까지는 분자적인 수준까지 설명할수 있을 정도로 자세한 기작이 밝혀져 있다. 그러나 아직까지 포자형성과정이 보여주는 catabolite repression은 그 기작이 전혀 밝혀지지 않은 상태이다. 본 연구에서 수행한 *tnrA* 유전자의 mutant study는 포자형성과정의 catabolite repression 기작을



정확히 이해하는데 많은 도움이 될것으로 여겨진다. 또한 competency의 시작과정에서 중요한 역할을 하고있는 ComP-ComA의 signal transduction pathway는 포자형성과정과 밀접한 관계를 가지면서 조절되는 pathway로서 ComA의 activation 기작을 정확하게 이해하기 위해 수행된 이번 연구는 *ttrA* study와 함께 포자형성과정의 초기단계를 조절하는 기작을 밝혀내는데 많은 도움이 될것으로 여겨진다. 산업적으로 유용한 많은 단백질들의 합성과 조절은 대부분 포자형성과정의 초기단계와 밀접하게 연결되어 조절되기 때문에 본 연구에서 수행된 실험결과들은 산업균주의 개발에도 기초적인 자원으로써 이용될 것이다.

## 제 6 장 참고문헌

1. Wray L.V. et al. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8841–8845.
2. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. 1961. *J. Bacteriol.* 81:741–746.
3. J. S. Parkinson. 1993. *Cell* 73:857–871.
4. Y. Weinrauch et al. 1990. *Gen. Dev.* 4:860–872.
5. R. Magnuson et al. 1994. *Cell* 77:207–216.
6. J.M. Solomon et al. 1996. *Gen. Dev.* 10:2014–2024.
7. F. Kunst et al. 1997. *Nature* 390:249–256.
8. M. Perego. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:8612–8617.
9. J. P. Mueller et al. 1992. *J. Bacteriol.* 174:4361–4373.
10. B. A. Lazazzera et al. 1997. *Cell* 89:917–925.
11. U. Bai et al. 1993. *Gen. Dev.* 7:139–148.
12. J. M. Solomon et al. 1995. *Gen. Dev.* 9:547–558.
13. B. Wanner and M. R. Wilmes–Riesenberg. 1992. *J. Bacteriol.* 174:2124–2130
14. J. Feng et al. 1992. *J. Bacteriol.* 174:6061–6070.
15. L. A. Pratt and T. J. Silhavy. 1994. *J. Mol. Biol.* 243:579–594.
16. A. Guerout–Fleury et al. 1996. *Gene* 180:57–61.
17. S. Fisher and A. Sonenshein. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 79:987–995.
18. Doi, R.H. 1983. In R.L. Rodriguez and R.C. Tait (eds.), *Recombinant DNA Techniques*. Addison Wesley, Reading, MA. p162–163.
19. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. *Nucl. Acids Res.* 7:1513–1523.
20. Inoue, H et al. 1990. *Gene* 96:23–28.
21. Miller, J.H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.
22. Wray et al. 1998. *J. Bacteriol.* 180:2943–2949.
23. Nakano et al. 1998. *J. Bacteriol.* 180:5344–5350.
24. Wray et al. 1997. *J. Bacteriol.* 179:5494–5501.
25. Roggiani M. and D. Dubnau. 1993. *J. Bacteriol.* 175:3182–3187.

# 기관고유사업보고서

## 초

계 정 번 호	KG1341	당해년도 연구기간	1999. 1. 1~ 1999. 12. 31	
연구과제명	과제명	Bacillus의 분화관련 분자조절 연구		
연구책임자	박 승 환	총 참여 연구원수	총 : 6 명 내부 : 6 명 외부 : 0 명	
연 구 비	142,000,000 원			
위 탁 연 구	연구기관명 : 연 구 비 :	연구책임자 : 연구기간 :		
요 약			면수	24
<p>1. Sporulation의 catabolite repression이 해제되어 CRS phenotype을 보이는 <i>tnrA</i> mutation을 연구하였다. <i>tnrA</i>의 null mutation은 CRS phenotype을 보이지 않았으며 C-terminal의 amino acid를 일부만 deletion 시킨 mutant에서 CRS phenotype을 보였다. 또한 CRS mutant의 경우에는 과량의 nitrogen하에서도 <i>nrg-lacZ</i>와 <i>nasB-lacZ</i>를 activation 하는 것으로 보아 glutamine synthetase로부터 nitrogen signal을 받지 못하며 이 때문에 CRS 특성을 보이는 것으로 보여진다.</p> <p>2. <i>comP</i> mutant에서 acetyl phosphate가 실제로 <i>comA</i>를 activation 시킬수 있는지를 조사하기 위하여 <i>pta</i> mutant를 이용하여 <i>srf-lacZ</i> expression을 조사하였다. <i>comP</i> mutant에서의 <i>srf-lacZ</i> expression보다 <i>comP pta</i> double mutant 에서의 <i>srf-lacZ</i> expression이 훨씬 감소되는 것을 관찰할수 있었으며 따라서 acetyl phosphate가 <i>comA</i>의 phosphoryl donor로서 작용할수 있다는 것을 알게 되었다.</p> <p>3 <i>comA</i>가 phosphorylation 되지 않더라도 activation 기능이 남아 있는지를 알아보기 위해서 <i>comA</i>의 phosphorylation site인 55번째 aspartate를 alanine으로 바꾼후에 <i>srf-lacZ</i>를 이용하여 <i>comA(D55A)</i>의 activity가 남아있는지를 조사해 보았다. 그 결과 ComA(D55A) 도 <i>srf-lacZ</i>를 약하게 발현시킬수 있다는 사실을 알게 되었다.</p>				
색인어	한 글	바실러스, 포자형성, 신호전달		
	영 어	Bacillus, sporulation, tnrA, competence, two-component signal transduction.		