

Pseudomonas sp. PY002에서 Exotoxin A의 생성에 미치는 철 이온의 영향과 Exotoxin A 유전자의 클로닝

최선아 · 김호상 · 최지영 · 강정숙 · 김춘성 · 김덕례 · 김영주 · 여명구 · 박 열*

조선대학교 자연과학대학 생물과학부

Pseudomonas sp. PY002의 exotoxin A의 발현 양상을 관찰하기 위하여 *P. aeruginosa* PAO1의 anti-exotoxin A와 immunoblot hybridization을 실시한 결과 배지내에 유용 가능한 철이 고갈됨에 따라 exotoxin A의 발현양은 점차적으로 증가하는 양상을 보였으며, CAS 배지에 적절한 배양 상층액에서 siderophore의 발현양도 증가함을 보였다. *P. sp.* PY002의 genomic library를 제조하여, exotoxin A를 분비하는 2개의 클론을 선별하여 pETA23과 pETA42로 명명 후, 반응성이 강한 pETA42를 선별하였다. pETA42는 약 1.7 kb 크기의 insert를 가지며, 양쪽말단에 cloning site인 *Pst*I site가 존재하며 2개의 *Nco*I, 1개의 *Pvu*II, 1개의 *Sst*I, 3개의 *Sma*I, 1개의 *Kpn*I, 3개의 *Hae*II, 1개의 *Eco*RI site가 존재하였다.

KEY WORDS □ cloning, exotoxin A, *Pseudomonas* sp. PY002, siderophore

*Pseudomonas aeruginosa*를 포함한 다수의 그람 음성균들은 배지내로 periplasmic 단백질을 왕성하게 분비한다. Liu(20)가 *P. aeruginosa*에서 exotoxin A를 발견한 이래로 다수의 연구자들이 동물실험이나 조직배양 실험에 이용하고 있다. Exotoxin A가 발견된 초기에는 이를 PA-toxin이라 명명하였으며, 이 toxin은 *in vitro*상의 조직배양에서나 *in vivo* 상에서 쥐의 기관에서 단백질의 합성을 방해함이 밝혀졌으며, 약 66,000 dalton의 분자량을 갖는 열에 불안정한 단백질로(6), 흰혈세포의 배양시 세포독성을 나타내며 다수의 포유동물을 치사시킨다. 체중이 20 g인 쥐에서 exotoxin A의 LD₅₀은 0.2 µg이다. Exotoxin A의 독성이 이같이 높은 치사율을 나타내는 것은 감수성이 있는 세포에서 단백질 합성을 저해하는 능력에서 기인한다(6, 21). 이 toxin은 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD)의 adenosine diphosphate ribosyl moiety(ADPR)를 elongation factor 2(EF-2)로 전달하여 리보솜 표면에 polypeptide가 조합되는 것을 방해한다. Iglewski와 Kabat(13)는 exotoxin A가 diphtheria toxin과 유사한 기능을 갖는 것으로 보고 하였으나, 이들 두 toxin 상호간에는 면역학적으로 교차반응이 일어나지 않는다. Diphtheria toxin은 효소학적으로 활성화된 adenosine 5'-diphosphate-ribosyl transferase의 생성을 절단하고 감소시키는데 비해 exotoxin A는 활성화된 adenosine 5'-diphosphate-ribosyl transferase이다(14, 15). 이 toxin을 분리 정제하는 과정에서 간혹 ADP ribosyl transferase 활성을 갖는 저분자량의 단백질(16)이 분리되어 지기도 하나, 이 저분자량의 단백질과 exotoxin A의 상관관계는 아직 밝혀져있지 않다. Exotoxin A의 ADPR-transferase는 단독으로는 mouse L-cell이

나 mouse 세포독성에 영향을 미치지 않으나, diphtheria toxin의 경우는 활성화된 ADPR-transferase 이외에 다른 단편이 존재하여 mammalian cell과 animal cell에 독성을 나타낸다(7).

Exotoxin A와 diphtheria toxin가 생화학적으로 유사한점으로는 서로 비슷한 크기를 가지며(18), sulfhydryl기를 함유하지 않으며, 4개의 disulfide bridge를 포함하는 단일가닥의 polypeptide를 분비한다(22). ADP-ribosyl transferase는 활성화 되기전에 약간의 구조가 변경되어야 하는 proenzyme 형태로 분비되며(28), EF-2의 동일한 부위를 변형하며 NAD⁺에 대한 비슷한 결합상수를 갖는다(8). 이들은 철이 제한된 배지에서 발현이 잘 된다(4).

Exotoxin A와 diphtheria toxin이 생화학적인 측면에서 다른점으로는 서로 다른 아미노산으로 구성되어 있으며(13) 면역학적으로 교차반응하지 않는다(18). 또한, 활성화되는 방식이 다르며(22), 서로 다른 receptor에 결합한다(28). Diphtheria toxin은 ATP에 결합하여 NAD-glycohydrolase 활성을 나타내는 반면에 exotoxin A는 이러한 특성이 없다(22).

따라서, 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. PY002에서 exotoxin A의 생성 유무와 생성시의 분비 양상을 관찰하며, 철에 의해 그 발현이 조절되는 siderophore와의 상관 관계를 연구하여 exotoxin A의 생성에 대한 조절 기작을 밝히고자 하였고, exotoxin A 유전자를 재조합하여 그 특성과 염기서열을 결정하여 궁극적으로는 exotoxin A에 의해 야기되는 질병의 치유에 일익이 되고자 본 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에서 사용된 균주는 토양 정착 능력이 뛰어나고

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 062-230-6661, Fax : 062-230-6619
E-mail : ypark@mail.chosun.ac.kr

iron(Fe^{3+}) chelating agent인 siderophore를 분비하여 토양 속의 병원성 미생물의 집락을 억제함으로써 식물의 성장을 촉진시키는 형광성 *Pseudomonas*(PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)를 우리 나라 남부 지방인 광주를 중심으로 근교의 논이나, 고추, 배추, 무의 발작물을 재배한 지역의 근권토양에서 분리한 *P. sp.* PY002를 사용하였다(26).

Exotoxin A 발현 양상은 Modified King's B 배지(MKB, 1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2 g K_2HPO_4 , 5 g Proteos Peptone NO. 3 or 7 g Casamino acid, 0.2% glycerol, per liter, pH 6.8, 12)와 CAS 배지 (Chrmoe Azruol S, 2)에 접종하여 실험 하였으며, exotoxin A 유전자의 클로닝에 사용된 vector는 pBluescript SK(+)(24)이며, 형질전환 숙주는 *E. coli* DH 5 α (24)를 사용하였다.

Pseudomonas sp. PY002에서 exotoxin A의 발현 양상 관찰

Pseudomonas sp. PY002의 외분비 단백질을 10% SDS-PAGE 전기영동 방법(17)에 의하여 분리한 다음 분리된 단백질을 Bio-Rad immunoblot kit(Bio-Rad)를 이용하여 96 mM glycine, 12.5 mM Tris-HCl과 20%(v/v) methanol을 함유한 transfer buffer(pH 8.5)에서 nitrocellulose membrane filter(NC filter)에 이동시켰다. 그 다음 NC filter를 3%(w/v) skim milk를 함유한 TBS(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl)에서 1시간 동안 방치한 후, 0.05% Tween 20(w/v)가 함유된 TBS로 세척 하였고, goat anti-exotoxin A를 1%(w/v) skim milk를 함유한 TTBS 용액에 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가하여 NC filter에 가하여 16~18시간 동안 반응시켰다. NC filter를 TTBS 용액으로 세척한 후 peroxidase-conjugated anti-goat IgG로 NC filter에 2시간 동안 처리하였다. 그 후 NC filter를 TTBS로 2회 TBS로 1회 세척하고, ECL-enhanced chemiluminescence kit(Amersham)내의 soultion A와 B를 1:1로 혼합하여 NC filter에 부어준 후 1분간 흔들여 주었다. NC filter를 Saran wrap으로 싸서 cassette에 넣고 암실에서 2~3분간 감광하여 현상하여 exotoxin A의 발현 양상을 관찰하였다.

CAS 한천 배지 확산법에 의한 siderophore의 측정

Bernhard와 Neiland(2)의 방법을 변형시켜 CAS agar plate를 제작하여 gel puncher를 사용하여 CAS agar plater에 지름 3.5 mm의 well을 뚫어서 매 8시간 간격으로 배양 상층액 200 μl 를 well에 넣은 후 30°C 항온기에서 하룻밤 배양하여 well 주위에 생성되는 황색 hollow의 생성 유무로 siderophore 생성능을 관찰하였다.

흡광도를 이용한 siderophore 생합성은 측정

Siderophore의 측정은 Marugg 등 (25)의 방법을 변형하여 실시하였다. *Pseudomonas sp.* PY002를 5 ml의 King's B 액체 배지에 접종하여 30°C에서 하룻밤 진탕 배양한 배양액 1 ml를 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 형성된 침전물을 0.85% NaCl 용액 1 ml로 3회 현탁하였다. 현탁액을 dipyrlydiol이 0에서 500 μM 이 첨가된 M9 최소배지에 4×10^7 ml이 되도록 접종하여 30°C에서 배양하면서 측정하였다.

배양액 1 ml를 12,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 형성

된 상층액을 0.2 M Tris 완충용액(pH 7.4)으로 1/10으로 희석하여 UVICON 930 spectrophotometer로 200 nm에서 500 nm까지의 흡광도를 측정하였다.

Pseudomonas sp. PY002에서 exotoxin A 유전자의 클로닝

Genomic library 제조에 사용할 chromosomal DNA의 대량 분리는 Little(19)의 방법을 이용하였다. pBluescript SK(+)의 대량 분리는 Birnboim과 Doly(3), Maniatis 등(24)의 방법에 준하여 실시하였다. 형질전환은 Hanahan(10)와 Alaxander(1)의 방법을 변형하여 사용하였다. Dot blot hybridization과 immunoblot hybridization에서 선별된 클론에서 분리된 DNA를 제한효소 *Pst*I, *Nco*I, *Pvu*II, *Sst*I, *Sma*I, *Kpn*I, *Hae*III, *Eco*RI, *Hind*III와 *Xba*I으로 단일 절단 및 이중 절단한 뒤 1.0% agarose gel 전기 영동으로 확인 후 제한효소 지도를 작성하였다.

결과 및 고찰

Pseudomonas sp. PY002에서 exotoxin A의 발현 양상 관찰

*In vitro*에서 exotoxin A의 생성 양은 균주의 의존성이며, 철의 농도와 다수의 환경적 요소에 의해 영향을 받는다(5). O_2 , 온도, alanine의 농도 등과 같은 요소들이 존재함에도 불구하고 exotoxin A 유전자의 발현에 영향을 미치는 요소들에 대해서는 아직 명확치 않다. Exotoxin A는 철에 의한 diphtheria toxin의 조절 모델처럼 전통적인 repressor-operator model에 의해 exotoxin A가 조절되거나, 최근에 연구되어진 cholera toxin처럼 조절 될 가능성이 있다(23). 미생물에 의해 분비되는 대다수의 물질들은 물리적이거나 생리적인 환경에 의해 조절 되는 것과 마찬가지로 exotoxin A 또한 배지 내의 탄소원, aeration 정도, 온도나 철 이온의 농도에 의해 발현양이 조절된다. 특히, 철이온의 농도는 *P. aeruginosa*에서 분비되는 elastase, alkaline protease, pyochelin, pyoverdine, outer membrane proteins과 pigment의 생성량을 조절하는 것으로 보고되고 있다(30).

Exotoxin A의 발현 양상을 관찰하기 위하여 MKB 액체배지에 *Pseudomonas sp.* PY002를 접종하여 매 8시간의 간격으로 세포외로 분비되는 단백질과 *P. aeruginosa* PAO1의 anti-exotoxin A와 immunoblot hybridization을 실시하였다. *Pseudomonas sp.* PY002의 외분비 단백질 50 μg 을 SDS-PAGE 전기영동 방법으로 분획 한 후 goat anti-exotoxin A를 NC filter에 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 첨가하여 16~18시간 동안 반응시켰다. 그 결과 배양시간이 길어짐에 따라 배지내에 유용 가능한 철이 고갈됨으로 exotoxin A의 발현양은 점차적으로 증가하는 양상을 보였으며, CAS 배지에 점적한 배양 상층액에서 siderophore의 발현양도 증가함을 보였다(Fig. 1). CAS 평판배지에서 미생물에 의해 합성된 siderophore는 철과 복합체를 형성하고 이때 방출되는 색소는 배지를 청색에서 황색으로 변화시킨다(i.e., $\text{Fe Dye}^{3+} + \text{L}^{\text{b}} \rightarrow \text{FeL}^{3+} + \text{Dye}^{\text{a}}$; L: a strong ligand <e.g., a siderophore>, Dye: Chrome Azurol S, 27). Fig. 1에서 exotoxin A의 발현 양상과 siderophore의 발현 양상을 비교함에 따라 2가지 형태의 siderophore 중에서 어떤 형태의 siderophore와 상관 관계가 있는지 관찰하기 위하여 M9 액체배지에 화학적으로 합성된 철-킬레이트인

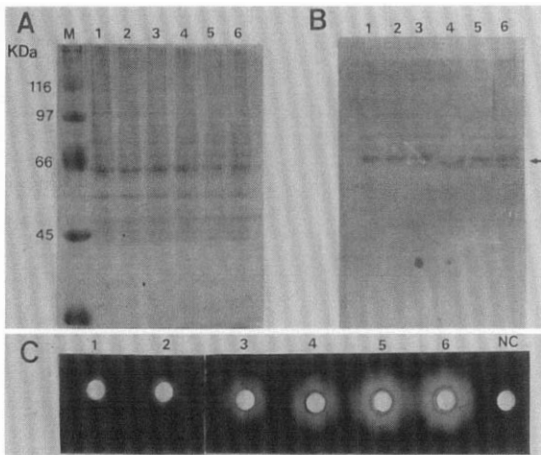


Fig. 1. Identification of *Pseudomonas* sp. PY002 protein which is immuno-logically related to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exotoxin A protein and relationship of siderophore production in MKB. Extracellular protein of *P. sp.* PY002 were prepared every 8 hrs., electrophoresed on 10 % SDS-polyacrylamide gel (A), immunoblot hybridization (B) and siderophore production analysis on CAS plate (C) were performed as described in Materials and Methods. Lane M, Protein size marker; 1, 8 hrs. culture; 2, 16 hrs. culture; 3, 24 hrs. culture; 4, 32 hrs. culture; 5, 40 hrs. culture; 6, 48 hr culture; NC, Negative control.

dipyridyl를 0에서 500 μM 이 되도록 첨가한 후 36시간 동안 배양하여 exotoxin A의 발현 양상을 비교하였다(Fig. 2). 100 μM 의 dipyridyl를 첨가하였을 때, exotoxin A의 발현이 최고조에 달했으며, pyochelin 역시 최고의 발현 양상을 나타냈으나, pyoverdinin의 발현은 200 μM 이 첨가되었을 때 최고의 농도로 발현되다가 점차적으로 감소하였다. 이 결과로부터 exotoxin A의 발현은 pyochelin에 의해 지배됨을 알 수 있었다. 이는 1979년에 Bjorn 등(5)이 *P. aeruginosa* PA-103을 포함한 7개의 균주를 대상으로 배지내에 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 철이온을 첨가하였을 때는 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 철이온을 첨가하였을 때 보다 7개 모든 균주에서 exotoxin A의 양이 85% 감소함을 보고하여 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 이들은 외분비되는 haemagglutinin의 발현양상을 관찰하여 기존에 보고된 외분비 단백질이 철이온의 농도에 의해 조절됨을 확인하였다.

Pseudomonas sp. PY002에서 exotoxin A 유전자의 클로닝

Pseudomonas sp. PY002의 genomic library는 *E. coli* cloning vector인 pBluescript SK(+)를 사용하여 제조하였다. *Pseudomonas* sp. PY002의 염색체 DNA를 분리한 뒤 *Pst*I로 절단하여 0~8 kb *Pst*I 단편을 가장 많이 얻을 수 있는 제한 효소 농도를 설정하기 위하여 제한효소 농도 2배 희석법에 의한 부분 절단을 실시하여 1 μg DNA를 *Pst*I 0.03125 unit로 절단할 때 0~8 kb 크기의 DNA 단편이 가장 많이 형성되어 *Pseudomonas* sp. PY002의 염색체 DNA 300 μg 을 *Pst*I 9.375 unit로 절단하였다. 10~40% sucrose 밀도구배법을 이

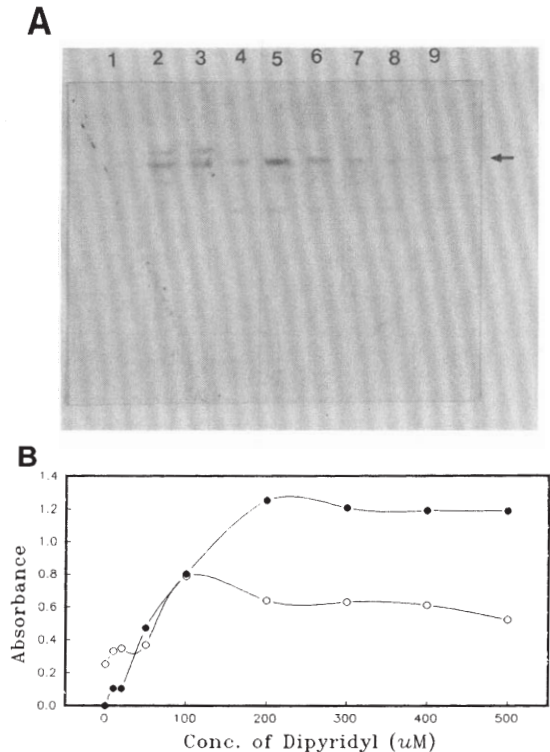


Fig. 2. Identification of *Pseudomonas* sp. PY002 protein which is immunologically related to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exotoxin A protein and relationship of siderophore production in M 9 minimal medium. A fully grown *P. sp.* PY002 was diluted in sterile saline solution to obtain a cell density of ca 10^7 CFU per ml. From this bacterial suspension 1 ml was inoculated in 10 ml of M9 minimal medium containing of 0 to 500 μM dipyridyl to obtain cell density of ca 10^6 CFU per ml and incubate at 30°C. After 36 hrs later, the supernatant of the bacterial culture were analysed exotoxin A production (A) and siderophore production (B) The relative intensity of the fluorescence was measured at 200 to 500 nm with UVICON 930. Panel A: Lane 1, 0 μM dipyridyl; 2, 10 μM dipyridyl; 3, 20 μM dipyridyl; 4, 50 μM dipyridyl; 5, 100 μM dipyridyl; 6, 200 μM dipyridyl; 7, 300 μM dipyridyl; 8, 400 μM dipyridyl; 9, 500 μM dipyridyl. Panel B: ○—○, pyochelin; ●—●, pyoverdinin.

용하여 0~8 kb 단편을 pBluescript SK(+)에 cloning 하는데 삽입 DNA로 이용하였다. 이 때 pBluescript SK(+)는 *Pst*I 절단한 후 phosphatase 처리로 5' 인산기를 제거하여 0~8 kb 단편 1 μg 을 excess T4 DNA ligase(400 unit/ μl)를 이용하여 접합시킨 후 *E. coli* HB101에 형질전환시킨 결과 2,000개의 재조합체를 얻었으며 genomic library로부터 임의로 선정된 clone들에서 재조합 plasmid를 분리하여 삽입된 insert DNA의 크기를 확인한 결과 평균 크기는 약 1.3 kb 정도였다.

이들 재조합 클론에서 exotoxin A 유전자를 암호화하는 재조합 클론을 선별하기 위하여 dot-blot hybridization을 실시하였다. 개개의 클론에서 외분비 단백질을 분리한 다음

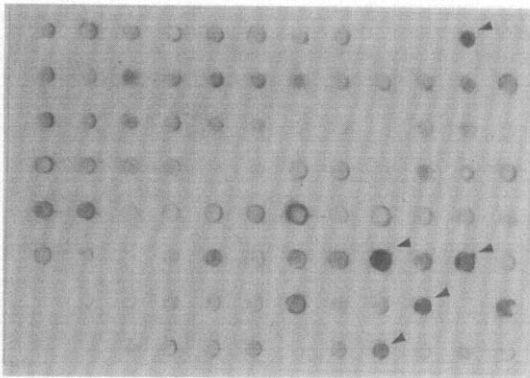


Fig. 3. Detection of exotoxin protein-producing recombinant clones by dot hybridization. Extracellular proteins of genomic libraries were prepared, spotted on nitrocellulose filter using by Bio-dot microfiltration apparatus, and isolated cross-reactive clones to anti-exotoxin A produced by *P. aeruginosa* PAO1. Arrows indicate positive clones.

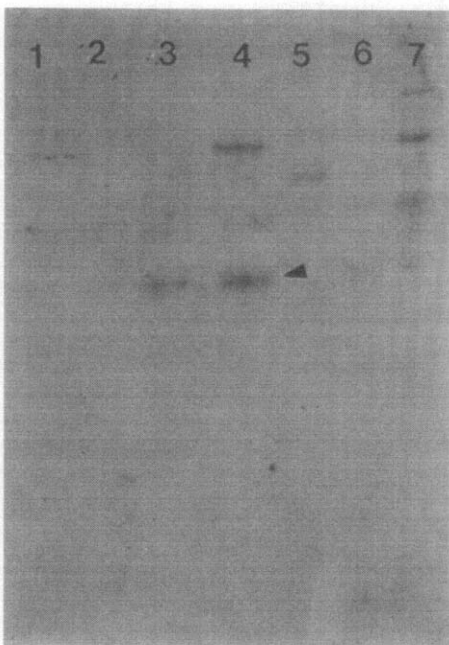


Fig. 4. Immunoblotting of *Pseudomonas* sp. PY002 exotoxin protein-producing recombinant clones. Extracellular protein of recombinant clones were hybridized with anti-exotoxin A produced by *P. aeruginosa* PAO1. Arrows indicate exotoxin A produced by *P. sp.* PY002.

Bio-dot microfiltration apparatus를 이용하여 NC filter에 전이시킨 후 goat anti-exotoxin A를 16 µg/ml가 되도록 첨가하여 16~18시간 동안 반응시켜서, goat anti-exotoxin A와 반응하는 28개의 클론을 획득하였다(Fig. 3). 이들의 exotoxin A 생성을 재확인하기 위하여 재차 immunoblot hy-

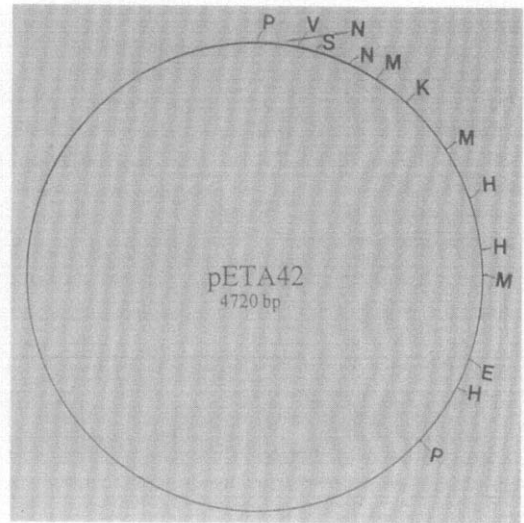


Fig. 5. Restriction map of the recombinant plasmid pETA42. The plasmid pETA42 contains a 1.7 kbp fragment of *P. sp.* PY 002 DNA. Various restriction enzyme recognition sites were mapped. P, *Pst*I; N, *Nco*I; V, *Pvu*II; S, *Sst*I; M, *Kpn*I; H, *Hae*II; E, *Eco*RI.

bridization을 실시하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 3번 lane과 4번 lane이 goat anti-exotoxin A와 반응이 강함을 보였다 이 중 goat anti-exotoxin A와의 반응성이 강한 4번 lane의 클론을 선택하여 pETA42로 명명하고 추후 실험에 사용하였다. pETA42의 제한 효소 지도를 작성하기 위하여 plasmid DNA를 분리하여 여러 가지 제한효소를 이용하여 절단한 후 제한 효소 지도를 작성하였다(Fig. 5). 양쪽말단에 cloning site인 *Pst*I site가 존재하며 2개의 *Nco*I, 1개의 *Pvu*II, 1개의 *Sst*I, 3개의 *Sma*I, 1개의 *Kpn*I, 3개의 *Hae*II, 1개의 *Eco*RI site가 존재하였다. Lory 등(23)은 *P. aeruginosa* PAK에서 pUC9를 이용하여 8 kb의 exotoxin A 유전자를 클로닝하여 *E. coli* K38에서 exotoxin A의 cellular location을 immunoblot hybridization을 이용하여 periplasm에 위치함을 보고 하였다. 이 결과는 본 실험에서 *E. coli* DH5α의 extracellular에 exotoxin A가 위치하는 것과는 상이한 결과를 보이는데 이는 성숙한 exotoxin A가 extracellular로 방출되기 전에 proenzyme 형태로 periplasm에 위치하는 결과로 해석되며, Gray 등(9)이 *P. aeruginosa*의 exotoxin A 유전자를 *E. coli*에서 발현시켰을 때 extracellular에서 검출된다고 보고한 결과와도 상이하나 본 실험과는 유사한 결과로 나타났다. Hedstrom 등(11)은 exotoxin A 생합성 유전자가 결여된 변이주 *P. aeruginosa* PA103-29과 *P. aeruginosa* PAO1의 3 kb 크기의 *Xho*I 단편과 complementation 기법을 이용하여 구조 유전자를 클로닝 하였으며, 변이주가 야생형보다 exotoxin A의 발현이 10배 정도 증가하며, 철이 함유된 배지에서 부분적으로 그 발현이 조절 됨을 보고 하였다. 따라서, 추후에 Tn5 등을 이용하여 exotoxin A 생합성 유전자가 결여된 변이주를 제작하여 pETA42와의 complementation을

이용하여 변이주와 야생형 균주간에 exotoxin A 유전자의 발현 양상의 변화와 염색체 상에 exotoxin A 유전자의 위치 분석 등의 실험을 수행하여야 할 것이다.

참고문헌

- Alaxander, D.C. 1987. An efficient vector-primer cDNA cloning system. *Method Enzymol.* **154**, 41-64.
- Bernhard, S. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, **160**, 47-56.
- Birnbom, H.C. and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bjorn, M.J., B.H. Iglewski, S.K. Ives, J.C. Sadoff, and M.L. Vasil. 1978. Effect on iron on yields of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PAO103. *Infect Immun.* **19**, 785-791.
- Bjorn, M.J., P.A. Sokol, and B.H. Iglewski. 1979. Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol.* **138**, 193-200.
- Callahan, L.T. III. 1974. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. *Infect Immun.* **9**, 113-118.
- Collier, R.J. 1975. Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriological Reviews* **39**, 54-85.
- Eidels, L., R.L. Proia, and D.A. Hart. 1983. Membrane receptors for bacterial toxin. *Microbiol. rev.*, **47**, 596-602.
- Gray, G.L., D.H. Smith, J.S. Baldrige, R.N. Harkins, M. L. Vasil, E.Y. Chen, and H.L. Heyneker. 1984. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2645-2649.
- Hanahan, D. 1985. DNA cloning: a practical approach. *IRL press.* **1**, 109-136.
- Headstrom, R.C., C.R. Funk, O.R. Pavlovskis, and D.R. Galloway. 1986. Cloning of a gene involved in regulation of exotoxin A expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. and Immunol.* **51**, 37-42.
- Höfte, M., K.Y. Seong, E. Jurkevitch, and W. Verstraete. 1991. Pyoverdine production by the plant beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK₂: Ecological significance in soil. *Plant and Soil* **130**, 249-257.
- Iglewski, B.H. and D. Kabat. 1975. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2284-2288.
- Iglewski, B.H., L.O. Elwell, P.B. Liu, and D. Kabat. 1976. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and by diphtheria toxin. In: Shaltiel S., (ed.) *Merabolics interconversion of enzymes*. 1975; Fourth International Symposium. Berlin: Springer Verlag, 150-155.
- Iglewski, B.H., L.O. Elwell, P.B. Liu, and D. Kabat. 1977. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun.* **15**, 138-144.
- Iglewski, B.H. and K.C. Sadoff. 1979. Toxin inhibitors of protein synthesis: production, purification, and assay of *Pseudomonas aeruginosa* toxin A. In: Moldave K. Grossman L., (eds.) *Methods in enzymology*. Vol. 60. New York: Academic Press, 780-793.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Leppia, S.H. 1976. Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **14**, 1077-1086.
- Little, P.F.R. 1987. DNA cloning: A practical approach. Washington DC: IRL press, **3**, 19-42.
- Liu, P.V. 1966. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. III. Identity of lethal toxins produced *in vitro* and *in vivo*. *J. Infect. Dis.* **116**, 506-513.
- Liu, P.V. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect Dis.* **130**, S94-99.
- Lory, S. and R.J. Collier. 1980. Expression of enzymic activity by exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **28**, 494-501.
- Lory, S., M.S. Strom, and K. Johnson. 1988. Expression and secretion of the cloned *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **170**, 714-719.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning; a laboratory manual. N. Y. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Marugg, J.D., M. van Spanje, W.P.M. Hoekstra, B. Schippers, and D.J. Weisbeek. 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth-stimulating *Pseudomonas putida* WCS358. *J. Bacteriol.* **164**, 563-570.
- Park, Y., H.H. Kim, M.G. Yeo, Y.W. Seo, H.C. Koh, Y. G. Yang, H.S. Cheong, and S.J. Kim. 1992. Identification of fluorescent *Pseudomonads* producing siderophore and construction of siderophore biosynthesis defective mutant. *Kor. Jour. Microbiol.* **30**, 286-290.
- Schwyn, B. and J.B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
- Vasil, M.L. and B.H. Iglewski. 1978. Comparative toxicities of diphtherial toxin and *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: evidence for different cell receptors. *J. Gen. Microbiol.* **108**, 333-337.
- Vasil, M.L., D. Kabat, and B.H. Iglewski. 1977. Structure-activity relationships of an exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **16**, 353-361.
- Wood R. E. and B.H. Iglewski. 1983. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev. Infect. Dis.*, **5**, S715-S722.

(Received August 20, 1998/Accepted December 17, 1998)

ABSTRACT: Effect of Ferrous Ion on the Formation of Exotoxin A from *Pseudomonas* sp. PY002 and Cloning of it's Gene

Sun-Ah Choi, Ho-sang Kim, Ji-Young Choi, Jeong-Suk Kang, Chun-Sung Kim, Duck-Lae Kim, Young-Ju Kim, Myeong-Gu Yeo, and Yeal Park* (Department of Biological Science, College of Natural Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot analysis that a protein with 66,000 daltons in size was recognized by *P. aeruginosa* anti-exotoxin A from *P. sp.* PY002. The yields of exotoxin A in *P. sp.* PY002 culture were influenced by the concentration of iron in the culture media. Increasing of the exotoxin A production and siderophore production was made slight increasing in the MKB medium. On the other hand, to clone the gene encoding the exotoxin A genomic library of *P. sp.* PY002 was constructed in pBluescript SK(+). From this library a exotoxin A homologous gene was isolated by immunological hybridization method using *P. aeruginosa* anti-exotoxin A as a probe. Two putative clones were isolated and designated pETA23 and pETA42. The restriction analysis of pETA42 demonstrated that the 1760 bp insert contained one *Nco*I, *Pvu*II, *Sst*I, *Kpn*I and *Eco*RI site and three *Sma*I and *Hae*II sites.