

CheY-OmpR 혼성 단백질의 삼투조절효과

고민수 · 박찬규*

한국과학기술원 생물과학과

이전의 연구에서 우리는 CheY-OmpR 융합단백질인 'Chp'을 제조하여 *ompF*와 *ompC* 유전자에 미치는 영향을 조사하였다(6). 본 연구에서는 Chp의 활성 및 작용기작을 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통해 알아보았다. 융합단백질 Chp은 OmpR과 마찬가지로 DNA에 염기서열 특이적인 결합을 하지만, 유전자의 전사 활성 기능은 나타내지 않았다. 따라서 Chp의 *ompF/C* 유전자의 발현에 대한 효과는 DNA 결합 부위에 대한 OmpR과의 경쟁에 의해 나타나는 것으로 결론지을 수 있다. 그러나, *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 Chp의 인산화에 따른 DNA 결합력 변화는 관찰할 수 없었다. Chp이 *ompR* 유전자의 발현을 증가시키는 것이 관찰되었는데, OmpR도 이와 같은 효과를 나타내었으며, 배지의 삼투압을 변화시켰을 때와 EnvZ 돌연변이체에서도 *ompR* 유전자의 발현변화가 관찰되었다.

KEY WORDS □ *Escherichia coli*, osmoregulation, chemotaxis, *cheY*, *ompR*, *envZ*

박테리아는 외부 환경이 변화함에 따라 여러 효소의 활성과 발현되는 유전자의 종류 및 발현양의 변화를 통하여 사용하는 영양분의 종류와 대사 경로의 변화, 위치 이동, 세포의 외부형태 변화 등의 현상을 보이며 단기 또는 장기적으로 적응한다. 이러한 적응과정에서 가장 먼저 일어나는 것은 환경변화의 감지와 그 감지된 변화를 신호로 바꾸어 세포내 분자들로 전달하는 신호전달(signal transduction) 과정이다.

박테리아의 신호전달은 개념적으로, 변화를 감지하는 '인지자(sensor)'와 그로부터 나오는 신호를 받아 유전자발현, 세포의 운동성 등을 조절하는 '반응조절자(response regulator)'로 구성되는 이른바 '이 인자 조절계(two-component regulatory system)'을 통하여 이루어진다(7). 대장균의 주화성계와 삼투조절계도 이러한 조절 시스템으로 이루어져 있으며, CheY는 주화성계에서, OmpR은 삼투조절계에서 각각의 반응조절자로 작용한다(15).

CheY는 129개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로서 편모의 모터 부분에 결합하여 그 회전 방향에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. CheY의 D12, D13, D57과 K109 잔기는 CheY의 인산화와 그에 따른 활성화에 주요 역할을 하는 것들로, 다른 반응조절자들의 receiver module에서도 이에 해당하는 아미노산 잔기들은 거의 항상 보존되어 있다(17, 1). 결정 구조 분석에 의하여 이들 잔기들은 서로 가까이 위치하고 있어서 이른바 'acid pocket'을 형성하고 있다는 것이 밝혀졌다. 또한 화학적 분석에 의하여 CheY의 D57이 인산화되는 잔기라는 것이 알려졌다(19), 돌연변이 연구로부터 K109는 D57에 인산화가 일어났을 때 CheY의 conformation 변화를 유도하는데 필수적인 잔기라는 것이 알려져 있다(9).

OmpR은 삼투조절계의 반응조절자로 N-말단쪽에 인산기를 받아들이는 모듈이 있고, C-말단쪽에는 DNA-binding

domain을 갖고 있다(24). OmpR은 세포 외막 단백질인 OmpF와 OmpC의 발현을 조절하는데, *ompC*에 대해서는 발현증가의 활성을 보이고, *ompF*에 대해서는 발현 증가와 억제효과를 모두 나타낸다(2). 이러한 조절은 이들 유전자의 프로모터 부분에 OmpR-binding site(OBS)s가 있고, 이 sites에 OmpR이 붙음으로써 이루어진다(13, 22). OmpR의 DNA-binding은 막 단백질인 EnvZ에 의한 인산화에 따라 조절된다. 즉, OmpR은 인산화되었을 때 더 높은 DNA-binding affinity를 나타낸다(18).

이전의 연구에서 우리는 CheY와 OmpR의 구조적 유사성과 domain의 기능으로부터, 주화성 신호를 유전자 발현으로 바꾸어 주기 위해 N-domain에는 CheY를 갖고, C-domain에는 OmpR의 DNA-binding domain으로 알려진 C-terminal half를 갖는 융합단백질 'Chp'을 만들어 그 발현과 *ompF/ompC*에 미치는 영향을 조사하였다(6). 본 실험에서는 Chp이 *ompF*와 *ompC*에의 작용 기작을 규명하기 위해서 Chp의 *in vivo* 활성과 *ompF/C*의 upstream region에 대한 *in vitro* affinity를 조사하였다. 그 결과 Chp이 *ompF/C*의 OmpR-binding sites에 대해 경쟁적으로 결합하여 이들 porin 단백질의 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, Chp의 인산화 정도의 변화에 따른 DNA 결합력 변화는 *in vivo*와 *in vitro* 실험에서 모두 관찰되지 않았다. 또한 Chp과 OmpR이 *ompR* 유전자의 발현에 영향을 미치는 것을 관찰하였고, 배지 삼투압을 변화시켰을 때와 EnvZ 돌연변이체에서도 *ompR*의 발현이 변화하는 것이 나타났다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

DNA 조작 과정에서는 DH5 α 를 사용하였으며, 그 외의 assay 등은 MC4100과 그 유도체들을 사용하였다(Table 1). pMS107(6)을 *EcoRI*와 *ScaI*으로 처리한 후 pTTQ19의

*To whom correspondence should be addressed

Table 1. The strains and plasmids used in this work

<Strains>

Strain name	Parent	Genotype	Source
MC4100		<i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flhD5301 ptsF25 deoC1 thiA1</i>	Laboratory collection
RU1012	MC4100	<i>envZ::Km Φ(ompC'-lacZ')10-25</i>	M. Inouye
CK272	MC4100	<i>Φ(ompC'-lacZ')10-25</i>	C.H. Kim
MS3	MC4100	<i>envZ::Km</i>	This work
MS22	MC4100	<i>flhD* Φ(ompC'-lacZ')10-25</i>	This work
MS24	MS22	<i>cheZ292(Am) eda::Tn10</i>	This work
MS25	MS22	<i>eda::Tn10</i>	This work
MS32	MC4100	<i>flhD* cheZ292(Am) eda::Tn10</i>	This work
MS33	MC4100	<i>flhD* eda::Tn10</i>	This work
MS35	HB180	<i>cheZ'</i>	This work
MS37	MS35	<i>ompR::Tn10</i>	This work
MH1160	MC4100	<i>ompR101</i>	T.J. Silhavy
MH1461	MC4100	<i>envZ473</i>	T.J. Silhavy
BS114	MC4100	<i>ΔompR zhf::Tn10</i>	S.H. Bae

<Plasmids>

Plasmid	Containing genes	Reference
pTTQ19	<i>bla, lacF</i>	
pAT428	<i>bla, ompR, envZ</i>	(13)
pMY150	<i>bla, ompC</i>	(12)
pMS107	<i>bla, chp</i>	(6)
pMS110	<i>bla, chp, lacF</i>	This work
pMS114	<i>bla, PompR::cat fusion</i>	This work
pMS115	<i>tet, PompR::cat fusion, pACYC184 origin</i>	This work

lacIq 유전자를 포함하는 *ScaI/EcoRI* fragment와 ligation하여 pMS110을 얻었다. *ompR*의 프로모터를 갖는 *cat* fusion은 pAT428(13)을 *AvaI*과 *StuI*으로 처리하여 얻은 약 530 bp의 fragment를 pKK232-8을 *SalI*으로 자른 후 Klenow fragment로 fill-in한 후 *AvaI*으로 처리한 vector와 ligation하여 pMS114를 제조하였다. pMS115는 pMS114를 *NcoI*과 *SspI*으로 잘라 얻은 약 1.5 kb fragment를 *NcoI*과 *PvuII*로 처리한 pACYC184 vector와 ligation하여 얻었다.

β-Galactosidase assay와 CAT assay

β-Galactosidase assay와 CAT assay는 TB(1% Trypton, 0.25 % 또는 1.0% NaCl), 35°C에서 mid-log phase(OD₆₀₀ 0.4-0.5)까지 키운 cell을 써서 수행하였다. β-galactosidase assay는 Miller(1972)(11)의 방법을 따랐고, CAT assay는 Rodriguez 등(1983)에 의해 제시된 방법을 따라 수행하였다.

Fluorometry

Acetyl phosphate에 의한 단백질의 인산화를 측정하기 위해 형광측정법을 이용하였다. 인산화 완충용액으로는 8.8 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl(pH 7.0)을 사용하였고, 단백질(CheY 또는 Chp)은 3 μM의 농도로 사용하였다. Tryptophane 잔기의 형광을 검출하기 위해서 excitation wave로 295 nm를 사용하였으며, 346 nm의 emission을 time scan으로 측정하였다. Acetyl phosphate를 첨가하고 약 1분 후에 emission이 평형에 도달한 값을 읽었고, 단백질이 없는 완충용액

이 나타내는 값을 빼주어 기록하였다.

Chp purification

pMS107로 형질 전환한 MC4100을 ampicillin containing L broth 3 L에 12시간 키운 후 harvest하고 TE buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA) 50 ml에 풀고, 초음파 분쇄기로 cell을 깼 후에 ultracentrifuge를 하여 맑은 상층액을 얻어 TE로 equilibration된 Affi-Gel Blue(Bio-Rad) 칼럼(2 cm × 20 cm)에 loading하고, 1.0 M NaCl이 첨가된 TE buffer로 용출해 내어 Chp이 포함된 fraction들을 모았다. 모은 fraction들을 Sephacryl S-200 칼럼에 loading한 후, TE로 용출하고, DEAE-sepharose 칼럼에 loading하고 NaCl gradient(0-0.5 M)로 용출하였다. 여기서 얻은 Chp fraction들을 다시 Sephacryl S-200에 loading한 후 20 mM Tris-HCl(pH 8.0)으로 용출하여 95% 이상의 정제된 Chp을 얻었다. 이를 Centricon으로 농축하여 0.220 mg/ml의 농도로 만들었다.

Gel retardation assay

pMY150을 *XbaI*, *EcoRI*, *BglII*, *HindIII*로 자른 DNA 절편을 사용하였다. 순수 정제된 OmpR 또는 Chp 단백질 0-40 pmole을 4 mM acetyl phosphate를 첨가한 PBB buffer(10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 5% glycerol, 50 μg/ml BSA, 0.05% NP40, 1 mM DTT)와 첨가하지 않은 PBB buffer(final 20 μl)에 섞어 상온에 20분간 놓아둔 후 low-ionic strength gel(6.75 mM Tris-

Cl, pH 7.4, 3.8 mM sodium acetate, 0.5 mM EDTA, 4% acrylamide, 0.05% bisacrylamide, 2.5% glycerol)에 loading하여 100 V의 정전압을 걸어주었다. 이때 running buffer로는 6.75 mM Tris-Cl, pH 7.4, 3.8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA를 사용하였다. 전기영동 후 gel을 ethidium bromide로 염색하고 UV-transilluminator상에서 분석하였다.

Immunoprecipitation

각 균주를 1x H1 salt, 0.2% glucose, 0.01% thiamine 배지에서 OD₆₀₀ 0.3까지 키워 0.9 ml씩을 2개의 1.5 ml tube로 옮기고, 한 tube에는 1x H1 salt를 0.1 ml 첨가하고 다른 tube에는 3 M NaCl, 1x H1 salt를 0.1 ml 첨가한 후 35°C에 20분간 방치한다. 여기에 각각 15 µCi의 ³⁵S-methionine을 첨가하고, 35°C에 30분간 더 놓아둔 후 얼음으로 옮긴다. 10분 후, 4°C에서 원심분리(14,000 rpm, 3 min)하고 1x H1 salt로 2회 씻어준다. 다시 원심분리한 후 cell 침전을 50 µl의 Lysis buffer(10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1% SDS)로 녹이고 5분간 끓인다. 원심분리하여 상층액을 40 µl 따내어 새 tube로 옮기고, Antibody binding buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 2% Triton X-100) 0.96 ml를 첨가하여 잘 섞어준다. 이중 10 µl를 따내어 scintillation counting을 하여 dpm값을 결정하여 각 sample이 일정 dpm을 나타내는 부피의 sample에 anti-Chp 항체 혈청을 10 µl 첨가하고 4°C에 10시간 놓아둔 후 Protein A Se- pharose CL-4B(Sigma) 5 µl를 첨가하여 4°C에서 천천히 돌려주며 3시간 더 방치하고, 원심분리한 후 침전물을 0.5 M NaCl solution(0.5 M NaCl, 0.5% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.1% SDS) 1 ml로 2회 씻어준다. 침전물에 30 µl의 1x SDS sample buffer(mercap- toethanol은 제외된 buffer)를 첨가하고 3분간 끓여서 녹인 후, 12% SDS-PAGE를 수행하고, Gel을 말려서 X-ray film에 이틀간 감광한다.

결 과

Chp은 세포 외막 단백질인 OmpF와 OmpC의 발현에 영향을 미친다

융합단백질 Chp의 발현양을 조절하기 위해 *lac* promoter 다음에 *chp* 유전자를 갖고, *lacP* 유전자를 포함하는 pMS110으로 MC4100을 형질전환하고, Chp 발현양을 IPTG로 조절하여 OmpF와 OmpC의 발현양을 total cell SDS-PAGE에서 관찰하였다. Fig. 1(A)에서 나타나는 바와 같이 Chp의 발현증가는 OmpC양을 줄이고, OmpF의 양은 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 Chp의 영향이 유전자의 전사 수준에서 나타나는지에 대한 조사를 하기 위해 *ompC::lacZ* transcriptional fusion(23)이 있는 CK272/pMS110의 β-galactosidase 활성을 측정해 보았다. IPTG에 의해 Chp 발현을 증가시켰을 때 *ompC::lacZ* 발현이 7배 가량 감소하였다(Fig. 1(B)).

그 작용 기작은 OBS(OmpR-binding site)에 대한 *ompR*과의 경쟁에 의한 것으로, *ompC*에서는 전사 수준에서, *ompF*에서는 전사 수준과 *micF* RNA를 통한 번역 수준의 조절로

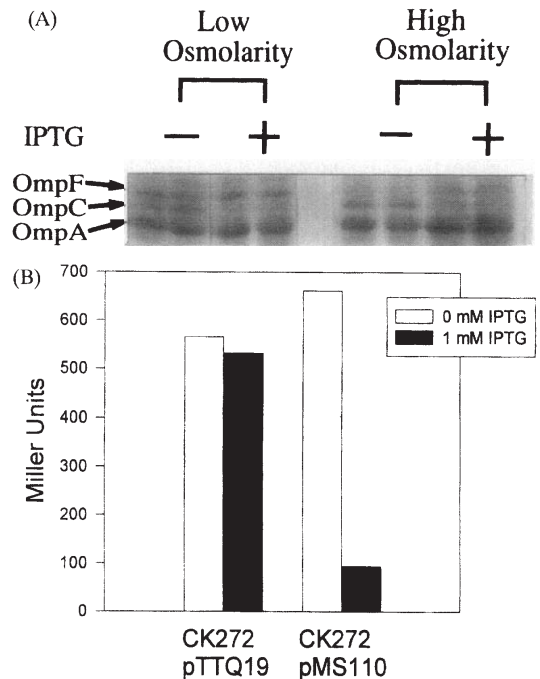


Fig. 1. Chp effect on the OmpC and OmpF expressions. (A), Overnight culture of MC4100/pMS110 grown in TB were 1/100 diluted to fresh TB containing 0.25% NaCl (Low Osmolarity) and TB containing 1.25% NaCl (High Osmolarity). IPTG (final 1 mM) was added at the start of the fresh culture, and the cells were grown to mid-log stage with shaking at 35°C. Total cell proteins were electrophoresed on the SDS-polyacrylamide gel (12%) and stained with Coomassie-blue. OmpF, OmpC and OmpA bands are indicated by arrows. (B), Overnight culture of CK272/pTTQ19 or CK272/pMS110 grown in TB were 1/100 diluted to fresh TB (open bar) or TB containing 1 mM IPTG (closed bar), and the cells were grown to about O.D 0.5 with shaking at 35°C, and their β-galactosidase activities were assayed. The *ompC::lacZ* expression was represented as Miller Unit (11).

설명되어진다. 이에 대해서 ‘고찰’에서 논의하였다.

또 한 가지 가능한 기작은 Chp이 *ompR*의 발현을 억제하거나 EnvZ와 OmpR의 상호작용을 방해한다면 Chp의 OmpF/OmpC 발현양에 대한 효과가 설명될 수 있다. 이에 대해서는 뒤에서(결과 4) 실험하였다.

Chp의 활성은 주화성 신호에 의해 조절받지 않는다

Chp의 N-terminal half는 CheY로 구성되어 있으므로 C-terminal half의 DNA-binding 활성이 N-terminal half의 인산화 상태에 따라 변화될 것을 기대하였다. 이를 조사하기 위해 Chp활성에 대한 CheZ의 효과를 관찰하였다. CheZ는 CheY의 탈인산화를 촉진하는 인자로서, cheZ 유전자가 결합되어 있는 경우 CheY의 인산화가 증가하는 것으로 알려져 있다(21). MC4100은 편모합성 master operon의 *flhD* 유전자가 결합되어 있기 때문에 *cheZ*를 포함한 모든 주화성

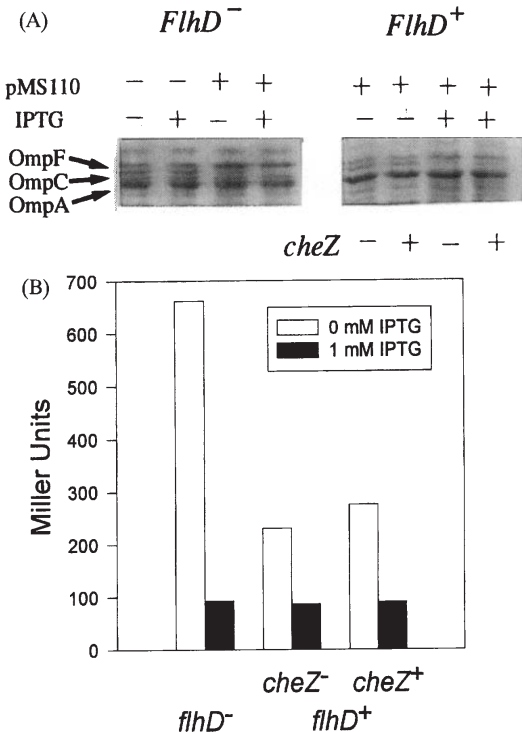


Fig. 2. Chemotactic signaling and the Chp activity on the OmpC/OmpF expression. (A), MC4100(*flhD*⁻), MC4100/pMS110, MS32(*flhD*⁺, *cheZ*⁻)/pMS110 and MS33(*flhD*⁺, *cheZ*⁺)/pMS110 were grown in TB or TB containing 1 mM IPTG to about O.D 0.5 with shaking at 35 ml. Total cell proteins were electrophoresed on the SDS-polyacrylamide gel (12%) and stained with coomassie-blue. (B), CK272(*flhD*⁻)/pMS110, MS24(*flhD*⁺, *cheZ*⁻)/pMS110 and MS25(*flhD*⁺, *cheZ*⁺)/pMS110 were grown in TB or TB containing 1mM IPTG to about O.D 0.5 with shaking at 35°C, and their β -galactosidase activities were assayed.

인자와 편모 구성 성분들이 발현이 크게 감소된다(8). 따라서 운동성이 있는 MC4100/*flhD*⁻에 *cheZ* allele(MS24)와 *cheZ*⁺ allele(MS25)을 만들고 여기에 각각 pMS110을 도입한 균주를 사용하여 두 균주에서의 OmpC/OmpF 발현에 대한 Chp 활성을 비교하였다(Fig. 2(A) and (B)). 그 결과 Chp활성에 대한 *cheZ*의 효과는 보이지 않았다.

Chp의 인산화/탈인산화는 CheY와 유사하게 일어나지만, Chp의 인산화 정도가 DNA-binding을 변화시키지는 않는다

Chp의 활성이 CheY에 의해 변화되지 않는 가능한 이유들은 다음과 같다. 첫째, Chp의 인산화가 제대로 이루어지지 않거나, 둘째, CheZ가 Chp의 탈인산화를 촉진시키지 못하거나, 셋째, Chp의 CheY 부분 인산화가 DNA-binding에 영향을 미치지 못하는 경우 등을 가정할 수 있다. 따라서, Chp의 인산화와 DNA-binding 활성 변화 여부를 보다 직접적으로 조사하였다. Chp의 인산화는 CheY를 *in vitro*에서 인산화시킬 수 있는 acetyl-phosphate를 사용하였고, DNA-

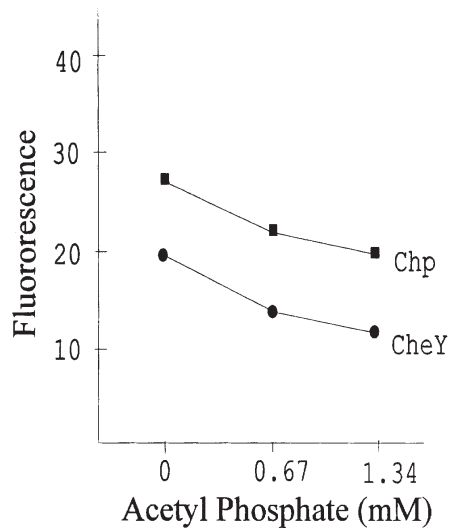


Fig. 3. Fluorescence intensity decrease by acetyl phosphate in CheY and Chp. The purified proteins(CheY and Chp) were diluted in 8.8 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl(pH 7.0) at 3 mM concentration, and the fluorescence was measured after it reaches to steady-state at each concentration of acetyl phosphate. Excitation wave length was 295 nm; fluorescence intensity was monitored at 346 nm.

binding 정도는 gel-retardation assay로 측정하였다.

CheY에는 하나의 tryptophan이 존재하며 그 위치는 58번 residue로 인산화되는 Asp-57의 바로 옆에 존재한다. Tryptophan residue는 295 nm 파장의 빛으로 여기(excitation)되었을 때 형광을 내는 것으로 알려져 있다. CheY의 Trp-58도 295 nm의 파장으로 여기시켰을 때 일정 형광을 내며 CheY가 인산화되었을 때는 그 형광 발색이 감소한다(10). 대장균의 주화성 신호 전달계에서 CheY의 인산화는 kinase인 CheA에 의해 이루어지는데, *in vitro*에서 acetyl phosphate와 carbamoyl phosphate 등의 물질에 의해서도 그 인산기가 CheY로 전달되는 것이 보고되었다(10).

이러한 사실을 근거로, 순수정제된 Chp의 인산화와 탈인산화를 CheY의 인산화/탈인산화와 비교하였다. Fig. 3은 CheY와 Chp의 acetyl phosphate에 의한 인산화를 나타내는데, Chp의 형광이 더 크게 나타나는 것은 Chp의 C-terminal half에 3개의 tryptophan이 더 존재하기 때문으로 보인다. Acetyl phosphate에 의한 형광 감소치가 CheY와 Chp에서 거의 같이 나타나므로 acetyl phosphate에 의한 인산화는 두 단백질에서 거의 동일하다고 할 수 있다. 또한 CheY와 Chp를 acetyl phosphate로 인산화시킨 후, acetyl phosphate가 없는 buffer에 희석하여 phospho-CheY와 phospho-Chp의 탈인산화 속도를 측정하였을 때, CheY와 Chp이 거의 비슷한 속도를 나타내었다(data not shown).

Chp의 인산화에 따른 DNA-binding 정도의 변화 여부를 알아보기 위해 Chp를 acetyl phosphate로 인산화시키고, *ompC* 유전자가 클로닝되어 있는 pMY150(12)의 *Xba*I/*Bgl*II 단편(약 0.6 kb, *ompC* promoter 포함)에 대한 gel-retardation

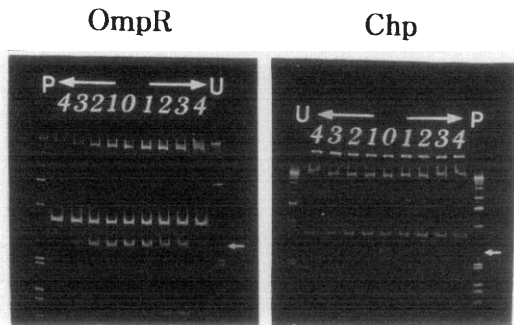


Fig. 4. Binding of purified OmpR or Chp to the *ompC* promoter. The *ompC* containing plasmid, pMY150 was digested with *Xba*I, *Eco*RI, *Bgl*II and *Hind*III. The *ompC* promoter region was in the 0.6 kb *Xba*I-*Bgl*II fragment(indicated by arrow). The restriction fragment mixture was incubated with either purified OmpR(left) or Chp(right) in PBB buffer(see the 'Material and Methods') added 4 mM acetyl phosphate(P) or none(U). After the incubation, the samples were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis. The amounts of the proteins (OmpR or Chp) used were the following: 0, none; 1, 5 pmole; 2, 10 pmole; 3, 20 pmole; 4, 40 pmole. Following electrophoresis, the gels were stained with ethidium bromide and then photographed.

assay를 수행하였다. 그 결과, Chp를 acetyl phosphate로 인산화시켜도 *ompC* promoter에 대한 binding이 증가하지 않았다. 같은 실험을 OmpR로 해보았을 때는 acetyl phosphate로 인산화시킨 OmpR의 DNA-binding이 증가함을 볼 수 있었다(Fig. 4). Chp의 인산화에 의해 DNA-binding이 증가하지는 않았지만 *ompC* promoter에 대한 특이성(specificity)은 OmpR과 같이 나타났다(Fig. 4).

따라서, Chp는 *ompC* promoter에 대해 OmpR과 경쟁적으로 특이적인 결합을 할 수는 있으나, OmpR과는 달리 그 결합력이 N-terminal half의 인산화에 의해 증가되지 않는다고 결론을 내릴 수 있다.

Chp의 발현은 *ompR* transcription을 증가시킨다

앞에서 언급했듯이 Chp는 *ompF* 발현을 증가시키고 *ompC* 발현을 감소시켰다. 이는 gel-retardation 실험 결과로부터 Chp이 OmpR과 마찬가지로 *ompC* promoter에 특이적인 결합을 하기 때문에 OBS에 대한 OmpR과의 경쟁에 기인한 것으로 볼 수 있다. 그러나 *ompF* 증가와 *ompC* 감소는 *ompR* 발현 억제에 의해서도 나타날 수 있기 때문에 Chp이 *ompR* 발현에 영향을 미치는지에 대한 조사가 필요하였다. 이를 위해 *ompR* promoter를 갖는 *cat* fusion plasmid(pMS115)를 제조하였다. 이 *PompR-cat* fusion의 CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 활성을 *ompR* 균주와 *ompR* 균주에서 비교해 보았을 때 *ompR*이 결합되면 CAT 활성이 약 3.5배 감소하였으며, *chp* 유전자를 갖는 pMS110을 *ompR* 균주에 도입했을 때 CAT활성이 2배 가량 증가하였다(Fig. 5).

이러한 결과는 OmpR이 자신의 유전자 발현을 증가시키는 것을 나타낸다. 그런데, 전사활성과 능력이 없는 Chp에

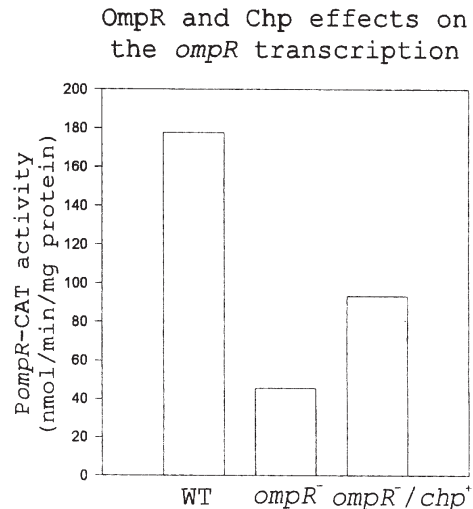


Fig. 5. OmpR and Chp effects on the *ompR* transcription. Wild type(MS35/pMS115), *ompR* (MS37/pMS115) and *ompR*/Chp (MS37/pMS115, pMS110) were grown in TB to mid-log phase with shaking at 35°C. Cells were harvested and resuspended in TDTT(50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 30 μM DTT), and sonicated to be used for CAT assay.

의해서도 *ompR* 유전자 전사가 증가하므로, OmpR이나 Chp이 *ompR* 유전자에 직접 결합하여 활성화시키는 것이 아니라 간접적인 방법에 의한 것으로 생각된다. 즉, OmpR이나 Chp이 '*ompR* 전사 억제자'의 발현을 감소시켜, *ompR* 전사를 증가시키는 것으로 생각된다.

*ompR*의 전사는 배지 삼투압에 영향 받는다

이와 같이 OmpR이 다른 유전자의 발현을 억제하여 나타나는 결과라면 OmpR의 DNA binding이 증가되는 조건, 즉, 배지 삼투압을 높이거나, hyperkinase 활성을 지니는 EnvZ 돌연변이체(EnvZ11) 균주에서 *ompR*의 발현이 증가하고 EnvZ가 결합되어 있는 균주에서는 *ompR* 발현이 감소할 것으로 기대되었다. 이와 같은 것을 조사하기 위해서 anti-Chp antibody를 이용하여 total cell lysate에서 OmpR을 면역침전(Immunoprecipitation)하여 SDS-PAGE에서 분석하였다('재료 및 방법' 참조). 그 결과 *ompR*과 *envZ*가 모두 야생형인 MC4100에서 삼투압이 높을 때 OmpR의 양이 약 3배 증가한 것으로 나타났고, *envZ*가 결합된 *envZ::Km* 균주인 MS3는 MC4100보다 OmpR 양이 감소한 것으로 나타났다. 또한 *envZ11* 돌연변이체에서는 2배 정도 증가한 것으로 나타났다(Fig. 6). *ompR* 발현량을 *PompR-cat* fusion을 이용하여 측정해 본 결과도 이와 유사하게 나타났다(data not shown).

이러한 결과는 배지 삼투압과 *envZ*에 의한 OmpR인산화 정도가 *ompR* 유전자의 발현에 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 그러나, *envZ::Km* 균주에서도 배지삼투압의 효과가 나타나는 것으로 보아 삼투압에 의한 *ompR* 발현 조절은 EnvZ/OmpR 경로 외에 다른 경로를 통해서도 일어난다고 볼 수 있다.

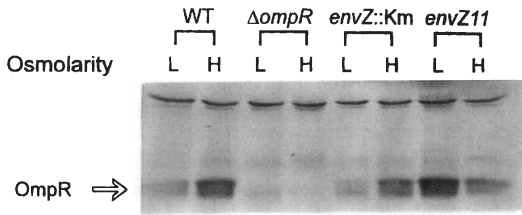


Fig. 6. OmpR expression is affected by the medium osmolarity and by EnvZ activity. Wild type (MC4100), $\Delta ompR$ (BS114), *envZ::Km* (MS3) and *envZ11* (MH1461) were grown in 1x H1 salt, 0.2% glucose, 0.01% thiamine to OD 0.3, and each culture incubated with 35 S-methionine in low osmolarity medium (no NaCl) or high osmolarity medium (0.3 M NaCl). The detail method is described in the 'Materials and Methods'. L, low osmolarity; H, high osmolarity. OmpR bands are indicated by arrow.

고찰

CheY와 OmpR C-terminal half로 이루어진 융합단백질 Chp은 OmpR과는 달리 *ompC* 발현을 증가시키는 효과는 보이지 않았고, EnvZ/OmpR과 같이 존재할 때 Chp은 *ompF* 발현을 증가시키고 *ompC* 발현은 감소시켰다.

Chp단백질의 *ompC*에 대한 전사 억제 효과는 이 융합단백질이 OmpR의 DNA-binding domain을 갖고 있지만 전사 활성화 기능은 없기 때문에 *ompC* promoter의 OmpR-binding site(OBS)(22)에 대해 OmpR과 경쟁하여 *ompC* 발현을 억제하기 때문으로 생각된다.

OmpR을 증가시키는 Chp의 효과는 *ompF*의 전사 수준(transcriptional level)과 번역 수준(translational level)에서 각각 설명될 수 있다. 즉, 배지의 삼투압이 높아지면 OmpR은 *ompF*의 전사 개시점으로부터 -384부터 -351 위치와 -56부터 -41 위치에 결합하고 이 두 위치에 결합한 OmpR들 사이의 상호작용에 의해 그 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다(20, 4). 따라서, Chp은 이 두 위치에 대해 OmpR과 경쟁적으로 binding하게 되어, OmpR 전사억제에 필요한 두 site간의 interaction을 방해하여 *ompF*의 전사를 증가시킬 수 있다. 그러나 Chp 발현양이 크게 증가한 경우(*lacI*^q가 없고 *chp* 유전자만을 갖는 plasmid인 pMS107로 형질 전환된 균주)에서는 *ompF*의 발현도 크게 감소하였다(6). 이는 Chp이 과량 발현되어 *ompF*의 OBS 중 전사 활성 부위에 대해서도 Chp이 결합하여 나타나는 현상으로 사료된다.

pMS110에서 발현된 Chp에 의한 *ompF*의 증가는 번역 수준에서도 설명되어질 수 있다. 즉, *ompC*의 upstream 쪽에서 반대 방향으로 *micF*가 발현되는데, 이 유전자는 *ompC*와 같은 경향으로 삼투압에 의해 조절된다. *micF*는 *ompF*의 transcript에 결합하는 anti-sense RNA를 만들어 *ompF*의 번역을 억제한다(12). 따라서 Chp에 의해 *ompC*와 같이 *micF*의 전사가 억제되어 *ompF* transcript의 번역이 증가할 수 있다. 그리고 Chp이 *ompR*의 발현을 오히려 증가시켰기 때문에 Chp의 *ompC/ompF*에 대한 효과가 *ompR* 발현 억제에 의한 것일 가능성은 배제되었다.

Chp이 전사 활성화 능력이 없는 이유는 OmpR의 C-ter-

minal half만으로는 RNA polymerase와의 결합이 안된다는 것을 의미한다. 실제로 Leslie A. Pratt 등이 전사 활성화 능력이 결합된 OmpR 돌연변이체를 얻어 분석해 본 결과 R 42, P179, E193, A196, E198 등의 위치에 변이가 나타났다(16). 융합 단백질 Chp은 OmpR의 L120부터 그 뒤쪽을 갖고 있다. 따라서 DNA-binding에는 C-domain만으로 충분하지만, RNA polymerase와의 결합에는 N-domain과 C-domain이 모두 필요하다고 할 수 있다.

Chp이 OmpR과는 달리 인산화에 의해 DNA-binding이 증가하지 않는 이유는 다음의 몇 가지 가능성들을 생각해 볼 수 있다. 하나는, 융합시의 구조적 문제 때문에 N-domain의 인산화 신호가 C-domain으로 전달되지 못했을 가능성이 있다. 둘째는, CheY와 OmpR의 인산화시에 형성되는 conformational change가 다르기 때문일 수 있고, 셋째는 인산기의 turn-over rate의 차이 때문일 수 있다. 보고된 바에 따르면, OmpR의 인산기는 수 시간의 life-span을 나타내는 반면에 CheY의 인산기는 몇 초의 life-span을 보인다(7). 이러한 차이 때문에 Chp에서 인산화에 의한 활성 변화가 보이지 않았을 가능성이 있다.

한편, Chp과 OmpR은 *ompR* 유전자의 발현양을 증가시키는 것으로 나타났으며, 그러한 조절은 전사 수준에서 일어나는 것으로 보인다. 그런데, 전사 활성화 능력이 없는 Chp에 의해서도 *ompR*의 전사량이 증가하는 것으로 보아서, Chp과 OmpR의 이러한 조절이 직접적인 것보다는 간접적인 기작으로 생각되어진다. 현재까지는 CRP(catabolite-gene regulatory protein)가 *ompR*의 전사를 조절하는 사실만이 알려져 있다(5).

또한 면역 침전실험에서 나타난 바와 같이 EnvZ가 없는 균주에서도 삼투압 증가에 따른 *ompR*의 발현 증가가 관찰되었다. 즉, EnvZ/OmpR과는 상관없이 삼투압에 의한 조절이 있다는 것을 보인다. 이러한 'EnvZ/OmpR independent osmoregulation' 현상은 *ompR* 외에도 *ompC*와 *ompF*에서도 보고된 바 있다. EnvZ/OmpR 외에 배지 삼투압을 인지하는 것으로는 BarA(14)가 알려져 있으며, 삼투압에 의한 DNA-structure의 변화(3)가 작용할 가능성이 있다.

배지 삼투압에 의한 *ompR* 발현 조절의 생리적 의미는 무엇일까? 이는 아마도 OmpR이 global regulator로써 역할하는데에 필요한 조절일 것으로 생각되어진다. 즉, 박테리아의 외부 삼투압이 크게 높아질 경우에 적응하기 위한 유전자 발현 변화에 OmpR의 충분한 작용을 위해 그 copy수를 증가시키는 것으로 추측되어진다.

감사의 말

본 연구는 교육부의 유전공학 학술 연구비의 보조에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

1. Bourret, R.B., K.A. Bordovich and M.I. Simon, 1991. Signal transduction pathways involving proteins phosphorylation in prokaryotes. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 401-441.

2. Hall, M.N. and T.J. Silhavy, 1981. The ompB locus and the regulation of the major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **146**, 23-43.
3. Higgins, C.F., C.J. Dorman, D.A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, E. Bremer, 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression on *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*. **52**, 569-584.
4. Huang, K., J.L. Schiebel and M.M. Igo, 1994. A distant upstream site involved in the negative regulation of the *Escherichia coli* ompF gene. *J. Bacteriol.* **176**, 1309-1315.
5. Huang, L., P. Tsui and M. Freundlich, 1992. Positive and negative control of ompB transcription on *Escherichia coli* by cyclic AMP and the cyclic AMP receptor protein. *J. Bacteriol.* **174**, 664-670.
6. Ko, M and C. Park, 1993. CheY-OmpR Chimeric Response Regulator. *Kor. J. Genetics* **15**(1), 39-46.
7. Kofoid, E.C. and J.S. Parkinson, 1988. Transmitter and receiver modules in bacterial signaling proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 4981-4985.
8. Komeda, Y, 1986. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **168**, 1315-1318.
9. Lukat, G.S., B.H. Lee, J.M. Mottonen, A.M. Stock and J.B. Stock, 1991. Roles of the highly conserved aspartate and lysine residues in the response regulator of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **266**, 8348-8354.
10. Lukat, G.S., W.R. McCleary, A.M. Stock and J.B. Stock, 1992. Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 718-722.
11. Miller, J.H., 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
12. Mizuno, T., M. Chou and M. Inouye, 1984. A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript(micRNA). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1966-1970.
13. Mizuno, T., M. Kato, Youl-Lae Jo and S. Mizushima, 1988. Interaction of OmpR, a positive regulator, with the osmoregulated ompC and ompF genes of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**(2), 1008-1020.
14. Nagasawa, S., S. Tokishita, H. Aiba and T. Mizuno, 1992. A novel sensor-regulator protein that belongs to the homologous family of signal-transduction proteins involved in adaptive responses in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 799-807.
15. Parkinson, J.S. and E.C. Kofoid, 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Ann. Rev. Genetics* **26**, 1-10.
16. Pratt, L.A. and T.J. Silhavy, 1994. OmpR mutants specifically defective for transcriptional activation. *J. Mol. Biol.* **243**, 579-594.
17. Ronson, C.W., B.T. Nixon and F. Ausubel, 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*. **49**, 579-581.
18. Russo, F.D. and T.J. Silhavy, 1991. EnvZ controls the concentration of phosphorylated OmpR to mediate osmoregulation of the porin genes. *J. Mol. Biol.* **222**, 567-580.
19. Sanders, D.A., B.L. Gillece-Castro, A.M. Stock, A.L. Burlingame, D.E. Koshland, Jr., 1989. Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator proteins, CheY. *J. Biol. Chem.* **264**, 21770-21778.
20. Slauch, J.M. and T.J. Silhavy, 1991. cis-Acting ompF Mutations that result in OmpR-dependent constitutive expression. *J. Bacteriol.* **173**, 4039-4048.
21. Stewart, R.C. and F.W. Dahlquist, 1987. Molecular components of bacterial chemotaxis. *Chem. Rev.* **87**, 997-1025.
22. Tsung, K., R.E. Brissette and M. Inouye, 1989. Identification of the DNA-binding domain of the OmpR protein required for transcriptional activation of the ompF and ompC genes of *Escherichia coli* by in vivo DNA footprinting. *J. Biol. Chem.* **264**, 10104-10109.
23. Utsumi, R., R.E. Brissette, A. Rampersaud, S.A. Forst, K. Ososawa and M. Inouye, 1989. Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science* **245**, 1246-1249.
24. Wurzel, E.T., M.Y. Chou and M. Inouye, 1982. Osmoregulation of the gene expression: I. DNA sequence of the ompR gene of the ompB operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *J. Biol. Chem.* **257**, 13685-13691.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: CheY-OmpR Hybrid Protein Acting on the Osmoregulatory System

Minsu Ko and Chankyu Park* (Department of Biological Sciences, KAIST, Taejeon 305-701)

In the previous study(6), we constructed the CheY-OmpR hybrid, Chp, which affects the expressions of ompF and ompC genes. Here we further characterize these effects and present the regulatory mechanism based on in vivo and in vitro data. Although Chp retained the sequence-specific DNA-binding ability, it was not possible to enhance transcriptional activity, suggesting that it may act as a competitive inhibitor to OmpR. The DNA-binding affinity of Chp was not modulated by phosphorylation of its CheY portion. Chp was able to increase ompR transcription. Furthermore, it was found that the wild-type OmpR also exerts the same effect, which is also controlled by changes in medium osmolarity and in EnvZ activity.