J. Fd Hyg. Safety 15(1), 51-54 (2000)

재조합 *E.coli*에서 고온성 *Bacillus* 균주의 과발현에 관한 연구

서화정 · 이인선†
계명대학교 식품가공학과

Overexpression of Termostable *Bacillus* sp. in Recombinant *E.coli*

Hwa-Jeong Seo and In-Seon Lee†
Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

ABSTRACTS – In the 5'-flanking region of the D-AAT, AspAT and AlaDH gene, I found three or two pairs of sequences(designated as P1, P2, P3) which show significant similarity to the *E.coli* consensus sequences of −35 and −10 for promoters. The spacing between −35 and −10 is 16 to 18bp in all the three putative promoters P1, P2 and P3 which is in good agreement with the preferred spacer length in *E.coli* and in *B.subtilis*. Therefore, the putative promoters may also function to increase the efficiency of transcriptional initiation. The most stable, double-helical "Shine-Dalgarno" pairing is formed with a free energy change(ΔG) of −13.0 kcal/mol, −9.6 kcal/mol, −15.8 kcal/mol.

Key words □ D-Amino acid aminotransferase(D-AAT), Aspartate aminotransferase(AspAT), Alanine dehydrogenase(AlaDH), promoters, Shine-Dalgarno sequence

최근에는 재조합 유전자 기술과 같은 생명 공학 기술이 현저하게 발달되어 생체내 극히 미량으로 존재하는 호르몬, 세포성장인자, 사이토카인 등과 같은 생리활성 단백질과 유용 효소등이 *E.coli*, *Bacillus*, 및 yeast 등을 이용하여 원하는 단백질 및 유용 효소를 용이하게 대량 생산하는 방법이 널리 사용되고 있다.[1] 이중에서도 *E.coli*를 사용하는 방법은 가장 널리 이용되는 방법으로, 특징으로는 재조합 균주인 *E.coli*가 다른 재조합 균주보다 유전자 조작이 비교적 간편하며, 고농도로 대량 배양이 가능하고, 유전자 발현에 대한 분자 생물학적 규명도 잘 연구되어 있다.

각종 유전자의 발현은 일차적으로 전사수준에 의해서 조절되며, 전사 과정은 genome 또는 염색체의 이중나선 DNA에 존재하는 유전자로 부터 messenger RNA (mRNA)가 합성되는 과정으로 RNA polymerase 가 유전자 첫 부위(promoter)를 찾는 단계로 개시된다. 이러한 프로모터는 RNA polymerase 가 유전자의 5'쪽 특정부위에 특이적으로 결합하는 부위로 이들 사이에는 공통적으로 두드러지게 나타나는 배열이 존재한다. 전사 개시 코돈 ATG의 (A위치를 0으로 하고 5'쪽으로는 (-)부호를 3'쪽으로는 (+)부호를 표시하였을 때) −10부위의 6염기쌍과 −35부위의 6염기쌍이며 이 부위가 매우 중요하며, 또한 이들 사이의 간격이 대체로 일정한 것으로 알려지고 있다.[5] 그리고 mRNA 합성연장이 완료되고, 전사된 mRNA와 RNA polymerase가 template DNA로 부터 분리되면 전사가 종결된다.[2-3]

그리고 전사단계를 거쳐 만들어진 mRNA를 주형으로 하여 ribosome상에서 단백질을 합성하는 번역과정이 수행되는데, 이 과정에서 가장 중요한 요인은 개시 코돈 ATG의 5'앞쪽에 약 10base 정도 위치에 존재하는 주로 purine 염기쌍으로 된 염기 배열이며, 이것을 Shine-Dalgarno(SD) sequence라고 한다.[4] SD sequence는 30S단위체의 16s rRNA와 염기 배열 이루어 개시 코돈의 인식에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. 이와 같이 *E.coli*의 경우에 있어서는 상세한 분자생물학적 연구가 다른 재조합 균주보다 비교적 많은 연구가 진행되어 있다

유용 효소의 유전자의 유전자 조작을 통하여 유용 효소를 대량 생산하여 산업적 적용을 목표로 고온성 *Bacillus* 균주 유래의 이들 공업적으로 안정한 내열성 효소 D-amino acid aminotransferase (*Bacillus* sp. YM-1)6), Aspartate aminotransferase (*Bacillus* sp. YM-2)7), Alanine dehydrogenase (*B. stearothermophilus*)[8]에 대하여 gene cloning을 수행하였다. 그 결과, 고온성 *Bacillus*유래의 이들 유용 효소들은 별도의 과발현 벡터를 사용하지 않고도 과발현됨을

†Author to whom correspondence should be addressed.

확인하였다. 이러한 유용 효소의 과발현은 고온성 *Bacillus* 균주가 가지고 있는 발현기구가 *E.coli*를 사용하였을 때도 잘 적용되고 있다는 것을 시사한다.

본 연구에서는 값비싼 Isopropyl β-thio galactoside (IPTG)와 같은 유도물질을 첨가하는 Induction system을 대체할 수 있는 constitutive expression vector의 개발의 첫 번째 단계로서 D-amino acid aminotransferase (*Bacillus* sp. YM-1),[6] Aspartate aminotransferase (*Bacillus* sp. YM-2),[7] Alanine dehydrogenase (*B. stearothermophilus*)[8] 와 같은 고온성 *Bacillus* 균주 유래의 유전자들이 *E.coli*에서 과발현되는 것에 대하여 조사하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용유전자

본 실험에 사용된 유전자는 각 효소 유전자가 이미 클로닝되어 있는 plasmid pICT113 (고온성 *Bacillus* sp. YM-1 ; D-Amino acid aminotransferase gene 포함), pICT212 (고온성 *Bacillus* sp, YM-2 ; Aspartate aminotransferase gene 포함)과 pICD3 (고온성 *Bacillus stearothermophilus* 유래 ; Alanine dehydrogenase gene 포함)를 Dr.Tanizawa (Osaka Univ., Japan), Dr. Kuroda (Kobe Univ., Japan) 및 성문희 박사(생명공학 연구소 미생물전환 연구 Unit)로부터 연구목적으로 제공받아 사용하였다. 실험에 사용된 제한 효소, ligase, Taq polymerase는 Boehringer Mannheim (GmbH Germany)에서 구입하여 사용하였으며, 그 밖의 시약은 Sigma Co.에서 구입하여 사용하였다.

E.coli 균주 배양

각 효소의 유전자를 함유하고 있는 *E.coli* 균주 배양은 ampicillin을 75 μg/ml 으로 첨가한 Luria-Bertani(LB)배지 (1% trypton 0.5% yeast extract, 1% Nacl) 100 ml에 1%로 접종하고, 37°C에서 200 rpm 교반 속도로 24시간 진탕 배양하였다.

E.coli 형질전환

형질전환 숙주로는 *E.coli* XL1-Blue[F'::*Tn 10 ProA*$^+$ *B*$^+$ *lacI*^{q} △(*lacZ*)*M15/rec endAl gyrA96*(*Nal*^{r}) *thi hsR17*($r_k m_k^-$) *supE44 relAl lac*]을 LB(Ampcilin 75 μg/ml)에 1% 접종한 후 대수기 중기까지 ($O.D_{600}$ 0.8) 37°C, 200 rpm에서 배양한 후 4000 xg에서 15분간 원심분리하여 모은 뒤, 10% glycerol로 3번 씻고, 다시 10% glycerol로 1–3x10^{10} cell/ml이 되도록 재현탁하여 competent cell로 사용하였다. Bio-Rad사의 *E.coli* Pulser를 사용하여 electrophoration 방법[11]으로 형질전환을 실시하였다. 대장균의 경우 competent cell 40 μl에 ligate DNA 50 ng을 혼탁하여 0.1 cm cuvette을 사용하여 1.8 kV/cm로 electorphoration을 수행하였다.

DNA조작 및 DNA sequencing

DNA조작은 Manaiatis 등[9]의 방법을 따랐으며, 사용된 유전자의 5'부분의 일부 염기 배열을 알아보기 위해 di-deoxy chain termination방법[10]에 따라 sequencing을 수행하였다.

DNA sequence computer 분석

Autoradiograph로 부터 읽은 유전자의 염기 배열로부터 ORF, 존재가능한 프로모터등의 염기 배열 분석을 위해서는 GENETYX-MAC 8.0 program (Software. Development co., Tokyo)를 이용하였다.

결과 및 고찰

유용 효소 유전자들의 프로모터 지역 분석

전사의 개시는 RNA 중합효소에 의해 시작되며 σ^{55}factor

Table 1. Poteintial promoters of D-AAT, AspAT, and AlaDH gene

Promoter		-35 region							-10 region						
D-AAT	P1	-667	T	T	c	A	C	t	----17bp----	T	A	T	A	A	T	-639
	P2	-414	T	T	G	A	t	t	----16bp----	T	A	T	A	c	T	-387
	P3	-81	T	T	G	A	C	A	----16bp----	T	g	c	A	A	t	-54
AspAT	P1	-488	T	a	a	A	C	A	----17bp----	T	A	g	g	c	T	-459
	P2	-424	T	g	G	A	a	A	----17bp----	a	A	a	A	A	T	-396
	P3	-161	T	T	G	g	a	t	----18bp----	T	A	T	g	t	T	-33
AlaDH	P1	-137	T	T	c	A	C	t	-----16p-----	T	t	T	c	g	T	-109
	P2	-92	T	T	G	A	t	t	-----17bp----	T	c	a	t	t	T	-65
E.coli consensus		-35	T	T	G	A	C	A	----16-17bp--	T	A	T	A	A	T	-10

Numbered sequences are taken from reference 9, 10, 11. The distances between -35 and -10 region are indicated in the center of the dashed lines. Nucleotides homologous to the *E. coli* consensus sequence are shown in boldface.

Table 2. Putative ribosome binding sites and complementarity with 3'end of *E.coli* 16S rRNA

Source	Sequence													Free energy
E.coli Consensus 16S rRNA 3' end	3' A	U	U	C	C	U	C	C	A	C	U	5'		
D-AAT(Bacillus sp. YM-1)	g	A	A	G	G	A	u	G	U	G	g	gaaa	AUG	-13.0 Kcal/mol
Aspartate aminotransferase (*Bacillus* sp. YM-2)	a	G	G	G	G	A	G	a	a	G	A	uuacaaa	AUG	- 9.6 Kcal/mol
Alanine dehydrogenase (*B.stearothermophilus*)	a	A	A	G	G	A	G	G	a	a	A	ugua	AUG	-15.8 Kcal/mol

Boldface nucleotides are complementary to the 3'end of 16S rRNA. The initiation codons are boxed. Free energies(ΔG) of formation of the most stable double helical Shine-Dalgarno pairing were calculated by the rules of Tinoco *et al*[12].

를 가지는 RNA polymerase 중합효소의 작용은 σ단위체가 −35부위에 붙는 것과, 중합효소의 적절한 부분이 −10 부위에 접하게 되면서 시작한다.[15-16] 따라서 전사 단계에 중요한 역할을 하는 프로모터의 −35부위와 −10부위를 검색하였다. 각각 Bacilli 프로모터 −35 부위와 −10부위의 consensus sequence는 TTGACA와 TATAAT이었다.[5,18] D-AAT, AspAT의 5'-부위에서는 *E.coli* consensus sequence와 매우 상동성을 가지고 있어 프로모터로 예측되는 배열을 P1, P2, P3라 명명하였고, AlaDH에서는 프로모터 P1, P2와 같은 2개의 프로모터 부위가 예측되었다 (Table 1). Ruiqiong. YE,[17] Kobayashi M.[19] 의 보고와 일치하게 고온성 *Bacillus*균주의 유용 효소의 5'-up stream에 존재하는 프로모터들이 연속적으로 존재한다는 사실을 찾을 수 있었다.

이와 같이 프로모터가 연속적으로 존재하는 것이 유용 효소의 유전자의 과발현에 기여하는지는 유추된 각각 프로모터의 세기를 좀 더 자세히 비교 검토하여야 할 것으로 판단되나, 이와같이 프로모터가 연속적으로 존재하는 것은 유용 유전자의 과발현에 기여하는 하나의 요인으로 추측된다.

유용 효소 유전자들의 translation 관련 5'-flanking 부위의 분석 및 해석

리보솜의 16s rRNA의 3 말단 근처의 염기와 상보적인 염기쌍을 형성하여 리보솜의 부착자리 역할을 한다고 알려진 Shine-Dalgarno sequence의 검색과 SD sequence와 pairing을 하여 형성되는 자유에너지 변화를 조사하였다. D-AAT 유전자는 ATG 개시 코돈으로 부터 −6에 위치한 9개 염기 배열을 (AAGGAtGTG, −14~6), AspAT 유전자는 −8에 위치한 10개의 염기 배열을 (GGGGAGaaGA, −17~8) 그리고 AlaDH 유전자는 −5 bp에 위치한 10개의 염기 배열을 (AAGGAGGaaA, −14~5) 찾을 수 있었다. *B. subtilis*와 *E.coli*의 consensus Ribosome Binding Site (RBS ; U or A UUUCCUCCACUA)[4]와 비교하여 본 결과 매우 상보적임을 알 수 있었으며(Table 2), 이러한 사실은 안정한 mRNA-rRNA hybridization 형성을 의미한다.[20]

그리고, Ticono방법[12]으로 SD염기 배열과 pairing을 하여 형성되는 자유에너지 변화(ΔG)를 조사한 결과, D-AAT, AspAT, AlaDH 유전자에서 각각 −13.0 Kcal/mol, −9.5 Kcal/mol, −15.8 Kcal/mol로 그람 양성 박테리아의 경우 전사단계에서의 평균적인 자유에너지 변화가 −17 Kcal/mol, 그람 음성 박테리아의 경우 −11.6 Kcal/mol[13-14]과 비교하여 볼때 비교적 높게 나타났고, 특히 AlaDH 유전자에서 자유에너지 변화가 가장 높음을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

국문요약

1. *E.coli*에서 별도의 expression vector를 사용하지 않고도 *Bacillus* 균주 유래의 유용효소(D-Amino acid aminotransferase;D-AAT, Aspartate aminotransferase;AspAT, Alanine dehydrogenase;AlaDH 등)의 유전자의 5'-up stream 부위의 발현 기구를 검토한 결과 각 유용 효소의 유전자들의 5'-upstream 부위에 존재하는 프로모터 들이 연속적으로 존재한다는 사실이 유추되었고, *E.coli*의 SD sequence와 매우 상동성이 높은 서열 또한 존재함을 확인하였다. 2. 유용 효소 유전자의 번역과 관련된 5'-upstream 부위의 분석을 통하여 유용 효소의 유전자들은 *E.coli*의 ribosomal RNA와 매우 안정한 SD pairing을 형성(D-AAT의 경우; −13.0kcal/mol, AspAT의 경우; −9.5kcal/mol, AlaDH의 경우 −15.8 kcal/mol)할 수 있음을 확인하여, 이러한 높은 자유에너지 변화는 *E.coli* 내에서 유용 효소의 번

역에 기여함을 예상할 수 있다.

참고 문헌

1. 이정은, 황재성, 안태인: Amoeba proteus 공생세균의 groEx를 응용한 온도 감응 발현벡터의 개발. *Kor. Jour. Microbiol.*, **326**, 501-509 (1994).
2. Platt, T.: Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 339-372 (1986).
3. Das, A.: Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 893-930 (1993)
4. Shine, J., and L. Dalgarno.: The 3'-terminal sequence of E.coli 16s ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplet and ribosome binding stes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1342-1346 (1974)
5. Gold L, Pribnow D, Schneider T, Shinedling S, Singer BS, Stormo G.: Translational initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **5**, 365-403 (1981).
6. Tanizawa K, Asano S, Masu Y, Kuramitsu S, Kagamiyama H, Tanaka H, Soda K.: The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic Bacillus species and its correlation with L-amino acid aminotransferases. *J.Biol. Chem.*, **264**, 2450-2456 (1989).
7. Moon-Hee, S., K. Tanizawa, H. Tanaka, S. Kuramitsu, H. Kagamiyama, K.Hirotsu, A. Okamoto, T. Higuchi and K. Soda.: Thermostable Aspartate Aminotransferase from a Thermophilic Bacillus Species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2567-2572 (1991).
8. Kuroda, S., K. Tanizawa, Y. Sakamoto, H. Tanaka and K. Soda.: Alanine dehydrogenases from Two Bacillus Species with Distinct Thermostabilites: Molecular Cloning, DNA and Protein Sequence Determination and Structural Comparison with Other $NADP^+$-Dependent Dehydrogeanse. *Biochemistry*, **29**, 1009-1015 (1990).
9. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory New York, (1989)
10. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson: DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**, 5463-5467 (1977.)
11. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W Ragsdale.: High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145 (1988).
12. Ticono, I., N.B. Philp, B. Dengler, D.L. Mark, C.U. Olke, M. C. Donald: Improved estimation of secondary structure in Ribonucleic acids. *Nature*, **246**, 40-41 (1973).
13. McLaughlin, J.R., C.L. Murray, and J.C. Rabinowitz: Plasmid-directed expression of staphylococcus aureus β -Lactamase by Bacillus subtilis in vitro. *Jounal of Biological Chemistry*, **256**, 11273-11282 (1981).
14. McLaughlin, J.R., C.L. Murray, and J.C. Rabinowitz: Unique Features in ribosome binding site sequence of gram postive staphylococcus aureus β-Lactamase gene *J. Biol. Chem.*, **256**, 11283-11291 (1981).
15. Losick R, Pero J: Cascades of Sigma factors. *cell.* **25**, 582-584 (1981).
16. Pei-Zhi, W., and H.D. Roy.: Pverlapping promoters transcribed by Bacillus subtilis σ55 and σ37 RNA polymerase holoenzymes during growth and stationary phase. *J. Biol. Chem. U.S.A.* **259**, 8619-8625 (1984).
17. Ruiqiong, Y.E. and Sul-Lam, Wong.: Transcriptional Regulation of the Bacillus subtilis Glucitol Dehydrogenase Gene. *Jounal of Bateriology*, **17611**, 3314-4420 (1994).
18. Ayers, D. G., Auble, D. T. and deHaseth, P.L.: Promoter recognition by E.coli RNA polymerase. Role of the spacer DNA in functional complex formation. *J. Mol. Biol.* **207**, 749-756 (1989).
19. Kobayashi M., Nagata K., and Ishihama A.: Promoter selectivity of Escherichia coli RNA polymerase: effect of base substitutions in the promoter -35 region on promoter strength. *Nucleic Acid Research*, **1824**, 7367-7372 (1990).
20. Tamar Schurr, Eyal Nadir and Hanah Margalit.: Identification and characterization of Escherichia coli ribosomal binding sites by free energy computation. *Nucleic Aicds Research*, **21**, 4019-4023 (1993).