

대장균 내에서의 Bdi I Methylase 유전자의 클로닝과 발현

전희숙 · 김용석 · 최경래 · 노현모

서울대학교 자연과학대학 동물학과

Cloning and Expression of the Bdi I Methylase Gene in *E. coli*

Jun, H.S., Y.S.Kim, K.R.Choi and H.M.Rho

Department of Zoology, Seoul National University Seoul 151, Korea

ABSTRACT: The gene for the Bdi I modification enzyme, which is one of Bdi I restriction-modification system, from *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948 was cloned and expressed in *E. coli*. For cloning of the Bdi I methylase gene, we have initially used three cloning site(EcoRI, BamHI and Sal I) of plasmid vector pBR 322 and adopted the retransformation method after Bdi I restriction endonuclease cleavage. Selection of transformants carrying the gene was based on the resistance of the modified plasmid encoding the enzyme to cleavage by Bdi I restriction enzyme, and the recombinant plasmid pBDIM 116 containing 5.6 kb EcoRI insert was proved to carry the gene. Crude cell extracts prepared from strains carrying the plasmid pBDIM 116 contained an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase activity specific for the Bdi I recognition site, ATCGAT. The restriction map was constructed with 11 restriction enzyme, and the Bdi I restriction-modification system was also discussed.

KEY WORDS □ Bdi I methylase, Cloning, Plasmid.

거의 모든 미생물은 특정 DNA 염기서열을 인지하여 잘라내는 제한효소(restriction endonuclease)와 그 제한효소가 인지하는 염기서열내의 특정염기를 methylation 시켜 그 제한효소로부터 방호받게하는 methylase 로 구성되는, restriction-modification(R/M) 체계를 가진다(Roberts, 1985). 이 R/M 체계의 유전자는 숙주 DNA 상에 존재하는 것(Hha II, Mann *et al.*, 1978; Pst I, Walder *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1982; DdeI, Howard *et al.*, 1986)과 플라스미드 상에 있는 경우(EcoRI, Newmann *et al.*, 1981; Pae R7, Gingeras and Brooks, 1983; Pvu II, Blumenthal *et al.*, 1985)도 있으며 후자의 경우 쉽게 클로닝되어 유전자구조가 잘 밝혀지고 있다. 보통의 경우 이 R/M 체계의 두 유전

자가 아주 가까이 인접하고 있으나(Bsu RI, Kiss *et al.*, 1985; EcoRI, Pst I 등) 멀리 떨어져있는 경우도 있어(Bsp RI, Szomolanyi *et al.*, 1980; Msp I, Walder *et al.*, 1983) 완전한 R/M 체계의 유전자 클로닝이 어려운 경우도 있다.

이 R/M 체계의 두 효소는 시험관내에서의 유전자조작에 필수적인 소재일 뿐만 아니라 똑같은 DNA 염기서열을 인지하여 하나는 자르고 또 하나는 methylation 시키는 서로 다른 작용을 하므로 DNA-단백질의 상호작용을 연구하는데 좋은 모델이 될 수 있어(Green *et al.*, 1981; Walder *et al.*, 1984) 이 R/M 체계의 유전자클로닝은 여러면에서 유용하다. 또한 이 R/M 체계는 외부로부터 들어오는 DNA 를 인지하여 잘라버리므로 특정 숙주세포내에서 유전공학적인 방법으로 유전자조

작을 하려면 그 숙주세포의 R/M 체계를 잘 연구하는 것이 중요하다. 본 연구실에서는 산업적으로 유용한 미생물인 *Brevibacteria* 와 *Corynebacteria* 내에서의 유전자조작을 위한 숙주-유전자운반체 연구를 해오고 있는데 이를 위하여 이미 *Brevibacterium divaricatum* 균주로부터 Bdi I 제한효소를 분리하여 그 인지부위(5' ATCGAT 3')를 동정한 바 있다(Kim and Rho, 1986).

본 실험에서는 위 연구의 일환으로 우리가 분리한 Bdi I 제한효소를 이용하여 R/M 체계의 다른 하나인 Bdi I methylase 유전자를 대장균내에 클로닝하였고 Bdi I methylase 유전자에 대한 제한효소지도(restriction map)를 작성하였다. 재조합한 pBDIM 116은 5.6 kb의 insert DNA를 가지며 *E. coli* 내에서도 Bdi I methylase 유전자가 발현됨을 볼 수 있었고 insert DNA내에 Hind III, BamHI, Hinc II, EcoRI 부위가 각각 하나씩 있었으며 Pst I, Taq I 부위는 두 군데, Sal I, Bgl II, Xho I, Sph I 등은 인지부위가 없는 것으로 나타났다.

재료 및 방법

시약

S-adenosyl-L-(methyl-³H) methionine(³H-SAM; 15 Ci/mmol)은 New England Nuclear에서 구입했고 DE-81 필터는 Whatman에서 구입하였다. 배지에 필요한 시약은 Difco에서, agarose를 비롯한 일반시약은 주로 Sigma 제품을 사용했다.

균주 및 배지

Bdi I 제한효소와 Bdi I methylase 유전자 분리를 위한 *Brevibacterium divaricatum* FERM 5948 균주는 고영희박사(과학기술원)로부터 분양받았고 BY 배지(bactotryptone 10g, beef extract 5g, NaCl 5g, per liter)로 30°C에서 진탕배양한 뒤 수확하여 사용하였다. 형질전환용으로는 *E. coli* HB101(F⁻, r⁻, m⁻, recA13)을 LB배지에 키워 사용했다.

DNA와 효소

B. divaricatum 숙주세포 DNA는 Gros

-Bellard 등의(1973) 방법을 조금 수정하여 분리하였다. 벡터용 pBR 322는 알칼리법으로 추출한 뒤 초원심분리법으로 분리했고 재조합플라스미드들은 mini-prep.으로 λ DNA는 표준 방법으로 분리하여 사용하였다(Maniatis *et al.*, 1982). Bdi I 제한효소는(Kim and Rho, 1986) 직접 분리하여 사용했고 Cla I을 비롯한 다른 제한효소 및 T4 DNA ligase는 New England Biolab에서 구입하여 사용하였으며 Pst I methylase는 본 실험실에서 분리해 놓았던 것을(Kim and Rho, 1984) 사용하였다.

Bdi I methylase의 활성측정

Bdi I methylase의 활성은 이전에 출판된 방법(Kim and Rho, 1984)을 조금 수정하여 ³H-methyl기가 DNA에 이동되는 정도로써 측정하였다. 측정도자 하는 각 균주들을 100 ml씩 배양하여 수확한 뒤 초음파로 파쇄하고 20,000×g로 원심분리하여 상층액을 얻고(crude extract) 이상층액(5 μl)을 50 μl의 반응용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 50 μg/ml bovine serum albumin, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.5 μM ³H-SAM)에 넣고 원하는 기질 DNA 1 μg을 넣은 뒤 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 반응용액 40 μl를 DE-81 필터에 흡착시키고 방사능을 측정하였다.

Bdi I methylase 유전자의 클로닝

벡터로 pBR 322(1 μg)을 5 unit의 EcoRI, BamHI 그리고 Sal I으로 각각 자르고 *B. divaricatum* 숙주 DNA(5 μg)도 동일 제한효소로 각각 자른 뒤 cohesive end가 같은 것끼리 서로 섞고 12시간 정도 12°C에서 ligation(T4 ligase 2 units)시켜 CaCl₂/RbCl 방법으로 *E. coli* HB 101에 형질전환시켰다. 이때 일부는 ampicillin이 들어있는 agar 배지에 뿌려 cloning efficiency를 조사하고 나머지는 액체배지에서 하룻밤 키운 뒤 여기에서 플라스미드를 추출하여(5 μg) Bdi I 제한효소(50 units)로 충분히 잘라주었다. 이것의 일부를 이번에는 ligation시키지 않고 직접 *E. coli* HB 101에 다시 형질전환시켰다. Bdi I methylase 유전자의 클로닝은 2차 형질전환시켜 나온 콜로니에서 플라스미드를 뽑아 Bdi I으로 잘라보아 방호되는 것을 일차선별하였

다. 클로닝과정에 필요한 방법이나 완충용액은 Maniatis 등의 (1982) 방법을 따랐다.

제한효소 지도작성

제한효소 지도작성을 위한 반응은 common digestion buffer (33 mM Tris-HCl, pH 7.0, 66 mM potassium acetate, 10 mM magnesium acetate, 0.5 mM dithiothreitol)를 이용하였고 pBDIM 116을 여러 제한효소로 단독 또는 두효소로 동시에 잘라 agarose gel 전기영동으로 측정하였다. 또한 subcloning 으로 얻은 플라스미드도 제한효소로 잘라 비교 확인 작성하였다.

결과 및 고찰

Bdi I methylase 유전자의 클로닝

Bdi I R/M 체계에 관해서는 Bdi I 제한효소가 Cla I 제한효소와 같은 5'ATCGAT3'을 인지하여 자른다는 것을 알고 있으므로(Kim and Rho, 1986) Bdi I 부위가 하나있는 pBR 322를 벡터로 이용하였다. Bdi I R/M 체계의 클로닝을 위하여 일차적으로 3 개의 클로닝 site(EcoRI, BamHI, SalI)에 각각 자른 숙주 DNA를 무작위로 ligation 시킨 뒤 이것을 *E. coli* HB 101에 형질 전환시켰다. 1 차 형질전환된 콜로니들을 cracking으로 분석해 본 결과 70% 이상이 insert DNA가 있는 것이 확인되었으므로(data not shown) 재료 및 방법에 나와있는 대로 액체배지에서 하룻밤 키운뒤 플라스미드를 뽑아 Bdi I으로 잘랐다. 이때 Bdi I methylase 유전자가 클로닝되어 발현된 경우에는 Bdi I 제한효소에 대해 방호될 것이고 그렇지 않은 경우에는 잘려져버려 2 차 형질전환시 형질전환력이 감소되어 screening이 좀더 용이해질 것이다. 2 차 형질전환 후 나온 콜로니에서 재조합된 플라스미드를 뽑아 Bdi I으로 잘라 방호되는 것을 1 차 선별하였고(data not shown) 그중에서 Bdi I에 확실하게 잘라지지않는 76번 플라스미드를 pBDIM 116이라 명명하였다. Fig.1에서 보듯이 재조합된 pBDIM 116은 Bdi I에 의해서 잘라지지않음을 볼 수 있고(lane a) 또한 Bdi I의 isoschizomer인 Cla I에도 마찬가지로 방호되었음을 알 수 있다(lane b). 클로닝 site가 3 군데중 하나이므로 그것을 알아보기위해

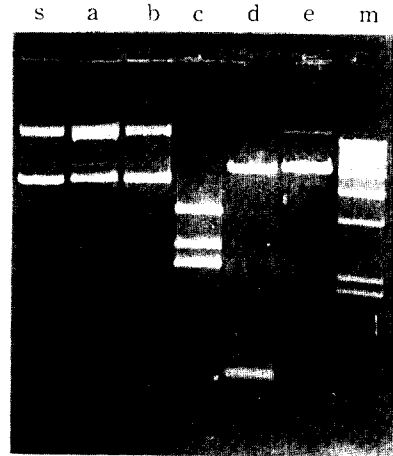


Fig.1. Modification of plasmid DNA encoding Bdi I methylase.

The Bdi I recognition site within the cloning vector pBR 322 is protected from digestion in the recombinant plasmid pBDIM 116. Lane s, pBDIM 116 STD; a, pBDIM 116 + Bdi I; b, pBDIM 116 + Cla I; c, pBDIM 116 + EcoRI; d, pBDIM 116 + BamHI; e, pBDIM 116 + Sal I; m, λ DNA + Hind III.

EcoRI, BamHI 그리고 Sal I으로 각각 잘라보면 EcoRI으로 잘랐을 때만 4.4 kb의 벡터와 3.0 kb와 2.6 kb의 insert DNA가 나타나는 것으로 보아(lane c-e) EcoRI 위치에 클로닝되었음을 알 수 있다. 이 pBDIM 116 DNA를 좀더 오랜시간 Bdi I과 Cla I으로 잘라보아도 open-circular 형태의 DNA band만 더 생기고 여전히 방호되었고, 다른 플라스미드를 섞어주고 또는 다른 제한효소와 동시에 잘라보아도 pBDIM 116의 Bdi I 부위는 거의 방호됨을 볼 수 있었다(data not shown). pBDIM 116에는 EcoRI으로 잘랐을 때 3.0 kb와 2.6 kb의 두 DNA 조각이 나오는데 이것이 원래부터 숙주 DNA 상에 바로 연결되어 있는 것인지 아니면 ligation 시 서로 붙어들어간 것인지를 알아보기 위하여 pBDIM 116을 EcoRI으로 자른뒤 self-ligation 시켜 형질전환시킨뒤 나온 콜로니를 분석하였다(Fig.2). Fig.2에서 보듯이 각각의 작은 조각이 들어갔을 경우에는 Bdi I에 잘려짐을 확인할 수 있었다. 이 사실은 pBDIM 116에 Bdi I site가 정확하게 존재한다는 것을 의미하며 pBDIM 116 DNA가 Bdi I이나 Cla I에 잘려



Fig.2. Screening of subcloned plasmid.

pBDIM 116 was digested, self-ligated and transformed into *E. coli* HB 101, and subcloned recombinants were digested with Bdi I and EcoRI respectively. The left lane of each sample(a through e) shows the plasmid; the middle lane shows the plasmid digested with Bdi I; the right lane shows the plasmid digested with EcoRI. Lane m shows λ -Hind III size marker, and arrows indicate insert DNA fragments.

지지 않는 것은 methylation에 의해 방호되었음을 짐작하게 한다. 또한 두 EcoRI DNA 조각은 원래부터 숙주 DNA 상에 연결되어 있었던 상태임을 시사한다. 그러므로 재조합된 pBDIM 116은 적어도 Bdi I methylase 유전자가 클로닝 되어있다고 생각할 수 있다. Bdi I methylase의 대장균 내에서의 발현정도를 살펴보면(Table I) pBDIM 116을 가지는 균주에서 추출한 세포내용물로 활성을 조사했을때 인지부위가 있는 기질 DNA(pBR 322 플라스미드)의 경우에 높은 활성을 보이다가 인지부위가 제거된 DNA를 기질로 사용하면

Table 1. Expression of Bdi I methylase gene in *E. coli*.

Substrate DNA	CPM incorporated			
	HB 101	HB101+ pBDIM 116* ¹⁾	<i>B. di- varicatum</i>	M. Pst I* ²⁾
pBR322	1.1×10 ³	4.5×10 ³	1.9×10 ³	6.8×10 ³
pBR 322-Bdi I* ³⁾	0.9×10 ³	1.0×10 ³	0.3×10 ³	5.5×10 ³
pBDIM 116	1.4×10 ³	1.2×10 ³	0.4×10 ³	9.2×10 ³

Methylase activities were assayed with cell extract prepared from bacterial strains, and incorporated radioactivities were determined as described in 'Materials and Methods'

- 1). *E. coli* HB 101 containing pBDIM 116 plasmid
- 2). Purified Pst I methylase(5 units)
- 3). pBR 322 DNA digested with Bdi I restriction endonuclease

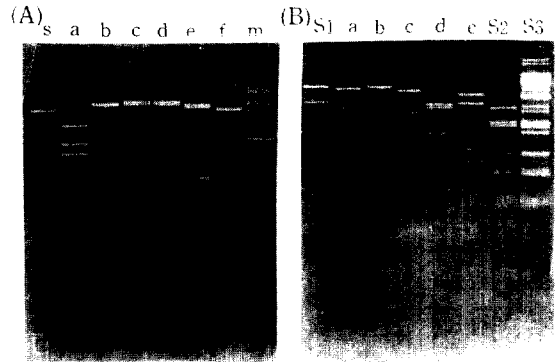


Fig.3. Digestion pattern of pBDIM 116 and pBDIE 26 plasmid.

A) pBDIM 116 was digested with various restriction endonucleases and analyzed by agarose gel(1.0%) electrophoresis. Lane s, pBDIM 116 plasmid; a, pBDIM 116 + EcoRI; b, pBDIM 116 + BamHI; c, pBDIM 116 + Sal I; d, pBDIM 116 + Sph I; e, pBDIM 116 + Hind III; f, pBDIM 116 + Bgl II; m, λ -Hind III + pBR 322-Hinc II size marker. B) pBDIE 26 was codigested with EcoRI and various restriction endonucleases and analyzed agarose gel(1.4%) electrophoresis. Lane S1, pBDIE 26 plasmid; a, pBDIE 26 + EcoRI + BamHI; b, pBDIE 26 + EcoRI + Hind III; c, pBDIE 26 + EcoRI + Pst I; d, pBDIE 26 + EcoRI + Pvu II; e, pBDIE 26 + EcoRI + Hinc II; S2, pBDIE 26 + EcoRI + Taq I; S3, λ -Hind III + pBR 322-Hinc II + pBR 322-Taq I size marker.

control 수준으로 활성이 떨어지는 것으로 보아 Bdi I site에 specific한 methylase가 생산됨을 알 수 있다. 원균주인 *B. divaricatum*과 비교해 보면 2 배정도 생산되는 것처럼 보인다. 그러나 이것은 Bdi I methylase 유전자가 플라스미드 상에 위치한 상태이므로 gene dosage effect를 고려하면 대장균내에서의 발현정도가 오히려 낮은 것으로 판명된다. 아마도 Bdi I methylase 유전자의 발현이 자체 promoter에 의해 작동된다고 생각한다면 gram-negative인 대장균내에서는 전사 효율이 낮기때문인 것으로 추측된다.

Bdi I methylase 유전자의 제한효소지도

재조합된 pBDIM 116 플라스미드를 11개의 제한효소(BamHI, BglII, EcoRI, Hinc II, PstI, Pvu II, Sal I, Sph I, Taq I, Xho I)로 분석하였고 또한 subcloning으로 얻은 pBDIE 26(Fig.3)과 pBDIE 30(data not shown)을 이용하여 codiges-

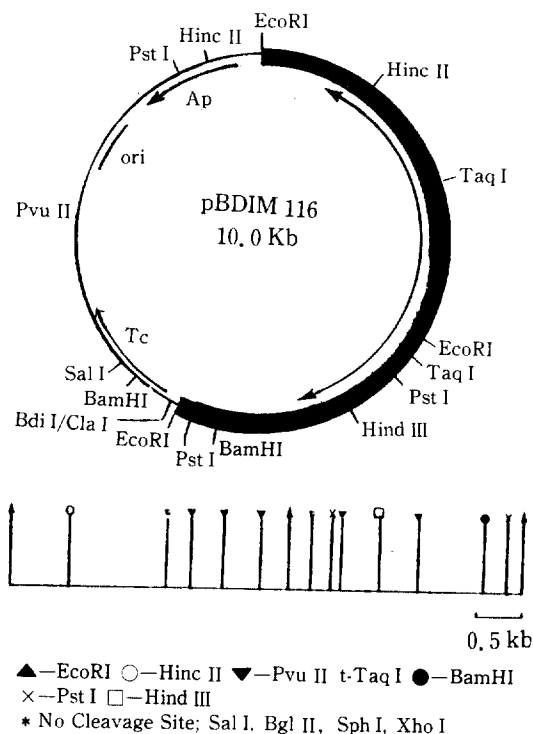


Fig. 4. Restriction map of pBDIM 116 plasmid encoding Bdi I methylase

tion 등으로 확인하여 최종적으로 제한효소지도를 완성하였다(Fig. 4). 그림에서 보듯이 5.6 kb의 insert DNA 내에는 EcoRI, BamHI, Hind III, Hinc II가 각각 하나씩 있고 Pst I, TaqI 부위가 두 군데 있으며 Sal I, Bgl II, Sph I, Xho I 등은 작용부위가 없음이 확인되었다. 이렇게 작성된 제한효소지도를 이용하여 subcloning 등으로 부분적으로 결실시킨 재조합 플라스미드를 만들어 methylase assay를 해 본 결과(data not shown) Fig. 4의 화살표 부위내에 Bdi I methylase 유전자

가 위치하는 것으로 생각되었으며 자세한 유전자 지도작성과 Bdi I methylase의 순수분리는 진행 중에 있다.

Brevibacterium divaricatum FERM 5948의 restriction-modification system

*B. divaricatum*의 R/M 체계중 Bdi I 제한효소는 Cla I과 동일한 염기배열인 5'ATCGAT3'를 인지하여 T와 C 사이를 자른다는 것이 밝혀진 바 있다(Kim and Rho, 1986). 다른 하나인 Bdi I methylase도, 앞에서 pBDIM 116 플라스미드가 Cla I 제한효소에 방호되는 것으로 보아(Fig. 1, lane b), Cla I methylase와 마찬가지로 G와 T 사이의 A 위치에 methylation 시키는 것으로 추측된다(Roberts, 1985). *B. divaricatum* FERM 5948 균주에는 플라스미드가 없는 것으로 밝혀져 있는데(unpublished result) Bdi I R/M 체계의 유전자는 *Hha* II(Mann *et al.*, 1978) 체계처럼 숙주 DNA 상에 존재하는 것으로 사료된다. 또한 Bdi I methylase 유전자를 가지는 pBDIM 116은 insert DNA의 size가 크므로 Bdi I 제한효소에 대한 활성을 측정해 보았으나 활성이 나타나지 않는 것으로 보아 *Msp* I(Walder *et al.*, 1983) R/M 체계처럼 두 유전자가 멀리 떨어져 있을 가능성도 있다. 그러나 이에 대해서는 정확한 유전자 지도가 밝혀지고 또 인접부위의 DNA가 클로닝되어야 자세히 밝혀지리라 생각된다.

사 사

본 연구는 과학재단 연구비 지원으로 수행된 것임.

적 요

Brevibacterium divaricatum FERM 5948 균주로부터 Bdi I R/M 체계에 속하는 Bdi I methylase 유전자를 클로닝하여 발현을 조사하였다. Bdi I methylase 유전자의 클로닝을 위해 pBR322의 EcoRI, BamHI, Sal I 3 군데의 클로닝 site를 이용했고 1차 형질전환후 나온 플라스미드를 Bdi I으로 자른 뒤 ligation 시키지 않고 형질전환시키는 방법을 이용하였다. 유전자를 가지는 형질전환체의 선별은 Bdi I methylase에 의해 수정된 재조합 플라스미드는 Bdi I 제한효소에 방호된다는 것에 기초하여 선별하였는데 5.6 kb의 EcoRI insert DNA를 가지는 pBDIM 116이 Bdi I methylase 유전자를 가지는 것으로 판명되었다. pBDIM 116을 가지는 숙주세포에서 추출한 추출용액에는 S-adenosylmethionine이 있으면 Bdi I의 인지부위인 ATCGAT에만 특정한 methylase 활성이 측정되었다. 11개의 제한효소를 이용하여 제한효소지도를 작성하였고, Bdi I restriction-modification 체계에 관해서도 논의하였다.

REFERENCES

1. Blumenthal, R.M., S.A. Gregory and J.S. Cooperider, 1985. Cloning of a restriction-modification system from *Proteus vulgaris* and its use in analyzing a methylase-sensitive phenotype in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **164**, 501-509.
2. Gingeras, T.R. and J.E. Brooks, 1983. Cloned restriction/modification system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 402-406.
3. Green, P.J., M. Gupta, H.W. Boyer, W.E. Brown and J.M. Rosenberg, 1981. Sequence analysis of the DNA encoding the EcoRI endonuclease and methylase. *J. Biol. Chem.* **256**, 2143-2153.
4. Gros-Bellard, M., P. Oudet and P. Chambon, 1973. Isolation of high molecular DNA from mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* **36**, 32-38.
5. Howard, K.A., C. Card, J.S. Benner, H. L. Callahan, R. Maunus, K. Silber, G. Wilson and J.E. Brooks, 1986. Cloning the DdeI restriction-modification system using a two-step method. *Nucleic Acids Res.* **14**, 7939-7951.
6. Kim, Y.S. and H.M. Rho, 1984. Purification and characterization of Pst I methylase from *Providencia stuartii* 164. *Kor. Biochem. J.* **17**, 107-119.
7. Kim, Y.S. and H.M. Rho, 1986. Characterization of the restriction endonuclease Bdi I from *Brevibacterium divaricatum* Kor. *J. Microbiol.* **24**, 18-23.
8. Kiss, A., G. Posfai, C.C. Keller, P. Venetianer, and R.J. Roberts, 1985. Nucleotide sequence of the Bsu RI restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6403-6421.
9. Lee, K.S., S.Y. Seo, S.W. Lee and H.M. Rho, 1982. Cloning and expression of Pst I endonuclease gene. *Kor. Biochem. J.* **15**, 323-333.
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. *Molecular cloning*. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
11. Mann, M.B., R.N. Rao and H.O. Smith, Cloning of restriction and modification genes in *E. coli*; the Hha II system from *Haemophilus haemolyticus*. *Gene* **3**, 97-112.
12. Newmann, A.K., R.A. Rubin, S.H. Kim and P. Modrich, 1981. DNA sequences of structural genes for EcoRI DNA restriction and modification enzymes. *J. Biol. Chem.* **256**, 2131-2137.
13. Roberts, R.J. 1985. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **13**: suppl. 165-200.
14. Szomolanyi, E., A. Kiss and P. Venetianer, 1980. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *E. coli*. *Gene* **10**, 219-225.
15. Walder, R.Y., J.L. Hartly, J.E. Donelson and J.A. Walder, 1981. Cloning and expression of Pst I restriction modification system in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 1503-1507.
16. Walder, R.Y., C.J. Langtimm, R. Chatterjee and J.A. Walder, 1983. Cloning of the Msp I modification enzyme. *J. Biol. Chem.* **258** 1235-1241.
17. Walder, R.Y., J.A. Walder and J.E. Donelson, 1984. The organization and complete nucleotide sequence of the Pst I restriction-modification system. *J. Biol. Chem.* **259**, 8015-8026.

(Received Feb. 4, 1987)