

알카리 내성 *Bacillus* 속 Promoter의 Cloning

유주현*·구본탁·공인수·정용준·박영서

연세대학교 공과대학 식품공학과

Cloning of Promoters from Alkali-tolerant *Bacillus* sp.

Yu, Ju-Hyun*, Bon-Tag Koo, In-Soo Kong, Yong-Joon Chung, and Young-Seo Park

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Promoters of an alkali-tolerant *Bacillus* sp. isolated from soil have been cloned in *Bacillus subtilis* using promoter probe vector pPL703. The CAT specific activity of a clone harboring the strongest promoter activity among these transformants was 8.07. This activity was 2.5 times higher than that of *Bacillus subtilis* harboring expression vector pPL708 and was increased after the end of the logarithmic growth phase. In the 2.8kb of inserted DNA fragment, *Bam*HI and *Sal*I recognition sites were located.

Bacillus subtilis 는 여러 종류의 sigma-like subunit를 가진 RNA polymerase를 지니고 있으며 이들은 서로 다른 promoter 특이성을 나타내는 것으로 알려져 있다(1, 2). 또한 *B. subtilis*의 RNA polymerase는 *Escherichia coli*의 RNA polymerase와 비교하여 promoter에 대한 특이성이 높기 때문에 대부분의 *B. subtilis* 유전자가 *E. coli* 내에서는 잘 발현되는 반면 *B. subtilis* 내에서는 *E. coli*의 유전자 등 외래 유전자가 발현되기 어렵다고 알려져 있다(3). Moran 등(2)에 의하면 *B. subtilis*의 RNA polymerase는 -35와 -10의 promoter hexanucleotides에 고도의 정확성을 요구하고 기타 다른 염기배열, 예를 들면 -35 위쪽의 AT-rich 부위와 -18~-14 위치의 PuTPuTG 염기배열 등에도 이러한 정확성을 요구하는 것으로 밝혀졌다.

Bacillus promoter에 대한 연구는 외래 유전자를 *Bacillus*에서 발현시키기 위한 목적 뿐만 아니라 포자 형성에 이르는 일련의 복잡한 분화과정을 규명하기 위해서도 중요하나 아직 미비한 실정이다. *Bacillus*의 promoter를 cloning하기 위한 promoter probe vector로는 자체의 promoter를 결손시킨 *B. pumilus* 유래의 *cat*-86(chloramphenicol acetyltransferase의 subunit에 대한 유전자)을 이용

하는 pPL 703 plasmid vector가 현재까지 가장 많이 이용되고 있다(4).

본 연구에서는 토양에서 분리한 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14(5)의 chromosomal DNA로부터 pPL 703을 이용하여 promoter들을 cloning하고 상대적으로 활성이 가장 높은 promoter를 검색하여 그 유전 생화학적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주

Promoter 공여균주로는 토양에서 분리한 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14(5), 숙주균주로는 *B. subtilis* 207-25(6)를 사용하였으며 promoter probe vector는 pPL 703(4), expression vector로는 pPL 708(4)을 사용하였다.

배 지

*B. subtilis*의 원형질체 형질전환을 위한 액체배지는 PAB(Penassay broth, Difco)를 사용하였고 재생 배지로는 DM-3 배지(7)를 사용하였다. *Bacillus* sp. YA-14의 competent cell을 이용한 형질전환에는 액체배지로 MSPI(modified SPI) 배지(5)를 사용하였

Key words: Promoter, cloning, alkali-tolerant *Bacillus* sp.

* Corresponding author

고 그 조성은 배지 1L 당 2g(NH₄)₂SO₄, 14g K₂HPO₄, 6g KH₂PO₄, 1g C₆H₆Na₂O₃, 4g MgSO₄·7H₂O, 5g glucose, 1g yeast extract, 0.2% casamino acid(pH8.0)으로 하였다. 형질전환체의 선별에는 각 항생물질을 첨가한 TBAB(Tryptose blood agarbase, Scott) 평판배지를 사용하였으며 CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 비활성을 측정할 때에는 PAB를 사용하였다. 항생물질은 배지에 첨가할 경우 kanamycin은 5 µg/ml, chloramphenicol은 10 µg/ml로 가했으며 단 DM-3 배지의 경우에는 kanamycin을 1mg/ml의 농도로 첨가하였다.

Plasmid DNA와 chromosomal DNA의 분리 및 재조합 plasmid DNA의 제조

*B. subtilis*로부터 plasmid의 대량분리는 Geurry 등의 방법(9)을 변형하여 사용하였고 plasmid의 신속분리는 Doi 등의 방법(10)을 이용하였다. 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14로부터 chromosomal DNA 추출은 spool method(11)로 행하였다. *Bacillus* sp. YA-14의 promoter들을 cloning하기 위해 *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA를 제한효소 *Pst* I으로 절단한 후 동일한 제한효소로 처리한 pPL 703과 ligation시켰다. Cloning 과정은 Maniatis 등의 방법(12)에 따라 행하였다.

*B. subtilis*의 원형질체 형질전환 및 *Bacillus* sp. YA-14의 competent cell 형질전환

*B. subtilis*의 원형질체 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법(7)에 따라 행하였으며 kanamycin이 1mg/ml 첨가된 DM-3 재생배지에 도말한 후 이를 배양시켜 생성된 colony들을 형질전환체로 하였다. *Bacillus* sp. YA-14의 competent cell 형질전환은 Anagnostopoulos 등의 방법(13)을 변형하여 사용하였으며 kanamycin이 5 µg/ml 첨가된 TBAB 선택 배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양시켜 나온 colony들을 형질전환체로 하였다.

CAT 활성 측정

Promoter의 활성 정도를 비교하기 위한 CAT 활성 측정은 Hitachi model 200-20 spectrophotometer를 이용하여 Shaw의 방법(14)에 따라 행하였다. CAT의 1 unit는 37°C에서 분당 acetylation되는 chloramphenicol의 micromole 수로 나타내었다. 단

백질 정량은 Lowry 등의 방법(15)에 따라 행하였으며 CAT unit를 단백질 양으로 나뉜 값을 CAT 비활성으로 하였다.

결 과

Bacillus sp. YA-14 promoter들의 cloning

알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14로부터 chromosomal DNA를 분리하여 *Pst* I으로 절단한 후 동일한 제한효소로 절단한 pPL 703과 ligation시킨 후 *B. subtilis* 207-25에 형질전환시켰다. 이로부터 얻어진 3,600여 주의 형질전환체들을 200 µg/ml의 chloramphenicol이 첨가된 TBAB 평판배지에 replica하여 내성을 갖는 형질전환체 28주를 선별하였다. 각 재조합 plasmid DNA와 pPL 703 및 pPL 708을 함유한 *B. subtilis* 207-25의 CAT 비활성을 측정한 결과는 Table 1과 같았다. pPL 703을 함유한 *B. subtilis* 207-25는 CAT 비활성이 전혀 나타나지 않았다. pPL 708은 *Bacillus* phage SPO 2 DNA로부터 유래된 0.3 kb의 *EcoR* I promoter 단편을 pPL 703에 삽입시킨 expression vector이고 그 promoter는 *Bacillus*에서 이용될 수 있는 가장 강력한 promoter 중의 하나로 알려져 있는데(4) pPL 708을 함유한 *B. subtilis* 207-25의 CAT 비활성은 3.07로 나타났다. pPL 708의 CAT 비활성과 비교해 볼 때 p-4, p-9, p-12, p-16 등이 나타내는 CAT 비활성은 더 높은 것으로 나타났고 이들 중 특히 p-12의 CAT 비활성은 8.07로 pPL 708에 비해 약 2.5배 이상의 높은 비활성을 나타내었다.

*B. subtilis*의 생육시기에 따른 p-12의 CAT 비활성

알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA에서 유래된 promoter중 *B. subtilis* 207-25에서 CAT 비활성이 가장 높은 p-12 plasmid를 선정하여 생육시기에 따른 CAT 비활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 p-12의 CAT 비활성은 *B. subtilis*에서 대수 증식기가 끝난 이후에 급격하게 증가함으로써 p-12 plasmid가 함유한 promoter는 대수 증식기 이후에 발현이 촉진되는 것으로 생각되었다.

Mongkolsuk 등(16)은 pPL 703을 이용하여 대수 증식기 이후에 발현이 촉진되는 두 종류의 promoter를 cloning하였고 Horikoshi 등(17)은 호 알카리성 *Bacillus* sp. DNA로부터 역시 대수 증식기 이후 발

Table 1. CAT specific activities of *B. subtilis* 207-25 harboring plasmids with various promoter-containing fragment.

Plasmid	Source of promoter	CAT specific activity (U/mg of protein)
pPL703	none	undetectable
pPL708	SPO2 <i>EcoRI</i> fragment	3.07
p-1	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	3.01
p-2	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.52
p-3	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.22
p-4	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	5.45
p-5	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	2.49
p-6	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.30
p-7	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.53
p-8	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.43
p-9	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	3.31
p-10	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	2.39
p-11	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.53
p-12	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	8.07
p-13	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	2.29
p-14	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.58
p-15	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.45
p-16	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	5.81
p-17	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.46
p-18	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.53
p-19	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.34
p-20	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.24
p-21	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.61
p-22	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.33
p-23	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	2.27
p-24	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.83
p-25	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	1.45
p-26	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.81
p-27	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.96
p-28	<i>Bacillus</i> sp. YA-14 DNA	0.97

현이 촉진되는 promoter를 cloning하였다. *Bacillus*는 생육시기에 따라 RNA polymerase의 특이성이 변하거나 modification되어 세포의 분비효소들의 합성이 전사단계에서 조절된다는 가설이 제시되어 있다(18). 실제로 *B. subtilis* 내에서 공통적인 core enzyme를 가지면서 서로 다른 몇가지 종류의 sigma-like-subunit를 갖는 RNA polymerase들이 발견되고 있다(19). 이러한 sigma-like-subunit들은 promoter 선택과 직접 관련되어 있고 각 sigma-lik-

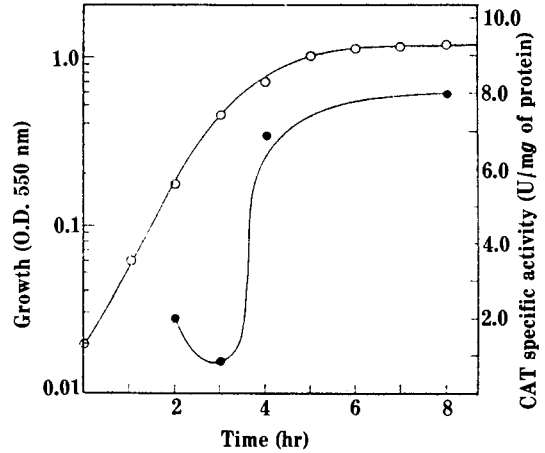


Fig. 1. CAT specific activity as a function of growth in *B. subtilis* 207-25 harboring p-12

○ - ○ : cell growth, ● - ● : CAT specific activity

e-subunit에 의해 인식되어지는 promoter의 염기배열은 서로 다른 것으로 알려져 있다(20~22). 한편 대수 증식기 이후에 발현이 촉진되는 promoter는 주로 세포의 분비효소와 포자 형성에 관련되어 있는 것으로 알려져 있다(18).

재조합 plasmid p-12의 유전적 분석

재조합 plasmid p-12가 함유한 promoter내의 제한효소 인식부위를 알기 위하여 pPL 703과 p-12 plasmid를 제한효소 *Pst* I으로 각각 절단하여 전기영동을 하는 한편 제한효소 *Bam* HI, *Sal* I으로 p-12를 절단하여 전기영동을 하였다(Fig. 2). p-12를 cloning에 사용된 제한효소인 *Pst* I으로 절단한 결과 Fig. 2의 lane D와 같이 4.9 kb의 pPL 703 linear 형태외에 약 2.8 kb의 분자량을 갖는 삽입 DNA 단편을 확인할 수 있었다. 한편 lane F에서와 같이 *Bam* HI으로 절단한 p-12 plasmid는 6.4 kb와 1.3 kb의 분자량을 가지는 두 가지의 linear 형태를 나타내었는데 이로부터 pPL 703 내에 한군데 존재하는 *Bam* HI 인식부위 외에 또 다른 *Bam* HI 인식부위가 삽입 DNA 단편 내에 존재한다는 것을 알 수 있었다. pPL 703 내에 그 인식부위가 한군데 존재하는 또 다른 제한효소인 *Sal* I으로 p-12를 절단한 결과도 lane G와 같이 두 가지의 linear 형태로 나타나 삽입 DNA 단편 내에 *Sal* I 인식부위도 존재한다는 것을 알 수 있었고 그 분자량들은 각각 5.6 kb와 2.1 kb로 나타났다.

이상의 agarose gel 전기영동의 결과로부터 약 7.

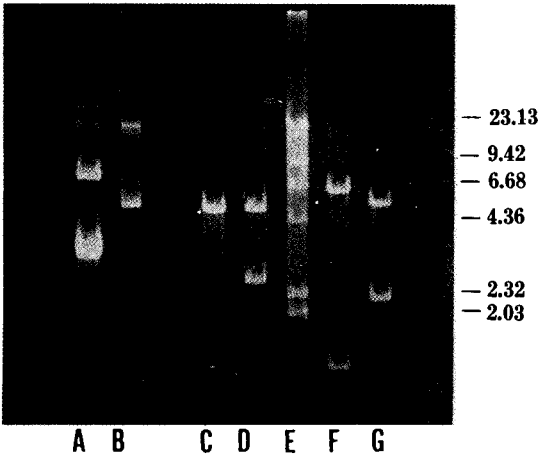


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of p-12

- A: pPL703
- B: p-12
- C: linearized pPL703 with *Pst*I
- D: fragmented p-12 with *Pst*I
- E: λ -DNA fragmented with *Hind*III as a molecular weight marker (kb)
- F: fragmented p-12 with *Bam*HI
- G: fragmented p-12 with *Sal*I

7 kb의 분자량을 갖는 p-12 plasmid의 제한효소 지도를 Fig. 3과 같이 작성할 수 있었다.

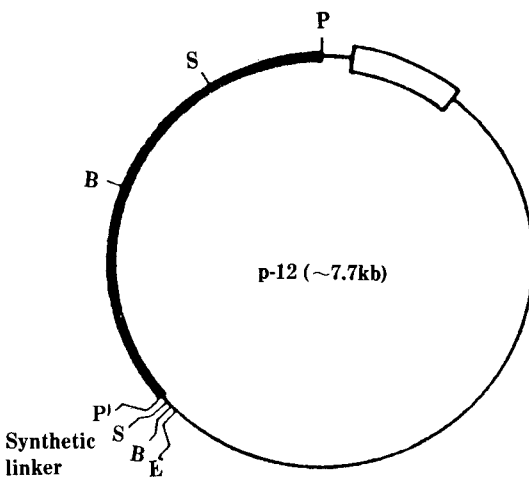


Fig. 3. Restriction map of p-12.
 P: *Pst*I, S: *Sal*I, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI
 □: *cat*-86 coding sequence
 ■: *Bacillus* sp. YA-14 DNA fragment

Table 2. CAT specific activities of *B. subtilis* 207-25, *B. subtilis* 207-21 and *Bacillus* sp. YA-14 harboring plasmids with promoter-containing fragments.

Strain	Plasmid	CAT specific activity (U/mg of protein)
<i>B. subtilis</i> 207-25	pPL708	3.07
<i>B. subtilis</i> 207-25	p-12	8.07
<i>B. subtilis</i> 207-21	pPL708	3.69
<i>B. subtilis</i> 207-21	p-12	8.14
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	pPL708	1.27
<i>Bacillus</i> sp. YA-14	p-12	9.53

재조합 plasmid p-12를 함유한 *B. subtilis* 및 *Bacillus* sp. YA-14의 CAT 비활성

재조합 plasmid p-12와 pPL 703 및 pPL 708을 *rec*⁺ 균주인 *B. subtilis* 207-21과 promoter의 공여 균주인 *Bacillus* sp. YA-14에 형질전환시켜 얻은 형질전환체에 대한 CAT 비활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같았다. pPL 708은 *B. subtilis* 207-21에서는 *B. subtilis* 207-25에서와 유사한 CAT 비활성을 나타내었으나 *Bacillus* sp. YA-14에서는 상당히 낮은 CAT 비활성을 나타내었다. 이와 같이 동일 promoter에 대한 효율에 있어서 두 *Bacillus* sp.에서 종간의 차이를 나타내는 것은 최근 Okada 등 (23)이 *B. stearothermophilus*의 β -galactosidase promoter가 *B. subtilis*에서 더 효율적이라는 사실과 일치한다. 한편 p-12는 *B. subtilis* 207-21과 *Bacillus* sp. YA-14에서의 CAT 비활성이 *B. subtilis* 207-25에서의 CAT 비활성과 유사하게 나타났다.

사 사

이 연구를 위하여 목적기초 연구비를 지원하여 주신 한국과학재단에게 감사드립니다.

요 약

토양에서 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 promoter를 *Bacillus* promoter probe vector인 pPL 703을 이용하여 *Bacillus subtilis*내에 cloning 하였다. 얻어진 형질전환체 중 promoter 활성이 가장 높은 균주의 CAT 비활성은 8.07로 expression

vector인 pPL 708의 CAT 비활성보다 2.5배 이상 높았으며 대수 증식기가 끝난 이후에 그 활성이 급격하게 증가하였다. 재조합 plasmid내의 삽입 DNA 단편은 그 크기가 2.8 kb이고 제한효소 Bam HI, Sal I 인식부위가 각각 한군데 존재하였다.

참고문헌

1. Doi, R.H. and L. Wang: *Microbiol. Rev.*, **50**, 227 (1986).
2. Moran, C.P., N. Lang, S.F.J. Le Grice, G. Lee, M. Stephens, A.L. Son enshein and R. Losick: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 339 (1982).
3. Shorenstein, R.G. and R. Losick: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6170 (1973).
4. Williams, D.M., E.J. Duvall and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **146**, 1162 (1981).
5. Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung, and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986).
6. Oozai, K. and K. Yamane: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 351 (1985).
7. Chang, S. and S.N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111 (1978).
8. Goldfarb, D.S., S.L. Wang, T. Kudo, R.H. Doi: *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 319 (1973).
9. Guerry, P., D.J. LeBlanc and S. Falkow: *J. Bacteriol.*, **116**, 1064 (1973).
10. Goldfarb, D.S., R.L. Rodriguez and R.H. Doi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 5886 (1982).
11. Dubnau, D. and R.D. Abelson: *J. Mol. Biol.*, **56**, 209 (1971).
12. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: "*Molecular cloning, A laboratory manual*", Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
13. Anagnostopoulos, C. and F.G. Priest: *J. Bacteriol.*, **81**, 741 (1961).
14. Shaw, W.V.: *Methods Enzymol.*, **43**, 737 (1975).
15. Lowry, O.E., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
16. Mongkolsuk, S., Y. Chiang, R.B. Reynolds and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **155**, 1399 (1983).
17. Kuto, T., J. Yoshitake, C. Kato, R. Usami and K. Horikoshi: *J. Bacteriol.*, **161**, 158 (1985).
18. Priest, F.G.: *Bacteriol. Rev.*, **41**, 711 (1977).
19. Wiggs, J.L., M.Z. Gilman and M.J. Chamberlin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 2762 (1981).
20. Moran, C.P., Jr., N. Lang and R. Losick: "*Molecular Cloning and Gene Regulation in Bacilli*", Academic Press, Inc., New York (1982).
21. Doi, R.H.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 772 (1982).
22. Jonson, W.C., C.P. Moran, Jr. and R. Losick: *Nature (London)*, **302**, 800 (1983).
23. Hirata, H., T. Fukazawa, E. Negoro and H. Okada: *J. Bacteriol.*, **166**, 722 (1986).

(Received February 26, 1988)