

알카리 내성 *Bacillus*속 Promoter의 특성

유주현^{1*}·구본탁¹·박영서¹·정용준¹·배동훈²·오두환¹

¹연세대학교 공과대학 식품공학과 ²퍼듀대학교 생화학과

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

Yu, Ju-Hyun^{1*}, Bon-Tag Koo¹, Young-Seo Park¹, Yong-Joon Chung¹, Dong-Hoon Bai²
and Doo-Hwan Oh¹

¹Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Department of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette, In 47907 U.S.A.

The promoters of alkali-tolerant *Bacillus* sp. had been cloned in the promoter probe vector pPL703 and recombinant plasmid p-12 had been constructed. As a result of subcloning, two different promoters were found to exist in the cloned 2.9 kb promoter fragment and two recombinant plasmids p-12B1 and p-12B2, each harboring different promoter, were constructed. The promoter activity, which was expressed in the CAT specific activity, of p-12B1 was 7 times higher than that of p-12B2. The promoter activity as a function of growth revealed that both promoters of p-12B1 and p-12B2 were expressed after the late logarithmic growth phase and repressed in the presence of 1.0% (w/v) glucose.

*Bacillus*속 미생물은 특정 환경하에서 복잡한 형태학적, 생화학적 변화를 일으켜 내세포자를 형성하는 대표적인 포자형성 세균으로서 그 유전자 발현이 다양하기 때문에 원핵세포에 있어서 분화과정의 연구에 많이 이용되고 있다(1, 2, 3). *Bacillus*에서 유전자 발현의 첫단계인 전사과정에 관여하는 RNA polymerase는 core enzyme 이외에 적어도 5가지 종류의 sigma subunit를 지니고 있는 것으로 알려져 있고 이들 각각이 인식하는 promoter의 염기배열은 서로 다르고 이 염기배열에 고도의 정확성을 요구하는 것으로 알려져 있다(4, 5). 또한 *Bacillus*의 RNA polymerase는 *Escherichia coli*의 RNA polymerase와 비교하여 promoter에 대한 특이성이 높기 때문에 외래유전자가 *B. subtilis* 내에서 효율적으로 발현되기 위해서는 *B. subtilis*의 RNA polymerase가 인식할 수 있는 적합한 promoter가 요구된다. 따라서 *Bacillus*의 promoter는 포자형성 등 원핵세포의 분화과정을 연구하는 중요한 소재로 이용될 뿐만 아니라 산업적 유용 단백질의 대량생산을 위한 expression vector의 제조 목적으로 연구되

고 있다. Yu 등(6)은 *Bacillus* promoter probe vector인 pPL 703(7)을 이용하여 토양에서 분리한 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14(8)의 chromosomal DNA로부터 활성이 높은 promoter를 cloning 하였는데 삽입된 DNA 단편은 그 크기가 2.9 kb이고 내부에 제한효소 *Bam*HI과 *Sal*I 인식부위가 각각 한군데 존재하였다. 본 연구에서는 promoter가 cloning된 재조합 plasmid를 subcloning 하여 *B. subtilis*에서의 유전적 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

숙주균주로는 *B. subtilis* 207-25(9)를 사용하였고 plasmid는 promoter probe vector인 pPL 703과 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA로부터 분리한 2.9 kb의 promoter 단편이 삽입되어 있는 p-12(6)를 사용하였다.

배 지

Key words: Promoter, subcloning, catabolite repression

*Corresponding author

*B. subtilis*의 원형질체 형질전환을 위한 액체배지는 PAB(Penassay broth, Difco)를 사용하였고 재배배지로는 DM-3 배지(9)를 사용하였다. 형질전환체의 선별에는 각 항생물질을 첨가한 TBAB(Tryptose blood agar base, Scott) 평판배지를 사용하였으며 CAT(Chloramphenicol acetyltransferase) 비활성을 측정할 때에는 2xSSG(modified Schaeffer medium) 배지(10)를 사용하였다.

재조합 plasmid의 제조 및 Agarose gel로부터 DNA 회수

*B. subtilis*로부터 plasmid의 신속분리는 Doi 등의 방법(11)을 이용하였고 subcloning을 위한 제한효소 처리와 ligation은 Maniatis 등의 방법(12)에 따라 행하였다. Agarose gel로부터 DNA의 회수에는 IBI(International Biotechnologies, Inc.)사 제품의 Unidirectional electroeluter(model UEA)를 사용하였다.

***B. subtilis*의 원형질체 형질전환과 Promoter의 활성측정**

*B. subtilis*의 원형질체 형질전환은 Chang과 Cohen의 방법(9)에 따라 행하였으며 Promoter의 활성은 Shaw 등의 방법(13)에 따라 CAT 비활성을 측정하여 나타내었다. CAT의 1 unit는 37°C에서 분당 acetylation되는 chloramphenicol의 μmol 수로 나타내었다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법(14)에

따라 행하였으며 CAT unit를 단백질 양으로 나눠준 값을 CAT 비활성으로 하였다.

실험결과 및 고찰

p-12 promoter 유전자의 subcloning

p-12에 삽입된 *Bacillus* sp. YA-14의 2.9 kb promoter 단편 내에는 제한효소 *Bam*HI과 *Sal*I 인식부위가 각각 하나씩 존재하였다(6)(Fig.1). p-12에 삽입된 DNA 단편내에 존재하는 *Sal*I 인식부위와 pPL 703 내에 존재하는 21-base pair synthetic linker에 위치한 *Sal*I 인식부위를 이용하여 p-12의 *Sal*I-*Sal*I 단편이 제거된 재조합 DNA를 제조하기 위하여 1 μg 의 p-12 DNA를 *Sal*I으로 절단한 후 1 U의 T 4-DNA ligase를 사용하여 ligation 시켰다. 원형질체 형질전환 방법에 의해 *B. subtilis* 207-25에 형질전환시키고 kanamycin이 함유된 DM-3 재배 배지에 도말하여 48시간 배양시켜 형질전환체를 얻었다. 이들로부터 plasmid DNA를 신속분리하여 agarose gel 전기영동을 행한 결과 Fig.2의 lane B와 같이 새로운 재조합체를 찾을 수 있었고 이를 p-12S로 명명하였다. *Sal*I으로 절단하여 전기영동 분석한 결과(Fig. 2, lane E, F, G) p-12는 p-12의

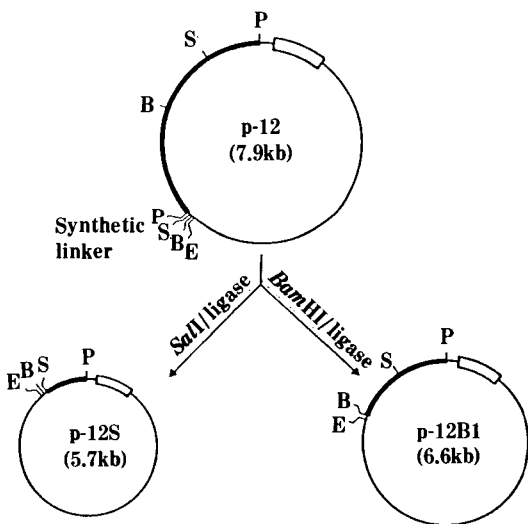


Fig. 1. Construction of p-12S and p-12B1 from p-12.
 P: *Pst*I, S: *Sal*I, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI
 ◯: *cat*-86 coding sequence
 ◻: *Bacillus* sp. YA-14 DNA fragment

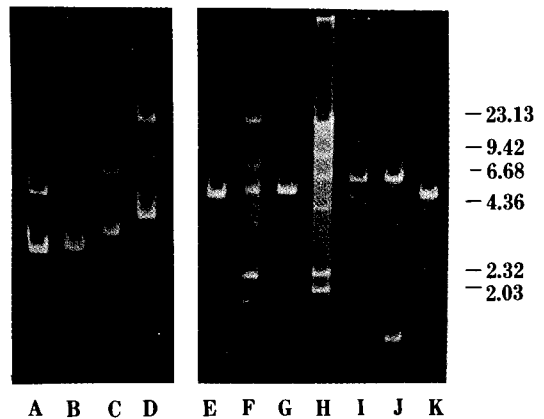


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of p-12S and p-12B1.
 A : pPL703
 B : P-12S
 C : p-12B1
 D : p-12
 E : linearized pPL703 with *Sal*I
 F : fragmented p-12 with *Sal*I
 G : linearized p-12S with *Sal*I
 H : DNA fragmented with *Hind*III as a molecular weight marker(kb)
 I : linearized p-12B1 with *Bam*HI
 J : fragmented p-12 with *Bam*HI
 K : linearized pPL703 with *Bam*HI

2.2kb *Sall-Sall* 단편이 결손된 상태로 다시 ligation된 재조합체임을 알 수 있었으며 그 제한효소 지도는 Fig.1과 같았다. p-12S를 함유하는 *B. subtilis* 207-25는 10 µg/ml 농도의 chloramphenicol에 대해 감수성을 나타냈다. 앞에서와 같은 방법으로 *Bam*HI으로 절단한 p-12 DNA를 ligation시켜 *B. subtilis*에 형질전환시킨 결과 또다른 새로운 재조합체를 선별할 수 있었고(Fig.2, lane C)이 재조합 plasmid는 p-12B1으로 명명하였다. *Bam*HI으로 절단하여 전기영동 분석한 결과(Fig.2, lane I) p-12B1은 p-12의 1.3kb *Bam*HI-*Bam*HI 단편이 결손된 새로운 재조합 plasmid임을 알 수 있었다. p-12B1을 함유한 *B. subtilis* 207-25는 10 µg/ml의 chloramphenicol에 대해 내성을 나타내었다. 이상의 결과들로부터 pPL 703의 *cat-86* 유전자를 발현시킬 수 있는 p-12내의 promoter는 삽입 DNA 단편내의 *Bam*HI 인식부위와 *Sall* 인식부위 사이에 걸쳐있는 0.9 kb DNA 단편내에 위치하는 것으로 예상할 수 있었다. 한편 p-12B1의 제조과정에서 결손된 1.3kb *Bam*HI-*Bam*HI 단편내에 또 다른 promoter가 존재하는지 알아보기 위해 *Bam*HI으로 절단된 p-12 DNA 1 µg과 역시 *Bam*HI으로 절단하고 BAP

(Bacterial alkaline phosphatase)처리한 pPL 703 DNA 1 µg을 ligation한 후 *B. subtilis*에 형질전환시켰다. 형질전환체로부터 plasmid DNA를 신속분리, 전기영동한 결과 Fig.3의 lane B와 같은 새로운 재조합체를 확인할 수 있었고 이를 p-12B2로 명명하였다. Fig.3의 lane D, E, F에서와 같이 p-12B2는 pPL 703의 *Bam*HI 인식부위에 p-12의 1.3kb *Bam*HI-*Bam*HI 단편이 삽입된 새로운 재조합 plasmid임을 알 수 있었다. 한편 p-12B2를 *Pst*I으로 절단한 전기영동 형태는 Fig.3의 lane G와 같았으며 이에 따라 p-12B2 내에 삽입된 DNA의 방향을 결정하고 Fig.4와 같은 제한효소 지도를 작성할 수 있었

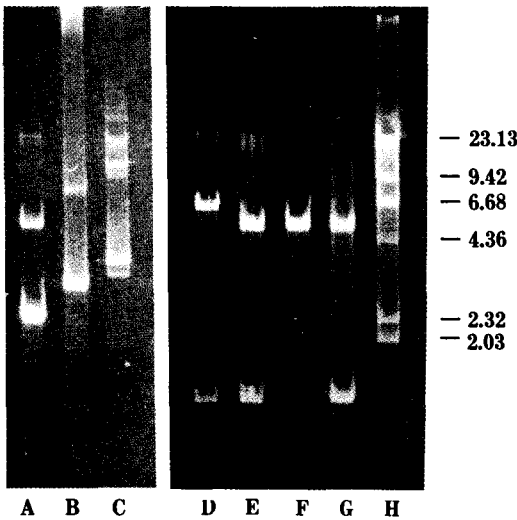


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of p-12B2.

A : pPL703
 B : p-12B2
 C : p-12
 D : fragmented p-12 with *Bam*HI
 E : fragmented p-12B2 with *Bam*HI
 F : linearized pPL703 with *Bam*HI
 G : fragmented p-12B2 with *Pst*I
 H : λ-DNA fragmented with *Hind*III as a molecular weight marker(kb)

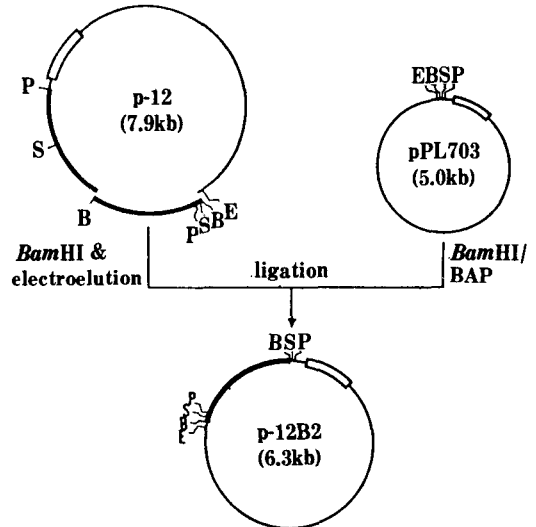


Fig. 4. Construction of p-12B2 from p-12 *Bam*HI fragment and pPL703.

P: *Pst*I, S: *Sall*, B: *Bam*HI E: *Eco*RI
 ◯: *cat-86* coding sequence
 ◼: *Bacillus* sp. YA-14 DNA fragment

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

Plasmid	Source of promoter	CAT specific activity (U/mg of protein)
pPL703	none	undetectable
p-12	<i>Pst</i> I- <i>Pst</i> I fragment of p-12	8.01
p-12S	none	undetectable
p-12B1	<i>Bam</i> HI- <i>Pst</i> I large fragment of p-12	7.42
p-12B2	<i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI fragment of p-12	1.01

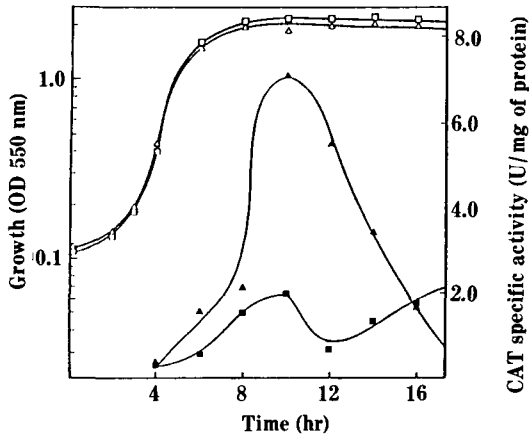


Fig. 5. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *B. subtilis* 207-25 harboring p-12B1.

△-△: cell growth in 2xSSG containing 0.1% glucose
 □-□: cell growth in 2xSSG containing 1.0% glucose
 ▲-▲: CAT specific activity in 2xSSG (0.1% glucose)
 ■-■: CAT specific activity in 2xSSG (1.0% glucose)

다. p-12B2를 함유한 *B. subtilis* 207-25는 10 μg/ml 농도의 chloramphenicol에 대해 내성을 나타내었으므로 p-12B1내의 promoter외에 또 다른 promoter가 p-12B2에도 존재함을 알 수 있었다.

재조합 plasmid DNA들을 함유한 B. subtilis의 CAT 비활성

위와 같은 방법으로 제조된 재조합 plasmid p-12S, p-12B1, p-12B2 및 pPL 703과 p-12를 각각 함유하는 *B. subtilis* 207-25의 형질전환체들을 PAB에 접종하여 15시간 진탕배양시킨 후 CAT 비활성을 측정된 결과 Table 1과 같았다. pPL 703과 p-12S의 경우 CAT 비활성이 나타나지 않는 것으로 보아 p-12S에 삽입된 DNA 단편내에는 promoter가 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 한편 p-12B2의 CAT 비활성 1.01과 비교해 볼 때 p-12B1이 가지는 CAT 비활성은 7.42로 7배 이상 높은 것으로 나타나 p-12가 나타내는 promoter 활성의 대부분은 p-12B1의 0.9kb BamHI-SalI DNA 단편내에 있는 promoter에 의한 것임을 알 수 있었다.

p-12B1 및 p-12B2를 함유한 B. subtilis의 생육시기에 따른 CAT 비활성 및 glucose 효과

새로운 재조합 plasmid p-12B1과 p-12B2를 각각 함유한 *B. subtilis* 207-25들의 생육시기에 따른 CAT 비활성을 측정하고 CAT 비활성에 미치는 배지중 glucose 농도의 영향을 살펴보았다. 각

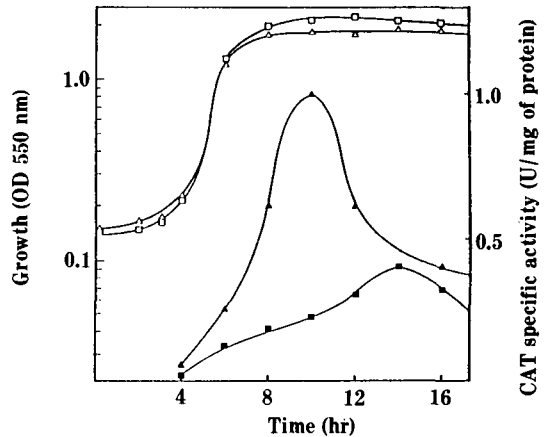


Fig. 6. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *B. subtilis* 207-25 harboring p-12B2.

△-△: cell growth in 2xSSG containing 0.1% glucose
 □-□: cell growth in 2xSSG containing 1.0% glucose
 ▲-▲: CAT specific activity in 2xSSG (0.1% glucose)
 ■-■: CAT specific activity in 2xSSG (1.0% glucose)

plasmid를 함유한 *B. subtilis* 207-25를 10 μg/ml의 chloramphenicol이 첨가된 2xSSG에 5% 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 생육정도를 측정하고 시료를 취해 CAT 비활성을 측정된 결과 Fig. 5, Fig. 6과 같이 나타났다. Fig. 5는 p-12B1을 함유한 *B. subtilis* 207-25를 0.1% 및 1.0%의 glucose가 첨가된 2xSSG 배지에서 첨가해 배양시킨 경우로서 생육에는 별다른 차이를 나타내지 않았다. 한편 0.1% glucose에 생육시킨 경우에는 접종 10시간 후 최대 CAT 비활성이 나타나 p-12를 함유하는 *B. subtilis* 207-25와 같이 대수증식기 종료 이후에 promoter 활성이 촉진되는 특성을 나타내었고 10시간 이후에는 약간씩 감소하는 경향을 보였다. 1.0% glucose에서 생육시킨 경우에는 0.1% glucose의 경우와 비교하여 CAT 비활성이 상당히 감소되는 현상을 볼 수 있었는데 8시간 배양시킨 상태에서는 약 3배의 감소를 나타내었다. 이와같이 고농도의 glucose에 의해 CAT 비활성이 감소되는 것은 p-12B1의 삽입 DNA 단편내에 catabolite repression에 관여하는 조절 유전자가 존재하여 *B. subtilis*에서 glucose 효과를 받는 것으로 추정되었다. Fig. 6은 p-12B2를 함유한 *B. subtilis* 207-25를 0.1% 및 1.0%의 glucose가 첨가된 2xSSG 배지에서 생육시킨 경우로서 역시 생육에는 차이를 나타내지 않았다. 0.1% glucose 첨가 배지에서 생육시킨 경우 접종 10시간 후에 최대 비활성이 나타났으며 1.0% glucose의 경우 0.1% glucose의 경우와 비교하여 CAT 비활성이 상당히

감소하여 p-12B1을 함유한 *B. subtilis*와 마찬가지로 glucose에 의해 catabolite repression을 받는 것으로 나타났다.

요 약

토양에서 분리한 알칼리 내성 *Bacillus*속의 chromosomal DNA로부터 promoter를 cloning하여 선별된 제조합 plasmid p-12내의 promoter를 subcloning을 하였다. 그 결과 cloning된 promoter 내에는 서로 다른 두 가지의 promoter가 존재하는 것을 확인할 수 있었고 이로부터 각각의 promoter를 함유한 제조합 plasmid p-12B1, p-12B2를 제조하였다. 또한 CAT 비활성 측정에 의해 각 promoter의 활성을 비교해 본 결과 p-12B1의 promoter는 p-12B2의 promoter에 비해 상대적으로 높은 활성을 가지고 있었다. CAT 비활성을 생육시기에 따라 측정해 본 결과 p-12B1과 p-12B2는 대수증식기 이후 활성이 급증되었으며 배지 중 첨가된 1.0%의 glucose에 의해 활성이 억제되는 효과를 받았다.

사 사

이 연구를 위하여 목적기초 연구비를 지원하여 주신 한국과학재단에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Piggot, P.J. and J.G. Coote: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 908

- (1976).
2. Schaeffer, P.: *Bacteriol. Rev.*, **33**, 48 (1969).
 3. Losick, R., P. Youngman and P.S. Piggot: *Annu. Rev. Genet.*, **20**, 625 (1986).
 4. Moran, C.P., N. Lang, S.F.J. LeGrice, G. Kee, M. Stephens, A.L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 339 (1982).
 5. Doi, R.H. and L. Wang: *Microbiol. Rev.*, **50**, 227 (1986).
 6. Yu, J.H., B.T. Koo, I.S. Kong, Y.J. Chung and Y.S. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 126 (1988).
 7. Williams, D.M., E.J. Duvall and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **146**, 1162 (1981).
 8. Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986).
 9. Chang, S. and S.N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111 (1978).
 10. David S. Golfarb, S.L. Wang, T. Kudo and R.H. Doi: *Mol. Gen. Genet.*, **191**, 319 (1983).
 11. Goldfarb, D.S., R.L. Rodriguez and R.H. Doi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5886 (1982).
 12. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: "Molecular cloning, A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
 13. Shaw, W.V.: *Methods Enzymol.*, **43**, 737 (1975).
 14. Lowry, O.E., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

(Received July 12, 1988)