

공여 균주인 알칼리 내성 *Bacillus* 속에 도입된 Promoter의 특성

유주현* · 구본탁 · 정용준

연세대학교 식품공학과

Properties of Promoters Transferred to the Donor Strain, Akali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14.

Yu, Ju-Hyun*, Bon-Tag Koo and Yong-Joon Chung

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

The promoters from akali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA cloned in *B. subtilis* using pPL703 were stably transferred to the donor strain. In alkali-tolerant *Bacillus* sp., the promoters revealed similiar properties with in *B. subtilis* but were proved to be more efficient than in *B. subtilis* comparing with pPL708.

Alkali-tolerant *Bacillus* sp. harboring the recombinant plasmid, p-12B1, was abnormally more inducible with chloramphenicol than *B. subtilis* having the plasmid. Therefore the host-vector system using this recombinant plasmid and alkali-tolerant *Bacillus* sp. was expected to be more available.

Bacillus 속 미생물은 내생포자를 형성하는 대표적 포자형성균으로서 원핵세포에 있어서의 분화과정 연구에 많이 이용되고 있다(1,2,3). *Bacillus* 속에서는 여러 종류의 sigma subunit를 갖는 RNA polymerase가 전사과정에 관여하고 이-은 서로 다른 특정 염기배열의 promoter 유전자에 대해 특이적으로 결합하는 것으로 알려져 있다(4,5). *Bacillus*의 promoter에 대한 연구는 포자 형성에 이르는 일련의 복잡한 분화과정을 규명하는데 중요한 역할을 하고 있으며 또한 외래의 유용 유전자를 *Bacillus*에서 효과적으로 발현시키기 위한 목적으로도 이용되고 있다. Yu 등(6)은 *Bacillus* promoter probe vector인 pPL 703을 이용, 알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 chromosomal DNA로부터 활성이 높은 promoter를 cloning하고 *Bacillus subtilis* 내에서의 유전 생화학적 특성을 관찰하였다. 본 연구에서는 유전 공학적 숙주 미생물로 이용할 목적으로 토양으로부터 분리된 알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 chromosomal DNA로부터 cloning된 promoter 유전자들을 그 공여 균주에 도입시키고 *B. subtilis*에서의 특성과 비교하여 보았다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

숙주 균주로는 *B. subtilis* 207-25(7)와 Yu 등이 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14(9)를 사용하였다. Plasmid는 promoter probe vector pPL 703과 bacteriophage SPO2 유래의 promoter를 함유하는 pPL 708(8) 및 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA로부터 분리한 promoter 단편이 삽입되어 있는 p-12, 그리고 p-12의 subcloning 결과 제조된 p-12 B1, p-12 B2(6)을 사용하였다.

Bacillus sp. YA-14의 competent cell 형질전환을 위한 배지는 MSPI(modified SPI) 배지(9)를 사용하였다. 형질 전환체의 선별에는 각 항생물질을 첨가한 TBAB(tryptose blood agar base, Scott) 평판 배지를 사용하였으며 CAT(chloramphenicol acetyl transferase) 비활성을 측정할 때에는 2×SSG(modified schaeffer medium) 배지(10)를 사용하였다.

재조합 plasmid의 제조 및 agarose gel로부터 DNA의 회수

Key words: Promoter, alkali-tolerant *Bacillus* sp., host-vector system

*Corresponding author

Plasmid의 신속 분리는 Doi 등의 방법(11)을 사용하였고 subcloning을 위한 제한효소 처리와 ligation 등은 Maniatis 등의 방법(12)에 따라 행하였다. Agarose gel로부터의 DNA 회수에는 IBI(International Biotechnologies, Inc.)사 제품의 electroeluter(model UEA)를 사용하였다.

*B. subtilis*와 *Bacillus* sp. YA-14의 형질전환과 promoter 활성 측정

*B. subtilis*의 형질전환은 Chang 등의 원형질체 형질전환 방법(13)에 따라 행하였으며 *Bacillus* sp. YA-14는 Yu 등(9)의 competent cell 형질전환 방법에 의했다. Promoter의 활성은 Shaw 등의 방법(14)에 따라 CAT 비활성을 측정하여 나타내었다. CAT 활성에서 1 unit는 37°C에서 분당 acetylation되는 chloramphenicol의 μmol 수로 나타내었다. 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법으로 행하였으며 CAT unit를 단백질 양으로 나뉜 값을 CAT 비활성으로 하였다.

실험결과 및 고찰

Bacillus sp. YA-14의 형질전환

토양에서 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA로부터 자체의 promoter를 제거한 CAT 유전자를 지니고 있는 promoter probe vector인 pPL 703을 이용하여 promoter 유전자들을 *B. subtilis*에 cloning하고 그 중 활성이 가장 높은 promoter를 함유하는 재조합 plasmid p-12를 선별하였다. p-12내의 promoter 함유 삽입 단편에 대한 subcloning의 결과 서로 다른 promoter를 함유하는 p-12B1 및 p-12B2 재조합체를 제조할 수 있었다(6). Promoter 유전자들의 공여 균주인 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14내에서 각 promoter들의 특성을 살펴보고 *B. subtilis* 207-25에서와 비교해 보기 위하여 p-12, p-12B1 및 p-12B2 plasmid DNA를 *Bacillus* sp. YA-14내에 .MSPI 배지를 이용한 competent cell 방법에 의해 형질전환시켰다. Chloramphenicol이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가된 TBAB 선택배지에서 colony를 형성하는 형질전환체들로부터 plasmid를 신속 분리하여 형질전환에 사용된 각 plasmid들과 함께 agarose gel 전기영동을 행한 결과 CCC 형태의 plasmid band들을 비교하여 볼 때 각 promoter 함유 plasmid들은 *Bacillus* sp. YA-14내에서 DNA 단편의 결손 등이 일어남이 없이 구조적으로 안정하게 형질전환되었음을 알 수 있었다(Fig.1). 각각 다른 종류의 promoter를 가진 re-

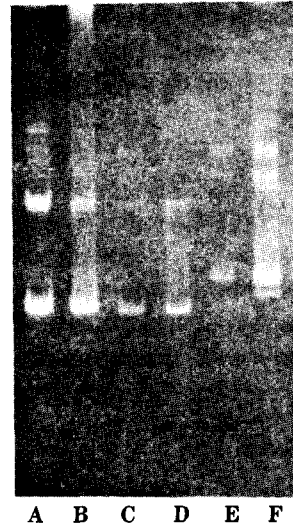


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of p-12, p-12B1 and p-12B2 isolated from *Bacillus* sp. YA-14, which shows the plasmid structural stability in both strains.

A: p-12B1 from *Bacillus* YA-14

B: p-12B1 from *B. Subtilis* 207-25

C: p-12B2 from *Bacillus* sp. YA-14

D: p-12B2 from *B. subtilis* 207-25

E: p-12 from *Bacillus* sp. YA-14

F: p-12 from *B. subtilis* 207-25

combinant DNA p-12, p-12B1, p-12B2 및 *Bacillus*내에서 강력한 활성을 나타내는 0.3kb SPO2 promoter를 지니는 pPL 708의 *Bacillus* sp. YA-14 형질전환체들에 대한 CAT 비활성을 측정하여 *B. subtilis* 207-25의 결과와 비교한 결과는 Table 1과 같았다. p-12, p-12B1 및 p-12B2의 promoter들에 의한 CAT 비활성은 *B. subtilis* 207-25의 형질전환체보다 약간 높게 나타났다. 반면 pPL 708의 CAT 비활성은 *Bacillus* sp. YA-14에서 오히려 상대적으로 낮게 나타났다. 이러한 현상은 *B. subtilis*에서는

Table 1. Effect of promoter kinds on CAT specific activity in *Bacillus subtilis* 207-25 and *Bacillus* sp. YA-14.

Plasmid	CAT specific activities (U/mg of protein)	
	in <i>Bacillus subtilis</i> 207-25	in <i>Bacillus</i> sp. YA-14
p-12	8.0	9.5
p-12B1	7.4	11.4
p-12B2	1.0	1.2
pPL708	3.1	1.3

*CAT: chloramphenicol acetyl transferase

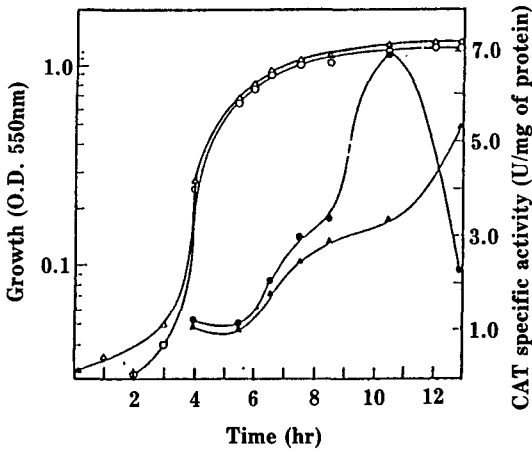


Fig. 2. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *Bacillus* sp. YA-14 harboring p-12B1.
 ○ - ○ : cell growth in 2XSSG containing 0.1% glucose
 △ - △ : cell growth in 2XSSG containing 1.0% glucose
 ● - ● : CAT specific activity in 2XSSG (0.1% glucose)
 ▲ - ▲ : CAT specific activity in 2XSSG (1.0% glucose)

높은 효율을 나타내는 pPL 708의 promoter 유전자가 *Bacillus* sp. YA-14 내에서는 자체 chromosome 유래의 promoter 들에 비해 그 효율이 상대적으로 낮게 나타나기 때문에 일어나는 것으로 여겨진다. 이와 같이 동일한 promoter 유전자에 대한 효율에 있어서 *Bacillus* 속에서 종간의 차이를 나타내는 것은 최근의 Okada 등(15)의 보고와도 일치하였다.

재조합 plasmid p-12B1 및 p-12B2 를 함유하는 *Bacillus* sp. YA -14 의 생육시기에 따른 CAT 비활성 및 배지 중 첨가된 glucose 에 의한 억제효과

Bacillus sp. YA -14 내에서의 p-12B1 및 p-12B2 promoter 유전자의 특성을 살펴보기 위하여 p-12B1 및 p-12B2 가 도입된 *Bacillus* sp. YA-14 를 0.1% 및 1.0% 의 glucose 가 각각 첨가된 2×SSG 배지에서 배양시키면서 시간별로 CAT 비활성을 측정하였다 (Fig.2). p-12B1 을 함유하는 *Bacillus* sp. YA-14 는 0.1% 의 glucose 가 첨가된 배지에서 대수 증식기 말기에 CAT 비활성이 급격히 증가하였다. 이 결과는 *B. subtilis* 의 결과와 유사하였다(6). 한편 1.0% 의 glucose 가 첨가된 경우 대수 증식기 말기까지 CAT 비활성이 상대적으로 억제되는 것으로 나타나 glucose 에 의한 억제효과가 *B. subtilis* 에서와 마찬가지로 관찰되었다. 재조합 plasmid p-12B2 를 함유하는 *Bacillus* sp. YA-14 의 생육상태에 따른 CAT

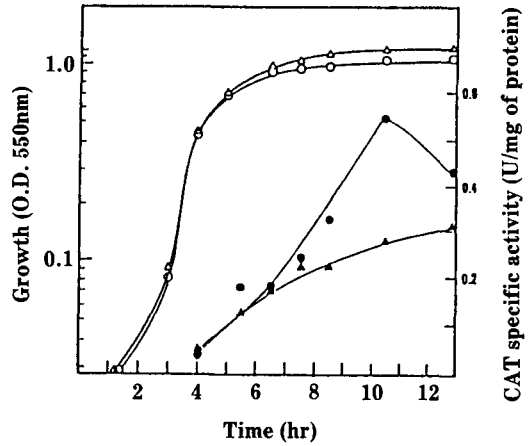


Fig. 3. CAT specific activity as a function of growth and effect of glucose concentration on CAT specific activity in *Bacillus* YA-14 harboring p-12B2
 ○ - ○ : cell growth in 2XSSG containing 0.1% glucose
 △ - △ : cell growth in 2XSSG containing 1.0% glucose
 ● - ● : CAT specific activity in 2XSSG (0.1% glucose)
 ▲ - ▲ : CAT specific activity in 2XSSG (1.0% glucose)

비활성을 측정한 결과는 Fig.3 과 같았다. p-12B1 의 경우와 거의 유사한 특성을 나타내었으며 이는 *B. subtilis* 에서와 거의 동일하였다(6). 또한 배지 중 첨가된 glucose 에 의한 CAT 비활성의 억제도 *B. subtilis* 에서와 마찬가지로 나타났다.

Chloramphenicol 에 의한 CAT induction

Chloramphenicol 에 대한 세균의 내성은 주로 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 효소의 존재에 기인하고 이 효소는 acetylation 반응을 일으킴으로써 chloramphenicol 을 불활성화시키는 것으로 알려져 있다(14). 또한 Gram 음성 세균에서 발견되는 CAT 의 경우와는 달리 Gram 양성 세균의 경우 CAT 효소의 발현이 배지 중 첨가된 chloramphenicol 에 의해 induction 효과를 대부분 받는 것으로 밝혀져 있다(14). Chloramphenicol 에 의한 induction 효과는 posttranscriptional regulation 에 의해 일어나는데 구조 유전자와 promoter 유전자 사이의 inverted repeat sequence 와 그 위쪽의 cis-acting regulatory region 에 의하여 형성된 transcript 의 2차구조가 chloramphenicol 첨가에 의하여 변화함으로써 CAT 이 induction 되기 때문에 *Bacillus* 가 인식할 수 있는 promoter 라면 그 promoter 의 종류에 관계없이 induction 될 수 있다. 이러한 점은 그 자체의 promoter 를 제거한 CAT 유

Table 2. Effect of chloramphenicol on induction of CAT.

Strain	Plasmid	CAT specific activity (U/mg of protein)	
		concentration of CM ($\mu\text{g/ml}$)	
		0	10
<i>B. subtilis</i> 207-25	pPL708	0.39	3.05
<i>B. subtilis</i> 207-25	p-12	1.17	8.01
<i>Bacillus sp.</i> YA-14	pPL708	0.16	1.32
<i>Bacillus sp.</i> YA-14	p-12	0.18	10.03
<i>Bacillus sp.</i> YA-14	p-12B1	0.38	11.96
<i>Bacillus sp.</i> YA-14	p-12B2	0.16	1.27

*CAT: chloramphenicol acetyl transferase
CM: chloramphenicol

전자를 지니고 있는 pPL 703을 promoter probe vector로 사용할 수 있는 중요한 특징이 된다. pPL 703은 cloning된 promoter 유전자에 상관없이 약 10배의 induction 효과가 나타나 promoter가 cloning된 pPL 703을 expression vector로 이용할 때 중요한 장점이 될 것으로 여겨지고 있으며 *E. coli trpC* 유전자를 CAT 유전자 위치에 삽입시켰을 때 그 발현 역시도 chloramphenicol에 의해 induction되었다는 연구에 의해 그 유용성이 입증되었다(16). 각 plasmid들을 함유하는 *B. subtilis* 및 *Bacillus sp.* YA-14를 chloramphenicol이 이 첨가되지 않은 PAB 배지와 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가된 배지에서 15시간 동안 진탕 배양시킨 후 CAT 비활성을 측정 한 결과는 Table 2와 같았다. pPL 708과 p-12가 도입된 *B. subtilis*의 경우에는 각각 8배 및 7배 정도의 induction 효과를 보여 앞서의 보고들과 일치하였으나, *Bacillus sp.* YA-14에서는 pPL 708과 p-12 B2가 *B. subtilis*에서와 유사한 정도의 induction 효과를 나타낸 반면 p-12와 p-12B1의 경우 약 30~60배 정도의 높은 induction 정도를 보였다. *Bacillus sp.* YA-14에서 관찰되는 p-12B1에 의한 높은 induction 효과는 이들을 이용한 expression system을 이용할 때 보다 유용한 장점이 될 것이다.

요 약

토양에서 분리된 알칼리 내성 *Bacillus sp.* YA-14의 chromosomal DNA로부터 *B. subtilis* 207-25에 cloning된 promoter 유전자들을 그 공여 균주로 재형질전환시킬 수 있었다. 그 결과 promoter 유전자들은 공여 균주내에서 대부분의 특성들이 *B. subtilis* 207-25 내에서의와 유사하였다. 재조합 plasmid p-12, p-12B1 및 p-12B2의 CAT 비활성은 *B. subtilis* 207-25의 형질전환체보다 약간 높게 나타났으며 반면 pPL 708의 CAT 비활성은 *Bacillus sp.* YA-14에서 오히려 상대적으로 낮게 나타났다. Chloramphenicol에 의한 induction 정도도 월등하게 높은 것으로 나타나 이를 이용한 expression vector의 유용성이 높은 것으로 생각되었다.

사 사

이 연구를 하는데 균주 및 plasmid(pPL 703, pPL 708)를 공여하여 주신 *Bacillus* Genetic Stock Center의 Lovett 박사와 이 연구를 위하여 목적기초연구비를 지원하여 주신 한국과학재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Piggot, P.J. and J.G. coote: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 908 (1976)
- Schaeffer, P.: *Bacteriol. Rev.*, **33**, 48 (1969)
- Losick, R., P. Youngman and P.S. Piggot: *Annu. Rev. Genet.*, **20**, 625 (1986)
- Moran, C.P., N. Lanf, S.F.J. LeGrice, G. Ke, M. Stephens, A.L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 339 (1982)
- Doi, R.H. and L. Wang: *Microbiol. Rev.*, **50**, 227 (1986)
- Yu, J.H., B.T. Koo, Y.S. Park, Y.J. Chung, D.H. Bai and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 343 (1988)
- Otozai, K. and K. Yamane: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 351 (1985)
- Williams, D.M, E.J. Duvall and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **146**, 1162 (1981)
- Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986)

10. David S. Goldfarb, 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. Fritschj and J. Sambrook: "Molecular cloning, A laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory (1982)
13. Chang, S. and S.N. Cohen: *Mol. Gen. Genet.*, **168**, 111 (1978)
14. Shaw, W.V.: *Methods Enzymol.*, **43**, 737 (1975)
15. Hirata H., T. Fukazaqa., E. Negoro and H. Okada: *J. Bacteriol.*, **166**, 722 (1986)
16. Ambulos, N.P., JR. S. Molgolsuk, J.D. Kaufman and P.S. Lovett: *J. Bacteriol.*, **164**, 696 (1985)

(Received March 6, 1989)