Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19, No. 6, 575-582 (1991)

E. coli K-12 균주로부터 글루타치온 합성 유전자의 클로닝

남용석[1]* · 박영인[2] · 이세영[1]
[1]고려대학교 농화학과, [2]유전공학과

Cloning of Genes for the Biosynthesis of Glutathione from *E. coli* K-12

Nam, Yong-Suk[1]*, Young-In Park[2] and Se-Yong Lee[1]
[1]*Department of Agricultural Chemistry,*
[2]*Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea*

Abstract — To increase the production of glutathione by the expression of recombinant *gsh* plasmids, two genes responsible for the biosynthesis of glutathione were isolated and cloned. To clone a *gsh*I gene, the GS903 mutant strain, which is deficient in γ-glutamylcysteine synthetase activity, has been raised. A *gsh*I gene was cloned using pBR322 plasmid as a 3.6 Kb *Pst*I DNA fragment isolated from *E. coli* K-12 chromosomal DNA. Also a *gsh*II gene was cloned using pUC13 plasmid as a 2.2 Kb *Pst*I-*Bam*HI DNA fragment. To study the effects of plasmid copy number and passenger DNA size on the expression levels of the *gsh* genes, various recombinant plasmids containing different sets of genes were constructed. The expression levels of the *gsh* genes were increased approximately twice higher in pUC series plasmids than that in pBR322 plasmid. But the sizes of the passenger DNA containing the *gsh* genes in the vector plasmid did not affect on the expression levels of the *gsh* genes.

글루타치온은 글루타민산, 시스테인 및 글리신이 펩티드 결합으로 이루어진 비단백성 thiol 물질로서 많은 효소의 보효소, -SH기의 보호, 산화환원 전위의 유지 및 항산화제로서의 생화학적 역할 뿐만 아니라, 독성물질에 대한 해독작용은 물론, 간장질환, 당뇨병, 그리고 방사선 장애에 대한 치료 의약품으로서 현재 널리 이용되고 있다(1-4).

글루타치온은 산업적으로 효모 균체에서 추출되거나 유기합성법에 의해서 생산되고 있으나, 효모 균체에서의 추출은 공정상의 여러가지 어려움 뿐만 아니라 균체내 함량이 적다는 단점이 있으며, 유기합성법은 합성시 보호기를 필요로 하며 반응공정이 길다는 단점이 있기 때문에 새로운 글루타치온 생산법의 개발이 요구되고 있는 실정이다(5).

Murata 등은(6-10) 미생물이 보유하고 있는 글루타치온 합성효소를 이용하여 에너지 도입의 관점에서 여러가지의 ATP 재생계를 도입시킨 생체반응계에서 효소법으로 글루타치온 생산을 시도한 바 있으나 그 생산성은 그다지 높지 않았다. 또한 *E. coli* B균주로부터 글루타치온의 생합성에 관여하는 γ-glutamylcysteine synthetase(GSH-I ; EC 6.3.2.2)와 glutathione synthetase(GSH-II ; EC 6.3.2.3)의 두 유전자를 클로닝하여 유전공학적인 기법을 이용한 글루타치온 생산 균주의 개발을 시도한 바 있으며, 한편 보다 높은 글루타치온 생성능을 갖는 균주를 개발하기 위하여 여러 재조합 플라스미드를 구성하여 공업적으로 이용이 가능한 균주를 개발하고 있다(11-13).

글루타치온은 GSH-I 및 GSH-II에 의한 비교적 간단한 두 단계의 효소반응에 의해서 이루어지므로 본 실험에서는 유전공학적인 방법을 이용하여 글루타치온 생산 균주를 개발하고자 *E. coli* K-12 균주로부터 글루타치온 생합성에 관여하는 유전자를 클로닝하였다. 먼저 *gsh*I 유전자를 클로닝하기 위하여 *gsh*I⁻ 결손 변이주를 제조하였으며 이 결손 변이주를 숙주세포로 하여 *gsh*I 유전자를 클로닝하였으며, *gsh*II

Key words: *E. coli*, cloning, biosynthesis of glutathione
*Corresponding author

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	Genotype	Reference
E. coli K-12 strains		
W3110	Wild type	Yanofsky, C.
GS913	$MG^{r,a}$	in this study
GS903	*gsh*$I^{-,b}$, MG^r	in this study
CYS22	*cys*$^-$, *trp*$^-$	in this study
HB101	F^- *hsd20*(r^-m^-) *recAB leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsC20*(*str*^{r}) *xyl-5 mtl-1 supE44* X^-	

Plasmids		Characteristics		
pLF4	pUC13-*gsh*II^c	Ap^r	4.9 Kb	Lim, C.J. (unpublished)
pLF6	pUC13-*gsh*II	Ap^r	4.1 Kb	Lim, C.J. (unpublished)
pGH100	pBR322-*gsh*I	Tc^r	7.9 Kb	in this study
pGH101	pBR322-*gsh*I	Ap^r	6.3 Kb	in this study
pGH200	pUC8-*gsh*I	Ap^r	6.3 Kb	in this study
pGH201	pUC8-*gsh*I	Ap^r	4.7 Kb	in this study
pGH300	pBR322-*gsh*II	Ap^r	5.4 Kb	in this study

[a] MG^r: resistance to methylglyoxal
[b] *gsh*I: gene for γ-glutamylcysteine synthetase
[c] *gsh*II: gene for glutathione synthetase

유전자는 이미 *E. coli* K-12로부터 클로닝된 pLF4 플라스미드(Table 1)로부터 subcloning하여 유전자의 발현을 증대시키기 위한 여러 재조합 플라스미드를 구성하여 그 유전자의 증폭 효과(gene dosage effect)를 관찰하였다.

재료 및 방법

사용균주, 플라스미드 및 배지

사용한 균주는 모두 *E. coli* K-12 유도체이며, 균의 성장을 위한 배지는 LB 및 VB 최소 배지를 사용하였다. 사용한 균주와 플라스미드는 Table 1과 같다.

α-Glutamylcysteine synthetase의 효소활성

GSH-I의 효소활성은 Jackson(14)의 방법을 다음과 같이 변형하여 사용하였다. 30 μmole L-glutamate, 30 μmole L-cysteine, 30 μmole ATP, 20 μmole $MgSO_4$, 200 μmole KCl, 200 μmole diethanolamine-HCl buffer(pH 9.15) 및 조효소액의 조성을 가진 반응액 2.0 m*l*를 37℃에서 15분간 반응시킨 후, 3.2% sulphosalicylic acid 3.3 m*l*을 첨가하여 반응을 중지시키고, 0℃에서 20분간 방치하였다. 이를 원심분리하여 그 상등액 1 m*l*에 glyoxylate 용액(1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8, 5 mM EDTA, 1g of ascorbic acid per 1*l*, and 3.0g of glyoxylic acid monophosphate per 1*l*) 4 m*l*를 혼합하여 정확히 60℃에서 5분간 반응시키고, 곧 얼음속에서 식힌 후, 다시 25℃로 유지시켰다. 이어서 3.8 mM DTNB[5,5′-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) in 1 M potassium phosphate buffer, pH 6.8] 0.5 m*l*를 넣고 7분 후에 412 nm에서 흡광도를 측정하여 반응액 중에 ATP와 글루타민산를 첨가하지 않은 blank와 비교하여 그 흡광도의 차이를 측정하여 표준곡선에 의해 GSH-I 효소의 unit를 결정하였다. GSH-I 효소 1 unit는 시간당 1 μmole의 γ-glutamylcysteine을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 단백질 정량은 Lowry 등의 방법에 따랐다(15).

Glutathione synthetase의 효소활성

GSH-II의 활성은 글루타치온의 합성에 따라 생성되는 ADP의 양을 NADH의 산화에 의한 340 nm에서 흡광도의 감소로 측정하였다(16). 4.6 mM γ-glutamylcysteine, 12.5 mM glycine, 250 nM Tris-HCl buffer (pH 8.5), 1.25 mM ATP, 1.25 mM $MgCl_2$, 125 mM KCl, BSA(0.75 mg/m*l*), 0.125 mM NADH, 0.25 mM phosphoenol pyruvate, pyruvate kinase(Type II, 7.4 units, Sigma사 제품), lactate dehydrogenase(Type II, 12.7 units, Sigma사 제품)의 조성을 가진 반응액 0.6 m*l*에 조효소액 0.2 m*l*을 가하고 37℃에서 2분간 반응시킨 후 340 nm에서 감소된 흡광도의 값을 NADH의 흡광계수($6.22\times10^3\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$)를 적용시켜 생성된 글루타치온의 몰수를 산출하였다. GSH-II 1 unit는 시간당 1 μmole의 글루타치온을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

글루타치온 정량

글루타치온은 Tietze의 방법에 따라 정량하였다(17). 즉, 0.6 μmole DTNB, Glutathione reductase(1 unit), 0.2 μmole NADPH와 시료를 넣은 후 412 nm에서 1분간에 증가하는 흡광도의 값을 측정하였다.

DNA의 분리 및 정제

염색체 DNA의 분리 및 정제는 SDS 용해방법을 사용하였다(18). 재조합 플라스미드 확인을 위한 플라스미드의 분리는 Ish-Horowicz의 방법에 준하여 실시하였다(19).

DNA 절단 및 접합

DNA의 제한효소 처리는 공급자의 지시에 따라 실시하였으며, ligation은 cohesive ends를 가진 경우는 삽입 DNA와 벡터 DNA의 비율을 3 : 1으로 하여 13~14℃에서 16시간 반응시켰으며, blunt ends를 가진 경우는 삽입 DNA와 벡터 DNA를 1 : 1로 섞어 23℃에서 16시간 반응시켰다. Ligation 정도는 0.7% agarose gel 전기영동에 의하여 확인하였다. 각 DNA 확인용 전기영동은 TBE buffer(pH 8.3)에서 0.7% agarose gel을 사용하여 전기영동하고 ethidium bromide(50 μg/ml) 용액에서 10분간 염색시킨 다음 transilluminator(TM36, UV products, Inc., U.S.A.)로 확인하였으며 polaroid type 667 필름을 사용하여 사진을 찍었다.

형질전환 및 형질전환체 선별

E. coli GS903 균주를 $CaCl_2$를 처리하여 competent cell을 만든 다음 형질전환을 실시하였다(18). *gsh*I 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 갖는 형질전환체의 선별은 TMTD(tetramethylthiuramdisulfide) 40 μg/ml이 함유된 YB 최소 배지에서(20) 생존하는 콜로니들을 선별하여 암피실린(50 μg/ml)에 민감하고 테트라싸이클린(10 μg/ml)에 저항성을 가진 콜로니들에 대해서 글루타치온을 정성적으로 측정하였다. 글루타치온이 검출되는 콜로니들에 대해서는 nitroprusside에 의해 γ-glutamylcystein synthetase가 결핍된 변이주를 검출하는 방법인 'colony color technique'(21)에 의해서 효소를 함유한 것으로 추정되는 적색의 콜로니들을 일차로 선별하고, 이들 콜로니로부터 재조합 플라스미드를 분리하여 크기와 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

GSH-I⁻ 결실 변이주의 선별 및 특성

대부분의 미생물은 정상적인 상황하에서 글루타치온을 세포밖으로 배출시키지 못한다. 그러나 MG(methylglyoxal)에 저항성을 갖는 변이주는 많은 양의 글루타치온을 세포밖으로 배출하는 특성을 갖는다고 보고된 바가 있으며(22), 또한 시스테인 영양요구주는 그들의 성장에 시스테인 대신 글루타치온을 이용할 수 있다고 알려져 있다(23). 따라서 글루타치온을 세포밖으로 배출하는 특성을 가진 변이주와 시스테인 영양요구주를 병행 사용하여 GSH-I⁻ 결실변이주를 획득하였다. 시스테인 영양요구주는 그들의 성장에 시스테인 대신 글루타치온을 이용할 수 있기 때문에, 최소 고체배지 중에 첨가한 시스테인 영양요구주는 글루타치온을 세포밖으로 배출하는 변이주가 배출한 글루타치온을 이용하여 성장함으로써 그 변이주 주위에 환(halo)을 형성한다(23). 따라서 글루타치온 생합성 능력이 결여된 변이주는 시스테인 영양요구주를 첨가한 최소 고체배지에서 환을 형성하지 않은 콜로니로서 1차로 선별할 수 있다. 그러므로 먼저 *E. coli* K-12 W3110에 NTG를 처리하여 돌연변이를 일으켜서 MG(1.38 mM)에 내성을 갖는 변이주를 선별하였다. MG에 내성을 갖는 변이주들 중 배양액 중에 가장 많은 글루타치온을 배출하며, 가장 크고 선명한 환을 형성하는 변이주를 GS913으로 명명하였다. 이 변이주는 야생형 W3110에 비해 12배나 높은 양의 글루타치온을 배양액 중에 배출하였으며, 시스테인 영양요구주를 첨가한 최소 고체배지에서 가장 선명한 환을 형성하였다. GSH-I⁻ 결실 변이주를 얻기 위하여 GS913 변이주를 NTG로 처리하여 돌연변이를 일으켜 먼저 시스테인 영양요구주가 함유된 최소 고체배지에

Table 2. Inhibitory effect of TMTD on the growth of the various *E. coli* strains[a]

Strains / TMTD[b] (μg/ml)	Wild (*gsh*I⁺)	GS913 (*gsh*I⁺)	GS903 (*gsh*I⁻)
10	+	+	+
20	+	+	−
40	+	+	−
60	+	+	−
80	+	+	−
100	+	+	−
120	+	+	−

[a] All strains were grown on VB minimal medium containing TMTD at 37℃ for 48 h (+: growth, −: no growth)
[b] TMTD: Tetramethylthiuramdisulfide

도말하였다. 이들 중 환을 형성하지 않은 변이주들을 선별하여 글루타치온 생합성 능력이 결여된 변이주의 성장을 가장 민감하게 저해한다고 알려진 TMTD(40 μg/ml)(24)에 감수성을 나타내며 배양액 중에 글루타치온과 GSH-I 효소활성이 검출되지 않은 변이주를 선별하여 GS903으로 명명하고 이 GS903 변이주를 *gsh*I 유전자를 클로닝하기 위한 숙주세포로 이용하였다. 유독성 thiol 화합물인 TMTD는 글루타치온 생합성 능력에 따라 그 민감도의 차이가 크기 때문에 TMTD를 *gsh*I 유전자를 클로닝하기 위한 선별약품으로 선정하고 GS903 변이주의 TMTD에 대한 그 민감성을 조사한 결과 TMTD 20 μg/ml에서 성장이 저해되었다(Table 2). 한편 GS903 변이주는 'colony color technique'에 의해서 white-pink 색깔을 띄었다.

*gsh*I 유전자의 클로닝

*gsh*I 유전자를 클로닝하기 위하여 *E. coli* K-12 W 3110의 염색체 DNA를 분리하여 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII 및 *Pst*I과 같은 제한효소로 부분 절단하였다. 이미 Murata와 Kimura 등은 *E. coli* B의 *gsh*I의 구조 유전자내에 *Pst*I 제한효소 절단부위가 존재하지 않는다고 보고하였지만(11), 그 유전자는 돌연변이가 일어나기 때문에 *E. coli* K-12 야생형 균주의 *gsh*I 유전자와는 그 제한효소의 절단부위가 동일하지 않을 가능성을 고려하여, *E. coli* K-12 염색체 DNA를 상기 제한효소들로 부분 절단하고, 또한 pBR322 벡터 DNA를 상응하는 제한효소를 완전 절단한 후, 분자적 클로닝을 실시하여 GS903 균주에 도입하였다. 재조합 플라스미드를 갖는 형질전환체는 TMTD(40 μg/ml)가 함유된 VB 최소배지에서 생존하는 콜로니들을 선별하여 글루타치온을 정성적으로 측정함으로써 선별하였다. 글루타치온이 검출되는 콜로니들을 'colony-color technique'에 의해서 붉은색으로 나타나는가에 대해서 조사한 결과, 대부분의 형질전환체들은 white-pink 색을 띄는 반면 9개의 콜로니가 붉은색을 띄었으며, 이들 중 3개의 콜로니가 적당한 크기의 재조합 플라스미드를 가지고 있음을 확인하였다. 분리된 재조합 플라스미드를 *Pst*I 제한효소로 완전 절단하였을 때 2주의 형질전환체에서만 Murata 등(11)에 의해서 보고된 것과 그 크기가 동일한 3.6 Kb의 삽입 DNA를 가지고 있었다(Fig. 1). 재조합 플라스미드 A는 *Pst*I 제한효소에 의한 염색체 DNA의 절단시

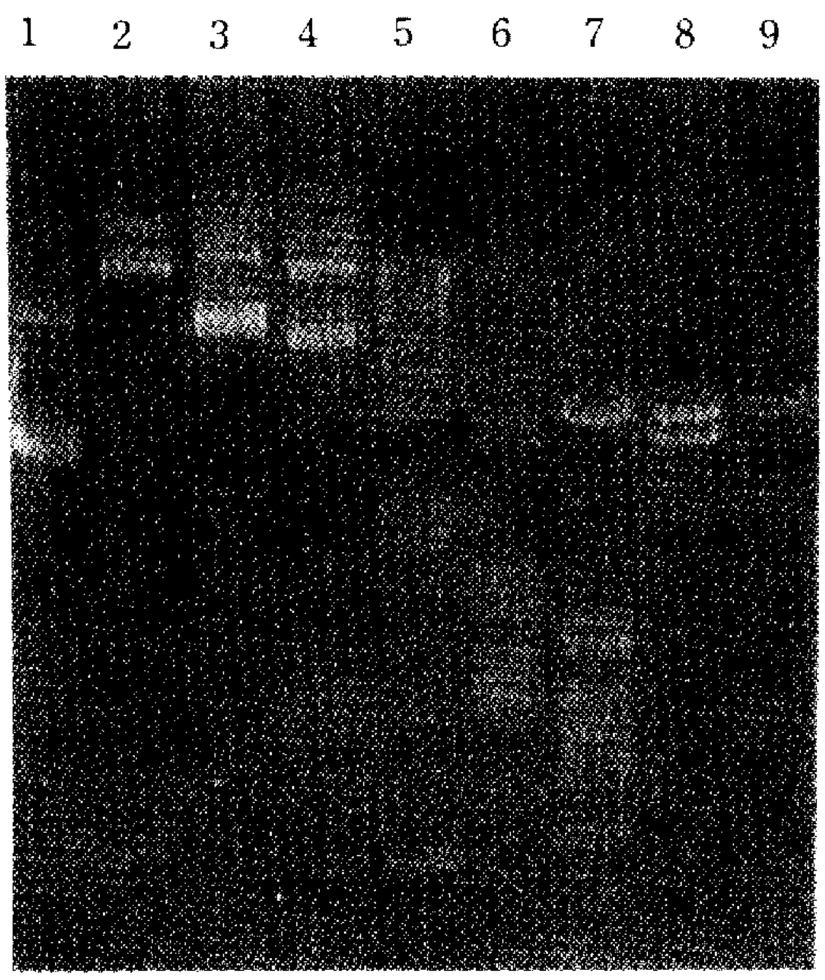

Fig. 1. *Pst*I digestion patterns of recombinant plasmid DNA fractionated on a 0.7% agarose gel.
Lane 2: pBR322, lane 2: recombinAnt plasmid A, lane 3: recombinant plasmid B, lane 4: recombinant plasmid C, lane 5: λ DNA+*Hin*dIII, lane 6: recombinant plasmid A+*Pst*I, lane 7: recombinant plasmid B+*Pst*I, lane 8: recombinant plasmid C+*Pst*I, lane 9: pBR322+*Pst*I

부분절단으로 인하여 3.6 Kb보다 더 큰 DNA 조각이 삽입되었으며, 형질전환체 B는 글루타치온은 검출되었으나 삽입 DNA가 확인되지 않는 점으로 미루어 *gsh*I 유전자가 소실되거나 염색체 DNA내로 재조합되어 삽입된 것으로 추정된다. 이들 중 3.6 Kb 크기의 삽입 DNA를 가진 재조합 플라스미드를 pGH100으로 명명하였다. Fig. 2는 3주의 형질전환체를 nitroprusside로 처리하였을 때의 콜로니 색깔을 보여주는 것으로 *gsh*I 유전자를 함유하고 있는 형질전환체인 A와 C는 붉은색을 띄고 있는 반면 *gsh*I 유전자 결핍 균주인 GS903은 white-pink 색을 보여주고 있다.

*gsh*II 유전자의 서브 클로닝

글루타치온 합성에 관여하는 두번째 효소인 glutathione synthetase의 유전자는 pLF4(임창진, 미발표 결과) 플라스미드로부터 분리하였다. pLF4 플라스미드는 pUC13의 *Bam*HI과 *Pst*I 제한효소 절단부위에 *E. coli* K-12로부터 유래된 2.2. Kb의 염색체 DNA가 삽입되어 있다. 따라서 pLF4 플라스미드를 *Bam*HI과 *Hin*dIII 제한효소로 절단하여 *gsh*II 유전자를 포함하는 1.4 Kb의 DNA 절편을 분리하여 pBR322 벡터의

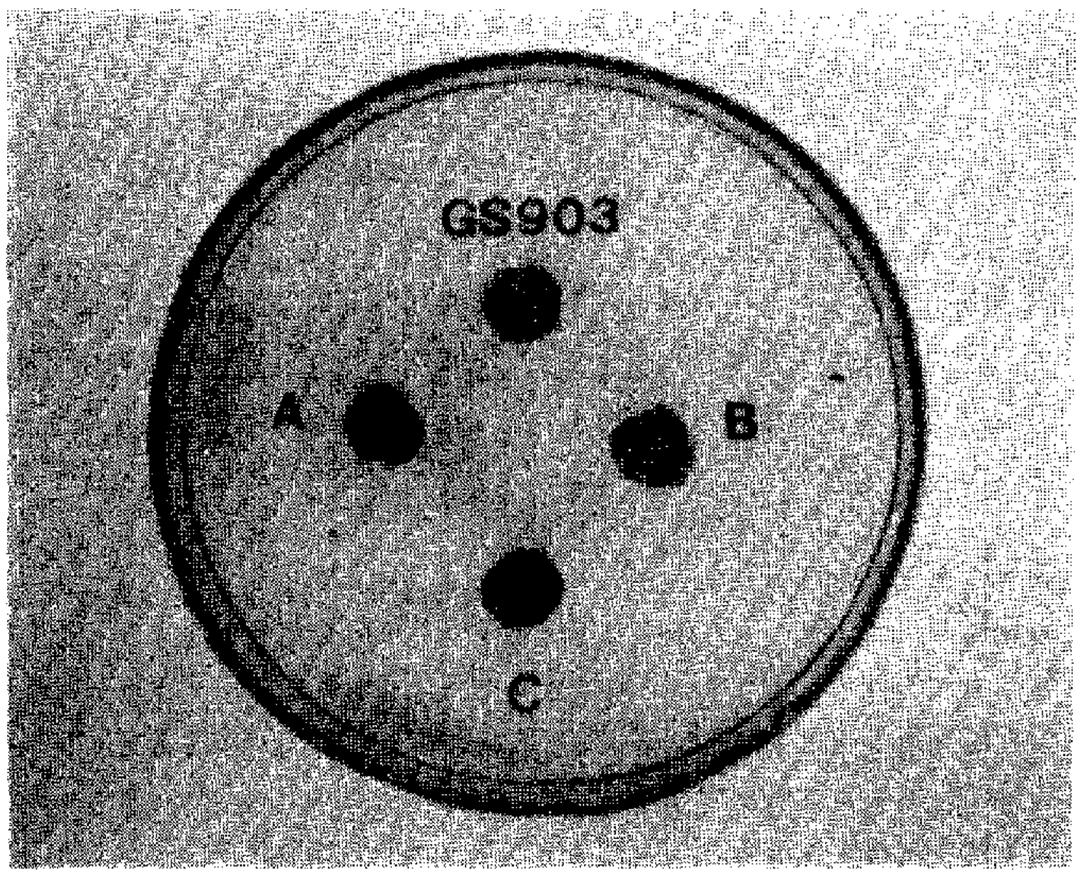

Fig. 2. Color of transformants.
Colonies were stained with nitroprusside. GS903 which is host strain deficient in GSH-I activity, shows the white-pink color. A, B, and C are transformants, expressing red color except B after the treatment with nitroprusside.

대응하는 제한효소 부위에 삽입하여 구성한 플라스미드를 pGH300으로 명명하였다.

재조합 플라스미드들의 특성

pGH100 플라스미드(Fig. 3)와 pGH300 플라스미드(Fig. 4)의 제한효소 지도를 작성한 결과, 이 재조합 플라스미드는 Murata 등에 의해 보고된 pBR322-*gsh*I 및 pBR322-*gsh*II의 제한효소 지도와 일치하였다(11-13). 한편 Murata 등에 의해서 클로닝된 *E. coli* B *gsh*II 유전자는 2.4 Kb의 *Hin*dIII 제한효소의 절편을 포함하여(12) *E. coli* K-12에서 유래된 것과 다른 크기의 절편내에 존재함을 확인하였다. 그러나 그 절편내에 존재하는 1.4 Kb *Bam*HI-*Hin*dIII DNA 절편은 pGH300 플라스미드의 *Bam*HI-*Hin*dIII DNA 절편과 그 크기가 일치함을 확인하였다.

재조합 플라스미드의 발현

*gsh*I 유전자가 클로닝된 형질전환체들의 글루타치온 함량과 GSH-I 활성을 조사한 결과가 Table 3에 나타나 있다. 형질전환체 C는 *gsh*I 유전자를 함유하지 않은 대조균주에 비해 8배의 높은 GSH-I 효소활성을 보여주고 있다. 형질전환체 A와 B의 GSH-I 활성이 형질전환체 C보다 낮은 이유는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 형질전환체 B로부터 분리한 재조합 플라스미드

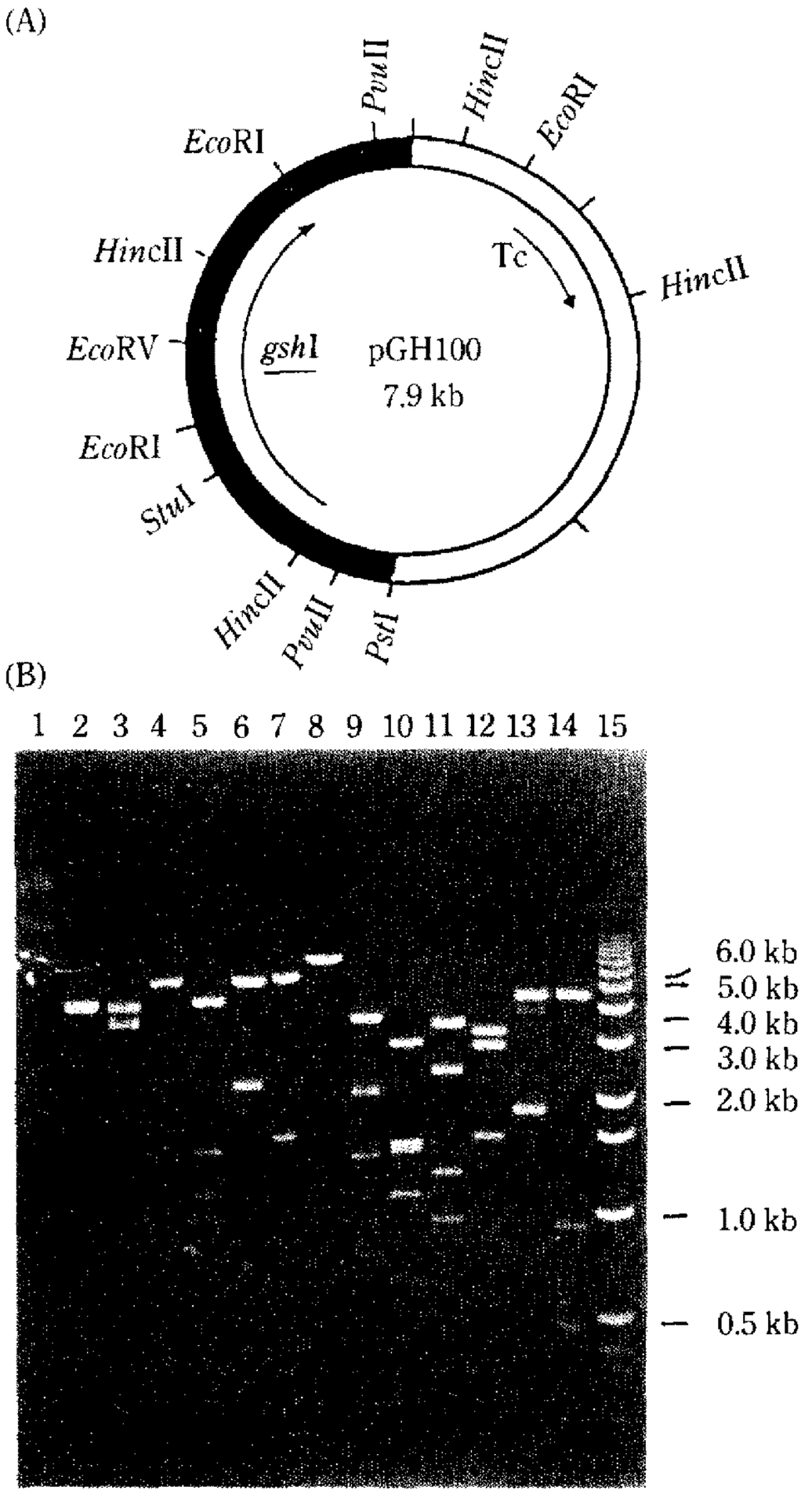

Fig. 3. Restriction map of pGH100 plasmid originated from pBR322 which contains 3.6 Kb *gsh*I gene region.
(A) is the circular map of pGH100 (pBR322-*gsh*I). (B) is the restriction patterns of pGH100 fractionated on a 1% agarose gel.
Lane 1: pGH100, lane 2: pBR322+*Pst*I, lanes from 3 to 14 indicate the digestion pattern of pGH100 with *Pst*I, *Eco*RI, *Hin*cII, *Eco*RV, *Pvu*II, *Stu*I, *Pst*I+*Eco*RI, *Pst*I+*Hin*cII, *Pst*I+*Eco*RV, *Pst*I+*Pvu*II, *Pst*I+*Stu*I, and *Eco*RI+*Hin*cII, respectively. Lane 15: 1 Kb ladder DNA (marker).

는 *gsh*I 유전자가 존재하지 않은 반면 형질전환체 A는 *gsh*I 유전자가 포함된 3.6 Kb의 삽입 DNA 뿐만 아니라 다른 여러 DNA 조각이 삽입되어 있어 *gsh*I 유전자가 발현하는데 어떤 영향을 주어 그 효소활성이 떨어진 것으로 생각된다.

*gsh*I 및 *gsh*II 유전자들의 보다 효율적인 발현을

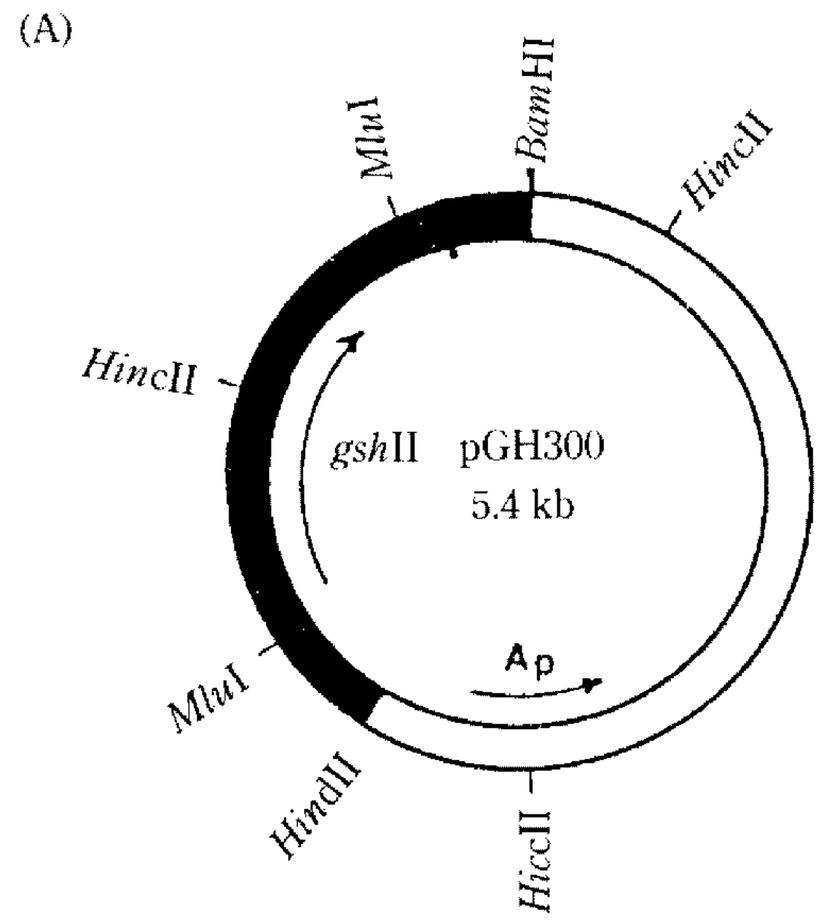

Fig. 4. Restriction map of pGH300 plasmid containing *gsh*II gene.

(A) describes the circular map of pGH300 (pBR322-*gsh*II). (B) lane 1 is the undigested pGH300 and lanes 2 to 8 represent digestion patterns of pGH300 with *Hin*dIII, *Mlu*I, *Bam*HI, *Hin*cII, *Mul*I+*Hin*dIII, *Hin*dIII+*Hin*cII, and *Hin*dIII+*Bam*HI, respectively. Lane 9 is 1 Kb ladder DNA as a size marker.

모색하기 위하여 세포내의 copy수가 pBR322보다 많은 pUC8 플라스미드에 이 *gsh*I 유전자를 subcloning하여 pGH200(pUC8-*gsh*I)으로 명명하였으며, 또한 유전자 이외의 불필요한 non-coding sequence를 제거함으로써 삽입 DNA의 크기를 줄이기 위하여 3.6 Kb의 삽입 DNA 절편 중 약 1.95 Kb의 *Alu*I DNA

Table 3. Glutathione contents and GSH-I activities in the cells of various transformants

Strains	Glutathione contents in cells[a]	GSH-I[b]
HB101	0.11 (1.0)	0.16 (1.0)
Transformant A	0.68 (6.2)	0.75 (4.7)
Tarnsformant B	0.40 (3.6)	0.42 (2.6)
Transformant C	0.84 (7.6)	1.24 (7.8)

All strains were grown on VB minimal medium at 37℃ for 36 h. Values in parentheses show the relative activity and content as described in Materials and Methods. The content and enzyme activity of *E. coli* strain HB101 were taken as 1.00.

[a]Glutathione content [mg/g(wet wt. cells)]

[b]μmol/h/mg protein

Table 4. Enzyme activities of *E. coli* HB101 harboring various recombinant plasmids

Plasmids	Glutathione contents in cells[a]	Activities[b] GSH-I	GSH-II
None	0.22 (1.00)	0.15 (1.00)	0.34 (1.00)
pGH100	0.65 (2.82)	2.15 (14.30)	0.34 (1.00)
pGH101	0.60 (2.73)	2.05 (13.60)	0.34 (1.00)
pGH200	0.82 (3.73)	4.60 (30.60)	0.32 (1.00)
pGH201	0.79 (3.59)	4.52 (30.10)	0.32 (1.00)
pLF4	0.28 (1.27)	0.15 (1.00)	3.10 (9.10)
pLF6	0.27 (1.24)	0.15 (1.00)	3.10 (9.10)
pGH300	0.26 (1.21)	0.15 (1.00)	2.40 (7.10)

[a]Glutathione content [mg/g(wet wt. cells)]

[b]μmol/h/mg protein

절편은 *gsh*I 유전자의 발현에 관계하는 모든 부위를 포함하고 있기 때문에(25)이 절편을 분리하여 pBR 322의 *Eco*RV 제한효소 절단부위에, 그리고 pUC8의 *Hin*cII 제한효소 절단부위에 도입시켜 이들을 각각 pGH101(pBR322-*gsh*I)과 pGH201(pUC8-*gsh*I)으로 명명하였다.

Table 4에서 나타난 바와 같이 copy수가 다른 벡터에 3.6 Kb의 삽입 DNA를 함유한 pGH200 플라스미드를 함유한 균주는 pGH100 플라스미드를 함유한 균주보다 GSH-I 활성이 2배 높았으며, pGH100과 pGH101 그리고 pGH200과 pGH201 플라스미드를 함유한 균주는 그 효소활성에 있어서 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *gsh*I 유전자가 포함된 삽입 DNA의 크기 차이에 의해서는 *gsh*I 유전자의 발현이 영향을 받지는 않으나 벡터의 copy수에 의해서는 유

전자의 증폭효과가 크게 나타남을 보여주었다. 또한 *gsh*I 유전자의 발현에 있어서는 삽입 DNA 절편의 크기가 다른 pLF4(2.2 Kb)와 pLF6(1.4 Kb) 플라스미드에 의해서는 GSH-II 효소활성의 차이가 나타나지 않았으며, copy수가 다른 pLF6와 pGH300을 도입한 HB101 균주에서는 GSH-II 효소활성이 약간의 차이를 보여주었다. 이러한 결과는 글루타치온 합성효소를 증폭하여 효소법으로 글루타치온을 생산하고자 할 때 copy수가 높은 벡터를 이용하여 그 유전자를 증폭시키는 것이 바람직함을 시사하고 있다.

한편 *gsh*I 및 *gsh*II 유전자의 클로닝에 의해 글루타치온 합성효소들의 활성은 크게 증가하였으나, 이에 비례하여 세포내에 존재하는 글루타치온 함량은 거의 증가하지 않았다(Table 4). 이것은 글루타치온이 두 효소에 의해서 생합성되므로 각각 한 단계의 효소가 클로닝에 의해서 증폭되었더라도 또 다른 단계의 효소가 rate-limiting step이 되기 때문일 것으로 생각된다. 따라서 하나의 벡터에 글루타치온 합성에 관여하는 *gsh*I 및 *gsh*II 두 유전자를 동시에 갖는 재조합 플라스미드를 구성하면 글루타치온 함량이 증가할 것으로 기대된다. 그러나 한편으로는 글루타치온 합성이 ATP, 기질 등의 부족으로 직접 발효에 의해서는 한계점이 있으리라 사료된다.

요 약

글루타치온 생산증대를 도모하기 위하여 글루타치온 합성에 관여하는 효소들인 GSH-I 및 GSH-II 유전자들을 pBR322 벡터에 클로닝하였다. *gsh*I 유전자를 클로닝하기 위하여 GSH-I 효소활성이 결여된 GS 903 균주를 분리하였다. *E. coli* K-12 염색체 DNA로부터 분리된 3.6 Kb *Pst*I DNA 절편내에 *gsh*I 유전자가 존재하였으며 이 절편을 pBR322 벡터에 클로닝하였다. *gsh*II 유전자는 2.2 Kb *Pst*I-*Bam*HI DNA 절편내에 존재하며 이 절편을 pUC13 벡터에 클로닝하였다. 플라스미드의 copy number와 *gsh* 유전자들을 포함하고 있는 삽입 DNA의 크기의 차이에 의한 *gsh* 유전자들의 발현 정도를 조사하기 위하여 pGH100, pGH101, pGH200, pGH201, pLF4, pLF6 그리고 pGH 300같은 여러 플라스미드를 제조하였다. pBR322 플라스미드 대신 pUC계통의 플라스미드를 사용함으로써 *gsh*I 유전자의 발현이 의해 2배 이상 증가하였다. 그러나 벡터 플라스미드내에 존재하는 *gsh* 유전자들을 포함하는 삽입 DNA의 크기의 차이에 의해서는 *gsh* 유전자들의 발현이 영향을 받지 않았다.

감사의 말

본 연구는 문교부 학술연구 조성비(유전공학분야)에 의해서 수행된 연구의 일부이며, 또한 pLE4 플라스미드를 제공하여 주신 임창진 박사님(강원대)께 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Hopkins, F.G.: *Biochem. J.*, **15**, 286 (1921)
2. Kosower, N.S. and E.M. Koswer: *Int. Rev. cytol.*, **54**, 109 (1978)
3. Meister, A. and M.E. Anderson: *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 711 (1983)
4. Meister, A. and S.S. Tate: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 559 (1976)
5. Sawa, Y., H. Shindo, S. Nishimura and H. Ochiai: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1361 (1986)
6. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 23 (1978)
7. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *J. Appl. Biochem.*, **1**, 283 (1979)
8. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 11 (1980)
9. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *Biochimi.* **62**, 347 (1980)
10. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *Enz. Microb. Technol.*, **3**, 233 (1980)
11. Murata, K. and A. Kimura: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1444 (1982)
12. Murata, K., T. Miya, H. Gushima and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1381 (1983)
13. Gushima, H., T. Miya and A. Kimura: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1927 (1983)
14. Jackson, C.R.: *Biochem. J.*, **111**, 309 (1969)
15. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
16. Gushima, H., T. Miya, K. Murata and A. Kimura: *J. Appl. Biochem.*, **5**, 210 (1983)
17. Tietze, F.: *Anal. Biochem.*, **27**, 520 (1969)
18. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning, A labolatory manual, Cold Spring Harbor, New York, 97 (1982)
19. Ish-Horowicz, D.J.F.: *Nucl. Acids Res.*, **9**, 2989 (1981)

20. Vogel, H.J. and D.M. Bonner: *J. Biol. Chem.*, **218**, 97 (1956)
21. Apontoweil, P. and W. Berends: *Biochim. Biophys. Acta.*, **399**, 10 (1975)
22. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 545 (1980)
23. Murata, K., K. Tani, J. Kato and I. Chibata: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2131 (1981)
24. Murata, K. and A. Kimura: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1047 (1982)
25. Watanabe, K., Y. Yamano, K. Murata and A. Kimura: *Nucl. Acids Res.*, **14**, 4393 (1986)

(Received September 11, 1991)