

Pseudomonas sp. W7로부터 Agarase 유전자의 cloning 및 *Escherichia coli*에서의 발현

하정철 · 김구택 · 김성구 · 유주현¹ · 공인수*
부산수산대학교 생물공학과, ¹연세대학교 식품생물공학과

Molecular Cloning and Expression of an Agarase Gene from *Pseudomonas* sp. W7 in *Escherichia coli*

Jeong-Chul Ha, Gu-Taek Kim, Sung-Koo Kim, Ju-Hyun Yu¹ and In-Soo Kong*

Department of Biotechnology and Bioengineering, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

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

Abstract — A marine bacterium which produces extracellular agarase was isolated from sea water. Isolated strain was identified as *Pseudomonas* sp. by the morphological and biochemical properties (1). *Hind*III restriction fragment of 3.2 kb from *Pseudomonas* genomic DNA was cloned into pUC19 to obtain recombinant plasmid pJA1 which enables *E. coli* JM83 to produce agarase. Most of agarase produced in *E. coli* was secreted into the culture medium. The enzyme (pJA1) showed the highest agarase activity during the stationary phase (20 hrs) of *E. coli*. The optimum temperature and pH were 40°C and 7.8, respectively. Restriction gene map analysis revealed that it has different restriction pattern with three kind of agarase gene reported.

해양환경에 산재하고 있는 agar는 공업적 목적 내지는 식량자원으로 이용가능한 대표적 polysaccharide이다. 일반적으로 해조류의 세포벽에 다량 존재하는 agar의 구조는 확실히 규명되어 있지는 않으나, 대체로 agarose와 agaropectin의 두 형태로 존재하는 것으로 알려져 있다. Agarose는 1→3 결합으로 연결된 β-D-galactose와 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro-α-L-galactose의 연쇄로 구성된 neutral polymer 형태이며, agar polysaccharide의 약 70% 정도를 차지한다. Agaropectin은 3,6-anhydro-α-L-galactose 잔기의 일부가 L-galactose sulphate로 D-galactose 잔기의 일부가 pyruvic acid acetal 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose로 치환된 형태로 구성된 charged polymer이다. Agar의 주성분인 agarose는 가수분해에 의해, 2가지 다른 종류의 oligosaccharide를 생성하는데, agarobiose를 구성단위로 하는 agarooligosaccharide와 neoagarobiose를 구성단위로 하는 neoagarooligosaccharide이다(2).

T. Kono(3, 4) 등은 agar의 가수분해로부터 얻어진

neoagarooligosaccharide의 특성으로 1) 전분노화작용이 강하다. 2) 난분해성으로 소화효소, 아울러 장내세균에 의해서도 분해되지 않는다. 3) 가열처리하면 정균 작용을 나타내는 유용한 heterooligosaccharide라고 보고하고 있다. 이와같은 중요성으로 말미암아 세계적으로 agar 분해 효소의 개발을 목표로 활발한 연구를 진행하고 있는 실정이다. Agarose를 분해하는 효소를 그 분해 기작에 따라 분류하면, 두가지 그룹으로 분류할 수 있다. agarose의 α-1,3 결합을 절단하는 α-agarase, β-1,4 결합을 절단하는 β-agarase로 분류할 수 있다(5, 6). α-agarase는, 그램 음성 박테리아에 존재하리라고 예측되지만 특성이 검토되거나 정제되어졌다는 보고가 아직 없다. 반면에, 여러 종류의 β-agarase가 *Cytophaga* sp.(7), *Pseudomonas* sp.(8), *Vibrio* sp.(9) 그리고 *Streptomyces* sp.(10) 등에서 발견되었다. 그러나 지금까지 많은 β-agarase가 분리되고, 생화학적 연구가 진행되어 온 사실에도 불구하고, 클로닝과 유전자수준에서의 연구분석은 단지 3건 정도가 보고되어 있을 뿐이다. 세포외 β-agarase (M.W. 57,486) 유전자와 signal peptide를 포함하고 있는 *Pseudomonas atlantica*의 *agrA* gene, 309개 아미노산으로 구성되어 있는 *Streptomyces coelicolor* 유

Key words: Agarase gene, *Pseudomonas*, *E. coli*
*Corresponding author

래의 *dagA* gene 그리고 *Vibrio* sp. 유래의 *agaA* gene (M.W. 105,271) 등이 그것이다.

본 연구실에서는 agar의 효율적인 효소분해에 의하여 유용한 oligosaccharide의 경제적 대량 공급의 가능성을 검토하기 위하여 agar 분해능이 뛰어난 균주를 우리나라 남해안의 바닷물로부터 분리하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였으며 이균으로부터 agar 분해 효소인 agarase를 분리, 정제하여 보고하였다(1). 본 연구에서는 분리된 *Pseudomonas* sp.로부터 agarase 유전자를 클로닝하였으며 *E. coli*에서 발현된 agarase의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주와 플라스미드

Agarase 유전자의 공여체(gene donor)로 사용한 균주는 전라남도 완도에서 채취한 해수에서 분리한 *Pseudomonas* sp. W7 균주이었으며(1) 사용한 *E. coli* 균주는 JM83[*ara*, Δ (*lac-pro* AB), *rpsL*, Φ 80, *lacZ* Δ M15]를 사용하였고, 클로닝 vector로는 pUC19를 사용하였다.

배지 및 배양조건

Pseudomonas sp. W7 균주는 본 실험실에서 변형시킨 marine 배지(Bacto peptone 5 g, Bacto yeast extract 1 g, Ferric citrate 0.1 g, Ammonium Nitrate 0.0016 g, Disodium hydrogen phosphate 0.008 g, Bacto agar 1.5%/Artificial sea water 1 l(pH 7.8))를 사용하여 25°C에서 진탕배양하였으며 *E. coli*의 경우는 LB 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 항생물질 첨가량은 ampicillin 50 μ g/ml를 사용하였고, ampicillin과 X-Gal, IPTG가 첨가된 LB agar 배지를 이용하여 형질전환된 colony를 선택하였다. 평판배지상에서, 세포의 agarase의 식별을 위해서 ampicillin과 1.5% agar가 포함된 LB 고체 배지를 이용하였다.

사용시약

Agarose(Type II), RNase, Protease 등은 Sigma Co., T4 DNA ligase, Calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)와 기타 모든 제한 효소(*Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI, *Kpn*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Dra*I 등)는 Boehringer Mannheim 제품을 구입사용하였으며 기타 일반 시약류는 시판 일급 이상의 분석용을 사용하였다.

Chromosomal DNA 분리

Pseudomonas sp. W7의 genomic DNA는 Marmur

등의 방법(11)의 변법을 이용하여 다음과 같이 분리하였다. 24시간 배양(100 ml)해서 얻은 균체를 원심분리로 회수한 후에 25% sucrose, Tris-HCl(pH 8.0) 15 ml로 1회 세척한다. 세척 후 다시 원심분리하여 5 ml TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하고 1.5 ml의 lysozyme(4 mg/ml)을 첨가한 후 37°C에서 60분간 반응시킨다. 2.5% SDS를 1.5 ml 첨가하여 잘 혼합하고 실온에서 10분 정도 반응시킨 후 protease K를 55°C, 90분간 반응시켰다.

Phenol : chloroform(1 : 1)을 이용하여 3회 추출한 후 2~3배의 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 하룻밤 정치시키고, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리한다. 마지막으로 70% ethanol로 세척한 후 TE buffer 2 ml에 용해시켜 보관하였다.

플라스미드 분리

플라스미드의 대량 분리 정제는 Sambrook(12)과 Ish-Horowitz(13)의 방법의 변법이나 polyethylene glycol을 이용하였다. 플라스미드의 소량분리정제를 Holmes와 Quigley의 방법(14)에 따라 실시하였다.

재조합 플라스미드 제조

모든 제한 효소 절단은 Maniatis 등의 방법(15)에 준하여 행하였다. Agar 분해효소를 생성하는 균으로부터 genomic DNA를 *Hind*III나 *Eco*RI를 이용하여 무작위로 자른 후에 전기영동을 행하여 절단부위를 확인하였다. Circular plasmid pUC19 DNA를 *Hind*III나 *Eco*RI를 이용하여 자른후에 calf intestinal alkaline phosphatase로 탈인산화시킨 후 linear pUC19을 전기영동으로 확인하였다. 그리고 68°C, 5분간 가열시켜 반응을 중단시킨 후 phenol : chloroform 추출후 ethanol에 침전시켜 ligation 반응을 위한 DNA를 회수하였다. Chromosomal DNA fragment와 plasmid pUC19 vector를 15°C, 16~17시간 ligation 시켰다.

E. coli JM83에의 형질전환과 형질전환체의 선별

재조합 플라스미드 DNA의 *E. coli* JM83에의 형질전환은 Mandel과 Higa 등(16)이 확립한 CaCl_2 방법에 따라 실시되었다. Transformation mixture를 300 μ l씩, ampicillin, IPTG와 X-Gal이 포함된 LB agar 배지에서 도말하여, insertional inactivation을 일으킨 형질전환된 흰색의 colony들을 선택하였다.

흰색을 나타내는 형질전환된 *E. coli* JM83의 colony만 선별하여 agarase 선택배지에 옮겨 37°C에서 하루 배양한 후 Gran's Iodine solution(0.05M iodine in 0.12M KI)(17)을 뿌려 균체주위에 투명환을 나타내거나 agar 배지상에 함몰성을 나타내는 1개의 co-

lony를 선택하여 보존하였다.

Agarose gel electrophoresis

전기영동에는 TBE buffer를 사용하였고, ethidium bromide(0.5 µg/ml)를 0.8% agarose gel에 첨가하여 DNA를 염색하였다. λ DNA를 HindIII로 절단한 단편을 size marker로 이용하였다.

효소활성 측정

세포배양액을 이용한 agarase 효소활성의 정량적 측정은 Somogyi-Nelson의 방법(18)에 따라 행한 후, spectrophotometer(Gilford model 240)를 사용하여 510 nm에서 흡광도로 측정하였다. 기질용액[1 g Agarose/l, 20 mM Tris-HCl(pH 7.8)] 1 ml에 효소액 200 µl를 가하고, 40°C에서 30분 반응 후 끓는 물에 3분간 두어 반응을 정지시켰다. 원심분리 후, 상층액에 유리된 환원당을 정량하는 방법으로, 활성을 측정하였다. galactose와 glucose의 환원당 정량 표준곡선을 agarase 활성에 대한 표준값으로 이용하였고 최종 반응값은 기질 용액에 효소액을 가지고, 효소 반응만을 시키지 않고 동일 과정을 행한 후 얻은 값을 빼 주는 방법으로 보정하였다. 1 unit의 agarase 활성은 분당 1 µmol의 D-galactose에 해당하는 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

E. coli JM83에서 pJA1 agarase의 Localization

세포내외와 periplasmic 상에 존재하는 효소의 활성은 Cornelis *et al*(19)의 방법에 따라 측정하였다. 초기 정지기의 E. coli 균체를 모은 후, 10 mM Tris-HCl(pH 7.8)로 두번 씻은 후 TES buffer[20 mM Tris-HCl(pH 7.8), 1 mM EDTA, 25%(w/v) sucrose]에 다시 현탁시켰다. 현탁액을 실온에서 10분간 진탕배양하고, 8000 rpm에서 10분간 원심분리 후 모은 균체를 4°C 증류수에 현탁시켰다. 4°C에서 10분간 다시 진탕배양하고 9000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻

은 균체를 sonicator(Sonics & Materials Inc., DANBURY, CT, U.S.A; output control 4, Duty cycle 70%)를 이용 파쇄하였다. 세포외 agarase 활성은 상층액, 2번의 세척 그리고 EDTA 처리 후 상층액의 효소활성 각각의 함으로 나타내고 periplasmic에 존재하는 효소활성은 증류수에 처리 후 상층액으로 세포내에 존재하는 효소활성은 sonication 후 상층액의 활성 측정으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Agarase 유전자의 클로닝

Agarase를 세포외로 다량 생산하는 *Pseudomonas* sp. W7 균주의 genomic DNA를 HindIII로 절단, 분리한 3~8 kb의 DNA 단편과 HindIII로 절단 후 CIP 처리한 pUC19 DNA를 ligation 시켜 E. coli JM83에 형질전환시켰다. Ampicillin과 X-Gal, IPTG가 포함된 LB agar 선별 배지에서 흰색을 나타내는 균주를 약 5,000개를 분리하여, agar를 분해하여 Iodine solution을 가했을 때 투명환을 형성하는 colony를 선별하였다(Fig. 1).

분석 결과 Fig. 2에 표시되어 있는 바와 같이, 약 3.2 kb의 DNA 단편이 삽입된 재조합 플라스미드를 가지고 있는 것을 확인하였다.

pJA1 재조합 플라스미드의 제한효소 지도

pJA1에 삽입된 3.2 kb 삽입 DNA의 제한효소 지도를 작성하기 위하여, 각종 제한 효소 처리후 DNA 단편을 분석하였다(Fig. 3).

DNA 단편 내의 KpnI, BstXI과 SalI의 한쪽 위치는 단일 처리와 HindIII와의 두 가지 제한 효소 처리 후 나타나는 결과로 결정하였으며 BstXI의 나머지

Table 1. Localization of Agarase in E. coli JM83 (pJA1)

Location	Agarase activity (Units/ml) ^a
Cytoplasm	0.4(3) ^b
Periplasm	3.15(26)
Growth medium	8.6(71)

^aOne unit is defined as the amount of Agarase producing 1 µmol D-galactose per minute

^bPercent of total activity

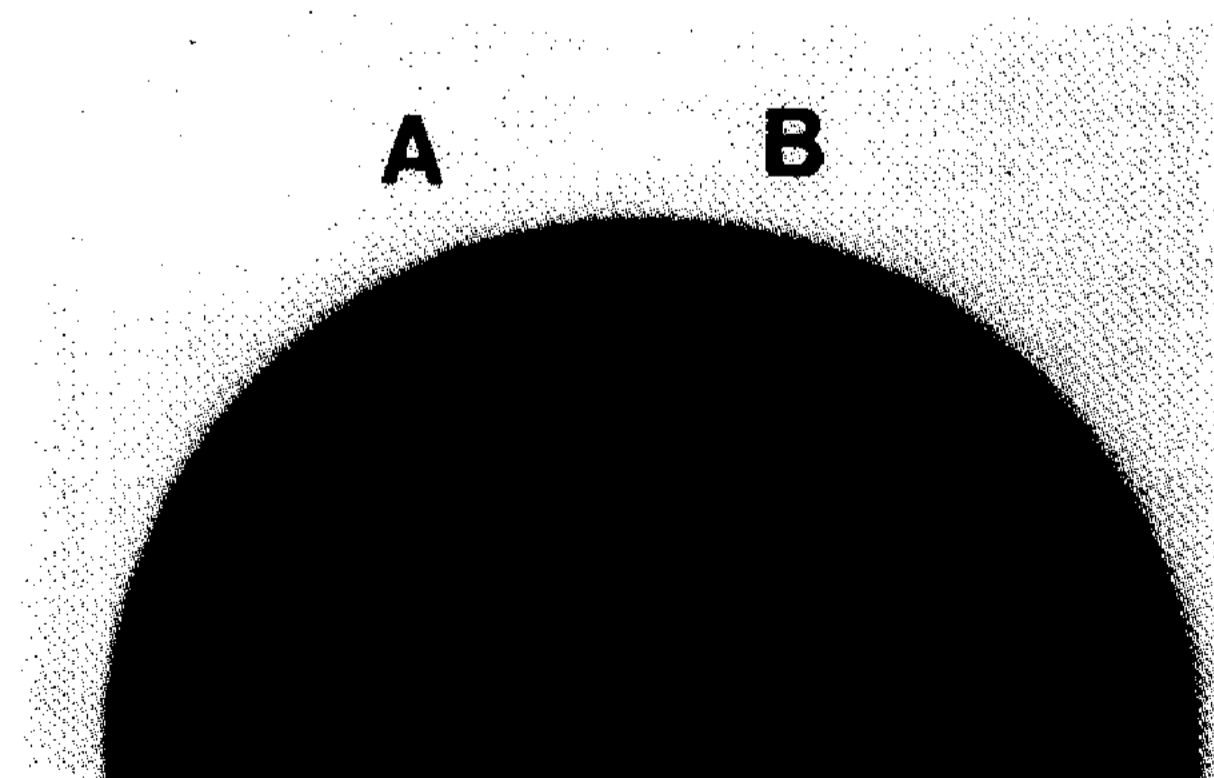


Fig. 1. Clear zone showing the agarase activity from recombinant plasmid pJA1 in E. coli JM83. A: pJA1, B: pUC 19 (control)

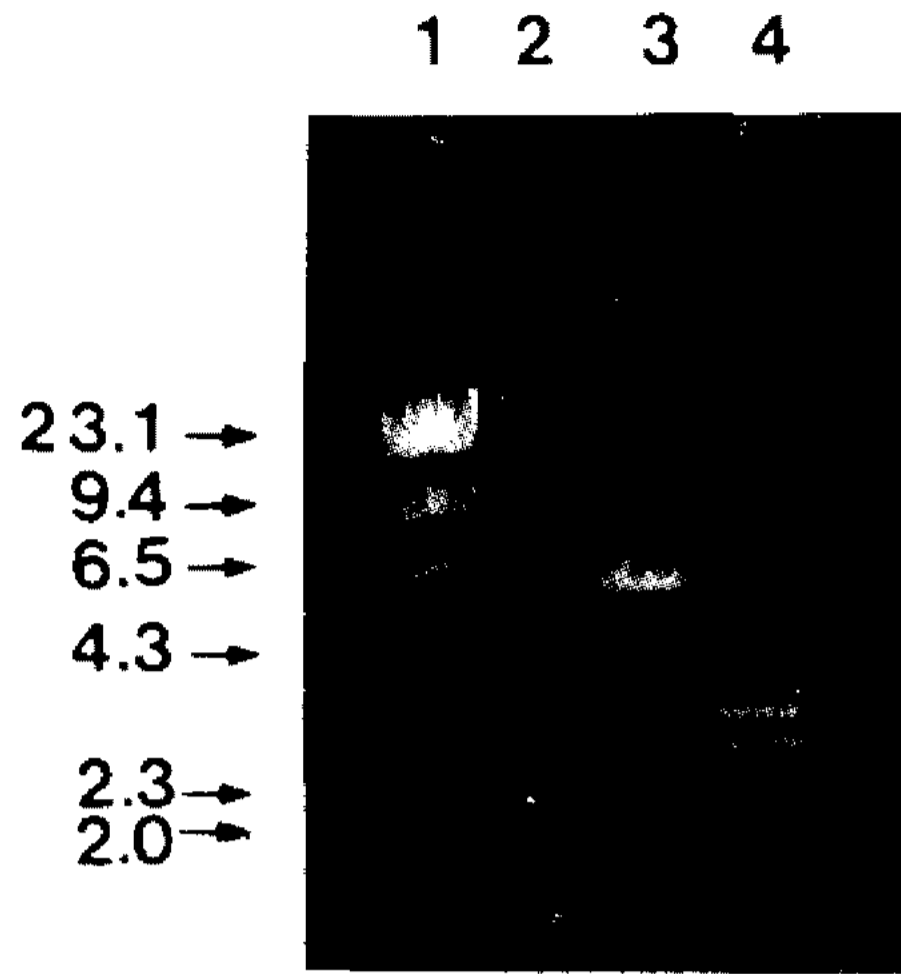


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of the recombinant plasmid pJA1.
 Lane 1; *Hind*III digest of λ -DNA (size marker)
 Lane 2; *Hind*III digest of pUC19 (control)
 Lane 3; pJA1
 Lane 4; *Hind*III digest of pJA1 insert

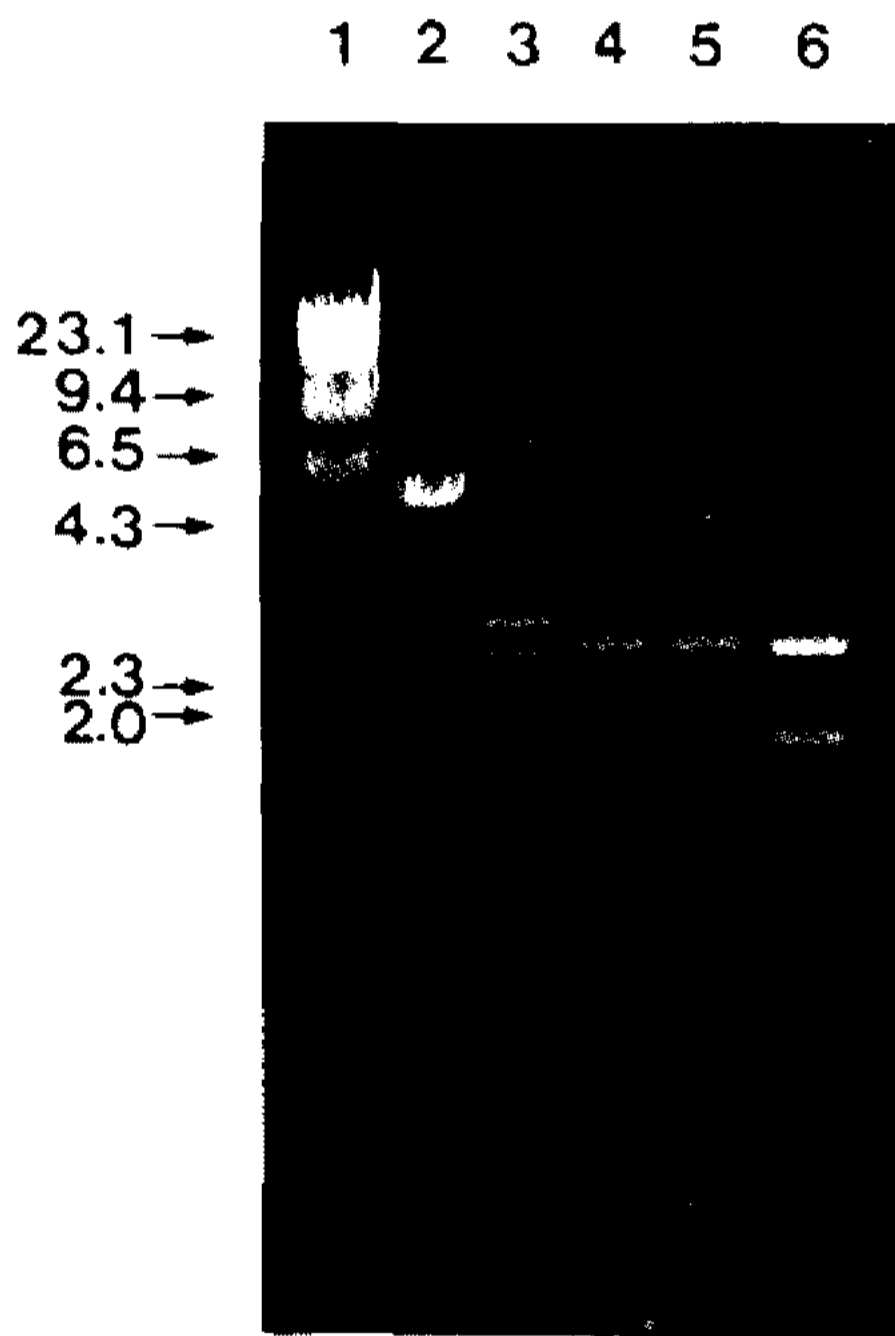


Fig. 3. Restriction enzyme digestion pattern of pJA1.
 Lane 1; *Hind*III digest of λ -DNA (size marker)
 Lane 2; *Eco*RI digest of pJA1
 Lane 3; *Hind*III digest of pJA1
 Lane 4; *Kpn*I/*Hind*III double digest of pJA1
 Lane 5; *Sal*I/*Hind*III double digest of pJA1
 Lane 6; *Bst*XI/*Hind*III double digest of pJA1

위치는 *Bst*XI과 *Eco*RI, *Hind*III의 두 가지 제한 효소 처리 결과를 바탕으로 분석하였다. *Sal*I의 나머지 위치는 위치가 밝혀진 *Bst*XI을 이용하여 분석하여 Fig. 4와 같은 제한 효소 지도를 작성하였다. Fig. 4의 제

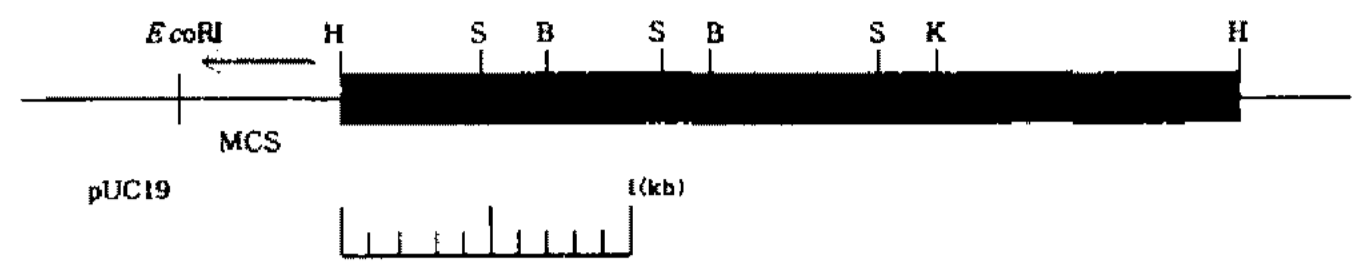


Fig. 4. Restriction enzyme map of pJA1.
 Restriction sites: B, *Bst*XI; K, *Kpn*I; H, *Hind*III; S, *Sal*I

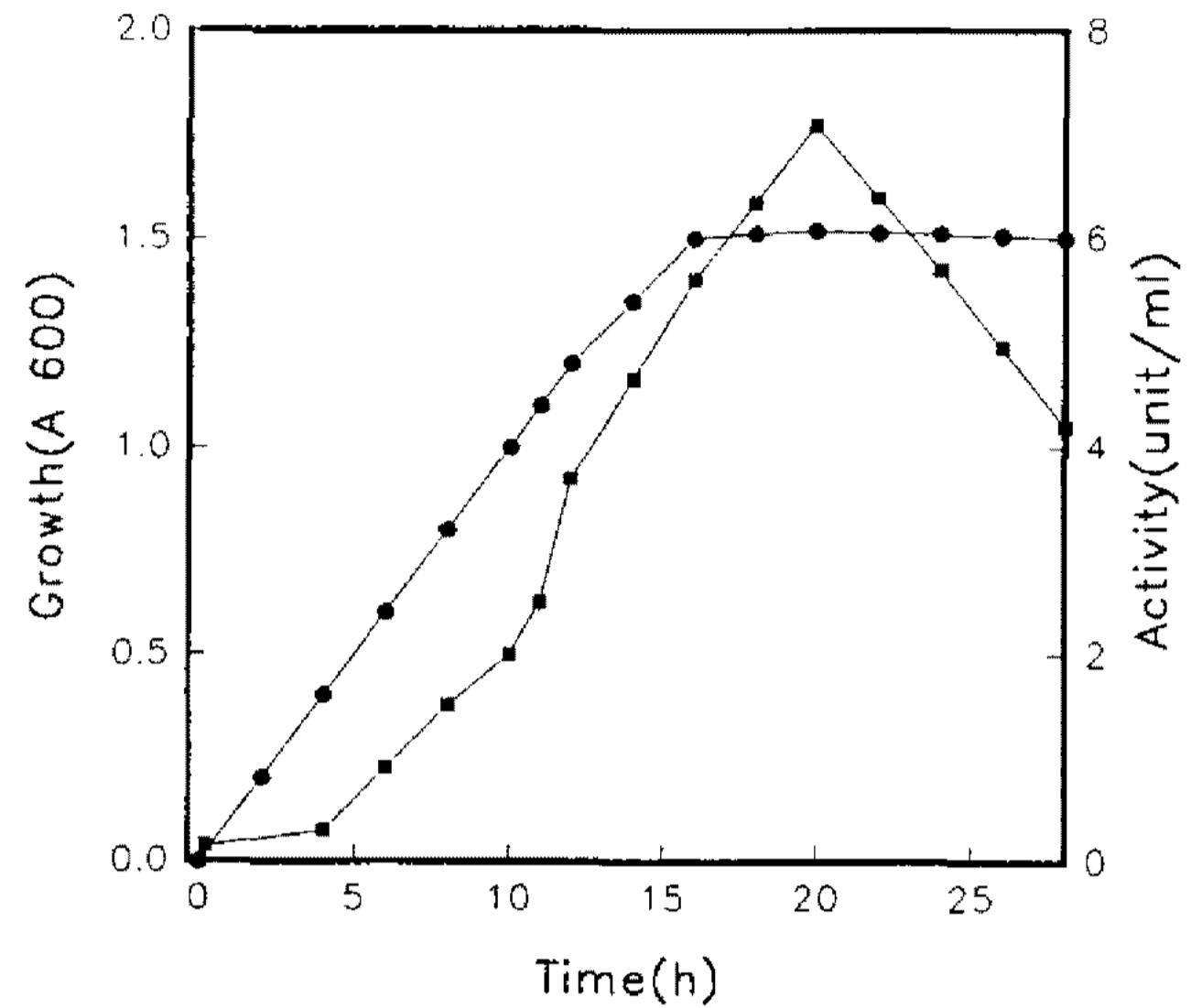


Fig. 5. Expression of extracellular agarase gene and growth of *E. coli* JM83
 ●: Growth curve of *E. coli* JM83 (pJA1)
 ■: Agarase activity

한 효소지도에 기초하여 subcloning을 행하여 다양한 크기의 mutant를 얻었고 현재 전체 sequencing을 시행하고 있다. pJA1을 지니는 *E. coli*로부터 발현되는 agarase를 정제한 결과 약 58 KDa 정도의 분자량을 갖는 것으로 확인하였다(data is not shown). 이같은 결과로 발현되는 agarase가 클로닝된 유전자 자체에 지니는 promoter를 사용하여 *E. coli*에서 단백질을 생산하는 것으로 추정된다.

배양시간에 따른 cell growth, enzyme activity 측정

E. coli JM83에서 agarase의 활성을 성장곡선에 따라 측정한 결과, 성장 초기에는 활성이 완만하게 증가하다, 약 20시간에 해당하는 정지기에서 가장 높은 agarase 활성을 보이다가 다시 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5).

효소적 특성

효소의 최적 pH를 결정하기 위하여, pH 2.0~6.5는 citrate phosphate buffer를, pH 7.0~8.5는 Tris-HCl

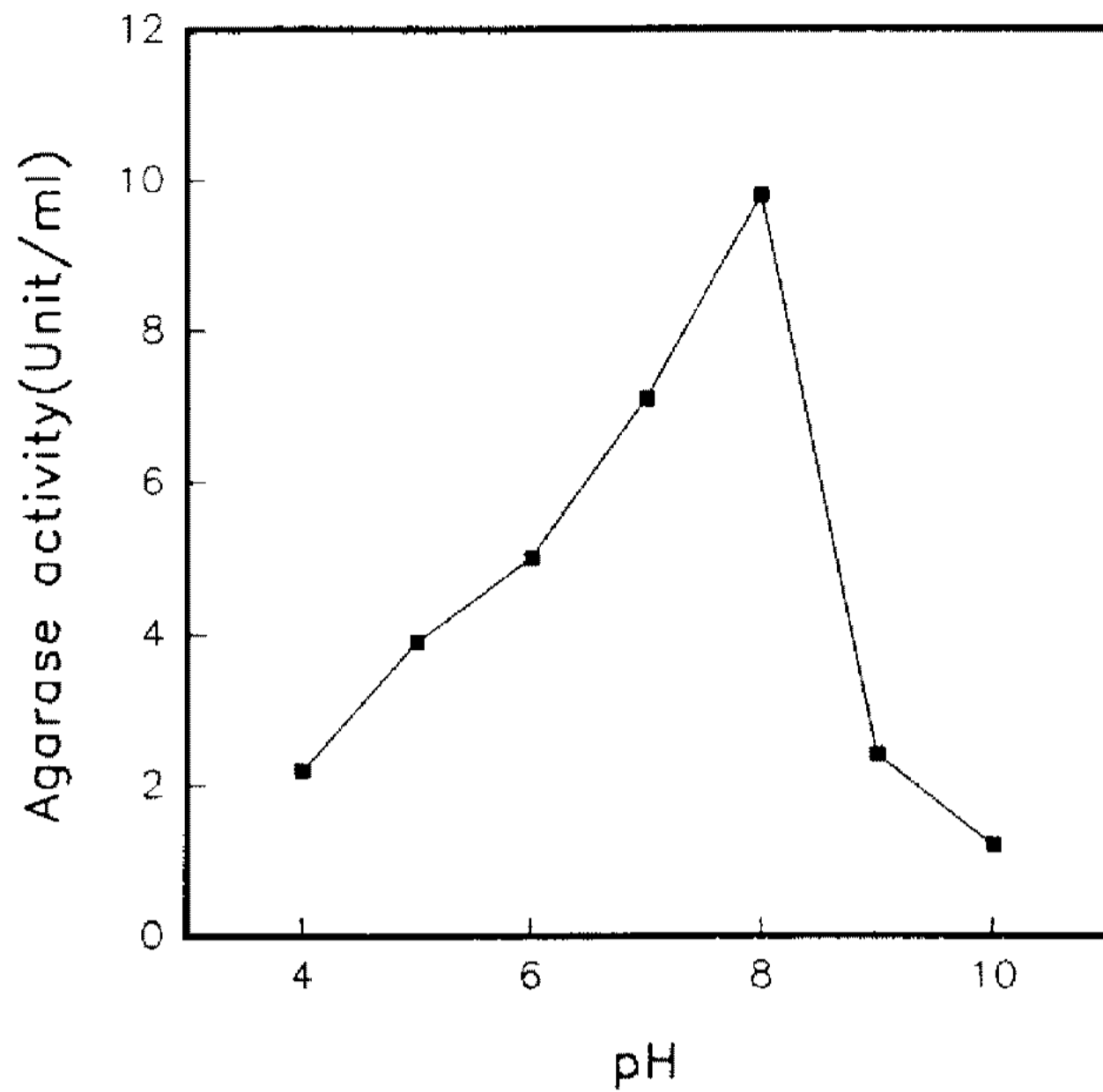


Fig. 6. Effect of pH on agarase activity.

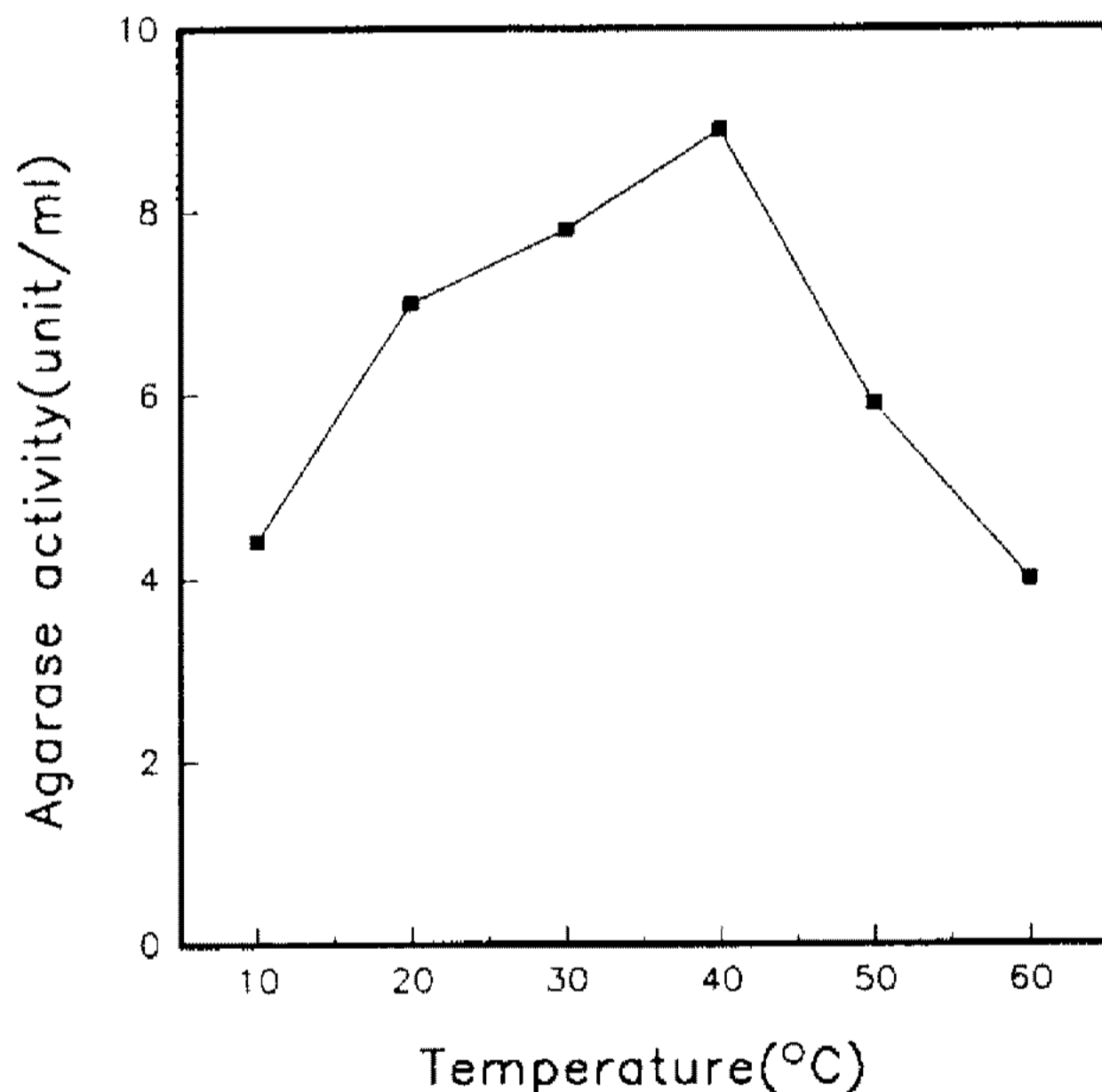


Fig. 7. Effect of temperature on agarase activity.

buffer를, pH 9.0~10.0까지는 carbonate-bicarbonate buffer를 사용하여 pH 2.0~10.0까지의 각 pH에 따른 활성을 알아보았다. pH 2.0~10.0 범위에서 기질용액 (0.1% agarose)을 만들어 최적시간까지 배양한 배양액의 상층액을 가지고 40°C에서 30분간 반응 후 효소 활성을 측정해 본 결과 pH 7.8에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 6). 20 mM Tris-HCl buffer에서 반응시간 30분, 반응온도를 10°C에서 60°C까지 각기 달리하여, 효소의 활성을 측정해 본 결과, 40°C에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 7). 지금까지 보고된 대부분의 해양 유래 미생물이 분비하는 agarase는 다음과 같은 특

징을 가지고 있다(20). 첫째는 중성 또는 약산성 조건에서 최적 활성을 나타내고 있고, 둘째는 40°C 이상에서 최적 활성 온도를 나타낸다는 사실이다. 이와는 대조적으로 본 연구에서 클로닝 된 agarase는 약알칼리에서 최적 pH를 보여주고 있고 약 15°C에서 40°C의 낮은 온도 범위에서 높은 활성을 보여주고 있는 점은 지금까지 보고된 agarase와는 다른 독특한 특징이라고 할 수 있으며 해양미생물의 최적 생육 온도와 유사한 점을 보여주고 있다. 효소의 세포 외부로의 분비, 세포 내의 축적, periplasmic 상에 잔존 여부를 확인하기 위한, 실험결과 세포 외부로 약 71%, 세포 내 축적 3%, 그리고 periplasmic 상에서 약 26%가 잔류하는 것으로 밝혀졌다(Table 1).

요 약

해양에서 분리한 높은 agar 분해능을 가진 *Pseudomonas* sp. W7 균주로부터 agarase 유전자를 pUC19 vector를 이용하여 *E. coli*에 클로닝시켰다. 이 재조합 plasmid(pJA1)는 전기영동 결과, 약 3.2 kb의 insert를 가지고 있었다. *E. coli*에서 생성된 agarase는 세포외로 대부분이 분비되었다. 이 효소는 pH 7.8, 온도는 40°C에서 가장 높은 효소활성을 보였고, 제한효소 지도를 작성하여 보고된 agarase 유전자와 비교한 결과 현재까지 보고된 3종류의 agarase 유전자와는 상이한 제한효소 지도를 가지고 있었다.

감사의 말

본 연구는 과학재단의 우수연구센터(연세대 생물산업 연구센터) 지원 연구비와 교육부의 기초과학 지원 연구비(BSRI 94-4410)의 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 하순득, 공인수, 공재열. 1994. Purification of Extracellular Agarase from Marine Bacterium. Pp. 190. 한국산업미생물학회 춘계학술발표대회 Program.
2. Hayashi K. and Nonaka K. 1967. *J. Food Science and Technol.* 14: 67.
3. 河野敏明, 徳永隆久, 日高秀昌, 三好熙三, 北川應進, 平賀哲男, 片所 功. 1987. Property and production of neoagarooligosaccharides. 日本農藝化學會 講演要旨集, 777.
4. 河野敏明. 1988. *Food Chemical.* 4: 40.
5. Young, K.S., S.S. Bhattacharjee and W. Yaphe.

1978. Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose, to yield agarooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **66**: 207-211.
6. Duckworth, M. and J.R. Turvey. 1969. The action of a bacterial agarase on agarose, porphyran and alkali treated porphyran. *J. Biochem.* **113**: 687-692.
7. Duckworth, M. and J.R. Turvey. 1969. The specificity of agarase from a *Cytophaga species*. *J. Biochem.* **113**: 693-697.
8. Morrice, L.M., M.W. Melean, F.B. Williamson and W.F. Long. 1983. β -Agarase I and II from *Pseudomonas atlantica*: purification and some properties. *Eur. J. Biochem.* **135**: 553-558.
9. Aoki, T., T. Araki and M. Kitamikado. 1990. Purification and characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur. J. Biochem.* **187**: 461-466.
10. Buttner, M.J., I.M. Fernley and M.J. Bibb. 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**: 101-109.
11. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
12. Sambrook J., E.F. Fritsch and Maniatis. 1989. A laboratory manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989.
14. Holmes, D.S. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual, Pp. 149-172. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
16. Mandel, M. and A. Higa. 1970. The calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
17. Gran, H.H. 1941. *J. Bacteriol.* **42**: 527-559.
18. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **153**: 375.
19. Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willinot. 1982. Cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **86**: 507.
20. Sugano, Y. and T. Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(5): 1549-1554.

(Received 8 May 1995)