

단 보

Promoter-Selection Vector를 사용한 유산균 Promoter의 탐색

우 승 희 · 김 갑 석 · †김 정 환 · \*정 대 균 · \*\*이 형 주  
경상대학교 식품공학과, \*경희대학교 유전공학과, \*\*서울대학교 식품공학과

Screening of Promoter Sequences from Lactic Acid Bacteria Using  
a Promoter-Selection Vector

Sung-Hee Woo, Kab-Suck Kim, Jeong Hwan Kim<sup>†</sup>,  
Dae-Kyun Chung\*, and Hyong-Joo Lee\*\*

Dept. of Food Science & Technology, Gyeongsang National University, Chinju, Kyongnam 660-701, Korea

\*Dept. of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon, Kyonggi 449-701, Korea

\*\*Dept. of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon, Kyonggi 441-744, Korea

ABSTRACT

Promoters which are useful for constructing expression vectors for lactic acid bacteria were obtained from the chromosomal DNA of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MG1363. pBV5030, a promoter-selection vector, replicates in *L. lactis* and *Escherichia coli* and carries a promoterless chloramphenicol acetyltransferase gene (*cat-86*). After examining *E. coli* transformants which grew on LB media containing chloramphenicol (Cm, 20 $\mu$ g/mL), many MG1363 derived DNA fragments which encompass promoter sequences were identified. Some recombinant *E. coli* cells can grow at the Cm concentration of 1,000 $\mu$ g/mL. When plasmids from those highly resistant *E. coli* cells were purified and introduced into *L. lactis* ssp. *lactis* MG1614 cells by electroporation, lactococcal transformants showing Cm resistance were obtained. So far, five plasmids with different promoter inserts were introduced into *L. lactis* MG1614 cells. The maximum level of Cm resistance in *L. lactis* MG1614 transformants was quite low (20 $\mu$ g/mL) when compared with that observed in recombinant *E. coli* cells harboring the same plasmids.

서 론

유산균들은 수천년 동안 각종 발효식품들의 생산에 이용되어 온 유용 산업균이다. 산업적 중요성과

함께 건강 보조 식품이나 의약품으로서의 개발 잠재력 때문에 최근들어 유산균 연구는 선진국을 중심으로 가속화 되고 있으나(1), 분자생물학, 유전학 분야의 연구 수준이나 성과는 대장균이나 고초균 또는 효모 등의 다른 균들에 비해 아직은 훨씬 미미하여 초보단계에 머물러 있는 실정이다. 유전공학적인 방법

† Corresponding Author

을 사용해 산업적으로 더욱 바람직한 특성을 갖는 유산균주를 개발하기 위해서는 유산균의 생육에 중요한 기능을 갖는 유전자들을 클로닝하는 한편으로 유산균 유래 또는 외래 유전자들의 발현을 위한 food-grade 발현 vector 또는 발현-분비 vector 들의 개발과 함께 비효율적인 현재의 유전자 도입 방법의 개선이 선행되어야 한다(2-5). 유산균 유전 공학 측면에서 효용 가치가 큰 발현 vector를 얻기 위해서는 적절한 선택표지 유전자와 복제원점외에도 유산균 유래의 강력한 promoter가 필요하다. van der Vossen 등을 비롯한 연구자들은 promoter-screening vector들을 사용하여 유산균주들의 염색체 DNA로부터 잠정적인 여러 promoter들과 분비 신호들을 얻었다(6-8). 즉, 이들 연구자들은 promoter가 결여된 chloramphenicol acetyl-transferase(CAT) 유전자들(6, 8) 이나 TEM  $\beta$ -lactamase 유전자를 reporter로 사용하여 promoter 역가를 지닌 염색체 DNA 단편들을 찾아내었다. 반면에 Vos 등(9-10)은 *Lactococcus lactis*로부터 클로닝한 유전자들의 염기서열을 먼저 결정하고 염기서열로부터 promoter나 분비신호 부위를 확인하였다. Asseldonk 등(11)은 *L. lactis* ssp. *lactis* MG1363을 포함한 대부분의 *L. lactis* 균주들이 세포막으로 분비하는 단백질인 Usp45의 유전자(*usp45*)를 클로닝하고 염기서열을 결정하여 promoter와 분비신호를 확인하였다. 이렇게 확인된 유산균 promoter와 분비신호들은 유산균에서 외래 단백질인 tetanus toxin fragment C를 발현, 분비시키는 실험에 성공적으로 이용되었다(12). 그러나 아직까지 확보된 유산균 promoter들의 수가 많지않기 때문에 유산균으로부터 다양한 발현, 분비 신호들을 계속 확보하려는 노력이 필요하다. 본 연구의 목적은 *L. lactis* subsp. *lactis*의 염색체 DNA로부터 유산균용 발현 vector 개발에 유용하게 사용될 수 있는 다양하면서도 강력한 promoter들을 promoter-screening vector를 이용하여 분리 확인하는 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주, plasmid 및 균 배양 조건

본 실험에 사용된 균주 및 plasmid를 Table 1에 나타내었다. Promoter 탐색에 사용한 pBV5030은 Dr. Topisirovic(Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade, Yugoslavia)로부터 분양받았다. pBV5030은 *L. lactis* ssp. *cre-*

Table 1. Strains and vector used in this study.

Strains or Plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>+</sup> , $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>K</sub><sup>-</sup></i> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> ,	Stratagene (La Jolla, CA)
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> MG1363	Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , plasmid-cured strain	13
MG1614	Prt <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , plasmid-cured strain	13
pBV5030	4.3 kb, Em <sup>r</sup> , <i>cat-86</i> gene	8

*moris* Wg2 유래의 광범위 숙주 plasmid인 pWV01의 복제원점을 지니고 선택표지로 pE194 유래의 erythromycin 내성(Em<sup>r</sup>) 유전자를 그리고 promoter screening에 사용되는 pPL603 유래의 *cat-86* 유전자를 가지고 있다(8). van der Vossen 등(6)이 만든 pGKV210과 거의 동일하나 reporter 유전자로 사용되는 *cat-86* 유전자는 chloramphenicol 유무에 상관없이 항상 CAT 효소를 발현하여서 chloramphenicol에 의해 유도되는 *cat* 유전자를 지닌 pGKV210보다 더 효율적으로 promoter를 탐색할 수 있다고 알려져 있다(8). 대장균주들은 LB 배지에서 37°C 진탕배양하였고 *L. lactis* 균주들은 포도당을 0.5% (w/v) 첨가한 M17 배지(M17G, 21)에 접종하여 30°C에서 정지배양하였다. pBV5030을 지닌 대장균주들은 Em을 200 $\mu$ g/mL 농도로 *L. lactis* 균주들은 5 $\mu$ g/mL 농도로 각각 배지에 첨가하여 배양하였다.

### *L. lactis* ssp. *lactis* MG1363 염색체 DNA 제조

*L. lactis* ssp. *lactis* MG1363을 M17G 배지 500mL에 1% 접종하여 30°C에서 대수기 중기(OD 600nm, 0.5~0.6)에 도달할 때까지 배양한 다음 4000rpm에서 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체로부터 염색체 DNA는 Luchansky 등(14)의 방법을 일부 수정하여 얻었다. Cell pellet을 2mL TES buffer(50mM NaCl, 30mM Tris, pH 8.0, 5mM EDTA)에 현탁하고 37°C에서 1시간 동안 lysozyme(30mg/mL)을 처리하여 세포벽을 용해시켰다. SDS를 3% 되게 첨가한 후 65°C에서 현탁액이 맑아질 때까지 반응시킨 후 phenol, phenol-

chloroform(1:1) 추출을 3~4회 반복하였다. 2배의 에탄올로 DNA를 침전시키고 유리막대로 DNA를 회수하여 70% 에탄올로 세척한 후 500 $\mu$ L TE buffer에 녹였다. DNA의 최종 농도는 260nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

#### Promotor Screening

*L. lactis* ssp. *lactis* MG1363 염색체 DNA 20 $\mu$ g을 *Sau*3AI으로 절단하여 *Bam*HI으로 절단한 다음 Calf Intestinal Phosphatase(CIP) 처리를 한 pBV5030과 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation 시켰다. 염색체 DNA와 vector의 몰 비율은 5:1이었고 16 $^{\circ}$ C에서 16시간 이상 반응을 진행시켰다. Ligation mixture를 에탄올 침전시킨 후 TE buffer 2 $\mu$ L에 다시 녹이고 이를 Dower 등(15)의 방법으로 얻은 *E. coli* DH5 $\alpha$  냉동 competent 세포 40 $\mu$ L에 electroporation 방법으로 도입시켰다. Gene Pulser 장치(BioRad, Richmond, CA, U.S.A.)를 사용하였고 electroporation 조건은 2.5kV, 200  $\Omega$  25 $\mu$ F였다. 단일 pulse를 가한 세포에 LB를 1mL 첨가해 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 다음 LBEm(200 $\mu$ g/mL) plate에 도말한 후 24시간 이내에 생긴 colony들을 LBCm(20 $\mu$ g/mL)에 replica하여 생긴 colony들을 선발하였다. 이들을 다시 Cm 농도를 순차적으로 1,000 $\mu$ g/mL까지 높인 배지에 접종하여 생육 여부를 살펴 봄으로써 Cm 내성 정도를 조사하였다. Cm 내성이 높아 선발된 형질전환체들을 5mL LB 배지에 접종 배양한 다음 Birnboin과 Doly의 방법(16)에 준해서 plasmid를 얻어 promoter sequence를 지닌 insert DNA의 삽입 유무 및 크기를 확인하였다.

#### 유산균으로의 도입

대장균에서 확인된 promoter를 지닌 재조합 plasmid들을 electroporation 방법에 의해 Holo 등(17)의 방법으로 얻은 *L. lactis* ssp. *lactis* MG1614의 냉동 competent cell에 도입시켰다. Pulse를 가한 후 0.5M sucrose를 함유한 M17G 배지 1mL를 첨가하여 30 $^{\circ}$ C에서 3시간 배양하여 도입된 plasmid의 유전자를 발현시킨 후 Em이 5 $\mu$ g/mL 첨가된 M17G sucrose(0.5M) 한천배지에 도말한 후 48시간 이내에 생기는 colony들을 형질전환체로 선발하였다. 이들을 M17G 5mL에 배양한 후 O'sullivan 등(18)의 방법으로 plasmid를 분리하고 제한효소로 절단하여 대장균에서 얻은 plasmid와 동일하지 확인

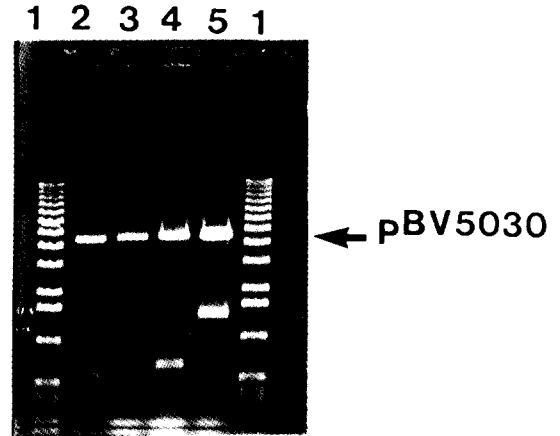


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of few selected recombinant pBV5030 plasmids digested with *Eco*RI and *Pst*I simultaneously to release insert DNAs. lane 1, 1 kb DNA size ladder (BRL); lane 2, # 1 plasmid in Table 2; lane 3, # 6 plasmid in Table 2; lane 4, a plasmid with 0.7 kb insert (not shown in Table 2); lane 5, # 10 plasmid in Table 2. Arrow indicates the 4.3 kb pBV5030 linear DNA.

하였다. 유산균 형질전환체들의 Cm 내성 정도는 Cm이 5, 10, 15, 20 $\mu$ g/mL 농도로 첨가된 M17G 배지에 접종 배양하여 흡광도를 측정하여 조사하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Promotor Screening

pBV5030을 사용하여 MG1363의 염색체 DNA를 screening 한 결과 promoter sequence를 지닌 것이라 추정되는 수십개의 DNA 단편들을 확인할 수 있었다. 실험 초기에는 MG1363 DNA를 *Hae*III로 절단한 다음 *Sma*I으로 끊고 CIP 처리를 한 pBV5030과 결합시켰으나 blunt-end ligation 이어서 재조합체를 얻는 효율이 좋지 않았다. 이에 비해서 염색체 DNA를 *Sau*3AI으로 절단할 경우 훨씬 많은 수의 재조합체들을 얻을 수 있어서 MG1363 염색체 DNA를 주로 *Sau*3AI를 사용하여 절단하였다. pBV5030에 삽입된 MG1363 insert들의 크기는 제한효소 처리로 확인했을 때 300bp에서 3kb까지 다양하였고 1.2에서 2.5kb 사이의 크기가 가장 많았

Table 2. Chloramphenicol Resistance of Selected *E. coli* Transformants Harboring Recombinant pBV5030 Plasmids.

Transformant number	Chloramphenicol concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )						insert size (kb)
	20	50	200	700	900	1000	
1	R	R	R	R	S	S	0.5
2	R	R	R	R	R	R	2.3
3	R	R	R	R	R	R	3.3
4	R	R	R	S	S	S	1.7
5	R	R	R	R	S	S	2.8
6	R	R	R	R	S	S	0.3
7	R	R	R	R	R	R	3.0
8	R	R	R	R	R	R	1.2
9	R	R	R	R	S	S	1.5
10	R	R	R	R	R	R	1.4
11	R	S	S	S	S	S	2.5

R : resistant

S : sensitive

다. 얻어진 재조합 plasmid DNA들을 *EcoRI*과 *PstI* 두 제한효소를 동시에 사용, 절단한 다음 agarose gel 전기영동방법으로 insert DNA 크기를 조사하였다. 일부 재조합 plasmid를 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단한 전기영동 사진을 Fig. 1에 나타내었다. Agarose gel로부터 insert DNA band를 잘라내고 Gene Clean(Bio101, La Jolla, CA, U.S.A.) kit을 사용 정제한 다음 *HaeIII*, *AluI* 등으로 절단 비교하였다. 크기와 제한효소 절단 pattern이 명백히 다른 것들과 구별이 되는 것만 Table 2에 나타내었다.

#### 대장균 형질전환체들의 Cm 내성 측정

선발된 재조합 균주들에 대한 Cm 내성 실험 결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에 나타낸 것 처럼 많은 재조합 대장균주들이 Cm 농도 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 잘 생육하여 대장균에서는 이들 promoter sequence들에 의해 효과적으로 CAT 효소가 생산됨을 보여준다. 이 결과는 Bojovic 등(8)이 *E. coli* MM294에서 pBV5030을 사용하여 *L. lactis* NP45의 염색체 DNA를 탐색한 결과 Cm 내성이 최대 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 insert들을 얻을수 있었다는 보고와도 잘 일치한다. 재조합균주 11번과 같이 Cm 농도 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 생육하나 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서는 생육하지 못하는 것도 있고 4번 균주는 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 그리고 5, 6 및 9번 균주들은 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상에서는 생육하지 못하였다. 이처럼 삽입 DNA 크기와 Cm 내성 정도가 다양한 것으로 미루

어 여러 promoter들이 얻어진 것이라 생각된다. 이 들중 일부는 진정한 promoter가 아니고 삽입 위치에 따라 우연히 promoter 기능을 수행하게된 pseudopromoter일 가능성도 있다. 특히 유산균 DNA같이 A+T 비율이 높을수록 pseudopromoter로 작용할 가능성이 크다고 알려져 있다(19). 이런 점에서 11번 같이 Cm 내성이 낮은 insert는 pseudopromoter일 가능성을 배제하지 못하나 Cm 농도가 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  같이 높은 경우에도 생육을 잘 일어나게 해주는 insert들의 경우에는 진정한 promoter가 들어있으리라 생각된다. Table 2의 결과는 insert들의 크기와 Cm 내성과는 상관 관계가 없음을 보여준다. 이는 insert내의 promoter sequence의 위치나 promoter 자체의 특성에 따라 promoter의 효율성이 영향을 받기 때문일 것이다. Promoter에 의해 Cm 내성이 유도되는 것을 확인하는 방법은 insert DNA의 염기서열을 결정하여 Gram 양성균들에서 관찰되는 consensus sequence가 존재함을 보이는 것으로 현재 Cm 내성이 높은 재조합 plasmid 들을 대상으로 염기서열을 조사중이다.

#### 유산균으로의 도입

대장균에 높은 Cm 내성을 부여하는 promoter 함유 plasmid들을 선정하여 *L. lactis* ssp. *lactis* MG1614 세포에 electroporation 방법으로 도입을 시도하였다. 잘 알려져 있는 것 처럼 유산균의 형질 전환 효율은 낮아서 본 실험에서도 CsCl-ethidium

bromide 초원심분리 방법으로 얻은 pBV5030 1 $\mu$ g 당 최대 1 $\times$ 10<sup>4</sup> 형질전환체 정도였다. 대장균에서와 동일한 plasmid를 갖는 것이 확인된 형질전환체는 Table 2의 2, 3, 8, 10, 11번 5개이고 나머지는 형질전환체가 얻어지지 않거나 형질전환체에서 plasmid를 뽑아 제한효소로 절단시 vector와 삽입단편 이외의 band가 나타나거나 또는 다른 크기의 band가 나타나 확인이 어려웠다. 이들 형질전환체 모두가 Em이 함유된 배지에서 빨리 생육하며 MG1614는 plasmid가 없는 cured strain이고 이는 본 실험에서도 확인하였기 때문에 형질전환 과정에서 plasmid의 구조변화가 일어났을 것이라 추정된다(20). 대장균주와는 달리 유산균 형질전환체들은 높은 Cm 내성을 보이지 않아 20 $\mu$ g/mL이 생육 가능한 최대치였다. 동일한 plasmid를 갖는 두 균에서 이처럼 Cm 내성 차이가 큰 이유 중의 하나로는 두 숙주세포에서 pBV5030의 copy 수가 다르기 때문이라 추측된다. pBV5030과 동일한 복제원점을 갖는 pGKV210의 경우 대장균에서는 63 copies/cell이나 유산균에서는 3 copies/cell로 20배 이상 차이가 난다는 보고가 있다(6).

## 요 약

유산균용 발현 vector들을 만드는데 유용하게 사용될 수 있는 promoter들을 *L. lactis* ssp. *lactis* MG1363 염색체 DNA로부터 얻었다. Promoter가 결합된 chloramphenicol acetyltransferase gene(*cat-86*)을 가지고 있는 pBV5030을 promoter-selection vector로 사용하였으며, *Sau3AI*으로 부분절단한 MG1363의 염색체 DNA를 pBV5030에 ligation 시킨다음 *E. coli*에 형질전환시켰다. Cm(20 $\mu$ g/mL)이 포함된 배지에서 자라는 대장균 형질전환체들을 조사한 결과 promoter sequence를 포함하는 MG1363 유래의 여러 DNA 단편들을 확인할 수 있었다. 여러 재조합 대장균주들은 Cm 농도 1,000 $\mu$ g/mL 에서도 생육할 수 있었으며 이들 Cm 내성이 높은 대장균주들로부터 얻은 plasmid를 electroporation 방법으로 *L. lactis* ssp. *lactis* MG1614에 도입시킨 결과 Cm 내성을 갖는 유산균 형질전환체들을 얻을 수 있었다. 현재까지 다섯개의 다른 promoter insert가 삽입된 plasmid를 확인할 수 있었으나 MG1614 형질전환체들의 Cm 내성은(20 $\mu$ g/mL) 동일 plasmid를 지닌 대장균주들에 비해 훨씬 낮았다.

## 감 사

이 연구는 한국과학재단의 특정연구과제(과제번호: 94-1400-01-3) 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다. pBV5030을 제공해준 Dr. Topisirovic(Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Belgrade, Yugoslavia)에게도 감사드립니다.

## 참고문헌

- O. Kandler and N. Weiss(1986), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 8th ed., vol.2, 1208, Williams and Wilkins, Baltimore/London.
- W. M. de Vos and G. F. M. Simons(1994), *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, (M. J. Gasson and W. M. de Vos, eds), p.52, Blackie Academic & Professional, London.
- W. E. Sandine(1986), *Fed. Eur. Microbiol. Rev.*, **46**, 205.
- W. de Vos(1987), *FEMS Micro. reviews*, **46**, 281.
- M. van de Guchte, J. Kodde, J. M. B. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2606.
- J. M. B. M. van der Vossen, D. van der Lelie, and G. Venema(1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2452.
- M. Sibakov, T. koivula, A. von Wright, and I. Palva(1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 341.
- B. Bojovic, G. Djordjevic, and L. Topisirovic (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 385.
- P. Vos, G. Simons, R. J. Siezen, and W. M. de Vos(1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 13579.
- J. Kok, K. J. Seenhouts, A. J. Haanorikman, A. M. Sedeboer, and G. Venema(1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 231.
- M. van Assenldonk, G. Rutten, M. Oteman, R. J. Siezen, W. M. de Vos, and G. Simons (1990), *Gene*, **95**, 155.
- J. M. Wells, P. W. Wilson, P. M. Norton, and R. W. F. Le Page(1993), *Appl. Environ.*

- Microbiol.*, **59**, 3954.
13. M. J. Gasson(1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 1.
  14. J. B. Luchansky, M. C. Tennant, and T. R. Klaenhammer(1991), *J. Dairy. Sci.*, **74**, 3293.
  15. W. J. Dower, J. F. Miller, and C. W. Ragsdale (1988), *Nucleic Acids Research*, **16**, 6127.
  16. H. C. Birnboim and J. Doly(1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513.
  17. H. Holo and I. F. Nes(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3119.
  18. D. J. O'sullivan and T. Klaenhammer(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2730.
  19. R. Kilpper-Balz, G. Fischer, and K. N. Schleifer.(1982), *Curr. Microbiol.*, **7**, 245.
  20. 유민(1995), *생물산업*, **8**(4), 20.
  21. B. E. Terzaghi and W. E. Sandine(1975), *Appl. Environ. Microbiol.*, **29**, 807.