

Lactobacillus casei YIT 9018의 Shuttle Vector 개발을 위한 분자유전학적 연구

유 민* · 남진식 · 권오식 · 백영진¹
계명대학교 생물학과, ¹(주)한국야쿠르트 중앙연구소

Molecular Genetics for the Construction of a Shuttle Vector for *Lactobacillus casei* YIT 9018. Min Yoo*, Jin-Sik Nam, Oh-Sik Kwon and Young-Jin Baek¹. Department of Biology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ¹Korea Yakult Institute, Yongin 449-900, Korea - A shuttle vector, pSHvec, was constructed for *Lactobacillus casei* (*L. casei*) YIT 9018 and JM109 by recombinant DNA technology. This vector contained the β -lactamase II gene from *Bacillus cereus* as a selection marker and replication origins for both Gram(+) and Gram(-) strains. It could transform the wild type *L. casei* YIT 9018 as well as *E. coli* JM109 and transformed cells were selected based on antibiotics resistance. The ability of *L. casei* YIT 9018 for curd formation in 11% skim milk was maintained even after transformation with pSHvec. The vector was stable as long as antibiotics were added to the medium. These results could contribute to the study of lactic acid bacteria for the industrial purpose at a genetic level.

유전자 재조합에 사용되는 shuttle vector들은 복제 기작이 서로 다른 균주들 간에 유용 유전자 이동이 가능하도록 고안된 plasmid 구조가 대부분이다(1). 특히 관심의 대상이 되는 것은 Gram(+) 균과 Gram(-) 균 모두를 형질전환 시킬 수 있는 shuttle vector로서 1980년대 이후 식품공학을 비롯한 여러 분야에서 그 개발을 서둘러 왔다(2). 이러한 shuttle vector의 필수적인 조건은 첫째, 대상 균주 모두에서 replication이 가능해야 하고 둘째, 형질전환된 균주를 손쉽게 선별할 수 있는 marker를 가지고 있어야 하며 셋째, 균주가 배양 배지나 산업적 환경에서 성장할 때 적어도 일정기간 이상 안정하게 유지될 수 있어야 한다는 것들이다(3, 4).

최근에 분자유전학의 발달과 함께 발효식품 분야에서 유용한 유전형질들을 신속하게 starter내로 도입할 수 있다는 장점 때문에 안전한 shuttle vector 개발을 위한 노력이 점차 증가하는 추세이다. 그러나 발효식품 분야의 starter가 대부분 젖산균이고 이에 대한 유전학적 연구가 아직은 초기 단계에 있다는 어려움 때문에 일부 개발된 vector가 있기는 하지만 산업적으로 이용하기에는 아직 부족한 실정이다(5). 특히 *L. casei* YIT 9018의 경우 70 kb에 달하는 커다란 stringent plasmid를 가지고 있고 손쉬운 형질전환 방법 역시 개발되어 있지 않은 점이 연구의 또다른 장애이다. 본 연구에서는 *L. casei* YIT 9018과 *E. coli* JM109 사이에 형질전환이 가능한 shuttle vector 개발을 시도하였고, 이의 안정성 및 생리적 특

성 분석을 수행하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

Gram(+) 균인 *L. casei* YIT 9018은 (주)한국야쿠르트 중앙연구소로부터 분양받았다. *Bacillus cereus*의 plasmid인 pTZ19R-tet(1.2)는 임현만 교수(충남대학교)로부터 분양받았다(6). Gram(-) 균의 plasmid로는 pBR 322를 사용하였고 대장균 숙주세포로는 *E. coli* JM109를 이용하였다. 형질전환은 한국생공(주)의 electroporator set를 사용하여 실시하였다. N-acetylmuramidase SG는 Seikagaku Kogyo Co.(Japan)으로부터, 각종 제한효소와 T4 ligase 등은 Boehringer Mannheim(Germany)으로부터 구입하였다.

Plasmid의 분리

L. casei YIT 9018의 plasmid(pL9018)는 Bae 등(7)이 제시한 방법을 다소 변형하여 분리하였다. 간략하면 TCM 배지[beef extract 4.5 g, peptone 7.5 g, yeast extract 5.0 g, Tween 80 1.0 ml, K₂HPO₄ 3.0 g, KH₂PO₄ 1.5 g, glucose 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, MnSO₄·4H₂O 25 mg per liter(pH 6.8)] 5 ml에 15시간 배양한 균액을 원심분리하여 회수한 후 potassium phosphate buffer[0.02 M KH₂PO₄ 51%, 0.02 M K₂HPO₄ 49%, (pH 6.8)]로 2회 세척하였으며 N-acetylmuramidase SG 효소를 1.5 mg/ml의 농도로 37°C에서 15분간 처리하였다. 여기에 1% SDS와 0.2 N NaOH 적당량을 첨가하여 세포 벽을 용해한 후 phenol 용액으로 1회 추출하였다. 최종

*Corresponding author
Tel. 82-53-580-5537, Fax. 82-53-580-5164
E-mail: ymin@kmucc.keimyung.ac.kr
Key words: Shuttle vector, *Lactobacillus casei* YIT 9018

적으로 ethanol 침전법에 의해 DNA를 회수하였다. 한편 대장균으로 부터의 plasmid 분리는 Birnboim과 Doly의 alkaline lysis 방법에 의거하였다(8).

Ligation

Vector DNA와 insert DNA를 1:9의 부피 비율로 혼합하였고 여기에 2X ligase buffer(0.1 M Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM spermidine, 2 mM ATP, 0.2 mg/ml BSA)를 10 µl 첨가하여 전체 반응액을 20 µl로 조성하였다. T4 ligase는 반응당 0.2 U를 사용하였다. 반응은 16°C에서 15-18시간 수행하였다.

Electroporation

E. coli JM109 균을 30 ml의 LB(1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract) 배지에서 OD₆₀₀이 0.5-0.8 될 때까지 배양하였고, 얼음에 급격히 냉각하여 배양을 일시 중지시킨 후 10% glycerol 용액으로 2회 세척하였다. 이렇게 준비된 균액을 최종적으로 200 µl의 10% glycerol 용액에 녹인 후 각 electroporation 반응마다 50 µl를 사용하였다. 반응조건은 Gram(+) 균의 경우에는 5 kv/cm, Gram(-) 균의 경우에는 12 kv/cm로 하였다. 형질전환 균주를 선별하기 위해서는 유산균은 ampicillin이 15 µg/ml(stringent plasmid)로 포함된 TCM 배지를, JM109는 100 µg/ml(relaxed plasmid)로 포함된 LB 배지를 각각 사용하였다.

Vector의 안정성 실험

Shuttle vector의 안정성을 실험하기 위하여 형질전환된 *L. casei* YIT 9018의 경우에는 11% skim milk에서 6일 간격으로 계대 배양을 하면서 산생성능력과 항생제 내성 정도를 주기적으로 확인하였다. 형질전환된 *E. coli* JM109는 항생제를 첨가한 LB 배지에서 동일한 실험을 실시하였다. 안정성 실험은 실험 결과의 신뢰도를 위하여 적어도 3개월 이상 연속 실시하였다.

결과 및 고찰

Selection marker의 클로닝

Shuttle vector를 제조하기 위한 전체적인 연구 수행 전략은 Fig. 1에 요약하였다. Shuttle vector의 기본 구조로써 pBR322를 선택하였고 여기에 pL9018의 Gram(+) replication origin을 클로닝하고자 하였다. 한편 pBR322 구조 속에 원래 위치한 β-lactamase의 promoter는 Gram(-) 균에 의해서만 인식될 수 있기 때문에 Gram(+)와 Gram(-) 균 모두가 인식할 수 있는 promoter를 가진 β-lactamase의 클로닝이 선행조건이었는데 이에 해당하는 것이 바로 *Bacillus cereus*의 pTZ19R-tet(1.2) plasmid에서 분리한 β-lactamase II 유전자였다. β-lac-

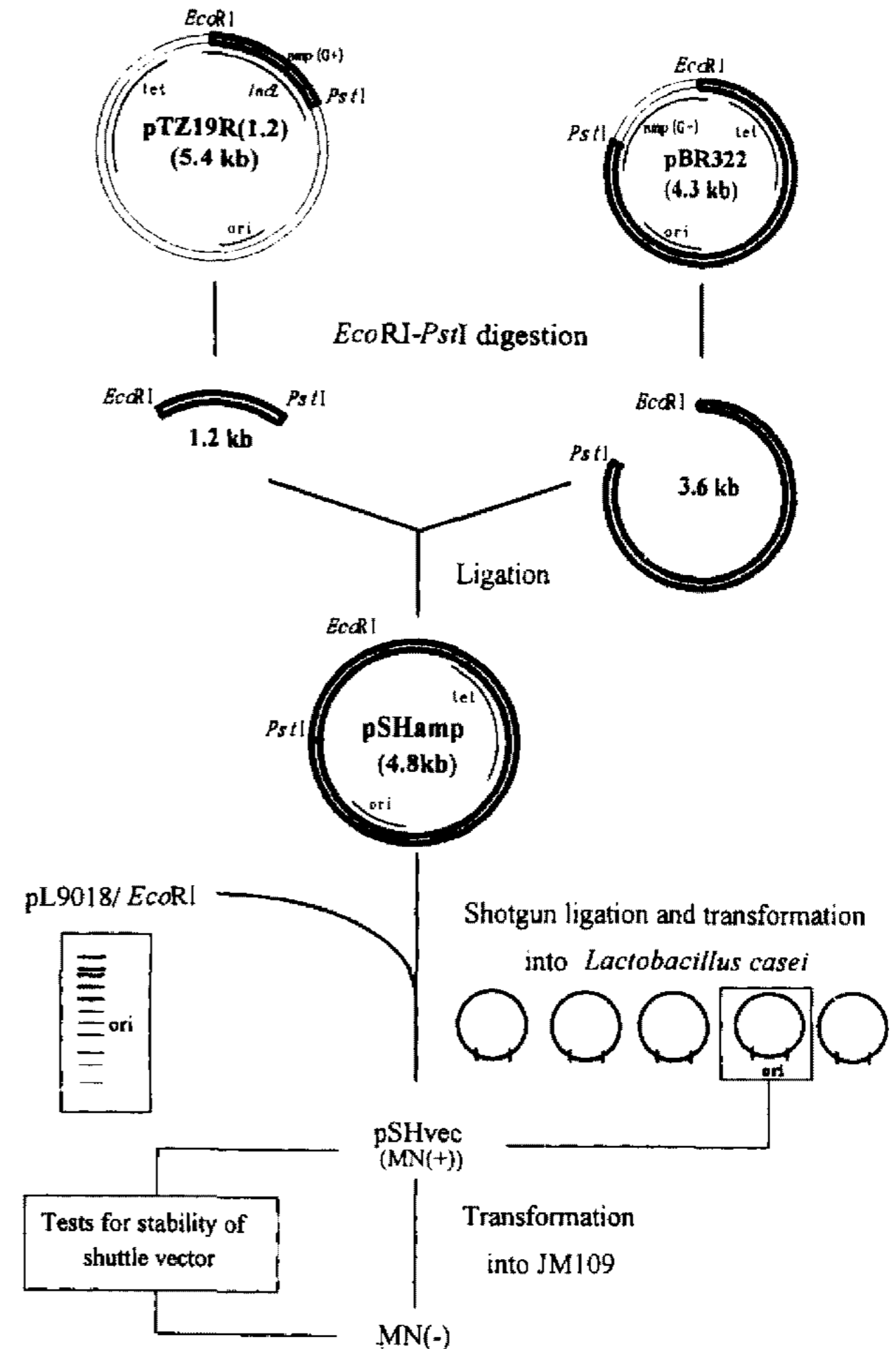


Fig. 1. A strategy for the construction of shuttle vector, pSHvec and for tests for its stability.

tamase II 유전자의 클로닝을 위해서 pBR322를 EcoRI 과 PstI으로 처리하였고(Fig. 1) 역시 동일한 효소로 처리한 1.2 kb의 β-lactamase II 유전자를 클로닝하여 pSHamp라 명명한 plasmid를 먼저 일차적으로 제조하였다. pSHamp의 제한효소 분석 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

pL9018의 replication origin 클로닝

pSHamp는 pBR322에서 유래된 Gram(-)의 replication origin은 갖고 있지만 Gram(+)의 replication origin이 없기 때문에 pL9018에서 유래한 replication origin을 새로이 재조합할 필요가 있었다. 이를 위하여 먼저 약 70 kb의 pL9018 구조를 여러 종류의 제한효소로 처리하였고 전기영동하여 조사한 결과 대단히 복잡한 양상을 나타내었다(Fig. 3). 실험을 더욱 어렵게 만든 요인은 pL9018에 대한 유전학적 연구가 거의 이루어져 있지 않기 때문에 이들 DNA band 중 어느 부분이 replication origin에 해당하는지 알 수 없다는 것이었다. 게다가 제한효소에 따라서는 replication origin 자체를 절단하고 있을 가능성도 배제할 수 없었다. 따라서 특정한 DNA band를 선택하여 클로닝하기 보다는 pL9018을 여러 종류의 제

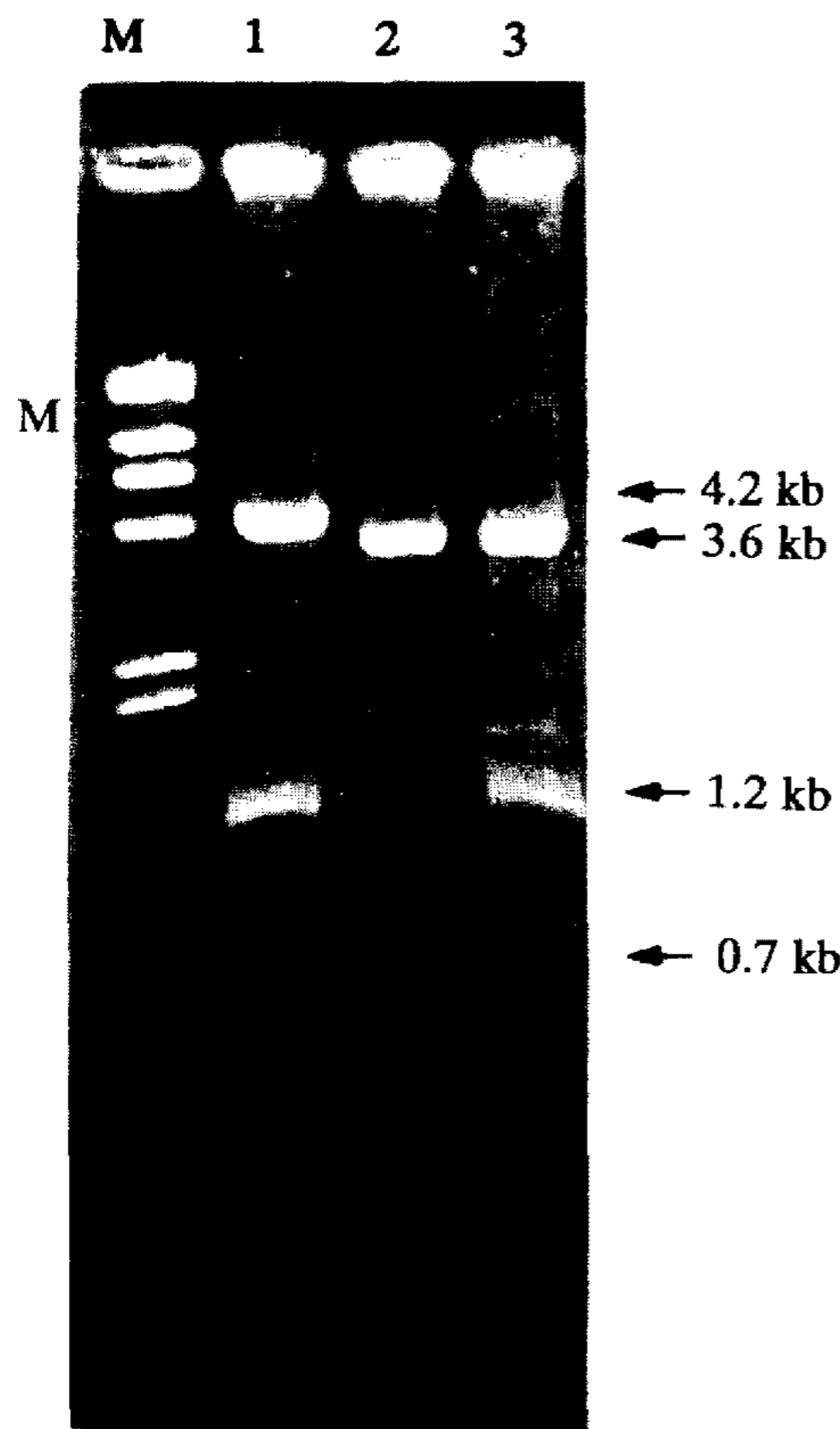


Fig. 2. Analysis of pSHamp. M: λ DNA digested with *Hind*III. lane 1: pTZ19R-tet(1.2) digested with *Eco*RI and *Pst*I, lane 2: pBR322 digested with *Eco*RI and *Pst*I, lane 3: pSHamp digested with *Eco*RI and *Pst*I.

한효소로 절단하고 이들을 pSHamp에 shotgun 클로닝하여 electroporation으로 wild type *L. casei* YIT 9018에 형질전환한 다음 selection marker로서 항생제가 포함된 TCM 선별배지에서 자라나오는 균만을 선별하고자 하였다. 이렇게 선별된 재조합 균주들은 역시 항생제를 포함한 LB 배지에서 재조사하였다.

MN(+)와 MN(-)의 선별

여러가지 제한효소를 이용한 shotgun 실험 결과 *Eco*RI에 의하여 모두 5개의 절산균주가 재조합된 plasmid를 갖고 있는 것으로 선별되었고 이중 하나를 무작위적으로 항생제가 포함된 TCM 배지에서 연속 배양하여 안정성 있게 유지됨을 확인한 후에 MN(+)라 명명하였다. 한편 MN(+)에 들어있는 shuttle vector는 pSHvec이라 명명하였으며 pSHvec을 *L. casei* YIT 9018에서 분리하여 다시 *E. coli* JM109로 형질전환한 다음 형질전환된 *E. coli* JM109를 MN(-)라 명명하였다.

pSHvec의 안정성 및 MN(+)와 MN(-)의 생리적 특성

MN(+)와 MN(-) 균주들로부터 pSHvec의 안정성을 확인하고 MN(+)균의 curd 형성능력과 항생제내성 유지의 결과를 조사한 결과는 Table 1, 2에 각각 나타낸 바

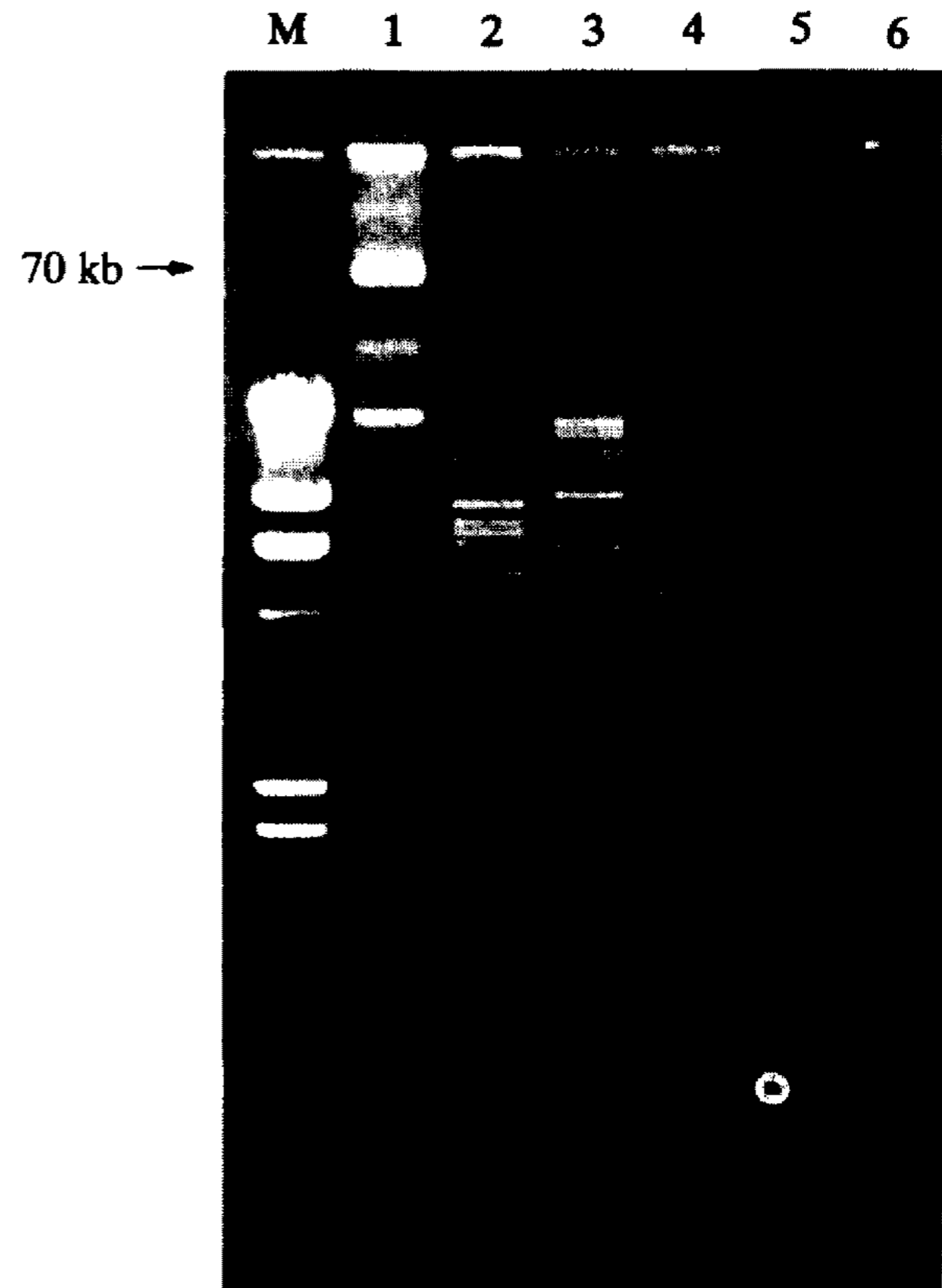


Fig. 3. Restriction enzyme digestion of pL9018.

M: λ DNA digested with *Hind*III. lane 1: pL9018 undigested (supercoiled plasmid form is also shown at the lower position), lane 2-6: pL9018 digested with *Eco*RI, *Hind*III, *Eco*RI and *Hind*III, *Hinf*I, and *Sau*3AI.

와 같았다. MN(+)는 curd 생성능력이 wild type의 *L. casei* YIT 9018과 비교할 때 거의 차이를 보이지 않았다. 한편 배양 배지에 항생제 내성 marker를 포함시키는 한 pSHvec은 *L. casei* YIT 9018과 *E. coli* JM109 내에 계속 유지될 수 있음이 역시 확인되었다. 이들 실험은 연속적으로 계대배양하면서 적어도 3개월 이상 실시하였고 그 결과는 항상 동일하게 확인되었다.

Table 1. Curd Formation by MN(+) and MN(-)

Strains \ Days	1	2	3	4	5
<i>L. casei</i> YIT 9018	-	+	+	+	+
MN(+)	-	+	+	+	+
MN(-)	-	-	-	-	-

Table 2. Stability of pSHvec vector in the MN(+) and MN(-) determined by ampicillin resistance when cultured in antibiotic medium

Strains \ Days	1	2	3	4	5
<i>L. casei</i> YIT 9018	-	-	-	-	-
MN(+)	+	+	+	+	+
MN(-)	+	+	+	+	+

*Antibiotic was used as concentrations of 15 μ g/ml and 100 μ g/ml for the MN(+) and MN(-), respectively.

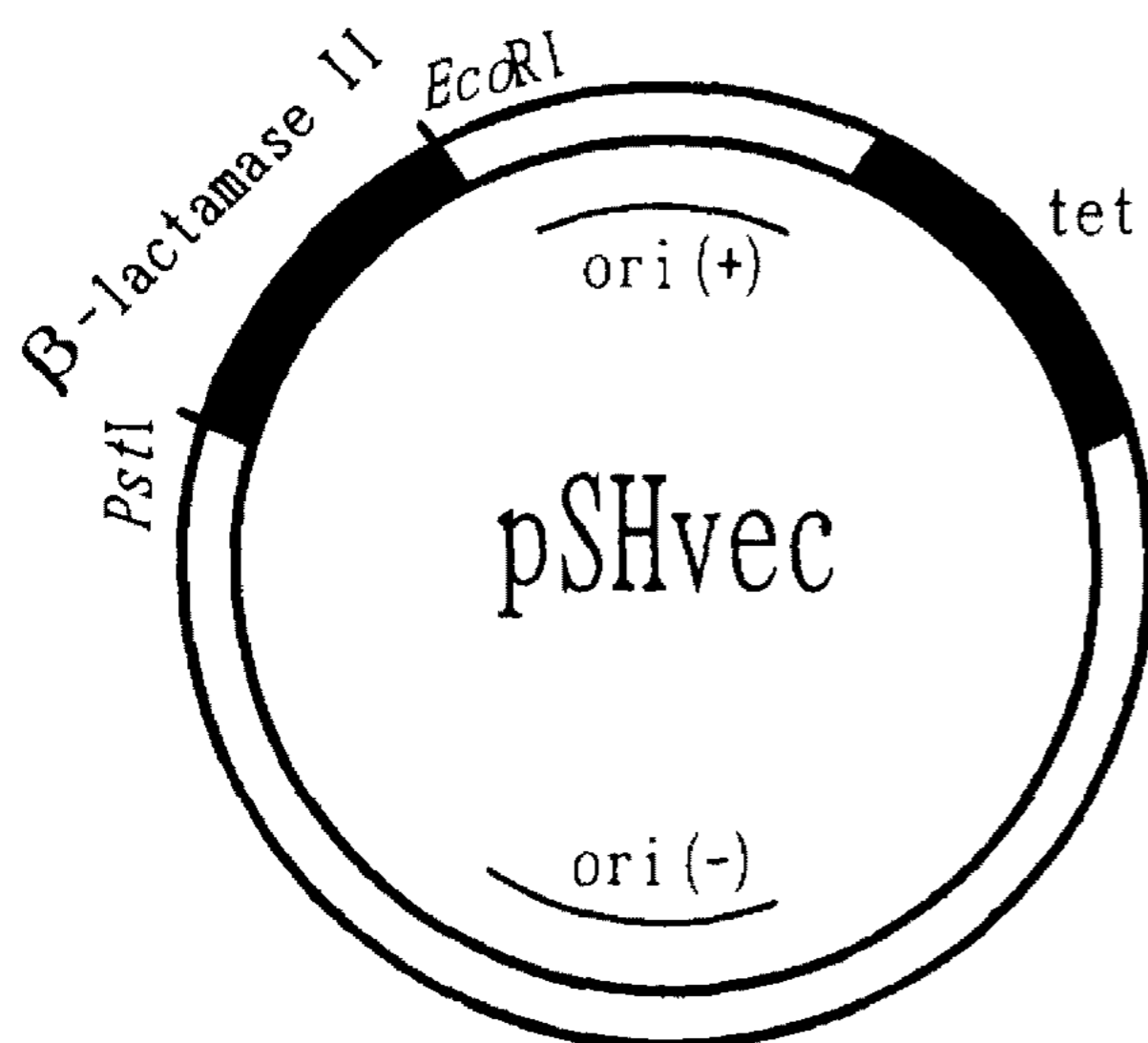


Fig. 4. Schematic illustration of pSHvec.

It contains two replication origins for Gram(+) and Gram(-) strains and β -lactamase II gene as a selection marker. tet represents the gene for tetracycline that was originated from pBR322.

pSHvec의 구조

Shuttle vector인 pSHvec의 구조적 도해는 Fig. 4와 같다. pSHvec 구조의 특징은 Gram(+)와 Gram(-)에서 모두 인식될 수 있는 β -lactamase II를 selection marker로서 클로닝한 점과 젖산균인 *L. casei* YIT 9018과 대장균인 *E. coli* JM109 모두에서 replication될 수 있도록 pBR322의 replication origin과 pL9018의 replication origin 모두를 한 구조안에 클로닝하였다는 점이다. 따라서 pSHvec은 *L. casei* YIT 9018과 *E. coli* JM109를 위한 shuttle vector로서의 필요한 구조를 모두 갖추고 있었다. 한가지 유의할 점은 형질전환을 위하여 사용한 젖산균 숙주가 recombinase 활성을 내재하고 있는 wild type의 *L. casei* YIT 9018이었으므로 형질전환 과정에서 예상하지 못한 약간의 유전자 재배열이 일어났을 가능성을 배제할 수 없다는 것이다. pSHvec으로 부터 pL9018의 replication origin을 분리하여 세부 구조를 밝히기 위한 작업과 pSHvec의 전체적인 염기서열을 확인하여 유전자 재배열의 유무를 확인하기 위한 분자유전학적 분석은 현재 진행 중에 있다.

결론적으로 pSHvec은 wild type의 *L. casei* YIT 9018을 숙주 세포로 사용하였기 때문에 비교적 쉽게 산업화에 응용될 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 그러나 발효식품 분야의 starter로서 MN(+)를 이용하기 위해서는 궁극적으로 항생제 marker를 생리적 marker로 대체시키는 등 지속적인 연구가 앞으로 필요할 것이다. 본 연구는 아직도 초기 단계에 있는 젖산균의 유전자 차원에서의 연구를 촉진시키기 위한 학문적 발판으로서 기여할 것이다.

요 약

유전자 재조합 기술을 이용하여 *L. casei* YIT 9018과 *E. coli* JM109를 위한 shuttle vector인 pSHvec에 *Bacillus cereus*의 β -lactamase II 유전자를 선별 marker로써 재조합하였고 Gram(+)와 Gram(-) 균을 위한 replication origin들도 모두 클로닝 시켰다. 이렇게 재조합된 pSHvec plasmid vector로 wild type의 *L. casei* YIT 9018과 *E. coli* JM109를 형질전환시켰고 ampicillin이 함유된 선별 배지에서 shuttle vector의 요건을 갖추어 형질전환된 균주들만을 선별해 내었다. 형질전환된 *L. casei* YIT 9018은 11% skim milk에서 curd 형성 능력을 그대로 유지하고 있었으며 항생제를 배양 배지에 첨가하는 한 안정하게 유지되었다. 본 연구결과는 산업적 응용을 위한 젖산균의 유전학적 연구에 기여할 것이다.

감사의 글

본 연구는 (주)한국야쿠르트 중앙연구소의 산학협동연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Macrina, F. S., J. A. Tobian, K. R. Jones, R. P. Evans and D. B. Clewell. 1982. A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene* 19: 345-353.
2. Shimizu-Kadota, M., H. Shibahara-Sone and H. Ishiwa, 1991. Shuttle plasmid vectors for *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli* with a minus origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3292-3300.
3. Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss, 1992. New Thermosensitive Plasmid for Gram-Positive Bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 5633-5638.
4. Chang, A. C. Y. and S. N. Cohen, 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134: 1141-1156.
5. Kim, J. H. and S. H. Woo, 1995. Expression of *Bacillus licheniformis* α -amylase gene in *Lactobacillus casei* strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5: 257-263.
6. Lim, H. M., J. J. Pene and R. W. Shaw, 1988. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 β -lactamase II structural gene. *J. Bacteriol.* 170: 2873-2878.
7. Bae, H. S., Y. J. Baek, Y. K. Kim, M. Yoo and M. Y. Pack, 1985. Rapid and simple method for isolating plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 13: 289-296.
8. Birnboim, H. C. and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

(Received 27 February 1997)