

알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14 유래의 중복 Promoter를 이용한 재조합 Plasmid로부터의 Pectate lyase의 발현

박희경¹ · 함병권 · 유주현¹ · 배동훈*

단국대학교 식품공학과 · 연세대학교 생물산업소재 연구센터,
¹연세대학교 생명공학과 · 생물산업소재 연구센터

Expression of Pectate Lyase from Recombinant Plasmid Using Clustered Promoter Originated from Alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. Hee-Kyoung Park¹, Byoung-Kwon Hahm, Ju-Hyun Yu¹ and Dong-Hoon Bai*. Department of Food engineering, Dankook University, Chunan 330-714, Korea and Bioproduct Research Center Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, ¹Department of Biotechnology and Bioproduct Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea – For the overproduction of pectate lyase (PL), the recombinant plasmid p12BS f1 which has strong promoter from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 was used. In order to overexpress the pectate lyase by the action of overlapping strong promoter in p12BSΔf1, 1.6 kb of PL gene was inserted into p12BSΔf1 to form p12BSΔf1-PL and the enzyme was expressed. But decreased expression efficiency of the PL gene was observed and it was due to the presence of the transcription terminator region on the upstream of the PL gene. The transcription terminator of the PL gene in p12BSΔf1-PL was removed and the resulting plasmid p12BSΔf1ΔPL was formed. *Bacillus subtilis* 207-25 harboring the recombinant plasmid, p12BSΔf1ΔPL, revealed increased expression efficiency with chloramphenicol induction when *cat-86* was used as a reporter gene.

Heterologous gene의 발현을 위한 매우 유용한 체계로서의 잠재성을 가지고 있는 *Bacillus* 속 미생물은 생산된 단백질을 배지상으로 분비하는 능력을 가지고 있으며, 인체 및 동물에 대하여 비병원성이라는 장점을 가지고 있다. 또한 비교적 극한 조건이나 단순 및 복합배지에서 생육이 가능하여 의약품, 식품 및 일반산업에 유용한 산물들의 생산에 전통적으로 이용되어 왔다.

현재까지 *Escherichia coli*는 광범위한 유전학적, 생화학 및 생리학적 지식 때문에 재조합 DNA기술의 개발과 응용에 가장 유용한 균주로 주로 사용되어 왔다(1). 그러나 *E. coli*를 최종 숙주로 사용할 경우 세포 자체의 독성으로 인하여 인체 및 동물체 내에서 유해하게 작용할 가능성이 있으며, 유전자 산물의 세포외 분비가 어렵기 때문에 산업적 생산시 제조공정 증가에 따른 생산단가의 상승이 문제가 된다. 또한 유전자를 조작하여 이종 단백질의 대량생산을 유도할 경우 산물의 세포내 축적으로 인한 세포자체의 독성 및 성장저해뿐만 아니라 plasmid의 불안정성을 초래할 가능성이 있다.

이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 분자 유전학적으로 비교적 섬세하고 포자를 형성 하는 *Bacillus subtilis*를

이용함으로써 우수한 숙주세포로 개발하기 위한 노력이 집중되고 있으며, 분화과정체계 연구의 model로서도 구조적, 생화학적 연구가 광범위하게 진행되고 있다. 복잡한 growth cycle을 가지고 있는 세균 중 *B. subtilis*는 생화학적 및 유전학적 접근이 용이하기 때문에 분화 및 포자형성 과정에서 일어나는 유전자 조절기전을 연구하는데 특별한 장점을 가지고 있다. 최근 미생물체재 무공해 농약으로 각광을 받고있는 *B. thuringiensis*가 생산하는 crystal toxic-coding 유전자 또한 포자형성 단계에서 형성되는 것으로 알려져 관련 기전에 대한 연구가 이루어지고 있다(2, 3). *B. subtilis*를 이용하여 단백질과 같은 생화학적 제제의 효율적인 생산을 위해서는 우선 조절인자를 포함하는 유전적 전사와 번역기구 및 이들의 중요한 기능에 대한 폭넓은 이해가 요구되며, 안정한 재조합 plasmid의 개발, 세포내 protease와 nuclease의 생산을 감소시킨 균주의 개발과 세포내 단백질을 정상적으로 분비하도록 하는 인자를 결정하고 조작하는 체계적인 단백질 분비체계에 대한 연구가 필요하다.

*B. subtilis*를 이용하여 이종 단백질의 생산성을 증대하기 위한 요소중의 하나는 이종 유전자의 발현을 최대로 이끌어내기 위한 강력한 promoter의 사용이다. 이러한 promoter를 이용한 이종 유전자의 발현을 위해서는 *B. subtilis* 내에서의 그 promoter의 효율과 조절기작을 우선 이해하는 것이 필수적이다. 근래에 *B. subtilis*의 몇몇

*Corresponding author

Tel. 82-417-550-3562, Fax. 82-417-554-4769

E-mail: baidh@chollian.dacom.co.kr

Key words: Alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14, Strong promoter, Pectate lyase

genome 상의 tandem promoter 부위(4, 5)와 overlapping promoter 부위(6-8)가 보고되었다. 이러한 promoter에 의해 세포생육의 정지기 단계까지 유전자의 발현이 연장될 가능성이 있다.

본 연구에서는 promoter 활성이 높은 재조합 plasmid p12BSΔf1을 이용한 유용산물의 생산성 증대를 검토하기 위하여 pectate lyase를 모델 단백질로 정하고 그 유전자를 promoter 하단에 연결시킨 재조합 plasmid를 제조하여 그 발현특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 연구에 사용된 균주와 plasmid vector는 Table 1과 같다.

사용배지

Plasmid의 대량분리 및 신속분리를 위한 액체배지로는 LB 배지를 사용하였고, *B. subtilis*의 protoplast 형질 전환의 경우는 Pen assay broth(PAB, Antibiotic medium 3, Difco)에서 균체를 생육시켰으며, 재생배지로는 DM-3배지를 사용하였다. *Bacillus* 균주는 TBAB(Tryptose blood agar base, Scott Lab. INC) 평판배지에서 보존하였으며, 세포생육에 따른 pectate lyase 활성 측정에는 *Bacillus* 포자형성배지인 2×SSG배지를 사용하였다. Pectate lyase 생산균주의 검색은 YC 평판배지를 이용하였다. 배지에 첨가하는 항생물질 중 kanamycin은 사용하는 vector의 종류에 따라 1 mg/ml, 또는 5 µg/ml의 농도로 사용하였다. Chloramphenicol은 plasmid의

내성 정도에 따라 5-10 µg/ml으로 조절하였으며, 내성 유전자를 가지고 있지 않은 균주의 생육시 유도가 필요한 경우 최저생육농도인 0.1 µg/ml의 농도로 첨가하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 *Bacillus subtilis*의 protoplast transformation

*E. coli*로부터 plasmid DNA의 대량 분리는 Ish-Horowitz 등(14)의 방법을 변형하여 사용하였다. *E. coli*로부터 plasmid DNA를 신속 분리하기 위해서는 miniscreeen법(15)을 변형하여 사용하였다. *B. subtilis*의 protoplast transformation은 Chang과 Cohen의 방법(16)을 변형하여 사용하였다.

Pectate Lyase(PL)의 활성 측정

PL 활성을 측정하기 위해서 37°C에서 하룻밤 배양한 PAB 종배양액을 50 ml의 LB 액체배지에 1%(v/v) 되게 접종하여 37°C에서 일정시간 배양시킨 후, 5분 동안 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. PL 활성은 Keen 등(17)의 방법에 따라 Hitachi model 200-20 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며, 반응액의 조성은 0.5 ml의 0.2 M Tris-HCl(pH 8.5), 0.2 ml의 3 mM CaCl₂, 1.27 ml의 증류수를 혼합하여 사용하였다. 이 반응액에 30 µl의 조효소액과 1 ml의 1%(w/v) Na-polygalacturonic acid를 가하여 섞어준 후 232 nm에서의 흡광도의 변화도(ΔA₂₃₂)를 recorder로 기록한 다음, 기울기를 산출하여 시료의 PL 효소 활성을 계산하였다. PL 1 unit(U)는 위의 조건하에서 조효소액 1 ml에 대한 분당 A₂₃₂ 변화치(ΔA₂₃₂/min)로 정의하였다. BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford의 방법(18)에 따라 단백질을 정

Table 1. Bacterial strains and plasmids used for experiments

Strains		
Strain	Genotype	Reference
<i>Bacillus subtilis</i> 207-25	<i>rk-</i> , <i>mk-</i> , <i>amyE07</i> , <i>hsrM</i> , <i>arol906</i> , <i>lys21</i> , <i>leuA8</i> , <i>recEA</i>	Shirozo et al. ⁹⁾
<i>Bacillus subtilis</i> DB104	<i>his</i> , <i>nprR2</i> , <i>prE18</i> Δ <i>aprA3</i>	Doi et al. ⁹⁾
Plasmids		
Plasmids	Relevant properties	Reference
pPL703	promoter cloning vector (Km ^r , Cm ^r)	Williams et al. ¹⁰⁾
pPL708	expression vector pPL703+0.3 kb promoter from <i>Bacillus</i> phage SPOII (Km ^r , Cm ^r)	Mongkolsuk et al. ¹¹⁾
pWT19	terminator cloning vector (Km ^r)	
p12BSΔf1	temporary regulation vector (Km ^r , Cm ^r CRS)	Yu et al. ¹²⁾
p12BSΔf3	temporary regulation vector (Km ^r , Cm ^r CRS)	"
p12BSΔf4	temporary regulation vector (Km ^r , Cm ^r , CRS)	"
p12BSΔf5	temporary regulation vector (Km ^r , Cm ^r)	"
pYBP3	pPL703+pectate lyase promoter	
pYPC29	pBR322+1.6 kb <i>pelk</i> gene from <i>Bacillus</i> sp. YA-14	Yu et al. ¹³⁾

Abbreviations : CRS, catabolite repression site; Km, kanamycin; Cm, chloramphenicol

량한 후 그 양을 mg/ml로 나타내고 산출한 PL unit를 단백질 양으로 나누어 U/mg of protein의 단위를 갖는 PL 비활성을 결정하였다.

Chloramphenicol acetyltransferase(CAT)의 활성측정

하룻밤 배양한 PAB 종배양액을 2×SSG 배지에 5% (v/v)되게 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 550 nm에서의 흡광도가 0.5에 도달하였을 때 재접종하였으며, 이를 2회 반복한 후 2×SSG에 6배 희석하고 고속으로 진탕배양하면서 550 nm에서의 흡광도가 0.5에 도달했을 때 균체를 수집하였다. 수확된 균체는 0.5 ml의 solution I (0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 1.0 M KCl, 1.0 mM PMSF)으로 세척하여 다시 균체를 모으고, 0.4 ml의 solution II (0.1 M Tris-HCl, pH 7.8, 0.5 mM PMSF)에 재현탁시켰다. 이를 ice bath내에서 10초 간격으로 5초 동안 microtip으로 5회 sonication한 후 10분 동안 원심분리하여 얻은 상정액을 CAT assay를 위한 조효소액으로 사용하였다.

Spectrophotometer를 이용한 CAT 활성의 측정은 Shaw 등(19)의 방법에 의해 행하였으며, 반응액의 조성은 8.8 ml의 dd-H₂O, 1.0 ml의 10 μM DTNB, 0.2 ml의 5 mM acetyl-CoA로 하였다. 이 반응액 0.588 ml을 sample cell에 채우고 412 nm에서의 흡광도를 0.0으로 조정후, 20 μl의 조효소액을 혼합하여 일정한 기울기의 흡광도가 얻어질 때까지 recorder를 2-3분 동안 작동시켜 그 결과를 background acetylation의 속도로 하였다. 이 반응액에 12 μl의 5 mM chloramphenicol 용액을 가하여 혼합 후 A₄₁₂에서의 변화도를 recorder로 기록한 뒤, 그 기울기로 시료의 CAT 활성을 계산하였다. CAT 활성치를 계산하기 위해서는 먼저 Cm 용액을 가하기 전과 가한 후의 분당 A₄₁₂의 변화치(ΔA₄₁₂/min)를 각각 계산하여 Cm을 가한 후의 ΔA₄₁₂/min로부터 가하기 전의 ΔA₄₁₂/min를 감한 값을 시료의 ΔA₄₁₂/min로 하였다. 이 ΔA₄₁₂/min를 반응에 이용된 Cm 의존 DTNA의 양으로 나타내기 위하여 extinction coefficient 13.6으로 나누면 이것은 Cm의 acetylation 속도(μmol of Cm acetylated/min)와 동일하여 분당 1 μmol의 acetylation된 Cm의 양을 1 unit(U)의 CAT로 나타내었다. BSA를 표준물질로 하여 Bradford 등(18)의 방법에 의해 단백질을 정량한 후 그 양을 mg/ml로 표시하고, 위의 CAT unit를 단백질 양으로 나누어 U/mg protein의 단위를 갖는 CAT 비활성을 결정하였다.

Pectate lyase 활성을 나타내는 재조합 균주의 선별

Ligation된 DNA를 *B. subtilis*에 형질전환한 후 얻은 형질전환체들을 10 μg/ml의 kanamycin이 첨가된 LB 평판배지와 50 μg/ml 또는 0.1 μg/ml의 chlorampheni-

col이 첨가된 LB 평판배지에 replica하여 37°C에서 18-24 시간 배양한 후, kanamycin 내성, chloramphenicol 감수성 colony를 선별하였다. 이들을 YC 평판배지로 이식하여 배양한 후 6 N HCl을 사용하여 배양된 배지의 표면을 10분 동안 처리하여 투명환을 나타내는 colony를 PL 유전자가 함유된 colony로 선택하였다. 선택된 colony로부터 plasmid DNA를 신속 분리하여 처리한 후 전기영동에 의한 분석으로 PL 유전자가 삽입되었음을 확인하였다.

결과 및 고찰

Pectate lyase 유전자 발현을 위한 재조합 plasmid의 제조

Overlapping promoter를 이용하여 이중 단백질의 발현효율을 증대시키기 위한 기본단계로서 pectate lyase 유전자를 promoter의 하단에 연결하였다. *E. coli*에 cloning된 *Bacillus* sp. YA-14 유래의 pectate lyase 유전자에는 자체 promoter, signal peptide, 그리고 mature 단백질에 해당하는 염기배열이 함유되어 있다. 1.6 kb의 전체 유전자를 σ^B, σ^E, σ^A가 overlapping되어있는 재조합 plasmid p12BSΔf1에 연결시키기 위하여 pYPC29를 *Hind* III로 절단한 후 전기영동하여 1.6 kb 단편을 electroeluter를 사용하여 회수하였다. 동일한 제한효소로 SPOII phage promoter가 함유된 pPL708을 절단하여 ligation시키고 *B. subtilis* 207-25에 형질전환시켰다. Pectate lyase가 함유된 재조합 균주를 확인하기 위하여 kanamycin 10 μg/ml, chloramphenicol 30 μg/ml가 각각 첨가된 plate에 tooth picking하여 Km resistant, Cm sensitive 균주를 선별하였다. 선별된 형질전환체들을 YC agar 평판배지에 이식하여 하룻밤 배양한 후 6 N HCl을 사용하여 polygalacturonic acid를 침전시켜 투명환을 형성하는 목적 균주를 선별하였다. 선별된 균주로부터 plasmid DNA를 분리하고, 이를 여러 종류의 제한효소로 절단하여 확인한 결과 Fig. 1의 A와 같은 제한효소 지도를 작성할 수 있었으며 이를 pPL708-PL로 명명하였다.

재조합 plasmid pPL708-PL을 *Pst*I과 *Bgl*II로 절단하고 1.6 kb pectate lyase 유전자가 함유된 단편을 회수하였으며 p12BSΔf1을 동일한 제한효소로 절단한 후 ligation시켰다. Protoplast 형질전환법으로 *B. subtilis*에 형질전환시킨 후 위와 동일한 방법으로 목적하는 균주를 선별하였다. 선별된 재조합 균주로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소로 확인하고 이를 p12BS f1-PL로 명명하였다(Fig. 1, B). 재조합 plasmid p12BSΔf1-PL에는 overlapping 되어져 있는 3개의 promoter외에 PL 자체 promoter를 함유하고 있어 발현되어지는 PL 단백질이 Δf1 promoter에 의한 영향인지, 또는 Δf1과 PL promo-

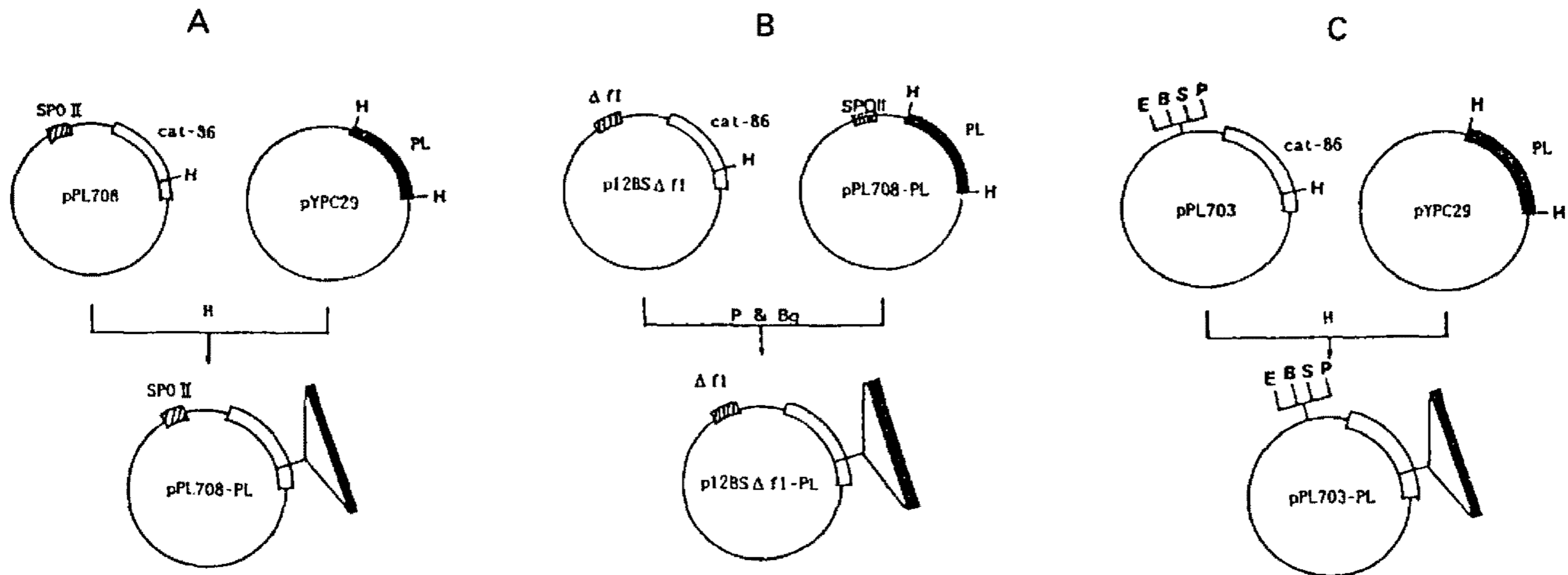


Fig. 1. Schematic diagram for construction of pPL708-PL, p12BS Δ f1-PL and pPL703-PL. A, pPL708-PL; B, p12BS Δ f1-PL; C, pPL703-PL.

ter의 병행효과인지를 비교 분석하기 위하여 promoter cloning vector인 pPL703을 *Hind*III로 절단하고 1.6 kb의 pectate lyase 유전자를 ligation시켜 *B. subtilis*에 형질전환하였다. 같은 선별방법에 따라 확인된 재조합 plasmid를 pPL703-PL로 명명하였다(Fig. 1, C).

재조합 plasmid에 의한 PL 유전자의 발현특성

성장상태에 따른 각 재조합 균주들의 발현정도를 비교하기 위하여 pPL703-PL, pPL708-PL과 p12BS Δ f1-PL을 포함하고 있는 *B. subtilis* 207-25를 PAB 배지에서 하루 밤 배양한 후, 10 μ g/ml의 kanamycin과 0.1% glucose가 첨가된 2 \times SSG 배지에 6배 희석하여 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 진탕배양하며 일정 시간간격으로 시료를 취하여 PL 효소의 비활성을 측정하였다. Overlapping promoter인 Δ f1, PL 유전자 자체 promoter(*pel pro*), 그리고 비교 promoter로 사용된 SPOII phage promoter의 CAT 활성에 따르는 promoter 활성정도는 Table 2와 같다. Cm을 첨가하지 않은 경우 pPL703-PL을 함유한 재조합체는 균체생육과 유사한 양상으로 활성이 증가하여 32시간 배양할 때까지 높은 비활성을 나타내었다(Fig. 2, A). 재조합 plasmid pPL708-PL을 함유한 균주는 pPL703-PL과 유사한 경향을 보였으나 전체적으로 낮은 비활성도를 나타내었으며(Fig. 2, B) 높은 promoter 활성

을 갖는 Δ f1에 PL 유전자가 삽입된 p12BS f1-PL의 경우도 예측과는 달리 낮은 PL 비활성을 보였다(Fig. 2, C).

*cat-86*을 지시유전자로 하여 promoter의 Cm에 의한 유도효과를 살펴 보았을 경우 Table 2와 같이 Δ f1은 높은 유도효과를 나타내었으나, PL을 지시유전자로 삽입한 경우 Fig. 2에서 보는 바와 같이 최저 생육농도인 0.1 μ g/ml의 Cm을 첨가하였을 때 첨가하지 않은 배양액보다 낮은 PL 활성을 나타내었으며, PL 유전자 상단에 존재하는 promoter의 활성이 높을수록 전체 비활성도가 감소하였다. Pectate lyase 유전자의 염기 배열을 분석하였을 때 initiation codon(+1)으로부터 -183에서 -147까지 inverted repeats(IR) sequence가 존재하며, 이 부분이 Δ G=-30 kcal/mol로 안정한 stem-loop를 형성하여 전사 종결구조로서 작용할 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 3). 만약 이 부분이 강력한 전사저해인자로서 작용할 수 있다면 상단에 높은 활성의 promoter가 존재할지라도 전사 효율의 증가를 기대할 수 없으며, 오히려 상단의 promoter에서부터 생성된 전사체가 이 구조에 이르러 불완전한 전사체를 형성하게 되므로 낮은 효소활성을 보이게 된다.

전사저해인자 구조를 함유하는 110 bp의 DNA 단편을 terminator cloning vector인 pWT18에 연결하여 전사 종결구조로서의 가능성을 검토하였다. 강한 promoter 활성으로 인하여 plasmid가 불안정해지는 결과들로부터 특정 유전자의 하단에 강력한 전사종결구조를 삽입시켜 세포내에서 재조합 plasmid의 안정성을 부여하기 위하여 terminator 선별 vector들을 개발하였다. pWT19(20)는 *B. subtilis* 유래의 alkaline protease(subtilisin)의 구조 유전자와 σ^{43} operon의 *veg* promoter 사이에 multi cloning site(MCS)가 존재하는 구조로서 protease 결손 변이주 내에서 강한 protease 활성을 보이거나 MCS에 전사

Table 2. CAT specific activities of *B. subtilis* 207-25 harboring various plasmids

Plasmids	CAT activity (Unit/mg of protein)	
	Not induced	Induced
pPL708	0.6	3.9
pYBP3	0.5	4.2
p12BS f1	0.6	14.1

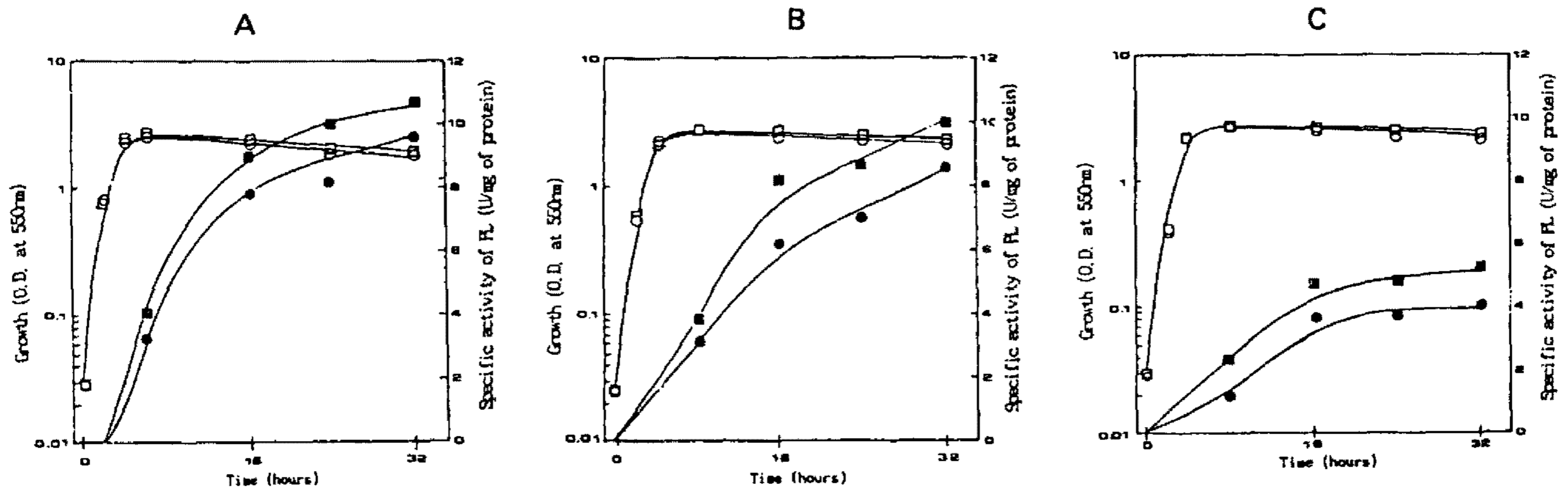


Fig. 2. Time course of cell growth and pectate lyase production.

The PL assay was done with or without chloramphenicol induction. The open symbols represent the absorbance at 550 nm and the closed symbols represent the specific activity of PL. □ and ■, without chloramphenicol; ○ and ●, with chloramphenicol. A, *B. subtilis* 207-25 harboring pPL703-PL; B, *B. subtilis* 207-25 harboring pPL708-PL; C, *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf1-PL.

종결구조로서 작동할 수 있는 DNA 단편이 삽입되어지는 경우 protease 활성저하로부터 삽입된 DNA의 terminator로서의 작용 가능성을 검토할 수 있는 vector이다.

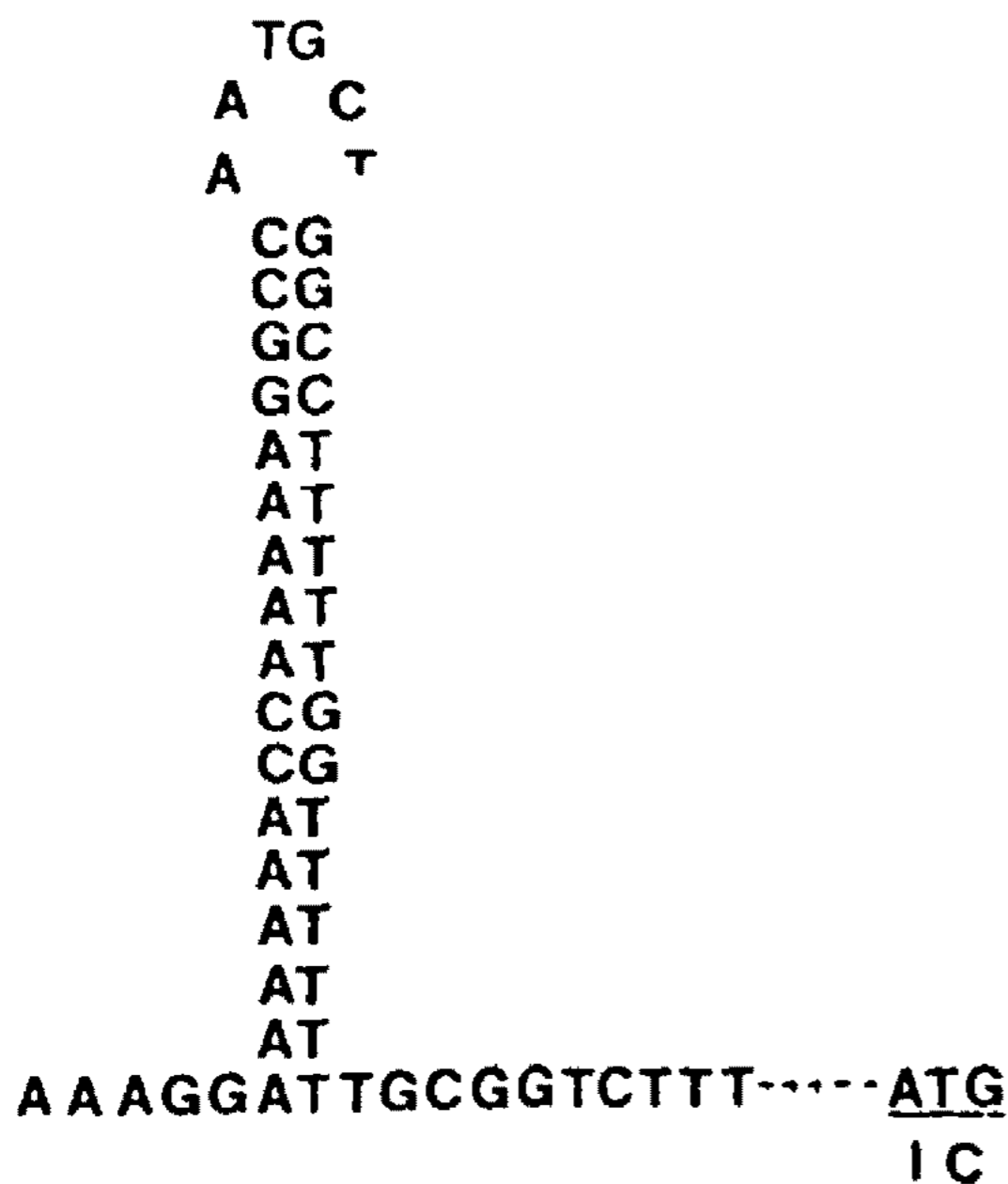
Table 3에서 보는 바와 같이 PL 유전자 상단의 110 bp의 DNA 단편이 삽입된 재조합 plasmid pWT1이 형질전환된 *B. subtilis* DB104는 intact한 pWT19가 함유된 균주보다 protease 활성이 70% 감소되었다. 이 결과로부터 computer 분석을 토대로 한 전사종결구조가 *in vivo*상에서 강한 terminator로 작용할 수 있음을 알 수 있었으며, PL 유전자의 발현을 저해할 수 있는 요인 중의 하나로 추측되었다. 또한 0.52 kb의 promoter 단편을 연

결시키기 위하여 이용하였던 promoter cloning vector의 하나인 pPL703에 존재하는 Cm 유도에 관계된 조절기구가 전사가 아닌 번역단계에서 일어나며, 이 구조가 promoter와 PL 유전자 상단의 전사종결구조 사이에 존재하기 때문에 낮은 PL 효소활성을 보인 것으로 추측되었다.

Terminator가 제거된 재조합 plasmid의 제조

PL 유전자의 상단에 존재하는 terminator로 인하여 Δf1 promoter에서 개시된 전사가 불완전하게 끝나게 되어 p12BS f1-PL이 pPL703-PL보다 낮은 발현효율을 보인 것으로 추측하고, 약 110 bp에 해당하는 terminator sequence를 제거한 재조합 plasmid를 제조하기 위하여 PL 유전자가 함유된 pYPC29를 *Hind*III와 *Xmn*I으로 절단하여 전기영동을 행한 후, 1.5 kb의 DNA 단편을 electroelution으로 회수하였다. pPL703의 경우는 *Hind*III와 blunt end를 형성하는 *Hpa*I으로 절단하여 large fragment를 회수하였다. 두 DNA 단편을 ligation한 후 *B. subtilis*에 형질전환하였다. 형질전환체 가운데서 목적 균주를 선별하였으며 여러가지 제한효소로 절단하여 확인된 재조합 plasmid를 pPL703ΔPL로 명명하였다(Fig. 4, A).

제조된 pPL703ΔPL을 *Pst*I과 *Bgl*II로 절단하여 PL 유전자가 함유된 단편을 회수하고 동일한 제한효소로 처리한 pPL708, p12BSΔf1과 ligation시켜 형질전환하였다.



ΔG = - 30.3 Kcal/mol

Fig. 3. Potential transcription terminator sites of the PL gene upstream.

Table 3. Action of transcription terminator region from pectate lyase gene in terminator cloning vector

Strain	Relative activity (%)
<i>B. subtilis</i> DB104	8.3
<i>B. subtilis</i> DB104 (pWT19)	100
<i>B. subtilis</i> DB104 (pWT1)	27

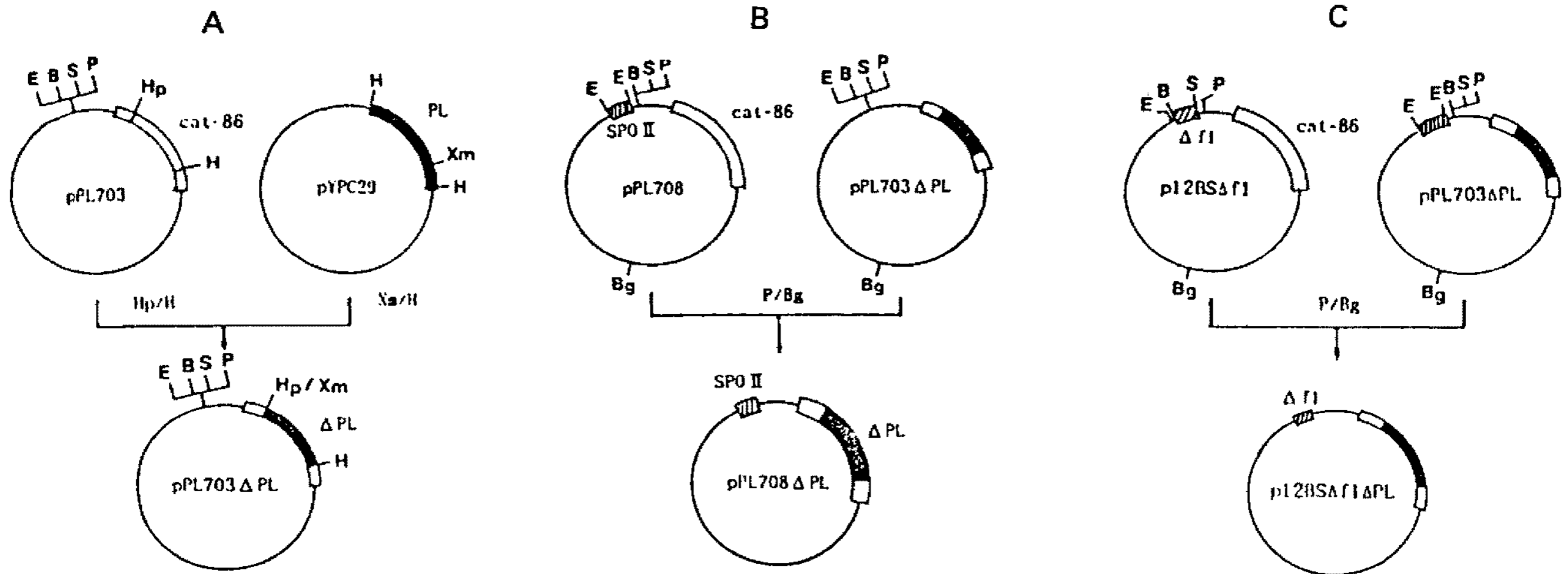


Fig. 4. Schematic diagram for construction of pPL703ΔPL, pPL708ΔPL and p12BSΔf1ΔPL.
 A, pPL703ΔPL; B, pPL708ΔPL; C, p12BSΔf1ΔPL.

형질전환체들을 각각 10 μg/ml의 Km, 30 μg/ml의 Cm 이 첨가된 평판배지에 이식하여 Km resistant, Cm sensitive한 균주들을 1차 선별한 후 0.1 μg/ml의 Cm이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에 각각 이식하여 투명한이 큰 재조합균주를 2차 선별하였다. 선별된 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리하고 제한효소로 절단하여 plasmid의 존재를 확인하고 이들을 각각 pPL708ΔPL, p12BSΔf1ΔPL로 명명하였다(Fig. 4, B, C).

재조합 균주의 성장상태에 따른 PL 유전자의 발현

pPL703ΔPL, pPL708ΔPL, p12BSΔf1ΔPL을 함유하는 *B. subtilis* 207-25를 앞에서와 동일한 방법으로 동조 배양한 후 성장상태에 따른 PL 유전자의 발현율을 측정하였다. pPL703ΔPL을 함유한 재조합체는 숙주세포 자체가 생산하는 정도의 pectate lyase 활성을 보이는 것으로 보아 terminator 제거단계에서 PL promoter 부위가

일부 손실되었을 것으로 추측하였다(Fig. 5, A). 그러나 염기배열을 분석한 결과 *Xmn*I으로 절단할 경우 전사초기위치 (+1)를 기준으로 -45 bp까지 결실되어지기 때문에 essential promoter부위에는 손실이 없으나 RNA polymerase가 DNA에 처음 결합할 때 -55 bp 위치 정도에서 부터 overlapping된다는 실험결과로 보아 PL 유전자의 -45 bp까지의 결실이 DNA와 protein의 결합력을 저해한 것으로 추정할 수 있었다. pPL708ΔPL과 p12BSΔf1ΔPL을 함유한 재조합체의 경우 promoter의 활성이 커질수록 PL 효소의 비활성이 증가했으며 배양시간이 경과해도 분해되지 않고 활성을 유지하였다(Fig. 5, B, C).

Cm을 첨가한 경우 *cat-86*을 지시유전자로 사용했을 때와 유사한 유도효과를 나타내지만 Cm의 영향이 번역 단계에서 조절되는 현상이며, *cat-86*과 PL 유전자가 hybrid되어 생성된 전사체 상에는 translation stop codon 이 2개 존재한다는 염기배열 분석과, Cm 첨가시 증가된

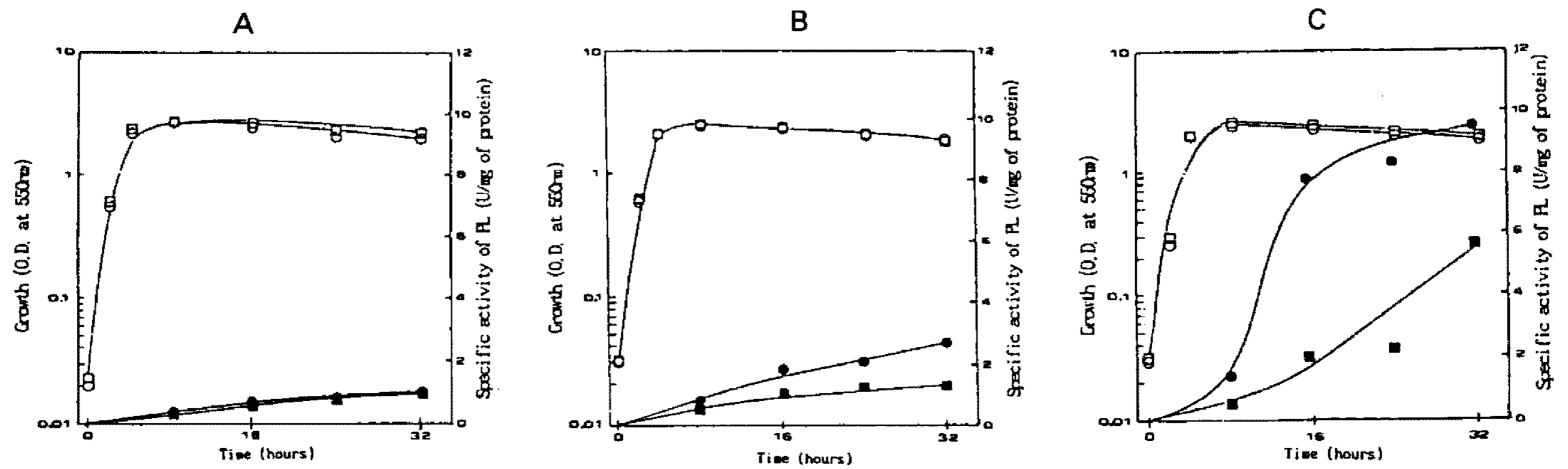


Fig. 5. Time course of cell growth and pectate lyase production.
 The PL assay was done with or without chloramphenicol induction. The open symbols represent the absorbance at 550 nm and the closed symbols represent the specific activity of PL. □ and ■, without chloramphenicol; ○ and ●, with chloramphenicol. A, *B. subtilis* 207-25 harboring pPL703ΔPL; B, *B. subtilis* 207-25 harboring pPL708ΔPL; C, *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf1ΔPL.

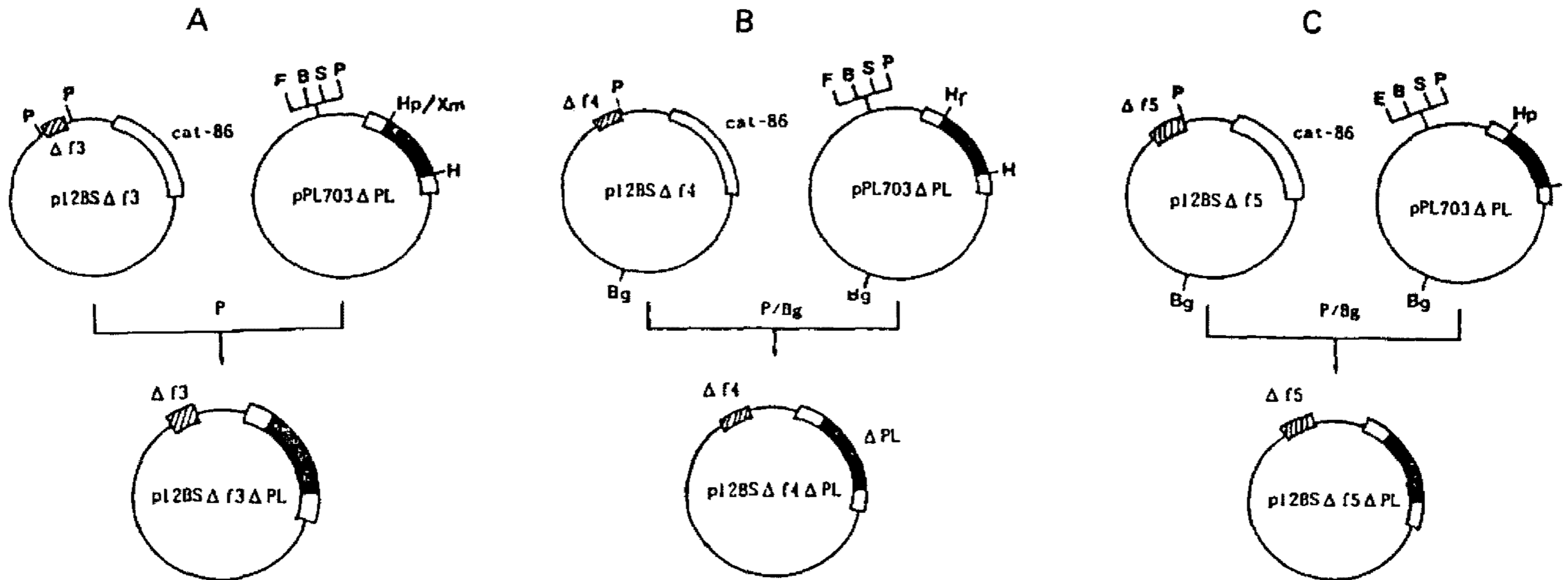


Fig. 6. Schematic diagram for construction of p12BSΔf3ΔPL, p12BSΔf4ΔPL and p12BSΔf5ΔPL. A, p12BSΔf3ΔPL; B, p12BSΔf4ΔPL; C, p12BSΔf5ΔPL.

PL 효소의 비활성은 Cm에 의해 유도되지 않은 cell에서도 mRNA의 양이 약 20% 증가했다는 Lovett 등(21)의 보고를 참고할 때, 이는 mRNA의 증가에 의한 현상임을 알 수 있다. 그러나 pPL708ΔPL 또는 p12BSΔf1ΔPL을 함유한 재조합 균주들의 PL 활성이 Cm에 의해 각각 2배, 4배로 증가되어진 결과는 Lovett 등이 보고한 것과 같은 Cm 첨가에 의한 mRNA의 상승 효과에 더하여 Serap 등(22)의 실험결과처럼 translation coupling현상에 의한 증가인 것으로 추측되어진다. 즉 hybrid transcript상에서 vector 자체의 ribosomal binding site(RBS)에 결합하여 번역하던 ribosome이 2개의 stop codon에 의해 mRNA상에서 일시 정지, 또는 분리되어지지만, stop codon 바로 뒤에 존재하는 pectate lyase의 RBS를 인식하고 빠른 속도로 재결합하여 translation을 진행하게 되므로 PL 효소활성이 각각 2배, 4배로 증가되어진 것으로

예측할 수 있다.

p12BSΔf1 유도체와 PL 유전자와의 재조합 plasmid 제조

Kim 등(23)은 p12BSΔf1이 가지고 있는 0.52 kb promoter 단편내에는 적어도 3가지 이상의 promoter가 overlapping 또는 직쇄상연결로 구성되어있음을 밝혀내었고, 이를 분락하여 p12BSΔf3, p12BSΔf4와 p12BSΔf5를 제조하고 *B. subtilis*내에서 각 promoter에 의한 CAT의 정량분석을 행한 결과, 대수증식기 말기, 포자형성 초기와 포자형성 단계에서 활성정점이 나타나 Δf1 promoter내에는 σ^A σ^B σ^H promoter가 존재함을 확인하였다. 그러나 *Bacillus* sp. YA-14 유래의 세포외 효소인 pectate lyase 유전자를 사용한 경우 Fig. 5의 C에 나타난 바와 같이 특정한 활성정점이 없이 계속적으로 증가

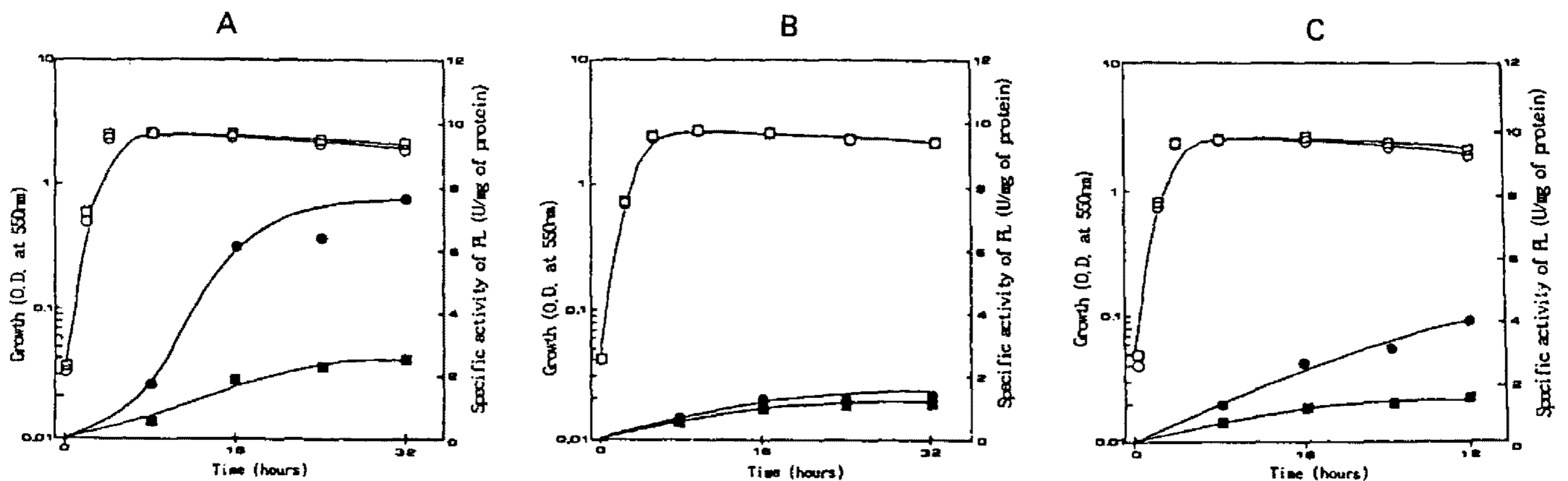


Fig. 7. Time course of cell growth and pectate lyase production.

The PL assay was done with or without chloramphenicol induction. The open symbols represent the absorbance at 550 nm and the closed symbols represent the specific activity of PL. □ and ■, without chloramphenicol; ○ and ●, with chloramphenicol. A, *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf3ΔPL; B, *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf4ΔPL; C, *B. subtilis* 207-25 harboring p12BSΔf5ΔPL.

되어지는 양상을 보였다.

p12BSΔf1ΔPL의 최대 비활성치가 각 σ factor의 작동에 의한 것인지의 여부를 검토하기 위하여 Δf1 유도체에 PL 유전자를 연결하여 재조합 plasmid를 제조하였다. σ^E 와 σ^A promoter 부위가 함유된 p12BSΔf3를 *Pst*I으로 절단하여 전기영동을 행한 후 0.3 kb의 단편을 회수하여 pPL703ΔPL을 동일한 제한효소로 절단한 다음, 이를 회수한 0.3 kb의 단편과 ligation시켰다. Protoplast 형질전환법을 사용하여 형질전환시킨 후 동일한 방법으로 목적균주를 선별하였으며, 선별된 균주로부터 재조합 DNA를 분리하여 제한효소로 처리하여 확인된 plasmid를 p12BSΔf3PL로 명명하였다(Fig. 6, A).

σ^B promoter 부위가 포함된 p12BSΔf5와 σ^A promoter를 함유한 p12BSΔf4를 각각 *Pst*I과 *Bgl*II로 절단하여 promoter를 함유한 단편을 회수하였다. PL 유전자가 포함된 pPL703ΔPL을 동일한 제한효소로 절단하여 회수된 promoter 단편과 ligation시켜 동일한 방법으로 형질전환하였다. 선별된 균주의 plasmid를 여러 가지 제한효소로 절단하여 확인하였으며 각각 p12BSΔf4ΔPL, p12BSΔf5ΔPL로 명명하였다(Fig. 6, B, C).

Δf1 유도체들에 의한 PL 유전자의 발현

각 재조합 균주들을 동조배양법으로 배양하면서 적당한 시간 간격으로 시료를 취하여 PL 효소의 비활성을 측정하였다. 재조합체들 모두 CAT을 지시유전자로 사용했을 때와 비슷한 상대활성도를 보였으나 CAT 경우처럼 생육단계별의 최대활성정점은 없었다(Fig. 7, A, B, C). 이는세포내 효소인 CAT과 달리 PL이 세포외 단백질이며, 작지만 영양세포 단계에서 작동되어지는 PL promoter에 의해서 PL 유전자의 발현이 조절되어지고 있기 때문인 것으로 추측할 수 있다.

요 약

알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14 유래의 strong promoter가 삽입되어져 있는 p12BSΔf1에 동일 공여균주로부터 분리된 pectate lyase(PL)의 유전자를 연결하여 pectate lyase의 대량생산을 유도하였다. Overlapping promoter인 Δf1에 의한 pectate lyase의 발현증대를 위하여 1.6 kb의 PL유전자를 p12BSΔf1에 도입한 p12BSΔf1-PL을 제조하였으나, PL유전자 상단에 존재하는 전사저해구조로 인하여 발현효율이 저하되었다. PL 유전자 상단의 전사종결구조를 제거함과 동시에 promoter의 근접한 부위에 PL 유전자를 연결하여 p12BSΔf1ΔPL을 제조하였다. 이 재조합 plasmid를 함유하는 *B. subtilis* 207-25는 strong promoter에 의하여 발현효율이 증대되었으며, *cat*-86 유전자를 지시유전자로 사용하였을 경우 chlo-

ramphenicol 유도에 의해 효소활성이 2배 증가되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처 주관 G7 project에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Pouwels, P. H., B. E. E. Valk and W. J. Brammer. 1985. *Cloning vectors*, 2. Elsevier, New York.
2. Ganesan, A. T. and J. A. Hoch. 1986. *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*. Academic Press, New York.
3. Wong, H. C., H. E. Schnept and H. R. Whiteley. 1983. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* **258**: 1960-1967.
4. Stewart, G. C. and K. F. Bott. 1983. DNA sequence of the tandem ribosomal RNA promoter for *B. subtilis* operon *rrnB*. *Nucleic Acids Res.* **11**: 6289-6300.
5. Ogasawara, N., S. Moriya and H. Yoshikawa. 1983. Structure and organization of rRNA operons in their region of the replication origin of *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res.* **11**: 6301-6318.
6. Johnson, W. C., C. P. Moran Jr. and R. Losick. 1983. Two RNA polymerase sigma factors from *Bacillus subtilis* discriminate between overlapping promoters for a developmentally regulated gene. *Nature.* **302**: 800-804.
7. Moran Jr. C. P., N. Lang, C. D. B. Banner, W. G. Haldenwang and R. Losick. 1981. Promoter for a developmental regulated gene in *Bacillus subtilis*. *Cell.* **5**: 783-791.
8. Wang, L-F. and R. H. Doi. 1987. Promoter switching during development and the termination site of the σ^{43} operon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 114-119.
9. Kawamura, F. and R. H. Doi. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
10. Williams, D. H., E. J. Duvoll and P. S. Lovett. 1981. Cloning restriction fragments that promote expression of a gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **146**: 1162-1165.
11. Mongkolsuk, S. and P. S. Lovett. 1983. Restriction fragments that exert promoter activity during postexponential growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **155**: 1399-1406.
12. Park, H. K., Y. S. Park, J. M. Kim and J. H. Yu. 1991. Studies on the properties of the promoter from alkali-tolerant *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 21-24.
13. Yu, J. H., Y. S. Park, J. M. Kim, I. S. Kong and Y. J. Chung. 1988. Cloning of pectate lyase gene of alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 and its expression in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. and Bioeng.* **16**: 316-319.
14. Ish-Horowicz, D. and J. F. Burke. 1981. Rapid and ef-

- ficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989-2998.
15. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1990. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.
 16. Chang, S. and S. W. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
 17. Keen, N. T., D. Dahlbeck, B. Staskawicz and W. Belser. 1984. Molecular cloning of pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* and their expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **159**: 825-831.
 18. Bradford, H. B. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
 19. Shaw, W. V. 1975. Chloramphenicol acetyltransferase from the chloramphenicol-resistant bacteria. *Method in Enzymol.* **43**: 737-755.
 20. Brosius, J. 1987. Plasmids for the selection and analysis of prokaryotic promoters. *Method in Enzymol.* **153**: 54-68.
 21. Ambulos, N. P. Jr., S. Mongkolsuk and P. S. Lovett. 1985. A transcription termination signal immediately precedes the coding sequence for the chloramphenicol-inducible plasmid gene cat-86. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 70-75.
 22. Aksoy, S., C. L. Squires and C. Squires. 1984. Translational coupling of the *trpB* and *trpA* genes in the *Escherichia coli* tryptophan operon. *J. Bacteriol.* **157**: 363-367.
 23. Kim, J. M., Y. S. Park, H. K. Park, D. Y. Yum, D. H. Bai and J. H. Yu. 1993. Structure and regulation of a complex promoter region from an alkali-tolerant *Bacillus* sp. *J. Microbiol. Biotech.* **3**: 146-155.

(Received 12 June 1997)