

## *Brevibacterium lactofermentum*의 *dapD* 유전자의 Cloning 및 *E. coli*에서의 발현

김옥미\* · 박선희 · 박혜경 · 이송언 · 하대중\* · 이갑량†

영남대학교 식품영양학과

\*대경대학 호텔쿠크리과

### Cloning and Expression of the *dapD* Gene from *Brevibacterium lactofermentum* in *E. coli*

Ok-Mi Kim\*, Sun-Hee Park, Hea-Kyung Park, Sung-Eun Lee,  
Dae-Joong Ha\* and Kap-Rang Lee†

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

\*Dept. of Hotel Cookery, Taekyeung College, Kyongsan 712-851, Korea

#### Abstract

The *dapD* gene of *Brevibacterium lactofermentum* encoding tetrahydrodipicolinate N-succinyl transferase, one of the enzymes involved in lysine biosynthesis, was cloned by complementation of *Escherichia coli dapD* mutant. The recombinant plasmid pLS1 was found to contain a 3.6 kb DNA fragment. Southern hybridization analysis confirmed that the cloned DNA fragment originated from *B. lactofermentum*. The data of L-lysine production showed that the *B. lactofermentum dapD* gene was expressed in *E. coli*.

Key words: *dapD* gene, cloning, *Brevibacterium lactofermentum*

#### 서 론

원핵생물계에서의 L-lysine은 3가지 서로 다른 경로를 통하여 합성된다(1). Fig. 1에서 보는 바와 같이 acetyl화된 중간 대사물과 succinyl화된 중간대사물을 각각 거쳐 lysine을 생합성하는 acetylase경로(2) 및 succinylase경로(3,4)는 중간 물질인 tetrahydrodipicolinate(THDPA)로부터 meso-diaminopimelate(meso-DAP)로의 전환에 4단계의 효소반응을 요구하지만, dehydrogenase 경로는 이들의 4단계 효소반응을 *ddh*(meso-DAP-dehydrogenase) 유전자가 관여하여 한 단계로 진행시켜 lysine 생합성 경로를 단축시키는 것으로 알려져있다(5-7).

*E. coli*를 비롯한 대부분의 미생물들은 3가지 경로 중 한가지 경로를 통하여 lysine을 생합성하는 반면 lysine 생산 균주인 *Corynebacterium glutamicum* 및 *Brevibacterium lactofermentum*에서는 succinylase 경로 및 dehydrogenase 경로가 함께 작용하여 lysine을 생합성하며 실제 아미노산 발효 산업에 이용되고 있다(6-8).

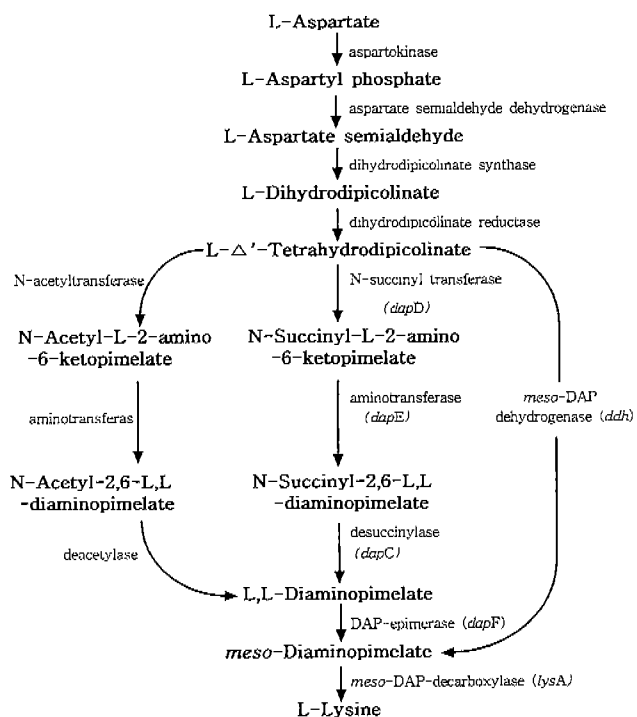
본 연구자 등은 lysine 생합성에서 dehydrogenase 경로의 중요성을 조사하기 위하여 *B. lactofermentum*의 *ddh* 유전자를

불활성화시켜 dehydrogenase 경로를 차단시킨 결과, succinylase 경로 단독의 작용은 lysine 생산량의 극적인 감소를 초래한다고 보고하였다(9). 이러한 결과는 lysine 생산균주인 *C. glutamicum* 및 *B. lactofermentum*에서 높은 수율의 lysine을 생성하는 것은 dehydrogenase 경로가 부가적으로 존재하기 때문일 것으로 사료된다.

그러므로 본 연구자 등은 *B. lactofermentum*의 lysine 생산성에 있어 succinylase 경로 및 dehydrogenase 경로의 상관 관계를 좀 더 면밀히 조사하기 위해서 succinylase 경로를 차단시켜 dehydrogenase 경로의 단독작용을 조사하기로 하였다. 그런데 지금까지 *B. lactofermentum*의 succinylase 경로에 관여하는 *dapD*, *dapE*, *dapC* 및 *dapF* 유전자의 분리가 보고된 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 *B. lactofermentum*의 succinylase 경로에 관여하는 유전자, 즉 lysine 생합성 단계의 중간 물질인 THDPA로부터 N-succinyl-L-2-amino-6-ketopimelate로 전환시켜 궁극적으로 lysine을 생합성하는 *dapD* 유전자를 complementation test를 통하여 cloning하고, *E. coli*에서의 발현을 조사하였다.

†Corresponding author. E-mail: krlee@yu.ac.kr  
Phone: 82-53-810-2871, Fax: 82-53-813-2357



**Fig. 1. Biosynthetic pathway of L-lysine in procaryotes.** The acetylated intermediates (left) and succinylated intermediates (center) of the diaminopimelate (DAP) pathway and *meso*-DAP-dehydrogenase (DDH) pathway (right) are utilized for biosynthesis of lysine in procaryotes.

**재료 및 방법**

**사용균주 및 plasmids**

제한효소 *Bam*HI 으로 부분 절단된 *B. lactofermentum*의 염색체 DNA와 역시 동일 효소로 절단된 pBR322 DNA를 ligation시켜 제조된 *B. lactofermentum* KTCC1844(10)의 genomic library는 본 연구실에서 보유한 것을 사용하였다. *E. coli* AT986은 *dapD* 유전자를 cloning하기 위한 host로, *E. coli* JM109는 plasmid DNA를 안정하게 보관시키기 위한

균주로 사용하였다. Plasmid pBR322는 *B. lactofermentum*의 genomic library제조에 이용되었으며 pBluescript SK<sup>+</sup>는 cloning vector로 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다.

**배지 및 배양 조건**

실험에 사용한 모든 균주 배양에는 LB(Luria-Bertani)배지(11)를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin(50 µg/mL)을 첨가하여 배양하였다. M9 선택배지(11)는 *dapD* 유전자를 cloning하기 위한 최소배지로 사용하였으며, 필요에 따라 thiamine(0.1M), DAP(50 µg/mL) 및 ampicillin(50 µg/mL)을 첨가하여 사용하였다. *E. coli*는 호기적 조건하에서 37°C에서 배양하였다.

**Plasmid DNA 분리 및 형질전환**

*E. coli*로부터 plasmid DNA 분리는 Birnboim and Doly의 alkaline lysis 방법(12)에 따라 추출되었다. 제한효소 및 ligation반응은 Sambrook 등의 방법(11)에 준하여 수행하였으며 DNA 단편은 투석막을 이용하여 agarose gel상에서 분리되었다. *E. coli*의 형질전환은 Sambrook 등(11)의 방법에 따라 행하였으며, DAP<sup>r</sup>, Ap<sup>r</sup> 형질전환체들은 DAP가 함유되지 않고 ampicillin 및 thiamine이 첨가된 M9 선택배지에서 선별되었다.

**Southern hybridization**

Southern hybridization은 Southern의 방법(13)에 따라 수행하였으며 이때 probe DNA는 *dapD*를 함유한 DNA 단편을 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP로 labeling하여 사용하였다.

**meso-DAP-dehydrogenase(DDH) 활성 측정 및 lysine의 정량**

DDH 활성 측정은 Roh 등(8)의 방법에 따라 행하였으며 lysine 정량은 Chinard의 방법(14)에 따라 항생제가 첨가된 LB배지에서 배양시킨 균체를 원심분리하여 모우고 0.9%

**Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study**

Strain/plasmid	Genotype	Source or reference
<i>B. lactofermentum</i> KCTC1844 genomic library	Nx <sup>r</sup>	KCTC
<i>E. coli</i> AT986 JM109	<i>dapD8 relA1 spoT1 thi-1 λ</i> <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)F.</i> [ <i>traD36 proA<sup>+</sup> proB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15</i> ]	Dr. Bachmann Promega
Plasmids		
pBR322	Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Our lab.
pBluescript II SK <sup>+</sup>	Ap <sup>r</sup>	Our lab.
pLS1	Ap <sup>r</sup> <i>dapD</i> <sup>r</sup>	This work
pLS2	Ap <sup>r</sup> <i>dapD</i> <sup>r</sup>	This work

Abbreviations: Nx, nalidixic acid; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

NaCl용액으로 2회 세척한 다음, 각 sample의 OD<sub>600</sub> 값을 동일하게 하여 M9 선택배지로 재접종하여 37°C에서 72시간 배양하였다.

균체 농도는 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(U-2000, Hitachi Co., Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며, lysine 정량은 배양된 균체의 세포를 sonicator으로 파괴한 후 원심분리한 상등액을 crude extract로 사용하여 OD<sub>465</sub>에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

결과 및 고찰

*B. lactofermentum*의 *dapD* 유전자의 분리

*B. lactofermentum*의 genomic library로부터 *dapD* 유전자를 cloning하기 위하여 genomic library DNA를 *dapD*가 결여된 *E. coli* AT986내로 형질전환시킨 결과, DAP가 함유되지 않고 ampicillin 및 thiamine이 첨가된 M9 선택배지에서 72시간만에 성장하는 20개의 Ap<sup>r</sup>, DAP<sup>r</sup> 형질전환체를 획득했다. 선별된 형질전환체들을 M9 선택배지에서 성장하였으므로 영양요구성이 해제되었음을 알 수 있었지만 이들 형질전환체 중에는 *dapD* 유전자 외에도 *dhh* 유전자가 함유될 수 있기 때문에 20개의 형질전환체 중에서 5개의 형질전환체를 선별하여 DDH 효소활성을 측정하였다. 그 결과 1개의 형질전환체가 DDH 효소활성을 나타내고 나머지 형질전환체에서는 활성이 검출되지 않았다(data not shown). 그러므로 1개의 형질전환체는 *dhh* 유전자를 함유하고 있다고 판단되어 제외시키고 나머지 4개의 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소 *Bam*HI으로 절단시켜 전기영동하였다. Fig. 2에서와 같이 DNA는 모두 같은 크기의 공통적인 형태를 나타내었으며 vector로 사용된 pBR322(4.4kb) 외에 3.6 kb 정도의 *dapD* 유전자를 포함한 DNA 단편을 관찰할 수 있었다. 이들 형질전환체 중 하나를 선택하여 pLS1으로 명명하였다.

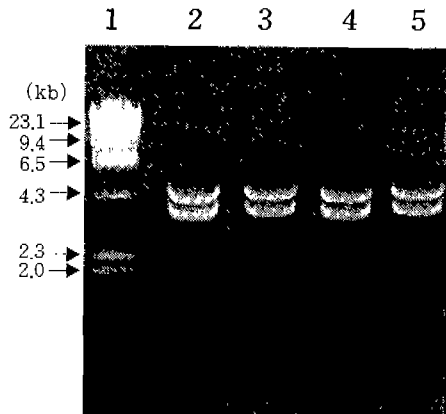


Fig. 2. Restriction pattern of the transformant. Isolated plasmids DNA were digested with restriction endonucleases *Bam*HI. Lane 1,  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III; Lane 2~5, transformant DNAs digested with *Bam*HI.

*dapD* 유전자 유래 확인 및 제한지도작성

*dapD* 유전자를 함유한 pLS1의 3.6 kb *Bam*HI 단편이 *B. lactofermentum*의 염색체에서 유래되었음을 증명하기 위하여 약 3.6 kb *Bam*HI 단편을 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP로 labeling한 후 이를 probe로 하여 *B. lactofermentum*의 염색체 DNA와 Southern hybridization을 수행하였다. Fig. 3에서 보는 것처럼 3.6 kb DNA probe는 염색체 DNA상의 동일한 위치에서 hybridization하였으므로 *dapD* 유전자를 함유한 3.6 kb DNA 단편은 *B. lactofermentum*에서 유래하였으며 또한 염색체내에 single copy로 존재함을 알 수 있었다.

*dapD* 유전자를 함유한 DNA 단편의 제한지도 작성을 위해 pLS1로부터 3.6 kb의 *Bam*HI 단편을 분리하여 multicloning site를 함유하고 있는 pBluescriptII SK<sup>+</sup>의 *Bam*HI site에 삽입하여 pLS2를 제조하였다. pLS2를 여러 종류의 제한효소로 절단시켜 확인한 결과 *dapD* 유전자를 포함한 DNA 단편 내에는 *Xho*I site가 1개, *Pst*I 및 *Hind*III site가 각각 2개씩 존재하였다(Fig. 4).

L-Lysine의 정량

*B. lactofermentum* *dapD* 유전자의 *E. coli*에서의 발현을 확인하기 위하여 재조합 plasmid pLS1 및 pLS2를 *dapD*가

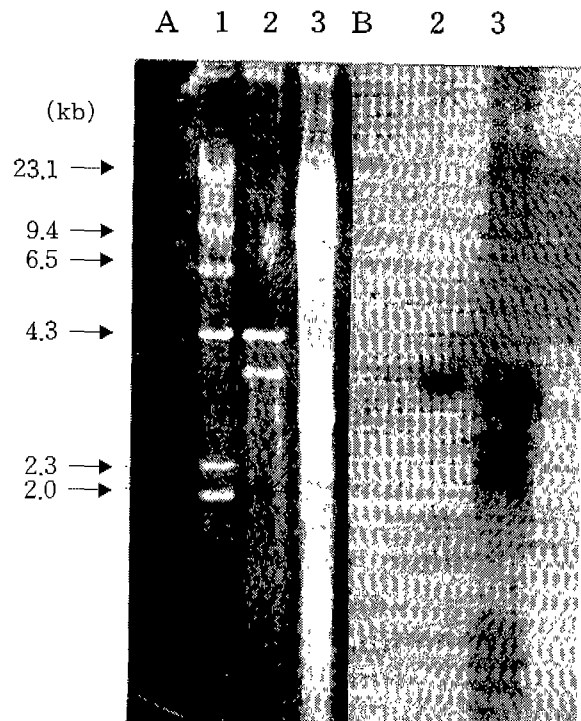


Fig. 3. Identification of the plasmid pLS1 with Southern blot hybridization.

The chromosomal DNAs isolated from *B. lactofermentum* KCTC 1846 were digested with *Bam*HI and hybridized with a labeled 3.6 kb *Bam*HI fragment of pLS1. A: Agarose gel electrophoretogram. lane 1.  $\lambda$  DNA digested with *Hind*III; lane 2, pLS1 digested with *Bam*HI; lane 3, *B. lactofermentum* KCTC1846 chromosomal DNA digested with *Bam*HI, B: Autoradiogram.

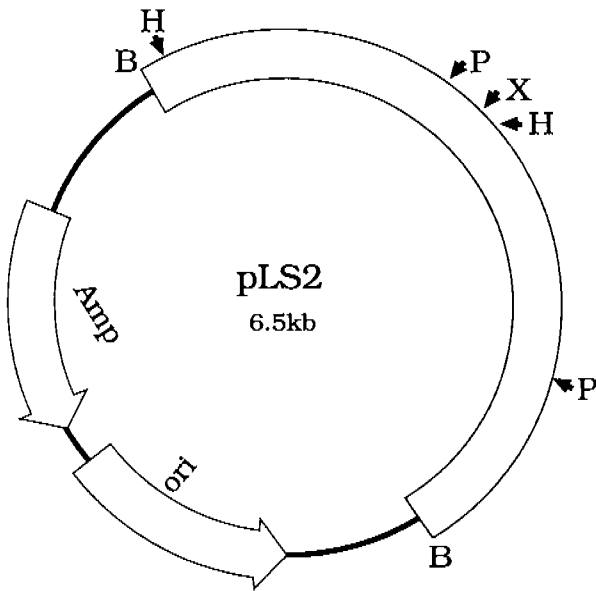


Fig. 4. Restriction map of pLS2.  
B, BamHI; H, HindIII; P, Pst I; X, XhoI.

Table 2. Expression of *B. lactofermentum* *dapD* gene in *E. coli*

Strain/plasmid	Relevant genotype	Growth (OD <sup>1)</sup> )	Lysine (mg/L)
<i>E. coli</i> JM109	wild type	0.91	1.98
<i>E. coli</i> AT986	<i>dapD8 relA1 spoT1 thi-1 λ</i>	0.01	ND <sup>2)</sup>
<i>E. coli</i> AT986 (pLS1)	Ap <sup>r</sup> <i>dapD</i> <sup>1</sup>	0.89	2.53
<i>E. coli</i> AT986 (pLS2)	Ap <sup>r</sup> <i>dapD</i> <sup>1</sup>	0.90	2.40

<sup>1)</sup>OD, optical density.

<sup>2)</sup>ND, not detected.

결여된 *E. coli* AT986으로 형질전환시켜 균체 성장 및 L-lysine을 정량하였다. Table 2에서 보는 것처럼 대조균주로 사용한 *E. coli* AT986은 M9 선택배지에서 성장하지 못하였으며 *dapD* 유전자를 함유한 균주의 성장은 wild type으로 사용한 *E. coli* JM109와 거의 유사하였다. 또한 lysine 생성량 비교 분석에서는 재조합체를 함유한 균주는 wild type으로 사용한 *E. coli* JM109와 비슷한 수준을 나타내었으며 *E. coli* AT986에서는 검출되지 않았다.

요 약

산업적으로 lysine 발효 산업에 이용되고 있는 *B. lactofermentum*으로부터 lysine 생합성에 관여하는 tetrahyrodipicolinate N-succinyl transferase를 지령하는 *dapD* 유전자를 *E. coli*의 *dapD* 결손변이주와의 complementation test를 통하

여 cloning하였다. 재조합 plamid는 3.6 kb의 DNA 단편을 함유하고 있었으며 Southern blot hybridization을 통하여 *dapD* 유전자는 *B. lactofermentum*으로부터 유래하였으며 염색체 DNA내에 single copy로 존재함을 알 수 있었다. 또한 lysine 생성량 분석을 통하여 *E. coli*에서 *B. lactofermentum* *dapD* 유전자의 발현을 확인하였다.

문 헌

- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Eggeling, L. and Sahm, H. : A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.*, **173**, 4510-4516 (1991)
- Sundharadas, G. and Gilvarg, C. : Biosynthesis of 2,6-diaminopimelate acid in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.*, **242**, 3983-3988 (1967)
- Berges, D.A., Dewolf, W.E., Dunn, G.L., Newman, D.J., Schmidt, S.J., Taggart, J.J. and Gilvarg, C. : Studies on the active site of succinyl-CoA : tetrahyrodipicolinate N-succinyl transferase. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6160-6167 (1996)
- Kindler, S.H. and Gilvarg, C. : N-succinyl-L- $\alpha$ ,  $\epsilon$ -diaminopimelate acid deacylase. *J. Biol. Chem.*, **235**, 3532-3535 (1960)
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. and Sahm, H. : Regulation of enzyme of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 3221-3229 (1988)
- Misono, H.M., Ogasawara, M. and Nagasaki, S. : Characterization of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2729-2734 (1986)
- Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T. and Furuya, A. : Functional expression of the genes of *Escherchia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen Genet.*, **196**, 175-178 (1984)
- Roh, J.H., Kim, O.M., Park, D.C., Kim, H.J., Yun, H.K., Kim, S.D., Lee, I.S. and Lee, K.R. : Cloning and functional expression of the *dhh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *Mol. Cells*, **4**, 295-299 (1994)
- Kim, O.M., Park, S.H. and Lee, K.R. : Site-specific inactivation of meso-diaminopimelate-dehydrogenase gene (*dhh*) in a lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 400-405 (1998)
- Santamaria, R.I., Gil, J.A. and Martin, J.H. : High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, **162**, 463-467 (1985)
- Sambrook, J., Fritsh, E.T. and Maniatis, T. : *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)
- Birnboim, H.C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523 (1979)
- Southern, E.M. : Detection specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975)
- Chinard, F.P. : L-lysine measurement with the acid-ninhydrin reagent. *J. Biol. Chem.*, **199**, 91-95 (1952)

(2001년 7월 6일 접수)