

## 용균과 DNA 패키징 유전자가 결핍된 온도 민감성 박테리오파아지 람다 시스템에서 재조합 단백질 생산성에 미치는 온도의 영향

오 정 석 · † 박 태 현

서울대학교 화학생물공학부

(접수 : 2005. 2. 17., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

## Temperature Effect on the Productivity of Recombinant Protein in a Lysis and DNA packaging-deficient and Temperature-sensitive Bacteriophage $\lambda$ System

Jeong Seok Oh and Tai Hyun Park†

School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University,  
Gwanak-gu, Sillim-dong San 56-1, Seoul 151-744, Korea

(Received : 2005. 2. 17., Accepted : 2005. 4. 23.)

*E. coli* in combination with bacteriophage  $\lambda$  was used to overcome the intrinsic plasmid instability that is frequently found in recombinant fermentation especially in long-term operation. In order to enhance the stability and productivity, the bacteriophage  $\lambda$ NM1070 was used in this study. It is a  $\lambda$  mutant, which is deficient in the synthesis of protein related to DNA packaging and cell lysis. The  $\lambda$ NM1070 is also a temperature-sensitive mutant. To optimize the production of recombinant protein in this temperature-sensitive system, the temperature effects on growth and cloned gene expression were investigated for stable and efficient recombinant gene expression. The induction to the lytic state was not complete at 36°C while the temperature above 40°C induced the lytic state completely. However, the productivity was decreased at 42°C by temperature inhibition. The  $\lambda$ -free cell concentration increased with the increase of temperature until 40°C. In conclusion,  $\lambda$  NM1070 has the optimal temperature at 38°C for stability and at 40°C for expression.

**Key Words** : Bacteriophage  $\lambda$ , temperature induction, productivity, plasmid instability

### 서 론

재조합 단백질 생산을 위하여 산업적 공정에서 플라스미드 벡터가 보편적으로 이용되고 있다. 따라서 재조합 단백질 생산 능력은 플라스미드를 얼마나 안정적으로 유지하는 것이 중요한 요소이고(1), 특히 장기간 조업하는 연속 배양인 경우 플라스미드 안정성은 매우 중요한 요소가 된다. 플라스미드 안정성을 유지하기 위해서 지금까지 많은 연구가 진행되었다. *hok/sok* 킬러 로커스(2, 3), 항생제 선별 마커(1), 회색률 다이내믹 사이클링(4), 박테리오파아지  $\lambda$  시스템(5, 6) 등

과 같은 방법들이 고안되었다. 이 중에서 박테리오파아지  $\lambda$ 는 대장균의 염색체에 들어가서 안정적으로 복제하는 lysogenic 상태와, 자기 자신을 복제 할 수 있는 lytic 상태를 가지고 있다는 특징이 있다.

세포 성장과 재조합 단백질 생산을 분리한 2단계 배양에서 람다의 이런 특징을 이용하면 안정성과 생산성을 가진 공정 개발이 가능하다. 즉, lysogenic 상태를 이용하여 vector가 들어 있는 숙주 세포를 안정적으로 공급하는 세포 성장 단계와 lytic 상태를 유도함으로써 재조합 단백질을 생산하는 생산 단계로 분리하는 것이다. 그러나 박테리오파아지  $\lambda$ 는 숙주 세포를 죽이는 바이러스이므로 대장균/박테리오파아지  $\lambda$  시스템에서는 재조합 단백질이 완전히 생산되기 전에 용균 단백질의 발현에 의해서 대장균이 죽게 되고,  $\lambda$  DNA는 패키징이라는 단계를 거쳐서 껍질을 입게 되어 생산성이 낮아지는 결과를 보였다(5). 이런 문제를 극복하기 위하여 용균이

† Corresponding Author : School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea  
Tel : +82-2-880-8020, Fax : +82-2-875-9348  
E-mail : thpark@plaza.snu.ac.kr

나  $\lambda$  DNA 패키징에 관여하는 단백질의 발현을 억제해서 생산성을 증가시키려는 시도가 진행되었다(7, 8).

본 연구에서는 용균에 관여하는 S 단백질과  $\lambda$  DNA 패키징에 관여하는 W, E 단백질 생산이 결핍된 박테리오파지  $\lambda$  NM1070을 벡터로 사용하였다. 또한  $\lambda$  NM1070은 온도 민감성 돌연변이 유전자를 사용하고 있다. 온도 민감성 돌연변이는 온도에 의해서 lysogenic과 lytic 상태가 결정되는 시스템이다(9, 10). 즉, 낮은 온도에서는 lysogenic 상태로 벡터 안정성을 유지하고, 높은 온도에서는 lytic 상태로 전환되어서 자기 자신을 복제하게 된다. 따라서 온도 민감성 돌연변이를 사용한 시스템에서 온도는 재조합 단백질 생산에 있어서 중요한 인자가 된다(11, 12). 본 연구에서는  $\lambda$  NM1070을 이용한 재조합 단백질 시스템에서 유전자 불안정성과 생산성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

*E. coli* P90c (*ara*  $\Delta$  (*lac-pro*) *thi*)를 숙주 세포로 사용하였다(13). P90c는 *lacZ*와 *lacI*가 결손된 변이주이다. 따라서  $\beta$ -galactosidase를 생산하는데 있어서 IPTG는 필요하지 않다. 박테리오파지  $\lambda$  NM1070 (*Wam403Eam1100lacZchs857Sam100*)이 벡터로 사용되었다. 이 돌연변이  $\lambda$ 는 *lacZ*를 포함하고 있어서  $\beta$ -galactosidase를 생산하고, 용균에 관여하는 S 유전자, DNA 패키징에 관여하는 W, E 유전자에 변이가 있어서 DNA 패키징과 용균이 억제된 변이주이다.  $\lambda$  NM1070이 들어가 있는 대장균을 배양하기 위해서 5 g/L 효모 추출물을 포함하는 M9 배지를 사용하였고, 초기 세포 농도를 0.015 ~ 0.025 ( $O.D_{600nm}$ )으로 맞추는 다음 33°C 1시간 동안 배양한 후 다양한 온도 (36°C, 38°C, 40°C, 42°C)로 올려서 배양하였다.

### Lysogenization

박테리오파지  $\lambda$  NM1070을 대장균에 감염시킨 후 안정적인 lysogenic 상태를 유도하기 위해서 다음과 같은 방법을 수행하였다. *E. coli* P90c를 10 mM  $MgSO_4$ 와 0.2% (W/V) maltose가 들어 있는 LB 배지 (LBMM)에서 12시간 동안 37°C에서 seed culture를 한 후 새로운 LBMM 배지로 접종하고,  $O.D_{600nm}$ 가 1이 될 때까지 키운 후 10 mM  $MgSO_4$ 로  $O.D_{600nm}$ 가 0.5가 되도록 희석시킨다. 이렇게 만들어진 competent P90c에 적절한 농도의 박테리오파지  $\lambda$  NM1070을 30°C에서 30분 동안 감염시킨 후 30°C X-gal plate 위에서 12시간 동안 배양한다. X-gal plate 위의 맑은 콜로니 중에서 푸른색 콜로니를 선별하고 다시 X-gal plate 위에서 배양한다. X-gal plate 위의 모든 콜로니가 푸른색이 될 때까지 반복한 후 lysogenized P90c/ $\lambda$  NM1070을 선별하였다.

### 분석 방법

세포 농도는 spectrophotometer (Genisys<sup>TM</sup> 5, Spectronic)를 사용하여 측정하였고,  $\beta$ -galactosidase 농도는 Miller 방법에 따라 총  $\beta$ -galactosidase 농도와 세포의 농도를 분리하여 측정하였다. 박테리오파지 수는 대장균이 덮힌 plate 위에 나타나는 plaque의 개수를 plaque forming unit (pfu) 단위로 측정하

였다. 박테리오파지가 들어있지 않은 빈 세포들의 농도는 X-gal plate에 나타나는 흰색 콜로니의 개수로서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 세포 성장

온도 민감성 돌연변이를 사용한  $\lambda$  NM1070은 온도에 의해서 lysogenic 상태에서 lytic 상태로 전환된다. lytic 상태는 재조합 단백질을 생산하는 단계로서 전환 정도에 따라서 세포 안정성이나 생산성에 많은 영향을 주게 된다. 또한 세포 안정성과 생산성의 최적 온도는 일치하지 않기 때문에 최적의 온도를 구하기 위해서 다양한 온도에 따른 영향을 관찰하였다. Fig. 1은 다양한 온도가 세포 성장에 미치는 영향을 나타내는 그림이다. 33°C는 lytic 상태가 유도되지 않은 lysogenic 상태를 나타내는 온도이며, 33°C에서의 배양은 세포 성장에는 저해 효과를 보여주지 않고 있다. 36°C에서의 배양은 33°C와 큰 차이를 보이지 않고 있다. 이 결과는 36°C의 배양 온도는 충분하지 못한 lytic 전환 온도임을 말해준다. 38°C 이상의 배양 온도에서는 세포 성장에 저해 효과를 보여주고 있으며, 온도 증가에 따라서 그 저해 효과는 증가하였다.

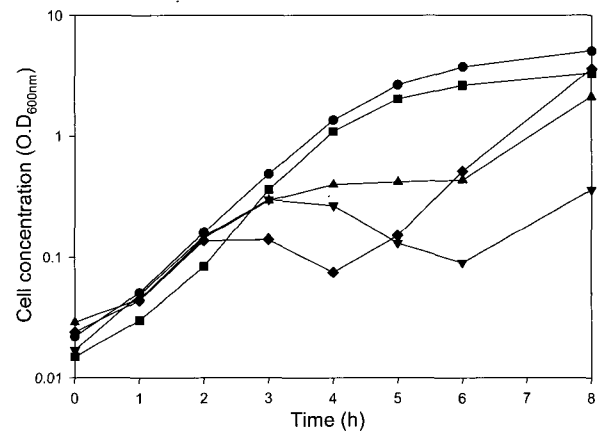


Figure 1. Effect of induction temperature on cell growth of P90c/ $\lambda$  NM1070. Cells were grown at 33°C for 1 h and induced by temperature shift to higher temperature. (●) 33°C (■) 36°C, (▲) 38°C, (▼) 40°C, (◆) 42°C.

박테리오파지  $\lambda$  NM1070은 세포 용혈에 관여하는 S 유전자에 돌연변이가 되어 있으므로 용균을 억제할 것으로 예상하였다. 그러나 40°C 이상의 배양 온도에서는 용균현상이 관찰되었다. 본 연구에서는 S에 대한 suppression을 방지하기 위해서 non-suppressor 균주를 사용하였지만, 용균을 막지는 못했다. 이 결과는 자연적인 S변이의 leakage에 의한 S 단백질의 축적에 의해서 발생했을 가능성이 있으며, 혹은 람다의 성장시에 생산되는 다른 단백질에 의한 cell 자체의 손상에 의해서 용균이 일어난 것으로 추정된다.

특이한 사실은 용균 진행 일정 시간 후 대장균이 다시 자라는 현상을 나타내고 있는 것이다. Table 1, 2는 다양한 온도에서 자라는 대장균을 33°C의 X-gal plate에서 배양한 후 조사한 푸른색 콜로니와 흰색 콜로니의 개수를 나타내고 있다.

흰색 콜로니는  $\lambda$  DNA가 들어 있지 않은 대장균을 나타내고, 푸른색 콜로니는  $\lambda$  DNA를 가지고 있으나 lytic 전환이 완전히 일어나지 않아서 살아있는 대장균의 수를 나타내고 있다. 40°C까지는 온도가 증가할수록  $\lambda$  DNA가 들어 있지 않은 대장균 수가 증가했고, 42°C에서는 40°C에 비해서 다소 감소하였다. Lytic 상태로 유도할 때  $\lambda$  DNA가 들어 있지 않은 대장균의 발생은 자연적인 현상으로 생각된다.  $\lambda$ NM1070은 *W*, *E* gene에 돌연변이가 되어 있어서 새로운  $\lambda$ NM1070을 만들지 못하므로(data not shown) 새롭게 만들어진 파아지에 의한 재감염 현상이 일어나지 않는다. 이런 이유로 불균일 분배 유전자 불안정성 (segregational instability)이 높게 나타나는 것으로 생각된다. 만약 새로운 파아지를 만들 수 있는  $\lambda$  DNA를 사용한다면 새롭게 만들어진 파아지가 대장균을 재감염시켜서 불균일 분배 유전자 불안정성을 완화시킬 것으로 예상된다. 온도에 따른 푸른색 콜로니의 수를 보면 40°C 이상의 온도에서 완전히 lytic 상태로 전환되는 것을 알 수 있다.

**Table 1.** Effect of temperature on  $\lambda$ -containing cell concentration

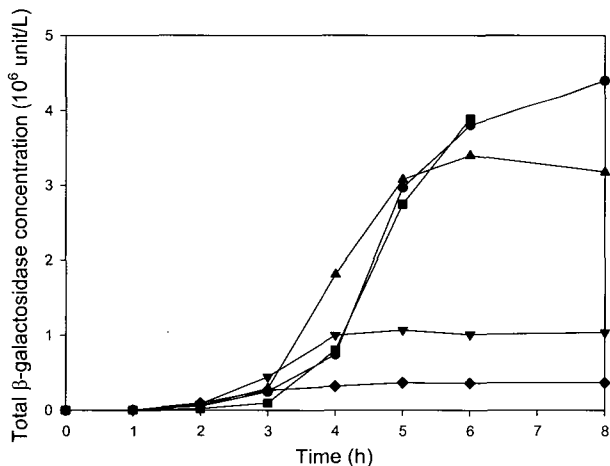
Time after induction (h)	$\lambda$ -containing cell concentration ( $10^6$ bcfu/L)			
	36°C	38°C	40°C	42°C
2	290	5	ND	ND
3	4165	50	ND	ND
4		80	ND	ND
5	37120		ND	ND
7		240	ND	ND

bcfu: blue colony forming unit

**Table 2.** Effect of temperature on  $\lambda$ -free cell concentration

Time after induction (h)	$\lambda$ -free cell concentration ( $10^6$ wcfu/L)			
	36°C	38°C	40°C	42°C
2	3.3	35	180	7
3	150	430	1320	11.2
4			18360	82
5	560	1440	692760	372
7		11740		989600

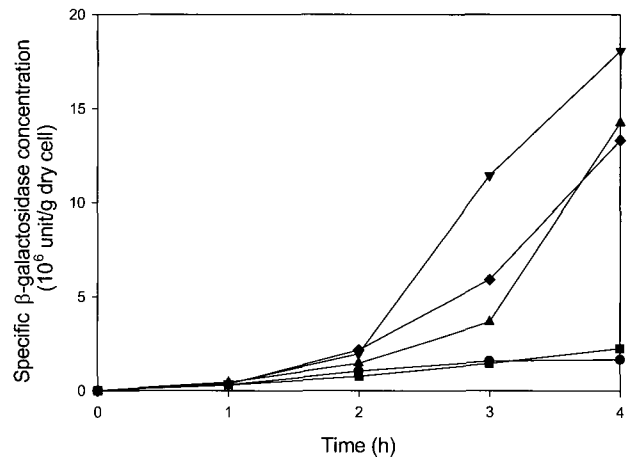
wcfu: white colony forming unit



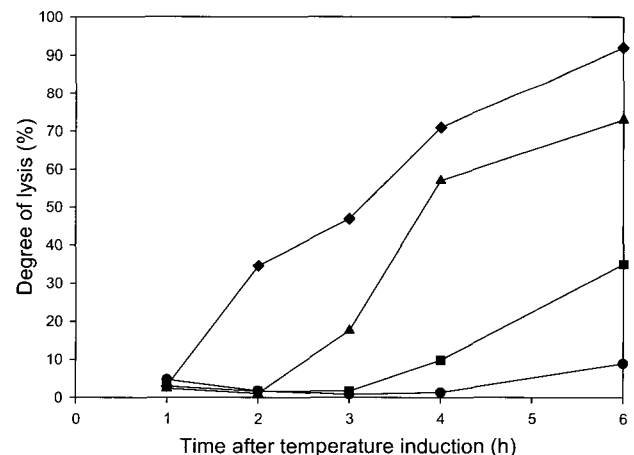
**Figure 2.** Effect of induction temperature on  $\beta$ -galactosidase production in P90c/ $\lambda$ NM1070 system ((●) 33°C (■) 36°C, (▲) 38°C, (▼) 40°C, (◆) 42°C).

**생산성 및 안정성에 미치는 영향**

Fig. 2와 Fig. 3은 온도에 따른 총 또는 단위 세포당  $\beta$ -galactosidase 농도를 나타내는 그림이다. 그림에서 보듯이 36°C는 33°C와 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않고 있다. 이 결과는 Fig. 1에서 언급한 것처럼 lytic 상태로의 전환이 잘 일어나지 않았음을 보여주고 있다. 40°C에서는 높은 specific  $\beta$ -galactosidase 농도를 나타내고 있지만, 세포 안정성의 저해로 3시간 이후에는 38°C보다 낮은 총 발현량을 보이고 있다. 42°C의 배양 온도에서는 높은 온도에 의해서 세포 성장이 저해를 받게 되어 매우 낮은 총  $\beta$ -galactosidase 농도를 나타내고 있다. Fig. 4는 온도에 따른 용균 정도를 나타내는 그림이다. 용균 정도는 총  $\beta$ -galactosidase 농도에서 세포의 농도가 차지하는 비율을 백분율로 표시하여 나타내었다. 이 백분율은 온도에 따라서 세포의 안정성이 어떻게 영향을 받는지를 나타내는 것이다. 그림에서 보듯이 온도가 증가할수록 안정성이 떨어지는 것을 관찰 할 수 있다.



**Figure 3.** Specific  $\beta$ -galactosidase concentration of P90c/ $\lambda$ NM1070 depending on temperature ((●) 33°C (■) 36°C, (▲) 38°C, (▼) 40°C, (◆) 42°C).



**Figure 4.** Effect of induction temperature on host cell lysis ((●) 36°C (■) 38°C, (▲) 40°C, (◆) 42°C).

## 요 약

본 연구는 장시간의 산업적인 연속 배양에서 문제가 되는 플라스미드 불안정성을 극복하기 위해서 박테리오 파아지 람다를 벡터로 이용하였다. 또한, 벡터의 안정성과 생산성을 높이기 위해서 용균과  $\lambda$  DNA 패키징이 결핍된 돌연변이 람다를 선별하였다. 이 돌연변이 람다는 온도 전환에 의해서 단백질이 생산되는 온도 민감성 돌연변이 *cI* 유전자를 가지고 있기 때문에 재조합 단백질 생산,  $\lambda$  DNA 복제, 숙주 세포의 안정성 등이 lytic 상태로의 전환을 유도하는 온도에 영향을 받게 된다. 36°C의 배양 온도는 lytic으로 전환이 잘 되지 않았고, 40°C 이상의 배양 온도는 완전한 lytic 상태를 유도하였다. 그러나 42°C의 배양 온도에서는 생산성이 감소되는 온도 저해 효과가 관찰되었다. 온도가 증가 할수록 박테리오 파아지가 들어 있지 않는 대장균의 수는 증가하였고, 이것은 새로운 파아지를 만들 수 있는 박테리오 파아지를 사용하여 재감염을 시키면 완화될 수 있을 것으로 예상된다. 결과적으로 단위 세포당 발현량은 40°C에서 최대를 나타내었고, 안정성이나 총 발현량의 관점에서는 38°C가 최적의 온도로 관찰되었다.

## REFERENCES

1. Imanaka, I. and S. Aiba (1981), A perspective on the application of genetic engineering stability of recombinant plasmid, *Ann. NY Acad. Sci.* **369**, 1-14.
2. Wu, K. and T. K. Wood (1994), Evaluation of the *hok/sok* killer locus for enhanced plasmid stability, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 912-921.
3. Doug, C. P., S. K. Craig, W. Kuowei, G. Kenn, and K. W. Thomas (1997), Combining the *hok/sok*, *parDE*, and *pnd* postsegregational killer loci to enhance plasmid stability, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1917-1924.
4. Stephens, M. L. and G. Lyberatos (1988), Effect of cycling on the stability of plasmid-bearing microorganisms in continuous culture, *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 464-469.
5. Park, T. H., J. H. Seo, and H. C. Lim (1991), Two-stage fermentation with bacteriophage  $\lambda$  as an expressionvector in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 297-302.
6. Padukone, N., S. W. Peretti, and D. F. Ollis (1992), Characterization of the mutant lytic state in lambda expression systems, *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 369-377.
7. Lin, C. S., B. Y. Chen, T. H. Park, and H. C. Lim (1998), Characterization bacteriophage  $\lambda Q'$  mutant for stable and efficient production of recombinant protein in *Escherichia coli* system, *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 529-535.
8. Padukone, N., S. W. Peretti, and D. F. Ollis (1990),  $\lambda$  vectors for stable cloned gene expression, *Biotechnol. Prog.* **6**, 277-282.
9. Sugimoto, S., M. Yabuta, N. Kato, T. Seki, T. Yoshida, and H. Taguchi (1987), Hyperproduction of phenylalanine by *Escherichia coli*: application of a temperature-controllable expression vector carrying the repressor-promoter system of bacteriophage lambda, *J. Biotechnol.* **5**, 237-253.
10. Reinkainen, P., B. Sevela, M. Suutari, and P. Markkanen (1989), Analysis and modeling of the  $\lambda$ -pL promoter controlled expression of a cloned thermostable  $\alpha$ -amylase gene in *Escherichia coli* during batch cultivation, *J. Biotechnol.* **9**, 221-234.
11. Kim, T. S. and T. H. Park (2000), Optimization of bacteriophage  $\lambda$  Q-containing recombinant *Escherichia coli* fermentation process, *Bioprocess Eng.* **23**, 187-190.
12. Park, S. and T.H. Park (2000), Analysis of two-stage continuous operation of *Escherichia coli* containing bacteriophage  $\lambda$  vector, *Bioprocess Eng.* **23**, 557-563.
13. Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner (1987), Improved signal and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions, *Gene* **53**, 85-96.