

토양의 DNA로부터 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase 유전자 탐색 및 분리

윤상순¹ · 이정환 · 김수진 · 김삼선 · 박인철 · 이미혜 · 구본성 · 윤상홍 · 여윤수*

¹농업생명공학연구원 미생물기능팀

Screening and Isolation of a Gene Encoding 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase from a Metagenomic Library of Soil DNA

Sang-Soon Yun¹, Jung-Han Lee, Soo-Jin Kim, Sam-Sun Kim, In-Cheol Park, Mi-Hye Lee, Bon-Sung Koo, Sang-Hong Yoon, Yun-Soo Yeo*

¹Microbial Function Team, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

Received November 28, 2005; Accepted December 12, 2005

To access the natural products of uncultured microorganisms, we constructed and screened the metagenomic DNA libraries by using a cosmid vector and DNA inserts isolated directly from soil. Initial screening of the libraries in *Escherichia coli* resulted in the isolation of several clones that produce a dark brown color when grown in LB medium. One of the positive clones, designed pYS85C, was transposon mutagenized and the DNA surrounding the transposon insertions in cosmids that no longer conferred the production of brown pigment to *E. coli* was sequenced. Annotation of the pYS85C sequence obtained from the transposon mutagenesis experiment indicated a single 393 amino acid open reading frame (ORF) with a molecular mass of about 44.5 kDa, predicted to be a 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases (HPPDs), was responsible for the observed brown pigment. In a BLAST search against deposited sequence, the translated protein from this ORF showed moderate-level identity (>60%) to the other known HPPDs and was most conserved in the C-terminal region of the protein. These results show that genes involved in natural product synthesis can be cloned directly from soil DNA and expressed in a heterologous host, supporting the idea that this technology has the potential to provide novel natural products from the wealth of environmental microbial diversity and is a potentially important new tool for drug discovery.

Key words: Soil DNA, metagenomic library, HPPD(4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases)

서 론

미생물은 비록 눈에 보이지는 않지만, 지구생물권에 꼭 필요한 존재이다. 이들은 생물 에너지 순환에 있어서 유일한 분해자이며 촉매제 역할을 할 뿐만 아니라 지구대기에 중요한 구성 성분을 생산해 내며 생명의 유전 다양성에 중요한 부분을 차지한다.¹⁾ 지구상의 총 미생물 종은 수백만에서 수억의 미생물 종이 있을 것으로 추정되지만 현재까지 알려진 미생물 종은 대략 5,000여종에 지나지 않는다.²⁾ 이렇게 총 미생물 종에 비하여 소량의 미생물만이 동정이 된 이유는 그 동안 전통적인 배양 방법인 순수 배양기술에 의해서 배양이 되었기 때문이다. 많은 종류의 유용한 미생물들이 순수 배양을 통하여 밝혀졌으며, 산업

적으로 유용하게 이용되고 있다. 실제로 대부분의 자연계에 존재하는 미생물들 중 대략 0.1-1% 미만이 배양 가능하며 우점인 많은 미생물들은 배양이 되지 않는다.³⁾

50년전 항생물질의 아버지라고 불리는 Waksman은 토양 박테리아에서 항생제인 actinomycin D와 streptomycin을 발견한 이래로⁴⁾ 토양미생물은 항생제 개발에 있어서 중요한 역할을 담당해 왔다. 그러나 현대에 들어서면서 새로운 항생물질을 찾으려는 시도는 계속되고 있지만 기존의 물질을 재발견하는 경우가 대부분이어서 방선균의 경우 재발견율이 99%에 이르고 있다.⁵⁾ 이러한 재발견율을 낮추면서 신규 유용성 유전자를 확보하기 위해서는 전통적인 배양방법으로 배양되지 않는 난배양 미생물의 유전자를 확보하는 것이 필수적이라고 할 수 있다.

Metagenome은 자연계에 존재하는 총 미생물집합이라고 정의되며 미생물의 기능이나 다양성을 유전자 형태로 분석하는 기술을 말한다.⁶⁾ 이것은 자연계의 여러 환경에서 존재하는 총 미생물의 유전체인 metagenome을 클로닝 하여 *Escherichia coli*

*Corresponding author
Phone: 82-31-299-1754; Fax: 82-31-299-1752
E-mail: ysyseo@rda.go.kr

등에서 유지, 발현시켜 metagenomic library를 만들어 난배양 미생물의 계통을 분류하고, 유용한 효소와 이차 대사산물을 탐색하는 하기 위한 연구라고 할 수 있다.⁷⁻¹⁰⁾

현재까지 metagenomic library 구축 및 screening 연구를 통해서 탐색된 유용 신규물질로는 토양 DNA를 Streptomyces속주를 통해서 Terragine A-E라는 새로운 천연물을 분리하였고,¹¹⁾ 미국 Wisconsin대학과 Cornell대학의 공동연구팀에서는 cosmid vector를 이용해 항생물질인 violacein과 deoxyviolacein을 분리하였으며¹²⁾ 신규항생물질인 turbomycin A와 B도 발견하였다.¹³⁾ 또한, 유용효소로는 lipase, cellulase, amylase, chitinase, esterase 등¹⁴⁻¹⁷⁾ 다양한 효소가 분리되었는데 대부분이 기존에 밝혀진 효소와 identity가 거의 없는 새로운 효소로 밝혀졌다.

4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase(HPPD)는 homodimeric 효소로서 tyrosine/phenylalanine의 분해작용 중에서 4-hydroxyphenylpyruvate(HPP)를 2,5-dihydroxyphenylacetate (homogentisic acid, HGA)로 전환하는데 중요한 효소로 알려져 있다. 선천적으로 인간의 생화학적 대사 이상이 원인 되는 hawkinsinuria라는 질병은 HPPD 효소의 33번째 아미노산이 alanine에서 threonine로 돌연변이가 일어나서 소변에 hawkinsin이 다량 배설되고 어린이 경우는 발육부진이 일어난다. 또한, 식물에서는 HPPD가 plastoquinone과 tocopherol 생합성의 전구물질인 HGA를 합성하는데 크게 관여할 뿐만 아니라 제초제 개발의 스크리닝 작용점으로서 많이 이용된다.¹⁸⁻²⁰⁾

본 논문에서는 인위적으로 환경저해가 적은 늪지나 갯벌토양으로부터 직접 DNA를 순수하게 분리하고 cosmid vector에 삽입하여 metagenomic library를 만든 다음 96-well plate에 배양하면서 색깔을 나타내는 클론을 분리하고 관여 유전자인 HPPD 유전자를 분석하였다.

재료 및 방법

Microbial strain, plasmid, 배지 및 토양시료 수집. 실험에서 사용되어진 *E. coli*와 vector 등은 Table 1에 나타내었다. 재조합 *E. coli*는 LB배지에 적당한 항생제를 첨가하여 37°C에서 배양하였으며 DNA작업에 사용된 효소들은 Takara회사(Japan)의 것을 이용하였다. 토양으로부터 metagenomic library작업을 위하여 경상남도 창원군 유어면 일대의 우포늪 토양, 경상남도 울주군 삼동면 정족산(530 m)일대의 무제치늪 토양, 경기도 안산시 대부도의 갯벌 토양을 시료로 채취하였다. 시료 수집은 토양표면에서 깊이 5~25 cm 지역을 채취하였고, 냉동건조 하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

토양 DNA 순수분리. 토양으로부터 전체 DNA를 추출하기

위하여 Zhou 등의²⁰⁾ 방법과 Bürgmann 등의²¹⁾ 방법을 수정하여 추출하였다. 먼저 지역별 토양 5 g씩을 13.5 ml의 완충용액(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM sodium phosphate pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1% hexadecyltrimethylammonium bromide(CTAB))에 넣고 현탁한 후 proteinase K(20 mg/ml)를 50 µl씩을 넣어 37°C배양기에서 30분간 반응시킨 후 20% SDS 1.5 ml를 첨가하여 65°C에서 2시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 그런 다음 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 모아서 동량의 chloroform : isoamylalcohol(24 : 1, v/v)을 첨가하여 혼합한 후에 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액만을 취하고 0.6 배의 isopropanol을 넣어 1시간동안 상온에서 방치한 다음 원심분리하여 DNA를 분리하였다.

Metagenomic library 제작. 보관중인 crude DNA시료에 섞여있는 humic compound를 제거하기 위하여 전기영동용 loading buffer(60% glycerol, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol)을 넣어 혼합하고 0.8% low melting agarose gel(0.5×TBE: 45 mM Tris base, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA)에 DNA시료를 넣은 후 PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis)의 CHEF II system(BioRad, USA)을 이용하여 6 V/cm로 14시간 동안 전기영동 하였다. 40 kb 이상의 DNA를 포함하는 agarose block단을 자른 다음 agarase효소를 넣어 1시간동안 반응시킨 후 70°C에서 10분간 agarase를 비활성화 시켰으며 ethanol를 넣어 순수한 DNA를 분리하고 metagenomic library를 만드는데 사용하였다.

순수 정제된 DNA는 적당량의 *Sau3AI* 제한효소로 부분절단하고 1% agarose gel에서 전기영동하여 40-50 kb 부분의 DNA만을 elution하였으며 CIAP(Calf intestinal alkaline phosphatase)로 DNA를 탈인산화 하였다. SuperCos 1 vector는 *BamHI* 제한효소로 자른 후 *Sau3AI*로 부분절단된 DNA와 16°C에서 16시간 ligation반응시켰다. MAX lambda packaging extracts kit(Epicentre, USA)로 *in vitro* packaging을 수행하였으며 kanamycin(50 µg/ml)이 들어간 LB 고체 배지에 도말하여 재조합된 colony만 이용하였다.

유용 유전자 탐색 및 염기서열 분석. 형질전환 된 *E. coli*와 비교하여 다른 색을 나타내는 clone을 선발하였다. 우선 384-well plate에 접종된 metagenomic clone을 kanamycin 첨가한 LB고체 배지에 96-pin replica를 이용하여 접종한 후 28°C에서 7일간 배양하면서 색을 나타내는 clone을 선발하였으며 4 mM tyrosine이 첨가된 LB배지에서 최종 확인 하였다. 선발된 유용 유전자를 분석하기 위하여 transposon mutagenesis를 GeneJumper Primer insertion kit(Invitrogen, USA)로 이용하였으며 방법은 kit에 있는 protocol를 사용하였다. 돌연변이는 chloramphenicol

Table 1. Microbiological materials used in the experiment

Material	Relevant trait (s)	Source
<i>E. coli</i> strains		
Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>endA1</i> <i>mupG</i>	Invitrogen
XL-1Blue MR	Δ(<i>mcrA</i>)183Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i>	Epicentre
Plasmids and cosmid		
SuperCos 1	Cosmid cloning vector for the construction of DNA libraries, Km ^r	Stratagen

Table 2. Molecular characteristics of the libraries constructed from soils

Library	DNA source	Cloning vector	Average insert size of the library (kb)	No. clones
YS-1	Soil (Upo wetland)	Super CosI (cosmid)	40-50	230,000
YS-2	Soil (Mujeachi bog)	Super CosI (cosmid)	40-50	65,000
YS-3	Soil (Daebudo)	Super CosI (cosmid)	40-50	82,000

(12.5 µg/ml)이 첨가된 LB배지에 자라면서 색깔을 나타내지 않는 colony를 배양하여 염기서열을 결정 하였으며 DNASTAR회사(USA)의 software와 BLAST조사로 비교 분석 하였다.

결과 및 고찰

Metagenomic library 제작 및 효율성 검증. 순수 분리된 토양 DNA를 *E. coli*에서 발현시키기 위하여 cosmid vector인 SuperCos 1에 ligation한 후 metagenomic library를 제작 하였다. 지금까지 metagenome을 연구함에 있어서 가장 일반적으로 쓰이는 vector로는 Bacterial Artificial Chromosomes(BAC vector)이었다. 왜냐하면 대개의 경우 미생물이 생산하는 유용물질 중 항생물질로 이용 가능한 이차대사 산물의 경우 그 생산에 관련된 유전자와 저항성에 관련된 유전자가 대개 cluster로 존재²²⁾ 하기 때문에 유용 이차대사산물이나 유전자를 분석하기 위해서는 큰 단편이 필수적이다. 따라서 350 kb 이상의 큰 단편까지 포함할 수 있는 BAC vector를 유전자 분석에 있어 많이 사용되어져 왔다.²³⁾ 그러나 최근 들어서는 BAC vector를 이용한 유용 유전자 분석도 행해지고 있지만 cosmid와 fosmid vector를 이용하여 항균활성에 관련된 유전자 연구도 많이 행하여지고 있다.²⁴⁾ 특히, cosmid vector를 이용하는 이유는 BAC vector에 비하여 평균 40 kb 정도로 비교적 적은 단편크기를 요구하지만 BAC vector에 비하여 평균 100-1000배가 넘는 copy number의 효율을 나타내기 때문에 저분자 이차대사산물이나 유전자를 찾기에는 BAC vector보다는 훨씬 효율적이라고 할 수 있다.¹⁰⁾

우포늪에서 분리한 토양 DNA의 metagenomic library는 230,000개 이상 colony 숫자를 가지고 있으며 또한 삽입 단편 크기 역시 40 kb 이상을 가지고 있었다(Table 2). 그러나 무제치늪과 대부도 갯벌토양에서는 80,000-65,000개의 colony를 얻을 수 있었다. Kim 등²⁵⁾ 토양의 특성별 토양DNA 분리에 대한 효율성 분석에서 무제치 토양인 경우 유기물 함량이 일반농경지 보다 약 8배 정도 높았고 대부도 갯벌토양인 경우 pH가 높을 뿐만 아니라 염농도가 매우 높아서 다양한 생물종의 서식지로서 제한을 받아 순수한 DNA분리가 어렵고 분리되는 양도 매우 적다고 하였다. 이는 실질적으로 metagenomic library를 제작하는데 효율성이 크게 떨어지는 원인으로 생각된다.

또한, 제작된 metagenomic library의 다양성을 보기 위하여 임의로 10개 클론을 *EcoRI*으로 절단 하여 전기영동 한 결과 Fig. 1에서와 같이 2개 clone을 제외하고는 다양한 제한효소 양상과 여러 개의 밴드를 가진 clone들을 볼 수 있었다. 이러한 결과로 보아 본 실험에서 제작한 metagenomic library는 각기 다른 미생물 DNA가 알맞은 vector에 삽입되어 성공적으로 metagenomic library가 만들어 졌다고 할 수 있다. 이러한

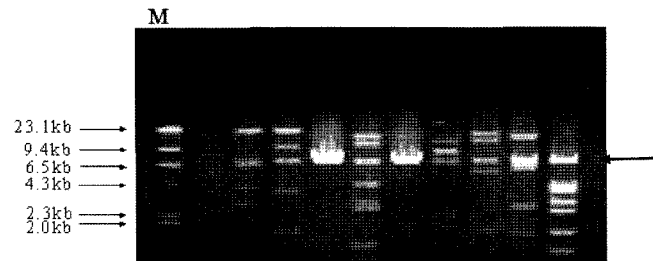


Fig. 1. Restriction profile of random 10 clones of metagenomic library constructed from a weed in Upo wetland. M; *HindIII*-cut bacteriophage lambda molecular size marker. Clones were digested with *EcoRI*. Vector bands are indicated by arrow in the figure.

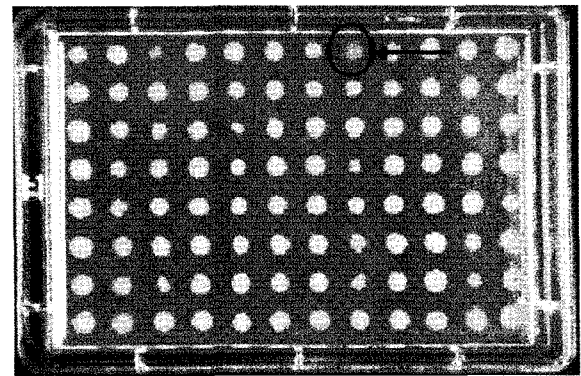


Fig. 2. Colony screening of library clones for production of the pigment on *E. coli*. Colonies were grown on LB agar plates with kanamycin. Arrow indicates the colored compounds.

metagenomic library는 일반적으로 서론에서 언급한 바와 같이 유용 효소나 미생물 계통발생 연구, 환경오염 저항 유전인자에 대한 연구 등 미생물 생물자원을 이용하여 무수히 많은 분야에 확대하여 적용할 수 있다.

유용 clone 탐색. 국내최대의 자연 늪으로 환경부에서 생태계특별보호구역으로 지정된 우포늪인 경우 습지 특성상 근권 토양에 다양한 생물자원이 있을것으로 추정되어서 3개의 metagenomic library들중 우포늪 library부터 탐색 하였다. 일반적으로 metagenomic library의 유용 clone 탐색방법에 관해서는 알려진 바가 적으며¹⁰⁾ 색소생산 clone탐색의 경우 눈에 의한 식별 방법으로 일반적인 형질전환 clone과 다른 색을 나타내는 clone을 찾았는데^{12,26,27)} 먼저 384-well plate에 metagenomic library의 clone을 1일간 배양하고 LB고체 배지에 96-well replica를 이용하여 접종한 다음 28°C에서 7일간 배양하면서 색을 나타내는 clone을 5개 선발하였다(Fig. 2). Gillespie 등¹³⁾ 보고에서 색소생산 유전자를 가지고 있는 clone의 경우 항균활성 또한 지니고 있는 것으로 알려져 있으나 본 실험에서 분리

```

GTCTCGGTATTGCAAAAAAATCACAGTTCAAACCTGCGAACTGTGACCAGACGGTGTGGGGTTATAGGCTTAATTTGCATATCAGCACACGGCTGTCTG -105
CAGCGAAGCCGACATATAGAAAAATTTGTGTCACATATCGAAAATCTGATTGAGAACTGGAATAGACGCCGCCAAGGCAATAGAAATCAGAGCTAATAAA -5
GACAATGTCGAGGGAAATTTATGACTGAAAAAATCCGCTGGGGCTAAAGAAGATACATCAGCTTGGATTTTACGTCGGCAACGCTAAGCAGCGGGAATTC 96
M S R E F M T E K N P L G L K K I H H V E F Y V G N A K Q A E F 32
TATTACCGGAAGGCTTTCCGGCTTTTCGCGCGCCGACTACTCAGGGCTGGAGACCGGTAATCGTGAACCTACCAGTTACCTGATCAGGCAAAAATATGTCA 196
Y Y R K A F G F S R A A Y S G L E T G N R E T T S Y L I R Q N N V N 66
ATTTGCTTCTAACGACGCGCTCTCGCCGACCATCCGCGCGAGAACATATCAAGCAGCATGGCAGCGGTGTGGGGATATCGCGTCTCTGGTCGATGA 296
F V L T T P L S P D H P A A E H I K Q H G D G V R D I A F L V D D 99
CGCCGACCATGCATTCAACGAAGCCGTAAAACGCGGAGCTCGCGTTGCTGTTGAGCCGCGCATCTGAAGGACGATAACGGCAGCGTACGGCACGCGGGC 396
A D H A F A V K R G A R V A V E P R D L K D D N G S V R H A A 132
ATCGCCACATACCGCGTACTATCCATTGCTTTCATTTACACAACAATCTCACAACGCCATAATTACAGCGGCCGCTTCTTCCGGTTTTGTCGAGC 496
I A T Y G D T I H S F I S Y N N S H N G H N Y S G P F L P G F V E Q 166
AGAAAGTCAAAGGCGAGCCGCTCGGCATCATGATCGATCAGTCCGGGAATGTGGAACCTCGGAAAATGGGTACTGGTGGCATTTTTACCGCGA 596
K V E G E P V G I M I V D H I V G N V E L G K M G Y W C D F Y R 199
CGTGTGGGATTTTCGCTACATCACCTTCGACGACAAGGATATCTCGACCAATATTGCGGATTGATGCTATCGTTATGTCGCGGCAACAACAAT 696
V L G F F R Y I T F D D K D I S T E Y S A L M S I V M S D G Q H N 232
ATCAAGTTCCCGATAAACGAACCGCGGAGGGCAAGGGCGGCAAAATCGCAGATACAGGAGTACATCGATTTTATAAGTCAGCGGTCGCCAGCACATCG 796
I K F P I N E P A E G K G G K S Q I Q E Y I D F Y K S A G A Q H I A 266
CCGCTGTCGCGTACGTTCTTGACACGGTACGCAAACTGCAGCGCAACCGCGTGGAGTTTCTCGCGTCCGCGACCTaTTAgAGGATCCCGGCG 896
L L C R D V L D T V A K L Q A N G V E F L R V P D T Y Y D E I P A 299
CCGCTTGGCGAGATAGCAAGAGATATCGAGGACCTCAAGCGGCTTGGCATCCTGGTTGACCGCGCAAGAAGGATATCTGCTACAGATCTTACCAAAA 996
R V G E I D E D I E D L K R L G I L V D R D E E G Y L L Q I F T K 332
CCGGTCGAGGACCGCGCGAGCGTGTCTACGAGATCCTCCAGCGTAAGGCTGCAAGGTTTGGTAAGGGAATTTCAAGCGCGTTTTCGGATCGATCG 1096
P V E D R P T V F Y E I L Q R K G C K G F G K G N F K A L F V S I E 366
AAGAAGCAGCGAAGACGCGGGAATCGTGAAGCGGTCGATGCACGCTGACGGTTCTGCGGCTCAGCGTAATACGATACCGTGACGTCAGCAGACATT 1196
E E Q R R R G N R E G G R C T L T V L R L S V I R I R * 393
GAGATGAGAATCAACAGCTCGTAGATCTTTCGTTTGTGCTGCTCGTATTAGCGCATGCTTTCCTCGTAGCTCAGCGAAGGCGGTTTTACCTTGGAGCAA 1296
GTATTGAGCTCGCGTTCCCTTCGGAGCTTACGGCGCCGCGGAGACAACGCATCGCG 1356

```

Fig. 3. Nucleotide sequence of the metagenomic HPPD gene. The presumptive TATA box is indicated by an underline. The deduced amino acid sequence is given in the one-letter code below the nucleotide sequence. Translation termination codon is indicated by an asterisk.

된 색소생산 clone인 경우 항균활성을 나타내지 않았다.

색소생산 유전자의 염기서열. *E. coli*에 형질전환되어 색소를 나타내는 5개의 clone들중 가장 강한 브라운 색깔을 나타내는 pYS85C clone에 대한 염기서열을 결정하기 위하여 transposon mutagenensis를 유도 하였다. 분리된 pYS85C clone은 HPPD유전자로써 ORF의 시작점인 ATG(+1)로부터 시작해서 TGA까지 1182 bp로 구성되어있으며 아미노산은 393개이고 추정되는 분자량은 44.5 kDa이었다. 이는 기존 여러 종류의 생물종에서 알려진 분자량크기(40-50 kDa)¹⁹⁾와 크게 일치하였고 비록, 5'-flanking 영역에 존재하는 RBS(Ribosomal Binding Site)는 없지만 TATA box(-90)는 가지고 있었다(Fig. 3).

Metagenomic HPPD유전자 비교분석. pYS85clone이 함유하고 있는 metagenomic HPPD유전자를 DNASTAR회사의 프로그램들을 이용하여 기존에 밝혀진 다른 HPPD유전자와 비교분석해보았다. 그결과 *Bacillus cereus*(58% identity), *Streptomyces avermitilis*(50% identity), *Homo sapiens*(42% identity)순으로 높았으며 *Pseudomonas fluorescens*인 경우 31%로 가장 낮았다(Fig. 4). 또한 분리된 metagenomic HPPD유전자는 대부분의 HPPD유전자가 일반적으로 가지고 있는 conserved domain을 포함하고 있었으며 특히, C-말단에 높은 identity를 보였다. 반면에, metagenomic HPPD유전자를 포함하여 많은 HPPD유전자의 N-말단이 식물인 *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* HPPD유전자보다 30개정도의 아미노산 부족한 것을 볼 수 있는데 이는 식물에서 HPPD유전자가 targeting signal로서 엽록체와 cytosol에서 각각 prenylquinone합성과 아미노산 분해 과정에 큰 역할을 하기 때문이며¹⁹⁾ 이런 결과들을 종합해 보면 metagenomic HPPD유전자는 식물종 으로부터 유래된 것은 아니며 procaryote에서 유래되었을 가능성 높으며 이는 기존 밝혀

진 아미노산을 이용한 계통수 결과에서도 *B. cereus*에 보다 더 연관성을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 5). 실제로 metagenomic library중에서 *E. coli*에 발현되는 clone들은 intron이 없는 단편만 가능하기 때문에 기존에 탐색된 대부분의 metagenomic library유래 clone들은 eucaryote보다는 procaryote에 가깝다고 할 수 있다.

Metagenomic HPPD유전자 기능분석. 색소를 나타내는 pYS85C clone이 가지고 있는 HPPD유전자의 기능을 분석하기 위하여 *in vitro* mutagenesis을 유도하여 색깔을 나타내지 않는 돌연변이 clone을 1차로 선발 하였고 최종적으로 선발된 돌연변이 clone을 tyrosine이 첨가된 LB배지에서 28°C로 4일간 배양하였다. 그 결과 pYS85C clone에서는 브라운 색깔의 색소를 보였으나 돌연변이와 vector clone은 색소를 나타내지 않았다(Fig. 6).

선천성 아미노산 대사이상 질병인 알카톤뇨증(alkaptonuric)은 피부, 연골등에 검고 붉은 색소가 축적되는데 이러한 색소를 ochronotic pigment라고 한다. 특히, 이색소는 알카톤뇨증환자 소변에서 많이 배출되는데 이는 tyrosin으로부터 분해작용을 거쳐 만들어진 HGA로 시작해서 oxidation과 polymerization과정을 거치면서 만들어진다.¹⁹⁾ Denoya 등은²⁸⁾ *S. avermitilis*로부터 분리된 HPPD유전자를 *E. coli*에 형질전환 하여 발현 시킨 결과 ochronotic pigment를 생산하며 더욱이 형질전환된 *E. coli*에 tyrosin을 첨가하여 HGA와 ochronotic pigment를 크게 증가시켰다. 이는 *E. coli*내에 존재하는 3개의 aminotransferase 즉 tyrB, ilvE, aspC(aromatic aminoacid, branched-chain aminoacid, aspartate aminotransferase)에 의하여 tyrosin에서 HPP로 되고 HPPD효소에 의하여 HGA로 전환되어 색소를 형성하는데 본 실험에서 분리된 pYS85C clone인 경우 비록 HPPD유전자만을

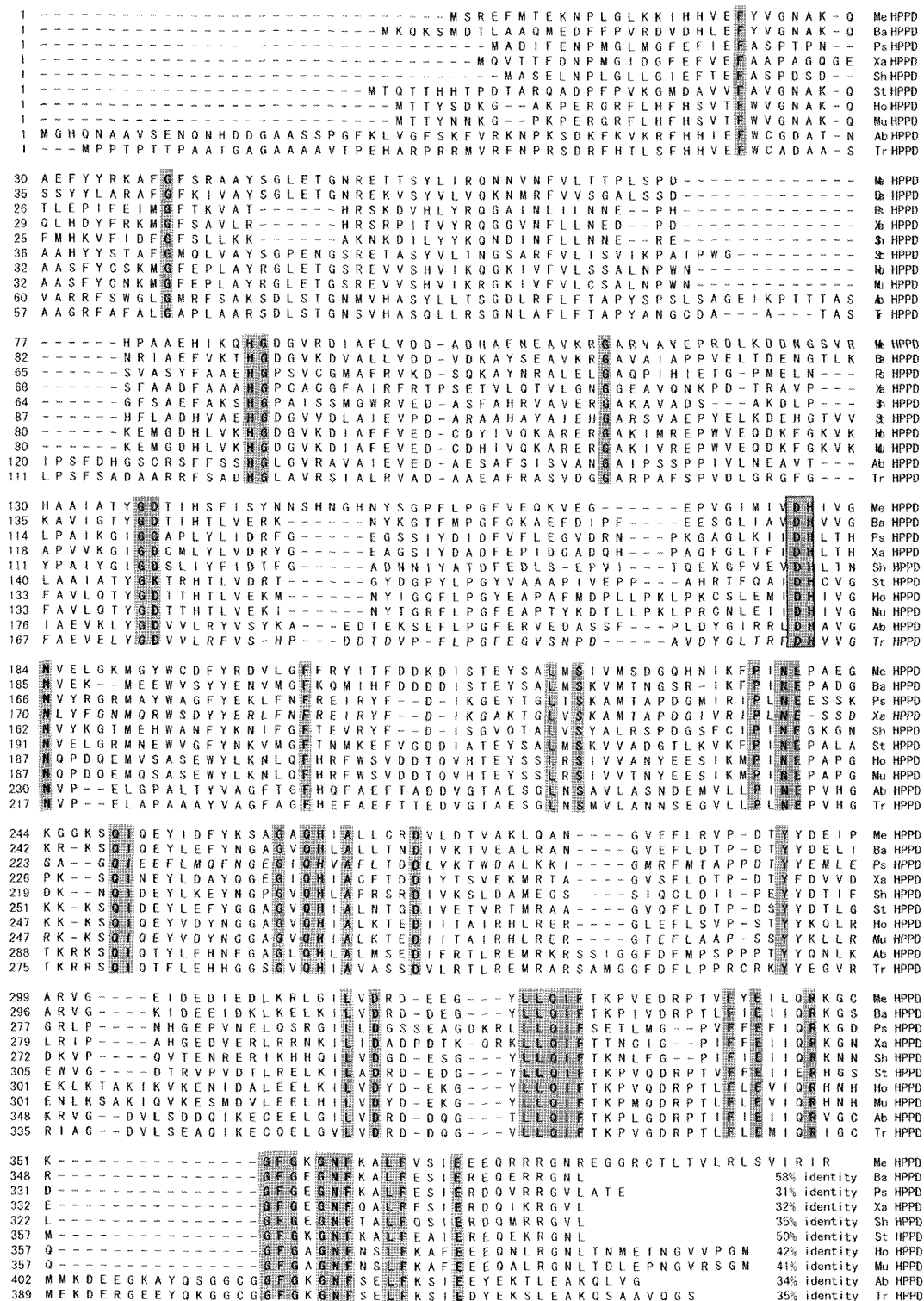


Fig. 4. Alignment of the predicted amino acid sequence of the metagenomic HPPD protein with those of the other protein. Me, Metagenomic; Ba, *Bacillus cereus* (AAZ67144); Ps, *Pseudomonas fluorescens* (YP_260492); Xa, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (YP_362213); Sh, *Shewanella* sp. (ZP00856354); St, *Streptomyces avermitis* (BAB69150); Ho, *Homo sapiens*; Mu, *Mus musculus*; Ab, *Arabidopsis thaliana*; Tr, *Triticum aestivum*. Identical residues appear in gray boxes.

*E. coli*에 형질전환을 하진 않았지만 metagenomic library 자체가 cosmid vector를 이용하여 *E. coli*에 형질전환 되었고 또한 돌연변이 유도한 clone에서는 브라운 색깔을 나타내지 않아서 HPPD유전자가 색소형성에 관여하는 것을 알 수 있었다.

결론적으로, 토양으로 직접 분리된 토양DNA를 cosmid vector에 cloning하고 *E. coli*에 형질전환 하여 발현을 유도할수 있는 metagenomic library기술은 극한지역 또한 미지의 토양 등 다양한 DNA를 이용하여 기존에 밝혀지지 않은 신기능성 소재를

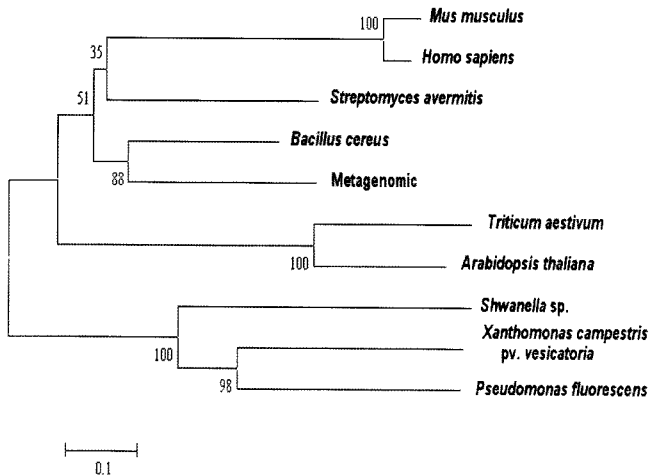


Fig. 5. The Neighbor-joining tree showing the relationship of the deduced metagenomic HPPD amino acid sequence to the sequence of other known HPPDs. The scale bar indicates 0.1 substitutions per amino acid position. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50% are shown at the branch points. This tree was constructed by MEGA 3.1.

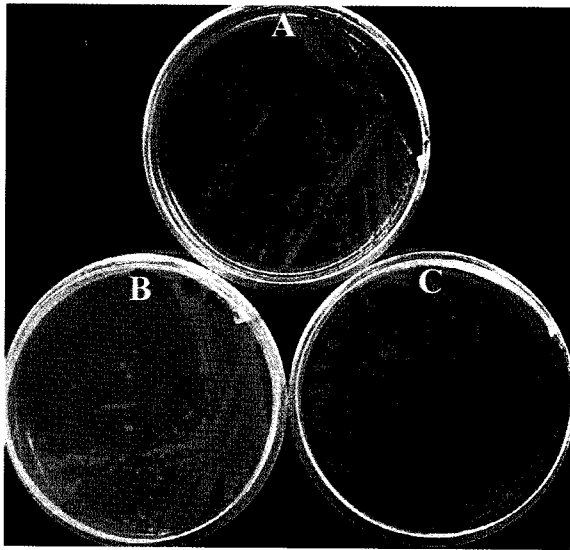


Fig. 6. Analysis of pigment production (browning) by transformants of *E. coli* DH5 α harboring Vector (A), mutant pYS85C (B) and pYS85C (C) grown in LB plus ampicillin plus L-tyrosine plates 3 days incubation at 28°C.

개발하는데 유용할 것으로 사료된다.

초 록

난배양 미생물로부터 천연물질을 찾기 위하여 토양으로부터 직접분리된 DNA와 cosmid vector를 이용하여 metagenomic library를 제작하고 탐색 하였다. 대장균에서 발현되는 유전자는 행 초기 탐색 결과 LB배지에서 잘 자라면서 브라운 색깔을 내는 여러 개의 clone을 선발 하였다. 선발된 여러 후보 clone중 pYS85C는 돌연변이를 유도하였으며 색깔을 생산하지않는 clone들에 대하여 염기서열을 결정 하였다. 돌연변이clone들로부터 결정된 pYS85C 염기서열 결과 아미노산이 393개이며 44.5 kDa

으로 색소형성에 관여하는 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase(HPPD) 유전자로 판명 되었다. 또한, BLAST비교 분석에서 이효소는 기존에 밝혀진 HPPD효소와 60% 정도의 identity를 보였고 C-말단에서는 많은 conserved domain이 있었다. 이러한 결과로 볼 때 천연물질을 합성 할 수 있는 유전자는 토양DNA로부터 직접 분리되어 발현될 수 있으며 이러한 기술은 새로운 물질을 찾는 데 중요한 tool이 될 수 있다.

Key words: 토양DNA, metagenomic library, 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase (HPPD)

감사의 글

본 연구는 농림기술개발 연구과제로 수행되었으며 연구비 지원에 감사 드립니다.

참고문헌

- Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6578-6583.
- Short, J. M. (1997) Recombinant approaches for accessing biodiversity. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1322-1323.
- Pace, N. R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Waksman, S. A. and Tishler, M. (1942) The chemical nature of actinomycin, an anti-microbial substance produced by *Actinomyces antibioticus*. *J. Biol. Chem.* **142**, 519-528.
- Zaehner, H. and Fiedler, F. P. (1995) In *Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trend*. Cambridge University Press, England, pp. 67-84.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. and Goodman, R. M. (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, 245-249.
- Schleper, C., Swanson, R. V., Mathur, E. J. and DeLong, E. F. (1997) Characterization of a DNA polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J. Bacteriol.* **179**, 7803-7811.
- Eisen, J. A. (1998) Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome Res.* **8**, 163-167.
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J. and Goodman, R. M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2541-2547.
- Handelsman, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, C. and Goodman, R. M. (2002) Cloning the metagenome: culture-independent access to the diversity and functions of the uncultivated microbial world. *Methods in Microbiology.* **3**, 241-255.
- Wang, G. Y., Graziani, E., Waters, B. Pan, W. Li, X.

- McDermott, J. Meurer, G. Saxena, G., Andersen, R. J. and Davies, J. (2000) Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org. Lett.* **2**, 2401-2404.
12. Brady, S. F., Chao, C. J., Handelsman, J. and Clardy, J. (2001) Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Org. Lett.* **3**, 1981-1984.
13. Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M. and Handelsman, J. (2002) Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4301-4306.
14. Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G. and Daniel, R. (2000) Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3113-3116.
15. Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., Wilkie, A. C., Ingram, L. O. and Shanmugam, K. T. (1995) Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 667-674.
16. Richardson, T. H., Tan, X., Frey, G., Callen, W., Cabell, M., Lam, D., Macomber, J., Short, J. M., Robertson, D. E. and Miller, C. (2002) A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low-pH, thermostable alpha-amylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 26501-26507.
17. Cottrell, M. T., Moore, J. A. and Kirchman, D. L. (1999) Chitinases from uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2553-2557.
18. Kavana, M. and Moran, G. R. (2003) Interaction of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase with the specific inhibitor 2-[2-nitro-4-(trifluoromethyl)benzoyl]-1,3-cyclohexanedione. *Biochemistry* **42**, 10238-10245.
19. Moran, G. R. (2005) 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 117-128.
20. Norris, S. R., Barrette, T. R. and DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* **7**, 2139-2149.
21. Zhou, J., Bruns, M. A. and Tiedje, J. M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 316-322.
22. Bürgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F. and Zeyer, J. (2001) A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil. *J. Microbiol. Methods.* **45**, 7-20.
23. Vining, L. C. (1992) Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity-a review. *Gene* **115**, 135-140.
24. Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiri, Y. and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8794-8797.
25. Brady, S. F., Chao, C. J. and Clardy, J. (2002) New natural product families from an environmental DNA(eDNA) gene cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9968-9969.
26. Kim, S. J., Koo, B. S., Park, I. C., Yun, S. H., Yun, S. S., Sa, T. M. and Yeo, Y. S. (2004) Evaluation of DNA recovery from soil and sediment samples. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**, 194-198.
27. MacNeil, I. A., Tiong, C. L., Minor, C., August, P. R., Grossman, T. H., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., Phillips, T., Narula, S., Sundaramoorthi, R., Tyler, A., Aldredge, T., Long, H., Gilman, M., Holt, D. and Osborne, M. S. (2001) Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 301-308.
28. Denoya, C. D., D. D. Skinner, and M. R. Morgenstern. 1994. A *Streptomyces avermitilis* gene encoding a 4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase-like protein that directs the production of homogentisic acid and an ochronotic pigment in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **176**, 5312-5319.