

Transconjugation for Molecular Genetic Study of *Streptomyces platensis* Producing Transglutaminase

Se-Joung Bae, Yang-Ho Jo and Sun-Uk Choi*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Received November 9, 2009 / Accepted January 21, 2010

Streptomyces platensis YK-2, newly isolated from forest soil, produces transglutaminase (TGase), which catalyses an acyl transfer reaction between the primary grade amine and protein or γ -carboxamide group of peptide bound glutamine residues. For a molecular genetic study of *S. platensis*, an effective transformation method was established by using a conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to spores of actinomycetes. The highest transconjugation frequency of *S. platensis* was obtained on an MS medium containing 50 mM MgCl₂, using 5×10^7 *E. coli* as a DNA donor and 1×10^8 spores without heat treatment as a host. We also identified that *S. platensis* contains a single *attB* site within an ORF encoding a pirin-homolog, and that its *attB* site sequence shows high homology to that of *S. logisporoflavus*. In addition, it was confirmed by phenotypic analyses of exconjugants that the introduction of heterologous DNA into the *attB* site of the *S. platensis* chromosome does not affect its morphological differentiation and TGase production.

Key words : *Streptomyces platensis* YK-2, transformation, *attB* site, transglutaminase

서 론

식품단백질의 물성과 유연성을 개선하고 식품단백질 중의 lysine 보호, 내열성과 보수성 강화, 저온에서의 겔화, 탄력성과 수분함유 능력 향상, 가용성과 기능성 향상 등의 특성 변화를 도와주는 transglutaminase (TGase, protein-glutamine γ -glutamyltransferase: E.C.2.3.2.13)는 포유동물의 모발, 뇌, 간장 등의 생체 내에 널리 존재하며 조류, 어류, 식물 등에도 존재하는 것으로 알려져 있다[8,12]. 그러나 포유동물 유래와 다르게 미생물 유래의 TGase는 칼슘 비의존성, 열안정성, 활성의 넓은 pH 범위 등의 반응특성을 가지고 있어 산업적으로 적용하기 쉽기 때문에 더욱 주목받게 되었다. 미생물 유래의 microbial transglutaminase (MTG)는 방선균인 *Streptoverticillium* sp. S-8112 [9]에서 처음 분리되었으며 우수한 TGase 생산 균주를 획득하기 위한 연구는 끊임 없이 진행되고 있다. 최근 대구지역에서 새로운 MTG를 생산하는 방선균, *Streptomyces platensis* YK-2가 신규로 분리되어 연구되었다[22]. 하지만 *S. platensis* YK-2가 생산하는 MTG는 우수한 특성을 가졌음에도 불구하고 생산량의 한계로 산업적인 활용이 쉽지 않기 때문에 분자생물학적인 방법을 통한 생산균주의 개량이 필요한 상황이다. 그러나 방선균은 외부 유전자에 대한 강력한 제한계, 효율적인 형질전환 시스템의 부재, 재조합체의 불안전성 등의 특징을 가지고 있어 분자생물학적인 연구가 쉽지 않다[2,13].

지금까지 방선균의 형질전환에는 주로 protoplast법과

electroporation법 등이 사용되었다. 그러나 이들 방법들은 형질전환율이 높지 않거나 적용되는 방선균이 제한적이라는 단점이 있다. 최근에 이러한 문제를 극복하기 위하여 *Escherichia coli*를 공여체로 사용하여 단일가닥 DNA를 세포 내로 도입하는 접합전달법(transconjugation)이 도입되었다[7,11,17]. 접합전달법은 *E. coli* 내에서 재조합 플라스미드의 구축 및 조작이 가능하며 구축된 플라스미드를 방선균으로 직접 전달할 수 있어 유전자 클로닝 및 유전자 파괴, 변이유전자 회복 등에 폭 넓게 사용되고 있다. *E. coli*를 이용한 접합전달이 Mazodier 등[15]에 의해 처음으로 보고되어진 이후, 방선균에 존재하는 메틸화된 DNA의 제한계를 극복하기 위해 DNA의 공여균주(donor)로 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002 [3,16, 20]을 사용함으로써 보다 다양한 속(genus)의 방선균에 적용할 수 있게 되었다[14,21]. 또한 현재 사용되고 있는 접합전달을 위한 벡터들 가운데 방선균의 chromosome에 존재하는 *attB* site로 integration되는 *phC31* 유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*) 기능을 가진 벡터들이 가장 유용한 것으로 알려져 있다[7,20]. 이러한 벡터들은 접합전달을 통해 *E. coli*로부터 방선균으로 전달되고 전달된 벡터의 *attP* site는 integrase에 의해 방선균 chromosome의 *attB* site로 삽입된다. 그러나 새로운 MTG를 생산하는 *S. platensis* YK-2에 대한 형질전환방법은 아직 연구된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 새로운 MTG를 생산하는 신규 방선균, *S. platensis* YK-2의 분자생물학적인 연구를 위해 접합전달법을 이용한 고효율 형질전환방법을 구축하였으며 *attP* site가 삽입되는 *S. platensis* YK-2의 genomic *attB* site에 대하여 연구하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2258, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : suchoi@kyungnam.ac.kr

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용된 방선균은 대구지역에서 분리된 *S. platensis* YK-2 [22]로 TGase를 생산하며 본 균주의 포자는 접합전달의 수용체로서 사용하였다. *E. coli* XL-10-Gold는 클로닝을 위한 숙주로 사용하였으며 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 접합전달의 DNA 공여균주로 사용하였다. *phC31* 유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*intI*) 기능을 가진 pSET152 (5.7 kb) [3]를 접합전달의 부위-특이적 재조합(site-specific recombination) 벡터로 사용하였다. 본 벡터가 접합전달을 통해 숙주세포 내로 전달되면 integrase의 도움으로 방선균 chromosome의 *attB* site로 삽입되어 유전자 재조합(recombination)이 이어서 일어나기 때문에 본 논문의 결과들은 접합전달효율(transconjugation frequency)로 나타났다.

배지 및 배양조건

S. platensis ATCC 49173의 포자생산용 배지는 ISP2 한천배지(yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, glucose 4 g/l, agar 20 g/l, pH 7.0~7.4)를 사용하였으며 접합전달을 위한 배지로는 AS-1 (yeast extract 1 g/l, L-alanine 0.2 g/l, L-arginine 0.2 g/l, L-asparagin 0.5 g/l, soluble starch 5 g/l, NaCl 2.5 g/l, Na₂SO₄ 10 g/l, agar 20 g/l, pH 7.5), ISP4 (soluble starch 10 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, MgSO₄·7H₂O 1 g/l, NaCl 1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, CaCO₃ 2 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.001 g/l, MnCl₂·4H₂O 0.001 g/l, ZnSO₄·7H₂O 0.001 g/l, agar 15 g/l, pH 7.0~7.4), MS배지(mannitol 20 g/l, soya flour 20 g/l, agar 20 g/l)를 사용하였다. 또 *E. coli*의 일반배양 및 형질전환을 위해 Luria Bertani (LB)배지를 이용하여 37°C에서 180 rpm으로 진탕배양 하였다.

DNA 조작 및 분리

대장균에서의 DNA 조작은 Sambrook 등[19]의 방법을 사용하였고 *S. platensis*에서의 DNA 조작은 Kieser 등[10]의 방법을 사용하였으며 *S. platensis* 접합전달체의 total DNA는 Rao 등[18]의 방법으로 회수하였다. Southern blot hybridization을 위해 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)와 pSET152의 0.5 kb apramycin-resistant 유전자 단편을 probe로 사용하였다. DNA 염기서열 결정은 pSET152의 *attP* site에서 100 bp 떨어진 부분의 염기서열을 이용하여 ATTPR primer (5'-CTGGGTGGGTTACACGACGCCCT-3')를 제작하여 진행하였다.

접합전달방법

*E. coli*에서 *S. platensis*으로 plasmid의 접합전달은 Kieser

등[10]이 확립한 방법에 변형하여 수행하였다. pSET152를 포함하는 공여균주 *E. coli* ET12567/pUZ8002은 apramycin (50 µg/ml; 이하 Apr), chloramphenicol (25 µg/ml; 이하 Cm), kanamycin (50 µg/ml; 이하 Km)이 첨가된 LB 배지에 접종한 후, optical density 600에서 0.4가 될 때까지 배양하였다. *S. platensis*의 생육에 저해가 되는 첨가된 항생제를 제거하기 위해 동량의 LB 배지로 두 번 세척한 후 0.1 배의 LB 배지로 재현탁하여 *S. platensis*와의 접합전달을 위한 공여균주로 사용하였다. 열처리하지 않은 1×10⁷의 *S. platensis* 포자를 2×YT 배지 0.5 ml로 현탁한 후 준비된 공여균주의 현탁액 0.5 ml (2.5×10⁷)와 잘 혼합한 다음, 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 얻어진 pellet을 10 mM의 MgCl₂를 포함한 4종류(AS-1, ISP2, ISP4, MS)의 고체배지에 도말하고 28°C에서 16~20시간 동안 정지배양하였다. 형질전환체의 선별을 위해 1.5 ml의 살균수에 0.5 mg의 nalidixic acid (이하 Nal)와 1 mg의 Apr을 첨가하여 배지위에 중첩시킨 후, 28°C에서 6일간 더 배양하였다. 선별된 접합전달체를 Nal (25 µg/ml) 및 Apr (25 µg/ml)이 함유된 선택 배지에 계대배양하여 얻어진 균주들의 chromosome DNA를 추출하고 PCR에 의해 형질전환 유무를 확인하였다. 본 연구를 통해 얻어진 모든 접합전달효율(transconjugation frequency)은 접합전달실험에 사용된 포자수 대비 획득된 접합전달체수의 비율로 나타내었다.

염기서열의 accession number

본 논문에서 보고된 *S. platensis* ATCC 49173의 *attB* site의 염기서열은 GeneBank에 accession number AB531501로 등록되었다.

결과 및 고찰

접합전달을 위한 최적배지

*S. platensis*의 접합전달을 위한 최적배지를 조사하기 위해 지금까지 접합전달법에 사용된 배지 4종(AS-1, ISP2, ISP4, MS)을 선정하여 연구하였다. 이미 수행된 연구들을 보면 접합전달에 사용되는 고체배지에 따라 접합전달효율이 크게 영향 받는 것을 알 수 있다[4]. 본 연구에 사용된 MS와 AS-1배지는 방선균의 접합전달에 가장 많이 사용되는 배지이며[7,10,17], ISP2배지는 *S. lavendulae* FRI-5 [11]에, ISP4는 희소방선균 *Kitasatospora setae* [4]의 접합전달에 사용된 최적배지이다. Table 1과 같이 4종의 배지를 각각 *S. platensis*의 접합전달실험에 적용해 본 결과 AS-1, ISP4, MS의 경우에는 접합전달체가 형성되어 본 실험에 사용 가능하다는 것이 확인 되었다. 그러나 ISP2의 경우에는 *S. platensis*의 포자생산용 최적배지임에도 불구하고 접합전달체를 전혀 형성하지 못해 *S. platensis*의 접합전달에는 부적합한 것으로 확인되었다(Table 1). 또 형질전환체가 형성된 3종의 배지 중에서 접합전달효율은 MS가 가장

Table 1. Effects of medium on transconjugation efficiency

Medium ^a	Transconjugation frequency ^b
MS	2.3×10 ⁻⁶
ISP4	1.4×10 ⁻⁶
AS-1	6.5×10 ⁻⁸
ISP2	-

^aEach medium contains 10 mM MgCl₂.

^bValues represent average frequencies from three independent experiments.

- indicates no exconjugant.

높았고 ISP4와 AS-1의 순서였지만 ISP4의 경우 MS와 거의 차이가 없는 것으로 밝혀져 MS와 ISP4는 *S. platensis*의 접합전달을 위해 모두 사용 가능한 것으로 판단된다. 그러나 가장 낮은 접합전달효율을 보인 AS-1의 경우에는 MS보다 35배나 낮은 효율을 보여 배지간의 차이가 대단히 크다는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 MS배지를 *S. platensis*의 접합전달을 위한 최적배지로 선정하고 이후 실험에 계속 사용하였다.

포자의 열처리 효과

방선균 포자에 일정 시간 동안 열처리를 하였을 경우 접합전달효율이 상승하는 것으로 밝혀졌다[6,10,15]. 이러한 현상은 열처리가 포자의 발아를 유도하여 접합전달의 효율이 향상되거나[16] 방선균이 가진 제한계를 일시적으로 약화시킴으로써 효율이 증가되는 것으로 알려져 있다[1,6]. 따라서 *S. platensis*포자에 대한 최적 열처리 온도를 결정하기 위하여 30°C에서 60°C까지 5°C 간격으로 각각 10분간 열처리하고 처리하지 않은 대조군과 비교하여 열처리에 대한 포자의 생존율을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 열처리 온도가 올라갈수록 포자의 생존율이 떨어졌으며 45°C부터는 급격하게 떨어져 60°C에서는 전혀 생존하지 못했다. 접합전달을 위한 열처리조

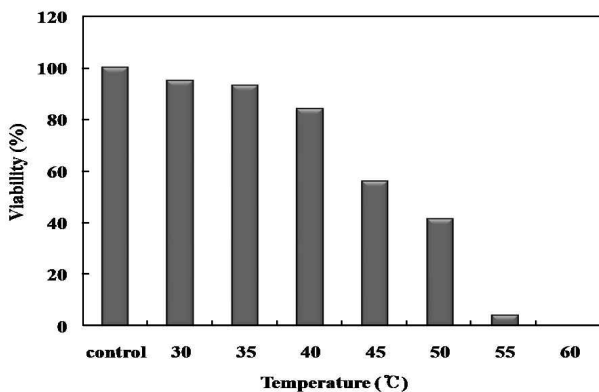


Fig. 1. Effects of temperature on the viability of *S. platensis* spores. Spores (10³/ml) in 2×YT medium were incubated for 10 min at the temperature indicated. The data are the average of three independent experiments, and expressed as a percent of the colony count obtained in the absence of heat treatment (control).

Table 2. Effects of heat treatment of spores on transconjugation efficiency

Temperature of heat treatment	Transconjugation frequency ^b
No heat treatment	1.4×10 ⁻⁶
30°C	7.9×10 ⁻⁷
35°C	7.0×10 ⁻⁷
40°C	4.9×10 ⁻⁷
45°C	-

^aThe heat treatment of spores was performed for 10 min.

^bValues represent average frequencies from three independent experiments.

- indicates no exconjugant.

건으로는 50% 이상의 생존율이 보장되는 것이 좋기 때문에 56%의 생존율을 보인 45°C까지 접합전달을 위한 열처리 온도에 포함하여 접합전달효율을 조사하였다. 그 결과 열처리를 하지 않은 대조군에 비해 열처리를 한 모든 실험군에서 접합전달효율이 떨어졌으며 특히 45°C의 열처리에서는 접합전달체가 전혀 형성하지 못했다(Table 2). 그러므로 *S. platensis* YK-2의 경우에는 포자에 대한 열처리가 오히려 접합전달효율을 떨어뜨리는 결과를 가져온다는 것을 확인할 수 있었다.

DNA 공여체수와 수용체수의 관계

접합전달효율이 낮은 방선균의 경우 plasmid DNA의 공여체로 사용되는 *E. coli*수와 수용체인 포자수의 비율이 접합전달효율에 대단히 중요한 영향을 미친다[4]. 선행연구에 의하면 *S. platensis*의 경우 다른 방선균에 비해 접합전달효율이 낮을 것으로 판단되었다[3]. 그러므로 접합전달에 필요한 최적공여체수를 조사하기 위해 Table 3에서 보는 바와 같이 공여체인 *E. coli*수를 2.5×10⁶에서 2.5×10⁸까지 단계적으로 적용하였으며 수용체인 포자의 수도 5×10⁶에서 1×10⁸까지 사용하여 실험하였다. 그 결과 DNA 공여체의 수와 수용체의 수가 모두 증가할수록 접합전달의 효율이 전체적으로 증가하는 경향을 보였다. 또 포자수가 5×10⁶일 때 *E. coli*수가 2.5×10⁶ 이하이면 접합전달이 일어나지 않지만 *E. coli*수가 5×10⁷ 이상이면 모든 포자수의

Table 3. Effects of the number of *E. coli* donor cells on transconjugation efficiency

Number of recipient spores	Transconjugation frequency ^a			
	Number of <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002(pSET152)			
	2.5×10 ⁶	2.5×10 ⁷	5×10 ⁷	2.5×10 ⁸
5×10 ⁶	-	1.8×10 ⁻⁶	2.8×10 ⁻⁴	3.3×10 ⁻⁴
1×10 ⁷	2.0×10 ⁻⁷	2.3×10 ⁻⁶	3.0×10 ⁻⁴	3.2×10 ⁻⁴
1×10 ⁸	2.5×10 ⁻⁷	2.4×10 ⁻⁶	3.3×10 ⁻⁴	3.2×10 ⁻⁴

^aValues represent average frequencies from three independent experiments.

- indicates no exconjugant.

조건에서 접합전달효율이 크게 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 *E. coli*수가 5배 많은 5×10^8 에서는 5×10^7 와 크게 차이가 없었다. 따라서 *S. platensis*의 접합전달을 위한 최적 *E. coli*수는 5×10^7 이며 2.5×10^7 이상의 공여체가 접합전달을 위해 필요하다는 것도 확인하였다.

배지에 첨가되는 MgCl₂의 최적농도

배지에 MgCl₂의 첨가유무는 접합전달효율에 큰 영향을 미치게 되며 10 mM의 MgCl₂가 일반적으로 배지에 첨가되어 왔다[15]. 그러나 최근 *K. setae*의 연구결과[4]에 따르면 ISP4배지에 50 mM의 MgCl₂가 첨가되었 때 무첨가와 10 mM 첨가의 경우에 비해 각각 3.8배와 3.3배 높은 접합전달효율을 보였다. 이러한 결과는 방선균의 종류에 따라 최적농도도 달라질 수 있다는 것을 의미한다. 그러므로 *S. platensis*에 대한 MgCl₂의 최적 첨가농도를 확인하기 위해 최적배지로 선정된 MS배지에 0~60 mM까지 다양한 농도의 MgCl₂를 첨가하여 접합전달을 진행하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 MgCl₂를 첨가하지 않은 실험군에 비해 첨가농도가 증가할수록 접합전달효율이 높아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 50 mM의 MgCl₂를 첨가했을 때 6.4×10^{-6} 로 가장 높은 접합전달효율을 보였는데 무첨가군에 비해 183배나 높았으며 10 mM 첨가에 비해서도 3.2 배 높았다. 이러한 결과는 *K. setae*의 연구결과와 매우 유사한 것으로 *S. platensis*의 접합전달을 위해서는 MS배지에 50 mM MgCl₂를 첨가하는 것이 최적 농도라는 것을 확인할 수 있었다.

지금까지의 연구를 통해 확인된 *S. platensis*를 위한 최적 접합전달 조건들은 접합전달용 배지로 50 mM MgCl₂가 첨가된 MS배지를 사용하고 열처리하지 않은 1×10^8 포자와 DNA 공여체로써 5×10^7 *E. coli*를 사용하는 것이다. 따라서 본 조건들을 모두 적용한 결과 9.4×10^{-4} 이라는 높은 접합전달효율을 획득할 수 있었다. 이것은 Table 1과 같은 초기조건에 비해 400배 이상 향상된 결과로써 특히 부위-특이적 재조합보다 100배 이상 높은 형질전환효율을 요구하는 상동 재조합 (homologous recombination) [7]에도 충분히 사용 가능하다

Table 4. Effects of MgCl₂ concentration in MS medium on the transconjugation efficiency

Concentration of MgCl ₂ added in MS medium (mM)	Transconjugation frequency ^a
0	3.5×10^{-8}
10	2.0×10^{-6}
20	2.5×10^{-6}
30	2.9×10^{-6}
40	4.3×10^{-6}
50	6.4×10^{-6}
60	5.8×10^{-6}

^aValues represent average frequencies from three independent experiments.

는 것을 확인하였다.

attB site의 특징

본 연구에 사용된 pSET152벡터는 *phC31* 유래의 *attP* site를 포함하고 있어 접합전달에 의해 방선균 내로 도입된 벡터는 integrase에 의해 chromosome의 *attB* site로 삽입되어 안정하게 유지된다. 지금까지 연구된 결과에 의하면 *attP* site가 삽입되는 곳은 단일 *attB* site만이 아니라는 것이 밝혀졌다[20]. 따라서 *attP* site가 삽입되는 *S. platensis*의 *attB* site에 대해 연구하였다. 먼저 본 연구를 통해 얻어진 4개의 접합전달체로부터 chromosome DNA를 각각 추출한 뒤 *KpnI*으로 절단하고 pSET152의 Apr 내성유전자를 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 수행하였다. 그 결과 4개의 접합전달체로부터 동일한 단일밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이것은 *S. platensis*의 chromosome내에 pSET152벡터가 삽입되는 곳이 한곳만 존재한다는 것을 시사하는 것이다. 또 *attB* site의 chromosome내의 위치와 염기서열을 확인하기 위해 pSET152가 삽입된 4개의 접합전달체로부터 chromosome DNA를 각각 추출하여 *KpnI*으로 처리한 뒤 agarose 전기영동을 통해 Southern blot에 확인된 단일밴드부근의 DNA단편을 회수하였다. 얻어진 DNA는 self-ligation을 거쳐 *E. coli* XL10-Gold로 형질전환되었고, Apr (50 µg/ml)가 첨가된 배지를 사용하여 형질전환체를 선별하여 *attB* site의 일부가 포함된 chromosome단편을 클로닝하였다. 얻어진 chromosome 단편의 염기서열은 ATTPR primer를 이용하여 분석하였다. 그 결과 4개의 접합전달체로부터 얻어진 *attB* site의 right-region은 모두 동일한 염기서열을 보였으며 accession number AB531501로 GeneBank에 등록되었다. 또 이미 밝혀진 다른 방선균 유래 *attB* site의 right-region 염기서열에 대해 77.8%~96.3%의 상동성을 보였으며 *attB* site의 chromosome내 위치는 *S. platensis* chromosome의 *pirin* 상동체를 코드하는 ORF내에 위치해 있었다(Fig. 3A). 그러나 *attB* site의 left-region에 대한 염기서열은 확인할 수 없었는데 이러한 현상은 다른 연구에서도 보고된 바 있다[17]. *attB* site의 계통학적인 분석에서는 *S. longisporoflavus*의 *attB* site와 가장 가까웠으며 *S. aureofaciens*

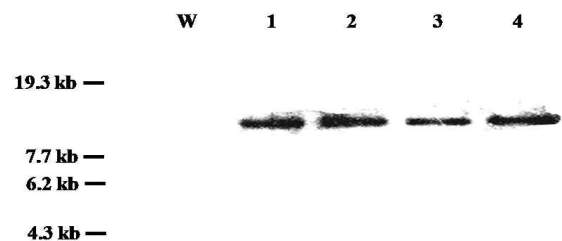


Fig. 2. Southern blot analysis of *KpnI*-digested genomic DNA of wild-type strain and exconjugants. Lane W; wild-type *S. platensis*, lane 1-4; apramycin-resistant exconjugants of *S. platensis*.

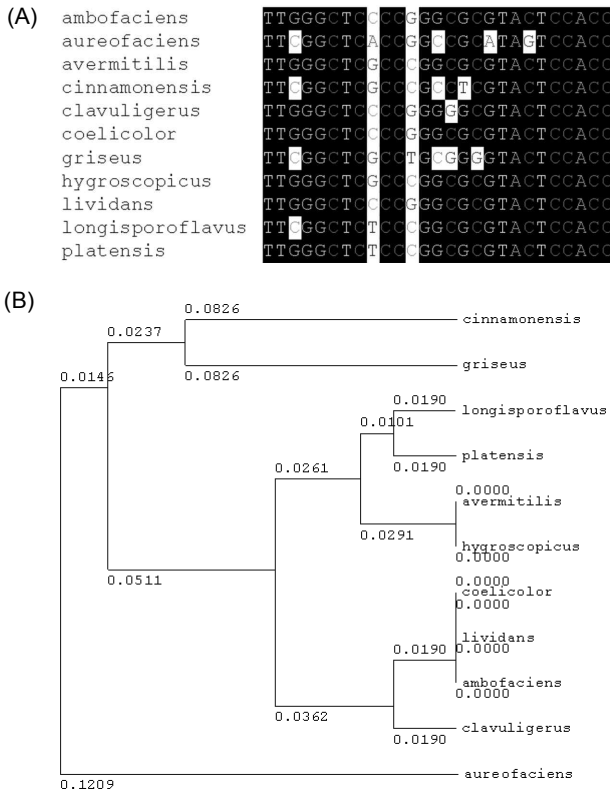


Fig. 3. Alignment of the attB site sequences (A) and phylogenetic tree (B) among *S. platensis* and other actinomycetes: ambofaciens, *S. ambofaciens*; aureofaciens, *S. aureofaciens*; avermitilis, *S. avermitilis* MA-4680; cinnamomensis, *S. cinnamomensis*; clavuligerus, *S. clavuligerus*; coelicolor, *S. coelicolor* A3 (2) strain M145; griseus, *S. griseus* ATCC 12475; hygroscopicus, *S. hygroscopicus* NRRL5491; lividans, *S. lividans* 66 TK64; longisporoflavus, *S. longisporoflavus* 83E6; platensis, *S. platensis* YK-2 (this work). The alignment and the phylogenetic tree were created by GENETYX software (GENETYX Co., Tokyo, Japan). The numbers among actinomycetes in the phylogenetic tree indicate evolutionary relationship based on Kimura's two parameter model and neighbor-joining methods.

와 가장 멀었다(Fig. 3B). 또한 *S. platensis* chromosome의 attB site에 pSET152백터만의 삽입으로 *S. platensis*의 표현형이 변화되는지를 확인하기 위해 접합전달체와 야생주에 대하여 TGase 생산량과 형태분화를 확인해 보았으나 어떤 변화도 관찰할 수 없었다(자료 미제시). 그러므로 본 연구에서 사용된 접합전달시스템은 *S. platensis* YK-2의 분자생물학적인 연구를 위해 대단히 안정적이고 효율적인 형질전환방법이라는 것이 확인되었다.

감사의 글

이 논문은 2009학년도 경남대학교 학술연구장려금 지원에

의한 것임.

References

- Bailey, C. R. and D. J. Winstanley. 1986. Inhibition of restriction in *Streptomyces clavuligerus* by heat treatment. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2945-2947.
- Baltz, R. H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* **6**, 76-82.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-49.
- Choi, S. U., C. K. Lee, Y. I. Hwang, H. Kinoshita, and T. Nihira. 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer. *Arch. Microbiol.* **181**, 294-298.
- Combes, P., R. Till, S. Bee, and M. C. M. Smith. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-attB sites for the ϕ C31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* **184**, 5746-5752.
- Engel, P. 1987. Plasmid transformation of *Streptomyces tendae* after heat attenuation of restriction. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1-3.
- Flett, F., V. Mersinias, and C. P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 223-229.
- Folk, J. E. 1980. Transglutaminase. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 517-531.
- Kanaji, T., H. Ozaki, T. Takao, H. Kawajiri, H. Ide, M. Motoki, and Y. Shimonishi. 1993. Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. Strain s-8112. *J. Bio. Chem.* **268**, 11565-11572.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.
- Kitani, S., M. J. Bibb, T. Nihira, and Y. Yamada. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 535-538.
- Lorand, L. and S. M. Conrad. 1984. Transglutaminase. *Mol. Cell Biochem.* **58**, 9-35.
- MacNeil, D. J. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 5607-5612.
- Matsushima, P., M. C. Broughton, J. R. Turner, and R. H. Baltz. 1994. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*. effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* **146**, 39-45.
- Mazodier, P., R. Petter, and C. Thompson. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **171**, 3583-3585.
- Motamedi, H., A. Shafiee, and S. J. Cai. 1995. Integrative

- vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene* **160**, 25-31.
17. Paranthaman, S. and K. Dharmalingam. 2003. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 84-91.
 18. Rao, R. N., M. A. Richardson, and S. Kuhstoss. 1987. Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 166-198.
 19. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, New York.
 20. Smokvina, T., P. Mazodier, F. Boccard, C. J. Thompson, and M. Guerinéau. 1990. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* **94**, 53-59.
 21. Stegmann, E., S. Pelzer, K. Wilken, and W. Wohlleben. 2001. Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer. *J. Biotechnol.* **92**, 195-204.
 22. Yeo, S. H., J. H. Yoon, D. G. Lee, and H. S. Kim. 2009. Screening and identification of a *Streptomyces platensis* YK-2, a new transglutaminase producer. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 588-595.

초록 : Transglutaminase를 생산하는 *Streptomyces platensis*의 분자생물학적인 연구를 위한 접합 전달법 확립

배세정 · 조양호 · 최선욱*
(경남대학교 식품생명학과)

식품단백질의 물성과 기능성을 개선시켜 산업적인 가치가 매우 높은 TGase를 생산하는 *S. platensis* YK-2의 분자 유전학적인 연구를 위해 형질전환방법을 확립하였으며 본 연구를 위해 도입된 방법은 대장균을 plasmid DNA의 공여체로, *S. platensis*의 포자를 수용체로 사용하는 접합전달법이다. *S. platensis*를 위한 최적 접합전달조건은 50 mM의 MgCl₂를 첨가한 MS배지에 열처리를 하지 않은 포자와 5×10⁷의 plasmid DNA 공여체인 *E. coli*를 사용하는 것이다. 또 본 연구를 통해 얻어진 접합전달체의 *attB* site에 대한 분석을 통해 *S. platensis* chromosome의 *pirin* 상동체를 코드하는 ORF내에 *attB* site가 단일위치로 존재하고 있으며 이미 밝혀진 다른 방선균유래 *attB* site의 염기서열에 대해 77.8%~96.3%의 상동성을 나타냈다.