

대장균 *xylA* 프로모터를 이용한 xylose 유도성 발현벡터의 구축

김현호 · 소재현 · 이인구*

경북대학교 농화학과

Construction of Xylose-Inducible Expression Vector Using *xylA* Promoter of *Escherichia coli*

Hyun-Ho Kim, Jai-Hyun So, and In-Koo Rhee*

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Received March 2, 2010; Accepted March 8, 2010

xylA promoter is a major promoter in xylose operon of *Escherichia coli*. *xylA* promoter is sufficient as the promoter for the construction of new expression vector because this promoter was tightly controlled and induced by the addition of xylose. For the construction of xylose-inducible expression vector, 600 bp of *xylA* promoter was ligated between *Aat*II and *Hind*III of pUC18, named pXA600. In order to investigate the effect of XylR protein encoded by *xylR* gene on the *xylA* promoter, 1,988 bp of *xylR* gene including its promoter was ligated into downstream of multiple cloning site to the opposite direction of *xylA* promoter in pXA600, named pXAR600. For the measurement of expression level, 3,048 bp of *lacZ* structural gene was fused into *xylA* promoter in both plasmids pXA600 and pXAR600 as a reporter gene, named pXA600-*lacZ* and pXAR600-*lacZ*, respectively. The β -galactosidase activity of pXA600-*lacZ* and pXAR600-*lacZ* in *E. coli* JM109 was determined to be 1,641 and 2,304 unit by the induction with xylose in LB medium, respectively. The β -galactosidase activity of pXAR600-*lacZ*/JM109 was about 1.4 times higher by the induction with xylose than that of pXA600-*lacZ*/JM109. The β -galactosidase activity of pXA600-*lacZ* and pXAR600-*lacZ* in *E. coli* JM109 showed 6,282 and 9,320 unit by the induction with xylose in DM minimal medium, respectively. A regulator, xylR protein works as an activator for the gene expression by the addition of xylose in the xylose-inducible vectors because the level of gene expression in pXA600 is increased by the insertion of *xylR* gene into the same vector. The *xynA* gene of *Streptomyces thermocyanoviolaceus* cloned in pXA600 and pXAR600 was successfully expressed in *E. coli* BLR(DE3). As a result, plasmids pXA600 and pXAR600 using *xylA* promoter are sufficient as new expression system to produce a foreign protein in *E. coli*.

Key words: expression vector, *xylA* gene, *xylA* promoter, xylose isomerase

서 론

대장균에서 xylose 대사는 xylose 오페론 상에 위치한 xylose 대사 유전자의 발현에 의하여 이루어진다[David와 Weismeyer, 1970]. Sofia 등[1994]에 의하여 대장균 염색체의 76.0분에서 81.5분 사이의 염기서열이 밝혀졌으며, 이 영역의 78분 위치에 있는 xylose 오페론을 이루는 각 유전자들의 위치가 결정되었다. 대장균의 xylose 오페론은 세포 내로 유입된 xylose를 xylulose로 이성화시키는 xylose isomerase 유전자인 *xylA*와

xylulose를 인산화시켜 xylulose-5-phosphate로 전환하는 xylulokinase 유전자인 *xylB*가 동일한 방향으로 위치해 있으며, xylose의 수송에 관여하는 *xylF*(xylose ABC transporter, periplasmic), *xylG*(xylose ABC transporter, ATP-binding protein), *xylH*(xylose ABC transporter, permease protein)와 오페론에서 조절을 담당하는 XylR 단백질을 코딩하는 *xylR* 유전자 *xylAB*와는 반대방향으로 위치해있다[David와 Weismeyer, 1970]. 오타당인 xylose를 대사하는 xylose 오페론의 프로모터인 *xylAF* 프로모터는 xylose에 의해 유도되며 XylR 단백질이 발현수준을 조절해준다. 이는 *xylAF* 프로모터와 XylR 단백질을 이용하여 유용한 발현 벡터의 개발에 응용될 수 있는 가능성을 암시한다. 또한 현재까지 외래 유전자의 발현을 위해 제작된 대장균 발현벡터는 대부분 유도성인 대장균 유래의 프로모터로써 *lac*[Gronenborn, 1976], *trc* 및 *tac*[Brosius 등, 1985],

*Corresponding author

Phone: +82-53-950-5718; Fax: +82-53-953-7233

E-mail: ikrhee@knu.ac.kr

```

CGGTTTATCATGTTTTCAATCTGCGACATTTGTGTTTCTTCATTGCCATT
TGCAGACTGTACAAATACTTTCGCGCCGAGAGATTCTGCCTTTTTACAAA
AGATATCTCGATCTTTTTGCCAGCGTTCAAGACGGAGATCATCAATCGCC
ATACCTATTTTTGACTTCTTTGGCGTGTGCAGCAACGTTGGTAAGCAGGAG
IF02
TGAGGTGCAAAGGGTGAGTAGAATGTTCTTTATTTTCATGGTGTAGGGCC
IF01 ← xylF translational start
TTCTGTAGTTAGAGGACAGTTTAAATAAGTAACAATCACCGCGATAAACG
TAACCAATTTTTAGCAACTAAACAGGGGAAAACAATTACAGATTTTTTATC
IF1
TTTCGATTACGATTTTTGGTTTATTTCTTGATTTATGACCGAGATCTTAC
IF2
TTTTGTTGCGCAATTGTACTTATTGCATTTTTTCTCTTCGAGGAATTACCC
AGTTTCATCATTCCATTTTATTTGCGAGCGAGCGCACACTTGTGAATTA
IA1
TCTCAATAGCAGTGTGAAATAACATAATTGAGCAACTGAAAGGGAGTGCC
IA2
CAATATTACGACATCATCCATCACCCGCGGCATTACCTGATTATGGAGTT
CAATATGCAAGCCTATTTTGACCAGCTCGATCGCGTTCGTTATGAAGGCT
→ xylA translational start IA0
CAAAATCCTCAAACCCG

```

Fig. 1. Nucleotide sequence of *xylA* promoter region of *E. coli* K802. Six hundreds bp of the promoter region amplified by PCR (shaded nucleotides in the sequence) includes 235 bp of *xylF* structural gene, and two regulatory sites (I_{F01}, and I_{F02}) are located on the *xylF* gene region. Underlined sequence (I_{A0}, I_{A1}, I_{A2}, I_{F1}, I_{F2}, I_{F01}, I_{F02}) represent the putative *xylR* binding site [Shin, 2001].

araBAD[Guzman 등, 1995] 프로모터 등을 이용한 발현벡터와 대장균에 감염하는 파이지 유래의 λP_L [Elvin 등, 1990] 및 T7 RNA polymerase[Studier 와 Moffatt, 1986] 프로모터를 이용하여 개발되었다. 이에 본 연구에서는 xylose로 유전자 발현을 유도하여 외래의 단백질을 생산하는 대장균 발현벡터를 구축하기 위하여 양방향으로 발현되는 *xylAF* 프로모터중 *xylA* 유전자 쪽으로 발현되는 프로모터(*xylA* 프로모터)를 분리하여 xylose 존재 하에서 *xylA* 프로모터에 의한 유전자 발현 수준을 확인하였다. 이러한 벡터를 구축하기 위한 골격 플라스미드로 세포 내에 500~700 복제수를 가진 pUC18을 선택하여 목적단백질을 대량 생산할 수 있는 벡터의 개발을 시도하였다. 우선 600 bp의 *xylA* 프로모터를 pUC18에 삽입하여 xylose존재 하에서 *xylA* 프로모터에 의하여 발현되는 벡터 pXA600을 구축하고 *lacZ* 구조유전자를 연결하여 xylose 유도 하에서 발현되는 β -galactosidase의 활성을 측정하여 이 벡터의 발현 수준을 조사하였다. 또한 xylose 오페론의 조절유전자인 *xylR* 유전자를 동일 발현벡터인 pXA600에 삽입하여 *xylA* 프로모터의 발현수준을 조사하였다. 외래 유전자인 *Streptomyces thermocyanoviolaceus*의 내열성 xylanase를 코딩하는 *xynA* 유전자를 실제로 구축된 벡터에 발현시켜 새로운 xylose 유도성 발현벡터로서의 기능성을 확인하였다.

재료 및 방법

사용균주, 플라스미드 및 DNA 조작. 형질전환용 대장균으로는 *Escherichia coli* DH5 α [Hanahan, 1983]를 사용하였고, 구축된 발현 벡터를 도입할 균주로는 *E. coli* JM109[Yanisch-Perron 등, 1985]를 사용하였다. 본 실험에서 구축한 플라스미드 벡터들은 고복제수 클로닝 벡터인 pUC18[Yanisch-Perron 등, 1985]을 기본골격으로 하여 제작하였다. 중합효소연쇄반응(PCR)에 의한 *xylA* 프로모터 영역의 증폭에는 *E. coli* K802 [Wood, 1966]의 염색체 DNA를 주형으로 사용하였으며 리포터 유전자인 *lacZ* 구조유전자의 증폭에는 프로모터 검색 벡터인 pMC1403[Casadaban, 1980]을 사용하였다. 내열성 xylanase유전자인 *xynA* 유전자의 증폭을 위하여는 *S. thermocyanoviolaceus* KCCM40049[Lee, 2000; Choi 등, 2006]의 염색체 DNA를 주형으로 사용하였으며, *xynA*의 발현을 위한 숙주세포로는 *E. coli* BLR(DE3)를 사용하였다(Novagen, Madison, WI).

플라스미드의 추출과 형질 전환은 Sambrook 등의 방법[1989]에 따라 수행하였으며 형질 전환을 위한 competent cell은 Inoue 등의 방법[1991]에 따라 준비하였다. 염색체 DNA의 추출은 Ausubel등의 방법[1992]에 따라 수행하였다.

사용배지 및 균의 배양. 대장균의 배양 및 보존을 위한 배지

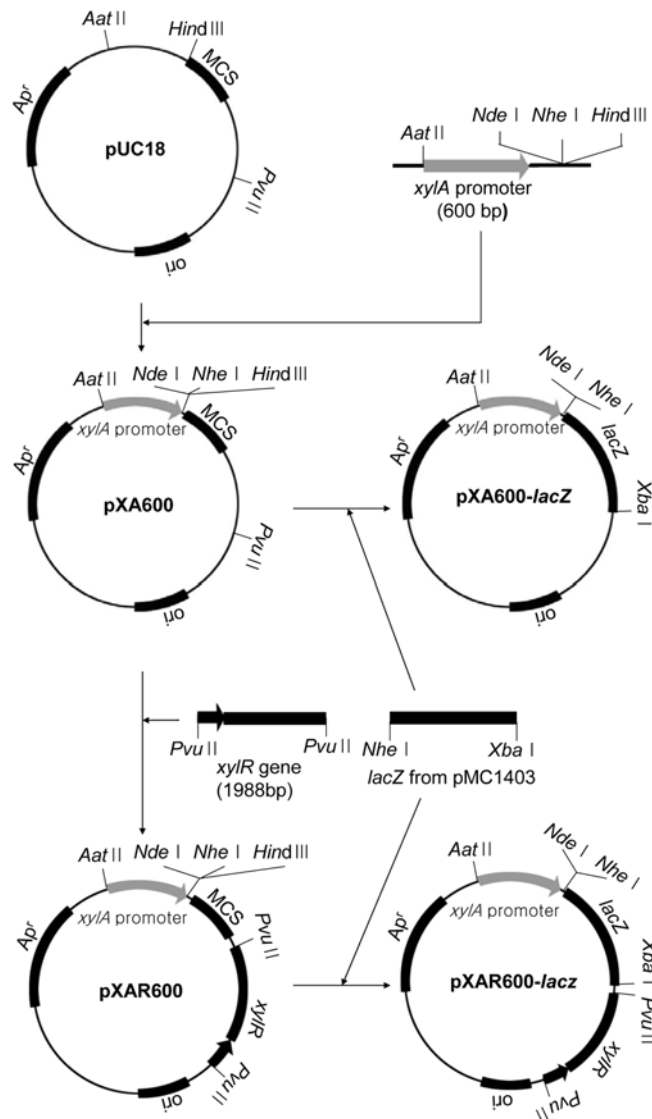


Fig. 2. Construction of expression vectors including *xylA* promoter. Arrow heads in plasmids represent the transcriptional direction of promoters.

로는 Luria-Bertani 배지[LB배지; Bertani와 Weigle, 1953]를 사용하였고 필요에 따라 ampicillin을 각각 최종농도 100 µg/mL 되게 첨가하여 사용하였다. β-Galactosidase 활성 측정을 위한 대장균의 배양은 LB배지에 균을 접종하고 37°C에서 200 rpm으로 진탕 되는 회전식 진탕배양기에 12시간 중배양한 뒤 이 중배양액을 1%(v/v)가 되게 본 배양액에 접종하여 같은 온도조건에서 3시간 전배양한 후 유도물질로서 xylose를 0.5%가 되도록 첨가하여 4시간 동안 유도배양 하였다. 또한 DM배지 (0.7% K₂HPO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.05% trisodium citrate · 2H₂O, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.5% glycerol)에서 대장균을 배양할 때는 37°C에서 6시간 동안 전배양한 후 xylose를 0.5%가 되도록 첨가하여 같은 온도에서 4시간 유도배양 하였다.

플라스미드 pXA600와 pXAR600의 제작. 600 bp의 *xylA*프로모터 영역을 pUC18에 삽입하고자 AatII와 HindIII-NheI-NdeI 제한인식 서열이 삽입된 정방향 및 역방향 프라이머(정방향, 5'-GGCGACGTCCTCGAGCGGTTTATCATGTTTCA-3'; 역방향,

5'-CCCAAGCTTGCTAGCCATATGATTGAACTCCATAATCAG-3')를 각각 사용하여 대장균 K802의 염색체 DNA를 주형으로 하여 증폭하였다. PCR반응은 우선 95°C에서 2분간 변성시키고, 95°C에서 30초간 변성후, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 1.5분간 중합하는 반응을 30회 반복하였다. 이렇게 증폭한 600 bp의 *xylA* 프로모터를 AatII, HindIII로 절단하여 같은 제한효소로 절단된 pUC18에 연결하고 *E. coli* DH5α에 형질전환 하였다. 재조합된 플라스미드를 추출하여 염기서열분석을 실시하여 *xylA* 프로모터가 맞게 삽입되었음을 확인하고 이를 pXA600이라 명명하였다(Fig. 2). *xylA* 프로모터에 의한 유전자 발현 수준을 측정하기 위하여 리포터 유전자로서 β-galactosidase 유전자인 *lacZ*를 선택하였다. *lacZ* 유전자는 프로모터 검색 백터인 pMC1403을 주형으로 하고 프라이머 LF-Nhe(5'-CTAGCTAGCGTCGTTTTACAACGTCGTA-3'), LR-Xba(5'-TCCTCTAGATTATTTTTGACACCAGAC-3')를 사용하여 증합효소 연쇄 반응을 위와 같이 수행하여 증폭하였다. 정제한 증폭산물과 pXA600을 제한효소 NheI과 XbaI으로 절단하여 pXA600의

xylA 프로모터 하류에 위치한 *NheI*과 *XbaI* 사이에 삽입하고 리포터 유전자인 *lacZ* 구조유전자가 연결된 플라스미드는 pXA600-*lacZ*으로 명명하였다(Fig. 2). 또한 조절인자인 XyIR 단백질의 영향을 확인하기 위하여 자신의 프로모터를 함유한 1,988 bp의 *xylR* 유전자[Shin, 2001]를 분리하여 pXA600의 multiple cloning site(MCS) 하류의 *PvuI* 절단부위에 삽입하여 pXAR600를 제작하고 여기에 위와 같은 방식으로 *xylA*프로모터 하류에 *lacZ* 구조유전자를 삽입하여 pXAR600-*lacZ*를 제작하였다(Fig. 2). 외래 유전자의 발현을 확인하기 위하여 *S. thermocyanoeviolaceus* KCCM4009의 *xynA* 유전자를 *NdeI*과 *HindIII* 제한효소 인식 서열이 각각 삽입된 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 정제된 증폭산물과 pXA600을 제한효소 *NdeI*과 *HindIII*으로 절단하여 pXA600의 *xylA* 프로모터 하류에 연결하고, 이 플라스미드를 pXA600-*xynA*로 명명하였다. *xylR* 유전자를 함유한 벡터 pXAR600에 외래 유전자인 *xynA* 유전자를 삽입하여 유전자 발현 수준을 조사하기 위하여 *xynA* 유전자를 *NheI*과 *HindIII* 제한효소 인식 서열이 각각 부가된 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 사용하여 증폭하여 pXAR600의 *xylA* 프로모터 하류에 연결하여 플라스미드 pXAR600-*xynA*를 제작하였다(data not shown).

효소의 활성 측정. 프로모터의 발현강도 측정을 위한 β -galactosidase의 활성은 Miller의 방법[Miller, 1972]에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 대장균 배양액 500 μ L를 원심 집균하고 새 배지로 1회 세척한 후 같은 배지 500 μ L에 현탁시켜 그 중 20 μ L를 취하여 Z-buffer(60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM β -mercaptoethanol, pH 7.0) 980 μ L와 toluene 20 μ L를 혼합하였다. 이 혼합액을 20초간 vortex mixer로 교반한 후 기질로서 10 mM *O*-nitrophenyl- β -D-galactoside(ONPG) 200 μ L를 가하여 28°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액에 1 M Na_2CO_3 용액 1 mL를 가하여 반응을 중지시키고 420 nm와 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 효소의 활성은 Miller unit로 환산하여 표시하였다[Miller, 1972]. 이 때 균의 생육도는 600 nm에서 측정된 값을 사용하였다.

Xylanase의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 200 μ L와 배양 상정액 200 μ L 그리고 1.0% xylan 용액 400 μ L를 혼합하여 60°C에서 20 분간 반응시킨 후 dinitrosalicylic acid(DNS)용액[Miller, 1959] 800 μ L를 가하여 효소반응을 정지시키고 생성된 환원당을 정량하였다. DNS 용액을 가한 상기 반응액을 끓는 수조에서 10분간 반응시킨 후 급냉하고 재증류수로 6배 희석하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성의 단위는 위 조건에서 1분간에 1 μ mol의 xylose에 상당하는 환원당을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 나타내었다.

단백질의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli의 방법[1970]에 준하여 수행하였다.

결과 및 고찰

플라스미드 pXA600 및 pXAR600의 구축. *xylA* 프로모터는 Fig. 1에서와 같이 *xylF* 프로모터와는 반대방향으로 발현되는 양방향 프로모터의 일부이다. Shin의 보고[2001]에 의하면 *xylA* 프로모터는 *xylF* 프로모터보다 2배 정도 높은 발현 강도를 나타내고 발현의 조절도 xylose 유도 시에만 발현되고 xylose가 존재하지 않으면 전사가 강하게 억제된다. *xylA* 프로모터 영역을 pUC18에 삽입하고자 대장균 K802의 염색체 DNA를 주형으로 하여 600 bp의 *xylA* 프로모터를 PCR로 증폭하였다(Fig. 1). Shin[2001]은 *xylA* 유전자의 개시코돈으로부터 시작하여 60 bp는 XyIR 조절단백질이 결합하여 조절작용을 하는 주요한 부위라는 것을 확인하였으며 XyIR dimer에 의한 looping repression 현상이 일어나는 주요 부위로 추정하였다. 그러므로 이 부위를 포함하지 않는 *xylA* 프로모터 영역은 구성적인 발현도 높게 나타날 가능성이 있으나 만약 이 부위를 포함할 경우 목적 단백질 앞에 20개의 아미노산이 붙은 융합단백질이 생산될 수 있으며 이는 그 기능에 있어서 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 또한 *xylF* 유전자의 개시코돈으로부터 100 bp 이내에도 XyIR 조절단백질이 결합하는 두 부위가 있는 것으로 추정하고 있다(Fig. 1). 따라서 60 bp의 *xylA* 구조유전자를 포함하지 않고 *xylF* 유전자의 개시코돈으로부터 235 bp 지점까지의 부위를 포함한 총 600 bp의 프로모터 영역을 *AatII*와 *HindIII*-*NheI*-*NdeI* 제한효소 인식 서열이 삽입된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 이 후 pUC18의 *AatII*와 *HindIII* 절단 부위에 600 bp의 *xylA* 프로모터를 삽입하여 pXA600을 구축하였다. 이후 XyIR 단백질의 영향을 보기 위하여 구축된 pXA600에 자신의 프로모터가 함유된 1,988 bp의 *xylR* 유전자를 pXA600의 *PvuII* 절단부위에 *xylA*프로모터의 전사방향과 반대 방향으로 삽입하여 pXAR600을 구축하였다(Fig. 2).

플라스미드 pXA600과 pXAR600에서 β -galactosidase 발현 양상. 구축한 pXA600과 pXAR600의 *NheI*와 *XbaI* 사이에 *lacZ*를 연결하여 pXA600-*lacZ*와 pXAR600-*lacZ*를 각각 제작하여 대장균 JM109에 형질전환 하였다. 형질전환된 균주 pXA600-*lacZ*/JM109와 pXAR600-*lacZ*/JM109를 ampicillin이 포함된(100 μ g/mL) LB배지에 3시간동안 전배양한 후 xylose가 0.5% 되도록 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 유도배양 하였다. 이를 원심집균한 후 효소를 추출하여 재료 및 방법에서 기술한 방법에 따라 β -galactosidase 활성 측정을 실시하였다. Xylose로 유도한 pXA600-*lacZ*/JM109에서 β -galactosidase의 발현 증가를 SDS-PAGE를 통해서 확인한 결과 xylose로 유도한 경우 116 kDa 부근에서 β -galactosidase의 밴드를 확인하였다(Fig. 3).

LB 배지에서 pXA600-*lacZ*/JM109와 pXAR600-*lacZ*/JM109에 대한 β -galactosidase의 활성도를 측정한 결과 pXA600-*lacZ*/JM109의 경우 xylose로 유도한 경우 β -galactosidase의 활성은 1,641 unit이었으며 유도하지 않은 경우는 264 unit이었다. 또한 pXAR600-*lacZ*/JM109의 경우 xylose로 유도한 경우 β -

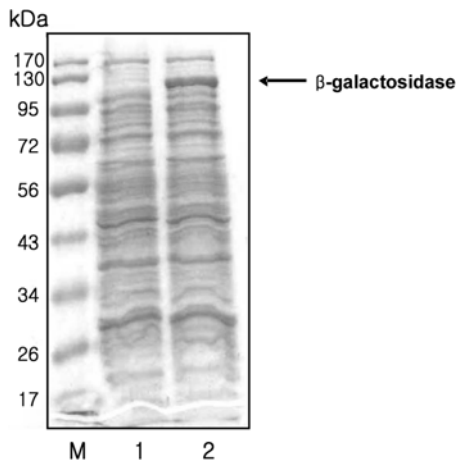


Fig. 3. SDS-PAGE profile of β -galactosidase expressed from pXA600-*lacZ*/JM109 having *xyIA* promoter. M, molecular marker; 1, uninduced; 2, induced with xylose.

galactosidase의 활성은 2,304 unit이었으며 유도하지 않은 경우는 198 unit이었다(Fig. 4). 최소배지에서의 발현수준을 알아보기 위하여 DM배지에 xylose와 그 대조군으로서 glycerol을 최종 0.5%가 되도록 첨가하여 유도배양 하였다. DM 최소배지에서 pXA600-*lacZ*/JM109에 대한 β -galactosidase의 활성도를 측정할 결과 xylose로 유도한 경우 β -galactosidase의 활성은 6,282 unit 이었으며 유도하지 않은 경우는 1,017 unit이었다. 또한 벡터에 *xyIR* 유전자를 가진 pXAR600-*lacZ*/JM109의 경우 xylose로 유도했을 때 β -galactosidase의 활성은 9,320 unit이었으며 유도하지 않은 경우는 973 unit이었다(Fig. 5). *xyIR* 유전자를 동일 벡터에 함유한 pXAR600-*lacZ*/JM109의 β -galactosidase 활성이 벡터에 *xyIR* 유전자를 함유하지 않은 pXA600-*lacZ*/JM109보다 LB배지와 DM배지에서 모두 더 높은 활성을 보였다. 이 결과로 보아 XylR 단백질은 *xyIA* 프로모터상에서 촉진제(activator)로서 양의 조절을 하며, 단백질의 더 많은 발현을 위해서는 *xyIR* 유전자가 함유된 pXAR600 벡터가 더 좋은 것으로 생각된다.

Fig. 4와 Fig. 5에서 보는 바와 같이 β -galactosidase 활성이 LB배지에서보다 DM배지에서 3.84배 높게 나타났다. 이것은 최소배지인 DM배지에서는 대장균의 생육속도는 느리지만 다른 단백질에 비해 β -galactosidase 발현수준이 더 높게 나타났기 때문이다. 이러한 사실은 최소배지인 DM배지에서 *xyIA* 프로모터에 의한 유전자발현에 있어서 포도당이나 아미노산등에 의한 이화물억제(catabolite repression) 현상이 해제되었기 때문인 것으로 추측된다. Shin[2001]에 의하면 *xyIA* 프로모터는 강하게 이화물억제를 받는 것으로 알려져 있다.

Fig. 1에 표시된 주요한 XylR 결합부위인 I₄₀부위가 포함되지 않은 *xyIA* 프로모터로 구축된 pXA600과 pXAR600은 조절을 담당하는 XylR이 결합하는 부위의 일부가 결손됨으로 인해 glycerol 유도 하에서 LB배지에서는 13.8% 그리고 DM 최소배지에서는 8.6%에 상당하는 구성적인 발현을 나타내는 것으로 생각된다. 또한 이런 현상은 pXAR600의 경우에도 각각의 배지에서 16.2%와 10.4%에 상당하는 구성적인 발현을 나타내었다.

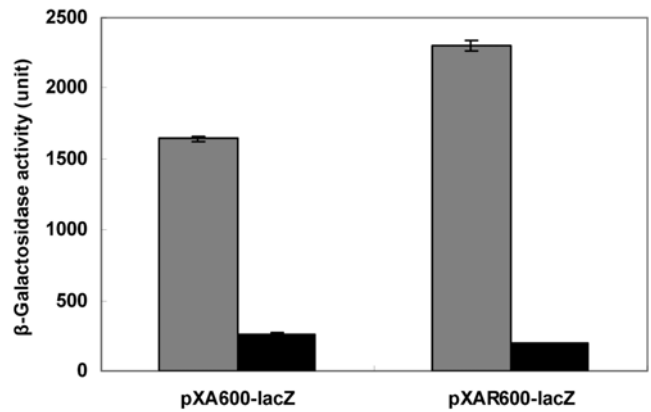


Fig. 4. Expression level of pXA600-*lacZ*/JM109 and pXAR600-*lacZ*/JM109 by the induction with xylose in LB medium. 1% seed culture of *E. coli* JM109 harboring pXA600-*lacZ* and pXAR600-*lacZ* were inoculated into LB medium contained ampicillin (100 μ g/mL). Each bacterium was induced in LB medium containing 0.5% xylose for 4 h after 3 h of pre-culture at 37°C. The activity of β -galactosidase was determined by Miller's method (Miller, 1972). Error bar indicated the standard deviation of the mean by triplicate determinations. ■, induced; ■, uninduced.

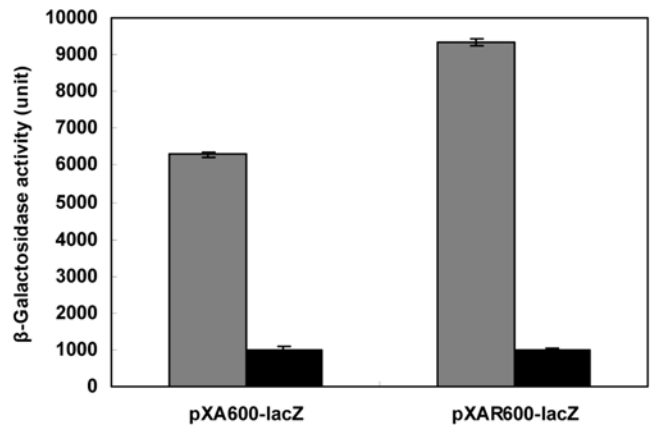


Fig. 5. Expression level of pXA600-*lacZ*/JM109 and pXAR600-*lacZ*/JM109 by the induction with xylose in DM medium. 1% seed culture of *E. coli* JM109 harboring pXA600-*lacZ* and pXAR600-*lacZ* was inoculated into DM medium contained ampicillin (100 μ g/mL). Each bacterium was induced in DM medium containing 0.5% xylose for 4 h after 3 h of pre-culture at 37°C. and grown at 37°C in shaking incubator with 200 rpm for 3 h. The activity of β -galactosidase was determined by Miller's method [Miller, 1972]. Error bar indicated the standard deviation of the mean by triplicate determinations. ■, induced; ■, uninduced.

플라스미드 pXA600과 pXAR600에서 외래의 내열성 xylanase 유전자의 발현. 외래 유전자 발현의 실례로써 *S. thermocyanoeviolaceus* KCCM4009의 *xynA* 유전자를 *NdeI*와 *HindIII* 제한효소 인식 서열이 부가된 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 사용하여 증폭하여 구축된 pXA600의 MCS에 삽입하여 발현되는 내열성 xylanase의 활성을 측정하였다. 또한 *xynA* 유전자를 *NheI*와 *HindIII* 제한효소 인식 서열이 부가된 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 사용하여 증폭하여 구축된 pXAR600의 MCS에 삽입하여 발현되는 내열성 xylanase의 활성을 측정하였다. 먼저 구축된 pXA600-*xynA*

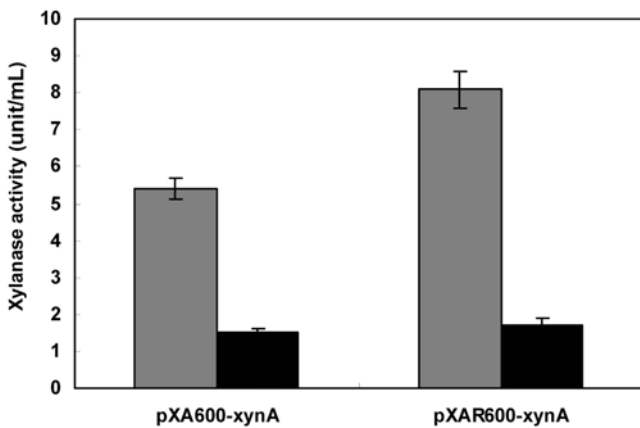


Fig. 6. Expression of xylanase from pXA600-*xynA* and pXAR600-*lacZ* having *xynA* gene of *S. thermocyaneoviolaceus* in *E. coli* BLR(DE3). The plasmid pXA600-*xynA* and pXAR600-*lacZ* were transformed into *E. coli* BLR(DE3) and the enzyme was induced by the addition of 0.5% xylose to LB medium for 4 h at 37°C after 3 h pre-culture. Error bar indicated the standard deviation of the mean by triplicate determinations. ■, induced; ■, uninduced.

과 pXAR600-*xynA*를 대장균 JM109에 형질전환 하여 xylanase의 활성을 측정 한 결과 xylose로 유도한 경우와 유도하지 않은 경우 모두 배양 상정액에 활성이 나타나지 않았으나 균체를 파쇄한 경우에 전자에서 미미한 xylanase의 활성이 나타났다(data not shown). 또한 congo red를 이용해 xylan 함유 LB 평판배지 상에서 xylan 분해한 시험에서 분해환을 보이지 않았다(data not shown). *S. thermocyaneoviolaceus* KCCM4009의 xylanase는 분비 효소로서 신호배열 펩티드를 가지고 있으며[Lee, 2000], Choi등[2006]은 pET 발현백터를 사용하여 대장균 BLR(DE3)에서 *S. thermocyaneoviolaceus* KCCM4009의 *xynA* 유전자를 성공적으로 발현 시킨바 있으며 xylanase가 세포 외로 분비되는 것을 확인하였다. pXA600-*xynA*와 pXAR600-*xynA*를 대장균 BLR(DE3)로 형질전환한 후 xylanase의 활성을 측정 한 결과 LB배지에서 xylose로 유도를 하였을 때 각각 5.4 및 8.1 unit/mL로 나타났으며, 유도하지 않았을 때 각각 1.3 및 1.7 unit/mL로 나타났다(Fig. 6). 이로서 외래 유전자인 *xynA*가 pXA600 및 pXAR600 플라스미드 벡터에서 성공적으로 발현됨을 확인하였다. 외래의 내열성 xylanase 유전자가 대장균 JM109에서 발현이 잘 되지 않았던 이유는 신호배열 펩티드가 정확하게 processing되지 않았거나 혹은 대장균 BLR(DE3)의 경우 외래 단백질의 발현 숙주로서 외막(outer membrane) 단백질인 ompT protease[Stumpe등, 1998]가 제거되어 있으나 대장균 JM109에서는 ompT protease가 존재하기 때문인 것으로 추측 된다.

대장균 xylose 오페론에 관한 연구로는 Roh[1996]가 조절 유전자인 *xyIR*이 *xyIA* 유전자의 발현을 조절하는 양상을 확인하였고 Song과 Park[1997]은 xylose 오페론 상에서 XyIR 단백질이 전사를 촉진함을 밝혔으며 *xyIAF* 프로모터에서의 XyIR 결합 부위를 확인하였다. 또, Shin[2001]은 대장균에서 XyIR 단백질을 과발현, 정제하여 *xyIAF* 프로모터에 대한 친화력을 확인하였고 이 프로모터 영역을 확장시켜 XyIR 단백질이 결합하

여 activation 및 repression이 일어나는 구체적인 위치를 밝혀냈다(Fig. 1). 이러한 전사조절은 대장균의 arabinose 오페론에 작용하는 조절단백질 AraC의 작용양상과 흡사하였다[Hendrickson과 Schleif, 1985]. Guzman과 Beckwith[1995]는 *araBAD* 프로모터의 전사활성과 AraC 조절단백질에 의한 강력한 발현조절 능력을 대장균 발현 시스템의 제작에 활용하였다. 이들은 arabinose로 유도되는 arabinose 오페론의 *araBAD* 프로모터와 *araC* 유전자를 이용하여 arabinose의 존재 하에서 목적 유전자가 집중적으로 발현될 수 있게 하였다. 이렇게 정교한 조절을 받는 arabinose 유도성 프로모터와 조절유전자로 제작된 벡터는 미국의 Invitrogen사(Carlsbad, CA)에 의하여 pBAD expression system이라는 이름으로 상품화되어 현재 전 세계에서 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 우선 600 bp의 *xyIA* 프로모터를 pUC18에 삽입하여 xylose 존재 하에서 *xyIA* 프로모터에 의하여 발현되는 벡터 pXA600을 구축하고 *lacZ* 유전자를 연결하여 xylose 유도하에서 과발현되는 β -galactosidase의 활성을 확인하였다. 한편 pXA600에 조절유전자인 *xyIR*을 삽입하면 유전자 발현율을 더 높일 수 있다는 사실을 확인하였다. 또한 외래 유전자인 *S. thermocyaneoviolaceus*의 내열성 xylanase를 코딩하는 *xynA* 유전자를 실제로 구축된 pXA600 및 pXAR600에서 발현시켜 값싼 오단당인 xylose를 유도물질로 사용할 수 있는 발현 벡터를 개발 하였다.

초 록

xyIA 프로모터는 대장균의 xylose 대사에 관여하는 xylose 오페론 상의 중요한 프로모터이다. 이 프로모터는 xylose에 의해 강하게 조절을 받는다고 알려져 있다. 이러한 특징은 새로운 발현 벡터를 구축하는데 충분한 조건을 갖추고 있다고 생각된다. 본 연구에서는 이러한 xylose에 의해 유도 되는 발현벡터를 구축하기 위하여 600 bp의 *xyIA* 프로모터를 증폭하여 pUC18의 *AatII*와 *HindIII* 사이에 삽입하여 pXA600을 구축하였다. 또한 조절단백질인 XyIR의 영향을 조사하기 위하여 *xyIR* 유전자를 삽입하여 pXAR600을 구축하였다. 발현의 강도를 측정하기 위하여 3,048 bp의 *lacZ* 유전자를 *xyIA* 프로모터의 하류에 연결하여 pXA600-*lacZ*와 pXAR600-*lacZ*를 구축하고 대장균 JM109에 형질전환시켰다. 구축된 pXA600-*lacZ*와 pXAR600-*lacZ*는 LB 배지에서 배양하였을 때 xylose 유도하에서 각각 1,641 unit와 2,304 unit의 β -galactosidase 활성을 보였으며, DM 배지 상에서 배양했을 때 xylose 유도 시 각각 6,282 unit와 9,320 unit의 β -galactosidase 활성을 보였다. 또한 외래 유전자의 발현 가능성을 확인하기 위하여 *S. thermocyaneoviolaceus*의 내열성 xylanase를 코딩하는 *xynA* 유전자를 실제로 구축된 pXA600과 pXAR600에서 발현을 확인하여 pXA600 및 pXAR600이 새로운 xylose 유도성 발현벡터로서의 사용 가능성을 확인하였다.

Key words: 발현벡터, *xyIA* 유전자, *xyIA* 프로모터, xylose isomerase

감사의 글

이 논문은 2009년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K (1992) In *Short Protocol in Molecular Biology*, (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Bertani G and Weigle JJ (1953) Host controlled variation in bacterial viruses. *J Bacteriol* **65**, 113.
- Brosius J, Erfle M, and Storella J (1985) Spacing of the -10 and -35 regions in the *tac* promoter. Effect on its in vivo activity. *J Biol Chem* **260**, 3539-3541.
- Casadaban M, Chou J, and Cohen S (1980) In vitro gene fusions that join an enzymatically active β -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous protein; *Escherichia coli* plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *J Bacteriol* **143**, 971-980.
- Choi JH, Lee OS, Shin JH, Kwak YY, Kim YM, and Rhee IK (2006) Thermostable xylanase encoded by *xynA* of *Streptomyces thermocyanoeviolaceus*: Cloning, purification, characterization and production of xylooligosaccharides. *J Microbiol Biotechnol* **16**, 57-63.
- David JD and Wiesmeyer H (1970) Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Acta* **201**, 497-499.
- Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, Hendry P, Stamford NP, Lilley PE, and Dixon NE (1990) Modified bacteriophage lambda promoter for overproduction of proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **87**, 123-126.
- Gronenborn B (1976) Overproduction of phage lambda repressor under control of the *lac* promoter of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **148**, 243-250.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ, and Beckwith J (1995) Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose *pBAD* promoter. *J Bacteriol* **177**, 4121-4130.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hendrickson W and Schleif R (1985) A dimer of AraC protein contacts three adjacent major groove regions of the *ara I* site. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 3129-3133.
- Inoue H, Nojima H, and Okayama H (1991) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee OS (2000) Production of xylooligosaccharides with thermostable xylanase from the streptomyces thermocyanoeviolaceus. PhD Thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-428.
- Miller JH (1972) In *Experiments in Molecular Genetics*, (2nd ed.). pp. 125-129. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Roh DH (1996) Regulation of *xylR* gene in *Escherichia coli*. PhD Thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
- Sambrook J, Fritsch E, and Maniatis T (1989) In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Shin JH (2001) Mode of regulation of XylR protein in xylose operon of *Escherichia coli*. PhD Thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea.
- Sofia JH, Burland V, Daniels DL, Plunkett III G, and Blattner FR (1994) Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic acids Res* **22**, 2576-2586.
- Song S and Park C (1997) Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *J Bacteriol* **179**, 7025-7032.
- Studier FW and Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Stumpe S, Schmid R, Stephens DL, Georgiou G, and Bakker E (1998) Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 4002-4006.
- Wood WB (1966) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affected the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol* **16**, 118.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, and Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.