

Construction of Expression Vector for Functional Analysis of Target Protein in *Streptomyces* sp.

Yong-Jik Lee¹, Jae-Ki Ryu² and Hyun-Soo Kim^{3,†}

¹System & Synthetic Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University, Gyungbuk 740-704, Korea

³Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Streptomycetes are gram-positive filamentous bacteria that are well-known for producing a vast array of bioactive compounds, including more than 70 % of commercially important antibiotics. For the research about *Streptomyces* sp., the protoplast and electroporation transformation method have been the general techniques for the construction of transformants. However, these techniques have low efficiency and are time-consuming. Another option is intergenetic conjugation, which is used for DNA transfer using methylation-deficient *E. coli* as a DNA donor to avoid the methylated-DNA-dependent restriction systems of actinomycetes. This conjugation method has been widely improved and applied to many other actinomycetes. In this research, an effective transformation procedure for the construction of expression vector by using gateway system was established to avoid limit of restriction enzyme site for cloning of target gene based on transconjugation by *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 with a pSET152 integration vector.

Key Words: Streptomyces, Expression vector, Conjugal transfer

서 론

방선균 (Actinomycetes)이란 그램 양성균의 토양 세균으로 곰팡이와 유사한 형태의 포자와 균사체를 형성하는 형태분화능력을 지닌 미생물로서 기저균사, 기중균사, 분생포자, 포자 발아의 life cycle을 가지고 있다 (Chapter. 1993; Kieser et al., 2000). 방선균 중에서도 *Streptomyces*로 대표되는 방선균속 미생물들에 의해 현재 사용되는 항생물질의 약 70%를 생산해 내는 이차대사산물 생산능력으로 인하여 많은 연구자들의 관심을 받아 온 미생물로서 형태분화, 일차대사 및 이차대사산물 생산에 관한 조절 메카니즘에 관한 연구가 활발히 수행되고 있다 (Du et al., 2011; Park et al., 2011; Swiatek et al., 2012). 최근에 홍미

를 끌고 있는 방선균이 생산하는 생리활성물질로는 각종 효소저해제, 면역증강제, 제초제, 구충제 등이 있으며 (Demain et al., 1989; Hosoya et al., 2012; Hwang et al., 2005; Kim et al., 2011), 이들 몇몇의 물질들은 이미 산업화에 성공하여 의약 및 농업 분야에 응용되고 있다. 특히, 현대 사회에서 항생물질 내성균의 출현에 따른 새로운 이차대사산물의 필요성과 기존의 항생물질 생산성 향상이라는 목적이 방선균이라는 미생물을 활발히 연구하게 된 계기가 되었으나, 새로운 방선균을 분리한다거나 UV나 화학적 방법을 통한 변이주를 획득하는 등의 일반적인 탐색 방법들은 많은 시간과 노력, 투자를 필요로 하기 때문에 좋은 결과를 얻기에는 한계가 있는 실정이다. 따라서 최근에 분자레벨에서의 형질전환을 통한 방선균 연구가 이루어져 왔으며 방선균의 형질전환에는 주로 protoplast법과 eletroporation법 등이 사용되었다. 그러나 이들 방법들은 형질전환율이 높지 않거나 적용되는 방선균이 제한적이라는 단점이 있다. 최근에 이러한 문제를 극복하기 위해 *Escherichia coli*를 이용하여 plasmid DNA를 전달하는 접합전달법 (conjugal transfer)이 관심을 받기 시작하였다 (Choi et al., 2004; Kitani et al., 2000). 접합전달법은 *E. coli*

*Received: 6 October, 2011 / Revised: 23 March, 2012
Accepted: 25 March, 2012

^{1,2}They have equally contributed to this work.

†Corresponding author: Hyun Soo Kim. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.
Tel: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-6447
e-mail: hskim@kmu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

내에서 재조합 플라스미드의 구축 및 조작이 가능하며 구축되어진 플라스미드를 방선균으로 전달할 수 있어 유전자 클로닝, 유전자 파괴, 변이 유전자 회복 등에 폭 넓게 사용될 수 있다. 일반적으로 발현 벡터를 제조하기 위해서는 발현시키하고자 하는 목적 유전자와 제한 효소를 이용하여 cloning하는 방법이 사용되어 지는데, 이러한 방법은 사용하고자 하는 제한 효소 인식 부위가 목적 유전자에 존재하거나 또한 벡터에 사용하고자 하는 제한 효소 사이트의 부족으로 인하여 발현 벡터의 구축에 어려움이 따르기도 한다. 본 연구에서는 이러한 제한 효소 인식 부위에 따른 발현 벡터 구축의 어려움을 해결하고자 Gateway system (Invitrogen)을 이용한 방선균에서 사용할 수 있는 발현 벡터 구축 시스템을 확립하고자 한다. 이를 위하여 희소방선균인 *Saccharopolyspora erythrae*의 *seaR* 유전자를 사용하여 발현 벡터 시스템을 확립하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 Plasmids

발현 벡터 시스템 확립을 위하여 사용된 목적 유전자인 *seaR* gene은 *Saccharopolyspora erythrae* IFO 13426의 chromosomal DNA로부터 증폭하여 사용하였다. Entry 벡터는 목적 유전자인 *seaR* gene의 cloning을 위하여 Invitrogen 사의 pENTR/D-TOPO Cloning kit를 사용하였다. Destination 벡터의 제조에는 Choi 등 (Choi et al., 2004)에 의해 목적 유전자의 constitutive expression을 위한 erythromycin promoter가 삽입되어 있는 pSET152 (Bierman et al., 1992) 유래의 벡터를 기본 벡터로 사용하였으며 entry 벡터와 recombination이 일어날 수 있도록 Reading frame cassette RfC.1 (Invitrogen)를 삽입하였다. 최종적으로 entry 벡터와 destination 벡터의 recombination을 통한 *seaR* expression vector 제조를 위하여 gateway LR clonase enzyme mixture (Invitrogen)가 사용되었다. Entry 벡터의 형질전환용 competent cell은 Mach1-T1 cell (One Shot Mach1-T1 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen)을 사용하였고, destination vector 및 expression vector의 형질전환 및 대량 회수를 위해서는 일반적인 competent cell인 *E. coli* DH5α를 사용하였다.

배지 및 배양조건

Saccharopolyspora erythrae IFO 13426의 chromosomal DNA를 추출하기 위하여 Tryptic Soy Broth (TSB, BD

science)를 사용하여 28°C에서 140 rpm으로 진탕 배양하였다. *E. coli*의 일반 배양 및 형질전환에는 Luria-Bertani broth (LB) 배지를 사용하였으며 entry 벡터의 형질전환균의 배양시에는 50 µg/ml의 농도로 ampicillin, destination 벡터의 형질전환균의 배양시에는 50 µg/ml의 농도로 apramycin을 선택 항생물질로써 첨가하여 37°C에서 120 rpm으로 각각 진탕 배양하였다.

DNA 조작 및 분리

방선균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood법 (Kieser et al., 2000)에 따라 실행하였고, *E. coli* DH5α competent cell은 Hanahan법 (Sambrook et al., 1989)으로 제작하였다. Plasmid DNA의 분리는 FlexiPrep kit (GE life science) 및 alkaline-SDS 추출법 (Sambrook et al., 1989)을 사용하였으며, 모든 제한 효소, 수식 효소 및 DNA marker는 Takara 사 제품을 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

발현 벡터 확립에 사용된 *Saccharopolyspora erythrae*의 *seaR* 유전자는 NCBI의 nucleotide sequence database의 GenBank accession number AB188088를 토대로 entry vector에 특이적인 primers (Table 1)를 제작하여 PCR 방법으로 증폭하였다. PCR은 Applied Biosystems 사의 GeneAmp PCR System 2400을 사용하였으며 PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara)를 사용하여 수행하였으며 PCR 반응을 위한 조성 및 조건은 Table 2에 나타내었다.

PCR 산물의 염기배열 결정 및 해석

목적 유전자인 *seaR* gene을 entry 벡터에 cloning한 후 목적 유전자에 mutation 삽입유무를 확인하기 위하여 형질전환균을 50 µg/ml의 농도로 ampicillin이 첨가된 3 ml LB 액체배지를 사용하여 배양 후 plasmid를 분리하여 sequencing 분석을 수행하였다. Sequencing은 DNA sequencer (MegaBASE500, Amersham Biosciences)를 이용하거나 SolGent 사에 의뢰하였고, sequence 분석과 homology 비교는 GENETYX-WIN (version. 3.2, Software Development)과 NCBI BLAST database를 이용하였다.

결 과

PCR을 통한 목적 유전자의 회수

Saccharopolyspora erythrae IFO 13426의 chromosomal

Table 1. Design of PCR primers

Sequences 5' → 3'	
SeaR-F	CACCCGGAGTCGCCGGAGCCGCGTGATGCC
SeaR-R	TCAGCGGGGCGTTCGTCGGGCGGCTGGAG

Table 2. Composition and condition for PrimeSTAR HS DNA polymerase

PCR composition		PCR condition	
Template (100 ng/μl)	1 μl	98°C	5 min
SeaR1-F (10 pmol/μl)	1 μl	98°C	10 sec
SeaR1-R (10 pmol/μl)	1 μl	55°C	5 sec
dNTP (2.5 mM)	4 μl	72°C	1 min
5 × PrimeSTAR Buffer	10 μl	72°C	7 min
PrimeSTAR HS		4°C	∞
DNA Polymerase (2.5 U/μl)	0.5 μl		
dH ₂ O	32.5 μl		
Total	50 μl		

DNA를 추출하여 PCR 반응을 위한 template로 사용하였다. 발현 벡터 확립에 사용된 목적 유전자인 *seaR* gene을 증폭하기 위하여 *seaR* gene과 특이적으로 결합하도록 제작된 primers (Table 1)을 이용하여 PCR (Table 2)을 수행하고 1% agarose gel에 전기영동 후 615 bp의 목적 DNA 단편 (Fig. 1)을 회수하였다.

Entry 벡터의 제조

Entry 벡터 제조를 위하여 Invitrogen사의 pENTR/D-TOPO Cloning kit를 매뉴얼에 따라 사용하였다. PCR로 증폭 후 회수된 *seaR* gene 단편은 pENTR/D-TOPO 벡터에 특이적으로 삽입될 수 있도록 5'쪽에 CACC 염기를 포함하고 있기에 pENTR/D-TOPO cloning kit에 포함되어 있는 ligation 효소에 의하여 pENTR/D-TOPO 벡터에 특이적으로 삽입이 된다. *seaR* gene이 삽입된 형질전환균으로부터 plasmid를 분리하여 삽입된 *seaR* 유전자의 염기 배열을 해석한 결과, PCR에 의한 nucleotide mutation이 존재하지 않는 것을 확인하였으며 최종적으로 목적 유전자인 *seaR*이 삽입된 3.2 kb의 entry 벡터를 제조하였다 (Fig. 2).

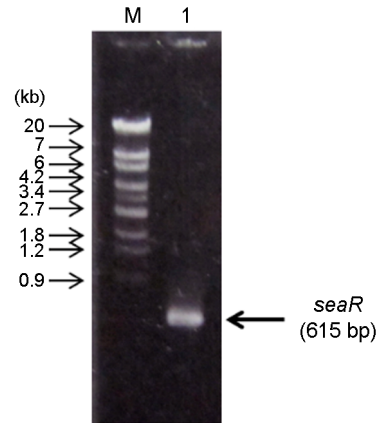


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplified PCR products from isolated *Saccharopolyspora erythraea* genome DNA. M, λ -EcoT14 digest marker; 1, amplified *seaR* gene.

Destination 벡터의 제조

Destination 벡터는 pSET152 (Bierman et al., 1992) 유래의 벡터로 방선균에서 유전자의 대량 발현에 보편적으로 이용되는 *Saccharopolyspora erythraea* 유래의 promoter 유전자 (*ermEp*^{*}) (Kieser et al., 2000)가 삽입되어 있는 벡터로써 entry 벡터에 cloning된 *seaR* gene의 상하류에 존재하는 *attL* site와 recombination이 일어날 수 있는 *attR* site를 가지고 있는 reading frame cassette RfC.1 (Invitogen)을 제한 효소 *XbaI* 및 탈인산화 반응을 거친 promoter 유전자 (*ermEp*^{*})가 삽입되어 있는 pSET152의 cloning site에 ligation을 통하여 삽입하여 제조하였다 (Fig. 2).

최종 *seaR* 발현 벡터의 구축

Entry 벡터에 삽입된 유전자의 상, 하류에 존재하는 *attL* site와 destination 벡터에 삽입되어 있는 reading frame cassette에 존재하는 *attR* site와의 recombination, 즉 LR reaction을 위하여 gateway LR clonase enzyme mixture (Invitrogen)가 사용되었으며 최종적으로 *seaR* 발현 벡터가 제조되었다 (Fig. 2). 구축된 발현 벡터를 접합전달용 공여균주로 사용할 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 형질전환하였다. 형질전환된 균으로부터 plasmid를 분리하여 전기영동한 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 4.4 kb 정도로 나타났고, 분리된 plasmid DNA를 *seaR* 단편 및 destination 벡터에 하나씩의 제한 효소 사이트가 존재하는 *ClaI*으로 처리한 결과 1.1 kb 및 5.5 kb의 2개의 단편이 확인되었으며 (Fig. 3B), 제조된 *seaR* expression vector를 pEV615라고 명명하였다. 제조된 pEV615는 *oriT*, *attP*, *ermEp*^{*}과 *seaR*

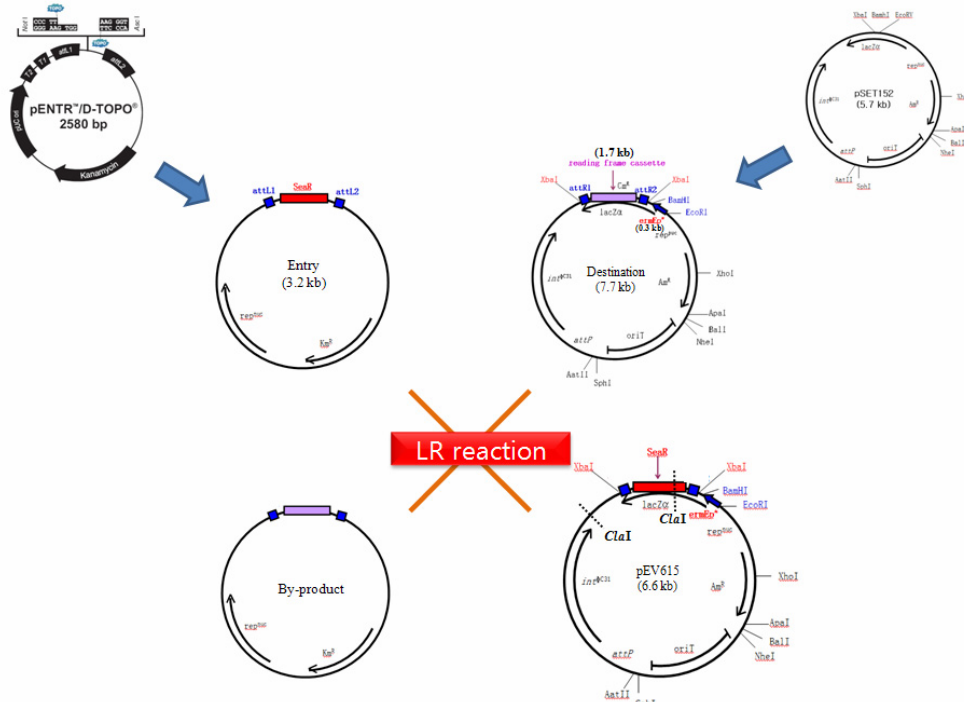


Fig. 2. Construction of expression vector (pEV615) for *seaR* gene expression. Facilitates recombination of an *attL* substrate (entry vector) with an *attR* substrate (destination vector) to create an *attB*-containing expression clone. This reaction is catalyzed by LR Clonase mix.

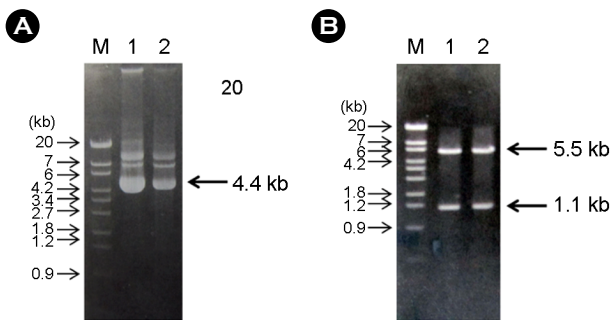


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of pEV615. (A) Plasmid was isolated from transformant (ET12567/pUZ8002). M, λ -EcoT14I digest marker; 1, 2, pEV615. (B) pEV615 was digested with *ClaI*. M, λ -EcoT14I digest marker; 1, 2, pEV615 digested by *ClaI*.

gene 단편을 가지고 있는 방선균용 발현 벡터이다.

고 찰

토양 미생물인 방선균은 원핵 생물임에도 불구하고 기저균사, 기중균사, 분생포자, 포자 발아의 복잡한 형태분화를 나타내므로 원핵 생물 중에서도 가장 진화한 미생물이라 생각되어지며, 형태분화 메카니즘의 해명이라고

하는 기초 생물학적 측면에서 아주 흥미로운 미생물이다. 또한 방선균은 항생물질, 효소, 효소저해제, 색소 등 다종 다양한 유용산물을 생산하는 미생물로서 산업적으로 중요한 위치를 차지하고 있다. 그러나 강력한 제한계의 존재에 따른 외래 유전자 도입의 어려움 및 형질전환 시스템의 부재로 인해 분자생물학적인 연구에 어려움이 있었다 (Baltz, 1993; MacNeil, 1988). 최근 방선균 연구에 있어서 *E. coli*를 이용한 접합전달이 Mazodier 등 (1989)에 의해 처음으로 보고된 이후 방선균에 존재하는 메틸화된 DNA의 제한계를 극복하기 위해 DNA의 공여균주 (donor)로 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Bierman et al., 1992)을 사용함으로써 보다 다양한 속 (genus)의 방선균에 적용할 수 있게 되었다 (Matsushima and Baltz, 1996; Stegmann et al., 2001; Voeykova et al., 1998). 그리고 현재 사용되고 있는 접합전달을 위한 벡터들 가운데 방선균의 염색체에 존재하는 *attB* site로 integration 되는 bacteriophage ϕ C31 유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*) 기능을 가진 벡터들이 가장 유용한 것으로 알려져 있다 (Kieser et al., 2000). 이러한 벡터들은 접합전달을 통해 *E. coli*로부터 방선균으로 전달되고 전달된 벡터의 *attP* site는 integrase에 의해 방선균 염색체의 *attB*

site로 삽입되게 된다 (Combes et al., 2002; Kieser et al., 2000). 방선균용 pSET152 벡터는 *attP* site를 보유하고 있어 숙주 방선균의 염색체 상에 존재하는 *attB* site에 integration에 의해 목적 유전자들을 염색체 상에 도입할 수 있으며 효율적인 형질전환체의 선별을 위한 apramycin 약제내성 유전자를 보유하고 있기 때문에 형질전환체의 선별이 용이한 특징이 있으며 현재까지 *Streptomyces* 속 및 희소 방선균이 생산하는 이차대사산물의 생산량 증가 및 외래 유전자의 기능 연구에 많이 사용되고 있다 (Paudel et al., 2011; Jnawali et al., 2011; Jeon et al., 2011). 하지만 본 연구에서 발현 벡터로 사용된 pSET152의 경우 cloning할 유전자의 지속적인 발현을 위하여 *ermEp** (erythromycin promoter)가 삽입됨으로 인하여 목적 유전자의 cloning을 위한 제한 효소 사이트가 *Bam*HI과 *Xba*I만 존재하므로 만약 cloning 하고자 하는 목적 유전자 염기 서열 중에 *Bam*HI과 *Xba*I의 제한 효소 사이트가 존재하게 된다면 cloning을 할 수 없게 되는 어려움이 있었다. 따라서 본 연구를 통하여 목적 유전자의 cloning을 통한 발현 벡터 구축에 있어서 PCR을 통한 목적 유전자의 증폭 및 회수 후 entry 벡터 제조를 통하여 제한 효소 사이트의 한계를 극복하게 되었다. 이와 함께 제조된 entry 벡터와 *ermEp** (erythromycin promoter)가 삽입되어 있는 pSET152 벡터를 기반으로 새롭게 구축되어진 destination 벡터를 사용하여 LR reaction을 통한 최종 발현 벡터 구축에도 제한 효소를 사용하지 않기 때문에 어떠한 유전자도 쉽고 빠르게 발현 벡터를 구축할 수 있게 되었다. 또한 본 연구에서 구축된 *seaR* 발현 벡터를 사용하여 *Streptomyces* 속 방선균에 형질전환시켜 형질전환된 방선균의 형태변화 관찰을 통하여 형질전환에 사용된 Non-*Streptomyces* sp. 유래의 *SeaR* 단백질의 기능에 관한 연구를 수행할 예정이다.

REFERENCES

- Baltz RH. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. Trends Microbiol. 1998. 6: 76-82.
- Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. Gene. 1992. 116: 43-49.
- Chater KF. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. Annu Rev Microbiol. 1993. 47: 685-713.
- Choi SU, Lee CK, Hwang YI, Kinishita H, Nihira T. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer. Arch Microbiol. 2004. 181: 294-298.
- Combes P, Till R, Bee S, Margaret C, Smith M. The *Streptomyces* Genome Contains Multiple Pseudo-*attB* Sites for the ϕ C31-Encoded Site-Specific Recombination System. J Bacteriol. 2002. 184: 5746-5752.
- Demain AL, Somkuti GA, Hunter-Cevera JC, Rossmore HW. Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture. Elsevier Science Ltd. 1989. New York, USA.
- Du YL, Shen XL, Yu P, Bai LQ, Li YQ. Gamma-butyrolactone regulatory system of *Streptomyces chattanoogensis* links nutrient utilization, metabolism, and development. Appl Environ Microbiol. 2011. 77: 8415-8426.
- Hosoya T, Hirokawa T, Takagi M, Shin-Ya K. Trichostatin Analogues JBIR-109, JBIR-110, and JBIR-111 from the Marine Sponge-Derived *Streptomyces* sp. RM72. J Nat Prod. 2012. 75: 285-289.
- Hwang JH, Lee CK, Lee KM, Jo BK, Park HR, Hwang YI. Development of a Recombinant *Streptomyces griseus* with *sprA* and *sprB* Genes for Proteolytic Enzyme Production. Kor J Microbio. 2005. 41: 87-92.
- Jeon HG, Lee MJ, Kim HB, Han KB, Kim ES. Gene Transfer Optimization via *E. coli*-driven Conjugation in Nocardioopsis Strain Isolated via Genome Screening. Korean J Microbiol Biotechnol. 2011. 39: 104-110.
- Jnawali HN, Yoo JC, Sohng JK. Improvement of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus* by genetic manipulation of structural biosynthesis genes. Biotechnol Lett. 2011. 33:1221-1226.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. Practical *Streptomyces* Genetics. 2000. The John Innes Foundation. Norwich, UK.
- Kim DY, Hwang YI, Choi SU. Cloning of *metK* from *Actinoplanes teichomyceticus* ATCC31121 and effect of its high expression on antibiotic production. J Microbiol Biotechnol. 2011. 21: 1294-1298.
- Kitani S, Bibb MJ, Nihira T, Yamada Y. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. J Microbiol Biotechnol. 2000. 10: 535-538.
- MacNeil DJ. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. J Bacteriol. 1988. 170: 5607-5612.
- Matsushima P, Baltz RH. A gene cloning system for *Streptomyces toyocaensis*. Microbiology 1996. 142: 261-267.

- Mazodier P, Petter R, Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J Bacteriol.* 1989. 171: 3583-3585.
- Park JW, Park SR, Nepal KK, Han AR, Ban YH, Yoo YJ, Kim EJ, Kim EM, Kim D, Sohng JK, Yoon YJ. Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation. *Nat Chem Biol.* 2011. 7: 843-852.
- Paudel S, Lee HC, Kim BS, Sohng JK. Enhancement of pradimicin production in *Actinomadura hibisca* P157-2 by metabolic engineering. *Microbiol Res.* 2011. 167: 32-39.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (ed.) 2, 1989. Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor, New York, USA.
- Stegmann E, Pelzer S, Wilken K, Wohlleben W. Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer. *J Biotechnol.* 2001. 92: 195-204.
- Swiatek MA, Tenconi E, Rigali S, van Wezel GP. Functional Analysis of the N-Acetylglucosamine Metabolic Genes of *Streptomyces coelicolor* and Role in Control of Development and Antibiotic Production. *J Bacteriol.* 2012. 194: 1136-1144.
- Voeykova T, Emelyanova L, Tabakov V, Mkrtumyan N. Transfer of plasmid pTO1 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. *FEMS Microbiol Lett.* 1998. 162: 47-52.
-