

Development of New Vector Systems as Genetic Tools Applicable to Mycobacteria

Ji-A Jeong¹, Ha-Na Lee¹, In-Jeong Ko² and Jeong-Il Oh^{1*}

¹Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Korea Science Academy of KAIST, Busan 614-822, Korea

Received January 23, 2013 / Revised February 15, 2013 / Accepted February 15, 2013

The genus *Mycobacterium* includes crucial animal and human pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, and *Mycobacterium bovis*. Although it is important to understand the genetic basis for their virulence and persistence in host, genetic analysis in mycobacteria was hampered by a lack of sufficient genetic tools. Therefore, many functional vectors as molecular genetic tools have been designed for understanding mycobacterial biology, and the application of these tools to mycobacteria has accelerated the study of mechanisms involved in virulence and gene expression. To overcome the pre-existing problems in genetic manipulation of mycobacteria, this paper reports new vector systems as effective genetic tools in *Mycobacterium smegmatis*. Three vectors were developed; pKOTs is a suicide vector for mutagenesis containing a temperature-sensitive replication origin (TSRO) and the *sacB* gene encoding levansucrase as a counterselectable marker. pMV306lacZ is an integrative *lacZ* transcriptional fusion vector that can be inserted into chromosomal DNA by site-specific recombination. pTnMod-OKmTs is a minitransposon vector harboring the TSRO that can be used in random mutagenesis. It was demonstrated in this study that these vectors effectively worked in *M. smegmatis*. The vector systems reported here are expected to successfully applicable to future research of mycobacterial molecular genetics.

Key words : Integration vector, minitransposon, mutagenesis, mycobacteria, temperature-sensitive replication origin

서 론

Mycobacterium 속(genus)은 동물과 인간에 병원성을 나타내는 다수의 종을 포함하고 있어 의학적으로 중요한 의미를 지닌다. 대표적인 인체 병원균인 *Mycobacterium tuberculosis*는 결핵을 일으키는 종으로, 전 세계 약 3분의 1 정도의 인구수가 이 병원균에 감염되어 있다고 추정되고 있다[11]. 따라서 *Mycobacterium* 속에 대한 병인학적 연구와 세균 중 자체에 대한 기초과학적 연구의 필요성이 대두되어왔으며, 현재까지도 여전히 중요하게 거론되고 있다. 이러한 연구의 필요성은 *Mycobacterium* 속에 대한 분자생물학적 연구 기법과 유전학적 연구 수단에 대한 다양화를 촉진하였으며, 그 결과 지난 십수년 간 많은 발전이 있었다. 그러나 실험 수행 시, 이들의 느린 세대기간(generation time 혹은 doubling time)으로 인한 큰 시간적 소모와 세포벽의 높은 지질함량으로 인한 낮은 형

질전환 효율 등의 여러 가지 실험상 문제가 야기되었다. 따라서 mycobacteria는 다른 세균 중에 적용되는 일반적 실험기법 보다는 이들 특성에 맞게 고안된 실험기법과 수단이 필요하다. 세균의 생리학적 특성을 밝히는데 있어 mutagenesis는 가장 유용한 실험 기법으로 활용된다. Mycobacteria에서도 역시 생리학적 특성과 병원성 기작을 연구하는데 있어서 효과적인 mutagenesis 방법이 요구된다. 유전자의 knockout이나 교체는 suicide vector를 사용하는 방법[14, 31], mycobacteriophage에 의해 매개되는 방법[3], incompatible plasmid를 이용하는 방법[27] 등으로 수행된다. 최근, 여러 연구에서 homologous recombination 기반의 유전자 교환을 통해 *M. tuberculosis*와 *Mycobacterium bovis* BCG의 돌연변이를 제작한 사례가 보고되었다[1, 2]. Mycobacteria의 돌연변이 제작과정 중에서도 특히, 낮은 homologous recombination 확률과 형질전환율을 극복하는 것이 가장 중요한 쟁점으로 대두되었으며[9, 21], 이를 극복하기 위한 방법의 일환으로 temperature-sensitive replication origin (TSRO)과 *Bacillus subtilis*의 *sacB* 유전자를 가진 vector를 이용하여 돌연변이를 구축하는 방법이 제시되었다[29]. 이 체계는 두 단계로 이루어지는데, 온도 조건에 따라 vector의 복제여부를 조절함으로써 DNA의 세균 내로의 도입을 증가시켜 유전자 교환이 일어날 확률을 증가시키고, mycobacteria에서 sucrose 존재 시 독성을 나타내는 *sacB* 유전

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2593, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : joh@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

자 산물을 counterselectable marker로 사용하여 double-crossover의 결과로 형성된 돌연변이 균주에 대한 후보군을 쉽게 선별하도록 하였다[10, 30]. 따라서 본 연구에서는 기존의 suicide vector로 알려진 pKO vector [34]에 TSRO를 삽입함으로써 온도 조건에 따라 vector의 복제가 조절이 가능한 pKOTs를 구축하였다.

Mycobacteriophage L5는 mycobacteria에 감염하는 lyso-genic phage로 *Mycobacterium smegmatis*의 chromosomal DNA의 *attB* (bacterial attachment site)에 single-copy로 삽입된다[20, 35]. L5가 가지는 integrase는 *attP* (phage attachment site)와 *attB* 사이의 site-specific recombination을 촉매하며, 그 결과로써 phage DNA의 삽입이 일어나게 된다. 이러한 삽입 과정은 integrase와 *attP* site 이외의 다른 phage 유전자들이 존재하지 않아도 충분히 유도된다는 것이 이미 알려져 있으며 [20], 숙주가 가지는 host-factor인 mIHF (mycobacterial IHF)에 의해 조절된다[19, 20, 28]. Mycobacteriophage DNA를 *Escherichia coli* cosmid로 삽입한 recombinant shuttle vector의 경우 *E. coli*에서는 plasmid로서 복제되지만 mycobacteria에서는 phage로서 기능을 하여 chromosomal DNA로 삽입된다고 보고되어 있다[16, 35]. 이러한 원리로 L5의 *attP* site와 integrase 유전자를 포함하는 vector들은 *M. smegmatis*와 *M. tuberculosis* 등의 chromosomal DNA로 삽입된다. Promoter가 존재하지 않는 reporter 유전자들은 transcriptional fusion을 통하여 세균들의 유전자 발현 조절 연구에 이용되어 왔고, *cat*, *gfp*, *lacZ*, *FFlux*, *phoA*, *xyIE* 등은 mycobacteria에서 작용한다고 알려진 reporter 유전자들이다[32]. 본 연구에서는 이러한 reporter 유전자 중 *lacZ* 유전자를 L5의 integrase와 *attP* site를 가지는 삽입 vector인 pMV306에 cloning하여 pMV306lacZ vector를 구축하였다. 이를 이용해 조사하고자 하는 유전자를 *lacZ* 유전자와 transcriptional fusion시켜 이를 chromosomal DNA로 삽입시키는 과정을 통해 쉽게 유전자 발현 조절의 조사가 이루어질 수 있도록 하였다.

Transposon은 mycobacteria를 포함하여, 세균의 유전학적 분석을 위한 수단으로 이용되고 있다[6, 10, 24, 29]. 현재까지 다양한 세균에 대한 연구에 적용시킬 수 있는 transposon이 많이 알려져 있다. 그러나 대부분의 transposon은 자체의 크기가 매우 크고, 이들이 가지고 있는 항생제 내성 유전자는 특정 균에는 적용되지 않는 경우도 있으며, 많은 transposon이 숙주의 chromosomal DNA 상으로 임의적 transposition을 하지 않고 특정 DNA 서열로의 transposition하는 등의 실험 효율상의 문제가 발생한다[6]. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 다양한 minitransposon이 개발되어 왔다[5]. Transposon이란, 스스로의 위치를 다른 DNA로 옮길 수 있는 DNA 서열 단위를 의미하며, 양쪽 끝에 역반복 서열(inverted repeat)을 가지고 있고, 일반적으로 transposon 자체가 transposition을 촉매 하는 효소인 trasposase를 암호화하고 있다. Transposase가

transposon 영역을 정의하고 있는 두 개의 역반복 서열 사이에 존재하지 않도록 DNA 서열 상에서 재조합 된 것을 minitransposon이라고 한다[5]. 이러한 배열로 인해 minitransposon이 숙주의 chromosomal DNA로 transposition할 때 transposase가 함께 이동하지 않게 되므로 다른 DNA 영역으로의 2차 transposition이 일어날 가능성은 배제된다. 따라서 transposase가 없는 transposon이 안정적으로 transposition된 상태를 유지하게 한다. 또한 이렇게 *in vitro*에서 합성된 minitransposon은 transposon 내부에 항생제 내성 유전자 등과 같은 selectable marker를 연구 방향에 맞게 다른 종류의 marker로 교체할 수 있다는 장점을 가진다[5, 6]. 본 연구에서 사용된 minitransposon은 대장균에서 기능을 하는 복제시작점을 가진다. Chromosomal DNA로 transposition이 일어난 chromosomal DNA를 분리하여, 제한효소를 처리하고 self-ligation을 시켜 이를 *E. coli*로 도입하면, 세포 내에서 plasmid형태로 복제될 수 있도록 구성되어 있다. 이 점은 transposon이 삽입된 유전자를 발굴하기 위한 빠른 cloning 작업을 가능하게 하므로 여러 측면에서 다양한 활용이 가능하다[7]. Tn5에 기초를 두어 구축된 pTnMod-OKm은 Gram-negative 세균에서의 효율적인 유전적 분석을 위한 self-cloning minitransposon vector이다[6]. pTnMod-OKm은 Tn5에서 유래한 내부 역반복 서열과 외부 역반복 서열, pUC19 vector에서 유래한 pUC ori (pMB1 narrow-host-range 복제시작점), 그리고 kanamycin 내성 유전자인 kanamycin 3'-phosphotransferase (aminoglucoside phosphotransferase)를 암호화하고 있는 유전자로 이루어져 있다. 그리고 transposon 바깥쪽에, Gram-negative 세균에서의 DNA transfer에 이용되는 RP4 transfer 시작점과 Tn5 transposase를 암호화하고 있는 유전자를 포함하고 있다(Fig. 5). Tn5 transposase는 숙주와 목적 DNA 서열에 대한 낮은 특이성을 가진다. 또한 이 vector는 cloning에 이용될 수 있는 비교적 드물게 존재하는 제한효소자리를 가지고 있는데 GC함량이 높거나 낮은 DNA 서열 각각을 모두 인지하는 제한효소들의 인식부위이므로 숙주 genome의 GC함량으로 비롯되는 실험적 한계를 고려하지 않아도 된다는 장점을 가지고 있다[6]. pTnMod-OKm이 Gram-negative 세균 연구를 위해 고안된 vector이나, 위에서 기술한 특성들은 이 vector 체계를 Gram-positive한 성격을 가지고 있으면서도 높은 genome의 GC 함량을 보이는 *Mycobacterium* 속에 적용시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있기 때문에 이를 mycobacteria에 적용할 새로운 minitransposon vector 개발의 기반으로 이용하였다. 여기에 형질전환의 효율이 높지 않은 mycobacteria에서의 random mutagenesis의 효율을 높이고자 TSRO인 pAL500Ts를 cloning하여 pTnMod-OKmTs를 구축하였다. 상기된 vector들의 사용은 mycobacteria에서의 효율적인 돌연변이 구축과 유전자 연구 기반을 제시할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

사용된 균주, plasmid, 균주의 생장조건, 그리고 균주의 형질전환

본 연구에서 사용된 균주와 plasmid에 대한 정보는 Table 1에 표기하였다. *E. coli* 균주들은 37°C에서 Luria-Bertani (LB) 배지를 이용하여 배양하였고, 선별이 필요한 경우에는 항생제인 ampicillin을 100 µg/ml, kanamycin을 50 µg/ml, 그리고 hygromycin을 200 µg/ml의 농도로 처리하였다. *M. smegmatis* 균주들의 경우에는 7H9 액체배지(Difco, MD, USA)에 0.2% (w/v) glucose와 0.02% (v/v) Tween 80을, 고체배지에 0.2% (w/v) glucose를 첨가하고, 이를 이용하여 37°C에서 배양하였으며, TSRO가 존재하는 vector를 이용하는 실험과정에 있어 필요한 온도조건은 해당 실험과정에 대한 설명과 함께 상세 기술하였다. 선별이 필요한 경우에는 kanamycin을 30 µg/ml, hygromycin을 50 µg/ml의 농도로 처리하여 배양하였다. *E. coli* 균주의 형질전환과정과 *M. smegmatis* 균주의 형질전환과정은 각각 그 과정들이 기술되어 있는 서적을 참고하였다[25, 33].

pKOTs를 이용한 돌연변이 제조 및 선별

돌연변이 제조를 위해 *M. smegmatis* chromosomal DNA를 주형으로 MSMEG_2660_F (5'-AACGGGATCCGACCAGAC CTGGTCGGCG-3')와 MSEM2660_del_R (5'-TCCTCGGT GTCGCGGGCGGCTATGCGTGCATCGTCGTGCA-3')을

primer로 사용하여 MSMEG_2660의 start codon을 중심으로 445 bp의 DNA 단편을, MSMEG_2660_R (5'-AACGAAGCTT CCAAGCCCACGCTGACGA-3')과 MSEM2660_del_F (5'-TGCACGACGATGCACGCATAGCCGCCGCGACACCG AGGA-3')를 primer로 사용하여 MSMEG_2660의 stop codon을 중심으로 435 bp의 DNA 단편을 얻었다. 20 bp가 겹치도록 MSMEG_2660_del_F와 MSMEG_2660_del_R primer를 고안하였기 때문에 이 두 단편은 40 bp가 겹치게 된다. 두 단편을 주형으로 MSMEG_2660_F와 MSMEG_2660_R을 primer로 사용하여 270 bp가 결실(deletion)된 MSMEG_2660을 얻었다. 이렇게 결실된 MSMEG_2660을 포함하는 840 bp의 DNA를 HindII로 절단하여, HindII와 EcdRV로 자른 pKOTs suicide vector에 cloning하였다(pKOTsΔMS2660). *M. smegmatis*를 pKOTsΔMS2660으로 형질전환 시킨 후 hygromycin을 50 µg/ml로 가지는 7H9 고체배지에 도말하여 30°C에서 4일간 배양하였다. 성장한 colony를 다시 삼분도말(streaking)한 후 형성된 colony를 hygromycin이 50 µg/ml의 농도로 포함된 7H9 액체배지에 접종하여 30°C에서 2일간 완전히 배양한 다음, 배양액을 10배 희석하여 30 µl를 항생제가 들어있는 7H9 고체배지에 도말하여 42°C에서 3일간 배양하였다. 성장한 colony를 다시 삼분도말한 후 형성된 colony를 항생제가 없는 7H9 액체배지 20 ml에 접종한 다음 42°C에서 배양하였다. 4일동안 배양한 후 배양액 10 µl를 10% (w/v) sucrose가 첨가된 7H9 고체배지에 도말하여 37°C에서 3일간 배양하였다. 성장한 colony를 다시 삼분도말한 후 형성된 colony 일부를 항생제가 들어있는

Table 1. The bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Genotype or description	References/Sources
Strains		
<i>M. smegmatis</i>		
mc ² 155	High-transformation-efficiency mutant of <i>M. smegmatis</i> ATCC 607	[36]
ΔMSMEG_2660	MSMEG_2660 deletion mutant derived from <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	This study
<i>E. coli</i>		
DH5α	(φ80d <i>lacZ</i> ΔM15)Δ <i>lacU169 recA1 endA1 hsdR17 supE44thi1 gyrA96 relA1</i>	[17]
Plasmids		
pKO	Hyg ^r ; <i>sacB</i> , suicide vector	[34]
pDE	Cm ^r ; pUC ori, pAL500Ts; temperature-sensitive mycobacterial replication origin	Unpublished
pKOTs	Hyg ^r ; pKO-based vector constructed by inserting <i>HindIII-KpnI</i> fragment containing pAL500Ts and pUC ori derived from pDE	This study
pKOTsΔMS2660	pKOTs::0.83-kb <i>BanHI-HindIII</i> fragment containing ΔMSMEG_2660	This study
pNC	Hyg ^r ; Promoterless <i>lacZ</i>	[23]
pMV306	Km ^r ; Integrative vector containing <i>int</i> and <i>attP</i> site of mycobacteriophage L5 for integration into the mycobacterial genome	[4, 18, 37]
pMV306lacZ	Km ^r ; pMV306::3.17-kb <i>NotI-XbaI</i> fragment containing promoterless <i>lacZ</i> derived from pNC	This study
pADLACZ	pNC::0.51-kb <i>XbaI-ClaI</i> fragment containing the <i>ald</i> promoter region	Unpublished
pMV306lacZald	pMV306lacZ::0.51-kb <i>EccRI-HindIII</i> fragment containing the <i>ald</i> promoter region	This study
pTnMod-OKm	Km ^r ; minitransposon vector based on Tn5; pUC ori; RP4 transfer origin; Tn5 transposase	[6]
pTnMod-OKmTs	pTnMod-OKm-based vector constructed by replacing RP4 origin with pAL500Ts	This study

7H9 고체배지와 항생제가 들어 있지 않은 7H9 고체배지에 각각 삼분도말하여 37°C에서 배양하였다. 항생제가 들어있지 않은 배지에서 성장하고 항생제가 들어있는 배지에서는 성장하지 못한 colony를 돌연변이 후보군으로 선정하여, 돌연변이 후보군을 각각 20 ml 7H9 액체배지에서 3일간 배양한 다음 chromosomal DNA를 추출하여 MSMEG_2660_F와 MSMEG_2660_R의 primer를 이용하여 PCR로 돌연변이를 확인하였다.

β -galactosidase 활성 측정

β -galactosidase 활성은 Miller (1972)에 의해 보고된 방법을 토대로 수행되었다[22].

pTnMod-OKmTs를 이용한 *M. smegmatis*에서의 mini-transposon에 의한 random mutagenesis

구축된 pTnMod-OKmTs를 이용하여 *M. smegmatis* 균주를 형질전환 시킨 후, pTnMod-OKmTs vector의 선별을 위한 30 μ g/ml 농도의 kanamycin이 포함된 7H9 고체배지에 도말하여 colony가 형성될 때까지 5~6일 정도 30°C에서 배양하였다. 생성된 colony를 30°C에서 삼분도말을 통해 단일 클론(clone)을 얻은 다음, 이를 100 ml 플라스크에 준비된 20 ml 7H9 액체배지에 kanamycin을 첨가하여 이에 접종하고 30°C에서 배양하였다. OD₆₀₀값이 0.5일 때, 배양액을 10¹으로 시작하여 10⁵에서 10⁶정도의 희석 배수까지 연속희석법으로 희석하고, 이를 100 μ l씩 7H9 액체배지에 kanamycin이 첨가된 고체배지 2개에 각각 도말하였다. 같은 sample이 도말되어 있는 두 개의 고체배지 중 하나는 42°C에서, 나머지 하나는 30°C에서 배양하였다. 이때 30°C에서 배양되어 생성된 colony의 수는 희석된 배양액 내에 존재하는 실질적인 세균 수를 의미하며, 42°C 배양조건에서 선별된 colony들은 이론적으로 minitransposon에 의한 transposition이 일어난 클론으로 간주하였다.

결과 및 고찰

pKOTs 구축

일반적으로 suicide vector에 의한 mutagenesis의 방법은 유전자 교환을 기본으로 하며, single-crossover를 통한 목적 유전자로의 selectable marker와 일부가 돌연변이(결실 혹은 삽입)된 목적 유전자 서열의 삽입, 그리고 negative selection을 통한 double-crossover 형질전환체 분리의 두 가지 과정으로 이루어진다[26]. Mycobacteria 내의 homologous recombination은 10³ 이하의 낮은 확률로 일어나기 때문에[21], 유전자 교환이 일어난 돌연변이를 얻기 위해서는 새로운 유전학적 방법이나 mycobacteria의 낮은 형질전환율(DNA μ g당 10²~10⁵의 형질전환체)을 극복하는 것이 필요하다[9]. 효과적으로 돌연변이를 얻기 위한 suicide vector의 조건은 (i) 형질전환에 이용될 vector가 세균 내로 높은 효율로 도입되고, 특정

조건에서 세균 내에서 충분한 양으로 증폭됨으로써 chromosomal DNA에 삽입될 수 있는 확률이 높아야 하며, (ii) counterselection 조건에서 vector를 포함하고 있는 클론이 쉽게 제거될 수 있어야 한다. pKO vector는 selectable marker로서 kanamycin과 hygromycin에 저항성을 가지는 유전자 및 levansucrase (2,6- β -D-fructan 6- β -D-fructosyltransferase; EC 2.4.1.10)를 암호화하는 *sacB* 유전자를 가지며 mycobacteria의 복제시작점이 존재하지 않기 때문에 mycobacteria에서 suicide vector로 사용될 수 있지만[34], 세균 내로 vector의 도입 효율이 낮아서 확률적으로 homologous recombination에 의한 single-crossover를 얻는데 어려움이 있다. 이점을 극복하기 위하여 본 연구에서는 pKO vector를 주형으로 pKO_F (5'-ATATAAGCTTCGGTCCTCCGATCGTTG-3')와 pKO_R (5'-CCCCGGTACCATGCAACAGAACTATAA-3')을 primer로 사용하여 hygromycin에 저항성을 가지는 유전자와 *sacB* 유전자를 포함하는 3,944-bp DNA 단편을 얻은 후 *KpnI* 과 *HindIII*로 절단하고, pDE vector를 동일한 제한효소로 처리하여 *E. coli*의 복제시작점인 pUC ori와 pAL500Ts를 포함하는 3,918-bp DNA 단편을 얻어 temperature-sensitive suicide vector인 pKOTs vector (7,852 bp)를 구축하였다(Fig. 1). pAL500Ts는 32°C 또는 그 이하에서는 세포 내에서 안정하게 유지되지만 39°C 이상에서는 복제 활성을 잃게 된다[9]. 따라서 mycobacteria를 pKOTs로 형질전환 시킨 후 32°C 이하에서 배양할 경우에는 pKOTs는 복제가 가능한 vector로서 기능을 하지만, 39°C 이상에서는 복제를 하지 못하고 mycobacteria 내에서 suicide vector로 작용한다. 이러한 점을 이용하여 32°C 이하에서 vector가 도입된 형질전환체를 선별하여 mycobacteria 내로의 낮은 DNA 도입 효율을 극복하고, 유전자 교환이 일어날 수 있는 확률을 증가시킬 수 있다. Hygromycin을 포함하는 배지에서 39°C 이상으로 형질 전환된 균주를 배양할 경우 suicide vector가 chromosome에 삽입된 single-crossover 형질전환체를 얻을 수 있으며, pKOTs에는 *sacB* 유전자가 존재하기 때문에 10% (w/v) sucrose를 포함하는 배지에서 *sacB* 유전자를 가지고 있는 균주는 생존할 수 없으므로[30] double-crossover가 일어난 돌연변이 후보군을 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. pKOTs에서 돌연변이 제작을 위한 제한효소로 *HindIII*, *EcdRV*, *NotI*, *KpnI*, *NruI*를 이용할 수 있다.

pKOTs를 이용한 *M. smegmatis* MSMEG_2660 결실 돌연변이 제작

pKOTs vector가 돌연변이 제작에 사용이 가능한지 알아보기 위하여 유전자 일부분이 결실된 MSMEG_2660을 cloning 하여 돌연변이 균주용 vector를 구축하였다(pKOTs Δ MS2660). 돌연변이 제작과정은 위의 재료 및 방법에 서술하였다. Vector의 복제를 위한 균주 배양은 30°C에서, single-crossover 형질전환체를 획득하기 위한 조건은 42°C에서 수행되었다.

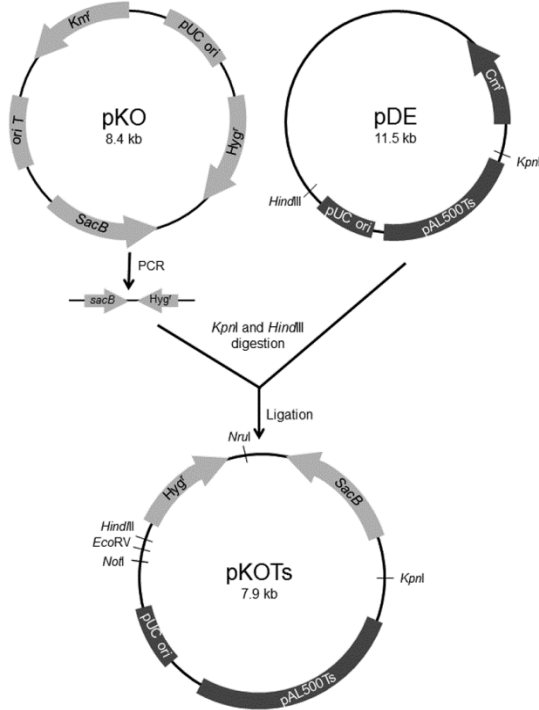


Fig. 1. Schematic diagram for the construction of the pKOTs vector. The relevant restriction sites and genetic elements are shown. pKOTs was constructed by joining two *KpnI-HindIII* fragments. The one containing the pUC ori and pAL500Ts was generated by restriction of pDE with *KpnI* and *HindIII* and the other carrying the hygromycin resistant gene and the *sacB* gene as the selectable markers was obtained by PCR using pKO as the template. The restriction enzymes with a single restriction site are present for *EcoRV*, *HindIII*, *NotI*, *NruI*, and *KpnI*. Abbreviations: pUC ori, replication origin from pUC19 (pMB1); Km^r, kanamycin resistance cassette; Cm^r, chloramphenicol resistance cassette; pAL500Ts, TSRO for mycobacteria; *sacB*, the gene encoding levansucrase of *B. subtilis*.

Hygromycin이 존재하지 않는 배지에서 성장하지만 hygromycin이 존재하는 배지에서는 성장하지 못하는 colony를 돌연변이 후보군으로 선정하여, 돌연변이 후보군을 각각 20 ml 7H9 액체배지에서 3일간 배양한 다음 chromosomal DNA를 추출하여 MSMEG_2660_F와 MSMEG_2660_R의 primer를 이용하여 PCR로 돌연변이를 확인하였다. Wild type의 경우에는 1,110 bp의 크기를 가지는 DNA band를 확인할 수 있었고, MSMEG_2660 돌연변이는 MSMEG_2660 내의 270 bp가 결실된 840 bp의 DNA band를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 실험 결과는 pKOTs가 mycobacteria의 유전자를 knockout 시키는데 성공적으로 작용하는 vector임을 보여주었다.

pMV306lacZ 구축

lacZ 유전자는 β-galactosidase (EC. 3.2.1.23)를 암호화하며,

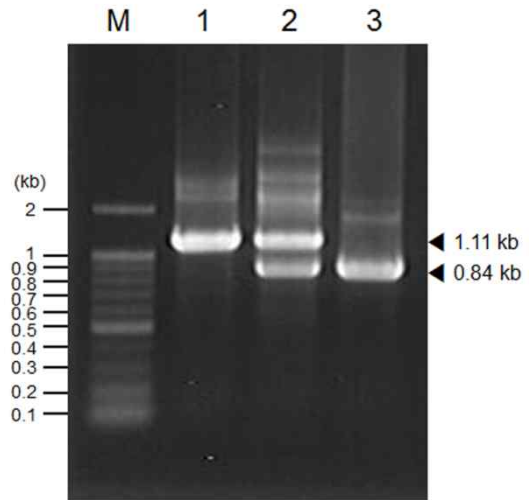


Fig. 2. Confirmation of a MSMEG_2660 deletion mutant by PCR. The PCR reaction was carried out with the primers MSMEG_2660_F and MSMEG_2660_R using the chromosomal DNAs from the wild type (lane 1), the single-cross-over transformant (lane 2), and the MSMEG_2660 mutant (lane 3). Lane M indicates the DNA size marker.

유전자 특성을 조사하기 위한 reporter 유전자로서 주로 사용된다. Mycobacteria에는 *lacZ* 유전자가 존재하지 않기 때문에 promoter가 없는 *lacZ* 유전자 앞부분에 조사하고자 하는 유전자의 promoter를 cloning하여 transcriptional fusion을 구축한다. β-galactosidase의 효소 활성을 측정함으로써 유전자의 발현 정도를 알 수 있다. Mycobacteriophage L5는 *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*와 BCG 균주들에 감염하여 chromosomal DNA로 삽입되어 lysogenic 상태로 존재하게 되는데, 이는 mycobacteria의 chromosomal DNA내의 tRAN^{Gly} 유전자 부분과 겹쳐 존재하는 *attB* site와 mycobacteriophage L5의 *attP* site간의 site-specific recombination의 결과이다[12, 20]. Mycobacteria의 삽입 vector인 pMV306은 mycobacteriophage L5의 *attP* site와 integrase를 암호화하는 유전자인 *int*를 가지며 selectable marker로 *Tn903* 유래의 kanamycin 저항성 유전자를 포함하고 있다[4, 18, 37]. 이러한 점들을 기반으로 pNC vector를 주형으로 pMV306lacZ_F (5'-AATTGCGGCCGCAA AAAACCCCTCAAGACC-3')와 pMV306lacZ_R (5'-CCGGTCTAGACAGGAGGATTCACCATGG-3')을 primer로 사용하여 promoter가 존재하지 않는 *lacZ* 유전자를 포함하는 3,193-bp DNA 단편을 PCR을 통해 얻은 다음, PCR 산물을 *NotI*과 *XbaI*으로 자른 후 동일한 제한효소를 처리한 pMV306에 cloning하여 pMV306lacZ vector (7,149 bp)를 구축하였다(Fig. 3). pMV306lacZ는 pMV306의 특성을 그대로 보존하고 있기 때문에, *E. coli*에서 복제가 가능하여 조작이 쉽고, *attB* site로 site-specific recombination이 일어나 mycobacteria의 chromosomal DNA에 삽입되어 single copy로 존재하므로, β-

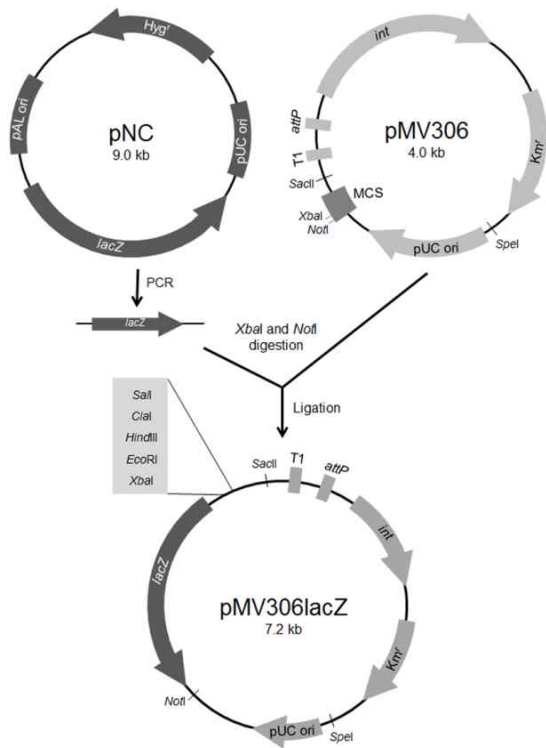


Fig. 3. Schematic diagram for the construction of the pMV306lacZ vector. The pMV306lacZ vector was generated as follows. pMV306 was restricted by *XbaI* and *NotI* and ligated to the promoterless *lacZ* fragment amplified by PCR from pNC. The single-cut restriction sites in the multiple cloning site of pMV306lacZ are boxed and shaded in grey. Abbreviations: *lacZ*, the gene encoding β -galactosidase; T1, the terminator for transcription; *attP*, mycobacteriophage L5 attachment site; *int*, the gene encoding integrase of mycobacteriophage L5; pUC ori, replication origin from pUC19.

galactosidase 활성을 측정하거나 β -galactosidase의 antibody를 이용하여 Western blot을 통해 특정 유전자의 발현 조절을 연구하는데 용이하다. 또한 Kanamycin 저항성 유전자를 가지고 있기 때문에 다른 항생제 저항성 유전자를 가지는 mycobacteria의 vector와 호환성이 높으며, pMV306 유래의 multi-cloning site (MCS)를 가지므로 cloning이 쉬운 장점이 있다.

pMV306lacZ를 이용한 *M. smegmatis*의 *ald* 유전자 발현 확인

Mycobacteria의 alanine dehydrogenase (EC 1.4.1.1)를 암호화하는 *ald* 유전자는 저산소 조건뿐만 아니라 alanine (Ala)에 의해서도 발현이 유도된다[8, 15]. 따라서 pMV306lacZ가 mycobacteria내에서 효과적으로 작동하는지 알아보기 위한 목적으로, pALDLACZ vector를 주형으로 F_ald_int (5'-ATTAAAGCTTGCCGCGCGTGGATTG-3')와 R_ald_int (5'-CAAAGAATTCACCTCGTGACCTCTGCGG-3')를 primer

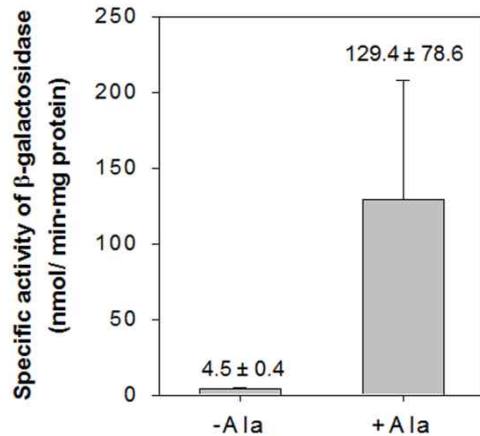


Fig. 4. Promoter activities of the *ald* gene in *M. smegmatis* grown in the presence or absence of alanine. The wild-type strain of *M. smegmatis* containing the *ald:lacZ* transcriptional fusion (pMV306lacZald) in its chromosome was grown aerobically in 7H9 medium to an OD₆₀₀ of 0.5-0.6. Following the addition of 25 mM L-alanine to the cultures, the strain was further grown for 1 hr (+Ala). For the control, the *M. smegmatis* strain was grown under the same growth conditions without the addition of L-alanine (-Ala). The *ald* promoter activities were measured by determining the β -galactosidase activities. Each value is the mean \pm the standard deviation of data from two independent determinations.

로 사용하여 alanine dehydrogenase를 암호화하고 있는 MSMEG_2659 (*ald*) 유전자의 start codon 앞 398 bp와 뒤 97 bp를 포함하는, *ald*의 promoter가 존재할 것이라 예상되는 513 bp DNA 단편을 얻은 후 pMV306lacZ를 *EcoRI*과 *HindIII*로 절단하여 동일한 제한효소로 처리된 PCR 산물을 *lacZ* 유전자와 같은 방향으로 cloning 하였다 (pMV306lacZald). 구축된 pMV306lacZald를 이용하여 *M. smegmatis* wild type을 형질전환 시켰다. Kanamycin 30 μ g/ml이 첨가된 7H9 액체배지에서 OD₆₀₀ 0.5-0.6까지 배양한 후, 25 mM L-alanine을 첨가한 다음 추가적으로 1시간 동안 배양하여 β -galactosidase 활성을 측정하였다. 실험결과, 배지에 alanine을 첨가한 조건에서 alanine이 존재하지 않는 조건에 비해 *ald* 유전자 발현에 의해 β -galactosidase의 활성이 29배 정도 증가한 것을 확인하였다(Fig. 4). 또한 X-Gal을 포함하는 7H9 고체배지에서도 alanine이 존재하는 경우 β -galactosidase의 활성에 의해 colony의 푸른색 정도가 진해짐을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과들을 통해 pMV306lacZ는 안정하게 chromosomal DNA내로 삽입이 되어 유지되며, 유전자 발현 연구에 유용한 삽입 vector로서 작용하는 것을 알 수 있었다.

pTnMod-OKmTs 구축

pTnMod-OKm vector를 주형으로하여 minitransposon과

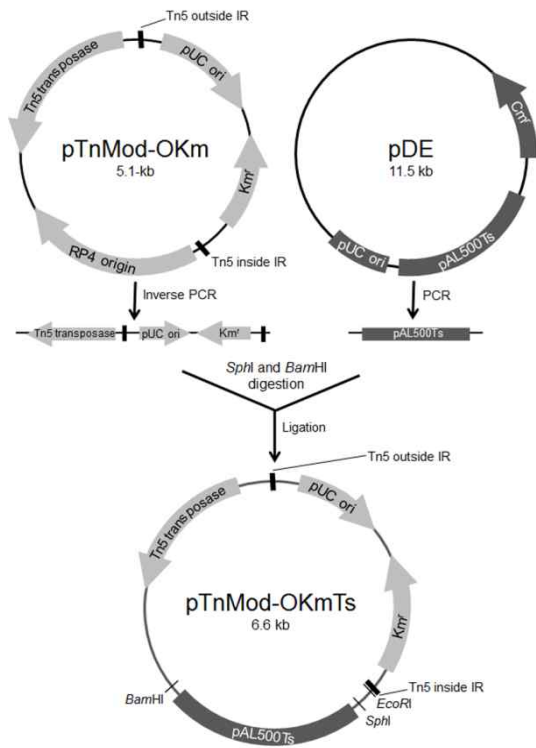


Fig. 5. Construction of pTnMod-OKmTs for random mutagenesis of mycobacteria. pTnMod-OKmTs was constructed by replacing the RP4 origin of pTnMod-OKm with the DNA fragment containing pAL500Ts TSRO from pDE. Abbreviations: Km^r, kanamycin resistance cassette; RP4 origin, the transfer origin; Cm^r, chloramphenicol resistance cassette; pAL500Ts, TSRO for mycobacteria; pUC ori, replication origin from pUC19; IR, inverted repeat from Tn5.

transposase, 그리고 *E. coli* 복제시작점 영역을 포함하는 vector 부분인 3,775 bp를 양 말단에 *SphI*, *BamHI* 제한효소 자리를 갖도록 두 primer (pTnMod_OKm_F, 5'-GAAAGCATGCAC CATTCTTGC-3'과 pTnMod_OKm_R, 5'-ATATGGATCCC ATACCAATTCCTTTG-3')를 이용하여 inverse PCR을 통해 얻어냈다. 또한 pAL500Ts는 이를 포함하고 있는 2,808 bp의 DNA 단편을 pDE vector를 주형으로 하여, primer set인 *BamHI* site를 포함하는 pAL500Ts_F (5'-AATTGGATCCCAC CGCTCAGCTGCGCAC-3')와 *SphI* site를 포함하는 pAL500Ts_R (5'-GGCCGCATGCGGTTTTTTTGTGGCAAGCAG-3')을 사용한 PCR을 통해 얻었다. PCR을 통해 얻어진 vector 부위와 pAL500Ts를 포함하는 DNA 단편을 *SphI*과 *BamHI*을 처리한 다음, ligation을 통해 pTnMod-OKmTs vector (6,563 bp)를 구축하였다(Fig. 5).

pTnMod-OKmTs를 이용한 random mutagenesis

pTnMod-OKmTs vector는 mycobacteria에서의 random mutagenesis를 보다 효율적으로 수행할 수 있도록 본 연구에

서 개발된 vector이다(Fig. 5). pTnMod-OKmTs의 기반인 pTnMod-OKm은 Gram-negative 세균에서의 유전적 연구를 위해 고안된 vector였으나[6], 여기에 pAL500Ts를 pTnMod-OKm vector에 도입함으로써 실험자가 적절히 온도환경을 조절하여, 앞서 설명한 TSRO 작동 원리를 통해 vector의 복제를 실험적 의도에 맞게 조절할 수 있도록 하였다. 이를 통해 mycobacteria 세포 내로의 vector의 도입 효율을 높이고, minitransposon이 세포내에 다중의 copy수로써 존재할 수 있도록 유도할 수 있다. 이러한 실험적 조작은 minitransposon이 mycobacteria chromosomal DNA 내로 transposition될 확률을 높여 줄 수 있게 된다. pTnMod-OKmTs를 이용한 random mutagenesis 체계를 이용함으로써 얻을 수 있는 실험적 이점을 나열하면 다음과 같다. 첫 번째, 실험자는 random mutagenesis를 수행한 후, minitransposon에 의한 삽입 돌연변이가 일어난 chromosomal DNA상에서의 위치를 정확히 알 수 있다. pTnMod-OKm vector의 구조를 보면 Tn5 외부 역반복 서열과 RP4 transfer origin사이에 하나의 *EcoRI* 제한효소자리가 존재한다(Fig. 5). Minitransposon의 transposition으로 인해 얻어진 kanamycin 내성으로 선별된 균주의 chromosomal DNA를 분리하여 *EcoRI*로 처리 한 후, self-ligation 시킨 다음 *E. coli* 형질전환과정을 거쳐 kanamycin 내성에 대한 선별 과정을 수행하면, colony를 형성하는 *E. coli* 균주는 minitransposon이 삽입되어 있었던 mycobacteria의 chromosomal DNA의 일부 영역과 minitransposon 영역, 즉, 두 개의 역반복 서열로 정의된 부분인 pUC ori, kanamycin 내성 유전자를 포함한 영역이 self-ligation된 plasmid를 가지고 있을 것이다. 따라서, 이미 알려져 있는 pTnMod-OKm vector의 염기서열 정보를 이용한 primer를 제작하여, *EcoRI* 처리와 self-ligation 과정에서 얻어지는 mycobacteria chromosomal DNA의 일부 염기서열을 sequencing을 통해 알아낼 수 있게 되므로 transposition이 일어난 chromosomal DNA 상에서의 정확한 위치를 파악할 수 있다. 두 번째, pTnMod-OKmTs는 kanamycin 내성 유전자를 가지고 있어 mycobacteria에서 selectable marker로 주로 쓰이는 hygromycin 내성 유전자를 가지는 vector와 호환이 가능하며, complementation test와 같은 돌연변이 균주를 이용한 다양한 실험 과정에 있어서 사용이 용이하다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의해 연구되었습니다.

References

1. Azad, A. K., Sirakova, T. D., Rogers, L. M. and Kolattukudy,

- P. E. 1996. Targeted replacement of the mycocerosic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 4787-4792.
2. Balasubramanian, V., Pavelka, M. S., Jr., Bardarov, S. S., Martin, J., Weisbrod, T. R., McAdam, R. A., Bloom, B. R. and Jacobs, W. R., Jr. 1996. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol* **178**, 273-279.
 3. Bardarov, S., Bardarov, S., Jr., Pavelka, M. S., Jr., Sambandamurthy, V., Larsen, M., Tufariello, J., Chan, J., Hatfull, G. and Jacobs, W. R., Jr. 2002. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* **148**, 3007-3017.
 4. Brown, A. K., Bhatt, A., Singh, A., Saparia, E., Evans, A. F. and Besra, G. S. 2007. Identification of the dehydratase component of the mycobacterial mycolic acid-synthesizing fatty acid synthase-II complex. *Microbiology* **153**, 4166-4173.
 5. De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**, 6568-6572.
 6. Dennis, J. J. and Zylstra, G. J. 1998. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2710-2715.
 7. Fellay, R., Krisch, H. M., Prentki, P. and Frey, J. 1989. Omegon-Km: a transposable element designed for *in vivo* insertional mutagenesis and cloning of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **76**, 215-226.
 8. Feng, Z., Caceres, N. E., Sarath, G. and Barletta, R. G. 2002. *Mycobacterium smegmatis* L-alanine dehydrogenase (*Ald*) is required for proficient utilization of alanine as a sole nitrogen source and sustained anaerobic growth. *J Bacteriol* **184**, 5001-5010.
 9. Guilhot, C., Gicquel, B. and Martin, C. 1992. Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. *FEMS Microbiol Lett* **77**, 181-186.
 10. Guilhot, C., Ota, I., Van Rompaey, I., Martin, C. and Gicquel, B. 1994. Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *J Bacteriol* **176**, 535-539.
 11. Gupta, A., Kaul, A., Tsolaki, A. G., Kishore, U. and Bhakta, S. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* **217**, 363-374.
 12. Hatfull, G. F. and Sarkis, G. J. 1993. DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Mol Microbiol* **7**, 395-405.
 13. Howard, N. S., Gomez, J. E., Ko, C. and Bishai, W. R. 1995. Color selection with a hygromycin-resistance-based *Escherichia coli*-mycobacterial shuttle vector. *Gene* **166**, 181-182.
 14. Husson, R. N., James, B. E. and Young, R. A. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J Bacteriol* **172**, 519-524.
 15. Hutter, B. and Dick, T. 1998. Increased alanine dehydrogenase activity during dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* **167**, 7-11.
 16. Jacobs, W. R., Jr., Tuckman, M. and Bloom, B. R. 1987. Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature* **327**, 532-535.
 17. Jessee, J. 1986. *New subcloning efficiency. Competent cells: >1x10⁶ transformants/μg* Focus 8:9.
 18. Kong, D. and Kunimoto, D. Y. 1995. Secretion of human interleukin 2 by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* **63**, 799-803.
 19. Lee, M. H. and Hatfull, G. F. 1993. Mycobacteriophage L5 integrase-mediated site-specific integration *in vitro*. *J Bacteriol* **175**, 6836-6841.
 20. Lee, M. H., Pascopella, L., Jacobs, W. R., Jr. and Hatfull, G. F. 1991. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 3111-3115.
 21. McFadden, J. 1996. Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol* **21**, 205-211.
 22. Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor, NY, USA
 23. Oh, J. I., Park, S. J., Shin, S. J., Ko, I. J., Han, S. J., Park, S. W., Song, T. and Kim, Y. M. 2010. Identification of *trans*- and *cis*-control elements involved in regulation of the carbon monoxide dehydrogenase genes in *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803. *J Bacteriol* **192**, 3925-3933.
 24. Otero, J., Jacobs, W. R., Jr. and Glickman, M. S. 2003. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium avium* by specialized transduction. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5039-5044.
 25. Parish, T., Stoker, N. G. 1999. *Mycobacteria protocols*, Humana Press, NJ, USA.
 26. Parish, T. and Stoker, N. G. 2000. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology* **146**, 1969-1975.
 27. Pashley, C. A., Parish, T., McAdam, R. A., Duncan, K. and Stoker, N. G. 2003. Gene replacement in mycobacteria by using incompatible plasmids. *Appl Environ Microbiol* **69**, 517-523.
 28. Pedulla, M. L., Lee, M. H., Lever, D. C. and Hatfull, G. F. 1996. A novel host factor for integration of mycobacteriophage L5. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 15411-15416.
 29. Pelicic, V., Jackson, M., Reytrat, J. M., Jacobs, W. R., Jr., Gicquel, B. and Guilhot, C. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10955-10960.
 30. Pelicic, V., Reytrat, J. M. and Gicquel, B. 1996. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**, 1197-1199.
 31. Pelicic, V., Reytrat, J. M. and Gicquel, B. 1996. Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using su-

- crose counter-selectable suicide vectors. *Mol Microbiol* **20**, 919-925.
32. Pelicic, V., Reytrat, J. M. and Gicquel, B. 1998. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol* **28**, 413-420.
33. Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor, NY, USA.
34. Sherman, D. R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M. I. and Schoolnik, G. K. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7534-7539.
35. Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R. E., Kieser, T., Bloom, B. R. and Jacobs, W. R., Jr. 1988. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 6987-6991.
36. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. and Jacobs, W. R., Jr. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**, 1911-1919.
37. Stover, C. K., De La Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G. Jacobs, W. R., Jr. and Bloom, B. R. 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456-460.

초록 : Mycobacteria에 적용 가능한 genetic tool로서의 새로운 vector system 개발

정지아¹ · 이하나¹ · 고인정² · 오정일^{1*}

(¹부산대학교 미생물학과, ²카이스트부설 한국과학영재학교)

Mycobacterium 속은 *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis*와 같은 동물과 인체에 병원성을 나타내는 세균 종을 다수 포함하고 있다. 이들의 숙주에서의 생존과 병원성에 관한 유전학적 정보를 확보하는 것은 매우 중요하지만, 효과적인 유전학적 도구가 부족하였기 때문에 이들에 관한 연구가 미비하였다. 따라서 mycobacteria의 연구를 위한 분자생물학적 실험 도구로서 다양한 기능성 vector들이 고안되었고, 이러한 기능성 vector의 개발은 실질적으로 mycobacteria에서의 연구 효과를 증진시켰다. 본 연구에서는 *Mycobacterium smegmatis*에 적용 가능하고 기존에 제시되었던 mycobacteria 연구에 있어서의 한계점을 극복하기 위한 노력의 일환으로, 기능성 vector인 temperature-sensitive replication origin (TSRO)과 counterselectable marker로 levansucrase를 암호화하는 *sacB* 유전자를 포함하는 suicide vector pKOTs, chromosomal DNA로 site-specific recombination을 통해 삽입되는 *lacZ* transcriptional fusion vector pMV306*lacZ*, 그리고 TSRO를 가지는 mini-transposon vector pTnMod-OKmTs를 개발하였다. 이 vector들은 실질적으로 *M. smegmatis*에서 효과적으로 작동하는 것이 확인되었으며 목적으로 하는 실험 결과 도출 가능성 또한 보여주었다. 따라서 이들 vector는 앞으로의 mycobacteria에 대한 효과적인 연구 기반이 될 것으로 기대된다.