

## Investigation into the Ethanol Tolerance Mechanism by Regulation of Gene Expression

Hoe-Myung Jung<sup>1</sup>, Ho-Jung Choi<sup>2</sup>, Soo-Wan Nam<sup>1,2</sup>, Sung-Jong Jeon<sup>1,2</sup> and Yeon-Hee Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Smart-Biohealth, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received September 15, 2015 / Revised October 27, 2015 / Accepted November 9, 2015

Ethanol is a very valuable material, however, it is also a source of stress, as the accumulation of ethanol in a medium inhibits cell viability and decreases productivity of the target product. Therefore, the ethanol tolerance of yeast, which is closely related to ethanol productivity, is an important factor in industrial ethanol production. In this study, the *YDJ1* and *PEP5* genes were selected as target genes for elucidating ethanol-tolerant mechanisms by analyzing the expression regulation of these genes. The pA-*YDJ1* and pA-*PEP5* plasmids containing *YDJ1* and *PEP5* genes under an *ADH1* promoter, respectively, were constructed and transformed into BY4742 (host strain), BY4742  $\Delta ydj1$ , and BY4742  $\Delta pep5$  strains. The ethanol tolerance in the BY4742  $\Delta ydj1$ / pA-*YDJ1* and BY4742  $\Delta pep5$ /pA-*PEP5* transformants was restored by overexpression of the *YDJ1* and *PEP5* genes to the host strain level. The *YDJ1* and *PEP5* genes were also introduced into the double gene disruptant (BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ ) to investigate the expression regulation of the *YDJ1* and *PEP5* genes. The simultaneous overexpression of the *YDJ1* and *PEP5* genes restored ethanol tolerance to the 90% level of the BY4742 strain under 8% ethanol stress. The *YDJ1* gene induced more overexpression of the *PEP5* gene in the BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-*YDJ1*, pA-*PEP5* strain, suggesting that the *YDJ1* gene partially regulates the expression of the *PEP5* gene as an upstream regulator.

**Key words** : Ethanol tolerance, expression regulation, *PEP5* gene, simultaneous overexpression, *YDJ1* gene

### 서론

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 제빵 및 양조를 포함한 발효산업뿐만 아니라, 최근에는 starch나 cellulose와 같은 바이오 매스로부터 바이오에탄올의 생산에도 이용되고 있는 전통 미생물이다[12, 16, 19]. 그렇지만 효모는 생산공정 동안의 삼투압 증가 또는 에탄올 및 이산화탄소의 축적 등과 같은 몇 가지 환경적 변화에도 종종 노출되고 있다[2]. 그 중에서 에탄올은 여러 분야에서 사용되고 있지만 미생물 생장의 주저해제로 알려져 있기 때문에 배양 중 에탄올의 축적은 세포성장과 목적 제품의 생산을 감소와 같이 효모 세포에 스트레스를 준다고 알려져 있다[3]. 따라서 효모의 에탄올내성은 산업적으로 에탄올을 생산함에 있어 에탄올 생산성 증대와 밀접한 관계가 있는 중요한 요소임에는 분명하다. 실제로 많은 연구자들이 에탄올 생산을 증가시키기 위한 다양한 방법을 연구하고 있으

며, 그 중의 하나가 발효에 사용되는 효모 균주의 직접적인 육종이라고 말할 수 있다[1, 14, 15]. 하지만 에탄올 내성은 게놈수준의 복잡한 네트워크 상호작용으로 복잡하게 조절되고 있어 효모에서 에탄올 내성을 증가시키기 위한 유전적 조작에는 한계가 있고[7], 여전히 규명되지 않은 에탄올 내성 메커니즘이 많이 존재하는 것도 사실이다. 에탄올 내성을 향상시키기 위한 대부분의 접근법은 EMS/MMS 등과 같은 돌연변이 유도 화학물질에 의한 돌연변이 방법이나 DNA microarray 분석과 균의 성장에 영향을 미치지 않는 비필수유전자(non-essential gene)의 결실에 의해 에탄올 내성에 관련된 유전자를 screening하는 방법으로 에탄올에 민감한 돌연변이(ethanol sensitive mutant)를 분리하는 것에 초점을 맞추어왔다[4, 13, 17, 18]. 또한 global transcription machinery engineering (gTME)을 통해 에탄올 함유 배지에서 에탄올 내성 균주를 순차적으로 분리해 내는 방법도 보고되었고[1], 에탄올 스트레스에 관여하는 유전자의 단순 과발현(overexpression) 또는 단순 결실(deletion)로는 에탄올 내성이 증가되지 않는다는 것도 일부 보고되어 있다[9]. 이는 분명히 에탄올 내성에 관여하는 다양한 유전자들의 발현이 서로 상호 조절되고 있고, 그 상위의 유전자들과의 발현조절을 잘 이용한다면 에탄올 내성을 증가시킬 수 있는 방법을 제시할 수 있다는 것을 의미한다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2281, Fax : +82-504-033-6356

E-mail : yeonheekim@deu.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.

이전의 연구에서 염색체가공기술(chromosome manipulation technique)을 통해 만들어진 12개의 인공미니염색체를 가진 SH6310 균주(31개의 염색체 함유)를 이용하여 에탄올 스트레스 조건에서 에탄올 내성균주(ETY (ethanol-tolerant yeast) 균주)를 선별한 것에 대해 보고하였다[14]. 이때 에탄올 내성에 민감한 SH6310 균주의 microarray 결과에서 특정 유전자의 발현이 저하됨을 확인 하였고, 그 유전자 중, 5배 이상 발현률이 저하된 *YDJ1* (YNL064C)과 *PEP5* (YMR231W) 유전자를 본 연구에서 에탄올 내성 증가를 위한 목적유전자로 선별하여, 이 두 유전자의 과발현에 의한 에탄올 내성 유도 가능성을 조사하고 두 유전자의 상호 과발현에 의한 유전자 조절에 대해 조사하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmids

Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *Escherichia coli* 숙주세포는 DH5 $\alpha$ 를 사용하였고, 효모 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (*MATa ura3- $\Delta$ 0 his3- $\Delta$ 1 leu2- $\Delta$ 0 lys2- $\Delta$ 0*)와 이 균주에 각각 *YDJ1* (ORF 1.2kb)과 *PEP5* (ORF 3kb) 유전자가 *KanMX* 유전자로 대체되어 결실된 BY4742  $\Delta$ *ydj1*와 BY4742  $\Delta$ *pep5* 균주를 사용하였다. 또한 *YDJ1*과 *PEP5* 유전자의 상호 조절작용을 알아보기 위해서는 BY4742  $\Delta$ *ydj1* 균주의 *PEP5* 유전자가 *CgLEU2* 유전자로 대체되어 결실된 BY4742  $\Delta$ *ydj1*  $\Delta$ *pep5* 균주를 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*의 *YDJ1*와 *PEP5* 유전자 발현을 위한 발현 plasmid는 구성적 promoter인 *ADH1* (alcohol dehydrogenase) promoter와 *ADH3* terminator를 포함하는 pA-*YDJ1*과 pA-*PEP5* plasmid를 사용하였다. pA-*YDJ1* plasmid는 선별마커로 *URA3* 유전자를 함유하고 있어 uracil 영양요구성 변이주 효모세포(*ura3- $\Delta$ 0*)를 숙주세포로 사용할 수 있으며, pA-*PEP5* plasmid는 *URA3* 유전자 대신 *loxP-CgHIS3-loxP*를 선별마커로 가지고 있다.

### 재조합 plasmid 구축 및 형질전환

*YDJ1* 유전자의 과발현을 위한 plasmid 구축을 위해 *ADH1* promoter를 가지고 있는 pAnu-exgA [10] plasmid를 vector로 사용하였고, *YDJ1* 유전자는 BY4742의 genomic DNA를 주형으로 *YDJ1-F* (5'-GCGTCTAGAATGGTTAAAGA-3')와 *YDJ1-R* (5'-GCGCTCGAGTCATTGAGATG-3') primer를 이용하여 증폭하였다. 증폭된 단편은 *XbaI*과 *XhoI* 제한효소로 처리하고, *YDJ1* 유전자를 pAnu-exgA의 *EXGA* 유전자 대신에 도입하여 pA-*YDJ1*을 구축하였다. *PEP5* 유전자도 *YDJ1* 유전자와 마찬가지로 BY4742의 genomic DNA를 주형으로 *PEP5-F* (5'-AGAGGATCCATGTCCCTGAG-3')와 *PEP5-R* (5'-GCGAAGCTTTTAAATAGTGA-3') primer를 이용하여 증폭하였다. 얻어진 단편은 *BamHI*과 *HindIII* 제한효소에 의해 처리되고,

pAnu-exgA의 *EXGA* 유전자를 *PEP5* 유전자로 치환시켜 pA-*PEP5(U)*를 구축하였다. 하지만 pA-*YDJ1*와 pA-*PEP5(U)* plasmid는 선별마커로서 모두 *URA3* 유전자를 가지고 있어, 동시에 한 균주로 형질전환이 불가능하므로, pA-*PEP5(U)*의 *URA3* 유전자 마커는 *loxP-CgHIS3-loxP* 유전자로 대체하였다. *loxP-CgHIS3-loxP* 유전자는 *S. cerevisiae*에서 상보적으로 *HIS3* 유전자의 기능을 하는 유전자로 영양요구주 선별마커로 사용될 수 있어, in-fusion cloning (Clontech)법을 사용하여 pA-*PEP5* plasmid를 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에서 증폭, 추출되었고, *S. cerevisiae*의 형질전환은 salmon testes 유래의 single-stranded carrier DNA를 사용하는 high efficiency transformation법[6]을 이용하였다.

### 배지 조성 및 배양조건

*S. cerevisiae* 균주의 증식배지로는 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)를 사용하였으며 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 YNBCAD 배지(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 1% casamino acid, 2% glucose)와 필요한 아미노산과 핵산만을 첨가한 SC 배지(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 2% glucose supplemented with the appropriate amino acids and nucleic acids)를 사용하였다. 재조합 효모 균주의 에탄올 노출에 따른 성장률을 조사하기 위해서 50 ml YPD 배지와 6% 및 8% ethanol이 포함된 YPD (YPDE) 배지에서 30 $^{\circ}$ C, 190 rpm으로 72시간 배양하였다. 또한 모든 균은 액체배지에서 배양한 다음 세포농도(OD<sub>600</sub>)를 1로 맞추고 10배씩 희석하여 모두 동일한 농도로 spot하여 YPD와 YPDE (6% ~10% ethanol 함유) 배지에서 그 성장 정도를 비교 관찰하였다.

### RT-PCR을 통한 유전자 발현률 조사

BY4742 균주와 각각의 형질전환체에서 *YDJ1* 및 *PEP5* 유전자의 발현률을 비교하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Trizol method [8]를 통해 각 효모 균주의 total RNA를 추출하였고, Hyperscript™ First strand synthesis Kit (GeneAll<sup>®</sup>)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 조건은 2  $\mu$ g의 total RNA와 Oligo dT를 첨가한 14  $\mu$ l를 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응 후, ice에서 1분간 cooling하고 10x RTase reaction buffer 2  $\mu$ l, 0.1M DTT 1  $\mu$ l, HyperScript™ Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, ZymAll™ RNase Inhibitor 1  $\mu$ l를 첨가하여 55 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응 후, 85 $^{\circ}$ C에서 5분 반응하여 ice에서 cooling하였다. 합성된 cDNA는 PCR의 주형으로 사용되었고, *YDJ1* 및 *PEP5* 유전자의 증폭을 위해 *YDJ1-F1* (5'-GGTGACGATATCTTTTCCCA-3')와 *YDJ1-R2* (5'-ATACCGACCTTTAACCAATC-3'), *PEP5-F*와 *PEP5-R2* (5'-GCTTTTTTCCACTAGAGCTG-3') primer set을 사용하였다. *ACT1* 유전자는 internal control로서 *ACT1-F* (5'-ATCCAAGAGAGGTATCT-3')와 *ACT1-R* (5'-

CACACTTCATGATGGAG-3') primer를 사용하여 증폭되었다. 전기영동 후 각각 signal intensity는 Scion image (<http://www.scioncorp.com/>) program을 이용하여 비교 분석하였다 [11].

### 결과 및 고찰

#### YDJ1과 PEP5 유전자의 단독 과발현에 의한 에탄올 내성 조사

YDJ1 유전자와 PEP5 유전자의 과발현이 BY4742 숙주세포와 single gene disruptant (BY4742  $\Delta ydj1$  와 BY4742  $\Delta pep5$ )의 에탄올 내성을 어느 정도 증가시킬 수 있는지 알아보기 위해, pA-YDJ1과 pA-PEP5 plasmid를 각각 BY4742  $\Delta ydj1$  와 BY4742  $\Delta pep5$  균주에 형질전환하였다. Uracil (SC-Ura)과 histidine (SC-His)이 없는 각각의 배지에서 선별된 형질전환주들을 6%와 8% 에탄올이 첨가된 YPD 고체배지에 동일한 균체농도로 spot 하여 30°C에서 3일 동안 배양하였다. 그 중 에탄올 내성이 보이는 형질전환주 1개(BY4742  $\Delta ydj1$ /pA-YDJ1과 BY4742  $\Delta pep5$ /pA-PEP5)를 선택하여 YPD 와 6와 8% 에탄올이 첨가된 50 ml YPD (YPDE) 배지에서 3일 동안 액체배양 (baffled flask culture)하여 균주의 성장을 관찰해 보았다 (Table 1). 그 결과, 숙주세포인 BY4742는 에탄올 농도 6%에서 균의 성장이 약 33% 정도 저하되었고, 에탄올 농도 8%에서는 약 76%의 성장저하가 관찰되었다. 반면, YDJ1 유전자와 PEP5 유전자가 결실된 BY4742  $\Delta ydj1$  과 BY4742  $\Delta pep5$  균주는 에탄올 배지에서 95%이상으로 성장이 매우 저해됨을 확인할 수 있었다. 하지만 YDJ1 유전자가 과발현된 BY4742  $\Delta ydj1$ /pA-YDJ1 균주의 경우, 8% 에탄올 배지에서 숙주세포보다 1.4배 성장이 증가되었음을 확인할 수 있었고, PEP5 유전자가 과발현된 BY4742  $\Delta pep5$ /pA-PEP5 균주의 경우에도 숙주세포보다 약 1.2배정도 에탄올 내성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. 또한 6%의 에탄올 배지에서 BY4742  $\Delta ydj1$  균주 보다 BY4742  $\Delta pep5$  균주가 약 5배 정도의 에탄올 내성을 보이고, YDJ1 유전자의 과발현에 의해 PEP5 유전자 과발현 균주(BY4742  $\Delta pep5$ / pA-PEP5)보다 더 에탄올 내성을 보인다는 것은 YDJ1 유전자가 PEP5 유전자보다 에탄올 내성에 좀 더 직접적으로 또는 상위에서 관여하고 있을 가능성을 시사한다.

#### Double gene disruption 균주에서 YDJ1과 PEP5 유전자의 상호작용

YDJ1 유전자와 PEP5 유전자의 단독 과발현에 의한 에탄올 내성 조사에서 YDJ1 유전자가 PEP5 유전자보다 에탄올 내성 메커니즘에서 상위에 있을 가능성을 제시했는데, 두 유전자가 결실된 균주(BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ )를 이용하여, 두 유전자의 상호조절에 관해 조사해보았다. 먼저 double gene disruptant 인 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주는 PEP5 유전자의 5'말단 300bp fragment, loxP-CgLEU2 gene-loxP 영역과 3'말단 300bp fragment를 overlapping PCR로 증폭하여 작성된 5'-*pep5*-loxP-CgLEU2-loxP-*pep5*-3' 단편을 BY4742  $\Delta ydj1$  균주의 PEP5 유전자 locus에 integration하여 구축하였다. 다음으로 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주에 pA-YDJ1와 pA-PEP5 plasmid를 각각 그리고 동시에 형질전환하여 각각의 형질전환주를 선별하였다. 선별된 형질전환주 및 숙주세포는 YPD배지에서 2일 정도 액체배양 한 후, 세포농도(OD<sub>600</sub>)를 1로 맞추고 10배씩 희석하여 모두 동일한 농도로 YPD와 YPDE (8% ethanol 함유) 배지에서 spot하여 그 성장 정도를 비교 조사해보았다(Fig. 1). YDJ1 유전자와 PEP5 유전자가 결실된 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주는 8% 에탄올 배지에서 거의 성장을 하지 못하는 것을 확인할 수 있었다. YDJ1 유전자의 과발현 유도에 의해서 세포농도  $1 \times 10^2$  정도까지는 성장을 확인할 수 있었고, PEP5 유전자의 과발현에 의해서도 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주 보다는 에탄올 내성이 증가되었음을 확인할 수 있었다. YDJ1 유전자와 PEP5 유전자를 동시 과발현 시켰을 경우(BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ / pA-YDJ1, pA-PEP5)는 BY4742 균주의 수준까지 에탄올 내성이 회복되는 것을 볼 수 있었다. 각각의 균주를 YPD와 YPDE (8% ethanol 함유) 배지에서 72시간 회복배양 한 결과, 그 차이를 확실히 확인할 수 있었는데 (Table 2), BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1, pA-PEP5 균주의 경우, 8% 에탄올 배지에서 BY4742 균주의 약 90%정도 까지 에탄올 내성이 회복됨을 확인하였다. BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1 균주의 경우는 YDJ1 유전자의 과발현으로 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주 보다는 약 10 배정도 에탄올 내성이 증가되었지만, PEP5 유전자의 부재로 숙주세포에 비해 약 30% 정도의 에탄올 내성만이 회복됨을 알 수 있었다. 반면에, BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-PEP5 균주의 경우는 PEP5 유전자의 과발현에도 불구하고 BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주와 비슷한 수준의 성장율을 보임을 알 수 있었는데

Table 1. Comparison of cell growth (OD<sub>600</sub>) in host strain BY4742, single gene disruptant (BY4742  $\Delta ydj1$  and BY4742  $\Delta pep5$ ) and transformants

Media \ Strains	BY4742	BY4742 $\Delta ydj1$	BY4742 $\Delta ydj1$ /pA-YDJ1	BY4742 $\Delta pep5$	BY4742 $\Delta pep5$ /pA-PEP5
YPD	20.6	18.5	21.2	16.2	22.8
YPDE (6%)	13.9	0.72	14.1	3.78	13.7
YPDE (8%)	4.97	0.22	6.8	0.35	5.88

Each strain was cultivated in YPD and YPD containing 6% and 8% ethanol (YPDE) for 72 hr at 30°C.

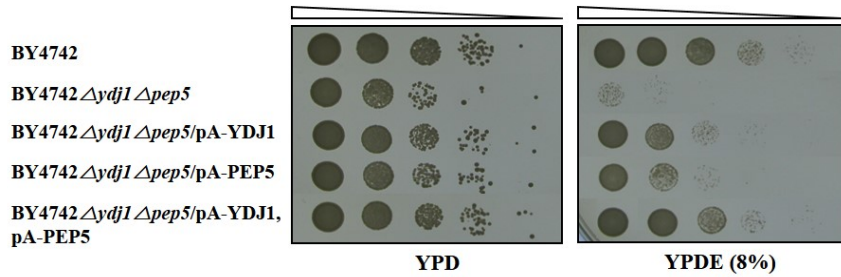


Fig. 1. Analysis for ethanol tolerance of host strain, double gene disruptant and each transformant. The each strain was grown to OD<sub>600</sub>=1.0 in YPD. Aliquots of 10-fold serially diluted cell suspensions from each strain were spotted onto YPD and YPD containing 8% ethanol (YPDE) plates.

Table 2. Comparison of cell growth (OD<sub>600</sub>) in host strain BY4742, double gene disruptant (BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ ) and transformants

Media \ Strains	BY4742	BY4742 $\Delta yjd1 \Delta pep5$	BY4742 $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1	BY4742 $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-PEP5	BY4742 $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1, pA-PEP5
YPD	19.4	13.9	15.2	11.4	20.7
YPDE (8%)	4.85	0.15	1.6	0.17	4.23

Each strain was cultivated in YPD and YPD containing 8% ethanol (YPDE) for 72 hr at 30°C.

이는 *YDJ1* 유전자의 결실이 큰 영향을 미쳤음을 시사한다. 또한 *YDJ1* 유전자와 *PEP5* 유전자 동시 과발현에 의해 에탄올 내성이 숙주세포 수준까지 증가되었다는 것은 *YDJ1* 유전자의 결실에 의해 *PEP5* 유전자의 발현이 저하되었고, *YDJ1* 유전자의 도입에 의해서 *PEP5* 유전자가 발현 유도되어 에탄올 내성의 phenotype을 보인 것이라고 생각할 수 있다.

**YDJ1과 PEP5 유전자 과발현에 따른 상호 발현 조절 메커니즘**

BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$  균주에 도입된 *YDJ1* 유전자에 의해 *PEP5* 유전자의 발현률이 조절되는지의 여부를 RT-PCR을 이용하여 조사해보았다(Fig. 2). *YDJ1* 유전자의 영역을 증폭하는 primer로 RT-PCR을 수행한 결과, BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1 균주에서 internal control (*ACT1* gene) 보다 약 5배 진한 PCR band를 확인할 수 있었지만(Fig. 2. lane 3), *PEP5* 유전자를 증폭하는 primer로 RT-PCR을 수행한 결과, BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-PEP5 균주에서는 과발현에도 불구하고 internal control과 비슷한 수준의 발현률 밖에 관찰되지 않았다. 하지만 BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1, pA-PEP5 균주에서는 *YDJ1* 유전자와 *PEP5* 유전자의 발현률이 모두 약 6~8배 증가되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2. lane 5). 이는 *YDJ1* 유전자가 직접적으로 *PEP5* 유전자의 발현에 영향을 미친다는 결과이고, 에탄올 내성 메커니즘에 있어 *YDJ1* 유전자가 *PEP5* 유전자보다 상위에 있다고 생각할 수 있다. *Ydj1* 단백질은 chaperone의 한 종류로 막을 가로지르는 protein translocation에 관여하고, *Pep5* 단백질은 vacuolar membrane 단백질의 일종으

로 protein trafficking에 필요한 단백질로 두 단백질의 대사 pathway는 다르지만 외부 스트레스에 직접적인 영향을 받아 조절되는 단백질이다. 따라서 에탄올 스트레스에 관해서는 *YDJ1* 유전자가 상위에서 *PEP5* 유전자를 조절하는 상위조절인자(upstream regulator)일 가능성을 제시한다.

*YDJ1* 유전자와 *PEP5* 유전자의 과발현이 BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$  균주의 에탄올 내성을 증가시켰음을 확인하였는데, 숙주세

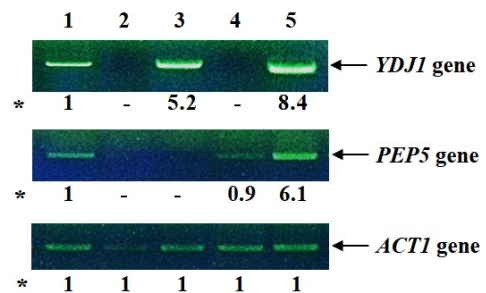


Fig. 2. Analysis of the expression levels of *YDJ1* and *PEP5* genes using RT-PCR (A). Total RNA was isolated from *S. cerevisiae* BY4742, BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$  and each transformant. cDNA was synthesized from total RNA by RT-PCR. The *YDJ1*, *PEP5* and *ACT1* (internal control) genes were PCR-amplified using each cDNA as template, and the products were visualized by agarose gel electrophoresis. Expression level (\*) was analyzed by comparing intensity of PCR products. Lane 1: BY4742, lane 2: BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ , lane 3: BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1, lane 4: BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-PEP5, lane 5: BY4742  $\Delta yjd1 \Delta pep5$ /pA-YDJ1, pA-PEP5.

포 BY4742의 경우에도 에탄올 내성을 더 증가시킬 수 있는지 조사해보았다. BY4742균주에 pA-YDJ1과 pA-PEP5 plasmid를 각각 도입한 후, 8%와 10%의 에탄올 배지에서 에탄올 내성을 조사해본 결과, BY4742, BY4742/pA-YDJ1과 BY4742/pA-PEP5 균주 모두 비슷한 수준의 에탄올 내성을 보임을 확인할 수 있었다(data not shown). RT-PCR의 결과도 세 균주 모두 유의한 차이는 보이지 않았다. 이는 French et al. [5]의 유전자의 수가 정상 level보다 증가 또는 감소되어도 RNA synthesis rate는 거의 동일하게 조절된다는 보고에서처럼, 세포 내에서 YDJ1과 PEP5 유전자의 발현률도 일정 수준으로 엄격하게 조절되고 있는 것이라고 생각된다.

본 연구에서는 에탄올 내성 증가를 위해 필요한 유전자들의 상호조절에 대한 영향을 조사하기 위해 에탄올 내성에 관여하는 YDJ1 과 PEP5 유전자를 이용하여, 에탄올 스트레스 하에서 YDJ1 유전자가 PEP5 유전자의 발현을 조절함을 확인하였다. 그리고 이러한 결과가 향후 다양한 에탄올 내성 유전자들의 상호 조절 메커니즘 확립과 더불어 산업적으로 유용한 에탄올 내성 균주의 육종 연구에 중요한 기초자료가 되기를 기대해 본다.

## 감사의 글

본 연구는 2015학년도 동의대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었습니다(2015AA076). 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G. R. and Stephanopoulos, G. 2006. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* **314**, 1565-1568.
- Attfield, P. V. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1351-1357.
- Birch, R. M. and Walker, G. M. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Micro. Technol.* **26**, 678-687.
- Dinh, T. N., Nagahisa, K., Yoshikawa, K., Hirasawa, T., Furusawa, C. and Shimizu, H. 2009. Analysis of adaptation to high ethanol concentration in *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarray. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **32**, 681-688.
- French, S. L., Osheim, Y. N., Cioci, F., Nomura, M. and Beyer, A. L. 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1558-1568.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. 1995. Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell Biol.* **5**, 225-269.
- Hu, X. H., Wang, M. H., Tan, T., Li, J. R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R. M. and Luo, Z. W. 2007. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 1479-1487.
- Hummon, A. B., Lim, S. R., Difilippantonio, M. J. and Ried, T. 2007. Isolation and solubilization of proteins after TRIZOL extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques* **42**, 467-472.
- Inoue, T., Iefuji, H., Fujii, T., Soga, H. and Satoh, K. 2000. Cloning and characterization of a gene complementing the mutation of an ethanol-sensitive mutant of sake yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 229-236.
- Kim, M. J., Nam, S. W., Tamano, K., Machida, M., Kim, S. K. and Kim, Y. H. 2011. Optimization for production of exo- $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 427-432.
- Kim, Y. H., Ishikawa, D., Ho, P. H., Sugiyama, M., Kaneko, Y. and Haragima, S. 2006. Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast. *Nucleic. Acids Res.* **34**, 2914-2924.
- Ko J. K., Bak, J. S., Jung, M. W., Lee, H. J., Choi, I. G., Kim, T. H. and Kim, K. H. 2009. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresour. Technol.* **100**, 4374-4380.
- Kubota, S. Takeo, I., Kume, K., Kanai, M., Shitamukai, A., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Shimoi, H., Iefuji, H. and Hirata, D. 2004. Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 968-972.
- Park, A. H., Sugiyama, M., Harashima, S. and Kim, Y. H. 2012. Creation of an ethanol-tolerant yeast strain by genome reconstruction based on chromosome splitting technology. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 184-189.
- Park, A. H. and Kim, Y. H. 2013. Breeding of ethanol producing and tolerant *Saccharomyces cerevisiae* by using genome shuffling. *J. Life Sci.* **23**, 1192-1198.
- Stanley, G. and Hahn-Hägerdal, B. 2010. Fuel ethanol production from lignocellulosic raw materials using recombinant yeasts. In *Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries* (eds A. A. vertès, N. Qureshi, H. P. Blaschek and H. Yukawa). Blackwell Publishing Ltd., Oxford. UK.
- Takahashi, T., Shimoi, H. and Ito, K. 2001. Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 1112-1119.
- Van Voorst, F., Houghton-Larsen, J., Jønson, L., Kielland-Brandt, M. C. and Brandt, A. 2006. Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast* **23**, 351-359.
- Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L. and Rao, L. V. 2011. Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* **102**, 6473-6478.

## 초록 : 유전자 상호발현 조절을 통한 에탄올 내성 메커니즘의 규명

정희명<sup>1</sup> · 최호정<sup>2</sup> · 남수원<sup>1,2</sup> · 전승종<sup>1,2</sup> · 김연희<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 스마트바이오헬스학과, <sup>2</sup>동의대학교 생명공학과)

에탄올은 산업적으로 매우 가치 있는 물질이지만, 효모세포에 있어서 에탄올의 축적은 세포 독성과 목적산물의 생산성을 감소시키는 스트레스원이다. 따라서 효모세포에 있어서 에탄올 내성의 증가는 에탄올 생산성 증대와 밀접한 관계가 있는 중요한 요소라고 할 수 있다. 본 연구에서는 에탄올 내성을 증가시키기 위해 *YDJ1*과 *PEP5* 유전자를 목적 유전자로 선정하여 이들 유전자의 과발현과 과발현에 따른 상호발현조절을 분석하여 에탄올 내성 메커니즘의 일부를 해명하고자 한다. *YDJ1*과 *PEP5* 유전자를 *ADH1* promoter 하류에 연결시켜 pA-*YDJ1*과 pA-*PEP5* plasmid를 구축하고 각각 BY4742, BY4742  $\Delta ydj1$ 와 BY4742  $\Delta pep5$  균주에 도입하였다. *YDJ1*과 *PEP5* 유전자의 과발현에 의해서 BY4742  $\Delta ydj1$ /pA-*YDJ1*과 BY4742  $\Delta pep5$ /pA-*PEP5* 균주의 에탄올내성이 숙주세포의 수준까지 회복되었음을 확인 할 수 있었다. 이 두 유전자의 상호발현조절을 조사하기 위해, BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$  균주에서 *YDJ1*과 *PEP5* 유전자의 과발현을 시도해본 결과, BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-*YDJ1*, pA-*PEP5* 균주의 경우, 8% 에탄올 배지에서 BY4742 균주의 약 90%정도 까지 에탄올 내성이 회복됨을 확인하였다. BY4742  $\Delta ydj1 \Delta pep5$ /pA-*YDJ1*, pA-*PEP5* 균주에서 *YDJ1* 유전자는 *PEP5* 유전자의 과발현을 더욱더 유도하여 에탄올 내성을 증가시켰으며, 이는 *YDJ1* 유전자가 *PEP5* 유전자의 상위에서 발현을 부분적으로 조절한다고 생각 할 수 있다.