

System for Repeated Integration of Various Gene Expression Cassettes in the Yeast Chromosome

Yeon-Hee Kim*

Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Korea

Received August 31, 2018 / Revised October 1, 2018 / Accepted October 4, 2018

In this study, a repeated yeast integrative plasmid (R-YIp) harboring Cre/loxP system was constructed to integrate various gene expression cassettes into the yeast chromosome. The R-YIp system contains a reusable selective marker (*CgTRP1*), loxP sequence, and target sequence for integration. Therefore, many gene expression cassettes can be integrated into the same position of the same yeast chromosome. In the present study, several model enzymes involving xylan/xylose metabolism were examined, including endoxylanase (*XYLP*), β -xylosidase (*XYLB*), xylose reductase (*GRE3*) and xylitol dehydrogenase (*XYL2*). Efficient expression of these genes was obtained using two promoters (*GAL10p* and *ADH1p*) and various plasmids (pGMF-GENE and pAMF-GENE plasmids) were constructed. The *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*, and *XYL2* genes were efficiently expressed under the control of the *GAL10* promoter. Subsequently, R-YIps containing the *GAL10p*-GENE-*GAL7t* cassette were constructed, resulting in pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, and pRS-Xyl2 plasmids. These plasmids were sequentially integrated into chromosome VII of a *Saccharomyces cerevisiae* strain by repeated gene integration and selective marker rescue. These genes were integrated by the R-YIp system and were stably expressed in the yeast transformants to produce active recombinant enzymes. Therefore, we expect that the R-YIp system will be able to overcome current limitations of the host cells and allow selective marker selection for the integration of various genes into the yeast chromosome.

Key words : *Candida glabrata* selective marker, Cre/loxP system, *GAL10* promoter, repeated yeast integration, *Saccharomyces cerevisiae*

서 론

Saccharomyces cerevisiae (출아효모)는 제약산업, 에탄올 생산 및 다양한 바이오매스의 생산 까지 넓은 범위에서 산업적으로 중요한 산업미생물이며, 유전학적, 분자생물학적 연구가 상당히 진행되어 있는 미생물로 알려져 있다. 출아효모가 다양한 분야에서 산업적으로 활용되기 위해서는 유용한 외래유전자를 안정적으로 도입하고 유지시킬 수 있는 능력이 필요하게 되는데 이는 대부분의 대규모 생산시설에서 재조합효모를 이용한 효소 및 바이오매스 생산에 복합배지(complex medium)를 주로 사용하기 때문이다. 출아효모에서 외래유전자의 발현을 위해 주로 사용되는 발현시스템은 YEp (yeast episomal plasmid, high copy number plasmid)를 사용한 시스템으로 높은 발현율은 보이나 대규모 연속배양에서 세포분열 시 불안정해지는 경향이 많으며, plasmid를 안정적으로 유지

시키기 위해 선택적 조건(selective condition (medium))을 사용해야 한다는 단점이 있다[14, 15]. 따라서 숙주세포의 염색체에 발현시키고자 하는 목적유전자(target gene)를 직접 도입(integration)하는 방법이 출아효모에서 외래유전자를 안정적으로 발현시키는 효과적인 방법이라고 할 수 있다[11]. 유전자를 효모 염색체내에 도입하기 위해 주로 사용하는 YIp (yeast integrative plasmid) 시스템은 염색체내의 특정 부위에 원하는 유전자를 자유롭게 도입하는 것이 가능한 발현시스템이나 여러 개의 유전자를 염색체내에 순차적으로 도입(sequential integration)하기 위해서는 서로 다른 selective marker (선택 표지)를 가진 YIp system을 각각 구축해야 한다는 어려움이 생긴다. 때문에 재조합균주를 선별하기 위한 숙주세포의 선택 및 도입할 수 있는 유전자 갯수의 한계가 생기게 된다. 따라서 본 연구에서는 4개의 서로 다른 유전자를 하나의 염색체에 도입하기 위해 하나의 selective marker 만을 이용한 반복적 도입(repeated integration)을 시도하였다.

이전의 연구에서 효모염색체공학 기술의 하나인 Cre/loxP site-specific recombination system [18]을 이용한 PCR-mediated Chromosome Splitting (PCS) method를 개발하여 보고하였다. 이 시스템을 이용하여 염색체를 반복적으로 절단(split)하여 효모인공염색체(yeast artificial chromosome)를 작성하고 균주 선별을 위한 selective marker를 반복해서 사용하

*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.

였다[5, 9, 10]. 본 연구에서는 Cre/loxP site-specific recombination system을 도입한 R-YIp (Repeated-YIp) system으로 반복적이면서도 다양한 selective marker를 사용할 필요가 없는 유전자도입시스템을 구축하였다. R-YIp system에는 Cre/loxP system과 CgTRP1 selective marker를 가지고 있도록 디자인하였다. Cre/loxP system은 CRE recombinase와 34 bp loxP 서열을 CgMARKER (*Candida glabrata* 유래의 selective marker)의 양쪽에 가지고 있는 selective marker (loxP-CgMARKER-loxP)를 이용하는 system으로, CRE recombinase의 발현유도에 의해 CgMARKER 양쪽의 loxP 서열간의 자발적인 재조합이 유도되어 loxP 서열 사이에 있는 CgMARKER가 pop-out되어 결실되는 방식이다. 본 연구에서는 CgMARKER로 *C. glabrata* 유래의 TRP1 유전자(CgTRP1)를 사용하였는데, CgTRP1 유전자는 *S. cerevisiae*의 TRP1 유전자와 낮은 염기서열 상동성(61%)을 가지면서도 세포내의 기능이 유사하여, 유전자도입 시 integrative plasmid와 효모 염색체내의 TRP1 유전자좌(loci)와 비정상적인 재조합이 일어나는 것을 피하기 위해 사용되었다.

본 연구에서는 R-YIp system의 구축을 위해 모델 유전자로 xylan/xylose 대사에 관련된 4개의 유전자를 선택하였다. 지구온난화 및 석유고갈로 인한 환경문제와 제한된 에너지원 문제를 해결하고자 전 세계적으로 새로운 biofuel의 개발이 진행되고 있고, 다양한 바이오매스로부터 바이오에탄올, 바이오부탄올, 바이오가스 등 다양한 biofuel의 생산이 보고되고 있다. 하지만 효율적인 에탄올 생산균주로 알려져 있는 *S. cerevisiae*는 값싸고 풍부한 lignocellulosic materials (biomass)로부터 에탄올 생산을 위해 적합한 xylose를 발효할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 woody plant materials로부터 xylose를 효율적으로 발효할 수 있는 *S. cerevisiae*는 효과적인 biofuel 생산에 직접적으로 사용될 수 있으므로, 이러한 균주의 구축이 주요한 산업적 관심사가 되고 있다[3, 19]. 본 연구에서는 lignocellulosic biomass 중 hemicellulose를 구성하고 있는 xylan (β -1,4-linked monomers로 구성된 다당)를 발효 가능한

당으로 분해하기 위해 필요한 여러 가지 효소 중 대표적인 4가지의 효소(endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase, and xylitol dehydrogenase)를 코딩하는 유전자를 R-YIp system에 도입하였다. Xylan을 xylose로 단당화하기 위한 1차적인 효소인 β -1,4-endoxylanase와 β -xylosidase를 각각 코딩하는 XYLP 유전자와 XYLB 유전자를 사용하였고, xylose를 xylitol로 환원시키는 xylose reductase (XR)를 코딩하는 XYL1 (GRE3) 유전자와 xylitol을 xylulose로 산화시키는 xylitol dehydrogenase (XDH)를 코딩하는 XYL2 유전자를 사용하여 효모염색체내에 반복적이면서 안정적으로 유전자를 도입하고 동시에 재조합 효소를 효율적으로 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주

Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *Escherichia coli* 숙주세포는 DH5 α 를 사용하였고, 효모 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 (*MATa ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2 Δ 9*)의 TRP1 (ORF 0.7kb) 유전자가 *KanMX* 유전자로 대체되어 TRP1 유전자가 결실된 SEY2102 Δ trp1 균주를 사용하였다. *Bacillus* sp. KK-1 [2]와 *Pichia stipitis* KCTC7230 (wild type strain) 균주(genomic DNA)는 XYLB 유전자와 XYL2 유전자의 PCR을 위한 주형으로 사용되었다.

재조합 발현 plasmid (YEp and YIp)구축

XYLB, GRE3 (YHR104W)와 XYL2 유전자의 효율적인 발현을 위해 pGMF-XylB, pGMF-Gre3 그리고 pGMF-Xyl2 plasmid를 구축하였다. 본 연구에 사용된 plasmid는 Table 1에 나타내었다. 각각의 유전자는 galactose에 의해 발현이 유도되는 GAL10 promoter를 가지고 있는 pGMF-XylP plasmid [6]를 vector로 사용하였다. pGMF-XylB plasmid는 pGMF-XylP vector의 *XbaI-SalI* site에 1.6 kb XYLB 유전자를 삽입하여 구축되었는데, XYLB 유전자는 *Bacillus* sp. KK-1균주의 genomic

Table 1. Plasmids list used in this study

Plasmids	Descriptions
pGMF-XylP	XYLP gene expression cassette (<i>GAL10p-MFas.s-XYLP-GAL7t</i>) [6]
pGMF-XylB	XYLB gene expression cassette (<i>GAL10p-MFas.s-XYLB-GAL7t</i>)
pGMF-Gre3	GRE3 gene expression cassette (<i>GAL10p-MFas.s-GRE3-GAL7t</i>)
pGMF-Xyl2	XYL2 gene expression cassette (<i>GAL10p-MFas.s-XYL2-GAL7t</i>)
pRS306	YIp type vector, URA3 selective marker [17]
pRS-CgTRP1	pRS306/ CgTRP1 selective marker
pRS-PMT6	pRS306/ CgTRP1 selective marker, target gene (PMT6)
pRS-XylP	XYLP gene expression cassette, CgTRP1 selective marker, target gene (PMT6)
pRS-XylB	XYLB gene expression cassette, CgTRP1 selective marker, target gene (PMT6)
pRS-Gre3	GRE3 gene expression cassette, CgTRP1 selective marker, target gene (PMT6)
pRS-Xyl2	XYL2 gene expression cassette, CgTRP1 selective marker, target gene (PMT6)
pSH47	CRE recombinase, URA3 selective marker [17]

Table 2. Oligonucleotides list used in this study

Oligonucleotides	Sequences (5'-3')
XYLB-F	CTCTCTAGATAAGAGAAAAATTATCAATCC
XYLB-R	GCACTCGAGTCATAGCTCTTTATAC
GRE3-F	AGGTGTTCCCTAGATAAGAGATCTTCACTGGTACT
GRE3-R	TTCGTTCAAGTCGACTCAGGCAAAAGTGGG
XYL2-F	AGGTGTTCCCTAGATAAGAGAACTGCTAACCCCTCC
XYL2-R	TTCGTTCAAGTCGACTTACTCAGGGCCGTC
PMT6-F	ACCGCGGTGGAGCTCTTCTCTTCAATAACG
PMT6-R	GGAACCTAGAGGCTATAACATGTGTAGAGG
pBlue-F	CTACACATGTATAGGCCTCATCGCTTCGCTGATTA
pBlue-R	AAAGGAACCTAGAGGTCGATAACGACACCGACAAT
pRSGAL-F	TTTTCTGTCTTCGAACATCGCTTCGCTGAT
pRSGAL-R	TTTTTATCTTTCGAATCGATAACGACACCG

DNA를 주형으로 XYLB-F와XYLB-R primer set를 이용하여 PCR 증폭하였다. 본 연구에 사용된 oligonucleotide의 서열은 Table 2에 나타내었다. pGMF-Gre3와 pGMF-Xyl2 plasmid를 구축하기 위해서는 In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories, Inc. TAKARA)를 사용하였다. Vector와 20 bp extensions homologous 서열을 가지고 GRE3 유전자에 특이적인 서열을 가진 GRE3-F와 GRE3-R primer를 사용하여 *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp 균주의 genomic DNA를 주형으로 GRE3 유전자(984 bp)를 증폭하였다. XYL2 유전자도 XYL2-F와 XYL2-R primer를 사용하여 *P. stipitis* KCTC7230 균주의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 통해 XYL2 유전자(1.1 kb)를 증폭하였다. 증폭된 GRE3 유전자와 XYL2 유전자는 pGMF-XylP vector에 각각 ligation되었고, pGMF-Gre3와 pGMF-Xyl2 plasmid가 구축되었다. 이어서 XYLP, XYLB, GRE3 그리고 XYL2 유전자의 발현 cassette (*GAL10p*-GENEs-*GAL7*)는 각각 R-YIp에 도입되었다. 먼저 R-YIp의 vector를 만들기 위해 yeast integrative plasmid (YIp, pRS306 containing *URA3* selective marker) [17]의 selective marker인 *URA3* 유전자를 *loxP*-CgTRP1-*loxP* 유전자로 교체한 pRS-CgTRP1 plasmid를 구축하였다. *loxP*-CgTRP1-*loxP* 유전자는 효모형질 전환체의 반복적인 선별을 가능하게 하는 reusable selective marker로서 pSKcT plasmid [17]를 주형으로 pBlue-F/pBlue-R primer set을 이용하여 증폭되었다. 또한 pRS-CgTRP1 plasmid에 효모 7번염색체상에 있는 *PMT6* 유전자를 도입하여 pRS-PMT6 plasmid (5.9 kb)를 구축하였는데, *PMT6* 유전자는 homologous recombination을 통한 YIp integration을 위한 목적유전자(target gene, target region)로 사용되었다. *PMT6* 유전자는 *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp1 균주의 genomic DNA를 주형으로 사용하였고, PMT6-F/PMT6-R primer set를 이용해 증폭하여 pRS-CgTRP1 vector에 삽입되었다. 최종적으로 XYLP, XYLB, GRE3 그리고 XYL2 유전자의 발현 cassette는 각각 pRSGAL-F/pRSGAL-R primer set를 이용해 증폭되어 pRS-PMT6 vector에 도입되었고, pRS-XylP,

pRS-XylB, pRS-Gre3 그리고 pRS-Xyl2 plasmid를 구축하였다. 이렇게 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5 α 에서 증폭, 추출 (plasmid purification kit (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea))되었고, 구축된 plasmid의 연결서열 및 유전자의 서열은 ABI 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통해 분석, 확인하였다.

효모형질전환, 배지 조성 및 배양조건

S. cerevisiae 균주에 YEp (pGMF-XylP, pGMF-XylB, pGMF-Gre3 and pGMF-Xyl2 plasmid)를 도입하기 위해서 salmon testes 유래의 single-stranded carrier DNA를 사용하는 high efficiency transformation법[4]을 이용하였다. Integrative plasmids (pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, and pRS-Xyl2)의 형질 전환을 위해서는 각각의 plasmid를 *AccIII* 제한효소(*PMT6* 유전자내의 제한효소)로 선형화한 후, *S. cerevisiae* SEY2102 Δ trp 균주의 7번염색체내에 integration하여 Trp⁺ 형질전환체를 선별하였다. Trp⁺ 형질전환체의 선별을 위해 synthetic complete (SC) 배지 (SC-TRP, 6.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids (YNB), 20 g/l dextrose, appropriate amino acids (20 mg/l uracil, 100 mg/l leucine, 20 mg/l histidine), and 15 g/l agar)를 사용하였다. *S. cerevisiae* 균주의 증식배지로는 YPD 배지(10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 20 g/l dextrose)를 사용하였으며, 효모에 도입된 각 유전자의 발현을 유도하기 위해서는 YPDG 배지(10 g/l yeast extract, 20 g/l peptone, 10 g/l dextrose, 10 g/l galactose)를 사용하였다. 반복적인 유전자 도입을 위해 YPD-5-FOA (YPD medium containing 0.1% 5-fluoroorotic acid (5-FOA))의 배지에서 uracil auxotrophs를 선별하였다. 재조합 효모 균주는 5 ml YPD 배지에서 16~24시간 동안 전배양 한 후 50 ml YPDG 배지에 접종(initial OD₆₀₀ 0.1)하여 30°C, 190 rpm에서 48시간 배양하였다.

효소활성 측정

Endoxylanase 효소활성 측정은 xylan을 분해해서 생성된

reducing sugar (xylose)를 분석하는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 법[12]을 사용하였다. 50 μ l의 효소액을 400 μ l의 1% birchwood xylan (Sigma)과 50 μ l의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)와 혼합하여 50°C에서 15분간 반응시키고, DNS solution 첨가 후 boiling하여 540 nm의 흡광도에서 흡광값을 측정하였다. 1 unit는 1분간 1 μ mole의 환원당 (xylose)을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다. β -xylosidase의 활성측정을 위해서는 p -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (p NPX (N2132), sigma)를 기질로 사용하였다. 450 μ l의 5 mM p NPX (in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5))와 50 μ l의 효소액을 혼합하여 40°C에서 10분간 반응시킨 후, 500 μ l의 0.5 M Na_2CO_3 를 첨가하여 반응을 정지시키고, 분해되어 나온 p -nitrophenol을 405 nm의 흡광도에서 측정하였다[2]. 1 unit는 1분간 1 μ mole의 p -nitrophenol생산을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다. Xylose reductase의 효소활성은 700 μ l의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5), 100 μ l의 효소액, 100 μ l의 2 mM NADPH와 100 μ l의 1 M xylose 기질을 포함한 반응액에서 측정되었다. Xylose가 없는 반응액을 25°C에서 1분간 반응시킨 후, xylose를 첨가하고 340 nm 흡광도에서 10분간 흡광값의 변화를 모니터링하였다[8]. Xylose reductase 활성의 1unit는 1분당 1 μ mol의 NADPH를 전환(산화)하는 양으로 정의하였다. Xylitol dehydrogenase의 효소활성 측정은 700 μ l의 50 mM Tris buffer (pH 9.0), 100 μ l의 효소액, 100 μ l의 2 mM NAD(P)⁺를 포함하는 반응액을 1분간 25°C에서 반응하고, 100 μ l의 1 M xylitol의 기질을 첨가한 후 340 nm에서의 흡광값의 변화량을 2분간 모니터링하여 측정하였다[8]. 1 unit는 1분간 1 μ mol NAD(P)⁺를 전환하는 효소의 양으로 정의하였다. Protein 농도는 Bradford법[1]으로 정량하였고, BSA (Bovine Serum Albumin)를 표준물질로 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml의 양만큼 첨가하여 표준적정곡선을 작성하였다.

Pulse field gel electrophoresis와 Southern hybridization

효모형질전환체들의 karyotype (핵형) 및 각각 도입한 유전자가 7번 염색체의 위치에 제대로 integration되어 있는지를 분석하기 위해 pulse field gel electrophoresis (PFGE)와 Southern hybridization을 실시하였다. PFGE를 위해 먼저 각 균주의 chromosomal DNA는 Sheehan and Weiss [16]에서 사용된 방법으로 1% low melting agarose (Sigma)를 사용해 DNA plug형태로 만들어 준비하였다. Chromosomal DNA는 CHEF-DRIII system (Bio-Rad Laboratories)를 사용하여 0.5x TBE buffer에 1% gold agarose (pulsed field certified agarose; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) gel에서 분리하였다. CHEF gel electrophoresis의 조건은 120°의 angle로 6.0 V/cm에서 15시간 동안 60초의 interval로 switching 후, 6.0

V/cm에서 9시간 동안 90초의 interval로 switching하였다. 전기영동 후 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide (EtBr)로 염색 후 UV상에서 karyotype을 확인하였다. Southern hybridization을 위해 DNA를 Hybond-N+ membranes (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 transfer하였고 probe DNA는 *PMT6*, *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*, *XYL2* 유전자의 PCR 산물을 사용하였다. Probe의 labelling과 signal detection은 ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling와 Detection system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

XYLP, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자의 발현시스템 선별

*S. cerevisiae*는 고등생물세포와 유사한 번역 후 수식계가 있어 folding, disulfide 결합 등 단백질의 구조와 기능을 천연상태로 생산할 수 있으며, 대장균에 비해 유전자 재조합단백질을 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산할 수도 있다[13]. 따라서 효모세포를 이용한 재조합단백질의 생산을 위해서는 분비서열을 사용한 단백질의 분비를 유도하거나 발현시키고자 하는 유전자의 특성에 따라 발현에 적합한 promoter (constitutive or inducible promoter)와 유전자의 combination을 선택해야 한다[7]. 그러므로 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자의 발현에 적합한 promoter를 알아보기 위해 pAMF-XyIP, pAMF-XyIB, pAMF-Gre3와 pAMF-Xyl2 plasmid를 추가로 구축하였다. 이들 plasmid는 galactose에 의해서 유도되는 *GAL10* promoter 대신에 *ADH1* (alcohol dehydrogenase, constitutive) promoter를 가지고 있는 plasmid로서 세포증식과 함께 항상적으로 유전자의 발현을 유도할 수 있는 promoter이다. 따라서 promoter에 따른 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자 발현에 의한 효소활성을 비교 조사해보았다. *GAL10* promoter를 가진 형질전환주들은 galactose가 첨가된 YPDG 배지를 사용하였으며, *ADH1* promoter를 가진 형질전환주들은 YPD 배지를 사용하여 48시간 동안 배양하였다. 그 결과, 4개의 유전자 모두 *GAL10* promoter를 사용한 발현에서 *ADH1* promoter를 사용하여 발현한 경우보다 재조합 효소의 활성이 1.6배에서 최대 8배까지 높게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 결과로부터 xylan 대사에 관여하는 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자의 발현에 대해서는 *GAL10* promoter에 의한 발현유도가 더 적합하다고 판단하여, R-YIp system구축을 위해서 *GAL10p-GENEs-GAL7t*의 발현 cassette를 사용하였다.

유전자의 sequential integration을 위한 R-YIp system

GAL10 promoter에 의해 발현이 유도되는 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자를 효모염색체내에 안정적으로 도입하기 위한 R-YIp system을 구축하기 위해, 각각의 유전자 발현

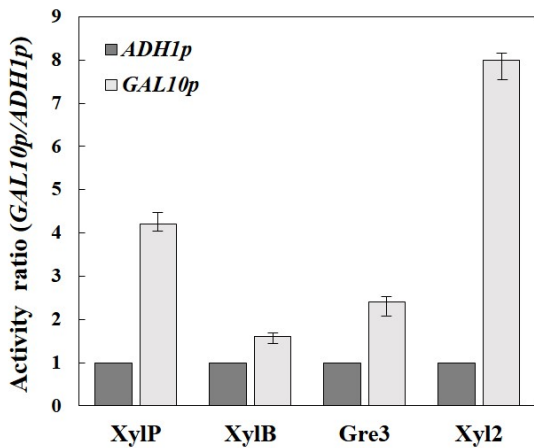


Fig. 1. Comparison for strength of *GAL10* promoter and *ADH1* promoter in *SEY2102*Δ*trp1*/pAMF-Xylp and *SEY2102*Δ*trp1*/pGMF-Xylp, *SEY2102*Δ*trp1*/pAMF-XylB and *SEY2102*Δ*trp1*/pGMF-XylB, *SEY2102*Δ*trp1*/pAMF-Gre3 and *SEY2102*Δ*trp1*/pGMF-Gre3, *SEY2102*Δ*trp1*/pAMF-Xyl2 and *SEY2102*Δ*trp1*/pGMF-Xyl2 transformants, respectively.

cassette는 pRS-PMT6 vector에 In-fusion cloning을 통해 cloning되었고, pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 그리고 pRS-Xyl2 plasmid가 구축되었다(Fig. 2A). 이 plasmid에는 sequential integration을 위한 selective marker로서 *loxP*-*CgTRP1*-*loxP* marker를 포함하고 있다. *LoxP*서열간의 재조합을 유도하기 위해 CRE recombinase를 발현하는 pSH47 plasmid를 사용하였고, CRE 유전자는 galactose에 의해 유도 발현되도록 설계되었다[17]. 먼저 pRS-XylP plasmid를 *PMT6* target sequence 내에 유일하게 존재하는 *AccIII* 제한효소로 선형화 한 후, *S. cerevisiae* *SEY2102*Δ*trp* 균주에 형질전환하여 SC-TRP배지에서 Trp⁺ 형질전환체를 선별하여 *SEY2102*Δ*trp*/pRS-XylP (designated Strain P) 균주를 구축하였다. 다음으로 pRS-XylB plasmid를 도입하기 위해 P 균주의 *CgTRP1* selective marker

를 CRE recombinase를 발현시켜 제거(pop-out)하였다. CRE recombinase의 발현을 위해 도입된 pSH47 plasmid는 5-FOA 배지의 사용(uracil auxotroph selection)에 의해 결실시키고, 선형화 된 pRS-XylB plasmid를 P균주에 형질전환하여 *SEY2102*Δ*trp*/pRS-XylP, pRS-XylB (designated Strain PB) 균주를 구축하였다. 이어서 pRS-Gre3와 pRS-Xyl2 plasmid도 같은 방법으로 효모염색체내에 도입하여, 최종적으로 *SEY2102*Δ*trp*/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 (designated Strain PBG) 균주와 *SEY2102*Δ*trp*/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, pRS-Xyl2 (designated Strain PBG2) 균주를 구축하였다(Fig. 2B).

R-Ylp system을 통해 도입된 유전자의 확인 및 효소활성 분석

pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 그리고 pRS-Xyl2 plasmid를 순차적으로 형질전환하여 구축한 P 균주, PB 균주, PBG 균주, 그리고 PBG2 균주의 염색체내에 도입된 각각의 유전자가 제대로 발현이 되었는지 알아보았다. 유전자 발현유도를 위해 각 균주들을 YPDG 배지에서 48시간 동안 baffled-flask 배양하여 endoxylanase, β-xylosidase, xylose reductase 그리고 xylitol dehydrogenase의 활성을 분석해 보았다(Table 3). 처음으로 염색체내에 도입한 *XYLP* 유전자의 의한 endoxylanase의 활성은 13.37 unit/ml로 *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자를 순차적으로 도입하는 여러 과정을 거치면서도 P균주에서부터 PBG2균주의 구축에 있어서 endoxylanase활성을 잘 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다. β-xylosidase 효소활성의 경우에도 PB 균주, PBG 균주와 PBG2균에서 활성을 잘 유지하고 있었으며, PBG 균주에서 endoxylanase와 β-xylosidase 효소활성이 다소 감소하는 경향을 보였으나 최종 균주인 PBG2 균주에서 다시 활성을 회복하여 유전자 발현에 문제가 없음을 확인하였다. *GRE3*와 *XYL2* 유전자를 추가로 도입한 PBG균주와 PBG2 균주의 경우에도 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase의 활성을 확인 할 수 있어 정상적인 유전자의

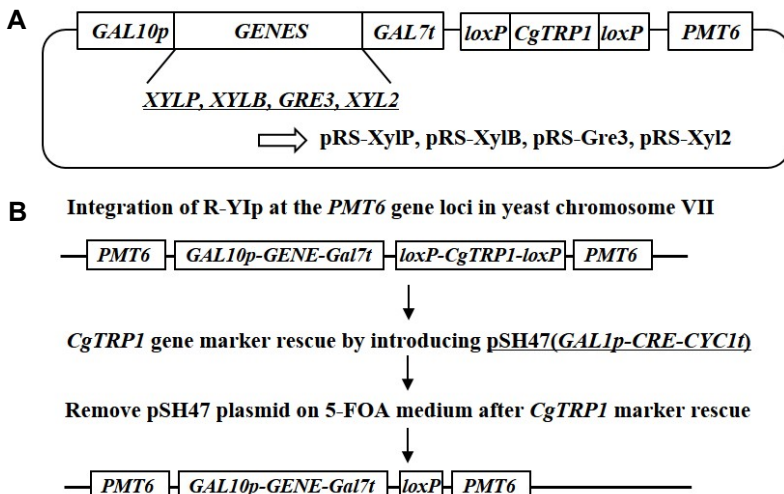


Fig. 2. Schematic of the R-Ylps; pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 and pRS-Xyl2 plasmid (A) and procedure for repeated integration of foreign genes expression cassette by Cre/*loxP* system (B). *CgTRP1* : *TRP1* gene of *C. glabrata*, *loxP* : ATAACCTCGT ATAATGTATGCTATACGAAGTTAT (for sequential integration).

Table 3. Comparison of cell growth, endoxylanase, β -xylosidase, xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) activity in each transformant. Each transformant was cultivated in YPDG medium for 48 hr

Strains*	Dry cell weight (DCW)	Endoxylanase activity (unit/ml)	β -xylosidase activity (unit/ml)	XR activity (unit/mg)	XDH activity (unit/mg)
P	4.85	13.37	-	-	-
PB	5.63	14.23	0.28	-	-
PBG	5.51	11.28	0.14	0.13	-
PBG2	5.74	13.14	0.22	0.14	0.015

* Strain P; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP transformant.
 Strain PB; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB transformant.
 Strain PBG; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 transformant.
 Strain PBG2; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, pRS-Xyl2 transformant.

발현이 유도되었음을 확인 할 수 있었다. 같은 염색체의 동일한 위치에서 반복적인 유전자 integration을 유도하는 경우, target gene (region)으로 사용한 유전자의 copy number가 증가하게 되어 유전자의 과발현이 발생되는데, 이를 막기 위해 R-YIp system에는 2.2 kb의 *PMT6* 유전자의 5'말단에서 1 kb만을 target region으로 사용하여 정상적으로 발현 가능한 *PMT6* 유전자의 copy number 증가를 막을 수 있도록 설계하였다. 하지만 부분적인 *PMT6* 유전자간의 homologous recombination (상동성재조합)이 일어날 가능성도 배제할 수 없다. 이런 경우는 도입한 유전자 및 R-YIp system 자체가 염색체로부터 pop-out 될 수도 있다. 따라서 P 균주, PB 균주, PBG 균주와 PBG2 균주에 도입된 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*와 *XYL2* 유전자의 위치 및 karyotype을 PFGE와 Southern hybridization법을 통해 확인해보았다. 먼저 각 형질 전환주로부터 chromosomal DNA plug를 제작하여 PFGE를 실시하고, Southern hybridization을 위해 *PMT6*, *XYLP*, *XYLB*, *GRE3*, *XYL2* 유전자의 약 0.5~1 kb 정도 크기의 DNA를 추출하여 probe DNA로 사용하였다. Fig. 3에 나타난 것처럼, *PMT6* 유전자를 probe로 사용한 경우는 숙주세포(SEY

2102 Δ trp)를 포함한 모든 형질전환주에서 7번 염색체상의 *PMT6* 유전자가 검출됨을 확인하였다. *XYLP* 유전자를 probe로 사용한 경우에는 숙주세포를 제외한 P 균주, PB 균주, PBG 균주와 PBG2 균주에서 *XYLP* 유전자의 band를 확인할 수 있었고, *XYLB* 유전자를 probe로 사용한 경우에는 숙주세포와 P 균주를 제외한 PB 균주, PBG 균주와 PBG2 균주에서 *XYLB* 유전자의 band를 확인할 수 있었다. *GRE3* 유전자를 probe로 사용한 경우는 원래 숙주세포의 8번 염색체(562 kb)에 *GRE3* 유전자가 존재하기 때문에 모든 균주에서 positive control로 8번 염색체 위치의 original *GRE3* 유전자의 band가 검출되었고, PBG 균주와 PBG2 균주에서 추가로 도입된 *GRE3* 유전자 band를 확인할 수 있었다. *XYL2* 유전자를 probe로 사용한 경우는 PBG2 균주에서만 *XYL2* 유전자의 band를 확인할 수 있어 의도한 목적 염색체와 위치에 정확히 R-YIp system이 도입되었음을 확인하였다. *S. cerevisiae*의 경우에 세포분열 및 증식 중에 homologous recombination이 매우 활발히 일어나 유전자의 발현조절이나 다양한 스트레스 환경에 적응한다고 알려져 있다. *GRE3* 유전자의 경우에도 7번 염색체에 도입된 pRS-Gre3 plasmid와 8번 염색체에 있는 original *GRE3* 유전

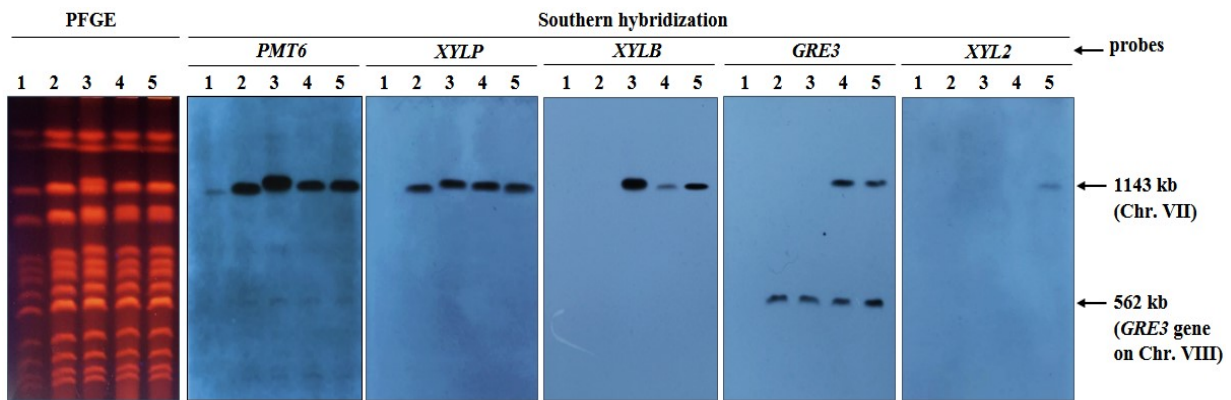


Fig. 3. Confirmation of integration position of each gene by PFGE and Southern hybridization. *PMT6*, *XYLP*, *XYLB*, *GRE3* and *XYL2* genes were used as probe. Lane 1; SEY2102 Δ trp (Host strain), lane 2; 2102 Δ trp/pRS-XylP (P), lane 3; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB (PB), lane 4; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3 (PBG), lane 5; SEY2102 Δ trp/pRS-XylP, pRS-XylB, pRS-Gre3, pRS-Xyl2 (PBG2) transformant

자와의 homologous recombination이 일어날 수도 있고, 또는 pRS- Gre3 plasmid가 비정상적으로 8번염색체의 GRE3 유전자좌에 integration이 될 가능성도 생각할 수 있다. 하지만 Fig. 3의 결과에서처럼 7번 염색체와 8번염색체의 GRE3 유전자의 band signal의 intensity가 동일한 것으로 보여져 pRS-Gre3 plasmid는 의도한대로 7번 염색체의 PMT6 유전자좌에 integration되었음을 알 수 있었다.

따라서 본 연구에서 구축한 R-YIp system을 통해 하나의 selective marker (CgTRP1 gene)를 사용하여 반복적으로 4개의 서로 다른 유전자(XYLP, XYLB, GRE3, XYL2 유전자)를 하나의 효모염색체상에 순차적으로 도입하였고, 각각의 유전자는 활성형의 재조합효소를 생산함을 확인하였다. 본 system에는 비정상적인 homologous recombination의 발생을 막기 위해 *C. glabrata*의 selective marker를 사용하였으며, target gene의 copy number 증가에 의한 과발현 억제도 고려되었다. 또한 여러 유전자의 도입에 있어 제한이 되는 selective marker를 하나만 사용해도 반복적인 다수의 유전자 도입이 가능하므로 다양한 균주를 숙주세포로 사용할 수 있는 가능성이 높아졌다고 할 수 있다. 원핵세포에서는 관련된 대사경로에 있는 유전자군(gene cluster)이 하나의 promoter 하류에 연결되어 있는 operon을 구성하여 각각의 유전자를 조절, 발현되고 있다. 진핵세포에서는 이러한 시스템이 존재하지 않아 하나의 유전자에 하나의 promoter가 연결되어 있는 발현 cassette (one promoter-one gene)를 구성하고, 동일한 염색체가 아닌 서로 다른 염색체에 관련된 유전자들이 분포하는 경향이 있으며 복잡한 조절시스템을 가지고 있다. 따라서 R-YIp system을 통해 하나의 대사경로에 있는 다수의 유전자 cassette를 하나의 염색체 위에 인공적으로 나열하고 이를 인공적으로 염색체화하는 방법으로 새로운 효모균주의 육종이 가능할 것이며 다양한 산업에 안정적으로 발현되는 유전자군을 가진 균주의 제작에도 유용하게 이용될 수 있을 것이라 기대한다.

References

- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chun, Y. C., Jung, K. H., Lee, J. C., Park, S. H., Chung, H. K. and Yoon, K. H. 1998. Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 28-33.
- Eliasson, A., Christensson, C., Wahlbom, C. F. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Anaerobic xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in mineral medium chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3381-3386.
- Gietz, R. D. and Schiestl, R. H. 1995. Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 225-269.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. and Heemann, J. H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2519-2524.
- Kim, M. J., Kim, B. H., Nam, S. W., Choi, E. S., Shin, D. H., Cho, H. Y., Son, K. H., Park, H. Y. and Kim, Y. H. 2013. Efficient secretory expression of recombinant endoxylanase from *Bacillus* sp. HY-20 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **23**, 863-868.
- Kim, M. J., Nam, S. W., Tamano, K., Machida, M., Kim, S. K. and Kim, Y. H. 2011. Optimization for production of exo- β -1,3-glucanase (laminarinase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 427-432.
- Kim, S. R., Kwee, N. R., Kim, B. and Jin, Y. S. 2013. Feasibility of xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* overexpressing endogenous aldose reductase (GRE3), xylitol dehydrogenase (XYL2), and xylulose kinase (XYL3) from *Scheffersomyces stipitis*. *FEMS. Yeast Res.* **13**, 312-321.
- Kim, Y. H., Ishikawa, D., Ha, H. P., Sugiyama, M., Kaneko, Y. and Harashima, S. 2006. Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2914-2924.
- Kim, Y. H., Sugiyama, M., Yamagishi, K., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A. and Harashima, S. 2005. A versatile and general splitting technology for generating targeted YAC subclones. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 65-70.
- Lee, F. W. and Da Silva, N. A. 1997. Sequential delta-integration for the regulated insertion of cloned genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **13**, 368-373.
- Lee, L. H., Kim, D. Y., Han, M. K., Oh, H. W., Ham, S. J., Park, D. S., Bae, K. S., Sok, D. E., Shin, D. H., Son, K. H. and Park, H. Y. 2009. Characterization of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. HY-20, a bacterium in the gut of *Apis mellifera*. *Kor. J. Microbiol.* **45**, 332-338.
- Lim, M. Y., Lee, J. W., Lee, J. H., Kim, Y. H., Seo, J. H. and Nam, S. W. 2007. Secretory overexpression of clostridium endoglucanase A in *Saccharomyces cerevisiae* using GAL10 promoter and exoinulinase signal sequence. *J. Life Sci.* **17**, 1248-1254.
- Murray, A. W. and Szostak, J. W. 1983. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* **34**, 961-970.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. and Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Sheehan, C. and Weiss, A. S. 1990. Yeast artificial chromosomes: rapid extraction for high resolution analysis. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2193.
- Sugiyama, M., Ikushima, S., Nakazawa, T., Kaneko, Y. and Harashima, S. 2005. PCR-mediated repeated chromosome splitting in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioTechniques* **38**, 909-914.
- Sugiyama, M., Nishizawa, M., Hayashi, K., Kaneko, Y., Fukui, K., Kobayashi, A. and Harashima, S. 2003. Repeated chromosome splitting targeted to delta sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 397-400.
- Zhang, J., Tian, S., Zhang, Y. and Yang, X. 2008. Construction of a recombinant *S. cerevisiae* expressing a fusion protein and study on the effect of converting xylose and glucose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **150**, 185-192.

초록 : 효모염색체내에 다양한 유전자발현 cassette의 반복적 integration을 위한 system 구축

김연희*

(동의대학교 바이오응용공학부 의생명공학전공)

본 연구에서는 효모염색체내에 다양한 유전자 발현 cassette를 도입하기 위해 Cre/loxP system을 가진 repeated yeast integrative plasmid (R-YIp)를 구축하였다. R-YIp는 반복적으로 형질전환체를 선별할 수 있는 selective marker (*CgTRP1*)와 loxP 서열, 그리고 integration을 위한 목적서열을 함유하고 있어 같은 염색체의 동일한 위치에 여러 개의 유전자 발현 cassette를 도입하는 것이 가능하다. 따라서 xylan/xylose 대사에 관련된 endoxylanase (*XYLP*), β -xylosidase (*XYLB*), xylose reductase (*GRE3*) 그리고 xylitol dehydrogenase (*XYL2*)의 효모염색체내에 도입을 시도하였다. 먼저 *XYLP*, *XYLB*, *GRE3* 그리고 *XYL2* 유전자의 효율적인 발현을 위한 promoter를 선별하기 위해 pGMF-GENE과 pAMF-GENE plasmid를 구축하였고, 각 유전자들의 발현에 *GAL10* promoter가 적합함을 확인하였다. 다음으로 *GAL10p-GENE-GAL7t* cassette를 가진 pRS-GENE plasmid (R-YIp)를 구축하여, 반복적 integration 과정과 selective marker의 제거를 통해 각각의 R-YIps를 효모 7번염색체에 순차적으로 도입하였다. R-YIp system을 통해 효모염색체내에 도입된 유전자들은 모두 안정적으로 발현되었고, 활성형의 재조합효소를 생산함을 확인할 수 있었다. 따라서 다수의 외래유전자를 효모염색체내 도입함에 있어 selective marker와 숙주세포 선택의 한계를 R-YIp system을 통해 어느 정도 극복할 수 있을 것이라 기대한다.