

효모 HIS_5 유전자에 관한 연구
—*Saccharomyces cerevisiae*의 HIS_5-lacZ 융합과 조절—

鄭 東 孝·大嶋泰治*·西脇清二*

중앙대학교 산업대학 식품가공학과

*오사카대학 공학부 발효공학과

(1984년 12월 29일 수리)

Studies on the HIS_5 Gene of Yeast
— HIS_5-lacZ fusion and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*—

Dong Hyo Chung · Yasuji Oshima and Kyoni Nishiwaki

Department of Food Science and Technology, College of Industry

Chung-ang University, Korea *Department of Fermentation Technology,

Faculty of Engineering, Osaka University, Japan

Abstract

HIS_5 gene of *Saccharomyces cerevisiae* was cloned into pBR 322 and also into pSH 610 shuttle vector. HIS_5 gene was expressed as promoter of lactose operon ($lacZ$). And HIS_5-lacZ fusion was intergrated into chromosome III of yeast. HIS_5 gene in yeast growth was controlled general amino acid control mechanism.

서 론

근간 대장균과 같은 원시핵세포의 세균을 이용한 재조합 DNA 실험기술이 발전됨에 따라 효모와 같은 진핵세포는 물론 직접 재배식물, 동물 혹은 사람 배양세포도 연구재료로써 많이 쓰이게 되었다. 특히 효모와 같은 미생물은 고등동물에 비교하여 유전해석이 용이한 연구재료임으로 유전공학 연구에 있어서는 숙주세포로서 많이 사용되어 온 것이다.

1978년에 Hinnene¹⁾ 등에 의하여 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 형질전환법이 확립된 이래, 효모에 내재하는 plasmid (2 μ m DNA)나 염색체

DNA의 복제개시점 (ARS, autonomously replicating sequence)을 사용한 vector가 차츰 개발되어 효모의 유전자 조작의 연구는 급진되었다. 효모를 DNA 재조합 연구의 숙주로서 사용하는 의의는 여러가지가 있으나 특히 풍부한 유전학적인 자원이 축적되어 있고 세포의 구조나 기능, 유전자의 복제, 전사, 번역기구 등 여러가지 점에서 고등생물의 특징을 갖추어 있고 고등생물의 생명현상을 해석하는데 최적의 재료이며 식품 양조, 사료, 의약품원료 생산의 유용한 미생물로서 인간의 생활과는 떨어질 수 없는 존재이다.

지금까지 분리된 효모유전자는 tryptophan 유전자 ($TRP1$ ²⁾ $TRP2$ $TRP3$ ^{3,4)} $TRP5$ ⁵⁾, arginine 유전자 ($ARG4$ ⁶⁾, histidine 유전자 ($HIS1$ ⁷⁾,

*HIS3*⁸⁻¹²), *HIS4*¹³⁻¹⁶), *HIS5*¹⁷), leucine 유전자 (*LEU2*^{18,19,46}) 등의 아미노산 합성계의 효소 유전자, uracil(*URA3*²⁰) 등의 핵산염기 합성효소 유전자, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase²¹나 3-phosphoglycerate kinase^{22,23} 등의 해당계효소 유전, galactose 유전자(*GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL40*, *GAL8*)²⁴⁻²⁶)와 alcohol dehydrogenase 유전자²⁷), *Ty912*²⁸)나 *MAT*^{29,30}) 등의 transposon 유전자 그리고 *L10*³¹), *L29*³²), *CRY1* 등³³)의 ribosome 단백질 유전자 이외에 *CYC1*^{34,35}), 산성 phosphatase 유전자³⁶) 등이 발견되어 있다.

특히 효모의 histidine 합성효소 유전자 중 *HIS1*은 ATP phosphoribosyltransferase를 code하고 *HIS 3*는 imidazoilyglycerolphosphate dehydrogenase (4.2.1.19)를 code하고, *HIS4*는 phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase, phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydro lase, histidinol dehydrogenase (CE. 1.1.1.23)의 3개의 cistron을 code 하고, *HIS 5*는 histidinol phosphate amino transferase (EC. 3.1.3.15)를 code 하는 네 종류의 유전자의 연구가 있으나 본연구에서는 효모 plasmid 2 μ m DNA의 복제기점으로 복제되는 YIp형 plasmid pSH 610상에서 yeast *HIS5* 유전자 promoter에 의하여 전사 발현되는 대장균 β -galactosidase 유전자 (*lacZ*) 산물 생산량을 측정하므로써 유전자 조절계에 대한 해명을 규명함에 그 목적을 두었다.

재료 및 방법

1. 사용 균주와 plasmid 및 효소

본실험에 사용한 효모 대장균의 균주와 plasmid는 Table 1과 같고 효소는 Table 2와 같다.

2. 배지와 배양

(1) 대장균 : 대장균은 완전배지로서 LB(Lunja-Bertani) 배지 [1% Bactotryptone (Difco), 0.5% yeast extract (Difco), 0.5% NaCl, N NaOH로 pH 7.0으로 조정], 최소배지로서 M9 최소 배지 (0.6% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.05% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 1mM Mg SO₄·7H₂O, 0.1mM CaCl₂, 0.2% glucose, 1 μ g/ml thiamine)를 사용하였다. 필요에 따라 ampicillin (50 μ g/ml), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside 40 μ g/ml (Sig-

ma)을 첨가하였다.

(2) 효모 : 효모는 완전배지로서 YPDA배지 (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose, 0.2% KH₂PO₄, 40 mg% adenine), 최소배지로서 2% glucose를 함유한 0.67% yeast nitrogen base (W/O) amino acid (Difco)를 사용하였다. 필요에 따라 아미노산, 핵산염기 및 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (40 μ g/ml)를 가하였다.

고체배지는 2% 한천을 가하여 사용하였다. 효모는 30°C에서, 대장균은 37°C에서 각각 배양하였다.

Table 1. Principal microorganisms and plasmids.

Organisms and plasmids	Genotype, characteristics or both*
<i>Escherichia coli</i>	
JA 221	leuB6 trp Δ E5 lacY hsdR recA
MC 1065	Δ lac leuB6 trpC 9830 strB hsdR
JM 83	ara Δ (lac, pro) thi strA 80d lacZ M15
<i>Sacch. cerevisiae</i> DKD-5D	MATa trp1 his3 leu2
Plasmid (Yeast, YIp)	
pSH 510	Amp ^r , HIS5
pSH 615	Amp ^r , HIS5
pSH 616	Amp ^r , HIS5
pSH 617	Amp ^r , HIS5
Plasmid (Bacteria)	
pBR 322	Amp ^r , Tet ^r

*The genetic symbols for tests are those proposed by the Nomenclature Committee for Yeast Genetics³⁰), and genetic symbols for *E. coli* follow Taylor⁵¹). Amp^r and Tet^r indicate the phenotypes of ampicillin and tetracycline respectively.

3. 대장균에서 plasmid DNA의 조제

(1) CsCl-EtBr 평형밀도 구별 원심분리법 : 대장균에서의 plasmid는 Clewell과 Helinski 방법³⁷)을 개변하여 조제하였다. 즉 ampicillin (50 μ g/ml)을 함유한 LB배지에서 하룻밤 정지배양 (37°C) 하여, 5 ml의 배양액을 casamino acid (Difco) 0.5%를 함유한 M9 배지 150ml에 접종한 후 37°C에서 진탕배양하고 배양액의 흡광도 (OD₆₆₀)가 0.8에 달

Table 2. Restriction endonuclease, other enzymes and linkers

Restriction endonuclease	Maker and purchased
<i>Ava</i> II	New England Biolabs
<i>Alu</i> I	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Bam</i> HI	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Dde</i> I	New England Biolabs
<i>Hpa</i> II	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Hinc</i> II	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Hind</i> III	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Hinf</i> I	Takara Shuzo Co. Ltd.
<i>Hne</i> I	New England Biolabs
<i>Rsa</i> I	New England Biolabs
<i>Sau</i> 3A	New England Biolabs
Other enzyme	
T4 DNA ligase	Takara Shuzo Co. Ltd.
T4 polynucleotide kinase	Takara Shuzo Co. Ltd.
Bacterial alkaline phosphatase	Sigma Co.
Ribonuclease	Sigma Co.
Linker	
<i>Bam</i> HI linker (-CGGGATCCCG-)	Takara Shuzo Co Ltd.

한 시점에서 chloramphenicol을 최종농도가 0.1 mg/ml (100 mg/l)이 되게 첨가하였다. 다시 하룻밤(16시간) 진탕배양하여 plasmid만을 amplification하였다. 만약 점성이 있을 때는 다음 과정으로 옮겼다. 이 상태가 너무 오래 계속되면 chromosomal DNA가 오염되기 쉬웠다. 4°C에서 원심분리로 집균(8,000 rpm, 10분간 Kubota model KR-200A 원심기 rotor RA-6)하여 15 ml의 0.8M (25%) Sucrose-50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 용액에 현탁하였다. 여기에 25% sucrose 용액에 녹인 10 mg/ml의 lysozyme (Sigma) 0.3 ml를 가하여 얼음중에서 2~3분간 방치하고 0.3 ml의 0.5M EDTA (pH 8.0) 용액을 가한 후 2.25 ml의 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/25 mM EDTA-2% Triton X-100 용액을 가하여 10분간 교반하여 용균시켰다. 원심관을 parafilm으로 덮고 4~5회 관을 상하로 하여 액을 혼합하였다. 이것을 27,000 rpm, 0°C에서 2시간 원심분리 (Hitachi 55p-7 초원심분리, RP 65T rotor)하여 상정액을 얻는다. 상정액 5 ml에 대하여 EtBr 수용액 (5 mg/ml, Aldrich 회사 제품)을 0.56 ml, CsCl 5 g을 가하여, Hitachi pol-

yallomer 원심분리침전관 (12PA)에 옮기고 16°C에서 50,000 rpm, 6~12시간 (Hitachi, rotor RP 65 T-153에 취하고) 평형밀도 구배원심분리하였다. 원심분리한 후 자외선 램프로 조사하면 형광을 내는 두 개의 밴드가 검출된다. 상층의 밴드가 chromosomal DNA, lineared DNA, 중간밴드가 open circular DNA이며, 하층 밴드가 covalently closed circular DNA이다. 하층 밴드의 plasmid DNA를 주사기 (Terumo)로 빼내어 (약 2.5 ml) 등량의 isopropyl alcohol (혹은 butanol)을 가하여 가볍게 흔들어 EtBr 함유용매상 (상층)을 제거하였다. 이 조작을 2~3회 반복하여 불순물을 제거하였다. DNA 용액에 2~3배량의 물을 가하고 3 M Na-acetate 용액으로 최종농도가 0.3 M 되게 첨가한다. 여기에 두배량의 95% ethanol (-20°C)을 가하여, -20°C에서 하룻밤 방치하거나 혹은 -80°C에서 30분간 방치후 원심분리 (10,000 rpm, 10분간, Kubota KR-200A 원심기)하여 DNA를 모은다. 이 침전을 0.3 M Na-acetate 용액에 녹여 ethanol (-20°C) 침전 후, 최종적으로 0.5 ml의 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA 용액에 녹여 4°C에 보존하여 시료로 하였다. 그러나 plasmid로 사용할 때는 ethanol 침전을 3회 행하는 것이 좋았다.

(2) 속성 알칼리 추출법 (rapid alkaline extraction) : DNA 구조해석이나 형질전환용 plasmid는 간편한 Birnboim과 Doly의 방법³⁸⁾으로 crude plasmid를 추출하였다. 즉 고체배지위에 생육된 3~5×20~30 mm 크기의 colony를 Eppendorf tube에 작은 spatule의 손잡이로 균을 취하고 25 mM Tris-HCl-50 mM glucose-10 mM EDTA (pH 8.0) 용액 100 μl로 현탁시켜 30분간 빙냉한다. 여기에 200 μl의 0.2 N NaOH-1% (w/v) SDS (Na-dodecylsulfate) 용액을 가하여 부드럽게 몇번 뒤흔들어 5분간 빙냉하고서 3 M Na-acetate (pH 4.8) 용액 150 μl를 가하여 빙수중에서 한시간 방치한다. 원심분리 (12,000 rpm, 10분간, Microfuge MC-15A, Tomy) 후 상정액을 다른 Eppendorf tube에 옮기고 2배량의 95% ethanol (-20°C)을 가하여 -80°C에서 30분 방치하고 원심분리하여 침전 (12,000 rpm, 10분간)으로 DNA를 모은다. 상등액은 버리고 이 침전을 진공 (desiccator) 하에서 30분간 ethanol을 증발시킨다음 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)-0.1 M Na-acetate 용액 100 μl에 녹이고 다시 200 μl의 95% ethanol (-20°C)을 가하

여 -80°C 에서 30분간 방치하고 원심분리하여 침전(12,000 rpm, 10분간)시킨다. 이 조작을 한번 더 반복하여 정제하고 얻어진 DNA는 감압하에서 ethanol을 증발건조시키고 0.1 ml의 RNase 용액(10 mM Tris-HCl(pH 7.8)-1 mM EDTA에 RNase A를 용해하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 용해한 것, 100°C 에서 10분간 가열처리하여 존재되어 있는 DNase를 실패한다)을 가하여 37°C 에서 30분간 반응시켜 RNA를 분해시킨 다음 다시 3 M Na-acetate 용액으로 0.3 M로 되게 가하고 2배량의 alcohol(-20°C)을 가하여 -80°C 에서 30분 방치하고 원심하여 증발건조하고 알맞은 용액에 녹여 사용하였다. 4°C 에서 보존하면서 시료로 사용하였다.

4. 효모에서 plasmid DNA(환상)의 조제

(1) CsCl-EtBr 평형밀도 구배원심분리법 : 효모의 세포벽을 Cameron의 방법³⁹⁾에 따라 protoplast화 하고 Livingston과 Klein방법⁴⁰⁾에 따라 plasmid DNA를 조제하였다. 즉 *Sacch. cerevisiae*를 YPAD 배지에서 24시간 전배양한 후 5%를 종균으로 하여 1 l의 YPAD 배지에서 하룻밤 배양하여 원심분리(Sovall GSA 5,000 rpm, 5분)로 집균후 탈이온화수로 2~3회 세척하고(약 40 g), 다시 1.2 M sorbitol 용액으로 2회 세척한다. 2 mg/ml zymolyase 60,000 (Kirin Beer 회사)을 protoplast 용 완충용액(50 mM K_2HPO_4 (pH 7.5)-1.2 M sorbitol-14 mM β -mercaptoethanol) 400 μl 에 현탁하여 30°C 에서 60~100분간 방치한다. 현미경으로 protoplast 형성을 확인한 후 집균하고 1.2 M sorbitol-용액으로 2회 씻고, 40 ml의 구연산 완충용액(0.1 M citrate (pH 5.8)-1.2 M sorbitol-10 mM EDTA 용액)에 현탁한다. 이 현탁액을 4개의 10 ml드리 Sovall 금속 원심관(SS 34)에 나누어 넣고 여기에 각각 등량의 SDS용액(sodium dodecylsulfate, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)-10 mM EDTA-2% (w/v) SDS)을 적가하여 원심관을 parafilm으로 봉한 후 약 10회 반전 혼합한다. 여기에 다시 1/4용(약 7 ml)의 5 M NaCl 용액을 가하여 다시 위와같이 하여 반전 혼합한후 빙수중에서 16시간 방치한다. 4°C 에서 원심분리(15,000 rpm, 60 min, Sorvall SS 34 rotor)하여 상정액을 얻는다.

이 상정액은 평형밀도구배원심분리법으로 DNA를 조제하였다. 위의 상정액에 1/4용(약 37 ml)의 50% (w/v) PEG 6,000을 가하여 빙수중에서 2시

간 방치하였다. 원심분리(3,000 rpm, 5분간, Sovall GSA)로 균체를 모으고 이 침전을 32 ml의 TE용액(10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA)에 녹여 8 ml의 5 M NaCl 용액을 다시 가하고 빙수중에서 하룻밤 방치한다. 다음에 원심분리(15,000 rpm, 60 min, Sovall SS34 rotor)하여 상정액에 1/4용(10 ml)의 50% (w/v) PEG 6,000을 가하여 빙수중에서 2시간 방치한다. 원심분리(3,000 rpm, 5 min)로 침전을 모은다. 이 침전을 24 ml의 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl(pH 8.0)-1 mM EDTA)에 녹여 6 ml의 5 M NaCl 용액을 가한다. 이 DNA 용액 30 ml에 CsCl 36.0 g, EtBr 용액(10 mg/ml) 6.0 ml를 가하고 TE 완충용액으로 총중량을 81.6 g로 한다. 이것을 초원심분리기(Hitachi RP 65T rotor)로 50,000 rpm, 6시간~12시간 평형밀도 구배원심분리하였다. 이 환상의 DNA 분획(하측밴드)을 주사기(Terumo)로 분취하여 EtBr을 추출제거하기 위하여 다시 TE 완충용액으로 포화시킨 isopropyl alcohol을 가하여 상층을 제거한다. 그 후는 대장균의 경우와 같이 ethanol 침전을 행하고 500 μl 의 TE 완충용액에 용해하여 사용하였다.

5. 형질전환

(1) 대장균의 형질전환 : 대장균의 형질전환은 Morrison의 방법⁴¹⁾에 따랐다. 즉 대장균의 배양은 10 ml의 L broth(LB) 배지에서 하룻밤 진탕배양하고 다시 1 l의 L broth (LB) 배지에서 37°C 에서 2시간 배양하여 배양액의 흡광도(O.D.₆₀₀)가 0.5~0.6의 시점에서 원심분리로 집균(8,000 rpm, 5분간)하고, 미리 냉각하여둔 배양액의 1/4량(250 ml)의 0.1 M MgCl_2 용액에 현탁하여, 다시 원심분리후 250 ml의 0.1 M CaCl_2 용액에 현탁한다. 빙수중에서 20분간 보존한 후, 원심분리로 집균하고 배양액의 1/20량의 85 mM CaCl_2 -15% glycerol 용액중에 현탁하여 competent cell로 하였다. 곧 사용하지 않을 때는 앞의 현탁액을 뚜껑이 있는 작은 시험관에 분주하여 곧 dry ice-acetone중에서 동결시켜, -80°C 에 보존하였다.

Competent cell을 녹인 이 대장균 현탁액 0.3 ml (300 μl)에 0.1~1.0 μg 의 plasmic DNA를 가하여(총량 300 μl) 0°C 에서 30분간 보존한 후 42°C 에서 2분간 water bath에서 heat shock하였다. 여기에 2.7 ml의 LB배지(L broth;를 가하여 37°C 에서 90분간 incubate(정지)한 후 집균하고 (3,

000 rpm, 10분간) 생리적 식염수로 알맞게 희석하거나 혹은 농축하여 선택평판 배지에 도말하여 1~2일 배양하였다.

(2) 효모의 형질전환 : 효모의 형질전환은 Begg의 방법¹⁹⁾을 개변하여 행하였다. 12 ml 드리의 원심관에 4 ml의 YADA 배지로 넣고 효모를 한백금이 점종하여 30°C에서 하룻밤 배양한 효모배양액 4 ml를 원심분리(2,000 rpm, 5분간, Kubota K-80 원심분리기)하여 집균하고, 균체를 구연산완충용액(0.1 M Na-citrate (pH 5.8)-10 mM EDTA-1.2 M sorbitol로 세척한 다음 3.6 ml의 상기의 구연산 완충용액에 현탁하여 0.4 ml의 zymolyase 용액(상기의 구연산 완충용액에 zymolyase 6,000 (Kirin Been Co)을 1 mg/ml되게 녹인 것을 여과제균한 용액)을 가하여 30°C에서 1~2시간 정치 보존하여 protoplast화 하였다. 이를 원심분리(2,000 rpm, 5분간)로 protoplast를 모으고 4 ml의 10 mM CaCl₂-1.2 M sorbitol 용액에 현탁하여 원침(2,000 rpm, 5분간)으로 2회 세척하고 상정액을 제거한 나머지의 용액(0.1 ml)으로 균체를 현탁시킨 다음 약 1 µg(10 µl 이하)의 plasmid DNA 용액을(10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-1 mM EDTA) 첨가하여 25°C에서 15분간 incubate한 후 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)-20% polyethylene glycol 4,000-10 mM CaCl₂용액 2 ml를 가하여 현탁 후 다시 25°C에서 15분간 incubate하였다. 원심분리(2,000 rpm, 5분간)로 집균후 0.3~0.5 ml의 1.2 M sorbitol을 함유한 YPDA 용액에 현탁하여 30°C에서 20분간 배양한다. 이것을 미리부터 녹여 46°C에 보존하여 둔 10 ml의 상층배지[3% 한천(Difco) 및 1.2 M sorbitol을 함유하는 최소배지]에 0.1 ml씩 가하여 혼합하고 한천 2%의 선택용 평판배지(최소배지)에 증충하여 30°C에서 7~10일간 배양하였다.

Plasmid 안정성은 형질전환을 완전배지에서 하룻밤 배양하고 무균수로 희석한 후 YPDA 평판배지에 plate하여 이것을 최소평판배지에 replica함으로써 plasmid marker를 잃은 colony의 수로부터 구하였다.

6. 효소반응

(1) 제한효소반응 : Eppendorf tube에 분해하려는 2 µl의 plasmid DNA용액, 2 µl의 33 mM Tris-Na-acetate (pH 7.9)-66 mM K-acetate-10 mM Mg-acetate-0.5 mM dithiothreitol (DTT, Si-

gma), 제한효소(DNA 1 µg에 대하여 제한효소 2단위 정도)용액, 증류수를 가하여 합친 것이 20 µl되게 하여 37°C에서 2시간 분해하였다. 제한효소표품에는 DNase가 존재하여 있으므로 2시간 이상의 반응은 DNase의 영향이 생기므로 주의하였다. 반응이 끝나면 70°C에서 5분간 가열하여 제한효소를 실활시켰다.

(2) Ligase의 반응 : 별도로 제한효소 처리한 DNA시료를 70°C에서 5분간 가열하여 제한효소를 실활시킨 다음 일단 ethanol 침전(2~3배량의 -20°C ethanol을 가하고 -80°C에서 10~15분간 방치하여 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다)을 한 다음 얻어진 침전을 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA용액 8 µl에 녹이고 여기에 2 µl의 50 mM MgCl₂, 2 µl의 0.1 M dithiothreitol, 2 µl의 0.5 mM ATP, 4 µl의 ligation용 완충용액(100 mM Tris-HCl (pH 7.5)-10 mM MgCl₂-60 mM NaCl) 및 2 µl의 T4 ligase(2.5 µl/µl) 당연구실조제 정제)를 가하여 전체용량을 20 µl로 하고 16°C에서 약 16시간 ligation시켰다. 이것을 형질전환의 공여 DNA로 하였다.

(3) β-Galactosidase 측정 : β-Galactosidase 조효소용액은 Rose의 방법⁴²⁾에 따르고, 활성측정은 Miller의 방법⁴³⁾에 따라 행하였다.

대장균의 경우에는 흡광도(OD₆₀₀)가 0.6에 달한 배양액 0.1 ml를 시험관에 취하고 여기에 Z buffer(60 mM Na₂HPO₄-40 mM NaH₂PO₄ (pH 7.0) 10 mM KCl-1 mM MgSO₄-50 mM β-mercaptoethanol) 0.9 ml, chloroform 50 µl 및 0.1% SDS 용액 20 µl를 각각 첨가한 후 곧 Vortex mixer로 10초간 혼합하여 28°C에서 5분간 preincubate한 것을 조효소용액으로 하였다.

효모의 경우에는 leucineless medium 20 ml로 30°C에서 2일간 진탕배양하여 포화상태까지 생육시킨 배양액 5 ml를 원심관에 취하여 원심분리(3,000 rpm, 10분간, Kubota K-80 원심기)로 균체를 모으고 5 ml의 SM buffer(20 mM Tris-HCl (pH 7.4)-85 mM NaCl-1 mM MgCl₂) 용액으로 한번 원심세척한 다음 추출완충용액(0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)-20% (v/v) glycerol-1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)-1 mM DT-T(dithiothreitol)용액 0.5 ml)에 현탁하고 여기에 1 g의 glass bead (Fugistone 0.25~0.40 mm)를 가하였다. 이것을 -80°C에서 30분간 동결시킨 다음 실온에서 용해하여 Vortex mixer로 30초씩

(4°C) 6회 행하였다. 여기에 다시 추출완충용액 0.5 ml(동량)를 가하고, 원심분리(3,000 rpm, 10분간(상온))후 상정액을 최대한 다량 Eppendorf tube에 옮기고, 원심분리(Tomy 12,000 rpm, 10분간)하여 glass bead를 제거한 다음 이 용액을 다른 Eppendorf에 옮겨 조효소용액으로 하였다.

한편 다른 시험관에 Z buffer (60 mM Na₂HP-O₄-40 mM NaH₂PO₄(pH 7.0)-10 mM KCl-1 mM MgSO₄-50 mM β-mercaptoethanol 용액) 0.9 ml와 상기 대장균, 효모에서 얻는 조효소용액 0.1 ml를 취하고 28°C water bath에서 5분간 preincubate 하였다. 여기에 O-nitrophenyl-β-galactoside 용액(인산 완충용액(pH 7.0)으로 4 mg/ml 되게 녹임) 0.2 ml를 가하여 28°C에서 약간 황색으로 착색되는 시점에서 1 M NaCO₃용액 0.5 ml를 가하여 반응을 정지시키고 420 nm와 550 nm의 흡광도를 분광광도계(Hitachi Mode 101)로 측정하였다.

활성은 1분간당 10⁹개의 세포에서 생성된 β-galactosidase가 절단하는 O-nitrophenyl β-galactoside의 μmol수로 나타내었다.

반응에 요되는 시간 및 420 nm의 파장으로 측정할 흡광도(10 mm length path)를 측정하여 다음의 식으로 효소활성을 표시하였다.

$$\text{활성 (units/ml)} = \frac{\text{OD}_{420} \times \text{반응총 용량 (ml)}}{0.0045 \times \text{시간(분)} \times \text{효소용량(ml)}}$$

단 1 unit는 28°C, pH 8.0, 1분간에 1 μmol O-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. 또 1 μmol O-nitrophenol의 파장 420 nm에서의 흡광계수는 0.0045로 하였다.

(4) Polyacrylamide 전기영동 : Gel은 30% acrylamide stock solution (acrylamide 20 g, N, N-methylene bisacrylamide 1 g, H₂O로 100 ml로 정용) 23.3 ml의 buffer (89 mM Tris-89 mM boric acid (pH 8.3)-2.5 mM EDTA용액) 10 ml 및 20 μg/ml의 ammonium persulfate 0.5 ml와 물로 총량 100 ml로 정용하고 감압하에서 20분간 탈기후 100 μl의 TEMED(20 mg/ml)를 가하여 교반하여 8%의 polyacrylamide gel로 하였다. 경우에 따라서는 4, 6%를 만들었다.

Gel의 두께는 평균 3 mm로 하고 30~40V에서 16~20시간, 100~120V에서 2~3시간의 정압에서 전기영동하였다. Gel의 두께가 0.3 mm의 경우에는 1500V에서 전기 영동하였다.

영동하려는 DNA용액(30~40 μl)은 50 mM EDTA-30% sucrose-0.05%, bromophenol blue용

액 5 μl로 착색시켜 gel에 충전하였다. 이때 사용한 size marker로서는 λ DNA (Takara Shozu Co) pBR 322를 적당한 효소로 절단한 것을 사용하였다.

영동후 gel을 0.1 ml의 EtBr용액(5 mg/ml)에서 서서히 교반하면서 20분간 염색시킨 다음 물로 몇 번 씻어내고, DNA 단편의 이동도를 transilluminator(Ultra Violet회사 C-62형)으로 관찰하여 UV filter (Kenko SL-39) 적외 filter (Kenko R-60)를 붙인 polaroid camera(MP-4) 및 type 667 film으로 사진촬영하였다. 1 μg DNA 밴드까지 확인할 수 있었다.

9. Polyacrylamide gel에서 DNA의 회수

유전자를 함유한 DNA의 회수는 우선 DNA 단편을 제한효소로 plasmid에서 끊어내어 polyacrylamide gel 전기 영동에서 분리한 다음 polyacrylamide gel을 자외선 확인으로 DNA 밴드를 절단하여 pipetteman (1 ml의 pipetteman chip에 siliconized glass wool을 채우고 chip 끝을 불꽃으로 봉하였다. Glass wool의 siliconize는 dichloromethylsilane을 5%되게(Cl₄에 가한 용액에 glass wool을 담근 다음 물로 씻고 살균한 것)에 넣고 siliconized 유리막대기(혹은 spatule)로 1 mm경도로 깨뜨린다. 여기에 0.5 M NH₄-acetate-10 mM Mg-acetate-0.1%, SDS-0.1 mM EDTA 용액으로 조성된 추출액으로 gel 단편이 완전히 잠기게 채우고(0.5 ml정도) parafilm으로 밀봉하여 37°C~42°C에서 하룻밤 방치 추출시킨다. 다음에 chip끝을 가위로 끊어내고 eppendorff tube에 넣고 저속원심분리(2,000~4,000 rpm)한다. 용출된 DNA용액을 Eppendorf tube에 옮긴다. 만일 수층이 남아 있는 경우에는 acrylamide가 남아 있는 경우가 되므로 18,000×g, 20분간 원심분리하여 상층을 millipore millex filter로 여과하여 ethanol(-20°C) 침전을 행하고 phenol 처리를하여 다시 ethanol 침전을 2~3회 행하여 사용하였다.

결과 및 고찰

1. *HIS5* gene의 cloning과 vector구축

Vector는 shuttle vector로서 염색체에 integration되는 YIp type의 pSH 610 ΔB를 사용하였다. 이는 Casadaban이 구축한 것으로 *lac'Z*의 제 8 번

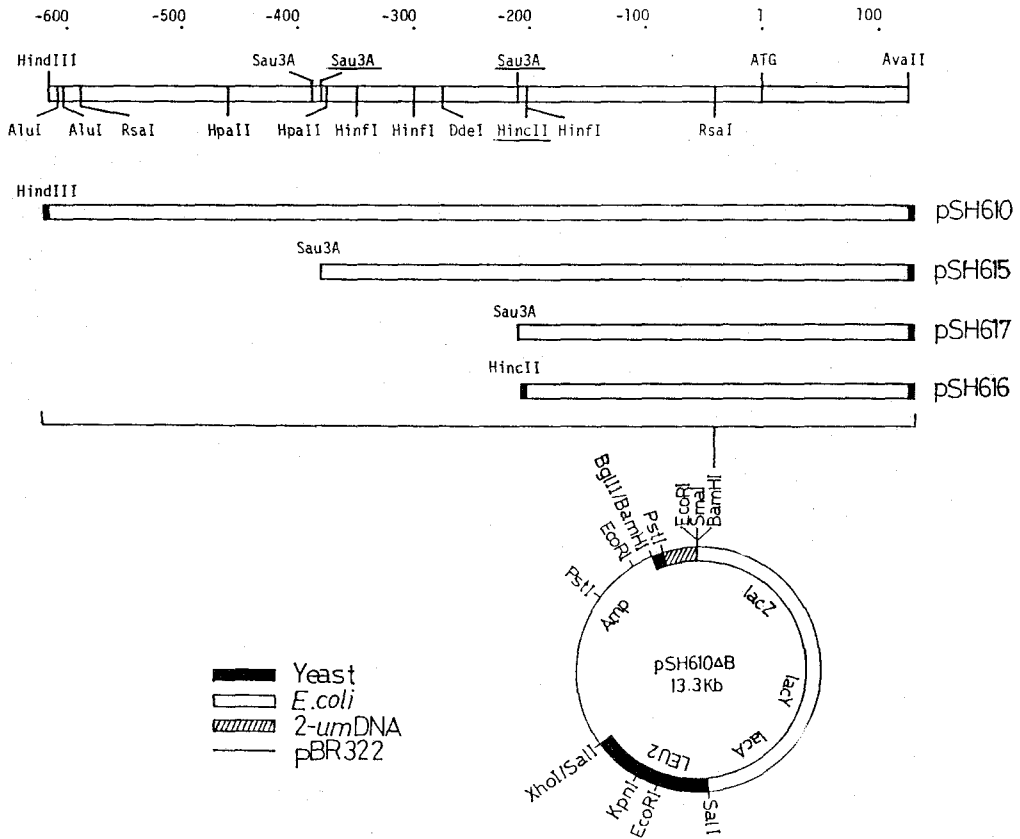


Fig. 1. Restriction endonuclease map of *HIS5* gene and construction of plasmid vectors pSH 610, pSH 615, pSH 617 and pSH 616 respectively. The double line represent *lac'ZYA* gene of *E. coli*. The heavy line represent yeast *LEU2* gene and 2 μ m DNA. The thin line shows DNA derived from pBR 322. Amp: ampicillin resistant.

체의 codon에서 *lac* operon의 구조 유전자가 있고, 이 부분에서 단백질의 N말단을 만드는 promoter fragment가 삽입된 reading frame이 있으면 *lac'Z* 유전자가 발현되는 unique한 vector이다. 즉 14.8 kb의 크기로 대장균의 lactose operon (*lac'Z*)에 효모 2 μ m DNA에서 유래한 (*LEU2* 유전자 (Isopropylmalate dehydrogenase 유전자), pBR 322에서 유래한 *Amp* 유전자를 함께 삽입한 것을 사용하였다 (Fig. 1):

HIS5 gene은 Fig. 1과 같이 785 bp의 크기로 제한효소 site가 15개소 있었다.⁴⁷⁾ 특히 flush end (평활말단)로서는 *Alu I*, *Rsa I* site가 각각 두 곳, *Hind II* site가 한곳이 있었고 cohesive end (부착말단)으로서는 *Hind III*, *Ava II*, *Dde I* site가 각각 한곳, *Sau 3A*, *Hpa II* site가 각각 두곳,

그리고 *Hinf I* site가 각각 세곳이 있었다. 양말단의 *Ava II* end와 *Hind III* end를 *Bam HI* linker [d(C-G-G-A-T-C-C-G)]를 붙여 *Bam HI* site로 end 만들었다. 한편 pSH 610 Δ B vector의 *Bam HI* site를 절단한 다음 상기의 *HIS5* gene을 삽입하여 lactose operon의 promoter로서 fusion하면 *lac,Z*의 유전자가 발현되는 것을 pSH 610 vector라고 하였다. 한편 *Sau 3A* site를 절단하여 삽입한 것을 각각 pSH 615, pSH 617 vector, *Hinc II* site를 절단하고 *Bam HI* linker를 붙여 삽입한 것을 pSH 616 vector라고 명명하였다.

2. 염색체에 *HIS5* gene의 integration

본 vector는 YIp형이므로 염색체에 integration

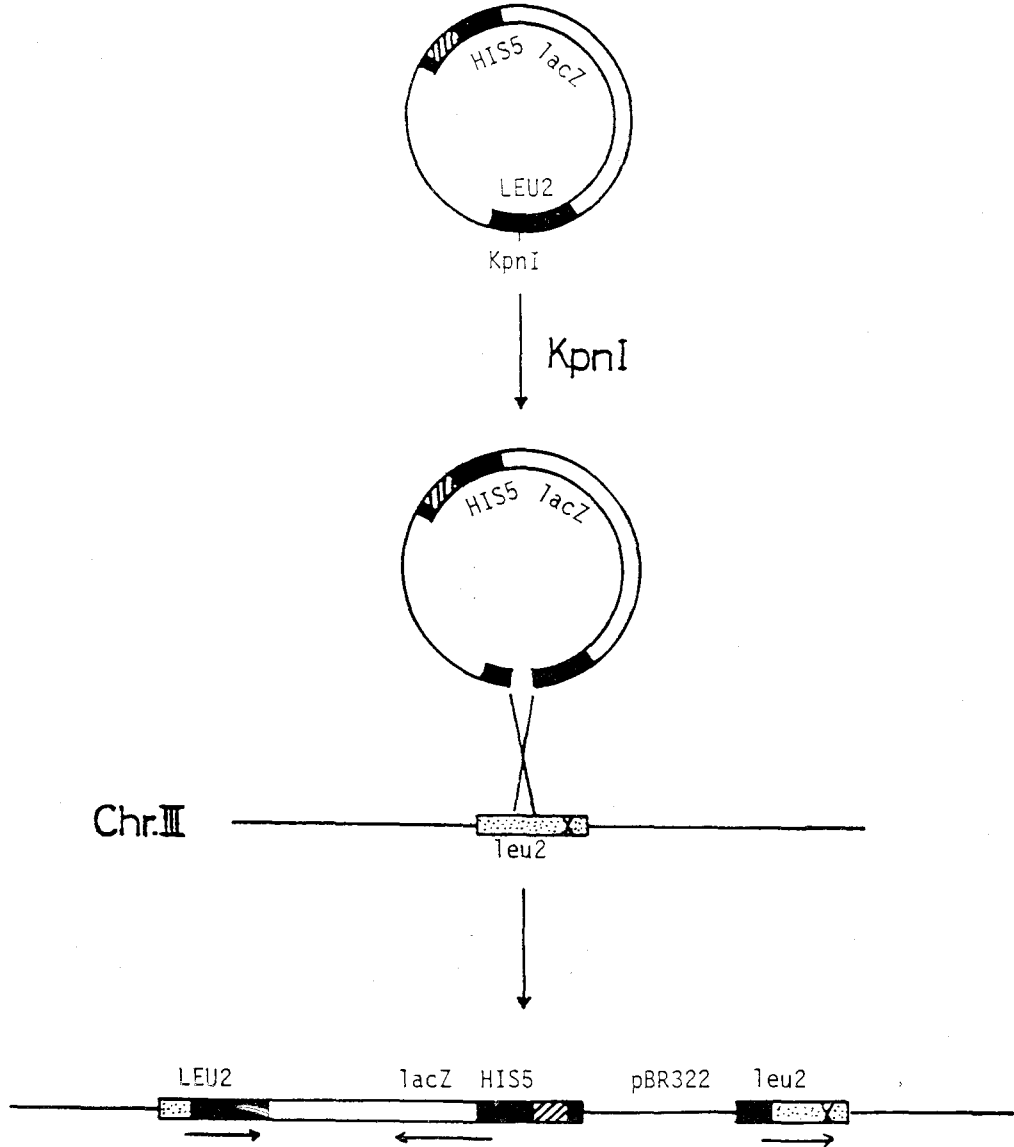


Fig. 2. Intergration of *HIS5-lac'Z* fusion into chromosome III of yeast.

되기 마련이다. 그러나 환상의 vector가 선상의 효모 염색체에 integration되기는 극히 어려운 점을 실험적으로 경험하여 *LEU2* gene의 *Kpn I* site를 절단하여 일단 선상으로 한 다음 효모 숙주에 transformation을 행하면 고빈도로 integration에 할 수 있었다.

HIS5 gene은 효모의 제 3 번 염색체에 integration 되므로 Fig. 2와 같이 가상할 수 있다.

Fig. 2와 같이 *HIS5-lac'Z* fusion 유전자는 두 개의 *LEU2* 유전자 사이에 끼여 존재하여 화살

표 방향으로 전사할 것이다. 그러나 *HIS5* promoter의 상류에 존재하는 *LEU2* 유전자와 전사의 방향이 반대방향인 것이 특이하다.

3. Promoter로서 각 plasmid

HIS5 gene을 각기 절단하여 Casadaban의 lactose operon (*lac'Z*)의 promoter로서 fusion하여 효모숙주(DKD-5D, α , *trp 1*, *his 3*, *leu 2*)에 전사발현되는 β -galactosidase 유전자(*lac'Z*) 산물의 생산량을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

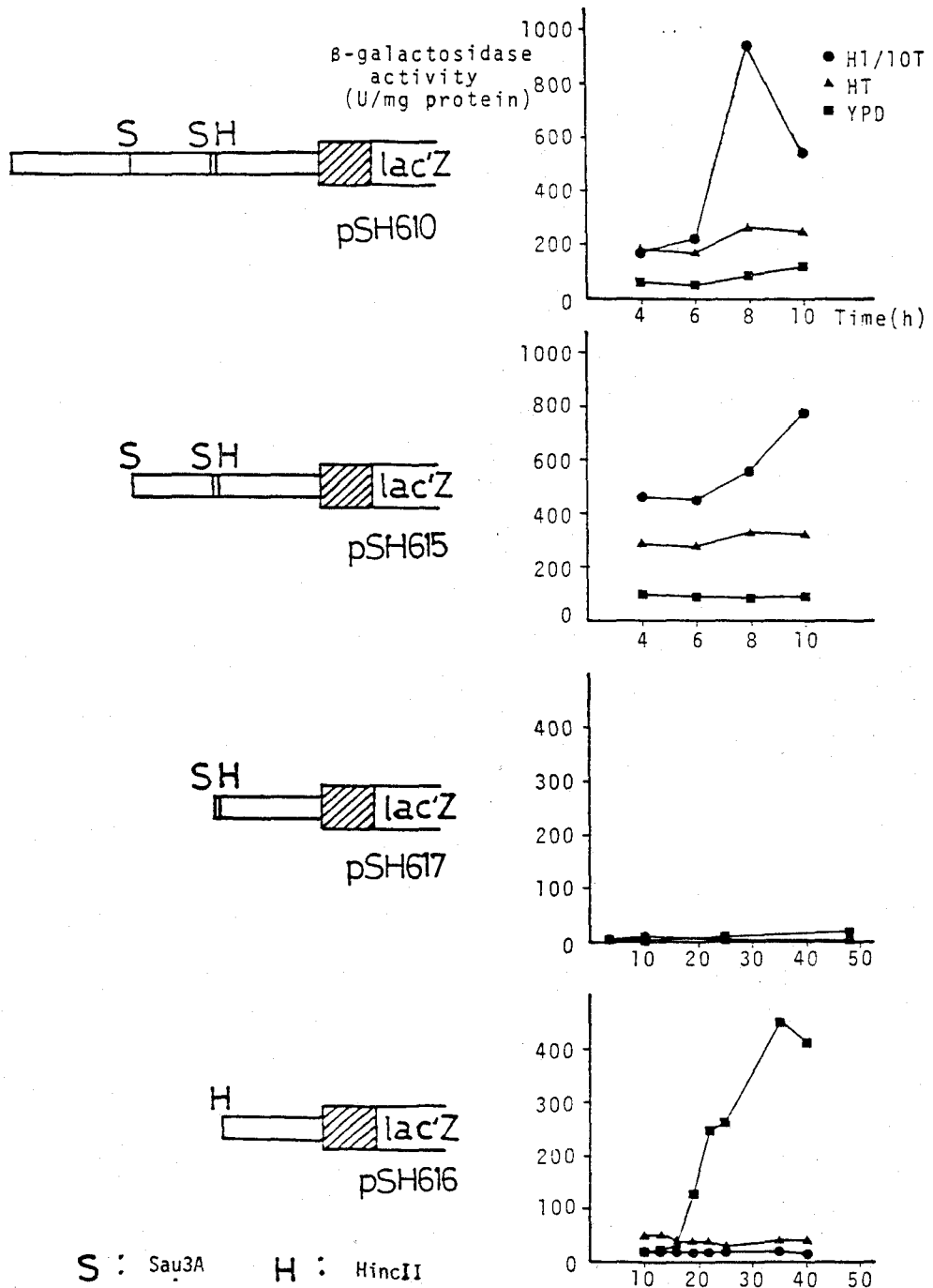


Fig. 3. The comparison of β -galactosidase activity among three types of vector and regulation of β -galactosidase formation in *Saccharomyces cerevisiae*.
 -■- : YPDA medium.
 -▲- : MM+His(20 mg/l)+Trp(20 mg/l) medium.
 -●- : MM+His(20 mg/l)+Trp(2 mg/l) medium.

pSH 610의 경우 nutrient rich인 YPDA media에서는 β -galactosidase 활성이 아주 낮고 그리고 최소배지에 histidine과 tryptophan을 20 mg/l 정도 첨가한 경우에는 YPDA 배지보다 β -galactosidase 활성은 약 2배 정도 높았다. 그러나 최소배지에 histidine은 20 mg/l로 정상으로 넣고 tryptophan만은 histidine의 1/10인 2 mg/l를 넣었을 때에는 결국 8시간만에 최고치에 달하였고 최소 배지의 약 4배나 달하는 β -galactosidase 활성이 있었다. 이 속주효모는 tryptophan과 histidine 요구균주임으로 tryptophan이 결핍 될 때 *HIS5*의 promoter가 활성이 높아짐에 따라 general amino acid control은 탈억제되는 것으로 생각될 수 있다.⁴⁹⁾

즉 효모(*Sacch. cerevisiae*)에 있어서 아미노산 합성계의 효소를 code하는 유전자군은 general control을 받고 histidine, lysine, arginine, tryptophan등의 아미노산의 결핍으로 일제히 탈억제되는 것으로 해석된다.

그리고 pSH 615의 경우에는 pSH 610과 거의 같은 경향을 보이며 역시 general control을 받고 있는 것 같다. 그러나 *Sau* 3A site까지를 완전히 제거시킨 pSH 617의 경우에는 전혀 β -galactosidase의 활성은 나타나지 않았다. 최후로 *Hinc* II site까지를 제거시킨 pSH 616의 경우에는 YPDA 배지에서만 β -galactosidase의 활성은 높았고 최소배지에 histidine과 tryptophan은 위와같이 같은 양을 넣고, tryptophan은 그의 1/10정도 넣은 최소 배지에서 β -galactosidase의 활성은 아주 낮았다. 이와같은 사실은 YPDA 배지의 glucose 대신 glycerol 첨가배지에서도 β -galactosidase 활성이 점차 상승되는 것으로 보아 glucose의 영향은 아닌 것 같다.

이상의 결과로서 *Sau* 3A와 *Sau* 3A 사이에 두 개의 consensus sequence가 존재하는 것이 예상되며 이곳에서 general amino acid control을 지배하는 것은 틀림없는 것 같다.⁴⁸⁾ 더욱 이곳을 절단해 버리면 β -galactosidase 활성이 극히 낮은 것으로 보아 이곳이 activation을 행하는 sequence라고 생각하지 않을 수 없다. 한편 pSH 616의 경우에는 YPDA에서 β -galactosidase 활성이 있는 것으로 보아 *Sau* 3A와 *Hinc*II 사이에 YPDA repression가 있을 것으로 예상할 수 있다.

따라서 제2 보⁵²⁾의 sequence에서 밝히겠으나 ATG의 5' 상류영역은 promoter의 positive 제어

영역, 그리고 하류영역은 promoter의 negative 제어영역으로 생각할 수 있을 것 같다.⁵³⁾⁵⁴⁾

사 사

본 연구는 1983년 9월부터 1984년 8월까지 국비 연구 교수(문교부)로 파견되어 오사카대학 공학부 발효공학과에서 공동으로 이루어진 결과의 일 부분임을 밝혀둔다.

연구비를 지급해 준 문교부와 본 연구 수행에 지도와 편달을 하여 주신, 大嶋泰治교수, 高田信男교수, 原島俊 조교, 西脇清二원생에게 감사료를 드리는 바이다.

요 약

*Saccharomyces cerevisiae*의 *HIS5* 유전자는 세균 vector인 pBR 322와 shuttle vector pSH 610에 clone되었고 lactose operon의 promoter로서 발현되었다. *HIS5-lac Z* fusion은 효모의 제 III번 염색체에 integration하였으며 *HIS5* 유전자는 general amino acid control을 받고 있었다.

참 고 문 헌

1. Hinnen, A., Hicks J. B. and Kink G. R.: *Proc Natl. Acad. Sci.*, 75: 1929 (1978)
2. Zakian, V.A. and Scott J. F.: *Mol. Cell.*, 2: 221 (1982)
3. Paluh, J. L. and Zalkin, H.: *J. Bacteriol.*, 153: 341 (1983)
4. Aigle, M., Niederberger, P. and Huetter, R.: *Curr. Genet.*, 5: 39 (1982)
5. Zalkin, H. and Yanofsky, C.: *J. Biol. Chem.*, 257: 1491 (1980)
6. Hsiano, C. L. and Carbon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 3829 (1979)
7. Hinnebusch, A. G. and Kink, C. K.: *J. of Biol. Chem.*, 258: 5328 (1983)
8. Struhl, K. and Davis, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 5255 (1977)
9. Struhl, K. and Davis, R. W.: *J. Mol. Biol.*, 136: 309 (1980)
10. Struhl, K.: *J. Mol. Biol.*, 152: 553 (1981)

11. Struhl, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 : 7389 (1982)
12. Struhl, K.: *Nature*, 300 : 284 (1982)
13. Silverman, S. J., Rose, M., Bostein, D. and Fink, G. R.: *Mol. Cell Biol.*, 2 : 1212 (1982)
14. Brujin, F. and Greer, H.: *Mol. Cell Biol.*, 1 : 381 (1981)
15. Donahue, T. F., Daves, R. S., Luchinini, G. and Fink G. R.: *Cell*, 32 : 89 (1983)
16. Donahue, T. F., Farabaugh, P. J. and Fink, G. R.: *Gene*, 18 : 47 (1982)
17. Harashima, S., Sidhu, R. S., Toh-e, A. and Oshima, Y.: *Gene*, 16 : 335 (1981)
18. Ratzkin, B. and Carbon, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 : 487 (1977)
19. Begg, J. D.: *Nature*, 274 : 104 (1978)
20. Struhl, K., Stinchomb, D. T., Scherer, S, and Davis, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 : 1035 (1979)
21. Holland, J. P. and Holland, M. J.: *J. Biol. Chem.*, 254 : 9839 (1979)
22. Hitzeman, R.A., Clark, L. and Carbon, J.: *J. Biol. Chem.*, 255 : 12073 (1980)
23. Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Hayflick, Ch-en, C. I., Seeburg, P. H. and Derynck, *Nucleic acids Res.*, 10 : 7791 (1982)
24. John, T. P. sT. and Davis, R. W.: *Cell*, 16 : 443 (1979)
25. John, T. P. st. and Davis, R. W.: *J. Mol. Biol.* 152 : 285 (1981)
26. John, T. P. sT., Scherer, S., McDonell M. W. and Dais, R. W.: *J. Mol. Biol.* 152 : 317 (1981)
27. Bennetzen, J. L. and Hall, B. D.: *J. Biol. Chem.*, 257 : 3018 (1982)
28. Farabaugh, P. and Fink, G.R.: *Nature*, 286 : 352 (1980)
29. Hick, J., Stranthern, J. N. and Klar, A. J.: *Nature*, 282 : 478 (1979)
30. Leer, R. J., Cohen, L. H., Magr, W. H. and Plantd, R. J.: *Nucleic acids Res.*, 10 : 5869(1982)
31. Fried, H. M. and Warner, J. R.: *Nucleic acids Res.*, 10 : 3133 (1982)
32. Larkin, J. C. and Woolford Jr., J. L.: *Nucleic acids Res.*, 11 : 403 (1983)
33. Guarente, L. and Ptashne, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78 : 2199 (1981)
34. Faye, G., Leung, D. W., Tatchell, K., Hall, B. D. and Smith, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78 : 2258 (1981)
35. Kramer, R. A. and Andersen, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77 : 6541 (1980)
36. Clewell, D. S. and Helinsk, D. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 62 : 1159 (1969)
37. Birnboim, H. C. and Doly, J.: *Nucleic acids Res.*, 7 : 1513 (1979).
38. Cameron, J. R., Philippsen, P., and Davis, R. W.: *Nucleic acids Res.* 4 : 1429 (1977)
39. Livingston, D. M. and Klein, H. L.: *J. Bacteriol.*, 129 : 472 (1977)
40. Morison, D. A.: *J. Bacteriol.* 132 : 349 (1977)
41. Rose, M., Casadabar, M. J. and Botstein, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78 : 2460. (1981)
42. Miller, J. H.: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 352~355, Cold Spring Harbor, New York (1972)
43. Tanaka, T. and Weisblum, C.: *J. Bacteriol.*, 121 : 354, (1975)
44. Cryczan, T., Shivakurmar, A. G., and Dubnau, D.: *J. of Bacteriol.*, 141 : 246 (1980)
45. Martiner-Arieas, A.E. and Casdaban, M. J.: *Mol. Cell Biol.*, 3 : 580 (1983)
46. 入江新司: Cloning 酵母 HIS5 遺傳子の大腸菌内高發現化 大阪大學工學部 醱酵工學科 修士學位論文 (1983)
47. Hinnebush, A. G. and Fink, G. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80 : 5378 (1983)
48. Hinnebush, A. G. and Fink, G. R.: *J. of Biol. Chem.*, 258 : 5238 (1983)
49. Plaschke, M. E., von Borstel, R. C., Mortimer, R.K. and Cohen, W.E.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 3rd ed. Nucleic acids, Vol. 2, pp. 767~832 CRC Press, Cleveland, Ohio (1976)
50. Taylor, A.L.: *Handbook of Biochemistry*

- and Molecular Biology*, 3rd ed. Nucleic acids, Vol. 2, pp. 654~663 CRC Press, Cleveland, Ohio (1976)
51. 鄭東孝, 西脇清二, 大嶋泰治 : 한국산업미생물학회지, 13(1), 19(1985).
52. 西脇清二, 鄭東孝, 原島俊, 大嶋泰治 : Yeast Genetics and Molecular Biology News, Japan, No. 17, p. 22 (July, 1984)
53. 西脇清二, 鄭東孝, 原島俊, 大嶋泰治 日本遺傳學會(第56回) 大會豫稿集(p. 80 (1984. 11)