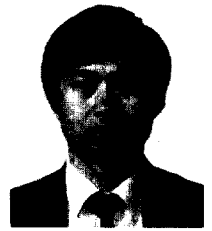


박테리아를 이용한 재조합 유전자의 발현



한국과학기술원 생물공학과 유 옥 준

어려운 과정을 통하여 목적하였던 어떤 유전자를 cloning하는데에 성공하였을 때 우리는 일단 자축할 수 있다. 생명현상의 일부과를 담당하던 DNA 조각이라는 물질을 이제는 얼마든지 증폭할 수 있고, 분석, 연구할 수 있고 그리고 영원히 보관할 수 있기 때문이다. 그러나 clone된 유전자를 다른 생명체 속에서 발현시키려 할 때에는 또다른 연구가 진행되어야 한다. 사실상 이 일은 유전자 조작기술(recombinant DNA technology)의 가장 중요한 chapter 중의 하나가 되는 것이다. 생명과학자들은 지난 십여년간 많은 노력을 들인 끝에 어떠한 유전자를 박테리아로부터 효모(yeast), 식물세포 또는 동물세포에 이르기까지 다양한 생체 system에서 그 발현의 증대화를 성공시킨 예를 보여주고 있다. 이러한 과정의 결과 대량 생성되는 물질들은(단백질 또는 RNA) 산업적으로 이용될 수 있다는데에도 가치가 있지만 사실상 생명과학자들에게는 그 자신들이 추구해왔던 어려운 실험들을 성공 가능케해주고 있다는데에 더 큰 의미가 있다고 생각한다. 충분한 실험 재료가 확보되기 때문이다. 이렇게 해서 얻어진 생명현상에 대한 정보들은 방대하였으며 앞으로도 대단히 많은 새로운 사실들이 밝혀질 것이고 그 지식들은 곧 아직 미흡한 재조합 유전자의 발현 연구에 다시 응용될 것이다.

본 장의 주제인 재조합 유전자의 발현 증대를 위하여는 우리가 알고 있는 대부분의 생명현상에 대한 지식들이 응용될 수 있을 것으로 일단 믿어진다. 그러나 그 지식들은 하나의 장으로 모아지기에는 너무나 방대하며 또한 그 각각의 지식들을 어떻게 서로 조화시켜 유전자 발현증대를 꾀할 것이냐 하는 것은 상당한 노력이 더 필요할 것이다. 여기에서는 이미 그 응용이 가능하였던 내용들을 기

초로 하여 유전자 발현조절에 대하여 알고 있는 지식들을 어떻게 재조합 유전자 실험에 응용하여 그 발현증대를 시도할 수 있겠는가에 대하여 기술해 보고자 한다. 저자로서는 이에 대한 체계적인 총설을 만들기에는 무리가 있다고 판단되므로 다만 *E. coli*를 숙주로 하는 경우를 중심으로 하여 단편적이고도 개인적인 감상을 적어 보는데 불과하게 될 것으로 생각하였다.

High copy number plasmid의 이용

유전자의 발현증대를 위하여 첫번째로 생각할 수 있는 것은 유전자의 수를 늘려주는 것이다. 이러한 방법은 세포내에 많은 양이 필요한 물질들의 유전자 수, 예를 들면 단백질 합성에 관여하는 물질(ribosomal proteins, rRNA, tRNA)들의 유전자 수가 특히 진핵세포에서는 대단히 많다는 사실을 보아 쉽게 생각할 수 있었다. 재조합 유전자의 수를 많게 하기 위해서는 재조합된 유전자를 high copy number plasmid에 옮겨 넣어 주면 되므로 아무런 문제가 없다. Plasmid들이 갖고 있는 replication origin의 종류는 다양한데 이는 가지고 있는 origin이 얼마만큼 세포내에서 그 복제가 조절, 감독을 받고 있느냐에 따라 stringent control을 받는 origin과 relaxed control을 받는 origin으로 구별된다. 자연계에서 발견되는 origin을 좀 더 축소하여 보다 더 relaxed control을 받도록 조작한 여러가지 종류의 pBR 322 derivative들이 현재 재조합 유전자의 발현 연구에 많이 사용되고 있다. 이러한 취지에서 λ 의 cII protein(cI repressor를 생산하는 P_L promoter와 int protein을 생산하는 P_I promoter의 activator로서 integration 즉 λ 가 lysogenic

cycle로 들어가기 위하여 필요한 단백질임) 유전자를 multicopy vector인 pBR 322 derivative에 재조합시킨 실험 결과를 먼저 살펴보자. cII 유전자를 포함하는 1.3 Kb 길이의 λ 의 HaeIII fragment (Fig. 1. A)를 pBR 322 derivative에 삽입하였을 때 Fig. 1. B에서 보는 바와 같이 vector의 promoter에 대하여 정방향으로 들어간 재조합 plasmid (Fig. 1. B. a)는 찾아 볼 수 없고 반대방향으로 들어갔거나 (Fig. 1. B. b) 또는 유전자가 파괴된 후 일부분만 들어갔을 경우의 plasmid (Fig. 1. B. c)만 재조합 박테리아 중에서 찾아진다는 사실이 발견되었다(1). 이는 cII 유전자가 정방향으로 들어갔을 때는 plasmid promoter가 작동하여 재조합 유전자인 cII 유전자를 발현시키게 되는데 이때 세포내의 plasmid copy 수가 너무 많아서 발현되는 cII protein의 총량이 세포가 생존할 수 없을 정도로 많아지게 된 결과에

기인하였다는 것을 알게 되었다. 따라서 pBR 322 derivative내의 외부 유전자 삽입부분에 작용할 수 있는 promoter를 제거한 plasmid를 대신 사용해 보았는데 이 경우에는 cII 유전자의 정방향과 역방향 재조합 plasmid가 모두 얻어짐이 밝혀졌다(1). 즉 적당한 promoter가 없는 상태로 재조합 유전자를 얻으면 그 발현 과다에 의해 세포가 죽게되는 일을 방지할 수 있다는 결과를 얻은 것이다. 아울러 이 실험은 재조합 유전자를 다룰 때에 그 발현이 너무 많이 될 경우에는 세포의 생존에 위협이 되므로 조심해야 하며 대체적으로 특별한 안전장치가 필요하다는 것을 알려주고 있다.

강한 promoter의 사용

박테리아에는 거의 모든 유전자들이 한개씩 존재하지만 박테리아가 필요로 하는 유전자 산물의 양은 각각 다르다. 따라서 경제적인 생합성 과정을 통하여 생존경쟁에서 이겨나가기 위하여는 유전자들마다 필요한 만큼씩의 발현을 하도록 하는 조절이 필요하였다. 생체내에 이 목적을 위하여 마련되어 있는 조절 기작은 여러가지 있지만 무엇보다도 근본적인 조절 기작은 그 첫단계에 있다. 즉 transcription의 시작을 위하여 RNA polymerase가 promoter에 binding하는 과정을 조절한다는 것이다. 유전자마다 다같은 RNA polymerase가 편여하지만 그 binding하는 정도는 promoter의 종류에 따라서 모두 다르다. 재조합 유전자가 가지고 있는 원래의 promoter를 절단해 버리고 다른 강한 promoter로 대체해 붙여줌으로써 유전자 발현증대를 꾀할 수 있다. 이제까지 연구된 promoter들 중 가장 강한 promoter는 P_{lac} 보다도 8-10배나 강한 λ 의 P_L promoter인데(2) 이 P_L promoter가 현재 가장 빈번히 재조합 유전자의 발현을 위한 실험에 사용되고 있다. 그러나 여기에도 심각한 문제가 생긴다는 것을 알게 되었다. Plasmid내에 P_L 과 같은 대단히 강한 promoter가 있으면 transcription이 너무 많이 일어나 DNA 복제가 방해되어 결국 plasmid 분자가 유지되지 못하고 없어진다는 사실이다(3). 따라서 transcription이 아무때나 일어나지 않고

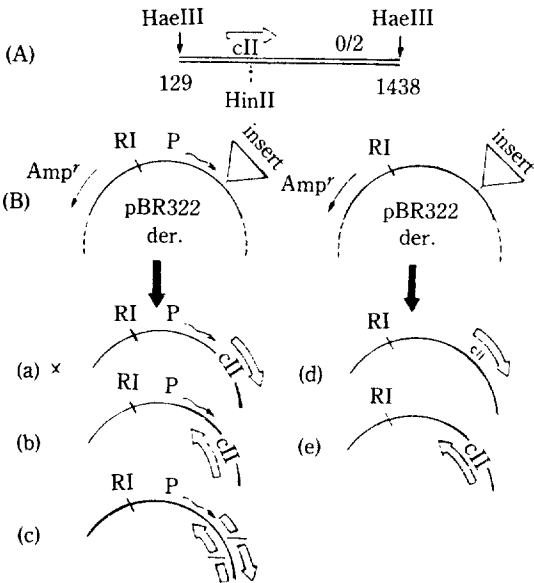


Fig. 1. pBR 322 derivative를 이용하여 λ cII protein의 발현을 시도한 scheme. (A) λ DNA를 Hae III로 처리하여 나온 1.3Kb 절편내에 cII 유전자와 O 유전자의 일부가 있음. (B) 이 DNA 절편을 pBR 322 derivative에 삽입한 결과를 보여주고 있음. (a), (b), (c)는 plasmid의 promoter가 재조합 되려는 유전자에 영향을 주고 있고, (d), (e)는 그렇지 않은 경우를 나타내고 있다.

원하는 때에만 일어나게 할 수 있는 장치가 필요하다는 것을 알게 되었다.

Induction에 의한 재조합 유전자의 발현

앞에서 언급한 내용 즉 재조합 유전자 산물이 너무 많아지면 세포가 죽게되거나 transcription이 과다하게 일어나면 plasmid의 복제가 방해되어 재조합 유전자 자체가 없어지게 되는 위험들을 동시에 제거할 수 있는 방법이 고안되었다. λ DNA를 Hind III와 BamH I으로 절단하면 P_L promoter는 2.4 Kb fragment에 있게 된다. 이 P_L promoter를 pBR 322에 넣어 주어 만든 vector가 많이 사용되고 있는 pKC 30이다(Fig. 2). 이 vector는 예상대로 대단히 불안정하여 정상적인 *E. coli*내에서 유지되지 못한다. 여기에 있는 P_L promoter는 λ 의 cI repressor에 의해

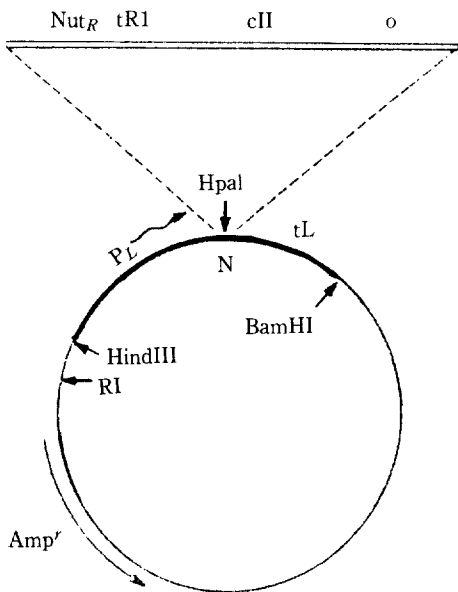


Fig.2. Plasmid pKC 30의 schematic diagram. Fig.1의 Hae III fragment(여기에는 cII 유전자가 있고 그 좌측에 Nut_R과 tR 1을, 우측에 o 유전자를 동반하고 있음)가 pKC 30의 Hpa I site에 삽입될 수 있음을 보여주고 있다. pKC 30은 λ 의 N 유전자를 포함하고 있는 2.4 Kb Hind III-BamHI 절편을 pBR 322의 tetracycline resistant 유전자 내에 넣어 주어 만든 것이다.

그 발현을 억제시킬 수 있으므로 숙주로 λ lysogen을 사용함으로써 cI repressor가 pKC 30 내에 있는 P_L promoter의 작동을 억제시킬 수 있다는 것을 알게 되었다(4). 여기에 사용된 cI gene을 대신 temperature sensitive cI mutant인 cI₈₅₇을 사용하면 우리가 원할 때는 언제든지 재조합 유전자를 다량 발현시킬 수 있는 것이다. 즉 plasmid의 수가 충분히 많아졌으며, 숙주 세포도 충분히 증식되어 있는 때에 온도를 32°C에서 42°C로 높여 줌으로써 갑자기 재조합 유전자를 발현시킨다는 것이다. 이 상태에서는 발현 산물에 의해 세포가 죽는대거나 plasmid의 복제가 일어나지 않는다 하여도 원하는 실험목적, 즉 유전자 발현 산물의 다량 획득에는 아무런 영향이 없게 된다. 유전자의 발현을 원하는 때 갑자기 일으키도록 유도하는 방법에는 cI₈₅₇ repressor를 이용한 경우와 같이 온도를 올려 주어 불활성화시켜서 그 조절을 받는 유전자를 induction시켰던 경우 뿐만 아니라 유전자의 종류와 그 조절 기작에 따라서 chemical inducer를 이용하여 induction시키는 방법도 사용되고 있다(5).

Translation 조절 부위(Shine-Dalgarno sequence)의 이용

pKC 30를 이용하여 발현시키고자 하는 유전자가 *E. coli*의 translation 조절 부위(Shine-Dalgarno sequence)(Fig. 3. b)를 가지고 있지 않을 경우에는 그 발현에 커다란 영향을 준다. 특히 eukaryotic 세포에서 얻은 유전자나 cDNA들은 모두 *E. coli*의 translation 조절 부위를 갖고 있지 않기 때문에 pKC 30를 이용하여 효과적인 발현을 기대할 수 없다. 따라서 이러한 경우에도 효과적인 발현을 할 수 있도록 Shine-Dalgarno sequence와 translation initiation site를 재조합 유전자 바로 앞의 올바른 위치에 오도록 pKC 30를 개조하여 pAS 1 plasmid를 만들게 되었다(6). Translation 조절 부위는 λ 의 cII 유전자의 것을 사용하였다. cII의 coding 부위 전체를 제거하고 그 initiation codon인 ATG와 upstream의 translation 조절 부위만 남겨 놓은 것이다(Fig.

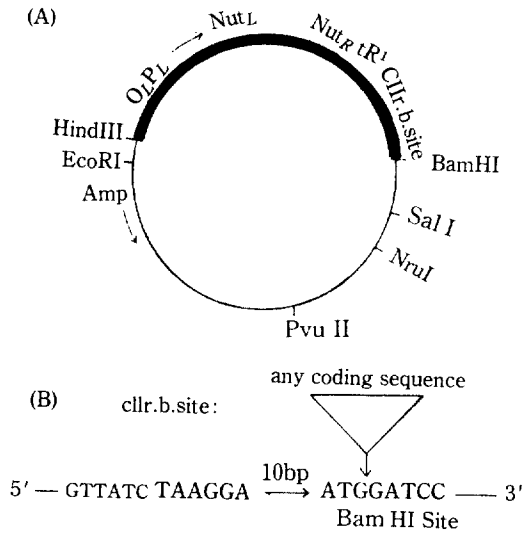


Fig. 3. pAS 1 (5878 bp)의 scheme. 이 vector는 pKC 30의 derivative로서 굵은 선 부분의 λ DNA sequence가 들어있다. λ c II 유전자의 ribosome binding site(r.b. site)와 ATG initiation codon이 남아 있으며 그 가장 우측은 BamH I site로 되어 있어서 이곳에 재조합 하려는 유전자의 두번째 codon이 접합될 수 있도록 설계되어 있다.

3). 물론 pKC 30에 존재하는 P_L promoter는 그보다 더 upstream 부위에 위치하고 있다. Fig. 3, A에서 보는 것처럼 ATG codon 바로 다음에는 제한효소 BamH I site가 위치하고 있어서 발현시키려는 어떠한 유전자건 그 두번째 codon을 pAS 1의 BamH I site에 붙여주면 재조합되어 들어가는 유전자는 *E. coli* 유전자와 완전히 같은 성격을 가지게 되며 동시에 강력한 P_L promoter의 영향을 받게 되는 것이다. 물론 발현시키려는 유전자의 두번째 codon 위치를 쉽게 유전자의 좌측 끝에 오게하기는 용이한 일이 아니다. 이를 위하여는 BamH I으로 절단한 pAS 1을 Klenow enzyme으로 blunt end로 만들고, 발현시키려는 유전자의 좌측을 Bal31 enzyme 등을 사용하여 그 두번째 codon이 좌측 끝에 위치하도록 하고 그 부분을 blunt end로 만들어서 앞서 만든 pAS 1과 결합시키는 상당히 긴 실험과정을 거치는 방법이 있지만, 이 보다는 oligonucleotide를 이용하는 보다 용이한 방법이 주로 사용된다. 즉 유전자의 initiation codon의 downstream 쪽으로 가까운

곳을 제한효소를 절단하고 그곳에 BamH I sequence를 좌측에 포함한 oligonucleotide를 합성하여 붙여주면 곧바로 pAS 1 plasmid에 재조합시킬 수 있다.

Supercoiling의 변화에 의한 유전자 발현 조절

Plasmid DNA의 supercoiling 정도에 따라 재조합된 유전자의 발현에 차이가 있게 된다는 사실이 밝혀졌다. 사실상 대부분의 유전자들은 자기가 위치한 곳에 supercoiling이 있어야 발현이 잘된다는 실험 결과들이 있으나(7) DNA gyrase의 유전자들처럼 오히려 relaxed DNA일 때에 발현이 촉진되는 경우도 보고 되었다(8). 따라서 DNA gyrase의 inhibitor를 사용하여 재조합 세포내의 plasmid들의 supercoiling 정도를 조절하면서 원하는 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있게 되었다.

Sigma subunit의 교체에 의한 유전자 발현 조절

*E. coli*의 RNA polymerase는 $\beta\beta'\alpha_2$ 와 σ (sigma)의 5개 subunit로 구성되어 있는데 이중 σ subunit는 transcription initiation에 관계한다. *Bacillus*에는 일반적인 σ 뿐만 아니라 sporulation에 관계하는 특이한 σ 가 별도로 있어서 여기에 관계하는 promoter에만 작용해 준다는 사실이 밝혀져 있었는데(9) 최근 *E. coli*에서도 heat shock 유전자들에 관계하는 σ 등 4가지의 특정한 σ 가 발견되었다(10). 따라서 이들 특정 σ 유전자를 이용하여 원하는 때에 작용하도록 할 수 있다면 특정 σ 의 지배를 받는 promoter에서만 발현이 되도록 할 수 있는 길이 열리게 되었다.

합성유전자의 이용

다른 생명체의 유전자가 *E. coli* 내에 들어와서 64가지 codon 각각에 대하여 사용하는 빈도수는 *E. coli* 유전자의 경우와 같지 않을 것이다. 따라

서 *E. coli* 유전자에 비하여 발현에, 특히 많은 양의 발현을 시도할 경우에 불리할 것이다. 이 문제는 유전자를 완전히 화학 합성함으로써 극복할 수 있다. 즉 *E. coli*의 codon 사용 빈도수에 맞고, pAS1과 같은 발현 증대를 위한 vector에 손쉽게 넣을 수 있는 DNA sequence를 합성한다는 것이다.

Bacillus를 숙주로 한 재조합 유전자의 발현

E. coli 대신 *Bacillus subtilis*를 숙주로 하였을 때에는 다음 몇가지의 유리한 점이 있다. 첫째, *Bacillus*는 값싼 media에서 잘 자라므로 숙주를 대량으로 배양할 때 유리하며 둘째, endotoxin을 만들지 않아서 유전자 발현산물을 정제했을 때 소량 섞어있을 물질들에 의해 동물에 해롭게 될 확률이 적게되며 셋째, *Bacillus*는 유전자 발현 산물을 세포 밖으로 내보내는 능력이 있으므로 그 정제에 유리하다는 것이다(11). 이러한 이유에서 *Bacillus*를 숙주로 사용하는 실험들이 진행되어 왔다. 현재 많은 종류의 plasmid vector들이 개발되었고 특히 pHV 14 등(12) *E. coli*-*Bacillus* shuttle vector가 여러 종류 개발되어 있다. 그러나 *Bacillus*를 숙주로 할 경우에는 *E. coli*와는 달리 transformation 효율이 상당히 떨어진다는 단점이 있다. 따라서 *Bacillus* cell을 protoplast로 만들어서 plasmid를 삽입하는 방법과 phage vector를 사용하는 방법(13)들이 연구되었다.

고 찰

생명과화학자들이 지난 수십년간 연구하여 알게 되었던 생명현상에 대한 정보들이 이제 재조합 유전자의 발현증대를 위하여 직접적으로 응용되고 있다. 이러한 응용에 대한 성공 사례는 많이 찾아볼 수 있는데 재조합 박테리아에 함유되어 있는 전체 단백질의 30-40% 정도가 재조합 유전자의 발현 산물로 되어 있는 결과까지 얻을 수 있게 되었

음을 알 수 있다. 그러나 여기에서 한가지 주의할 점은 과거의 실험 방법이 그때의 사용된 유전자의 경우에 성공적이었다하여서 반드시 다른 유전자의 경우에도 같은 결과를 기대할 수는 없다는 것이다. 다시 말하면 아직 한가지의 가장 좋은 방법, 즉 모든 경우에 적용되는 방법을 고안해 내기에는 우리의 지식이 못 미치고 있는 것이다. 본 장에서 언급하였던 pAS1을 이용하는 방법이 용이하지 않을 경우에는 이 plasmid를 변형시켜 보든가, 또는 다른 종류의 plasmid를 사용해 보는 일을 게을리하지 말아야 할 것이다.

REFERENCES

1. Shimatake, H. and Rogenberg, M. (1981) *Nature*, **292**, 128-132.
2. Rogenberg, M., Mckenny, K. and Schumperli, D. (1982) "Promoters: Structure and Function", 387-406. Praeger, New York.
3. Mckenny et al. (1981) "Gene Amplification Analysis" Vol. 2, 385-415, Elsevier-North Hollond, New York.
4. Ptashne et al. (1976) *Science* **194**, 156-161.
5. Nakayama, K. and Inouye, M. (1982) *EMBO J.*, **1**, 771-775.
6. Inouye, M. (1983) "Exp. Manipulation of Gene Expression", Academic Press, 1-14.
7. Gellert, M. (1981) *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 879-910.
8. Menzel, R. and Gellert. M. (1983) *Cell* **34**, 105-113.
9. Burgess, R.R. (1969) *Nature* **221**, 43-46.
10. Grossman, A., Erickson, J. and Gross, C. (1984) *Cell* **38**, 383-390.
11. Debabov, V.G. (1982) "The Molecular Biology of the Bacilli" **1**, 331-370, Academic Press, New York.
12. Ehrlich, S.D. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 1433-1436.
13. Heilmann, H. and Reeve, J.N. (1982) *Gene* **17**, 91-100.