

## 酵母 遺傳子 發現用 Promoter 開發에 關한 研究

정동호<sup>1\*</sup>, 정호권<sup>2</sup>, 박준희<sup>1</sup>, 심상국<sup>3</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 산업대학 식품가공학과, <sup>2</sup>건국대학교 공과대학 미생물학과,  
<sup>3</sup>동남보건전문대학 식품가공과

**초록** : 본 연구는 *lacZ'* 유전자의 promoter 개발을 위하여 착수하였다. *lacZ'* 유전자의 heterologous promoter I과 II를 효모 염색체의 *Bam* HI DNA 단편에서 분리하였다. Promoter I의 크기는 2.5 kb 정도이고  $\beta$ -galactosidase 활성은 124.6 U/mg protein이었으며 promoter II의 크기와 효소활성은 4.0 kb와 168.8 U/mg이었다. 형질 전환체에서의 YEp plasmid 안정성은 52.7%에서 67.4% 정도였다. YEp plasmid로부터 YIp plasmid를 재조합하였으며 이 YIp plasmid는 대장균에서나 효모에서도 발현되었다. 효모로부터 분리한 promoter I과 II는 재조합된 YEp와 YIp plasmid의 promoter로서 이용 가능하였다(1994년 10월 13일 접수, 1995년 1월 25일 수리).

### 서 론

유용한 생리활성을 가진 여러 종류의 polypeptide를 재조합 DNA 기술로 미생물에서 생산하는 연구가 많이 이루어지고 있으며 일부는 상품화되어 있다. 이와같이 이종(異種) peptide(본래 그 미생물이 생산하지 않는 peptide)의 생산에 사용되는 주된 숙주 미생물은 대장균이었으나 최근에는 효모나 고초균 등을 숙주로 하는 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 이것은 학문적으로도 흥미가 있으며 대장균이 가지지 않는 특징을 활용하여 유용 peptide를 보다 효과적으로 생산할 수 있다.

효모 특히 *Saccharomyces cerevisiae*는 옛날부터 주류의 양조나 빵 제조 등의 식품공업에 사용되어온 안정성이 높은 미생물이다. 또 효모는 소위 진핵세포로 고등동물에 가까운 여러가지 기능을 가지고 있어 분자생물학적으로 많이 연구되어 있다. 그러나 효모에 의한 이종 peptide의 생산은 아직 실용단계는 아니고 여러가지 문제점이 남아 있다. 그 하나는 생산량에 관한 것이다. 생산효율에는 이종 peptide 또는 단백질질을 code하는 유전자의 발현 효율 즉, promoter가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

최근에 *S. cerevisiae*의 숙주-vector계(SC계)에 있어서 효모에 외래 유전자를 도입시켜 발현시킴으로서 특성의 단백질을 대량 생산하려고 연구하고 있다.<sup>1)</sup> 특히 외래 유전자 발현에 관한 기본적인 요소는 구조유전자의 전사를 맡은 promoter 영역이다. 전사활성이 강한 효모 promoter 하류에 외래 유전자를 연결시킴으로써 외래 유전자로 code되는 단백질을 효모 내에서 대량생산이 가능하다. 몇개의 효모 유전자가 cloning 되었고 이것을 사용한 효모 발현 vector의 개발이 시도되어 왔다. 당초에는 mRNA가 전체 polyA<sup>+</sup> RNA의 수%에 이르는 해당 효모 유전자가 cloning 되었다. 즉 *ADC1*<sup>2)</sup>(alcohol

dehydrogenase를 code하는 유전자), *PGK1*<sup>3)</sup>(phosphoglycerate kinase를 code하는 유전자), *GAP1*<sup>4)</sup>와 *GAP2*<sup>5-6)</sup>(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase를 code하는 유전자) 및 *ENO1*과 *ENO2*<sup>7)</sup>(enolase를 code하는 유전자)가 cloning 되어 이들의 promoter 영역만을 subcloning시켜 외래 유전자를 연결시킬 수가 있는 효모 발현 vector의 제작이 시도되었다. 그 결과 *ADC1*와 *PGK1*을 이용한 발현 vector에 의하여 사람 interferon과 B형 간염비루스 표층항원유전자(HBs Ag)를 효모 내에서 발현시키는 것에 성공하였다.<sup>8-11)</sup>

대장균 *lacZ'* 유전자에 효모 plasmid 2  $\mu$ m DNA 복제점을 결합시킨 plasmid pMC1587은 promoter가 삽입되면 *lacZ'* 유전자가 전사 발현되는 vector이다. 따라서  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정함으로써 promoter의 삽입 여부를 쉽게 검색할 수 있다. 이 plasmid를 이용하여 효모 chromosome으로부터 강력한 promoter를 분리하였으며 이 promoter에 목적하는 유전자를 연결시켜 효모에서 유용물질(유전자 산물)을 양산하기 위하여 안정성이 높은 YIp plasmid를 재조합하여 실험한 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주와 plasmid

본 실험에서 사용한 효모와 대장균은 Table 1과 같다. 사용한 plasmid는 효모의 YEp vector인 pMC1587(Fig. 1)로서 *lacZ'* 유전자에 효모 plasmid의 2  $\mu$ m DNA 복제기점과 효모 *LEU2* 유전자 그리고 pBR322의 *Amp<sup>r</sup>* 유전자를 결합시킨 vector로서 *lacZ'* 유전자에 promoter가 삽입되면  $\beta$ -galactosidase 유전자가 발현되어 유전자 산물을 생산하기 때문에 promoter를 검색하는데 아주 적절한 vector이다.

찾는말 : promoter, *Saccharomyces cerevisiae*, YEp plasmid, YIp plasmid  
\*연락처자

Table 1. Principal microorganisms

Organisms	Genotype, characteristics of both
<i>Escherichia coli</i>	
Ja 221	<i>leuB5, try, ΔE5, lacY, hsdR, recA</i>
MC 1065	<i>Δlac, leuB6, trpC9830, strB, hsdR, ara</i>
JM 83	<i>Δ(lac, pro) thi, strA, 80d, lacZ, M15</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
DKD-5D	<i>MATa, trpl, his3, leu2</i>
NA87-11A (cir <sup>+</sup> )	<i>ho, trpl, his3, leu2-3, II2, pho3-1, pho5-1</i>
KA82-51A-SCI	<i>Ho, HMLAa, MAAtAa, HMRAa, s003-4, lys2, his4, andlor, his5, leu2</i>

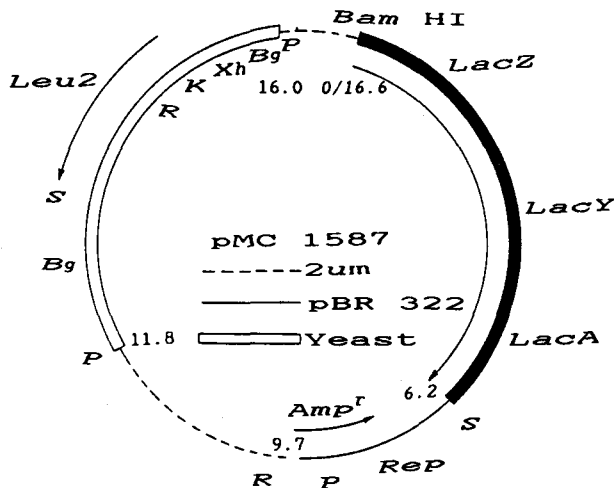


Fig. 1. The structure and restriction endonuclease map of plasmid pMC1587.

The heavy line represents *lacZYA* gene of *E. coli*. The double line represents yeast *LEU2* gene, the thin line shows DNA derived from pBR322. The dot line represents 2 $\mu$ m DNA of yeast. Amp, ampicillin resistance gene; P, *Pst*I; Bg, *Bgl*II, S, *Sal*I; R, *Eco*RI; K, *Kpn*I; Xh, *Xho*I.

### 배지 및 배양

대장균의 배양은 완전배지로서 L-broth[1% bactotrypton (Difco), 0.5% yeast extract(Difco), 0.5% NaCl]를 사용하였으며 최소배지로서 M9 최소배지(0.6% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.1% NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25% glucose)를 사용하였다. 필요에 따라 Casamino acid[0.5% (Difco), tryptophan(20  $\mu$ g/mg), ampicillin(50  $\mu$ g/mg), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactoside 40  $\mu$ g/mg(Sigma)]를 첨가하였다. 효모의 배양은 완전배지로서 YPD배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 mg% adenine)를 사용하였다. 고체배지에는 2% 한천을 가하여 사용하였다. 효모는 30 $^{\circ}$ C, 대장균은 37 $^{\circ}$ C에서 각각 배양하였다.

### DNA의 분리

대장균에서의 plasmid DNA의 대량분리는 Clewell과 Helinski법<sup>12)</sup>을 변형하여 CsCl-EtBr 평형밀도구배 초원심분리로 하였고 plasmid DNA의 소량분리는 Birnboim

과 Doly의 방법<sup>13)</sup>으로 행하였다. 효모에서의 plasmid DNA의 대량 분리는 효모의 세포벽을 Cameron의 방법<sup>14)</sup>에 따라 CsCl-EtBr 평형밀도구배 초원심분리로 행하였다. 효모 chromosomal DNA는 Hereford 등의 방법<sup>15)</sup>을 일부 변형하여 분리하였다.

### 형질전환

대장균의 형질전환은 Morrison의 방법<sup>16)</sup>에 따라 대장균의 competent cell을 제조하였으며 competent cell과 DNA를 혼합하여 0 $^{\circ}$ C에서 30분간 보존한 후 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 heat shock하였다. 신선한 L-broth를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 90분간 형질발현 시킨 후 선택평판배지에 도말하여 배양하였다.

효모의 형질전환은 Bergs의 방법<sup>17)</sup> 혹은 Ito 등의 방법<sup>18)</sup>을 변형하여 행하였다. 전자의 방법은 효모 배양액에서 균체를 모아 구연산 완충용액(0.1M Na-citrate[pH 5.8]-10 mM EDTA-1.2 M sorbitol)에 현탁하여 Zymolyase 용액을 가하여 30 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 정치보존하여 protoplast화 하였다. Protoplast 균체와 DNA를 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 15분간 방치하고 1.2 M sorbitol을 함유한 YPD 용액에 현탁하여 30 $^{\circ}$ C에서 20분간 배양한 후 선택용 평판배지(최소배지)에 증충하여 배양하였다.

후자의 변형법은 효모 배양액에서 균체를 모아 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl(pH 7.6)-0.1 mM EDTA)에 현탁한 후 균체를 회수하여 LA용액(0.1 M Na-acetate를 함유한 TE 완충용액)에 현탁하여 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 진탕하였다. 균체를 모아 LAG용액(0.1 M Na-acetate-15% glycerol-TE 완충용액)에 현탁한 후 DNA를 가하고 PEG 용액(50% polyethylene glycol 4000)을 가하여 혼합하고 30 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치 후 Leu<sup>-</sup> 배지에 도말하여 배양하였다.

### DNA의 절단 및 연결

DNA의 절단을 위한 제한효소의 처리는 plasmid DNA용액, TA 완충용액, 제한효소, 살균 증류수를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 행하였다. DNA 연결은 Maniatis 등의 방법<sup>19)</sup>에 따라 T<sub>4</sub> DNA ligase를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응 시켰다.

### Plasmid 안정성

Plasmid 안정성은 형질전환을 완전배지에서 하룻밤 배양하고 무균수로 회석한 후 YPD 평판배지에 배양하여 이것을 최소평판배지에 replica함으로써 plasmid marker를 잃은 colony의 수로부터 백분율로 계산하였다.

### $\beta$ -Galactosidase 비활성의 측정

$\beta$ -Galactosidase 조(粗)효소용액은 Rose 등의 방법<sup>20)</sup>에 따라 행하였다.

대장균의 경우에는 흡광도(OD<sub>660</sub>)가 0.6에 달한 배양액 0.1 ml/를 취하고 여기에 Z buffer[60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.0)-10 mM KCl-1 mM MgSO<sub>4</sub>-50 mM

$\beta$ -mercaptoethanol] 0.9 ml, chloroform 50  $\mu$ l 및 0.1% SDS용액 20  $\mu$ l를 각각 첨가한 후 곧 vortex mixer로 10초간 혼합하여 28°C에서 5분간 preincubate한 것을 조효소용액으로 하였다.

효모의 경우에는 제한배지로 30°C에서 2일간 진탕배양하여 포화상태까지 생육시킨 배양액 5ml를 원심분리하여 균체를 모으고 SM buffer[20 mM Tris-HCl(pH 7.4)-85 mM NaCl-1 mM MgCl<sub>2</sub>]용액으로 한번 원심 세척한 후 추출완충용액[0.1 M Tris-HCl(pH 8.0)-20%(v/v) glycerol-1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)-1 mM DTT(dithiothreitol)] 5 ml에 현탁하고 glass beads(Fugistone, 0.25~0.4 mm)를 가하였다. 이것을 -80°C에서 30분간 동결시킨 다음 실온에서 용해하여 vortex mixer로 30초씩(4°C) 6회 행하였다. 여기에 다시 추출완충용액 0.5 ml를 가하고 원심분리(3,000 rpm, 10분) 후 조효소용액으로 사용하였다.

활성측정은 Miller의 방법<sup>20)</sup>에 따라 행하였다. 활성은 1분동안에 10<sup>9</sup>개의 세포에서 생성된  $\beta$ -galactosidase가 절단하는 O-nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside의 mol수로 나타내었다. 단, 1 unit는 28°C, pH 7.0, 1분간에 1 nmol의 O-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 나타내었다.

단백질의 정량은 Bradford 등의 방법<sup>21)</sup>에 따랐다. 단백질 정량용 염색용액[protein assay kit I (BIO-RAD)]을 탈이온수로 5배로 희석하고 Whatmann No.1 여지로 여과하였다. 이것을 시료용액 100  $\mu$ l(0.1~0.5 mg/ml)의 단백질 함유)에 5 ml 가하여 교반하였다. Blank로서는 10  $\mu$ l의 효모 파괴용 완충용액을 사용하였다. 5~60분 사이에 595 nm에서의 OD를 측정하고 검량선에 의하여 단백질을 정량하였다.

$\beta$ -Galactosidase 비활성은 상기 정량한 효소액의 활성치를 단백질 측정치로 나누어 구하였다.

### 전기영동

1~8 kb까지의 DNA 단편의 분리에는 Tanaka 등의 방법<sup>22)</sup>에 따라 1% agarose(type II, Sigma) slab gel을

사용하여 전기영동을 행하였다. 0.1~1 kb까지의 DNA 단편의 분리에는 Maniatis 등의 방법<sup>19)</sup>에 따라 8% polyacrylamide gel로 전기영동을 행하였다.

### Gel에서 DNA 회수

저융점 agarose에서 DNA의 회수는 Weislander 등의 방법<sup>24)</sup>에 따라 65°C에서 10분간 가열하여 gel을 용해하여 회수하였다. Polyacrylamide gel에서 DNA의 회수는 Maxam 등의 방법<sup>25)</sup>에 따라 pipettman tip에 siliconized glass wool을 채우고 tip 끝을 밀봉하고 으깨뜨린다. 여기에 0.5 M NH<sub>4</sub>-acetate-10 mM Mg-acetate-0.1% SDS-0.1 mM EDTA용액으로 조성된 추출액으로 gel 단편이 완전히 잠기게 채우고 37°C~42°C 하룻밤 방치 후 추출하여 회수하였다.

## 결과 및 고찰

### 효모 염색체 DNA에서 gene bank 조제

효모[KA82-51A-SCI와 NA87-11A(cir<sup>-</sup>)]의 염색체를 추출하여 BamHI 제한효소로 절단하여 gene bank를 조제하고 이를 plasmid pMC1587에 ligation 하여 대장균에서 형질전환시켜  $\beta$ -galactosidase 활성을 육안으로 조사하여 1차에 40개 colony를 선발하였으며 2차선발에서 26개 colony가 그 활성을 유지하고 있어 상당수의 형질전환체를 얻을 수 있었다.

### 효모의 YEp plasmid 형질전환체의 유전자 발현산물

대장균의 형질전환체에서 BamHI 단편이 삽입된 plasmid pMC1587만을 순수 분리 조작을 하여 다시 효모에 형질전환시켜  $\beta$ -galactosidase 활성을 측정한 결과는 Table 2에서와 같이 lacZ' 유전자의 promoter가 효모 염색체의 BamHI 단편에 존재함을 알 수 있었다. 이와같이 전사활성이 강한 효모 promoter 하류에 외래 유전자로 연결시키므로써 외래 유전자로 code된 단백질을 효모내에서 대량생산 할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 2.  $\beta$ -Galactosidase activity, size of promoter and plasmid stability in the transformant of yeast

Number of transformant	$\beta$ -Galactosidase activity (U/ml)	$\beta$ -Galactosidase activity (U/mg protein)	Base pair (kb)	Plasmid stability (%)
1	Trace	Trace	0.3	34.1
2	3.40	3.24	0.15	29.0
3	136.55	85.90	5.5	52.9
4	182.39	124.60	2.5	67.4
5	72.30	67.80	12.5	28.8
6	3.19	2.20	0.19	20.5
7	6.46	5.26	4.8	50.6
8	Trace	Trace	?	20.0
9	119.07	168.80	4.0	52.7
10	1.15	3.58	0.11	22.2
11	101.58	62.50	7.5	50.3
12	4.20	3.92	0.11	25.0
13	42.45	35.00	8.5	52.2
14	4.60	3.78	0.18	23.0

**효모 염색체의 BamHI 단편 promoter의 크기**

효모 염색체 BamHI 단편이 삽입된 plasmid pMC1587 DNA들을 BamHI로 분해하여 agarose gel 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같고 이에 따른 DNA의 염기수는 Table 2와 같다.

Table 2와 같이 No.4, No.9 형질전환체에서의 유전자 산물인 β-galactosidase는 활성이 강하여 각각 124.6 U/mg protein, 168.80 U/mg protein이었으며, No.3, No.5, No.11

1 2 3 4 A 5 6 7 B 8 9 10 C 11 12 13 14

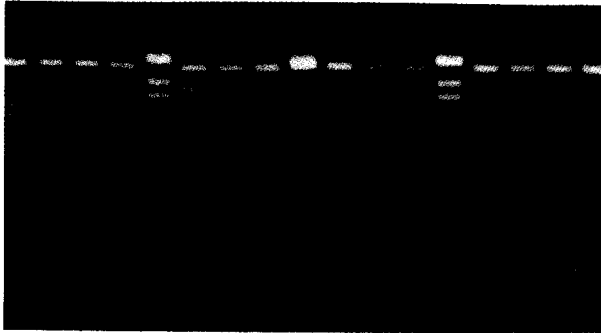


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of yeast chromosomal DNA digested with Bam HI. Lane 1~14; digested with BamHI; Lanes A, C; size marker(λ DNA digested with HindIII); Lane B; plasmid pMC1587 digested with BamHI.

형질전환체에서는 아주 그 활성이 낮았다.

Table 2의 promoter의 size에 따라 β-galactosidase 활성이 각각 다른 것을 알 수 있으며 형질전환체 No.4, No.9의 promoter의 대략적인 크기인 2.5 kb, 4.0 kb의 것이 β-galactosidase 활성이 높았고 그 이상이나 그 이하의 크기에서는 효소활성이 낮았다.

효모의 promoter 영역에서 몇개의 공통배열이 차츰 밝혀지고 있다.<sup>26-28)</sup> 특히 대장균의 Pribnow 배열이 상동되는 TATA box 이외에 pyrimidine rich 배열, 전사 개시점 부근의 PyAAPu 배열 등이 RNA polymerase II에 의한 전사에 필요한 것으로 생각한다.<sup>29,30)</sup> 또한 효모에서의 발현에는 mRNA의 3'말단의 polyA 부가의 signal이 아주 중요하다고 한다.<sup>31,32)</sup>

**Plasmid의 안정성**

각 효모의 형질전환체의 plasmid 안정성은 Table 2와 같이 높은것은 67.4%이고 낮은 것은 20%의 것도 있었다.

**Ylp plasmid vector의 재조합**

본 실험에 사용한 pMC1587은 YEp vector이므로 Table 2와 같이 안정성이 비교적 낮은 편이다. 그런데 일반적으로 YEp vector의 안정화에는 A, B의 두가지 단백질이 필요하므로 내재성의 2 μm DNA를 가진 효모 cir<sup>+</sup> 균주에서는 YEp vector는 안정하나 2 μm DNA를 가지지

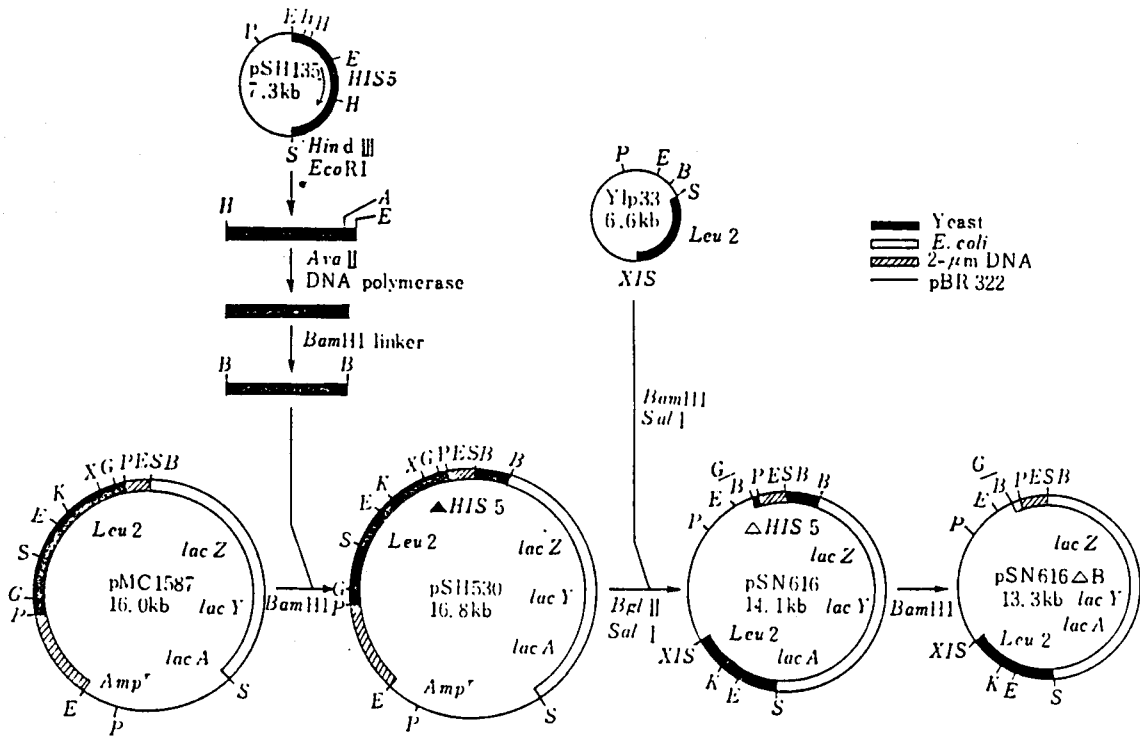


Fig. 3. Construction of the Ylp plasmids.

pSH135 was cut with HindIII and EcoRI to use HIS5 promoter and about 800 bp HindIII-EcoRI fragment was purified from the 4% polyacrylamide gel. This was cut with AvaII and the large HindIII-AvaII fragment was purified from the gel. The cohesive ends were filled up with E. coli DNA polymerase, attached with BamHI linker, cut with BamHI, and again the fragment was purified from the gel. Restriction endonuclease sites are: E, EcoRI; P, PstI; H, XhoIII; B, BglIII; S, SalI; G, BglII; X, XhoI; K, KpnI; A, Ava II.

않는 *cir*<sup>o</sup> 균주에서는 불안정하다. 그러므로 유전자 산물을 기대하는 경우에는 vector의 종류에 따라 숙주 효모의 선정에 유의하지 않으면 안될 것이다.<sup>33-39)</sup>

특히 YIp는 세포내에서는 효모 염색체의 상동배열과의 사이에서 재조합이 일어나고 YIp의 형질전환은 일반적으로 YEp나 YRp의 1/1000이라고 하나 YIp에 삽입된 효모 유래의 배열을 절단하여 직쇄화한 다음 형질전환을 하면 그 효율이 현저히 증대하여 50~3,000배나 된다고 하며<sup>40)</sup> YIp와 형질전환체는 아주 안정하므로 공업적 응용에서 YIp vector 재조합이 절실히 필요하다.

YEp plasmid인 pMC1587에서 YIp plasmid의 재조합 과정은 Fig. 3과 같다. 즉, *HIS5* promoter를 이용하기 위하여 먼저 plasmid pSH135를 *HindIII*과 *EcoRI* 제한 효소로 절단하였다. 단편의 크기는 약 800 bp정도이므로 4% polyacrylamide gel로 정제하고 나서 다시 *AvaII*로 절단한 *HindIII-AvaII* 단편을 gel로부터 정제하였다. Cohesive end는 *E. coli* DNA polymerase로 blunt로 만들고 *BamHI* linker를 붙이고 나서 *BamHI*으로 절단하여 이 단편을 gel로부터 정제하였다. 다음에 plasmid pMC1587을 *BamHI*로 절단하고 나서 *BamHI* 단편과 같이 ligation하여 plasmid pSH530을 재조합하였다.

pSH530은 *BglII*와 *SalI*로 절단하고, YIp 33은 *BamHI*와 *SalI*로 절단하고 나서 혼합하여 ligation하였다. 이들을 대장균에 형질전환하여 *Leu*<sup>+</sup>, *lacZ*<sup>'</sup> 형질전환체를 선별하고 plasmid pSN616을 이들로부터 분리하였다. pSN616을 *BamHI*으로 절단하고 나서 그대로 ligation한 다음 대장균에 형질전환시켜 증폭하였다. Plasmid pSN616△B를 대장균에서 분리하였으나 이 plasmid는 *lacZ*<sup>'</sup> marker를 잃고 있었다.

따라서 YEp plasmid vector에서 새로운 YIp plasmid vector의 재조합이 가능하였다. 이 재조합 pSN616△B는 대장균과 효모에서 발현되는 shuttle vector이며 염색체에 integration되는 YIp vector로서 기능을 갖고 있다. 그리고 이 plasmid는 *lac operon*의 구조유전자가 있어 이 앞부분에서 promoter가 삽입되면 *lacZ*<sup>'</sup> 유전자가 발현될 수 있는 unique한 vector이며, *LEU2*(isopropyl malate dehydrogenase를 code하는 유전자)를 함께 가진 13.3 kb의 크기이다.

#### 효모의 YIp plasmid 형질전환체의 유전자 발현산물

Plasmid pSN616△B에 효모로부터 분리한 promoter I과 promoter II를 삽입하여 재조합한 plasmid를 효모에 형질전환시켜 β-galactosidase 활성을 측정한 결과는 각각 117.8 U/mg protein과 164.5 U/mg protein이었다. 따라서 효모로부터 분리한 promoter I과 II는 재조합된 YEp와 YIp plasmid의 promoter로서 사용할 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 문교부 대학부설 유전공학연구소 연구비 지원으로 이루어진 연구결과의 일부이며 여러 실험재

료를 제공하여 주신 오사카대학 공학부 발효공학과 오시마 야스지 교수에게 감사를 드린다.

## 참 고 문 헌

- Inouye, M (1983) In experimental manipulation of gene expression. p 83, Academic Press, New York.
- Hitzeman, R. A., F. E. Hegie, H. L. Levine, D. V. Goedde, G. Ammerer and B. D. Hall (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature* **293**, 717-722.
- Hitzeman, R. A., L. Clarke and J. Carbon (1980) Isolation and characterization of the yeast 3-phosphoglycerokinase gene(*PGK*) by an immunological screening technique. *J. Biol. Chem.* **255**, 12073-12080.
- Dobson, M. J., M. F. Tuite, N. A. Roberts, A. J. Kingsman, S. M. Kingsman, R. E. Perkins, S. C. Coroy, B. Dubular and L. A. Forthergill (1982) Conversion of high efficiency promoter sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2625-2637.
- Holland, J. P. and M. J. Holland (1979) The primary structure of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **254**, 9839-9845.
- Mata, Z. S., and J. C. Rabinowitz (1980) Formyl-methyl-methylene tetrahydrofolate synthetase(combined) from yeast. *J. Biol. Chem.* **255**, 2569-2577.
- Holland, M. J., J. P. Holland, G. P. Thill and K. A. Jackson (1981) The primary structure of two yeast enolase genes Homology between the 5' noncoding flanking regions of yeast enolase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase genes. *J. Biol. Chem.* **256**, 1385-1395.
- Hitzeman, R. A., D. W. Leung, L. J. Perry, W. J. Kohr, F. E. Hegie, H. L. Levine, R. Wetzel and D. V. Goedde (1982) In Recent Advance in Yeast, Molecular Biology Recombinant DNA. p 173, Univ. California Press, Berkeley.
- Taussing, R. and M. Carlson (1983) Nucleotide sequence of the yeast *SUC2* gene for invertase. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1919-1928.
- Struhl, K. (1982) Regulatory site for *HIS3* gene expression in yeast. *Nature* **300**, 284-287.
- Kim, K. T., K. B. Song, Y. C. Choi, S. K. Rhee, M. H. Han (1985) Cloning of the structural gene for hepatitis B virus surface antigen into a yeast vector. *Korean Biochem. J.* **18**, 122-128.
- Clewell, D. B. and D. R. Helinsk (1969) Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escherichia coli*; Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **62**, 1159-1166.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Cameron, J. R., P. Philippsen and R. W. Davis (1977) Analysis of chromosomal intergration and deletion of yeast plasmids. *Nucleic Acids Res.* **4**, 1429-1448.
- Hereford, L. M., K. Fahrmer, J. Woolford Jr., M. Rosbash and D. B. Kaback (1979) Isolation of yeast histone gene *H2A* and *H2B*. *Cell* **18**, 1261-1271.

16. Morrison, D. A. (1977) Transformation in *Escherichia coli*: Cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**, 349-351.
17. Bergs, J. D. (1978) The transformation of yeast by a replication hybrid plasmid. *Nature* **275**, 104-109.
18. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cation. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
19. Maniatis, T., E. F. Firtsh and J. Sambrook (1982) Molecular Cloning. p396, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
20. Rose, M., M. J. Casadban and D. Bostein (1981) Yeast genes fused to  $\beta$ -galactosidase in *Escherichia coli* can be expressed normally in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 2460-2464.
21. Miller, J. H. (1972) Experiments in Molecular Genetics. p 325, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
22. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
23. Tanaka, T. and B. Weisblum (1975) Construction of colicin E1-R factor composite plasmid *in vitro*; Means for amplification of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **121**, 354-362.
24. Weislander, L. (1979) A simple method to recover intact high molecular weight RNA and DNA after electrophoretic separation in low gelling temperature agarose gels. *Anal. Biochem.* **98**, 305-309.
25. Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 560-564.
26. Dobson, M. J., M. F. Tuite, N. A. Roberts, A. J. Kingsman and S. M. Kingsman (1982) Conversion of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **10**, 2625-2637.
27. Hitzeman, R. A., F. E. Hagie, J. S. Hayflick, C. Y. Chen, P. H. Seeburg and R. Derynck (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for 3-phosphoglycerate kinase. *Nucleic Acids Res.* **10**, 7791-7808.
28. Bennetzen, J. L. and B. D. Hall (1982) The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase I. *J. Biol. Chem.* **257**, 3018-3025.
29. Russel, D. W. and M. Smith (1983) Nucleotide sequence of the yeast alcohol dehydrogenase II gene. *J. Biol. Chem.* **258**, 2674-2682.
30. Dobson, M. J., M. F. Tuite, N. A. Robert, R. M. King, D. C. Burke, A. J. Kingsman and S. M. Kingsman (1983) Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of human interferon-alpha directed by the TRP1 5' region. *Nucleic Acids Res.* **11**, 2287-2302.
31. Zalkin, H. C. Yanofsky (1982) Yeast gene *Trp5*: structure, function, regulation. *J. Biol. Chem.* **257**, 1491-1500.
32. Faye, G., D. W. Leung, K. Tatchell, B. D. Hall and M. Smith (1981) Deletion mapping of sequences essential for *in vivo* transcription of the iso-1-cytochrome c gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 2258-2262.
33. Scherer, S. and R. W. Davis (1979) Replacement of chromosomal elements with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4951-4955.
34. Beggs, J. D. (1978) Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **275**, 104-109.
35. Broach, J. R., J. N. Strathern and J. B. Hicks (1979) Transformation in yeast development of a hybrid cloning vector and isolation of CAN1 gene. *Gene* **8**, 121-133.
36. Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer and R. W. Davis (1979) High frequency transformation of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 1035-1039.
37. Stinchcomb, D. T., C. Mann and R. W. Davis (1982) Centromeric DNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **158**, 157-179.
38. Bostein, D., S. C. Falco, S. E. Stewart, M. Brennan, S. Scherer, D. T. Stinchcomb, K. Struhl and R. W. Davis (1979) Steril host yeast (SHY): a eukariotic system of biological container for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**, 17-24.
39. Kikuchi, Y (1983) Yeast plasmid requires a *cis*-acting locus and two plasmid proteins for its stable maintenance. *Cell* **35**, 487-493.
40. Orr-Weaver, T. L., J. W. Szostak and R. J. Rothstein (1979) Application of yeast transformation with linear and gapped plasmids. *Meth. Enzymol.* **101**.

#### Studies on the Development of Yeast Promoter for the Gene Expression

Chung, Dong Hyo<sup>1\*</sup>, Ho Kwon Chung<sup>2</sup>, Joon Hee Park<sup>1</sup>, Sang Kook Shim<sup>3</sup>(<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea, <sup>2</sup>Department of Microbial Technology, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea, <sup>3</sup>Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea)

**Abstract**: The purpose of this study was the development of promoter for the *lacZ'* gene. Two heterologous promoter I and II of *lacZ'* gene were isolated from chromosomal DNA Bam HI fragment of yeast. The size of the promoter I was estimated to be 2.5 kb and  $\beta$ -galactosidase activity was 124.6 U/mg protein, and the size of the promoter II was 4.0 kb and its  $\beta$ -galactosidase activity was 168.8 U/mg protein, respectively. The stability of the recombinant YEp plasmid in the transformant was from 52.7 to 67.4% at minimal medium. YIp plasmid was constructed from YEp plasmid, and expressed both in *E. coli* and yeast. The promoter I and II iso-lated from yeast chromosomal DNA can be used for promoter of plasmid YEp and YIp.

\*Corresponding author