

대장균에서 무작위 샤인-달가노 서열이 소성장호르몬 유전자 발현에 미치는 영향

나경수¹ · 백형석² · 이용세 · 최장원*

대구대학교 자연자원대학 생명자원학부
¹대구공업대학 식품영양과
²부산대학교 미생물학과

Effect of random Shine-Dalgarno sequence on the expression of Bovine Growth Hormone Gene in *Escherichia coli*

Kyung Soo Ra¹ · Hyung Suk Baik² · Yong Se Lee · Jang Won Choi*

Division of Life Resources, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea
¹Department of Food and Nutrition, Taegu Technical College, Taegu 704-350, Korea
²Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

In order to search for the effects of Shine-Dalgarno (SD) sequence and nucleotide sequence of spacer region (SD-ATG) on bGH expression, oligonucleotides containing random SD sequences and a spacer region were chemically synthesized. The distance between SD region and initiation codon (ATG) was fixed to 9 nucleotides in length. The expression vectors have been constructed using pT7-1 vector containing a T7 promoter. Positive clones were screened with colony hybridization and named pT7A or pT7B plasmid series. The selected clones were confirmed by DNA sequencing and finally, 19 clones having various SD combinations were obtained. When bovine growth hormone was induced by IPTG in *E. coli* BL21(DE3), all cells harboring these plasmids produced a detectable level of bGH in western blot analysis. However, various SD sequences did not affect on bGH expression, indicating that the sequences of SD and the spacer region did not sufficiently destabilize mRNA secondary structure of bGH gene. Therefore, these results indicate that the disruption of mRNA secondary structure might be a major factor for regulating bGH expression in the translational initiation process.

Key words – T7 promoter, Shine-Dalgarno sequence, bGH expression, mRNA secondary structure

서 론

소성장호르몬(bGH)은 191개의 아미노산으로 구성된 22 kDa의 단일 폴리펩타이드 사슬(당단백질이 아님)로 소의

뇌하수체 전엽에 217 아미노산의 전구체로 존재하며, 생성 및 분비과정 동안에 26개 아미노산으로 구성된 신호서열이 제거되면서 활성을 갖게 되는 전형적인 동물호르몬이며 [14], 소의 성장발육과 우유생산을 촉진하거나 또는 insulin-like growth factor의 분비를 유도하는 효과를 지니고 있다. 또한 생리대상적으로 볼 때 glucose의 산화나 지방산 합성의 저하, glucose의 생성, 지방산 산화, 단백질 합성, Ca⁺²

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : +82-53-850-6756, Fax : +82-53-850-6769
E-mail : chjawo@taegu.ac.kr

의 흡수, 세포증식의 증가 등에 영향을 준다[1, 2]. bGH 유전자는 4개의 intervening sequence (248 bp, 227 bp, 229 bp, 274 bp)를 포함하여 1800 bp의 길이를 가지고 있으며, 코돈사용 빈도면에서 보면 코돈의 마지막 염기는 보통 G 나 C 염기로 끝나는 경우가 대부분이다(81.7%)[13,30]. N-말단 아미노산 서열의 경우 알라닌 또는 페닐알라닌이 발견되는데, 이는 신호서열의 alternative cleavage에 의한 것으로 보이지만 생물학적 활성에는 차이가 없는 것으로 나타나고 있다[15,23]. 재조합 DNA를 이용한 bGH의 생산은 mouse metallothionein-I (MT) 프로모터에 융합된 chimeric MT-bGH 유전자를 동물세포에서 세포 배양에 의해 분비 단백질로서의 생산이 보고되었으며, intron이 없는 bGH의 구조가 bGH의 생성에 보다 효과적인 것으로 나타났다[16]. 또한 대장균에서 소성장호르몬 유전자의 발현에 관하여 여러 group들[3,6,20,21,23,27]에 의해 시도되었으며, 거의 모든 경우 소성장호르몬 유전자 자체의 변형 또는 주변서열의 최적화에 의해 발현 수준을 증가시킨 것으로 보고되었다. 소성장호르몬의 경우 미생물에서 발현시 여러 가지 발현상의 문제점들, 즉 (i) mRNA의 5'-말단에 존재하는 이차구조에 의한 단백질 합성의 저해[27], (ii) bGH 유전자에 존재하는 non-preferred codon들에 의한 대장균내의 tRNA pool과의 연관관계[6,23] (iii) bGH 단백질 자체의 염기성 등전점 등에 의하여 유전자 자체의 변형없이 직접적으로 발현을 유도하였을 때는 전체단백질의 0.5% 이상을 넘지 못하는 것으로 보고되었다[20].

대장균에서 클로닝 된 외부유전자를 높은 수준으로 발현시키기 위하여 multicopy를 갖는 plasmid replicon, 강력하면서 유도적인 프로모터에 의한 전사과정, mRNA 해독과정의 효율성, 숙주세포 등 여러 가지 요인들을 적절히 선택하여 조절해 주어야 한다. 그 중에서도 개시코돈 앞쪽에 위치한 Shine-Dalgarno (SD) 서열이 해독과정에서 필수적인 것으로 알려져 왔으며[7,20], 또한 SD와 ATG 개시코돈 사이의 거리(spacer region)[9,24] 및 염기서열도(AT rich sequence)[7,19] 해독과정의 효율성에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 그러나 이런 지역 주변의 염기서열도 전체적인 mRNA 이차구조에 영향을 주므로 중요한 요인으로 작용하고 있다[8,19].

따라서 본 연구에서는 소성장호르몬 유전자의 첫 번째 아미노산부터 다섯 번째 아미노산을 암호화하는 5'-말단 mRNA

서열에 존재하는 loop형태의 이차구조[27] 파괴 없이 해독과정의 효율성을 증가시키는 요인들, 즉 mRNA의 이차구조를 풀어 주는 적절한 SD 서열 및 spacer 지역의 서열을 찾기 위하여 SD와 ATG 코돈 사이의 거리를 9 염기로 고정하고 무작위 서열로 oligonucleotide를 합성하여 소성장호르몬 유전자 앞쪽에 넣어 bGH mRNA 이차구조에 영향을 줌으로서 소성장호르몬 단백질 발현에 미치는 영향에 대하여 조사하려 한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

대장균에서 발현백터 제조 및 형질전환, 유전자 증폭을 위하여 *Escherichia coli* HB101 (*hsdR*, *hsdM*, *leu*, *pro*, *rexA*, *supE*)를 사용하였으며, T7 프로모터를 이용한 소성장호르몬 발현을 위하여 *E. coli* BL21(DE3) (*F'*, *hsdS*, *gal*, λ CI⁸⁵⁷, *ind1*, *sam7*, *nim5*, *lacUV5-T7 gene1*) 균주[25]를 사용하였다. 플라스미드를 함유하는 대장균은 37°C에서 ampicillin (50 µg/ml)을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지(yeast extract 5 g/L, bactotryptone 10 g/L, sodium chloride 10 g/L)에서 키웠으며 고체 배지는 LB 배지에 bactoagar (15 g/L)를 첨가하여 사용하였다.

소성장호르몬의 전체 cDNA를 함유하는 유전자원으로서는 pUBG2 플라스미드[3]를 bGH 유도체 제조를 위하여 사용하였고, T7 프로모터를 갖는 발현백터인 pT7-1[26]을 대장균에서 소성장호르몬 발현을 위하여 재조합 플라스미드 구축을 위한 시작 플라스미드로 사용하였다.

시약 및 효소류

모든 제한효소와 DNA 변형효소는 Poscochem (Korea) 및 Boeringer Mannheim (Germany)으로부터 구입하여 사용하였다. 무작위 SD 서열 및 소성장호르몬의 5'-말단 서열을 갖는 oligonucleotide는 Bioneer (Korea)에서 합성하였다. [α -³⁵S] dATP (1,000 Ci/mmol)와 [α -³²P]dCTP (3,000 Ci/mmol)는 Amersham(UK) 것을 사용하였다. Prime-a-Gene Labeling kit는 Promega (USA)로부터, sequencing kit는 United States Biochemical (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, alkaline phosphatase labeled secondary antibody, BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate), NBT (nitroblue tetrazolium)

등은 Kirkegaard & Perry Lab으로부터 구입하여 사용하였다. IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactoside), acrylamide, molecular weight markers, urea, lysozyme, agarose, ampicillin 등은 Sigma (USA)로부터 구입하였고, 나머지 모든 시약 및 재료들은 일급 수준의 것을 사용하였다.

플라스미드 추출 및 제한효소처리

플라스미드를 함유하는 대장균 세포들로부터 플라스미드의 분리는 Birnboim and Doly[17]의 alkaline lysis 방법에 따라 행하였다. 많은 양의 플라스미드를 추출하기 위하여 5 M LiCl와 polyethylene glycol을 사용하는 방법에 따라 추출하거나, 또는 플라스미드 추출 키트(QIAGEN, Germany)를 사용하였다. 제한효소 처리는 공급한 회사에서 제공하는 반응 조건에 따라 DNA의 양과 효소의 unit를 조절하여 반응 buffer와 섞은 후, 37°C에서 1-2시간 반응시켰다. 자른 반응액은 6 × loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose)를 넣어 반응을 중지시킨 다음, agarose gel상에서 분리하여 ethidium bromide 용액(0.5 μ g/ml)에 5분간 착색시키고, 260 nm의 자외선을 통과시켜 polaroid 필름(Type 667)을 사용하여 사진 촬영하였다. 효소 처리에 의해 잘려진 DNA 조각을 회수하기 위하여 TAE (40 mM Tris/acetate, 1 mM EDTA) agarose gel에서 분리 후, 원하는 크기의 DNA 절편을 잘라내어 silicagel 입자를 이용한 추출 키트인 QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany)를 사용하여 분리하였다.

DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 double strand DNA를 주형으로 하는 Sanger 등[18]의 dideoxy chain termination 방법에 따라 행하고, 반응액은 8 M urea가 첨가된 6% polyacrylamide gel에서 분리하고, 이동이 끝난 gel은 건조 후, -70°C에서 X-ray 필름에 노출시켜 autoradiography에 의해 결과를 분석하였다.

Colony hybridization

Cohen 등[17]의 형질전환 방법에 따라 얻어진 형질전환체들을 LB 배지 위에 놓인 nitrocellulose filter에 멸균된 toothpick을 이용하여 옮긴 후, 37°C에서 colony들이 나타날 때까지 배양한다. 균이 성장하였을 때 filter를 제거한

후, 실온에서 변성용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 5분동안 DNA를 변성시키고, 중화용액(0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)에서 5분 중화시킨 다음, 2 × SSC에서 2분동안 washing 한 후 3 MM paper위에서 말리고 85°C vacuum oven에서 2시간동안 baking하였다. Hybridization은 bGH cDNA를 probe로하여 Sambrook 등[17]의 방법에 따라 수행하였고, 42°C에서 hybridization 후, filter는 실온, 2 × SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M Sodium citrate)에서 두 번, 65°C, 0.2 × SSC & 0.2% SDS에서 여러 번 세척한 다음, X-ray 필름에 현상한 후 결과를 분석하였다.

소성장호르몬 발현유도 및 단백질분석

소성장호르몬 유전자가 도입된 발현벡터를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3) 형질전환체들을 각각 ampicillin (50 μ g/ml) 이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 37°C에서 하루 밤 배양한다. 그다음날 균을 함유하는 배양액은 같은 때지에 1/200로 희석한 후, 세포밀도가 OD₆₀₀에서 0.5에 도달할 때까지 키운다. 단백질 합성을 유도하기 위하여 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가한 다음, 6시간 더 배양하고 배양액 1 ml을 취하여 원심분리에 의해 균체를 얻은 다음, sample buffer (0.05 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.1% bromphenol blue) 200 μ l에 현탁하여 세포를 파괴한 후 단백질 분석을 위하여 사용하였다. 단백질 전기영동은 Laemmli[12]의 방법에 따라 12.5% SDS-polyacrylamide gel에서 실시하였다. 일정한 전기장에서 분리가 끝난 gel은 coomassie brilliant blue 용액에 30분 정도 염색한 후 탈색용액(30% methanol, 10% acetic acid)에 옮겨 탈색을 행하고, 그 후 Kodak X-100 필름을 사용하여 촬영한 다음, 전체 단백질중 관심 단백질의 양은 densitometer (Shimadzu CS-9000)를 이용하여 분석하였다.

Western blot analysis

SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리한 후, immobilon-P membrane으로 단백질 이동은 electroblotting buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM glycine, 10% methanol)를 사용하여 wet gel blotting을 실시한다(20 mA, 2 h). Membrane에 이동 후 비특이적 결합을 방지하기 위해 3% non-fat dried milk가 첨가된 phosphate-buffered saline (PBS; 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄,

pH 7.4)으로 1시간 동안 blocking하고 polyclonal anti-bGH antibody (1:2,000 dilution)를 넣어 1시간 동안 반응을 시킨다. 결합하지 않은 1차 항체는 washing buffer (PBS + 0.5% Triton X-100)로 10분간 3회 세척하여 제거하고, goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (1:2,000 dilution)를 넣어 1시간 반응을 시키고, 다시 washing buffer로 3회 세척한다. 그 다음 BCIP/NBT phosphatase substrate system을 사용하여 발색시켜 항원항체 반응에 의해 형성된 bGH band를 확인하였다.

결과 및 고찰

무작위 사인-달가노 서열을 갖는 oligonucleotide의 설계 및 합성

진핵세포 유전자를 원핵세포에서 발현할 때 필수적 요소인 Shine-Dalgarno (SD) 주변서열을 변화시켜 소성장호르몬 전사체의 이차구조를 변화시키므로서 효율적인 단백질 생산을 위한 SD 서열과 그 주변서열을 찾기 위하여 Fig. 1에서 보는 바와 같이 두종류(oligonucleotide A, B)의 올리고머를 합성하였다. SD를 구성하는 6개의 염기서열은 adenine과 guanine이 무작위로 합성되도록 하였고, 또한

SD와 ATG 개시코돈 사이는 단백질 생산에 효율적인 즉, 라이보솜의 16S rRNA가 mRNA의 SD 서열에 결합한 후 단백질 합성을 위한 적절한 거리인 9 염기 서열을 유지하면서 A, T, G, C 모든 염기가 무작위적으로 합성되도록 설계하였다. 소성장호르몬 유전자의 5'-말단은 원래의 서열대로 합성하였지만(oligonucleotide A), oligonucleotide B에서는 codon 7, 8, 9번에서 아미노산 정보는 변화 없이 대장균에서 우세한 codon 서열로 바꾸었다. 벡터의 적절한 부위로 도입하기 위하여 올리고머의 앞쪽에는 EcoRI site를 부여하였고 bGH 유전자와 결합을 위해 아미노산 15번째까지 합성하여 아미노산 16번째에서 결합을 위해 HgiAI site를 도입하였다. 합성된 49 mer와 35 mer oligonucleotide를 T₄ polynucleotide kinase 효소를 이용하여 인산화 시킨 후, 47 mer와 25 mer oligonucleotide를 각각 같은 양으로 섞어 annealing시켰다. 두 가지의 annealing된 산물, 즉 49/47 oligonucleotide와 35/25 oligonucleotide를 ligation 시켜 82 base pair로 구성된 oligonucleotide A와 B를 제조하였다.

재조합 bGH 발현벡터의 구축

무작위 SD 서열과 bGH DNA를 결합 후 발현벡터를 만들기 위하여 강력한 T7 프로모터를 갖는 pT7-1 plasmid를 이 실험에 사용하였다. 이 벡터는 T7 RNA polymerase 프로모터, pUC12 벡터의 polylinker 부위, 항생제 marker 및 replication origin을 가지고 있으며 T7 RNA polymerase에 의해 프로모터의 아래쪽에 붙어있는 유전자의 전사체가 선택적으로 만들어진다[26]. bGH 유전자원으로 사용한 pUBG2 플라스미드[3]는 prehormone의 전체 정보를 갖는 coding region (651 bp), 3'-untranslated region (104 bp) 및 poly(A⁵) tail로 구성되어 있으며 염기서열을 분석하여 기존에 발표된 서열[13,30]과 비교하여 확인하였다. 클로닝 전략으로서 Fig. 2에서 보는 바와 같이 소성장호르몬의 cDNA가 클로닝 되어있는 pUBG2 플라스미드를 HgiAI과 HindIII로 자른 후 0.65 kb 크기의 소성장호르몬의 부분유전자를 분리하였다. 이 DNA 조각에 이미 합성하여 annealing 및 인산화 된 oligonucleotide A와 B를 각각 ligation한 다음, 가장 바깥쪽에 있는 EcoRI과 HindIII로 다시 자른 후 agarose gel 상에서 random 서열 및 완전한 bGH 유전자를 갖는 0.73 kb 크기의 DNA를 분리하였다. 이렇게 준비

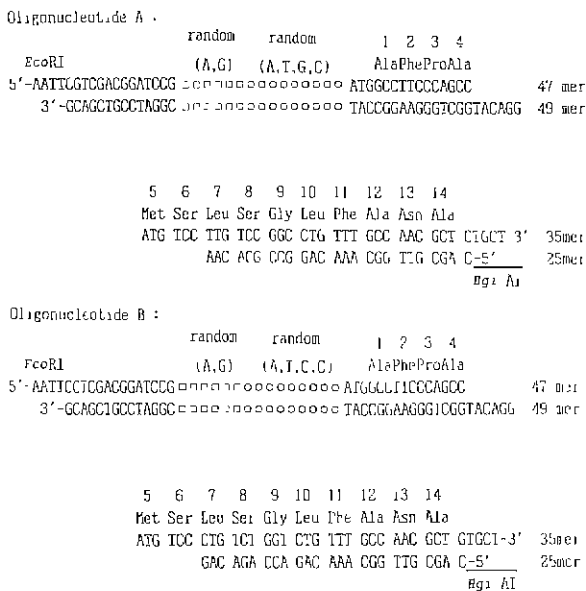


Fig. 1. Synthetic oligonucleotide with random SD sequence. Nucleotide substitutions are indicated by . (□), random Shine-Dalgarno sequence, (○), spacer region between SD and ATG

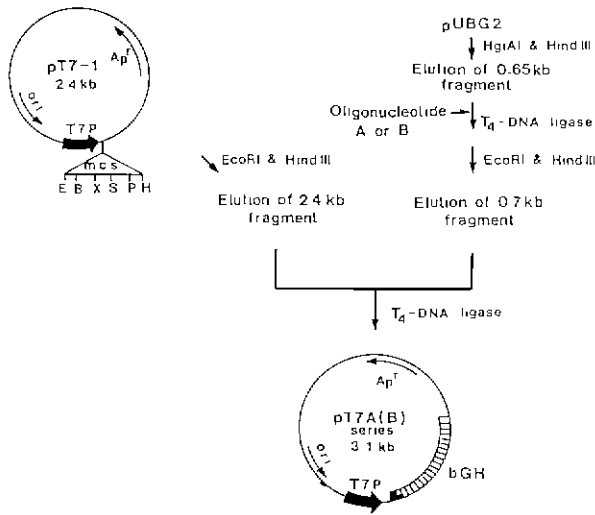


Fig. 2. Diagrammatic representation of the construction of plasmids, pT7A and pT7B series.

The plasmids contain a T7 promoter, the bGH cDNA truncated at the N-terminus by fifteen residues (lightly stippled box), the synthetic DNAs encoding random SD sequence and N-terminal amino acids (black box). MCS: multicloning site

된 유전자를 벡터에 클로닝 하기 위하여 pT7-1 플라스미드를 같은 제한효소(EcoRI과 HindIII)로 자른 후 전기영동에 의해 2.4 kb 크기의 linear DNA를 분리한 다음 미리 준비된 bGH 유전자와 ligation 하였다.

형질전환체 및 염기서열 분석

Ligation 된 product는 대장균 *E. coli* HB101으로 도입하여 항생제 내성을 갖는 균주 즉, 플라스미드가 도입된 형질전환체를 다수 확보한 다음, 소성장호르몬의 부분 유전자를 동위원소로 표지 시킨 probe DNA를 사용하여 colony hybridization을 수행하여 도입된 bGH 유전자를 확인하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 소성장호르몬 유전자가 도입된 균주를 다수 선별하였고, 이렇게 확인된 균을 master plate에서 picking하여 항생제가 첨가된 LB 액체배지에서 키운 후 DNA를 추출하여 선택된 클론들이 원래의 벡터보다 커진 것을 agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다. Hybridization과 size selection에 의해 확인된 클론들은 oligonucleotide A가 도입된 경우에는 pT7A 계열의 벡터로 명명하였고, oligonucleotide B가 도입된 경우에는 pT7B

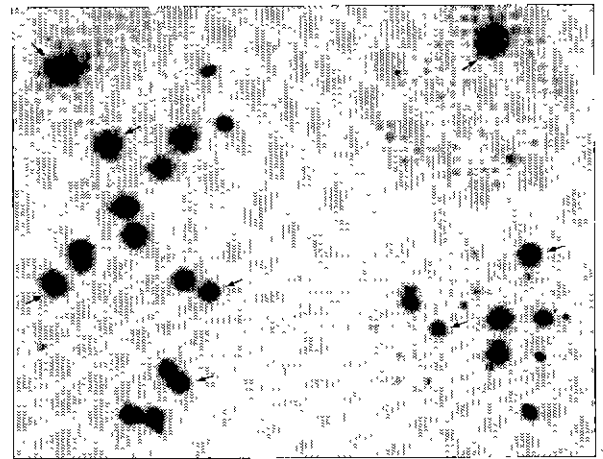


Fig. 3. Selection of transformants containing bGH DNA by colony hybridization.

The arrows indicate the right clones harboring bGH cDNA

계열의 벡터로 명명하였다. 도입된 무작위 SD 서열 및 SD-ATG 사이 spacer 지역의 염기서열을 확인하기 위하여 plasmid DNA를 Qiagen kit를 이용하여 고 순도로 추출하였다. 이렇게 얻어진 19개 클론들은 sequanase kit를 이용하여 염기서열을 분석하였고(Table 1), 일반적인 SD 서열 (AGGAGG)과는 다른 다양한 purine-rich 서열들을 갖는 클론들을 확보하였다. 또한 spacer 지역의 염기서열도 다양한 조합으로 분포하는 것을 알 수 있었다. 얻어진 클론들 중 B2, B3, B4 클론들은 같은 서열을 가지고 있었으며, B27, B37, B45 클론들 마찬가지로 같은 SD 서열을 가지고 있었다.

대장균에서 소성장호르몬의 발현과 SD 서열간의 관계

여러 가지 염기서열 조합을 갖는 SD 및 spacer 지역의 염기서열이 소성장호르몬의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 같은 서열을 갖는 클론들을 제외한 15 개의 플라스미드 벡터를 *E. coli* BL21(DE3) 균주로 도입하여 ampicillin이 첨가된 LB 배지에서 형질전환체를 선별하여 플라스미드 벡터가 각각 도입된 재조합 형질전환체를 확보하였다. 사용한 숙주세포의 염색체에는 유도적인 *lacUV5* 프로모터에 의해 전사가 조절되는 T7 RNA polymerase 유전자가 한 copy 존재 하므로 IPTG를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 T7 RNA polymerase가 생성되도록 하였고, T7

Table 1. Sequence differences in random ribosome binding sites

Clone No.	RBS sequences				G value ^a (Kcal/mole)	No. of ^b base pair
	-15	-10	-1	+1		
A11	TCC	GGGGAA	GCCTACCCG	ATG	-29.2	6
A24		GAAGAG	GGACGTAAT	ATG	-21.4	6
A45		GAAAAA	GCCACCCTG	ATG	-20.0	5
B3(2,4)		GAGAGA	CTTAAATTC	ATG	-18.4	6
B5		GGGAAG	TGCGGCGAA	ATG	-29.0	3
B27(37,45)		GGAGAG	CGCCGCAAT	ATG	-24.2	7
B27-1		GGAAAG	CTGACAAGG	ATG	-29.7	7
B33		GAGAGA	TGCATCGGT	ATG	-21.2	3
B53		GAGAAA	ACCTACGGA	ATG	-19.8	2
B54		GAAGAG	ACCTGCACC	ATG	-22.6	7
B55		GAGGAA	GTTTCGAGA	ATG	-19.6	7
B57		GGAAGA	TGATTAAGA	ATG	-19.3	7
B58		GGAAAA	GACACTGGC	ATG	-29.0	8
B59		GGGAGA	AGACGTAAT	ATG	-20.6	6
B60		GAAGGA	TGCATCGAC	ATG	-24.3	6

a: The free energy was calculated from -15 nucleotide of SD sequence to +51 of bGH gene

b: Number of base complementary to the 3'-end sequence of 16S rRNA in ribosome binding site.

promoter에 의해 소성장호르몬 전사체들이 만들어지도록 발현을 유도하였다. IPTG를 첨가 후, 6 시간정도 더 배양한 다음 세포들을 수거하여 단백질 전기영동을 위한 시료를 제조하였고, 12.5% SDS-PAGE에 의해 단백질을 fractionation 하였다(Fig. 4). 단백질 gel에서 소성장호르몬 발현정도의 확인은 nylon membrane으로 단백질을 이동시킨 후, primary 및 secondary antibody를 사용한 western blot에 의해 행하였다. Fig. 4에서 보듯이 단백질 발현을 유도하였을 때 SDS-PAGE에서는 발현 정도를 확인하기 어려웠으나, 항체에 의한 western blot시 낮은 양이지만 모든 클론에서 소성장호르몬이 발현됨을 확인할 수 있었다.

de Boer 등[4]은 ribosome 결합부위(SD)와 16S rRNA의 3'-말단 서열의 유사성 정도가 4에서 8 또는 13으로 증가함에 따라 translation 효율은 약 50% 정도 감소하는 것으로 보고하였다. Table 1에 얻어진 모든 클론들의 염기서열과 16S rRNA와의 유사성 정도는 2 base에서 8 base까지 다양한 것으로 나타났으며 합성하여 도입된 염기 서열이 de Boer 등의 일반적인 규칙을 벗어나고 있는 것으로는 보이지 않는다. 또한 소성장호르몬 mRNA의 실질적인 개시코돈 앞쪽에 또 다른 개시코돈이나 종결코돈이 존재한다면 translation

효율을 크게 증가시킨다고 보고되었다[11,22]. 그러나 플라스미드 pT7A24, pT7B3, pT7B27-1, pT7B57, pT7B59의 경우, spacer 지역에 UAA나 UGA 종결코돈이 존재하지만 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 더구나 nucleotide, -15에서 bGH 염기서열 +51까지 예상되는 염기 결합의 자유에너지[10,28] 수치가 -18.4 Kcal에서 -29.7 Kcal로 다양한 변화를 보이고 있어 mRNA 이차구조의 다양한 변화에 따른 단백질 발현에 영향을 줄 것이라 예상되었지만 기존의 보고된 다른 단백질의 경우와는 달리 소성장호르몬의 경우에는 주변서열의 변화에 의해 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다. SD-ATG 사이의 spacer 지역에 종결 코돈이나 AT-rich 서열을 가지고 있는 플라스미드의 경우에도 추정의 이차구조는 감소하였지만 소성장호르몬의 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. Tomich 등[27]에 의하면 bGH 단백질의 아미노산을 coding하는 mRNA의 시작부위에 추정의 stem-loop 구조가 2개 존재하는데, 이 중 두 번째 loop(아미노산 11번- 26번) 구조 아래쪽에 lacZ 유전자를 융합하여 발현을 하였을 때는 발현 수준에 전혀 영향을 미치지 않았지만, 첫 번째 loop 구조 다음에 lacZ 유전자를 융합하여 발현을 하였을 때 발현 수준

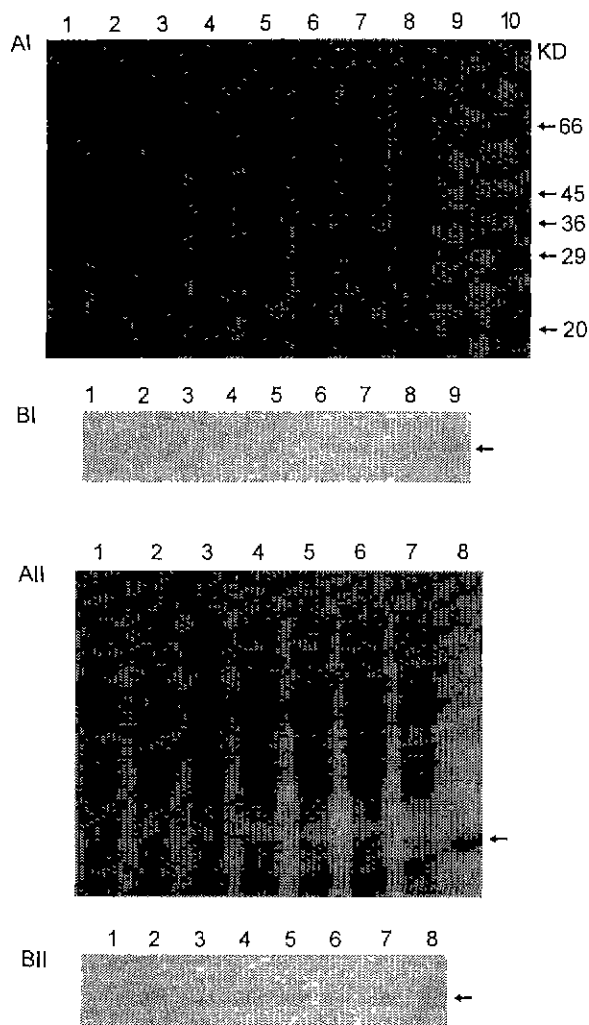


Fig. 4. SDS-PAGE and Western blot analysis of *E. coli* BL21(DE3) harboring pT7A or pT7B series plasmid. (Panel AI and AII) : 12.5% SDS-PAGE, (Panel BI and BII) : Western blot. AI; lane 1: pT7A11/BL21(DE3), 2: pT7A24/BL21(DE3), 3: pT7A45/BL21(DE3), 4: pT7B3/BL21(DE3), 5: pT7B5/BL21(DE3), 6: pT7B27/BL21(DE3), 7: pT7B27-1/BL21(DE3), 8: pT7B33/BL21(DE3), 9: purified bGH(2.5 μ g), 10: protein MW markers. AII; lane 1: pT7B53/BL21(DE3), 2: pT7B54/BL21(DE3), 3: pT7B55/BL21(DE3), 4: pT7B57/BL21(DE3), 5: pT7B58/BL21(DE3), 6: pT7B59/BL21(DE3), 7: pT7B60/BL21(DE3), 8: purified bGH(2.5 μ g). The arrows indicate the position of bGH

은 크게 감소하는 것으로 보고하였다. 이는 첫 번째 loop 구조의 이차구조가 유전자 발현에 중요하다는 것을 나타내는 것이며, 그 구조내의 코돈을 변화시켜 이차구조의 자유에너지가 증가함에 따라 발현 수준도 증가하는 것으로 보고하

였다. 또한 Watson과 Olson (1990)에 의하면 bGH mRNA 첫 번째 이차구조의 염기서열을 point mutation에 의해 변화시켰을 때 bGH 발현수준은 증가하는 것으로 보고하였다. 따라서 이런 결과들에 의하면 소성장호르몬의 경우 아미노산 1번부터 5번을 coding 하는 염기 사이에 존재하는 추정된 이차구조가 실질적으로 파괴되지 않고서는 주변에 발현에 영향을 주는 최적 서열이 있다 하더라도 단백질 발현은 증가하지 않는다는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

Table 2의 ribosome 결합부위 각 위치에 따른 염기분포 빈도를 조사한 경우 -14에서 -10까지의 위치에는 합성 전략에 따라 도입된 purine 기들이 많이 존재하는 것으로 나타났으며, 특히 -12에서 -10까지는 A 염기가 G 염기보다 우세하게 존재하였다. Spacer 지역 내에서 -9에서 -7까지는 G-C 염기가 A-T 보다는 우세하게 존재하는 것으로 나타났으며, -6에서 -1까지는 일정한 규칙없이 모든 염기(A, T, G, C)가 존재하는 것으로 분석되었지만 소성장호르몬의 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 소성장호르몬의 발현에 영향을 주는 적절한 조절 서열을 찾으려 했으나, bGH 유전자 자체의 5'-말단 지역에 존재하는 이차구조의 변형 없이는 발현에 좋은 영향을 주는 SD 및 SD-ATG 사이의 염기서열이 존재한다 해도 소성장호르몬의 발현에는 크게 영향을 주지 않는 것으로 보이며, Schoner 등[20]이나 Tomich 등[27]의 연구 결과와도 잘 일치하는 것으로 나타났다.

본 연구는 소성장호르몬 유전자를 변형시키지 않고 앞부분의 SD 서열 및 SD와 ATG까지의 염기서열이 소성장호르몬 발현에 미치는 최적 서열을 조사한 실험으로서 소성장호르몬의 5'-말단 구조가 발현에 미치는 영향, 5'-말단 구조의 변형 없이 SD 자체 서열이 발현에 미치는 영향, 또는 bGH 발현에 영향을 주는 적절한 주변 서열을 결정하는

Table 2. Frequency of nucleotide distribution at each position of RBS sequences

Nucleotide	Position														
	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
A		10	10	13	12	14	3	1	5	8	5	5	9	7	7
C							9	4	11	5	4	10	2	6	
G	21	11	11	8	9	7	5	11	1	3	9	1	7	8	3
T							4	5	4	5	3	5	3	4	5

것이다. 단백질 발현에 영향을 주는 요인들, 즉 -1 triplet[11], 16S rRNA와의 보족성 정도[4], spacer 지역의 거리[24], spacer 지역의 AT-rich 서열[7,19], spacer 지역의 종결코돈의 존재[11,22], mRNA 이차구조의 변화[6,21] 등에 관련된 염기서열을 갖는 클론들이 존재한다 해도, 소성장호르몬 유전자의 경우 코돈 1번과 5번 사이에 존재하는 mRNA 이차구조를 파괴하지 않고서는 소성장호르몬의 높은 발현을 기대하기는 힘든 것으로 나타났다. 즉, 단백질 합성의 초기 단계에서 ribosome이 mRNA에 결합 후 지속적인 합성을 위해 mRNA를 이동해야 하지만 이차구조에 의한 방해에 의해 단백질 합성률이 저하되는 것을 알 수 있었으며, 이는 진핵세포 유전자인 소성장호르몬을 원핵세포에서 발현시킬 때 5'-말단에 존재하는 이차구조를 제거하는 것이 소성장호르몬의 발현에 가장 중요한 요소라는 것을 제시하고 있다.

요 약

소성장호르몬 유전자를 대장균에서 발현시키기 위하여 외부 유전자 발현에 중요한 요인중의 하나인 해독과정의 효율성을 증가시킬 수 있는, 즉 mRNA의 이차구조를 풀어주는 적절한 Shine-Dalgarno (SD) 서열을 찾기 위하여 SD와 ATG 코돈 사이의 거리를 9 base로 고정하고 random DNA 서열로 oligonucleotide를 합성하여 소성장호르몬 유전자 앞쪽에 넣어 줌으로서 mRNA 이차구조의 변형에 의한 소성장호르몬 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 발현벡터들은 T7 프로모터를 갖는 pT7-1 벡터를 이용하여 제조하였고, positive 클론들은 colony hybridization과 DNA 크기에 의해 선별되었으며, 얻어진 클론들은 pT7A 또는 pT7B 계열의 플라스미드로 명명되었다. DNA 염기분석에 의해 소성장호르몬 유전자와 여러 가지 SD 서열을 갖는 19 클론을 선별하였고, *E. coli* BL21(DE3) 균주에서 단백질 발현을 유도하여 western blot에 의해 분석하였을 때, 낮은 양이지만 모든 클론들이 소성장호르몬을 생성하였다. 그러나 SD 서열 및 SD-ATG 사이의 염기서열들은 bGH 발현에 큰 영향을 주지 못하였다. 이는 대장균에서 bGH의 발현의 경우 bGH mRNA codon 1번부터 5번 사이에 형성되는 이차구조를 파괴시키는 것이 발현 조절에 중요 인자인 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 대구공업대학 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며, 일부는 과학기술부·한국과학재단 지정 대구대학교 농산물 저장·가공 산업화연구센터의 지원에 의해 수행되었음

참 고 문 헌

1. Bauman, D. E., P. J. Eppard., M. J. DeGeeter., and G. M. Lanza. 1985. Response of high producing dairy cows to long term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J. Dairy. Sci* **68**, 1352-1362.
2. Baumann, D. E., C. J. Peel., W. D. Steinhour., P. J. Reynolds., H. F. Tyrrell., A. C. G. Brown., and G. L. Haaland. 1988. Effect of bovine somatotropin on metabolism of lactating dairy cow. *J. Nutr.* **118**, 1031-1040.
3. Choi, J. W and S. Y. Lee. 1996. Optimization of bovine growth hormone gene expression in *E. coli*. *Mol. Cells.* **6**, 712-718.
4. de Boer, H. A., A. Hui., L. J. Comstock., E. Wong., and M. Vasser. 1983. Portable SD regions : A system for a systematic study of defined alterations of nucleotide sequences within *E. coli* ribosome binding sites. *DNA.* **2**, 231-235.
5. Denton, R. M., W. A. Hughes., B. J. Bridges., R. W. Brownsey., J. G. McCormack., and D. Stansbie. 1978. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase by hormones. *Hor. Cell. Regul.* **2**, 191-208.
6. George, H. J., J. J. L'Italien., W. P. Pilacinski., D. L. Glassman., and R. A. Krzyzek. 1985. High level expression in *E. coli* of biologically active bovine growth hormone. *DNA.* **4**, 273-281.
7. Gold, L., D. Pribnow., T. Schneider., S. Shinedling., B. S. Singer., and G. Stormo. 1981. Translational initiation in procaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**, 365-403.
8. Green, P. J. and M. Inouye. 1984. Roles of the 5' leader region of the *ompA* mRNA. *J. Mol. Biol.* **176**, 431-442.
9. Hui, A., J. Hayflick., K. Dinkelspiel., and H. A. de Boer. 1984. Mutagenesis of the three base pair preceding the start codon of the β -galactosidase mRNA and its effect on translation in *E. coli*. *EMBO. J.* **3**, 623-629.
10. Jaeger, J. A., D. H. Turner., and M. Zuker. 1989. Improved predictions of secondary structures for

- RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 7706-7710.
11. Kozak, M. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* **47**, 1-45.
 12. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
 13. Miller, W. L., J. A. Martial., and J. D. Baxter. 1980. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.* **255**, 7521-7524
 14. Morikawa, M., T. Nixon., and H. Green. 1982. Growth hormone and adipose conversion of 3T3 cells. *Cell.* **29**, 783-789.
 15. Paladini, A. C., C. Pena., and E. Poskus. 1983. Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **15**, 25-56.
 16. Ramabhadran, T. V., B. A. Reitz., and D. M. Shah. 1985. High-level expression of the bovine growth hormone gene in heterologous mammalian cells. *Gene.* **38**, 111-118.
 17. Sambrook, J., E. F. Fritsch., and T. Maniatis. 1989. *In Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 18. Sanger, F., S. Niklen., and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
 19. Scherer, G. E. F., M. D. Walkinshaw., S. Arnott., and D. J. Morre. 1980. The ribosome binding sites recognized by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. *Nucleic Acids Res.* **8**, 3895-3906.
 20. Schoner, B. E., H. M. Hsiung., R. M. Belagaje., N. G. Mayne., and R. G. Schoner. 1984. Role of mRNA translational efficiency in bovine growth hormone expression in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 5403-5407.
 21. Schoner, B. E., R. M. Belagaje., and R. G. Schoner. 1986. Translation of a synthetic two cistron mRNA in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 8506-8510.
 22. Seeburg, P. H., J. Shine., J. A. Martial., J. D. Baxter., and H. M. Goodman. 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature.* **270**, 486-494.
 23. Seeburg, P. H., S. Sias., J. Adelman., H. A. de Boer., J. Hayflick., P. Jhurani., D. V. Goeddel., and H. L. Heyneker. 1983. Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA.* **2**, 37-45.
 24. Shepard, M. G., E. Yelverton., and D. V. Goeddel. 1982. Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites. *DNA.* **1**, 125-131.
 25. Studier, F. W. and B. A. Moffat. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned gene. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
 26. Tabor, S. and C. C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 1074-1078.
 27. Tomich, C. S. C., E. R. Olsen., M. K. Olsen., P. S. Kaytes., S. K. Rockenbach., and N. T. Hazenbuhler. 1989 Effect of the nucleotide sequence directly downstream from the AUG on the expression of bovine somatotropin in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3179-3197.
 28. Turner, D. H., N. Sugimoto., and S. M. Freier. 1988. RNA structure prediction. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 167-192.
 29. Watson, N. and E. R. Olson. 1990. Point mutation in a pBR322-based expression plasmid resulting in increased synthesis of bovine growth hormone in *E. coli*. *Gene.* **86**, 137-144.
 30. Woychick, R. P., S. A. Campem., R. H. Lyons., S. Horowitz., E. C. Goodwin., and F. M. Rottmann. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. *Nucl. Acids Res.* **10**, 7197-7120.