

SPR 근거 DNA 칩을 이용한 페놀 화합물 특이 CapR 조절 단백질과 촉진유전자와의 상호작용 연구

박선미 · 박후휘 · 임운기 · 신혜자*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과
*동서대학교 응용공학부 환경공학전공

Interaction of Phenolic Compound-Specific Activator with Its Promoter using SPR-Based DNA Chip

Seun Mi Park, Hoo Hwi Park, Woon Ki Lim and Hae Ja Shin*

*Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
Busan 609-735, Republic of Korea*

**Environmental Engineering Major, Applied Engineering Division, Dongseo University,
Busan 617-716, Republic of Korea*

Abstract

Aromatic compounds are of major concern among environmental pollutants due to their toxicity and persistence. To monitor aromatic compounds in a real time with a better sensitivity, a new method of SPR (surface plasmon resonance) based on DNA chip (Biacore 3000) was developed here. It is thought that CapR regulatory protein as a complex with phenol, could bind to their corresponding promoter, *Po*. Biotinylated DNA oligomers for the promoter was synthesized by PCR and coupled onto streptoavidin-linked CM5-chip. CapR regulatory proteins were purified after cloning their genes in pET21a (+) vector and expressing proteins. The interaction was assessed by the system where the regulatory proteins flowed with or without phenol through the cells of DNA chip. CapR regulatory protein even in the presence of phenol had no response to its promoter, *Po*, suggesting that other factor(s) might be required for the activation of *Po* promoter. The present work reveals a promising possibility of the SPR-based DNA chip in monitoring specific environmental pollutants in a real time.

Key words – activator, SPR, phenol.

서 론

방향족 화합물은 독성과 잔류성이 높아 환경오염물질로

서 문제시 되고 있다. 이런 방향족 화합물을 에너지원으로 이용할 수 있는 미생물들은 이들을 분해하는 능력이 있다. 이는 일련의 효소들에 의하며, 이들의 분해과정과 그 기작은 매우 많은 주목을 받아 왔다 [2]. 근래에는 이들의 발현 조절 기작에 대한 연구도 활발하다. 이는 발현이 조절인자와 방향족화합물의 특이적인 결합에 의해 이루어지는 데,

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-320-1791, Fax : 051-320-1791
E-mail : hjshin@dongseo.ac.kr

이러한 특성이 바이오센서의 개발연구에 매우 유용하게 활용될 수 있기 때문이다.[2].

지금까지 연구된 방향족 화합물을 분해하는 여러 가지 활성인자가 알려져 있으며, 특히 유해한 페놀계 화합물에 관련된 활성인자는 NtrC 그룹에 속한다. 이 중 *Pseudomonas* sp. strain CF600에서 유래한 DmpR가 활발히 연구되어 있으며 [6,8-10], 그 외에도 PheR, PhhR [5], 그리고 PhlR [1] 등이 있다. NtrC 그룹의 활성인자들은 신호를 인지하는 A 도메인과, 중심 활성부위인 C 도메인, 이들을 연결하는 B 도메인, 그리고, DNA에 결합하는 helix-turn-helix 구조를 갖는 D 도메인으로 구성된다. 이 그룹의 활성인자들은 σ^{54} 와 함께 RNA 중합효소와 복합체를 형성하여 전사를 조절하게 된다 [2]. 이들은 조금씩 다른 염기서열을 가지고 있으며, 페놀계 화합물을 인지하는 A 도메인에서의 차이는 다른 페놀계 화합물에 대한 서로 다른 특이성을 나타내게 된다.

본 연구에서는 페놀계 화합물을 분해하는 데 관련된 활성인자인 CapR 단백질과 이것이 결합하는 촉진유전자 *Po*와의 상호작용을 SPR (surface plasmon resonance) 방법으로 연구하였다. SPR는 독특한 광학 현상을 이용하여 센서 칩 표면에서 일어나는 물질간의 결합 및 분리 과정을 실시간으로 확인할 수 있는 방법이다 [3,4,7]. 비오틴이 부착된 촉진유전자를 streptavidin과 연결된 CM5 표면에 고정시켜서 칩을 만들고, 이들의 페놀과 CapR과의 상호작용을 Biacore 3000로 조사하였다. 본 연구 시스템은 CapR 단백질의 기능에 관련된 인자들의 검색 및 기작을 연구하는 데 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

박테리아 균주

대장균 균주 BL21 (*hsdS gal (cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene 1)*)은 T7·tag을 가진 CapR 단백질을 발현되는데 사용하였다.

biotinylated DNA의 PCR증폭

본 연구에서 사용되어진 DNA는 다음과 같이 모두 5'에 biotin을 부착하여 PCR로 증폭하였으며, micron-30 (Millipore, 미국)을 이용하여 정제하였다. *Psal* promoter (forward,

biotin-5'-GCTGTACTCGTGATGGCTATTGATG-3'; reverse, 5'-GGGGCCTCGCTTGGGTTAT TGCTGGTG- 3'), 200bp control DNA (forward, biotin-5'-ATGGAAGTGCCTGACCTGACCTGGATTT AAC-3'; reverse, 5'-CCTGTAGCGACCTGCGCAGGCCTTTTCA-3'), *Pcmv* control promoter (forward, biotin-5'-GCACCAAATCAACGGGGACTTTCCAAA-3'; reverse, 5'-GGTGGCGACCGGTAGCGCTAG CGGATC-3'), *Po* promoter (forward, biotin-5'-GGCCTTGGGCAATTGATCAAATGC-3'; reverse, 5'-TAAC GAGTGGCTGATCGAAAGTCGGTG-3').

pET21a(+)CapR 벡터의 구축

페놀과 방향족 화합물을 산화시킬 수 있는 *Pseudomonas putida* KCTC1452를 한국유전자은행에서 구입하여 이로부터 *capR*와 *Po* 유전자를 PCR 방법으로 클로닝하였다 (투고중). ABI PRISM BigDye™ terminator sequencing system (Applied Biosystems, 미국)과 ABI PRISM 310 sequencer를 이용하여 염기서열을 밝혔다. 플라스미드는 Qiagen (미국)의 spin column kit을 이용하여 분리하였으며, 발현 벡터인 pET21a (+) (5,443 bp)는 Promega (미국)에서 구입하였다. 각각 양끝에 *Sac* I 과 *Xho* I을 가진 5'-CGGGAGCTCATGCCGATCAAGTACAAGCCT-3', 5'-CCGCTCGAGCTAGCCTTCGATGCCGATTTT-3' 프라이머를 이용하여 PCR로 *capR* (1,692 bp)을 증폭시켜 *Sac* I 과 *Xho* I으로 자르고, 이것을 *Sac* I 과 *Xho* I으로 자른 pET21a(+)에 넣어 약 7.0 kb의 pET21a (+)-CapR 벡터를 완성시켰다. 이것은 CaCl₂ 방법을 이용하여 대장균 BL21에 형질 전환시켰다.

CapR 단백질의 발현 및 분리방법

pET21a(+)CapR을 가진 대장균 5 ml을 TYS 배지에서 약 16시간 배양한 후, 이를 200 ml의 새로운 배지에 옮겨서 OD가 0.6~0.8이 되도록 2~3시간 키운 후 IPTG (isopropylthio-D-galactoside)의 최종 농도가 0.4 mM이 되도록 유도하여 2~3 시간을 키웠다. 5,000 x g에서 5분간 원심분리하여 세포를 수확한 뒤 T7·Tag Bind/Wash 완충용액 (4.29 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 0.1% Tween-20, 0.002% sodium azide, pH

7.3) 10 ml에 현탁시켰다. 이것을 초음파 파쇄기로 깎 다음, 39,000×g에서 20분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하고 수용성 단백질을 얻었다.

T7·Tag 흡착컬럼 (Clontech, 미국)을 이용한 CapR 단백질의 분리는 T7 tag를 항원으로 보고, 항원 항체에 대한 반응을 이용한 분리방법이다. 분리는 회사에서 권고한 방식대로 시행하였으며, 그 과정은 간단히 기술하면 다음과 같다. T7·tag 항체 agarose를 컬럼에 채운 후 세포 추출물을 컬럼에 흘려내려 결합시키고 컬럼을 T7·Tag Bind/Wash 완충용액으로 씻었다. T7·Tag Elute 용액 1ml씩 5번 컬럼에 넣어 결합된 단백질을 용출시킨 후, 이를 중성화하여 보관하였다. 단백질은 10% SDS-PAGE로 확인하였다.

SPR 근거 DNA 칩 실험

SPR 근거 DNA 칩 실험은 Biacore 3000 (Biacore, Inc., 스웨덴)을 사용하였다. 필터에 여과한 PBS 용액 (0.005% P20 포함)을 기본 용액 (running buffer)으로 사용했다. 칩 표면을 활성화하기 위해 0.05 M NHS (N-hydroxyl succinamide)와 0.2 M EDC (N-ethyl-N'-dimethyl aminopropyl carbodiimide)를 1:1로 혼합하여 리간드의 coupling을 위해 35 μ l 사용하였다. 이때 5 μ l/min 유출속도가 사용되었다. 칩의 나머지 3개의 셀도 같은 방법으로 활성화시켰다. 항상 면적당 RU의 밀도가 같게 조절하였다. Coupling은 산성 pH (pI 보다 낮은 pH) 그리고 낮은 이온 강도에서 이루어지며 약 10 μ g/ml (보통은 5 μ g/ml)의 DNA가 부피 75~200 μ l로 coupling에 사용되었다. 조절을 용이하게 하기 위해 자동에서 수동으로 방식으로 바꾸어 100 RU 이하가 되도록 리간드를 고정하였다. 2.5 μ l의 100 mg/ml streptavidin을 주입하였고 이때의 RU는 700정도였다. 새 칩을 사용할 경우 25 μ l의 산과 염기를 흐르게 하여 칩 위에 있는 glycerol을 제거하였다. 1 M ethanolamine (pH 8.5)을 사용하여 남아 있는 칩 표면을 봉쇄하고 반응성 있는 에스터 화합물을 불활성화 시켰다. DNA의 양을 최소로 하여야 칩에 결합시키는 것이 결합할 단백질의 응집 (aggregation)을 막을 수 있다. 결합할 단백질은 기본 용액으로 희석하였고, 분석하기 전에 채널을 PBS 0.1% soluble dextran으로 씻었다. 분석시 시료는 기본 용액으로 1 μ M에서 200 nM까지 희석하여 사용하였다. 용액의 속도는 5 μ l/min로 시작하였다. 칩을 다시 복구하기 위해 10

mM HCl로 씻어 내리거나, SDS를 사용하여 단백질을 제거하였다.

결과 및 고찰

조절 단백질 CapR의 발현과 순수분리

CapR 단백질과 촉진유전자와의 상호작용을 SPR-based DNA 칩을 이용하여 연구하기 위해서는 정제된 CapR 단백질이 필요하다. 이를 위해 본 연구에서는 단백질 발현 벡터인 pET21a(+)를 활용하였다 (Fig. 1). T7 촉진유전자하에 CapR이 발현될 수 있도록 *capR* 유전자 (1,692 bp)를 삽입하여 pET21a(+)CapR을 만들었다. 이 플라스미드가 형질 전환된 세포를 IPTG로 처리하여 발현을 유도하였다 (Fig. 2). IPTG를 넣어 발현시켰을 때는 넣지 않았을 때에 비해 약 60 kDa에 해당하는 위치에 수용성단백질이 증가한 것을 보여준다. CapR 단백질은 563개의 아미노산으로 구성되어 있으므로 이 단백질이 발현된 것으로 판단된다. pET21a(+) 벡터에서 발현된 단백질은 N 말단부위에 T7 Tag을 가지고 있도록 되어 있으므로 T7·Tag 흡착컬럼을

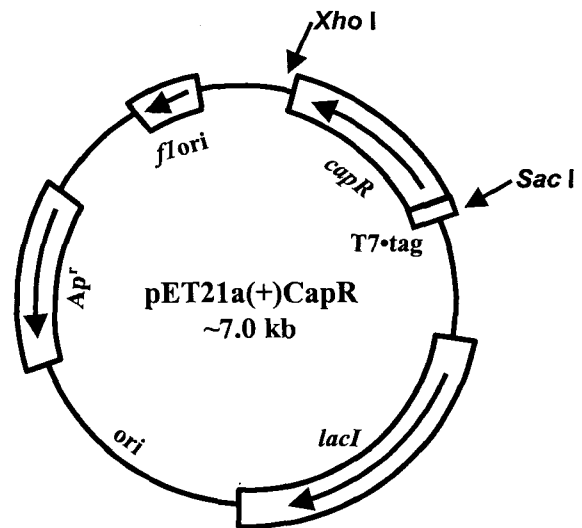


Fig. 1. Construction of a vector for the purification of CapR protein. The *capR* (1,692 bp) was introduced downstream of the T7·Tag in the pET21a(+) vector (5,443 bp) (Novagen, WI) at *Sac* I and *Xho* I sites to generate about 7.0 kb of pET21a(+)CapR. The arrows indicate the transcriptional or processing direction of the genes.

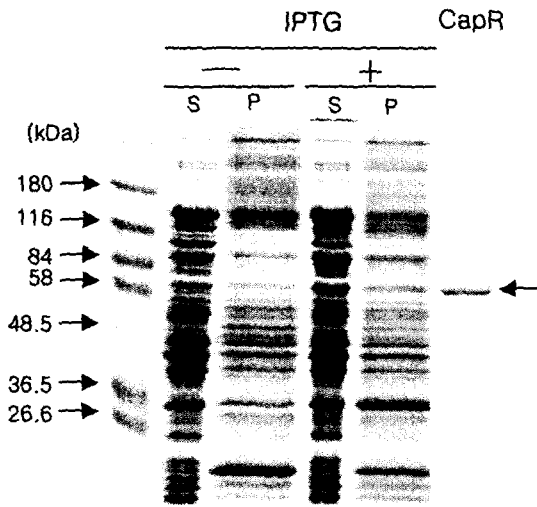


Fig. 2. Overexpression and purification of CapR protein. *E. coli* cells containing pET21a (+)CapR were grown in the absence (lane 2, 3) or in the presence of 0.4 mM IPTG (lane 4, 5). The cells were lysed, and then centrifuged into the pellet (P) and soluble fraction (S). CapR protein was purified by using T 7-Tag affinity column (Novagen, USA) according to a manufacturer's manual. Purified CapR protein appeared at about 60kDa position on SDS-PAGE gel (10%).

이용하여 CapR 단백질을 순수 분리하였다 (Fig. 2). SDS-PAGE상에서 CapR 단백질은 높은 순수로 분리 정제되었음을 보여준다.

SPR 근거 DNA 칩을 이용한 CapR 단백질과 촉진유전자들과의 반응

SPR-based DNA 칩을 이용하여 CapR 단백질과 촉진유전자가 서로 어떻게 작용하는지를 Biacore 3000을 이용하여 실험하였다. CapR 단백질에 대한 고유의 *Po* 촉진유전자를 biotin이 부착된 DNA oligomer로 PCR에서 합성한 후 정제하였다. 따라서, 합성된 *Po* 촉진유전자는 한쪽 끝에 biotin를 가지고 있게 되어 streptavidin이 연결된 칩에 결합시킬 수 있었다.

NtrC계에 속하는 활성인자들은 리간드와 결합하여 촉진유전자에 결합하는 것으로 알려져 있다. CapR 단백질도 페놀이 있는 조건하에서 기능을 수행할 수 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서, 페놀의 존재여부가 미치는 영향도

함께 조사하였다. Negative control로 진핵 세포의 촉진 유전자인 *Pcmv*를 사용하였다. 페놀 유무에 관계없이 예상대로 CapR 단백질은 *Pcmv* 칩에 결합하지 않는 경향으로 나타났다 (Fig. 3). 다음으로 positive control로 salicylate에 의해 반응하는 NahR 단백질의 조절 유전자인 *Psal* 촉진유전자를 이용한 DNA 칩을 사용하였다. *Psal*의 경우 촉진유전자의 특성상 조절 단백질만으로도 쉽게 반응하는 경향을 가지며, 다른 조절 단백질과도 cross-activation도 한다고 알려져 있다 [2]. *Psal* 촉진유전자의 경우는 페놀존재유무에 상관없이 CapR 조절단백질과 반응함을 보여주었다 (Fig. 4). 이는 본 실험에서 분리정제된 CapR 단백질이 기능성 있는 구조를 가지고 있음을 나타낸다.

이를 바탕으로 CapR 단백질 고유의 *Po* 촉진유전자가 결합된 칩에 결합여부를 조사하였다. 그러나, 0.01~100 nM 농도범위의 페놀 존재하에서 CapR 단백질이 *Po* 촉진유전자에 결합하지 않았다 (Fig. 5). 세포 바이오센서를 활용한

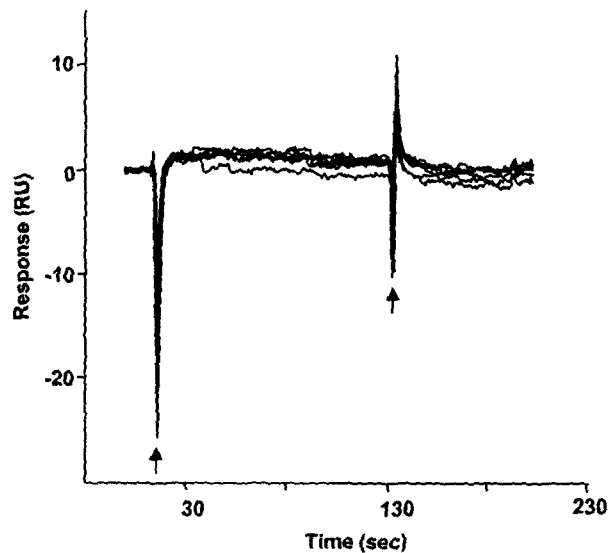


Fig. 3. Response of SPR-based *Pcmv* DNA chip to CapR regulatory protein. Binding between CapR regulatory protein and eukaryote promoter *Pcmv* DNA chip was initiated (at the first arrow point) with flowing of CapR protein solution over the DNA chip in the absence (—) or presence of phenol at 5, 10, 20, 40, 60, and 100 nM. No increasing responses appeared. The second arrow represents the time point for discontinuation of flowing of the protein solution. RU, resonance unit.

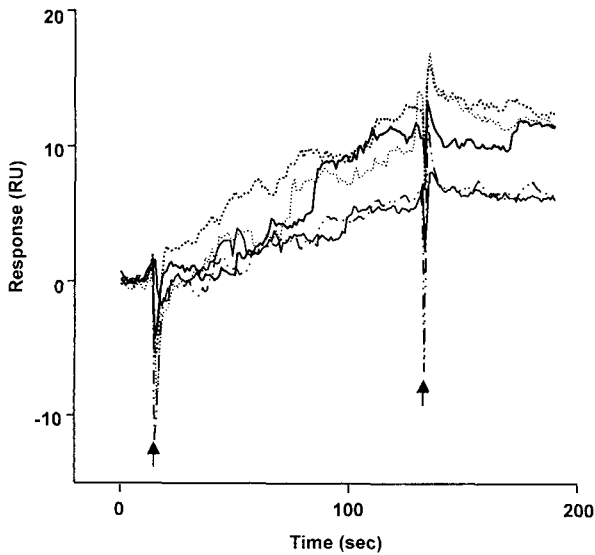


Fig. 4. Response of SPR-based *PsaI* DNA chip to CapR regulatory protein. Binding between CapR regulatory protein and prokaryote promoter *PsaI* DNA chip was initiated (at the first arrow point) with flowing of CapR protein solution over the DNA chip in the absence (—) or presence of phenol at 0.01 (···), 0.1 (— · —), 10 (—), and 100 nM (---). The responses increase from the beginning in a dose-dependent manner, indicating the on-going binding. The flowing of protein solution was discontinued at the arrow time point to see dissociation phase.

연구에서는 이 농도범위의 페놀에서 그 효과가 나타났고 (투고중), 이 시스템을 위해 발현, 분리정제된 CapR 단백질은 가능성이 있어 보임으로 다른 이유에 기인한 것으로 보인다. NtrC 구룹의 활성인자들은 σ^{54} 와 같은 세포내 인자를 필요로 한다는 보고가 있다. 따라서, CapR 단백질이 실제 *Po* 촉진 유전자에 결합하여 반응하기 위해서는 시그마인자가 필요한 것으로 보인다. 이 결과는 CapR이 NtrC 구룹에 속한다고 하는 것을 보여주는 것이다. 더욱이 본 시스템을 활용하여 결합에 영향을 미치는 여러가지 인자들을 연구해 나갈 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구는 SPR-based DNA 칩을 이용하여 조절단백질 CapR과 촉진 단백질들과의 반응을 실시간으로 정확하게 분석할 수 있었으며, 나아가서는 반응의 기작 및 반응 속도에 대한 정확하고 빠른 결과를 얻을 수 있을 것이라고

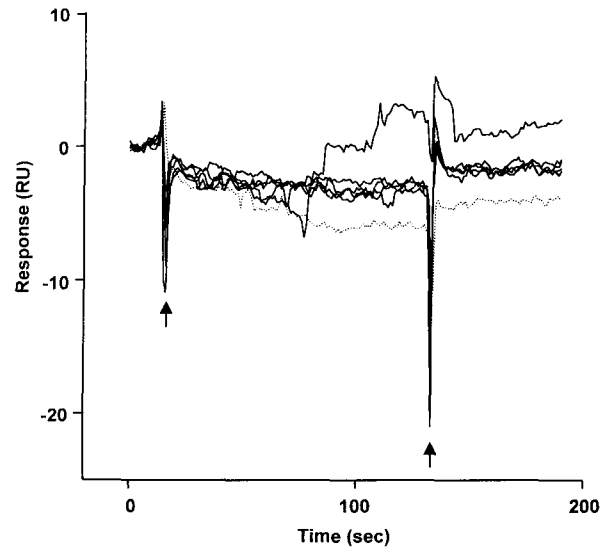


Fig. 5. Response of SPR-based *Po* DNA chip to CapR regulatory protein. Binding between CapR regulatory protein and its promoter *PoI* DNA chip was performed as described in Fig 4. No positive response was shown.

기대하며 이를 이용하여 주된 환경오염물질인 페놀계 화합물의 검출도 나노수준으로 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대 핵심 환경기술개발사업 (Eco-Technopia21 Project)과 2002년 산학연 컨소시엄사업으로 지원받은 과제입니다.

참고 문헌

1. Burchhardt, G., I.Schmidt, H. Cuyppers, L. Petruschka, A. Volker and H. Hermann. 1997. Studies on spontaneous promoter-up mutations in the transcriptional activator-encoding gene *phlR* and their effects on the degradation of phenol in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 539-547.
2. Diaz, E. and M. A. Prieto. 2000. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants. *Cur. Opinion Biotech.* **11**, 467-475.
3. Fivash, M., E. M. Towler and R. J. Fisher. 1998. BIAcore for macromolecular interaction. *Cur. Opinion*

- Biotech.* **9**, 97-101.
4. McDonnell, J. M. 2001. Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Cur. Opinion Chem. Biol.* **5**, 572-577.
 5. Ng, L. C., C. L. Poh and V. Shingler. 1995. Aromatic effector activation of the NtrC-like transcriptional regulator PhhR limits the catabolic potential of the (methyl)phenol degradative pathway it controls. *J. Bacteriol.* **177**, 1485-1490.
 6. O'Neill, E., C. C. Sze and V. Shingler. 1999. Novel effector control through modulation of a preexisting binding site of the aromatic-responsive σ^{54} -dependent regulator DmpR. *J. Biol. Chem.* **274**, 32425-32432.
 7. Rich, R. L. and D. G. Myszka. 2000. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Cur. Opinion Biotech.* **11**, 54-61.
 8. Sarand, I., E. Skarfstad, M. Forsman, M. Romantschuk and Shingler, V. 2001. Role of the DmpR-mediated regulatory circuit in bacterial biodegradation properties in methylphenol-amended soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 162-171.
 9. Shingler, V., M. Bartilson and T. Moore. 1993. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pV1150 and transcriptional activators. *J. Bacteriol.* **175**, 1596-1604.
 10. Shingler, V. and T. Moore. 1994. Sensing of aromatic compounds by the DmpR transcriptional activator of phenol-catabolizing *Pseudomonas sp.* strain CF600. *J. Bacteriol.* **176**, 1555-1560.
 11. Sze, C. C., D. Andrew., D. Laurie., and V. Shingler. 2001. In vivo and in vitro effects of integration host factor at the DmpR-regulated σ^{54} -dependent Po promoter. *J. Bacteriol.* **183**, 2842-2851.
 12. Sambrook, J., E. F. Fritsch. and T. Maniatis. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

(Received December 18, 2002; Accepted February 18, 2003)