

대장균 저온 유도성 유전자 Promoter의 단백질 생산성에 관한 연구

^{1,2}김 소 연 · ¹김 수 현 · ^{1,2}허 미 애 · † ¹이 선 구
¹부산대학교 화학공학과, ²부산대학교 환경기술산업개발연구소
(접수 : 2006. 8. 24., 게재승인 : 2006. 12. 4.)

A Study on the Protein Productivity of the Promoters for Cold Inducible Genes in *Escherichia coli*

So-Yeon Kim^{1,2}, Su-Hyun Kim¹, Mi-Ae Heo^{1,2}, and Sun-Gu Lee^{1†}

¹Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Institute of Environmental Technology and Industry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Received : 2006. 8. 24., Accepted : 2006. 12. 4.)

We investigated the protein productivity of the promoters for genes showing prolonged induction upon cold shock in *Escherichia coli*. Six low temperature inducible genes (*frdA*, *glpB*, *hypB*, *katG*, *nupG*, *ompT*) were selected based on the previously reported cDNA microarray based global transcription profiling of *Escherichia coli* K12 in response to cold shock. Their promoter regions were isolated from the genomic DNA of *E. coli* JM109 and expression levels induced by the promoters were examined by using green fluorescence protein (GFP) as a reporter at 15°C and 37°C. Among the six promoters, the promoter for *nupG* showed the highest and prolonged expression at both temperatures and the cold inducibility of *nupG* promoter was not observed.

Key Words : Cold shock promoter, *nupG*, GFP, protein expression

서 론

유전자 재조합 기술을 이용한 대장균에서의 외래 단백질의 과발현은 발현 단백질의 응집 현상으로 인한 불용성 단백질, 즉 inclusion body (IB) 형성의 문제를 종종 발생시키는데, 특히 진핵 생물 유래의 단백질을 대장균에서 발현할 때 가장 흔히 관찰할 수 있다(1). 대장균에서의 IB 형성은 단백질 생산 공정에 있어 단백질 정제 과정에 유리한 측면을 제공하기도 하지만 많은 경우 생산하고자 하는 단백질의 재접힘(refolding)이 쉽지 않기 때문에 IB 형성은 바람직하지 않은 현상이라고 할 수 있다. 실제로 IB 형성 문제는 뛰어난 단백질 생산 능력에도 불구하고 많은 단백질의 생산 공정에 있어 대장균을 효율적인 생산 세포로 사용할 수 없도록 만드는 요인 중의 하나이다(2).

단백질의 과발현시 일어나는 단백질의 불용성화를 방지하고 가용성으로 목표 단백질을 발현하기 위해 시도되어 온 대표적인 방법 중에 발현 온도를 낮추어 발현단백질의

접힘 효율을 높이는 방법은 단백질 구조에 관계없이 다양한 단백질 발현 시 효율적으로 사용되어왔다(3). 저온에서의 단백질 발현은 발현 단백질의 가용성 증가 뿐 아니라 protease 등에 민감한 단백질의 생산에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다(3).

한편 저온에서의 단백질 발현은 단백질 발현 속도의 감소에 의해 그 생산 효율이 상온 발현에 비해 떨어진다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 다양한 연구가 이루어져 왔으며 특히 저온 유도 단백질인 CspA 유전자의 promoter를 이용한 저온 발현 시스템에 대한 연구가 주를 이루어 왔다. CspA는 저온 충격이 가해질 때 *E. coli*를 비롯한 여러 미생물들에서 발현이 되는 단백질로써 37°C에서는 거의 발현이 되지 않다가 15°C에서는 총 단백질의 10% 이상을 차지할 정도로 발현도가 높아진다고 알려져 있다(4). 이러한 이유로 인해 *cspA*의 promoter를 이용하면 저온에서 단백질 발현을 효율적으로 할 수 있다는 결과들이 발표되었으며 예를 들면 *cspA* promoter 시스템을 이용하여 15-23°C에서 *tac* promoter 수준의 발현 효율을 얻을 수 있는 보고가 있었다(4). 또한 최근 들어 *cspA*의 promoter 뿐 아니라 *cspA* mRNA의 5' UTR과 3' UTR을 이용하여 저온에서의 유전자 발현 유도 및 전사/번역 효율을 향상시켜 저온에서의 단백질 발현 효율을 더욱 향상시킬

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Tel : +82-51-510-2786, Fax : +82-51-512-8563
E-mail : sungulee@pusan.ac.kr

수 있는 시스템에 대한 연구 결과가 있었다(5).

cspA의 promoter를 이용한 시스템의 경우 cspA 발현이 저온에서 지속적으로 일어나지 않고 상온에서 저온으로 발현 온도를 이동하였을 때 일시적으로 유도되며, cspA의 저온 유도성은 cspA promoter에 의해 유도된다기보다는 cspA mRNA의 온도에 따른 안정성 변화에 의해 일어나는 현상이라고 알려져 있다(6). 따라서 cspA를 이용한 효율적 발현시스템을 구현하기 위해서는 cspA의 promoter 뿐 아니라 cspA의 mRNA의 5' UTR과 3' UTR 및 번역 증진 인자 서열 등이 포함되어야 한다(5).

본 논문에서는 cspA promoter 이외에 효율적인 저온 유도성 promoter로 이용될 수 있는 promoter를 탐색하기 위한 연구 수행 결과에 대해 발표하고자 한다. 본 연구의 목표는 첫째, 저온에서 지속적으로 단백질 발현을 유도시키는 promoter의 탐색, 둘째, 저온 발현 유도성이 발현 유전자의 mRNA 서열에 의존하지 않고 promoter 자체가 저온 유도성을 지니는 promoter의 탐색에 있으며 이를 위하여 저온에서 지속적으로 발현이 유도되는 유전자 6가지의 promoter를 선별하여 이 promoter들의 발현 효율을 알아보았다. 저온 유도성 promoter 후보 6가지는 기존에 발표된 cDNA microarray를 이용하여 밝혀진 저온 유도 전사체에 대한 연구 결과를 이용하여 선별하였으며 promoter의 단백질 생산성은 Green Fluorescent Protein (GFP)를 reporter로 이용하여 살펴보았다.

재료 및 방법

Plasmids 제조

유전자 cloning은 Promega 사의 pGEM-T vecor 시스템을 이용하였으며 cloning을 위한 균주로 *E. coli* XL1-blue를 사용하였다. 선별된 6가지 promoter의 단백질 생산성을 측정하기 위하여 다음과 같이 vector를 제조하였다. gfpmut_{3,1} 유전자를 pGlnAp2-gfpmut_{3,1}(7)로부터 PCR을 이용하여 증폭하여 pET28a의 *Bam*HI, *Sac*I를 이용하여 삽입, pET28a-GFP를 제조하였다. 선별된 6가지 저온 유도 유전자 (frdA, glpB, hypB, katG, nupG, ompT)의 promoter 부분을 *E.coli* JM109

로부터 PCR을 이용하여 증폭한 후 pET28a-GFP의 *Bg*III, *Xba*I를 이용하여 삽입, pET28a의 T7 promoter를 선별된 promoter로 대체함으로써 6가지 promoter에 대한 GFP reporter 시스템을 구축하였다. promoter 선별 및 예측에 대한 구체적인 설명은 결과 및 고찰에 기술하였다.

배양 및 GFP 발현

6가지 promoter에 대한 GFP reporter 시스템을 *E. coli* XL1-blue와 *E. coli* BL21 (DE3)에 도입하여 37°C와 15°C에서 다음과 같이 단백질 발현을 유도하였다. 각각의 균주에 대한 colony를 ampicillin 50 µg/ml을 포함한 LB에 접종 후 37°C에서 16시간 배양한 뒤, 배양액을 1/50로 희석하여 37°C에서 OD_{600nm} 값이 0.4-0.6이 될 때까지 배양하였다. 이후 IPTG 0.05 mM을 첨가한 후 37°C 또는 15°C에서 배양하며 시간별로 시료를 채취하여 GFP 형광도 (fluorescence)를 측정하였다.

GFP 형광도 측정

균주 배양액으로부터 1 mL 씩 시료를 채취한 뒤 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 하여 세포를 침전시킨 후 0.9% NaCl 1 mL로 현탁하여 600 nm에서 OD를 측정하였다. OD 측정값이 0.1~0.2 사이가 되도록 0.9% NaCl 용액을 이용하여 희석한 후 200 µl씩 취하여 96 well plate에 각각 분주, Victor Multilabel Counter (1420-011) (Wallac,Finland)를 이용하여 excitation 파장 485 nm, emission 파장 515 nm에서 형광도 세기를 측정하였다.

결과 및 고찰

Promoter 선별 및 vector 제조

Phadtare과 Inouye는 37°C와 15°C에서의 대장균 (*E. coli* JM83)의 전사체를 cDNA microarray를 이용하여 대장균의 저온 유도성 유전자에 대한 분석을 수행한 결과를 발표하였다(8). 이들은 전사체 분석 자료를 이용하여 저온에서 일시적으로 발현이 유도되는 유전자 70개, 저온에서 발현이 일시적으로 억제되는 유전자 82개, 저온에서 지속적으로 발

Table 1. Sequences of predicted promoters for cold-inducible genes

gene	promoter sequence	vector
frdA	<u>agggcagcaagctctactc</u> gcaacgcgacggcgagacaaattttacgcggaatcaaacagcgtggcgcaagtactaataaaagcagatctgatggtttgaataaataatcatcttcagtgataattgacccctctgcgcaataaaatcgatctgcaatttcagcattatccatgactatactgtgtacctataaaggagcagtggaatagcgttcgacagccgtaacttcagctactaccctgaagtagcgtggctgtgggataaaaacaatctggaggaatgt	pfrdGFP
glpB	<u>gtgagagaaccgcttcttctg</u> agttgccgcatgtaagaaacattcataaataatgtgaattgccgcacattataaataagatttacaataatgttcaaaafgacgcatgaaatcagctttcactttcgaattatgagcgaatgctgcgaaatcaacaatfcatttttactatgctcaatgtgtaaaaacgaaactca	pglpGFP
hypB	<u>gtcagcgtgctatttcgacat</u> catcgacattattaccgcaggataaacaactggcacaattattgcttggctgcaatagtttaaggagggcagatgcaaaataaccctctgccaacggcactggaattgatcgaacagcaggcgcacaaacagcggcgaacgtaactgggtctgctgcaaaaatggcgcaatttctgtgctgaaaccagctcttctgcttttggatctggttgcggcagcgtggcggaagggtgtaaacgcaacctgaagaac	phypGFP
katG	<u>aaatagctgctcttctg</u> aaaatcacacagtgatcacaattttaaacagacacaaatgctgcctcgaatgagggcggaataaagttatcagcctgtttctccctactctgaagatgatgaagcctaaaccccttttataaagcaattgtccgaattcgcacataatcaaaaagcctaaatgaatgactacatctcttaaccaaataatgtaagatcctcaactatcgatctcgtggaatattcaatataactctctctaaacgctgtgactgtaacggaacactgtagggggag	pkatGFP
nupG	<u>acgctgagcaccgccatccct</u> ctgccaatctcgccttatctttataaagtaataccgcgcaaaaatcctaccgcccgcgataatccatfaaccgccctgacgatgctcagggcgaataatgttatccacatcacaattctgtttgcaattgggaattgtgcaattatggcacaagtaacaaaacacgaatcgcggaagttagataatccatcatctgcacggtca	pnupGFP
ompT	<u>aaaacatagtaattgag</u> gataaacctcatgctatttcttatgccttaaaagcagctgcaactaaatagataaaaagcaccacaaaagcataaaaaaacacacagtaaacggaaatgaaacataacagataataaacaaaacagatagcagcattgtgataatcattcaactaaaacaaatataaacagtgagca	pompGFP

* the underlined sequences were used for primer design in the cloning step

현이 유도되는 유전자 35개를 분류하였다. 본 실험에서는 Phadtare과 Inouye의 결과를 참고하여 저온 유도성 promoter 후보를 선별하였으며, 특히 저온에서 지속적으로 발현이 유도되는 35개의 유전자 중 15°C와 37°C에의 mRNA 비율이 15 이상인 유전자 *frdA*, *glpB*, *hypB*, *katG*, *nupG*, *ompT*에 대한 promoter들의 상온 및 저온에서의 발현도를 살펴보고자 하였다. 선별된 유전자의 정보를 NCBI를 통하여 수집하였고, 수집된 유전자의 promoter 서열을 prokaryote의 promoter 예측 사이트 (<http://www.fruitfly.org/promoter.html>)를 이용하여 예측하였다. 예측된 저온 유도성 promoter 후보들의 발현도 및 저온 유도성 여부를 알아보기 위하여 GFP를 reporter로 사용한 vector들을 제조하였다. 이를 위하여 pET28a plasmid에 GFP를 먼저 cloning하였고 예측 promoter 서열을 PCR을 이용하여 증폭한 후 pET28a의 T7 promoter 부분을 제거 후 증폭된 promoter로 교체하였다. Ribosome binding site9 (rbs)는 pET vector의 rbs를 사용하였다. 선별된 저온 유도성 유전자, 예측 promoter 서열과 제조된 vector를 Table 1에 정리하였다.

E. coli XL1-blue에서의 선별된 promoter의 GFP 발현도

선별된 6가지 promoter에 대한 상온 및 저온에서의 단백질 발현 효율을 비교하기 위하여 제조된 vector들을 *E. coli*

XL1-blue에 도입한 후 37°C와 15°C에서의 GFP 형광도를 측정하였다. 37°C에서의 실험의 경우 각각의 vector가 포함된 균주들을 37°C에서 키운 다음 OD가 약 0.4~0.6에서 IPTG를 첨가한 뒤, 다시 37°C에서 균주들을 배양하며 발현을 유도한 뒤, 각각 4시간 후에 시료를 채취하여 세포당 형광도를 측정하였다. pET28a에서 lac operator를 제거하여 lacI에 의한 발현 억제는 없을 것으로 예상되었지만 혹시 있을지 모르는 발현 억제를 방지하기 위해서 IPTG를 첨가하였다. Fig. 1(a)에서 볼 수 있듯이 *pnpGFP*의 경우 다른 vector들에 비해 4~5배 정도 높은 형광도를 보였으며 나머지 5가지 promoter의 경우 *nupG* 프로모터에 비해 상대적으로 매우 낮은 발현도를 보였다. 15°C에서의 실험의 경우 각각의 vector가 포함된 균주들을 37°C에서 키운 후 OD 약 0.4~0.6에서 15°C로 옮긴 후 IPTG를 첨가한 뒤 각각 4시간 후에 시료를 채취하여 형광도를 측정하였다. GFP 발현 정도를 측정해본 결과 37°C 결과와 마찬가지로 *nupG* gene을 유도하는 promoter로 바꾼 vector의 경우 GFP 발현도가 다른 벡터에 비해 3-4 배 정도 높은 값을 보였다(Fig. 1(b)).

E. coli B21(DE3)에서의 선별된 promoter의 GFP 발현도

일반적으로 같은 대장균이라도 strain이 다른 *E. coli* BL21의 경우 *E. coli* K12와는 다른 전사 효율을 가져올 수

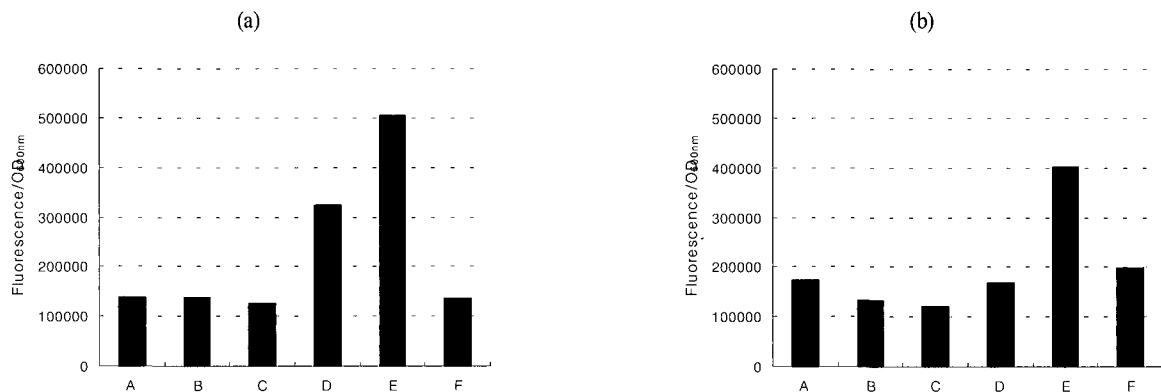


Figure 1. Expression level of GFP induced by promoters for cold inducible genes using *E. coli* XL1-blue as a host at 37°C (a) and 15°C (b) (A, B, C, D, E and F are the promoters for *frdA*, *glpB*, *hypB*, *katG*, *nupG* and *ompT*, respectively).

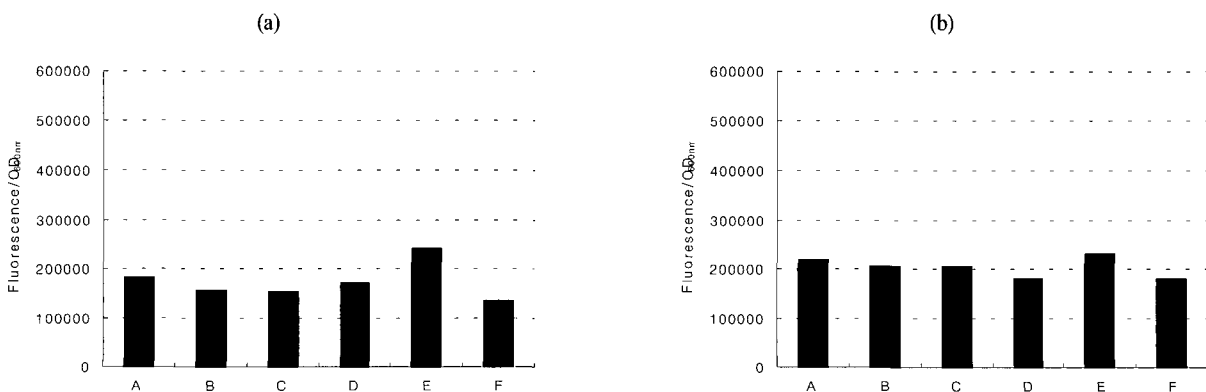


Figure 2. Expression level of GFP induced by promoters for cold inducible genes using *E. coli* BL21 (DE3) as a host at 37°C (a) and 15°C (b) (A, B, C, D, E and F are the promoters for *frdA*, *glpB*, *hypB*, *katG*, *nupG* and *ompT*, respectively).

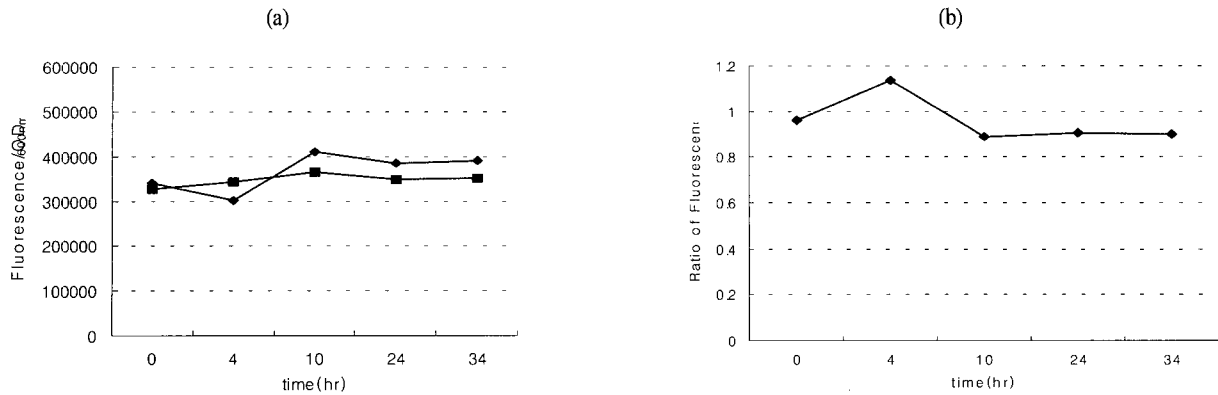


Figure 3. (a) Expression of GFP induced by nupG promoter at 37°C (◆) and 15°C (■). (b) Ratio of expression level of GFP induced by nupG promoter at 15°C to that at 37°C.

있을 것이라 생각되어 *E. coli* K12 균주가 아닌 *E. coli* BL21을 이용하여 위와 같은 실험을 반복 수행하였다. Fig. 2(a)와 Fig. 2(b)는 6가지 vector를 *E. coli* B21(DE3)에 도입한 후 XL1-blue를 이용한 실험과 동일한 실험을 수행하여 나온 37°C와 15°C에서의 GFP의 형광도이다. 결과에서 보는 바와 같이 XL1-blue에서의 결과와는 달리 nupG promoter 효율이 BL21에서는 현저히 감소하였으며, 이는 nupG promoter의 전사 유도 인자의 양 및 전사 효율성 등이 대장균 strain에 따라 달라질 수 있음을 보여주고 있다.

nupG promoter의 단백질 발현 지속성 및 저온 유도성

위의 결과를 바탕으로 6개의 promoter중 37°C와 15°C에서 발현도가 가장 높은 nupG의 promoter에 대하여 단백질 발현 지속성 및 저온 유도성에 대하여 살펴보았다. pnpG-GFP를 제외한 다른 vector들로부터 발현된 GFP의 형광도는 GFP가 발현되지 않는 XL1-blue의 형광도 (약 100,000 fluorescence/OD_{600nm})에 매우 근사한 값으로써 그 발현도를 거의 무시할 수 있을 만큼 작은 값이므로 이들에 대한 실험은 수행하지 않았다. 앞의 실험과 동일한 방법으로 하였으며, 다만 본 실험에서는 34시간까지 실험 시간을 연장하여 37°C와 15°C에서의 nupG promoter에 의한 단백질 생산 능력에 대한 지속성을 평가 해보았다. XL1-blue를 이용하여 37°C와 15°C에서 단백질 발현 정도를 발현 유도 후, 4시간 10시간, 24시간, 34시간 측정하였으며 Fig. 3(a)에서 알 수 있듯이 양 온도에서 34시간까지 형광도가 지속되는 것으로 나타났다. nupG promoter의 저온 유도성을 알아보기 위하여 위의 결과들을 이용하여 각 시간에 대해 [15°C에서의 형광도/37°C에서의 형광도]를 비교하였을 경우 거의 1에 가까운 값을 보이고 있다(Fig. 3(b)). 이 결과들은 nupG promoter의 경우 37°C와 15°C에서 모두 지속적으로 유전자 발현을 유도 할 수 있는 지속성 promoter이나 저온에 의해 발현이 유도되는 저온 유도성 promoter는 아님을 보여주고 있다. 이는 Phadtare과 Inouye의 DNA microarray를 이용한 nupG mRNA 발현도와는 매우 다른 결과를 보여주고 있는데, DNA microarray를 이용한 이들의 결과에서는 nupG 유전자의 15°C에서의 발현도가 37°C와 발현도에 비해 15배 이상 높은 결과를 보였다(8). 이는 nupG 유전자

의 저온 유도성이 promoter의 저온 유도성이 아닌 다른 요인에 의해 발생한다는 것을 간접적으로 알려주는 결과이다. 예를 들면 cspA 유전자의 저온 유도성은 cspA promoter의 저온 유도성보다는 cspA mRNA 유전자의 상온 불안정성 및 저온 안정성에 기인한다고 알려져 있다(6). nupG 유전자의 저온 유도성에 대한 보다 구체적인 기작은 이에 대한 연구를 좀 더 수행하여야 할 것으로 생각되며 promoter의 저온 유도에 의한 것은 아닌 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 저온에서 발현이 유도되고 지속적으로 발현된다고 알려진 대장균의 6개의 유전자 (frdA, glpB, hypB, katG, nupG, ompT)에 대한 promoter의 단백질 생산성을 알아보기 위하여 GFP를 reporter 단백질로 이용하여 각각의 promoter들에 대한 37°C와 15°C에서의 발현도와 저온 유도성에 대하여 고찰하였다. nupG promoter의 경우 37°C와 15°C 모두에서 지속적인 유전자 발현도를 보였으나 promoter에 의한 저온 유도성은 없는 것으로 판별되었다.

감 사

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비 (2년)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Baneyx, F. (1999), Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411-421.
- Baneyx, F. and M. Mujacic (2004), Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399-1408. Review.
- Mujacic, M., K. W. Cooper, and F. Baneyx (1999), Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein, *Gene*. **238**, 325-332.

4. Vasina, J. A. and F. Baneyx (1997), Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems, *Protein Expr. Purif.* **9**, 211-218.
5. Qing, G., L. C. Ma, A. Khorchid, G. V. Swapna, T. K. Mal, M. M. Takayama, B. Xia, S. Phadtare, H. Ke, T. Acton, G. T. Montelione, M. Ikura, and M. Inouye (2004), Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*, *Nat. Biotechnol.* **22**, 877-882.
6. Fang, L., W. Jiang, W. Bae, and M. Inouye (1997), Promoter-independent cold-shock induction of cspA and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization, *Mol. Microbiol.* **23**, 355-364.
7. Bulter, T, S. G. Lee, W. W. Wong, E. Fung, M. R. Connor, and J. C. Liao (2004), Design of artificial cell-cell communication using gene and metabolic network, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 2299 - 2304.
8. Phadtare, S. and M. Inouye (2004), Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **186**, 7007-7014