

메타게놈에서 발굴한 프로모터를 장착한 새로운 항시발현 벡터의 가치평가

한상수 · 김근중*

전남대학교 분자생명과학부 생물학과

Evaluation of Novel Constitutive Expression Vectors Equipped with Mined Promoters from Metagenome. Han, Sang-Soo and Geun-Joong Kim*. Department of Biological Sciences, College of Natural Science, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea – The choice of expression vector is very important for industrial production of proteins. Therefore, the systematic mining of promoters over a wider range of genetic resource and/or host is required. We previously reported a novel bidirectional reporting system (pBGR) for the isolation of promoters from metagenome and screened useful promoters that functioned constitutively in *E. coli* under general culture conditions. Among them, three promoter sequences including each upstream region were amplified by PCR and used to construct new expression vectors. To facilitate subcloning, a multi-cloning site was incorporated into the downstream region of the reverse primer sequence. At these sites, GFP, esterase and β -glucosidase were subcloned and analyzed the constitutive expression ability of new promoter in terms of protein solubility and expression level. As a result, these vectors expressed the proteins constitutively to a level of 2~3% of the total cell protein in soluble fraction (>80 %). This study suggested that excavation of metagenomic promoters for construction of expression vector in a certain strain could provide a way for the development of the expression systems.

Key words: Constitutive expression, metagenome, promoter, expression vector

서 론

자연환경의 모든 생태계에 수백에서 수만종 이상의 미생물들이 존재하며 다양한 유기물과 무기물을 에너지로 전환하고 대사하며 동식물에 영양소를 공급한다. 인간 역시 이들의 중요한 서식처의 일부여서 장내에서 음식물의 소화를 돕고, 독소를 분해하며 때로는 질병을 유발하기도 한다[17]. 전통적으로 이러한 미생물들 중 순수배양이 가능한 종들을 대상으로 항생제나 핵산, 아미노산과 같은 대사물질이나 single cell protein, 바이오 에너지 생산과 같은 산업적인 목적에 폭 넓게 이용되었다[8]. 하지만 이들 자원을 대상으로 시도되는 유전자나 효소의 발굴이 포화상태에 도달하고 자연계 전체 미생물 중 순수배양이 가능한 비율이 0.1 % 미만으로 알려지면서 난(비)배양성 미생물의 순수배양을 위한 기술과 관련자원의 탐색 및 확보가 시급한 문제로 대두되고 있다. 최근 환경시료로부터 난배양성 미생물들을 포함한 전체 DNA를 직접 추출하여 활성과 염기서열 정보를 이용해 목적하는 유전자를 탐색하는 metagenome과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이미 가수분해효소나 항생물질 같은 유용자원의 발굴이 성공적으로 보고되었다[10, 14, 15,

21, 23].

Metagenome을 활용한 신규효소 및 유전자의 발굴이 계속되고 있지만 선별된 효소 및 유전자의 산업적 이용에는 아직 많은 난제가 남아있다. 특히 산업적 생산에 꼭 필요한 발현벡터의 대부분이 제한된 숙주에서만 사용이 가능하며 고가의 유도체(inducer), 예를 들면 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)와 같은 합성화합물이 필요한 유도시스템을 사용하기 때문에 의료용 단백질의 생산이나 저가의 산업용효소의 대량생산에는 이용하기 힘들다. 이러한 문제의 해결책으로 최근 온도나 염 혹은 빛과 같은 다양한 유도기작을 이용할 수 있는 프로모터를 장착한 발현벡터들이 보고되고 있다[3, 4, 13]. 하지만 온도를 이용한 발현유도 시스템은 지나치게 낮거나 높은 발현온도로 인해 숙주내의 heat shock protein, chaperon, protease등이 동시 발현되어 목적하는 재조합단백질의 안정성이나 생산량에 영향을 주고, 다른 발현유도시스템의 경우 대량생산 시 유도체 농도나 설비, 발현유도시간 등을 세밀하게 조절해야 하는 단점이 있다[18]. 따라서 화학 유도체나 물리적인 충격에 의존하지 않고 재조합단백질의 안정적인 생산이 가능한 항시발현(constitutive expression)시스템은 아직 많은 관심의 대상이 되고 있다. 특히 생리나 성장에 유리한 최적조건을 이용하는 장점으로 인해 플라스미드에 장착하는 경우는 물론, 대사공학적인 방법으로 균주를 개량하는 경우에 생리나 대사흐름을 방해하지 않고 발현이 가능함으로 관련된 프로모터의 발굴에 많은 노력이 경주되

*Corresponding author

Tel: 82-62-530-3403, Fax: 82-62-530-3409

E-mail: gjkim@chonnam.ac.kr

고 있다.

위와 같은 목적에 부합하는 선행연구로서 metagenome 유래의 항시발현 프로모터를 발굴하기 위해 녹색(GFP)과 적색형광(DsRed) 탐침자를 장착한 promoter trap system을 구축하였고, 대장균 숙주의 일반적인 배양조건에서 성장저해 없이 항시발현되는 프로모터들을 보고하였다[9]. 본 연구에서는 선별된 프로모터를 이용한 새로운 항시 발현벡터에 산업적으로 유용한 GFP, β -glucosidase, esterase 유전자를 클로닝하여 다른 발현벡터들과 특성을 비교 분석하는 방법으로 실제 활용가치를 평가하였다.

재료 및 방법

균주와 플라스미드

본 실험에 사용된 형질전환 및 발현숙주로는 *E. coli* XL1-BLUE(*endA1gyrA96 (nalR) thi-1recA1relA1lacI_nV44F* [::Tn10*proAB+lacIq* Δ (*lacZ*)M15]*hsdR17*(rK-mK+))를 사용하였다. 균주 배양은 증류수 1리터에 bacto-tryptone 10 g, bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g의 조성을 지닌 전형적인 Luria-Bertani(LB)배지에 ampicillin 50 ppm을 첨가하여 수행하였다. 이들 균주는 37°C의 배양기에서 일반적인 방법으로 성장을 유도하였다. 플라스미드 pBluescriptII-SK(+) (Stratagene)는 새로운 항시발현 벡터 제작의 기본골격으로 사용하였고, 제작된 벡터의 성능비교대상으로 pTrc-99A (Pharmacia), pMAL-c2X(New England Biolabs), pBluescriptII-SK(+)를 사용하였다.

항시발현 벡터의 제작

메타게놈으로부터 프로모터를 발굴한 선행연구에서 기술

한 프로모터인 g118(GenBank accession number, EU122301), g196(EU122304), g200(EU122305)을 사용하여 항시발현 벡터를 제작하였다[9]. pBluescriptII-SK(+)의 기본골격을 이용할 목적으로 제한효소인 *Pvu*II을 처리하여 multi cloning site(MCS)를 제거한 후 PCR로 증폭된 3종의 프로모터 영역을 각각에 클로닝하였다. 이를 위해 g118, g196, g200의 upstream영역을 포함하는 forward primer, 프로모터와 RBS및 multi cloning site(MCS)를 포함하는 reverse primer를 제작하였다(Table 1). 교정기능이 뛰어난 Pfu polymerase (Soligent)를 이용하여 발굴한 프로모터를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 *Pvu*II 제한효소로 절단한 플라스미드에 blunt end ligation 방법으로 삽입하였다. 얻어진 재조합 벡터에 삽입된 insert의 방향성을 확인한 후 새로운 항시발현 벡터를 완성하였고 각각을 pG118, pG196 그리고 pG200으로 명명하였다(Fig. 1).

프로모터 특성평가를 위한 유전자의 클로닝

새로이 제작된 항시 발현벡터의 성능평가와 특성비교를 위해 산업적으로 유용한 GFP, Esterase[5], β -Glucosidase [12]유전자를 클로닝하였다. 성능평가의 비교대상으로 일반적으로 널리 사용되는 pTrc-99A, pMAL-c2X, pBluescriptII-SK(+) 벡터를 이용하였고, 이를 위해 항시발현 벡터와 같은 방법으로 세 개의 유전자를 각각에 클로닝하였다. GFP, esterase, β -glucosidase유전자의 클로닝을 위한 제한효소서열이 첨가된 primer를 주문 제작한 후 PCR을 통해 유전자를 증폭하였다(Table 1). 증폭된 유전자를 각각의 벡터에 Table 1에서 명시된 제한효소를 이용해 클로닝하였다.

새로운 항시발현 벡터의 단백질 발현특성 분석

제작한 항시발현 벡터와 대조군으로 사용될 벡터에 3개의

Table 1. Oligonucleotides used in this study.

Primer name	Sequence
Common F	5'-AATGCAGC <u>CCCGGGG</u> GATC-3'
	<i>Sma</i> I
G118 R	5'- <u>TCAAGCTTCTGCAGGAATTCCCATGGC</u> ATGCTTAGICTTCCTCA-3'
	<i>Hind</i> III, <i>Pst</i> I, <i>Eco</i> RI, and <i>Nco</i> I
G196 R	5'- <u>TCAAGCTTCTGCAGGAATTCCCATGGC</u> CATAAATTCCTCCAGGC-3'
	<i>Hind</i> III, <i>Pst</i> I, <i>Eco</i> RI, and <i>Nco</i> I
G200 R	5'- <u>TCAAGCTTCTGCAGGAATTCCCATGGC</u> ATTTTGCGCATTCCCTT-3'
	<i>Hind</i> III, <i>Pst</i> I, <i>Eco</i> RI, and <i>Nco</i> I
GFP F	5'-ATCCATGGATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA-3'
	5'-ACGAATTCATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCA-3'
GFP R	5'-ATAAGCTTTTATTTGTAGAGCTCATCCATGC-3'
Esterase F	5'-ATAGAATTCGTGCAGATTCAGGGTCATTA-3'
Esterase R	5'-ATAAAGCTTTTACAGACAACCGGCCAAT
β -Glucosidase F	5'-ATCCATGGTGATCGAAGCCAAGA-3'
	5'-TAGAATTC AACGCCGAAAAATTC-3'
β -Glucosidase R	5'-ATAAGCTTTCATCCCGGCTTG-3'

- Single underline represents the recognition and cleavage site by restriction endonuclease.

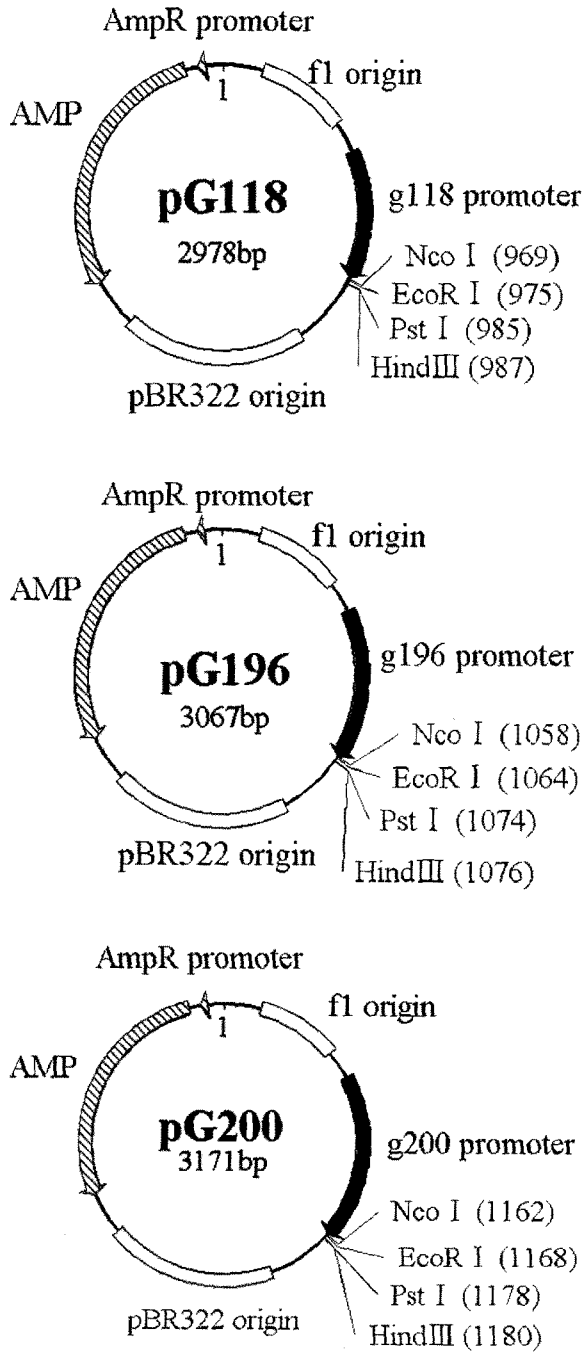


Fig. 1. Schematic representation of novel expression vectors. pBluescriptII-SK(+) was used to provide a scaffold including the ampicillin resistance gene and the replication origins. The predicted promoter was subcloned into *PvuII*-digested pBluescriptII-SK(+) by blunt end ligation.

유전자 각각이 클로닝된 재조합 균체를 50 ppm의 ampicillin이 첨가된 LB배지를 사용해 37°C 배양기에서 유도제 (IPTG)를 포함하지 않는 조건으로 24시간 배양하였다. 대조군중 inducible promoter를 지닌 pTrc-99A와 pMAL-c2X는 IPTG 1 mM을 첨가해 발현을 유도하는 실험을 병행하였다.

배양된 각각의 세포를 원심분리기로 수확(12000 rpm, 10분)한 후, 흡광도(spectrophotometer, UV2100, Shimadzu)를 측정해 세포양을 같게 하고 deepfreezer(-80°C)를 이용해 freezing-thawing을 2회 반복한 후 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액에 현탁하였다. 그 후 초음파 파쇄기(Sonics & Materials, USA)를 10초 간격으로 50초 pulse를 3번 가해 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 용액을 12,000 rpm, 30 min 동안 원심분리 하여 상등액을 회수한 후 침전물과 분리해 단백질의 용해도를 확인하였다. 상등액의 경우 단백질 정량법(Bradford 방법과 280 nm에서 흡광도 측정)에 의해 농도를 결정한 후 일정한 양(10 mg)을 SDS-PAGE와 Native-gel을 이용해 전기영동 하였고, 침전물(insoluble fraction)의 경우 상등액과 같은 부피의 50 mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액에 현탁한 후 상등액(soluble fraction)과 동일양(volume)을 SDS-PAGE를 이용해 전기영동 하였다[20]. SDS-PAGE의 경우, 상등액과 침전물을 전개한 후 densitometer를 이용해 전체 단백질에 대한 발현 비율과 발현된 총단백질에 대한 가용성 정도를 결정하는데 이용하였다. Native gel의 경우는 발현된 단백질의 기능성을 확인하기 위해 환원제와 열처리 를 하지 않은 상등액을 전개한 후 GFP는 UV(345 nm)를 통해 형광을 띄는 단백질의 위치와 크기를 관찰하였고[1], esterase는 α -naphthyl acetate와 Fast-Blue RR를 사용한 전형적인 activity staining법으로 활성밴드를 관찰하였으며[5], β -glucosidase는 형광기질인 4-methylumbellifery- β -D-glucopyranoside(MUG)를 이용해 활성밴드의 위치를 확인하고 정량하였다[12].

새로운 항시발현 벡터에 의한 세포성장 영향분석

대조군과 새로운 항시 발현벡터들을 지닌 클론들을 ampicillin 50 ppm이 첨가된 LB액체배지에 각각 접종하고, 37°C 배양기에서 24시간 배양하며 성장패턴을 관찰하는 방법으로 유전자의 항시발현에 의한 성장저해나 생리영향을 분석하였다. 이를 위해 세포의 성장곡선과 비성장속도를 비교하였고, 스트레스 인자로서 발현되는 chaperone과 같은 heat shock protein들의 발현여부를 PAGE를 통해 정상적으로 자라는 공 벡터를 지닌 클론들과 비교하였다. 또한 배양된 재조합 균체의 양을 같게 하여 plasmid를 순수분리한 후 copy number의 유지 및 스트레스에 의한 nicking정도와 super-coiling변화를 비교하였다. 모든 과정은 seed culture를 수행한 후 본 배양하는 방법으로 진행하였고 2회 이상 반복해 평균값을 측정 하였다.

결과 및 고찰

메타게놈 유래 프로모터를 장착한 항시발현 벡터 제작

선행연구로 metagenome으로부터 프로모터를 발굴하기 위해 녹색(GFP)과 적색형광(DsRed)탐침자를 지닌 trap vector

pBGR1을 제작한 후 특성을 확인한 결과, 높은 신뢰도를 지니 다양한 자원으로부터 유용한 프로모터의 발굴에 폭넓게 활용할 수 있음을 확인하였다[9]. 실례로 조습지토양(소래 생태공원, 인천)을 0.8 m 깊이까지 채취하여 FastDNA® SPIN Kit(Bio 101, USA)을 이용해 전체유전체(metagenome)를 분리한 후, 제한효소로 부분절단하는 방법으로 라이브러리를 제작해 프로모터 발굴을 시도하였다. 제작된 라이브러리를 통해 37°C의 일반적인 배양조건에서 녹색형광 탐침자와 적색형광 탐침자의 발현을 유도한 클론을 400종 이상 선별하였다. 얻어진 클론들을 생육온도와 배지성분을 달리하며 분석한 결과, 배양조건에 따라 발현편파가 크지 않은 강력한 녹색형광 클론 7개와 적색형광 클론 4개를 최종 선별하였다. 염기서열분석을 통해 삽입된 유전자 서열을 확인한 후 다양한 Web기반의 프로모터 예측 프로그램과 ORF예측 프로그램을 조합하여 유전자간 서열(intergenic sequence)내의 프로모터를 신뢰성 있게 예측하였다. 11개의 클론 중, 8개의 클론에서 완전하지 않은 ORF들이 포함되어 있었으나 하나 이상의 putative promoter서열을 확인할 수 있었다. 이들 중, 숙주인 대장균 전사조절인자, 즉 -35, -10 그리고 +1 위치가 잘 보존되어 있는 세 개의 프로모터(g118, g196, g200)를 임의로 선정해 기능성을 확인한 결과, 대장균에서 특정한 유도체의 첨가 없이 항시 발현되는 패턴을 보여주고 있음을 부분적으로 증명하였다[9].

이때 제작된 항시발현 벡터의 구성은 pBluescriptII-SK(+)를 벡터시스템에 필요한 요소(replication origin and selection marker)를 제공하는 기본골격으로 사용하였다. 결과적으로 pBluescriptII-SK(+)의 프로모터를 포함한 MCS가 PvuII(CAGCTG) site로 절단하면 제거할 수 있어 실험목적에 부합하였다. 이 곳에 장착 될 항시발현 프로모터는 예측

된 -35 위치의 upstream 부위(up element를 포함하기도 한 non-coding region, 100-200 bp)를 포함하는 forward primer, RBS와 MCS(인위적으로 합성해 삽입한 NcoI, EcoRI, HindIII, PstI 인식부위)를 포함하는 reverse primer를 주문 제작한 후 PCR로 확보하였다(Table 1). 이후 각각의 프로모터의 클로닝 과정을 통해 새로운 항시발현 벡터로 pG118, pG196과 pG200을 제작하였다(Fig. 1). 실험에 사용된 3종의 프로모터 염기서열과 Web에 공시된 software로 분석된 -35 과 -10 부위, 전사개시점(TSP)의 위치는 Table 2에 표시하였다. 특징적으로 대장균 프로모터의 보존서열과 유사한 배열을 지녔음을 확인할 수 있었으며, 특히 g196의 염기서열과 배열패턴이 전형적인 대장균 구성요소와 매우 유사함이 확인되었다.

제작된 항시 발현 벡터의 경우 오작동 여부, 즉 예측된 프로모터 위치가 맞지 않거나 클로닝 과정에서 돌연변이가 생겼을 경우, MCS에 클로닝 된 단백질이 transcriptional 혹은 translational fusion에 의해 고유의 활성을 갖지 못할 수 있다[16]. 이를 방지하고자 MCS앞에 RBS를 지닌 primer를 제작하여 예측된 프로모터에 포함시켜 증폭하였고, 실제 insert가 도입되지 않은 벡터의 단백질 발현여부를 확인하였을 때 공벡터 상태에서 특정 단백질의 발현이 검출되지 않았다. 또한 임의의 DNA조각을 insert로 삽입하여 발현을 유도한 결과, 도입된 프로모터의 3'말단 쪽에서의 protein(peptide) fusion이나 frame shift가 발견되지 않아 발현벡터로 이용하기에 문제가 없는 것으로 확인되었다.

항시발현 벡터의 특성분석을 위한 유전자의 클로닝과 발현능 비교

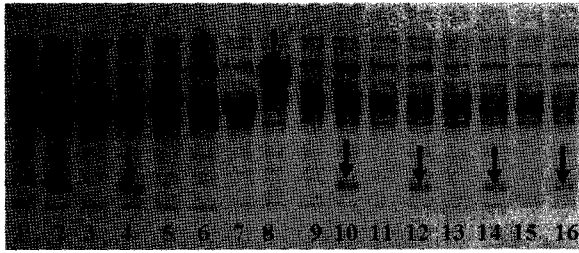
항시발현 벡터의 발현능을 비교하기 위해 trc프로모터를

Table 2. DNA sequence of promoter regions of mined promoter used in this work.

Promoter	Structural organization of promoter sequence predicted
g118	GATCTCCGCT GTTGCATAAA GTGAGTTTAT CTGTTTCTGT AGTAAGCTCT GTTTCGATGGT AGGGAAAGAC TTAATAATT TGATGTAGAA TAGATTTGGT ACTTGTAATT CTCTGTACT AGCGTCGATT CCTGTAGATC GATAATAATCG CATTGGTAAA TTGGAACATA TTGGTCAAGG CATTGATAAA AGTATTGTTTC -35 -10 +1
g196	GATCCGCGCC GAATAGATAT CCATCTGTAT ATATTGCGGC GAAGCAGCAC TTAGGCTATA ATAAAAATAA TTGGACCTCG ACTTGGCCGT ATCCTGTTTG ATAAAGTCAA ATTGCAGGTC AAAATCATCG TAGTACCGGT CGGATGGCAC -35 -10 +1
g200	GATCCTCCG GTAATACTAC CAATGCGGCT GCTTATTCAT TCCNTACCTG GATGCTACCA ATCAGATCCA AGCTACCGCG TACTAGACTN GACTTCGGAC CCGTTTTCGG ATGCCCGTCC ATCCTACTTC CATAAATCCT TAGGAGGATA CCATGCTGCA AAATTAATGC GTTCCAGGA AATTTTGAA AATCAAITTA ATGGTGGCT CAATGAAGAT GTGTTGGATA TGTTAATGT GCGTTATCTG -35 ATTACAACAG ATCGTGCTGG CTGCATTTTC CGTACAGAAG GCAACCGCCC -10 +1

Single underline represents -35 region, -10 region and +1 region, respectively.

A. Soluble fraction



B. Insoluble fraction

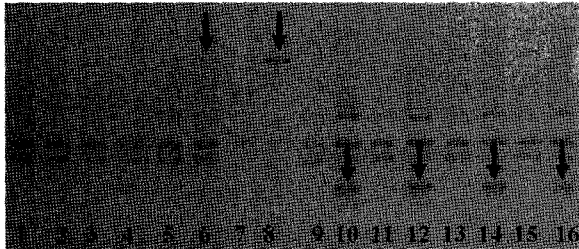
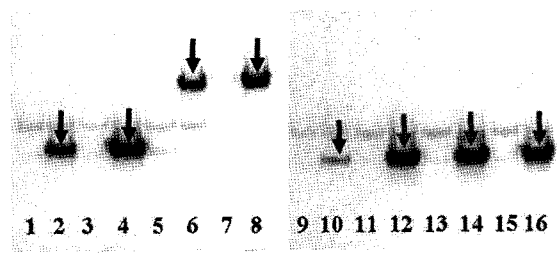


Fig. 2. SDS-PAGE analysis for the measurement of expression level in soluble and insoluble fraction. lane 1, pTrc-99A; lane 2, pTrc-GFP; lane 3, pTrc-99A (induced); lane 4, pTrc-GFP (induced); lane 5, pMAL-c2X; lane 6, pMAL-GFP; lane 7, pMAL-c2X (induced); lane 8, pMAL-GFP (induced); lane 9, pBluescriptII; lane 10, pBluescriptII-GFP; lane 11, pG118; lane 12, pG118-GFP; lane 13, pG196; lane 14, pG196-GFP; lane 15, pG200; lane 16, pG200-GFP. All soluble (A) and insoluble (B) fractions were loaded on an acrylamide gel (10%) under denaturing condition.

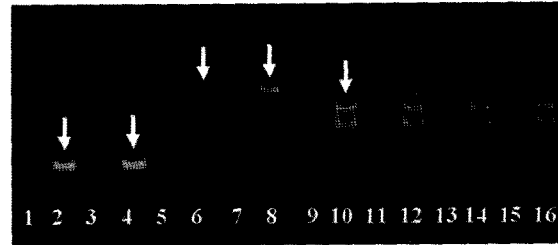
지닌 pTrc-99A, tac프로모터를 지닌 pMAL-c2X, T3과 T7 프로모터로 발현이 유도되는 pBluescriptII-SK(+))를 대조군으로 이용하였다. 새로이 제작된 발현벡터와 대조군의 비교를 위해 산업적으로 유용하고 세포 내, 외에서의 추적이 용이하며 비교적 간단하게 활성을 측정할 수 있는 형광단백질 GFP와 esterase, β -glucosidase 유전자를 채용하였다[1, 5, 12]. 클로닝한 유전자는 염기서열분석과 활성측정을 통해 정상적으로 원하는 위치에 삽입되었음을 확인하였다.

단백질 발현특성 비교를 위해 클로닝된 신규벡터와 대조군을 지닌 각각의 클론을 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 병행해서 유도제로 유도되는 프로모터를 지닌 pTrc-99A와 pMAL-c2X는 1 mM의 IPTG를 첨가한 후 일정한 시간 간격으로 시료를 취해 비교 분석하였다. 회수된 재조합 균체는 초음파로 파쇄하였으며 지나친 열의 발생으로 인한 단백질의 변성, 발현양이 다른 클론들의 파쇄정도가 다를 수 있음을 고려해 freezing과 thawing을 반복하여 세포벽(막)을 약화시킨 후 짧은 시간에 충분히 저온을 유지한 상태에서 세포를 파쇄하였다. 이 후 원심분리를 이용해 soluble fraction과 insoluble fraction으로 나누어 분석하였다. 얻어진 시료들의 단백질 농도를 결정한 후 SDS-PAGE(Fig. 2)와 Native gel(Fig. 3)을 이용해 단백질 발현양과 가용성을 분석하였다.

A. Esterase



B. GFP



C. β -Glucosidase

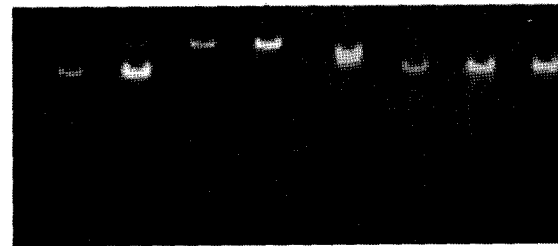


Fig. 3. Native gel electrophoresis and direct detection of esterase (A), GFP (B) and β -glucosidase (C) activity on the solid gel. lane 1, pTrc-99A; lane 2, pTrc-insert; lane 3, pTrc-99A (induced); lane 4, pTrc-insert (induced); lane 5, pMAL-c2X; lane 6, pMAL-insert; lane 7, pMAL-c2X (induced); lane 8, pMAL-insert(induced); lane 9, pBluescriptII; lane 10, pBluescriptII-insert; lane 11, pG118; lane 12, pG118-insert; lane 13, pG196; lane 14, pG196-insert; lane 15, pG200; lane 16, pG200-insert. All samples were loaded on an acrylamide gel (10%) under non-denaturing conditions.

결과적으로 새로이 제작된 항시발현 벡터는 삽입된 유전자의 종류나 특성에 큰 영향을 받지 않고 대조군에서 안정적으로 발현되는 것이 확인되었다. 3개의 유전자가 각각 클로닝된 모든 항시발현 벡터에서 전체단백질의 2~3% 정도로 발현되었으며 이중 60~100%는 soluble fraction에서 관찰되었다(Table 3). 발현 유도제를 첨가한 대조군 시료들은 세포 전체단백질 대비 삽입된 유전자의 발현비율이 항시 발현벡터보다 월등히 높은 것으로 확인되었지만, 심한 경우 발현된 단백질의 90% 이상이 insoluble fraction에서 관찰되었다. 일반적으로 알려진 바와 같이 pMAL-c2X에서의 발현은 융합된 MBP의 도움으로 protease에 의한 가수분해를 줄일 수 있고 folding에 긍정적인 도움을 받아 전체적인 발현량은

Table 3. Comparison of expression level and solubility of proteins expressed by commercial and our vector systems.

Expression system	Total expression (%)	Soluble fraction (%)
pTrc-esterase(-)	0.6	>98.0
pTrc-esterase(I)	2.4	>98.0
pMAL-esterase(-)	1.3	>98.0
pMAL-esterase(I)	38.7	30.2
pBS-esterase(-)	2.1	>98.0
pG118-esterase(-)	2.4	>98.0
pG196-esterase(-)	3.0	>98.0
pG200-esterase(-)	3.4	>98.0
pTrc-GFP(-)	2.6	>98.0
pTrc-GFP(I)	6.8	>98.0
pMAL-GFP(-)	2.2	92.3
pMAL-GFP(I)	26.4	93.4
pBS-GFP(-)	5.6	72.3
pG118-GFP(-)	6.8	81.2
pG196-GFP(-)	7.6	73.7
pG200-GFP(-)	6.8	85.1
pTrc- β -glucidase(-)	0.3	>98.0
pTrc- β -glucidase(I)	5.9	12.3
pMAL- β -glucidase(-)	2.2	>98.0
pMAL- β -glucidase(I)	17.6	63.4
pBS- β -glucidase(-)	7.7	9.2
pG118- β -glucidase(-)	2.3	>98.0
pG196- β -glucidase(-)	2.1	>98.0
pG200- β -glucidase(-)	3.1	>98.0

Protein extracts were prepared from uninduced (-) and 1mM IPTG-induced (I) cultures of recombinant cells with genes encoding target proteins. All data given in table were mean value of duplicate experiments.

증가하지만, 지나치게 과발현된 상태에선 상대적으로 높은 비율(7~70%)이 비가용성 응집체를 형성하는 것으로 보여진다. 이러한 결과를 native-gel 상에서 추적이 용이한 단백질들의 특성을 이용해 activity staining하는 방법으로 검증하였다. 그림 3의 결과처럼 전술한 SDS-PAGE의 결과와 유사하게 단백질의 발현비율과 가용성 정도, 활성을 지닌 비율 등을 검증할 수 있었다. 대조군의 하나로서 pBluescriptII-SK(+)의 경우 β -galactosidase fragment와 융합되어 단백질이 발현됨으로 활성을 보이는 위치가 다른 벡터의 경우보다 좀 더 위로 이동하였음을 알 수 있다. 이러한 특성으로 인해 융합된 peptide와 목적 단백질의 folding이 잘 유도되지 않아 활성이 줄어들거나 관찰되지 않을 수도 있고, 경우에 따라서는 독자적으로 발현되는 경우에 비해 강한 활성을 보일 수도 있는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서 이용한 esterase는 *P. fluorescens* KCTC1767 유래의 전형적인 carboxyl esterase의 일종으로 산업적으로 유용한 ketoprofen이나 ibuprofen의 광학분할에 유용하게 활

용되는 단백질이다[5]. 하지만 야생형 효소는 대장균에서 발현이 불안정해 과발현을 유도하는 경우 inclusion body로 대부분 발현되는 특성을 지니고 있다. 이러한 단점의 극복을 위해 단백질공학 기술로 개량한 돌연변이효소를 제작하여 발현특성을 개선하기도 하였으나[11], Fig. 3에서와 같이 야생형 효소자체를 새로이 제작된 항시발현 벡터에서 발현시키는 경우, 양은 적지만 활성을 지닌 단백질을 대부분 soluble fraction에서 얻을 수 있음을 확인하였다. β -Glucosidase의 경우도 친환경 염료생산에 적합한 고효율 단백질로 선별되었으나 fusion partner와 융합된 상태에서만 안정적이며 가용성으로 발현되는 것을 보도하였다[12]. 하지만 항시발현 벡터(pG196과 pG200)에서 발현되는 경우 특별한 융합단백질의 도움 없이 활성이 담보된 가용성의 효소를 확보할 수 있음이 확인되었다. 그림(Fig. 3B)에서 GFP의 발현 양상을 보면 형광이 두 곳에서 보이는 경우가 있다. 이 경우, 발현된 단백질의 농도에 따라 dimerization되는 경향이 증가해 monomer와 dimer위치 모두에서 형광을 나타내기 때문이다[7].

플라스미드 안정성과 세포성장에 미치는 영향

숙주에서 벡터를 이용한 재조합 단백질이 과발현되면 여러 가지 대사경로의 변화를 유발하거나 세포 성장에 영향을 주는 경우가 있다. 또한 재조합 단백질 자체의 folding능력이 떨어지거나 3차구조 형성에 필요한 보조인자가 부족한 경우 불용성 응집체를 형성하거나 단백질 가수분해효소에 의해 분해되기도 한다[2, 22]. 이러한 결과로 숙주의 표현형질에도 변화가 유발되며 플라스미드의 안정성에도 영향을 주게 된다. 따라서 신규 발현벡터에 의한 metabolic burden이나 stress response 등의 생리적 변화에 대해 고려하여야 한다[6, 24].

제작된 벡터들은 클로닝된 단백질의 발현이 충분히 유도된 장기배양(72시간)후에도 고체배지에서 뚜렷한 세포 표현형의 변화는 보이지 않았다. 다만, GFP가 삽입된 벡터의 경우, 액체배지에서의 성장이 esterase와 β -glucosidase가 삽입된 클론들보다 비성장속도가 20-30%정도 느려지는 것이 관찰되었다. 접종량을 변화시키거나 배양온도를 달리한 조건에서도 정도의 차이는 있지만 성장속도가 지연됨을 재현성 있게 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 단백질 회수를 위한 cell lysis과정에도 영향을 주어 GFP가 삽입된 벡터를 지닌 재조합균체의 경우, 다른 대조군에 비해 약 40-60%만이 파쇄되는 것이 확인되었다. 이는 신규벡터 제작의 주형으로 사용한 pBluescriptII-SK(+)에서도 같은 양상을 보여 높은 copy number에 따른 단백질의 과발현과 세포생리에 대한 영향 때문인 것으로 추측된다. 상대적으로 발현율이 낮은 esterase나 glucosidase를 지닌 클론에서는 이러한 현상이 나타나지 않았다. 이외에 다른 세포생리나 표현형질에는 별다른 영향이 관찰되지 않았다. 순수분리 정제된 신규 벡터들은 copy

number가 잘 유지되었고, 새로운 competent cell에 반복적으로 도입하여도 같은 양상을 유지하였다.

단백질의 발현이나 생산 혹은 미생물의 대사공학적 변형과 개량에 반드시 필요한 것이 발현벡터이다[19, 24]. 특히 현재 사용되는 벡터의 대부분이 발현유도과정을 거쳐야 하는 단점을 지니 단백질의 대량생산에 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 원인과 결부되어 신규 발현벡터의 제작에 관련된 많은 결과들이 보고되고 있다. 하지만 대부분이 발현유도 벡터에 집중되어 단백질 대량생산 시 inducer의 농도 및 유도시간을 최적화해야 하는 번거로움을 지니 효율적으로 산업체에서 활용 가능한 벡터는 극히 제한적이다. 또한 지나치게 강한 promoter strength로 인해 과발현이 유도되었으나 단백질의 folding ability나 chaperone이 부족한 경우, 혹은 metabolic burden에 의해 stress를 유발하는 경우 inclusion body가 급격히 증가한다. 가용성이 유지되더라도 protease에 의해 가수분해되기도 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구의 경우처럼 적절한 수준의 전사와 번역 정도가 유지돼 숙주의 생리에 영향이 크지 않는 범위 내에서 최적의 단백질을 얻는 것이 매우 중요하다[19]. 특히, 단백질 자체를 과생산하는 목표 이외의 연구, 즉 숙주를 대사공학으로 개량하거나 인공대사경로를 특정 세포에 도입하는 경우, 적절한 세기를 유지하며 항시발현되는 프로모터의 활용은 매우 중요하다. 따라서 무한한 생물자원의 보고인 metagenome을 통해 다양한 숙주에서 작동하는 항시발현 벡터의 제작을 시도할 경우 재조합단백질의 생산과 유용 균주의 개량연구에 큰 기여를 할 것으로 예상된다. 또한 다양한 숙주에서 제작될 항시발현 벡터들은 metagenome shotgun library 구축 시 활성을 근거로 한 선별과정에 클로닝벡터로서 활용할 수 있을 것이다.

요 약

단백질의 산업적 생산을 위해 발현벡터의 선정이 중요하지만 이용 가능한 프로모터가 극히 제한적이며 많은 경우 과발현되는 특성과 함께 불용성 응집체가 형성되는 단점을 지닌다. 따라서 다양한 생물로부터 유래된 잠재성이 큰 유전 자원(metagenome)에서의 프로모터 발굴과 한정된 숙주를 해결하려는 노력이 요구된다. 선행연구에서 발굴한 metagenome 유래의 항시발현 프로모터를 이용해 대장균의 일반적인 배양조건에서 세포생리에 영향이 적은 신규 항시발현 벡터를 제작하였다. 이를 위해 예측된 프로모터 서열과 MCS를 포함하는 합성 primer를 제작한 후 PCR로 증폭해 발현벡터를 구성한 후, 프로모터 구성여부와 단백질 발현양상 등을 관찰하였다. 인위적으로 도입된 MCS에 GFP, esterase, β -glucosidase를 클로닝해 단백질 발현양과 가용성을 분석한 결과, 안정적으로 전체단백질의 2~3% 정도로 발현되며 80% 이상의 높은 가용성을 지닌 단백질의 발현이 유도되는 것

으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 잠재적인 생물자원의 보고로서 metagenome의 활용가능성을 제시하고 있다. 따라서 다양한 숙주에서 작동하는 프로모터의 발굴 및 발현벡터의 제작을 시도할 경우 단백질의 생산이나 대사공학에 의한 균주개량에 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 전남대학교 학술연구비와 2단계 BK21 사업의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Aoki, T., T. Tahara, K. Satoh, H. Fujino, and H. Watabe. 2003. General properties of GFP-display, an electrophoretic analysis for single amino acid changes in target polypeptides. *Anal. Biochem.* **317**:107-115.
2. Baneyx, F. and M. Mujacic. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1399-1408.
3. Bhandari, P. and J. Gowrishankar. 1997. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J. Bacteriol.* **179**: 4403-4406.
4. Cardona, S. T. and M. A. Valvano. 2005. An expression vector containing a rhamnose-inducible promoter provides tightly regulated gene expression in *Burkholderia cenocepacia*. *Plasmid* **54**: 219-228.
5. Choi, G. S., J. Y. Kim, J. H. Kim, Y. W. Ryu, and G. J. Kim. 2003. Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantio selectivity to (*S*)-ketoprofen ethyl ester. *Protein. Expr. Purif.* **29**: 85-93.
6. Chou, C. P. 2007. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**: 521-532.
7. Cramer, A., E. A. Whitehorn, E. Tate, and W. P. C. Stemmer. 1996. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* **14**: 315-319.
8. Dubey, S. K., A. K. Tripathi, and S. N. Upadhyay. 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Biores. Technol.* **97**: 2217-2224.
9. Han, S. S., J. Y. Lee, W. H. Kim, H. J. Shin, and G. J. Kim. 2008. Screening of promoters from metagenomic DNA and their use for the construction of expression vectors. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1634-1640.
10. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 669-685.
11. Kim, J. H., G. S. Choi, S. B. Kim, W. H. Kim, J. Y. Lee, Y. W. Ryu, and G. J. Kim. 2004. Enhanced thermostability and tolerance of high substrate concentration of an esterase by

- directed evolution. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **27**: 169-175.
12. Kim, J. Y., J. Y. Lee, Y. S. Shin, and G. J. Kim. 2008. Mining, identification of a glucosidase family enzyme with high activity toward the plant extract indican. *J. Mol. Catal. B Enzym.* doi:10.1016/j.molcatb.2008.10.001.
 13. Lim, J. M., M. J. Hong, S. Kim, D. B. Oh, H. A. Kang, and O. Kwon. 2008. Iron chelator-inducible expression system for *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 1357-1363.
 14. Lorenz, P. and J. Eck. 2005. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 510-516.
 15. Lorenz, P. and C. Schleper. 2002. Metagenome - a challenging source of enzyme discovery. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **19**: 13-19.
 16. Mokhonova, E. I., V. V. Mokhonov, H. Akama, and T. Nakae. 2005. Forceful large-scale expression of "problematic" membrane proteins. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **327**: 650-655.
 17. Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**: 734-740.
 18. Poo, H., J. J. Song, S. P. Hong, Y. H. Choi, S. W. Yun, J. H. Kim, S. C. Lee, S. G. Lee, and M. H. Sung. 2002. Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosis factor-alpha. *Biotechnol. Lett.* **24**: 1185-1189.
 19. Rud, I., P. R. Jensen, K. Naterstad, and L. Axelsson. 2006. A synthetic promoter library for constitutive gene expression in *Lactobacillus plantarum*. *Microbiology* **152**: 1011-1019.
 20. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 21. Streit, W. R., R. Daniel, and K. E. Jaeger. 2004. Prospecting for biocatalysts and drugs in the genomes of non-cultured microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**: 285-290.
 22. Ventura, S. and A. Villaverde. 2006. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol.* **24**: 179-185.
 23. Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6235-6242.
 24. Vostiar, I., J. Tkac, and C. F. Mandenius. 2004. Off-line monitoring of bacterial stress response during recombinant protein production using an optical biosensor. *J. Biotechnol.* **111**: 191-201.

(Received Oct. 30, 2008/Accepted Dec. 1, 2008)