

빙핵활성단백질의 N-terminal 부분을 이용한 녹색형광단백질의 *Zymomonas mobilis* 세포 표면 발현

Display of green fluorescent protein (GFP) on the cell surface of *Zymomonas mobilis* using N-terminal domain of ice nucleation protein

이 은 모* 최 신 건**
Lee, Eun-Mo Choi, Shin-Geon

Abstract

Green fluorescent protein (GFPuv) was displayed on the surface of ethanol-producing bacteria *Zymomonas mobilis* using N-terminal domain of ice nucleation protein (INP) as an anchoring motif. To evaluate the ice nucleation protein as plausible anchor motif in *Z. mobilis*, GFPuv gene was subcloned into *Zymomonas* expression vector yielding pBBR1MCS-3/pPDC/INPN/GFPuv plasmid., INP-GFPuv fusion protein was expressed in *Z. mobilis* and its fluorescence was verified by confocal microscopy. The successful display of GFPuv on *Zymomonas mobilis* suggest that INP anchor motif could be used for future fusion partner in *Z. mobilis* strain improvement.

키워드 : *Zymomonas mobilis*, 빙핵활성단백질 (INP), 녹색형광단백질, 세포 표면 발현
Keywords : *Zymomonas mobilis*, ice nucleation protein (INP), green fluorescent protein, cell surface display

1. 서론

그람 음성 박테리아인 *Zymomonas mobilis*는 대표적인 에탄올 생성 균주이다. 하지만 사용 가능한 기질의 제한성이 크기 때문에 실제 산업적으로는 이용이 되지 않고 있는 것이 현실이다[1]. 따라서 이를 극복하기 위한 방법 중의 하나로 세포 표면 발현을 시도하게 되었다. 세포의 표면에 기질 제한성을 극복할 수 있는 특정 효소를 부착 발현시켜 기질의 이용성을 증대하려는 것이다. 이 논문에서는 이를 위한 선행 연구로 *Zymomonas mobilis*에서 세포표면 발현의 가능성을 조사하기 위하여 먼저, 융합단백질로서 발현효과의 관찰이

유리한 *Aequorea victoria* 형광해파리로부터 유래된 녹색형광단백질 green fluorescent protein을 사용하였다[4][7].

이전부터 외래 단백질의 박테리아 세포의 표면 발현이 수차례 시도되어져 왔다. 이러한 시스템을 이용하면 Vaccines, environmental adsorbents, biocatalysis, bioconversion의 개발에 유용하게 사용될 수 있기 때문이다[5].

따라서 다양한 표면 발현 시스템을 위해 반드시 필요한 세포 표면으로의 signaling 역할을 하는 단백질에 대한 연구가 진행되어 왔다. 그 종류에는 outer membrane proteins, lipoproteins, secretory proteins, ice nucleation proteins 등이 있다[4]. 이중 ice nucleation proteins (INP)는 *Pseudomonas syringae*와 몇몇의 다른 그람 음성 박테리아에서 생성되는 단백질이다. INP의 장점으로는 세포 표면의 형성에 영향을 주지 않기 때문에 안정적인 발현이 가능하고, 필요에 따라 단백질의 중간부위

* 강원대학교 대학원 생물공학과 석사과정

** 강원대학교 공과대학 생물공학과 교수, Ph.D.,
교신저자

에 해당하는 반복 서열의 크기를 알맞게 조절하여 사용할 수 있다는 것이다. 따라서 이 논문에서는 INP를 이용한 *Zymomonas mobilis*의 세포 표면에서의 발현을 시도하였다. 특히 INP의 N-terminal 부분만을 이용하여 *Escherichia coli*에서의 발현이 성공적으로 이루어졌다는 이전의 연구 내용을 토대로 *Zymomonas mobilis*에서의 발현을 시도하였다[2][6].

2. 재료 및 연구 방법

2.1 균주 및 배양 조건

E.coli 내에서의 플라스미드 클로닝 및 단백질 발현을 위해 XL10-gold와 DH5α 균주를 사용하였고, *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* (ZM4)와 *Pseudomonas syringae* (KCTC1832) 균주는 한국생명공학연구원의 생물자원센터(BRC)에서 구입하여 각각 사용하였다.

배양조건은 XL10-gold와 DH5α 균주는 LB배지(NaCl 0.5%, Yeast extract 0.5%, Tryptone 1%)에서 37°C 배양, ZM4 균주는 RM배지(Yeast extract 1%, MgSO₄ 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.2%, glucose 2%)에서 30°C로 하였다. 항생제의 농도는 ampicillin은 50 μg/ml⁻¹, tetracycline은 20 μg/ml⁻¹을 사용하였다.

2.2 플라스미드의 제작

E.coli 내에서의 INP N-terminal의 클로닝 및 발현을 위해 항시발현 vector인 pHCEII B를 사용하였다. 클로닝에 필요한 primer의 제작은 Bioneer(Korea) 업체에 의한 주문제작을 이용하였다. INPN의 증폭을 위해서 *Pseudomonas syringae* (KCTC1832) 균주를 이용한 colony PCR을 이용하였다. PCR을 통해 얻은 모든 DNA는 Real Biotech에서

제공하는 T&A Cloning Kit를 이용한 클로닝 과정을 우선적으로 거친 후 본 클로닝을 시도하였다.

모든 형질전환 과정은 열충격법을 이용하였고, pHCEII B가 들어간 균주는 ampicillin이 들어간 배지에서 선별하고 pBBR1MCS-3가 들어간 균주는 tetracycline이 들어간 배지에서 선별하였다.

pHCEII B/GFPuv, pHCEII B/INPN, pHCEII B/IPN/GFPuv를 각각 제작하기 위해 Table. 1의 primer를 사용하였다. pHCEII B/GFPuv와 pHCEII B/INPN의 제작을 위해서 각각 GFPuv① 5'와 GFPuv 3' primer, INPN 5'와 INPN① 3' primer를 이용하여 증폭시킨 후 Nde I, Xba I 제한효소 site를 이용하여 pHCEII B에 클로닝을 하였다. pHCEII B/INPN/GFPuv의 제작을 위해서는 먼저 INPN 5'와 stop codon이 없는 INPN② 3' primer를 이용하여 증폭하여 Nde I, EcoR I 제한효소 site를 이용하여 pHCEII B에 클로닝을 한 후, 이렇게 생성된 pHCEII B/INPN에 start codon이 없는 GFPuv② 5'와 GFPuv 3' primer를 이용하여 증폭시킨 후 EcoR I, Xba I 제한효소 site를 이용하여 최종적인 산물을 생성하였다 (Fig 1A).

이후, *Zymomonas mobilis* (ZM4) 내에서 INPN을 발현하기 위해 broad host range vector인 pBBR1MCS-3를 사용하였다[3]. Vector 내에는 발현에 필요한 promoter와 terminator가 없기 때문에 ZM4 내에서 강력하게 작용하는 것으로 잘 알려진 pyruvate decarboxylase (pdc) promoter를 이용하기 위해 Ppdc 5'와 Ppdc 3' primer를 이용하여 ZM4를 template로 이용하여 colony PCR을 하였다. 이를 Sac I, Nde I 제한효소 site를 이용하여 pBBR1MCS-3에 클로닝하여 pBBR1MCS-3/Ppdc를 생성하였다. 그리고 pHCEII 내의 terminator인 rrnBT1T2를 클로닝하기 위해 이전에 만든 pHCEII B/INPN/GFPuv에

Table. 1. Primers used in this study

Primer	Restriction site	Sequence (5' → 3')
INPN 5'	Nde I	GGAATTC <u>C</u> ATATGACTCTCGACAAGCGG
INPN① 3'	Xba I	GCTCTAGACTAGGTCTGCAAATTC <u>T</u> GCGG
INPN② 3'	EcoR I	CGGAATTCGGTCTGCAAATTC <u>T</u> GCGG
GFPuv① 5'	Nde I	CGGGAATTC <u>C</u> ATATGAGTAAAGGAGAAGAAC
GFPuv② 5'	EcoR I	CGGAATTCAGTAAAGGAGAAGA <u>A</u> CTT
GFPuv 3'	Xba I	GCTCTAGATTATTTGTAGAGCTC <u>A</u> T
Ppdc 5'	Sac I	CGAGCTCTTATCGCTCATGATCGCG
Ppdc 3'	Nde I -Xba I	GCTCTAGAGGCATATGTGCTTACTCCATATATTC
rrnBT1T2 3'	Apa I	CGGGCCCTAAACAAAAGAGTTTGTA

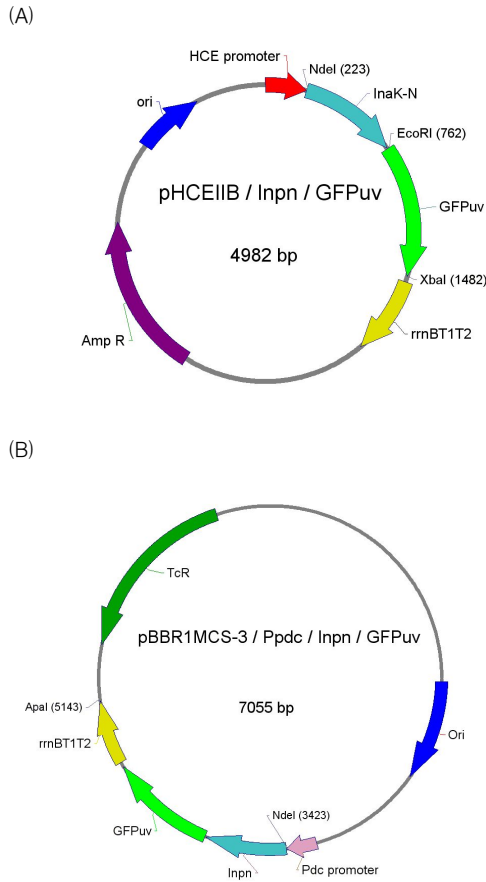


Fig.1. Schematic maps of (A) HCE IIB/INPN/GFPuv, (B) pBBR1MCS-3/Ppdc/Inpn/GFPuv

INPN 5'와 rrnBT1T2 3' primer를 이용해 PCR을 하여 얻은 증폭물을 Nde I 과 Apa I 제한효소 site를 이용하여 pBBR1MCS-3/Ppdc에 클로닝하였다 (Fig 1B).

2.3 XL10-gold에서 재조합 단백질 pHCE IIB/INPN/GFPuv의 발현

E.coli 균주인 XL10-gold에 삽입된 pHCEIIB/INPN/GFPuv를 LB배지에서 약 12시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 4,000g에서 10분간 원심분리하여 배지를 제거하였다. 이후 Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4로 두 번 세척하였다. PBS로 제현탁 후 초음파 파쇄기를 이용하여 30초씩 3번에 걸쳐 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포추출액을 SDS sample 완충용액과 섞은 후 12% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 수행하였다.

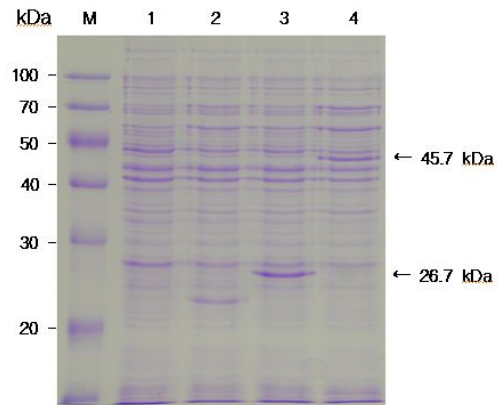


Fig.2. SDS-PAGE analyses of pHCEIIB/INPN/GFPuv expressed in *E. coli* XL10-gold. Lane 1: total cell lysate of vector control (pHCEIIB), Lane 2: total cell lysate of INPN (pHCEIIB/INPN), Lane 3: total cell lysate of GFPuv (pHCEIIB/GFPuv), Lane 4: total cell lysate of INPN-GFPuv fusion (pHCEIIB/INPN/GFPuv).

2.4 pBBR1MCS-3/Ppdc/INPN/GFPuv의 ZM4로의 형질전환

ZM4로의 형질전환은 electroporation을 사용하였다. 형질전환 효율을 높이기 위해 DH5a 균주에 들어가 있는 플라스미드를 New England Biolabs (NEB)에서 구입한 dam-/dcm- 균주로 옮겼다. dam-/dcm- 균주는 dam, dcm methylation을 하지 않는 특징을 갖기 때문에 dam, dcm mutation에 의한 형질전환 효율의 감소를 방지할 수 있다. 이렇게 옮겨진 dam-/dcm- 균주를 miniprep하여 electroporation에 필요한 DNA를 획득하였다.

ZM4는 50ml을 OD₆₀₀값이 약 0.6이 될 때까지 정지배양한 후 10% 글리세롤이 첨가된 증류수로 두 번 세척을 하여 염을 제거하였다. 최종적으로 500 μl의 10% 글리세롤이 첨가된 증류수로 현탁하였다. 이를 40μl씩 micro tube에 담아 차가운 상태로 보관해 두었다.

Electroporation을 실행하기에 앞서 Bio-Rad사의 0.2cm Gene Pulser Cuvette과 DNA, micro tube에 담긴 40μl의 ZM4를 얼음에 두어 차가운 상태로 유지하였다. 100ng에서 1.5μg의 DNA를 40μg의 ZM4에 첨가한 후 얼음에 10분간 두었다. electroporation은 Bio-Rad사의 MicroPulser 장치의 Ec2 mode (*E.coli*-0.2cm cuvette, 2.5kV)를 이용하였고, pulse를 가한 후 RM배지를 바로 넣어주어 30°C에서 약 1.5시간 동안 배양하였다. 이후, tetracycline이 들어간 RM 아가배지에 도말하고 약 5일간 배양하였다.

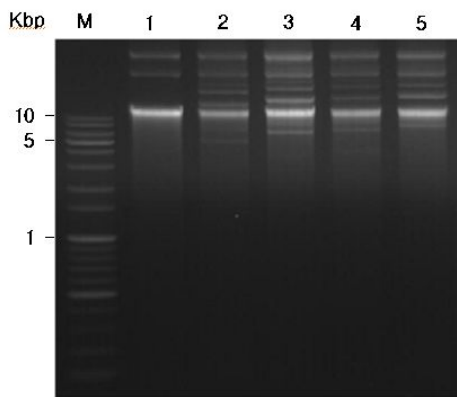


Fig.3. Agarose gel electrophoresis analysis of plasmids in recombinant *Zymomonas mobilis* (ZM4). Lane 1: negative control, Lane 2: pBBR1 MCS-3/Ppdc, Lane 3: pBBR1MCS-3/Ppdc/INPN, Lane 4: pBBR1MCS-3/Ppdc/GFPuv, Lane 5: pBBR1MCS-3/Ppdc/INPN/GFPuv.

2.5 현미경을 통한 ZM4에서의 INPN/GFPuv 발현 여부 확인

형질전환된 ZM4를 30℃, 200rpm 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 3000g에서 10분간 원심분리하여 배지를 제거하고 PBS (pH7.4)로 두 번 세척하였다.

현미경을 이용한 세포의 형광측정은 강원대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 진행하였다. 기기는 Confocal laser microscope (CLM)인 OLYMPUS사의 FLUOVIEW-FV300을 사용하였다. GFPuv의 발현을 보기 위해 Ar Laser 488nm를 이용하였고 배율은 800:1로 확인하였다.

3. 결과

3.1 INPN 유전자의 확인

PCR을 통하여 증폭시킨 INPN 유전자를 T-vector 클로닝한 것을 염기서열분석을 통해 유전자 서열의 정확도를 확인하였다. 염기서열분석은 Macrogen사에 의뢰를 하였다.

확인 결과 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에 등록되어 있는 것과 동일한 537bp크기의 sequence임을 확인할 수 있었다[2].

3.2 SDS-PAGE를 통한 *E.coli*에서의 INPN/GFPuv의 발현여부 및 크기 확인

SDS-PAGE를 이용하여 INPN/GFPuv의 발현 유무를 확인하였다 (Fig 2).

그 결과 45.7kDa에 해당하는 INPN/GFPuv의

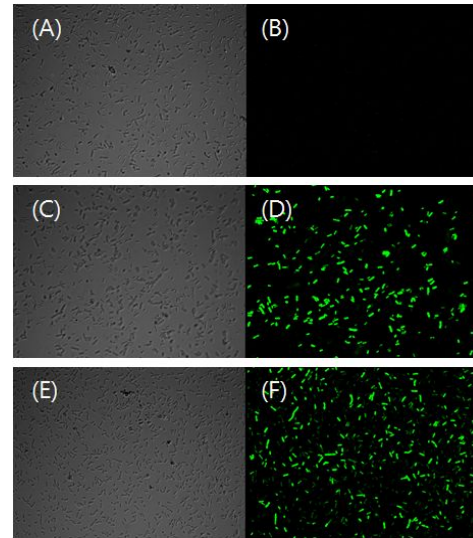


Fig.4. GFP expression in *Zymomonas mobilis* (ZM4). Panels A, B represent the phase contrast (A), GFP fluorescence (B) micrographs of the same field of ZM4 (pBBR1MCS-3/Ppdc). Panels C, D represent the phase contrast (C), GFP fluorescence (D) micrographs of the same field of ZM4 (pBBR1MCS-3/Ppdc/GFPuv). Panels E, F represent the phase contrast (E), GFP fluorescence (F) micrographs of the same field of ZM4 (pBBR1MCS-3/Ppdc/GFPuv).

단백질 band가 정확히 검출되었다. 이를 통하여 단백질의 발현이 제대로 이루어지고 있음을 확인할 수 있었다.

3.3 DNA 상에서의 ZM4 내 형질전환 유무 확인

ZM4 내로의 형질전환을 한 후 실제 플라스미드가 세포 내에서 복제가 되고 있는지 확인하기 위해 약 24시간 배양한 후 miniprep을 하였다. 실험은 Invitrogen사의 plasmid DNA purification kit를 사용하였다. miniprep후 0.8% agarose gel에 전기영동을 하여 확인하였다 (Fig 3).

그 결과 희미하지만 플라스미드가 ZM4 세포 내에서 복제되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 참고로 플라스미드는 초나선형태로 존재하기 때문에 size marker로 정확한 크기를 확인할 수는 없었다.

3.4 현미경을 통한 ZM4에서의 INPN/GFPuv 발현 여부 확인

현미경을 통해 ZM4 내에서 INPN/GFPuv이 발현되는지를 확인하였다 (Fig 4). 각각의 세포가 제

대로 발현되었는지 확인하기 위해 위상차와 GFPuv의 형광을 모두 확인한 결과, GFPuv 유전자 없이 pBBR1MCS-3/Ppdc는 형광이 나타나지 않았고 그 외의 pBBR1MCS-3/Ppdc/GFPuv와 pBBR1MCS-3/Ppdc/INPN/GFPuv는 형광이 밝게 나타났다. 따라서 pBBR1MCS-3/Ppdc/INPN/GFPuv가 정상적으로 발현되고 있음이 확인되었다.

4. 고찰

ZM4 세포 표면에서의 효소 발현은 21세기에 새롭게 각광받고 있는 바이오 에탄올 생산 연구에 촉진 역할을 할 수 있다고 여겨진다. 실제 산업 규모에서 대표적으로 사용되고 있는 에탄올 생성균주인 효모의 경우 이미 이러한 세포 표면에서의 효소 발현에 대한 연구가 많이 이루어졌고 큰 성과들이 있었다. 하지만 효모의 경우 *Zymomonas mobilis*에 비해 균주의 성장속도가 느릴 뿐만 아니라 에탄올 생성능도 떨어지는 단점을 갖고 있다. 따라서 *Zymomonas mobilis*에 대한 세포 표면에서의 효소 발현 연구가 성공적으로 이루어질 경우 *Yeast*에 못지않은 산업적 에탄올 생성균주로서 충분히 자격을 갖출 것이라 믿고 있다.

본 연구에서는 그람음성 균주에서 대표적으로 시도되고 있는 세포 표면 발현 역할의 중추인 signal 단백질인 INP의 N-terminal 부분을 사용하여 GFPuv의 성공적인 발현을 이루어냈다.

추후에 이렇게 만들어진 재조합 균주를 이용하여 단백질의 발현이 실제 세포 표면에서 이루어졌는지에 대한 확인 실험이 더 필요하다. 이러한 확인 실험을 거친 후 GFPuv가 아닌 cellulase 등의 효소를 이용한 연구를 추가적으로 진행할 예정이다.

참 고 문 헌

- [1] Jeon YJ, Svenson CJ, Joachimsthal EL, Rogers PL, "Kinetic analysis of ethanol production by an acetate-resistant strain of recombinant *Zymomonas mobilis*", *Biotechnol Lett*, Mar:24:819-824 2002.
- [2] Li L, Kang DG, Cha HJ, "Functional display of foreign protein on surface of *Escherichia coli* using N-terminal domain of ice nucleation protein", *Biotechnol Bioeng*, Jan:85(2):214-21 2004.
- [3] Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM, "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes", *Gene*, Dec:166(1):175-6, 1995.
- [4] Shi H, Wen Su W, "Display of green fluorescent protein on *Escherichia coli* cell surface", *Enzyme Microb Technol*, Jan:28(1):25-34, 2001.
- [5] Jung HC, Park JH, Park SH, Lebeault JM, Pan JG, "Expression of carboxymethyl cellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein", *Enzyme Microb Technol*, Apr:22(5):348-54, 1998.
- [6] Kang DG, Li L, Ha JH, Choi SS, Cha HJ, "Efficient cell surface display of organophosphorous hydrolase using N-terminal domain of ice nucleation protein in *Escherichia coli*", *Korean J. Chem. Eng*, Feb:25(4):804-807, 2008.
- [7] Xu Y, Liu Q, Zhou L, Yang Z, Zhang Y, "Surface display of GFP by *Pseudomonas syringae* truncated ice nucleation protein in attenuated *Vibrio anguillarum* strain", *Mar Biotechnol (NY)*, Nov-Dec:10(6):701-8, 2008.
- [8] Jung HC, Lebeault JM, Pan JG, "Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*", *Nat Biotechnol*, Jun:16(6):576-80, 1998.
- [9] Lee JS, Shin KS, Pan JG, Kim CJ, "Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine", *Nat Biotechnol*, Jun:18(6):645-8, 2000.
- [10] Kim JH, Roh CH, Lee CW, Kyung DH, Choi SK, Jung HC, Pan JG, Kim BG, "Bacterial surface display of GFPuv on *Bacillus subtilis* spores", *J. Microbiol. Biotechnol*, Oct:17(4):677-680, 2007.