

국내 토착 메타게놈 유전자은행으로부터 새로운 항균 유전자군의 선발 및 분리

농촌진흥청: 윤상홍, 여윤수, 이인범, 이창묵, 구본성, 김수진  
건국대학교 : 김동관, 안중훈, 이영한, 정유훈, 임용호

Screening and Isolation of *Anti-bacterial* Genes from Metagenomic Libraries  
of Various Korean Soils

National Academy of Agricultural Sciences, Rural Development Administration  
Sang-Hong Yoon, Yun-Su Yeo, In-Beom Lee, Chang-Muk Lee,  
Soo-Jin Kim, Bon-Sung Koo  
Department of Bioscience & Biotechnology, Konkuk University  
Dong-Gwan Kim, Joong-Hoon Ahn, Young-Hwan Lee, You-Hoon Chung, Yoong-Ho  
Lim,

**실험목적 (Objectives)**

국내의 다양한 생태환경의 토양DNA로부터 제작된 메타게놈 유전자은행으로부터 항균 유전자를 선발 분리하여 이 유전자의 구조 특성을 분석하고 새로운 분자유종 소재로 다양한 산업분야에서 응용할 수 있는 원천 유전자 특허를 확보하고자 한다.

**재료 및 방법 (Materials and Methods)**

○ 실험재료

- 탐색자원 : 메타게놈 유전자은행 2만 클론으로부터의 물질은행

○ 실험방법

1. 물질은행 제작과 기능 선발 전략

메타게놈 은행은 토양 내 인공배양이 어려운 미생물의 유전자 단편을 인공배양이 가능한 대장균에 삽입하여 새로운 기능물질이나 신규 유전자를 탐색하고자 개발된 기술이다. 그러나 기주 미생물의 한계에 의해 설혹 이차대사산물 생합성 유전자 군을 포함하는 클론이라 하더라도 대장균에서 발현될 가능성은 매우 낮을 수 있다. 이러한 이유로 우리는 각 개의 클론의 단독 배양하여 기능검색을 할 경우 시간이나 경비 측면에서 매우 비효율적이므로 한정된 연구기간 내에 막대한 수의 클론을 검색하기가 사실상 불가능하다. 이에 본 연구팀은 보유한 20만 클론의 메타게놈 클론 중 우선 2만 클론을 채취 원별로 개별 클론을 28℃에서 3일간 진탕 배양하여 원심분리한 배양액을 각 5ml씩 384클론 배양액을 모두 모아서 ethylacetate로 추출하여 384배 농축한 것을 1그룹으로 묶고 동시에 2ml의 98클론 배양액을 모두 모아서 ethylacetate로 추출하여 98배 농축한 것을 그것의 8개 sub그룹으로 나누어 제작하고 또한 각각의 클론 배양액은 일회용 0.45µm 제균 필터로 균을 제거하여 각 배양여액을 -20℃ 냉동고에 보관하여 항균 클론의 선발 자원으로 사용하였다. 따라서

주저자 연락처 (Corresponding author) : 윤상홍 E-mail : shyo556@rda.go.kr Tel : 031-299-1691

우리는 384클론을 하나의 그룹으로 하여 항균 검정을 하여 1차로 선발되면 이 그룹의 8개 sub 그룹을 검정하여 2차 선발하고 최종적으로 각 개별 클론을 검정하는 전략을 사용하였다.

## 2. 항균 기능 선발

항균 클론을 대량 고속으로 검색하고자 본 연구팀은 tyrosine을 이용하여 갈색색소를 생산하는 HPPD(4-hydroxy phenyl pyruvate dioxygenase)유전자를 pUC118에 클로닝한 대장균 균주를 검색 시스템으로 활용하였다. 이 경우 LB + tyrosine 배지에 사전 배양된 이 균주와 그룹별 물질 균을 동시 접종하고 하룻밤 37°C 진탕배양한 뒤 갈색 발현이 대조구와 비교하여 낮은 처리 균을 선발하고 이를 원심분리하여 균체의 양을 측정하여 1차 선발한다. 이는 유효 처리균의 그룹이 대장균의 성장을 저해함으로써 갈색발현 정도를 낮추기 때문이다. 또한 이 선발 시스템의 HPPD는 tyrosine을 갈색의 멜라닌으로 만드는데 중요한 효소로 이 효소의 저해제는 식물의 제초제로 개발될 수 있다는 보고가 있으며 이러한 기전에 근거해 제초제 후보 물질의 검색이 가능할 것으로 기대한다. 이 시스템은 비교적 간편하고 저렴하며 동시에 많은 시료를 정량적으로 분석할 수 있는 장점을 가진다.

## 실험결과 (Results)

항균 클론의 선발 및 분리: 약 8,000클론에 대한 23그룹의 물질은행을 HPPD시스템으로 1차선발한 결과 YSTC 204, 209, 210, 211 Group이 선발되었고 이것의 subgroup 검정 및 개별 클론의 항균검정 결과 YSTC211 그룹의 CD-subgroup에서 C12와 D21 클론의 배양액 ethylacetate 추출액에서 *Bacillus subtilis*와 *Listera monocytogenes*에 대해 항균활성이 있음을 확인하였다. 이들 클론 내 삽입유전자 단편의 크기는 약 40kb 정도이고 C12클론 추출액의 경우 항 세균 외에 작물 역병 균인 *Phytophthora capsici*의 균사 성장도 어느 정도 저해하는 것으로 나타났으며 현재 전체 염기서열 분석에서 약 50개의 gap을 확인하는 작업 중에 있다.

\* 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린사업의 지원에 의해 수행되었음(과제번호;20070301034029)