

*Candida maltosa*에서 분리된 *n*-Alkane 유도성 유전자(*ALII*, *POX18Cm*)의 *n*-Alkane 대사에 있어서의 기능

黃哲源* · 梁昌述¹ · 高木正道²

農業遺傳工學研究所 分子遺傳科, ¹建國大學校 農科大學 農化學科

²東京大學農學部 農芸化學科, 日本

The Function of Two *n*-Alkane Inducible Genes (*ALII*, *POX18Cm*) for *n*-Alkane Assimilating *Candida maltosa*

Hwang, Cher-Won*, Chang-Sool Yang¹ and Masamichi Takagi²

Molecular Genetics Division, Agricultural Biotechnology Institute, Suwon 441-707

¹Department of Agricultural Chemistry Kon-Kuk University, Seoul 133-701

²Department of Agricultural Chemistry ToKyo University, 113, ToKyo, Japan

Abstract — The functions of *n*-alkane inducible genes, *ALII* and *POX18Cm* isolated from *Canida maltosa* were investigated, using it's disruptants. As a result, it is suggested that *ALII* is essential for *n*-alkane assimilation in *C. maltosa* and it regulates genes related to assimilation of *n*-alkane (*ALII*, *P450alk*, *POX18Cm*) at transcriptional level. Nuclear localization experiments indicated that *ALII* was located and functioned in the nucleus. *POX18Cm* is considered as a peroxisomal nonspecific lipid transfer protein gene related to *n*-alkane assimilation in *C. maltosa* and also regulated by *ALII*. But it had no significant effect on *n*-alkane assimilation in *C. maltosa*.

*Candida maltosa*는 무포자 효모로서 *n*-alkane(석유)을 자화할 수 있으며(1, 2) glucose에서 배양된 균체를 *n*-alkane 배지에다 옮기면 *n*-alkane 대사의 초기 산화에 관여하는 효소 cytochrome P-450을 포함한 여러가지 특이한 단백질이 유도된다(3, 4). 따라서 이 효모는 석유 물질에 의한 환경 오염 문제의 생물학적 해결 및 단세포 단백질(S.C.P.)로서 이용가치가 높으며 또한 학문적으로 진핵세포에 있어서 소수성 물질에 의한 유전자 발현 조절의 기구를 해명하는데도 좋은 model이 된다. 이들 유도 단백질들이 전사 수준에서 유도됨이 이미 보고되었으며(5) 최근 이러한 단백질의 유도 현상을 분자 생물학적으로 연구하기 위한 *C. maltosa*용 host-vector system도 구축되었다(6-10). 또한 유도되는 단백질, cytochrome P-450의 유전자 *P450alk*를 cloning(11)하였으며 최근에는 본 논문의 전보인 *n*-alkane 유도성 유전자들(*ALII*과 *POX18Cm*)

을 cloning하여 이들의 핵산 염기배열과 단백질 산물(32.1 KDa, 17 KDa)을 분리 동정하여 보고하였다(12). 본 연구에서는 *n*-alkane 유도성 유전자를 상실한 파괴 균주를 이용하여 대사물질을 gas-chromatography로 원 균주의 대사물질과 비교해 보고, cytochrome P-450의 함량 측정 및 Northern blot을 행하여 전편에서 보고한 *ALII*과 *POX18Cm* 유전자의 기능을 조사하였다.

재료 및 방법

실험균주 및 plasmid

C. maltosa CHAI(*Ade His*⁻), *C. maltosa* CHI(*His*⁻)는 *C. maltosa* IAM12447(동경대학 응용미생물연구소)의 영양요구성 변이균주들이며 이들의 배양을 위해 효모의 합성배지(MS 배지)를 사용하였다. 합성배지의 조성은 MgSO₄ 2.5 g, KH₂PO₄ 21 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.6 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, NaCl 0.1 g, biotin 20 g, Fe₂SO₄ 5 mg, ZnCl₂ 0.5 mg, CoCl₂ 1 mg, CaCl₂

Key Words: *n*-Alkane assimilation, induction, *Candida maltosa*, gene regulation

*Corresponding author

0.5 mg, MoO_4Na_2 0.5 mg, CaSO_4 1 mg/1 H_2O 이며 pH는 5.6으로 조절하였다(5). 또한 변이균들의 배양 배지에는 histidine과 adenine을 필요에 따라 각각 24 mg/ml 첨가하였으며(6), 탄소원으로는 glucose, *n*-tetradecane, *n*-tetradecanol, oleic acid를 각각 1%가 되도록 첨가하였다. Plasmid는 pUC119와 pBTH10B(12) 그리고 pBTH10B-TIG1(12)을 사용하였으며 이러한 plasmid 증식용 *E. coli*로서 *E. coli* JA221(*leuB6*, *recA1*, *lacA1*, *trpE5*, *hsdR*, *thi*, *tri*)를 사용하였으며 대장균 배지는 L-broth를 사용하여 필요에 따라 ampicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tetracycline 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하였다.

시약

본 실험에서 사용된 효소류는 일본 Takara Shuzo Co. 제품을 사용하였으며 그외의 시약은 Sigma사 제품을 사용하였다.

균체량 측정법

석유 물질을 무기질로 사용할 경우 기질의 탁도에 의해 균체의 정량이 불가능하며 따라서 본 실험에서는 中源이 개발한 방법(13)을 사용했다. 먼저 1% glucose + 합성배지에서 균이 완전히 성장하도록 전 배양 후, 다시 1% glucose + 합성배지에 2%의 균체를 접종하여 하루밤 본 배양을 하였다. 본 배양한 배양액을 멸균수로 세정 후 각각의 탄소원의 배지에 2%가 되도록 접종하여 배양하였다. 배양 개시 후 적당한 시간마다 1 ml의 배양액을 취해 용매(에타놀 : 부타놀 : 크로로포름 = 10 : 10 : 1) 2 ml를 가해 가볍게 혼합한 후 660 nm에서 균체량을 측정했다.

효모 염색체 시료의 조제법

P.F.G.E(Pulse Field Gel Electrophoresis)용 효모 염색체 시료의 조제를 위해 McCormick 등의 방법(14)을 사용했다. 단 효모의 protoplast화에는 일본 생화학공업의 zymolyase 100T를 사용했다

P.F.G.E의 조건

P.F.G.E. 장치는 Schwartz 및 Cantor가(15) 고안한 O.F.A.G.E.(Orthogonal field alteration gel electrophoresis)의 개량형인 P.F.G.E형 전기영동 장치(일본 아토-주식회사)를 사용하였다. 전기영동용 gel은 1% agarose를 용해해서 50 ml을 10 cm² gel 판에 만들어 사용했으며, 전기영동조건은 pulse 시간 100초, 150 mA 12°C 에서 12시간 전기영동 후 다시 pulse 시간을

300초, 150 mA, 12°C 에서 24시간 전기영동했다.

Cytochrome p-450의 측정

균체를 0.1 M의 인산 buffer(pH7.5)에 현탁한 후 동액을 2분하여 각각 dithionite를 0.1 mg 넣어 cytochrome p-450을 환원시킨 후 한편만 일산화탄소를 첨가하여 일산화 탄소가 첨가되지 않은 액을 비교치로 사용하여 500~400 nm에서 환원시킨 cytochrome P-450양을 측정하였다.

SDS-polyacrylamide 전기영동

단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli(16)의 방법에 따라 주로 15%의 acrylamide gel을 사용했다. 분자량 marker는 Bio-Rad사의 저분자량 marker를 사용했다.

Gas-chromatography(G.C.) 측정

G.C. 측정은 G.C.-9A(Shimazu Co.)을 사용했으며, 측정조건은 Column : Silicon SE-60 130 mesh, chromosorb(AW DMCS) 3%, Glucose-column : 7GE 3.2(2.1 m), injection 온도 : 270°C, column oven 온도 : 100°C -250°C/min, gas flow rate : N₂ gas 20.0 ml/min로 하였으며, 시료 용매는 diethylether를 사용하였다.

Southern hybridization

Agarose gel상의 DNA 단편은 Maniatis 등(17)의 방법을 이용하여 membrane에 옮긴 후 68°C 에서 hybridization을 행했다.

Northern hybridization

RNA 분석을 위한 RNA는 total RNA를 사용했으며 total RNA는 Robert 등(18)의 Phenol법을 사용해 추출했다. Hybridization은 Maniatis 등(17)의 방법에 따라 행했다.

효모의 핵단백질 분리

*Candida maltosa*의 핵 단백질 분리는 Pringle(19)의 핵 단리 방법에 의해 분리하였으며 세포의 파쇄는 가능한 완전한 핵의 단리를 위해 Zymolase 100T를 사용한 protoplast화에 의해 행해졌다.

결 과

분리된 유전자의 염색체상의 mapping

전보(12)에서 분리된 유전자 *ALI1*과 *POX18Cm*는

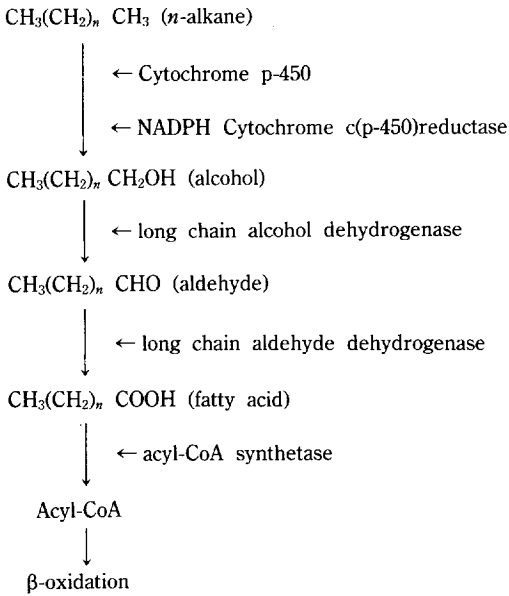


Fig. 1. Metabolic pathway of *n*-alkane in *Candida* sp.

267aa와 127aa을 code하는 유전자로 보고했다. 먼저 효모 *Candida maltosa*의 염색체상에 있어서 이 두 유전자의 위치를 알기 위해 이들 유전자의 mapping을 행했다. *C. maltosa*의 염색체수는 Hiroshi(20) 등에 의해 1 Mb로부터 3 Mb 범위에서 8개의 염색체수가 확인되어 있다. 본 연구에서는 분리된 두 유전자 *ALII* 과 *POX18Cm*의 염색체상의 위치를 결정하기 위해 P.E.G.E. 영동법으로 효모 염색체를 분리하여 두 유전자를 probe로 하여 Southern hybridization을 행했다. 그 결과 Fig. 2에서 보듯이 *ALII*과 *POX18Cm*은 둘다 염색체 3과 4에 두 copy가 존재하므로 두 유전자는 서로 연관된 상태로 *n*-alkane 대사에 관여하는 것으로 추정된다. 이것은 전보(12)에서 행한 유전자 파괴법에서 확인된 사실과 일치하는 결과였다.

대사물질의 측정에 의한 *AL11* 기능조사

AL11 유전자의 기능을 알아보기 위해 전보에서 보고한 *AL11* 유전자 기능이 상실된 균주를 사용해 *n*-alkane 대사에 관여하는 *AL11*의 대사물을 G.C.를 이용하여 측정했다. 먼저 glucose에서 배양한 파괴 균체를 *n*-tetradecane 배지에 접종하여 *n*-alkane 대사능을 유도시킨 후 균체의 *n*-alkane 대사산물을 측정 한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 측정한 대조균으로서 사용된 vector(pBH10B)를 도입시킨 균주에서는 *n*-tetradecane이 대사되어 소실하였지만 파괴 균체에서는

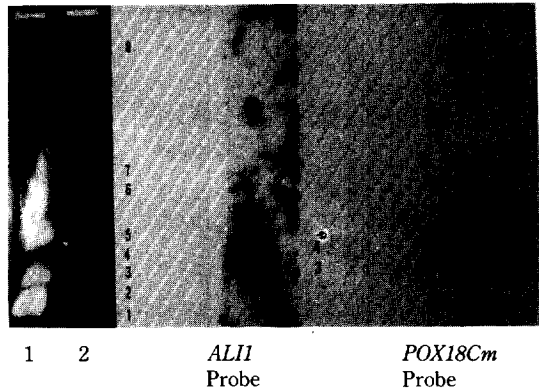


Fig. 2. Chromosomal mapping of *ALII* and *POX18Cm*

Lane 1: Chromosomal DNA molecules of *S. cerevisiae*, Lane 2: Chromosomal DNA molecules of *C. maltosa*. *The numbers indicated the separated chromosomal DNAs of *C. maltosa*.

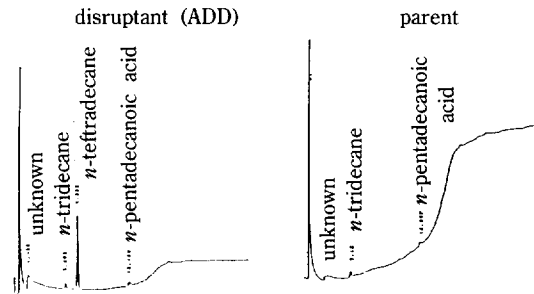


Fig. 3. Gas chromatograms of *n*-tetradecane metabolic products in *AL11* gene disruptant.

n-tetradecane이 대사되지 않은채 그대로 남아 있어 *n*-alkane 대사능이 상실되었음을 알 수 있었다.

Cytochrome P-450의 함량 측정에 의한 *AL11* 기능조사

AL11 유전자기능이 상실된 균주에서 *n*-alkane 초기산화에 관여하는 cytochrome p-450 함량을 조사함으로써 *AL11*의 기능을 조사했다. Fig. 4에서 보듯 *n*-tetradecane 배지에서 배양한 vector(pBTH10B)를 도입한 균주와 *AL11* 유전자기능이 상실된 균주의 P-450 함량을 비교한 결과 *AL11* 유전자기능이 상실된 균주에서는 P-450이 전혀 나타나지 않았음을 알수있었다. 이러한 결과로부터 *AL11* 유전자가 파괴되면 *n*-alkane이 대사되지 않고 또한 그 대사 초기에 필요한 P-450의 기능도 없어짐을 추측할 수 있었다.

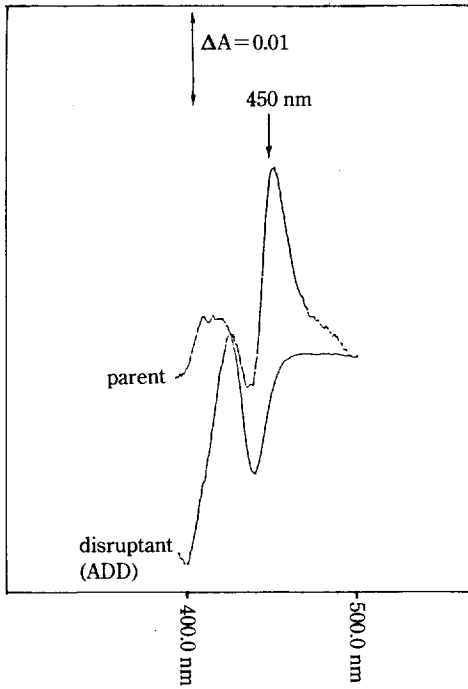


Fig. 4. Contents in cyt p-450 of *ALII* gene disruptant.

Northern 해석에 의한 *ALII*의 기능조사

G.C.의 분석과 cytochrome P-450 함량 측정에서 얻어진 결과로부터 *ALII* 유전자가 *n*-alkane 대사에 중요한 역할을 하며 이것이 없으면 세포내 *n*-alkane이 대사되지 않음을 알 수 있었다. *ALII*의 기능이 Cytochrome P-450을 비롯한 *n*-alkane 대사에 관여하는 효소 및 유전자에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 *n*-alkane 대사에 관여하는 일련의 유전자 (*ALII*, *P450alk*, *POX18Cm*) 등의 발현을 Northern blot으로 확인해 보았다. 이미 보고된(5, 12) 바와 같이 이러한 일련의 유전자는 mRNA의 수준에서 유도되는 것으로 확인되었다. Fig. 5에 나타난 결과를 보면 *ALII*은 물론 *POX18Cm*, *P450alk* 유전자중 어느것을 probe로 사용하여도 *ALII*이 파괴된 균주에서는 유전자의 전사 산물이 나타나지 않아 이러한 유전자가 유도 발현되지 않음을 알 수 있었다.

ALII 유전자 산물의 핵내에서의 국소화

지금까지의 결과에 의해 *ALII* 유전자는 *n*-alkane 대사에 관여하는 유전자군의 발현을 조절하며 그것은 전사 level에서 기능을 가진것으로 추측할 수 있다. 유전자 발현을 조절하는 유전자 산물은 일반적으로

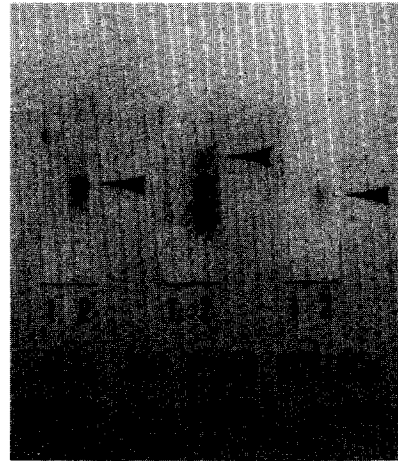


Fig. 5. Northern analysis of *ALII* gene disruptant. Lane 1: RNA(4 g) of *ALII* disruptant, Lane 2: RNA(4 g) of *CHA1* (parent)

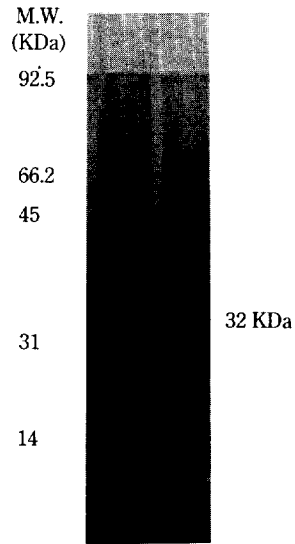


Fig. 6. Regulated products of *ALII* using *GALI* promoter in nucleus.

Lane 1 : Induced nuclear proteins from *S. cerevisiae*, Lane 2: Induced nuclear proteins from *S. cerevisiae* containig *ALII*.

핵내에 존재하여 기능을 한다고 알려져 있다. 만약에 *ALII*이 이러한 기능을 가진다면 이들의 유전자 산물은 핵에 존재함을 예측할 수 있다. 이러한 사실을 입증하기 위해 *ALII* 유전자를 효모의 *GALI* promoter에 연결하여 구축한 plasmid를 효모 *S. cerevisiae*에 도입하여 galactose에 의해 유도시킨 균체의 핵을 분

리하여 SDS-PAGE한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그림에서 보듯이 galactose에서 유도한 효모의 핵에서는 vector만을 도입한 효모의 핵에 나타나지 않은 약 32 KDa의 단백질이 *ALII* 유전자를 포함한 효모의 핵에서 유도되었음을 알 수 있었다. 이 결과 *ALII*은 효모의 핵내에 존재하며 *n*-alkane 대사에 관여하는 유전자 군의 발현을 조절하는 중요한 역할을 담당함을 추정할 수 있었다.

고 찰

본 논문에서는 *n*-alkane에 의해 유도되는 유전자 *ALII*과 *POX18Cm*의 기능을 몇가지 실험을 통해 살펴 보았다. *C. maltosa*에서 *n*-alkane 대사에는 Fig. 1에서 표시한 바와 같이 다양한 효소들이 관여한다(21). 본 논문에서 연구한 *ALII*은 *n*-alkane 대사에 필수적인 유전자이며 또한 *n*-alkane 대사에 관여하는 효소 유전자들의 발현을 전사 수준에서 조절하는 조절인자로서 기능함을 추정할 수 있다. 이와 관련하여 주목할 만한 것은 *ALII*은 amino acid 배열상 핵에 국소화할 수 있는 signal(Lys-Lys- Arg)을(22) C 말단(nt 2153-2161)에 갖고 있는 점으로 보아 *ALII*의 핵내 조절인자(regulation factor)로서의 기능을 가졌음을 뒷받침하며 또한 Fig. 5에서 보듯이 핵내에 *ALII* 유전자 산물이 존재함을 확인함으로써 C 말단 Lys-Lys-Arg이 signal로서 인식되고 있음을 간접적으로 시사한다.

최근 Tan 등(23)에 의하면 *POX18Cm*은 peroxisome상의 non-specific lipid transfer protein과 높은 상동성을 갖고 있는 것으로 보아서 이와 유사한 기능을 가진 유전자로 생각되며 또한 peroxisome에 있어서 지방산의 β -oxidation의 반응시 Acyl-CoA 산화효소의 활성화에 관여하는 것으로도 알려져 있으나 세포내 생리적 기능은 아직 불명확하다. 그러나 본 논문에는 제시하지 않았지만 *POX18Cm*의 유전자량의 효과를 검토해본 결과 *n*-alkane 대사시 *C. maltosa*의 생육에는 효과가 없으며, 유전자 파괴에 의한 영향도 없는 것으로 판단되어 유전자의 양에는 그다지 의존하지 않으며 또한 지방산의 β -oxidation 대사에도 중요한 열쇠 단백질로서는 작용하지 않는 것 같다. 그러나 *ALII*은 *C. maltosa*에 있어서 *n*-alkane 대사에 필수적이며 또한 대사에 관여하는 유전자군을 조절하는 인자로 생각된다.

요 약

석유 (*n*-alkane)자화 효모 *C. maltosa*에서 분리된 유전자 *ALII*과 *POX18Cm*의 *n*-alkane 대사에 있어서의 기능을 이들 유전자들이 상실된 균주를 이용하여 해석한 결과, *ALII*은 *n*-alkane 대사에 필수 유전자이며, *n*-alkane 대사에 관련되는 유전자군들을 전사 수준에서 조절하는 유전자인 것으로 추정되었다. 또한 핵 분리에 의한 *ALII* 단백질의 국소화 실험은 위의 사실을 뒷받침하는 것으로 *ALII* 유전자 산물이 핵내에 존재하여 전사조절인자로서의 기능을 갖고 있는 것으로 생각된다. *POX18Cm*은 *C. maltosa*의 *n*-alkane 대사시 관련되는 유전자로서 *ALII*에 의해 조절되는 것으로 추정되나, *POX18Cm* 산물의 존재양은 *C. maltosa*의 *n*-alkane 대사에 영향을 미치지 않는 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Komagata, K., T. Nakase, and N. Katsusa. 1964a. Assimilation of hydrocarbons by yeast. I. Preliminary screening. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**: 313-321.
2. Komagata, K., T. Nakase, and N. Katsusa. 1964b. Assimilation of hydrocarbons by yeast. II. Determination of hydrocarbons-assimilating yeast. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**: 323-333.
3. Gallo, M., J.C. Bertrand, B. Roche, and E. Azoular. 1973. Alkane oxidation in *Candida tropicalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **196**: 624-638.
4. Lebeault, J.M., E.F. Lode, and M.J. Coon. 1971. Fatty acid and hydrocarbon hydroxylation: Role of cytochrom P450 in *Candida tropicalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **4**: 413-419.
5. Sunairi, M., K. Watabe, M. Takagi, and K. Yano. 1984. Increase of translatable mRNA for major microsomal proteins in *n*-alkane-grown *Candida maltosa*. *J. Bacteriol.* **167**: 551-555.
6. Kawamura, M., M. Takagi, and K. Yano. 1983. Cloning of a *LEU* gene and an *ARS* site of *Candida maltosa*. *Gene* **24**: 157-162.
7. Takagi, M., S. Kawai, M.C. Chang, L. Shibuya, and K. Yano. 1986. Construction of host-vector system in *Candida maltosa* by using an *ARS* site isolated from its genome. *J. Bacteriol.* **167**: 551-555.
8. Kawai, S., C.W. Hwang, M. Sugimoto, M. Takagi, and K. Yano. 1987. Sub-cloning and nucleotide sequencing of an *ARS* site of *Candida maltosa* which also function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1587-1591.
9. Hikiji, T., M. Ohkuma, M. Takagi, and K. Yano.

1989. An improved host-vector system for *Candida maltosa* using a gene isolated from its genome that complements the *his5* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **16**: 261-266.
10. Kawai, S., T. Hikiji, S. Murao, T. Takagi, and K. Yano. 1991. Isolation and sequencing of a gene, *C-ADE1*, and its use for a host-vector system in *Candida maltosa* with two genetic markers. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 59-65.
 11. Takagi, M., M. Ohkuma, N. Kobayashi, M. Watanabe, and K. Yano. 1989. Purification of cytochrome P-450 *alk* from n-alkane-grown cells of *Candida maltosa* and cloning and nucleotide sequencing of encoding gene. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2217-2226.
 12. Hwang, C. W., K. Yano, and M. Takagi. 1991. Sequences of two tandem genes regulated by carbon sources, one being essential for n-alkane assimilation in *Candida maltosa*. *Gene.* **106**: 61-69.
 13. 中原忠 篤. 1968 石油と微生物 No. 1, P. 32.
 14. McCormick, M., K.J.H. Shero, C.J. Connelly, S.E. Antonarakis, and D. Hieter. 1990. Methods for cloning large DNA segments as artificial chromosomes in *S. cerevisiae*. *Technique-A.J. of methods in cell and Mol. Biol.* **2**: 65-71.
 15. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**: 67-75.
 16. Leammli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 17. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 18. John, M.W. 1984. *Method in molecular biology: Nucleic acid II*: 101.
 19. Pringle, J.R. 1975. *Methods in Cell Biology Vol. 12*, ed. Prescott, D. M. (Academic Press, New York), PP. 149-184.
 20. Hiroshi, T., T. Masamichi, and K. Yano. 1987. Separation of chromosomal DNA molecules of *Candida maltosa* on agarose gels using the OFAGE technique. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 3161-3163.
 21. Hwang, C.W. 1991. Isolation and analysis of n-alkane inducible genes in *Candida maltosa*. PhD. thesis, University of Tokyo, Japan.
 22. Estruch, F. and M. Carlson. 1990. SNF6 encodes a nuclear protein that is required for expression of many genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2544-2553.
 23. Tan, H., K. Okazaki, I. Kubota, T. Amiry, and H. Utiyama. 1990. A Novel peroxisomal nonspecific lipid-transfer protein from *Candida tropicalis*: gene structure, purification and possible role in β -oxidation. *Eur. J. Biochem.* **190**: 107-112.

(Received February 15, 1993)