

특정부위돌연변이화에 의해 변형된 *nar* 프로모터를 발현 프로모터로 사용하기 위한 특성연구

이 종 원

대구효성가톨릭대학교 의과대학 생화학교실

Characterization of the *Nar* Promoter Modified by Site-directed Mutagenesis to Use as an Expression Promoter

JongWon Lee

Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Catholic University of Taegu-Hyosung, Taegu 705-034, Korea

ABSTRACT

The *nar* promoter of *Escherichia coli*, which is maximally induced under anaerobic conditions in the presence of nitrate, was characterized to see whether the *nar* promoter cloned onto pBR322 can be used as an expression promoter. The modified *nar* promoter, in which several bases in the -10 region was mutated to the consensus sequence by site-directed mutagenesis, was characterized in *E. coli*, on which chromosome the *fnr* gene affecting expression of the *nar* promoter according to dissolved oxygen level was mutated. The *E. coli lacZ* gene was used as a reporter gene. The following effects were investigated to find optimal conditions to induce the modified *nar* promoter: induction methods, optimal nitrate concentrations, the amount of β -galactosidase expressed at the different growth conditions, and induction characteristics. The following results were obtained from the experiments: expression of β -galactosidase from the modified *nar* promoter was not affected much by nitrate concentrations. The maximal specific β -galactosidase activity was obtained when *E. coli* was grown under aerobic conditions, and then the modified *nar* promoter was induced at $OD_{600}=2.2$ under microaerobic conditions ($DO=1\sim 2\%$), under which conditions the maximal specific β -galactosidase activity was 13,000 Miller units. However, the specific β -galactosidase activity was approximately 6,000 Miller units even before the modified *nar* promoter was induced. Therefore, the modified *nar* promoter seemed to be useful when the cloned gene wants to be expressed in *E. coli* constitutively.

서 론

현재 의약품으로 쓰이는 여러 가지 단백질들이 재조합 DNA 기술에 의해 대장균으로부터 대량으로 생산되고 있다. 이 때 이 단백질들을 생산하기 위해 다양한 발현운반체(expression vector)들이 이용되

며, 그 중에서도 원하는 시점에서만 발현이 되게 하는 *tac*, *lac*, *trpA*, 그리고 λP_L 등의 유도성 프로모터들이 많이 이용된다(1-4). 최근에는 호기성 박테리아인 *Vitreoscilla*로부터 산소 의존형 프로모터가 발견되어 유도성 프로모터로 개발되었다(5-6).

본 연구실에서는 또 다른 산소 의존형 프로모터로

(*VHb*질산염의 존재하에서 혐기조건이 되면 최대로 발현되는 *nar* 프로모터에 대한 연구를 수행해 오고 있다. 대장균은 혐기와 호기조건하에서 각각 호흡과정(respiratory process)과 발효과정(fermentative process)에 의해 자랄 수 있는 통성(facultative) 박테리아이다. 하지만 대장균이 산소가 없는 조건하에서 자라게 되면 호기조건하에서는 발현되지 않는 여러 유전자들이 발현된다(7). 이 중에는 질산염 환원효소(nitrate reductase)를 발현하는 *nar* 오페론이 있다. 질산염 환원효소는 산소가 없을 때 산소 대신에 질산염(NO_3^-)을 전자수용체(electron acceptor)로 이용하여 질산염을 아질산염(nitrite) (NO_2^-)으로 바꾸면서 그 대사를 발효과정에서 호흡과정으로 바꿔게 한다(8). 이 *nar* 오페론은 호기조건하에서는 산소가 전자수용체로 쓰이므로 발현되지 않다가 혐기 조건하에서 질산염이 존재하면 이 질산염을 전자수용체로 쓰기 위해 최대로 발현된다. 배양 조건이 호기상태에서 혐기상태로 바뀌면 조절단백질(regulatory protein)인 FNR이 *nar* 오페론의 프로모터(*nar* 프로모터)에 붙어 발현이 일부분되고, 질산염까지 배지에 존재하면 또 다른 조절단백질인 NARL이 *nar* 프로모터에 붙어 이 *nar* 프로모터가 최대로 유도된다(9). 이러한 2개의 조절단백질들이 *nar* 프로모터에 있는 자신의 결합부위에 각각 붙게 되면 *nar* 오페론의 전사의 개시가 증가되고, 따라서 구조유전자들인 *narG*, *narH*, *narI*의 발현이 촉진된다(10-11). 이 *nar* 프로모터가 유도되는 특성을 조사하기 위해 이 *nar* 프로모터가 플라스미드에 클로닝되었으며, 또한 이 *nar* 프로모터에 대한 연구를 쉽게 하기 위해 구조유전자들 대신에 *nar* 프로모터의 하류에 대장균으로부터 온 *lacZ* 유전자가 클로닝되었다(9). 본 연구실에서는 클로닝된 *nar* 프로모터(pXR8971)가 정상적인 *nar* 오페론을 염색체상에 가지고 있는 대장균(Mv1190)내에서 발현되는 특성을 조사한 바 있다(12).

한편, 이 pXR8971/Mv1190 계에서와 같이 대장균내 염색체상의 *nar* 오페론이 정상적이면 이 염색체로부터 발현된 질산염 환원효소가 질산염을 아질산염으로 변환시키면서 발생시키는 산소에 의해 클로닝된 *nar* 프로모터의 유도는 억제되므로(DeMoss, personal communications), 이 영향을 없애기 위해 염색체상에 비정상적인 *nar* 오페론을 가지는 대장균에 들어 있는 계(pMW61/RK5265)에 대한 특성연구도 수행되었다(13). 이 비정상적인 *nar* 오페론은 질산염 환원효소를 이루는 한 subunit가 돌연변이되

어 만들어진 것이다(14).

또한, *fnr* 유전자와 *narL* 유전자로부터 각각 발현되는 조절단백질(regulatory protein)들인 FNR과 NARL이 *nar* 프로모터의 유도를 촉진하는 기전을 알아보기 위해 이 프로모터 내의 -10과 -35 지역의 염기서열이 특정부위돌연변이화(site-directed mutagenesis)에 의해 바뀌어진 다음 *fnr*과 *narL* 유전자에 각각 돌연변이가 일어난 대장균에서의 *nar* 프로모터가 유도되는 특성이 조사되었다(15). 본 연구에서는 이 중에서 발현되는 정도가 제일 큰 것으로서 -10 지역에서의 염기서열이 consensus sequence로 바뀐 *nar* 프로모터(pMW616)가 염색체상의 *nar* 오페론은 정상이면서 용존산소농도에 영향을 받지 않도록 하기 위해 *fnr* 유전자가 transposon인 Tn10의 삽입에 의해 비활성화된 대장균(ES2001)에서 유도되는 특성이 발현운반체로 쓰일 수 있는지를 진탕플라스크와 발효기 실험을 통해 조사하였다.

재료 및 실험 방법

박테리아 균주 및 플라스미드

염색체상에 존재하는 정상적인 *fnr* 유전자가 Tn10의 삽입(insertion)에 의해 비활성화된 대장균 균주 ES2001(F^- *araD139* Δ (*argF-lac*)*U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR fnr-250 zcJ-637::Tn10*)(14)과 *nar* 프로모터의 -10 지역에서 *nar* 프로모터의 유도에 영향을 미치는 TACCTT가 특정부위돌연변이화에 의해 TATAAT로 치환된 *nar* 프로모터를 가지는 플라스미드 pMW616(15)은 미국의 The University of Texas Medical School에 재직하고 있는 John DeMoss 교수로부터 분양받았다. 플라스미드 pMW616은 그 크기가 8.0 kb로 pBR322을 골격으로 하며, 이 변형된 *nar* 프로모터가 유도되는 정도를 쉽게 측정하기 위하여 질산염 환원효소를 발현하는 구조유전자대신에 β -galactosidase를 발현하는 대장균 *lacZ* 유전자가 *nar* 프로모터의 하류에 subcloning되어 있다(Fig. 1)(9).

배양조건

대장균의 배양배지로는 Luria Broth(10 g/L Bacto tryptone, 5 g/L yeast extract, 10 g/L NaCl)가 사용되었고, 모든 배지에는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin(Boehringer Mannheim)이 첨가되었다. 진탕 플라스크(shake flask) 실험은 250 mL 플라스크에

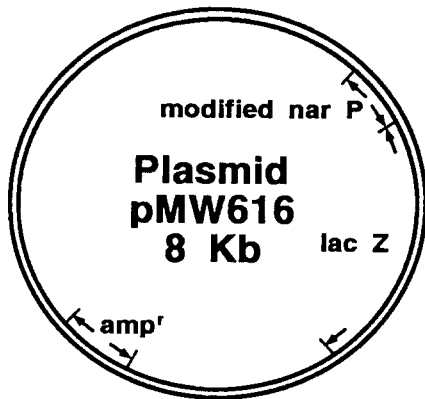


Fig. 1. Schematic diagram of plasmid, pMW616. pMW616, 8.0 kb, is a pBR322-based plasmid containing the modified *nar* promoter (*nar* P) upstream of the *lacZ* gene (*lac* Z). The bases in the -10 region of the modified *nar* promoter, TACCTT, were mutated to the consensus sequence, TATAAT by site-directed mutagenesis. The plasmid also has ampicillin-resistant gene (*amp*^r).

50 mL 배지를 넣고 하룻밤(overnight) 배양액을 1 mL 접종하여 이루어졌다. 이 때, 배양온도는 37°C, 교반속도는 250 rpm으로 하여 shaking incubator에서 배양되었다. 변형된 *nar* 프로모터의 유도는 600 nm에서 흡광도로 표시된(OD₆₀₀) 대장균 농도가 적절한 값이 되었을 때 이루어졌다. 이 *nar* 프로모터의 유도는 초기 접종시에 질산염의 첨가유무와는 상관없이 배양액이 교반되는 동안에 자연스럽게 이루어졌다.

발효기실험은 5 L 발효기에서 2 L 배지에 하룻밤 배양액 40 mL를 접종한 다음 배양이 이루어졌다. 대장균의 배양온도는 37°C, pH=7-7.5, 공기 공급속도 1 vvm으로 하여 배양하였다. 배지중의 용존산소(DO)는 교반속도를 0~500 rpm으로 변화시켜 원하는 농도로 조절하였으며, 낮은 용존산소 조건은 공기공급을 줄여서 만들었다.

β -galactosidase의 비활성도 측정

대장균 *lacZ* 유전자로부터 발현된 β -galactosidase의 비활성도의 측정은 Miller의 방법(16)에 따라 다음과 같이 이루어졌다. 600 nm에서의 흡광도가 측정된 대장균을 적절한 양 취하여 Z 완충용액(60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1

mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol; pH 7.0)과 섞어 전체부피가 1 mL되게 하였다. 여기에서 30 μ L의 chloroform과 15 μ L의 0.1% SDS를 섞은 다음 10초 동안 vortex하였다. 이 용액을 28°C에서 10분 동안 유지한 다음 0.2 mL의 4 mg/mL의 o-nitrophenyl- β -D-galactoside(ONPG)를 넣었다. 15분 후 반응을 멈추게 하기 위해 0.15 mL의 1 M Na₂CO₃를 넣었다. 이 용액의 흡광도를 420 및 550 nm에서 측정하였다. 이 때 단위세포당 발현된 β -galactosidase의 상대적인 비활성도로 쓰인 Miller unit는 다음과 같이 계산되었다.

$$1 \text{ Miller unit} = 1,000 \times \frac{(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})}{t \times v \times OD_{600}}$$

여기서 t, v, OD₄₂₀, OD₅₅₀, OD₆₀₀는 각각 반응시간(min), 분석에 사용된 배양액의 부피(mL), 420, 550 및 600 nm에서의 흡광도를 각각 나타낸다.

결 과

진탕 플라스크(shake-flask) 실험

fnr 유전자가 발현되지 않는 대장균(ES2001)에 들어있는 변형된 *nar* 프로모터(pMW616)가 진탕플라스크에서 진탕중에 발현되는 특성을 조사하였다(Fig. 2). 배양초기에는 하룻밤 배양액(overnight culture)에 발현된 β -galactosidase때문에 그 비활성도가 높게 나타났다. 하지만 호기상태에서 대장균이 성장함에 따라 그 활성도가 일단 감소하다가 대장균의 농도가 증가하면서 용존산소농도의 부족으로 인하여 다시 증가하였다. 이 때 발현된 β -galactosidase의 비활성도의 최대치는 약 15,000 Miller unit로 질산염의 존재유무와는 상관없이 비슷하게 나타났다(Fig. 2B). 이 때 발현된 β -galactosidase의 비활성도인 15,000 Miller unit는 본 연구실에서 이미 발표된 결과(13)와 비교하면 전체 단백질의 약 15%에 해당하는 값이다. 한편, 첨가된 1% 질산염은 대장균의 성장을 억제하였다(Fig. 2A). 이러한 결과를 더 확인하기 위해 질산염의 농도에 따른 변형된 *nar* 프로모터로부터 β -galactosidase의 발현을 조사한 결과(Fig. 3), Fig. 2에서 이미 관찰된 것과 같이 질산염은 변형된 *nar* 프로모터의 유도에 크게 영향을 미치지 못하였다. 한편, 질산염은 대장균의 성장을 억제하였으며, 이는 대장균의 염색체에 있는 *nar* 오페론으로부터 발현된 질산염 환원효소에 의해 질산염으로부터 생성된 아질산염(nitrite)의 독성때

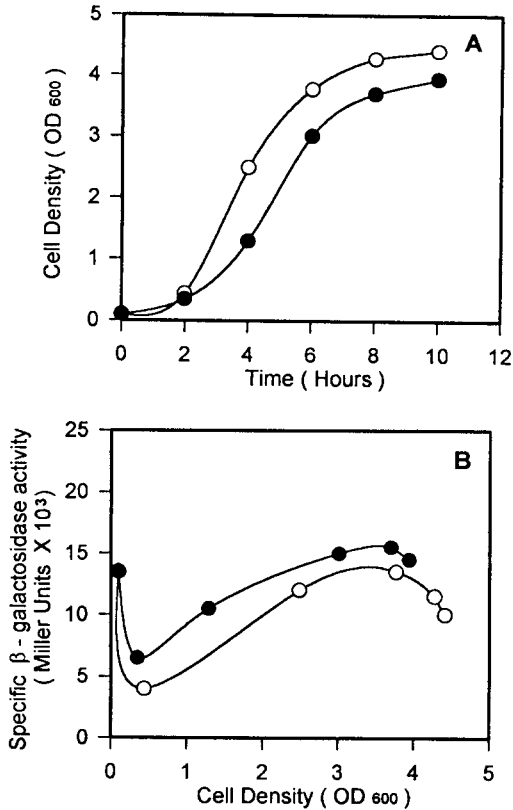


Fig. 2. Growth dependence of expression of β -galactosidase.

OD₆₀₀ (A) and the specific β -galactosidase activity (B) were measured during growth of *E. coli* in 250 mL flask. *E. coli* was grown in LB medium in the presence of 1% nitrate (●) or in the absence of nitrate (○), and the specific β -galactosidase activity was measured at different growth times without induction by anaerobic conditions.

문에 일어난 현상으로 사료된다. 따라서, pMW 616/ES2001 계에 대해서는 질산염이 없는 상태에서 변형된 *nar* 프로모터를 유도시키는 것이 세포성장은 억제하지 않으면서 최대에 가깝게 변형된 *nar* 프로모터를 유도시킬 수 있는 최적조건임을 알 수 있었다.

발효기 실험

발효기실험을 통하여 용존산소농도가 변형된 *nar*

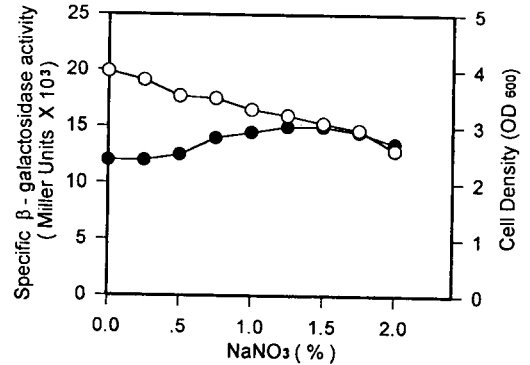


Fig. 3. Effect of the nitrate concentrations on the growth of *E. coli* (ES2001) and on the expression of β -galactosidase from the modified *nar* promoter on the plasmid, pMW 616.

E. coli was grown in the LB medium in 250 mL flasks, and cell concentrations (OD₆₀₀) (○) and the specific β -galactosidase activity (●) were measured at the different nitrate concentrations after 6 hours of growth without induction. Nitrate was added at the beginning of growth.

프로모터의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 질산염이 없는 상태에서 용존산소농도를 0-2, 5-15, 40-50 및 80-95%를 항상 유지하면서 배양을 실시하여 시간에 따른 β -galactosidase의 비활성도변화를 측정하였다. 이 중에서 용존산소농도 0-2% 및 40-50%에서의 실험결과가 Fig. 4에 표시되었다. 용존산소농도를 0-2%를 항상 유지하여도 높은 OD₆₀₀에서의 β -galactosidase의 비활성도는 배양초기에는 하룻밤 배양에서 생긴 높은 값으로부터 대장균이 자람에 따라 계속 감소하기만 하였다. 뿐만 아니라 그 값은 OD₆₀₀=1.8에서 진탕플라스크에서 관찰된 값보다 낮은 값인 약 6,000 Miller unit가 관찰되었다 (Fig. 4A). 한편, 용존산소농도가 40-50%로 증가하면 세포는 훨씬 높은 농도까지 자랄 수 있었으나 β -galactosidase의 비활성도는 감소하였다 (Fig. 4B). 이러한 경향은 용존산소농도가 80-95%가 되면 더욱 두드러지게 나타났다 (Data not shown).

용존산소농도가 낮으면 *nar* 프로모터의 유도는 증가하나, 그 농도가 너무 낮으면 대장균의 성장에 영향을 미치므로 발현되는 β -galactosidase의 비활성도를 최대로 하기 위해 *nar* 프로모터의 발현조건을

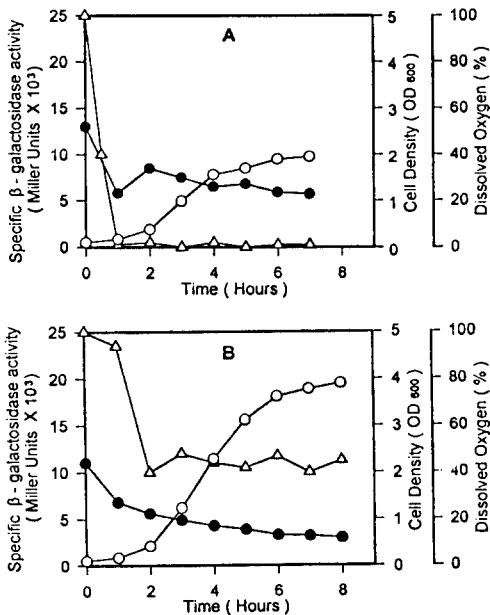


Fig. 4. Effect of dissolved oxygen (DO) levels on the growth of *E. coli* and on the expression of the specific β -galactosidase activity from the modified *nar* promoter.

E. coli was grown in the absence of nitrate in a 5 L fermentor under constant DO levels maintained by stirring rate. DO levels were maintained 0-2% (A) or 40-50% (B), and DO levels (Δ), cell concentrations (OD_{600}) (\circ), and the specific β -galactosidase activity (\bullet) were measured at different growth times.

성장단계와 발현단계로 나누어 실험하였다(Fig. 5). 즉, 대장균을 호기상태(DO=80-95%)를 유지하면서 질산염없이 키우면 초기배양단계에서는 하룻밤 배양때문에 높게 나타난 비활성도가 호기상태에서 대장균이 자라는 동안에는 약 6,000 Miller unit로 일정한 값을 유지하였다. 이 때 OD_{600} 이 2.4가 되었을 때 용존산소농도를 0-2%로 낮추어 발현시킨 결과 OD_{600} 이 약 3.5에서 최대로 발현된 β -galactosidase의 비활성도가 약 13,000 Miller unit로 진탕플라스크실험에서와 비슷한 값을 얻었다. 따라서, 호기상태에서 혐기상태로 바뀌면서 β -galactosidase의 발현이 약 2배 정도만 증가하였다.

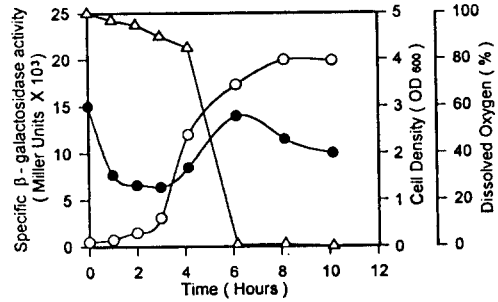


Fig. 5. Expression of the specific β -galactosidase activity from the modified *nar* promoter at the growth phase and at the expression phase.

E. coli was grown in the fermentor under aerobic conditions (DO over 80%) to $OD_{600} = 1.7$ before the modified *nar* promoter was induced by reducing DO level to 0-2% (Δ). At the same time the specific β -galactosidase activity (\bullet) and OD_{600} (\circ) were also measured.

고찰

클로닝된 *nar* 프로모터에는 두 가지 조절단백질인 NARL과 FNR이 결합하는 부위가 있으므로 *nar* 프로모터의 유도는 *nar* 프로모터가 가지는 염기서열과 대장균내에서 조절단백질이 생성되는 정도에 관계한다; 질산염의 농도에 따라 *nar* 프로모터에 대한 결합이 결정되는 NARL의 결합부위는 전사개시지점으로부터 상류(upstream) 약 200 bp에 위치하며, 용존산소농도에 따라 *nar* 프로모터에 대한 결합이 결정되는 FNR의 결합부위는 전사개시지점으로부터 약 40 bp 앞에 위치한다(9). 한편, 혐기조건하에서 *nar* 프로모터의 유도는 FNR 결합부위 뿐만아니라 -10 지역의 염기서열에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려졌다(17). 즉, 이 지역의 염기서열을 특정부위 돌연변이화에 의해 consensus sequence(TATAAT)가 되도록 돌연변이시킨 결과 호기조건에서의 유도가 증가하였다. 이 돌연변이된 *nar* 프로모터(pMW 616)를 용존산소농도에 따른 영향을 없애기 위해 FNR이 생성되지 않는 대장균(ES2001)에서 발현시킨 결과 용존산소농도와는 상관없이 질산염의 존재에 따른 영향만 관찰되었다. 즉, 용존산소와는 상관없이 질산염(1%)이 존재하면 그 유도가 약 10배 정도만 증가하여, 따라서 이 변형된 *nar* 프로모터는

유도성프로모터보다는 구성적프로모터에 적절할 것으로 사료되어 본 연구에서는 이에 대한 연구가 시도되었다. 본 연구에서 진탕플라스크 실험과 발효기 실험 모두로부터 얻은 최대 β -galactosidase의 비활성도는 질산염의 존재유무와는 상관없이 약 12,000-15,000 Miller unit였다(Fig. 2, 3 & 5). 이 때 최대 발현된 β -galactosidase의 비활성도는 Walker & DeMoss(15)에 의해 보고된 값과 비슷하였으나, 질산염의 영향은 Walker & DeMoss에 의한 보고와는 달리 진탕 플라스크 실험에서 별로 관찰되지 않았다(Fig. 2 & 3). 한편, 용존산소농도에 따른 변형된 *nar* 프로모터의 유도를 알아 보기 위해 발효기에서의 실험을 행한 결과 Walker & DeMoss에서의 보고에서와 같이 *nar* 프로모터의 유도가 크게 촉진되지 않았다(Fig. 5). 뿐만 아니라 용존산소농도를 조절하여 혐기조건으로 낮추더라도 발현되는 β -galactosidase는 진탕플라스크에서 인위적으로 혐기상태를 만들지 않고 얻어진 값과 비슷한 것으로 보아 이 pMW616/ES2001로부터 최대 발현될 수 있는 β -galactosidase의 비활성도는 약 15,000 Miller unit일 것으로 유추된다. 이상의 결과로부터 이 변형된 *nar* 프로모터는 구성적 프로모터로 쓰이기에 적절한 프로모터로 사료된다.

한편, 정상적인 질산염 환원효소가 염색체상의 *nar* 오페론으로부터는 생성되는 대장균에서 야생형(wild-type) *nar* 프로모터가 유도되는 pXR8971/Mv1190 계에서는 OD₆₀₀이 1.7이 될 때까지 호기조건하에서 키우다가 1% 질산염을 넣으면서 기체질소로 완전한 혐기상태를 만들었을 때 OD₆₀₀이 약 2.7이 되면서 *nar* 프로모터로부터 단위배지당 β -galactosidase가 최대 발현되었으며, 이 때 β -galactosidase의 비활성도는 약 7,600 Miller unit였고, 유도율은 약 250이었다(12). 또한, 정상적인 질산염 환원효소가 염색체상의 *nar* 오페론으로부터는 생성되지 않는 대장균에서 야생형 *nar* 프로모터가 유도되는 pMW61/RK5265 계에서는 배양초기부터 1% 질산염을 넣고 OD₆₀₀이 1.7이 될때까지 호기조건하에서 키우다가 용존산소농도를 1-2%로 낮추어 *nar* 프로모터를 유도시키면 OD₆₀₀이 약 3.2가 되면서 단위배지당 β -galactosidase가 최대 발현되었으며, 이 때 β -galactosidase의 비활성도는 약 36,000 Miller unit였고, 유도율은 약 300이었다(13). 이 변형된 *nar* 프로모터계(pMW616/ES2001)는 -10 지역의 돌연변이로 인하여 유도율은 훨씬 낮아지면서 야생형 프로모터가 *nar* 오페론이 정상적인 대

장균(pXR8971/Mv1190)에서의 발현보다는 높으나, 야생형 프로모터가 *nar* 오페론이 비활성화된 대장균(pMW61/RK5265)에서의 발현보다는 낮다. 따라서, 본 연구에서 사용된 변형된 *nar* 프로모터를 구성적 프로모터로 쓰면서 β -galactosidase의 발현을 더욱 증가시키기 위해서는 사용된 대장균(ES2001)의 *fnr* 유전자가 비록 비활성화되었다고 염색체에 존재하는 *nar* 오페론까지 비활성화시키는 것이 필요하리라 사료된다.

본 연구에서 사용된 *nar* 프로모터는 기존에 이용되는 다른 여러 프로모터들에 비견할만 세기를 가진 것이 여러 발표된 자료들과 간접적인 비교로 확인되었다. Khosla와 Bailey(5)는 낮은 용존산소농도에서 산소이용을 증가시키기 위해 발현되는 *VHb* 프로모터를 pBR322에 클로닝하여 실험한 결과 OD₆₀₀이 약 1.0에서 최대로 유도되며, 이 때 발현된 β -galactosidase의 비활성도는 약 13,000 Miller unit인 것이 확인되었다. 한편, Hughes 등은 *VHb* 프로모터와 기존의 잘 알려진 유도성 프로모터인 *tac* 프로모터를 서로 비교하였다(6). 여기에서 비교가 타당성을 가지기 위해 두 프로모터들은 동일한 플라스미드인 pBR322에 클로닝되었다. 이 실험으로부터 단위 mg당의 전체 세포단백질 중에 두 프로모터로부터 발현되는 chloramphenicol acetyltransferase의 활성도는 거의 같다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 연구에서 이용된 변형된 *nar* 프로모터도 *VHb*와 *tac* 프로모터만큼의 프로모터 세기를 가질 것으로 유추될 수 있으며, 이 변형된 *nar* 프로모터가 훨씬 높은 세포농도(OD₆₀₀=3.6)에서 유도가 최대로 되었으므로 단위배지 부피당으로 계산하면 *nar* 프로모터로부터 더 많은 재조합단백질이 생산될 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 주장은 Labes 등의 실험결과로부터도 뒷받침된다(18). Labes 등은 대장균에 *lac* 프로모터와 *tac* 프로모터로부터의 β -galactosidase의 발현정도를 측정하였다. 이 실험에서는 *lac* 프로모터와 *tac* 프로모터가 pBR322보다 더 많은 복제수(copy number)를 가지는 플라스미드에 도입되었음에도 불구하고 β -galactosidase의 비활성도는 OD₆₀₀가 1.0보다 작을 때 각각 2,000, 11,300 Miller unit로 변형된 *nar* 프로모터로부터 얻은 값인 13,000 Miller unit에 비해 각각 1/6정도로 적거나 또는 대등하였다.

요 약

본 연구에서는 질산염(nitrate) 존재하에서 혐기

조건이 되면 최대로 발현되는 변형된 *nar* 프로모터를 대장균내에서 단백질을 대량 생산하기 위한 발현 운반체로 쓰일 수 있는지를 조사하였다. 이를 위해 용존산소농도에 따라 *nar* 프로모터의 유도에 영향을 미치는 염색체 *fnr* 유전자가 발현되지 못하는 대장균(ES2001)에 pBR322 플라스미드에 프로모터상의 -10 지역에서 특정부위돌연변이화에 의해 consensus sequence로 바뀐 변형된(modified) *nar* 프로모터(pMW616)가 도입되어 있는 계(pMW616/ES2001)가 이용되었다. 이 변형된 *nar* 프로모터의 하류에는 구조유전자(structural gene)인 질산염 환원효소대신에 β -galactosidase를 발현하는 *lacZ* 유전자가 클로닝되어 있다. 이 변형된 *nar* 프로모터의 유도에 대한 최적조건을 찾기 위해 변형된 *nar* 프로모터를 유도시키는 방법, 변형된 *nar* 프로모터가 최대로 유도되는 질산염의 농도, 발현된 β -galactosidase의 양 및 변형된 *nar* 프로모터가 유도되는 특성들이 조사되었다. 이에 대한 실험으로부터 다음과 같은 결론들이 얻어졌다; 이 변형된 *nar* 프로모터로부터 β -galactosidase의 발현은 질산염의 농도에 의해서는 크게 영향을 받지 않았다. 한편, 변형된 *nar* 프로모터로부터 β -galactosidase의 발현은 성장단계에서 대장균을 호기상태에서 OD₆₀₀이 약 2.2가 될 때까지 키우다가 유도시 혐기상태로 만드는 것이 가장 유리하였으며, 이 때 발현된 β -galactosidase의 비활성도는 약 13,000 Miller unit였다. 하지만, 이 변형된 *nar* 프로모터는 이것을 유도시키기 전에도 발현된 β -galactosidase의 비활성도가 약 6,000 Miller unit로 매우 높음으로 인하여 이 변형된 *nar* 프로모터는 원하는 단백질을 유도성보다는 구성적으로 발현시키는데 더 적합한 프로모터였다.

감 사

본 연구에 사용된 균주와 플라스미드를 제공해 준 DeMoss 교수와 실험에 도움을 준 이진태군에게 감사드립니다. 본 연구는 '95년도 생물공학연구센터의 지원(과제번호 95-K4-05-03-01-1)으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. V. Goeddel, H. L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D. G. Yansura, M. J. Ross, G. Miozzari, R. Crea, and P. H. Seeburg (1979), *Nature*, **281**, 544.
2. D. V. Goeddel, E. Yelverton, A. Ulrich, H. L. Heyneker, G. Miozzari, W. Holmes, P.H. Seeburg, T. Dull, L. May, N. Stebing, R. Crea, S. Maeda, R. McCandliss, A. Sloma, J. M. Tabor, M. Gross, P. C. Familetta, and S. Pestka(1980), *Nature*, **273**, 411.
3. E. Remaut, P. Stanssens, and W. Fiers (1981), *Gene*, **15**, 81.
4. H. A. deBoer, L. J. Comstock, and M. Vasser (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 21.
5. C. Khosla and J. E. Bailey(1989), *J. Bacteriol.*, **171**, 5995.
6. D. E. Hughes, J. E. Curtis, C. Khosla, and J. E. Bailey(1989), *Biotechniques*, **7**, 1026.
7. S. Iuchi and E. C. C. Lin(1991), *Cell*, **66**, 5.
8. G. Gottschalk(1986), *Bacterial Metabolism*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
9. S. F. Li and J. A. DeMoss(1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 13700.
10. S. F. Li, T. Rabi, and J. A. DeMoss(1985), *J. Bacteriol.*, **164**, 25.
11. S. F. Li and J. A. DeMoss(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 4614.
12. J. T. Lee, M. H. Cho, E. K. Hong, K. S. Kim, and J. W. Lee(1996), *Biotechnol. Lett.*, **18**, 129.
13. J. T. Lee, M. H. Cho, and J. W. Lee(1996), *Biotech. Bioeng.*, In press.
14. V. Stewart and C. H. MacGregor(1982), *J. Bacteriol.*, **151**, 788.
15. M. S. Walker and J. A. DeMoss(1992), *J. Bacteriol.*, **174**, 1119.
16. J. H. Miller(1972), *Experiments in Molecular Genetics*, 2nd ed., p. 352, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
17. M. S. Walker and J. A. DeMoss(1991), *Mol. Microbiol.*, **5**, 353.
18. M. Labes, A. Puhler, and R. Simon(1990), *Gene*, **89**, 37.

1. D. V. Goeddel, H. L. Heyneker, T. Hozumi, R.