

*Serratia marcescens*에서 maltose 대사를 촉진하는 유전자의 클로닝 및 해석

이승진 · 유주순 · 김혜선 · 이상철 · 정수열¹ · 최용락*

동아대학교 생명자원과학부, ¹동주대학 식품영양과

Analysis and cloning of the gene involved in activation of maltose metabolism in *Serratia marcescens*.

Lee, Seung-Jin, Ju-Soon Yoo, Hae-Sun Kim, Sang-Cheol Lee, ¹Soo-Yeol Chung, and Yong-Lark Choi*.

Division of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan, 604-714,

¹Department of Food Science, Dongju College, Pusan, 604-715, Korea – We have got several clones from *Serratia marcescens* which stimulated the cells to use maltose as a carbon source in *Escherichia coli* TP2139 (Δlac , Δcyp). One of the cloned genes, pCKB17, was further analyzed. In order to find whether the increased expression of the gene was under the direction of maltose metabolism, we constructed several recombinant subclones. We have found that the clone, pCKB17AV, codes maltose metabolism stimulation(*mms*) gene. *E. coli* transformed with the cloned gene showed increase in the activity of maltose utilization. The recombinant proteins expressed by multicopy and induction with IPTG, one polypeptide of 29-kDa, was confirmed by SDS-PAGE. The overexpression of maltose-binding protein in the presence of *mms* gene was confirmed by Western blot analysis. Southern hybridization analysis confirmed that the cloned DNA fragment was originated from *S. marcescens* chromosomal DNA.

Key words: *Serratia marcescens*, *mms* gene, MBP protein, gene expression

Maltose 대사에 관여하는 대장균 유전자는 염색체상 두 군으로 위치하고 있다. 하나는 *malPQ* operon으로서 염색체 지도상 75분대에 존재하며 maltodextrin phosphorylase와 amylomaltase를 coding하고 있다[14]. 또, 91분대에 위치하는 *malEGF*, *malK*와 *lamB*로서 이들 유전자들은 주로 maltose의 uptake와 transport에 관여하며, maltose와 *malT* activator에 의해 발현이 촉진되어진다. *malT*와 *malEGF* operon은 cAMP-cyclic AMP receptor protein (CRP)에 의해 발현이 촉진되어지며, *malPQ* operon은 cAMP-CRP의 조절을 받는 Malt operon 단백질에 의해 간접적인 조절을 받게 되므로 lactose 분해계 유전자로서 cAMP-CRP에 의해 발현 촉진을 받게 되는 *lacZYA* operon과는 다른 조절 system을 가지게 된다[1, 4].

Serratia sp. 균주는 그람음성, enteric soil bacterium으로서, chitinase를 생성하여 식물체에 병해를 제공하는 균의 세포벽 구성물인 키틴을 분해하여 병해 발생을 감소 시켜주는 균이다. 또한 이 세균이 생산하는 유용효소는 키토산, 키토올리고당 등을 생산하여 의약 및 여러분야의 산업에 이용되어지며, 이를 이용하고자하는 분자생물학적 및 생물공학적 연구가 진행되고 있는 실정이다[5, 11].

최 등[3, 7, 10]은 CRP*¹ 변이가 도입된 대장균 MK

2001(*cyp**¹, *cya*::*km*)를 숙주로 사용하여 cAMP 혹은 cGMP의 비존재하에서도 *mal* 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자 *sfs* (sugar fermentation stimulation) 12종을 클로닝 하였다. *sfs* 유전자 중 *sfs1*, *sfs4* 및 *nlp*(Ner like protein) 유전자에 대하여 당대사 촉진 및 1차구조를 결정하였다. 그 결과 *nlp* 유전자 산물은 전사조절 단백질로서 잘 알려져 있는 Ner 단백질과 높은 상동성(62~63%)을 나타내었으며, *Sfs1*과 *Nlp* 둘다 전사조절 단백질에서 잘 보존되어 있는 DNA 결합영역이 존재하였다. 또한 *cyp**에 의존하여 maltose 대사관련 유전자의 발현이 촉진되어지는 점 등으로 이들 유전자는 maltose 대사계에 관여하는 새로운 조절 factor로서 작용할 가능성이 주목되어지고 있다.

본 연구는 대장균의 *sfs* 유전자와 비슷한 기능을 지닌 유전자를 해석하고자, *Serratia* 균주에서 다수의 maltose 대사관련 유전자 및 cAMP 조절을 받는 유전자를 분리하고, 분리된 유전자의 기능을 확인하고, 발현 산물의 확인 등을 통한 유전자 해석을 실시하였다.

실험재료 및 방법

균주 및 플라스미드

*Corresponding author
Tel. 82-51-200-7585, Fax. 82-51-200-6993
E-mail: ylchoi@mail.donga.ac.kr

본 실험에 사용한 균주 및 plasmid vector는 Table 1에 나타내었다. 세균의 일반적 배양을 위하여 LB를 사용하였으며, plasmid가 도입된 균주는 항생제를 첨가하고 배양하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

strains & plasmids	genotype	source and ref.
STRAINS		
W3110	wild type	Lab. stock
JM 109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17,</i> <i>supE44, relA1, Δ,(lac-proAB)F'</i> [<i>traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZ Δ, M15</i>]	Lab. stock
TP 2139	<i>crp, lacX74, xyl, ilvA, argH, recA1</i>	A. Danchin, [9] [7]
<i>Serratia marcescens</i> KTCC 2172		
LASMIDS		
pBluescript KS(+)	Amp ^r [5]	
pCKB17	<i>mms17, kdgK, Amp^r</i>	this study
pACB17P	<i>mms17, kdgK, Amp^r,</i>	this study
pCKB17A	<i>kdgK, Amp^r</i>	this study
pACB17AV	<i>mms17 Amp^r</i>	this study

사용시약 및 재료

DNA sequencing kit, restriction endonuclease, Klenow fragment 및 DNA ligation kit는 Takara shuzo사 제품을 사용하였고, IPTG, X-gal, glucose-B test kit는 Wako사 제품을, 방사능 표지물질은 Amersham 제품을 사용하였고, Wizard miniprep DNA purification system은 Promega에서 구입하였고, 그 밖에 사용한 모든 시약은 시중에서 구입한 특급품을 사용하였다.

재조합 DNA techniques

Genome DNA 분리는 Qiagen의 kit를 사용하여 분리정제 하였다. 제한효소 처리, 형질전환, agarose gel 전기영동 및 기타 재조합 DNA technique는 표준방법을 사용하였다 [12]. 염기배열 및 기타 유전자 재조합 실험을 위한 plasmid DNA 정제는 Wizard miniprep 정제 kit로 분리하였다. DNA 염기배열 결정을 위하여 이중가닥 DNA를 사용하였으며, autocycle DNA sequencing kit와 A.L.F. DNA sequencer(Pharmacia)를 사용하여 dideoxy-chain termination법[13]으로 결정하였다.

효소 활성 측정

효소 활성 측정을 위한 단백질 추출액은 전보[18]의 방법에 의했다. amylosemaltase는 Wiesmeyer와 Cohen의 방법[17], maltodextrin phosphorylase는 Helmreich와 Cori의 방법[6], glucose의 정량은 Sharp의 방법[17], 및 단백질의 정량은 Bradford의 방법[2]에 의하여 정량하였다.

Southern hybridization

분리 정제한 DNA를 0.7% agarose gel에 전기영동하여

DNA를 확인한 후, 6염기 제한효소를 사용하여 완전히 분해시켰다. 분해된 DNA를 다시 전기영동으로 분리한 뒤에 변성과 중화 과정을 거친 뒤에 nylon membrane에 하루밤 동안 Southern transfer하였다[15]. 이중가닥 DNA probe는 [α -³²P] dCTP(3,000 Ci/mmol)과 얻어진 클론의 DNA를 가지고서 라벨링하여 사용하였다.

Western blotting

L-배지로 배양한 균체를 25 mM 인산 원총액(pH 7.5)으로 세척한 후, 4°C에서 30초씩 4회 균체를 파괴시켰다. 35,000 × g에서 20분간 원심분리하여 세포잔사를 제거시킨 상등액을 단백질 시료로 사용하였다. 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하고[9], Towbin 등의 방법[16]으로 nylon membrane에 blotting 하였다. 1차 antibody인 anti-MBP (0.2~1 µg/ml)를 반응시킨 후, 2차 antibody인 HRPO-IgG conjugate (0.2~1 µg/ml)를 반응시켜 PBS (10 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.2)로 세척한 후, 발색시켰다.

결과 및 고찰

mms 유전자의 클로닝

MacConkey 배지에서 maltose를 잘 이용 못하는 대장균 TP2139(Δ crp, Δ lac)를 클로닝을 위한 숙주균으로 사용하였다. 대장균 염색체 DNA를 조제하고 6염기 인식 제한효소 5~6종을 선택하여 제한효소로 절단시킨 것을 벡터인 pBluescript KS(+)에 shot-gun cloning을 시도하여 1% maltose가 함유된 MacConkey 배지에서 red colony를 선별하여 조사하였다. TP2139의 균주를 MacConkey,

maltose 배지를 사용하여 배양하면 white colony를 나타내므로, 이 방법으로 얻어진 클론에서 red 콜로니를 생성하는 것은 maltose 대사촉진 관련을 가진 것이다. 약 수만 개의 recombinant로부터 수 종류의 clone을 얻었다[8, 18]. 그 중에서 pCKB17 클론에 대하여 더욱 해석하였다.

pCKB17은 3-kb의 *Bam*HI 단편이 삽입되어 있으므로 subcloning을 위하여 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 1). *Pvu*II-*Bam*HI의 2.4-kb를 *Sma*I-*Bam*HI으로 절단한 pBluescript KS(+)에 삽입시킨 pCKB17P와 *Ava*I의 1.4-kb를 pBluescript KS(+)에 삽입시킨 pCKB17AV를 작성하였다. 이들을 TP2139에 도입시킨 형질 전환체는 MacConkey 배지에서 pCKB17AV는 강한 red colony를 나타내었으나,

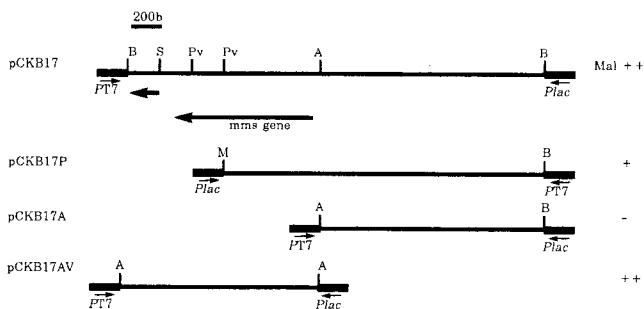


Fig. 1. Physical map of the plasmid pCKB17 of *S. marcescens* and derivative plasmids.

The transcriptional direction of the gene is shown by the thick arrow.

Abbreviations: A; *Ava*I, B; *Bam*HI, E; *Eco*RI, Pv; *Pvu*II, M; *Sma*I

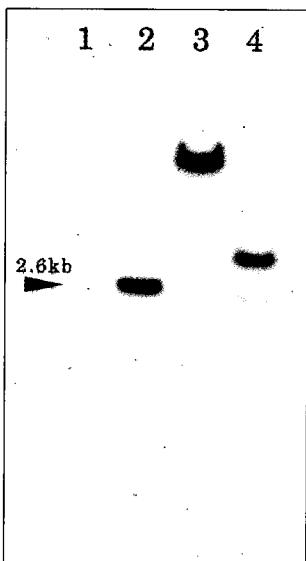


Fig. 2. Southern hybridization analysis of the enzyme-digested *S. marcescens* chromosomal DNA.

The 1.5 kb insert fragment of pCKB17 was used as a probe. Lanes : 1; size marker, 2; *S. marcescens* chromosomal DNA digested with *Bam*HI, 3; *Eco*RI, 4; *Hind*III.

pCKB17P도 약한 red colony를 나타내었다. 반면 *Ava*-*Bam*HI의 1.6-kb가 삽입된 pCKB17A는 MacConkey 배지에서 white colony를 나타내었다. 실제로 이 결과는 maltose 대사촉진에 관여하는 유전자가 양방향 중에서 존재하기 위해서는 두 개의 ORF를 가질 것으로 예상된다. 실제로 클로닝 된 pCKB17의 양 말단의 염기 배열을 결정하니 한 쪽은 75KDa의 미지의 단백질과 또 한쪽은 *kdgk*(2-keto-3-deoxy gluconate kinase) 유전자와 상동성을 나타내는 ORF를 코드하는 것으로 나타낸 결과(data not shown)와 잘 일치하였다. 즉, pCKB17P는 *kdgk* 유전자에 의해 발생되는 MacConkey 배지의 당 이용성 때문으로 red colony가 생성된 것으로 판단된다. 배지 발색의 정도는 pCKB17AV가 가장 강했는데, 단편의 크기를 줄임으로서 벡터의 강력한 프로모터에 당대사 촉진의 발현 기능이 증가됨을 시사해 주었다. 따라서, pCKB17이 코드하는 유전자가 maltose 대사촉진에 관여하는 점으로 보아 *mms*(maltose metabolism stimulation)유전자로 명명하였다. 한편, 클로닝된 유전자가 *S. marcescens*의 염색체 DNA에서 유래된 것인지를 확인하고자 Southern blotting을 실시한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *S. marcescens*의 염색체 DNA를 *Bam*HI, *Eco*RI 및 *Hind*III로 절단한 DNA와 pCKB17의 삽입단편을 [α -³²P]dCTP(3,000 Ci/mmol)로 라벨링 한 것과 hybridization을 실시하였다. 그 결과, *Bam*HI으로 절단한 것에서 pCKB17의 삽입단편 크기인 3-kb의 밴드 시그널이 나타났다. 이러한 결과는 클로닝된 유전자가 *S. marcescens*의 염색체 DNA에서 유래된 것임을 확신해 주는 것이다.

maltose 대사촉진 활성의 측정

pCKB17이 코드하는 *mms* 유전자가 maltose 대사촉진에 관여하는 점을 구체적으로 확인하고자 maltose 대사촉진 관련 기능을 측정하였다. *mms* 유전자가 도입된 대장균 TP2139를 배양하여 maltose로부터 분해되어 생성된 glucose의 양을 측정한 결과를 Table 2에 나타냈다. *mms*

Table 2. Induction of maltose metabolism in *E. coli* TP2139 strains harboring *mms* gene^a

Plasmid	Glucose production ^b (pg)	Efficiency ^c (%)
pBluescript KS(+)	9.45	100
pCKB17	20.79	220
pCKB17P	23.63	250
pCKB17AV	52.92	560

^a; *E. coli* strains were grown in M9 medium supplemented with 1% maltose, 0.2% casamino acids, and 25 µg ampicillin.

^b; Amount of glucose was estimated as described in Materials and Methods, and shown in pg per µg of protein extracts. ^c; Relative value with that in the presence of plasmid pBluescript KS(+) taken as 100.

Table 3. Specific activity of amylofytase in *E. coli* harboring the *mms* gene^a

Strain	Plasmid			
	pBluescript KS(+)	pCKB 17	pCKB17P	pCKB17AV
TP2139	2.14	2.71	3.52	5.12
W3110	4.52	4.79	5.21	6.25

^a; Amylofytase activity was shown in units/ μ g protein. One unit of amylofytase activity was defined as the amount of 1 pg of glucose produced per min at 30°C. *E. coli* strains were grown in M9 medium supplemented with 1% glycerol, 0.2% casamino acids, and 25 μ g/ml ampicillin.

유전자가 도입된 대장균 TP2139 균주는 벡터인 pBlue-script KS(+) 가 도입된 대조구보다 2.2배에서 5.6배 까지 maltose의 분해력이 증가하였다. 이러한 결과는 *mms* 유전자의 대량발현에 의한 유전자산물의 생산결과에 의한 것으로 생각된다. 따라서 maltose의 분해에 관여하는 두 유전자, *malP*(maltodextrin phosphorylase)와 *malQ*(amylofytase)의 발현조절에 미치는 *mms* 유전자가 관여하는지를 알아보기 위하여 두 유전자 산물인 효소활성을 측정하여 Table 3에 나타냈다. *mms* 유전자의 대량발현에 의하여 분해관련 효소인 amylofytase는 2.4배 까지 효소활성이 증가되었으며, maltodextrin phosphorylase는 효소활성의 증가가 미미하였다(data not shown). Kawamukai 등[7]은 대장균에서 maltose 대사를 촉진하는 *sfs*유전자의 maltodextrin phosphorylase와 amylofytase의 발현 촉진현상은 *malE* 유전자가 결손된 균주에서는 나타나지 않았으며,

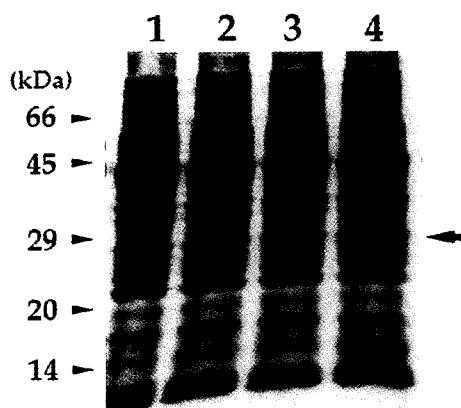


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns showing expression of *mms* gene in *E. coli*.

Staining was done with Coomassie brilliant blue. The black triangle arrows indicate the position of the Mms proteins. Lanes : 1; pBluescript KS(+)/TP 2139, 2; pBluescript KS(+)/TP 2139/1 mM IPTG, 3; pCKB17AV/TP 2139, 5; pCKB17AV/TP 2139/ 1 mM IPTG.

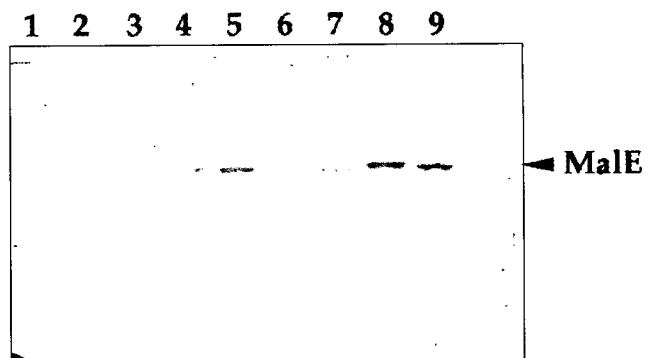


Fig. 4. Immunoblot analysis of the MalE protein.

The arrow indicates the position of the MalE protein.

Lanes; 1: size marker, 2: pBluescript KS(+), 3: pBluescript KS(+)/0.5 mM IPTG, 4: pCKB17, 5: pCKB17/0.5 mM IPTG, 6: pCKB17A, 7: pCKB17A/0.5 mM IPTG, 8: pCKB17AV, 9: pCKB17AV/0.5 mM IPTG.

이것은 이러한 발현촉진 현상이 *malE* 유전자에 기인된 것임을 알 수 있다.

mms 유전자의 발현

Maltose 대사에 새로운 조절인자로서 관여 하는 *mms* 유전자의 발현 산물을 확인하고자 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 대량발현 벡터에 재조합된 pCKB17AV를 도입한 균주에서 추출한 단백질을 전기영동한 결과 (Fig. 2의 lane 3)에서 약 29 kDa의 밴드를 분명히 확인할 수 있었다. 동일 균주에서 IPTG로 유도시킨 결과에서는 더욱 진하게 나타난 유전자 산물이 나타났다. Kawamukai 등[7]이 발표한 대장균에서의 maltose 대사를 촉진하는 *sfs* 유전자의 발현 촉진현상에는 *malE* 유전자가 관여한다고 보고한 바 있다. 또한, *malE* 유전자의 생성물인 MBP(maltose-binding protein)는 periplasmic protein으로서 maltose나 maltodextrin에 높은 친화성을 가지며, cytoplasmic membrane에 존재하는 MalF, MalG 그리고 MalK 단백질과 MBP-MalFGK2 복합체를 형성하여 maltose의 운반에 관여하는 것으로 알려져 있다[10]. 따라서, *mms* 유전자도 maltose 대사 촉진에 비슷한 기능을 나타내는지를 확인하고자 하였다. Western blotting 실험을 수행한 결과 (Fig. 4), *mms* 유전자가 도입된 균주에서는 벡터만이 도입된 대조구에 비하여 이 유전자의 대량발현으로 *malE* 유전자 산물의 발현이 촉진됨을 확인하였다. 이러한 발현촉진 현상은 maltose 분해능에 따른 glucose 생성 및 관련효소의 활성증가 결과와 잘 일치하였다.

요약

Serratia 균주에서 *crp* 유전자의 분자적 특성 및 cAMP

에 의한 발현조절을 받는 분자기구를 보고자, MacConkey 배지에서 maltose를 탄소원으로 충분히 이용하지 못하는 대장균 TP2139 (Δcrp , Δlac)를 이용하여 염색체 DNA를 library로 작성하여 얻은 형질전환체 약 일만 개의 콜로니에서 red colony를 나타내는 5종류의 양성 클론을 얻었다. 이들 클론을 확인한 결과 pCKB12 클론은 *crp* 유전자, pCKB13은 CoA transferase 유전자를 coding하고 있음을 확인하였다. 본 연구는 미해석된 클론인 pCKB17에 대하여 해석하였다. MacConkey 배지에서 maltose를 탄소원으로 이용하는 것을 기준으로 몇몇 subclone을 얻었으며, 이들은 더 복제 조건하에서의 maltose 이용능이 증가하였다. 따라서 이 유전자를 *mms*(maltose metabolism stimulation)이라 명하였다. 유전자산물의 확인을 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과 대량생산된 29 kDa의 발현산물을 얻어냈다. *mms* 유전자의 대량발현이 유도되는 조건하에서는 *malE* 유전자의 산물인 MBP 단백질의 발현이 증대됨을 확인하였다. Southern blot으로 확인한 결과 얻어진 클론은 *Serratia* sp. 염색체 유래임을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 동아대학교 공모과제 연구비 및 청춘 재단의 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Beckwith, J. 1987. The lactose operon. pp. 1444-1459. In Neidhardt, F. C et al(ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Choi, Y. L., T. Nishida, M. Kawamukai, R. Utsumi, H. Sakai, and T. Komano. 1989. Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* gene, *nlp*, highly homologous to the *ner* genes of bacteriophages Mu and DIO8. *J. Bacteriol.* **171**: 5222-5225.
- De Crombrugghe, B. S. Busby, and H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein: role of transcriptional activation. *Science* **224**: 831-838.
- Gal, S. W., J. Y. Choi, C. Y. Kim, Y. H. Cheong, Y. J. Choi, J. D. Bahk, and M. J. Cho. 1998. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC 2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**: 151-158.
- Helmreich, S. and C. F. Cori. 1964. The role of adenylic acid in the activation of photophorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **51**: 131-138.
- Kawamukai, M., R. Utsumi, K. Takeda, A. Higashi, H. Matsuda, Y. L. Choi, and T. Komano. 1991. Nucleotide sequence and characterization of the *sfs1* gene: the *sfs1* gene is involved in the *crp** dependent *mal* gene expression of *E. coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 2644-2648.
- Kim, H. S., J. S. Yoo, Y. G. Kim, C. H. Chung, and Y. L. Choi. 1999. Cloning and expression of *Serratia marcescens* Coenzyme A(CoA) transferase gene in *E. coli*. *J. Life. Science* **9(1)**: 54-57.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Markgref, M., H. Bocklage, and B. Muller-Hill. 1985. A change of threonine 266 to isoleucine in the *lac* permease of *Escherichia coli* diminishes the transport of lactose and increases the transort of maltose. *Mol. Gen. Genet.* **198**: 473-475.
- Matsumoto, H., H. Noguchi, and Y. Hayakawa. 1998. Primary cause of mortality in the army warm larva simultaneously parasitized by parasitic wasp and infected with bacteria. *Eur. J. Biochem.* **252(2)**: 299-304.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schwarz, M. 1987. The maltose regulon. pp. 1482-1502. In Neidhardt, F. C et al, (ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Wiesmeyer, H. and M. Cohen. 1960. The characterization of the pathway of maltose utilization by *Escherichia coli* 1. Purification and physical chemical properties of the enzyme amylomaltase. *Biochim. Biophysics. Acta* **39**: 417-426.
- Yoo, J. S., H. S. Kim, J. H. Moon, S. Y. Chung, and Y. L. Choi. 1998. Analysis and cloning of cAMP receptor protein gene in *Serratia marcescens*. *Kor. J. Life Science* **8**: 263-271.

(Received October 21, 1999)