

Enterobacter aerogenes 의 phoA 유전자 Promoter를 이용한 인 제한환경에서 발현하는 벡터 구축

장화형¹ · 고병훈² · 박신영² · 이성호² · 김성진² · 임유정² · 한갑진² · 김영호² · 이영근⁴ · 이기성^{*1,2,3}

¹배재대학교 바이오의약연구센터(Bio-Med RRC), ²자연과학대학 생물약학과

³(주)에코바이오메드, ⁴한국원자력연구소 방사선응용부

토양 등의 인 제한환경에서 특이적으로 발현하는 벡터를 구축하기 위해서 *Enterobacter aerogenes*의 *phoA* 유전자의 promoter가 든 pEAAP를 구축하였다. pEAAP는 pET-22b(+)을 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하여 T7 promoter와 *lac* operator를 제거하고 *pho* box가 포함된 *phoA* promoter를 삽입하여 구축하였다. pEAAP가 인 제한 환경에서 특이적으로 발현되는지 조사하고자 *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* (KCTC 8913P)의 phytase 유전자인 *Bsa-phy1*을 도입한 pEAPHY1을 구축하였다. CK-PHY1 (pEAPHY1을 도입한 *Escherichia coli* JM109)는 인 제한 환경에서 41 kD의 *Bsa-Phy1*을 발현하였다. 또한, CK-PHY1은 phytate를 유일한 인산원으로 첨가된 고체배지에서 phytate를 분해하여 투명대를 형성하였다.

Key words □ *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Enterobacter aerogenes*, expression vector, *phoA* promoter, phosphate-limitation, phytase

인(phosphorus)은 생물의 생장에 다량으로 필요한 영양원(macronutrient)이다. 토양은 풍부한 인산이 함유되어 있으나 미생물과 식물이 유용할 수 있는 가용성 인산은 극히 미비하다(3). 따라서, 경작지와 시설재배지의 경우 무기인산이 든 비료를 주기적으로 공급하여 작물의 생장을 촉진하고 있다. 그러나, 첨가되는 가용성 인산의 80% 이상은 토양 내 칼슘, 알루미늄과 철 등의 이온과 결합하여 불용성 인산 화합물을 형성함으로써 식물이 사용할 수 없는 무기질성 인화합물로 축적된다(7). 또한, 토양에는 유기질성 인화합물이 다량 존재하는데 이중 50% 이상을 차지하는 것은 미생물과 식물이 생산하는 inositol phosphate (soil phytate)이다. 이러한 phytate도 불용성 인화합물로서 토양을 가용성 인이 제한된 환경으로 만든다(2). 그러나, 이와 같은 토양 내 불용성 인화합물도 일부의 토양 미생물에 의해 분해가 가능한 것으로 알려졌다. 현재까지 불용성 인화합물의 분해에 관련하여 유기산 합성에 관여하는 pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthase (6), acidic phosphatase (8)와 phytase (4) 등에 대한 유전자 연구가 이루어졌다.

세균은 가용성 인이 부족한 환경에 적응하기 위해서 특유의 신호전달 체계로서 two-component signal transduction system으로 PhoR (sensor kinase)과 PhoB (transcription activator)를 지니고 있다. 이들은 인산화 및 탈인산화 과정을 거치면서 인산 결핍 환경에서 특정의 하류 유전자들의 발현을 조절하는데 이때 PhoB에 의해 발현이 조절되는 유전자들을 총칭하여 phosphate

(*pho*) regulon이라 한다(1). PhoB는 *pho* regulon에 속하는 유전자의 promoter 부위에 있는 *pho* box에 부착하여 전사를 유도하게 된다. *pho* regulon에 속하는 유전자 중 alkaline phosphatase는 PhoB에 의해 인 결핍시 그 발현이 150 배 이상 증가되는 것으로 밝혀졌다(9).

본 연구에서는 인 결핍 환경인 토양에서 불용성 인화합물의 분해유전자를 효과적으로 발현시켜 토양의 가용성 인을 증가시키는 연구의 일환으로 인 결핍 환경에 특이적으로 발현되는 발현벡터를 구축하였기에 보고하고자 한다. 본 발현벡터는 각종 불용성 인화합물 분해 유전자를 도입하여 토양 내 불용성 인화합물을 가용화시킬 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

*Enterobacter aerogenes*의 *phoA* promoter (*Ea-phoAP*)의 확보

Enterobacter aerogenes IFO 12010 (ATCC 15038)로부터 min-Mu phage를 이용하여 *in vivo* molecular cloning 방법을 통해 확보한 *phoA* 유전자와 CAT assay를 통해 확인된 promoter 부위의 염기서열 정보를 활용하였다. *E. aerogenes phoA*의 염기서열로부터 APF primer (5'-CGGGATCCAGATCTTGTGAC-CAGT-3', *Bam*HI와 *Bgl*II 삽입)와 APR primer (5'CCCAAGC-TTCTAGATAATTTAC-3', *Hind*III와 *Xba*I 삽입)를 합성하였다. PCR은 PCR primix (Bioneer, Changwon, Korea)에 APF와 APR primer를 각각 10 mg/l 씩 첨가하고 주형으로 *E. aerogenes*의 *phoA* promoter가 포함된 subcloning plasmid인 pSH33 10 ng을 첨가하

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-520-5781, Fax: 042-520-5785
E-mail: kslee@mail.pcu.ac.kr

었다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 1회 처리하고, 94°C 30초, 40°C 1분, 72°C 1분을 30회 반복한 후 72°C에서 5분간 합성하였다.

인 걸핍 환경 특이적 발현 벡터 (pEAAP) 구축

pET-22b(+) (Novagen)를 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하여 T7 promoter와 *lac* operator를 제거하였다. PCR로 확보한 *Ea-phoAP*를 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하였고 이들을 ligation하여 pEAAP를 구축하였다. APF와 APR primer를 이용하여 pEAAP의 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 결정은 배재대 TIC의 자동 염기서열 결정기(CEQ2000, Beckman)를 이용하여 수행하였다.

Phytase 유전자의 cloning

Bacillus subtilis var. *amyloliquefaciens* (KCTC 8913P)의 phytase 유전자의 염기서열로부터 coding region을 cloning하고자 Phy-1 primer (5'-GGAATCCATATGAATCATTCAAAAACACTT-3', *Eco*RI과 *Nde*I 삽입)와 Phy-4 primer (5'-GCGAGCTCGTTA-TTTCCGCTTCTGTCGG-3', *Sac*I과 stop codon 포함)를 제작하였다. PCR primix (Bioneer, Changwon, Korea)에 10 mg/l의 농도로 각각의 primer를 첨가하고 여기에 *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*의 phytase 1의 유전자(*phy1*)를 pBluescript SK(+)에 cloning한 p1114-5 (*phy1*의 promoter부터 stop codon이 포함되어 있음) 10 ng을 template로 첨가하였다. PCR 반응은 94°C, 4분간 열처리한 후 94°C 30초, 50°C 1분, 72°C 1분을 30회 반복하였고 72°C에서 5분간 합성하였다. PCR 산물을 *Eco*RI과 *Sac*I으로 절단하여 pBluescript SK(+)에 삽입하여 pBsa-PHY1을 구축하였다.

Phytase 유전자를 도입한 pEAPHY1의 구축 및 Bsa-Phy1의 발현

pEAAP과 pBsa-PHY1를 *Nde*I과 *Sac*I으로 절단하여 pEAAP 벡터와 *Bsa-phy1* DNA를 각각 분리하였다. 이들을 ligation하여 pEAPHY1을 구축하고 이를 JM109에 형질전환하였다. *Bsa-phy1*의 발현이 인 제한환경에서 유도되는지 확인하기 위하여 pEAPHY1이 형질전환된 JM109 균주(CK-PHY1)를 LB-amp 배지에서 18시간 배양한 후 100 μ l의 세포를 수거하여 ampicillin이 든 Glu-MOPS LP (0.1 mM Pi) 배지(5)에 접종하였다. 접종 후 5, 6, 12 및 24 시간에 세포를 수거하고 초음파 마쇄기로 단백질을 추출하였다. 12% SDS-PAGE gel에 동량의 단백질을 접종하여 Bsa-Phy1의 발현양상을 조사하였다.

Phytate 분해능 조사

Phytate의 분해능을 조사하고자 CK-PHY1, p1114-5를 지닌 DH5 α , pEAAP를 지닌 JM109와 *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* (KCTC 8913P) 균주의 단일 colony를 Glu-MOPS 배지에 15% Novel agar (Difco, Detroit, USA) 첨가하여 autoclave한 후 0.5% phytic acid-dodecasodium salt (Sigma, St. Louis, USA)를 첨가하여 만든 고체배지에 접종하였다. 37°C에서 1일간

배양하여 투명환의 생성을 조사하였다.

결과 및 고찰

*E. areogenes*의 *phoA* promoter (*Ea-phoAP*)가 든 pEAAP 특성

pSH33으로부터 APF와 APR primer를 이용한 PCR을 통해 *E. areogenes*의 *phoA* promoter (*Ea-phoAP*)를 포함하는 134 bp의 PCR 산물을 확보하였다. *Ea-phoAP*에는 *pho* box로 예상되는 5'-CTGTCATTTTTTTGTCAC-3'와 -10 부위(5'-TAAAGT-3')가 포함되어 있다. *Ea-phoAP*를 *Bgl*II와 *Xba*I으로 절단하여 pET-22b(+)에 삽입하여 pEAAP를 구축하였다. 그 염기서열을 확인한 결과는 Fig. 1과 같았다. pEAAP는 pET-22(+의 multicloning site을 모두 지니고 있으나 T7 promoter와 *lac* operator를 *Ea-phoAP*로 치환한 것으로 인 제한환경에서 PhoB가 부착되어 전사가 개시될 수 있는 *pho* box가 promoter역할을 하도록 만든 것이다. 따라서, pEAAP 발현벡터는 인 제한 환경에서 정상적인 PhoB-PhoR two-component transcriptional signal system이 작동하는 host에서 발현이 유도될 수 있다. 또한, pET-22b(+벡터의 특징인 N-terminal 쪽에 *pelB* signal peptide와 C-terminal 쪽에 6xHis-tag가 부착되는 fusion protein을 발현시킬 수도 있다.

pEAAP를 이용한 Bsa-Phy1의 발현 및 phytate의 분해

B. subtilis var. *amyloliquefaciens* (KCTC 8913P)의 phytase gene의 coding region을 Phy-1과 Phy-4 primer를 이용하여 PCR을 통해 확보한 후 pBluescript SK(+)에 cloning하여 pBsa-PHY1을 구축하였다. Cloning된 *Bsa-phy1*은 start codon인 ATG와 stop codon인 TAA를 지니고 있으며 start codon인 ATG의 5'쪽에 CAT를 첨가해 *Nde*I site를 지니게 한 것으로 *Nde*I과 *Sac*I으로 절단하여 pEAAP에 삽입하여 발현 벡터인 pEAPHY1을 구축할 수 있었다. 따라서, pEAPHY1은 *pelB* signal peptide와 6xHis tag가 부착되지 않은 phytase인 Bsa-Phy1을 발현할 수 있다. pEAPHY1을 *E. coli* strain인 JM109에 삽입하여 CK-PHY1을 확보하였다. JM109는 Glu-MOPS 배지에 2 mM의 phosphate (HP)

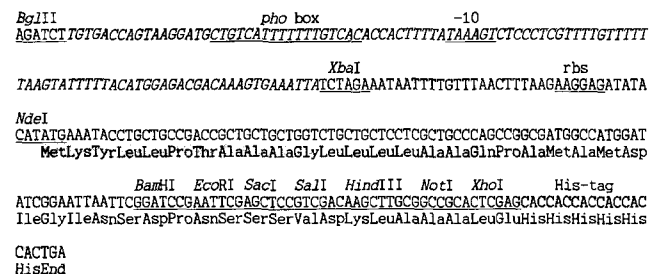


Fig. 1. pEAAP cloning/expression region. Italic letters indicate the promoter of *Enterobacter aerogenes phoA* gene. The *pho* box and -10 regions are indicated by underline and italic letter. Restriction enzyme sites and ribosomal binding site are indicated by underline. The *pelB* leader is indicated by shaded amino acid sequences. His-tag region is indicated by the shaded nucleotide sequences.

와 0.1 mM의 phosphate (LP)를 첨가하여 배양하였을 때 오직 LP에서만 bacterial alkaline phosphatase (Bap)의 활성이 높아지는 전형적인 PhoB-PhoR two-component transcriptional signal system이 작동됨을 Bap의 기질인 XP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-*p*-toluidine)를 분해하여 blue dye를 형성하는 능력의 증가를 통해 확인하였다(결과 미제시). CK-PHY1을 LB에서 배양한 후 LP배지에서 배양하여 *Bsa-Phy1*의 발현을 확인한 SDS-PAGE gel은 Fig. 2에 제시하였다. LP 배지에서 12 시간부터 41 kDa의 *Bsa-Phy1*이 발현됨을 확인할 수 있었다. CK-PHY1이 phytate을 분해할 수 있는가를 고체배지에서 확인한 결과는 Fig. 3에 제시하였다. Phytate를 인의 유일한 공급원으로 제공한 고체배지에서 CK-PHY1과 KCTC 8913P는 투명환을 형성함을 확인할 수 있었다. 이는 *Bsa-phy1* 유전자를 pEAAP 벡터에 도입했을 때 인 제한 환경에서 특이적으로 *Bsa-Phy1*을 생산하여 phytate를 분해할 수 있음을 보여준 것이다. KCTC 8913P에서 phytase 분해능을 보인 결과는 Kerovuo 등(4)이 *B. subtilis* VTT E-68013에서 phytate를 유일 인산원으로 사용할 경우 phytase의 분비가 유도된다는 결과와 유사하였다. 그러나, pEAAP가 형질전환된 JM109와 p1114-5가 형질전환된 DH5 α 는 투명환을 형성하지 못하였다. 이는 p1114-5에 포함된 KCTC8913P의 phytase1 유전자의 promoter가 DH5 α 에서 작동하지 못하는 때문인지 현재까



Fig. 2. SDS-PAGE analysis of *Bsa-Phy1* protein expression under 0.1 mM phosphate media in CK-PHY1 strain. Protein maker is indicated by M. Proteins were extracted at the indicated time (hour) after inoculation. LB indicates the proteins which are extracted from the cell growing in LB media. *Bsa-Phy1* protein (41 kDa) is indicated by double arrow.

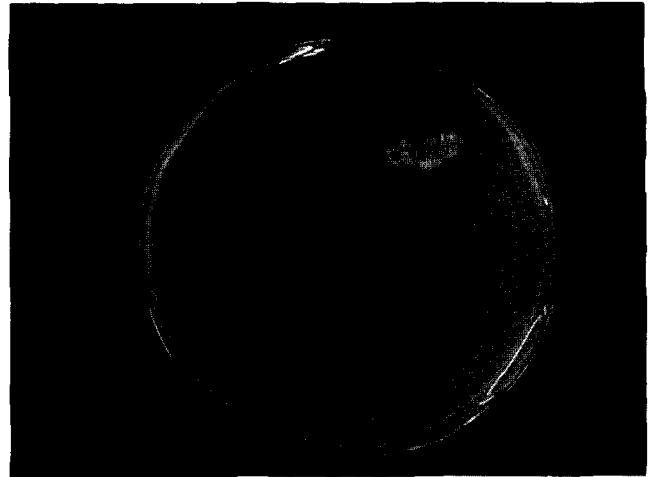


Fig. 3. Phytate degrading ability of CK-PHY1 and KCTC 8913P. Degradation of phytate is detected as a clear zone. Strains are indicated by the name of transferring plasmid. p1114-5, pBluescript SK(+) containing promoter and coding region of phytase1 gene of KCTC 8913P; pEAAP, pET-22b(+) containing promoter of *phoA* gene of *Enterobacter aerogenes*; pEAPHY1, pEAAP ligating *Bsa-phy1* gene (contains only coding region); KCTC 8913P, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*.

지의 결과로는 결론을 내릴 수 없으며 이에 대한 상세한 연구가 필요하다고 판단된다. 이상의 결과는 *E. aerogenes*의 *phoA* 유전자 promoter가 효과적으로 인 제한 환경에서 재조합된 *Bsa-phy1*을 발현시킬 수 있음을 보여준 것이다. Xu 등(10)은 *E. coli*의 *phoA* promoter와 signal peptide를 포함한 발현벡터에서 mouse의 endostatin을 과발현을 유도하고 분비시킨 바가 있다. pEAPHY1에 포함된 *Bsa-Phy1*에는 signal peptide로 예상되는 아미노산서열이 포함되어 있어 발현시 세포밖으로 분비될 것으로 기대되었다. 본 연구에서도 Fig. 3에 제시한 바와 같이 CK-PHY1과 KCTC 8913P에서 고체배지에 포함된 phytate를 분해하여 투명환을 형성하는 것으로 보아 세포 외부로 분비되는 것으로 판단된다. 앞으로 pEAAP에 포함된 *peB* signal peptide와 6xHis tag을 활용한 fugion phytase를 생성하는 발현벡터를 구축하여 활용한다면 발현유도된 phytase의 분리, 정제를 보다 쉽게 이룰 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구결과로 구축된 pEAAP에 다양한 불용성 인화합물을 분해할 수 있는 유전자(다양한 미생물로부터 유래된 phytase나 PQQ synthase 혹은 C-P lyase 등)를 도입한다면 가용성 인이 부족한 토양에서 phytate, hydroxyapatite와 인광석 등과 같은 불용성 인화합물로부터 가용성인을 생산하여 토양 미생물이나 식물의 생장에 필요한 가용성 인을 공급할 수 있는데 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단지정 지역협력연구센터인 배재대학교 바이오의약연구센터 (Bio-Med RRC), 과학기술부의

원자력연구개발프로그램 및 농림부의 농업기술개발 연구비의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 김수기, 이기성. 2000. 세균에 있어서 phosphate regulon의 transcriptional activator, PhoB의 역할. *생화학 뉴스* 20, 145-150.
2. Anderson, G. 1980. Assessing organic phosphorus in soils, p. 411-432. In F.E. Khasawneh, E.C. Sample, E.J. Kamprath (eds.), *The role of phosphorus in agriculture*. Amer Soc Agronomy, Madison, Wisconsin.
3. Goldstein, A.H. 1994. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria, p. 197-203. In A. Torriani-Gorini, E. Yagil, S. Silver (eds.), *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC.
4. Kerovuo, J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen, and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2079-2085.
5. Lee, K., W.W. Metcalf, and B.L. Wanner. 1992. Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 174, 2501-2510.

6. Liu, T.S., L.Y. Lee, C.T. Tai, C.H. Hung, Y.S. Chang, J.H. Wolfram, R. Rogers, and A.H. Goldstein. 1992. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: Nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *J. Bacteriol.* 174, 5814-5819.
7. Richardson, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability, p. 50-62. In C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta, P.R. Grace (eds.), *Soil biota, management in sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne, Australia.
8. Thaller, M.C., F. Berlutti, S. Schippa, P. Iori, C. Passariello, and G.M. Rossolini. 1995. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass polypeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4, 255-261.
9. Wanner, B.L. and B.D. Chang. 1987. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169, 5569-5574.
10. Xu, R., P. Du, J. Fan, Q. Zhang, T. Li, and R. Gan. 2002. High-level expression and secretion of recombinant mouse endostatin by *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* 24, 453-459.

(Received October 29, 2002/Accepted November 27, 2002)

ABSTRACT: Construction of the Phosphate-Limitation Inducible Expression Vector Containing the *phoA* Promoter of *Enterobacter aerogenes*

Hwa-Hyoung Chang¹, Byung-Hoon Kho², Shin-Young Park², Sung-Ho Lee², Sung-Jin Kim², You-Jung Lim², Gabjin Han², Young-Ho Kim², Young-Keun Lee⁴, and Ki-sung Lee^{*1,2,3} (¹Bio-Med RRC, ²Department of Biology & Medicinal Science, PaiChai University, Daejeon 302-735, Korea, ³Eco-Bio-Med Co. Ltd., Daejeon 302-120, Korea, ⁴Radiation Application Division, Korea Atomic Energy Research Institute, Yuseong P.O. Box 105, Daejeon 305-600, Korea)

To induce recombinant protein under phosphate restricted conditions such as soil, we have constructed the expression vector (pEAAP) with *phoA* gene promoter of *Enterobacter aerogenes*. To construct the pEAAP, deletion of the T7 promoter and lac operator from pET-22b(+) by *Bgl*III-*Xho*I digestion and addition of the *phoA* gene promoter (containing the *pho* box) were performed. To test pEAAP as an expression vector controlled by phosphate limitation, pEAPHY1 was constructed with the phytate gene (*Bsa-phy1*) of *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* (KCTC 8913P). Under the phosphate-limitation condition, CK-PHY1 (*Escherichia coli* JM109 was transformed with pEAPHY1) expressed the 41 kD Bsa-Phy1. Also CK-PHY1 formed the clear zone in solid medium containing phytate as a sole phosphate source.