

Synechocystis sp. PCC 6803의 에너지 대사 결함 돌연변이 균주에서의 Poly(3-hydroxybutyrate) 축적량 증진

김수연 · 최강국 · 박연일¹ · 박영목² · 양영기^{3*} · 이영하^{**}

충남대학교 미생물학과, ¹충남대학교 생물학과, ²한국기초지원연구원 프로테오믹스팀, ³조선대학교 유전공학과

본 연구에서는 남세균인 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn6803)을 대상으로 transposable element Tn5를 이용하여 획득된 1,200 여 돌연변이주로부터 모균주에 비하여 PHB 축적량이 크게 증진된 균주를 선별하고, Tn5 삽입에 의해 결함을 나타낸 유전자를 확인함으로써 Syn6803에서의 PHB 생합성에 영향을 주는 세포내 생리학적 요인을 조사하고자 하였다. 모균주인 야생형 균주의 경우 질소원이 제한된 BG11₀ 배지에서의 PHB 생합성량이 전체량의 4% (w/w) 수준인데 반하여, 10-34%의 생합성량을 보이는 25개의 돌연변이 균주를 얻을 수 있었다. Inverse PCR을 이용하여, 선별된 돌연변이 균주내 돌연변이가 일어난 유전자를 조사한 결과, 아직까지 그 기능이 규명되지 않은 유전자가 대부분이었으나, NADH-ubiquinone oxidoreductase, O-succinylbenzoic-CoA ligase 또는 photosystem II PsbT protein과 같이 광합성과 호흡에 관여하는 유전자에 돌연변이가 일어난 4 균주와 histidine kinase가 결여된 1 균주가 확인되었다. 이들 균주를 대상으로 pulse-amplitude modulated fluorometer를 이용하여 세포내 NAD(P)H/NAD(P)⁺비를 측정된 결과, 에너지 대사 흐름의 차단에 의해 세포내의 NAD(P)H/NAD(P)⁺비가 모균주에 비하여 현저하게 높은 것으로 나타났다. 이는 잉여의 전자로 포화된 세포, 즉 NAD(P)H에 의해 환원적 상태를 유지하고 있는 세포의 경우 PHB 축적이 증진될 수 있음을 시사한다. 이러한 사실은 인위적으로 광합성과 호흡 관련 유전자가 제거되어 NAD(P)H/NAD(P)⁺비가 높아진 것으로 알려진 다수의 Syn6803 돌연변이 균주들을 대상으로 PHB 생합성량을 조사한 결과로부터 재확인되었다.

Key words □ NADPH/NADP⁺ ratio, poly(3-hydroxybutyrate), *Synechocystis* sp. PCC 6803, transposon mutagenesis

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 과량의 탄소원이 존재하는 조건에서 질소, 인, 황 등의 영양원이나 배양액내의 용존산소가 고갈되어 영양상태가 불균형적 조건을 형성하고 있을 때, 에너지 및 탄소원으로서 미생물의 세포내에 축적되는 저장성 폴리머 고분자이다(3, 13). PHA를 이루는 단위체의 조성은 미생물과 공급되는 탄소원에 따라 달라질 수 있으며, 지금까지 약 150 여 종류의 단위체가 알려져 있다(19). PHA를 생합성하는 미생물은 그들이 가지고 있는 PHA synthase의 종류에 따라 크게 두 그룹으로 구분된다(13). 첫 번째 그룹은 short-chain-length (SCL)-PHA synthase를 가지고 있어 단위체의 탄소수가 5 이하인 SCL-PHAs를 생합성할 수 있으며, 두 번째 그룹은 medium-chain-length (MCL)-PHA synthase를 가지고 있어, 단위체의 탄소수가 여섯 이상인 MCL-PHAs를 생합성한다.

PHA는 생분해성, 생체적합성, 열가소성, 키랄성의 특징을 가지고 있어 환경오염원이 되고 있는 합성고분자의 대체 소재로 사용될 수 있는 장점을 가지고 있으나, 기존의 합성고분자에 비하

여 생산비가 높아 상업화에 제한을 받고 있다. PHA 생산비 중 탄소원의 비용이 약 40% 정도를 차지하고 있음을 고려해 볼 때 (8), 광합성세균을 이용한 PHA 생산은 생산비를 절감할 수 있다는 점에서 많은 관심을 모으고 있다. 이미 *Spirulina*, *Synechocystis*, *Gloeocapsa* 등과 같은 여러 종류의 광합성세균의 경우 SCL-PHAs를 생합성할 수 있음이 보고되고 있는데(2, 14, 21), 일부 광합성세균을 제외한 대부분은 SCL-PHAs 중에서도 poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)만을 생합성한다. 그러나 광합성세균의 경우 SCL-PHAs를 생합성하는 다른 미생물과 비교하여 볼 때 생합성량이 적다는 단점을 가지고 있다(4, 14).

PHB의 생합성은 β -ketothiolase (PhaA), NAD(P)H-dependent acetoacetyl coenzyme A reductase (acetoacetyl-CoA reductase) (PhaB)와 PHA synthase (PhaC)의 3가지 효소에 의해 이루어진다. 먼저 대사과정 중 형성된 acetyl-CoA 두 분자가 β -ketothiolase에 의해서 acetoacetyl-CoA로 축합된 후, acetoacetyl-CoA reductase에 의해서 3-hydroxybutyl-CoA로 되고, 마지막으로 PHA synthase에 의해 중합반응이 일어나 단일중합체(homopolymer)인 PHB가 생합성된다(19). 따라서 PHB 생합성은 이와 같은 3가지 효소의 활성에 의해 직접적인 영향을 받지만 세포내 다른 대사 작용이나 세포의 생리적 상태에 의해서도 생합성이 조절될 수 있다.

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 062-230-6663, Fax: 062-234-4326

E-mail: ygyang@chosun.ac.kr

**To whom correspondence should be addressed.

Tel: 042-821-6413, Fax: 042-822-7367

E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr

본 실험에서 이용한 남세균 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Syn6803)은 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*와 마찬가지로 형질전환 능력이 뛰어나 쉽게 돌연변이 균주를 만들 수 있으며, 전체 유전체의 염기서열이 규명되어 있어 기능유전체학 연구 수행에 매우 유리한 특징을 갖고 있다(6). 이를 바탕으로 최근에는 PHB 생합성 유전자들에 대한 open reading frames (ORFs)가 확인된 바 있다(4, 20). 특히 국내의 Syn6803 균주은행인 SMCC (*Synechocystis* sp. PCC 6803 Mutants Culture Collection)에서는 transposable element인 Tn5를 Syn6803 균주의 DNA에 삽입하는 random mutagenesis 방법을 통해 만들어진 다수의 돌연변이 균주를 보유하고 있는데 (www.kbsi.kr/jschoi/smcc), 이러한 돌연변이 균주는 PHB 생합성에 영향을 주는 유전자들을 확인하고 대사 경로의 네트워크를 이해하는데 매우 좋은 재료가 될 수 있다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 Syn6803로부터 만들어진 다수의 Tn5 돌연변이 균주에서 PHB 축적량이 높은 돌연변이를 선별하여 Tn5가 삽입된 유전자를 확인하고, 유전자 결실에 따른 균주의 상태와 PHB 생합성간의 관계를 조사함으로써, PHB 생합성 조절 기작을 이해하고 더 나아가 PHB 생산을 증대시키기 위한 metabolic engineering의 기본 자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에서 사용된 *Synechocystis* sp. PCC 6803 (야생형)와 Tn5 transposon을 이용한 무작위 돌연변이에 의해 제조된 약 1,200 여개의 돌연변이 균주는 모두 Syn6803 균주은행인 SMCC로부터 분양받았다. 모든 균주는 glucose가 첨가된 BG11 배지 (16)에서 3일간 배양하여 보관하였으며, PHB 생합성을 위해서는 NaNO_3 가 제한된 BG11₀ 배지에 glucose를 첨가하여 빛과 유기물이 함께 있는 mixotrophic한 영양조건으로 28°C의 조도진탕배양기(광의 세기는 $\sim 150 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$)를 이용해 250 ml 삼각플라스크(배양액 50 ml)에서 5일간 배양하였다. 다만 돌연변이 균주는 kanamycin 내성 유전자를 가지고 있으므로 배양시 kanamycin (20 μg)을 첨가해 주었다.

PHB 분석

BG11₀ 액체배지에서 5일간 배양 한 후 원심 분리(12,000 rpm/15분)하여 얻은 균체를 동결건조하였다. 건조된 균체는 일정량의 sea sand와 섞은 후 막자사발로 갈고, 분쇄된 세포를 thimble filter (Advantec Co., USA)에 넣고 soxhlet extractor를 사용하여 chloroform으로 PHA를 추출하였다(9). 추출된 PHB는 10배 부피의 ethanol에 침전시킨 후 filtration으로 고분자만 수확하여 건조시켰다. 건조된 고분자를 diethylether로 세척하여 색소를 빼내었으며, 침전과 세척을 수회 반복하여 정제하였다. 수확된 PHB의 정량은 앞서 발표된 방법(7)에 따라 gas chromatography (GC, Hewlett-Packard 5890, USA)를 이용하여 수행하였다.

Inverse PCR 수행

돌연변이 균주의 genomic DNA를 *TaqI* 제한효소를 처리한 후, 얻어진 fragment들을 T4 ligase를 이용하여 16°C에서 self-ligation시켰다. 이 ligation된 DNA를 주형으로 하고, 알고 있는 Tn 부위 중 5' 부분을 primer로 잡아서 inverse PCR을 수행하였다(Fig. 1). 이때 사용한 primer는 TNS01 (5'-CCGCACGATG AAGAGCAGAA-3')와 TNA01 (5'-CGCTTACCGATTITACCGCA-3')이었다. PCR반응은 genomic DNA를 주형으로 각 primer 10 pmol, ExTaq polymerase (TaKaRa) 1.5 units, 10 mM dNTP와 10 x Taq polymerase buffer를 넣은 반응액을 만들어 GeneAmp system 2400 (Perkin Elmer Co.) 을 이용하여 94°C에서 50 sec, 58°C에서 50 sec, 72°C에서 90 sec 조건으로 32회 반복하였다. PCR을 통해 얻은 산물은 gene clean후 염기서열 분석기기 (Perkin Elmer Co. model 377, version 3.3)를 이용하여 Syn6803에서의 Tn 삽입 부위를 확인하였다. 이 때 사용한 primer는 inverse PCR에 이용한 primer (TNA01과 TNS01)와 동일하였다.

광계 II의 형광과 NAD(P)H 전환량 측정

선별된 균체 중 광합성 및 호흡 관련 유전자에 Tn이 삽입된 균주를 대상으로 세포내 산화/환원 정도 및 NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio를 pulse amplitude modulated (PAM) fluorometer를 이용하여 측정하였다. 균주의 산화/환원 상태 측정은 세포의 틸라코이드 막 내부에 존재하는 광계 II의 상태를 조사함으로써 알 수 있다

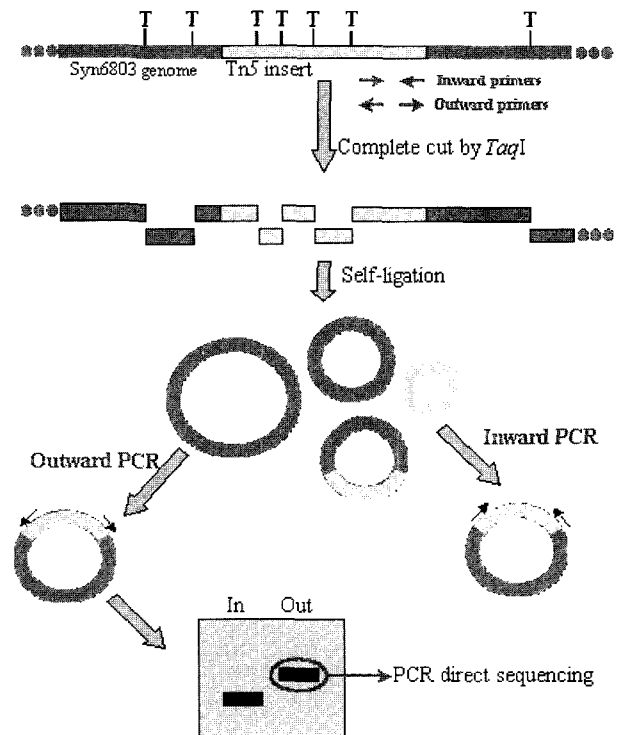


Fig. 1. Schemes for the identification of Tn-inserted gene by inverse PCR.

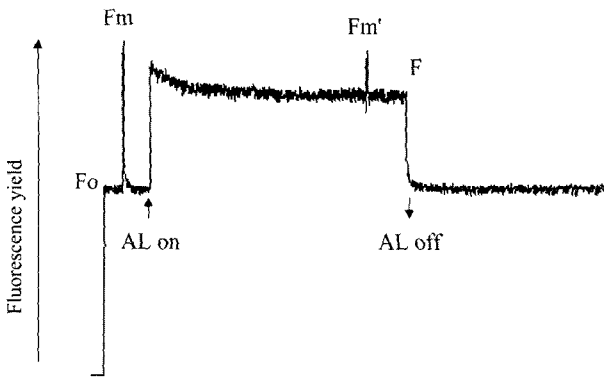


Fig. 2. Typical example of Chl fluorescence for the measurement of photochemical efficiency of photosystem II (PSII). AL; actinic light.

(1). 광계 II의 상태는 ED-101US/D, PAM data acquisition system (PDA-100), temperature control unit US-T과 emitter-detector-cuvette 이 장착된 pulse amplitude modulated fluorescence measuring system (Xe-PAM, Heinz Walz, GmbH, Effeltrich, Germany)을 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 PHB 생합성 배지인 BG11₀에서 5일간 배양 후 측정하였다. Syn6803에서 Chl fluorescence profile의 전형적인 예는 Fig. 2와 같다. 암적용 상태에서 광계 II center에 약한 빛 4 Hz 을 비추면 Fo 까지 형광이 증가한다. 다시 800 ms, 2800 μmol photons m²s⁻¹의 강한 빛을 광계 II에 비추면 Fm 까지 형광이 증가하는데, 이 때의 수치가 광계 II에 전자가 최대 포획 될 수 있는 수치이다. Fm에서 Fo를 빼 값을 Fv (maximum variable fluorescence)라 하며, Fv/Fm 값은 광화학 반응에 대한 양자수율의 최대치를 의미한다(11). 측정광(measuring light)을 비추어 Fo 형광값을 측정하고, 암적용된 곳에 포화광을 비추어 최대 형광 값인 Fm을 측정한다. 광합성이 일어나게 하는 광을 비추어(actinic light, AL), 즉 세포가 광합성 하는 동안에 포화광을 비추어 측정한 최대 형광 값인 Fm을 측정한다. 이렇게 얻어진 측정값을 통해 이 균주의 광합성 능력 수율은 (1-F)/Fm'에 의해 계산하였다. 이때 F는 광이 사라졌을 때의 형광값이다. 본 실험에서는 배양액 1 ml을 cuvette에 담고 28°C에서 암적용 시킨 후 PAM을 측정하였다(12).

또한, 배양 시간 경과에 따른 NAD(P)⁺로부터 NAD(P)H로의 변환량 측정을 위해 사용된 emitter는 UG11 filter이며, detector는 BG18, KV418 filter를 사용하였다. 30초간의 암적용 후, actinic light는 400 μmol photons m²s⁻¹으로 1분간 주었다. 모든 실험은 PHB 생합성 배지인 BG11₀에서 키운 균주를 대상으로 측정하였고, 이때 세포의 클로로필 량을 16 μl로 동일하게 측정하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 균주 분리

Synechocystis sp. PCC 6803는 BG11 배지에서 조도배양하였을 때 PHB를 축적하지 않았으나, 질소원이 제한되고 0.15 g/L

glucose를 포함하는 BG11₀ 배지에서 5일간 조도배양시 건체량(dry cell weight, DCW)의 4% (w/w)에 해당하는 PHB를 축적하였다(미제시 자료). 또한, glucose 대신 다른 탄소원을 사용하여 배양하였을 때의 PHB 축적량은 2% 이하의 수준으로 매우 낮았다. 이러한 예비실험을 바탕으로 본 실험에서는 빛과 유기물(glucose)이 같이 존재하는 mixotrophic한 조건에서 1,200여개의 Tn5 돌연변이 균주들을 BG11₀ 액체배지에서 배양하고, gas chromatography 분석을 통해 PHB 생합성능을 분석하였다. 그 결과, PHB 축적량이 10-20% 수준으로 나타난 21개의 균주와 20% 이상의 축적량을 보인 4개의 균주를 선별하였다.

Inverse PCR을 통한 Tn 삽입 유전자 확인

선별된 25개의 돌연변이 균주를 대상으로 균주의 genome상에 Tn이 삽입된 유전자 부위를 확인하기 위하여 inverse PCR을 수행하여 얻은 PCR 산물의 염기서열을 분석하고, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)을 이용한 Cyanosite (<http://www.cyanosite.bio.purdue.edu/>)의 *Synechocystis* sp. PCC 6803 전체 유전체 염기서열과의 비교를 통하여 해당 유전자를 확인하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 Tn5 삽입에 의해 손상된 유전자는 모두 14 종류이었으며, 7개 돌연변이 균주의 손상된 유전자는 그 기능이 밝혀지지 않은 것으로 나타났다. 한편, 선별된 돌연변이 균주의 손상된 유전자 발현산물의 기능을 유형별로 구분하였을 때 매우 다양한 것으로 나타났다(Table 2). 그 중에서 호흡과 광합성 대사에 관련되는 유전자에 Tn5가 삽입되어진 균주는 모두 5 균주(E1-33, E2-36, M19-1, M24-27, LJS04-22)로서 가장 많은 부분을 차지하였다.

E1-33 균주의 경우, photoreceptor에의 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 histidine kinase 유전자가 결여된 균주이다. 또한 E2-36, M19-1, M24-27 균주의 경우, cytoplasm에 위치하는 NADH dehydrogenase를 암호화하는 유전자 부위에 Tn5가 삽입된 것으로, NADH dehydrogenase는 광합성과 호흡 모두에 관여한다(17). Syn6803는 빛이 없는 조건에서도 약간의 ATP 생성이 일어나며, 성장이 가능하다. 그것은 빛이 없는 조건에서 광계 II에서 빛을 이용하여 전자를 생성하여 전달하는 경로가 아닌, NADH dehydrogenase에 의해 NADH의 산화를 통하여 생성된 전자가 quinone pool로 옮겨져 궁극적으로 ATP 생성이 일어날 수 있기 때문이다(17). 앞의 세 균주는 이 부위에 Tn5가 삽입된 경우로 이 경우에는 전자의 전달이 원활하게 일어나지 못하게 된다. 마지막으로 LJS04-22 균주의 경우는 광합성의 첫 번째 단계인 광계II을 이루는 subunit인 PsbT 단백질을 이루는 유전자에 Tn5가 삽입되어진 경우로 이 경우에도 빛이 있는 조건에서 전자의 전달이 원활하게 이루어지지 않을 것으로 추정된다.

PAM fluorometer를 통한 광계II의 형광 조사

앞에서 기술한 바와 같이 광합성과 호흡에 관련된 유전자에 Tn이 삽입된 다섯 균주의 경우 세포내의 전자의 전달이 원활히 일어나지 않음으로써 광합성 효율에 많은 변화가 있을 것으로 예측되었다. 그 중에서도 광계 II의 상태를 확인해 보기 위해

Table 1. List of Tn-induced mutants showing high amounts of PHB accumulation and proposed function of the proteins encoded by the genes disrupted by Tn

Mutant	PHB content (wt%)	ORF	Product
E1-32	30	slr 0723	hypothetical protein (putative fibronectin type III domain)
E1-33	16	slr 1969	two-component sensor histidine kinase
E1-60	17	slr 0616	preprotein translocase SecA subunit
E1-91	18	slr 1050	hypothetical protein
E2-36	14	slr 0914	hypothetical protein(putative NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4)
M5-31	18	slr 0854	deoxyribopyrimidine photolyase
M19-1	13	slr 0914	hypothetical protein(putative NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4)
M19-13	10	slr 1404	biopolymer
M21-28	16	slr 1945	hypothetical protein
M23-5	16	slr 1917	hypothetical protein (putative α/β hydrolase fold)
M24-27	13	slr 0914	hypothetical protein(putative NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4)
Y01-6	11	slr 0983	α -D-glucose-phosphate cytidylytransferase
Y01-12	10	slr 0983	α -D-glucose-phosphate cytidylytransferase
LJS04-17	25	slr 1443	serine/threonine kinase
LJS04-19	34	slr 1959	inositol monophosphatase
LJS04-22	15	smr0001	photosystem II PsbT protein
K1-26	18	slr 1674	hypothetical protein
K2-31	13	slr 1554	hypothetical protein
M28-32	23	slr 1081	hypothetical protein
M46-6	11	slr 2002	cyanophycin synthetase
M46-8	17	slr 1917	hypothetical protein (putative α/β hydrolase fold)
M50-32	19	slr 0752	enolase
Y01-24	10	slr 1896	hypothetical protein
Y02-2	10	slr 0454	RND multidrug efflux transporter
Y02-13	11	slr 1998	hypothetical protein

PAM fluorometer를 이용하여 선별된 네 균주의 광계 II의 형광 능력을 조사한 결과, 야생형 균주의 광합성 능력이 0.12 인 반면에 돌연변이 균주들은 모두 0.04-0.07 수준으로 매우 낮았다 (Fig. 3a). 돌연변이 균주 중에서는 광계 II의 subunit인 PsbT에 Tn이 삽입된 LJS04-22 균주의 광합성 능력이 가장 낮았다. 또한, 최대 양자수율을 비교해 본 결과, 야생형 균주가 0.45인데 비하여 돌연변이 균주의 경우는 0.26-0.39의 양자수율을 보였으며, 그

중 동일한 유전자인 slr0914에 Tn이 삽입된 E2-36, M24-27과 M19-1 균주의 경우 최대 양자수율이 비슷한 것으로 나타났다 (Fig. 3b). 이를 통해 광합성과 호흡 관련 유전자에 Tn이 삽입된 돌연변이 균주들의 경우 야생형 균주에 비해 광합성 능력이 떨어지며, 결국 전자의 흐름이 원활하지 못하여 세포의 상태가 환원된 상태임을 추측 할 수 있었다.

Table 2. Classification of Tn-induced mutants showing high amounts of PHB accumulation based on the function of proteins encoded by ORFs in the Tn-inserted regions

ORF grouping	Number of mutants
Biosynthesis of cofactors, prosthetic group and carriers	1
Cell envelope	2
Cellular processes	1
DNA replication, recombination, repair, restriction, modification	2
Energy metabolism	1
Other categories: Adaptations and atypical condition	2
Photosynthesis and respiration	5
Regulatory Functions	1
Transport and binding proteins	2
Unknown protein	9

배양 시간에 따른 생장 및 PHB 생합성

야생형 균주와 광합성과 호흡 관련 유전자에 Tn이 삽입된 균주 중 E1-33, M24-27, LJS04-22 균주를 대상으로 시간에 따른 균체의 생장 및 PHB 생합성량을 조사하였다. Fig. 4a에서 보는 바와 같이 야생형 균주에 비해 돌연변이 균주는 생장이 저조하여 약 40-70% 수준의 건체량을 보였다. 이는 돌연변이 균주의 경우 광합성과 호흡이 원활히 일어나지 못하기 때문에 ATP 생성 능력이 부족하여 야생형 균주에 비해 생장이 느린 것으로 생각되어진다. 그러나 야생형 균주에 비해 모든 돌연변이 균주는 PHB 축적량이 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4b). 이는 생장이 뛰어난 야생형 균주에 비해 생장이 제대로 될 수 없는 돌연변이 균주는 탄소 및 에너지를 축적하는 방향으로의 물질대사 변화가 일어났음을 보여 준다. 특히 생장이 고조되는 대수기에는 PHB 축적량이 저조한 반면, 생장이 정체되는 시기에는 PHB 축적량이 급속히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를

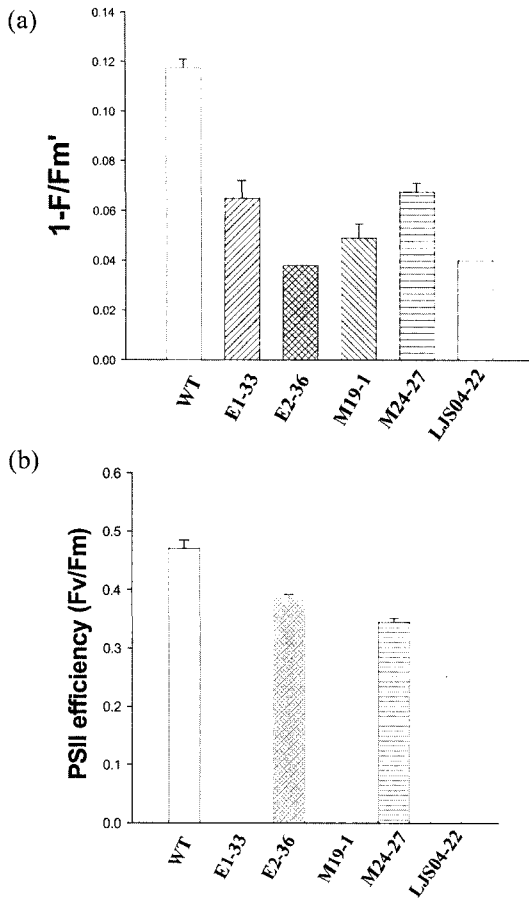


Fig. 3. The maximal photochemical efficiency of PSII measured as F_v/F_m (a) and $1-F/F_m'$ (b) fluorescence. Each bars indicate the range of experimental readings obtained (sample number, $n=3$).

불 때, 세포는 에너지를 일차적으로 성장에 이용하며, 열악한 환경시에 에너지를 저장물질로 전환시킨다고 생각된다. 따라서, 야생형 균주와 비교하여 돌연변이 균주는 PHB 축적량이 높으며, 또한 성장과 PHB 축적량 사이에는 밀접한 관계가 있는 것으로 여겨진다.

NAD(P)H의 induction transients 형광 변화

Syn6803 균주는 oxidative pentose phosphate cycle을 통해 포도당으로부터 NADPH를 생성하고, 또한 TCA cycle을 통해 NADH를 만든다. 이렇게 생성되어진 NADH와 NADPH가 광합성과 호흡 관련 대사경로 및 PHB 생합성 경로에 이용되어진다. 따라서 세포내에서의 NAD(P)H의 양적 변화는 PHB 합성에 큰 영향을 준다. 야생형 균주와 광합성 관련 유전자에 Tn이 삽입된 균주 E1-33, M24-27, LJS04-22 균주에서의 시간 변화에 따른 NAD(P)⁺로부터 NAD(P)H로의 형광변환량은 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 야생형 균주와 돌연변이 균주의 초기 NAD(P)H의 형광을 100으로 하였을 때, 시간 변화에 따른 NAD(P)H 형광을 상대적으로 계산한 결과, 야생형 균주에 비해 돌연변이 균주의 NAD(P)H로의 형광변환량이 낮은 것으로 나타났다. 즉 야생형 균주에 비하여 돌연변이 균주 세포내에 이미 환원형인 NAD(P)H의 양이 많이 존재하고 있음을 확인할 수 있었는데, 이는 돌연변이 균주의 경우 관련 유전자의 결손으로 인하여 전자의 흐름이 제대로 되지 않아 세포의 상태가 환원된 상태로 변화되고 있음을 의미한다. 앞서 Lee 등(10)은 *Ralstonia eutropha* 세포 내에 NADPH가 많은 조건에서는 citrate synthase의 활성이 억제되고 반면에 NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase가 활성화되어 PHB 생합성이 촉진됨을 보고한 바 있으며, 최근 Lim 등(11)도 NADPH 생성과 관련된 유전자의 도입에 의해 재조합 대장균으로부터의 PHB 생합성이 향상됨을 확인한 바 있다. 따라서 본 실험의 돌연변이 균주의 경우 세포의 상태가 환원된 상태, 즉 NAD(P)H가 많은 조건에서 세포내 PHB 축적량이 높아지는 것은 틸라코이드 막 주변에 산재하는 잉여의 전자들이 PHB의 합성에 관여하는 두 번째 효소인 NAD(P)H-dependent acetoacetyl-CoA reductase와 반응하여 세포내 PHB 축적량 향상에 기여하였기 때문인 것으로 생각되어진다. 이러한 결과는 *Synechocystis* sp. PCC 6803 에서의 PHB 축적이 세포 내의 산화/환원상태와 밀접한 관계가 있으며, 광합성 및 호흡과정의 손상에 의해 전자의 흐름이 제대로 되지 않아 세포 내부가 환원된 상태일 때 잉여의 전자들이 PHB 생합성을 촉진함을 보여준다. 또한, 본 실험의 결과는 Syn6803에서의 PHB 축적이 일반적으로 알려진 그림

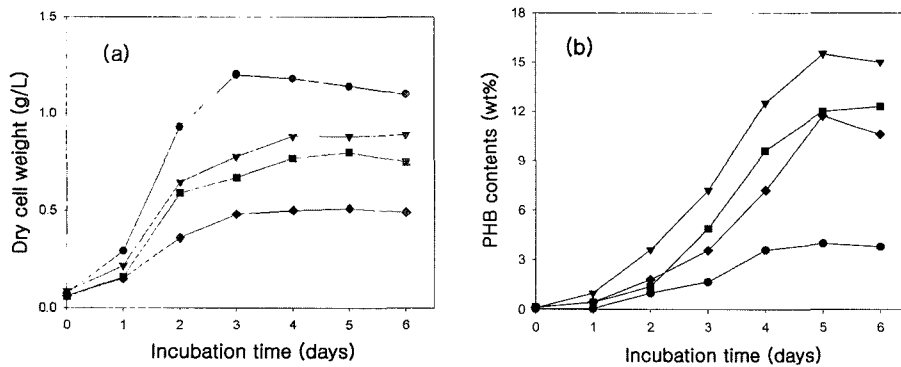


Fig. 4. Time courses of the cell growth (a) and PHB accumulation (b) during the mixotrophic cultivation of wild type and Tn-induced mutants in BG11₀ medium containing 0.15 g/L glucose. Symbol; ●, wild type; ▼, E1-33; ■, M24-27; ◆, LJS04-22.

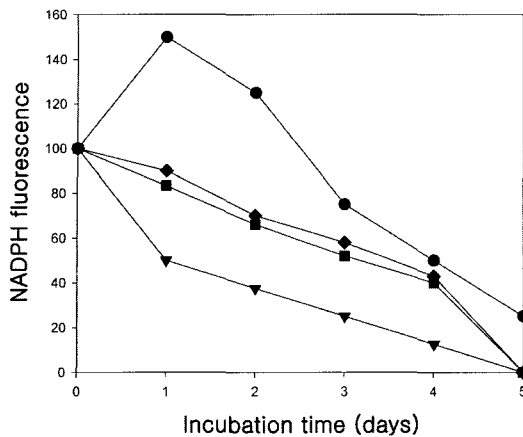


Fig. 5. Time profiles of the dark-light-dark induction transients of NAD(P)H fluorescence in wild type and Tn-induced mutants. Symbol: ●, wild type; ▼, E1-33; ■, M24-27; ◆, LJS04-22.

양성 및 음성 세균에서의 생합성 경로 이외에도 세포내 metabolic flux에 의해 많은 영향을 받고 있음을 시사하며, 이러한 사실은 PHB 축적량이 높은 돌연변이 균주의 제조를 위한 metabolic engineering의 기초 자료로도 유용할 것으로 기대된다.

광합성과 호흡 관련 유전자 결실 돌연변이에서의 PHB 함량 조사

앞에서 본 바와 같이 광합성과 호흡에 관련된 유전자에 Tn이 삽입된 돌연변이 균주들의 경우 모두 PHB 함량이 높아졌다. 따라서 이러한 현상의 재확인을 위하여 인위적으로 광합성과 호흡 관련 유전자를 제거시킨 여러 가지 돌연변이 균주에서의 PHB 함량을 조사해 보았다(Table 3). 각 돌연변이 균주의 특징 및 결실된 유전자 산물의 기능은 다음과 같다. *ApetM* 균주의 경우 cytochrome C_{6f} complex (4KDa)의 유전자인 *smr0003*을 제거시킨 균주이며, 이는 빛이 있는 조건에서 광계 II에서 만들어진 전자가 quinone pool을 지나 광계 I으로 가기 전에 존재하는 복합체로써 구조는 α -helix이며, 빛이 있는 조건에서 전자의 흐름에 관련하는 직접적인 복합체이다(18). 이 복합체를 구성하는 유전자가 결실된 돌연변이 균주는 빛이 있는 조건에서 전자의 흐름이 원활하지 못하여 quinone pool에 전자가 꽂찬 상태가 되어진다. *Δcyd*, *ΔctaDII*, *ΔctaDI* 균주의 경우는 quinol oxidase, cytochrome C oxidase를 구성하는 subunit의 유전자를 제거시킨 균주이다(5). Cytochrome C oxidase는 빛이 없는 조건에서 quinone pool의 전자를 산화시키는 역할을 수행한다. *Synechocystis* sp.

PCC 6803에는 빛이 없는 조건에서 quinone pool의 전자를 빼내는 역할을 하는 oxidase가 세 개 존재하는데, 각각 *Cyd*, *CtaDII*, *CtaDI*이다(5). 이들은 틸라코이드 막 또는 cytoplasmic 막에 존재할 것으로 예상되어진다. *CtaDI*은 틸라코이드 막에서 호흡적 전자 전달에 관여하는 효소로 보고되고 있다. Quinol oxidase, *Cyd*는 cytoplasmic 막에 위치할 것으로 예상되어지며, *CtaDII*는 아직 뚜렷한 기능이 밝혀지지 않았으나, 산소의 전자 전달에서 최소의 역할을 할 것으로 예상되어진다(5). *AndhB* 돌연변이 균주는 NADH dehydrogenase의 유전자가 제거된 균주이다(15). 이렇게 직접적으로 광합성에 관련되는 유전자를 결실시킨 돌연변이 균주를 대상으로 PHB 축적 배지인 BG11₀에서 5일간 배양 후, PHB 함량을 조사해 보았다. 그 결과 조사된 다섯 균주 모두 PHB 축적율이 10% 이상으로 나타났다. 그 중에서도, cytochrome C oxidase중 *CtaDI* 유전자가 결실된 돌연변이 균주의 경우, PHB 축적율이 세포 전체량의 30.2%로 제일 높았다. 이와 같은 결과는 광합성 세균에서의 PHB 생합성량은 광합성과 호흡에 관련된 유전자가 결실되어 그 기능이 원활하지 못하여 틸라코이드 막 주변에 전자가 축적될 경우 크게 증진될 수 있음을 다시 한번 확인해 주고 있다.

감사의 글

본 연구의 일부는 2002년도 조선대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. 박연일. 1993. 배추 잎의 무기인산 결핍에 따른 틸라코이드막 전자전달능의 변화. 이학박사학위논문, 서울대학교, 대한민국
2. Arifio, X. and J. Julio. 1995. Effect of sulfur starvation on the morphology and ultrastructure of the cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. PCC6909. *Arch. Microbiol.* 163, 447-453.
3. Braunegg, G., G. Lefebvre, and K.F. Genser. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127-161.
4. Hein, S., H. Tran, and A. Steinbüchel. 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170, 162-170.
5. Howitt, C.A. and W.F.J. Vermass. 1998. Quinol and cytochrome oxidase in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry* 37, 17944-17951.

Table 3. PHB accumulation by *Synechocystis* sp. mutants defective in respiration electron transport

Mutant	PHB content (%)	ORF	Possible function
<i>ApetM</i>	10.2	<i>smr0003</i>	Cytochrome C_{6f} complex
<i>Δcyd</i>	8.10	<i>slr1379</i>	Cytochrome bd-type quinol oxidase
<i>ΔctaDII</i>	11.7	<i>slr2082</i>	Cytochrome b_0 -type quinol oxidase
<i>ΔctaDI</i>	30.2	<i>slr1137</i>	Cytochrome aa_3 -type cytochrome c oxidase
<i>AndhB</i>	17.2	<i>slr0261</i>	NADH dehydrogenase subunit 7

6. Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, T. Wada, A. Watanabe, M. Tamada, M. Yauda, and S. Tabata. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
7. Kang, H.O., C.W. Chung, H.W. Kim, Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2001. Cometabolic biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxyvalerate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. DSY-82. *Antonie van Leeuwenhoek* 80, 185-191.
8. Kim, G.J., Y.K. Yang, and Y.H. Rhee. 2001. Economic consideration of poly(3-hydroxybutyrate) production by fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* KHB 8862. *Kor. J. Microbiol.* 37: 92-99.
9. Kim, Y.B., D.Y. Kim, and Y.H. Rhee. 1999. PHAs produced by *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas oleovorans* grown with n-alkanoic acids containing aromatic groups. *Macromolecules* 32, 6058-6064.
10. Lee, I.Y., M.K. Kim, H.N. Chang, and Y.H. Park. 1995. Regulation of poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis by nicotinamide nucleotide in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 35-39.
11. Lim, S.J., Y.M. Jung, H.D. Shin, and Y.H. Lee. 2002. Amplification of the NADPH-related genes *zwf* and *gnd* for the oddball biosynthesis of PHB in an *E. coli* transformant harboring a cloned *phbCAB* operon. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 543-549.
12. Lyu, J.Y. 2002. Cytochrome aa3 oxidase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 is a main terminal oxidase for the oxidation of reduced plastoquinone in the dark. M.Sc. thesis, Chungnam National University, Korea.
13. Madison, L.L. and G.W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53.
14. Massimo, V., S. Claudio, M. Ricardo, and E. Alba. 1990. Occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in *Spirulina* species. *J. Bacteriol.* 172, 2791-2792.
15. Ogawa, T. 1991. A gene homologous to the subunit-2 gene of NADH dehydrogenase is essential to inorganic carbon transport of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4275-4279.
16. Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, and R.J. Stanier. 1979. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 3, 1-61.
17. Schmetterer, G. 1995. Genetic analysis of cyanobacteria, p. 409-435. In D.A. Bryant (ed), *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, London.
18. Schneider, D., S. Berry, P. Seidler, and M. Rogner. 2001. A regulatory role of the PetM subunit in a cyanobacteria cytochrome b6f complex. *J. Biol. Chem.* 276, 16780-16785.
19. Steinbüchel, A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Micromol. Biosci.* 1, 1-24.
20. Taroncher-Oldenburg, G., K. Nishina, and G. Stephanopoulos. 2000. Identification and analysis the polyhydroxyalkanoate-specific β -ketothiolase and acetoacetyl coenzyme A reductase gene in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4440-4448.
21. Wu, C.F., Q.Y. Wu, and Z.Y. Shen. 2001. Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresour. Technol.* 76, 85-90.

(Received November 16, 2004/Accepted February 28, 2005)

ABSTRACT : Enhanced PHB Accumulation in Photosystem- and Respiration-defective Mutants of a Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

Soo-Youn Kim, Gang Guk Choi¹, Youn Il Park, Young Mok Park², Young Ki Yang^{3*}, and Young Ha Rhee^{}** (Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, ¹Department of Biology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, ²Bio-molecular Research Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, ³Department of Genetic Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

Photoautotrophic bacteria are promising candidates for the production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) since they can address the critical problem of substrate costs. In this study, we isolated 25 Tn5-inserted mutants of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 which showed enhanced PHB accumulation compared to the wild-type strain. After 5-days cultivation under nitrogen-limited mixotrophic conditions, the intracellular levels of PHB content in these mutants reached up to 10-30% of dry cell weight (DCW) comparable to 4% of DCW in the wild-type strain. Using the method of inverse PCR, the affected genes of the mutants were mapped on the completely known genome sequence of *Synechocystis* sp. PCC 6803. As a result, the increased PHB accumulation in 5 mutants were found to be resulted from defects of genes coding for NADH-ubiquinone oxidoreductase, *O*-succinylbenzoic-CoA ligase, photosystem II PsbT protein or histidine kinase, which are involved in photosystem in thylakoid inner membrane of the cell. The values of NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio in the cells of these mutants were much higher than that of the wild-type strain as measured by using pulse-amplitude modulated fluorometer, suggesting that PHB synthesis could be enhanced by increasing the level of cellular NAD(P)H which is a limiting substrate for NADPH-dependent acetoacetyl-CoA reductase. From these results, it is likely that NAD(P)H would be a limiting factor for PHB synthesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803.