

GFP 리포터를 이용한 외부 푸마르산 유도 *dctA* 유전자 발현 특성 파악

Ganesh Irisappan · Sambandam Ravikumar · 김주한 · 홍순호*
울산대학교 공과대학 생명화학공학과

Understanding of Extracellular Fumarate Induced *dctA* Gene Expression Profile Using GFP Reporter

Ganesh Irisappan, Sambandam Ravikumar, Joo Han Kim, and Soon Ho Hong*

School of Chemical Engineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Republic of Korea

(Received May 17, 2011 / Accepted June 27, 2011)

In *Escherichia coli*, DcuS/R two-component system controls fumarate import and utilization related gene expression. To understand the dynamic response of the bacterium DcuS/R two-component system with respect to fumarate concentrations, DcuS/R induced *dctA* promoter was integrated with GFP reporter protein. Expression monitoring study using recombinant strain showed that *dctA* promoter was upregulated with 1 mM of fumarate in M9 minimal medium.

Keywords: *dctA*, *Escherichia coli*, fumarate, green fluorescent protein, two-component system

식물과 박테리아의 주요 대사작용에 있어 C₄-dicarboxylates는 공통적인 구성요소로 역할을 수행한다. 일반적으로 박테리아는 성장을 위해 포도당 등의 6탄당을 이용하지만 C₄-dicarboxylates를 대안으로 이용하여 성장하기도 한다(12). 혐기성 조건의 장내 박테리아인 *Escherichia coli*의 경우에는 호기 및 혐기성 조건에서 C₄-dicarboxylates를 탄소원으로 이용하여 성장 가능하다(6, 11, 14, 15, 17). 특히, 호기성 조건에서는 C₄-dicarboxylates를 유일한 탄소원과 에너지원으로 사용하여 성장할 수 있다(1, 7, 8). C₄-dicarboxylates인 숙신산, 푸마르산, L-말산, 아스파르트산은 DctA (Dicarboxylate Transport)에 의하여 세포 안으로 전달된다(4, 7). *E. coli*는 외부의 C₄-dicarboxylates 농도를 two-component system (TCS)를 이용하여 감지하고, TCA 회로 등의 C₄-dicarboxylates 대사와 연관된 유전자들의 전사수준을 조절한다(10). *E. coli*의 C₄-dicarboxylates 감지 TCS는 DcuS, DcuR로 구성되어 있으며, DcuS/R에 의하여 *dctA* 유전자의 발현이 조절된다(7, 16). DctA는 호기성 조건에서 가장 활발한 푸마르산 수송체이며, *dctA* knock-out 돌연변이는 푸마르산, 말산, 아스파르트산을 탄소원으로 사용하였을 경우 성장이 저하됨이 보고되었다(7).

TCS는 외부의 환경변화를 감지하는 histidine kinase와 신호를 수용하여 관련유전자의 발현을 조절하는 response regulator

로 구성되어있다. DcuS는 transmembrane 상에 위치하는 histidine kinase이며, 세포 밖 푸마르산을 감지하고 인산화/탈인산화를 통하여 response regulator인 DcuR의 DNA-결합활성을 조절 할 수 있다(2, 7). 인산화에 의하여 활성화된 DcuR은 *dctA* 유전자의 발현을 유도한다(3, 7, 9, 11).

C₄-dicarboxylates 대사의 거동특성에 핵심적인 영향을 미치는 *dctA* 유전자의 전체적인 발현특성을 이해하기 위해서 우리는 *dctA* 유전자 발현을 Green fluorescence protein (GFP) 리포터를 이용하여 측정할 수 있는 박테리아 시스템을 구축하였다(Fig. 1). 다양한 푸마르산 농도 조건에서 *dctA* 유전자 활성화 특성이 복합배지와 최소배지에서 조사되었다.

E. coli XL1-Blue가 재조합 균주로 사용되었으며, 연구에서 사용된 박테리아 종류와 제작된 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 균주배양을 위한 배지는 Luria-Bertani (LB) 배지 (10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract, 5 g/L NaCl) 그리고 M9 최소배지(2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1% Thiamine HCl, 0.4% glucose)가 사용되었다. 항생물질로 ampicillin (100 mg/L)을 첨가하였으며, 균주는 37°C, 225 rpm에서 배양되었다.

183 bp의 *dctA* 프로모터는 oligonucleotides *dctA* F_{EcoRI}와 *dctA* R_{PstI}을 이용하여 *E. coli* 염색체 DNA로부터 증폭되었다(Table 1). GFP를 암호화하는 *gfp* 유전자는 oligonucleotides GFP F_{PstI}와 GFP R_{BamHI}을 사용하여 pPROBE-NT' 플라스미드로부터 증폭되었다(Table 1)(5). Polymerase chain reaction

* For correspondence. E-mail: shhong@ulsan.ac.kr; Tel: +82-52-259-1293; Fax: +82-52-259-1689

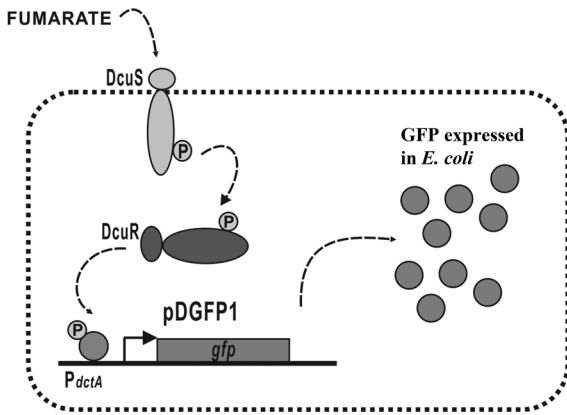


Fig. 1. Histidine kinase (DcuS) senses fumarate and transfer phosphate to response regulator (DcuR). The activated DcuR induce expression of *dctA* promoter controlled GFP.

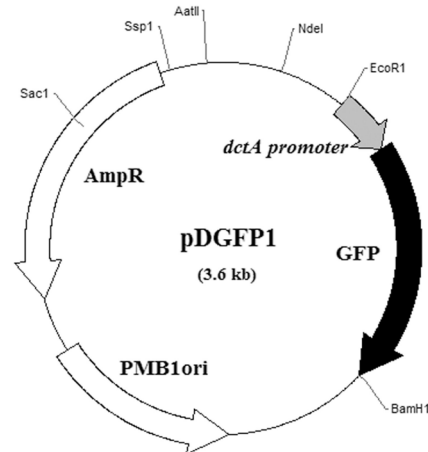


Fig. 2. Plasmid map of pDGFP1.

(PCR)은 Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Germany)을 이용하여 MJ mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)에서 수행하였다. Oligonucleotides *dctA* FEcoRI와 GFP RBamHI을 사용하여 overlap PCR을 수행하여 *dctA* 프로모터와 *gfp* 유전자를 통합하였다(Table 1). PCR product를 pUC19 플라스미드(NEB, USA)에 클로닝하여 pDGFP1 플라스미드(Fig. 2)를 제작하였으며, 이를 *E. coli* 균주에 형질전환시켰다(13). 구축된 pDGFP1 플라스미드의 염기서열은 oligonucleotides *dctA* FEcoRI 와 GFP RBamHI를 이용한 primers extension sequencing을 통해 확인하였다(Table 1).

pDGFP1 플라스미드를 포함한 *E. coli* 균주의 단일 콜로니를 37°C에서 overnight 배양했다. 배양된 균주는 새로운 복합 배지(LB)와 최소배지(M9)에 100배 희석한 후 흡광도 600 nm

(OD₆₀₀)에서 0.5에 도달 할 때까지 37°C, 250 rpm에서 배양하였다.

E. coli (pDGFP1) 균주의 *dctA* 유전자 발현을 확인하기 위하여 다양한 범위의 푸마르산을 함유한 LB와 M9 배지에서 GFP 형광을 측정했다. 다양한 푸마르산 농도(0, 0.1, 1.0, 10, 50 mM)에서 흡광도와 형광을 측정하였다. 균주의 성장은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하는 것을 통해 확인하였다. 균주의 GFP 형광발광 정도는 RF-5301PC Spectrofluorimeter (Shimadzu)를 이용하여 측정되었다. Spectrofluorimeter의 excitation 파장은 490/10 nm, 그리고 emission 파장은 510/10 nm로 작동하였다. Specific fluorescence intensity (SFI)는 각각의 시점에서 측정된 형광도를 그에 상응하는 600 nm에서 측정된 흡광도로 나눈 값으로 각각의 시료로부터 최소한 3개의 측정치를 구하였다.

Table 1. List of bacterial strains, plasmids, and primers used in this study

Strain, plasmid or primer	Relevant genotype and/or property	Source of reference
Strains		
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	SupE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 lac F'(proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15 Tn10 (tet ^R))	Laboratory stock
Plasmids		
pUC19	Amp ^R	New England Biolabs ^a
pDGFP1	pUC19 (183bp), <i>dctA</i> '-gfp transcriptional fusion vector, containing <i>dctA</i> promoter region, Amp ^r	This work
Oligonucleotide primers		
Name		
Sequence		
<i>dctA</i> FEcoRI	5'-gaattcGCTACCCCAAACCTGATTA-3'	
<i>dctA</i> RPstI	5'-ctgcagAGGGTGTCTTTAGTAAA-3'	
GFP FPstI	5'-ctgcagCATATGCAGTCTAAAGGA-3'	
GFP RBamHI	5'-ggatccCTCGAGTTATTAATGGTG-3'	

^a New England Biolabs, USA.

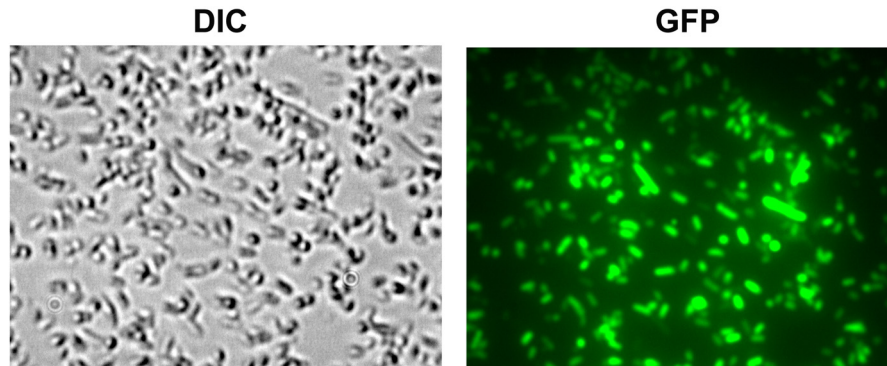


Fig. 3. The fumarate-induced GFP expression of was observed by reflected fluorescence microscopy. Concentration of fumarate is 10 mM. Magnification 100 \times .

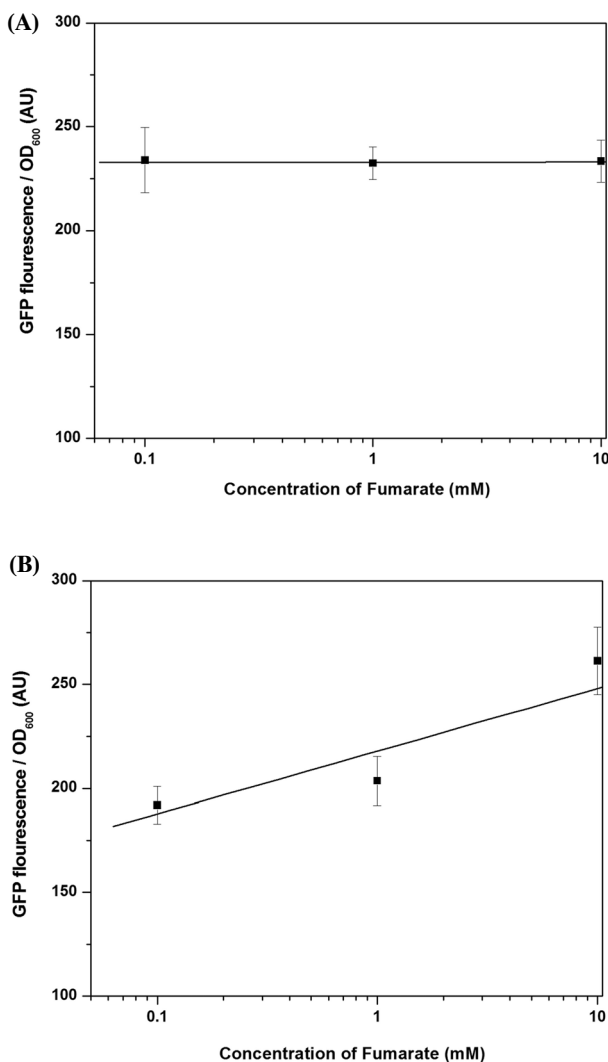


Fig. 4. Linear correlation between the fluorescence levels of GFP and the varying fumarate concentration in both LB (A) and M9 medium (B) were determined after 4 h of induction. The error bars indicate one standard deviation from the mean. The data are aggregate results from fumarate treatments from replicate experiments ($n=3$).

dctA 프로모터에 의한 GFP 발현 여부를 분석하기 위하여 푸마르산 유도 4시간 후 균주의 형광도를 측정하였다. 균주를 3,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 5분 동안 원심분리를 수행한 후, 원심 분리된 균주를 phosphate buffered saline (PBS) 용액을 이용하여 씻고 0.3% 아가로즈가 첨가된 PBS 용액으로 re-suspend 시켰다. 균주는 reflected fluorescence microscope (Olympus, Japan)와 charge-coupled device camera (B&W SenSys, KAF1401)를 이용하여 100 \times 배율로 형광발광을 측정하였다. Emission intensity는 MetaMorph image analysis software (Molecular devices, USA)를 이용하여 기록되었으며 excitation 과 emission filter는 EGFP 이미지의 최적조건으로 조정되었다.

*E. coli*는 DcuS/R TCS를 이용하여 외부의 푸마르산을 모니터링하고, 이의 흡수 및 호기성 대사과정에 관련된 유전자 발현을 조절한다. DcuS/R의 활성화 기작을 이해하기 위해서 *dctA* 프로모터와 GFP를 융합하여 리포터 플라스미드를 구축하였으며, 이것은 외부의 푸마르산에 반응하여 GFP 형광을 발현한다. 본 연구에서 DcuS/R TCS에 의하여 발현이 조절되는 *dctA* 유전자의 프로모터와 *gfp* 리포터 유전자를 pUC19 플라스미드에 삽입하여, 다양한 푸마르산 농도에서 GFP 발현 및 형광도를 관찰하였다. *E. coli* (pDGFP1) 균주를 푸마르산 포함한 배지에 배양하였을 경우, 외부 푸마르산에 반응하여 형광을 나타냄을 형광현미경으로 확인하였다(Fig. 3). 푸마르산에 노출된 균주는 녹색을 나타내었으며 이는 DcuS/R system의 조절하에 GFP가 발현되었음을 나타낸다.

푸마르산 농도에 따른 *dctA* 유전자의 발현 특성을 파악하기 위하여, *E. coli* (pDGFP1) 균주를 0.1-50 mM 농도의 푸마르산을 포함한 배지에서 배양하였다(Fig. 4). 배양배지는 LB와 M9 배지를 이용하였다. 형광현미경을 사용하여 재조합 균주의 형광도를 관찰한 결과, LB 배지에는 2시간 후에 약한 형광발광을 관찰하였다. M9 배지에서 배양하였을 경우 1 mM 이상의 푸마르산 농도에서 GFP에 의한 형광을 관찰할 수 있었으며, 형광도는 푸마르산의 농도가 증가함에 따라 함께 증가하는 경향을 보여주었다. 푸마르산에 의한 형광발광은 10 mM 농도의 푸마르산까지는 증가하는 것을 확인하였으며, 그 이상의 농도에서는 주목할만한 형광발광의 증가는 확인되지

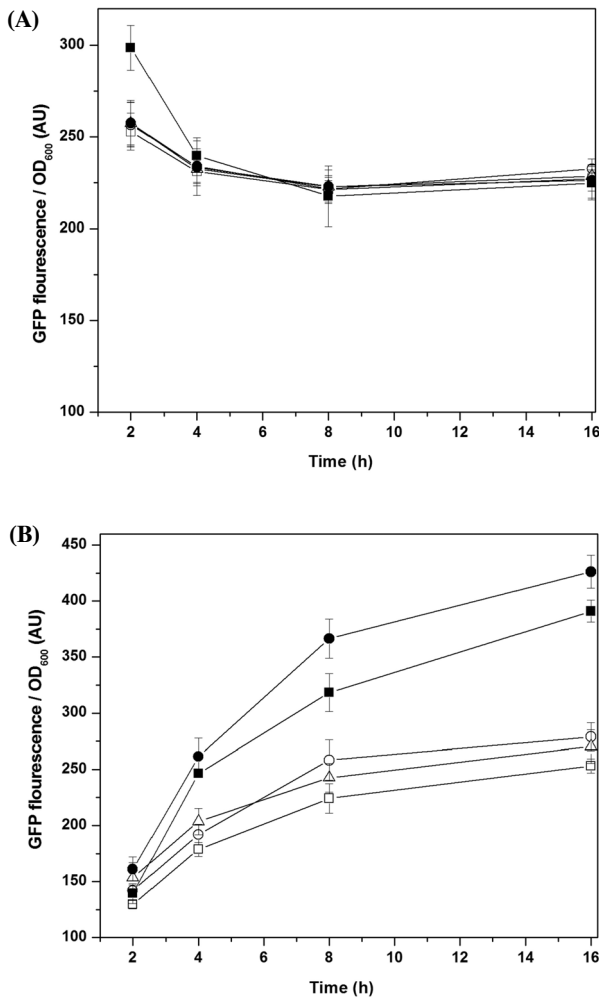


Fig. 5. Time course of GFP fluorescence of *E. coli* (pDGFP1) after induction with varying concentrations fumarate in both LB (A) and M9 medium (B): 0 mM (\square); 0.1 mM (\circ); 1 mM (\triangle); 10 mM (\bullet); 50 mM (\blacksquare). The data are aggregate results from fumarate treatments from replicate experiments ($n=3$).

않았다(자료 미제시). 이것은 균주의 DcuS/R TCS의 포화 때문인 것으로 보여진다. 즉, 균주가 세포의 표면에 발현시킨 DcuS/R가 감지 할 수 있는 양보다 많은 양의 푸마르산에 노출되어, *dctA* 프로모터가 최대 활성화되어 더 이상의 GFP가 발현되지 않은 것으로 보여진다.

푸마르산 농도에 따른 *dctA* 유전자의 발현특성을 정량분석하기 위하여 푸마르산 농도와 그에 상응하는 SFI 사이의 상관관계를 분석하였다. M9 배지에서의 경우, 0.1 mM-10 mM의 농도범위에서 상관계수는 0.907이었다(Fig. 4B). 그러나, LB 배지에서 배양하였을 경우에는 푸마르산 농도 변화에 따른 형광도의 변화를 관찰할 수 없었다.

시간에 따른 *dctA* 유전자의 발현특성을 파악하기 위하여, 푸마르산 첨가 후에 일정한 시간 간격으로 GFP에 의한 형광을 측정하였다. 시간에 따라서 형광이 점차적으로 증가하는

경향을 보여주었으며, 형광도는 첨가 후 16시간이 지난 후에 가장 높음을 확인하였다(Fig. 5). 16시간 후의 형광도는 2시간 후의 형광도에 비하여 약 3배 가량 증가하였음을 확인하였다. 푸마르산 농도변화 실험과 마찬가지로 LB 배지에서는 주목할 만한 형광의 변화는 확인되지 않았다(자료 미제시).

적요

본 연구에서는 외부의 푸마르산을 인식하는 DcuS/R TCS에 의하여 발현이 조절되는 *dctA* 유전자의 발현 특성을 GFP를 이용하여 관찰하였으며, 1 mM의 푸마르산을 감지하여 GFP를 발현시킬 수 있음을 확인하였다. 결론적으로, 개량된 *E. coli*는 간단한 *dctA* 프로모터와 GFP의 융합을 이용하여 푸마르산을 모니터링 할 수 있으며, 이것은 상승된 푸마르산 농도 조건하에서 원활히 작동함을 확인할 수 있었다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2008-313-D00304)을 받아 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Abo-Amer, A.E., J. Munn, K. Jackson, M. Aktas, P. Golby, D.J. Kelly, and S.C. Andrews. 2004. DNA interaction and phosphotransfer of the C₄-dicarboxylate-responsive DcuS-DcuR two-component regulatory system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 1879-1889.
2. Aucoin, M., V. McMurray-Beaulieu, F. Poulin, E. Boivin, J. Chen, F. Ardelean, M. Cloutier, Y. Choi, C. Miguez, and M. Jolicoeur. 2006. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microb. Cell Fact.* 5, 27.
3. Baker, K.E., K.P. Ditullio, J. Neuhard, and R.A. Kelln. 1996. Utilization of orotate as a pyrimidine source by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* requires the dicarboxylate transport protein encoded by *dctA*. *J. Bacteriol.* 178, 7099-7105.
4. Davies, S., P. Golby, D. Omrani, S.A. Broad, V.L. Harrington, J.R. Guest, D.J. Kelly, and S.C. Andrews. 1999. Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport (*dctA*) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5624-5635.
5. Miller, W.G., J.H. Leveau, and S.E. Lindow. 2000. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 1243-1250.
6. Engel, P., R. Kramer, and G. Uden. 1992. Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fmr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from aerobic dicarboxylate uptake. *J. Bacteriol.* 174, 5533-5539.
7. Golby, P., S. Davies, D.J. Kelly, J.R. Guest, and S.C. Andrews. 1999. Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylates in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 1238-1248.
8. Golby, P., D.J. Kelly, J.R. Guest, and S.C. Andrews. 1998. Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB*

- genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 6586-6596.
9. Jausch, I.G., I. Garcia-Moreno, and G. Uden. 2002. Function of DcuS from *Escherichia coli* as a fumarate stimulated histidine protein kinase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 277, 39809-39814.
 10. Jausch, I.G., E. Zientz, Q.H. Tran, A. Kröger, and G. Uden. 2002. C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1553, 39-56.
 11. Kay, W.W. and H.L. Kornberg. 1971. The uptake of C₄ dicarboxylic acids by *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 18, 274-281.
 12. Ruffner, H. and D. Rast. 1974. Die Biogenese von tartrat in der Weinrebe. *Z Pflanzenphysiol* 73, 45-55.
 13. Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
 14. Six, S., S.C. Andrews, G. Uden, and J.R. Guest. 1994. *Escherichia coli* possess two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate membrane transporters (*DcuA* and *DcuB*) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). *J. Bacteriol.* 176, 6470-6478.
 15. Uden, G. and A. Kleefeld. 2004. C₄-Dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth. Module 3.4.5; R. Curtiss III (Editor in Chief), *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. (Online) <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, DC, USA.
 16. Zientz, E., J. Bongaerts, and G. Uden. 1998. Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by the DcuSR (*dcuSR*) two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* 180, 5421-5425.
 17. Zientz, E., S. Six, and G. Uden. 1996. Identification of a third secondary carrier (*DcuC*) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. *J. Bacteriol.* 178, 7241-7247.