

미생물의 대사산물생산에 영향을 미치는
당전달계의 기작연구

A Study on Sugar-transport system for Production
of Microbial metabolites

1992. 2

한국과학기술연구원
부설유전공학연구소

T
KRIBB
92-
57

GERI

제 출 문

한국과학기술연구원

부설 유전공학연구소 소장 귀하

본 보고서를 “미생물의 대사산물 생산에 영향을 미치는 당 전달계의 기작 연구”의 최종보고서로 제출합니다.

1992 . 2 .

연구책임자 : 오태광 (부설유전공학연구소 선임연구원)

연 구 원 : 윤기홍 (부설유전공학연구소 선임연구원)

성문희 (" 선임연구원)

이정기 (" 연 구 원)

김형권 (" ")

최윤희 (" ")

요 약 문

I. 제 목

미생물의 대사산물 생산에 영향을 미치는 당 전달계의 기작 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

발효미생물은 유기산, 아미노산, 비타민과 같은 대사산물의 생산이나 산업적으로 유용한 효소(amylase, cellulase, protease 등)의 생산을 위해 오랫동안 이용되어 왔다. 그러나 미생물이 여러 유용물질을 생산하는데 필수적인 탄소원인 당 성분이 배지에서 세포내로 유입되는 과정에 관여하는 효소와 그 작용기작들이 아직 확실히 밝혀져 있지 않다. 발효에 이용되는 당 중에서 phosphoenolpyruvate (PEP)에 의존적인 phosphotransferase system (PTS)에 의해서 세포내로 유입되는 당이 미생물에 의해서 선호적으로 이용되어, 배지내에 PTS에 의해서 이용될 수 없는 당과 같이 존재할 경우 미생물은 PTS 당을 먼저 이용하여 그것이 소모될때 까지 대수기적 성장을 한 후 non-PTS sugar를 이용하는데 관련된 transport system이 작용하여 다시 대수기적 성장을 보이는 diauxie effect가 나타난다.

이러한 diauxie effect는 non-PTS 당을 이용하는데 관여하는 효소의 유전자가 PTS에 의해서 transcriptional regulation을 받는 결과라고 밝혀졌다. 이와같이 PTS는, PTS 당의 uptake 뿐만 아니라 non-PTS 당의 uptake와 catabolism에 필요한 operon의 전사를 조절하는 것을 비롯하여 주변의 많은 대사경로의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어지고 있다. 또한 PTS는 세균에서의 주된 signal transduction system으로서 protein의 phosphorylation을 통해서 외부의 환경변화에 기능을 나타내는

procaryotes에서는 첫번째로 알려진 signalling system 중의 하나로서 매우 흥미있는 많은 연구분야가 남아있다.

그러므로 PTS 당의 이용성을 증가시켜 유용대사 산물의 생산을 증대시키기 위해서나, 배지중에 PTS 당과 non-PTS 당의 존재시 PTS에 의한 조절기작을 이해함으로써 당의 이용성을 극대화하기 위해서 당의 세포내 전달에 관련된 효소와 유전자등을 분리하고 그 작용기작을 밝힐 필요가 있다.

특히 *Corynebacterium glutamicum*의 경우 *E. coli*에 비해서 PTS에 관한 분자수준에서의 연구가 전무한 실정이다. 산업적으로 유용한 *Bacillus subtilis*와 *Corynebacterium glutamicum*의 당 전달계에 관한 연구는 산업미생물의 응용면에서 중요한 의의를 가지고 있다.

Ⅲ. 연구의 내용 및 범위

*C. glutamicum*과 *B. subtilis*의 당 전달계의 연구를 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

1. PTS를 이용하여 glucose를 발효시키는 *C. glutamicum*과 *B. subtilis*로부터 chromosomal DNA의 분리 및 size fractionation
2. *C. glutamicum*과 *B. subtilis*의 chromosomal DNA와 *E. coli*의 glucose PTS 변이주를 이용한 EII 유전자의 cloning
3. 분리한 EII 유전자를 가지고 있는 형질 전환체의 여러가지 당에 대한 발효능 조사
4. *C. glutamicum*으로부터 분리한 EII 유전자의 분석
5. 분리한 EII 유전자의 subcloning 및 제한효소 지도의 작성

6. Non-PTS 당에서 생육시 PTS 당인 methyl α -glucopyranoside 첨가에 의한 생육억제 조사

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의사항

1. 세포의 용해가 어려워 chromosomal DNA의 분리에 많은 난점이 있는 *C.glutamicum*으로 부터 chromosomal DNA를 대량 순수 분리하여 제한효소 *Sau* 3AI으로 부분절단한 후 각 분자량 별로 sucrose gradient size fractionation을 행하였다.
2. 2 ~ 10 kb 범위의 *B.subtilis*와 *C.glutamicum*의 Chromosomal DNA와 glucose EII 변이주인 *E.coli* ZSC 113을 host로 이용하여 얻은 형질전환체중, MacConkey agar base에 glucose를 첨가한 선별 배지에서 glucose 발효능을 회복하여 red colony로 나타나는 총 7주의 positive한 형질전환체를 분리하였다. 7주의 형질전환체는 유일한 탄소원으로 glucose를 첨가한 최소배지에서 잘 생육하였다.
3. *C.glutamicum*의 chromosomal DNA로부터 얻은 총 5주의 형질전환체로부터 분리한 재조합 plasmid를 제한효소로 절단하여 분석한 결과, insert의 크기는 4.8 ~ 5.4kb까지 서로 다르게 나타났으나, 모두 2.1kb의 공통된 삽입단편을 가지고 있었으므로 모두 동일한 유전자임을 확인하였다.
4. 분리한 EII 유전자의 크기를 2.1 kb까지 pBR 322에 subcloning 하여 pCTS3라 명명하였으며, pCTS3의 제한효소 지도를 작성하였다.
5. 분리한 EII 유전자가 도입된 형질전환체의 여러가지 당에 대한 발효능을 조사한 결과 *C.glutamicum* 유래의 유전자가 도입된 Tf-8은 glucose, mannose, trehalose를 이용하였으며, *B.subtilis* 유래의 유전

자가 도입된 Tf-4는 glucose, trehalose, sucrose를 이용하였다.

특히 Tf-4의 경우 sucrose의 발효능이 우수한 것으로 나타났다.

6. 재조합 plasmid pCTS3를 함유한 형질전환체는 non-PTS당(maltose)에서의 생육중 PTS당인 methyl α -glucopyranoside의 첨가에 의해서 *E.coli*의 EII^{Glc}유전자를 함유한 형질전환체와는 달리 생육이 저해되지 않았다.

이상의 결과로부터 본 실험실에서는 *C.glutamicum*과 *B.subtilis*의 PTS로부터 glucose를 이용할 수 있는 Enzyme II를 coding하는 유전자들을 분리하였으며 그중 *C.glutamicum* 유래의 재조합 plasmid pCTS3는 *C.glutamicum*의 glucose를 이용하는 PTS의 연구에 좋은 재료가 될 것으로 기대된다. 특히 아미노산 생산균주로서 산업적으로 오랜 역사를 가지고 있는 *C.glutamicum*의 PTS에 대한 분자수준에서의 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 따라서 본 실험실에서 분리한 Enzyme II를 이용하여 glucose의 이용성을 늘리거나, 대사를 조절할 수 있다면 유용대사 산물의 생산을 증대시킬 수 있다. 또한 분리한 EII 유전자의 DNA 염기배열을 결정함으로써 EII 단백질의 생합성 조절과 생화학적 연구를 위한 아미노산 서열을 밝혀낼 수 있다고 생각되므로 더욱 많은 연구가 계속 되어질 것을 건의함.

S u m m a r y

I . Project Title

A study on sugar-transport system for production of microbial metabolites.

II . Objectives and Importance of the project

Fermentative microorganisms have long been used to produce organic acids, amino acids, vitamins and industrial enzymes such as amylase, cellulase, and protease, etc. Sugars and other nutrients are taken up by these organisms via specific transport systems localized in the cytoplasmic membrane. But we do not know the precise mechanism by which a sugar is translocated and phosphorylated. Phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent sugar phosphotransferase system (PTS) is involved in the uptake and concomitant phosphorylation of a large number of carbohydrates. In addition, the PTS regulates other metabolic and genetic pathway. Diauxie is also regulated by the result of PTS. As long as the PTS sugar is present in the medium, PTS inhibits both adenylate cyclase and permease activity required for uptake of inducer. After the PTS sugar is completely consumed, the cells enter stationary phase, PTS-mediated repression is relieved, induction of the operon takes place, and growth in the second sugar begins. PTS is the signal transduction system, the major one in the bacterial cell; it was the first recog-

nized procaryotic signalling system with functioning via protein phosphorylation. The uptake of the PTS and non-PTS sugar appears to be the rate-limiting step in the growth of the cell. Therefore it is necessary to understand sugar transport mechanism and regulation of and by the PTS exactly.

The objectives of the project are to isolate PTS genes for understanding of sugar transport mechanism and to enhance the production of useful metabolites from *C. glutamicum*. The cloning of the PTS EII gene could have informed us about the genetic of PTS system of *C. glutamicum*.

III. Content and Scope of the Project

The scopes of the project are summarized as follows ;

1. Purification and size fractionation of chromosomal DNA from *B. subtilis* and *C. glutamicum*
2. Cloning of the PTS EII genes from *B. subtilis* and *C. glutamicum*
3. Sugar fermentation of *E. coli* clones carrying recombinant plasmids
4. Analysis of restriction enzyme digestion of EII gene from *B. subtilis* and *C. glutamicum*
5. Subcloning and Determination of restriction enzyme map of EII gene from *C. glutamicum*.
6. Test for repression of growth on non-PTS sugar in the presence of methyl α -D-glucopyranoside

IV. Results and Proposal for their application

1. Seven *E.coli* transformants containing PTS EII gene of *C.glu-tamicum* and *B.subtilis* were isolated. These transformants could ferment glucose and grow well on glucose as the sole carbon source.
2. Among the transformants containing EII gene of *C.glutamicum* and *B.subtilis*, Tf-2 and Tf-8 could ferment mannose, trehalose as well as glucose, while Tf-4 could ferment glucose, trehalose and sucrose. Especially Tf-4 showed strong activity toward sucrose.
3. After analysis of restriction enzyme digestion, it was confirmed that five *E.coli* clones carrying PTS EII genes of *C.glutamicum* contained identical DNA fragment. Therefore, it was concluded that cloned DNA fragments contained the identical gene in spite of different size,
4. Subcloning of EII gene was carried out and recombinant plasmid designated as pCTS3. Molecular size of insert DNA fragment was 2.1 kb. The physical map of pCTS3 was determined.
5. The transformants containing recombinant plasmid pCTS3 do not show PTS-mediated repression. Methyl α -glucopyranoside does not prevent the transformants from utilizing non-PTS sugar, maltose. On the other hand, the growth of *E.coli* ZSC113 containing *E.coli* glucose EII gene (pTSG3) on non-PTS sugar was repressed by methyl α -glucopyranoside.

From these results, it was concluded that three PTS EII genes were cloned in *E.coli* from *B.subtilis* and *C.glutamicum*. Recombinant plasmids restored the ability to ferment glucose to the *E.coli ptsG* mutant. DNA sequencing experiment of EII gene should provide the amino acid sequence required for biochemical work and additional information on the transcriptional and translational regulation on the synthesis of EII protein. We suggest that the isolated EII gene from *C.glutamicum* will provide the opportunity for studying the PTS of *C.glutamicum*.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Materials and Methods	21
1. Materials	21
A. Bacterial strains and plasmids	21
B. Media	21
C. Restriction enzymes and reagents	22
2. Methods	22
A. Purification of plasmids and chromosomal DNA	22
B. Cloning of Enzyme II gene	23
C. Various sugar fermentation ability of transformants	23
D. Test for repression of growth on non-PTS sugar in the presence of α MeGlc	23
Chapter 3. Results and Discussions	25
1. Cloning of PTS EII genes from <i>B.subtilis</i> and <i>C.glutamicum</i>	25
2. Analysis of restriction enzyme digestion of EII genes from <i>B.subtilis</i> and <i>C.glutamicum</i>	28
3. Subcloning and determination of restriction enzyme map of EII gene from <i>C.glutamicum</i>	29
A. Subcloning of EII gene	29

B. Determination of restriction enzyme map	30
4. Sugar fermentation of <i>E. coli</i> clones carrying recombinant plasmids	31
5. Growth on non-PTS sugar in the presence of α MeGlc.	33
Chapter 4. Conclusion	35
Reference	37

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 실험재료 및 방법	21
1. 재 료	21
가. 사용균주 및 plasmid	21
나. 배 지	21
다. 제한효소 및 시약	22
2. 방 법	22
가. Chromosomal DNA와 plasmid의 분리 및 정제	22
나. Enzyme II 유전자의 cloning	23
다. 형질 전환체의 당 발효능 조사	23
라. Methyl α -glucopyranoside 첨가시 non-PTS 당인 maltose의 이용능	23
제 3 장 결과 및 고찰	25
1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> 과 <i>Bacillus subtilis</i> 로 부터 glucose PTS 중 Enzyme II 유전자의 Cloning	25
2. <i>C. glutamicum</i> 과 <i>B. subtilis</i> 로부터 분리된 EII 유전자의 분석	28
3. <i>C. glutamicum</i> 유래의 EII 유전자의 subcloning 및 제 한효소 지도 작성	29
가. EII 유전자의 subcloning	29

나. 재조합 plasmid pCTS3의 제한 효소지도 작성	30
4. 재조합 plasmids에 의한 여러가지 당 기질의 발효능	31
5. Non-PTS당에서의 생육시 α MeGlc 첨가에 의한 영향	33
제 4 장 결 론	35
참 고 문 헌	37

제 1 장 서 론

세균중 통성혐기성과 편성혐기성¹⁾ 세균들은 여러가지의 당류를 이용하는데 있어서, phosphoenolpyruvate에 의존적인 phosphotransferase system(PTS)을 통해 carbohydrate의 phosphoester로써 세포내로 받아들여지고 축적하게 된다.^{2, 3, 4)} Bacteria의 PTS는 많은 carbohydrate를 세포막을 통해서 세포내로 운반시키는 동시에 인산화를 수행한다. 또한, 이때 세포내로 운반된 carbohydrate phosphate는 계속되는 세포대사의 첫 중간물질이므로 uptake와 metabolism 사이를 긴밀히 연결하게 된다.

PTS는 모든 PTS당의 인산화에 필요한 general protein과 각 당에 특이적으로 작용하는 sugar specific protein으로 이루어져 있다. general protein은 cytosolic protein인 Enzyme I(EI)과 Histidine protein(HPr)이 있고, sugar specific protein은 막에 결합된 sugar specific enzyme II(EII) 또는 sugar specific protein III와의 결합체(EII/EIII pair)가 존재한다. 당이 PTS system을 통해서 세포내로 운반되면서 인산화될 때 phosphate 부분은 ATP에서가 아니라 PEP에서 오게 되며, enzyme cascade에 의해 phosphate가 전달되게 된다. EI은 분자량이 약 58,000~85,000 정도의 동일한 subunit가 dimer를 형성하고 있는 단백질로서

Abbreviation : PTS, phosphoenolpyruvate: glucose phosphotransferase system; PEP, phosphoenolpyruvate; EII, Enzyme II of the PTS; Hpr, EII, Enzyme II of the PTS; Hpr,

histidine-containing phosphocarrier protein of the PTS; α MeGlc, methyl α -D-glucopyranoside; II-B^{Glc}, glucose-specific integral membrane protein of the PTS; III^{Glc}, glucose-specific phosphocarrier protein of the PTS; III^{Man}, membrane-associated subunit of the mannose permease; II-P^{Man} and II-M^{Man}, membrane-linked subunit of the mannose permease; *ptsG*, gene coding for II^{Glc}; Glc⁺, capable of glucose fermentation.

PEP에 의해 EI의 histidine 잔기가 직접 인산화되고, 이어서 분자량 6,700~15,000 정도의 단백질인 HPr의 His-15에 phosphate를 전달한다. 연속적으로 HPr-P는 membrane-bound carbohydrate carrier인 EII와 결합하게 되고, phosphate를 carbohydrate에 전달한다. 이러한 transfer는 P-HPr과 EII사이에서 직접 이루어지거나, 혹은 specific EII와 complex를 형성하는 soluble Enzyme III를 통해서 이루어진다. 이러한 sugar specific enzyme은 두번 인산화되는 것처럼 생각되는데, 첫번째는 HPr에 의해서 EII나 혹은 EII의 C-말단 부위에 위치한 histidyl 잔기가 인산화 되고, 두번째는 EII에서 막과 연결되어 있는 부위에 존재하는 잔기가 인산화 되는 것처럼 보인다. EIII가 존재하지 않는 EII들은 625~675 개의 아미노산 잔기들의 단일 polypeptide chain으로 이루어져 있고, 이러한 크기는 EIII가 존재하는 경우 EII와 EIII를 합한 크기와 거의 일치한다.^{5 6)}

*E.coli*의 경우 glucose, mannitol, sorbitol, fructose, mannose, glucosamin 등이 PTS 당이고, *B.subtilis*의 경우 적어도 5 종류의 carbohydrate 즉, glucose, mannose, fructose, sucrose, mannitol등이 PTS에 의해서 translocation 되지만, 일부의 그람양성세균에서는 lactose와 같은 이당류등도 유사한 과정을 통해 세포내로 들어올 수 있다.⁷⁾ PTS는 세포막을 통해 당을 translocation시키는 동시에 인산화를 촉진시킬 뿐만 아니라, 그밖에 중요한 조절기능을 가지고 있어 당의 uptake와 당들에 대한 chemotaxis를 조절한다.⁸⁾ *E.coli*의 경우에 있어서 PTS는 lactose와 같은 non-PTS 당의 uptake와 catabolism에 필요한 operon의 전사를 조절한다(inducer exclusion, catabolite repression). 이와같은 조절은 세포외에 PTS당이 존재하면 PTS는 adenylate cyclase와 inducer의 uptake에 필요한 permease를 저해하여 cAMP와 inducer의 농도가 non-

PTS operon의 전사를 위해 필요한 세포내 농도이하로 유지하게 한다. 따라서, PTS 당이 우선적으로 완전히 이용된 다음, 세포는 stationary phase로 들어가게 되고 PTS-mediated repression이 해제되어 non-PTS 당의 operon이 induction되어서 non-PTS 당을 이용한 생육이 시작된다.⁴⁾ 현재까지 약 18종류의 sugar specific protein을 coding 하고 있는 유전자의 염기배열이 결정되었고⁹⁾, PTS 유전자의 발현을 조절하는 기작에 대해서는 거의 알려져 있지 않고 있으나 constitutive 하다 하더라도 생육배지에 따라 발현수준에 커다란 차이가 있음이 보고되어져 있다.¹⁰⁾

이와같은 PTS에 대한 연구에서 최근에 주요한 관심의 대상이 되고 있는 것은 sugar specific Enzyme II complex로서 PTS protein중 가장 다양하게 존재하는데, 1~3개의 polypeptide chain(class 1~class 3)으로 이루어져 있다.^{4 5 6)} 현재까지 밝혀진 24종류의 EII complex는 화학적, 물리적 성질에서 매우 다양성을 보이고 있지만, Enzyme II complex 간에는 상당한 기능상의 homology가 있는 것으로 보고되어져 왔다.^{6 11)} 단백질의 sequence 수준에서 비교했을 때 각각의 EII 들은 유사성이 아주 적거나 전혀 없는 것처럼 보이지만 기질 특이성이나 hydropathy plot에 의해 추론될 수 있는 transmembrane channel을 형성하는 것과 같은 3차구조의 공통성을 가지고 있다고 생각된다.^{6 9)}

PTS 중에서 가장 연구가 많이 진전된 것으로는 enteric bacteria의 Class III에 속하는 II^{Glc}/III^{Glc} complex이다.^{12 13)} 두 단백질은 *E.coli*와 *S.typhimurium*에서 완전 정제되었고, *E.coli*와 *S.typhimurium*의 III^{Glc}의 경우에 있어서는 단지 3개의 잔기만이 다른 것으로 나타났다.¹⁴⁾ 그리고, III^{Glc}/EII^{Glc} complex와는 다르게 membrane에 대칭적인 형태로 존재하는 *E.coli*의 EII^{Man} complex^{15 16 17)}는 glucose와 mannose를 같은 효율로

인산화 시킨다. III^{Man}의 sequence prediction에 의하면 hydrophobic 한 부분이 크지않고 상당한 양이 cytoplasmic fraction에 존재한다. II^{PMan}은 매우 hydrophobic 한 단백질인데 비하여, II^{BMan}의 경우는 N-terminal에서는 hydrophobicity가 낮으나 c-terminal 쪽으로 hydrophobicity 증가한다.

Gram 양성 세균의 sugar specific protein에 대한 연구는, *S. aureus*의 β -galactosidase system을 제외하고는 enteric bacteria의 것들 만큼 생화학적으로 많은 연구가 되어있지 않지만, 많은 Gram 양성세균의 기질특이성은 enteric bacteria에서의 기질특이성과 유사하다. 따라서 여러종의 Gram 양성 세균들은 enteric bacteria의 glucose (Glc, α -MG)나 mannose (Glc, Man, 2-DG) PTS system에 상응하는 기질특이성을 갖는, III^{Glc} / EII^{BGlc} 나 혹은 EII^{Man} complex와 유사한 두개의 PT system을 갖고 있다. *Enterobacteriaceae*에 속하는 97종의 세균의 glucose와 mannose PTS 활성화에 관한 연구결과 세가지의 group으로 나눌 수 있는데, 72종은 두가지의 system을 모두 갖고 있는 group과 mannose PTS가 없는 group (9종), glucose system이 없는 group (13종)으로 구분할 수가 있다.⁴⁾

이상에서 언급한 바와 같이 PTS는 많은 당의 운반과 인산화 뿐만 아니라 inducer exclusion, catabolite repression을 비롯한 많은 대사경로의 조절에도 관계되어 있는 복잡하고 중요한 uptake system이다. 세포는 PTS를 통해서 세포외에서 빈번하게 일어나는 다양한 signal을 감지하고 전달하여 반응을 하여야 하기 때문에 PTS는 복잡성, 다양성, 유연성의 특징을 나타내고 있다. 그러므로 많은 연구에도 불구하고 아직까지 당이 운반되고 인산화 되는 정확한 기작이 알려져 있지 않으며, PTS가 어떻게 조절을 받고 또한 그것이 다른 system을 어떻게 조절하는지, *pts* operon이 어떻게 조절

받는지, PTS가 다른 network의 단백질이나 유전자와 어떻게 작용하는지 등에 대해서도 아직 정확하게 알려져 있지 않다. PTS와 non-PTS당의 uptake rate는 세포의 성장에 있어서 rate-limiting step이 될 수 있으므로, 좀더 정확한 조절기작을 밝힐 수 있다면 PTS당의 이용성을 증가시켜 유용대사 산물의 생산을 증대시키거나, non-PTS당을 이용하는데 관여하는 유용한 효소를 생산할 수 있다. 이와같은 목적을 위해서 당의 세포내 전달에 관련된 효소와 유전자 등을 분리하고 그 작용기작과 조절에 관한 연구가 필요하다.

PTS에 의해서 glucose를 이용하는 *C.glutamicum*은 아미노산의 생산을 위해 산업적으로 오랫동안 사용되어져 왔으나 *E.coli*나 *B.subtilis*^{18 19 20)} 등의 균주에 비하여 glucose uptake system에 관한 유전적인 연구가 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 *E.coli*의 PTS와 밀접한 관계에 있는 *B.subtilis*와 *C.glutamicum*의 염색체로부터 *E.coli*의 PTS 변이주를 host로 사용하여 PTS 유전자중 glucose를 이용하는 Enzyme II를 coding하는 유전자를 cloning 하였으며, 그중 *C.glutamicum* 유래의 EII 유전자의 분석과 EII 유전자가 도입된 형질 전환체의 특성을 조사하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

1. 재 료

가. 사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 plasmids는 Table 1과 같다. *Corynebacterium glutamicum* KCTC1445 과 *Bacillus subtilis* ATCC6051은 PTS를 통하여 glucose를 이용하는 세균으로서 glucose Enzyme II를 분리하는 위한 분리원으로 사용하였다. glucose PTS중 EII 변이주인 *E. coli* ZSC113은 재조합 plasmid를 선별하기 위한 숙주로 사용하였다. Plasmid pBR322은 EII 유전자를 cloning하기 위한 유전자 운반체로 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in experiment.

Strains/plasmids	Relevant properties	Reference or source
<i>C. glutamicum</i> KCTC1445		
<i>B. subtilis</i> ATCC6051		
<i>E. coli</i> ZSC113	<i>ptsG</i> ⁻ , <i>ptsM</i> ⁻	21
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	
pTSG3	<i>ptsG</i>	12
pCTS3	Glc ⁺	this study

나. 배 지

실험에 사용한 균주들을 배양하기 위해 사용한 배지는 LB배지이고, 형질전환시 형질전환체 선별 배지로서 항생물질 Ampicillin(50 µg/ml)과 탄소원으로 glucose를 1% 첨가한 MacConkey agar base를 사용하였다.

여러가지 당에 대한 발효능을 시험하기 위해 각각의 당 1%를 MacConkey agar base에 첨가하여 사용하였다. 재조합 plasmid를 가지고 있는 형질전환체의 minimal media에서의 생육을 위한 실험에서는 0.2%의 glucose나 maltose를 첨가한 medium A (10.5g K₂HPO₄, 1g(NH₄)₂SO₄, 4.5g KH₂PO₄, 0.1g MgSO₄, 1g casamino acid per liter)에 Ampicillin (30 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

다. 제한효소 및 시약

시약은 모두 일급시약을 사용하였으며, 제한효소는 Boehringer Mannheim과 KOSCO에서 구입하고 최적조건에서 사용하였다. T4 DNA ligase와 Alkaline phosphatase는 BRL과 Promega에서 각각 구입하였다.

2. 방 법

가. Chromosomal DNA와 plasmid의 분리 및 정제

*B. subtilis*로부터 chromosomal DNA를 분리하는 방법은 KIST연구보고서 (BSE70540-190-3)에 기술한 바와 같이 행하였다. *C. glutamicum*의 경우 cell lysis에 어려움이 많아 broth에 glycine을 1% 첨가한 후 배양하였다. 37 °C에서 1.5ℓ 액체 배양하여 대수증식기 상태의 cell을 원심분리한 후 TEN buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.6, 1mM EDTA, 10mM NaCl)로 세척하였다. 원심분리된 cell pellet를 freezing and thawing으로 2회 반복한 후 lysozyme을 첨가한 SET buffer (20% sucrose 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 50mM EDTA)에 현탁시켜 37 °C에서 30min 반응시키고 20ml의 25% SDS 용액을 첨가하여 세포를 lysis시켰다.

Lysis가 일어난 용액에 proteinase K (20mg/ml)를 2ml 첨가하고 60 °C에서 1시간 방치한 후 phenol / chloroform 처리를 3회 반복하였다. Cleared lysate에 5M NaCl 를 최종농도 0.3M이 되도록 첨가한 후 2배 부피의 ethanol (4 °C)을 첨가하여 유리병으로 chromosomal DNA를 감아올려 95 % ethanol에 담구어 세척하고 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.8)에 녹였다.

나. Enzyme II 유전자의 Cloning

*C. glutamicum*과 *B. subtilis*의 chromosomal DNA를 *Sau* 3A1으로 부분절단하여 sucrose-gradient centrifugation (24,000 rpm, 24h)하여 2.0Kb ~ 10Kb 크기의 DNA 조각을 분취하였다. 이들을 *Bam*HI 으로 절단한 후 alkaline phosphatase로 처리한 pBR322와 T4 DNA ligase 로 ligation 시키고, 이를 이용하여 *E. coli* ZSC113에 형질전환 시켰다. Ampicillin (30 μ g/ml)과 glucose (1%)를 첨가한 MacConkey agar base에서 발효가 일어난 red colony를 direct selection 하였다.

다. 형질전환체의 당발효능 조사

Ampicillin (30 μ g/ml)을 첨가한 MacConkey agar base에 sole carbon source로서 각각의 당을 첨가한 후, 각각의 형질전환체를 streak 하여 하룻밤 배양해서 나타나는 colony의 색깔을 관찰하였다. 당을 이용하여 발효가 일어나면 red colony를 나타내고 발효가 일어나지 못하면 white colony를 나타내었다.

라. Methyl α -glucopyranoside 첨가시 non-PTS 당인 maltose의 이용능 carbon source로서 maltose (0.2%)를 첨가한 medium A에 균체를

접종한 후 하룻밤 배양하여 100 ml의 동일배지에 5% 되게 균체를 접종한 후, 37 °C에서 진탕배양하여 600nm 파장에서 배양액의 흡광도가 0.15 되었을 때 α -McGlc를 최종농도가 10 mM이 되게 첨가하였다. 37 °C에서 진탕배양하면서 매시간마다 OD₆₀₀ 값을 조사하며 생육저해 정도를 조사하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. *Corynebacterium glutamicum* 과 *Bacillus subtilis*로부터 glucose PTS 중 Enzyme II 유전자의 cloning

PEP의존성 당 전달계 효소기작(PTS)에 관련된 유전자를 분리하기 위하여, PTS에 의해서 glucose를 이용하는 균주중 산업적으로 유용한 *C. glutamicum* KCTC1445와 *B. subtilis* ATCC6051를 선정하였다. 이러한 균주들의 chromosomal DNA를 분리하여 *Sau*3A로 부분절단한 후, *Bam*HI으로 절단하고 CIP로 처리하여 dephosphorylation 시킨 plasmid pBR322와 T4 DNA ligase를 이용하여 14°C에서 ligation시켰다 (Fig.1).

이러한 재조합 DNA를 glucose PTS 중 EII 변이주인 *E. coli* ZSC 113에 형질전환 시킨 후 Ampicillin과 sole carbon source로서 glucose가 첨가된 MacConkey agar base에 도말한 결과, 각각 약 5,000 여주의 형질 전환체를 얻었으며, 이들 중 glucose를 첨가한 MacConkey agar base에서 red colony를 나타냄으로서 glucose를 이용하는 것으로 생각하는 형질전환체를 *C. glutamicum*의 chromosomal DNA으로부터는 5주, *B. subtilis*로부터는 2주를 각각 분리하였다 (Fig.2).

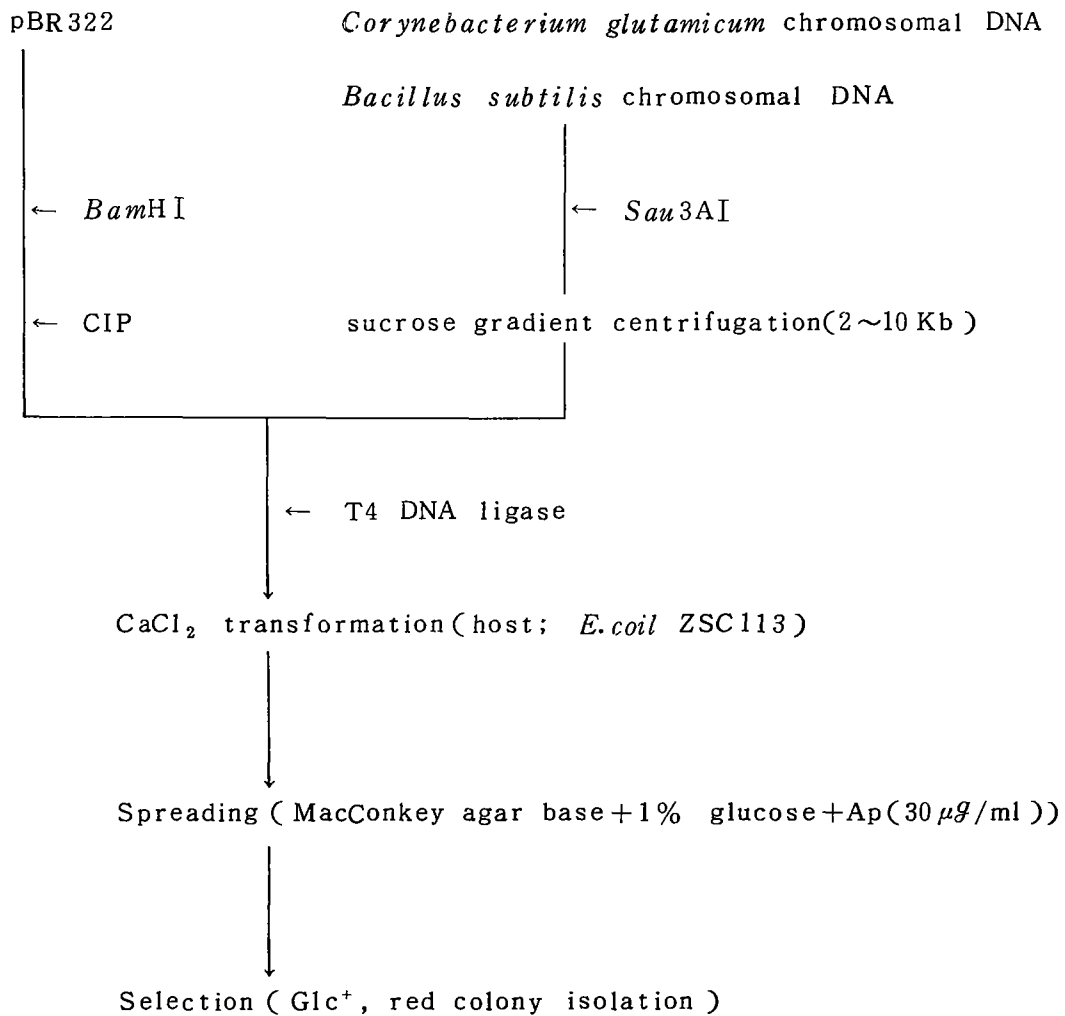


Fig.1. Cloning Scheme for Enzyme II gene of PTS



Fig. 2. Photograph of glucose fermentation of *E. coli* with (B) and without (A) EII gene on MacConkey agar base supplemented with glucose.

2. *C. glutamicum* 과 *B. subtilis* 로부터 분리한 EII 유전자의 분석

Glucose를 이용할 수 있는 형질전환체로부터 plasmid를 분리하여 *Hind*III와 *Pst* I으로 절단한 후 전기영동을 하여 insert DNA의 절단 단편들을 조사한 결과(Fig.3), *C. glutamicum*의 chromosomal DNA를 이용하여 얻은 형질전환체의 경우 서로 다른 제한효소 절단 pattern을 나타내었으나 5 균주 모두 약 2.1Kb의 *Hind*III fragment와 *Pst* I fragment를 공통된 insert DNA를 가지고 있었으므로 모두 동일한 유전자로 판명되었으며, insert DNA의 크기는 4.8~5.4Kb였다. *B. subtilis*의 chromosomal DNA를 이용하여 얻은 2주의 형질전환체의 경우 각기 서로 다른 유전자로 나타났으며 insert의 크기는 4.7Kb와 7.3Kb로 나타났다 (Table 2).

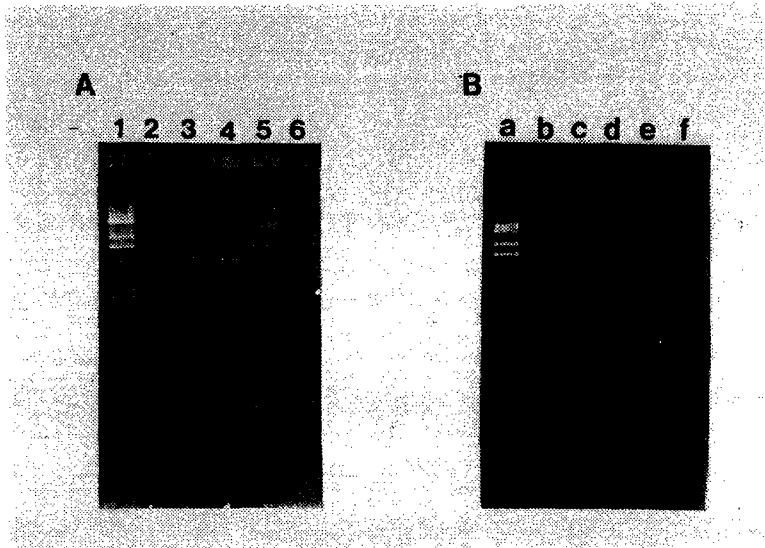


Fig.3. Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digested recombinant plasmids.

A; *Hind*III digested pattern, B; *Pst* I digested pattern
 Lanes: 1, a; λ -DNA digested with *Hind* III, 2, f; clone Tf-2, 3, e; clone Tf-5, 4, d; clone Tf-6, 5, c; clone Tf-7, 6, b; clone Tf-8.

Table 2. Restriction enzyme analysis of the different cloned EII genes

Chromosomal donor	Recombinant clone	Fragments size of digested plasmid		Total size of insert(Kb)
		<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	
<i>C. glutamicum</i>	Tf-2	4.0,3.2,2.1,0.4	4.6,3.0,2.1	5.4
	Tf-5 (= Tf-6)	4.0,2.6,2.1,0.4	4.6,2.4,2.1	4.8
	Tf-7	5.6,2.1,1.5	7.1,2.1	4.9
	Tf-8	4.2,2.6,2.1,0.4	4.8,2.4,2.1	5.0
<i>B. subtilis</i>	Tf-3	6.6,5.0		7.3
	Tf-4	9.0		4.7

3. *C. glutamicum* 유래의 EII 유전자의 **subcloning** 및 제한효소지도의 작성

가. EII 유전자의 subcloning

5 주 의 형질전환체는 약 4.8~5.4Kb의 insert DNA를 가지고 있었으므로 insert DNA의 크기를 줄이고자 *Hind* III로 절단하였을 때 공통적으로 나타나는 2.1Kb의 fragment에 structural gene이 들어있다고 판단되어 Tf-8 clone 으로부터 plasmid를 추출한 후 *Hind* III로 절단하고 2.1Kb의 *Hind* III fragment를 electroelution하여 동일한 제한효소로 절단한 pBR322 plasmid에 ligation하였다. 이러한 hybrid plasmid를 glucose와 mannose EII의 변이주인 *E. coli* ZSC113에 도입하여, PTS phenotype이 회

복된 재조합 균주를 얻어 plasmid를 분석한 결과 약 2.1Kb의 insert DNA만이 존재함을 확인하였으며 이러한 plasmid를 pCTS3라 명명하였다.

나. 재조합 plasmid pCTS3의 제한효소 지도 작성

plasmid pCTS3의 제한효소 지도를 작성하기 위해 2.1Kb의 insert를 함유하고 있는 clone으로부터 plasmid를 대량분리하여, 여러가지의 제한효소를 이용하여 절단한 후 agarose 전기영동을 행한 결과 Fig.4에서 보는 바와 같이 *Kpn* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Xba* I, *Xho* I의 인식부위는 존재하지 않았고 *Eco*R I, *Bgl* II, *Pst* I 인식부위가 각각 1곳씩 존재하였으며 그 결과 Fig.5와 같은 plasmid pCTS3의 제한효소지도를 작성하였다.

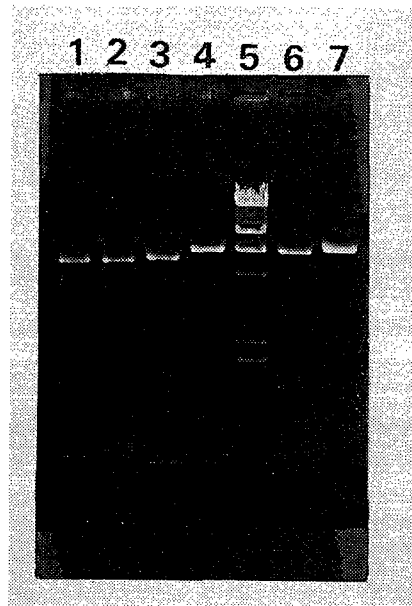


Fig.4. Agarose gel electrophoresis of restriction enzyme digested recombinant plasmid pCTS3.
Lanes : 1;*Ban*HI, 2;*Eco*RI, 3;*Pst*I, 4;*Bgl*II, 5; λ -DNA d;gested with *Hind*III, 6;*Sal*, 7;*Pvu*II

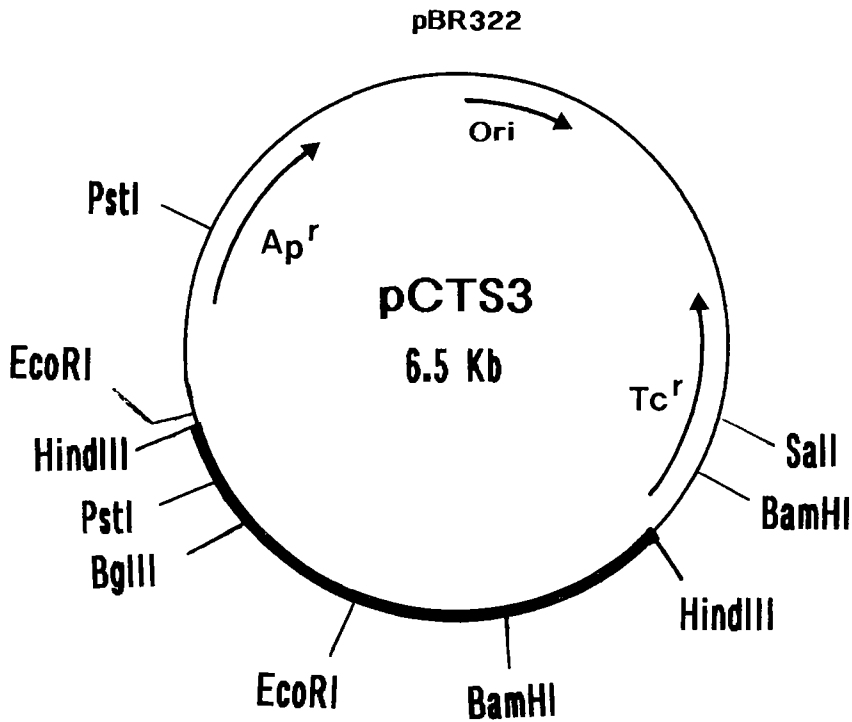


Fig.5. Physical map of hybrid plasmid pCTS3
 The bold line indicates the 2.1Kb insert DNA
 coding for Enzyme II

4. 재조합 plasmids 에 의한 여러가지 당기질의 발효능

*E. coli*의 경우 PTS에 의해 glucose를 이용할 수 있는 경로로서 Mannose PTS를 이용하는 경우와 glucose PTS를 이용하는 경로가 존재한다. glucose PTS의 EII의 경우 기질 특이성의 범위가 좁아 mannose를 이용할 수 없지만 Mannose PTS의 EII의 경우 기질로서 mannose와 glucose를 동시에 이용할 수 있다고 보고되어져 있다.⁴⁾ 따라서 clone한 유전자의 기질 특이성을 보기 위하여 MacConkey agar base에 당을 1%

되게 첨가한 후, 하룻밤 배양하여 각각의 당에 대한 발효능을 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 MacConkey plate 상에서 *C. glutamicum*의 EII 유전자를 함유한 clone은 glucose와 mannose, trehalose를 이용하였으며, *B. subtilis*에서 clone한 재조합 형질전환체는 glucose와 trehalose 이외에 sucrose에 강한 이용성을 보였다. Table 2의 결과와 같이 *E. coli*의 glucose EII 유전자인 pTSG3를 함유한 clone은 Mannose를 이용할 수 없었으나 본 실험실에서 clone한 EII는 mannose를 이용하는 것으로 보아서 clone한 유전자가 Mannose PTS의 EII 유전자인지 혹은 *E. coli*의 glucose EII 유전자와는 성질이 다른 glucose EII 유전자인지는 앞으로의 실험을 통해 밝혀야 할 것이다.

Table 3. Sugar fermentation ability of *E. coli* clones carrying recombinant plasmids

Chromosomal donor	<i>C. glutamicum</i>		<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	
	recominant clone			plasmid(control)	
	Tf-2	Tf-8	Tf-4	pTSG3 ¹²⁾	pBR322
Glucose	++	++	+	+++	-
Mannose	++	++	-	-	-
Trehalose	++	++	+	+++	-
Sucrose	-	-	+++	-	-
Fructose	-	-	-	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-

* + : ferment (red colony), - : not ferment (white colony)

5. Non-PTS 당에서의 생육시 α MeGlc 첨가에 의한 영향

*E. coli*의 glucose PTS의 EII 유전자의 경우 glucose와 non-PTS sugar를 동시에 첨가하면 우선적으로 glucose를 이용하고 나서 glucose 고갈시 다른 당을 이용하는 diauxic growth를 나타내는데⁴⁾ non-PTS 당인 maltose를 탄소원으로 생육시키다가 PTS 당이며 glucose의 nonmetabolizable analogue인 α MeGlc를 첨가함으로써 생육이 잠시 저해되는 현상이 나타난다. 따라서 본 실험실에서 clone한 유전자 pCTS3를 함유한 clone도 α MeGlc에 의해 maltose uptake에 영향을 받는지를 조사하기 위하여 실험을 행한 결과, *E. coli* glucose PTS의 EII 유전자를 insert DNA로 가지고 있는 plasmid pTSG3¹²⁾와는 다르게 Fig.6에서 나타난 바와 같이, 600nm에서 OD 값이 0.15에서 α MeGlc를 첨가하였을 때 생육이 저해를 받지 않는 것으로 나타났다. 이것은 아마도 이전에 설명한 바와 같이 *E. coli*의 glucose EII와는 성질이 다르거나, 혹은 mannose PTS의 EII일 가능성이 있는 것으로 생각된다.

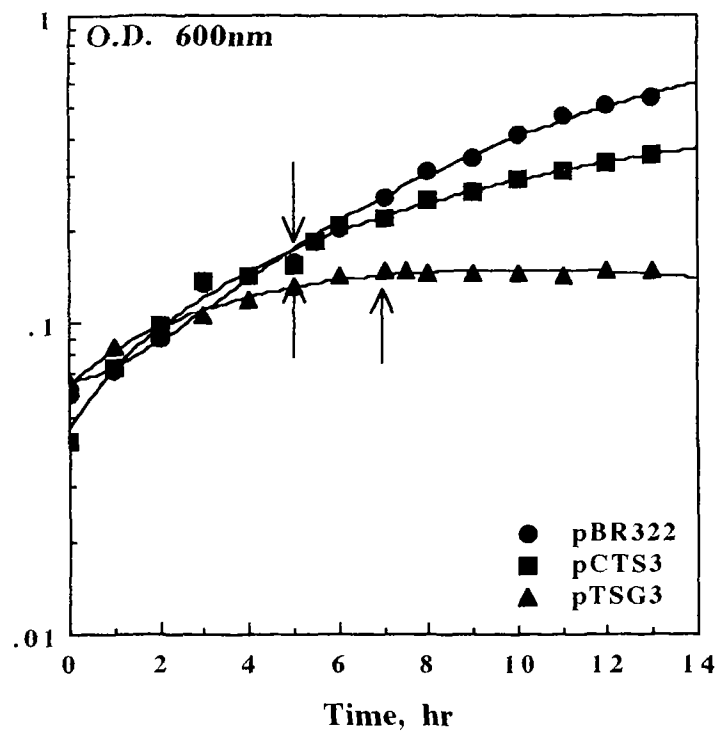


Fig.6. Growth on non-PTS sugar (maltose) in the presence of methyl α -glucopyranoside. α MeGlc was added to a final concentration of 10mM at point indicated by the arrow.

제 4 장 결 론

1. PTS를 이용하여 glucose를 uptake 하는 *B. subtilis*와 *C. glutamicum*의 chromosomal DNA로부터 glucose와 mannose EII 변이주인 *E. coli* ZSC 113을 host로 이용하여 얻은 형질전환체중, MacConkey agar base에 glucose를 첨가한 선별 배지에서 red colony를 나타내는 총 7주의 positive한 형질전환체를 분리하였다. 7주의 형질전환체는 glucose를 첨가한 최소 배지에서 잘 생육하였으며, glucose 발효능을 회복하였으므로 EII 유전자가 clone되었음을 확인하였다.
2. *C. glutamicum*의 PTS 유전자가 삽입된 총 5주의 형질전환체로부터 분리한 재조합 plasmid를 제한효소로 절단하여 분석한 결과, insert DNA의 크기는 4.8~5.4Kb까지 서로 다르게 나타났으나 모두 2.1Kb의 공통된 삽입 단편을 가지고 있었으므로 모두 동일한 유전자임을 확인하였고, *B. subtilis*로부터 얻은 2주의 형질전환체는 서로 다른 EII 유전자를 가지고 있었다.
3. *C. glutamicum*으로부터 분리한 EII 유전자의 크기를 2.1Kb까지 pBR 322에 subcloning하여 pCTS3라 명명하였으며, pCTS3의 제한효소지도를 작성하였다.
4. *C. glutamicum* 유래의 유전자가 도입된 Tf-8는 glucose, mannose, trehalose를 이용하였으며, *B. subtilis* 유래의 유전자가 도입된 Tf-4는 glucose, trehalose, sucrose를 이용하였다. 특히 Tf-4의 경우 sucrose의 발효능이 우수한 것으로 나타났다.

5. 재조합 plasmid pCTS3 를 함유한 형질전환체는 non-PTS 당 (maltose)
에서의 생육중 PTS 당인 α MeGlc 의 첨가에 의해서 *E. coli* 의 EII
유전자를 함유한 형질 전환체와는 달리 생육이 저해되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Mitchell, W.J., J.E. Shaw and L. Andrews. 1991.
Properties of the Glucose Phosphotransferase System of *Clostridium acetobutylicum* NCIB8052. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2534 ~ 2539.
2. Saier, Jr. M.H. 1977. Bacterial Phosphoenolpyruvate : Sugar Phosphotransferase Systems : Structural, Functional, and Evolutionary Interrelationships. *Bacteriol. Rev.* 41:856-871.
3. Postma, P.W. and J.W. Lengeler. 1985. Phosphoenolpyruvate : Carbohydrate Phosphotransferase System of Bacteria. *Microbiol. Rev.* 49:232 ~ 269.
4. Meadow, N.D., D.K. Fox and S. Roseman. 1990. The Bacterial Phosphoenolpyruvate : Glycose Phosphotransferase System. *Annu. Rev. Biochem.* 59:497 ~ 542.
5. Robillard, G.T. and J.S. Lolkema. 1988. Enzymes II of the Phosphoenolpyruvate-dependent sugar transport systems: a review of their structure and mechanism of sugar transport. *Biochimica et Biophysica Acta.* 947:493 ~ 519.
6. Lengeler, J.W. 1990. Molecular analysis of the Enzyme II - complexes of the bacterial phosphotransferase system (PTS) as carbohydrate transport systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1018:155 ~ 159.

7. Reizer J., M.H. Saier, Jr, J. Deutcher, F. Grenier, J. Thompson and W. Hengstenberg. 1988. The Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase system in Gram-Positive Bacteria: Properties, Mechanism, and Regulation. *Crit. Rev. Microbiol.* 15:297 ~ 338.
8. Saier, Jr. M. H. 1989. Protein Phosphorylation and Allosteric Control of Inducer Exclusion and Catabolite Repression by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System *Microbiol. Rev.* 53:109 ~ 120.
9. Lengeler, J.W., F. Titgemeyer, A.P. Voger and B.M. Wohrl. 1990. Structures and homologies of carbohydrate: phosphotransferase System (PTS) proteins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 326: 489 ~ 504.
10. Stock, J.B., E.B. Waygood, N.D. Meadow, P.W. Postma and S. Roseman. 1982. Sugar Transport by the Bacterial Phosphotransferase System. *J. Biol. Chem.* 257:14543 ~ 14552.
11. Saier, Jr. M.H., M. Yamada, B. Erni, K. Suda, J. Lengeler, R. Ebner, P. Argos, B. Rak, K. Schetz, C.A. Lee, G.C. St and R.F. Doolittle. 1988. Sugar Permeases of the bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: sequence comparisons. *FASEB. J.* 2: 199 ~ 208.
12. Erni, B. and B. Zanolari. 1986. The Glucose-permease of the bacterial phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.*

261:16398 ~ 16403.

13. Meadow, N.D., D.W. Saffen, R.P. Dottin and S. Roseman. 1982. Molecular cloning of the *crr* gene and evidence that it is the structural gene for III^{Glc} , a phosphocarrier protein of the bacterial phosphotransferase system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:2528 ~ 2532.
14. Nelson, S.O., A.R.J. Schuitema, R. Benne, Lex H.T. vander Ploeg, J.S. Plijter, F. Aan and P.W. Postma. 1984. Molecular cloning, sequencing, and expression of the *crr* gene: the structural gene for III^{Glc} of the bacterial PEP: glucose phosphotransferase System. EMBO. J. 3:1587 ~ 1593.
15. Erni, B. and B. Zanolari. 1985. The Mannose-Permease of the Bacterial Phosphotransferase System. J. Biol. Chem. 260:15495 ~ 15503.
16. Erni, B., B. Zanolari and H.P. Kocher. 1987. The Mannose Permease of *Escherichia coli* Consists of Three Different Proteins. J. Biol. Chem. 262:5238 ~ 5247.
17. Erni, B., B. Zanolari, P. Graff and H.P. Kocher. 1989. Mannose Permease of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 264:18733 ~ 18741.
18. Steinmetz, M. and G. Gonzy-Treboul. 1987. Phosphoenolpyruvate Sugar Phosphotransferase System of *Bacillus subtilis*: Cloning of the Region Containing the *ptsH* and *ptsI* Genes and Evidence

For a *crr*-Like Gene. J.Bacteriol. 169:2287 ~ 2290.

19. Postma, P.W., G.Gonzy-Treboul, J.H. de Waard and M. Zago-
rec. 1991. The glucose permease of the phosphotransferase
system of *Bacillus subtilis*: evidence for II^{Glc} and III^{Glc} domains.
Mol. Microbiol. 5:1241 ~ 1249.
20. Fouet, A., M. Arnaud, A. Klier and G. Rapoport. 1987. *Bacillus*
subtilis sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase
system: Expression in *Escherichia coli* and homology to enzyme
II from enteric bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:8773~8777
21. Bouma, C.L., N.D. Meadow, E.W. Stover, and S. Roseman.
1987. II-B^{Glc}, a glucose receptor of the bacterial phospho-
transferase system: Molecular cloning of *ptsG* and purification
of the receptor from an overproducing system of *Escherichia*
coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:930-934.