

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

장화형<sup>1</sup> · 고병훈<sup>2</sup> · 박신영<sup>2</sup> · 이성호<sup>2</sup> · 김성진<sup>2</sup> · 임유정<sup>2</sup> · 한갑진<sup>2</sup> · 김영호<sup>2</sup> · 이영근<sup>4</sup> · 이기성<sup>\*1,2,3</sup>

<sup>1</sup>배재대학교 바이오의약연구센터(Bio-Med RRC), <sup>2</sup>자연과학대학 생물약학과

<sup>3</sup>(주)에코바이오메드, <sup>4</sup>한국원자력연구소 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-Phy1을 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

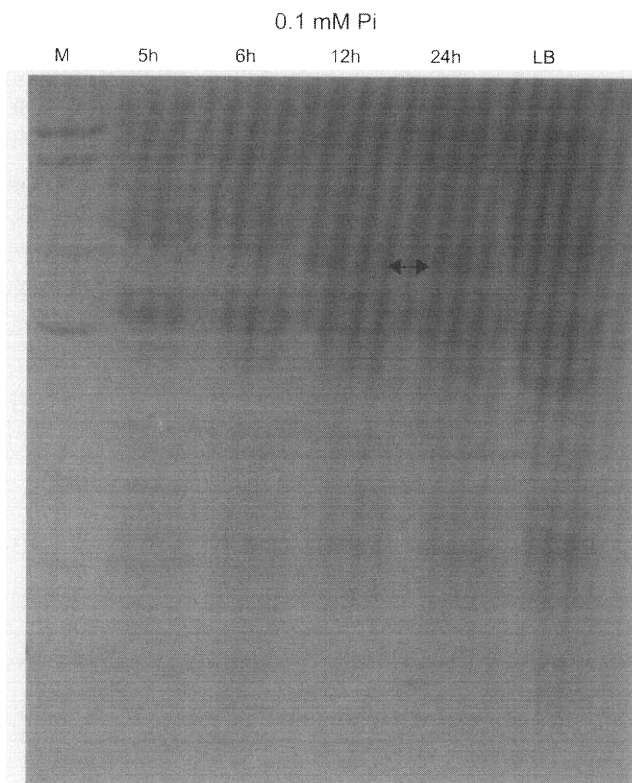
*Enterobacter aerogenes* IFO 12010 (ATCC 15038)로부터 min-Mu phage를 이용하여 *in vivo* molecular cloning 방법을 통해 확보한 *phoA* 유전자와 CAT assay를 통해 확인된 promoter 부위의 염기서열 정보를 활용하였다. *E. aerogenes phoA*의 염기서열로부터 APF primer (5'-CGGGATCCAGATCTTGTGAC-CAGT-3', *Bam*HI와 *Bgl*II 삽입)와 APR primer (5'-CCCAAGC-TTCTAGATAATTCAC-3', *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

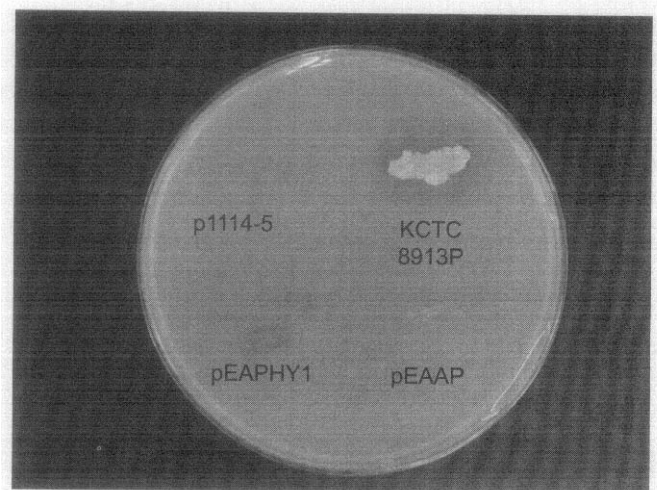




와 0.1 mM의 phosphate (LP)를 첨가하여 배양하였을 때 오직 LP에서만 bacterial alkaline phosphatase (Bap)의 활성이 높아지는 전형적인 PhoB-PhoR two-component transcriptional signal system이 작동됨을 Bap의 기질인 XP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-*p*-toluidine)를 분해하여 blue dye를 형성하는 능력의 증가를 통해 확인하였다(결과 미제시). CK-PHY1을 LB에서 배양한 후 LP배지에서 배양하여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



**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of *Bsa-PhyI* 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-PhyI* 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*; pEAAPHY1, pEAAP ligating *Bsa-phyI* 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-phyI*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. pEAAPHY1에 포함된 *Bsa-PhyI*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 fusion 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 가용성 인을 생산하여 토양 미생물이나 식물의 성장에 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 Chang<sup>1</sup>, Byung-Hoon Kho<sup>2</sup>, Shin-Young Park<sup>2</sup>, Sung-Ho Lee<sup>2</sup>, Sung-Jin Kim<sup>2</sup>, You-Jung Lim<sup>2</sup>, Gabjin Han<sup>2</sup>, Young-Ho Kim<sup>2</sup>, Young-Keun Lee<sup>4</sup>, and Ki-sung Lee<sup>\*1,2,3</sup> (<sup>1</sup>Bio-Med RRC, <sup>2</sup>Department of Biology & Medicinal Science, PaiChai University, Daejeon 302-735, Korea, <sup>3</sup>Eco-Bio-Med Co. Ltd., Daejeon 302-120, Korea, <sup>4</sup>Radiation 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-Phyl. Also CK-PHY1 formed the clear zone in solid medium containing phytate as a sole phosphate source.