

Mycobacterium tuberculosis
sigB 유전자에 존재하는 SigH-와
SigE-의존적 promoter의
염기서열분석

연세대학교 대학원

의과학과

송 승 은

Mycobacterium tuberculosis
sigB 유전자에 존재하는 SigH-와
SigE-의존적 promoter의
염기서열분석

지도교수 조 상 래

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원
의 과 학 과
송 승 은

송승은의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ □□

심사위원 _____ □□

심사위원 _____ □□

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

실험이 좋아서 시작한 석사학위를 마치며 많은 것을 배워갑니다. 논문이 완성되기까지 많은 지도를 해주신 조상래 교수님께 특히 감사드리고, 아직은 모자라기만 한 저에게 논문지도부터 실험지도까지 신경써주신 송택선 교수님께 감사드리며, 논문을 평가해 주시고 제 실험에 관심을 가져주신 김세규 선생님께 감사드립니다. 많은 조언을 해 주신 조성애 교수님과 저에게 생물에 대한 이해를 할 수 있도록 지도해 주신 미생물학교실 교수님들께 감사드립니다. 누구보다 저에게 실험이라는 것을 처음 가르쳐 주고, 석사생활 내내 큰 힘이 되어준 방혜은 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 함께 생활하고 실험하는데 도움을 준 우리 실험실 식구 지원, 원경 선생님, 아름, 지영, 수연에게 감사하고, 실험에 대한 생각을 나눠주신 한미영 선생님께 감사드립니다. 자리가 떨어져 있는 관계로 소원해 질 수 있는 저를 항상 이해해 주시고 아껴주신 조장은 선생님, 이은계 선생님, 최주영 선생님, 김영미 선생님, 김희숙 선생님, 김승철 선생님께 감사드립니다. 멋진 동기 홍성희 선생님과 밝은 모습의 최수정 선생님에게 든든한 동기들이 있어 좋은 석사학위기간이었다고 전하고 싶습니다. 미생물학교실의 양은정 선생님, 김형란 선생님, 김지수 선생님, 그리고 호명되지 않은 미생물학교실의 모든 선생님들에게, 지면관계상이라는 핑계를 대며 감사의 말을 전합니다. 만날 때마다 따뜻한 말을 해주시는, 원주에 계신 이해영 교수님과 힘들 때마다 다독여준 김연 선생님께 감사드립니다. 지금 실험실에 같이 있지는 않지만 함께 지내며 힘이 되어준 홍선화 선생님과 이초순 선생님에게 감사드립니다. 그리고 우리선배, 든든한 후원자 지수 선생님에게 감사의 말을 전합니다. 특별한 사부, 지유신 선생님께 감사드립니다. 그리고 나의 친구 은방울자매들 은영, 은정, 은혜에게 감사의 말을 전합니다. 멀리서 실험하며 학위과정 중인 김지연, 멋진 사람이 되자고 약속한 김은경, 대학동기 이정은과 한은정에게 감사드립니다. 한대부여고 선생님들에게 이날의 저를 만들어 주심에 감사하다고 전하고 싶습니다. 마지막으로 영원한 아군이 되어주고 언제나 나의 바탕을 만들어 준 엄마 아빠 상원이 그리고 가족에게 감사합니다.

저자 씀

차 례

그림 및 표 차례	
국문요약	1
I. 서 론	3
1. 결핵의 현황과 원인균	3
2. 결핵균 대사의 특징	3
3. 세균 RNA polymerase sigma factor의 기능	4
4. ECF sigma factor	5
5. 연구의 목적	6
II. 재료 및 방법	7
1. 실험재료	7
가. 사용 균주와 plasmid	7
나. 효소 및 시약	7
2. 실험 방법	7
가. 균주 배양	7
나. 일반적인 재조합 DNA 기술	9
다. <i>sigC</i> , <i>sigE</i> , <i>sigH</i> 유전자의 클로닝	9
라. <i>E. coli</i> 에서의 과량발현 및 정제	10
마. <i>sigB</i> promoter를 포함한 plasmid의 제작과 돌연변이의 도입	13
바. <i>in vitro</i> transcription assay	13
사. <i>Mycobacterium smegmatis</i> 의 형질전환	19
아. β -Galactosidase 활성 측정	20
III. 결 과	21
1. 과량발현을 위한 <i>sigC</i> , <i>sigE</i> , <i>sigH</i> 유전자의 클로닝	21
2. <i>E. coli</i> 에서의 과량발현 및 정제	21
가. SigH	21

나. SigE	24
다. SigC	24
3. <i>sigB</i> promoter 부분을 포함하는 plasmid 제작과 돌연변이 도입	27
4. SigC, SigE와 SigH에 의한 야생형 <i>sigB</i> promoter의 전사	27
5. SigE와 SigH에 의한 야생형 및 돌연변이 <i>sigB</i> promoter의 전사	27
6. <i>Mycobacterium smegmatis</i> 에서 돌연변이 <i>sigB</i> promoter들의 활성측정	35
IV. 고찰	38
V. 결론	42
참고문헌	43
영문요약	47

그림 차례

그림 1. SigH-dependent promoter들의 sequence alignment	14
그림 2. PCR을 이용한 site-direct mutagenesis	15
그림 3. <i>in vitro</i> transcription에 사용된 <i>sigB</i> promoter 염기서열과 모식도	18
그림 4. 과량발현을 위한 <i>sigC</i> , <i>sigE</i> 와 <i>sigH</i> 유전자의 클로닝	22
그림 5. SigH 재조합 단백질 과발현과 정제	23
그림 6. SigE 재조합 단백질 과발현과 정제	25
그림 7. SigC 재조합 단백질 과발현과 정제	26
그림 8. <i>sigB</i> promoter에 돌연변이 도입	28
그림 9. <i>in vitro</i> transcription assay에 사용된 template DNA	29
그림 10. SigC, SigE와 SigH에 의한 야생형 <i>sigB</i> promoter의 전사	30
그림 11. SigE와 SigH에 의한 야생형 및 돌연변이 <i>sigB</i> promoter의 전사	31
그림 12. SigE와 SigH에 의존적인 <i>in vitro</i> transcription assay의 정량적 분석	33
그림 13. β -Galactosidase assay를 통한 돌연변이 <i>sigB</i> promoter의 전사활성 측정	36

표 차례

표 1. 실험에서 사용된 균주와 plasmid	8
표 2. <i>in vitro</i> transcription assay를 위한 template의 제작에 사용된 primer들	16

국문요약

Mycobacterium tuberculosis *sigB* 유전자에 존재하는 SigH-와 SigE-의존적 promoter의 염기서열 분석

병원성세균들은 숙주에 감염하여 질병을 유발하는 과정에서 숙주의 방어기작에 따른 다양한 환경의 변화에 노출된다. Extracytoplasmic function (ECF) 계열의 sigma factor들은 미생물이 이러한 environmental stress에 저항하는데 필요한 유전자발현에 있어서 매우 중요한 조절인자로 알려져 있다. 결핵균의 genome에는 13개의 sigma factor 유전자가 존재하는데 이중 10개가 ECF 계열에 속한다. 이들 가운데 *sigE*와 *sigH* 유전자의 돌연변이가 결핵균의 병독성에 영향을 미치며 실제로 이들 유전자의 산물인 SigE와 SigH는 oxidative stress와 heat stress에 대한 결핵균의 유전자발현 조절기작에서 부분적으로 겹쳐지는 유전자 집단의 전사를 매개하는 것으로 밝혀졌다. SigE와 SigH는 다른 sigma factor, SigB와 더불어 결핵균의 stress에 대한 반응에서 중심적인 regulatory network을 구성하고 있는데, 외부 자극에 따라 SigH가 *sigE* 유전자의 발현을 유발하며 SigH와 합성된 SigE가 *sigB* 유전자의 전사를 촉진한다. 따라서 이들 sigma factor 유전자들의 발현에 매우 정교한 조절기작이 존재하며 두개의 sigma factor, SigE와 SigH가 *sigB* 유전자의 promoter를 인식할 것으로 예상된다. 각 sigma factor가 인식하는 promoter들의 염기서열 분석하기 위하여 *sigB* 유전자에서 이미 알고 있는 SigH-의존적 promoter의 -35와 -10 지역을 대상으로 -35 지역에 16개, -10 지역에 12개 위치에 돌연변이를 도입하고 SigE와 SigH에 대한 promoter 활성화에 미치는 각 돌연변이의 영향을 관찰하였다. 정제한 SigH, SigE와 대장균의 RNA polymerase core enzyme을 재조합하여 사용한 *in vitro* transcription assay를 통하여 SigH

와 SigE가 거의 유사한 -35 지역에 결합하며 각각 염기서열, GGAA(T/c)(A/t)와 GGAAGTC(A/C)를 인식하는 것을 확인하였다. 각 sigma factor가 인식하는 -10 지역의 염기서열도 서로 중복되어 있으며 SigH는 GTT, SigE는 (C/a)GTT 염기서열을 선호하였다. 이외에 아직 확실하게 규명되지 않은 다른 부위의 염기서열이 각 돌연변이 promoter의 전사에 영향을 줄 가능성도 있음이 제시되었다. 위에서 밝혀진 각 sigma factor들의 promoter 염기서열에 대한 세포내 결합특이성은 야생형 혹은 각 sigma factor 유전자의 돌연변이체 *M. smegmatis*를 대상으로 transcriptional *lacZ* fusion을 이용하여 돌연변이 promoter들의 전사활성을 측정하여 확인하였다. 이 연구를 통하여 얻어진 각 sigma factor가 인식하는 promoter 염기서열에 대한 정보는 이들에 의하여 조절되는 유전자집단 (regulon)에 대한 분석을 가능하게 함으로써 장차 보다 자세한 조절기작에 대한 연구와 더불어 결핵균의 병원성과 관련이 있는 세포내 유전자발현 조절기작의 규명에 기여할 것이다.

핵심되는 말: *Mycobacterium tuberculosis*, sigma factor, promoter, transcription

Mycobacterium tuberculosis
sigB 유전자에 존재하는 SigH-와 SigE-의존적 promoter의
염기서열 분석

<지도교수 조 상 래>

연세대학교 대학원 의과학과

송 승 은

I. 서론

1. 결핵의 현황과 결핵의 원인균

결핵은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의해서 발생하는 만성 세균감염증이다. 최근의 WHO 추계에 의하면 세계 인구 61억 명의 1/3인 20억 명이 결핵에 감염되어 있으며, 매년 800만 명의 새로운 환자가 발생하고, 결핵으로 인한 사망자는 매년 200만 명에 이른다고 한다¹. 우리나라에서도 전 인구의 약 1/3 이상이 결핵에 감염되어 있는 것으로 추정되며, 매년 약 12만 명의 새로운 결핵환자가 발생한다고 한다. 또한 OECD가입 30개국 중 결핵사망률 1위를 기록하고 있다². 따라서 결핵균의 특성을 이해하고 예방, 진단, 치료하기 위한 연구가 필수적이며, 그 중 결핵균의 병독인자 탐색과 병인 기전 규명 및 병독인자의 유전자들에 대한 연구가 중요하다.

2. 결핵균 대사와 특징

결핵균은 공기 중에 있다가 사람이 호흡함과 동시에 호흡기를 통해 인체에 유입되게 되는데, 이 때 처음 만나게 되는 폐포 대식세포(alveolar macrophage)의 공격을 이겨내고 대식세포내에서 증식을 반복하게 된다.

따라서 결핵균은 숙주내로 감염되어 처음 만나게 되는 환경인 대식세포 내에서 살아서 번식하기 위한 방어기전을 가지고 있어야 하는데, 대식세포가 세균을 살해하는 방법인 효소나 산을 분비하는 기전을 차단함으로써 대식세포를 무력화시키거나 대식세포의 공격에 의하여 손상된 기능을 회복할 수 있는 능력을 가짐으로써 대식세포 내에서 생존할 수 있는 것으로 알려져 있다³. 이와 같은 결핵균의 방어기전에는 다양한 유전자들의 발현이 필수적이며 결핵균은 대식세포 내의 환경에 따라 이러한 유전자의 발현을 조절하는 정교한 유전자발현 조절기작을 가지고 있는 것으로 생각된다.

3. 세균 RNA polymerase sigma factor의 기능

세균에서 유전자발현의 첫 단계는 RNA polymerase에 의한 유전자의 전사이다. RNA polymerase는 DNA의 특정한 부분, promoter를 인식하여 해당 유전자의 전사를 개시하는데, 세균은 주변 환경에 따라 RNA polymerase에 의한 특정 유전자집단의 발현을 조절함으로써 환경변화에 적응한다. 세균의 RNA polymerase는 $\alpha^2\beta\beta'\sigma$ 의 5가지 subunit으로 이루어져 있으며 이 중에서 sigma subunit 혹은 sigma factor가 RNA polymerase가 인식하는 특정 promoter 염기서열에 대한 특이성을 부여한다. RNA polymerase holo enzyme은 catalytic subunit로서 RNA를 합성하는 활성을 가지고 있는 $\alpha^2\beta\beta'$ 형태의 RNA polymerase core enzyme과 promoter에 대한 결합특이성을 가지고 있는 sigma factor가 결합하여 특정한 promoter 염기서열을 공통적으로 가지고 있는 유전자들을 전사할 수 있다. 세균은 주변 환경의 변화에 따라 특정 sigma factor들의 기능을 조절하여 이들이 인식하는 유전자집단의 발현을 조절함으로써 다양한 외부환경의 변화에 따른 적응이나 세포의 분화 등에 필요한 단백질을 생산을 조절한다.

Sigma factor들이 결합하는 유전자의 promoter 지역에는 sigma factor들이 인식하는 두 가지 중요한 염기서열이 존재한다. 전사시작점의 5' 방향 약 10번째 염기 주변에 주로 A와 T로 구성된 6개 정도의 염기서열을 -10

염기서열(-10 sequence)라고 하고, 전사시작점으로부터 약 35번째 염기 주변의 특정 염기서열을 -35 염기서열(-35 sequence)이라고 부른다. 모든 유전자들은 이 -10, -35 지역에 독특한 염기서열을 가지고 있고 다양한 sigma factor들이 이들 중 특정한 염기서열을 인식하여 결합함으로써 promoter에 유사한 염기서열을 가지고 있는 유전자집단의 발현을 유도한다.

4. ECF sigma factor

세균에 존재하는 다양한 sigma factor들은 각각이 전사를 매개하는 유전자의 특성에 따라 구분할 수 있는데, 일상적인 환경에서 세균의 기본적인 생존과 관련된 유전자들의 전사에 관여하는 것들을 principle sigma factor라 한다. 가장 잘 알려진 것이 대장균에서 housekeeping 유전자 발현에 관여하는 σ^{70} 이다. 그 밖에 heat shock 등 외부자극이나 특정한 환경에서 생존에 필요한 유전자들의 발현에 관계하는 것들을 alternative sigma factor라 한다⁴. 잘 알려진 alternative sigma factor로는 *E. coli*에서 ferric citrate 흡수와 heat shock에 대한 반응을 조절하는 σ^E 와 σ^{FecI} 이 있으며^{5, 6}, *Streptomyces coelicolor*에서는 oxidative stress에 관여하는 σ^R 이 보고된 바 있다⁷.

이러한 alternative sigma factor 중에서 extracytoplasmic function (ECF) 계열의 sigma factor들이 있는데 이것은 environmental stress의 환경에서 살아남기 위해 필요한 유전자 발현을 조절하는 중요한 조절인자이다. ECF sigma factor는 결핵균의 병원성에 관계가 있는데, 결핵균 이외에서도 ECF sigma factor의 연구가 활발히 진행되고 있으며 *Pseudomonas aeruginosa*⁸, *Vibrio cholerae*⁹의 sigma factor들이 세균들의 병원성에 중요한 역할을 담당하고 있음이 알려져 있다. 이외에도 많은 병원성 미생물에서의 sigma factor의 중요성에 대한 연구가 진행되고 있다.

결핵균에서는 대식세포가 미생물을 공격하는 기전인 heat shock, oxidative stress, surface stress 등의 환경적 변화에 적응하기 위한 메커

니즘의 하나로서 sigma factor의 역할이 주목되고 있다. 지금까지 알려진 결핵균의 sigma factor는 총 13개가 있는데 그 중 10개가 ECF sigma factor로 알려져 있다¹⁰⁻¹². 그 중 heat shock response에 세 가지 sigma factor σ^B , σ^E , σ^H 의 전사조절이 필요하다는 것이 알려져 있다¹³⁻¹⁵. ECF sigma factor의 하나인 *sigH* 유전자가 제거된 돌연변이 결핵균은 heat shock과 oxidative stress에 대하여 야생형 균주보다 더 적응성이 약하며, σ^H 가 thioredoxin reductase/thioredoxin 유전자와 heat shock response 유전자인 *dnaK*와 *clpB*의 유도를 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 σ^H 는 stress에 반응하는 또 다른 sigma factor인 *sigE* 유전자와 *sigB* 유전자의 발현을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 일부 논문에서 oxidative stress나 surface stress 또는 heat shock에 의한 적응반응에서 *sigE* 유전자의 전사가 σ^H 에 의존적으로 증가함을 확인하였다. 또한 surface stress 후에 σ^H 의 발현이 증가되며, 증가된 σ^H 는 *sigB* 유전자의 전사를 증가시키는 것으로 보고 되었다^{15, 16}.

따라서 다양한 외부자극에 대한 반응의 결과가 최종적으로 *sigB* 유전자의 전사와 관계가 있는 것으로 생각되는데, 다양한 종류의 외부자극에 따라 *sigB* 유전자를 전사하기 위하여 *sigB* 유전자의 promoter에 다양한 sigma factor들이 인지할 수 있는 염기서열들이 존재할 것이라 추측할 수 있다.

5. 연구의 목적

이 연구는 결핵균의 다양한 stress response에서 중심적인 역할을 하며 두개의 sigma factor, σ^E 와 σ^H 에 의하여 전사되는 것으로 알려진 *sigB* 유전자의 promoter를 대상으로 각 sigma factor가 인식하는 특정한 염기서열을 규명하기 위하여 SigH-의존적인 promoter의 -35, -10 부위에 돌연변이를 도입하고 각 돌연변이 promoter들의 σ^E 와 σ^H 에 대한 promoter 활성을 비교함으로써 각 sigma factor가 인식하는 promoter 염기서열을 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 사용 균주와 plasmid

실험에 사용한 균주 및 plasmid는 표 1에 정리되었다.

나. 효소 및 시약

제한효소는 대부분 New England Biolabs (Beverly, MA, USA) 제품을 사용하였고, 일부는 KOSCO (Seoul, Korea) 제품을 사용하였다. T4 DNA ligase는 New England Biolabs (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Ampicillin과 chloramphenicol은 Amersham Biosciences AB (Uppsala, Sweden)에서, kanamycin은 동아제약 (Seoul, Korea)에서, zeocin은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. Hygromycin은 Roche (Mannheim, Germany)에서 구입하여 사용하였고 그 외의 시약들은 Sigma 제품 (Louis, MS, USA)과 일반적으로 실험실에서 사용되는 양질의 시약을 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 균주 배양

E. coli DH5 α 와 *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS는 고체 또는 액체 Luria-Bertani 배지¹⁷ 를 사용하여 호기적 조건으로 37°C에서 배양하였다. 필요에 따라서 ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol (20 $\mu\text{g/ml}$), kanamycin (25 $\mu\text{g/ml}$), hygromycin (25 $\mu\text{g/ml}$)을 배지에 첨가하였다.

표 1. 실험에서 사용된 균주와 plasmid

Strain 혹은 plasmid	Genotype 혹은 description	Reference 혹은 source
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		
mc ² -155	High-frequency transformation strain of <i>M. smegmatis</i> derived from wild-type strain mc ² -6	25
RH244	mc ² -155 <i>sigE::zeo</i> (Zeo ^r) [SigE ⁻]	26
RH413	mc ² -155 <i>sigH::kan</i> (Kan ^r) [SigH ⁻]	R. N. Husson
RH414	mc ² -155 <i>sigH::kan</i> (Kan ^r) [SigH ⁻] and <i>sigE::zeo</i> (Zeo ^r) [SigE ⁻]	R. N. Husson
<i>E. coli</i>		
DH5 <i>α</i>	<i>supE44lac169(∅80lacZΔM15)hsdR17recA</i> <i>endA1gyrA96thi-1relA1</i>	BRL
BL21(DE3)	F2 <i>ompThsdSB(rB2mB2)galdcn</i> (DE3)	Novagen
Plasmid		
pET-3c	Expression vector for recombinant proteins; Amp ^r	Stratagene
pET-11a	Expression vector for recombinant proteins; Amp ^r	Stratagene
pGEX-4T-3	Expression vector for recombinant proteins; Amp ^r	Novagen
pCS3	7,545-bp plasmid derived from pCV77; Kanamycin resistant gene was replaced with hygromycin resistance gene	27
pTS130	pET-3c with <i>Mycobacterium tuberculosis sigH</i> gene; Amp ^r	This study
pTS143	pET-11a with <i>Mycobacterium tuberculosis sigE</i> gene; Amp ^r	This study
pTS144	pCV77 with T7 promoter region; Kan ^r	This study
pTS145	pTS144 with <i>sigB</i> promoter region; Kan ^r	This study
pTS148	pGEX-4T-3 with <i>Mycobacterium tuberculosis sigC</i> gene; Amp ^r	This study

*Mycobacterium smegmatis*는 10% albumin-dextrose-catalase (ADC; bovine albumin fraction V 50 g, dextrose 20 g, catalase 1 g/ℓ)가 포함된 Difco™ Middlebrook 7H9 broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체배지와 Difco™ Middlebrook 7H9 broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)로 만든 평판배지에서 호기적인 조건으로 37°C에서 배양하였다.

나. 일반적인 재조합 DNA 기술

제한효소의 사용, DNA ligation 및 기타 DNA 재조합 방법, *E. coli* 형질전환과 plasmid DNA 추출은 Sambrook 등¹⁸ 과 시약회사의 지시에 따라 수행하였다.

다. *sigC*, *sigE*, *sigH* 유전자의 클로닝

sigH 유전자를 클로닝하기 위한 PCR은 전체 반응용액 50 μℓ 중 20 ng의 결핵균 genomic DNA, 5 μℓ의 10X buffer (SolGent Co. Ltd., Daejeon, Korea.), 0.2 mM dNTP, 20 μM의 F primer, caccatcgatgtcg gccatatgtatatctc, 20 μM의 R primer, atcaccatcactcactaaggatccggctgctaac, 2.5 U *Pfu* DNA polymerase (SolGent Co. Ltd., Daejeon, Korea.)를 넣은 시료로 수행하였다. PCR은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation한 후, 95°C에서 20초간 denaturation, 54°C에서 20초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension을 30 cycles간 수행한 후, 72°C에서 10분간 final extension을 하는 조건으로 수행하였다. PCR산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 목적 단편임을 확인한 후, QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR산물은 제한효소 *Bam*HI 과 *Nde*I 으로 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. pET-3c vector 또한 같은 제한효소로 처리하였다. 제한효소로 자른 PCR산물과 pET-3c vector를 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA 단편들

을 50°C에서 5분간 가열시킨 다음, T4 DNA ligase를 첨가하고 16°C에서 16시간 반응시켰다. 전체 시료 중 5 μ l을 *E. coli* DH5 α 에 도입시켜 ampicillin (100 μ g/ml)이 포함된 LB 평판 배지에 도달한 후 37°C에서 16시간 동안 배양하였다. 얻어진 콜로니를 ampicillin이 포함된 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 다음, Plasmid SV mini kit (Generalbiosystem, Seoul, Korea)를 이용하여 plasmid를 정제한 후, 제한효소로 잘라 삽입된 DNA 단편을 확인하고, 염기서열을 분석하였다.

sigE 유전자를 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 PCR에는 F primer, gatatacatatgtctcatccaacaggtc와 R primer, ttagcagccggatccttagtgatggtgatg를 사용하였고 반응액의 조성은 앞의 실험과 동일하였다. PCR의 조건은 58°C에서 20초간 annealing을 실시한 것 외에 앞의 실험과 동일하였다. PCR산물은 제한효소 *Nde*I 과 *Bam*HI 을 이용해 pET-11a vector에 클로닝하였다.

sicC 유전자를 클로닝하기 위한 PCR의 반응물 조성은 앞의 실험과 같으며 F primer, tggtttgaattcaatgaccgacgcaagc와 R primer, ccggggtcgacctagtgatggtgatggtgatggccgggtgaggtcgtcggg를 사용하였다. PCR의 조건은 앞에서 *sigE* 유전자를 포함한 DNA 단편을 증폭하기 위한 PCR과 같았고, PCR산물을 *Eco*R I 과 *Sal*I 으로 잘라 같은 제한효소로 처리된 pGEX-4T-3 vector에 클로닝하였다.

라. *E. coli*에서의 과량발현 및 정제

각각 *sigE*, *sigH*, *sicC* 유전자가 클로닝된 단백질 발현 plasmid를 *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 도입하여 *E. coli* BL21(DE3)는 ampicillin LB 평판배지에, *E. coli* BL21(DE3)pLysS는 ampicillin과 chloramphenicol이 포함된 LB 평판배지에 도달한 후, 37°C에서 12시간 배양하였다. 형질전환체를 항생제를 포함하는 3 ml의 LB 액체배지를 이용하여 37°C에서 하루 동안 배양한 후, 배양된 균 450 μ l를 15 ml의 LB 액체배지에 옮겨서 호기적 조건으로 37°C에서 배양하다가 OD₆₀₀가 0.6에 이를

때까지 배양하였다. 과량발현할 세균 배양액에 1 mM IPTG를 첨가하여 3 시간 동안 배양하였고 IPTG가 첨가되지 않은 배양액을 같은 시간 배양하여 과량발현의 대조군으로 사용하였다. 배양액을 4°C에서 원심분리하여 균체들을 모아 25 mM Tris [pH 8.0]에 재현탁하였다 (10배 희석한 배양액의 OD₆₀₀가 0.25일 때 800 μ l의 25 mM Tris [pH 8.0]를 사용). 재현탁된 균 250 μ l와 BugBuster protein extraction reagent (Merck, Darmstadt, Germany) 250 μ l를 섞어 상온에서 10분간 방치한 후, lysis시킨 시료 중 SDS-PAGE의 전체 세포단백질 확인을 위한 시료로 100 μ l 남기고 나머지를 4°C에서 9,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 시료의 상층액을 수용성 단백질 시료로 하였고, 침전물을 400 μ l의 25 mM Tris [pH 8.0]에 풀어 불용성 단백질 시료로 하였다. 과발현하지 않은 균체, 과발현한 균체의 전체 세포단백질, 수용성 단백질 및 불용성 단백질을 SDS-PAGE로 분석하여 단백질의 발현 및 발현된 단백질의 수용성을 확인하였다.

SigH의 정제를 위해서 pTS130으로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 과량발현하였다. 형질전환체를 LB 액체배지를 이용하여 37°C에서 호기적인 조건으로 8시간 동안 배양하고, 배양된 균들은 100 ml의 LB 액체배지에 옮겨 37°C에서 3시간 배양하였으며, 30 ml의 배양된 균을 1 l의 새로운 LB 액체배지로 옮겨 37°C에서 OD₆₀₀가 0.6이 되었을 때, 1 mM IPTG를 넣어 3시간 동안 단백질을 과량발현하였다. 대량으로 배양한 균을 4°C에서 3,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리하여 회수한 다음, 25 mM Tris [pH 8.0] 40 ml에 재현탁 하였다. 재현탁한 균을 sonication으로 lysis시킨 후 4°C에서 10,000 $\times g$ 로 30분간 원심분리하여 상층액만을 취한 다음 Ni-NTA His \cdot Bind resin (Merck, Darmstadt, Germany)을 이용하여 정제하였다. 상층액을 50%(v/v) Ni-NTA His \cdot Bind resin 1 ml과 섞어 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 25 mM Tris [pH 8.0], 20 mM imidazole, 300 mM NaCl로 50 ml씩 3번 씻어 결합되지 않은 단백질들을 제거한 다음 column에 packing하여 25 mM Tris [pH 8.0], 200 mM imidazole, 300

mM NaCl로 elution하였다. 얻어진 단백질을 25 mM Tris [pH 8.5]에 투석한 후, MonoQ column (MonoQ 5/50 GL; Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)을 이용한 ion exchange chromatography로 정제하였다. 5 ml의 20 mM Tris [pH 8.5]를 미리 흘려준 MonoQ column에 2 ml의 단백질용액을 loading하고 1 ml의 20 mM Tris [pH 8.5]로 결합되지 않은 단백질들을 제거한 후에, 20 mM Tris [pH 8.5]에서부터 20 mM Tris [pH 8.5], 1 M NaCl까지 20 ml로 gradient를 주어 elution하면서 tube 당 500 μ l씩 받았다. 각 fraction을 SDS-PAGE로 분석하고 SigH 단백질을 포함하는 fraction들을 모아 bovine serum albumin (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)을 표준 단백질로 사용하여 Bradford 방법¹⁸에 따라 정량하였다. 정량이 끝난 단백질은 500 μ l씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

SigE 단백질은 pTS143으로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)pLysS를 사용하여 과량발현하였으며 위 SigH 단백질의 정제와 같은 방법으로 정제하였다. 정제된 단백질들은 정량하여 -70°C에 보관하였다.

SigC-GST fusion 단백질은 pTS147을 포함하는 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 과량발현하였다. 배양액의 OD₆₀₀가 0.6에 도달하였을 때 얼음에 10분간 두어 온도를 내리고, 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 25°C에서 5시간 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 배양된 균들은 4°C에서 3,000 $\times g$ 로 10분간 원심분리하여 회수한 다음, 50 mM Tris [pH 8.0] 40 ml에 재현탁하였다. 재현탁된 균을 sonication으로 lysis시킨 다음, 4°C에서 10,000 $\times g$ 로 30분간 원심분리하고 상층액을 취해 GSTrap column (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 정제하였다. 미리 10 ml의 50 mM Tris [pH 8.0]로 흘려준 column에 20 ml의 시료를 loading 한 다음, 50 mM Tris [pH 8.0]으로 결합되지 않은 시료들을 제거하고 50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM reduced L-Glutathione으로 elution하였다. 회수한 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 확인하였고, SigC-GST fusion 단백질이 포함된 fraction들을 모아 정량 후 -70°C에 보관하였다.

마. *sigB* promoter를 포함한 plasmid의 제작과 돌연변이의 도입

in vitro transcription assay의 template로 사용될 *sigB* promoter를 plasmid에 클로닝하였다. 야생형의 *sigB* promoter 염기서열을 포함하는 두 개의 oligonucleotide, p*sigB*-wt primer, caggggaagcttatcactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgtt와 p*sigB*-up primer, ttcaggccgaaacagcaatttgggg tactgtcagcagctagcc를 각각 200 μ M 씩 섞어 95°C에서 10분간 가열한 후, 25°C까지 서서히 식혀 annealing한 다음 *Sal*I 과 *Hind*III로 자르고 같은 제한효소로 처리된 pTS144와 연결하여 pTS145를 제작하였다.

돌연변이를 일으킬 -35, -10 지역은 이전 논문에서 밝혀진 SigH-dependent promoter들의 sequence alignment를 기초로 하여 선정하였다 (그림 1)¹⁷. 선정된 위치의 *sigB* promoter -35, -10 지역의 염기서열을 PCR을 이용한 site-direct mutagenesis 방법으로 돌연변이시켰다 (그림 2). 표 2의 primer들 중에서 pTS145에 primer a와 primer b를 PCR하고, primer c와 primer d를 PCR한 후, QIAquick PCR purification kit로 정제한 후에 두 PCR산물을 섞어 primer 없이 PCR을 수행하여 연장한 다음, 다시 QIAquick PCR purification kit로 정제하고 primer e와 primer f로 PCR을 수행하였다. 만들어진 PCR 산물을 QIAquick PCR purification kit로 정제한 후 *Sal*I 과 *Hind*III로 처리하고, 같은 제한효소로 처리된 pTS144와 연결하여 돌연변이 *sigB* promoter지역을 가지고 있는 plasmid를 제작하였다 (그림 3).

바. *in vitro* transcription assay

in vitro transcription assay는 기존 논문의 방법을 따랐다²⁰⁻²³. 0.2 U의 *E. coli* RNA polymerase core enzyme (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)과 0.5 μ g의 정제된 SigH (혹은 SigE) 단백질을 30 μ l의 transcription buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 250 μ g/ml bovine serum albumin과 2.5 U/ μ l SUPERase-In (Ambion, Austin, TX, USA)에서 37°C에서 30분 동안 반

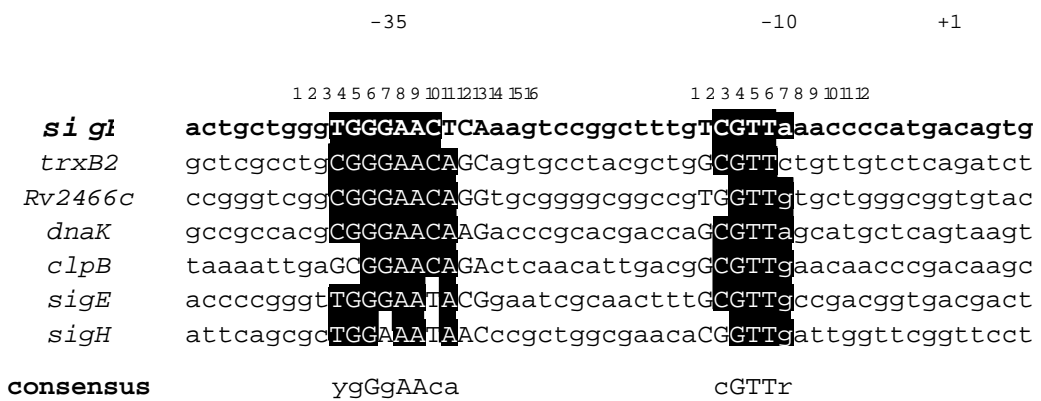


그림 1. SigH-dependent promoter들의 sequence alignment.

7개의 SigH-dependent promoter를 비교하였다. -35와 -10 지역은 검은 바탕으로 표시되었고, 위의 숫자들은 *sigB* promoter를 중심으로 돌연변이가 도입된 위치를 나타낸다.

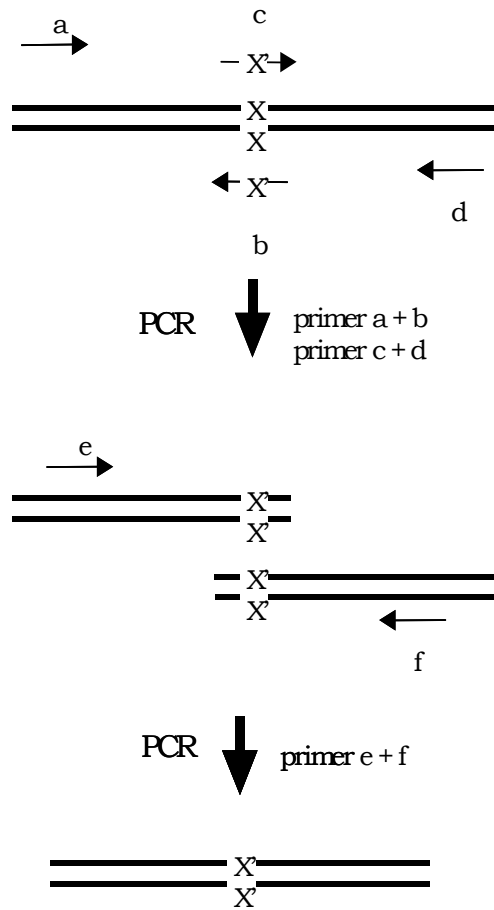


그림 2. PCR을 이용한 site-direct mutagenesis.

먼저 primer a와 b, primer c와 d를 이용하여 PCR을 수행하여 단편들을 얻어내고, 이 단편을 섞은 다음 primer e와 f를 이용하여 PCR을 수행하였다.

표 2. *in vitro* transcription assay를 위한 template의 제작에 사용된 primer들

primer	name	primer sequence (5' - 3')
a	sigBmut-1F	tgcgagagtagggaactg
	sigBmut-35a-R	gttcccaccDagcagtgat
	sigBmut-35b-R	agttcccacDcagcagtga
	sigBmut-35c-R	gagttcccaDccagcagtg
	sigBmut-35d-R	agccggactVtgagtccc
	sigBmut-35e-R	aagccggacVttgagtcc
	sigBmut-35f-R	aaagccggaDtttgagttc
b	sigBmut-10a-R	gtttaacgaDaaagccgga
	sigBmut-10b-R	catggggtVaacgacaaa
	sigBmut-10c-R	tcatggggtVtaacgacaa
	sigBmut-10d-R	gtcatggggtVtaacgaca
	sigBmut-10e-R	tgtcatgggHtttaacgac
	sigBmut-10f-R	ctgtcatggHgtttaacga
	sigBmut-10g-R	actgtcatgHggtttaacg
	psigB-35-up	ccgatgtcgacgcactgtcatggggtttaacgacaaagccggactt
	psigB-35-wt	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-1a	caggggaagcttatactgctgggaggggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-1g	caggggaagcttatactgctgggggggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-1c	caggggaagcttatactgctgggcggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-2c	caggggaagcttatactgctgggtcggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-2a	caggggaagcttatactgctgggttaggaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-2t	caggggaagcttatactgctgggttggaaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-3c	caggggaagcttatactgctgggtgcaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-3a	caggggaagcttatactgctgggtgagaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-3t	caggggaagcttatactgctgggtgtgaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-4c	caggggaagcttatactgctgggtggcaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-4a	caggggaagcttatactgctgggtggaaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-4t	caggggaagcttatactgctgggtggtaactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-5t	caggggaagcttatactgctgggtgggtactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-5g	caggggaagcttatactgctgggtgggactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-5c	caggggaagcttatactgctgggtgggactcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-6t	caggggaagcttatactgctgggtgggatctcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-6g	caggggaagcttatactgctgggtgggagctcaaagtcggctttgtcggt
c	psigB-35-6c	caggggaagcttatactgctgggtgggacctcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-7g	caggggaagcttatactgctgggtgggaagtcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-7a	caggggaagcttatactgctgggtgggaatcaaagtcggctttgtcggt
	psigB-35-7t	caggggaagcttatactgctgggtgggaattcaaagtcggctttgtcggt

	psigB-35-8a	caggggaagcttatactgctgggtgggaacacaaagtccggctttgctggt
	psigB-35-8g	caggggaagcttatactgctgggtgggaacgcaaagtccggctttgctggt
	psigB-35-8c	caggggaagcttatactgctgggtgggaacccaagtccggctttgctggt
	psigB-35-9g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactgaaagtccggctttgctggt
	psigB-35-9a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactaaaagtccggctttgctggt
	psigB-35-9t	caggggaagcttatactgctgggtgggaacttaaagtccggctttgctggt
	psigB-35-10t	caggggaagcttatactgctgggtgggaactctaagtccggctttgctggt
	psigB-35-10g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcgaagtccggctttgctggt
	psigB-35-10c	caggggaagcttatactgctgggtgggaactccaagtccggctttgctggt
	psigB-10-1a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgacgtt
	psigB-10-1g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgacgtt
	psigB-10-1c	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgccgtt
	psigB-10-2a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtagtt
	psigB-10-2t	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtgtt
	psigB-10-2g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtggtt
	psigB-10-3a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcatt
	psigB-10-3t	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcttt
	psigB-10-3c	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcctt
	psigB-10-4a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgat
	psigB-10-4g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcggt
	psigB-10-4c	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgtt
c	psigB-10-5a	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgtg
	psigB-10-5g	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgtc
	psigB-10-5c	caggggaagcttatactgctgggtgggaactcaaagtccggctttgtcgtc
	sigBmut-35a-F	atcactgctHgggtgggaac
	sigBmut-35b-F	tcactgctgHgtgggaact
	sigBmut-35c-F	cactgctggHtgggaactc
	sigBmut-35d-F	gggaactcaBagtccggct
	sigBmut-35e-F	ggaactcaaBgtccggctt
	sigBmut-35f-F	gaactcaaaHtccggcttt
	sigBmut-10a-F	tccggctttHtcgttaaac
	sigBmut-10b-F	ttgtcgttBaacccatg
	sigBmut-10c-F	ttgtcgttBaacccatga
	sigBmut-10d-F	tgtcgttaaBcccatgac
	sigBmut-10e-F	gtcgttaaaDcccatgaca
	sigBmut-10f-F	tcgttaaacDccatgacag
	sigBmut-10g-F	cgttaaaccDcatgacagt

d	sigBmut-2R	atcggcctcaggaagatc
---	------------	--------------------

e	sigBmut-2F	acgctctcctgagtagga
---	------------	--------------------

f	sigBmut-1R	attgaccgtaatgggata
---	------------	--------------------

Code name **H** : a + t + c, **V** : g + a + c, **D** : g + a + t, **B** : g + t + c

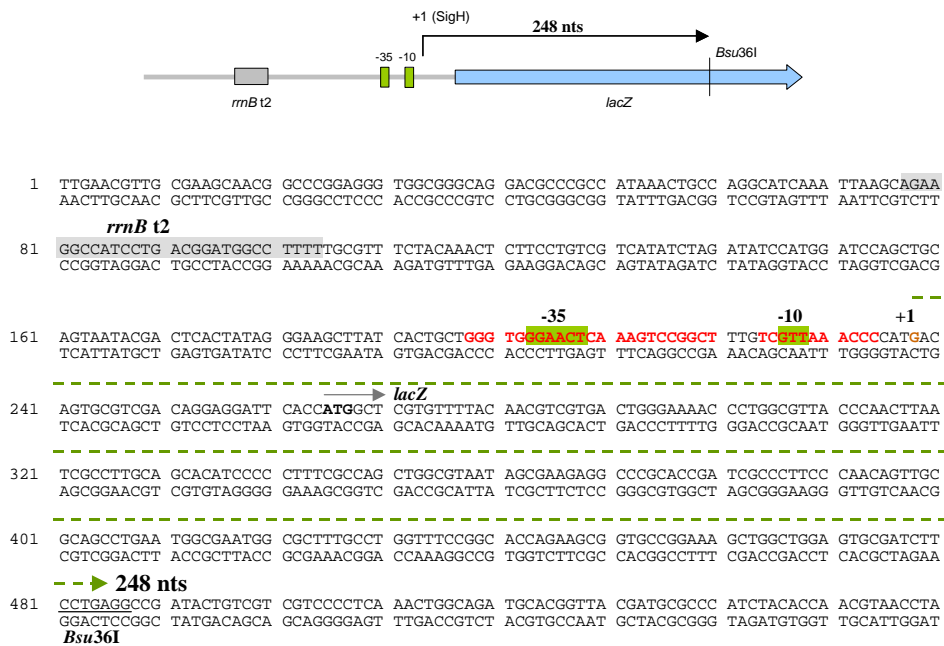


그림 3. *in vitro* transcription에 사용된 *sigB* promoter 염기서열과 모식도.
야생형 및 돌연변이 *sigB* promoter를 포함하는 plasmid를 *Bsu36I*으로 잘라 선형
으로 만들고 이를 template로 사용하여 transcription시켜 248 bp의 transcript를
얻었다.

응시켰다. 재조합된 E· σ^H holo enzyme(혹은 재조합된 E· σ^E holo enzyme)에 0.09 pmol의 DNA template를 더한 다음 37° C에서 5분간 반응 시켰다. [α -³²P]UTP와 다른 세 가지 nucleotides를 넣은 후, 37° C에서 2분간 반응시키고, heparin과 동위원소로 표지하지 않은 UTP를 첨가하여 37° C에서 5분간 두었다. 최종 반응액 40 μ l에 첨가된 [α -³²P]UTP와 nucleotide 및 heparin의 최종 농도는 0.15 mM ATP, 0.15 mM GTP, 0.15 mM UTP, 0.15 mM CTP, 4 μ Ci [α -³²P]UTP, 그리고 200 μ g/ml heparin이었다. 반응을 마친 시료들은 7 M Urea를 포함하는 6% denaturing polyacrylamide gel에서 20 W로 1시간 동안 전기영동하였으며, 결과는 전개된 gel을 말린 후 X-ray 필름을 감광시켜 분석하였다. 정량적인 분석은 감광된 필름을 스캐닝한 이미지를 TINA program (http://www.niac.man.ac.uk/Tina/tina_soft.html)으로 분석하여 실시하였으며, 결과는 각 돌연변이 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양을 야생형 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양에 대한 상대값으로 나타내었다.

사. *Mycobacterium smegmatis*의 형질전환

*M. smegmatis*의 형질전환은 electroporation 방법으로 수행하였다. 10% ADC가 포함된 7H9 액체배지에 전배양한 *M. smegmatis* mc²-155 (혹은 *M. smegmatis* RH244, *M. smegmatis* RH413, *M. smegmatis* RH414) 2 ml을 10% ADC가 포함된 7H9 액체배지 400 ml에 접종하고 37° C에서 호기적인 조건으로 OD₆₀₀이 0.8에 도달할 때까지 배양한 후, 얼음에서 1시간 30분 동안 방치하고 4° C에서 3,000 × *g*로 원심분리하여 균체를 수집하였다. 균체를 80 ml, 40 ml, 20 ml의 멸균된 차가운 10% (v/v) glycerol 용액으로 부피를 줄여가며 씻어 준 후, 최종적으로 4 ml에 다시 풀어 100 μ l 씩 분주하여 -70° C에 보관하였다.

형질전환을 위하여 100 μ l의 competent cell을 얼음에서 녹인 후, 4° C에서 3,000 × *g*로 2분간 원심분리하여 상등액을 버리고 다시 100 μ l의 10% (v/v) glycerol 용액에 재현탁하였다. 1 μ g의 DNA를 넣고 얼음에서 10분

간 방치하고 0.2 cm의 electroporation-용 cuvette으로 옮긴 후, 2.5 kV/cm, 25 μ F, 1000 Ω 의 조건으로 전기충격을 주었다. 전기충격 후 얼음에서 10 분간 방치하고 cuvette 당 10% ADC가 첨가된 7H9 액체배지 900 μ l를 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양한 후, 항생제와 10% ADC가 첨가된 7H9으로 만든 평판배지에 도달하여 배양하였다. 37°C에서 3일간 배양하여 얻어진 콜로니를 다시 새로운 고체배지로 계대하여 37°C에서 3일간 배양하여 형질전환체를 얻었다.

아. β -Galactosidase 활성 측정

야생형 및 돌연변이 *sigB* promoter 염기서열이 promoter를 갖지 않는 *lacZ* 유전자에 연결된 plasmid들을 이용하여 β -galactosidase 활성을 측정함으로써 야생형 및 돌연변이 *sigB* promoter의 전사정도를 확인하였다. 각 plasmid를 가지고 있는 *M. smegmatis* 형질전환체를 10%의 ADC가 포함된 7H9 액체배지에 전배양하고, 300 μ l를 같은 조성의 새로운 배지 15 ml에 옮겨 접종한 후 37°C에서 호기적으로 OD₆₀₀가 0.3이 될 때까지 배양하였다. 배양액 300 μ l와 Z buffer (0.1 M sodium phosphate [pH 7.0], 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol) 700 μ l를 섞은 후, toluene을 15 μ l씩 첨가하고 즉시 10초간 vortexing한 다음 37°C에서 40분간 회전시키면서 toluene을 증발시켰다. 각 시료에 4 mg/ml의 *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside 용액을 200 μ l 첨가하고 10초간 잘 섞어 주었다. 이 혼합액이 노란색이 되면 500 μ l의 1 M Na₂CO₃를 첨가함으로써 반응을 종결시키고 반응시간을 기록하였다. 반응액을 얼음에 1분간 방치한 후, OD₄₂₀과 OD₅₅₀에서의 흡광도를 측정하였다. β -Galactosidase의 활성은 아래와 같이 Miller unit로 계산하였다.

$$\text{Units} = 1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / t \times v \times \text{OD}_{600}$$

t, 반응시간 v, 사용한 배양액의 부피 (ml)

III. 결 과

1. 과량발현을 위한 *sigC*, *sigE*, *sigH* 유전자의 클로닝

SigE와 SigH를 과량발현시키기 위하여 각 sigma factor의 유전자를 T7 promoter를 포함하는 expression vector에 클로닝하였다. 각 유전자에 해당하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 PCR에는 *M. tuberculosis*의 genomic DNA를 PCR의 주형으로 사용하였으며, 각 유전자의 3' 말단에 해당하는 primer에 histidine을 coding하는 6개의 codon을 첨가함으로써 생산되는 단백질이 C-말단에 histidine tag를 갖도록 하였다. PCR을 통하여 각각 *sigE* 유전자와 *sigH* 유전자를 포함하는 666 bp와 651 bp DNA 절편을 증폭하였으며 각각의 PCR산물을 *Nde*I과 *Bam*HI으로 잘라 같은 제한효소로 미리 자른 pET-3c와 pET-11a에 클로닝하여 pTS130과 pTS143을 제작하였다 (그림 4).

SigC는 pGEX-4T-3를 이용하여 GST fusion의 형태로 과량발현될 수 있도록 하였다. PCR로 증폭하여 얻어진 *sigC* 유전자를 포함하는 660 bp DNA 단편을 *Eco*R I 과 *Sal*I 으로 자른 후, 같은 제한효소로 미리 자른 pGEX-4T-3에 클로닝하여 pTS148을 제작하였다 (그림 4).

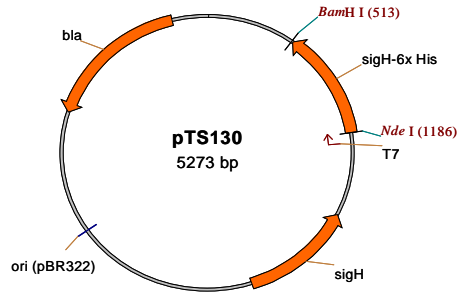
각 plasmid에 삽입된 DNA 단편의 염기서열을 결정하여 클로닝된 각 유전자에서 염기서열의 변화가 없음을 확인하였다.

2. *E. coli*에서의 과량발현 및 정제

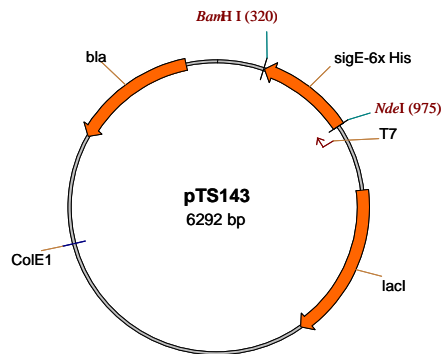
가. SigH

SigH 재조합 단백질을 과량발현하기 위해 만든 pTS130은 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하여 배양하였고, 배양액의 OD₆₀₀이 0.6에 도달하였을 때 1 mM IPTG를 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 발현을 유도하였다. 과발현된 단백질은 일차로 Ni-NTA His·Bind resin을 이용한 affinity

A



B



C

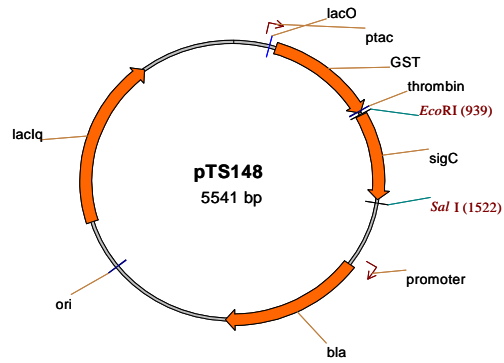


그림 4. 과량발현을 위한 *sigC*, *sigE*와 *sigH* 유전자의 클로닝.

A, B. 과량발현을 위하여 3' 말단에 6개 histidine의 codon이 첨가된 *sigH*와 *sigE* 유전자를 각각 T7 promoter를 포함하는 pET-3c와 pET-11a에 클로닝하였다. C. *sigC* 유전자를 pGEX-4T-3에 클로닝하여 SigC가 GST fusion의 형태로 발현되도록 하였다.

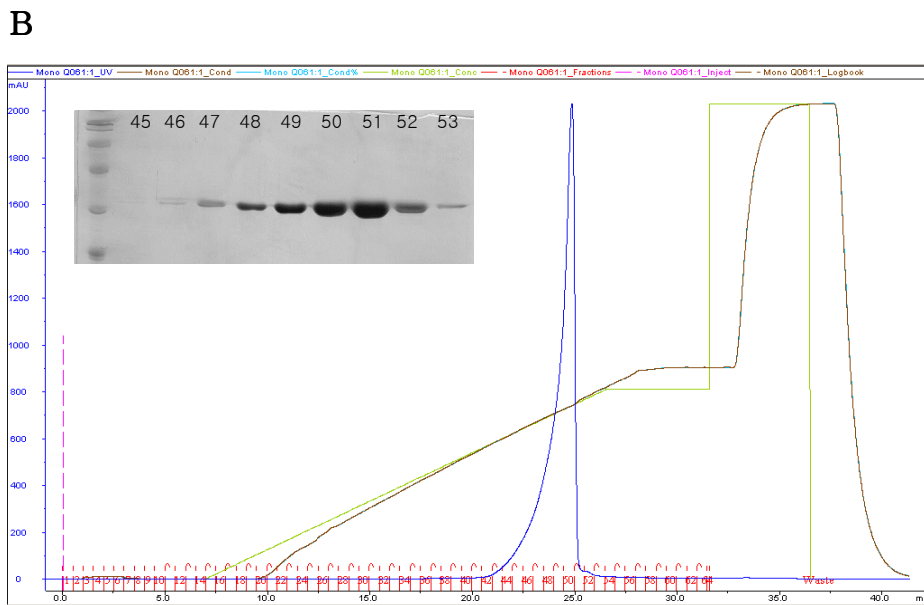
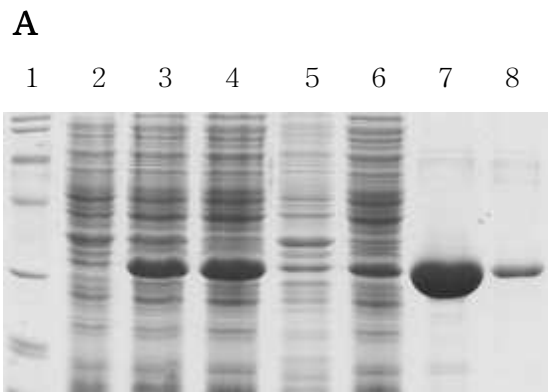


그림 5. SigH 재조합 단백질 과량발현과 정제.

A. 과량발현된 균체로부터 수용성단백질을 얻은 후 Ni-NTA His·Bind resin을 이용하여 SigH를 정제하고 SDS-PAGE로 확인하였다. Lanes: 1, size marker; 2, induction을 하지 않은 균체의 단백질; 3, IPTG를 넣어 induction한 균체의 단백질; 4, 과량발현된 균체의 수용성 단백질; 5, 과량발현된 균체의 불용성 단백질; 6, Ni-NTA His·Bind resin에 결합하지 않은 단백질; 7-8, elution 1-2. B. MonoQ column을 이용하여 SigH 단백질을 정제하고 SDS-PAGE로 확인하였다. Fraction 48부터 51번째에서 SigH를 회수하였다. Lane은 fraction number와 같다.

chromatography로 정제하였으며, MonoQ column을 이용한 ion exchange chromatography를 이용하여 섞여있는 다른 단백질들을 제거하였다 (그림 5). 1 ℓ 배양액으로부터 최종 13.3 mg의 SigH를 정제하였다.

나. SigE

SigE 재조합 단백질의 과량발현은 pTS143으로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)pLysS를 사용하였으며 배양액의 OD₆₀₀이 0.6에 도달하였을 때 얼음에서 10분간 식힌 다음 1 mM IPTG를 첨가하여 25°C에서 5시간 동안 배양하여 단백질의 발현을 유도하였다. 정제과정은 위의 SigH와 같으며, Ni-NTA His·Bind resin을 이용한 affinity chromatography로 정제할 때의 회수조건은 25 mM Tris [pH 8.0], 200 mM imidazole, 300 mM NaCl이었다 (그림 6). 이 단백질 또한 MonoQ column을 이용한 ion exchange chromatography를 이용하여 정제하였으나, SigE 재조합 단백질보다 분자량이 조금 작은 다른 단백질을 제거하지 못하였다 (data not shown). 그러나 *in vitro* transcription assay를 수행하기에는 무리가 없을 것으로 판단하여 더 이상의 정제를 하지 않았다. 1 ℓ 배양액으로부터 2 mg의 SigE를 정제하였다.

다. SigC

SigC 재조합 단백질의 과량발현은 pTS148로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 사용하였으며 배양액의 OD₆₀₀이 0.6에 도달하였을 때 얼음에서 10분간 두어 배양액의 온도를 내리고 0.5 mM IPTG를 첨가하여 25°C에서 5시간 동안 발현을 유도하였다. 과발현된 단백질은 GSTrap column (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden)을 이용한 affinity chromatography로 정제하였다 (그림 7). 정제된 SigC 중 3번째 elution이 가장 SigC를 많이 포함하고 있었으나 SigC 이외의 다른 단백질이 많이 섞여있어 사용하지 않았고, 4, 5, 15, 16, 17번째 elution의 단백질들만을 모아 다음 실험에 사용하였다. 1 ℓ의 배양액에서 3 mg의 SigC를 얻었다.

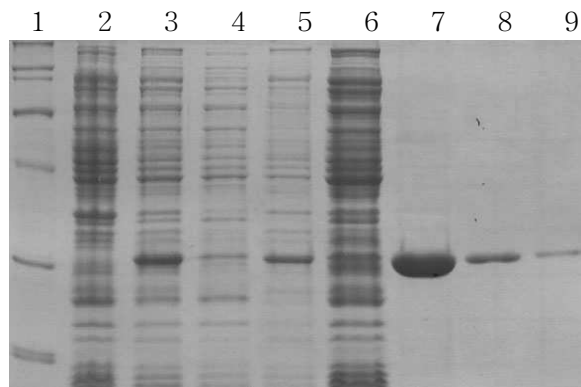


그림 6. SigE 재조합 단백질 과발현과 정제.

과량발현된 균체로부터 수용성단백질을 얻은 후 Ni-NTA His·Bind resin을 이용하여 SigE를 정제하고 SDS-PAGE로 확인하였다. Lanes: 1, size marker; 2, induction을 하지 않은 균체의 단백질; 3, IPTG를 넣어 induction한 균체의 단백질; 4, 과량발현된 균체의 수용성 단백질; 5, 과량발현된 균체의 불용성 단백질; 6, Ni-NTA His·Bind resin에 결합하지 않은 단백질; 7-9, elution 1-3.

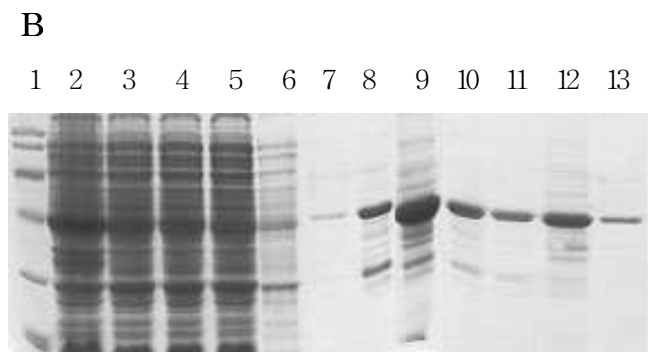
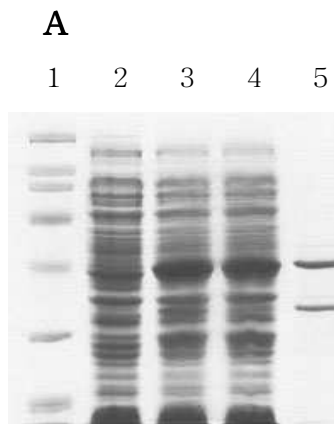


그림 7. SigC 재조합 단백질 정제.

A. pTS148로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)를 배양하여 과량발현 시켰을 때 수용성 단백질에 SigC가 있는지 SDS-PAGE로 확인하였다. Lanes: 1, size marker; 2, induction을 하지 않은 균체의 단백질; 3, IPTG를 넣어 induction한 균체의 단백질; 4, 과량발현된 균체의 수용성 단백질 5, 과량발현된 균체의 불용성 단백질

B. 과량발현된 균체로부터 수용성 단백질을 얻은 후 GSTrap column 을 이용하여 SigC를 정제하고 SDS-PAGE로 확인하였다. Lanes: 1, size maker; 2, IPTG를 넣어 induction한 후의 균체의 단백질; 3, 과량발현된 균체의 수용성 단백질; 4, 3MM paper로 거른 단백질; 5, GSTrap column에 loading 중 받아낸 단백질 1; 6, GSTrap column에 loading 중 받아낸 단백질 3; 7, washing 중 받아낸 단백질; 8-13, elution 1, 2, 3, 4, 5, 15, 16, 17

3. *sigB* promoter 부분을 포함하는 plasmid 제작과 돌연변이 도입

pTS144에 *sigB* promoter 부위를 삽입시켜 pTS145를 만들었으며, PCR을 이용한 site-direct mutagenesis로 *sigB* promoter 염기서열 중 -35 지역 16 군데와 -10 지역 12 군데의 염기서열을 변화시켰다. 최종적으로 만들어진 돌연변이 *sigB* promoter를 포함하는 plasmid의 염기서열을 결정하여 돌연변이가 유발되었음을 확인하였다 (그림 8). 모든 plasmid들은 *Bsu36I*으로 처리하고 농도를 20 ng/ μ l로 맞추어 *in vitro* transcription assay에서 사용할 template로 만들었다 (그림 9).

4. SigC, SigE와 SigH에 의한 야생형 *sigB* promoter의 전사

야생형 *sigB* promoter를 template로 하여 SigH, SigE, SigC 각각을 RNA polymerase core enzyme과 재조합한 후 *in vitro* transcription을 수행하였다. *E. coli* RNA polymerase core enzyme만으로는 transcription이 일어나지 않는 것을 확인하였고, 재조합한 E· σ^H 는 아주 약하게 *sigB* promoter와 결합하여 전사를 하는 반면, 재조합한 E· σ^E 는 재조합한 E· σ^H 보다 *sigB* promoter에 매우 강하게 결합하여 전사하는 것을 확인하였다. 그러나 재조합한 E· σ^C 는 *sigB* promoter로부터 전사를 하지 않는 것으로 확인되었다 (그림 10). 따라서 이후의 실험에서는 SigC가 제외되었다.

5. SigE와 SigH에 의한 야생형 및 돌연변이 *sigB* promoter의 전사

돌연변이 *sigB* promoter 및 야생형 *sigB* promoter가 포함된 plasmid 들을 *Bsu36I*으로 자른 것을 template로 하여, SigH와 SigE를 각각 *E. coli* RNA polymerase core enzyme과 재조합한 후 *in vitro* transcription assay를 수행하였다 (그림 11). 정량적인 분석은 감광된 필름을 스캐닝한 이미지를 TINA program (http://www.niac.man.ac.uk/Tina/tina_soft.html)으로 분석하여 실시하였는데, 각 돌연변이 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양을 야생형 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양에 대한 상대값으로 나타내었다. SigE와 SigH에 의한 야생형 및 돌연변이

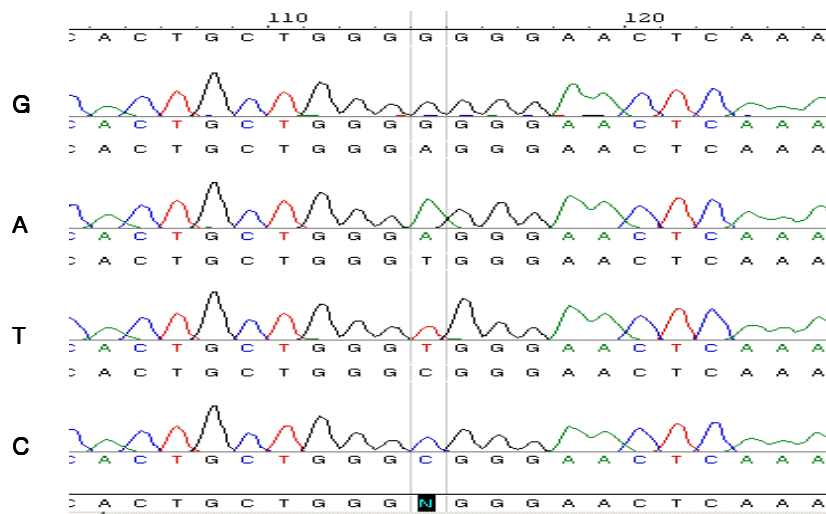


그림 8. *sigB* promoter에 돌연변이 도입.

pTS145를 주형으로 하여 *sigB* promoter의 -35, -10 부분을 PCR을 이용한 돌연변이를 일으킨 후, pTS144에 클로닝하여 돌연변이 *sigB* promoter를 갖는 plasmid를 만들었다. 그림은 염기서열을 확인한 대표적인 예로 -35 4T부분의 염기서열이 원래의 T에서 G, A, C로 변한 plasmid들을 얻어내었음을 나타내주고 있다.

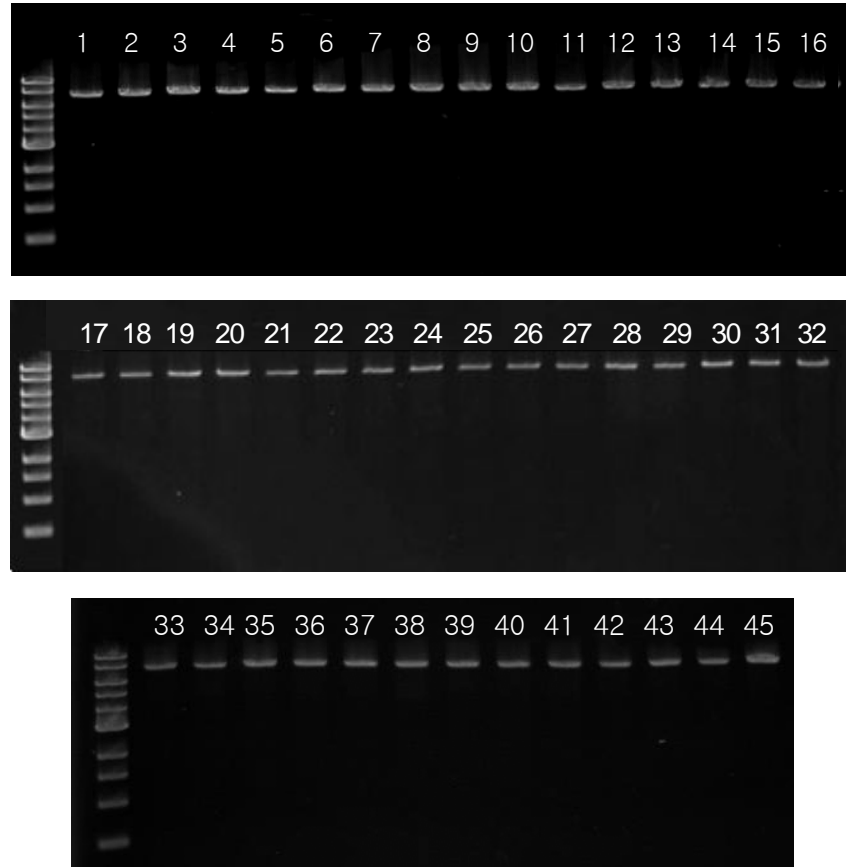


그림 9. *in vitro* transcription assay에 사용된 template DNA 준비.

in vitro transcription assay를 위해 돌연변이 *sigB* 및 야생형 *sigB*가 포함된 plamid들을 *Bsu*36 I 으로 자른 후, 정제하여 확인하였다. 그림의 1-45는 순서대로 -35의 1A, 1T, 1C, 2A, 2T, 4A, 4G, 4C, 5A, 5T, 5C, 6A, 6T, 6C, 7A, 7T, 7C, 8T, 8G, 8C, 9T, 9G, 9C, 10A, 10T, 10G, 11A, 11G, 11C, 12A, 12T, 12G, 13T, 13G, 13C, 14T, 14G, 14C, 15T, 15G, 15C, 16A, 16T, 16C, 돌연변이 및 야생형을 나타낸다.

1 2 3 4

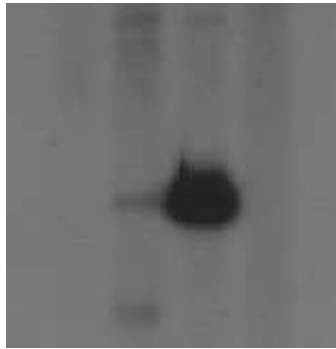


그림 10. 각 SigC, SigE, SigH에 의한 야생형 *sigB* promoter의 전사.

야생형 *sigB* promoter를 template로 하여 각 재조합 단백질 SigH, SigE, SigC를 RNA polymerase core enzyme과 재조합한 후 *in vitro* transcription을 수행한 결과 SigH보다 SigE가 강하게 *sigB* promoter를 인식하여 전사할 수 있는 것으로 보이며, SigC는 *sigB* promoter에 결합하지 않는 것으로 확인되었다. Lanes: 1, *E. coli* RNA polymerase core enzyme; 2, E · σ^H holo enzyme; 3, E · σ^E holo enzyme; 4, E · σ^C holo enzyme.

sigB promoter의 전사에 대한 실험으로 SigE와 SigH에 의존적으로 일어나는 전사가 promoter의 염기서열에 따라서 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (그림 12, 13).

SigH에 의존적인 돌연변이 및 야생형 *sigB* promoter 활성을 보면, -35 지역의 1G 위치부터 5G 위치까지는 A, T, G, C 어느 염기서열로 바뀌어도 전사량이 야생형과 비슷하게 나타났고, 다만 2G 위치의 염기서열이 C로 바뀌게 되면 야생형보다 전사량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 6G 위치부터 9A 위치까지는 야생형 염기서열에서 다른 염기서열로 변하게 되면 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 10C 위치부터 11C 위치까지는 야생형의 염기서열이 다른 염기서열로 변하게 되면 전사량이 증가하였다. 특히 10C 위치의 염기서열이 T가 되는 경우와 11T 위치의 염기서열이 G가 되는 경우 전사량이 20배 정도 증가함을 관찰할 수 있었다. 13A 위치부터 16G 위치까지는 어느 염기서열이 위치해도 야생형의 전사량과 비슷하며, 다만 14A 위치의 염기서열이 T나 C로 바뀌었을 때 전사량이 줄어들었다. -10 지역을 보면 1G 위치부터 3C 위치까지는 다른 염기서열로 변하여도 돌연변이 promoter의 전사량이 야생형의 전사량과 크게 달라지지 않았으며, 4G 위치부터 6T 위치까지는 염기서열이 야생형에서 다른 염기서열로 변했을 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 7A 위치부터 12C 위치까지는 어떤 염기서열로 바뀌어도 전사량이 크게 변하지 않았으나, 8A 위치에 G로 바뀌었을 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

SigE에 의존적인 돌연변이 및 야생형 *sigB* promoter 활성을 보면, -35 지역의 1G 위치부터 5G 위치에는 A, T, G, C 어느 염기서열로 바뀌어도 전사량이 야생형과 비슷하게 나타났으며, 2G 위치의 염기서열이 C로 바뀌었을 경우와 4T 위치의 염기서열이 C로 바뀌었을 경우 전사량이 야생형보다 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 6G 위치부터 12C 위치까지는 야생형 염기서열에서 다른 염기서열로 변할 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 13A 위치부터 16G 위치까지는 어느 염기서열이 위치해도 크게 전사량이 변하지 않는 것으로 보이며, 다만 13A 위치에 T나 G로 바뀌었을

SigR, -35

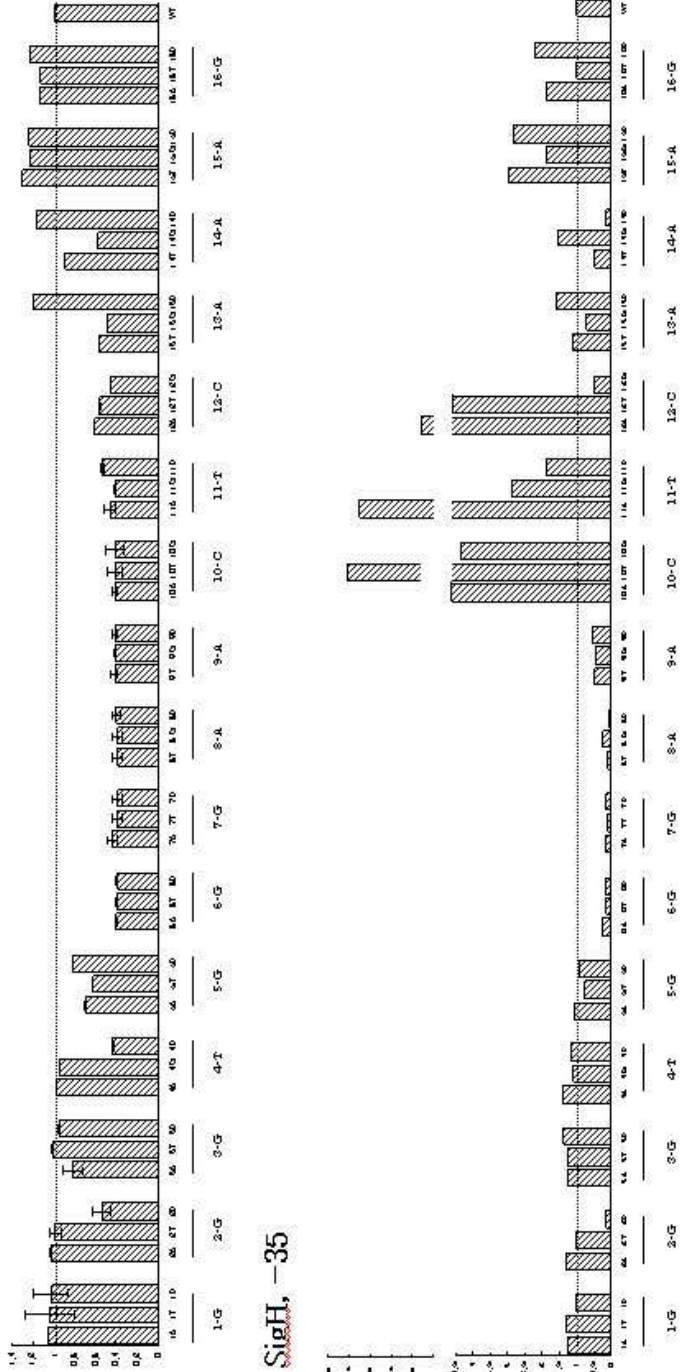
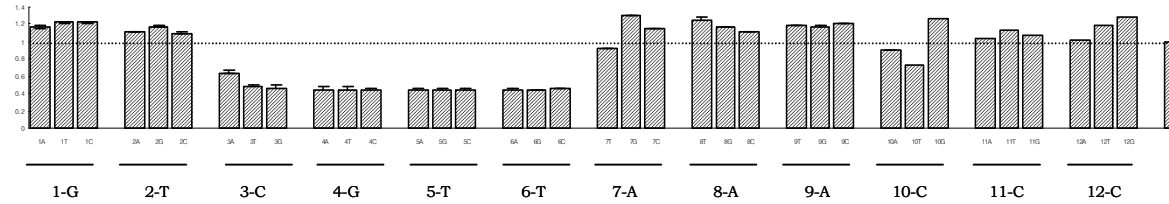


그림 12. SigE와 SigH에 의한 아생형 및 -35 지역 돌연변이 *sigB* promoter의 전사에 대한 정량적 분석. *in vitro* transcription assay 결과를 TINA program을 이용하여 이미지 분석을 하고, 돌연변이 *sigB* promoter의 전사량을 비교 하였다. (Y축, 각 돌연변이 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양/ 아생형 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양; X축, 돌연변이 *sigB* promoter의 바인딩 염기서열과 아생형의 염기서열).

SigE, -10



SigH, -10

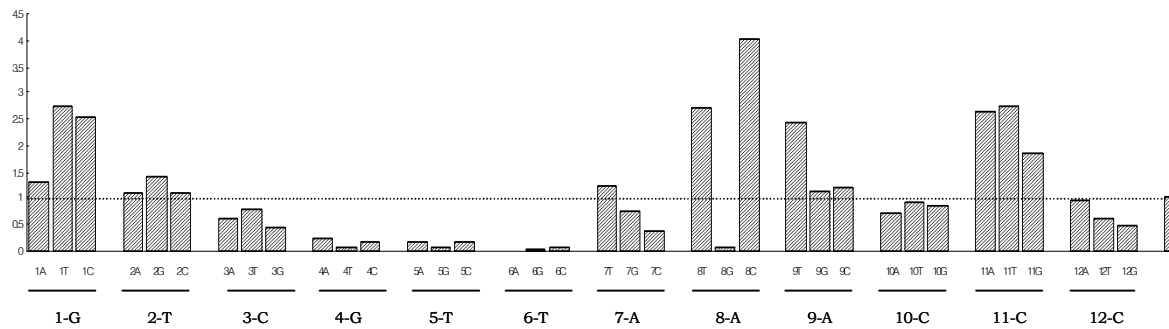


그림 13. SigE와 SigH에 의한 야생형 및 -10 지역 돌연변이 *sigB* promoter의 전사에 대한 정량적 분석. *in vitro* transcription assay 결과를 TINA program을 이용하여 이미지 분석을 하고, 돌연변이 *sigB* promoter의 전사량을 비교하였다. (Y축, 각 돌연변이 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양/ 야생형 *sigB* promoter로부터 전사된 transcripts의 양; X축, 돌연변이 *sigB* promoter의 바뀐 염기서열과 야생형의 염기서열).

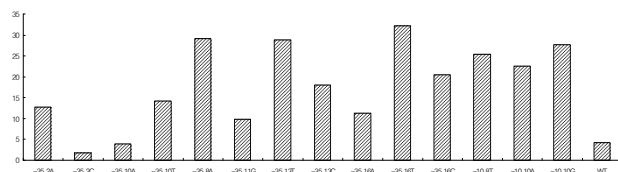
경우와 14A 위치의 염기서열이 G로 바뀌었을 경우 야생형보다 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. -10 지역을 보면 1G 위치부터 2T 위치까지는 염기서열이 변하여도 전사량이 크게 달라지지 않았으며, 3C부터 6T 위치까지는 야생형에서 다른 염기서열로 변했을 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 7A 위치부터 12C 위치까지는 어떤 염기서열이 위치해도 전사량이 크게 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

6. *Mycobacterium smegmatis*에서 돌연변이 *sigB* promoter들의 활성측정

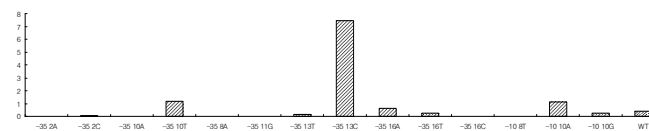
pTS145는 *lacZ* 유전자의 상단에 활성정도를 알아보려고 하는 promoter를 fusion하여 β -galactosidase의 활성을 알아봄으로써 promoter의 활성을 확인할 수 있다. 그렇지만 pTS145는 selection marker로 kanamycin 내성유전자를 갖고 있어서 이미 selection marker로 kanamycin 내성유전자를 가지고 있는 *sigH*가 결손된 *M. smegmatis*나 *sigH*와 *sigE*가 모두 결손된 *M. smegmatis*에 도입하게 되면 형질전환 되었는지를 확인할 수 없다. 따라서 이 문제를 해결하기 위하여 pTS145를 제한효소 BamHI 과 *Bsu36I*으로 처리하고 pCV77 벡터의 kanamycin 내성유전자를 hygromycin 내성 유전자로 바꾼 벡터인 pCS3에 클로닝하였다. 돌연변이 *sigB* promoter를 가지고 있는 plasmid들 중 LacZ 활성 확인을 위해서 selection marker를 변화시킨 것들은 돌연변이 -35 2A, -35 2C, -35 10A, -35 10T, -35 8A, -35 11G, -35 13T, -35 13C, -35 16A, -35 16T, -10 8T, -10 10A, -10 10G *sigB* promoter였다.

각 plasmid를 *M. smegmatis* mc²-155, *sigH*가 결손된 *M. smegmatis*나 *sigE*가 결손된 *M. smegmatis*, *sigH*, *sigE*가 동시에 결손된 *M. smegmatis*에 도입하였으며, 10%의 ADC가 포함된 7H9 액체배지에서 배양하여 β -galactosidase assay를 수행하였다. 수행결과는 Miller unit로 환산하여 정리하였다 (그림 14). *sigE*가 결손된 *M. smegmatis*를 이용하여 SigH에 의존적인 LacZ 활성을 확인하였는데, 돌연변이 -35 13C *sigB* promoter가 야생형 *sigB* promoter보다 β -galactosidase activity가 증가함

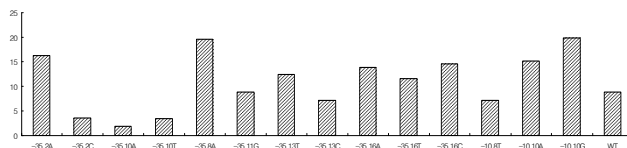
mc²-155



$\Delta sigE$



$\Delta sigH$



$\Delta sigH, \Delta sigE$

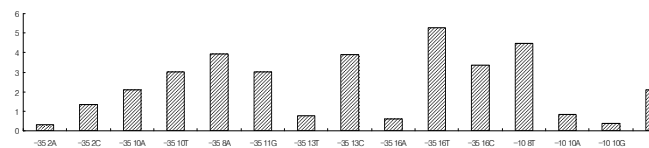


그림 14. β -Galactosidase assay를 통한 돌연변이 *sigB* promoter의 전사활성 측정. 돌연변이 *sigB* promoter를 제한효소 *Bam*HI과 *Bsu*36I을 이용하여 pCS3와 클로닝한 후, *M. smegmatis*에 도입시켜 β -galactosidase assay를 수행하였다. *sigE*가 결손된 *M. smegmatis*를 이용하여 SigH에 의존적인 LacZ 활성을 확인하고, *sigH*가 결손된 *M. smegmatis*를 이용하여 SigE에 의존적인 lacZ 활성을 확인하였다.

을 확인하였다. *sigH*가 결손된 *M. smegmatis*를 이용하여 SigE에 의존적인 LacZ 활성을 측정하였는데, 돌연변이 -35 2C *sigB* promoter는 *in vitro* transcription assay에서 SigH, SigE에 의존적인 전사가 모두 줄어들었던 것과 같이 β -galactosidase assay에서도 야생형의 *M. smegmatis*와 *sigH*가 결손된 *M. smegmatis*나 *sigE*가 결손된 *M. smegmatis*에서 모두 감소하는 것을 확인하였다.

IV. 고찰

숙주세포 내에서 결핵균의 생존과 성장과정을 이해하기 위해서는 변화된 환경에 대응하는 결핵균의 유전자 발현의 조절기작에 대한 연구가 필수적이다. 결핵균은 숙주내로 감염되었을 때 대식세포 내에서 생존하고 성장하게 되는데, 대식세포가 세균을 공격하는 기전인 heat shock, oxidative stress, surface stress 등에 대한 적응력을 가져야 한다. 결핵균은 다양한 sigma factor들을 가지고 있는데 이것들이 RNA polymerase에 결합하여 다양한 promoter를 인식함으로써 유전자집단의 발현을 조절할 수 있다. 본 연구에서는 결핵균의 *sigB* 유전자가 적어도 2개 이상의 sigma factor에 의하여 발현이 조절된다는 사실에 기반을 두고, 이 유전자의 5' 상위에 각 sigma factor, SigE와 SigH가 인식하는 promoter의 -35, -10 부위의 염기서열의 변화에 따라서 각 sigma factor의 결합력이 다르게 나타남을 확인하였다.

SigH 재조합 단백질을 과량발현하기 위해 만든 pTS130은 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하였다. 이것을 배양하여 과량발현했을 때 과량발현정도가 매우 강하여 1 ℓ 배양액에서 13.3 mg의 SigH 재조합 단백질을 정제해 낼 수 있었다. SigE 재조합 단백질을 과량발현하기 위해 만든 pTS142는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS에 도입하였다. SigH와 마찬가지로 과량발현정도가 강한 편이었으며 1 ℓ 배양액으로부터 2 mg의 순수한 SigE 재조합 단백질을 분리하였다. 하지만 정제시 항상 혼합되는 다른 단백질 때문에 순도가 SigH보다 못하였다. SigC의 경우, histidine을 coding하는 6개의 codon을 첨가한 *sigC* 유전자를 삽입유전자로 pET-11a에 클로닝하고 대장균에 도입하여 과량발현했을 때 온도, IPTG의 농도 등을 조절하는 것으로 단백질을 수용성 상태로 만들 수 없었다. 따라서 SigC-GST fusion방법을 택하게 되었다. SigC-GST fusion 단백질은 1 ℓ의 배양액에서 3 mg의 SigC를 얻었다.

SigC의 tag의 크기가 커서 *E. coli* RNA polymerase core enzyme과 결합하는데 문제가 생길 것이라 생각되었으나 이미 보고된 논문에서도 tag를 제거하지 않고 실험한 것을 미루어 보았을 때, 이 점은 배제시킬 수 있었다²⁴. *sigB* promoter의 전사에 SigC가 관여하는 것으로 추정되었으나, *in vitro* transcription assay결과를 미루어볼 때 SigC는 *sigB* promoter의 전사에 관여하지 않거나 아니면 SigH보다도 전사정도가 적어서 X-ray film 상에서 확인이 되지 않은 것으로 생각된다. 혹은 template로 사용한 *sigB* promoter부분보다 더 앞쪽으로 SigC가 인식하는 promoter가 존재하여 실험에서는 *sigB* promoter의 전사가 되지 않는 결과를 보였을 것이라고 생각된다. 따라서 *sigB* promoter에 SigC가 인식하는 부위가 있을 것이라는 가설을 확인하기 위해서는 *in vitro* transcription assay에서 사용된 *sigB* promoter보다 더 앞쪽까지 포함하는 *sigB* promoter를 만들어 실험해야 할 것이다.

*M. tuberculosis*의 ECF sigma factor가 어떠한 promoter들을 인지하는지에 대한 연구는 이미 진행되었고, 보고된 바 있다. *M. tuberculosis* SigE의 경우, 보고된 논문에서 DNA microarray를 통해 발현 정도가 달라지는 유전자 집단을 찾았었고, consensus promoter sequence로 GG(a/g)(a/c) (c/g) -- (c/g)GTTg를 제안하였다¹⁴.

본 실험결과에 의하면 SigE는 *sigB* promoter의 -35 지역의 야생형 염기서열 GGGTGGGA ACTCAAAG 중에서 1G 위치부터 5G 위치까지와 13A 위치부터 16G 위치까지에는 염기서열에 관계없이 야생형과 비슷한 전사량을 보였다. 2G 위치의 염기서열이 C로 바뀌었을 경우와 4T 위치의 염기서열이 C로 바뀌었을 경우, 그리고 13A 위치에 T나 G로 바뀌었을 경우와 14A 위치의 염기서열이 G로 바뀌었을 경우 야생형보다 전사량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 6G 위치부터 12C 위치까지는 야생형 염기서열에서 다른 염기서열로 변할 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. -10 지역을 보면 1G 위치부터 2T 위치까지와 7A 위치부터 12C 위치까지는 염기서열이 변하여도 전사량이 크게 달라지지 않았으며, 3C부터 6T 위

치까지는 야생형에서 다른 염기서열로 변했을 경우 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 따라서 SigE가 promoter를 인식 할 때에는 -35 지역에 GGAAGCTC(A/C)가 위치할 경우 강력하게 결합하는 것으로 보이며, -10 지역은 (C/a)GTT일 때 강력하게 결합하는 것으로 생각된다. SigE의 경우 SigH보다 더 넓은 지역의 염기서열이 결합에 관여하는 것으로 추측된다.

σ^H 에 의존적인 promoter 염기서열은 GGG(a/g)A - N17 - CGTT로 보고되었다²⁸. 본 실험결과에 의하면 -35 지역의 원래의 염기서열 GGGTGGGAAGCTCAAAG 중에서 1G 위치부터 5G 위치까지와 13A 위치부터 16G 위치까지는 염기서열에 관계없이 전사량이 야생형과 비슷하게 나타났다. 2G 위치에 C로 염기서열이 바뀌었을 때와 14A 위치에 T나 C로 염기서열이 바뀌었을 때 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 6G 위치부터 9A 위치까지는 야생형 염기서열에서 다른 염기서열로 변하게 되면 전사량이 줄어드는 것을 확인하였다. 10C 위치부터 11C 위치까지는 야생형의 염기서열보다 다른 염기서열이 위치할 경우의 전사량이 증가하는 것으로 관찰되었다. 특히 10C 위치에는 T가 위치할 경우와 11T 위치에는 G가 위치할 경우 전사량이 20배 정도 증가하였다. 따라서 SigH에 의존적인 promoter의 -35 지역은 GGAA(T/c)(A/t)의 염기서열로 구성된 것으로 보이며, 이 염기서열은 그림 1에서 분석된 SigH의 강력 promoter의 consensus sequence로 알려진 *dnaK*나 *trxB2*의 promoter와 일치한다. -10 지역을 보면 1G 위치부터 3C 위치까지와 7A 위치부터 12C 위치까지는 다른 염기서열로 변하여도 돌연변이 promoter의 전사량이 야생형의 전사량과 크게 달라지지 않았다. 4G 위치부터 6T 위치까지는 염기서열이 야생형에서 다른 염기서열로 변했을 경우 전사량이 줄어들었고, 8A 위치에 G로 염기서열이 바뀌었을 경우 전사량이 줄어들었다. 따라서 -10 지역의 GTT가 SigH에 결합을 잘 하는 것으로 보인다.

특히 SigH의 경우 -35 지역의 10C 위치에 C보다 T가 위치할 경우, 11T 위치에 A로 염기서열이 변했을 경우 발현되는 transcripts의 양이 현격하게 증가하는 것을 볼 수 있었는데, 이 염기서열은 GGAATA로 그림 1

에서 제시한 *sigE* promoter와 같으나 보고된 논문에 따르면 SigH는 *sigE* promoter에 강력하게 결합하는 것으로 나타나지 않았다. 따라서 위에서 밝혀진 -35 지역과 -10 지역의 염기서열 이외에 아직 확실하게 규명되지 않은 다른 부위의 염기서열이 promoter의 전사에 영향을 줄 가능성도 있음이 제시되었다.

SigH와 *E. coli* RNA polymerase core enzyme을 재조합한 후 *in vitro* transcription assay를 수행한 실험에서 돌연변이 *sigB* 및 야생형 *sigB*가 포함된 plamid들을 *Bsu36* I으로 자른 것을 template로 하였을 때 야생형조차 낮은 수준으로 전사되므로 전사가 잘 일어나는 돌연변이 promoter는 관찰하기 쉽지만, 전사가 적게 일어나는 돌연변이 promoter는 차이를 명확하게 구별하기 힘든 점이 있었다. 따라서 전사가 잘 일어나는 것으로 알려져 있는 *trxB2*나 *dnaK* 등의 promoter를 이용하여 실험할 경우 앞서 본 SigE에 대한 *sigB* promoter의 실험결과처럼 확연하게 전사량의 차이가 드러나는 결과를 얻을 수 있을 것이다.

야생형 혹은 각 sigma factor 유전자의 돌연변이체 *M. smegmatis*를 대상으로 transcriptional *lacZ* fusion을 이용하여 각 돌연변이 promoter들의 전사활성을 측정하여 *in vitro* transcription assay에서 밝혀진 각 sigma factor들의 promoter 염기서열에 대한 결합특이성을 생체 내에서 어떻게 일어나는지 확인하였다. 그림 13을 보면 -35의 2G 위치에 C로 염기서열이 바뀌었을 경우, *in vitro* transcription assay에서 SigH, SigE 모두 전사량이 특히 줄어드는 것을 볼 수 있는데, β -galactosidase assay를 하였을 때를 보면 야생형의 *M. smegmatis*에서도 LacZ 활성이 줄어들었다. RH244는 *sigE*가 결손된 *M. smegmatis*이므로 SigH에 의존적인 LacZ 활성을 확인할 수 있다. SigH와 *E. coli* RNA polymerase core enzyme을 재조합한 후 *sigB* promoter -10 지역의 10C 위치에 A나 G로 염기서열을 바꾼 *sigB* promoter를 template로 *in vitro* transcription assay를 하였을 때에는 야생형과 별다른 차이가 없는 것으로 보였으나, β -galactosidase assay에서는 차이가 있는 것으로 나타났다. 따라서 SigH에 의존적인 *sigB* promoter

활성의 결과로 SigH가 인식하는 promoter의 염기서열을 밝히는 것에는 한계가 있는 것으로 생각되며, 앞서 지적한 것과 같이 SigH에 대해서 전사가 잘 일어나는 것으로 알려져 있는 *trxB2*나 *dnaK* 등의 promoter를 이용한 실험이 필요하다고 생각된다.

V. 결 론

1. 결핵균의 *sigC*, *sigE*와 *sigH* 유전자를 각각 pGEX-4T-3, pET-3c와 pET-11a에 클로닝하고 대장균에서 과량발현시켜 SigC, SigE, SigH 단백질을 정제하였다.
2. SigC가 *sigB* 유전자의 전사에 관여할 것으로 예상하였으나 실험에 사용한 *sigB* 유전자의 promoter를 인식하지 않는 것으로 밝혀졌다.
3. -35와 -10 지역에 돌연변이가 도입된 *sigB* promoter를 주형으로 사용한 *in vitro* transcription assay에서 대장균의 RNA polymerase core enzyme과 재조합된 SigE와 SigH는 서로 겹쳐진 -35 및 -10 지역을 인식하지만 특정위치에서 서로 다른 염기서열을 선호함을 확인하였다.
4. SigE는 -35 지역에 GGAAGTC(A/C), -10 지역에 (C/a)GTT 염기서열에 높은 전사활성을 보였고 SigH는 -35 지역에 GGAA(T/c)(A/t), -10 지역에 GTT 염기서열을 선호하였다.
5. 위에서 밝혀진 -35 지역과 -10 지역의 염기서열 이외에 아직 확실하게 규명되지 않은 다른 부위의 염기서열이 각 돌연변이 promoter의 전사에 영향을 줄 가능성도 있음이 제시되었다.
6. 야생형 혹은 각 sigma factor 유전자의 돌연변이체 *M. smegmatis*를 대상으로 transcriptional *lacZ* fusion을 이용하여 각 돌연변이 promoter들의 전사활성을 측정하여 *in vitro* transcription assay에서 밝혀진 각 sigma factor들의 promoter 염기서열에 대한 결합특이성이 생체 내에서도 비슷하게 일어나는 것을 확인하였다.

참고문헌

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282:677-686.
2. 대한결핵협회. 2004년 결핵현황. 2004.
3. Hingley-Wilson SM, Sambandamurthy VK, Jacobs WR Jr. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Immunol 2003;10:949-955.
4. Lonetto M, Gribskov M, Gross CA. The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationship. J Bacteriol 1992;174:3843-3849.
5. Braun V. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. Arch Microbiol 1997;167:325-331.
6. De Las Penas A, Connolly L, Gross CA. The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. Mol Microbiol 1997;24:373-385.
7. Paget MS, Kang JG, Roe JH, Buttner MJ. SigmaR, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the

- thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). EMBO J 1998;17:5776–5782.
8. Firoved AM, Deretic V. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2003;185:1071–1081.
 9. Kovacicova G, Skorupski K. The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. Infect Immun 2002;70:5355–5362.
 10. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete sequence. Nature 1998;393:537–544.
 11. Gomez JE, Chen JM, Bishai WR. Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis 1997;78:175–183.
 12. Hatfull, Graham F, Jacobs, William R Jr, Molecular genetics of mycobacteria. 1st ed. Washington, D.C: ASM Press; 2000.
 13. Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, Kramer FR, Smith I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol 1999;31:715–724.
 14. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages. Mol Microbiol

2001;41:423-437.

15. Raman S, Song T, Puyang X, Bardarov S, Jacobs WR Jr, Husson RN. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress response in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 2001;183:6119-6125.
16. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Dubnau E, Gomez M, Smith I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor H in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. Mol Microbiol 2002;45:365-374.
17. Miller, JH. Experiments in molecular genetics. 1st ed. Albany(NY): Cold Spring Harbor Press; 1972.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Albany(NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.
20. Miyazaki E, Chen JM, Ko C, Bishai WR. The *Staphylococcus aureus* rsbW (orf159) gene encodes an anti-sigma factor of SigB J Bacteriol 1999;181(9):2846-2851.
21. Kang JG, Hahn MY, Ishihama A, Roe JH. Identification of sigma

- factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). NAR 1997;25(13):2566-2573.
22. Predich M, Doukhan L, Nair G, Smith I. Characterization of RNA polymerase and two sigma-factor genes from *Mycobacterium smegmatis* Mol Microbiol 1995;15(2):355-366.
23. Nomura T, Fujita N, Ishihama A. Promoter selectivity of *E. coli* RNA polymerase: analysis of the promoter system of convergently-transcribed dnaQ-rnh genes Nucleic Acids Res 1985; 11;13(21):7647-7661.
24. Sun R, Converse PJ, Ko C, Tyagi S, Morrison NE, Bishai WR. *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor *sigC* is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. Mol Microbiol 2004;52(1):25-38.
25. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs WR Jr. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol 1990;4:1911-1919.
26. Fernandes ND, Wu QL, Kong D, Puyang X, Garg S, Husson RN. A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress J Bacteriol 1999; 181(14):4266-4274.

27. 이초순. *Mycobacterium* sp. strain JC1 DSM 3803에 존재하는 일산화탄소탈수소효소유전자의 프로모터 영역 기능 분석. 학위논문. 연세대학교 생물학과;2004.
28. Kaushal D, Schroeder BG, Tyagi S, Yoshimatsu T, Scott C, Ko C, et al. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(12):8330-8335.

Abstract

Sequences analysis of the overlapping SigH- and SigE-dependent promoters of *sigB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*

Seung-Eun Song

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Sang-Nae Cho)

Sigma factors of the extracytoplasmic function (ECF) family are the major regulators of gene expression in the bacterial response to environmental stresses that pathogenic bacterias are likely to encounter during the course of infection. Mutations in *sigE* and *sigH* of *Mycobacterium tuberculosis*, encoding an ECF sigma factor respectively, affect virulence of the pathogen, and SigE and SigH were found to mediate expression of partially overlapping sets of genes in response to oxidative and heat stresses. Together with another sigma factor, SigB, SigH and SigE form a regulatory network where SigH directs expression of *sigE*, and both SigH and SigE, in turn, facilitates transcription of *sigB*, implying a complicated regulatory mechanism exists and both the sigma factors recognize similar sequence of the *sigB* promoter. To investigate the sequences of SigE- and SigH-

dependent promoters, mutations were introduced in the -35 and -10 regions of the SigH-dependent promoter of *sigB* gene and the binding of the sigma factors to the mutated sequences was monitored by *in vitro* transcription assay using purified SigH and SigE reconstituted with *E. coli* RNA polymerase core enzyme. SigH and SigE recognize the sequences of GGAA(T/c)(A/t) and GGAAGTC(A/C), respectively, which overlap at the -35 region. At -10 region SigH binds strongly to the sequence of GTT while SigE prefers (C/a)GTT. Results from *in vitro* transcription assay employing the mutated promoters also imply the presence of other sequence elements that affect promoter strength. Specificity for the promoter sequences of both SigH and SigE was also confirmed by measuring transcription activity of the mutated promoters in *Mycobacterium smegmatis*, either wild type or *sigH*- and/or *sigE*-deleted. Discrimination between SigE and SigH regulons based on the promoter sequences revealed in this study, along with further investigation of the regulatory mechanism involved, should provide insight into the regulation of cellular functions of *M. tuberculosis* implicated in pathogenesis.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, sigma factor, promoter, transcription