

극지 미세조류 프로모터를  
이용한 벡터 시스템 구축

Development of vector system  
using polar microalgal promoters



한양대학교  
산학협력단

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능 분석” 과제의 위탁연구 “극지 미세조류 프로모터를 이용한 벡터 시스템 구축” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2020. 01. 20.

(본과제) 총괄연구책임자 : 김 상 희  
위탁연구기관명 : 한양대 산학협력단  
위탁연구책임자 : 진 언 선  
위탁참여연구원 : 김 민 재  
“ : 서 승 범

## 보고서 초록

위탁연구과제명	극지 미세조류 프로모터를 이용한 백터 시스템 구축				
위탁연구책임자	진 언 선	해당단계 참여연구원수	3명	해당단계 연구비	120 (백만원)
연구기관명 및 소속부서명	한양대학교 생명과학과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : -		상대국연구기관명 : -		
요약					보고서 면수
<p>1차년도 (2017년)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* 극지 미세조류 유래의 프로모터를 이용한 백터 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 구조류 프로모터 (P9) 에 접합된 가우시아 루시퍼레이즈 발현 백터 1종 제작</li> <li>- P9에 접합된 가우시아 루시퍼레이즈 발현 백터가 삽입된 클라미도모나스 형질전환체 18개 확보</li> <li>- 형질전환체에서 저온에 유도되는 가우시아 루시퍼레이즈 활성 증가 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>2차년도 (2018년)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* 극지 미세조류 유래의 프로모터를 이용한 백터 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 구조류 프로모터 (P9) 를 다양한 크기로 절단한 백터 제작 (1,225, 900, 600, 477, 300bp)</li> <li>- 프로모터 절단을 통해 극지 구조류 프로모터의 저온 유도 관련 전사인자 위치 예상 (477bp 부분)</li> <li>- 극지 녹조류 프로모터 (P1, P3) 에 접합된 가우시아 루시퍼레이즈 발현 백터 2종 제작</li> <li>- P1, P3에 접합된 가우시아 루시퍼레이즈 발현 백터가 삽입된 형질전환체 각 3개 확보</li> </ul> </li> </ul> <p>3차년도 (2019년)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>* 극지 미세조류 유래의 프로모터를 이용한 백터 시스템 구축               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 극지 구조류 프로모터 (P9) 에 접합된 mVenus 형광 단백질 발현 백터 제작 (1,225, 600bp)</li> <li>- 형질전환체에서 mVenus 형광 단백질 발현 확인</li> <li>- 극지 녹조류 프로모터 (P1, P3) 와 구조류 프로모터 (P9) 의 비교를 통해 P3의 연구 필요성 확인</li> <li>- 극지 구조류 프로모터 (P9) 을 이용한 발현 시스템 특허 출원 (특허출원번호: 10-2019-0136817)</li> </ul> </li> </ul>					
색 인 어	한 글	극지 미세조류; 키토세로스 네오그라실; 클라미도모나스; 클로로모나스; 저온 유도성 프로모터; 발현 시스템; 가우시아 루시퍼레이즈; mVenus 형광 단백질			
	영 어	Polar microalgae; <i>Chaetoceros neogracile</i> ; <i>Chlamydomonas</i> ; <i>Chloromonas</i> ; Cold-inducible promoter; Expression system; Gaussia luciferase; mVenus			

# 요 약 문

## I. 제 목

극지 미세조류 프로모터를 이용한 벡터 시스템 구축

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구개발의 목적은 극지 미세조류의 프로모터 서열을 이용하여 신규 벡터 시스템을 구축하는 것이다. 총괄 과제의 목적인 ‘극지 미세조류 유래 천연 세포 보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석’의 가장 큰 문제는 극지 미세조류의 느린 성장으로 인한 원료물질의 충분한 확보가 어렵다는 것이다. 때문에 안정적 원료물질의 수급을 위해서는 기존에 널리 사용되고 있는 대장균 (*Escherichia coli*) 발현 시스템을 이용하거나, 극지 미세조류에 비해서 성장이 빠른 온대성 미세 녹조류인 클라미도모나스 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 발현 시스템과 같은 대체 시스템을 이용할 필요가 있다. 대장균 발현 시스템을 이용하면 생산이 빠르다는 장점은 있으나, 박테리아 시스템의 한계로 인해서 생산할 수 있는 물질이 제한적이기 때문에 미세 녹조류인 클라미도모나스를 이용하는 방안이 고려되었다. 또한, 총괄 과제에서 이용하고자 하는 천연 세포보호 물질은 단백질을 포함하는 다양한 화합물이므로 고온에 의한 구조 변형을 고려해야 한다. 따라서 본 연구개발은 높은 온도에 의한 단백질 구조 변형을 줄일 수 있는 저온 유도성 유전자 발현 시스템을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

## III. 연구개발의 범위 및 내용

본 연구개발의 범위는 저온에서 유전자 발현의 증가를 유도하는 특성과 관련된 전사인자 부위를 예측하는 것부터, 저온 유도성 프로모터 서열을 이용하는 유전자 발현 벡터의 개발까지를 포함한다.

본 연구개발의 내용은 극지 미세 규조류와 극지 미세 녹조류에서 유래한 프로모터의 저온에서의 유전자 발현 조절의 관찰에 관한 것이며, 다양한 분자생물학적 특성 분석을 통한 저온 유도성 전사인자를 포함한 유전 서열의 예측, 그리고 극지 미세 규조류와 극지 미세 녹조류의 프로모터를 이용한 발현 벡터의 개발과 비교에 관한 것이다.

#### IV. 연구개발결과

극지연구소에서 제공받은 극지 미세 녹조류인 클라미도모나스 ArM29 (*Chlamydomonas* ArM29) 와 클로로모나스 KNF32 (*Chloromonas* KNF32) 두 종, 그리고 본 연구팀이 기존에 가지고 있던 극지 미세 규조류인 키토세로스 네오그라실 (*Chaetoceros neogracile*) 로부터 저온에서 유전자 발현 증가가 유도되는 유전자의 프로모터 서열을 확보하였다. 이들 중, 클라미도모나스 ArM29 종의 Long chain acylCoA synthetase (contig\_12889), Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (contig\_8321), 그리고 키토세로스 네오그라실의 Antifreeze protein의 프로모터 서열을 이용하여 벡터 클로닝을 하였고, 프로모터를 각각 P1, P3, P9으로 명명하였다. 이후, 이들 프로모터의 저온 유도성을 확인하기 위해 지표 단백질인 가우시아 루시페레이즈 (*Gussia luciferase*)와 mVenus 형광 단백질을 접합시킨 발현 벡터를 구축하였다. 완성된 P1, P3, P9 발현 벡터는 유전자 발현과 효소/단백질 활성 검사를 통해서 저온에서 증가된 지표 단백질의 유전자 발현이 일어나는 것을 확인하였다. 3년간의 연구개발 결과를 종합하여 국내 특허 1건 출원을 완료하였다 (특허출원번호: 10-2019-0136817).

#### V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구개발을 통해서 얻어진 결과물은 다양하게 활용 될 수 있다. 먼저 클라미도모나스 레인하디티로부터 극지 미세조류 유래의 천연 세포보호 단백질 생산을 가능하게 할 수 있고, 다른 산업 미세조류로부터 유용 물질 생산을 위한 대사공학적 접근에 이용될 수 있다. 본 연구개발물의 활용성을 더욱 높이기 위해, 향후 추가 개량을 하여 좀 더 저온에 민감하게 조절되는 발현되도록 만들 필요가 있다.

# S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

## I. Title

Development of vector system using polar microalgal promoters

## II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to construct a novel vector system using the promoter sequence of polar microalgae. In particular, we develop a low-temperature inducible gene expression system that can avoid the protein denaturation caused by high temperature. The major problem for high production of valuable bio-compound from polar microalgae is to secure sustainable supply of algal biomass due to the slow growth of polar microalgae. Therefore, to supply feedstocks for valuable compounds more sustainably, bacterial expression system, such as *Escherichia coli*, or eukaryotic expression system are considered to be used. Although, *E. coli* expression systems have the advantage in fast production but have limitations that bacterial systems lack of post translational modifications such as glycosylation. Therefore, we proposed a microalgal system as an alternative expression system to bacterial system. The model green microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, has a lot of advantages that grow faster than the polar microalgae and has various genetic tool kits for transformation of expression vector. We tried to produce the natural cytoprotective substance from *C. reinhardtii* that introduced various vectors developed in this study.

## III. Contents and Extent of R&D

The scope of this research development ranges from predicting transcription factor sites associated with properties that induce an increase in gene expression at low temperatures to the development of gene expression vectors using low-temperature inducible promoter sequences. The contents of this research and development include the observation of gene expression regulation at a low temperature of promoters from polar micro diatoms and polar microalgae, prediction of genetic sequences including low-temperature

inducible transcription factors through various molecular biological characteristics. And the present invention relates to the development and comparison of expression vectors using promoters of polar diatoms and polar microalgae.

#### IV. R&D Results

In this study, we obtained the promoter sequences from *Chlamydomonas* ArM29 and *Chloromonas* KNF32 that received from Korean Polar Research Institute (KOPRI), and from *Chaetoceros neogracile* that we already have. Among them, we generated the new vectors using the promoter sequences of Long chain acylCoA synthetase (contig\_12889), Ribuloase-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (ocntig\_8321) from *Chlamydomonas* ArM29, and using the promoter sequences of antifreeze protein from *Chaetoceros neogracile*. The vectors generated in this study were named P1, P3, and P9, respectively. Subsequently, to confirm the low-temperature induction of these promoters, expression vectors obtained by conjugating *Gaussia* luciferase or mVenus fluorescent protein, which are reporter proteins, were constructed. The P1, P3, and P9 expression vectors were confirmed by gene expression and enzyme or protein activity test. Completion of three years of research and development results completed one domestic patent application (patent application number: 10-2019-0136817).

#### V. Application Plans of R&D Results

The results obtained through this research and development can be utilized in various ways. First, it can be applied to the production of natural cytoprotective proteins derived from polar microalgae, and can be used for metabolic approaches for the production of useful substances of other industrial microalgae. To expand the utility of developed vector systems, we need to improve them to be regulated more sensitively at low temperatures.

# 목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌



## 제 1장. 서론

### 1절. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구개발의 목적

극지 미세조류 프로모터를 이용한 벡터 시스템 구축

#### 2. 연구개발의 필요성

본 과제의 목적인 ‘극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석’의 가장 큰 걸림돌은 극지 미세조류의 느린 성장으로 인해 원료물질의 충분한 확보가 어렵다는 것이다. 때문에 안정적인 원료물질의 수급을 위해서는 기존에 널리 사용되고 있는 대장균 (*Escherichia coli*) 발현 시스템을 이용하거나, 극지 미세조류에 비해 성장이 빠른 미세 녹조류 모델인 클라미도모나스 레인하디티 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 발현 시스템을 이용하는 방법이 있다. 대장균을 이용하면 생산이 빠르다는 장점은 있으나, 박테리아 시스템의 한계로 인해 생산할 수 있는 물질이 제한적이기 때문에 미세 녹조류인 클라미도모나스를 이용하는 방안이 고려되었다. 또한, 본 과제에서 이용하고자 하는 천연 세포보호 물질은 단백질을 포함하는 다양한 화합물이므로 고온에 의한 구조 변형을 고려해야 한다. 따라서 본 연구개발은 온도에 의한 단백질 구조 변형을 줄일 수 있는 저온 유도성 유전자 발현 시스템을 개발하는 것을 목적으로 하였다.

### 2절. 연구개발의 범위

본 연구개발은 극지연구소에서 제공받은 극지 미세 녹조류 클라미도모나스 ArM29와 클로로모나스 KNF32 두 종과 본 연구팀이 기존에 보유하고 있는 극지 미세 규조류인 키토세로스 네오그라실 (*Chaetoceros neogracile*)을 대상으로 수행되었다. 그 중에서도 저온에 유도되는 특징을 가지는 *Chloromonas* KNF32의 Long chain acylCoA synthetase 유전자와 Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (contig\_8321) 유전자의 프로모터 서열, 그리고 *C. neogracile*의 Antifreezing protein의 프로모터 서열을 대상으로 하여 진행되었다. 연구개발의 범위는 프로모터 서열에서 저온 유도와 관련된 전사인자 부위를 예측하는 것부터 프로모터 서열을 이용한 유전자 발현 벡터의 개발까지 포함한다.

## 제 2장. 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내 기술개발 현황

서로 다른 종의 프로모터를 이용해서 발현 벡터를 개발하는 연구는 많이 진행되어 왔다. 국내에서 미세조류의 프로모터를 이용한 기술개발은 주로 본 연구진에 의해 선도되고 있다. 지금까지 본 연구진에 의해 보고된 프로모터 및 발현 벡터 관련 기술개발 현황은 다음과 같다. 2013년에는 해양 미세 녹조류 두날리엘라 (*Dunaliella* sp.) 유래의 광유도성 프로모터 (light-inducible promoter, LIP) 가 보고되었으며 (Park et al., *Planta* (2013)), 2015년에는 해양 미세 규조류 폐오닥틸럼 트리코누툼 (*Phaeodactylum tricornutum*) 유래의 EF2 프로모터를 이용한 규조 대상의 지속적 발현 벡터 시스템을 보고하였다 (Seo et al., *Algal research* (2015)). 2016년에는 기존에 보고된 LIP 프로모터의 개량과 함께 광유도와 관련된 전사인자를 발견하여 보고하였다 (Baek et al., *Biotechnology journal* (2016)). 2018년에는 본 연구진에서 담수 미세 녹조류 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 의 광합성 관련 유전자인 psaD 프로모터를 이용한 벡터가 제작되었으며, 클라미도모나스 외의 고등식물에서도 작동하는 것으로 확인되었다 (Kim et al., *International journal of molecular sciences* (2018)). 국내에서 기존에 제작된 프로모터는 광유도성 발현 벡터, 지속적 발현 벡터였으며, 저온 유도성 발현 벡터를 개발하려는 시도는 지금까지 없었다. 또한, 대부분 가우시아 루시퍼레이즈의 발현만을 확인하였고, 새로운 지표 단백질의 발현은 거의 시도되지 않았다.

### 2절. 국외 기술개발 현황

국외에서도 마찬가지로 서로 다른 종의 프로모터를 이용해서 발현 벡터를 개발하고자 하는 노력은 이미 많이 이루어져 왔다. 이미 1980년대부터 광합성 기구를 구성하는 요소들의 프로모터 서열을 이용한 광 반응성 발현 벡터에 대한 연구들이 보고되었으며, 특히 본 연구과제에서 발현 호스트로 사용한 미세조류 모델 종인 클라미도모나스의 경우에 다음과 같은 다양한 프로모터가 실제로 연구되고 사용되었다. 현재까지  $\beta$ -2-tubulin 프로모터 (Davies et al., *Nucleic acid research* (1992)), HSP70A 프로모터 (Schroda et al., *The plant journal* (2000)), RbcS2 프로모터 (Goldschmidt-Clermont et al., *Journal of molecular biology* (1986)), AR1 프로모터 (Schroda et al., *The plant journal*

(2000)), 그리고 Lhcb-1 프로모터 (Kindle et al., Plant molecular biology (1987)) 가 대표적으로 이용되어 왔다. 그 중에서도 AR1 프로모터가 지속적으로 높은 발현을 보이는 것으로 알려져 있는데, 이는 HSP70A 프로모터와 RbcS 프로모터의 접합을 통해 얻어진 키메라 프로모터이다.

이미 국외에서는 개발된 발현 벡터를 이용해서 짧은 펩타이드부터 크기가 큰 단백질에 이르기까지 다양한 크기의 물질을 미세조류에서 생산하고자 하였으며, 2013년에는 Lauersen 등의 연구자에 의해서 재조합 얼음 결합 단백질 (recombinant ice-binding protein)을 발현하고 세포 외부로 분비하였다는 논문이 보고된 바 있다 (Lauersen et al., *Applied microbiology and biotechnology* (2013)). 비록 해당 보고에서 얼음 결합 단백질의 생산 수율이 매우 낮음을 확인할 수 있지만, 미세조류를 이용해서 유용 단백질을 생산할 수 있다는 가능성을 보여준다.

### 3절. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

2장 1절에서 앞서 언급한 것처럼, 현재까지 미세조류에 적용 가능한 저온 유도성 발현 벡터는 국내외 어디서도 개발된 적이 없다. 따라서 본 연구개발에서 제작한 저온 유도성 발현 벡터는 미세조류의 형질전환 및 유전자 발현의 수준을 한층 더 끌어올릴 수 있는 계기가 될 것으로 보인다.

## 제 3장. 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 극지 미세 규조류 프로모터를 이용한 발현 벡터 개발

#### 1. 극지 미세 규조류에서 저온 유도 프로모터 서열 확보 (P9 프로모터)

##### (1) 연구 대상 프로모터 선정

본 연구팀이 극지 미세 규조류 키토세로스 네오그라실을 대상으로 한 선행 연구에서 결빙방지 단백질 (Antifreezing protein) 이 저온에 의해 유전자 발현이 증가하는 패턴을 보여준다 (그림 1) (Gwak et al., *Marine biotechnology* (2010)). 결빙방지 단백질의 RNA 발현은 저온 처리 40분 쯤 2.5배 이상으로 증가하고, 60분 쯤에는 감소한다.

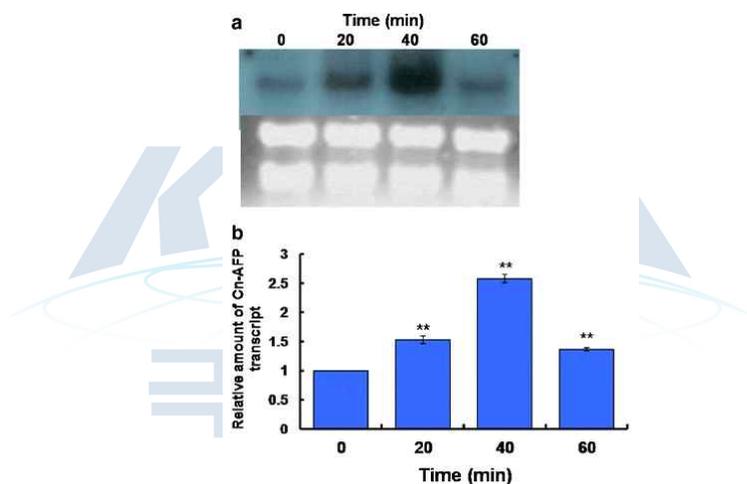


그림 1. 결빙방지 단백질의 발현 수준 증가 패턴

(Gwak et al., *Marine biotechnology* (2010))

이러한 선행연구를 바탕으로 결빙방지 단백질의 프로모터 서열에 저온 유도성 전사인자가 포함되어 있을 것으로 예상하였으며, 본 과제의 목적에 부합하는 저온 유도성 발현 벡터에 이용할 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 키토세로스 네오그라실의 genomic DNA에서 결빙방지 단백질의 프로모터 서열만을 PCR 증폭하여 얻어내었다. PCR 조건은 95°C에서 10분 pre-denaturing 하고, 95°C - 58°C - 72°C 로 이어지는 증폭 사이클을 35회 수행한 후, 72°C에서 post-elongation 후, 12°C로 온도 강하하는 것으로 설정하였다. PCR은 높은 정확도를 위해, pfu polymerase를 사용하여 수행되었다. 얻어진 DNA 증폭 절편의 길이는 1,225bp 이며 (그림 2), 프로모터의 서열은 그림 3에 제시되어있다.

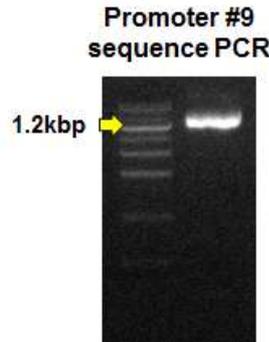


그림 2. 키토세로스 네오그라실의 프로모터 증폭 밴드

> CnAFP (P9 프로모터, full length)\_1,225bp

```

TCGGACTATACATCCCCACACCCCAACATGCTAACTGTAGCAGTCTCGACATGCAGGCCGCATATGTTGATGCTGCAG
GCCGCCCTGACCCGACTACGTTGAGCTTGGTGCTGGAACATTGAGGGTTTACTCTTGATCCTGGCCATACAAGTGG
GGGACTGATGTCGGCTTACCACACAGTCTCACCTTCAATGGTAATGCCACTGATATTTGGATCTTGCAGATTGATGGGGA
TGTCAAAGTAGGCAGCGGTGCAACAGTCACTTTCTGGCGGGGCCAAGGCTGAGAACATCTTTGGCAGATTGCGGGC
AAGACTGATCTAGGCACCACGTCCCATGTTGAGGGTGTTCCTCTGTAGCACAGCTATCACGGTCAAACTGGAAGCA
GCATGAATGGTGTGCTAGCACAGACAGCAGTCAAGTTGGATTCCGCTACGATCGTGAAGAAGTCCGATGCGATGC
GGATGTTGGGTGTGTGAAAACATAAAGGTGTGCTAAATGTGTGTACACAAACATGCAGTTGATGAGGATGCTGAATGAG
GATATTTGATGTTAAAAGTAGTACTACGAGTATGGTAATCATCGTCTCTACTGATCAATATACGGACAATTAATGTGAC
AGCACATATTTGTATAACC TTTAAACTAAAACCACTTCTCCAATTTTCTGATGGAATATCC TTTGGTCTCTTTGGTTTGC
ATATCTGTAATTTTGTGTTTAACTCTTCGATACATGATTTAAATAACTTGCCTCTCTTTGTTACACCATGCGAAACAATCA
CTAGCAGTGCACCTACAGTATTGACAAGACCAAGAAATCTAGCTAGTATAATAACATATACA TTTACTGTAATTCCTC
AACATTGCGAAAGAAATCAATGTAATCTTGGAGCCTTAAAAATCAAAGTGCAGAACTCTTAAGAAATGCAAGATA
TTTTTGCATTTTCATGAACTTACATGATGATGATGATTTTAAAAATGTGGTGCATGATTATCGTTAATCACTTTAGACAA
AAGTCAGAAGGCATTTAGTCAATGCCCTGTGCTTGTAGAGGCATAAAACAAGGCCCTGGCAAAACAACAGGCATT
TAATACAATGACCTTTCAATCACAGACTCAAATCGAAATCTCTCATTATCAATTCATTTGCTCTCTCAAAGCTCATAAT
TTCAGAAAGCACAAAAC

```

- CAAT-box:** common cis-acting element in promoter and enhancer regions
- TATA-box:** core promoter element around -30 of transcription start
- ACE:** cis-acting element involved in light responsiveness
- G-box:** cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
- 5'UTR Py-rich stretch:** cis-acting element conferring high transcription levels
- Circadian:** cis-acting regulatory element involved in circadian control

그림 3. 극지 미세 규조류의 결빙방지 단백질 프로모터 서열

얻어진 프로모터 서열 중, 유전자 발현과 관련이 있는 전사조절인자를 예측하기 위해서 PLANT CARE와 같은 전사조절인자 예측 프로그램을 사용하였다. 그 결과, 결빙방지 단백질 프로모터 서열에 포함되어 있는 전사조절인자 중에는 CAAT-box, TATA-box와 같은 프로모터의 핵심 전사조절인자 뿐만 아니라, 빛과 온도, 광주기에 반응하는 전사조절인자들이 있는 것을

확인 할 수 있었다. PLANTCARE는 고등식물 데이터 기반으로 예측 하는 것이기에 결과에 대해 100% 일치하지는 않을 수 있지만, 보편적으로 발견 되는 전사조절인자는 예측할 수 있다. 하지만 어떤 전사조절인자가 저온 유도에 관여하는지는 명확하지 않다. 따라서 본 연구개발에서는 결빙방지 단백질 프로모터 서열의 어느 부분에 저온 유도성 전사인자가 포함되어 있는지, 나아가 어떠한 전사조절인자에 의해 저온 유도성이 나타나는지 확인하고자 추가 연구를 수행하였다.

## 2. P9 프로모터를 이용한 가우시아 루시퍼레이즈 발현 벡터 제작 및 형질전환

### (1) P9 프로모터 (1,225bp) 의 가우시아 루시퍼레이즈 발현 벡터 제작

프로모터의 개량과 심층적인 분석에 앞서, 본 연구팀은 극미세 구조류 유래의 결빙방지 프로모터를 P9 (=CnAFP promoter) 으로 명명하였다. 또, 다양한 길이로 절단된 P9 프로모터의 구분을 위해서 full length인 1,225bp의 경우 P9\_1,225bp로 표기하였다.

P9 프로모터의 제작을 위해서 (주)Invitrogen 사의 pChlamy3 벡터를 주형으로 하여, 기존의 AR1 프로모터를 잘라서 빼내고, P9\_1,225bp (=CnAFP promoter)를 삽입하였다. 그리고 발현하고자 하는 단백질로, 대표적인 지표 단백질인 가우시아 루시퍼레이즈 (Gaussia luciferase, GLuc)을 삽입하였다. 그 외의 3'UTR 서열을 포함한 나머지 구성요소들은 기존의 pChlamy3에 있는 그대로를 사용하였다 (그림 4).

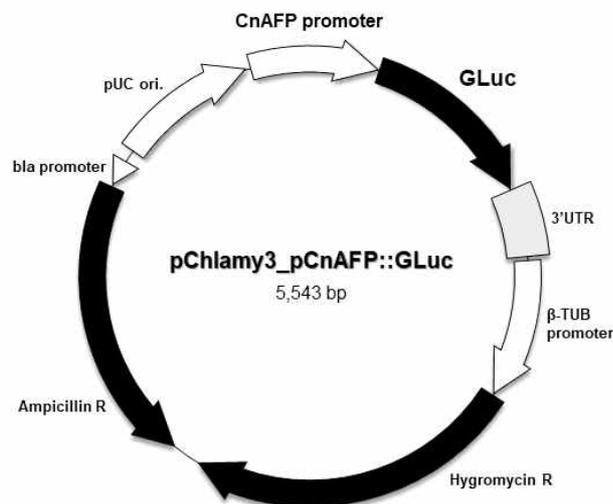


그림 4. P9 프로모터의 full length를 포함하는 발현 벡터 (1,225bp)

(2) P9 프로모터의 full length를 포함하는 발현 벡터의 형질전환

제작된 P9\_1,225bp 발현 벡터에 포함된 가우시아 루시퍼레이즈의 in vivo 활성을 확인하기 위해서 형질전환에 보편적으로 이용되는 미세조류 모델 종인 클라미도모나스 레인하디티에 벡터 도입을 시도하였다. 형질전환은 전기천공법 (electroporation)을 이용하였으며, 실험은 600V, 50uF, 200Ω으로 진행되었다. P9\_1,225bp 발현 벡터에는 하이그로마이신 (hygromycin) 저항 유전자가 포함되어 있다. 따라서 클라미도모나스 형질전환체는 하이그로마이신이 포함된 고체/액체 배지에서 선별하는 과정을 거쳐 얻어졌다 (그림 5). 이때 하이그로마이신 농도는 50 ug/mL으로 수행하였다.



그림 5. 고체 배지에서 하이그로마이신에 저항을 가진 콜로니의 형성

전기 천공법을 이용해서 클라미도모나스에 벡터를 도입한 후, 고체 배지에서 하이그로마이신에 저항을 가진 형질전환체를 액체 배지로 옮겨 2차 스크리닝을 수행하였다. 이후, 액체 배지에서 자란 샘플을 대상으로 프로모터 부분과 가우시아 루시퍼레이즈 유전자 부분을 함께 포함하는 PCR 프라이머 (예상 PCR 밴드 크기: 964bp)를 이용해서 PCR 증폭을 통해 벡터가 삽입된 것을 확인하였으며, 총 21개의 형질전환체를 얻었다 (그림 6).

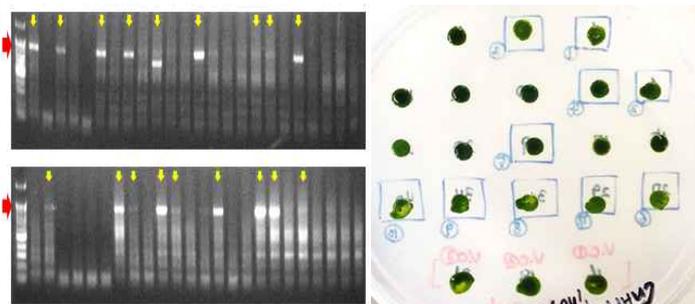


그림 6. P9\_1,225bp 벡터 형질전환체의 콜로니 PCR

### 3. P9 프로모터를 이용한 가우시아 루시퍼레이즈의 발현

#### (1) 상온 (25°C) 에서의 가우시아 루시퍼레이즈 활성 확인

도입된 P9\_1,225bp가 실제로 벡터로써 작동하는 지 확인하기 위해서 벡터의 삽입이 확인된 형질전환체 21개에 대해 가우시아 루시퍼레이즈의 활성을 측정하였다. 실험 방법은 프로메가 사 (Promega) 의 레닐라 루시퍼레이즈 (Renilla luciferase) 분석 키트를 제조사의 가이드 대로 따라서 진행하였으며, 프로메가 사의 글로맥스 루미노미터 (Glomax luminometer, Promega)를 이용해서 값을 측정하였다. 야생형의 측정값은 1,000 이하였으며, 형질전환체 21개 중에서 발현량이 10,000 이상인 것 중에서 높은 순서대로 3개의 형질전환체 (#5, #9, #19)를 최종 선발하였다 (그림 7).

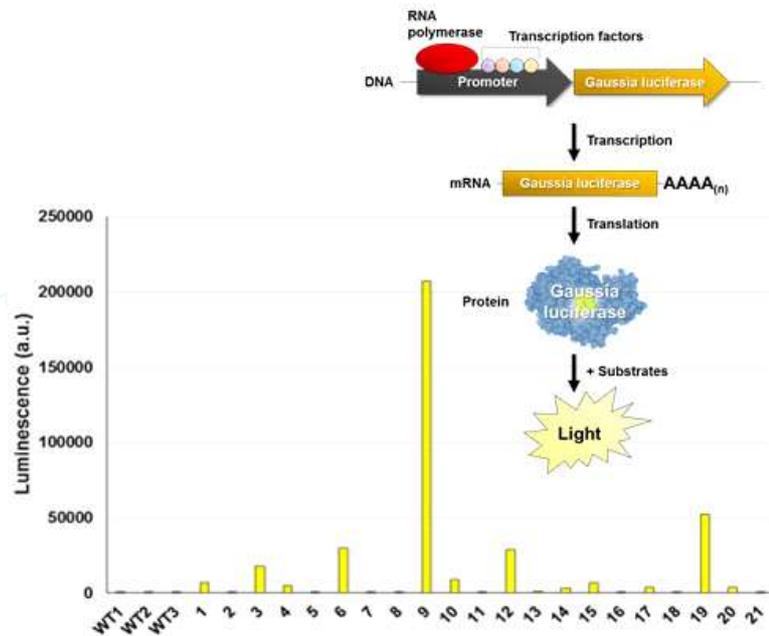


그림 7. P9\_1,225bp 벡터 형질전환체의 가우시아 루시퍼레이즈 실험 결과

#### (2) 다양한 온도 처리에 따른 가우시아 루시퍼레이즈 발현 및 활성 확인

최종 선발된 3개의 형질전환체를 대상으로 0°C, 10°C, 20°C, 35°C의 상온 (25°C)에 비해 낮거나 높은 온도를 결정하고, 각 온도를 2시간 처리한 형질전환체에서의 가우시아 루시퍼레이즈의 유전자 발현 및 활성이 어떻게 달라지는지 확인하였다. 우선 유전자 발현의 변화를 확인하기 위해서 가우시아 루시퍼레이즈 유전자의 quantitative real-time PCR (qRT) 프라이머와 레퍼런스 유전자인 Receptor For Activated C Kinase 1 (RACK1) 유전자의 프라이머를 이용해서 qRT PCR을 수행하였다 (그림 8A). 그 결과, 상온

(25°C)에 비해서 저온 및 고온에서 발현량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 세 종류의 저온 조건에서 10°C에서 약 2.5배의 발현 수준 증가를 보여주고 있었다. 이는 세포 상태에 영향을 미칠 수 있는 극저온이 아닌 10°C 만으로도 충분히 발현 증가가 유도 된다는 사실을 나타낸다. 다음으로 이들 형질전환체를 각각의 온도 처리 후에 가우시아 루시퍼레이즈의 활성 변화를 관찰하였을 때, 마찬가지로 저온과 고온에 의해서 측정값이 최대 2 배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 8B). 유전자 발현 수준과 가우시아 루시퍼레이즈 활성 사이에 경향성은 비슷하지만, 실제 증가 폭은 차이를 보이는 것을 확인하였다. 이 결과를 통해 P9 프로모터가 온도에 반응하여 유전자 발현을 조절한다는 것을 알 수 있었으나, 여전히 어떤 전사 조절인자가 저온 유도성과 관련이 있는지는 알 수 없었다. 또한 10°C에서 유전자 발현이 가장 많이 증가하기 때문에, 10°C를 저온으로 선택하여 향후 실험을 수행하였다.

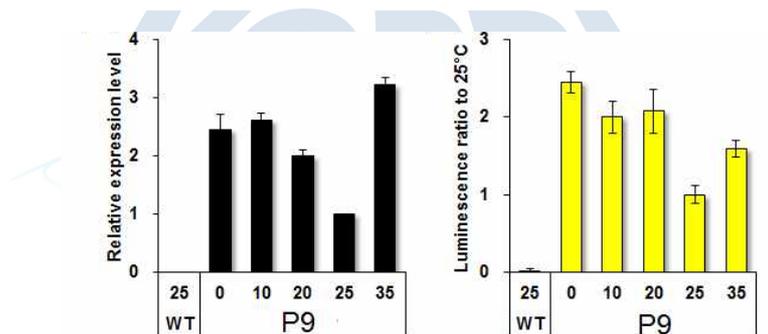


그림 8. P9 프로모터에 접합된 가우시아 루시퍼레이즈의 온도에 따른 패턴 ((좌) RNA 발현, (우) 가우시아 루시퍼레이즈 활성)

#### 4. P9 프로모터의 절단 분석을 통한 저온 유도성 전사조절인자 예측

##### (1) 다양한 길이의 프로모터를 포함하는 발현 벡터 제작

극지 미세 구조류 유래의 P9 프로모터에서 저온 유도성 전사인자가 포함된 서열을 예측하기 위해서 프로모터 절단 실험을 수행하였다. 1,225bp의 P9 프로모터 서열을 900bp, 600bp, 300bp (shortened 1, 2, 3) 으로 절단하였고, pChlamy3를 주형으로 짧아진 프로모터 각각에 해당하는 발현 벡터를 만들었다. 다양한 길이로 절단된 P9 프로모터의 구분을 위해서 절단 프로모터를 포함하는 벡터를 P9\_900bp (혹은 shortened 1), P9\_600bp (혹은 shortened 2), P9\_300bp (혹은 shortened 3) 으로 표기하였다 (그림 9).



그림 9. 전사인자에 따른 다양한 길이의 P9 벡터 제작

다양한 길이로 절단된 P9 프로모터는 특정 전사조절인자가 제외되었는데, P9\_900bp의 경우, ACE element라고 하는 광반응 전사조절인자와, LTRE라고 하는 저온 반응 전사조절인자가 제외되었다. P9\_600bp의 경우, G-box라고 하는 광반응 전사조절인자가 제외되었으며, P9\_300bp는 프로모터의 전사 과정을 증진시키는 5'UTR Py-rich stretch가 제외되는 것을 볼 수 있다 (그림 10). 고등식물의 데이터 베이스를 이용한 전사조절인자 예측을 통해 1,225bp와 900bp 사이에 있는 LTRE가 저온 유도성에 중요한 역할을 할 것으로 기대되었다.



그림 10. 다양한 길이로 절단된 P9 프로모터

(2) 다양한 길이의 프로모터를 포함하는 벡터의 형질전환체 제작

제작된 P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp 발현 벡터에 포함된 가우시아 루시퍼레이즈의 in vivo 활성을 확인하기 위해서 클라미도모나스 레인하디티에 벡터 도입을 시도하였다. P9\_1,225bp 벡터의 경우와 마찬가지로 형질전환은 전기 천공법을 이용하였으며, 실험 조건은 600V, 50uF, 200Ω으로 동

일하게 적용되었다. 절단된 프로모터를 포함하는 가우시아 루시퍼레이즈 발현 벡터에는 하이그로마이신 저항 유전자가 포함되어 있으므로 형질전환체는 하이그로마이신이 포함된 고체/액체 배지에서 선별하는 과정을 거쳐 얻어졌다 (그림 11). 전과 마찬가지로, 하이그로마이신 농도는 50 ug/mL으로 수행하였다.

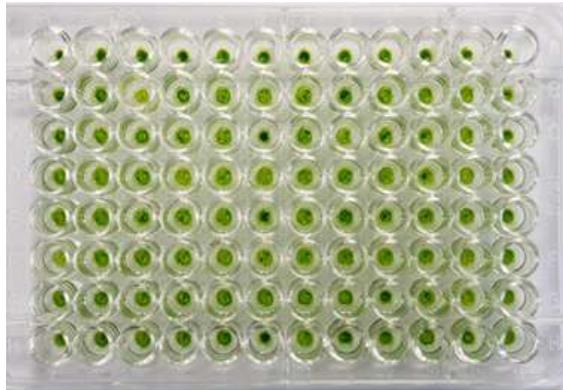


그림 11. P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp의 형질전환체 선별

액체 배지에서 자란 샘플을 대상으로 프로모터 부분과 가우시아 루시퍼레이즈 유전자 부분을 모두 포함하는 PCR 프라이머 (예상 PCR 밴드 크기: 698bp)를 이용해서 PCR 증폭을 통해 벡터가 삽입된 것을 확인하였으며, 형질전환체를 각각 25개씩 얻었다 (그림 12).

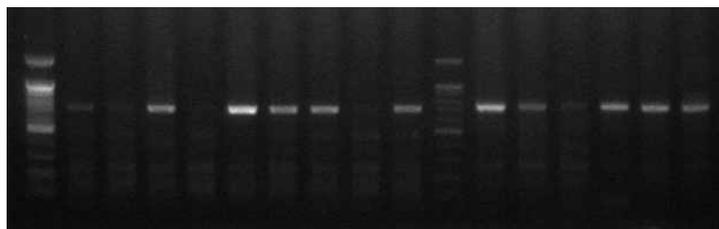


그림 12. P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp의 형질전환체의 콜로니 PCR

(2) 다양한 길이의 프로모터를 포함하는 벡터의 형질전환체에 대한 가우시아 루시퍼레이즈 활성 비교

도입된 P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp가 작동하는 지 확인하기 위해서 벡터의 삽입이 확인된 형질전환체에 대해 가우시아 루시퍼레이즈의 활성을 측정하였다. 실험 방법은 위에 언급한 방법을 따라 수행하였다. 앞선 P9\_1,225bp의 형질전환체에서 가우시아 루시퍼레이즈를 측정할 때는

positive control 그룹을 수행하지 않았었다. 따라서 본 실험에서는 가우시아 루시퍼레이즈 발현에 대한 positive control 그룹으로 기존에 클라미도모나스 형질전환에 주로 이용되는 AR1 프로모터를 도입한 형질전환체를 함께 측정하였다. 형질전환체에 따라서 가우시아 루시퍼레이즈 활성이 다른 것을 관찰할 수 있었으며, 그 중 유전자 발현 실험에 사용하기 위해서 각각 3개의 형질전환체를 선별하였다 (그림 13).

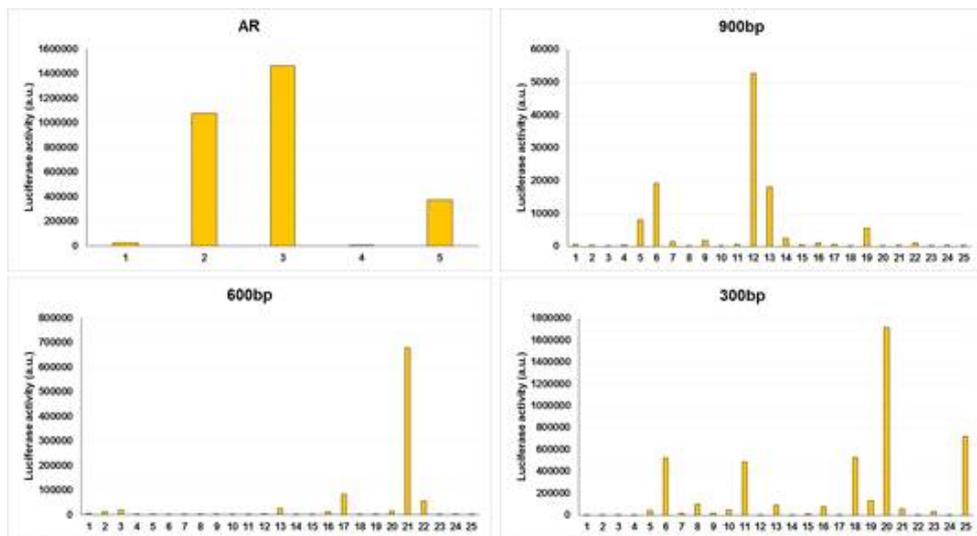


그림 13. P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp의 가우시아 루시퍼레이즈 활성 (AR1은 가우시아 루시퍼레이즈의 positive control)

(3) 다양한 길이의 프로모터를 포함하는 벡터의 형질전환체에 대한 가우시아 루시퍼레이즈 발현의 저온 유도성 비교

도입된 P9\_900bp, P9\_600bp, P9\_300bp가 저온에 의해 유전자 발현 증가를 유도하는 지 확인하기 위해서 상온 (25°C)에서 배양 중인 형질전환체를 저온 (10°C)에 2시간 처리하였다. 이때, positive control로 P9\_1,225bp (full length, FL)의 형질전환체를, negative control로 AR1의 형질전환체를 사용하였다. 가우시아 루시퍼레이즈 유전자의 발현 수준은 그림 14에 나타난 것처럼 뚜렷하게 구분되었다. Negative control인 AR1은 저온에서 유전자 발현이 25% 이상 감소하였고, positive control인 P9\_1,225bp는 1.5배 증가하였다. P9\_900bp와 P9\_600bp는 저온에서 발현이 증가하였으나, P9\_300bp는 발현에 변화가 없었다. 결과를 요약하면, 다양한 길이로 절단된 P9 프로모터 중에서 300bp만 남은 프로모터를 제외한 나머지 프로모터 (1,225bp, 900bp, 600bp) 는 저온 유도성이 있다. 이 결과를 통해서 1,225bp와 900bp 사이에

서 저온 유도성 전사조절인자로 예측되었던 LTRE 서열이 극지 규조류 유래의 P9 프로모터에서는 저온에서 유전자 발현을 증가시키는 것과 연관이 없다는 것을 보여준다. 또한, P9\_300bp의 형질전환체에서 저온에 의해 유전자 발현이 증가되지 않는 결과를 통해, 저온 유도성 전사조절인자가 300bp와 600bp 사이에 존재할 가능성이 있다. 극지 규조류 유래의 P9 프로모터에서 저온 유도성에 직접적으로 관여하는 전사조절인자를 찾기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

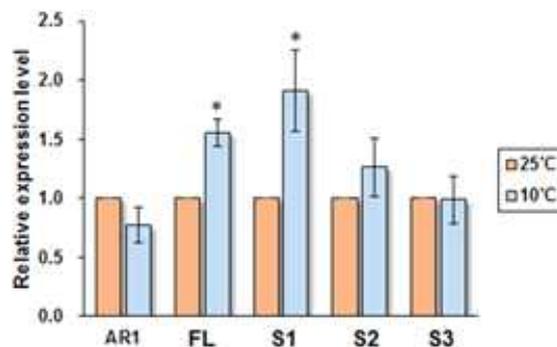


그림 14. 다양한 길이의 P9 프로모터의 저온 유도성 확인 (AR1: negative control, FL: 1,225bp, S1: 900bp, S2: 600bp, S3: 300bp)

## 극지연구소

### 5. P9 프로모터를 이용한 mVenus 형광 단백질 발현 시도

#### (1) P9\_1,225bp와 P6\_600bp을 이용한 mVenus 형광 단백질 발현 벡터 제작

본 연구팀의 사전 연구에서 확인한 결과, 클라미도모나스 레인하디티에서 외재 유전자 발현은 단백질의 종류에 따라서 발현 여부가 달랐다. 따라서 가우시아 루시퍼레이즈 외의 다른 지표 단백질의 발현을 통해서 본 연구과제에서 제작한 벡터의 이용 가능성을 파악할 필요가 있었다.

다양한 지표 단백질 중, 현미경을 통해 발현 여부를 직접 확인할 수 있는 형광 단백질을 선정하였다. 특히, 미세 녹조류가 가지고 있는 클로로필 색소의 파장과 거의 겹치지 않는 형광 단백질인 mVenus를 선정함으로써 엽록체의 자가 형광 (auto-fluorescence) 에 의한 간섭을 피하고자 하였다.

AR1+GLuc, P9\_1,225bp+GLuc, 그리고 P9\_600bp+GLuc을 각각 주형으로 하여, 가우시아 루시퍼레이즈의 유전자인 GLuc을 mVenus 형광 단백질인 mVenus로 대체해주었다 (그림 15A). 완성된 AR1+mVenus, P9\_1,225bp+mVenus, P9\_600bp+mVenus를 클라미도모나스 레인하디티에 형질전환 하

고, 콜로니 PCR을 통해 최종적으로 실험에 사용할 형질전환체를 각각 3개씩 확보하였다. 콜로니 PCR은 하이그로마이신 저항 유전자 부분만을 증폭하는 프라이머 세트와 (그림 15B), 프로모터와 mVenus 형광단백질 유전자를 함께 증폭하는 프라이머 세트 (그림 15C)를 사용하여 수행하였다. 최종적으로 유전자 발현 연구에 사용하기 위한 3개의 형질전환체만을 각각 선발하였다.

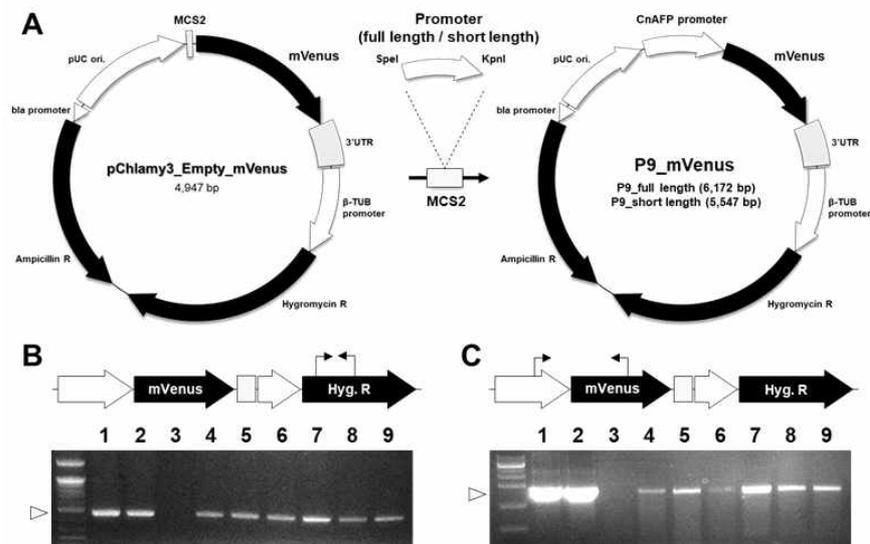


그림 15. mVenus 형광단백질 포함하는 P9 벡터 제작 및 형질전환체 제작 ((A) 벡터 모식도, (B, C) 형질전환체의 콜로니 PCR 결과)

## (2) 저온 처리 후, mVenus 형광 단백질의 유전자 발현 패턴 비교 연구

콜로니 PCR을 통해 확보된 형질전환체 각 3개에 대해서 저온 (10°C) 처리 후 2시간과 8시간째의 mVenus 형광 단백질 유전자의 발현 수준을 확인하였다. 레퍼런스 유전자로는 RACK1을 사용하였다. Negative control인 AR1은 발현이 감소하는 경향을 보였으며, P9\_1,225bp (full length)와 P9\_600bp (short length)의 경우에는 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 P9\_600bp에서는 10°C 저온 처리 시간이 경과할수록 발현이 크게 증가하였으며, 2.5배 이상의 발현 증가를 보여주었다. 이 결과는 가우시아 루시퍼레이즈에서 확인된 패턴과 동일하기 때문에 P9\_1,225bp와 P9\_600bp가 저온 유도성 프로모터로 이용 가능하다는 것을 확인시켜준다.

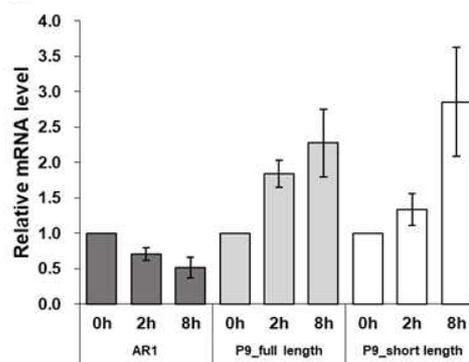


그림 16. 저온(10°C)에 의한 mVenus 형광단백질의 유전자 발현 패턴 확인

(3) 형광현미경을 통한 형질전환체의 mVenus 형광 단백질의 발현 확인

유전자 발현 수준에서는 P9\_1,225bp+mVenus와 P9\_600bp+mVenus의 형질전환체가 저온에 의해 유도되는 경향을 확인할 수 있었다. 이들 형질전환체가 실제로 mVenus 형광을 발현하는지 확인하기 위해서 형광현미경에 excitation filter로 495/35 (CWL/BW (nm))를 emission filter로 545/40 (CWL/BW (nm))를 사용하여 관찰하였다. 모든 시료는 상온 (25°C)에서 배양되고 있는 세포들을 사용하였다. Positive control로 사용된 AR1+mVenus의 형질전환체는 세포질 영역에서 뚜렷하게 mVenus 형광 단백질의 발현을 확인할 수 있었다. 한편, P9\_1,225bp+mVenus와 P9\_600bp+mVenus의 경우, AR1+mVenus보다 형광 단백질의 신호는 약했지만 AR1과 마찬가지로 세포질 영역에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 17).

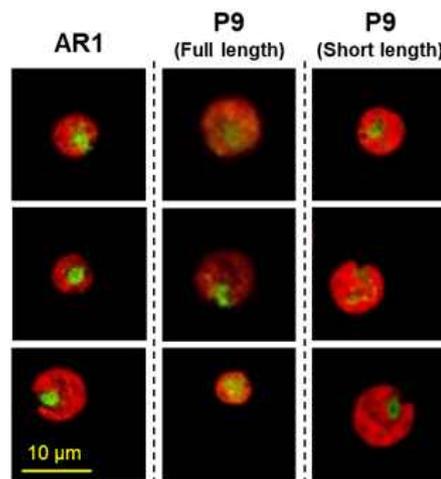


그림 17. 상온(25°C)에서 형질전환체의 형광현미경 이미지 (단일 세포)  
(AR1: positive control, P9(full length): 1,225bp, P9(short length): 600bp)

세 종류의 mVenus 형광 단백질 발현 벡터, AR1+mVenus, P9\_1,225bp+mVenus, P9\_600bp+mVenus, 모두 전체 세포군에서 mVenus 형광 단백질의 발현 빈도는 매우 낮았다 (그림 18). 이 결과는 아마도 형광 단백질의 크기가 크기 때문이거나 발현 수준의 차이 때문일 수 있다. mVenus 형광 단백질의 저온 유도성을 확인하기 위해서 저온 (10°C)에 처리하고 8시간, 12시간, 24시간을 관찰하였으나, 시간에 따라 발현이 증가하지도 발현하는 세포의 수가 증가하지도 않았다.

저온 처리 후의 세포를 보면, 움직임을 잃거나 터져있는 것 세포들이 많이 발견되었다. 본 연구팀의 사전 연구에 따르면, 클라미도모나스 레인하디티의 세포벽 존재 여부에 따라서 세포의 내구성이 매우 다른 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에 사용한 종은 세포벽이 결여되어 있기 때문에 아마도 이는 클라미도모나스 레인하디티가 급작스런 환경 변화로 인한 저온 스트레스로 세포 사멸이 유발되었을 수 있다. 따라서 향후 저온 유도성 프로모터의 적용 대상으로 세포벽이 있어서 저온에 의해 터지지 않는 미세조류를 선정해야 할 것이다.

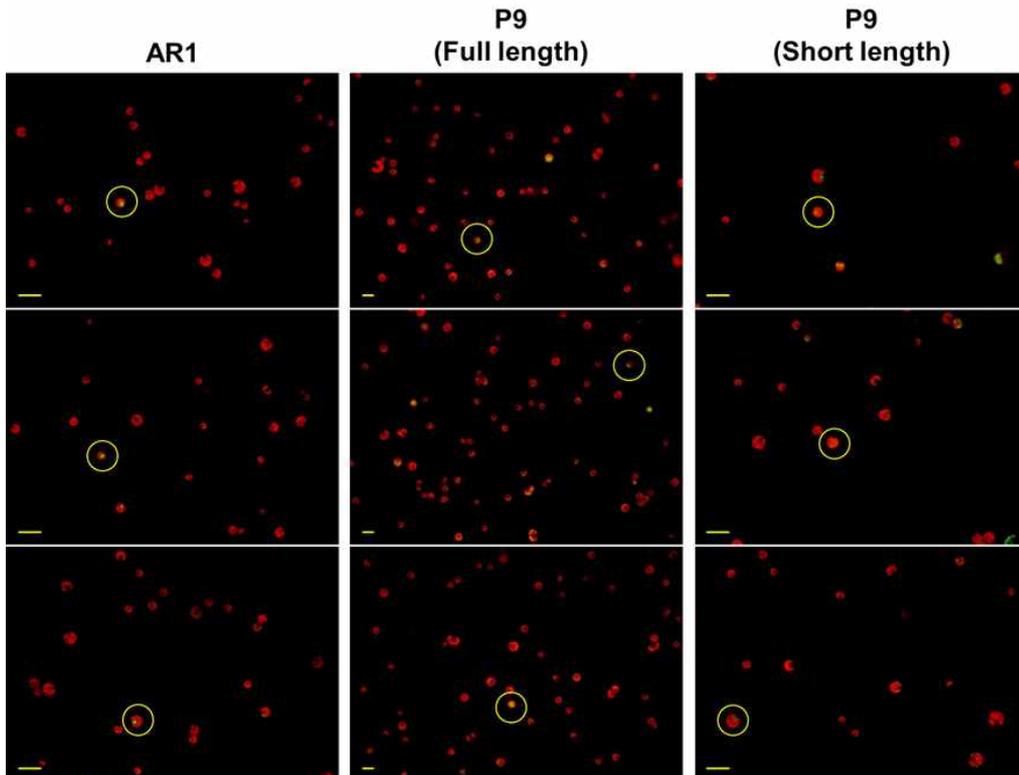


그림 18. 상온(25°C)에서 형질전환체의 형광현미경 이미지 (세포 군집) (AR1: positive control, P9(full length): 1,225bp, P9(short length): 600bp)

## 6. P9 프로모터를 이용한 CPS1 단백질 발현 시도

### (1) P9\_1,225bp를 이용한 CPS1 단백질 발현 벡터 제작

본 연구과제의 궁극적인 목표인 생리활성을 가지는 단백질의 생산을 시도하기 위해서 본 연구과제에서 개발한 P9\_1,225bp 프로모터를 이용하였다. 다양한 단백질 중에서 키토세로스 네오그라실의 결빙방지 단백질인 CPS1을 선별하였으며, 키토세로스 네오그라실의 genomic DNA로부터 CPS1 단백질의 open reading frame 서열을 얻고 P9\_1,225bp 프로모터 뒤에 접합하여 CPS1 단백질 발현 벡터를 완성하였다. 완성된 벡터를 전기 천공법을 이용해서 형질전환하고, 하이그로마이신 저항성을 가지는 콜로니들을 PCR을 통해서 최종 선별하였다 (#3, #5, #8, #9, #14, #15, #18) (그림 19).



그림 19. P9\_1,225bp+CPS1 벡터 형질전환체의 콜로니 PCR

### (2) P9\_1,225bp+CPS1 형질전환체의 저온 성장성 비교

CPS1 단백질은 결빙방지 단백질이므로 형질전환체들이 저온에 내성을 가질 것으로 예상하였고, 형질전환체 (#3, #5, #8, #9)와 야생형을 저온 (10°C)에 7일 이상 적응시킨 후에 성장을 비교하였다 (그림 20). 야생형과 비교할 때 형질전환체들의 성장이 월등하지 않았으며, 오히려 낮은 경향을 보였다. 이는 실험 조건으로 사용한 저온 (10°C)이 결빙방지 단백질을 꼭 필요로 하지 않는 조건이기 때문일 것으로 생각되었다. 아마도 결빙방지 단백질이 중요한 역할을 할 수 있는 영하 이하의 냉동 조건에서 비교한다면 유의미한 차이가 있을 것으로 가설을 수립하였고, 야생형과 형질전환체를 30분 급랭한 후의 생존률을 비교하였다. 하지만 성장 곡선의 결과와 마찬가지로 생존률에서 유의미한 차이는 확인되지 않았다 (데이터 표기 안함). 이 결과도 앞서 mVenus에서 언급한 이유와 비슷하게, 세포벽이 없는 클라미도모나스 레인하디티가 급랭 처리 시 급작스런 환경 변화로 인한 저온 스트레스로 사멸했을 것으로 해석할 수 있다.

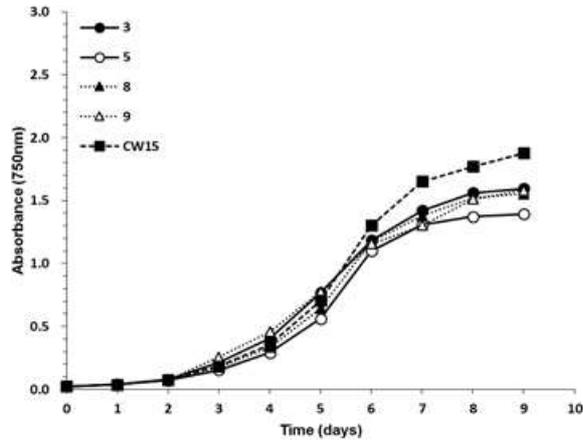


그림 20. P9\_1,225bp+CPS1 형질전환체의 저온에서의 성장 비교

(3) P9\_1,225bp+CPS1 형질전환체의 CPS1 단백질 발현 확인 실험

결빙방지 단백질은 얼음 결정이 얼면서 특정 형태를 갖도록 하는 것으로 알려져 있다. 순수한 물은 독특한 결정의 형태가 아닌 원형으로 얼게 되는데, 결빙방지 단백질이 포함되면 눈꽃 모양의 얼음 결정이 형성되게 된다. 따라서 CPS1 단백질의 발현을 간접적으로 확인하기 위해서 Nanolitre Osmometer에 연결된 현미경을 사용하여 형질전환체 추출물의 얼음 결정 형태를 관찰하였다 (그림 21).

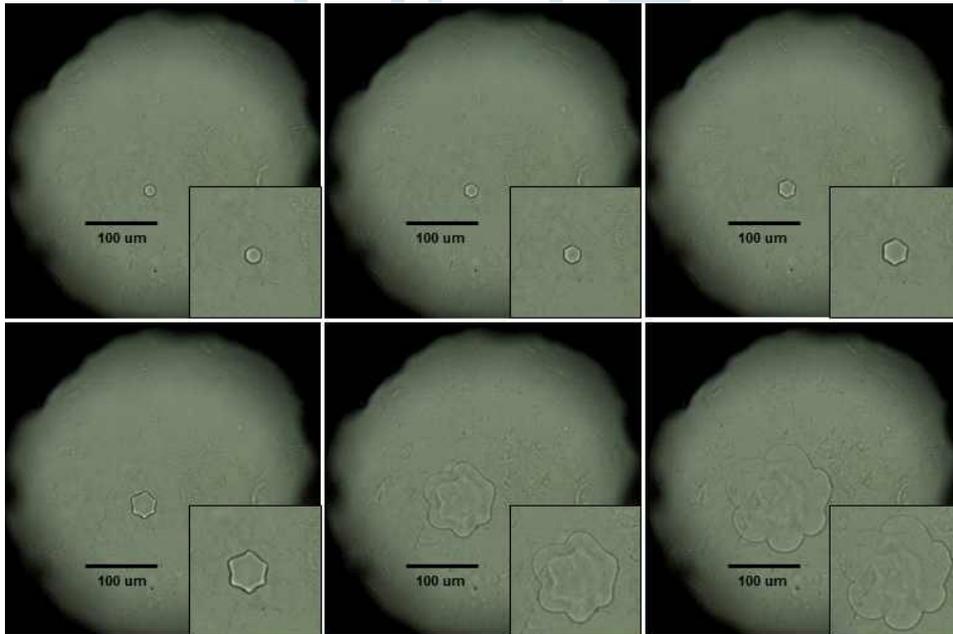


그림 21. P9\_1,225bp+CPS1 형질전환체 추출물의 얼음결정 형성 실험  
(왼쪽 위부터 시간의 흐름 순서대로 배치)

추출물의 얼음 결정 형태는 영하의 온도에서 원형이 아닌 육각 모양에서 천천히 꽃모양으로 커졌으며, 이는 활성이 매우 낮은 결빙방지 단백질의 얼음 결정 형태와 유사하였다. 아마도 CPS1 발현이 낮고, CPS1 단백질 합성 양이 매우 적기 때문에 이러한 결과를 얻었을 수 있다고 생각하여 면역 블롯 실험을 통해 단백질 발현을 검출하고자 하였다.

면역 블롯 실험은 #3, #14, #15, #18 형질전환체를 대상으로 진행하였고, positive control로 키토세로스 네오그라실의 추출물을 negative control로 야생형 클라미도모나스 레인하디티를 사용하였다. CPS1 단백질의 크기는 28 kDa으로, 면역 블롯 실험 결과에서 키토세로스 네오그라실의 total 추출물에서만 밴드가 확인되었다 (그림 22).

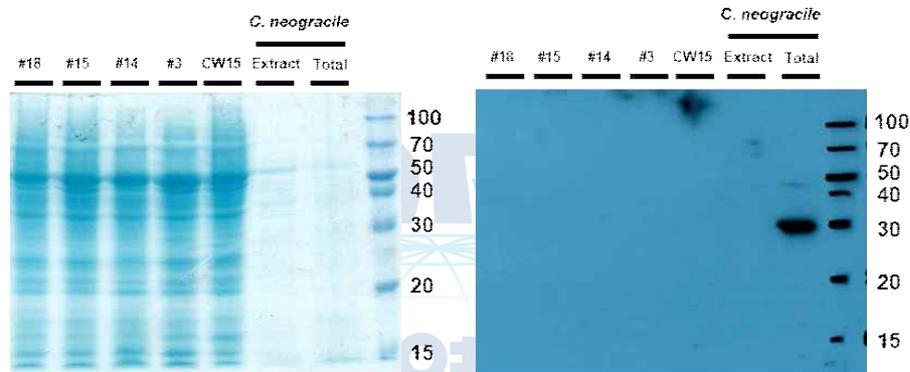


그림 22. P9\_1,225bp+CPS1 형질전환체의 면역 블롯 실험

## 7. 결론 및 고찰

결론적으로 극지 미세 규조류 유래의 P9 프로모터는 지표 단백질인 가우시아 루시페레이즈와 mVenus 형광 단백질의 활성 검증을 통해 미세 녹조류 모델인 클라미도모나스 레인하디티에서 작동하는 것을 확인하였다. 하지만 궁극적인 목표인 CPS1의 발현에는 실패하였다. 이 결과는 클라미도모나스 레인하디티에 코돈 최적화가 진행된 가우시아 루시페레이즈와 mVenus 형광 단백질과는 달리, CPS1 단백질의 코돈 사용법 (codon usage)이 호스트인 클라미도모나스 레인하디티와 달랐기 때문일 수 있다. 또한, 저온 유도성 확인을 위한 급작스런 저온 처리는 본 연구에서 주로 사용한 세포벽-결여 클라미도모나스 레인하디티에 세포 사멸을 유발하는 것으로 보였다. 따라서 향후 저온 유도성 벡터를 이용한 유용물질 생산을 위해서는 세포벽이 존재하는 클라미도모나스 레인하디티를 호스트로 이용할 필요가 있다.

## 2절. 극지 미세 녹조류 프로모터를 이용한 발현 벡터 개발

### 1. 극지 미세 녹조류 유래 저온 유도성 발현 벡터의 확보

#### (1) 극지 미세 녹조류 유래의 프로모터 후보군 선정

극지 미세 녹조류인 클라미도모나스 ArM29와 클로로모나스 KNF32의 RNA 시퀀싱을 통한 전사체 분석 결과에서 저온에서 발현이 높은 유전자 3종, 저온에서 발현이 증가하는 유전자 5종에 대한 서열 정보를 극지연구소로부터 제공 받았다 (그림 23). 총 8종의 유전자 후보군 중에서 기존에 이미 프로모터로 이용되어 신규성이 떨어지는 것들과, 실제 이용할 때 다른 변수가 생길 수 있는 것을 제외하여 최종적으로 2개의 유전자를 저온 프로모터로 사용하기로 결정하였다.

Transcripts and promoter sequences of highly expressed gene of ArM29 strain		
	Name	Contig number
P1	Long chain acyl-CoA synthase	Contig_12889
P2	Photosystem II protein D2 (psbD, Chloroplast)	Contig_598
P3	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit	Contig_8321
Low temperature induced gene sequences and their promoter sequences in KNF32 strain		
	Name	Contig number
P4	Chlorophyll a/b binding protein	Contig_9778
P5	Limiting CO <sub>2</sub> inducible protein	Contig_24443
P6	Carbonate dehydratase	Contig_17128
P7	Limiting CO <sub>2</sub> inducible protein	Contig_42495
P8	Early light-induced protein	Contig_2953

그림 23. 클라미도모나스 ArM29와 클로로모나스 KNF3의 유전자 중, 저온 발현 프로모터로 이용 가능한 후보군 선정

극지 미세 녹조류 유래의 저온 발현 벡터 제작을 위해 클라미도모나스 ArM29의 Long chain acyl-CoA synthase와 Ribulose-1,5 -bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit을 선정하였고, 표기의 수월성을 위해서 이들의 이름을 각각 P1, P3라고 명명하였다.

극지연구소에서 제공 받은 P1과 P3의 전사체 데이터를 분석한 결과, 저온에서 발현이 높은 것을 확인할 수 있었다 (그림 24). 하지만 저온에서 발현이 크게 증가하지는 않을 것으로 예상되었다.

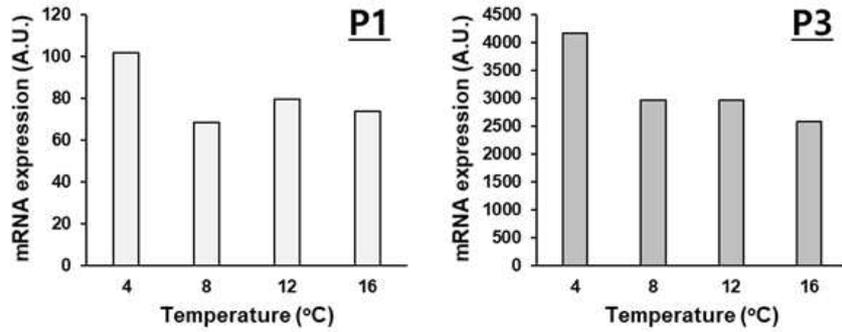


그림 24. P1, P3 프로모터의 온도에 따른 유전자 발현 수준 (RPKM 기준)

(2) 극지 미세 녹조류 유래 프로모터의 전사조절인자 예측

P1, P3 프로모터에 포함된 전사조절인자를 예측하기 위해 PLANTCARE 데이터베이스에서 분석을 실시하였다. 앞선 극지 미세 규조류 프로모터에서 확인한 것처럼 고등식물의 데이터베이스를 기본으로 예측하는 프로그램인 PLANTCARE는 100% 확률로 전사조절인자를 예측하지는 않는다. 하지만 해당 서열이 어디까지 프로모터로 작동할 수 있는지는 예측해 볼 수 있다.

P1은 460bp의 비교적 짧은 프로모터 서열임에도 불구하고 CAAT-box와 TATA-box같은 프로모터의 기본적인 전사조절인자를 가지고 있고, 온도 스트레스 반응 인자인 HSE와 광반응 인자인 Sp1을 포함하는 것으로 예측되었다 (그림 25).

>P1 (460bp)

```

GCGAGATAAGCAATCTGGTTCTAGCAATGTAATGTGGGTCTTGCTGTGGCTTGTGGGCAGGAACCTT
CAGGCCTTCTCTGTGTGCGTTAGTGAGCCATGGCCCTCTCAACCCGCACCTTCAGTGCCGCGTTCTCCT
CCGCATGTGCACCCAGCCTGCTTGCTTACGCTAGTCGCGTCCACCTGGATGGTGGCAGGCTCTGGGCTG
CCGGGGACAGCAGTTTGTTCCTGAGCGTGGGTCCCTGCATTGGCGTTGCCCTCCCCAGCCTGCAT
GGAGCCCTGCCTTTACTCCTCTAGACGCCCTCCTGGAGGCGGGCGCACCTTCAGAGCCTTCCACTCG
AATTCCGTTGCCAGCTCCACACCCCACTCAGTGA CTGGCTTTGCCGTAACGGTTGCGCGACCAGTC
CAAATCGATCATCTCAGATCGACCAACCCCGTGCCGACTGAATAACTGAG

```

- CAAT-box:** common cis-acting element in promoter and enhancer regions
- GC-motif:** enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
- HSE:** cis-acting element involved in heat stress responsiveness
- Sp1:** light responsive element
- TATA-box:** core promoter element around -30 of transcription start

그림 25. 클라미도모나스 ArM29의 P1 프로모터의 전사조절인자 예측 분석

다음으로, 1,199bp의 P3도 다른 프로모터와 마찬가지로 일반적인 프로모터 구성 요소인 CAAT-box, TATA-box를 포함하고 있으며, 온도 스트레스 반응 인자인 HSE, 광반응 인자인 Sp1, ACE, AE-box, I-box가 예측되었다. 특히 TATA-box로 예상되는 서열이 프로모터 서열 전반적으로 분포되어 있는 특징이 있었다 (그림 26). P1, P3 모두 저온에서 발현이 증가하는 유전자들의 프로모터이므로 저온에 의한 반응성을 예상해볼 수 있다. 하지만 앞선 P9의 경우에서도 LTRE로 예상된 전사조절인자가 저온 유도성에 크게 관여하지 않는 것처럼 보였기 때문에, 전사체의 결과가 클라미도모나스 레인하디티에서도 동일하게 적용되지 않을 수도 있다. 따라서 이를 확인하기 위해 in vivo에서 프로모터가 작동하는지 알아볼 필요가 있었다.

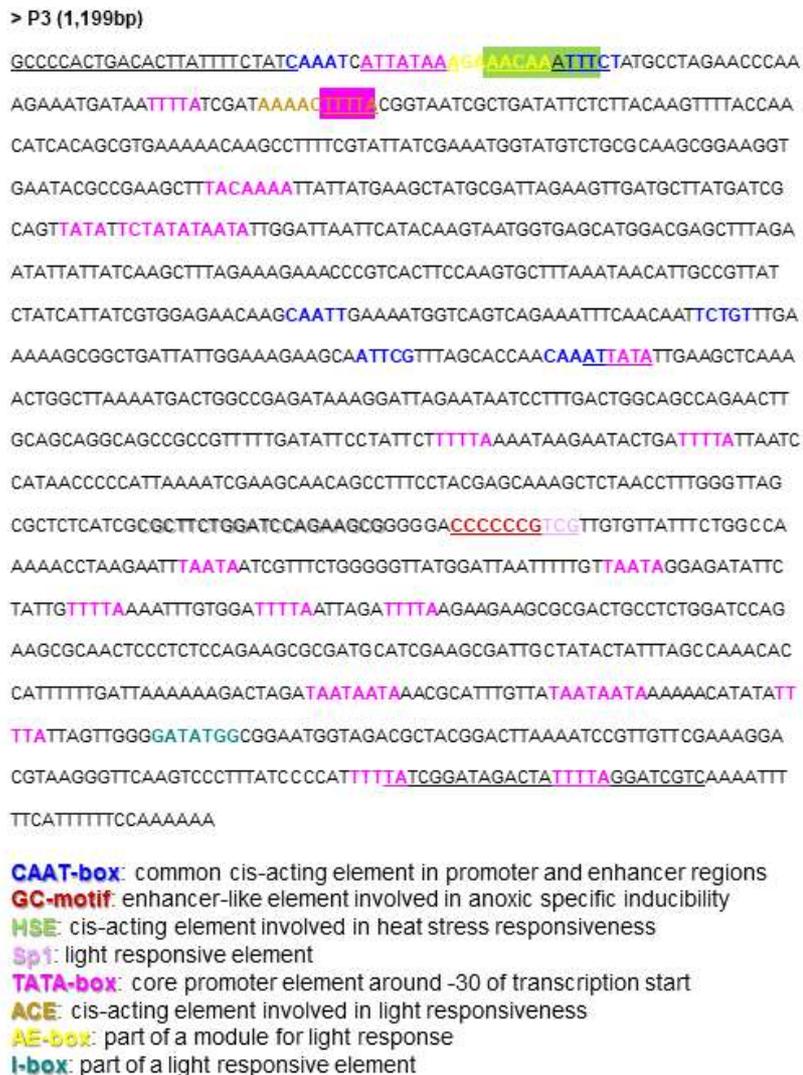


그림 26. 클라미도모나스 ArM29의 P3 프로모터의 전사조절인자 예측 분석

(3) Genomic DNA로부터 P1, P3 프로모터의 분리 획득

극지연구소로부터 클라미도모나스 ArM29와 클로로모나스 KNF32 종을 제공받아서 현미경으로 관찰한 결과, 담수 미세 녹조류인 클라미도모나스 레인하디티와의 형태적인 차이는 관찰되지 않았다. 50mL의 클라미도모나스 ArM29과 클로로모나스 KNF3의 배양액을 원심분리로 수확하여 genomic DNA를 추출하였다 (그림 27). 기존에 미세조류 genomic DNA 추출에 주로 사용되는 CTAB 방법으로 얻어진 DNA를 주형으로 하여 P1과 P3의 서열을 PCR로 증폭해서 얻어냈다.

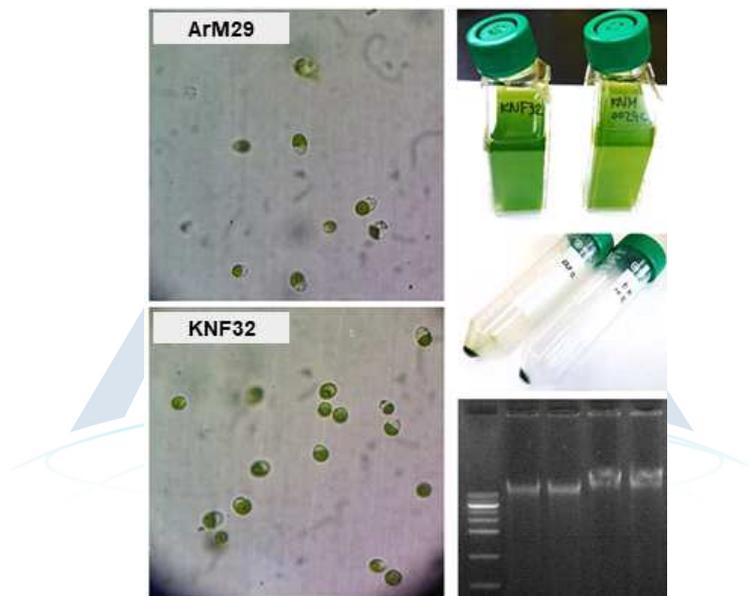


그림 27. 클라미도모나스 ArM29와 클로로모나스 KNF32, CTAB 방법으로 추출된 genomic DNA의 밴드

(4) P1, P3 프로모터를 이용한 가우시아 루시퍼레이즈 발현 벡터 제작

극지 미세 녹조류 유래의 P1, P3 프로모터의 in vivo 활성을 확인하기 위해서 지표 단백질인 가우시아 루시퍼레이즈를 접합한 발현 벡터를 제작하였다. 앞서 극지 미세 규조류 프로모터인 P9와 가우시아 루시퍼레이즈가 접합된 pChlamy3를 주형으로 하는 벡터 P9\_1,225bp+GLuc에서 P9 프로모터만 잘라내어 P1과 P3로 각각 교체해주었다. 완성된 벡터를 P1+GLuc, P3+GLuc으로 각각 명명하였다 (그림 28). 프로모터의 길이는 P1과 P3에서 각각 460bp, 1,199bp로 예상되었다.

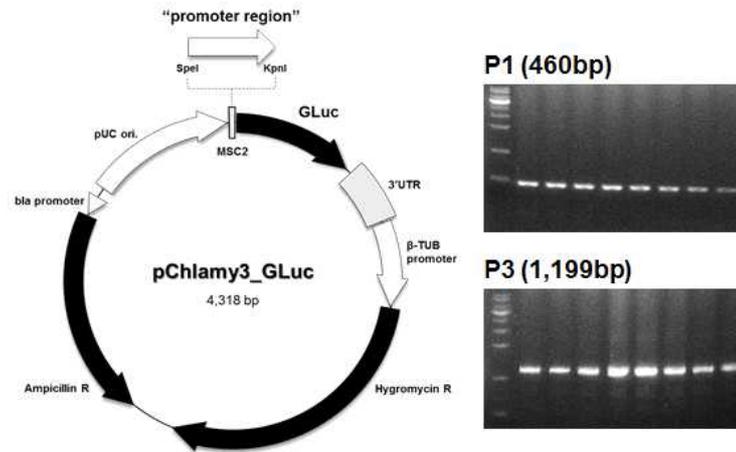


그림 28. P1, P3 프로모터의 모식도 및 클로닝 결과

## 2. 극지 미세 녹조류의 저온 유도성 프로모터의 특성 확인

### (1) P1, P3 벡터가 삽입된 형질전환체 제작

극지 미세 녹조류 유래의 저온 유도성 발현 벡터를 클라미도모나스 레인 하디티에 형질전환을 수행하였다. 마찬가지로 하이그로마이신 저항이 있는 형질전환체를 고체/액체 배지에서 선별하는 과정을 거쳤다. 액체 배지에서 자란 샘플을 대상으로 프로모터 부분과 가우시아 루시퍼레이즈 유전자 부분을 모두 포함하는 PCR 프라이머 (예상 PCR 밴드 크기: 968bp)를 이용해서 PCR 증폭을 통해 벡터가 삽입된 형질전환체를 10개 이상씩을 확인하였으나, 가우시아 루시퍼레이즈 활성화와 유전자 발현을 확인하기 위한 형질전환체는 최종적으로 3개씩만 선별하였다 (그림 29).

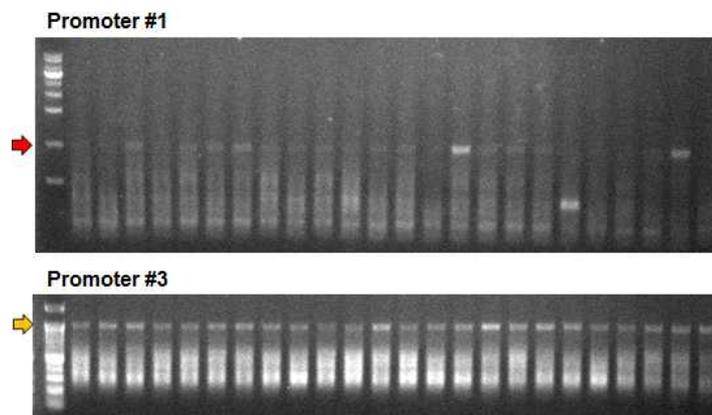


그림 29. P1, P3 프로모터가 삽입된 형질전환체 확보

(2) P1, P3 벡터가 삽입된 형질전환체 제작

도입된 P1, P3의 삽입이 확인된 형질전환체에 대해 가우시아 루시퍼레이즈의 활성을 측정하였다. 실험 방법은 위에 언급한 방법을 따라 수행하였다. 각 3개의 형질전환체는 모두 가우시아 루시퍼레이즈 활성이 있는 것을 확인하였으며, 활성의 측정값은 형질전환체마다 차이가 큰 것을 관찰할 수 있었다 (그림 30).

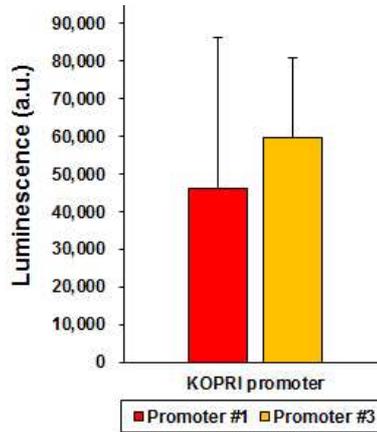


그림 30. P1, P3 프로모터 형질전환체의 가우시아 루시퍼레이즈 활성 결과

(3) 극지 미세 규조류 프로모터 P9와 P1, P3의 비교

극지 미세 녹조류 클라미도모나스 ArM29 유래의 프로모터 P1과 P3를 극지 미세 규조류 키토세로스 네오그라실의 프로모터 P9와 상대 비교를 수행하였다. 우선 상온과 저온에서 유전자 발현량의 절댓값을 비교하였다. 레퍼런스 유전자로는 RACK1을 사용하였다 (그림 31).

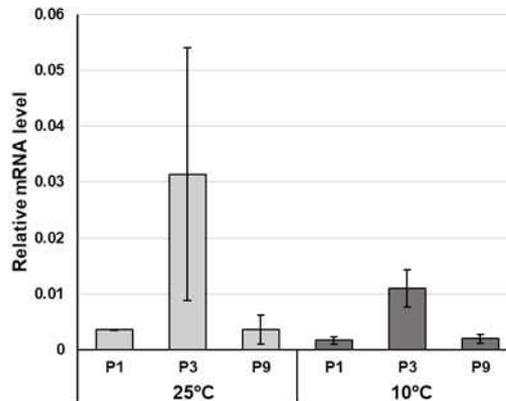


그림 31. P1, P3, P9 프로모터의 상온 및 저온에서 유전자 발현량의 절댓값 비교

전체적인 발현 수준을 보았을 때, P3가 상온과 저온에서 모두 발현량이 많은 것을 볼 수 있었다. 이는 P3가 단백질의 저온 발현에도 용이하게 쓰일 수 있는 가능성을 보여준다. 위의 결과에서는 발현량의 절대값만을 보여주고 있기 때문에, 추가로 저온 유도성 실험을 수행하였다. 앞선 실험들과 마찬가지로 상온에 배양 중인 형질전환체를 저온에 2시간 노출시킨 후 시료를 수확하였다. qRT-PCR 결과는 세 프로모터 모두 저온에 의해서 발현이 최대 2배까지 증가하는 것을 보여주었다 (그림 32).

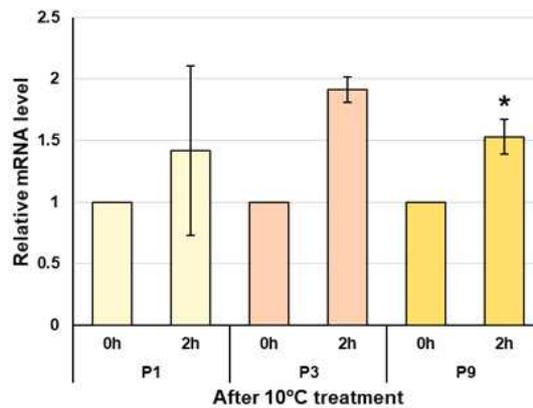


그림 32. P1, P3, P9 프로모터의 저온 유도성 비교

### 3. 결론 및 고찰

결론적으로 극지 미세 녹조류 유래의 P1, P3 프로모터는 지표 단백질인 가우시아 루시퍼레이즈의 활성 검증을 통해 미세 녹조류 모델인 클라미도모나스 레인하디티에서 작동하는 것을 확인하였다. 이는 본 연구팀이 앞서 수행하였던 극지 미세 규조류 유래의 P9 프로모터에서도 확인된 결과이다. P9에서도 지표 단백질의 발현까지는 확인할 수 있었으나 궁극적으로 발현하고자 하는 단백질은 실패하였는데, 이는 낮은 발현 수준 때문일 수 있다. 하지만 극지 미세 녹조류 프로모터인 P3의 경우에 P9보다도 발현의 절대 수준이 높으며 저온 유도성도 갖고 있는 것으로 볼 때, 향후 P3의 추가 연구를 통해 저온에서 높은 발현을 보이는 벡터의 개량을 달성할 수 있을 것이다.

## 제 4장. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1절. 연차별 연구개발목표 달성도

#### 1. 2017년 (1차년) 연구개발목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 미세 규조류 유래의 프로모터를 이용한 벡터 시스템 구축	1-1	프로모터가 삽입된 벡터제작 - 프로모터가 포함된 발현용 벡터 서열 및 플라스미드 1종 확보 (P9으로 명명)	- <b>100%</b> - 프로모터의 전사요소 분석결과 제시 - 벡터구조 제시
	1-2	제작된 벡터를 이용한 미세조류 형질전환 - 극지 미세 규조류 프로모터 P9와 지표 단백질인 가우시아 루시퍼레이즈 유전자를 포함하여 제작된 벡터를 모델 녹조류인 클라미도모나스 레인하디티에 형질전환 하여 변이주 18개 이상 확보	- <b>100%</b> - 분석결과 제시
2. 극지 미세 규조류 유래의 CPS1 재조합 단백질 확보	2-1	CPS1 재조합 단백질 제공 - 한의학 연구소에 단백질 3종 전달완료 - CPS1-1 : 9.354 mg/mL (총 1.5 mL) - CPS1-2 : 14.553 mg/mL (총 1 mL) - CPS1-3 : 5.101 mg/mL (총 2 mL)	- <b>100%</b> - 전달 완료

2. 2018년 (2차년) 연구개발목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 미세 규조류 및 미세 녹조류 유래의 프로모터를 사용한 벡터 시스템 구축	1-1	<p>극지 미세 규조류 프로모터의 생리적 특성 규명 연구</p> <p>- 다양한 크기로 자른 프로모터 서열의 저온에 의한 반응 확인</p>	<p>- <b>100%</b></p> <p>- 다양한 크기의 벡터 구조 및 서열</p> <p>- 각 서열에 따른 RNA 발현수준 상대비교</p>
	1-2	<p>극지 미세 녹조류 프로모터를 사용한 벡터 클로닝</p> <p>- 2종의 극지 미세 녹조류 유래 프로모터 서열에 대한 발현용 벡터 클로닝 완성</p>	<p>- <b>100%</b></p> <p>- 벡터 구조 및 서열</p>
	1-3	<p>극지 미세 녹조류 프로모터의 형질전환 후, 발현 연구</p> <p>- 극지 녹조류 유래 프로모터를 포함하는 벡터가 삽입된 형질전환체 각 3개 확보</p> <p>- 형질전환체의 가우시아 루시퍼레이즈 발현 수준을 루시퍼레이즈 활성 분석을 통해서 확인</p>	<p>- <b>100%</b></p> <p>- 형질전환체의 콜로니 이미지</p> <p>- 루시퍼레이즈 활성 분석 그래프</p>

3. 2019년 (3차년) 연구개발목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 미세 녹조류 프로모터의 생리적 특성 연구	1-1	극지연구소에서 받은 극지 미세 녹조류의 RNA seq. 데이터 분석 - RNA seq 데이터 분석하여, 저온 발현용 프로모터로 이용 가능한 타겟 (P1, P3) 및 실험 조건 선정	- 100% - RNA seq. 데이터 분석 후, 결과 도출
	1-2	극지 미세 녹조류 프로모터의 저온 유도성 확인 (25°C에서 10°C 처리) - P1 (Long-chain acylCoA synthetase (Contig_12889)와 P3 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (Contig_8321)의 저온 유도성 확인	- 100% - mRNA 발현 수준 비교 후, 결과 도출
2. 기 발굴한 3종의 프로모터 비교 연구	2-1	2종의 극지 미세 녹조류 프로모터 (P1, P3)와 1종의 극지 규조류의 프로모터 (P9)의 25°C와 10°C에서의 mRNA 발현 수준 비교 - P1, P3, P9 모두 저온 유도성 프로모터로 작동하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 저온 조건에서 녹조류 프로모터인 P3의 발현 수준이 가장 높은 것을 확인	- 100% - mRNA 발현 수준 비교 후, 결과 도출
3. 극지 미세 규조류 프로모터 연구 논문	3-1	기존의 Luciferase 외의 다른 reporter gene의 발현을 확인하기 위해 mVenus 도입한 형질전환체의 저온 유도 관련 특성 확인 - mVenus 유전자의 mRNA 발현과 단백질 발현 확인 완료	- 100% - mVenus 형질전환체 대상 mRNA 분석에서 성공적인 저온 유도성 확인 결과 및 단백질 발현 결과 도출
	3-2	논문 작성 및 투고 - Algal research에 투고 완료	- 50% - 현재 revision 중
4. 미세조류 시스템에서 CPS1 발현	4-1	P9 프로모터를 이용하는 CPS1 발현 벡터 제작 - 형질전환체는 얻었으나, CPS1 단백질을 발현하지는 않음. 단백질 발현이 확인되는 형질전환체 제작 시도 중	- 50% - 발현 벡터는 확보 하였으나, 형질전환체의 단백질 발현 확인 안 됨

## 2절. 연구개발결과의 대외 기여도

지금까지 미세조류에 적용 가능한 저온 유도성 프로모터의 개발은 수행된 적이 없었기 때문에, 본 연구개발결과물을 통해서 미세조류의 유전체 정보를 바탕으로 하는 새로운 프로모터와 발현 벡터의 개발이 이루어 질 토대를 마련했다고 생각한다. 또한, 본 연구개발결과 중, 저온 유도성 프로모터인 결빙 방지 프로모터를 이용한 P9 발현 벡터에 대한 결과물에 대해서 특허출원을 달성함으로써, 극지 생물 유전체를 지적재산 및 미래자원으로 이용할 수 있는 좋은 선례가 될 수 있을 것이다.



## 제 5장. 연구개발결과의 활용계획

미세조류는 박테리아 시스템과는 달리 진핵생물이기 때문에 좀 더 복잡한 구조의 단백질 접힘 (protein folding) 이 있는 단백질 산물을 얻을 수 있는 가능성이 있다. 하지만, 현재 사용되고 있는 광반응 유도성 및 고온 유도성 발현 프로모터는 단백질의 안정성 및 생산 수율에 영향을 미칠 수도 있다. 따라서 본 연구개발을 통해 확보한 저온 유도성 발현 프로모터는 미세조류를 사용한 유용단백질 생산에 직접적으로 이용될 가능성이 있다. 따라서 본 연구개발결과는 미세조류를 이용한 단백질 생산 연구에 초석이 될 수 있다.

본 연구개발결과를 활용하기 이전에, 본 연구개발 중에 도출된 문제 사항에 대해 추가 연구를 통한 개선이 필요하다. 첫 번째 문제 사항은 본 연구과제에서 저온 발현 벡터의 호스트로 사용되었던 세포벽이 결여된 클라미도모나스 레인하디티가 저온 스트레스에 의해 세포 사멸이 되는 경우인데, 이러한 문제를 보완하기 위해서는 세포벽 결여된 종이 아닌 세포벽이 온전한 종을 다시 선정하여 동일한 과정을 진행할 필요가 있다. 두 번째 문제 사항은 저온에서 전반적으로 낮아지는 물질대사 수준에 의한 낮은 유전자 발현이다. 이를 해결하기 위해서는 P3와 같은 저온에서도 발현 수준이 높은 프로모터를 이용하여 높은 유전자 발현 수준을 유지해줄 필요가 있다.

아직까지 미세조류에서는 저온 유도성 프로모터를 이용한 단백질 발현에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았기 때문에, 위에서 제시한 두 가지의 개선 사항 뿐 만 아니라 추가로 더 많은 개선 사항들이 발견될 수도 있다. 따라서 연구개발결과의 실제 산업에의 적용에는 좀 더 많은 연구 데이터가 필요 할 것으로 보인다.

## 제 6장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구개발의 목표달성을 위해, 이미 산업적으로 사용되고 있는 박테리아 시스템과의 비교를 많이 하게 되었다. 박테리아 시스템에서는 이미 다양한 프로모터를 이용한 발현 시스템이 개발되어 왔으며, 특히 저온에서 발현이 시작되는 Cold shock 프로모터와 같은 유용한 발현시스템이 많이 있다는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 미세조류에서는 저온에서 발현이 시작되는 프로모터는 아직 개발된 적이 없었다. 미세조류에서 이중 유전자를 발현시키기 위해 여러 유형의 프로모터가 개발되었는데, 특히 HSP70A와 RbcS2 프로모터를 연결해서 만든 키메라 프로모터인 AR1 프로모터는 높은 구성 유전자 발현으로 인해 널리 사용되어왔다는 것을 알게 되었다 (Schroda et al., *The plant journal* (2000)). 이처럼 서로 다른 종류의 프로모터의 일부분만을 연결해서 사용하거나, 특정 조건에서 발현량을 증가시키거나 반응성을 높이기 위해서 특정 전사 조절인자 서열을 반복하는 연구들은 많이 수행되고 있음을 알 수 있었다 (Baek et al., *Biotechnology journal* (2016)). 이러한 해외 연구진의 실험 결과들은 본 과제에서 개발한 프로모터의 향후 하게될 추가 연구 방향 설정에 도움이 될 것이다.

극지연구소

## 제 7장. 참고문헌

Park, S., Lee, Y., Lee, J. H., & Jin, E. (2013). Expression of the high light-inducible *Dunaliella* LIP promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 238(6), 1147-1156.

Seo, S., Jeon, H., Hwang, S., Jin, E., & Chang, K. S. (2015). Development of a new constitutive expression system for the transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Algal research*, 11, 50-54.

Baek, K., Lee, Y., Nam, O., Park, S., Sim, S. J., & Jin, E. (2016). Introducing *Dunaliella* LIP promoter containing light inducible motifs improves transgenic expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnology journal*, 11(3), 384-392.

Kim, J., Liu, L., Hu, Z., & Jin, E. (2018). Identification and Functional Analysis of the *psaD* Promoter of *Chlorella vulgaris* Using Heterologous Model Strains. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1969.

Gwak, I. G., sic Jung, W., Kim, H. J., Kang, S. H., & Jin, E. (2010). Antifreeze protein in Antarctic marine diatom, *Chaetoceros neogracile*. *Marine biotechnology*, 12(6), 630-639.

Gwak, Y., Jung, W., Lee, Y., Kim, J. S., Kim, C. G., Ju, J. H., ... & Jin, E. (2014). An intracellular antifreeze protein from an Antarctic microalga that responds to various environmental stresses. *The FASEB Journal*, 28(11), 4924-4935.

J.P. Davies, D.P. Weeks, A.R. Grossman, Expression of the arylsulfatase gene from the  $\beta$  2-tubulin promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Nucleic acids research*, 20 (1992) 2959-2965.

Lauersen, K. J., Vanderveer, T. L., Berger, H., Kaluza, I., Mussnug, J. H., Walker, V. K., & Kruse, O. (2013). Ice recrystallization inhibition mediated

by a nuclear-expressed and-secreted recombinant ice-binding protein in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(22), 9763-9772.



## 주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.