

# Yvrk 유전자를 발현하는 수산 분해 대장균 제작

## Development of Yvrk Gene-Recombinant *E. coli* Degrading Oxalate

Byong Chang Jeong, Yong Hyun Park<sup>1</sup>, Hyeon Hoe Kim<sup>1</sup>

From the Department of Urology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, <sup>1</sup>Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine and Clinical Research Institute, Seoul, Korea

**Purpose:** Recently, the whole DNA sequence of *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) was identified, revealing the existence of the YvrK gene encoding a 43 kD oxalate decarboxylase (OXDC), which degrades oxalate by a simple pathway. The objective of this study was to develop recombinant *Escherichia coli* (*E. coli*) expressing the Yvrk gene from *B. subtilis*.

**Materials and Methods:** After the extraction of total DNA from *B. subtilis*, the YvrK gene was cloned by polymerase chain reaction. The cloned DNA encoding OXDC was inserted into the pBAD/gIII-A vector, downstream of the L-arabinose promoter. The plasmid vector was transformed into TOP 10 *E. coli*, and the transformants were selected with ampicillin. The recombinant *E. coli*, named pBy, was then analyzed by DNA sequencing and Western blot. To evaluate the oxalate-degrading function of pBy, pBy was cultured in LB broth containing oxalate, and then the amount of oxalate in the medium was assessed. The oxalate-degrading activity of homogenates of pBy was evaluated.

**Results:** DNA sequencing showed the successful transformation of the YvrK gene into TOP 10 *E. coli*. Western blot analyses showed that pBy expressed OXDC. pBy removed oxalate during the overnight culture in oxalate-containing LB broth, and the homogenate of pBy degraded 90% of oxalate under acidic conditions.

**Conclusions:** A recombinant *E. coli* expressing the YvrK gene was successfully produced. The bacteria showed potent oxalate-degrading activity. The results of this study will provide a solution to the treatment of calcium oxalate stones and hyperoxaluria, for which there are few medical treatment modalities. (Korean J Urol 2009;50:1022-1026)

**Key Words:** Oxalates, Hyperoxaluria, *Bacillus subtilis*

Korean Journal of Urology  
Vol. 50 No. 10: 1022-1026, October 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.10.1022

성균관대학교 의과대학  
비뇨기과학교실, <sup>1</sup>서울대학교  
의과대학 비뇨기과학교실

정병창 · 박용현<sup>1</sup> · 김현호<sup>1</sup>

Received : July 14, 2009  
Accepted : August 21, 2009

Correspondence to: Hyeon Hoe Kim  
Department of Urology, Seoul  
National University Hospital, 28,  
Yeongseon-dong, Chongno-gu,  
Seoul 110-744, Korea  
TEL: 02-2072-2425  
FAX: 02-742-4665  
E-mail: hkim@snu.ac.kr

This work was supported by National  
Research Foundation of Korea Grant  
funded by the Korean Government (E  
00397).

© The Korean Urological Association, 2009

## 서론

요석은 비뇨기과 입원 환자의 약 1/4을 차지할 정도로 흔한데 국내의 경우 한국인 중 약 3.5%가 평생에 1회 이상 요석에 이환되는 것으로 밝혀졌다 [1]. 또한 요석은 그 재발이 흔하여 외국의 경우 약 50-70%에서 요석이 재발하고 국내의 경우 20%를 상회하는 것으로 알려져 있다 [2]. 요석은 체외충격파쇄석술이나 요관내시경을 이용한 치료법 등 다양한 치료법으로 치료가 가능하지만 현재까지 효과적인 내

과적 예방법이 개발되어 있지 않다.

한편 요 중 수산의 농도가 요 중 칼슘 농도보다 요석 생성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 알려진 후 요석의 병태생리 연구는 수산에 집중되었다. 수산은 인체에서 체내 대사 과정의 마지막 산물로서 더 이상 대사되지 않고 요로 배설된다. 따라서 식이를 통한 수산섭취가 증가된 경우나 체내 대사 과정의 이상으로 인해 수산 생산이 증가된 경우 고수산뇨증이 발생하는 데 현실적으로 고수산뇨증을 치료할 수 있는 방법은 없는 실정이다.

최근에 정상인의 장내세균으로서 수산을 분해하여 에너

지원으로 사용하는 그람 음성의 혐기성 세균인 *Oxalobacter formigenes* (*O. formigenes*)이 분리 동정되었는데 [3], 이 균주는 수산을 분해하여 장 내 수산 농도를 감소시킴으로써 수산의 흡수가 적게 되도록 하는데 도움을 주는 것으로 알려졌다. 상기 균주 및 수산분해효소에 대한 비약적인 연구가 이루어졌고 *O. formigenes*와 요석 간의 인과 관계가 밝혀졌다 [4-6]. 하지만 *O. formigenes*는 혐기성으로 그 배양과 동정이 매우 어려우며 비록 장 내 기생하는 정상 세균총이지만 인체에서 쉽게 정착하기가 어려워 이 균을 이용한 치료법의 개발이 현실화되지 않았다.

1997년 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)의 완벽한 게놈 분석이 끝난 후 이 균주의 유전자에 대한 다양한 연구가 이루어졌고 그 유전자 중 예전부터 혈 중 또는 요 중 수산을 측정하기 위해 사용되었던 수산 탈카르복실라아제 (oxalate decarboxylase, OXDC)를 부호화하는 유전자인 *Yvrk*가 상기 균주에 존재하는 것이 밝혀졌다 [7,8].

비록 *B. subtilis*는 수산을 에너지원으로 사용하지 않지만 이 유전자에 의해 발현하는 수산분해효소인 OXDC는 *O. formigenes*에서처럼 복잡한 과정을 거치지 않고 단지 하나의 경로를 통해 수산을 분해하는 것으로 밝혀졌다. 하지만 아직까지 요석과 관련된 연구로서 *B. subtilis*의 *Yvrk* 유전자에 대한 연구는 시행되지 않았다.

따라서 저자들은 *B. subtilis* 균주의 *Yvrk* 유전자를 발현하는 재조합 대장균을 제작하여 상기 유전자의 발현을 확인하고 이 대장균이 수산을 분해하는 능력을 갖고 있는가를 평가하고자 한다.

## 대상 및 방법

### 1. *B. subtilis* 균주 배양 및 동정

*B. subtilis* 128 균주 (한국유전자은행)를 사용하였다. 배양 배지로 LB broth (DIFCO, USA)를 사용하여 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 호기성 조건에서 배양하였다.

### 2. *Yvrk* 유전자 cloning

*B. subtilis*를 LB broth에서 24시간 배양한 후 4°C에서 5분간 5,000xg로 원심분리하여 상층액을 덜어냈다. 남아 있는 침사로부터 상용화된 QIAamp DNA mini kit (Quiagen, USA)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. *B. subtilis*에서 추출한 genomic DNA를 미리 제작된 primer를 사용하여 역전사중합효소연쇄반응법을 이용하여 *Yvrk* 유전자를 추출하였다. 반응 조건은 94°C에서 5분간 반응시킨 뒤 94°C 30초, 62°C 30초, 72°C 30초씩 30 주기로 반응시킨 후 72°C에서 5분간 고정된 뒤 4°C에서 반응을 정지시키고 전기영동을

통하여 확인하였다.

*Yvrk*-F: ATGAAAAAAC AAAATGACAT TCCG

*Yvrk*-R: TTTACTG CATTTCCTTT TCACTAC

### 3. *Yvrk* 유전자의 발현벡터 내 전이 및 대장균에 형질 전환

역전사중합효소연쇄반응법을 이용하여 얻어진 *Yvrk* DNA 절편을 histidine 꼬리표를 붙인 pBAD/gIII-A vector에 삽입하여 *Yvrk* 발현벡터를 제작하였다. Automated DNA sequence (ABI Prism<sup>®</sup>)를 이용해 삽입한 DNA fragment 염기서열을 확인하였다. 발현벡터를 배지가 포함된 비병원성의 TOP 10 *E. coli*에 넣어주고 90초간 42°C의 열충격 (heat shock)을 가하고 다시 10분간 4°C에서 방치시켜 형질전환하였다.

### 4. *Yvrk* gene recombinant *E. coli* (pBy)의 발현 확인

1) **Western blot:** 형질전환된 대장균 (pBy)을 37°C 배양 조건에서 L-arabinose가 포함된 LB broth에 4시간 배양한 후 단백질을 추출하여 10% SDS-PAGE gel로 전기영동시킨 후 Coomassie blue 염색법으로 확인하고 antihistidine antibody를 이용하여 Western blot을 시행하였다.

#### 2) *Yvrk* gene recombinant *E. coli*의 수산 분해능 확인

(1) **pBy의 수산 분해능 측정;** TOP 10 *E. coli*와 pBy를 L-arabinose 2%와 1 mM oxalate가 포함된 37°C LB broth 5 ml에서 다양한 pH (pH 3-7) 조건 하에 24시간 동안 배양하였다. 상기 균이 수산을 어느 정도 분해하는지 알기 위해 균을 넣지 않고 수산만 포함된 배지 (L-arabinose 2%와 1 mM oxalate가 포함된 LB broth)를 대조군으로 정하였다. 배양된 TOP 10 *E. coli* 및 pBy를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 배양된 균을 제거하고 수산이 포함된 배지인 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액의 수산 농도를 oxalate kit (Trinity Biotech, USA)로 측정하여 TOP 10 대장균과 pBy가 배지에 포함된 수산을 분해하는지 확인하였다.

(2) **pBy homogenate의 수산분해능 측정;** 배양된 TOP 10 *E. coli* 및 pBy를 수거하여 20 Hz 하에 20초간 세 번씩 음파처리 (sonication)한 후 수산 1 mM 농도의 PBS 용액에 37°C의 다양한 pH 조건 하에 shaking incubator에서 3시간 반응시킨 후 수산 농도의 변화를 oxalate kit (Trinity Biotech, USA)를 사용하여 측정하였다.

## 결 과

### 1. *B. subtilis*의 genomic DNA 추출 및 *Yvrk* 유전자 cloning

*B. subtilis*에서 추출한 genomic DNA로부터 primer를 사용

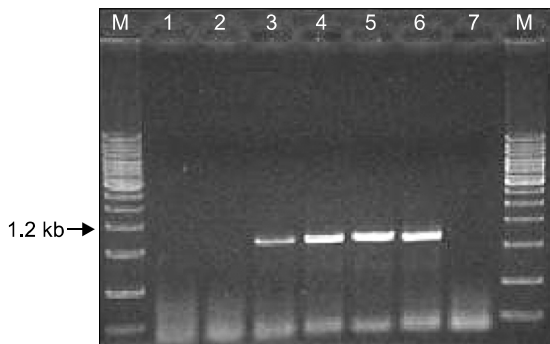
하여 역전사중합효소연쇄반응법을 이용하여 *Yvrk* 절편을 얻었다 (Fig. 1).

## 2. *Yvrk* gene-recombinant pBAD/gIII-A vector 제작

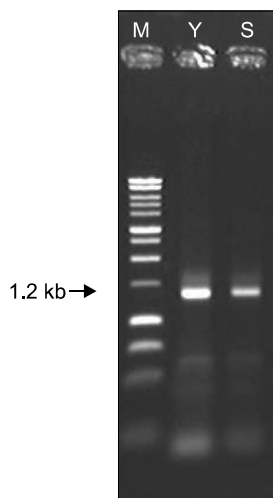
역전사중합효소연쇄반응법을 이용하여 획득한 *Yvrk*의 DNA fragment를 pBAD/gIII-A 벡터에 삽입한 후 자동염기서열분석기를 이용하여 염기서열을 분석한 결과, 유전자 은행에 있는 자료와 본 실험에서 얻어진 *Yvrk* 유전자의 염기서열은 동일하였다.

## 3. *Yvrk* 유전자 발현 재조합 대장균 제작

TOP 10 *E. coli*에 상기 발현벡터를 형질전환시켜 *Yvrk* 유전자 재조합 대장균을 제작하였고 이를 pBy라고 명명하였다. 이 대장균에서 역전사중합효소연쇄반응법을 이용하여



**Fig. 1.** *Yvrk* gene cloning by polymerase chain reaction (PCR). M: 1 kb plus DNA ladder, PCR using 1  $\mu$ l (1, 2), 3  $\mu$ l (3, 4), 6  $\mu$ l (5, 6), and 0  $\mu$ l (7) genomic DNA showing a 1.2 kb band.



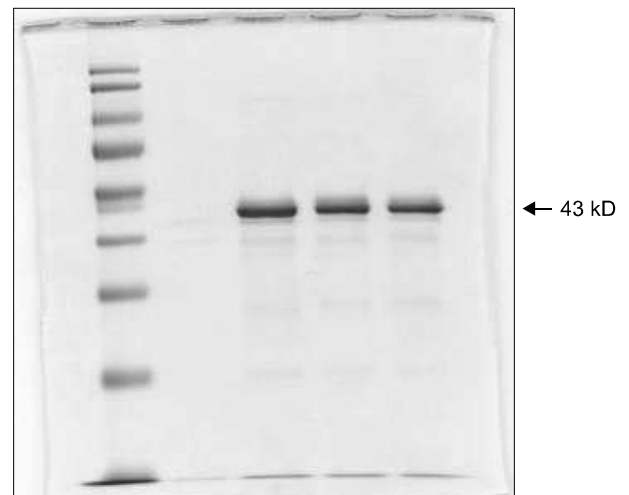
**Fig. 2.** Identification of *Yvrk* transformation by PCR. M: 1 kb plus DNA ladder, Y: *Bacillus subtilis*, S: pBy. 1.2 kb band of the *Yvrk* gene is seen in both *B. subtilis* and pBy.

*Yvrk* 유전자 cloning과 SDS-PAGE 분석을 시행하고 Coomassie Blue 염색 및 Western Blot 분석을 시행하였다. 그 결과 1,200 bp의 고초균에서 얻어진 *Yvrk* 유전자가 pBy에서도 관찰되었다 (Fig. 2).

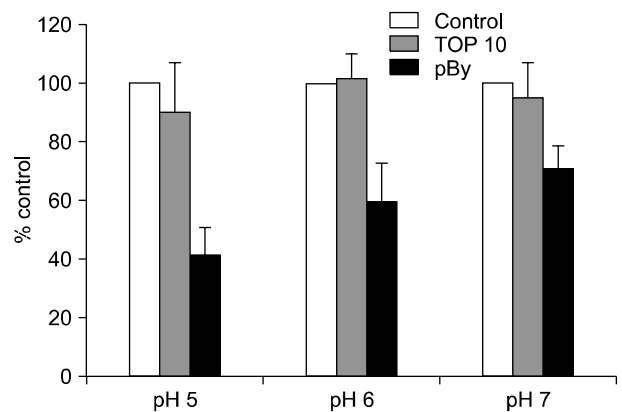
SDS-PAGE와 Western blot 분석에서 competent *E. coli*에 비해 각각 43 kD 크기의 band가 새로 관찰되었으며 이는 *Yvrk* 유전자가 발현하여 생산되는 수산탈카르복실라아제임을 알 수 있었다 (Fig. 3).

## 4. pBy의 수산 분해능 확인

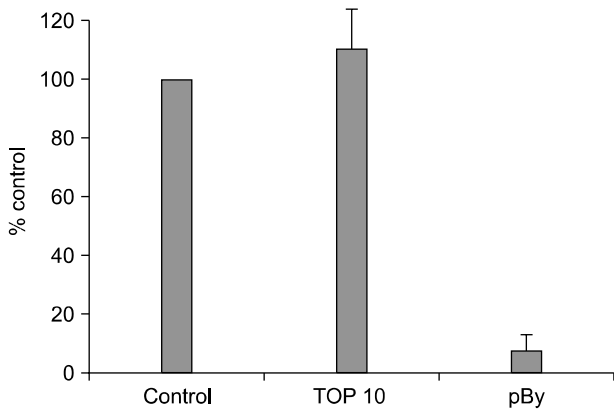
1) 수산이 포함된 배지 배양을 통한 수산 분해능 확인: pBy는 수산이 포함된 배지에 배양한 후 배지의 수산 농도를 조사하였을 때 TOP 10 *E. coli*의 경우 배양 전후의 수산



**Fig. 3.** Western blot for oxalate decarboxylase (OXDC). Using anti-histidine antibody, a 43 kD protein (oxalate decarboxylase) was observed.



**Fig. 4.** Functional assay of pBy. pBy showed oxalate-degrading activity during overnight culture in the LB broth containing oxalate. The activity was dependent on pH.



**Fig. 5.** Functional assay of pBy homogenate. Measurement of the oxalate concentration after mixing 1 mM oxalate and homogenate of pBy for 3 hours showed that most of the oxalate was degraded at pH 5.

농도의 변화는 관찰되지 않는 반면 pBy의 경우는 배양 후 배지의 수산 농도가 감소한 것이 관찰되었다. 이 pBy의 수산 분해능은 pH 의존적인 성향을 보여주어 pH 5에서 가장 높은 수산 분해능을 보여주었다 (Fig. 4).

**2) pBy homogenate의 수산 분해능 확인:** pBy를 음파처리한 후 수산 용액과 3시간 동안 반응시킨 결과 수산 농도는 90% 이상 분해되어 pBy의 강력한 수산 분해능을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

## 고 찰

현재까지 알려진 연구 결과에 의하면 결석의 생성은 요 중 결석의 성분이 되는 물질들과 결석을 억제하는 물질들의 농도에 따른 물리화학적 변화에 의해 이루어진다. 즉, 요 중 결석 성분들의 과포화 상태에서 결정화가 일어나고 이에 다양한 결정 억제제가 관여하리라는 것이다. 임상적으로 요로결석의 대부분을 차지하는 수산칼슘석의 경우도 고칼슘뇨증과 고수산뇨증의 경우에 요석 생성 발생률이 높다는 것이 밝혀졌다. 따라서 칼슘과 수산의 농도 조절이 가능하다면 수산칼슘석의 예방이 가능할 것이다. 이 중에서 특히 요 중 수산의 농도가 수산칼슘석의 결정화 과정에 칼슘 농도보다 훨씬 더 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 수산칼슘석의 형성을 막기 위해서는 먼저 요 중 수산의 배설을 줄여 고수산뇨증을 막는 것이 요석의 발생에 관한 위험을 줄이는데 가장 중요한 인자들 중의 하나가 될 것이다. 정상인에 있어서 수산은 하루에 약 15-40 mg이 요 중으로 배설되고 이 중 약 85%는 체내 대사과정의 부산물로 내인성으로 생산되며 10-15%만이 섭취하는 음식에 기인하는데 [9], 요 중 수산의 대부분을 차지하는 내인성 요인

에 의한 요 중 수산의 배설을 조절할 수 있는 방법은 현재로서는 알려진 바 없다.

한편 자연계에 널리 분포하는 비병원성 세균으로, 특히 공기·마른 풀·하수·토양 속에 존재하는 *B. subtilis*에 대한 완벽한 계통 분석이 1997년 끝난 후 이 균주의 유전자에 대한 다양한 연구가 이루어졌다. *B. subtilis*는 막대 모양의 간균으로 편모가 있어 활발히 운동하며, 균체의 중앙에 원형 또는 난원형의 아포 (芽胞)를 형성한다. 이 균의 특징은 아포를 갖고 있어 저항력이 강하며, 균체는 글리코겐을 함유하는 그람양성균인 점과 다수의 탄수화물을 분해하여 산을 생성한다. 또, 30-70°C에서 가장 잘 증식하며, 50-56°C의 고온에서도 잘 발육되는 것 등을 들 수 있다.

*B. subtilis*의 유전자 분석 결과 수산을 분해하는 수산탈카르복실라아제를 코딩하는 유전자인 *Yvrk*가 상기 균주에 존재하는 것이 밝혀졌다 [7,8]. 하지만 *B. subtilis*는 정상적인 상태에서 *Yvrk* 유전자가 발현되지 않고 대사 과정에서 *O. formigenes*처럼 수산을 분해하지 않는다. 단지 아포를 형성하는 산성의 환경에서 *Yvrk* 유전자가 발현하여 수산을 분해하는 기능을 갖는다. 따라서 저자들은 *Yvrk* 유전자를 대장균에 재조합하여 정상적인 환경에서도 수산을 분해시키는 유전자조합 대장균 (pBy)을 제작하였다.

pBy는 연구결과 매우 강력한 수산 분해능을 가지고 있음을 알 수 있다. pBy homogenate의 경우 3시간 이내에 거의 대부분의 수산을 분해시키며 그 수산 분해능은 pH 의존적으로 pH가 낮을수록 수산 분해능은 더 강력하였다. 이러한 결과는 pBy를 임상적으로 적용하는데 한계점을 가질 수 있다. 왜냐하면 수산의 흡수가 대개 pH가 중성인 상태의 회장 및 대장에서 흡수되는 것으로 알려져 있기 때문이다. 하지만 산성도가 매우 높은 위에서도 수산의 흡수가 되며 요 중 수산 농도에 수산의 위에서의 흡수가 매우 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 있다 [10]. 또한 요 pH 농도는 산성인 상태가 있기 때문에 pBy가 산성인 상태에서 수산 분해능이 충분히 역할을 할 수 있을 것이라고 생각한다.

저자들의 *Yvrk* 유전자 대장균 제작 기술은 여러 유전자 대사 공학에서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각한다. 즉, *Helicobacter pylori*균이 만성위염의 위험 인자임이 밝혀진 후 상기 균을 없애주는 기능성 식품이 개발된 것처럼 상기 연구 결과를 토대로 수산 분해능을 가지는 *Yvrk* 유전자 재조합 유산균을 제작할 수도 있을 것이며 이러한 유산균을 이용한 식품의 개발이 가능할 것이다. 또한 재조합 대장균이 생산하는 효소들의 활성도가 확인된다면 직접 상기 효소들을 이용한 요석의 예방 및 치료제 개발도 가능할 것으로 생각한다.

## 결론

*B. subtilis*로부터 *Yvrk* 유전자를 추출하여 발현벡터에 삽입한 후 비병원성의 TOP 10 *E. coli*에 상기 발현벡터를 형질 전환시켜 새로운 *Yvrk* 유전자 재조합 대장균인 pBy를 획득하는 데 성공하였다. pBy는 수산이 포함된 배지에서 pH의 존적으로 수산을 분해하는 능력을 보여주었으며 pBy homogenate는 강력한 수산 분해능이 있음을 알 수 있었다.

추후 추가적인 연구를 통하여 pBy로부터 수산디카르복실라아제를 대량으로 생산하여 고수산노증 및 요석 형성 동물모델에서 치료 효과를 확인할 수 있다면, 뚜렷한 내과적 치료 및 예방법이 없는 요석에서 새로운 치료법의 토대가 될 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang DH, Kim HH. Prevalence and epidemiological characteristics of urolithiasis for adults aged 40-79 in Seoul, Korea. Korean J Urol 2000; 41:367-74.
- Ahlstrand C, Tiselius HG. Recurrences during a 10-year follow-up after first renal stone episode. Urol Res 1990;18: 397-9.
- Allison MJ, Dawson KA, Mayberry WR, Foss JG. Oxalobacter formigenes gen. nov., sp. nov.: oxalate-degrading anaerobes that inhabit the gastrointestinal tract. Arch Microbiol 1985; 141:1-7.
- Kwak C, Jeong BC, Lee JH, Kim HK, Kim EC, Kim HH. Molecular identification of Oxalobacter formigenes with the polymerase chain reaction in fresh or frozen fecal samples. BJU Int 2001;88:627-32.
- Kwak C, Jeong BC, Kim HK, Kim EC, Cho MS, Kim HH. Molecular epidemiology of fecal Oxalobacter formigenes in healthy adults living in Seoul, Korea. J Endourol 2003;17: 239-43.
- Kwak C, Kim HK, Kim EC, Choi MS, Kim HH. Urinary oxalate levels and the enteric bacterium Oxalobacter formigenes in patients with calcium oxalate urolithiasis. Eur Urol 2003;44:475-81.
- Tanner A, Bornemann S. Bacillus subtilis Yvrk is an acid-induced oxalate decarboxylase. J Bacteriol 2000;182:5271-3.
- Tanner A, Bowater L, Fairhurst SA, Bornemann S. Oxalate decarboxylase requires manganese and dioxygen for activity. Overexpression and characterization of Bacillus subtilis Yvrk and YoaN. J Biol Chem 2001;276:43627-34.
- Menon M, Parulkar BG, Drach GW. Urinary lithiasis; etiology, diagnosis, and medical management. In: Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A, editors. Campbell's urology. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 1988;2661-734.
- Jaeger P, Robertson WG. Role of dietary intake and intestinal absorption of oxalate in calcium stone formation. Nephron Physiol 2004;98:p64-71.