

## 재조합 단백질 과발현을 위한 *Bacillus subtilis* 포자형성 변이주의 개발 및 특성 분석

오민규·\*박승환·김병기  
서울대학교 공업화학과, \*KIST 유전공학연구소

### Development and Characterization of Sporulation Mutants for Overexpression of Recombinant Protein of *Bacillus subtilis*

Min-Kyu Oh, \*Seung-Hwan Park and Byung-Gee Kim

Department of Chemical Technology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
\*Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejon 305-606, Korea

#### ABSTRACT

Sporulation mutants of *Bacillus subtilis* were developed for overproduction of heterologous proteins. The strains, spoOJ, spoIIG, and spoOJ spoIIG double mutant were constructed from two protease-deleted mutant(DB104). The vector containing aprE gene was integrated in the chromosome of each strain, then the morphology of each strain was observed by TEM(transmission electron microscopy). The morphology of spoOJ mutant and spoIIG mutant coincides with the description of the previous reports, respectively. The sporulating cells of spoOJ SpoIIG double mutation resemble spoIIG mutant more similarly, but with a little rougher cell wall membrane. The spoOJ mutation in *B. subtilis* gives negative effect on aprE activity with only a decreased sporulation frequency. On the contrary spoIIG mutation increases the aprE activity twice with an undetectable sporulation frequency. In the case of spoOJ and spoIIG, i. e. double mutation, the effect of spoOJ on aprE activity seems to be relieved and the double mutant shows more or less the same aprE activity compared to spoIIG mutant.

#### 서론

*Bacillus*는 현재까지 프로테아제 등 여러 효소의 높은 분비량으로 인해 공업적 효소의 생산균주로 많이 이용되어 왔다. 또한 최근에는 포자형성단계 등을 연구하기 위해 *B. subtilis*의 유전자에 대한 많은 연구가 이루어져, 박테리아 중 *E. coli* 다음으로 많은 유전자에 대한 이해가 이루어져 있다. 최근에는 이러한 장점들을 살려 *B. subtilis*를 재조합 이종 단백질 생산균주로 개발하려는 시도가 이루어지고 있다. 이는 *B. subtilis*의 높은 단백질 분비로 인한 회수단

계에서 많은 비용절감, inclusion body의 미생성으로 인한 수율 증가, 높은 수준의 발현 및 의약 및 식품공업에 사용시 안정성(GRAS) 때문인 것으로 알려져 있다.

하지만 *B. subtilis*를 재조합 단백질 생산균주로 이용하기 위해서는 과량으로 분비되는 프로테아제(1)의 문제, 강한 promoter의 개발, 생산시간의 극대화(2), 분비능의 향상, plasmid의 안정성 향상 등의 과제가 있다. 이중 프로테아제의 경우는 이미 6개의 프로테아제가 제거된 균주가 개발되어 프로테아제에 의한 영향을 거의 완전하게 제거할 수 있음이 보고

되었고(3), plasmid의 안정성은 integrational plasmid를 이용하여 해결하려는 시도와 *B. subtilis*에서 안정한 plasmid의 개발 등이 이루어지고 있다. 또한 강하고 유도가능한(inducible) promoter의 개발을 위한 levansucrase(4) 및 gluconate(5) 시스템의 이용과 아올러 amy, npr, apr 및 sacB 등의 pre-pro 배열을 이용한 분비능의 최적화 등이 보고된 바 있다.

본 연구에서는 이와 같은 연구들을 바탕으로 *Bacillus subtilis*의 aprE 즉, alkaline protease의 promoter를 이용하여 이종단백질을 생산함에 있어서 포자형성 돌연변이들을 유전자 조작법에 의해 만들어 생산시간 연장을 꾀하였다. 왜냐하면 aprE는 포자형성 초기단계에서 발현되어 2~3시간 정도 유지되며(6), 그 발현 정도가 특히 포자형성 초기단계의 유전자와 밀접하게 연관되어 있기 때문이다(7). 포자형성 0단계의 돌연변이들이 aprE의 생산에 미치는 영향에 대해서는 이미 보고된 바(2)가 있으며, 그 조절기작에 대해서도 이미 알려진 상태이다(8). 이에 의하면 spo0단계 유전자 중 spoOB, spoOE, spoOF, spoOK 등이 phospho relay 기작에 의해 spoOA를 phosphorylation시키고 이 spoOA-P가 포자형성에 관계하는 여러 유전자에 작용하여 포자형성이 진행되는 것으로 알려지고 있다. 이 spoOA-P는 aprE의 activator도 되기 때문에 이 조절기작에 관계하는 spo0 유전자변이주들은 모두 aprE의 발현정도를 감소시키는 역할을 하게 된다. 하지만 spoOJ는 이 기작과 무관하게 catabolic repressor 유전자의 repressor로 작용하기 때문에(9) aprE 발현에 무관한 것으로 알려져 있다.

포자형성 II단계에 있어서는 이에 관계하는 유전자들 중 일부의 역할에 대해서는 밝혀져 있으나 그들이 aprE의 발현에 미치는 영향에 대해서는 구체적으로 알려진 바가 없는 상태이다. 다만  $\sigma^H$ 를 coding 하고 있는 spoIIA 혹은 spoIIIE의 변이주들이 2XSG 배지에서 포자형성을 시작한 지 24시간이 지난 후에는 sporlet을 형성하는 반면(10),  $\sigma^H$ 를 coding하고 있는 spoIIG의 변이주는 포자형성과정 중 멈추게 되어 그 형태가 37시간 이상은 유지되는 것으로 알려져 있다(11). 그밖의 spoII 유전자에 대해서는 그 역할에 대한 명확한 이해가 되고 있지 않은 상태이다. 또한 aprE가 포자형성 0-III단계에서 발현이 거의 끝나기 때문에(6) 발현 시간의 연장을 꾀하려면 spo0, spoII 혹은 spoIII 유전자의 변이주가 그 연구대상이 된다.

본 논문에서는 우선, spoOJ, spoIIG의 변이주를 각각 혹은 이중변이주를 유전자 재조합을 이용해 만들고, 그 균주들의 포자형성단계상의 특징과 aprE의 생산 정도의 변화를 살펴 보았다.

## 재료 및 방법

### 배지

*B. subtilis*의 경우 액체 배지는 Schaeffer's 포자형성 배지(12)를 사용하였다. 고체 배지로는 Tryptose blood agar base(TBAB; Difco, U. S. A.)를 사용하였으며, 프로테아제의 정성분석을 위해서는 배지에는 Schaeffer's 포자형성 배지에 1.5%의 skim milk와 1.5%의 agar를 첨가한 고체 배지를 사용하였다. Integration된 phleomycin, kanamycin, erythromycin 저항성 유전자의 선별은 각각 1, 2, 3  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도를 사용하였으며, 플라스미드인 경우는 kanamycin 혹은 neomycin 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 썼다. Chloramphenicol은 integration을 선별하는 데는 5  $\mu\text{g/ml}$ , 증폭하는 데에는 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하였다. *B. subtilis*의 competent cell을 만드는 배지로는 Spizizen 배지(13)를 사용하였다. *E. coli*의 경우에는 LB나 LB고체 배지를 사용하였다. *E. coli*의 경우는 chloramphenicol은 15  $\mu\text{g/ml}$ , ampicilin 50  $\mu\text{g/ml}$ , kanamycin 10  $\mu\text{g/ml}$ 을 각각 사용하였다.

### 균주 및 플라스미드

*Bacillus subtilis*에서 두 개의 프로테아제가 제거된 DB104(14)를 이용하여 변이주를 만들었다. *B. subtilis*로부터 염색체를 얻는 방법은 다음과 같이 하였다. 균주를 LB 50ml에 키운 뒤 용균 배지(NaCl 5M, EDTA 0.5M, pH 6.9) 10ml에 분산시킨다. Lysozyme 5mg을 넣어 30분간 처리한 뒤, 10% SDS 1ml을 넣고 50°C에서 10분간 둔 뒤 5mg Pronase (Sigma, U. S. A.)를 넣고 같은 온도에서 50분간 방치한다. 5% NaCl 1.6ml을 넣고 에탄올을 20ml 넣은 뒤 유리막대로 chromosome을 걸어들린 뒤 그것을 2ml의 SSC(NaCl 0.15M, sodium citrate 0.015M) 용액에 녹인 다음 다시 한 번 NaCl과 에탄올을 넣고 위 과정을 되풀이한다. *B. subtilis*에 transformation시키는 방법은 이전에 보고된 바와 같이 하였다(15). *E. coli*는 JM109와 DH5 $\alpha$ 를 사용하였고 *B. subtilis*에 integration시키기 위한 플라스미드를 얻을 때는 RR1을 사용하였다. *E. coli*로부터 플라스미드를 추출하는 방법은 Sambrook 등(16)의 alkali

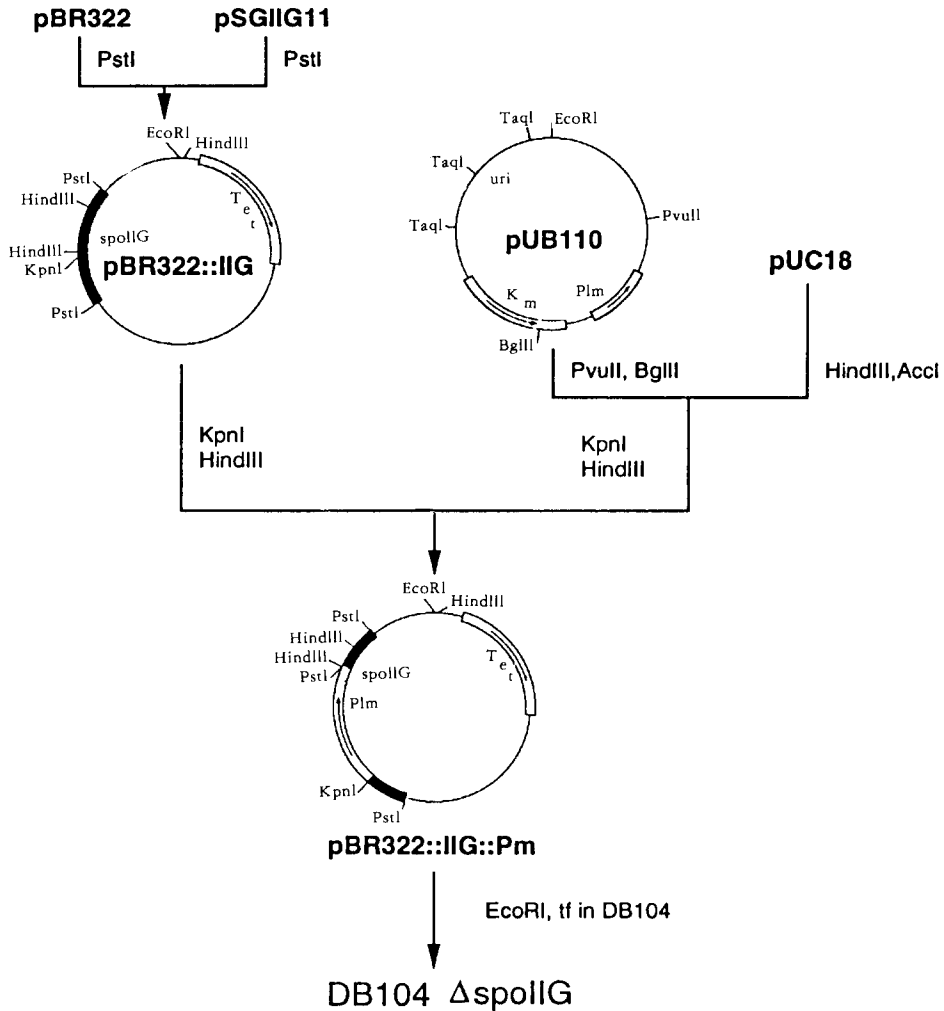


Fig 1. Construction of *spoIIIG* mutant from pSGIIG11. Km, Kanamycin resistant gene, Plm, Phleomycin resistant gene, Tet, tetracycline resistant gene. The size of *spoIIIG* gene and Phleomycin are 1.1kb and 1.8kb, respectively.

lysis방법을 사용하였으며 transformation시키는 방법도 Sambrook 등(16)의  $CaCl_2$  방법을 따랐다. 제한 효소는 Kosco enzyme이나 Boeringer Manheim의 것을 사용하였으며 반응은 역시 Sambrook 등(16)의 방법을 따랐다. 제한 효소로 자른 DNA는 TAE buffer에 0.8%의 agarose가 든 gel에서 확인하였다. Gel에서 DNA를 추출하는 방법은 Boeringer Manheim의 Gene clean kit II를 사용하였다.

Is75  $\Delta hpr$ -Ery으로부터 염색체를 추출하여 DB104로 transformation시킨 뒤 erythromycin으로 선별

하여 DB104  $\Delta hpr$ 을 구했다. *spoOJ* 변이주는 phage  $\phi 105$ 에 클로닝(9)된 것을 사용하여, 그것을 XhoI로 처리한 다음 DB104  $\Delta hpr$ 에 transformation시켜 chloramphenicol로 선별하여 DB104  $\Delta hpr \Delta spoOJ$ 를 구하였다. 그런 다음 pSI57 (chloramphenicol 저항성 유전자 중간에 kanamycin 저항성 유전자가 삽입되어 있는 플라스미드)을 *HindIII*로 처리하여 transformation시켜 chloramphenicol 저항성을 kanamycin 저항성으로 바꾸었다. *spoIIIG* 변이주를 위해서는 *spoIIIGB*가 플라스미

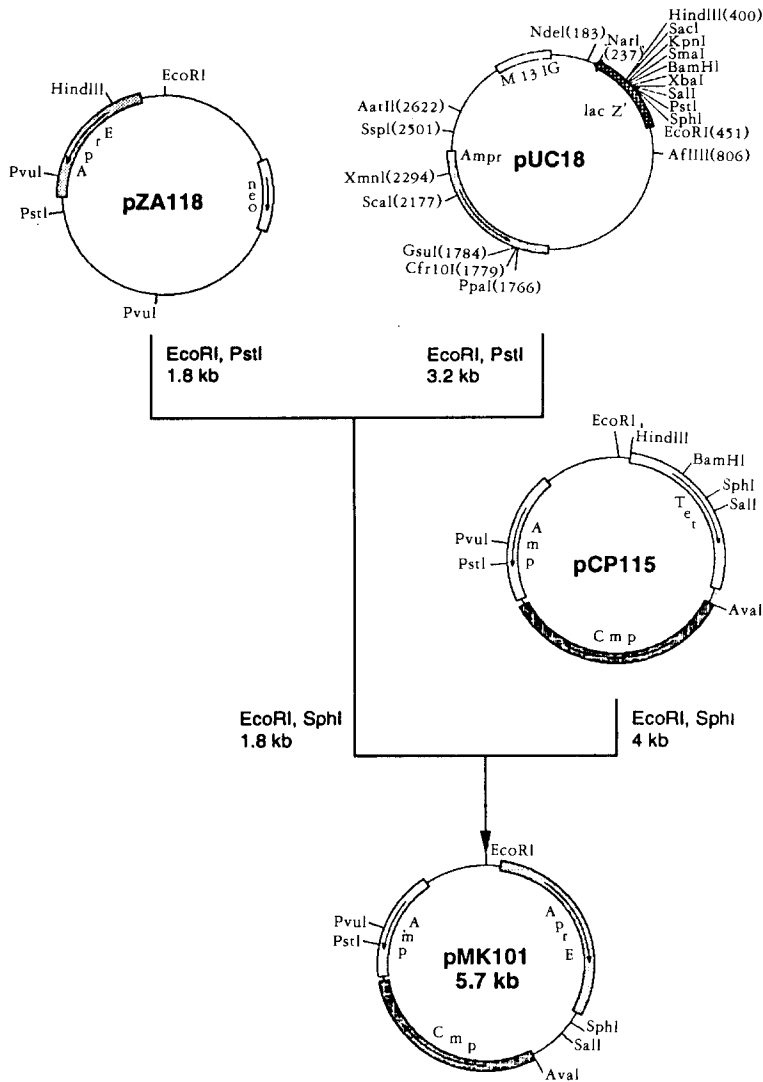


Fig 2. Construction of integrational plasmid containing aprE gene. Neo. amp. and cmp. represents neomycin resistant gene, ampicillin resistant gene and chloramphenicol resistant gene, respectively.

드에 클로닝되어 있는 pSGIIG11을 사용하였다 (17). pSGIIG11로부터 spoIIGB 유전자 부분을 PstI으로 잘라내어 pBR322의 PstI 위치에 옮겼다. spoIIGB의 중간부분을 KpnI과 HindIII로 partial digestion시켜 그곳에 pUB110에 있는 Phleomycin 저항성이 있는 유전자를 삽입하였다(Fig. 1). 이를 EcoRI으로 처리하여 DB104  $\Delta$ hpr와 DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoOJ에 각각 transformation 한 다음 phleomycin으로 선택하여 DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoIIG

와 DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoOJ  $\Delta$ spoIIG를 구하였다. Integrational vector는 pCP115(18)를 Bacillus Genetic Stock Center(Ohio, U. S. A.)로부터 제공 받고 aprE가 클로닝되어 있는 pZA118를 사용하였으며(Fig. 2), 재조합된 플라스미드를 pMK101이라고 명명하였다.

전자현미경 및 포자형성 빈도수 측정  
균주를 chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml의 Schaeffer's

배지에서 충분히 키운 다음 chloramphenicol이 없는 Schaeffer's 배지 10ml이 든 플라스크에 1%(v/v) 접종하였다. 세포가 휴지기로 접어든 지 5시간 및 13시간 후 각각을 원심분리시켜 전자현미경 사진을 위한 처리과정에 들어갔다. 포자형성 빈도수 측정은 균주를 Schaeffer's 배지에서 키운 다음 휴지기가 시작된 지 7시간 후, 80°C에서 15분간 열처리 한 세포와 열처리하지 않은 세포를 각각 agar plate에 깔아 콜로니 수를 비교하였다.

#### 세포 배양 및 Protease 활성 측정

각각의 균주에 pMK101을 integration시킨 다음 chloramphenicol 5 µg/ml의 agar plate에서 선별한 다음 chloramphenicol 30 µg/ml의 agar plate에 옮겼다. 액체배양은 agar plate로부터 콜로니를 취하여 chloramphenicol 30 µg/ml의 Schaeffer's 배지를 넣은 시험관에서 하룻밤 키운 뒤 chloramphenicol이 없는 Schaeffer's 배지 30ml이 든 플라스크에 10%(v/v)로 접종하였다. pZA118을 지닌 균주에 대해서는 위와 같은 방법으로 하되 neomycin 10 µg/ml의 배지에서 neomycin이 없는 배지로 옮겨 주었다. Protease activity를 측정하는 방법은 succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (Sigma, U. S. A.) 0.1mg을 0.1M Tris-buffer 0.9ml에 넣고 배지 0.1ml을 함께 넣은 뒤, 25°C, 420nm에서 1분간의 흡광도 변화를 보았다(19).

## 결 과

#### 포자형성 빈도

제작한 균주의 포자형성 빈도는 Table 1과 같다.

Table 1. Sporulation frequency of the spore mutants at T<sub>7</sub>.

Strains	Sporulation frequency(%)
DB104	2.3
DB104 Δhpr	3.6
DB104 Δhpr::pMK101	7.6
DB104 ΔspoOJ	2.4E-4
DB104 Δhpr ΔspoOJ	1.7E-5
DB104 Δhpr ΔspoIIg	>1.0E-6
DB104 Δhpr ΔspoIIg::pMK101	>1.0E-6
DB104 Δhpr ΔspoOJ ΔspoIIg	>1.0E-6
DB104 Δhpr ΔspoOJ ΔspoIIg::pMK101	>1.0E-6

그 빈도수는 이전에 보고된 바와는 약간 차이가 있으나(9, 11), 이는 측정 방법상의 차이에 기인한 것으로 생각된다. hpr변이주인 경우 포자형성을 약간 촉진하는 현상을 보였으며, spoOJ는 약 10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup> 빈도의 포자형성 감소, spoIIg 및 이중포자변이주는 거의 측정할 수 없는 정도의 포자형성 빈도를 나타내었다. 항생제에 대한 저항성과 포자형성 빈도수를 바탕으로 만든 균주가 계획한대로 만들어졌음을 확인할 수 있었다.

#### 전자현미경 사진에 의한 포자형성의 변화 확인

Fig. 3~Fig. 6에 나타난 그림은 DB104 Δhpr, DB104 Δhpr ΔspoOJ, DB104 Δhpr ΔspoIIg, DB104 Δhpr ΔspoOJ ΔspoIIg 각각에 pMK101을 integration시킨 균주를 Schaeffer's 배지에서 포자형성이 시작(T<sub>0</sub>)된 지 T<sub>5</sub>와 T<sub>13</sub>에서의 포자형태를 전자현미경으로 찍은 것이다. 보통 T<sub>7</sub> 정도에서는 완전한 포자가 형성됨이 알려져 있으므로, T<sub>5</sub>에서 DB104 Δhpr::pMK101의 경우는 많은 세포들이 포자에 cortex층이 형성되고 있음을 관찰할 수 있고, T<sub>13</sub>에서는 완전한 포자의 모습을 하고 있음을 볼 수 있다(Fig. 3). SpoOJ유전자의 역할은 catabolite repressor gene의 repressor라고 알려져 있으며(9) 따라서 이 유전자의 돌연변이는 탄소원이 고갈된 상황에서도 쉽게 포자형성을 하지 않으리라고 예상된다. Fig 4에서 보는 사진은 포자형성을 잘하고 있는 세포의 사진이다. 하지만 Fig. 4와 같은 형태의 세포는 수가 그리 많지 않았으며 T<sub>5</sub>, T<sub>13</sub>에서 모두 vegetative cell과 같은 형태의 세포가 다량 발견되었다. Fig. 5의 사진은 spoIIg 변이주의 포자형태를 보여주고 있다. 여기서 보는 세포의 모습은 이전에 보고된 것과 매우 흡사하며(11, 20) 세포의 양 선단에 두 개 혹은 그 이상의 수로 분열된 세포를 T<sub>5</sub>, T<sub>13</sub>에서 모두 발견할 수 있었다. T<sub>13</sub>의 사진에서도 포자를 완전히 형성한 세포를 찾아볼 수 없는 것으로 보아 더 이상은 포자를 형성하지 못함을 알 수 있다. DB104 Δhpr ΔspoOJ ΔspoIIg::pMK101의 사진(Fig. 6)의 경우는 DB104 Δhpr ΔspoIIg::pMK101과 유사한 형태의 세포들을 볼 수 있지만 사진에 나타나지 않은 많은 세포들이 형태에 있어서 더욱 다양하고 많이 일그러진 모습이었으며, 역시 포자를 형성한 것은 없었다.

#### 변이주들의 Protease 활성 변화

염색체에 integration된 플라스미드는 selection



(a)



(b)

Fig 3. Transmission electron microscope pictures of DB104  $\Delta$ hpr::pMK101 at (a) T<sub>5</sub> and T<sub>13</sub> of flask culture in Schaeffer's media.



(a)



(b)

Fig 4. Transmission electron microscope pictures of DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoOJ::pMK101 at (a) T<sub>5</sub> and T<sub>13</sub> of flask culture in Schaeffer's media.



(a)



(b)

Fig 5. Transmission electron microscope pictures of DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoIIG::pMK101 at (a) T<sub>5</sub> and T<sub>13</sub> of flask culture in Schaeffer's media.

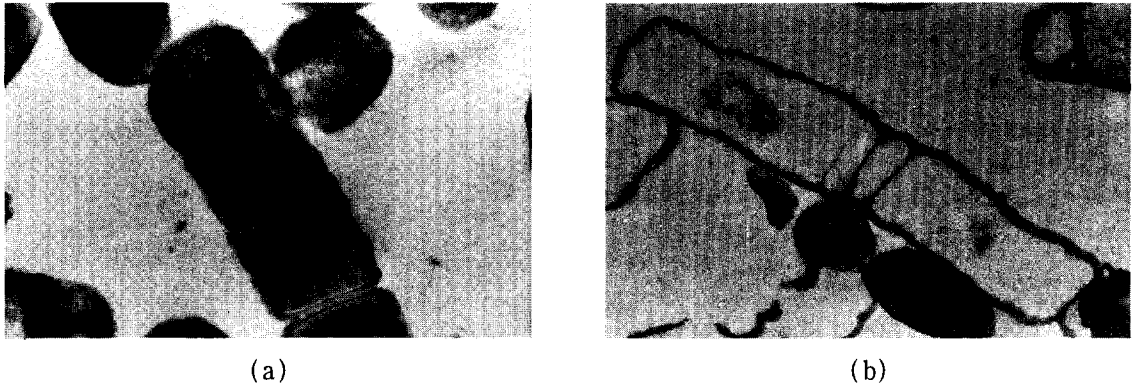


Fig 6. Transmission electron microscope pictures of DB104  $\Delta hpr \Delta spoOJ \Delta spoIIg:pMK101$  at (a)  $T_5$  and  $T_{13}$  of flask culture in Schaeffer's media.

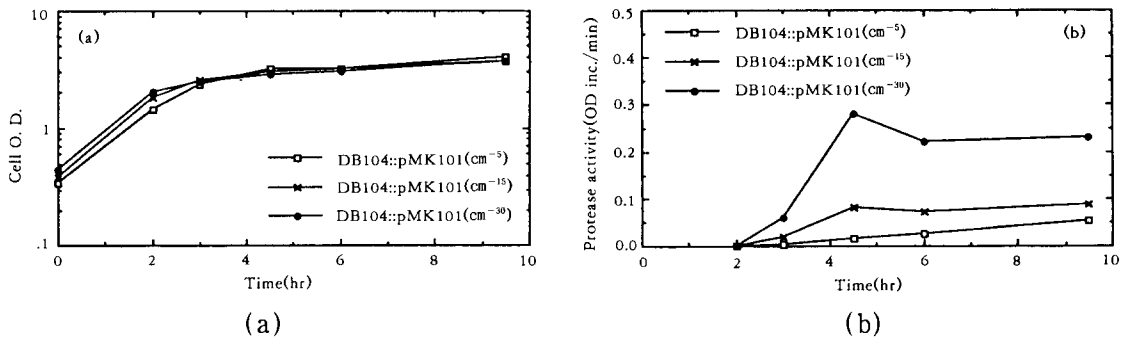


Fig 7. Effect of the concentration of chloramphenicol on protease activity in DB104:pMK101 of flask culture in Schaeffer's media. (a) Cell O. D. at 600nm (b) protease activity assay at O. D.<sub>600</sub>.

marker의 농도에 따라 복제수가 달라진다고 알려져 있다(21). 따라서 chloramphenicol의 농도를 변화시켜주며 integration된 유전자의 발현 정도를 살펴 보았다. aprE가 chloramphenicol농도가 증가함에 따라 발현되는 양도 늘어남을 볼 수 있었다(Fig. 7). 또한 chloramphenicol 농도가 25  $\mu\text{g/ml}$  이상이 되었을 때는 더 이상 복제수의 증가 효과가 없다고 보고된 바 있어(22) 다음 실험에는 계속 chloramphenicol농도를 30  $\mu\text{g/ml}$ 을 사용하였다. 플라스미드 상태와 염색체에 integration된 플라스미드 상태의 aprE 유전자 발현 정도를 비교하기 위해 DB104::pMK101와 DB104(pZA118)의 protease 활성을 비교하였다(Fig. 8). 그림에서와 같이 플라스미드상태일 때 가장 활성이 높으며 그 다음이 integration상태일 때이다. 이는 플라스미드의 복제

수에 의한 영향 때문으로 생각된다. pZA118은 pUB110의 origin을 가지며, 따라서 50개 정도의 aprE 유전자가 존재한다(15)고 추측되는 반면 integrational vector의 경우는 최대 복제수가 24 정도로 알려지고 있다(22). 플라스미드 형태로 존재하는 aprE가 약 2배 정도의 높은 발현수준을 보였으나 Bacillus에서는 플라스미드의 안정성이 매우 불안정함이 보고된 바 있어 앞으로의 실험을 위해 integration vector 형태에서 포자 변이주의 영향을 조사하였다. 이후 단일포자변이주인 spoOJ 변이주, spoIIg 변이주와 이중포자변이주인 spoOJ spoIIg 변이주에 pMK101을 integration한 변이주의 protease 활성변화를 살펴 보았다(Fig. 9). Fig. 9에 의하면 DB104  $\Delta hpr \Delta spoOJ::pMK101$ 의 활성이 가장 낮고, DB104  $\Delta hpr::pMK101$ 가 그 다음이었

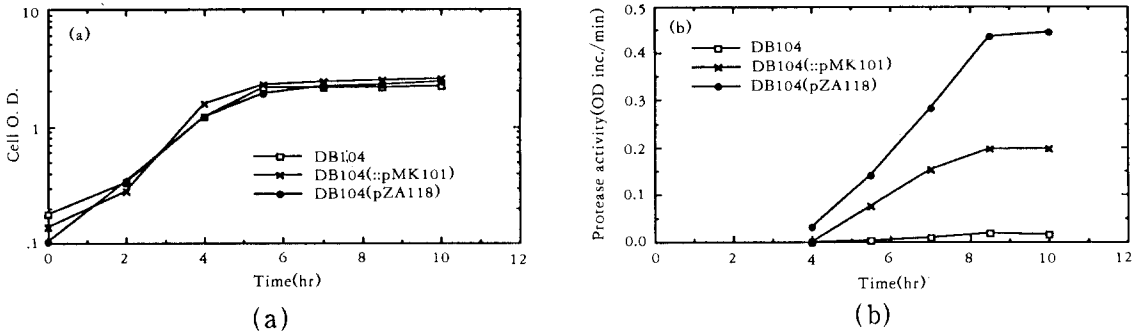


Fig 8. Comparison of protease activity between a replicable plasmid(pZA118) and a integrational plasmid (pMK101) of flask culture in Schaeffer's media. (a) Cell O. D. at 600nm (b) protease activity assay at O. D.<sub>420</sub>.

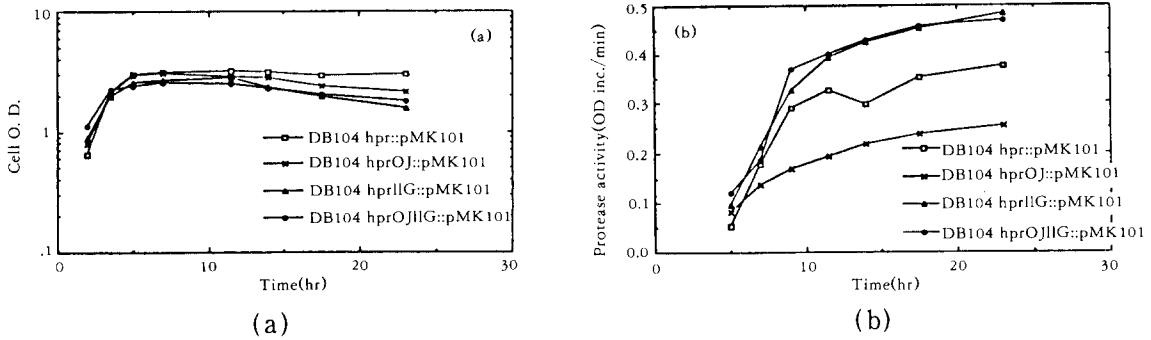


Fig 9. Comparison of protease activity among different sporulation mutants of flask culture in schaeffer's media. (a) Cell O. D. at 600nm (b) protease activity assay at O. D.<sub>420</sub>.

으며, DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoIIIG::pMK101, DB104  $\Delta$ hpr  $\Delta$ spoOJ  $\Delta$ spoIIIG::pMK101는 서로 비슷한 활성을 나타내며, DB104  $\Delta$ hpr::pMK101보다 약 1.5~1.7배 정도 높은 활성을 보인다.

### 고찰

포자형성에 관계되는 유전자들이 제거되었을 경우 그 유전자의 역할에 따라 각기 다른 영향이 예상되는데 위의 실험으로부터 spoOJ와 spoIIIG 유전자가 포자형성에 미치는 형태학적인 영향은 이미 보고된 바(9, 11)와 동일함을 확인할 수 있었다. 이들 변이주를 integration 벡터를 사용하여 chloramphenicol 30  $\mu$ g/ml 하에서 배양할 시에는(이와 다른 항생제의 농도의 경우는 hpr의 효과로 인한 차이가 있으며, 이에 대해서는 논문 투고 준비 중에 있다.) 포자형성을 지연시키는 spoOJ의 경우 protease 활성 증

가에 부정적인 영향을 미침을 알 수 있는데 이는 spoOJ에 의한 aprE의 전사활성 감소는 매우 큰 반면 포자형성 지연에 의한 활성 증가요인은 거의 없기 때문인 것으로 풀이된다. spoIIIG의 경우는 protease 활성 정도가 약 1.5~1.7배 정도 증가함을 보이는데, 이미 보고된 질소원 제한 성장조건에서의 spoIIIG의 효과(11)와 유사함을 알 수 있다. 이 경우 aprE의 전사 활성 감소의 정도는 알 수 없지만 뚜렷한 포자형성 방지에 의한 protease 생산성의 증가를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 실험결과는 aprE의 전사에 작용하는  $\sigma$  factor가 주로 어미세포(mother cell)에 존재하여 포자형성과정 동안 작용하기 때문에, 포자형성 변이주의 경우 aprE의 발현수준이 1.5배 이상 증가된 것처럼 보이는 것 같다. 이는 spoIIIG가 만드는  $\sigma^F$  발현 전후로 어미세포의 발달과정을 더욱 억제하면 더 높은 수준의 protease 발현이 가능하지 않은가를 시사해 주는 중요한 결과라고



생각된다. 최근의 어미세포와 forespore간의 신호전달체계에 대한 결과(23)로 미루어 보아  $\sigma^F$  및  $\sigma^G$  등의 이중포자변이주는 어미세포의 발달과정을 억제할 수 있는 후보로 생각되기에 이에 대한 많은 연구가 필요하다. 이중포자변이주의 경우는 spoII G와 거의 같은 활성을 띠므로써 spoO J에 의한 효과는 거의 없는 것으로 생각된다. 이는 spoII G의 포자형성 빈도수를 비교해 볼 때, 포자형성 지연의 효과는 spoII G 변이가 spoO J 변이에 비해 비교우위를 갖기 때문에 포자형성 지연에 의한 aprE의 활성 증가요인이 spoO J에 의한 전사활성 감소 요인보다 더 크다고 예측할 수 있으나, 어떤 다른 기작으로 spoO J 변이로 인한 aprE의 전사활성 감소를 회복시키지는 정확히 알 수 없다. 한 가지 가능성은 spoO J는 catabolite repressor 유전자의 repressor로 작용하는데, spoII G 변이가 spoO J로 인한 catabolite resistant 변이주의 superrepressor로 작용하여 그 효과를 회복시키거나, 또는 aprE의 전사활성 감소는 상존하지만 spoII G의 월등한 포자형성 지연으로 인한 활성 증가요인 때문에 spoO J 변이로 인한 전사활성 감소를 측정하기 힘든 경우이다. 후자의 경우라면 플라스크 배양에서보다는 유가식 배양에서 포자형성 지연효과는 더 크게 나타나므로 spoO J의 효과를 더욱 측정하기 힘들 것이라고 추측되기 때문에 lacZ 등의 fusion vector를 사용하여 플라스크 배양에서 aprE의 정확한 발현시작 시간 등의 정밀한 실험이 요구된다. 이와 같은 결과는 포자형성 변이주의 경우 발효시간의 연장이 가능한 것과 더불어 Bacillus 과발현을 위해 긴요한 성질임을 알 수 있었다. 이와 같은 특성을 좀 더 자세히 관찰하기 위해서 포자형성기 및 프로테아제 생성시기 및 발현량을 보다 정확하게 조절하여 줄 수 있는 유가식 배양 및 연속 배양 실험이 요구됨을 알 수 있었고, 현재 본 연구실에서는 이에 대한 실험이 진행 중이다. 또한 본 실험에서 관찰한 복제 가능한 플라스미드를 사용할시 integrational 플라스미드보다 2배 정도 높은 프로테아제 활성을 보이기 때문에 플라스미드의 사용 가능성 및 장점을 가늠할 수 있지만 이 플라스미드의 경우는 장시간 사용시 플라스미드의 안정성이 현저하게 감소함을 알 수 있기 때문에(미발표된 자료임) 이 경우에는 integrational 플라스미드가 더 유용함을 예측할 수 있다. 그러나 최근에 개발된 안정성이 뛰어난 플라스미드(24)의 경우는 상기 플라스미드의 장점을 쉽게 이용할 수 있어 앞으로의 세심한 연구가 필요하다고 생각된다. 현재 본 실험실에서는

상기한 포자변이주를 사용하였을 때 어느 정도 발현시간의 연장이 가능한지를 유가식 배양으로 실험하고 이를 극대화할 수 있는 배지의 개발도 병행하여 프로테아제 발현 및 생산의 진일보된 결과를 보여줄 수 있을 것이라고 생각한다.

## 요 약

*Bacillus subtilis*를 재조합 이중 단백질 생산 균주로 만들기 위하여 포자형성 변이주를 만들었다. 균주는 두 개의 프로테아제가 제거된 균주인 DB104로부터 spoO J와 spoII G 변이주를 유전자 조작법에 의해 만들고 두 개의 유전자가 모두 제거된 균주도 만들었다. 이에 목적 aprE 유전자를 삽입 벡터 형태로 만들어 integration시킨 뒤 변이주 각각의 형태적인 변화를 투과성 전자현미경으로 살펴 보았다. 각각 변이주의 모습은 이전에 보고된 것과 거의 일치하였으며, spoO J spoII G 이중포자변이주의 경우는 spoII G 변이주와 더욱 닮은 것을 알 수 있었으며, 훨씬 주름진 것과 같은 투박한 세포벽 및 막을 가지고 있음을 관찰하였다. spoO J 변이는 포자형성 빈도를 낮추고 aprE 활성을 감소시키는 반면, spoII G 변이는 포자형성을 거의 하지 않으면서 aprE 활성에 상승효과를 가져왔다. spoO J와 spoII G 이중포자변이주는 spoO J 변이의 효과는 거의 나타나지 않은 채, spoII G와 비슷한 aprE 활성을 보였다.

## 감 사

spoO J가 클로닝된 phage는 M. G. Bamucci 교수로부터, spoII G가 클로닝된 pSGII G11은 P. Stragier 박사로부터, DB104는 R. H. Doi 교수로부터 제공받았으며, aprE가 클로닝된 pZA118은 Doi 교수를 통해 한국과학기술원의 변시명 교수로부터, pIS157은 I. Smith 박사로부터 제공받았기에 감사의 뜻을 전합니다. 또한 전자현미경 사진을 찍는데 도움을 주신 한남대 생물학과 권선방 박사께도 감사의 뜻을 전합니다. 본 연구는 1993년도 교육부 학술연구조성비(유전공학분야) 및 93년도 서울대학교 발전기금 대우학술연구비 93-06-2087에 의해 재정적 지원을 받았음을 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. S. S. Park, S. L. Wong, L. F. Wang and R. H.

- Doi(1989), *J. Bacteriol.*, **171**, 2657.
2. E. Ferrari, S. M. H. Harward and J. Hoch (1986), *J. Bacteriol.*, **166**, 173.
  3. A. S. H. Pang, S. Nathoo and S. L. Wong (1991), *J. Bacteriol.*, **173**, 46.
  4. S. L. Wong(1989), *Gene*, **83**, 215.
  5. Y. Fujita and T. Fujita(1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 4524.
  6. L. Prestidge, et al.(1971), *J. Bacteriol.*, **107**, 815.
  7. I. Smith, R. A. Slepecky and P. Setlow (1989), Regulation of Procaryotic Development, p. 131, ASM, Washington D.C.
  8. A. D. Grossman(1991), *Cell*, **65**, 5.
  9. T. H. Mysliwec, J. Errington, A. B. Vaidya and M. G. Bramucci(1991), *J. Bacteriol.*, **173**, 1911.
  10. N. G. Magill and P. Setlow(1992), *J. Bacteriol.*, **174**, 8148.
  11. J. A. Pierce and C. R. Robertson(1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 211.
  12. P. Schaeffer et al.(1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 704.
  13. C. Anagnostopoulos and J. Spizizen(1961), *J. Bacteriol.*, **81**, 741.
  14. F. Kawamura and R. H. Doi(1984), *J. Bacteriol.*, **160**, 442.
  15. C. R. Harwood and S. M. Cutting(1990), Molecular Biological Methods for Bacillus, p. 140, John Wiley & Sons, Chichester.
  16. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  17. P. Stragier, J. Bouvier, C. Bonamy and J. Szulmajster(1984), *Nature*, **312**, 376.
  18. S. L. Wong, C. W. Price, D. S. Goldfarb and R. H. Doi(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 1184.
  19. M. L. Stahl and E. Ferrari(1984), *J. Bacteriol.*, **158**, 411.
  20. N. Illing and J. Errington(1991), *J. Bacteriol.*, **173**, 3159.
  21. M. Young(1980), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1613.
  22. P. J. Piggot and C. A. M. Curtis(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 1260.
  23. J. S. Parkinson(1993), *Cell*, **73**, 857.
  24. P. Haima et al.(1990), *Gene*, **86**, 63.