

AprE Promoter 전이상태 조절인자 변이주를 이용한 공업적 효소의 과발현과 고초균 숙주계의 개발

류 성 호 · *박 승 환 · †김 병 기
서울대학교 유전공학연구소 및 공업화학과,
*KIST 생명공학연구소

The Overexpression of Subtilisin Enzyme Using Mutations on Transition State Regulatory Proteins of AprE Promoter and Development of *Bacillus subtilis* Host System

Sung-Ho Ryu, Seung-Hwan Park*, and Byung-Gee Kim †

Institute for Molecular Biology and Genetics and Dept. of Chemical
Technology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-606, Korea

ABSTRACT

Bacillus subtilis strains with transition state regulator mutations and a spore mutation were developed for the overexpression of aprE and for the enhancement of expression level. Among the many regulator genes, degU and hpr were chosen as a representative positive and negative regulator for the aprE, respectively. SpoIIG was used for the construction of asporogeneous strains. All the mutants were constructed from two protease-deleted strain DB104 and the aprE gene was transformed with an integration vector pMK101. DB104(degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm) and DB104(Δhpr(Em))::pMK101(Cm) show 7-fold and about 2-fold increase in aprE expression level, respectively. But the effect of transition state regulator mutation on the aprE expression was diminished when the integrated aprE gene was amplified by the high concentration of chloramphenicol, i. e. 30 μg/ml. DB104(ΔspoIIG(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm) and DB104(ΔspoIIG(Pm) Δhpr(Em))::pMK101 double mutant show 10-fold and 3-fold increase in aprE expression level, respectively. The results suggest that sporulation mutation and transition state regulator mutation have independent and additive effect on the aprE expression, and the same gene dosage effect on the transition state regulator mutation was also identified.

서 론

*B. subtilis*는 subtilisin을 포함한 여러 효소의 높

은 분비량으로 인해 공업적 효소의 생산균주로 많이 이용되어 왔다. 이는 *B. subtilis*가 *E. coli* 다음으로 그 유전적 정보가 많이 알려져 있는 외에 최근에는 세포분화 및 신호전달체계에 관련된 활발한 연구에

† Corresponding Author

합입어 이중단백질 생산의 숙주로서 사용되기에 충분한 자료들이 축적되었으며, 탁월한 분비능력으로 인한 회수공정에서의 비용절감, 높은 수준의 발현 및 약약, 식품공업에 사용시 안정성 등 때문이다. 해서 *B. subtilis*를 이용한 다양한 재조합 이중단백질 생산에 대한 연구가 여러 방면에서 활발히 진행되고 있다.

그러나 *B. subtilis*를 재조합 단백질 생산에 이용하기 위해서는 과량으로 분비되는 프로테아제의 문제 (1), 유도가능한 프로모터(inducible promoter)의 개발(2), 낮은 발현수준 및 분비능의 향상 등의 해결 과제가 산재해있다.

프로테아제의 제거를 위해서는 현재 7개의 프로테아제가 제거된 균주까지 보고 되어 있고(3), 강하고 유도가능한 프로모터의 개발을 위한 levansucrase (4) 및 gluconate시스템(5)의 이용과 아올러 amy, apr, npr 등의 leader sequence를 이용한 분비최적화 등이 보고된 바 있으나 야생주 프로모터의 낮은 발현수준을 공업적으로 이용하기 위해서는 프로모터의 개발과 병행된 프로모터 전사조절에 관계한 변이주의 개발이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 앞선 연구들을 바탕으로 *B. subtilis*의 aprE 즉, 알칼리성 프로테아제의 프로모터를 이용한 이중단백질 생산에 있어 조절인자 변이주를 유전자 재조합에 의해 만들고, 이와 더불어 포자형성 변이주(19)와의 이중변이주를 제조하여 낮은 전사효율의 극복과 함께 생산시간의 연장을 꾀하였다.

*B. subtilis*는 최적성장 유지가 어려운 외부환경의 자극에 대해서 변화하는 환경에 순응하는 대사경로와 에너지 생산에 관여하는 유전자의 발현으로 대응한다. 이와 같은 유전자의 발현 중 특히 대수증식기에서 휴지기 상태로 성장이 전이되면서 기능을 발휘하며 세포성장 및 대사유지에 중요한 단백질(예, 프로테아제, 아밀라제 등)의 발현을 주도하는 유전자 프로모터의 전사조절은 전이상태 조절유전자(6)로 총칭되는 조절인자에 의한다. 물론 이들 인자는 프로모터의 종류에 따라 다르고 다양하나, 현재까지 aprE에 대한 그 생화학적 조절기작과 염기서열이 알려진 조절유전자는 9종류에 이르며, 전사에 영향을 미치는 형태에 따라 활성인자와 억제인자로 구분된다. 활성인자로는 SacU(DegU, DegS), DegQ, DegR, TenA, SenS, 억제인자로는 Sin, Hpr, AbrB, Pai가 알려져 있다. 이들 중 단백질 분해효소의 발현에 있어 조절범위가 가장 넓고, aprE전사단계에서 활성을 조절하는 효과가 매우 높은 것으로 알려져

DegU(7), 억제인자로는 그 생화학적 기능이 가장 많이 알려져 있고 직접적으로 aprE의 발현에 관여하는 것으로 Hpr(8)을 꼽을 수 있다.

DegU는 대장균의 ntr과 같은 두개의 부분으로 이루어져있는 영향인자로서 감지인자에 해당하는 degS와 하나의 제를 형성하며, 단백질 분해효소의 생산 이외에도 운동성과 형질전환능력 및 포자형성의 조절에도 작용한다. 이는 aprE의 발현시 ATP존재하에서 인산기복합체형성에 의해 조절인자로서의 기능을 가지며, aprE 프로모터에 어떤기작으로 작용하는가는 정확히 알려져 있지 않으나 프로모터 upstream에 결합해서 전사단계에 관여하는 것으로 알려져 있다(9). Hpr은 *B. subtilis*에서 발현되는 단백질 분해효소 중 aprE와 npr에만 한정적으로 관여한다고 알려져있으며 프로모터의 upstream과 downstream에 결합해서 전사단계를 방해함으로써 억제인자로서의 기능을 가진다(10).

본 연구에서는 degU^h, hpr 조절인자 변이주를 유전자 재조합법에 의해 제조하여 aprE의 과발현을 유도하고자 하였고, 이미 발표된 논문에서 고찰한 바 있는 제II기(stage)의 포자형성 단계를 막음으로써 aprE의 발현 증가를 유도할 수 있는 spoIIG (12, 19) 변이주와 이중 변이주를 제조하여 그 과발현 양상 및 aprE에 대한 조절인자 변이주와 포자변이주의 상관관계를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

배지

B. subtilis 배양시 액체배지로는 Schaeffer 포자형성배지(12), 고체배지로는 Tryptose Blood Agar Base(TBAB; Difco, U. S. A.), competent cell 제조시는 Spizizen 최소배지(13)를 이용하였고, 변이주의 운동성은 0.7% TBAB 고체배지에서 확인하였다(14). 프로테아제의 정성분석을 위해서는 15% skim milk를 포함한 TBAB를 사용하였다. Erythromycin, kanamycin, phleomycin저항성 유전자의 선별은 각각 5 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml의 농도를 사용하였고, chloramphenicol에 의한 integration vector의 선별은 5 μ g/ml, 플라스미드의 증폭에는 30 μ g/ml을 각각 사용하였다. *E. coli* 배양시에는 LB배지를 사용하였으며, ampicillin, tetracycline, kanamycin, erythromycin 저항성 유전자의 선택에는 각각 60 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 5 μ g/ml의 항생제 농도를 사용하였다.

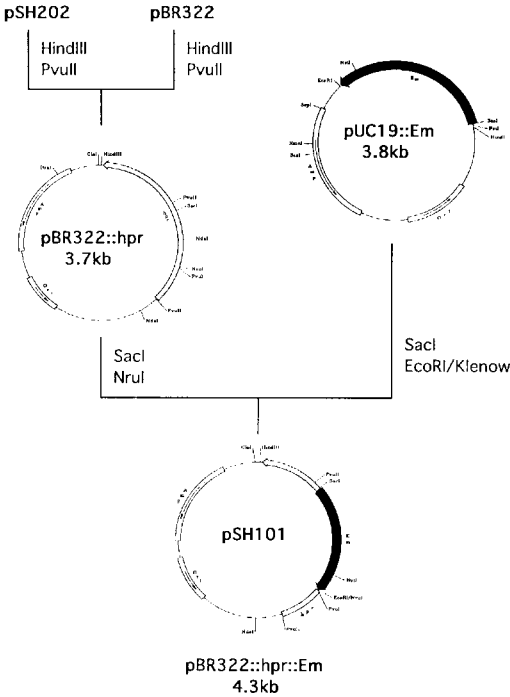


Fig. 1. Construction of a plasmid containing hpr gene deactivated by erythromycin gene.

균주 및 플라스미드

*B. subtilis*에서 두 개의 프로테아제가 제거된 DB104(15)를 이용하여 변이주를 만들었다. AprE의 활성은 염색체에 integration이 가능하고 유전자 증폭이 용이한 pMK101을 이용하여 측정하였다. *B. subtilis*로부터 염색체를 얻는 방법과 transformation시키는 방법은 Doi 등(15)에 의해 보고된 바와 같이 하였다. *E. coli*는 JM109와 DH5 α 를 사용하였고 *B. subtilis*에 integration시키기 위한 플라스미드를 얻을 때는 RR1을 사용하였다. *E. coli*로부터 플라스미드를 추출 및 형질변환의 방법은 Sambrook 등(16)의 alkaline lysis 방법 및 CaCl₂방법을 따랐다. 제한 효소는 Kosco enzyme이나 Boeringer Manheim의 것을 사용하였으며 겔에서 DNA를 추출할 시에는 gene clean kit II (BioRad-101)를 사용하였다.

degU^h(32) 조절인자 변이주는 Bacillus Genetic Stock Center(BGSC: Ohio, U. S. A.)에서 기증받은 1A165(18)로부터 제조되었다. 1A165의 chromosomal DNA를 분리하여 DB104::pMK101 competent cell에 형질전환시킨 후, his 유전자와의 높은

cotransformation 확률을 이용하여 histidine이 없는 Spizizen minimal 배지에서 선별하였으며, degU^h(32) 변이주의 경우 프로테아제의 생산이 증가되므로 1.5% skim milk 포함한 TBAB에서 단백질 분해에 의해 형성되는 halo의 크기를 비교하여 DB104 degU^h(32)::pMK101을 제조하였다.

hpr 조절인자 변이주 제조시 사용한 플라스미드는 박승환 박사(KIST, 생명공학연구소)로부터 hpr이 subcloning된 pSH202를 기증받아 이를 이용하였고, 선택표지는 pE194의 erythromycin 저항성 유전자를 사용하였다. Fig. 1과 같이 Em^r 900bp의 유전자를 hpr에 삽입하여 pBR322:: Δ hpr(Em)를 제조하여 hpr 형질변환에 사용하였다.

포자변이와의 이중변이주를 위해서는 이미 발표된 pBR322:: Δ spo IIG(Pm)를 사용하였다(19). Chloramphenicol 및 erythromycin 혹은 phleomycin을 포함한 TBAB에서 변이주를 얻고, 증가된 aprE의 활성과 포자형성 빈도를 측정하여 포자형성 및 조절인자 이중변이주임을 확인하였다.

포자형성 빈도수 및 운동성 확인

포자형성 빈도수 측정은 균주를 Schaeffer's 배지에서 키운 다음 휴지기가 시작된 지 7시간 후, 80°C에서 15분간 열처리한 세포와 열처리하지 않은 세포를 각각 LB평판 배지에 갈아 콜로니 수를 비교하였다. 균주의 운동성은 0.7% TBAB배지에 도달하여 육안으로 운동성 여부를 확인하였다.

세포 배양 및 프로테아제 활성 측정

프로테아제의 활성을 위해서는 각각의 균주를 chloramphenicol 5 μ g/ml의 평판배지에서 선별하였고, 목적유전자 증폭의 경우 chloramphenicol 30 μ g/ml의 평판배지에 옮겨 선별하였다. 액체배양은 평판배지로부터 콜로니를 취하여 원하는 양의 항생제 농도를 포함한 Schaeffer's 배지를 넣은 시험관에서 하룻밤 키운 뒤 항생제를 포함하지 않은 Schaeffer's 배지를 20ml이 든 플라스크에 5% (v/v)로 접종하였다. 세포성장은 UV spectrometer를 통해 파장 600nm에서 흡광도 측정으로 살펴 보았다. 프로테아제 활성 측정은 succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide(Sigma, U. S. A.) 0.1mg을 0.1M Tris-buffer 0.9ml에 넣고 시료 0.1ml를 함께 넣은 뒤, 25°C, 420nm에서 1분간의 흡광도 변화의 기울기로 측정하였다(20). 여러 가지 변이주의 프로테아제 활성과 세포성장을 상기한 방법으로 측정 결과, 세포의 농

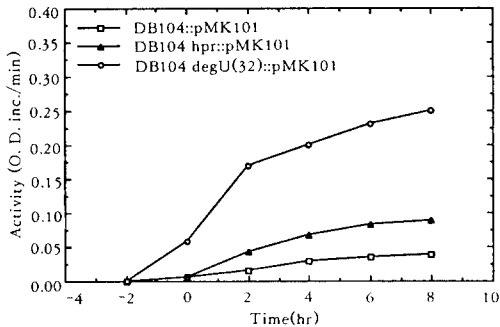


Fig. 2. Effect of hpr and degU⁽³²⁾ mutation on protease activity in flask culture with Schaeffer's media containing 5 µg/ml of chloramphenicol. The time scale refers to hours before and after T₀, the point marking the transition from the exponential to the stationary phase of growth curve.

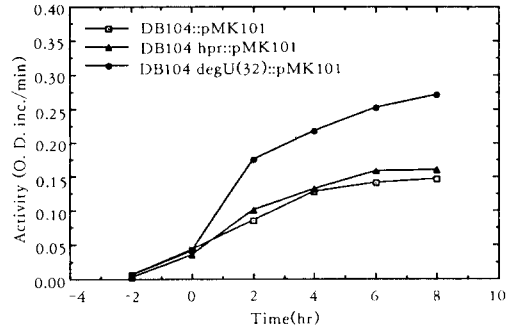


Fig. 3. Effect of hpr and degU⁽³²⁾ mutation on protease activity in flask culture with Schaeffer's media containing 30 µg/ml of chloramphenicol. The time scale refers to hours before and after T₀, the point marking the transition from the exponential to the stationary phase of growth curve.

도는 모든 변이주에서 거의 동일한 흡광도를 나타내어, 프로테아제의 활성 변화가 세포 농도의 변화로 인해 생기는 것은 아님을 확인할 수 있었기 때문에 본 논문의 모든 Fig에서는 세포의 농도는 제외하고 프로테아제 활성만을 각 변이주에 대해 비교하였다.

결 과

전이상태 조절인자 변이주 (degU^h 및 Δhpr)의 프로테아제 활성

degU^h 변이주는 his⁺야생주 및 DB104::pMK101 (Cm)와 비교시 현저하게 감소된 운동성과, 1.5% skim milk 배지에서 확인된 halo크기의 차이가 현저하게 다름을 보여준 반면 Δhpr 변이주는 항생제 저항성 및 약간의 halo크기의 차이 이외에는 콜로니 외관상으로는 별차이가 없었다. 프로테아제 활성은 Fig. 2에 잘 나타나있는 바와 같이 chloramphenicol의 농도가 5 µg/ml일때 DB104::pMK101(Cm)과 비교해 degU^h 변이주는 약 7배, Δhpr 변이주는 약 2배의 활성증가를 보여주었다. 이는 문헌 상에서 보고된 증가 폭(degU^h 변이주는 약 5~10배, Δhpr 변이주는 약 2~15배)에 비하면 hpr의 경우는 조금 낮은 편이지만 2~15배의 증가는 *B. subtilis*가 분비하는 모든 프로테아제를 합한 경우에 대한 영향이고 보면 알칼리 프로테아제의 경우는 보고된 바가 없어 거의 일치한다고 볼 수 있다.

이와 같은 전이상태 조절인자의 작용메카니즘은 최근에 들어 많이 연구되어, degU의 경우는 단백질의 인산화된 형태와 DNA의 결합이(22), hpr의 경우는 DNA와의 직접 결합이(8) 전사증가에 중요한 작용을 한다고 보고되었다. 그러므로 어떤 형태로든 조절인자 단백질과 DNA의 결합이 관여하기 때문에 숙주 내의 플라스미드 농도가 전사증가에 영향을 미칠 것이라고 판단되어 chloramphenicol의 농도를 변화시켜 주면서 프로테아제 AprE의 발현정도를 살펴 보았다. 본 연구에서 사용되고 있는 integrable 플라스미드는 selection marker인 chloramphenicol의 농도에 따라 복제수가 달라진다고 알려져 있기 때문에(20), chloramphenicol 5 µg/ml, 30 µg/ml의 농도를 사용하여 각 조절인자 변이주의 특성에 따른 aprE유전자의 증폭이 프로테아제 활성에 미치는 영향을 측정하였다. Fig. 2 및 Fig. 3에서 알 수 있듯이 chloramphenicol 농도가 5 µg/ml에서 30 µg/ml로 증가할 때 DB104::pMK101(Cm), DB104(degU^h his⁺):pMK101(Cm) 및 DB104(Δhpr (Em)):pMK101(Cm) 경우 각각 4배, 1.9배 및 1.1배의 활성증가를 보였다. 이는 degU^h와 Δhpr 변이주는 모두 aprE유전자의 증폭효과 및 이로인한 조절인자 유전자의 희석 효과를 나타내기 때문에 aprE의 고증폭 시(약 30 정도의 복제수를 나타낸다고 알려져 있음)에는 조절인자 유전자의 영향이 상대적으로 매우 낮음을 알 수 있다. 이상의 결과는

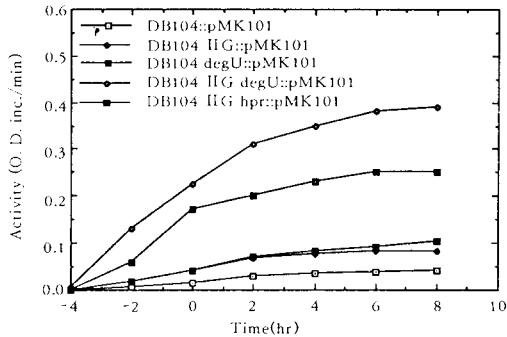


Fig. 4. Effect of sporulation and transition state regulatory double mutants on protease activity in flask culture with Schaeffer's media containing 5 µg/ml of chloramphenicol. The time scale refers to hours before and after T_0 , the point marking the transition from the exponential to the stationary phase of growth curve.

*B. subtilis*의 경우 목적유전자의 발현 시 selection marker를 이용한 유전자 증폭이 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

포자형성 및 전이상태 조절인자 이중변이주의 활성 분석

aprE에 대한 전이상태 조절인자 변이주가 가지는 발현효율의 증가와 포자형성 지연에 의한 발현수율 향상의 부가적 결과를 살펴보기 위해 포자형성 변이 및 전이 상태 조절인자 변이의 이중변이주를 제조하였다. 포자형성 초기과정에서 비교적 높은 subtilisin 활성을 보이는 spoII G 변이와 전술한 전이상태 조절인자 변이주 hpr 및 degU^h(32)를 선택하여 DB104 (Δ spoII G(Pm) Δ hpr(Em))::pMK101(Cm) 및 DB104(Δ spoII G(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm)을 제조하고 AprE의 활성을 측정하였다. Schaeffer's 배지를 사용한 shake flask 배양에서 DB104(Δ spoII G(Pm) Δ hpr(Em))::pMK101(Cm) 및 DB104(Δ spoII G(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm) 이중변이주는 chloramphenicol 농도 5 µg/ml로 선별한 경우 DB104(Δ hpr(Em))::pMK101(Cm) 및 DB104(degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm)과 비교시 각각 약 1.5배의 활성증가를 관찰할 수 있어, DB104(Δ spoII G(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm)의 경우는 DB104::pMK101(Cm)과

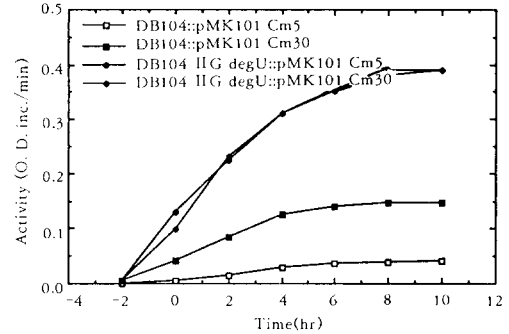


Fig. 5. The gene dosage effect of pMK101(Cm) on DB104(Δ spoII G(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm) for aprE expression in flask culture with Schaeffer's media containing 5 or 30 µg/ml of chloramphenicol. The time scale refers to hours before and after T_0 , the point marking the transition from the exponential to the stationary phase of growth curve.

비교시 약 10배의 활성증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 두개의 이중변이주에서 전사 조절인자 변이주보다 각기 1.5배 정도의 subtilisin의 활성 증가는 aprE 발현에 있어 spoII G 변이와 hpr 및 degU^h(32) 변이의 독립적인 영향을 보여주는 것으로, DB104::pMK101(Cm)과의 활성 비교시 확인된 포자형성 지연에 따른 활성증가효과와 hpr 혹은 degU^h(32)의 전사활성 증가효과를 곱한 값(hpr의 경우 1.5 × 2배 = 3.0배; degU^h(32)의 경우 약 1.5 × 7배 = 10.5배)과 비슷함을 알 수 있다. 이 결과는 aprE의 발현에 있어 포자형성에 관계한 변이가 전이상태 조절인자의 변화에는 영향을 미치지 않기 때문에 이와 같은 두개의 서로 독립적인 변이를 통해 목적유전자의 과발현이 가능함을 시사해주는 중요한 결과라 할 수 있다.

전이상태 조절인자의 성질에서 확인된 selection marker 농도에 따른 aprE 유전자 증폭 및 이로 인해 발현에 부정적으로 작용하는 gene dosage 영향을 새로 만든 spoII G degU^h(32) 이중변이주에서 확인하기 위해 실험을 수행하였다. Fig. 5에서 보인 바와 같이 DB104(Δ spoII G(Pm) degU^h(32) his⁺)::pMK101(Cm)의 경우는 chloramphenicol 5 및 30 µg/ml 농도에서 aprE 증폭과 무관하게 거의 동일

한 발현수율을 보여주었다. *SpoIIIG hpr* 이중변이주의 경우도 이와 동일한 결과를 보여주었다.(발표하지 않은 결과임) 이와 같은 *aprE* 증폭에 따른 활성의 희석효과는 전이상태 조절인자 변이가 포자 변이와는 독립적인 영향을 미침을 보이는 또 하나의 증거가 될 뿐만 아니라, 유전자 증폭, 전이상태 조절인자 변이 및 포자 변이를 통한 각각의 효과를 모두 부가적으로 발휘할 수는 없음을 알 수 있었다.

고 찰

aprE promoter upstream 영역에 작용해서 전사 효율을 조절하는 전이상태 조절인자중 *hpr*과 *degU^h*를 선택하여 변이주를 제조하여 *subtilisin* 발현수율에 관한 영향을 살펴본 결과, integration된 벡터 내의 *aprE* 유전자의 증폭이 미미한 경우(chloramphenicol 5 μ g/ml를 사용) *aprE*만 가진 야생주와 비교하여 *degU^h(32)*는 7배, *hpr*은 2배의 발현효율의 향상을 보여 전사 조절인자로서 *aprE* 활성에 미치는 영향을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 발현효율은 야생주를 이용한 기존 발표 결과(9, 23, 24)에서의 프로테아제 생산에 대한 *degU^h(32)* 및 *hpr*의 영향보다 매우 낮음을 알 수 있다. 이는 이들 발표들에서는 프로테아제가 사체되지 않은 야생주를 사용하였기 때문에 *aprE* 및 *npr* 모두에 대한 *degU^h(32)* 및 *hpr*의 영향을 나타내기 때문이라고 생각되며 이와 같은 설명은 상기한 전이상태 조절인자 변이주가 모든 프로테아제에 각기 다른 정도의 영향을 미친다(25)는 것으로 해석이 가능하다고 생각된다. 또한 본 실험의 결과는 여러 다른 실험실에서의 미발표 결과(캐나다, University of Calgary의 Sui-Lam Wong 교수와의 개인적인 의견 교환임)와도 일치된다고 확인한 바 있다. 이들 변이주를 chloramphenicol 30 μ g/ml를 사용하여 *aprE*를 증폭시킨 경우, *degU^h(32)*와 *hpr*변이주 각각은 *aprE*만이 증폭된 야생주와 비교시 프로테아제 활성이 4배와 1.1배로 증가하였으며, 이는 발현수율을 비교해 볼 때 5 μ g/ml의 사용 경우보다 야생주에 대한 *degU^h(32)*와 *hpr*에 의한 발현증가 정도가 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다. 이는 전사인자의 세포 내 농도가 전사인자의 역할에 매우 중요한 영향을 미침을 시사하며, *aprE* 유전자가 증폭될 경우 gene dosage 효과에 의한 변이된 조절인자의 희석효과로 나타난다고 생각된다.

포자형성은 *aprE* 발현에 있어 매우 중요한 역할

을 하고 있다. 이는 *aprE* 발현이 포자형성의 초기 단계에서만 발현되고 말기 단계에서는 그 발현이 현저하게 줄어들기 때문인 것으로 잘 알려져 있다. 해서 본 연구에서는 *aprE* 발현 초기단계에 관여하며 *aprE* 발현에 증가효과를 나타내는 포자형성 변이주인 *spoIIIG* 변이주를 선택하여, 조절인자 변이주와 포자형성 변이주의 특성을 모두 갖춘 이중 변이주를 제조하였다. *sopIIIG* 변이주는 정상적인 균주와 비교하여 포자형성 지연에 의한 발현 효율의 향상이 약 1.5배라고 보고되어 있는데(18), 제조된 DB104 ($\Delta spoIIIG(Pm) degU^h(32) his^+::pMK101(Cm)$)는 약 10배의 발현효율의 향상을 보여 주었다. 결과적으로 *spoIIIG*와 *degU^h(32)* 유전자는 전혀 다른 작용 기구(mechanism)로 *aprE* 발현에 영향을 미치기 때문에, *aprE* 발현에 서로 독립적 및 부가적으로 작용하는 것으로 생각된다. *spoIIIG degU^h(32)* 이중변이주 및 *spoIIIG hpr* 이중변이주 역시 chloramphenicol 농도에 따른 *aprE* 증폭에 의한 *subtilisin* 활성의 희석효과를 보여, 이는 포자형성과는 무관하게 일어나는 전사 조절인자 변이주 만이 가지는 특성으로 해석된다.

결과적으로 *spoIIIG* 변이와 *hpr* 및 *degU^h(32)* 변이를 통해 *aprE*의 발현 수율이 증가는 되었지만, *hpr* 및 *degU^h(32)* 변이를 통한 발현 수율의 향상은 *aprE* 유전자의 증폭으로 인해 전사 조절인자의 영향이 희석되어 기대하던 *aprE*의 발현 수율은 얻지 못하게 되었다. 본 결과는 orthogonal한 유전자 변이를 통해서 목적유전자의 발현 수율을 꺾을 수는 있으나, 다종의 변이 및 발효 조건에 따라 이들의 영향이 상쇄될 수 있다는 결과를 보여주고 있어, 좀더 나은 발현수율의 증가를 위한 방안으로 매우 세심한 연구가 요구된다는 것을 나타낸다. 또한, 앞서 지적한 포자형성 변이주의 개발과 연관시켜 생산시간의 증가를 꺾기 위해 진일보된 배양 공정 제어의 적용과 배지최적화 역시 병행하여 연구한다면 보다 나은 발현효율 향상을 성취할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

*Bacillus subtilis*를 재조합이종 단백질 생산에 응용하고 그 발현효율의 향상을 위하여, *aprE* 프로모터를 모델계로서 이에 작용하는 전이상태 조절유전자 변이와 포자형성변이의 영향을 살펴보았다. 사용된 균주는 두 개의 프로테아제가 제거된 DB104이며, 조절인자 변이주는 *degU^h*와 *hpr*을 각각 활성인

자와 억제인자로 선택하였고, 이중변이주는 DB104 ($\Delta spo II G(Pm) degU^h his^+$) 및 DB104($\Delta spo II G(Pm) \Delta hpr(Em)$)를 제조하였다. 이에 목적유전자인 *aprE* 유전자를 재조합하여 변이에 의한 과발현 양상을 확인하였다. $degU^h$ 및 *hpr* 조절변이주는 야생주와 비교하여 각각 약 7배 및 약 2배의 발현효율 향상을 보여주었다. 이들 전이상태 조절유전자 변이는 모두 목적유전자 복제 수의 증가에 따라 발현효율의 감소를 나타내어 증폭된 목적유전자에 대한 조절유전자의 희석효과(gene dosage effect)를 확인할 수 있었다. 이중변이주 DB104($\Delta spo II G(Pm) degU^h his^+$)::pMK101 및 DB104($\Delta spo II G(Pm) \Delta hpr(Em)$)::pMK101에서의 *aprE* 발현은 각각 약 10배 및 3배의 발현증가를 가져와 *aprE* 발현에 대한 포자변이주 및 전이상태 조절유전자의 독립적인 부가효과를 확인하였다.

감 사

본 연구는 교육부 유전공학연구비(1994. 5~1995. 4)에 의해 지원받았기에 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. U. Volker, S. Riethdorf, A. Winkler, B. Weigend, P. Fortnagel and M. Hecker(1993), *FEMS Microbiol. Letter* **106**, 287.
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. T. Msadek, F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport and R. Dedonder(1990), *J. Bacteriol.*, **172**, 824.
7. F. Kuns, M. Debarbouille, T. Msadek, M. Young, C. Mauel, D. Karamata, A. Klier, G. Rapoport and R. Dedonder.(1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 5093.
8. D. T. Kallio, J. E. Fagelson, J. A. Hoch and M. A. Strauch.(1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 13411.
9. D. J. Henner, E. Ferrari, M. Perego and J. A. Hoch.(1988), *J. Bacteriol.* **170**, 296.
10. M. Perego and J. A. Hoch(1988), *J. Bacteriol.*, **170**, 2560.
11. L. Prestidge, et al (1971). *J. Bacteriol.* **107**, 815.
12. P. Schaeffer, J. Millet and J. Aubert.(19650, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* **54**, 704.
13. C. Anagnostopoulous and J. Spizizen. (1961), *J. Bacteriol.* **81**, 741.
14. C. R. Harwood and S. M. Cutting.(1960). "Molecular Biological Method for *Bacillus subtilis*", John Wiley and Sons.
15. F. Kawamura and P. H. Doi(198, 4), *J. Bacteriol.* **160**, 442.
16. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989), "Molecular Cloning(a laboratory manual) vol. 1", 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Tanaka, T. and M. Kawata. (1988). *J. Bacteriol.* **170**: 3593-3560.
18. R. Villafane D. H. Bechhofer, C. S. Narayanan and D. Dubnau.(1987), *J. Bacteriol.* **169**, 4822.
19. M. K. Oh, S. H. Park and B. G. Kim, (194). *Korean J. Biotechnol Bioeng*, **9**, 16.
20. M. L. Stahl and E. Ferrari(1984), *J. Bacteriol.* **158**, 411.
21. M. Young(1980), *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1613.
22. M. K. Daht, T. Msadek, F. Kunst, and G. Rapoport(1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 14509.
23. M. M. Zukowski and L. Miller(1986) *Gene* **46**, 247.
24. T. B. Higerd, J. A. Hoch and J. Spizizen (1972) *J. Bacteriol.* **112**, 1026.
25. F. Kunst, M. Pascal, J. Lepesant-Kejzlarova, J. Lepesant, A. Billault and R. Dedonder (1974) *Biochimie* **56**, 1481.