

## 특집: 생물공정기술의 최적화(I-I)

### Bacillus균주의 분자육종과 응용

박 승 환

KIST 생명공학연구소 미생물분자유전학 연구Unit

*Bacillus*균주의 육종은 여러측면에서 여러가지 요소를 이용하여 이루어질 수 있다. 목적하는 산물과 직접 관련되어 있는 유전자를 증폭시키거나 발현을 증진시키는 것에서부터 숙주균의 생리를 변화시켜 보다 근본적인 차원에서 생산성을 높이는 등의 다양한 접근방식이 적용될 수 있고, 목적하는 산물이 무엇인지에 따라서, 즉 세포외로 분비되는 효소인지, 세포내에 축적되는 단백질인지, 아미노산, 비타민 등의 1차 대사산물인지, 항생물질과 같은 2차 대사산물인지, 또는 외래 단백질인지 등에 따라서 균주개발의 key point가 달라질 수 있다. 균주육종 방법에 있어서도 UV조사 또는 NTG와 같은 mutagen을 처리한 후 원하는 특성을 지닌 mutant를 선발하는 고전적 육종 방법과 더불어 분자생물학의 발전으로 이제는 생산성과 관련된 주요 유전인자를 발굴 분석하고 이를 직접 조작함으로써 보다 체계적인 균주개발이 가능하게 되었다. 본고에서는 *Bacillus* 균주개발의 요소가 될 수 있는 몇가지 측면과 재료 및 방법에 대해서 살펴보고자 한다.

#### Bacillus균의 특성 및 산업적 유용성

*Bacillus*속의 균주들은 호기성, 그람양성이며 내생포자를 형성하는 간균으로 다양한 대사작용을 하며 대개가 비병원성인 것으로 알려져 있다. 특히 *B. subtilis*의 경우 미국 FDA로부터 GRAS(generally regarded as safe) 미생물로 인정받았는데 여기에는 일본인들이 대두 발효식품 natto를 통해 *B. subtilis* var. natto균을 오랫동안 섭취해온 사실이 안전성을 증명하는 좋은 자료가 되었다.

Type species인 *B. subtilis*는 대장균 다음으로 유전학적 및 생리학적 기초연구가 많이 이루어진 세균이다. 대장균에서는 볼 수 없는 포자형성, competence발현과 같은 흥미있는 생물학적 현상과 함께 배양이 용이하고 병원성이 없어 오래전부터 그람양성균의 대표적인 연구모델로서 이용되어 왔을 뿐 아니라 산업미생물로서도 중요한 위치를 차지해왔다. *B. subtilis*를 대상으로 하여 이루어진 기초 및 응용연구 결과들은 다른 여러 *Bacillus* species의 연구개발에 파급되어 왔으며 앞으로도 그와 같은 역할을 계속할 것이다. 현재 *Bacillus*속 균주들의 분류에 대해 여러가지 이견이 있지만 한 연구논문(1)에 의하면

65종의 *Bacillus* species로 분류가 가능하다. 이렇게 많은 *Bacillus*속 균주중에는 유용물질의 산업적 생산균주로서 중요한 위치를 차지하고 있는 것들이 많으며 대표적인 산물로 (i) enzymes, (ii) antibiotics, (iii) 향신료 및 식품첨가물 등을 포함하는 fine biochemicals 및 (iv) insecticides를 들 수 있다. 또한 *B. subtilis*, *B. brevis* 등의 균주들은 외래단백질의 생산 숙주로서도 활발히 이용되고 있다.

#### Bacillus균의 유전적 분석 및 변이를 위한 재료 및 방법

##### Mutagenesis

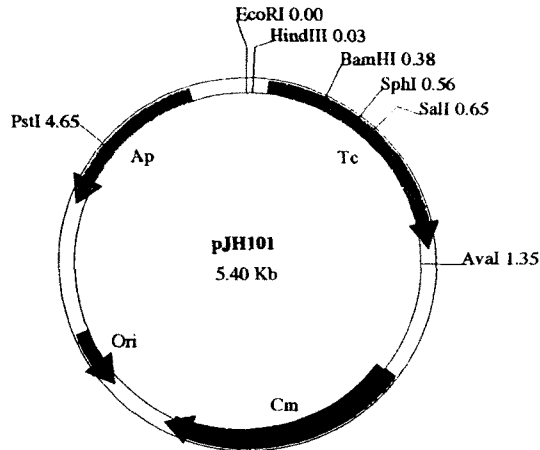
Mutagenesis는 유전자의 기능을 밝히거나 염색체상에서의 mapping 수단으로서 또는 균주개발을 위한 방법으로서 오랫동안 이용되어 왔다. Mutagenesis 방법은 transformation, transduction 및 protoplast fusion 등의 유전자 전달방법과 함께 주로 *B. subtilis*의 유전학적 연구과정에서 발전되었으며 점차 *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* 등의 다양한 균주에 응용되어 왔다. Mutagenic procedure는 크게 두가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 generalized mutagenesis로 chromosomal DNA를 random mutation 시키는 방법이며 전통적으로 유사한 형질을 지닌 돌연변이주들을 제작하는데 이용되어왔다. 다른 하나는 site-specific methods로 recombinant DNA techniques을 이용하여 염색체상의 정확한 위치에 base pair change를 일으키는 것이다. 여기서는 전자에 대해서만 간단히 살펴본다. 이러한 고전적인 방법들은 유전자를 직접 다루는 분자육종방법과 상호보완적으로 이용되고 있다.

##### (1) Mutagenesis by UV irradiation

UV에 의한 mutagenesis는 수행과정이 단순하며 deletions, transversions, G.C→A.T transitions 등의 다양한 돌연변이를 무작위로 일으키나 NTG보다는 덜 강력하다. 대수증식기에서 회수된 *Bacillus* 세포들을 대상으로 UV를 조사하는데 0.1~1.0%의 세포생존률이 되도록 조사량을 조절하는 것이 바람직하다.

##### (2) NTG mutagenesis

*N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)는 가장 강력한 bacterial mutagens중 하나로 G.C→A.T transitions에 의한 직



**Fig. 1.** Plasmid pJH101의 제한효소 지도. pJH101DMS pBR322를 모체로 pC194로부터 Cm<sup>r</sup> 표지를 도입하여 제작된 전형적인 integration vector임. 대장균에 대해서는 ampicillin, tetracycline 및 chloramphenicol 내성을 *B. subtilis*에 대해서는 chloramphenicol 내성을 제공한다.

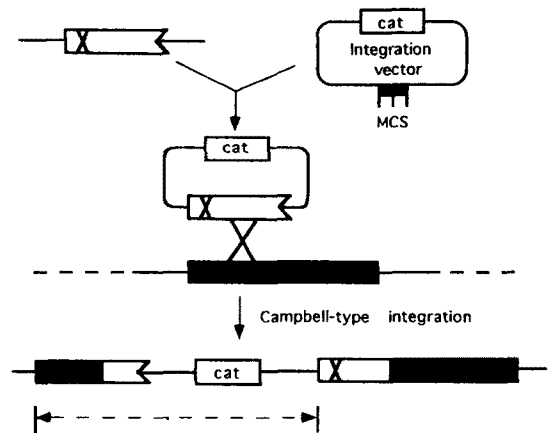
결 mutation 또는 error-prone repair를 통한 간접 mutation에 의해 frameshifts, deletions, transitions 을 일으킨다. NTG는 자라고 있는 세포의 replication fork에서 작용을 하며 single-stranded DNA가 target이 된다. 50% 정도의 세포생존율을 유지할 수 있는 NTG농도가 바람직하다. Balassa(2)는 포자를 발아시키면서 NTG를 처리하는 방법을 고안하였는데 포자를 형성하는 모든 미생물에 적용할 수 있으며 좋은 결과를 얻을 수 있는 것으로 알려져 있다.

(3) Mutagenesis *in vitro*

Plasmid vector나 bacteriophage vector에 cloning된 염색체 DNA를 시험관 내에서 mutation시킨후 이를 염색체상에 도입할 수 있다. 50 µg의 DNA에 nitrous acid나 o-methylhydroxylamine을 가하여 mutation을 유도하며 mutation이 일어난 염색체 DNA는 아래에 소개될 integration vector에 subcloning한 후 염색체내로 도입할 수 있다.

(4) *In vitro* mutation의 염색체내로의 도입

시험관 내에서 유도된 mutation의 *Bacillus* 염색체내로의 도입은 integration vector개발에 의해 가능해졌으며 대부분의 연구가 *B. subtilis*를 숙주로 이루어졌다. Integrational vector는 pJH101(3)(Fig. 1)과 pHV60(4) 등이 대표적인 예로 pBR322의 replication origin만을 가지고 있어 *B. subtilis*에서는 복제가 되지 않으며 *Bacillus*에서 작용하는 항생제 내성 유전자를 함유하고 있다. Integrational vector 그 자체로는 integration이 되지 않으나 여기에 숙주의 염색체와 상동성이 있는 DNA조각(예, *in vitro* mutagenesis에 의해 돌연변이가 일어난 염색체 DNA 조각)이 삽입되면 이 plasmid는 Campbell-type 기작에 의해 염색체내로 integration되고 그결과 변이부위는 Fig. 2에 나타난



**Fig. 2.** *In vitro*에서 제작된 mutation(X)을 염색체내로 도입하는 과정의 도해. 염색체내로의 integration후 그림하단의 점선으로 표시된 부위, 즉 vector와 이중으로 존재하는 염색체 DNA부위는 looping-out에 의해 제거될 수 있다.

바와 같이 염색체 상에 도입되게 되는데 이중으로 존재하는 염색체 부위 및 vector는 looping-out에 의해 제거될 수 있다. 한편 integrational vector는 insertional mutagenesis의 수단으로도 이용될 수 있다.

**Bacillus의 형질전환**

*Bacillus*의 형질전환은 크게 두가지 부류의 방법에 의해 이루어질 수 있다. 그 하나는 자연계에서 자연적으로 일어나고 있는 형질전환방식을 이용하는 것이며 다른 하나는 인위적 방법에 의한 것이다. 전자에 속하는 것으로는 자연적 competence를 이용한 transformation, bacteriophage를 이용한 transduction, 그리고 두 세포가 물리적으로 접촉된 상태에서 conjugative transposon 또는 conjugative plasmid와 더불어 DNA(숙주세포의 염색체 일부 또는 plasmid)가 전달되는 conjugation이 있으며, 인위적인 방법으로는 protoplast에 의한 transformation방법과 전기도입법이 이용되고 있다.

(1) Transformation

자연적 competence에 의한 transformation은 주로 *B. subtilis*를 대상으로 수행되고 있다. *B. subtilis*의 자연적 competence는 성장과정중 영양원의 고갈에 의해 생기게 되며 시기적으로는 대수증식기에서 정지기로 넘어가는 시기에 일어난다. *B. subtilis*의 competent 세포를 만드는 방법은 1961년 Spizizen(5,6)에 의해 처음 보고되었으며 *B. subtilis*를 특별히 조성된 배지(일종의 최소배지)에서 증식시켜 세포들이 대수증식을 마치고 정지기에 들어갈때 competent 상태가 되도록 하는 것이다. 이 방법은 간단하고 재현성이 있으며 competent 세포를 얼려서 보존 가능한 장점이 있는 반면 사용된 plasmid DNA량에 대한 transformation 효율이 염색체 DNA의 경우에 비해 낮은 단점이 있다(7).

Competent 세포의 transformation 과정은 몇가지 단계, 즉 binding, fragmentation, uptake로 구분되며 염색체 DNA의 경우 여기에 integration과 resolution의 단계를 거쳐 형질전환이 이루어진다. 여러 연구에 의해 CCC형태의 monomeric plasmid로는 transformation이 되지 않거나 그 효율이 매우 낮은 반면 trimer이상의 multimeric plasmid에 의해서는 높은 효율로 transformation된다는 중요한 사실이 밝혀졌다(8,9).

### (2) Transduction

바이러스를 매개체로 하여 이루어지는 transduction을 위해서는 DNA의 donor와 recipient 모두 phage의 숙주로서 작용할 수 있어야 한다. Phage를 매개체로 한 transduction은 크게 두가지로 구별된다. 하나는 generalized transduction으로 transducing phage particle은 단지 donor 세포의 DNA만을 가지며 넓은 범위의 숙주세포 염색체 DNA를 한꺼번에 옮길 수 있다. 다른 하나는 specialized transduction으로 숙주의 염색체내로 integration되는 temperate phage에 의해서 일어난다. 여기서는 prophage에 인접한 숙주의 유전자만이 다른 세포로 옮겨질 수 있다.

*B. subtilis*로 부터 발견된 많은 phage중 transduction을 일으킬 수 있는 phage는 일부이며 그중 generalized transduction을 위해 가장 많이 이용되어온 것은 PBS1(10,11)이다. PBS1은 매우 큰 phage로 하나의 virion내에 숙주군 전체 염색체 DNA의 6~8%(대략 250 kb)까지 담아 옮길 수 있다(12). 이러한 성질은 *B. subtilis* 염색체의 mapping에 절대적으로 중요한데 marker간의 거리가 매우 멀어 다른 방법으로는 cotransformation 이 불가능한 경우도 이들을 이용한 transduction에 의해서는 가능하다(13,14). 제한적 transformation을 위해서는  $\Phi 105$ 와 SP $\beta$  phage 등이 많이 이용되고 있다.

### (3) Conjugation

박테리아에서의 conjugation은 여러가지의 conjugative transposon(15)과 conjugative plasmid에 의해 일어나는데 매우 흥미있는 사실은 이들에 의해 종내 및 종간의 유전자교환은 물론 그람양성균과 그람음성균간의 유전자교환도 일어난다는 사실이다(16,17,18,19). 이때 conjugative transposon 또는 conjugative plasmid의 이동과 함께 숙주세포의 염색체 DNA 일부 및 다른 plasmid도 옮겨지는 경우가 있어 유전학적 연구에 이용되고 있다.

*Bacillus*에서 이용되는 conjugative transposon으로는 *E. faecalis*에서 분리된 Tn916(20), *Streptococcus pyogenes*에서 분리된 Tn3701(20a), *S. pneumoniae*에서 분리된 Tn1545(21) 등이 있다. 한편 conjugative plasmid로는 *B. subtilis* var. natto에서 분리되어 pLS20으로 명명된 plasmid가 있는데 pBC16과 pUB110 계열의 plasmid를 donation mechanism에 의해 함께 이동시킬 수 있는 것으로 알려졌다(19).

### (4) 전기적 형질전환법(electrotransformation)

전기적 형질전환법은 고압의 전기쇼크를 사용하여 세포로 생물산입

하여금 DNA를 받아들이게 하는 매우 강력한 방법으로 competence나 protoplast를 이용한 형질전환이 잘 되지않는 *Bacillus*균주를 형질전환시키는 목적으로 주로 이용되고 있다.

### (5) Protoplast 형질전환법

*Bacillus*의 protoplast 형질전환은 1979년 Chang과 Cohen에 의해서 처음 시도 되었는데 plasmid에 의해 competence가 결여된 *B. subtilis* 세포를 효율적으로 형질전환시키고자하는 것이 목적이었다(22). 적당한 삼투압조건하에서 lysozyme을 이용하여 세포벽을 제거함으로써 protoplast를 만들며, polyethylene glycol의 존재하에 plasmid DNA transformation을 시도한후 적당한 조건의 regeneration 배지상에서 정상세포로 성장시키는 것이 주요 과정이다. 이 방법에 의한 형질전환 효율은 상당히 높은편이다. Protoplast 형질전환의 중요한 특징 중 하나는 plasmid DNA가 double-strand 상태로 uptake 된다는 점이다(23). 따라서 이 방법에 의하면 competence에 의한 형질전환과는 달리 CCC monomer나 open circular monomeric plasmid에 의해서도 multimer와 같은 효율로 형질전환이 이루어진다(24).

한편 protoplast 형질전환방법은 *B. subtilis* 뿐 만아니라 *B. amyloliquefaciens*(25), *B. licheniformis*(26), *B. stearothermophilus*(27,28), *B. anthracis*(29), 및 다른 여러종의 *Bacillus* (30)에 적용가능하다. 그러나 생성된 protoplast가 매우 약하여 깨지기 쉬우며, 전반적으로 노동력이 많이 들고 재현성이 떨어지는 단점이 있다. 그밖에 regeneration효율이 1~10%로 낮은점, regeneration시 완전배지를 요구하여 prototrophic marker에 의한 형질전환주의 직접 선별이 곤란한점, 긴 regeneration 기간이 필요한점 등이 단점으로 지적되고 있다. 한편 competent 세포의 형질전환과는 반대로 plasmid 크기가 클수록 protoplast 형질전환 효율이 낮아지는 것으로 나타났는데(31,32) 이는 커다란 DNA 조각을 크로닝하고자 할때 중대한 제약조건이 되고 있다. Protoplast 형질전환과 전기도입법 두 경우 모두 염색체 marker에 대한 형질전환은 성공적이지 못했으며 plasmid나 phage 계놈같이 완전한 replicon을 갖는 DNA에 대해서만 성공적인 것으로 보고되고 있다.

## Bacillus를 숙주로 한 유전자의 크로닝 및 발현

### Cloning vectors

#### (1) Plasmids

*Bacillus*에서 사용가능한 plasmid의 개발은 *S. aureus*로부터 분리된 다양한 항생제내성 plasmid로부터 시작되었고 이들중 가장 대표적인 것들이 pUB110(Km<sup>r</sup>), pC194(Cm<sup>r</sup>) 및 pE194(Em<sup>r</sup>)이며 그자체로서 또는 다른 plasmid와 재조합된 형태로 개발되어 활용되고 있다. *Corynebacterium xerosis*에서 분리된 pTZ12(33), *Lactococcus lactis*에서 분리된 cryptic

plasmid pWVO1(34) 등이 *Bacillus*에서 이용가능한 것으로 보고되었고 pWVO1의 유도체 pGK12 plasmid(35)는 *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* 등의 *Bacillus*를 숙주로 이용가능한 것으로 알려 졌다. *Bacillus*로부터 분리된 plasmid들 중에는 cryptic plasmid가 대부분으로 pTA1060(36)이 한 예이며 이로부터 유도된 pHP13(31)이 많이 이용되어 왔다. 이 plasmid는 pC194, pE194, pUC9으로부터 필요한 부분을 취하여 재조합한 것인데, 4.9 kb의 작은 크기로 *B. subtilis*에서는 5 copy, 대장균에서는 200 copy를 유지하는 shuttle vector이며 *B. subtilis*를 숙주하여 크로닝하는데 있어서 매우 우수한 결과를 내는 것으로 알려지고 있다. *B. cereus*에서 분리된 pBC16(37)은 tetracycline 내성을 나타내며 *B. subtilis*, *B. thuringiensis* 등을 숙주로 이용할 수 있다.

지금까지 살펴본 plasmid들은 10 kb 미만의 작은 것들로서 소위 "rolling-circle replicating(RCR) plasmid"이다. 이들은 partitioning을 조절하는 특별한 기능이 없는 것으로 보이며 random partitioning에 따른 불안정성을 많은 copy수로써 극복하는 것으로 여겨진다. 또한 single-strand의 중간단계를 거치는 관계로 구조적 불안정성을 내포하고 있으며 특히 커다란 DNA 조각을 크로닝할 경우 더욱 문제가 된다. 이와는 대조적으로 안정된 partitioning이나 안정된 구조를 유지하는 새로운 부류의 plasmid, 소위 "theta replicating plasmid"가 발견되어 이용되고 있다(38). 이들은 22~34 kb의 매우 큰 plasmid들로서 *E. faecalis*에서 분리된 pAMβ1(39)이 대표적인 예이다. pAMβ1을 이용하여 제작된 유도체 pHV1431(38)은 *B. subtilis*에서 200에 달하는 매우 높은 copy수를 유지하며 구조적 안정성을 나타내어 많이 이용되고 있다.

## (2) Phage vectors

여러 temperate phage를 대상으로 유전자 크로닝 또는 발현 벡터를 개발하기 위한 많은 연구가 이루어 졌는데 그중 대표적인 것이 Φ105(40)와 SPβ(41)이다. Phage Φ105는 크기가 39.2 kb이며 이로부터 'prophage transformation'(42)이나 'direct transfection'을 위한 많은 벡터가 개발 되었다. SPβ는 120 kb의 매우 큰 phage(43)로 *B. subtilis* strain 168 및 이로부터 유도된 모든 균주에 prophage상태로 들어 있다. 이 phage로부터 개발된 vector의 장점중 하나는 10 kb 이상의 커다란 DNA 조각을 옮길 수 있다는 것이다(44). 이 벡터들을 이용하면 단일 copy의 유전자를 염색체상에 안정되게 삽입할 수 있어서 complementation 분석이나 유전자의 발현 연구 뿐 아니라 재조합 유전자의 과발현 등의 목적에 매우 유용한 것으로 밝혀지고 있다. 또한 *B. subtilis*를 직접 숙주로 하여 크로닝을 할 수 있다는 것이 장점이다.

## 외래유전자 발현 숙주로서의 *Bacillus*균주

재조합유전자의 cloning 및 expression을 위한 그람양성 숙

주로 *B. subtilis*가 가장 많이 이용되어 왔다. 여기에는 세가지 큰 이유가 있는데 첫째, GRAS 미생물로서 이로부터 생산되는 산물의 안전성이 쉽게 확보될 수 있다는점, 둘째, 단백질 분비 시스템이 잘 발달되어 있어 외래단백질의 고생산이 가능하다는점, 셋째, 연구모델로서 오랫동안 연구되어온 결과 생리학적 및 유전학적 연구결과가 많이 축적되어 있고 나아가 발효방법이나 산물의 회수기술 등이 잘 개발되어 있는 점이다. 보다 유용한 단백질 분비생산용 숙주개발을 위해 여러 연구팀들은 protease deficient mutant를 개발하여 왔는데 Wong 등은 7가지의 extracellular protease가 inactivation되어 wild type의 0.15%로 extracellular protease 역가가 낮아진 WB600주를 개발하였으며(45) Koide 등과 Sloma 등은 intracellular protease가 inactivation된 균주를 제작하였다(46-48).

Udaka 등은 *B. subtilis*의 단점을 보완할 수 있는 host-vector 시스템을 오랫동안 연구해온 결과 *B. brevis* 시스템을 개발하였는데 (49,50) *B. subtilis*에 비해 매우 낮은 수준(~0.02%)의 extracellular protease를 내는 것이 장점이며 middle cell-wall protein(MWP)의 promoter 및 signal sequence를 이용한 secretion vector를 개발하여 다른 미생물유래 효소의 경우 2 g/L 까지 eukaryotic protein의 경우 250 mg/L까지의 분비생산수율을 달성하여 유용성이 큰 것으로 평가된다.

## *Bacillus*에서의 gene expression system

*Bacillus*에서의 재조합유전자의 발현시스템은 크게 두가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 plasmid를 이용한 시스템이고 다른 하나는 염색체상에 도입하여 발현시키는 시스템이다. Plasmid를 이용한 시스템은 제작이 용이하고 high copy number를 유지할 수 있는 반면 시스템이 불안정한 단점이 있다. 이를 극복하기 위한 시도로서 염색체상에 발현시스템을 도입하게 되었는데 integration vector를 이용 homologous recombination을 통해 도입할 수 있다. 염색체상에 도입된 유전자는 일반적으로 항생제의 농도를 높임에 따라 copy수가 증폭 되는데 pUB110의 kanamycin resistance gene 사용시 최고 50 copy, pC194의 chloramphenicol resistance gene 사용시 최고 36 copy까지 증폭이된 보고가 있다(51,52). 그러나 염색체상에 도입된 상태에서도 recombination에 의한 불안정성이 야기될 수 있으며 염색체상의 어느 지점에 도입되었는지에 따라 recombination 빈도가 크게 달라질 수 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 copy수가 증폭된다해서 목적하는 산물의 생산이 항상 비례하여 증가되는 것은 아니므로 경우에 따라 적절한 수준을 선택해야 할 것이다.

## 분화제어와 균주유종

### *Bacillus*의 분화

*Bacillus*균은 영양원의 고갈 등 환경악화에 따라 대수증식기에서 정지기로 옮겨가면서 정교한 적응변화, 즉 세포외로 고분자물질 분해효소 및 항생물질의 생산·분비, competence 발현, 운동성의 발달 및 마지막 단계로 포자형성에 이르는 분화를 하게 된다. 이러한 분화과정을 이해하고 나아가 이를 제어하는 일은 균주를 육종하는데 있어서 매우 중요하다.

**Signal transduction**

*Bacillus*균이 환경조건의 변화에 적응하기 위해 반응을 나타내는 과정에서 환경의 변화를 감지하고 이를 세포내로 전달하여 적절한 대응을 할 수 있도록 하는 소위 signal transduction이 이루어지는데 그 기작을 밝히기 위해 많은 연구가 이루어졌다. 신호전달기작 그 자체를 밝히는 일도 의미가 크지만 이는 곧 균주육종을 위한 요소가 될 수 있으므로 더욱 중요하다. 현재까지 알려진 가장 보편적인 신호전달기작은 two-component system, 즉 두가지 조절단백질이 쌍을 이루어 한 단백질이 다른 단백질의 활성을 제어하는 방식으로 이루어져 있다. 두가지 단백질중 하나는 histidine protein kinase(동시에 phosphatase로서의 기능도 지님)로서 세포외로부터의 신호를 직접 또는 간접으로 받아들인후(그 결과 autophosphorylation됨) 이 신호를 두번째 단백질인 response regulator에 전달(phosphorylation)한다. 이렇게하여 활성화된 regulator는 일반적으로 transcriptional activator로서 작용하여 target이 되는 유전자의 발현을 촉진한다.

*B. subtilis*균을 대상으로 밝혀진 two-component regulatory system들을 Table 1에 나타내었다. 많은 regulatory protein의 경우 pleiotropic phenotype을 나타낸다. 즉 한가지 target이 아닌 여러 target 유전자의 발현에 영향을 미친다. 가장 잘 알려진 것중 하나가 DegS-DegU 시스템이다. 이 시스템은 주로 *sacB* 유전자의 산물인 levan sucrase의 고생산 변이주들을 연구하는 과정에서 밝혀졌는데 DegS는 'receiver'로서 외부로부터의 신호를 받아들여 autophosphorylation된 다음 'regulator'인 DegU를 phosphorylation 시키는 kinase로 작용하는 것으로 밝혀졌다. 또한 DegS는 조건에 따라 phosphatase로서의 기능

도 수행하는 것으로 알려졌다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 Phosphorylation된 DegU(DegU~P)는 여러가지 분해효소 유전자의 transcription을 활성화시킴으로써 이들 효소의 생산을 증가시킨다. 그러나 흥미롭게도 DegU~P는 competence의 발현에 대해서는 negative regulator로서 작용하며 dephosphorylation된 DegU가 competence의 발현에 필요한 것으로 밝혀짐으로써 하나의 regulatory protein이 *Bacillus*의 signal transduction에 있어서 한가지 이상의 기능을 수행하거나 다른 regulatory protein과 연계되어 작용할 수 있음을 짐작케 한다. Levan sucrose의 고생산을 일으키는 것으로 잘 알려진 *degS* 100(Hy), *degS*200(Hy), *degU*24(Hy), *degU*31(Hy), *degU*32(Hy) 등의 돌연변이(53-58)는 DegS 또는 DegU단백질상에서 아미노산 변이가 일어나 그결과 DegU~P가 높은 비율로 형성되거나 일단 형성된 DegU~P가 안정화(즉 dephosphorylation이 지연)됨으로써 DegU~P의 activator로서의 기능이 증폭되어 나타난 것이다.

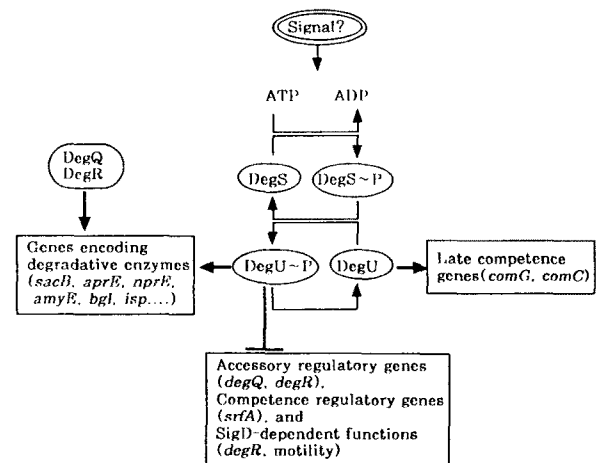
DegS-DegU시스템과 유사한 기작으로 작동되는 다른 여러가지의 two-component regulatory system에 의해 chemotaxis, competence, phosphate assimilation, sporulation 등에 관련된 신호전달 및 유전자 발현의 조절이 일어나며 이러한 기작의 이해는 분자생물학적 방법에 의한 균주육종의 바탕이 된다.

**Transition state regulators**

*Bacillus* 세포가 대수증식기에서 정지기로 옮겨가면서 signal transduction network이 가동되고 이들이 어떤 경로를 통해서든 종합되어 어떤 분화과정에 들어갈 것인지 소위 'decision-making'이 이루어 질 것이다. 즉 amylase, protease 등의 분해효소를 생산하여 분비할 것인지, 항생물질을 생산할

**Table 1.** Two-component regulatory pairs of *B. subtilis*

Histidine protein kinase	Response regulator	Adaptive-response
CheA	CheY and CheB	Chemotaxis
ComP	ComA	Competence
DegS	DegU	Degradative enzyme production, competence
PhoR	PhoP	Phosphate assimilation
SpoIIJ and KinB	Spo0F and Spo0A	Sporulation
Urf-1	Urf-2	?
OrfX-18	OrfX-17	?



**Fig. 3.** Pleiotropic regulation by the DegS-DegU signal transduction pathway controlling degradative enzyme synthesis and competence gene expression in *B. subtilis* (Symbols: →, positive regulation; -, negative regulation).

Table 2. Regulatory proteins that control late-growth development

Regulatory protein	Size in amino acids	Characteristics
AbrB	96	- DNA binding protein represses <i>spoOH</i> , <i>spoVG</i> , <i>spoOE</i> , <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , mot regulon - essential for competence - activates <i>comK</i> , <i>hpr</i>
ComA	214	- response regulator essential for late com genes - represses sporulation when over produced
DegQ	46	- activates <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>amyE</i> , when overproduced : competence and motility are inhibited
DegR	60	- activates <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>sacB</i> , when overproduced
DegT	372	- activates <i>aprE</i> , <i>sacB</i> , when overproduced : causes glucose resistant sporulation and lowers competence, autolysin production and flagellar formation
Hpr	119	- DNA binding protein represses <i>nprE</i> , <i>aprE</i> , <i>sinR</i>
Pai ORF1	172	- inhibits sporulation, <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>sacB</i> , <i>phoA</i> when overproduced - disruption of ORP1 gives glucose and glutamine insensitive sporulation
SinR	111	- DNA binding protein represses <i>aprE</i> , <i>nprE</i> , <i>sopIIA</i> , <i>spolIE</i> , <i>sopIIG</i> : essential for motility and competence and autolysin production
SinI	57	- antagonizes SinR function at level of protein
Spo0A	267	- DNA binding protein of response regulator class : is phosphorylated by phosphorelay, then represses <i>abrB</i> and activates <i>spIIA</i> , <i>spolIE</i> , <i>spolIG</i>

것인지, 운동성이나 competence를 발현시킬 것인지 아니면 최후의 수단으로 sporulation을 할 것인지를 결정해야 할 것이며 이는 *Bacillus*의 생존경쟁에 있어서 매우 중요하기때문에 신중히 하지 않으면 안될 것이다. 위에 언급한 two-component system을 포함하여 late-growth development에 관여하는 많은 종류의 regulatory protein 및 이들을 coding하는 유전자들이 계속 밝혀지고 있다(59). 잘 알려진 것들로는 AbrB, ComA, DegQ, DegR, DegT, Hpr, Pai(ORF1), SinR(and SinI), Spo0A 등이 있으며 이들의 특성을 Table 2에 간단히 정리하였다. 이들은 모두 pleiotropic effects를 나타낸다. 이들을 coding하는 유전자의 발현을 조절함으로써 목적하는 유용산물의 생산을 직접 향상시키거나 *Bacillus*균의 생리를 변화시켜 간접적으로 생산성을 증진시킬 수 있다.

앞으로 새로운 regulatory protein의 발굴가능성은 크다고 생각된다. 현재 활발히 진행되고 있는 *B. subtilis*의 total genome sequencing project를 통해 밝혀진 중요한 사실은 새로 드러난 open reading frame의 30~50%가 기존의 database와 상동성을 가지지 않으며 현재 그 기능이 규명되지 않은 상태라는 것이다(60-64). 이러한 사실은 새로운 유용 유전자원의 발굴가능성이 큼을 뒷받침한다. 또한 대부분의 연구가 *B. subtilis*를 대상으로 이루어 졌고 산업적으로 중요한 다른 많은 *Bacillus*균주에 대해서는 아직 미개척 유전자원이 많다고 생각된다.

### Sporulation 제어

포자형성은 세포분화연구의 모델로서 의미가 크고 또한 식품가공 및 무균제품을 생산하는 산업에 있어서 중요하게 인식되어 많은 연구가 이루어졌다. 널리 알려진 바와 같이 포자형

성이 진행되는 동안 여러 종류의 RNA polymerase holoenzymes이 등장하되  $\sigma^H \rightarrow \sigma^F \rightarrow \sigma^E \rightarrow \sigma^G \rightarrow \sigma^K$ 와 같은 sigma factor cascade(65)를 이루며 관련 유전자들을 선택적으로 발현시킨다. *Bacillus*에서 분리된 많은 유전자들에 있어서 서로 다른 sigma factor에 대해 작용하는 복수의 promoter가 자주 발견 되는데 우리가 어떤 특정 유전자를 *Bacillus*내에서 고발현시키고자 할때 이러한 사실을 염두에 두어야 할 것이다. 또한 sigma factor를 coding하는 유전자 또는 processing에 관련된 유전자의 발현조절이나 Table 2에 기술한 AbrB, Spo0A 등의 regulatory protein을 이용하여 포자형성을 적당한 단계에서 지연시키거나 아니면 촉진시키는 조작이 가능할 것이며 이러한 조작은 *Bacillus*가 어떤 산물을 생산하는데 있어서 커다란 영향을 미칠 수 있다.

### 효소 및 외래단백질 생산을 위한 *Bacillus*균주 개발

세포외로 분비되는 분해효소의 생산균주를 개발하고자 할 때 일반적으로 고려되어야할 요소들이 있다. 우선 우수한 산업적 생산균주가 되기 위해서는 고수율, 고농도로 효소를 생산해야한다. 그러나 야생 분리주의 경우 산업적 용도로는 이용할 수 없는 낮은 생산성을 보이는 것이 대부분이다. 높은 수준의 효소 생산을 막는 요인중 하나가 catabolite repression 이다. Glucose와 같이 쉽게 이용될 수 있는 carbon source 존재시 여러가지 분해효소의 생산이 저지되는 현상으로 저항성 mutant를 개발하여 이를 극복할 수 있다. 다른 요인으로는 specific inducer를 요구하는 것을 들 수 있다. 배지중에 inducer

가 없을 경우 repressor protein이 효소유전자의 발현을 저지하게 되는데 inducer의 가격이 너무 비싼 경우 대량생산에 이용할 수 없다. 이 경우에도 repressor 자체나 repressor가 작용하는 유전자부위(regulatory site)에 mutation을 유도하여 constitutive mutant를 제작함으로써 극복할 수 있다. 생산성과 관련된 또하나의 요인으로 secretion 효율을 들 수 있다. Secretion 효율에는 proteolytic processing과 같은 posttranslational modification이 요인이 될 수 있으며 또한 cell wall의 구조변화가 큰 영향을 미칠 수 있다. 이러한 요소들을 이용하여 균주를 개발하기 위해 고전적인 방법으로는 NTG 등과 같은 mutagen의 처리후 mutant를 선별하는 방법을 사용해 왔고 좋은 성과를 거둔 사례도 많다. 이와 같은 개개의 mutation을 종합하여 생산성이 더욱 향상된 균주를 개발하는데 분자생물학적인 방법이 도입됨에 따라 균주개발이 보다 더 효율적으로 이루어지게 되었으며 이러한 바탕위에 앞에서 언급한 다양한 regulatory gene들의 기능을 이용하고 sporulation 등 분화과정의 체계적 제어가 가능해짐에 따라 균주개발은 더욱 고도화되고 있다.

지난 10여년간 *Bacillus*를 외래단백질 생산을 위한 숙주로서 이용하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다. *Bacillus*균을 대상으로 오랫동안 amylase, protease 등의 효소생산을 위한 연구가 이루어져 균주의 생리, 발효 및 downstream process에 대한 충분한 기반지식이 확보되어 있고, 병원성이 없고 endotoxin을 만들지 않으며, 분비시스템이 잘 발달되어 있는 점 등이 *Bacillus*가 갖는 장점이다. *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*의 amy, apr, npr, sacB 유전자의 promoter와 signal sequence를 이용하여 expression-secretion vector를 제작한 보고가 많이 있으며 유용 인체단백질, 효소 및 항체생산 등에 적용하여 좋은 성과를 거두고 있다(66-70).

## 참고문헌

- Claus, D., and D. Fritze. 1989. Taxonomy of *Bacillus*, p5-26, In C.R. Harwood(ed.), *Biotechnology Handbooks*, 2. *Bacillus*. Plenum Press, New York.
- Balassa, G. 1969. *Mol. Gen. Genet.* **104**, 73-103.
- Ferrari, F. A. et al. 1983. *J. Bacteriol.* **154**, 1513-1515.
- Michel, B., B. Niaudet and S. D. Ehrlich. 1983. *Plasmid*, **10**, 1-10.
- Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen. 1961. *J. Bacteriol.* **81**, 741-746.
- Young, F. E. and J. Spizizen. 1961. *J. Bacteriol.* **81**, 823-829.
- Contente, S. and D. Dubnau. 1979. *Mol. Gen. Genet.* **167**, 251-258.
- Canosi, U., G. Morelli and T. A. Trautner. 1978. *Mol. Gen. Genet.* **166**, 259-267.
- Mottes, M. et al. 1979. *Mol. Gen. Genet.* **174**, 281-286.
- Takahashi, I. 1961. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **5**, 171-175.
- Takahashi, I. 1963. *J. Gen. Microbiol.* **31**, 211-217.
- Henner, D. J. and J. A. Hoch. 1980. *Microbiol. Rev.* **44**, 57-82.
- Dedonder, R. A. et al. 1977. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 989-993.
- Vandeyar, M. A. and S. A. Zahler. 1986. *J. Bacteriol.* **167**, 530-534.
- Gawron-Burke, C. and D. B. Clewell. 1982. *Nature* **300**, 281-284.
- Bertram, J. M. Stratz and P. Durre. 1991. *J. Bacteriol.* **173**, 443-448.
- Christie, P. J. et al. 1987. *J. Bacteriol.* **169**, 2529-2536.
- Guffanti, A. A. et al. 1991. *J. Bacteriol.* **173**, 1686-1689.
- Koehler, T. M. and C. B. Thorne. 1987. *J. Bacteriol.* **169**, 5271-5278.
- Franke, A. E. and D. B. Clewell. 1981. *J. Bacteriol.* **145**, 494-502.
- Le Bouguenec, C. et al. 1988. *J. Bacteriol.* **170**, 3930-3936.
- Buu-Hoi, A. and Horodniceanu. 1980. *J. Bacteriol.* **143**, 313-320.
- Chang, S. and S. N. Cohen. 1979. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111-115.
- deVos, W., G. Venema. 1981. *Mol. Gen. Genet.* **182**, 39-43.
- Gryzcan, T. J. et al. 1980. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 459-467.
- Vehmaanpera, J. 1988. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**, 101-105.
- Jensen, K. K. and M. F. Hullet. 1989. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2283-2287.
- Imanaka, T. et al. 1982. *J. Bacteriol.* **149**, 824-830.
- Zhang, M. et al. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3162-3164.
- Makino, S-I. et al. 1987. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**, 45-48.
- Mann, S. P. et al. 1986. *Curr. Microbiol.* **13**, 191-195.
- Haima, P. et al. 1987. *Mol. Gen. Gen.* **209**, 335-342.
- Haima, P. et al. 1988. *Mol. Gen. Gen.* **213**, 364-369.
- Aoki, T. et al. 1987. *Gene* **51**, 107-111.
- Vosman, B. and G. Venema. 1983. *J. Bacteriol.* **156**, 920-921.
- Kok, J. et al. 1984. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 726-31.
- Uozumi, T. et al. 1980. *J. Bacteriol.* **142**, 315-318.
- Bernhard, K. et al. 1978. *J. Bacteriol.* **133**, 897-903.
- Janniere, L., C. Bruand and S.D. Ehrlich. 1990. *Gene* **87**, 53-61.
- Leblanc, D. J. and L. N. Lee. 1984. *J. Bacteriol.* **157**, 445-453.
- East, A. K. and J. Errington. 1989. *Gene* **81**, 35-43.
- Poth, H. and P. Youngman. 1988. *Gene* **73**, 215-226.
- Kawamura, F. et al. 1979. *Gene* **5**, 87-91.
- Spancake, G. A. and H. E. Hemphill. 1985. *J. Virol.* **55**, 39-

- 44.
44. Poth, H. and P. Youngman. 1988. *Gene* **73**, 215-226.
45. Wong, S.-L., et al. 1995. Production and purification of antibody using *Bacillus subtilis* as an expression host, p. 100-107. In H. Y. Wang and T. Imanaka(ed), Antibody expression and Engineering. American Chemical Society, Washington, DC.
46. Koide, Y. et al. 1986. *J. Bacteriol.* **167**, 110-116.
47. Sloma, A. et al. 1988. *J. Bacteriol.* **170**, 5557-5563.
48. Sloma, A. et al. 1990. *J. Bacteriol.* **172**, 1024-1029.
49. Udaka, S. et al. 1989. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **7**, 113.
50. Udaka, S. and H. Yamagata. 1993. *Methods in Enzymol.* **217**, 23-33.
51. Janniere, L. et al. 1985. *Gene* **40**, 47-55.
52. Piggot, P. et al. 1987. *J. Bacteriol.* **169**, 1260-1266.
53. Dahl, M. K. et al. 1991. *J. Bacteriol.* **173**, 2539-2547.
54. Dahl, M.K. et al. 1992. *J. Biol. chem* **267**, 14509-14514.
55. Klier, A. et al. 1992. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 429-459.
56. Henner, D. J., M. Yang, and E. Ferrari. 1988. *J. Bacteriol.* **170**, 5102-5109.
57. Msadek, T. et al. 1990. *J. Bacteriol.* **172**, 824-834.
58. Tanaka, T. et al. 1991. *J. Bacteriol.* **173**, 5507-5515.
59. Smith, I. 1993. Regulatory proteins that control late-growth development. In *Bacillus subtilis* and other Gram-positive Bacteria(Sonenshein A.L. J.A.Hoch and R. Losick, ed), pp. 785-800.
60. Cosmina, P. et al. 1993. *Mol. Microbiol.* **8**, 821-831.
61. Glaser, P. et al. 1993. *Mol. Microbiol.*, **10**, 371-384.
62. Ogasawara, N. et al. 1995. *Microbiology* **141**, 257-259.
63. Ogawa, K. et al. 1995. *Microbiology* **141**, 269-275.
64. Sorokin, A. et al. 1993. *Mol. Microbiol.* **10**, 385-395. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
65. Stragier, P. and R. Losick, 1990. *Mol. Microbiol.* **4**, 1801-1806.
66. Honjo, M. et al. 1987. *J. Biotechnol.* **6**, 191-204.
67. Bellini, A. V. et al. 1991. *J. Biotechnol.* **18**, 177-192.
68. Parente, D. et al. 1991. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 243-249.
69. Wu, X.-C. et al. 1992. *Biotechnology* **11**, 71.
70. Saunders, C. W. 1987. *J. Bacteriol.* **169**, 2917-2925.