

## 유전자 cloning에 의한 *Bacillus subtilis*의 fibrinolytic enzyme 활성 변화

이홍석<sup>1</sup> · 유천권<sup>2</sup> · 이철수<sup>1</sup> · 강상모\*

<sup>1</sup>한국보건산업진흥원, <sup>2</sup>국립보건원, 건국대학교

**Variation of fibrinolytic enzyme activity produced from *Bacillus subtilis* by gene cloning.** Lee, Hong-Seok<sup>1</sup>, Cheon-Kwon Yoo<sup>2</sup>, Chul-Su Lee<sup>1</sup>, Sang-Mo Kang\*. <sup>1</sup>Korea Health Industry development Institute, Seoul 156-050, Korea, <sup>2</sup>Department of Microbiology, National Institute of Health, Seoul, 122-701, Korea, 93-1 Mojin-dong, Guangleon-Gu, Department of Microbiological Engineering, Kun-Kuk University, Seoul 143-701, Korea – The transformation of *Bacillus subtilis* K-54 and J-10 was carried out with constructed vectors containing structure and enhancer genes of *aprN* and *prtR*, to increase their fibrinolytic enzyme activity. Bands for the *aprN* and *prtR* genes were identified from *B. subtilis* J-10 by PCR that was carried out with the constructed primers for the genes. In addition, the gene fragments contained promoter site based on the results of analysing their nucleotide sequence. The two gene fragments, *aprN* and *prtR*, obtained by the PCR, were, then, inserted to vector such as T-vector and *E.coli/Bacillus* shuttle vector. The constructed vector were designated as pAPR2 (*aprN*), pENC2 (*prtR*) and pFLA1 (*aprN* and *prtR*), respectively. The constructed vector was used for transformation of the strains of *B. subtilis* J-10 and *B. subtilis* K-54 and the fibrinolytic activity of the transformed strains was investigated. The introduction of the vector, pAPR2 and pFLA1, resulted in the increase of fibrinolytic enzyme activity in *B. subtilis* J-10 by 27.3 % and 16 %, respectively. However, the introduction of pENC2 to *B. subtilis* J-10 did not seem to induce increase of the enzyme activity. The strain of *B. subtilis* K-54 transformed with pENC2 showed an increased fibrinolytic activity by 5 folds compared with that of the original strain of *B. subtilis* K-54.

**Key words:** fibrinolytic activity, gene cloning, *Bacillus subtilis*

*Bacillus*속에 속하는 균주의 가장 큰 특징 중의 하나는 다양한 종류의 효소를 세포 외로 분비하는 것이며[10] 대체로 균의 성장 곡선의 대수기말에 생산한다[1].

현재까지 7종류의 protease가 세포 외로 분비되는 것으로 알려져 있으며 이들의 유전자는 모두 cloning되어 염기서열이 밝혀져 있다. 알려진 7종류의 protease 유전자는 alkaline protease (subtilisin)를 암호화하는 *apr* [2], neutral protease를 암호화하는 *npr* [18], bacillopeptidase F를 암호화하는 *bpr* [14], Epr protease를 암호화하는 *epr* [15], metalloprotease를 암호화하는 *mpr* [14], neutral protease B를 암호화하는 *nprB* [18], 그리고 Vpr을 암호화하는 *vpr* [13] 유전자가 있다. Vpr protease 중 alkaline protease와 neutral protease가 *Bacillus*속의 균주가 분비하는 효소의 90% 이상을 차지하고 있으며[9] metalloprotease를 제외한 효소는 serine protease이다.

이러한 serine protease는 단백질의 분해능이 매우 뛰어나며 서구에서는 이미 1950년대 산업화에 성공하여 다양한 방면에 널리 사용하고 있다[5, 11]. 동양에서는 전통 발효

식품에서 많은 *Bacillus*속의 균주들이 분리되고 있으며[20], 분리된 균주들은 많은 양의 amylase와 protease를 분비하며 그 대표적인 균주가 *B. subtilis* var. *natto*[6]이다. 특히 이 균주는 두 종류의 protease, 즉, subtilisin으로 알려진 serine protease와 metalloprotease인 neutral protease를 다양 분비하는 것으로 알려졌는데 [17, 21] 이 중 serine protease인 subtilisin은 fibrin의 분해능이 뛰어나 nattokinase라고 불리기도 한다. 이 nattokinase [17]는 강력히 fibrin을 분해하기 때문에 plasmin과 유사한 serine protease로 생각되었으나 일반적으로 사용되는 antiplasmic agent인 EMCA 등에는 저해를 받지 않는 fibrinolytic enzyme으로 [3] *aprN* 유전자에 의해 암호화되고 있으며 약 1.6kb의 크기를 갖는다.

그러나 *B. subtilis*가 protease 활성이 높은 이유는 효소 자체의 활성이 클 뿐만 아니라 효소의 생산을 증가시키는 enhancer 때문이기도 하다. *B. subtilis* IMA1212주를 배양했을 경우 배양 상청액은 다른 *B. subtilis*의 상청액에 비하여 15-20배의 단백질 분해능을 나타내는데 이것은 *prtR*이라 불리는 일종의 조절유전자에 의해 다양한 효소가 생산되기 때문으로 밝혀졌다[19]. 이 유전자는 약 676bp로 이루어져 있으며 60개의 아미노산으로 구성된 단백질로 serine protease의 생산에 positive regulation을 하는 en-

\*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517  
E-mail: kangsm@kkucc.ac.kr

hancer로 최고 20배까지 효소의 생산을 증가시킨다고 보고 되었다.

따라서 본 연구에서는 구조 유전자와 조절 유전자가 fibrinolytic enzyme activity에 미치는 영향을 조사하고자 PCR을 이용하여 이 유전자들을 cloning하여 재조합 plasmid를 만들고 이미 alkaline serine protease인 fibrinolytic enzyme activity가 확인된 *B. subtilis* K-54 및 J-10을 형질전환시켜 fibrinolytic enzyme의 활성 변화를 측정하였다. 또한 재조합 DNA의 염기서열도 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주, plasmid, 배지 및 시약

전국대학교 미생물공학과에서 보관하고 있는 fibrinolytic activity를 나타내는 *Bacillus subtilis* 균주 즉, 국내에서 제조된 청국장에서 분리한 *B. subtilis* K-54 균주[22]와 일본 Natto에서 분리한 *B. subtilis* J-10 균주를 대상으로 실험하였다. 형질전환용 균주로는 *E. coli* NovaBlue (Novagen, USA)를 사용하였다. 사용한 vector로는 pCR 2.1 TOPO(Promega, USA)와 *Bacillus/E. coli* shuttle vector인 pHY300PLK(Takara, Japan)를 사용하였다. EcoRI, XbaI, BamHI 같은 제한효소는 Promega사 (USA)를 사용하였으며 ligase는 Takara사(Japan) 제품을 사용하였다. 배지는 LB 배지를 사용하였으며 기타 사용시약은 특급을 사용하였다.

### Fibrinolytic activity 및 cell growth 측정

Fibrinolytic activity는  $\alpha$ -casein을 이용한 plasmin casein unit (PCU)로 측정하였으며[22] cell growth는 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 염색체 및 plasmid DNA 분리

*B. subtilis* K-54와 *B. subtilis* J-10을 37°C에서 250 rpm으로 하루동안 진탕배양 후 원심분리하여 얻은 균체를 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 1회 세척하여 STE buffer (5 mg/mL lysozyme, 20% sucrose, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.6)로 혼탁시켜 37°C에서 1시간 30분동안 반응시켰다. SDS를 첨가 후 조심스럽게 섞은 후 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol을 넣어 혼합하고 원심분리하여 상층액을 취하였다. 다시 chloroform/isoamylalcohol으로 추출한 뒤에 상층액을 취한 후 5 M NaCl과 ethanol을 넣어 DNA를 침전시켰다. 다시 TE buffer를 넣고 RNase를 처리하여 ethanol로 침전시킨 후, 침전시킨 DNA 혼합물을 speed vac (Heto, Denmark)으로 건조시키고 TE buffer에 녹여 사용하였다. 재조합 DNA로 형질전환 시킨 *E. coli* NovaBlue로부터 plasmid를 분리하기 위하여 alkaline lysis 법을 사용하였다[7].

### *E. coli*의 competent cell 제조 및 형질전환

*E. coli*의 형질전환을 위한 competent cell은 Gietz방법을 사용하였으며[4] 제조된 competent cell은 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

### *B. subtilis*의 competent cell 제조 및 형질전환

*B. subtilis*에 재조합 DNA를 형질전환 시키는데는 Spizizen법 [16]을 사용하였다. 하루 배양한 하루 배양한 *B. subtilis* K-54와 *B. subtilis* J-10 균주를 TFI 용액 (Spizizen salt 2 mL, 2% casamino acid 0.2 mL, amino acid mixture 1 mL, 5% glucose 2 mL, 1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mL, D.W. 14.8 mL)에 접종하고 대수증식기말까지 배양하였다. 배양한 균체를 TFII 용액 (Spizizen salt 3.6 mL, 2% casamino acid 0.18 mL, amino acid mixture 0.18 mL, 5% glucose 3.6 mL, 1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 L, D.W. 28.44 mL)에 접종 후 1시간 30분동안 진탕배양하여 competent cell을 얻었다. 제조된 competent cell 1 mL에 pHY300PLK vector에 prtR과 aprN이 ligation된 재조합 DNA 10 L를 혼합하고 37°C에서 1시간 30분간 진탕 배양하고 1% skim milk가 들어있는 LB plate에 도말하여 하루 배양하여 투명 환이 생성되는 집락을 선별하였다.

### Primer 제작 및 polymerase chain reaction

분리주 *B. subtilis* J-10과 *B. subtilis* K-54로부터 nattokinase와 enhancer 유전자를 cloning하기 위하여 Genbank®로부터 이들 유전자의 염기서열을 받아 Oligomer® program과 amplify® program을 이용하여 각각의 promoter를 가지도록 primer를 제작하였다 (Fig. 1, Fig. 2). 제작된 primer와 *B. subtilis* K-54와 *B. subtilis* J-10에서 분리한 chromosomal DNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. Enhancer 유전자인 prtR에 대한 PCR조건은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 모두 25 cycle로 하였으며, nattokinase 유전자인 aprN에 대하여는 94°C에서 1분, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분씩 모두 25 cycle을 하였다. PCR 결과 나타나는 DNA 양말단의 AA를 이용하여 T-vector인 pCR 2.1 TOPO vector에 직접 ligation하였다.

### 재조합 DNA의 염기서열분석

pCR2.1 vector에 cloning된 PCR fragment의 염기서열

aprN 5' Forward primer 5' ATA GTT ATT TCG ATG CTC TAC G 3'  
3' Reverse primer 5' TCA GAG GCA GCC ATC CTT C 3'

prtR 5' Forward primer 5' AGC GTG CAT CAG CTG GAT GAA TTC 3'  
3' Reverse primer 5' TAA TGT TGT AAA ACT CTA AAC TCA 3'

Fig. 1. Primers constructed for amplification and cloning of the aprN, prtR gene.

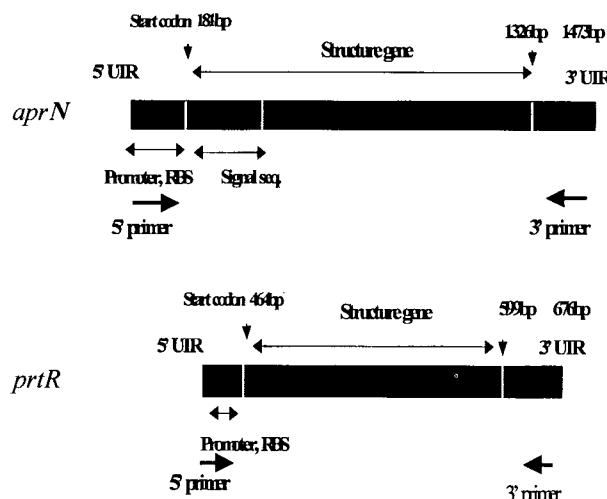


Fig. 2. Gene structure of *aprN* and *prtR* in *Bacillus* sp. used in primer design.

을 확인하기 위하여 Automatic sequencer (ABI, USA)를 사용하였다[12]. PCR 산물인 *prtR*과 *aprN*이 cloning된 재조합 plamid인 pAPR1과 pENC1을 *E. coli*로부터 분리한 후 AmpliTaq FS<sup>®</sup>가 들어 있는 terminator ready reaction mixture와 PCR로 반응시켰다. 반응후 생성된 DN는 정제하여 10 시간동안 전기영동을 실시하고 그 결과를 ABI prism<sup>®</sup> program과 Navigator<sup>®</sup> program을 이용하여 분석하였다.

#### 재조합 DNA 제조 및 형질전환

PCR로 얻어진 *aprN*과 *prtR* 얻어진 PCR fragment는 각각 APR과 ENC라고 명명한 후 pCR2.1 TOPO vector에 ligation 후 *E. coli* NovaBlue를 형질전환하여 재조합 vector인 pAPR1과 pENC1을 제조하였으며, *aprN*과 *prtR* 유전자의 DNA 단편을 *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector인 pHY300PLK에 subcloning하여 pAPR2와 pENC2를 얻었다. 얻어진 재조합 vector로 *B. subtilis* J-10를 형질전환하였으며, pAPR2는 제한효소 *Bam*H I과 *Xba*I으로 처리한 후 pENC2에 ligation하여 pFLA1을 얻어 *B. subtilis* J-10를 형질전환하여 fibrinolytic enzyme의 생산능의 변화를 조사하였다. 또한 *B. subtilis* K-54는 재조합 plasmid인 pENC2로 형질전환하여 fibrinolytic enzyme의 생산능의 변화를 조사하였다.

#### 결과 및 고찰

##### *aprN*과 *prtR*의 polymerase chain reaction

Enhancer 유전자는 *prtR*과 nattokinase 유전자는 *aprN*의 유전자의 염기서열을 GenBank로부터 확인하여 primer를 제작하여 *B. subtilis* J-10과 *B. subtilis* K-54의 chromo-

some에 대하여 PCR을 하였다. *aprN* 영역 cloning을 위한 primer는 구조유전자 뿐만 아니라 signal sequence, promoter site를 포함하고 전사 후 hairpin 구조에 의한 modification<sup>o</sup> 가능하도록 stop codon 이후 downstream으로 약 100 bp까지 선택하여 제작하였다. 또한 *prtR*에 대한 primer도 start codon보다 upstream 방향으로 약 60 bp되는 부위, stop codon으로부터 약 30 bp downstream 부위를 포함하도록 제작하였다. PCR 결과 *B. subtilis* J-10에서는 *prtR*과 *aprN*의 유전자 크기와 일치하는 600 bp, 1.4 kb의 DNA 단편을 확인할 수 있었으나, *B. subtilis* K-54주의 chromosome에서는 *prtR*과 *aprN*의 유전자를 확인할 수 없었다 (Fig. 3). 이를 볼때 *B. subtilis* K-54 주는 *prtR*유전자를 가지고 있지 않던가 또는 primer 제작에 사용된 *aprN*유전자의 untranslated region 부분이 *B. subtilis* J-10과는 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다.

#### 재조합 vector의 제작 및 염기서열 확인

Nattokinase 유전자는 *aprN*유전자의 PCR 단편 (1.4 kb)은 PCR 시 만들어지는 양 말단 AA에 양 말단이 TT로 처리된 pCR2.1 vector (3.9 kb)에 직접 ligation하여 pAPR1을 얻었다 (Fig. 4). 얻어진 재조합 vector는 약 5.3 kb로 ampicillin 내성 유전자를 가지고 있으며 lacZ 유전자가 발현되지 않았다. 이 vector에 삽입된 *aprN* 유전자를 확인하기 위하여 염기서열을 분석한 결과 primer 염기서열과 자체 promoter, shine-dalgano sequence, start codon, stop codon을 확인하였다. 염기서열 확인 후 이 유전자를 *B. subtilis* J-10과 *B. subtilis* K-54에 형질전환하기 위하여

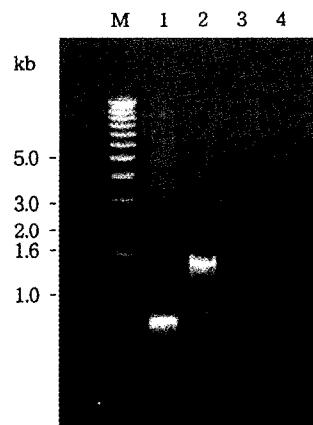


Fig. 3. Gel electrophoresis of PCR fragments on *prtR* and *aprN* genes of *B. subtilis* J-10 and K-54.

The DNA was applied to the sample slot in 3  $\mu$ l volumes containing 9% glycerol (W/V). Electrophoresis was carried out at 100 volts for 25 minutes in 0.8% agarose gel (Tris-acetate buffer). Lane M, 1 kb ladder; lane 1, *prtR* primer PCR of J-10; lane 2, *aprN* primer PCR of J-10; lane 3, *prtR* primer PCR of K-54; lane 4, *aprN* primer PCR of K-54.

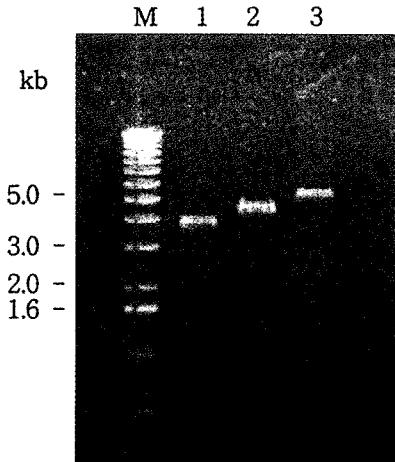


Fig. 4. Gel electrophoresis of single cut pCR vector and recombinant vectors.

The DNA was applied to the sample slot in 3  $\mu$ l volumes containing 9% glycerol(W/V). Electrophoresis was carried out at 100 volts for 25 minutes in 0.8% agarose gel (Tris-acetate buffer). Lane M, 1kb ladder; lane 1, pCR 2.1/EcoRI; lane 2, pENC1/BamHI; lane 3, pAPR1/BamHI.

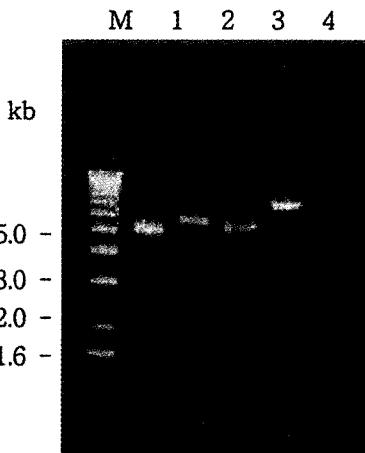


Fig. 5. Gel electrophoresis of single cut *E. coli/Bacillus* shuttle vector and recombinant vectors.

The DNA was applied to the sample slot in 3  $\mu$ l volumes containing 9% glycerol(W/V). Electrophoresis was carried out at 100 volts for 25 minutes in 0.8% agarose gel (Tris-acetate buffer). Lane M, 1kb ladder; lane 1, pHY300PLK/XbaI; lane 2, pAPR2/XbaI; lane 3, pENC2/XbaI; lane 4, pFLA1/XbaI.

*E. coli/Bacillus* shuttle vector인 pHY300PLK에 subcloning하였다. *aprN* 유전자는 그 구조유전자에 *Eco*R1, *Hind*III 등의 제한 효소부위를 가지고 있으므로 삽입된 *aprN* 유전자의 앞뒤로 위치한 pCR2.1 vector 자체 제한효소부위인 *Bam*HI과 *Xba*I 부위를 이용하여 유전자를 잘라내었다. 또한 pHY300PLK vector 역시 *Bam*HI과 *Xba*I로 잘라낸 후 calf intestinal phosphatase (CIP)로 처리 후 pAPR1에서 잘라낸 DNA 단편과 ligation하여 6.3 kb 크기의 재조합 플라스미드 pAPR2를 만들어 *B. subtilis* J-10에 형질전환시켰다.

또한, enhancer 유전자인 *prtR* 유전자에 대한 PCR 단편을 pCR2.1 vector에 ligation하여 pENC1 (4.6 kb)을 만들어 (Fig. 5) 염기서열을 분석하였다. 분석결과 자체 promoter, stop codon, start codon을 확인할 수 있었으며 Genbank®에서 상동성을 탐색한 결과 *prtR* 유전자임이 확인되었다. *prtR* 유전자는 유전자 내부에 제한효소부위를 가지고 있지 않았으므로 삽입된 *prtR* 유전자 바로 앞뒤에 있는 *Eco*R1 부위를 이용하여 잘라낸 후 역시 *Eco*R1과 CIP로 처리한 pHY300PLK에 ligation하여 pENC2 (5.5 kb)를 만들어 pENC2를 *B. subtilis* J-10과 *B. subtilis* K-54로 형질전환하여 *B. subtilis* J-10 (pENC2)과 *B. subtilis* K-54 (pENC2)를 얻었다. 또한 만들어진 재조합 vector인 pENC2를 *Bam*HI과 *Xba*I으로 처리한 부위에 pAPR2를 *Bam*HI과 *Xba*I으로 잘라 얻어진 *aprN* 유전자를 ligation하여 두 유전자를 모두 갖는 재조합 vector pFLA1을 제작하였다 (Fig. 5). 이 재조합 vector로 *B. subtilis* J-10를 형질전환하였다. 얻어진 재조합 vector들은 각 과정

마다 각각의 primer로 PCR하여 원하는 단편이 cloning되었음을 확인하였다.

#### *B. subtilis* K-54주의 fibrinolytic enzyme 유전자와 *B. subtilis* J-10의 enhancer 유전자의 염기서열 분석

*B. subtilis* K-54가 생산하는 fibrinolytic enzyme에 대한 구조 유전자의 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus* 속의 균주에서는 구조유전자의 start codon이 ATG뿐만 아니라 GTG, TTG, ATT 및 CTG도 가능하다는 것을 고려해 볼 때[23] GTG로 시작되어 ATT로 끝나는 전체 1,149 bp의 유전자를 확인할 수 있었다 (Fig. 6). GenBank®에서 염기서열이 이미 밝혀진 유사 단백질의 DNA서열과 상동성을 비교한 결과 DNA access no. K02396인 *B. amyloliquifaciens*의 alkaline protease와는 95%의 상동성을 보였으며 subtilisin DNA (access no. K01988), subtilisin J의 DNA, nattokinase DNA와는 85%의 상동성을, subtilisin carls-berg DNA와는 81%의 상동성을 보였다. 특히 *B. subtilis* K-54의 fibrinolytic enzyme의 염기배열은 95%의 상동성을 같은 DNA access no. K02496 효소의 DNA와 비교할 때 849 bp부터 930 bp 까지의 염기서열 46개 중 10개가 달라 다른 부위에 비해 염기배열의 차이가 심하였다. 또한, *B. subtilis* J-10의 enhancer유전자의 분석결과에는 *B. subtilis* var. *natto*에 있는 enhancer 유전자와 동일하였다 (data not shown).

#### 형질전환체의 fibrinolytic enzyme 생산능

Alkaline serine protease인 fibrinolytic enzyme activity

1 GTC AGA GGC AAA AAG GTA TGG ATC ACT GTG TTG CTG TTT GCT TTA GCG TTA ATC TTT ACG ATG  
 61 GCG TTC GGC AGC ACG TCT CCT CCC CAG GCG GCA GGG AAA TCA AAC GCG GAA AAG AAA TAC  
 121 ATT GTC GGA TTT AAA CAG ACA ATG AGC AGC ATG AGC GCC GCT AAG AAA AAA GAT GTC ATT  
 181 TCT GAA AAA GGC GGG AAA GTG CAA AAG CAA TTC AAA TAT GTT AGA CGC AGC TTC AGC TCA  
 241 TTA AAT GAA AAA GGC GTA AAA GAG CTG AAA AAA GAC CCT AGC GTC GCT TAC GTT GAA GAA  
 301 GAT CAC GTT GCA CAG GCG TAC GCG CAG TCC GTG CCT TAC GGC GTA TCA CAG ATT AAA GGC  
 361 CCT GCT CTG CAC TCT CAA GGC TTC ACC GGA TCA AAT GTT AAA GTA GCG GTT ATC GAC AGC  
 421 GGT ATC GAT TCT TCT CAT CCT GAT TTA AAG GTA GCA GGC GGG GGC AGC ATG GTT CCT TCT  
 481 GAA ACA AAT CCT TCT CAA GAC AAC AAC TCT CAC GGA ACT CAC GTT GCC GGT ACA GTT GGG  
 541 GCT CTC AAT AAC TCA GTC TTT GTA TTA GGC GTT GCG CCA AGC GCA TCT CTT TAC GCT GTA  
 601 AAA GTT CTC GGC GCT GAC GGT TCC GGC CAG TAC AGC TGG ATC ATT AAC GGA ATT GAG TGG  
 661 GCG ATC GCA AAC AAT ATG GAC GTT ATT AAA TGA GGC TCG CGC GGA CCT TCT GGT TCT GCA  
 721 GCG TTA AAA GGG GCA GTT GAC AAA GGC GTT GCT TCC GGC GTC GTA GTC GAA GCA GCA GGC  
 781 GGT AAC GAA GGC ACT TCC GGC GGC TCA AGC ACA GTG GGC TAC CCT GGT AAA TAC CCT TCT  
 841 GTC ATT GGG GTA GGG GCA GTT AAC AGC AGC AAC CAA CGA GCA TCA TTC TCA AGC GTA GGT  
 901 TCT GAG CTT GAT GTC ATG GCA CCA GGC GTC TCT ATC CAA AGC AGC CTT CCT GGA AAC AAA  
 961 TAC GGC GGG TAC AAT GGT AGC TCA ATG GCA TCT CCG CAC GTT GGG GCA GGG GCT GCT TTG  
 1021 ATT CTT TTT AAG CAC CCG AAC TGG ACA AAC ACT CAA GTC CGC AGC AGT TTA GAA AAC ACC  
 1081 ACT ACA AAA CTT GGT GAT GCT TTC TAT TAC GGA AAA GGG CTG ATC AAC GTA CAA GCA GCA  
 1141 GCA CAT \*\*\*

**Fig. 6. The nucleotide sequence of fibrinolytic enzyme structure gene of *B. subtilis* K-54. The numbers referred to the nucleotide positions. The start codon was underlined and stop codon was marked by asterisks.**

가 확인된 *B. subtilis* K-54 및 J-10 (data not shown)의 형질전환에 따른 fibrinolytic activity의 변화를 조사하고자, nattokinase 유전자를 갖는 재조합 vector pAPR2, enhancer 유전자를 갖는 pENC2, 이들 두 가지 유전자를 함께 갖는 pFLA1을 가지고 분리주를 형질전환시킨 후 fibrinolytic enzyme의 생산능력을 비교하였다 (Fig. 7, 8). 또한 *B. subtilis* K-54와 *B. subtilis* J-10주의 성장 곡선에 따른 fibrinolytic activity를 plasmin casein unit (PCU)로 측정하여 상대적 활성을 비교하였다 (Table 1).

pENC2를 이용하여 *B. subtilis* J-10를 형질전환하였을 경우 plasmid를 갖지 않는 *B. subtilis* J-10 야생형 균주에

**Table 1. Comparison of fibrinolytic activities\* of *B. subtilis* K-54 and J-10 having the recombinant vectors**

Recombinant vector	<i>B. subtilis</i> K-54	<i>B. subtilis</i> J-10
-	1.00	1.00
pAPR2	NT	1.27**
pENC2	5.21	1.01
pFLA1	†	1.16

† : Not tested

\* : The activity was estimated by using PCU described in Materials and Methods.

\*\* : The values were relative activity comparison with the wild type hosts.

비하여 활성증가는 없었으나, pAPR2로 형질전환하였을 경우 약 27.3%의 활성이 증가하였으며, pFLA1로 형질전환하였을 경우에는 활성이 약 16% 정도 증가하였다. 야생형 균주인 *B. subtilis* J-10의 경우 대수증식기인 6시간부터 효소의 활성이 증가되어 정지기 말인 19시간 부근에서 최대의 활성을 보였다. pAPR2를 갖는 형질전환균은 7시간부터 대수증식기가 시작하여 13시간부터 정지기에 들어 야생형 균주보다 약간 균의 성장이 느렸다. 따라서 plasmid 복제로 인하여 성장이 지연됨을 알 수 있었다. 효소활성의 경우에도 급격한 증가는 보이지 않았으나 19시간 부근에서 최대 활성을 보였고, 균의 대수증식기 말부터 활성 증가를 보여 재조합 DNA의 발현에 시간이 소요됨을 볼 수 있었다. 그리고 nattokinase 구조 유전자의 증폭으로 활성이 약간 올라감을 알 수 있었다.

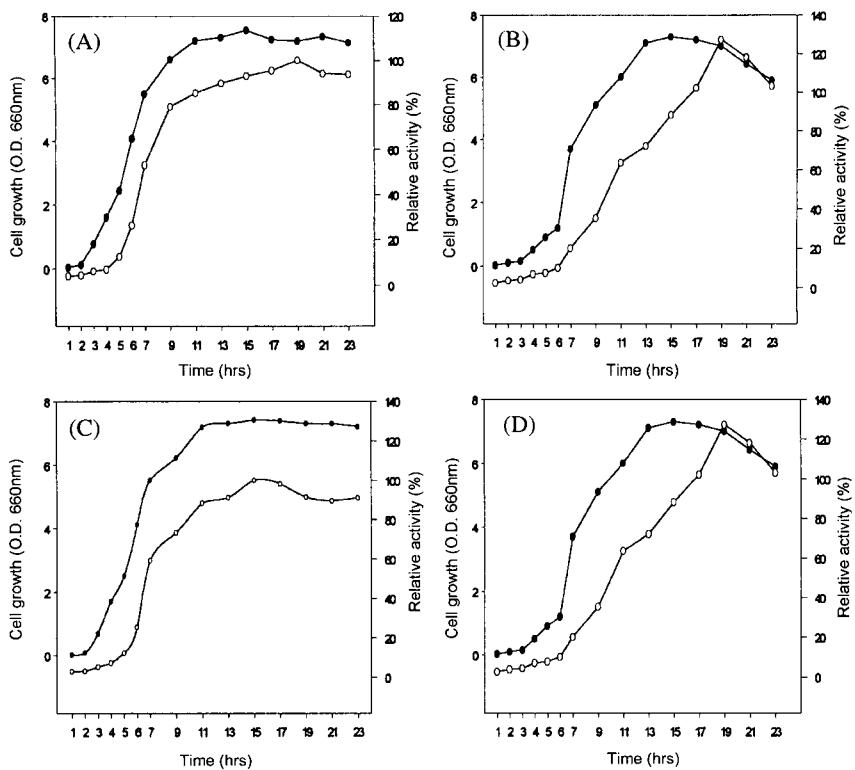
그러나, pENC2를 갖는 형질전환균은 효소 활성 발현이 7시간부터 시작되어 야생형 균주의 5시간보다 늦게 나타남을 보였으나, 효소 활성의 증가가 야생형 균주에 비해 증가되지 않았다. 또한 pFLA1로 형질 전환한 균주도 역시 7시간부터 효소 활성의 증가를 보이기 시작하여 균이 사멸기에 들어가는 21시간에 최대 활성을 보였고 활성은 약 16%의 증가를 보여 두 경우 모두 enhancer인 *prtR* 유전자의 도입에 따른 영향을 볼 수 없었다.

이것은 PCR cloning된 유전자가 자체 promoter를 가지고 있는 점으로 보아 이미 *B. subtilis* J-10주가 chromosome에 가지고 있는 *prtR* 유전자에서 발현되는 단백질이 포화상태에서 존재하는 것으로 보여 enhancer의 합성 증가는 fibrinolytic enzyme 합성에 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다.

*B. subtilis* K-54주의 경우는 *B. subtilis* J-10과 같이 대수증식기 중반인 5시간부터 효소 활성이 증가하기 시작하여 17시간에 최대에 이르렀다. 그러나 pENC2를 가지고 *B. subtilis* K-54주에 형질전환하였을 때는 7시간째부터 효소 활성이 증가하여 전 성장기에 걸쳐 효소 활성이 증가하여 약 5배 정도의 효소활성이 증가하였다. 이는 *prtR* 유전자가 *Bacillus* 균주의 효소 생산을 증가시킨다는 보고와 비교해 볼 때 도입된 *prtR* 유전자가 효소 생산량 증가에 기여 한 것으로 볼 수 있으나 효소 생산량이 40-400배[8], 15-60배[19] 증가한다는 보고와는 큰 차이가 있었다. 이는 *B. subtilis*에 새로 도입된 *prtR* 유전자는 형질전환된 *Bacillus* 균주에 따라 효소량 생산에 기여하는 정도가 약간씩 다른 것으로 생각된다.

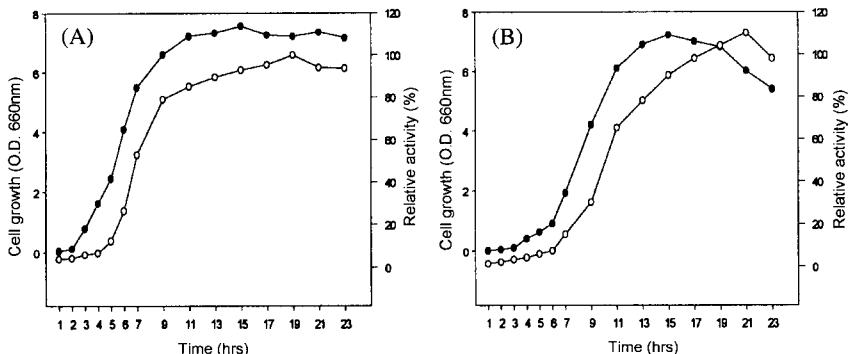
## 요약

구조유전자와 enhancer 유전자를 cloning 하여 fibrinolytic enzyme을 생산하는 *B. subtilis* K-54와 J-10의 fibrinolytic enzyme의 생산 능력을 높이기 위하여 이 유전



**Fig. 7. Time courses of growth and fibrinolytic activity by *B. subtilis* J-10.**

(A), *B. subtilis* J-10 (wild type); (B), *B. subtilis* J-10 (pENC2); (C), *B. subtilis* J-10 (pPAR2); (D), *B. subtilis* J-10 (pENC2/pAPR2).  
—●— cell growth, —○— relative activity.



**Fig. 8. Time courses of growth and fibrinolytic activity in *B. subtilis* K-54.**

(A), *B. subtilis* K-54 (wild type); (B), *B. subtilis* K-54 (pENC2). —●— cell growth, —○— relative activity.

자를 포함하는 재조합 vector를 만들어 형질전환하여 그 생산능의 변화를 조사하였다.

*aprN*과 enhancer 유전자인 *prtR* 유전자의 primer를 제작하여 PCR한 결과, *B. subtilis* J-10주에서는 *aprN*과 *prtR* 유전자 band를 확인하였고 염기서열 분석결과 자체 promoter를 갖는 완전한 유전자임을 확인하여 cloning에 사용하였다.

Cloning된 두 유전자를 가지고 *B. subtilis* J-10과 *B. subtilis* K-54를 형질전환하기 위해 *E. coli/B. subtilis* shuttle vector에 cloning하여 재조합 vector를 제작하였다. 그 결과 *aprN* 유전자를 갖는 pAPR2, *prtR* 유전자를 갖는 pENC2, 두 유전자 모두 가지는 pFLA1을 만들었으며 *B. subtilis* J-10과 K-54를 형질전환하여 재조합된 *Bacillus*속의 균주를 만들어 fibrinolytic activity의 생산량을

조사하였다. pAPR2 과 pFLA1로 형질전환하였을 경우 각각 약 27.3 와 16%의 활성 증가를 보였으나 pENC2의 경우 활성 증가를 보이지 않았다. pENC2로 분리주인 *B. subtilis* K-54를 형질전환하였을 경우 약 5배 정도의 활성 증가를 보여 효소의 생산이 증가하였음을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Boyer, H. W. and M. B. Ingle. 1972. Extracellular alkaline amylase from a *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* **110**: 992–1000.
- Bruckner, R., O. Shoseyov, and R. H. Doi. 1990. Multiple active forms of a novel serine protease from *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 486–490.
- Fujita, M., K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimuro. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**(3): 1340–1347.
- Gietz, D., A. S. Hearn, R. A. Wood, and R. H. Schiesel. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**: 1425–1429.
- Gunzelberg, A. V. and M. Ottesen. 1952. Preparation of crystals containing the plakalbumin-forming enzyme from *B. subtilis*. *Nature (London)* **170**: 802.
- Kato, E. 1985. The manufacture of natto-tradition and modern. in *Proc. Asian Symp. Non-salted soybean Fermentation*. Tsukubo Science City. Ibaraki. Japan.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold spring harbor. New York.
- Nagami, Y. and T. Tanaka. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from *B. natto* that enhances production of Extracellular proteases and Levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **166**(1): 20–28.
- Prestidge, L., V. Gage, and Spizizen, J. 1971. Protease activities during the course of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **107**: 815–823.
- Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* **41**: 711–752.
- Rappaport, H. P., W. S. Riggsby, and D. A. Holden. 1965. A *Bacillus subtilis* proteinase. I. Production, purification and characterization of a proteinase from a thermostable strain of *B. subtilis*. *J. Biol. Chem.* **240**: 78–86.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463–5467.
- Sloma, A., A. Rufo, K. A. Theriault, M. Dwyer, and J. Pero. 1991. Bacillopeptidase F of *B. subtilis*: Purification of protein and cloning of the gene. *J. Bacteriol.* **172**: 1470–1477.
- Sloma, A., C. F. Rudolph, G. A. Rufo, B. J. Sullivan, K. A. Theriault, and J. Pero. 1990. Gene encoding a novel extracellular metalloprotease in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**: 1024–1029.
- Sloma, A., A. Ally, D. Allay, and J. Pero. 1998. Gene encoding a minor extracellular protease in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5557–5563.
- Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 1072–1078.
- Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta, and H. Mihara. 1983. Activation of plasma fibrolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.* **70**: 289–295.
- Tran, L., X. C. Wu, and S. L. Chen. 1991. Cloning and expression of a novel protease gene encoding an extracellular neutral protease from *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 6364–6372.
- Uehara, H., Y. Yuko, K. Yamane, and B. Maruo. 1974. Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: Transformation of high protease productivity. *J. Bacteriol.* **119**(1): 82–91.
- Wang, J. and D. Y. Fung. 1996. Alkaline-fermented foods: A review with emphasis on pedan fermentation. *Crit. Rev. Microbiol.* **22**(2): 101–138.
- Yamagata, Y., R. Abe, Y. Fujita, and E. Ichishima. 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the 90K serine protease gene, *hspK*, from *Bacillus subtilis*(natto) No.16. *Curr. Microbiol.* **31**: 340–344.
- Yoo, C. K., W. S. Seo, C. S. Lee, and S. M. Kang. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 507–514.
- Yen C. M., H. K. Chang, H. M. Hsieh, K. Yoda, M. Yamasaki, and Y. C. Tsai. 1997. Improved translational efficiency of subtilisin YaB gen with different initiation codon in *B. subtilis* and alkalophilic *Bacillus* YaB. *J. Appl. Microbiol.* **83**: 758–763.

(Received November 1, 1999)