

단백질 대량 생산을 위한 *Bacillus* 유전학적 연구

Genetic Studies for the Overproduction of Protein in *Bacillus* sp.

이 상 준

(주)인바이오넷

1872년 Ferdinand J. Cohn이 처음으로 명명한 genus *Bacillus* (type strain *Bacillus subtilis* Marburg ACTC 6051)는 그람양성균으로 토양 및 수중 환경에 광범위하게 존재하는 미생물로서, 여러 가지 효소, 비타민, 항생제, 살충제 생산에 이용되는 산업적으로 매우 중요한 균주이다[4]. *Bacillus*속의 대부분 species는 사람이나 동물에게 해롭지 않으며, 단지 몇 가지의 병원성 균주만 알려져 있는데, 탄저병을 일으키는 *Bacillus anthracis*, 식중독의 원인균인 *B. cereus*, 그리고 곤충병원균인 *B. thuringiensis*가 있다. 식품 및 음료 산업과 밀접히 연관되어 있고, 낮은 병원성 유발 빈도로, 미국 FDA(U.S. Food and Drug Administration)로부터 *B. subtilis*는 GRAS(generally regarded as safe)로 공인받았다.

영양소가 고갈된 스트레스 환경에서 endospore를 형성하는 것 외에 *Bacillus*가 다른 미생물과 비교되는 가장 큰 특징은 높은 단백질 분비능이다. 여러 가지 protease와 amylase를 비롯한 여러 종류 효소의 분비능이 매우 높아서, 이것의 산업적인 이용을 위한 *Bacillus* sp.의 육종 및 단백질 분비기구에 관한 연구가 많이 이루어져 왔다.

Genomics and gene expression

미생물학자들을 비롯한 분자생물학자들의 대표적인 연구 도구인 대장균만큼 *Bacillus* sp.에 관한 유전학적 생리학적 연구는 많이 되었고, 그에 따른 유전자 조작 방법이 많이 개발되었다. 1997년 우리나라를 비롯한 여러 국가가 참여한 국제 콘소시움에 의해서 *B. subtilis* 168의 염색체 DNA의 4,214,814개 염기서열이 밝혀졌다[17]. *B. subtilis* 168의 genome은 4,107개 단백질 유전자, 88개 tRNA 유전자, 30개 rRNA 유전자와 3개 stable RNA 유전자를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다 (<http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/index.html>).

현재까지, *Bacillus subtilis* 168의 open reading frame들 중에 약 40%의 기능은 아직까지 밝혀지지 않았다. 유전자의 기능을 체계적으로 밝히기 위한 유전학적인 방법으로, 목표유전자의 위치에 pMUTIN plasmid를 integration시키는 방법이 있

다[29]. 이 방법의 장점으로서는 첫째, 목표유전자를 single crossover로 inactivation 시킬 수 있고, 둘째, *lacZ* reporter 유전자가 목표유전자의 promoter와 전사적으로 융합되어, 목표유전자의 발현 pattern을 monitoring할 수 있다. 셋째, IPTG-dependent Pspac promoter로 목표유전자를 포함한 downstream 유전자의 발현을 조절할 수 있어, operon과 같은 유전자 cluster 연구에 유용하다. 이와 같은 유전학적 방법은 *Bacillus* functional genomics의 연구에 큰 도움을 주어서 *Bacillus* genome을 보다 빨리 이해시켜, 장기적으로는 단백질 발현 host의 개발 등에 도움을 줄 수 있다.

효과적인 단백질 발현을 유도하기 위해서는 strong promoter를 확보하고 적용하는 것이 필수적이다. 지금까지 알려진 controlled promoter는 다음과 같다. Pspac promoter는 *Bacillus* phage SPO1 promoter의 5' 부분과 대장균의 *lac* promoter 3'의 operator부분을 융합시켜 만든 것으로, IPTG에 의해서 tight regulation이 가능하지만, IPTG는 비싸고, 해롭기 때문에 식품용 발효에는 적합하지 않다. CRE(catabolite responsive element)를 제거시킨 xylose-inducible promoter는 값이 싼 xylose에 의해 발현이 유도되는 장점이 있으나, xylose가 없는 상태에서도 약간의 단백질이 발현되는 leaky expression을 관찰할 수 있다. levansucrase의 promoter인 *sacB* promoter는 sucrose에 의해 exponential phase에서 발현 유도가 가능하고, catabolite repression을 받지 않는 장점이 있으나, promoter strength가 매우 강력하지는 않다. 그리고 온도를 높이면, 발현이 유도되는 매우 좋은 장점을 가진 phage ϕ 105와 phage PBSX의 promoter가 있다.

단백질 대량발현에는 strong promoter뿐 아니라, 전사 후 mRNA의 stability도 매우 중요한 역할을 한다. *B. thuringiensis*의 곤충 toxin 단백질인 Cry의 유전자의 Shine-Dalgarno 서열을 포함하는 5' 부분이 mRNA stability를 결정한다고 알려져 있고[1], 재조합 단백질 과잉 발현에 *cry*의 mRNA stabilizer를 이용하는 경우가 보고되어 있다[30]. 또한, *B. subtilis*의 subtilisin의 signal peptide를 encoding하는 부분이 mRNA stability에 매우 중요하다고 알려졌고 단백질 고발현에 이용한

경우가 있다[7].

***Bacillus* secretome**

세포 전체 단백질체(proteome)를 대상으로 연구하는 것도 중요하지만, *Bacillus*의 분비단백질과 그 분비에 직접적으로 관여하는 단백질들에 관한 단백질체, 즉 분비체(secretome)에 관한 연구에 더욱 관심이 많아 지고 있다. *B. subtilis*는 약 150~180여 개의 단백질을 세포외 배지로 분비하는 것이 실험적으로 알려져 있다[10]. Tjalsma 등은 *Bacillus* genome의 염기서열을 분석하여 분비단백질과 그 분비경로를 예측하였다[27]. 이들은 단백질 N-말단의 분석을 통해, 실험치보다 많은 약 300여 개의 단백질이 Sec pathway, twin-arginine pathway, type IV pilin export, 그리고 ABC transport를 통하여 분비될 것으로 예측했다.

분비단백질의 일반적인 일차구조는 signal peptide, propeptide 그리고 mature protein으로 나뉘어진다. Signal peptide는 18~35개의 아미노산으로 구성되어 있는데 반해, propeptide는 8개 아미노산(*B. subtilis* alpha amylase)에서 200개 아미노산(*B. subtilis* neutral protease)까지 다양한 길이로 이루어져 있다. 현재까지 이 부분은 단백질 분비에는 관여하지 않고, 단백질의 분비과정이나 분비 후, mature 단백질의 folding에 관여하는 것으로 알려져 있다. subtilisin을 비롯한 일부 protease의 경우 autocatalytic processing 되는데, 이러한 단백질 folding에 관여하는 기능을 강조하는 용어로 propeptide를 “intramolecular chaperone”이라고 일컫기도 한다[24].

단백질의 분비과정은 일반적으로 3단계로 크게 나눌 수 있다. 첫째, 분비단백질의 세포막으로의 이동. 둘째, 분비단백질의 세포막의 통과. 셋째, 신호서열의 processing을 통한 membrane의 trans side에서 folding과 cell wall의 통과로 나누어진다. 실험 결과에 의하면, 외래단백질 분비발현의 경우, bottleneck은 분비과정중 거의 마지막 단계로 알려져 있다[3].

재조합 단백질 대량생산 위한 *Bacillus* 육종

단백질 발현을 위해 개발된 벡터도 많지만, 요즘은 플라스미드의 segregational and structural instability의 문제점을 극복하기 위해서 expression cassette를 chromosome에 integration시키는 방법이 많이 시도되고 있다.

Chromosome integration에는 non-replicative plasmid를 이용한 방법과 temperature-sensitive plasmid를 이용한 방법이 있다. Temperature-sensitive plasmid사용의 장점은 transformation efficiency가 낮은 균주에 사용이 적합하고, 또한 높은 온도에서 replicating plasmid를 제거 시킴으로써, 효과적으로 plasmid-integrated cell을 분리해 낼 수 있다. Single

생물산업

crossover(SC)와 double crossover(DC) 방법으로 chromosome integration을 할 수 있다. DC의 경우는 stable integration이 가능하지만, single copy만 integration할 수 있다. 그러나, SC의 경우는 rolling circle plasmid를 이용하면, 몇 개의 copy를 integration시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 그런데, 일반적으로 SC에 의한 integration은 완전한 plasmid 구성요소를 모두 갖고 있기 때문에 구조적으로 불안정하여, 다시 chromosome으로부터 분리될 수 있는 단점이 있다. 최근에는 이러한 단점을 보완하기 위하여, *repF*는 제거되고 pE194-ori를 갖는 integration plasmid를 이용하는 방법이 고안되었다[14]. 보조적으로 pE194의 co-transformation이 필요한데, 이것은 transacting RepF를 integration plasmid에 공급해주기 위함이다. pE194와 integration plasmid를 차례로 모두 transformation 시킨 후, 온도를 올려주면 temperature-sensitive replicating plasmid는 모두 제거되고, integration plasmid만 amplification 되어 chromosome에 남게 된다. DC를 이용한 chromosome integration site로는 *amyE* locus가 많이 이용되었는데[30], 최근에는 *lacA* locus를 이용하는 방법도 고안되었다[8].

Chromosome integration된 균주의 selection 단계에는 보통의 항생제 내성 표지를 이용하는 것이 일반적인데, 잠재적 위험성이 매우 높은 항생제 유전자오염에 대한 우려를 불식시키고, 환경친화적인 GEM(Genetically engineered microorganism)을 개발하기 위해서, 대장균에서는 marker-free strain을 만들 수 있는 flippase 이용 방법[19]과 Cre/loxP 방법[20]이 개발되어 있으나, 이 방법이 아직까지 *Bacillus*에서 시도된 바는 없다.

효과적인 재조합 단백질 발현을 위하여 posttranslational stage에서 크게 2가지 방향으로 연구가 진행되었는데, 그 중 한가지가 재조합 목적 단백질의 발현과 분비를 돕는 chaperone의 동시 발현이다. Cytoplasmic chaperone인 GroEL과 GroES의 과잉발현이 single-chain antibody의 분비를 증진시키고[32], 세포막에 부착되어 있는 세포질의 chaperone인 PrsA가 역시 세포외 효소의 분비를 촉진한다고 알려져 있다[12]. 신호서열분해효소 SigS의 동시 발현은 단백질 pre-form의 processing 속도를 높여준다[2]. 그리고, chaperone-like activity를 갖는 protein disulfide isomerase(PDI)와 융합된 재조합 단백질은 그 생산량이 향상되었다[15].

또 다른 방법은 단백질 발현을 저해하는 장애 요인을 제거시키는 것이다. 세포벽은 구성요소인 polymer들이 갖는 음전하가 단백질 분비에 대해 물리적인 장애 요인이라고 생각되었지만, 실제로는 반대로 teichoic acid에 D-alanylation시키는 효소 유전자가 결손으로 말미암아, 오히려 세포벽의 음전하의 증가가 분비 단백질의 분비 후 folding과 stability를 촉진시켜주는 것으로 밝혀졌다[11].

그렇지만, 단백질 발현의 저해하는 요인 중 가장 관심을 갖

은 것은 단백질 생산에 치명적인 요소인 host의 protease이다. *B. subtilis*의 genome을 분석해보면, cytoplasm에 존재하는 protease가 35개, membrane에 존재하는 것이 18개, wall에 존재하는 것이 6개, 세포외로 분비되는 것이 8개로 예상되고 있다[27]. 오래 전부터 분비능이 우수한 *Bacillus*에서 재조합 단백질 생산에 치명적인 영향을 주는 것은 목적단백질과 세포외로 함께 분비되어 존재하는 host의 세포의 단백질가수분해효소라고 생각하고, 세포외단백질 가수분해효소를 찾아내서 그 유전자를 knock-out시켜 단백질 가수분해효소의 결손 균주를 제조하여 왔다[16,33]. 7개의 세포외가수분해효소의 유전자들 (*apr*, *npr*, *epr*, *bpr*, *mpr*, *nprB*, *vpr*)을 knock-out 시킨 WB700균주가 제조되어, *B. subtilis* 168의 전체 세포의 단백질 가수분해 효소량의 0.1%수준으로 낮추었지만, 여전히 단백질 가수분해효소에 민감한 재조합 단백질에 대해서는 심각한 수준이라고 여겨졌다[31]. 그래서, 원래 낮은 농도로 세포외 단백질 가수분해효소를 분비시키는 *B. brevis*를 자연으로부터 분리하여 새로운 단백질 발현 host로 사용해 온 경우도 있다 [5,28]. 최근에, *B. subtilis*의 세포벽에 존재하는 단백질 가수분해효소가 단백질 분비에 영향을 주고, 또한 외래단백질 분비와 세포외 안정성에 큰 영향을 주는 것으로 밝혀졌다[18,25]. 또한, 외래단백질이 세포에서 분비되기 전에 상당한 수준으로 가수분해된다는 것도 밝혀졌다[13]. 이로서, 최근에는 외래단백질 생산을 증대시키기 위해, 세포외 단백질 가수분해효소뿐 아니라, 세포막에 존재하는 HtrA homologous protease와 cell wall protease 등의 제거에 대한 관심이 매우 증가되었다. 이러한 추세는 다른 그람 양성 산업균주인 유산균에서도 보여지고 있다[21,22].

Bacillus expression 기술의 상업화

전 세계의 산업효소 시장은 연간 10억 USD 이상이 되고, 해마다 종이, 섬유, 쓰레기 처리 시장에 매우 큰 성장을 보이고 있다. 시장 전체의 3/4 은 가수분해효소가 차지하고 있고, 이중 2/3은 세제, 가축생산에 쓰여지고 있는 단백질가수분해효소가 차지하고, 나머지 1/3은 탄수화물가수분해효소가 차지하고 있다. *Bacillus* 발효를 이용한 효소생산은 전 세계 효소생산량의 절반을 차지하고 있다. *Bacillus*로부터 생산되는 여러 가지 효소 가운데, alkaline protease와 alpha-amylase가 가장 많이 생산되고 있다. Native protein의 생산 뿐만 아니라, heterologous protein의 생산에도 *Bacillus*는 이용되고 있다. Human growth hormone[6], epidermal growth factor (EGF)[5], Interleukin-2[26], single chain antibody[32]등의 eukaryotic protein 생산에 이용되고, 또한, diphtheria toxin[9], pertussis toxin[23]과 같은 gram-negative pathogenic bacteria의 outer membrane protein의 생산으로 vaccine 생산 가능성

을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이것은 vaccine 생산과정 중 native host가 가지고 있는 endotoxin의 오염을 피할 수 있는 이점이 있다.

일본의 한 회사가 *Bacillus brevis*를 숙주로 하여 재조합 EGF를 저비용으로 대량 생산에 성공함으로써, 노동력이 많이 필요로 하는 면도방법의 Australia의 양모(sheep wool)의 수확은 간편한 생물학적 방법으로 전환이 가능하게 되었다. 양에게 EGF를 투여하면, 일시적으로 양모의 성장이 멈추게 되는데, 이때 손으로 양모를 벗겨낼 수 있다. 이것은 *Bacillus* expression 기술의 상업화의 성공적인 한 예로 볼 수 있다 (<http://www.proteinexpress.co.jp>).

이 글에서는 *Bacillus*에 대한 유전학적인 연구 방법, 단백질 발현기법, 균주의 분자육종 등에 대해 논하였다. *Bacillus*의 생리학적 특성 및 유전학적 방법에 대한 바른 이해와 단백질분비에 영향을 주는 분자생물학적 요인들에 대한 정확한 이해는 성공적인 재조합 단백질 생산에 필수적이다. 또한, 나아가 다른 유용한 그람양성균에 대한 이해와 연구에도 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Agaisse, H. and D. Lereclus. 1996. STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5' untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol. Microbiol.* **20**: 633-643.
2. Bolhuis, A., A. Sorokin, V. Azevedo, and et al. 1996. *Bacillus subtilis* can modulate its capacity and specificity for protein secretion through temporally controlled expression of the sipS gene for signal peptidase I. *Mol. Microbiol.* **22**: 605-618.
3. Bolhuis, A., H. Tjalsma, H. E. Smith, and et al. 1999. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2934-2941.
4. Cohn, F. 1875. Untersuchungen uber Bakterien II. *Beitr. Biol. Pflanzen* **1**: 141-207.
5. Ebisu, S., H. Takagi, K. Kadowaki, H. Yamagata, and S. Udaka. 1996. The efficient production of human epidermal growth factor by *Bacillus brevis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**: 115-122.
6. Franchi, E., F. Maisano, S. A. Testori, and et al. 1991. A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnol.* **18**: 41-54.
7. Hambræus, G., M. Persson, and B. Rutberg. 2000. The *aprE* leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **146**: 3051-3059.
8. Hartl, B., W. Wehrl, T. Wiegert, G. Homuth, and W. Schumann. 2001. Development of a new integration site

- within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. *J. Bacteriol.* **183**: 2696-2699.
9. Hemila, H., L. M. Glode, and I. Palva. 1989. Production of diphtheria toxin CRM228 in *B. subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 193-198.
 10. Hirose, I., K. Sano, I. Shioda, M. Kumano, K. Nakamura, and K. Yamane. 2000. Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology.* **146**: 65-75.
 11. Hyyrylainen, H. L., M. Vitikainen, J. Thwaite, and et al. 2000. D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 26696-26703.
 12. Jacobs, M., J. B. Andersen, V. Kontinen, and M. Sarvas. 1993. *Bacillus subtilis* PrsA is required in vivo as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without pro-sequences. *Mol. Microbiol.* **8**: 957-966.
 13. Jensen, C. L., K. Stephenson, S. T. Jorgensen, and C. Harwood. 2000. Cell-associated degradation affects the yield of secreted engineered and heterologous proteins in the *Bacillus subtilis* expression system. *Microbiology.* **146**: 2583-2594.
 14. Jorgensen, P. L., M. Tangney, P. E. Pedersen, S. Hastrup, B. Diderichsen, and S. T. Jorgensen. 2000. Cloning and sequencing of an alkaline protease gene from *Bacillus lentus* and amplification of the gene on the *B. lentus* chromosome by an improved technique. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 825-827.
 15. Kajino, T., C. Ohto, M. Muramatsu, and et al. 2000. A protein disulfide isomerase gene fusion expression system that increases the extracellular productivity of *Bacillus brevis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 638-642.
 16. Kawamura, F. and R. H. Doi. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
 17. Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, and et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**: 249-256.
 18. Lee, S. J., D. M. Kim, K. H. Bae, S. M. Byun, and J. H. Chung. 2000. Enhancement of secretion and extracellular stability of staphylokinase in *Bacillus subtilis* by *wprA* gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 476-480.
 19. Martinez-Morales, F., A. C. Borges, A. Martinez, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram. 1999. Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J. Bacteriol.* **181**: 7143-7148.
 20. Palmeros, B., J. Wild, W. Szybalski, and et al. 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene.* **247**: 255-264.
 21. Poquet, I., A. Bolotin, and A. Gruss. 2001. Optimising the production of heterologous exported proteins in *Lactococcus lactis* by inactivation of HtrA, the unique housekeeping surface protease. *Lait.* **81**: 37-47.
 22. Poquet, I., V. Saint, E. Seznec, N. Simoes, A. Bolotin, and A. Gruss. 2000. HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* **35**: 1042-1051.
 23. Saris, P., S. Taira, U. Airaksinen, and et al. 1990. Production and secretion of pertussis toxin subunits in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**: 143-148.
 24. Shinde, U. P., J. J. Liu, and M. Inouye. 1997. Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature.* **389**: 520-522.
 25. Stephenson, K. and C. R. Harwood. 1998. Influence of a cell-wall-associated protease on production of alpha-amylase by *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2875-2881.
 26. Takimura, Y., M. Kato, T. Ohta, H. Yamagata, and S. Udaka. 1997. Secretion of human interleukin-2 in biologically active form by *Bacillus brevis* directly into culture medium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1858-1861.
 27. Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijl. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 515-547.
 28. Udaka, S., N. Tsukagoshi, and H. Yamagata. 1989. *Bacillus brevis*, a host bacterium for efficient extracellular production of useful proteins. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **7**: 113-146.
 29. Vagner, V., E. Dervyn, and S. D. Ehrlich. 1998. A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **144**: 3097-3104.
 30. Widner, B., M. Thomas, D. Sternberg, D. Lammon, R. Behr, and A. Sloma. 2000. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*
 31. Wong, S. L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 517-522.
 32. Wu, S. C., R. Ye, X. C. Wu, S. C. Ng, and S. L. Wong. 1998. Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J. Bacteriol.* **180**: 2830-2835.
 33. Wu, X. C., W. Lee, L. Tran, and S. L. Wong. 1991. Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J. Bacteriol.* **173**: 4952-4958.