

sprD 유전자의 과발현이 *Streptomyces griseus* HH1의 분화에 미치는 영향

이 재 학
서일대학 식품영양과

Effect of the Overexpression of the *sprD* Gene Encoding *Streptomyces griseus* Protease D for the Differentiation of *Streptomyces griseus* HH1

Jae-Hag Lee

Department of Food and Nutrition, Seoil College, 49-3, Meanmok-8 dong, Jung rang-Gu, Seoul, Korea, 131-208

Abstract

Streptomyces shows a eukaryotic characteristic that vegetative cell can grow into mycelial form and has morphological and physiological differentiation at a certain period during its life cycle. *Streptomyces* has been used for the production of many biologically active compounds, such as antibiotics and pronase. Production of second metabolites and differentiation of the vegetative cell share the certain period of its life cycle. Therefore, second metabolites may affect the differentiation of the vegetative cell. One of the microbial hormone, called A-factor, regulates the production of second metabolites, sporulation and differentiation of the cells. *Streptomyces griseus* produces streptomycin as well as many different kinds of proteinase. As mentioned, period of proteinases production overlaps with the period of differentiation of the vegetative cells. Protease may play a important role for the differentiation of the cells. In this paper, function of the SGPD gene cloned from *S. griseus* IFO 13350 tested whether it affects for the differentiation of A-factor mutated *S. griseus* HH1 and *S. griseus* IFO13350. pWHM3 and pWHM3-*sprD* plasmid was transformed into *S. griseus* HH1 and *S. griseus* IFO13350. Chymotrypsin activity of the cultured medium of the transformants with pWHM3-*sprD* plasmid didn't show any change with that of the transformants with plasmid only. The transformants with pWHM3-*sprD* plasmid didn't show the increase of the production of actinorhodin as well as morphological change in *S. griseus* IFO13350 and HH1, as well. The promoter sequences of the SGPA and SGPB gene which encode chymotrypsin-like protease, were compared with that of SGPD gene. Regulatory mechanism of gene expression of proteinase genes will be studied for the development of high production system for protease as well as the function of the proteases.

Key words : *sprD*, SGPD, *S. lividans*, *S. griseus* IFO13350, *S. griseus* HH1.

서 론

방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람 양성 진정세균에 속하며 이차 대사시기에 여러 가지 유용한 물질 즉, 항생물질로 대표되는

이차대사산물, 생리활성물질, 비타민 등의 저분자물질을 생산할 뿐만 아니라 소염제, 소화제, 세제, 공업용 효소 등으로 이용되는 다양한 pronase를 생산하여 현대 의약품의 개발과 함께 그 응용성과 중요성이 인식되어 현재까지 가장 중요하게 다루어지고 있는 유

† Corresponding author : Jae-Hag Lee

용한 산업미생물군이다.

방사상으로 생육하는 방선균은 일반적으로 이차대 사산물을 생산하는 시기와 포자착생이 시작되는 세포 분화의 시기가 배양후기에 거의 비슷한 시점에서 관찰되고 있고 또한 항생물질 생산능과 포자 착생능을 동시에 잃어버리는 현상이 빈번하게 관찰되고 있다. 따라서 이차대사 및 형태분화는 밀접한 관련이 있을 것이라고 생각되고 있다¹⁾.

이러한 방선균의 형태분화와 항생물질 생산이 미생물 호르몬이라고 불리는 화학물질에 의해 조절되는 사실은 A-factor(2-isocaprolyl-3-R-hydroxy-methyl-v-butyrolactone)의 연구에 의해 확인되었다²⁻⁵⁾. A-factor는 10^{-9} M이라는 극저농도에서 자신의 streptomycin 생합성 및 포자형성뿐 아니라 streptomycin에 대한 저항성도 유도하는 다형질적인 조절물질임이 밝혀졌다.

이러한 A-factor의 생합성은 *S. griseus* 뿐만 아니라, *S. coelicolor* 및 *S. lividans*를 포함하는 많은 방선균에서도 확인되었고, 이와 유사한 v-butyrolactone환을 갖는 유도체들이 많은 방선균에서 특이하게 생산균주의 이차대사생산 또는 세포분화를 조절해 주고 있음이 밝혀져 있다⁶⁾.

*S. griseus*는 streptomycin을 비롯한 다양한 종류의 이차대사산물을 생산할 뿐만 아니라, 의약 및 공업용으로 사용되는 pronase⁷⁻⁹⁾라는 이름으로 판매되는 단백질 분해효소를 생산하는데 이것은 세포외로 분비되는 protease의 혼합물로 구성되어 있으며 약 10여 종류 이상의 endopeptidase 및 exopeptidase들을 포함한다. 방선균에서의 protease 생산은 많은 경우에 이차대사산물이 형성되거나 형태분화가 유도되는 시기에 동시에 시작된다는 점에서 protease가 이차대사물질 생산 및 세포분화에 일정한 기능을 수행할 것이라는 점을 시사하고 있다⁹⁾. 아직까지 형태분화와 관련되어 연구된 단백질은 거의가 intracellular protein에 관한 연구였다¹⁰⁾.

*S. griseus*에 의해 생산되는 extracellular protease와 형태분화와의 관계를 연구하기 위하여, *S. griseus* IMRU 3499에서 보고된 SGPD(*Streptomyces griseus* protease D)를 암호화하는 유전자를 *S. griseus* IFO 13350으로부터 cloning 하였다¹¹⁾. SGPD는 serine계 chymotrypsin-like protease¹²⁾이며, sprD 유전자는 sprB와 염기 서열이 매우 높은 homology를 보인다. 또한 두 효소 모두 단백질을 분해할 때 hydrophobic side chain의 peptide 결합을 자른다. Protease D의 pre-mature protein은 392개의 아미노산으로 되어 있는데 그 중에 효소의 preregion은 mitochondrial import signal

인 hsp60와 높은 homology가 있는 것으로 밝혀졌다. 또한 SGPD는 SGPA, SGPB, SGPC, SGPE 및 *Lyso-bacter enzymogenes*의 α -lytic protease와도 많은 homology를 보이는 것으로 보고되었다¹³⁾.

본 연구에서는 *S. griseus* IFO 13350에서 클로닝한 SGPD protease가 각 strain에서 형태학적으로나 생리적으로 어떠한 gene dosage 효과를 미치는지 조사하는 것이었다. 따라서 우선 *Streptomyces lividans* TK24에 transformation하였고, 그 다음으로는 형태분화가 일어나지 않는 A-factor 결손주인 *S. griseus* HH1과 wild type인 *S. griseus* IFO13350에 transformation하여 그 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 Plasmid

S. griseus IFO 13350에서 chromosomal DNA를 분리하여 사용하였고 protease activity를 측정하기 위한 형질전환 균주로 *S. lividans* TK24, *S. griseus* HH1, *S. griseus* IFO13350를 protoplast로 사용하였다. 또한 대장균의 형질전환을 위한 competent cell은 *Escherichia coli* DH5aF⁺ 균주를 사용하였다¹⁴⁾. *S. griseus* IFO 13350의 genomic DNA를 template로 사용한 PCR product를 cloning하기 위한 vector로 PCR vector인 Novagen사의 pT7 Blue vector를 사용하였다. *Streptomyces-E. coli* shuttle vector로는 pWHM^{1,15)}를 사용하였다.

2. 사용시약

항생제는 Sigma사 제품을 사용하였고 제한 효소는 TaKaRa사와 Promega사 제품을 사용하였으며 미생물의 배양용 배지는 주로 Difco사와 Sigma사 제품을 사용하였다.

3. 사용배지 및 균주 성장조건

E. coli DH5aF⁺은 Luria-Bertani(LB) 배지를 이용하여 37°C에서 배양하였다. Protoplast 제조를 위한 *S. griseus* HH1과 *S. griseus* IFO 13350은 YMPD 배지를 사용하여 30°C에서 2~3일간 배양하였다. *S. griseus* HH1과 *S. griseus* IFO13350의 transformant들은 R2YE 배지(sucrose 103g, K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂ · 6H₂O 10.12g, glucose 10g, casamino acid 0.1g, yeast extract 5g, K₂HPO₄(0.5%) 10ml, CaCl₂ · 2H₂O(3.68%) 80ml, 20% L-proline 15ml, 5.73% TES(pH 7.2) 100ml, trace element 2ml)를 사용하였다. Protoplast를 위한 *S. lividans*는 YEME(malt extract 10g, MgCl₂ · 6H₂O 2g, glucose 4g,

sucrose 300g, yeast extract 4g, glycine 10g, pH 7.2) 배지에서 배양하였고, protoplast의 regeneration을 위한 배지는 R2YE 배지에 1.5% agar를 첨가하여 사용하였다^{14,16}.

4. 방선균의 형질전환

*S. lividans*를 YEME배지 100ml에서 2~3일간 배양한 후, 2,800rpm에서 5분간 cell을 침전시켜 0.35M sucrose 용액으로 씻어준 다음, 다시 2,800rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 얻었다. P buffer¹¹⁾ 10ml에 lysozyme 20mg을 녹인 용액을 0.45 μ m filter로 filtration 한 후에 균체를 현탁하여 1시간 반응시켰다. 반응 중 5분 경과 후에 tube를 3~4회 흔들어 lysozyme 처리가 잘 되도록 하였다. 이 용액을 2,800rpm에서 원심분리하여 그 pellet을 P buffer 2ml에 녹였다. 멸균된 tube에 200 μ l씩 분주하여 -70°C에 보관하여 사용하였다. *S. griseus* HHI은 YMPD 배지에서 배양하여 같은 방법으로 protoplast를 제작하였다. 형질전환에 사용할 P buffer와 T buffer¹¹⁾는 filtration하여 냉장고에 보관하여 사용한다. -70°C에 보관된 *S. lividans* protoplast 200 μ l를 녹인 후, P buffer 1ml을 첨가하고 2,800rpm에서 원심분리하여 protoplast를 얻는다. Clean bench에서 상층액을 따라 버리고, tube에 남아있는 buffer로 살짝 쳐서 현탁해준다. Ligation mixture를 넣고 2분간 두었다가 T buffer 1ml을 넣고 pipeting하여 다시 2분간 둔다. 미리 준비된 R1R2 plate 5~6개에 분주하여 살짝 도말한 다음 30°C에서 배양하였다. R1R2 plate는 하루 정도 충분히 마른 상태의 것이 좋다. 12~15시간 후에 항생제가 포함된 증류수 1ml을 overlay하고, 완전히 마른 후에 30°C에서 3~4일간 더 배양하였다. 얻어진 transformant는 항생제가 포함된 R1R2 plate에 옮겨 확인하였다. Thiostrepton은 20 μ g/ml의 농도로 사용하였다^{11,16)}.

5. 방선균에서 Plasmid DNA의 소량분리

1.5ml의 배양액을 10,000rpm으로 5분간 원심분리하여 균체를 얻은 다음, lysozyme을 TES(50mM Tris · Cl, 10mM EDTA, 25% Sucrose, pH 8.0) buffer에 2mg/ml의 농도로 녹여 500 μ l 첨가하여 vortex한 다음, 37°C에서 5~15분간 반응시켰다. 184 μ l의 alkaline SDS (2% SDS, 0.3M NaOH)를 첨가하여 부드럽게 섞은 후 55°C에서 5~15분간 반응시킨 다음, 얼음에 곧장 넣어 3분간 식힌 후 280 μ l 7.5M ammonium acetate를 넣고 부드럽게 섞어 10분간 얼음에 둔다. 4°C에서 15,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 옮겨 phenol/chl-

oroform 처리하고, 상층액 850 μ l에 510 μ l의 isopropanol을 첨가하여 얼음에 15분간 둔 후, 15,000rpm에서 15분간 원심분리하여 침전물을 70% ethanol로 세척하여 말린 후, RNase(20 μ g/ml)가 포함된 TE 20 μ l에 녹여 -20°C에 보관하였다^{11,14)}.

6. Protease 활성 측정

Seed culture 1ml을 액체배지에 접종하여 30°C shaking incubator에서 배양을 시작하였다. Data의 정확성을 위해 같은 균주를 3개의 플라스크에 동일하게 배양하였다.

1, 3, 5, 7, 9일 마다 배양액에서 5ml씩을 취하여 배양액 30ml씩을 확보하고 원심분리(3,500rpm, 20분)한 후 균체와 상층액을 각각 -20°C에 보관하였다. 상층액은 효소 활성을 측정하는데 사용하였다. 효소의 분해작용에 의해 각각의 artificial substrate(N-Succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide)에서 p-nitroanilide가 분리되는 것을 405nm 흡광도에서 측정하여 분석하였다. 반응의 정확성을 위해 사용할 reaction buffer와 substrate는 반응 전에 37°C에 미리 5분간 두었다가 사용하였다. 37°C에서 5분간 두었던 reaction buffer 890 μ l에 artificial substrate 10 μ l를 섞고, 준비된 상층액 sample 100 μ l를 첨가하여 vortex한 후 재빨리 37°C 반응시킨다. Dioxane을 용매로 한 30% acetic acid으로 반응을 정지시킨다^{11,17)}.

결과 및 고찰

1. *sprD* 유전자의 *S. griseus*에서의 대량발현

S. griseus IMRU 3499에서 보고된 *sprD* 유전자의 sequence data (accession number L 29018)에 근거하여 유전자 전체를 포함하는 산물을 얻을 수 있도록 primer를 작성하여 PCR을 실시한 결과 예상 size 1.4kb의 PCR band를 확인하였으며, 이를 제한효소 *EcoR I*, *Sph I*으로 처리하여 insert를 *Streptomyces-E. coli* shuttle vector인 pWHM3에 cloning하여 pWHM3-*sprD*를 얻었다¹¹⁾. pWHM3-*sprD*를 *S. lividans* TK24에 형질 전환시킨 결과 *sprD* 유전자는 성공적으로 발현되었으며, *S. lividans*의 silent 유전자인 actinorhodin 생합성 유전자의 발현을 활성화하는 것으로 나타났다. 그러나, 본 숙주세포가 생산하는 다른 색소성 항생물질인 undecylprodigiosin 생합성 유전자의 발현과 형태분화에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되었다¹¹⁾.

sprD 유전자가 *S. lividans*를 숙주로 사용한 시스템에서 대량발현이 성공적으로 되는 것을 확인한 후, 본

유전자의 방선균에서의 기능을 확인하기 위하여 본 유전자를 클로닝한 *S. griseus* IFO13350 균주와 이의 A-factor 결손주인 *S. griseus* HH1에 형질전환하였다. *S. griseus* HH1은 A-factor의 생합성이 결손된 변이주

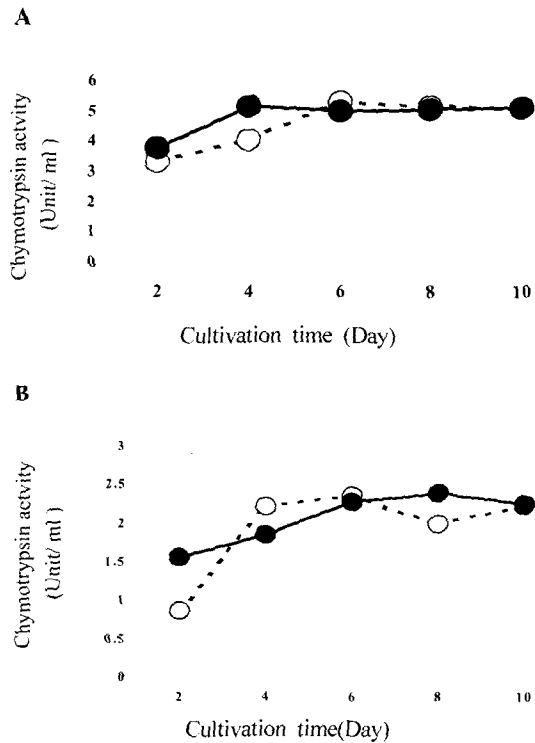


Fig. 1. Overexpression of the SGPD in *S. griseus* HH1(A) and *S. griseus* IFO 13350(B) transformed with pWHM3-*sprD*. The transformant was cultured in YEME broth as described in 'Materials and Methods'. The SGPD activity of the cultural filtrate prepared from the transformants (●--●, pWHM3-*sprD*; ○--○, pWHM3) was expressed in unit/mg of cellular protein.

로 이로 인하여 A-factor에 의한 영향을 받는 streptomycin 생산 및 저항성, 포자형성에 이르는 형태분화가 blocking된 표현형을 갖는다. *S. griseus*는 *S. lividans*에 비하여 형질전환이 어려움으로 대량의 DNA를 *S. lividans*로부터 분리하여 사용하였으며, *S. griseus* HH1에 먼저 형질전환시킨 후 얻어진 plasmid DNA를 이용하여 *S. griseus* IFO 13350에 형질전환하는 방법을 사용하였다.

pWHM3와 pWHM3-*sprD* 두 개의 plasmid를 각각 *S. griseus* HH1과 *S. griseus* IFO13350에 형질전환하였다. 형질전환된 균주를 각각 선별하여 thiostrepton(20mg/ml)이 포함된 R2YE 액체배지에 배양하여 이틀마다 채취하였고, artificial substrate를 사용하여 유전자가 암호화하는 chymotrypsin activity를 측정하였다. 그 결과, *sprD* 유전자가 *S. lividans*를 숙주로 사용한 경우 현저히 overexpression되었던 것과는 달리, *S. griseus* HH1과 *S. griseus* IFO13350에서는 protease activity가 벡터만 도입된 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 또한 *sprD* 유전자가 도입된 *S. lividans*의 경우 actinorhodin과 같은 이차대사의 활성화 형상이 관찰된 것과는 달리 *S. griseus* IFO13350 및 HH1 모두에서 생리학적·형태학적 분화의 차이를 발견하지 못하였다(Fig. 2). 이러한 사실은 *S. griseus* IFO13350 및 HH1에서 *sprD* 유전자의 발현이 억제되고 그 결과 이차대사 물질의 발현 및 분화가 일어나지 않은 것으로 생각된다.

2. *sprD* 유전자의 Promoter 분석

sprD(chymotrypsin-like protease D) 유전자에 대한 *S. lividans*, *S. griseus* HH1과 *S. griseus* IFO13350에서 gene dosage 효과는, 그 동안 연구되어 왔던 chymotrypsin-like protease A(SGPA) 및 protease B(SGPB) 유전자

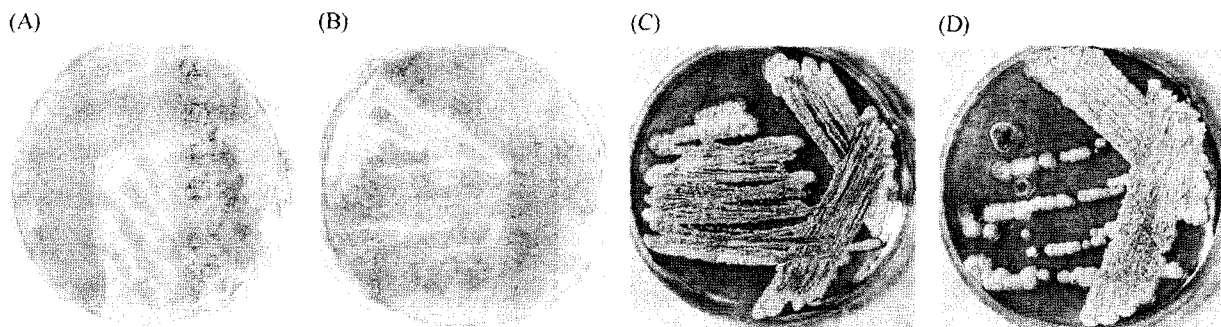


Fig. 2. Effect of SGPD overproduction on *S. griseus* HH1 and *S. griseus* IFO13350. (A) *S. griseus* HH1 with pWHM3 (B) *S. griseus* HH1 with pWHM3-*sprD* (C) *S. griseus* IFO13350 with pWHM3 (D) *S. griseus* IFO13350 with pWHM3-*sprD*.

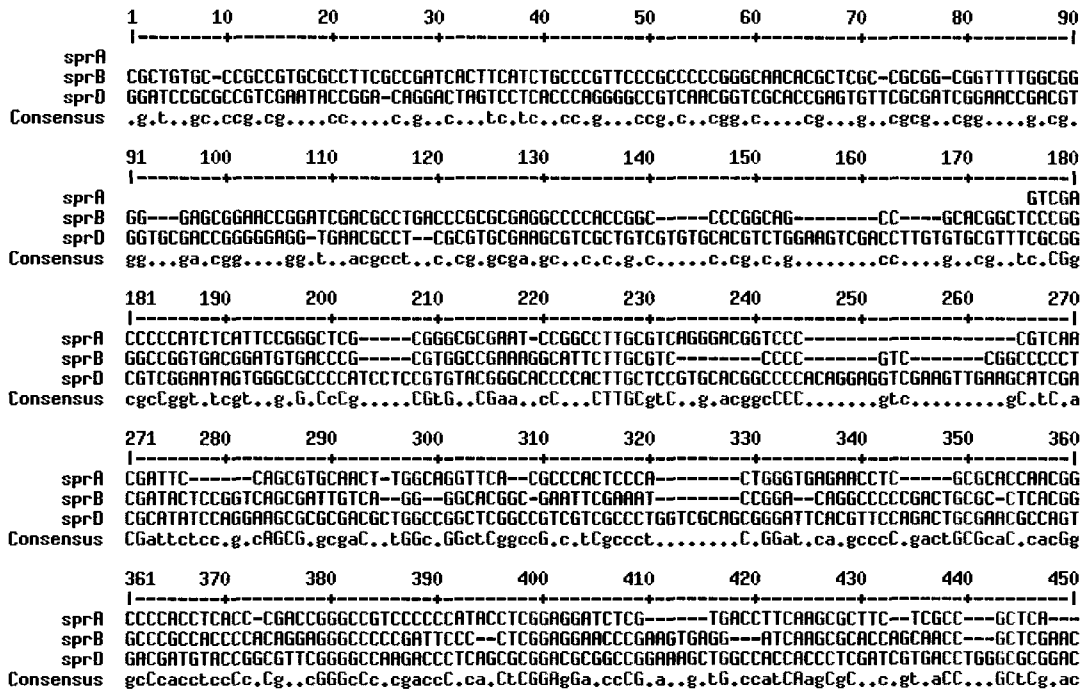


Fig. 3. Sequence homology of the promoter regions upstream the putative translational start sequences. *sprA*, *sprB*, and *sprD* encodes for chymotrypsin-like protease A(SGPA), chymotrypsin-like protease B(SGPB), and chymotrypsin-like protease D(SGPD) of *S. griseus*, respectively.

가 들어간 경우와 일치하는 결과이다. 그러나 trypsin-like protease (SGPT)를 암호화하는 유전자를 도입시킨 경우에는 *S. lividans* 및 *S. griseus* 모든 균주에서 대량 발현이 유도됨을 보고한 바 있다¹⁸⁾. 따라서, chymotrypsin계열의 protease를 암호화하는 유전자만이 *S. griseus*에서 발현이 repression된다는 사실을 본 연구 결과를 통하여 알게 되었다. 이를 바탕으로 *sprD* 유전자와 동일계열의 chymotrypsin 계열의 유전자들이 공통적으로 *S. griseus*에서 repression 되는 일반적인 기전이 있을 것으로 판단, 세 chymotrypsin 계열 유전자들의 promoter 부분의 염기 상동성을 조사하였다(Fig. 3). 번역개시부위 바로 상부 유전자부터 상동성을 조사한 결과 적어도 상당부분의 염기배열이 잘 보존된 지역이 존재함을 알게 되었다. 따라서, 각 chymotrypsin 계열 protease 유전자의 promoter부분을 보다 체계적인 방법으로 분석하여 repression에 관련된 조절 단백질을 동정하는 연구를 수행한다면 Pronase 고생산 균주 개발에 큰 기여를 할 것으로 판단된다. 아울러, repression의 결과로 *sprD* 유전자의 발현이 *S. griseus*의 생리학적·형태적 분화에 미치는 영향에 아무런 차이를 발견하지 못하였지만, 향후 이들 발현기구의 조절기구를 연구함으로써 protease의 기능을 밝히는데 좋은

단서를 제공할 것으로 판단된다.

요 약

방선균은 토양 속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람 양성 진정세균으로이차대사산물을 생산하는 시기와 포자 착생이 시작되는 세포분화의 시기가 밀접한 관련이 있다. *S. griseus*는 streptomycin을 비롯한 다양한 종류의 endopeptidase 및 exopeptidase들을 생산한다. 방선균에서의 protease 생산은 많은 경우에 이차대사산물이 형성되거나 형태분화가 유도되는 시기에 동시에 시작된다는 점에서 protease가 이차대사물질 생산 및 세포분화에 일정한 기능을 수행할 것이라는 점을 시사하고 있다. 본 연구에서는 *S. griseus* IFO 13350에서 클로닝한 SGPD protease가 각 strain에서 형태학적으로나 생리적으로 어떠한 gene dosage 효과를 미치는지 조사하는 것이었다. *sprD* 유전자가 *S. lividans*를 숙주로 사용한 시스템에서 대량발현이 성공적으로 되는 것을 확인한 후, 본 유전자를 클로닝한 *S. griseus* IFO13350 균주와 이의 A-factor 결손주인 *S. griseus* HHI에 형질전환하였다. *S. griseus* HHI과 *S. griseus* IFO13350에서는 protease activity가 벡터만 도

입된 대조군과 sprD 유전자가 들어간 형질전환체에서 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 *S. griseus* IFO13350 및 HH1 모두에서 생리학적·형태학적 분화의 차이를 발견하지 못하였다. Chymotrypsin계열의 protease를 암호화하는 유전자만이 *S. griseus*에서 발현이 repression된다는 사실을 본 연구 결과를 통하여 알게 되었다. 이를 바탕으로 sprD 유전자와 동일계열의 chymotrypsin 계열의 유전자들이 공통적으로 *S. griseus*에서 repression되는 일반적인 기전이 있을 것으로 판단, chymotrypsin 계열 유전자들의 promoter 부분의 염기 상동성을 조사하였다. 번역개시부위 바로 상부 유전자부터 상동성을 조사한 결과 적어도 상당부분의 염기배열이 잘 보존된 지역이 존재함을 알게 되었다. 향후 이들 발현기구의 조절기구를 연구함으로써 protease의 기능을 밝히는데 좋은 단서를 제공할 것으로 판단된다.

감사의 말

본 논문은 2001년도 서울대학 학술연구비에 의해 연구되었음.

참고문헌

- Hong, S. K., Matsumoto, A., Horinouchi, S. and Beppu, T. : Effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 347~354 (1993).
- Beppu, T. and Horinouchi, S. : Molecular mechanism of the A-factor dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica*, **57**, S44~S47 (1991).
- Hara, O. and Beppu, T. : Induction of streptomycin inactivating enzyme by A-factor in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.*, **35**, 1208~1215 (1982).
- Horinouchi, S. and Beppu, T. : Regulation of secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces* : A-factor as a microbial hormone and AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene*, **115**, 167~172 (1992).
- Kim, J. M. and Hong, S. K. : *Streptomyces griseus* HH1, an A-factor deficient mutant, produces diminished level of trypsin and increased level of metalloproteases. *The Journal of Microbiology*, **38**(3), 160~168 (2000).
- Moncheva, P. A., Danova, S. T., Antonova, S. K. and Ivanova, I. V. : Physiological role of extracellular proteases and calcium ions in the processes of differentiation and antibiotic production by *Streptomyces albogriseolus* 444. *Antibiot. Khimioter.*, **42**, 14~19 (1997).
- Awad, W. M. Jr., Brew, K., Powell, J. T., Russin, D. J., Seber, J. F., Siegel, S. and Vosbeck, K. D. : The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from a commercial preparation (Pronase). XI. *Evolutionary implications*. pp. 77~91 (1976).
- Trop, M. and Birk, Y. : The specificity of proteases from *Streptomyces griseus* (pronase). *J. Biochem.*, **116**, 19~25 (1970).
- Trop, M. and Birk, Y. : The trypsin-like enzyme from *Streptomyces griseus* (pronase). *J. Biochem.*, **109**, 475~476 (1968).
- Kim, J. C., Cha, S. H., Jeong, S. T., Oh, S. K. and Byun, S. M. : Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181**, 707~713 (1991).
- Choi, S. S., Chi, W. J., Lee, J. H., Kang, S. S., Jeong, B. C. and Hong, S. K. : Overexpression of the sprD Gene encoding *Streptomyces griseus* protease D stimulates actinorhodin production in *Streptomyces lividans*. *The Journal of Microbiology*, **39**(4), 305~313 (2001).
- Olfason, R. W. and Smillie, L. B. : Enzymatic and physicochemical properties of *Streptomyces griseus* trypsin. *Biochemistry*, **14**, 1161~1167 (1975).
- Henderson, G., Krygman, P., Liu, C. J., Davey, C. C. and Malek, L. T. : Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, **169**, 3778~3784 (1987).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory (1982).
- Gregory, D. G., Ordaz, D. E. and Strohl, W. R. : Overexpression of extracellular protease activity by *Streptomyces* C5-A13 in fed-batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 119~124 (1989).
- Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiat, D. J., Smith, C. P. and Ward, J. M. : *Genetic manipulation of Streptomyces : a laboratory manual*, The John Innes Foundation, Norwich, England (1985).
- Kim, I. S., Kim, H. T., Lee, H. S. and Lee, K. J. : Protease inhibitor production using *Streptomyces* sp. SMF13. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 288~292 (1991).
- Chi, W. J., Kim, J. M., Choi, S. S., Kang, D. K. and Hong, S. K. : Overproduction of SGPA and SGT Induces Morphological Changes in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**(6), 1077~1086 (2001).