

재조합 *Vibrio parahaemolyticus* 콜라겐분해효소의 분리 및 특성 분석

김수광 · 전인준 · 이재원 · 차재호*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Characterization of Recombinant *Vibrio parahaemolyticus* Collagenase

Soo-Kwang Kim, In-Joon Jeon, Jae-Won Lee and Jaeho Cha*

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

Abstract

The collagenase gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04 was subcloned into an expression vector pET-29b. The recombinant collagenase was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) and partially purified by Hi-Trap affinity and Sephacryl S-100 size exclusion chromatographies. The recombinant enzyme was purified by 43.7-fold and the yield was 73%. SDS-PAGE revealed that the molecular weight of the enzyme was approximately 35 kDa. Substrate specificity study of the enzyme displayed that the enzyme showed the highest activity with the type I collagen and the synthetic peptide, Z-GPGGPA, indicating that the enzyme was indeed a collagenase. The enzyme showed broad pH optimum around pH 6-12 and was stable between pH 5.5 and 11.5. The optimum temperature for the type I collagen degradation was 35°C. The thermostability measurement of the enzyme indicated that the enzyme was stable up to 55°C, but the activity was diminished quickly above 60°C.

Key words – collagenase, collagen, *Vibrio parahaemolyticus*

서 론

비브리오균은 해수에서 서식하는 통성혐기성 미생물로써 어류의 감염과 인간에게 있어서는 콜레라, 장염비브리오, 그리고 패혈증을 일으키는 유해균이다. 주로 콜레라를 일으키는 *Vibrio cholerae*에 대한 병리학적 연구는 상당한 연구수준에 이르고 있으나 그 밖의 다른 비브리오에 대한 연구는 상대적으로 많이 알려져 있지 않다. 최근 들어 주요 병원균으로 알려진 장염비브리오의 원인이 되는 *V. parahaemolyticus*에 대한 병리학적 연구가 활발히 진행되고

있다. 그러나 주 연구분야는 병원성인자로서 용혈인자로 알려진 헤모라이신(hemolysin)에 대한 연구[5,18,22]와 발병의 역학조사 및 진단법 개발에 대한 연구[4,8], 그리고 균의 생육에 관련된 생리적인 인자에 대한 연구에 국한되어 있고 다른 병원성 인자에 대한 연구는 미미한 실정이다. 최근 들어 병원성 인자로서 다양한 세포 외로 분비되는 효소 (extracellular enzymes)들의 역할에 대한 연구 결과들이 발표되고 있는 실정이나 아직 자세한 생화학적, 그리고 분자생물학적인 연구가 이루어지지 않고 있다.

실질적으로 비브리오가 생산하는 세포 외 단백질분해효소들이 인간이나 어패류의 병의 원인 물질에 관련되어 있다는 보고들이 발표되고 있다. 병원성균인 *Vibrio cholerae* O1가 생산하는 hemagglutinin/protease이 숙주세포의 생

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-510-2196, Fax: 051-514-1778
E-mail: jhcha@pusan.ac.kr

리적으로 중요한 기질인 mucin, fibrinectin, lactoferrin들을 분해하는 능력이 보고되었고[3], 패혈증을 일으키는 원인균인 *V. vulnificus*도 elastase 활성을 보이는 단백질분해효소를 생산하였다[10,21]. 비브리오가 생산하는 여러 세포의 효소들이 α -macroglobulin이라는 단백질에 의해 효소활성이 저해되어 병원성이 약화된다는 보고[15-17]들이 이러한 효소들의 중요성을 뒷받침 해 주고 있다. 또한 어패류에 병을 일으키는 *V. anguillarum*도 역시 protease를 분비하며[2,14], 기존의 *V. cholerae*, *V. vulnificus*와 아미노산 서열의 상동성을 보이며, 역시 elastase 활성을 나타냄으로써 숙주세포의 침입에 관여하는 것으로 추측되었다[19]. 현재 장염비브리오를 일으키는 원인균으로 알려진 *V. parahaemolyticus*도 다양한 단백질분해효소들을 생산하는 것으로 알려져 있다[9,12,23].

일반적으로 장염비브리오균이 병을 일으키려면 첫 번째 단계로 숙주세포로 침투하기 위하여 숙주세포에 부착하여 세포의 막을 통과하여 조직의 괴저가 먼저 일어난 후, 독성인자가 발현하게 된다. 이때 우선적으로 숙주세포의 표면 단백질을 분해하여야 하는데 이 때 세포의 효소들이 그 역할을 직접 또는 간접적으로 관여한다고 추측된다. 그러므로 세포 외로 분비되는 단백질 분해효소 중 하나인 콜라겐분해효소의 성질을 파악한다면 다른 독소단백질들과의 관계를 확인할 수 있는 밑거름이 될 뿐만 아니라 궁극적으로 식중독에 원인이 되는 요소들을 밝힐 수 있을 것이라 사료된다. 본 연구실에서는 이미 *V. parahaemolyticus*가 생산하는 콜라겐분해효소에 대한 유전자를 클로닝하였고, 이 효소의 유전적인 특성을 검토하였다[7]. 본 연구에서는 클론된 이 효소의 유전자를 발현벡터에 삽입하여 대장균에서 재조합효소를 발현시키고 분리하여 효소적 특성을 검사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

장염비브리오균인 *Vibrio parahaemolyticus* 04 (sero type-National Institute of Infectious Disease, Japan)은 부산대학교 주진우 교수님 연구실에서 분양받았고, 대장균은 발현숙주로 *E. coli* JM109과 *E. coli* BL21(DE3)를 각각 사용하였다. 대장균에서 발현벡터로 pET-29b가 사용되었다. *E.*

*coli*는 LB 배지에서 37°C로 배양시켰으며, 필요에 따라 kanamycin을 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 비브리오균은 tryptic soy broth에서 유지시키거나 1.5% NaCl이 첨가된 brain heart infusion 배지를 사용하였다. 배양온도는 30~37°C에서 진탕배양 하였다.

콜라겐분해효소의 활성 측정

10 mg의 type I collagen을 포함하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)액의 0.8 ml과 0.2 ml의 효소액이 사용되었다. 반응 혼합물은 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 0.1 N acetic acid 1 ml을 이용하여 반응을 정지시켰다. 생성된 free alpha-amino acid의 증가를 ninhydrin 방법으로 측정하였다[20]. 반응 혼합물은 10분간 원심분리 후, 0.1 ml의 상등액을 취하고 1.4 ml의 0.2 M citrate buffer(pH 5.5)와 1 ml의 2% ninhydrin 용액(0.05% SnCl₂를 포함하는 methylcellosolve)를 첨가한 뒤 100°C에서 10분간 가열하였다. 열음물로 반응액을 식힌 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성(specific activity)은 1 ml을 이용하여 1분당 생성된 leucine의 1 μ mole에 상응하는 양으로 정하였다. 펩타이드 기질인 Z-GPGGPA의 분해능에 대한 방법은 다음과 같다. 5 mM의 기질혼합액 0.1 ml과 4 mM CaCl₂를 포함하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)액의 0.3 ml을 0.1 ml의 효소액과 혼합하였다. 이 반응혼합물은 30°C에서 30분간 반응시킨 후, 0.1 N HCl 0.5 ml을 이용하여 반응을 정지시켰다. 생성된 free alpha-amino acid의 증가의 초기속도를 ninhydrin 방법으로 측정하였다.

발현벡터 pCOL3의 구축

콜라겐분해효소의 유전자가 pUC19 벡터에 삽입된 pCOL2를 NdeI primer (5'-AGGACCCATATGGAAGCTGAAAACCC-3')와 XhoI primer (5'-TCTCCGCTCGAGGTCTCGGCAAGCT-3')를 사용하여 PCR을 수행하고, 두 제한효소로 절단한 다음 동일 제한효소로 절단된 pET-29b에 클로닝하였다. PCR은 95°C에서 2분간 반응시키고, 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분간 반응을 30번 반복한 후, 최종적으로 72°C에서 7분간 반응하여 완성하였다. 이렇게 증폭된 2.4 kb의 콜라겐분해효소의 단편은 Concert Rapid Gel extraction kit (Gibco BRL, UK)로 정제된 후, pGEM-T 벡터에 삽입되고 두 제한 효소로 절단된 다음 pET-29b 발현벡터에

subcloning되었다. 이와 같이 구축된 벡터를 pCOL3로 명명하고 차후 실험에 사용하였다.

재조합 콜라겐분해효소의 발현 및 부분정제

발현벡터인 pCOL3는 *E. coli* BL21(DE3) 세포에 형질전환하여 30 µg/ml의 kanamycin에 대한 저항성이 있는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 여러번 계대배양하며 벡터의 안정화를 꾀하였다. 이 pCOL3를 포함하는 형질전환체는 30 µg/ml의 kanamycin이 포함된 LB 배지에서 37°C에서 24시간동안 배양되었고, 전배양된 균주는 400 ml LB 배지에서 흡광도가 0.4~0.6에 이를 때까지 배양한 후, 0.1 mM IPTG를 첨가하여 효소의 생산을 유도하였다. 생산된 효소는 원심분리한 후, 효소의 활성을 측정하였다. 배양상등액을 유안 80%로 단백질을 24시간동안 침전시키고, 침전된 단백질을 원심분리하여 회수한 후, 50 mM Tris-HCl 용액(pH 7.5)에 용해하여 조효소액으로 사용하였다. 이와 같이 농축된 조효소액은 1 ml Hi-Trap chelating column (Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)으로 정제되었다. 컬럼은 5 ml의 증류수로 씻어준 다음 0.1 M NiSO₄로 흡착시키고 0.5 M NaCl과 10 mM imidazole이 포함된 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.4)으로 평형화시킨 후, 1.0 ml/min의 유속으로 조효소액을 첨가하였다. 콜라겐분해효소는 70 mM imidazole의 농도로 용출하였다. 용출된 효소액은 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)로 투석하여 염을 제거한 후, YM10(Amicon) membrane을 이용하여 8 ml로 농축되었다. 이 효소액은 같은 완충액으로 평형화된 Sephacryl S-100 HR column (Pharmacia)에 의하여 정제되었다. 컬럼의 유속은 0.25 ml/min으로 하였으며, fraction volume은 1 ml로 하였다. 분리되는 콜라겐분해효소 용액은 활성측정을 통하여 수집하였다.

SDS-Polyacrylamide 전기영동

각 정제단계에서의 단백질의 순도는 Laemmli법[11]에 의한 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 시행하여 확인하였다. 각각의 시료는 3% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.0625 M Tris buffer(pH 6.8)에 가하여 100°C에서 5 분간 변성시킨 후, 사용하였다. 이 시료를 4.5% stacking gel과 12% resolving gel에 적용하여 150 volt로 1시간동안 전기영동한 후 0.1% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 후 탈색하였다. 시료중 단

백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법[13]을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

대장균에서 콜라겐분해효소의 생산

기존에 클로닝된 콜라겐분해효소의 효소활성을 대장균에서 확인하기 위하여 일차적으로 pUC19을 이용한 재조합벡터 pCOL2에서 활성을 검사하였으며, *E. coli* JM109에서 gelatin을 기질로 사용하였을 때 LB 한천배지에서 투명한 환을 볼 수 있었다(결과 미제시). 이러한 분해능은 대장균만을 배양했을 때는 활성이 나타나지 않는 것으로 보아 비브리오균에서 유래함을 알 수 있었다. *E. coli* JM109이 생산하는 효소의 수율이 그다지 높지 않았기 때문에 더 높은 수율의 효소를 얻기 위하여 강력한 T7lac 프로모터를 함유한 pET-29b 발현벡터에 콜라겐분해효소의 유전자를 클로닝시켜서 효소의 생산능을 검토하였다. PCR로 얻어진 이 효소의 유전자부분을 위의 벡터에 삽입하여 재조합벡터인 pCOL3를 구축하고, IPTG에 의하여 조절되는 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하여 형질전환체를 얻은 후, LB배지를 이용하여 기질로서 type I collagen을 가지고 콜라겐 분해정도를 측정하였고, 효소의 생산성을 검사하였다. 대부분의 효소활성이 배양 상등액에서 나타났으며, 효소의 활성은 약 5 units/ml로 비브리오균의 배양 상등액에서 얻어진 0.15 units/ml보다 약 50 배정도 높아짐을 알 수 있었다(Table 1). 그러나 생산된 효소는 부분 정제하는 중에 변성에 의하여 상당량의 효소의 실활이 일어남을 알 수 있었다.

발현된 효소의 부분정제

*E. coli*에서 대량 발현된 효소를 정제하기 위해 Hi-Trap chelating과 gel filtration 크로마토그래피법을 사용하였고,

Table 1. Collagenolytic activity of the recombinant *E. coli* cells carrying the constructed plasmid

	Collagenase activity (U/ml)	
	Cell-free extract	Supernatant
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pCOL3	0.07	5.40
<i>E. coli</i> JM109/pCOL2	0.10	0.30
<i>V. parahaemolyticus</i> 04	-	0.16

Enzyme units were expressed as µ mole of a leucine equivalent per min per ml.

부분정제된 효소의 전체 단백질의 양은 0.5 mg정도로 73%의 수율과 43.7배의 농축효과를 나타내는 것으로 판명되었다 (Table 2). Gel filtration을 통해 모아진 효소액을 12% SDS-polyacrylamide gel 을 수행하여 Fig. 1에 나타난 바와 같이 밴드를 확인할 수 있었으며, 표준단백질과 비교한 결과 약 35 kDa으로 추정되었다. 이러한 콜라겐분해효소의 분자량은 기존에 연구된 *Clostridium histolyticum*[1]과 *V. alginolyticus*[23]에서 생산되는 collagenase 90-110 kDa과는 큰 차이를 나타내었으며, 또한 이 효소유전자의 염기서열로부터 추론된 단백질의 분자량 89 kDa과도 큰 차이를 보였다. 부분정제로 얻어진 효소의 분자량이 클론된 유전자의 아미노산으로부터 추론된 분자량과 상당한 차이가 있는 것은 정제시 대장균이 생산하는 다른 여러 단백질분해효소들에 의한 분해에 의하여 크기가 감소된 것과 자기분해

(autoprocessing)에 분자량의 감소로 생각되어진다. 수많은 세포의 분비 효소들은 전구체의 형태로 생산되어진 후 processing이라는 단계를 거쳐 활성을 갖는 효소로 바뀌어진다고 알려져 있다.

정제효소의 pH 및 온도에 미치는 영향

정제효소의 pH의 영향을 조사하기 위해 100 mM acetate buffer(pH 3-5.5), phosphate buffer(pH 5.5-7), Tris-HCl(pH 7-9), boric acid/NaOH buffer(pH 9-10.5), Na₂HPO₄/NaOH buffer(pH 10.5-12)를 사용하여 35°C에서 각 pH 별로 30 분간 반응시켜 활성도를 측정 한 결과 효소의 반응 최적 pH는 Fig. 2와 같이 약 6.0에서 12.0까지 넓은 범위에서 최적활성을 보였다. 또한 pH의 안정성을 조사하기 위해 4°C에서 각기 다른 pH 완충액에서 1시간 반응시킨 후, 잔존활성을 측정 한 결과 pH 5.5에서 11.5 사이의 부근에서 안정성이 높았으나 pH 5 이하의 산성에서는 급격히 떨어졌다. 이 효소에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 20~80°C까지 변화시켜 활성을 조사하였다. Fig. 3과 같이 35°C에서 최적활성을 보였고, 효소를 각 온도별에서 15분간 열처리한 후 잔존활성을 실험한 결과 55°C까

Table 2. Purification step of recombinant collagenase from *E. coli* BL21 (DE3)/pCOL3

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
crude enzyme	30	1620	54	1	100
Hi-Trap chelating	3	1320	440	8.1	81
Sephacryl S-100	0.5	1182	2364	43.7	73

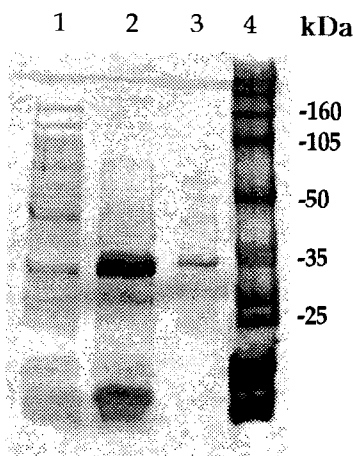


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the purified collagenase from *E. coli* BL21(DE3)/pCOL3. lane 1, total cell (induced); lane 2, Hi-Trap chelating pool; lane 3, sephacryl S-100 pool; lane 4, molecular weight standards.

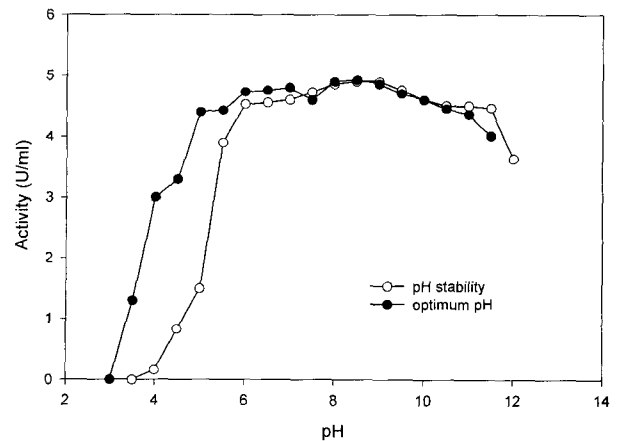


Fig. 2. The effect of pH on the enzyme activity and stability. For the determination of optimum pH, the reaction mixture containing the 0.2 ml of enzyme solution and 0.8 ml of 0.8% collagen in 10 mM each buffer was incubated at 35°C for 30 min. For the enzyme stability, the enzyme solution was preincubated in 10 mM each buffer at 4°C for 1 hr and then the residual activity was measured.

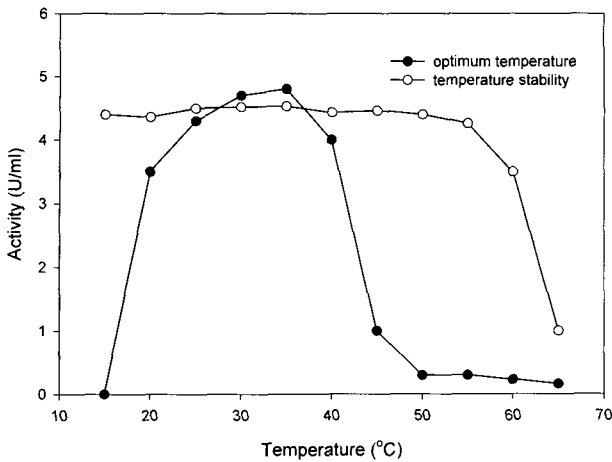


Fig. 3. The effect of temperature on the enzyme activity and stability. For the determination of optimum temperature, the reaction mixture containing the 0.2 ml of enzyme solution and 0.8 ml of 0.8% collagen in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) was incubated at the indicated temperature for 30 min. For thermostability, the enzyme solution was pre-incubated at each temperature for 15 min in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) and then the residual activity was measured.

지는 90% 잔존 활성을 유지하며 안정성을 유지하였으나 60°C에서는 약 50%의 잔존활성을 나타내었고, 그 이상의 온도에서는 효소활성이 거의 실활되는 것으로 나타났다.

정제효소의 기질 특이성

부분정제된 콜라겐분해효소가 기질인 type I 콜라겐 외에도 어떠한 기질을 이용하는지를 조사하기 위하여 gelatin, casein, elastin, 그리고 합성기질인 Z-GPGGPA를 사용하여 기질 특이성을 조사한 결과, Fig. 4와 같이 gelatin, casein, 그리고 Z-GPGGPA에는 반응을 보인 반면, elastin에는 전혀 반응을 나타내지 않았다. 활성의 정도도 type I collagen과 콜라겐분해효소의 합성기질로 알려진 Z-GPGGPA에는 높은 활성을 보였다. 콜라겐을 분해할 수 있는 효소는 콜라겐물질의 Pro-Xaa-Gly-Pro 서열의 Xaa와 Gly 사이의 펩티드 결합을 분해하는 것으로 알려져 있다[6]. 일반적인 세균유래 콜라겐분해효소는 다양한 기질에 대한 활성을 보이는 것으로 알려져 본 연구의 효소가 진정한 콜라겐분해효소라는 것을 말해준다.

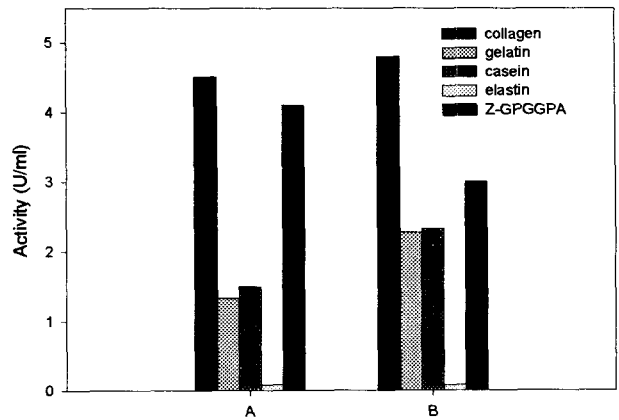


Fig. 4. Comparison of the substrate specificity of the recombinant collagenase and *V. alginolyticus* collagenase. A: recombinant collagenase from *V. parahaemolyticus*, B: *V. alginolyticus* collagenase.

요 약

식중독 병원균인 장염비브리오균 (*V. parahaemolyticus*)의 세포외 분비 효소 중 콜라겐분해효소를 발현백터인 pET-29b에 클로닝시키고 대장균에서 발현시킨 다음, 부분정제하여 그 특성을 조사하였다. *V. parahaemolyticus* collagenase는 (NH₄)₂SO₄ 침전, affinity adsorption, 그리고 Sephacryl S-100 gel filtration 과정을 통하여 부분정제되었다. 이 collagenase는 73%의 회수율과 43.7%의 정제도를 나타내었으며, 전기영동시 분자량은 약 35 kDa로 나타났다. 이 효소의 최적 pH 및 온도는 6~12와 35°C이었고, 온도안정성 조사에서 55°C까지는 90% 잔존 활성을 유지하였으나 60°C 이상에서는 급격하게 효소활성이 실활되었다. 기질특이성조사에서 type I collagen과 콜라겐분해효소의 합성기질로 알려진 Z-GPGGPA에서 gelatin과 casein에 비해 높은 활성을 보이는 것으로 보아 이 효소가 진정한 콜라겐분해효소라는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 연구(보조)비 (4년과제)에 의한 지원으로 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Bond, M. D. and H. E. Van Wart. 1984. Character-

- ization of individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* **23**, 3085-3091.
2. Farrell, D. H. and J. H. Crosa. 1991. Purification and characterization of a secreted protease from the pathogenic marine bacterium *Vibrio anguillarum*. *Biochemistry* **30**, 3432-3436.
 3. Finkelstein, R. A., M. Boesman-Finklestein and P. Holt. 1983. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibrinectin and ovomucin: F. M. Burnet revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 1092-1095.
 4. Hara-Kudo, Y., T. Nishina, H. Nakagawa, H. Konuma, J. Hasegawa and S. Kumagai. 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5819-5823.
 5. Honda, T., Y. X. Ni and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* **56**, 961-965.
 6. Keil, B. 1979. Some newly characterized collagenase from prokaryotes and lower eukaryotes. *Mol. Cell. Biochem.* **23**, 87-108.
 7. Kim, S. K., J. Y. Yang and J. Cha. 2002. Cloning and sequence analysis of a novel metalloprotease gene from *Vibrio parahaemolyticus* 04. *Gene* **283**, 277-286.
 8. Kim, Y. B., J. Okuda, C. Matsumoto, N. Takahashi, S. Hashimoto and M. Nishibuchi. 1999. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1173-1177.
 9. Kim, Y. H. and J. Cha J. 2001. Distribution of extracellular proteases from various *Vibrio* sp. *Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 222-227.
 10. Kothary, M. H. and A. S. Kreeger. 1987. Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1783-1791.
 11. Lamml, U. K. 1965. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
 12. Lee, C. Y., S. C. Su and R. B. Liaw. 1995. Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology* **141**, 2569-2576.
 13. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 263-275.
 14. Milton, D. L., A. Norqvist and H. Wolf-Watz, 1992. Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**, 7235-7244.
 15. Miyoshi, S. and S. Shinoda. 1989. Inhibitory effect of alpha 2-macroglobulin on *Vibrio vulnificus* protease. *J. Biochem.* **106**, 299-303.
 16. Miyoshi, S. and S. Shinoda. 1991. Alpha-macroglobulin-like plasma inactivator for *Vibrio vulnificus* metalloprotease. *J. Biochem.* **110**, 548-552.
 17. Narukawa, H., S. Miyoshi and S. Shinoda. 1993. Chemical modification of *Vibrio vulnificus* metalloprotease with activated polyethylene glycol. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**, 43-46.
 18. Nishibuchi, M, T. Taniguchi, T. Misawa, V. Khaemanee-Iam, T. Honda. and T. Miwatani. 1989. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **57**, 2691-2697.
 19. Norqvist, A., B. Norrman and H. Wolf-Watz. 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* **58**, 3731-3736.
 20. Ross, G. F., J. Meuth, B. Ohning, Y. Kim and J. A. Whitsett. 1986. Purification of canine surfactant-associated glycoproteins A. Identification of a collagenase-resistant domain. *Biochim. Biophys. Acta* **870**, 267-278.
 21. Smith, G. C. and J. R. Merkel. 1982. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.* **35**, 1155-1156.
 22. Takeda, Y. 1988. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Methods Enzymol.* **165**, 189-193.
 23. Tong, N. T., A. Tsugita and V. Keil-Dlouha, 1986. Purification and characterization of two high molecular mass forms of *Acromobacter* collagenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **874**, 296-304.

(Received April 3, 2003; Accepted June 17, 2003)