

Streptococcus equisimilis H46A에서 Streptokinase 프로모터를 이용한 Streptodornase 발현 증진

손현정 · 진종언¹ · 김일철² · 배 석 · 이황희*

전남대학교 생명과학부, ¹동강대학교 피부미용과, ²한국과학기술원 생물과학부

Expression of Streptodornase by Use of Streptokinase Promoter in *Streptococcus equisimilis* H46A. Sohn, Hyun-Jung, Jongeon Chin¹, Il-Chul Kim², Suk Bai, and Hwanghee Blaise Lee*. Department of Biological Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ¹Department of Cosmetology, Dongkang College, Gwangju 500-714, Korea, ²Department of Biological Science, KAIST, Taejon 305-701, Korea - A gene encoding streptodornase(*sd*) from *Streptococcus equisimilis* H46A was expressed in *S. equisimilis* H46A *sd*⁻ under the control of the streptokinase gene promoter. Secretion of the streptodornase was directed by the signal sequences of streptokinase or streptodornase. The expressed streptodornase activity from *S. equisimilis* H46A *sd*⁻ transformant with streptokinase promoter - streptodornase coding sequence fusion vector was 2.3 fold higher than that from wild type. Construct of signal sequence region replaced by streptokinase ones was similarly expressed as a wild type. But constructs of *skc* or *lrp* core regions of streptokinase promoter streptodornase fusion were similarly expressed as in *sd*⁻ mutant. In conclusion, improved expression of streptodornase by use of streptokinase promoter required the full length of promoter.

Key words: Streptodornase, streptokinase, *Streptococcus equisimilis* H46A, streptokinase promoter

Streptodornase는 *Streptococcus*의 C 그룹 미생물들이 생산하는 단백질이며, DNA를 분해하여 3-phosphonucleotide를 만드는 효소이다[1]. 이 효소는 streptokinase와 함께 혈전을 치료하는데 사용되며, 사람의 관절이나 복수와 같은 부분에 만들어진 혈전을 치료하는데 상업적으로 이용된다[17]. 혈전증 치료의 주된 효소인 streptokinase의 발현증진에 대한 연구는 유용한 프로모터를 이용하거나 OmpA 단백질 신호서열을 이용하여 대장균에서 대량발현시키는 등 활발한 연구가 진행되었다[3, 5, 9]. 이러한 연구와 함께 streptodornase에 대한 클로닝 작업과 발현증진을 위한 연구를 *E. coli*, *Bacillus subtilis* 및 *Lactobacillus lactis* 등의 균주를 대상으로 진행하였으나 발현되는 양이 streptokinase의 발현에 비해 너무 적어서 산업적 생산 증진은 어려운 실정이다[3, 18]. 실제로 모 제약회사에서 1990년 중반에 본 연구진에게 *Streptococcus equisimilis* H46A에서 혈전증치료제로 쓰이는 streptokinase와 streptodornase를 생산하는데 streptodornase의 발현이 상대적으로 적어 산업적 생산에 어려움이 있음을 알려와 원균주에서 streptodornase의 발현을 증진시키기 위한 방법을 찾기 위하여 본 과제를 수행하게 되었다.

S. equisimilis H46A 균주에서 이루어진 프로모터 연구로

는 streptokinase 프로모터-lacZ와 streptokinase 프로모터-luciferase 융합벡터들을 이용한 특정 연구에서, 프로모터의 *skc*와 *lrp* 부분이 중심적인 역할을 하고 있음이 보고되었다[4,8].

본 연구에서는 *S. equisimilis* H46A 균주에서 streptodornase의 발현을 증진시키기 위하여 streptodornase 유전자의 프로모터 부분을 streptokinase 프로모터의 전체 또는 부분적으로 치환하거나 분비 신호서열 부분의 유전자를 치환하여 발현을 분석하였다. Streptodornase는 DNA를 분해하는 deoxyribonuclease 효소로 유전자를 *sd*로 표시하며, 균주가 이러한 효소를 분비하는지 확인하는 방법으로 균주를 toluidine blue DNase test agar에 접종하여 콜로니 주위에 나타나는 자주색 환으로 발현유무를 파악하는 방법을 이용하고 있다[2, 7, 16, 18]. Streptodornase 유전자는 *S. equisimilis* H46A의 유전자를 이용하였고, 클로닝을 위한 숙주로는 *E. coli* JM83[*ara*, (*lac-pro* AB), *rps*, Φ80, *lacZ*M15] 균주와 *S. equisimilis* H46A *sd*⁻ 균주를 이용하였다. *S. equisimilis* H46A *sd*⁻ 균주는 Lawrence[6]의 방법으로 원 균주에 N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroguanidine(NTG, Fluka No. 68051)을 처리하여 toluidine blue(Sigma No. T3260) DNase test agar(TBD, Difco No. 0632-17)에 접종하고 DNase의 활성이 없어 자주색환이 나타나지 않은 콜로니를 선별하여 사용하였다. 유전자의 클로닝에는 pBluescript SK(+)(Stratagene, CA), pGMT-easy(Promega, WI), pUC19 벡터들을 사용하

*Corresponding author

Tel: 82-62-530-3400, Fax: 82-62-530-3409

E-mail: blaise@chonnam.chonnam.ac.kr

였고, 발현벡터로는 그람양성균 발현벡터인 pHY300PLK (Takara, Tokyo)를 사용하였다.

S. equisimilis H46A로부터 Marmur's 방법에 따라 DNA를 분리하였고[11, 12], PCR 방법을 이용하여 증폭하였다. PCR 증폭에 사용한 프라이머는 streptokinase[10]와 streptodornase [18]의 염기서열들을 참고로 하였다. Streptodornase 유전자의 클로닝을 위해 정방향의 프라이머에는 BamHI 부위를 첨가하고, 역 방향의 프라이머에는 KpnI과 HindIII 부위를 첨가하여 제작하였다. Streptodornase 전체 유전자의 증폭을 위해 제작한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다: SDF1(5-GGGGGATCCATGGATATGTCAAAAAGCTCAG-3), SDR1(5-GGGGTACCAAGCTTTTAGTTTTCTTCTTCTTCGGTAG-3). Streptodornase의 신호서열을 제외한 구조 유전자 부분의 클로닝을 위해 Ala24 부분의 프라이머를 제작하였으며 염기서열은 다음과 같다: SDF2(5-ATTC CTTATCATCACAAATACAGTC-3). Streptokinase 프로모터 부분의 subcloning을 위해서는 다섯 종류의 프라이머를 제작하였고 클로닝을 위해 BamHI이나 HindIII 부위를 첨가하였으며, 제작한 프라이머의 서열은 다음과 같다: SKF1(5-CAGACATGTAGCTACCTGATACCAGGCAT-3), SKF2(5-CGGAACCAAAAATCACTTTCT-3), SKF3(5-CAATCAC CCACTCTTTATCTCCT-3), SKR1(5-CAGCAAAAAGCTTG GACAGAATTGACTGT-3), SKR2(5-CGGGGATCCGCTG ACAACAACTGAACTG-3), SKR3(5-GCGGGATCCA GAAACCTCTAAAAGTTAAGTTTC-3).

모든 프라이머는 바이오니아 회사에 의뢰하여 합성하였으며, PCR은 PreMix Top DNA polymerase(바이오니아)를 사용하고 Gene Amp PCR system 2400(Perkin Elmer Co. UAS)를 이용하여 수행하였다. Streptokinase 유전자의 프로모터, 신호서열을 포함한 프로모터, 프로모터의 중심역할을 하는 것으로 알려진 *lrp*, *skc* 부분들의 증폭을 위해 사용한 프라이머 조합은 차례로 SKF1-SKR1, SKF1-SKR3, SKF2-SKR2, SKF3-SKR3이다.

Streptokinase 프로모터(794 bp)와 streptodornase 신호서열을 포함하는 streptodornase(833 bp) 유전자부분을 증폭하여 pGMT-easy 벡터에 넣고 프로모터의 EcoRI/BamHI 절편과 streptodornase의 BamHI/HindIII 절편을 차례로 pHY300PLK에 넣고 pKDSD라 하였다.

Streptokinase의 신호서열을 포함한 프로모터(900 bp)를 증폭한 DNA 절편을 DNA polymerase로 처리한 후 pBluescript SK 벡터의 EcoRV-HindIII 부위에 넣은 다음, 벡터를 HindIII/DNA polymerase I과 KpnI으로 처리하고, 신호서열이 없는 streptodornase 유전자를 증폭하여 DNA polymerase I으로 처리한 후 KpnI으로 처리하여 클로닝하고 pBKSD라 하였다.

pBKSD의 벡터의 EcoRI/KpnI 삽입 절편을 pUC19의 EcoRI/KpnI어 옮긴 다음 HindIII/EcoRI 절편을 pHY300PLK

벡터에 넣고 만들어진 벡터를 pKKSD라 하였다.

Streptokinase 프로모터의 *lrp*(560 bp)와 *skc*(300 bp) 부분들과 streptodornase의 융합벡터들은 유전자를 증폭하여 pGMT-easy 벡터에 넣고 EcoRI/BamHI 절편들을 얻은 다음 pSKSD의 EcoRI/BamHI 부위에 넣어 벡터를 만들고 차례로 plrpSD와 pskcSD라 하였다. 본 실험에 사용한 모든 벡터를 Fig. 1에 표시하였다.

S. equisimilis H46A *sdc*⁻ 균주의 형질전환은 Sadaie[13]의 방법에 따라 수행하였고, 형질전환 균주의 streptodornase 발현확인에는 테트라사이클린 20 µg/ml를 함유한 toluidine blue DNase test agar에 접종하여 나타나는 자주색 환의 크기를 이용하는 방법을 사용하였다[2]. 발현된 streptodornase 효소활성의 측정에는 Seog[14]와 Snincropi[15]의 방법을 이용하여 측정하였다. 효소활성을 측정하기 위해 형질전환 균주를 0.2 µg/ml의 테트라사이클린을 함유한 BHI 배양액(Difco No. 0037-17-8)에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 진탕배양하고 원심분리하여 배양액을 취한 다음, 40 mM Tris-Cl(pH7.4) 20 mM MgCl₂ 용액으로 투석하고, 37°C에서 30분 동안 DNA-methyl green(Sigma No. D2376) 용액과 반응시켜 활성을 측정하였다. Streptodornase의 활성은 기준시료인 40 Kunitz units/ml DNase(Sigma No. D4263)의 기준활성과 비교하여 Kunitz unit로 정하였으며, Sigma 회사에서 제시하는 기준자료에 따라서 측정된 값을 다음과 같이 정의하였다.

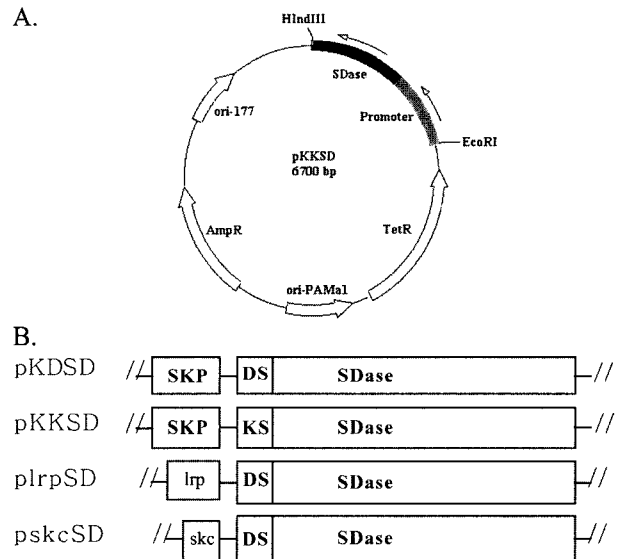


Fig. 1. Construction of various expression vectors for streptodornase. A. Map of the expression vector derived from pHYPLK300 used for cloning of streptokinase promoter and streptodornase gene from *S. equisimilis* H46A. B. Constructs of promoter-streptodornase fusion gene. SKP; full promoter of streptokinase, SDase; streptodornase gene, DS; signal sequence of streptodornase, KS; signal sequence of streptokinase, *lrp* and *skc*; core promoter of streptokinase.

One Kunitz = (A640nm 분당 시료의 흡광도 증가 40 × 준비한 시료의 희석율)/(A640 nm 기준시료의 흡광도 증가)

지금까지 streptodornase의 발현분석과 발현이 증진된 균주를 개발하기 위한 연구에서 균주의 분석 방법으로 toluidine blue DNase test agar에 접종하여 나타나는 자주색 환의 크기를 이용하는 방법을 주로 사용하고 있는데 [2, 7, 16, 18], 이 방법으로 발현이 증진된 균주를 찾는 것은 매우 어려운 일이다. 실제로 돌연변이 물질을 이용하여 돌연변이 균주들을 만들고 자주색 환의 직경이 커진 균주를 선별하여 효소 활성법으로 측정된 결과 전체 활성에서는 차이가 없거나 감소된 경우가 많았다. 이러한 문제를 해결하기 위해 먼저 돌연변이 방법으로 *S. equisimilis* H46A의 *sdc*⁻ 균주를 만들고 여기에 유전자 재조합하여 만든 플라스미드들을 형질전환하여 TBD에서 *sdc*⁻ 균주를 찾고 활성을 측정하여 비교하였다. 돌연변이 균주인 *S. equisimilis* H46A *sdc*⁻ 균주에서는 콜로니 주위에 자주색 환이 나타나지 않았으며 (Fig. 2A), 배양액

의 효소 활성도 나타나지 않았다. 이러한 결과는 돌연변이 균주가 streptodornase 발현이 없어진 것을 나타낸다.

돌연변이 균주에 streptodornase 유전자를 재조합한 플라스미드들을 형질전환하고 각각을 TBD에 도말하여 형질전환체들의 자주색환을 비교한 결과 야생형 균주와 비슷한 크기를 나타내어 발현의 증감을 분석할 수 없었다 (Fig. 2B). 형질전환 균주들의 streptodornase 세포내 활성을 조사한 결과 세포질에서는 활성이 나타나지 않았으며, periplasm에서는 전체 활성의 5% 이내로 매우 낮게 나왔으며, 대부분의 활성은 세포 배양액에서 나타났다. 형질전환체들을 BHI 배지에 배양하여 발현된 streptodornase의 활성을 비교한 결과, streptokinase 프로모터와 streptodornase 유전자를 융합한 벡터 (pKSD)의 발현이 42 Kunitz unit/ml로 나타나야생형 균주의 18 Kunitz unit/ml와 비교하였을 때 발현이 230% 정도로 현저히 증가되었다 (Fig. 3). pKSD 벡터의 streptodornase의 신호서열 부분을 streptokinase의 신호서열로 치환한 벡터 (pKKSD)는 야생형 균주의 발현도와 유사하여 streptodornase 원래의 신호서열을 사용하는 것이 더 효과적이었다. Streptodornase 신호서열을 streptokinase의 신호서열로 치환하였을 때 발현이 저하된 원인을 알아보기 위하여 신호서열의 아미노산 서열을 분석한 결과 streptokinase와 streptodornase의 아미노산 수는 26:24이었고, 소수성 아미노산의 비율은 70:73%로 별 차이가 없었으나, 전체 전하의 수는 +1:+4로 많은 차이가 있었다. 이러한 신호서열 부분의 전체 전하의 차이가 streptodornase의 발현 저하에 영향을 미쳤을 것으로 추측된다.

Streptokinase의 프로모터-lacZ 시스템에서는 *skc*와 *lvp* 부분을 이용하였을 때 β-galactosidase의 발현 증가율이 200

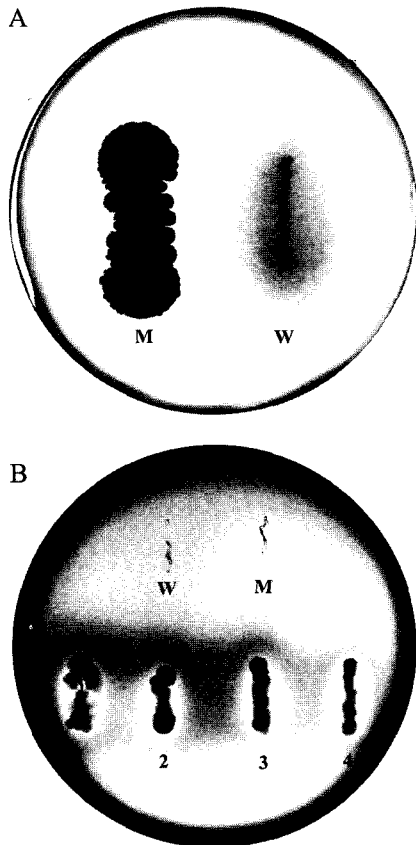


Fig. 2. Extracellular secretion of streptodornase by transformants of *S. equisimilis* H46A with various expression vectors on toluidine blue-DNase test (TBD) agar plate. A. TBD agar plate. W, wild type of *S. equisimilis* H46A; M, *S. equisimilis* H46A *sdc*⁻. B. TBD agar plate containing 20 µg/ml tetracycline. Indicated 1, 2, 3, and 4 represent the transformants of *S. equisimilis* H46A *sdc*⁻ with pKSD, pKKSD, plrpSD, and pskcSD, respectively.

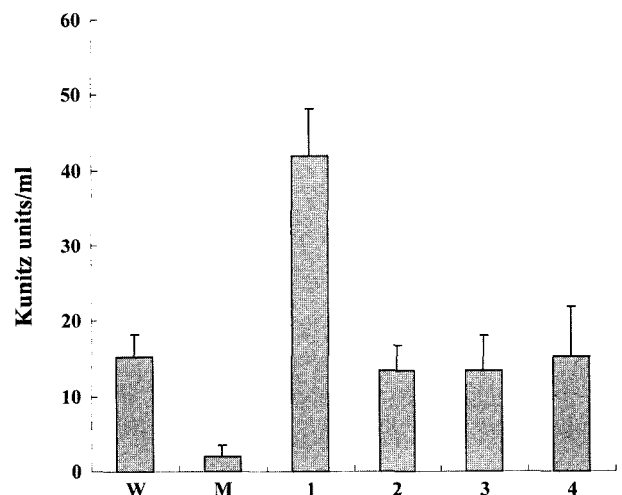


Fig. 3. Streptodornase activity in cell-free culture supernatants of various transformants. W, wild type; M, *sdc*⁻ mutant; 1, pKSD; 2, pKKSD; 3, plrpSD; 4, pskcSD. Graph values are the mean SD of results from triplicate experiments and express the streptodornase activity present in the culture supernatant after 3 days cultivation.

배와 50배로 각각 나타났으나[4, 8], 본 연구에서는 이 부분을 포함한 발현 벡터(plrpSD와 pskcSD)의 발현을 조사한 결과 발현율이 *sdc* 돌연변이체 보다는 7-8배 정도 증가하였고, 야생형 균주와는 비슷하게 나타났다. Streptokinase의 프로모터의 *skc*와 *lrp* 부분을 함께 이용한 경우에서도 lac-Z 시스템에서는 200배정도로 높게 나타 났으나 streptodornase 시스템에서는 *sdc* 돌연변이체에 비해 20배 정도 증가하였다. 프로모터-lacZ 시스템의 β -galactosidase와 본 연구에서 사용한 프로모터-streptodornase 시스템의 분석하는 방법이 다르고, streptokinase promoter를 이용하여 다른 유전자를 발현 시킨 다른 예가 없어 두 시스템을 단순비교 하기는 어려운 점이 있으며, streptodornase가 DNase인 이유로 세포에서 과 발현시키기는 어려우나 발현율을 개선시키기 위해서는 단백질 분비 시스템의 개선과 같은 또 다른 시스템이 필요한 것으로 판단되었다.

이러한 결과들로 볼 때 streptokinase 프로모터 부분을 다른 유전자의 발현을 위해 사용할 경우 전체를 사용하는 것이 좋을 것으로 판단되었다. 혈전증 치료제로 이용하는 streptokinase와 streptodornase 생산에서 streptokinase의 발현 증진 방법들은 균주 개량이나 유전자 재조합 방법 등을 이용하여 개선되었으나, streptodornase의 경우 돌연변이 방법에서는 분석에 사용하는 toluidine blue DNase test agar에서 나타나는 자주색환의 크기에 의한 발현 증진 균주의 선별이 어렵고, 유전자를 이용한 야생형 균주의 형질전환 방법에서는 야생형 균주 자체가 가지고 있는 발현으로 인해 새롭게 도입한 streptodornase 유전자의 발현증진 효과를 분석하기가 어려워 개선이 어려웠는데, 본 실험에서와 같이 streptodornase 유전자 발현을 이용한다면 개선시킬 수 있을 것으로 판단된다. 이러한 시스템을 산업적 생산에 이용하기 위해서는 streptokinase는 과발현되나 streptodornase의 발현은 증가하지 않은 균주에 유전자를 도입하여 두 가지 효소를 동시에 과발현시켜 생산의 비용을 줄이는 연구의 진행이 필요하다.

감사의 글

본 연구를 진행하는데 도움을 주신 김동만 박사님께 감사를 드립니다. 이 연구는 전남대학교 연구비(1995)와 호르몬 연구센터 연구비(2000)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Anfinsen, C. B., P. Cuatrecasas, and H. Taniuchi. 1971. Staphylococcal nuclease, chemical properties and catalysis, pp. 177-204. In P. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol.4, Academic Press. New York. U.S.A.
2. Ball, T. K., P. N. Saurugger, and M. J. Benedik. 1987. The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 183-192.
3. Estrada, M. P., L. Hernandez, A. Perez, Rodriguez, R. Serrano, R. Rubiera, A. Pedraza, G. Padron, W. Antuch, J. de la Fuente, and L. Herrera. 1992. High level expression of Streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnol.* **10**: 1138-1142.
4. Gase K., T. Ellinger, and H. Malke. 1995. Complex transcriptional control of the streptokinase gene of *Streptococcus equisimilis* H46A. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 749-758.
5. Ko, J.H., D. D. Park, I. C. Kim, S. H. Lee, and S. M. Byan. 1995. High-level expression and secretion of Streptokinase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1019-1024.
6. Lawrence, C. W. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Methods in Enzymol.* **194**: 23-81.
7. Lacks, S. 1970. Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonuclease and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *J. of Bacteriol.* **101**: 373-383.
8. Malke, H., K. Stenier, K. Gase, and C. Frank. 2000. Expression and regulation of the streptokinase gene. *Methods.* **21**: 111-124.
9. Malke, H. and J. J. Ferretti. 1984. Streptokinase: cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 3557-3561.
10. Malke, H., B. Roe, J. J. Ferretti. 1985. Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene.* **34**: 357-362.
11. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
12. Martin, B., H. Prats, J. P. Claverys. 1985. Cloning of the hexA mismatch-repair gene of *Streptococcus pneumoniae* and identification of the product. *Gene* **34**: 293-303.
13. Sadaie, Y. and T. Kada. 1983. Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **153**: 813-21
14. Kim, S. K. and B. Norden. 1993. Methylgreen. A DNA major groove binding drug. *FEBS.* **315**: 61-64.
15. Sinicropi, D., D. L. Baker, W. S. Prince, K. Shiffer, and S. Shak. 1994. Colorimetric determination of DNase I activity with a DNA-methyl green substrate. *Anal. Biochem.* **222**: 351-358.
16. Sortle, D. 1983. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* **22**: 181-189.
17. Tillet, W. S., S. Scherry, and L. R. Christensen. 1948. Streptococcal deoxyribonuclease: significance in lysis of purulent exudates and production by strains of hemolytic Streptococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **68**: 184 - 188.
18. Wolinowska, R., K. J. Ceglowski, and G. Venema. 1991. Isolation, sequence and expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* of the DNase (Streptodornase) encoding gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene* **106**: 115-119.

(Received July 21, 2003/Accepted Sep. 9, 2003)