

Bacillus subtilis BB-1으로부터 나토키나아제 유전자 크로닝 및 대량발현

이영훈¹ · 이성호¹ · 박기훈² · 최영주³ · 정영기⁴ · 갈상완*

진주산업대학교 미생물공학과, ¹경상대학교 생물학과, ²경상대학교 응용생명과학부, ³신라대학교 식품영양학부, ⁴동의대학교 미생물학과

Received January 9, 2006 / Accepted February 27, 2006

Cloning and High Expression of Nattokinase Gene from *Bacillus subtilis* BB-1. Young-Hoon Lee, Sung-Ho Lee¹, Ki-Hoon Park², Young-Ju Choi³, Yong-Kee Jeong⁴ and Sang-Wan Gal*. Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, 150 Chilamdong Jinju 660-758, Korea, ¹Department of Biology, Gyeongsang Natinal University, 900 Gajadong Chinju 660-701, Korea. ²Department of Applied Life Science, Gyeongsang Natinal University, 900 Gajadong Chinju 660-701, Korea. ³Department of Food and Nutrition, Silla University, San 1-1 Sasanggu Goebeopdong Pusan, 617-736, Korea. ⁴Department of Life science and Biotechnology, Dong Eui University, San24 Jingu Gayadong Pusan, 614-010, Korea. — A fibrinolytic enzyme gene was isolated from *Bacillus subtilis* BB-1 by PCR method. Primers for PCR cloning were designed according to pre-identified gene for fibrinolytic enzymes from *B. subtilis*. The primer sequences were 5'-CGG ATC CGT GAG AGG CAA AAA GGT G-3' and 5'-TGA ATT CTT AAT GTG CTG CTG CTT GTC C-3' as consensus sequences of the fibrinolytic genes of *Bacillus* species. The PCR product was 1,145 bp and the sequence homology was 99% with nattokinase gene isolated from Japanese natto. The cloned fibrinolytic gene was reconstructed in *Bacillus-E. coli* shuttle vector, pEB for bulk-production. The fibrinolytic enzyme was purified by FPLC from the cloned *B. subtilis* 168. The optimum pH and temperature of the enzyme were 7.0 and 35°C, respectively. The fibrinolytic enzyme did not show any activity toward to skim milk, gelatin, casein and blood agar plate. The enzyme specific polyclonal antibody was prepared in rabbit for further assays such as detection of the gene expression in plant cells. This means that the enzyme may be used for health-care such as thrombosis without any harmful effects in the blood vessel.

Key words – Nattokinase, fibrinolytic enzyme, *Bacillus-E. coli* shuttle vector, polymerase chain reaction

서 론

오늘날 물질문명의 발달로 인간의 활동량이 감소되고 우리의 식생활이 점차 서구화됨에 따라, 동물성 식품의 섭취량이 증가하여 동물성 지방의 과다섭취로 인하여 열량이 많아지고, 체액의 산성화 위험이 따르고 있다. 이러한 식생활로 동맥경화증, 심근경색, 뇌졸중, 고혈압, 혈전증과 같은 성인병 발생이 날로 증가하고[6,28] 있으므로 이들의 치료와 예방의 한 방법으로 혈전용해제의 개발에 많은 초점을 두고 있다. 그 일환으로 개발된 혈전제로서 유기합성체인 coumarin과 warfarin 제제가 있고, 거머리에서 생성되는 hirudin 제제가 있다[3,15,17].

혈전은 fibrin이 혈관에서 완전히 분해되지 않은 것이 주 원인인데[22], 이것을 용해하기 위한 효소계를 fibrinolytic enzyme이라고 하며, 현재 혈전용해제로 여러 가지가 사용되고 있는데 일본에서는 주로 urokinase (UK)[6,19,21,24], 구미에서는 streptokinase (SK)[4]가 정맥주사로 투여되고 있으며, 이 외에 staphylokinase[19], tissue type plasminogen ac-

tivator (TPA)[1]등도 개발되고 있으나, 이것들은 전부 정맥 주사약으로서 혈중에서의 반감기가 극히 짧고 인체와 다른 이물질로서 알레르기 등의 부작용이 따를 수 있다[22].

따라서 우리나라를 비롯한 일본, 중국에서 전통발효식품으로부터 혈전용해효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다[5,10,13,14]. 전통발효식품중의 하나인 청국장은 단백질 소화흡수가 용이하고, 혈청콜레스테롤 농도를 감소시키며[27], 특유의 점직성 조직감과 구수한 풍미를 지니고 있으면서 항산화효과가 있는 것으로 알려져 있고[8], 혈전분해력 또한 아주 높다고 보고되고 있다[12,18,26]. 특히, 최근에 일본에서 natto 점질물에서 발견된 fibrinolytic enzyme (nattokinase)이 fibrin을 강력하게 분해하는 효소로 밝혀지면서 nattokinase의 활성과 기능에 대한 연구가 보고 되고 있다 [7,8,16,20,22,23,29]. 하지만 이 효소의 대량발현이 어려워 효소사체의 상업적 이용은 많이 이루어지지 않고 있으며, 나토키나아제를 통하여 이 효소의 가치를 부여하고 있다. 현재까지는 *Bacillus* 유래의 혈전용해효소 유전자를 크로닝 후 대량생산 체계가 구축되지 않아 의학적 가치의 상품개발에 성공한 예가 없어 그 목적의 일환으로 본 연구에서는 혈전용해작용이 우수하며, 혈전만을 특이적으로 분해함으로써 섭취 시 인체나 혈액 내에서 부작용이 없는 혈전용해효소를 *Bacillus sub-*

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3393, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sangal@jinju.ac.kr

tilis BB-1 (KFCC11344P)로부터 크로닝하고 그 유전자를 *Bacillus host*에 대량발현 및 순수분리하고 효소의 특성을 조사하여 의학적 이용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

Chromosomal DNA의 분리

iNtRON사의 Genomic DNA Extraction kit (Cat. No 17121)를 사용하여 청국에서 분리한 *Bacillus subtilis* BB-1(KFCC 11344P)을 OD 1.0이 되게 배양한 후 회수한 균체를 50 μ l pre-buffer (added 20 mg/ml RNase A)로 현탁 후 lysozyme 3 μ l (100 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 15분동안 반응시켰다.

반응 후 250 μ l G-buffer (added 20 mg/ml RNase A, 20 mg/ml protease K)를 첨가, 65°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 250 μ l binding buffer를 첨가하여 binding 시킨 후 column을 이용하여 DNA를 분리하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)에 의한 DNA 증폭

PCR을 위한 primer들은 *Bacillus subtilis*로부터 이미 크로닝된 혈전용효소 유전자들 중 공통된 연결순서 영역으로부터 forward 5'-CGG ATC CGT GAG AGG CAA AAC GGT G-3'와 reverse 5'-TGA ATT CTT GIG CTG CTG CTT GTC C-3'를 각각 25 mer를 합성하였고, 이때 PCR 후 크로닝을 위하여 forward primer에 *Bam*H1 그리고 reverse primer에 *Eco*R1 restriction site를 각각 삽입하였다. 증폭에 사용된 Perkin Elmer-2400의 조건을 초기 denaturation 단계에서 95°C, 30초를 유지하였으며, annealing 55°C, 30초, 그리고 중합반응은 72°C, 30초에서 30 cycle을 실시한 후 최종 단계인 DNA합성은 72°C에서 10분동안 실시하여 증폭하였다.

PCR 산물의 크로닝

생성된 PCR 산물을 pGEM T-easy(Promega Co., USA) 크로닝 벡터에 크로닝 후 primer 제작시 인위적으로 삽입한 *Bam*H1과 *Eco*R1으로 절단하여 pBluescript II SK(-)에 sub-cloning하여 DNA 연결순서를 확인하고 혈전용효소 대량 발현을 위해 DNA 단편의 5'-end 에 *Nde*I, 3'-end에 *Bam*H1 restriction site를 각각 생성시켜 *Bacillus*와 *E. coli*의 shuttle vector인 pEB vector (BioLeaders Co., Korea)의 *Nde*I과 *Bam*H1 site에 연결하여 protease 활성이 약한 *B. subtilis* 168에 형질전환 하였다.

Bacillus subtilis 168의 electro-competent cell 제조

B. subtilis 168을 nutrient agar plate에서 37°C 12시간 배양한 후 생성된 단일 colony를 선별하고 10 ml의 nutrient broth에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이중 5

ml를 취하여 500 ml의 액체 배지에 다시 접종한 후 37°C에서 진탕 배양(150 rpm) 하면서 OD가 0.5가 될 때까지 배양하였다. 이 배양액을 30분 동안 얼음에 정치하였고, 4°C, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전물에 ice washing buffer (0.5 M sucrose, 0.01 mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.01 mM maleic acid, pH 6.5)을 가하여 수세하였다. 이 과정을 3번 반복하고 마지막 과정에서는 5 ml의 ice washing buffer로 침전물을 녹여 40 μ l씩 1.5 ml eppendorf tube에 분주하여 -80°C에 보관하면서 사용하였다[11].

Electroporation 방법에 의한 형질전환

pEB 벡터에 혈전용효소 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 *B. subtilis* 168 competent cell에 가하여 얼음에 10분간 방치하였다. Electroporator Gene Pulser^{II} (Bio Rad Co., USA)의 electric field strength (kV/cm)와 resistance (Ω), capacitance (μ F)를 선택한 후 혼합된 cell을 cuvette에 미리 37°C 항온 수조에서 가온한 expression medium(4×Penassay medium : 2×washing buffer) 1 ml를 가하고 세포를 부유시켜 회수하였다. 그 후 37°C의 항온수조에서 3시간 동안 배양한 다음 kanamycin (25 μ g/ml)이 포함된 Luria Bertani 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다[11].

혈전용효소 활성측정

혈전용효소 활성을 측정하기 위해 Astrup[2]방법에 따라 fibrin을 기질로 하는 fibrin plate법을 응용하였다. 즉 0.4 % Fibrinogen (from bovine plasma, Sigma Co., USA)을 10 ml의 sodium borate buffer (10 mM sodium borate, 160 mM boric acid, 40 mM NaCl, Merck Co., Germany)에 녹인 후 직경 87×15 mm petri dish에 넣고 thrombin (1 NIH unit/ml) 20 unit를 첨가하여 실온에 30 분간 방치하여 응고시켰다. 응고된 fibrin plate에 시료를 적당량 loading하여 6 시간동안 37°C에서 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다. 표준혈전 분해효소로 1 unit의 plasmin을 사용하여 비교하였다.

재조합 균주의 배양 및 분비발현

재조합 균주의 배양에 따른 혈전용효소의 분비발현을 측정하기 위하여 kanamycin (10 mg/ml)이 포함된 10 ml의 Luria-Bertani broth에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이중 5 ml를 취하여 500 ml의 액체 배지에 다시 접종한 후 37°C에서 진탕 배양(150 rpm)하면서 생육단계인 대수 증식기, 정지기, 사멸기의 배양 상등액을 회수하여 SDS-PAGE의 단백질 전기영동을 실시하여 확인하였다.

혈전용효소의 정제 및 단백질 확인

Ammonium sulfate에 의한 효소의 농축

재조합 균주를 37°C에서 12시간 배양한 후 배양 상등액을

ammonium sulfate로 70% 포화시킨 후 4°C에서 24시간 동안 침전시키고 원심분리 (13,000xg, 30 min, 4°C)하여 얻은 침전물을 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.2)에 용해하여 동일 buffer로 투석을 실시하였다. 투석 후 다시 원심 분리하여 침전물을 제거한 다음 얻어진 효소액을 다음 정제단계에 사용하였다.

FPLC에 의한 효소의 정제 및 단백질 확인

Ammonium sulfate에 의해 농축된 효소액을 멸균 증류수로 4°C에서 여러번 투석을 행하여 염 등을 제거한 다음 0.15 M NaCl이 포함된 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 녹인 후 FPLC system에서 0.15 M NaCl이 포함된 동일 buffer로 평형화시킨 superdex 200 HR 10/ 30 (Amersham pharmacia biotech, UK) column을 통하여 분당 0.5 ml 정도의 유속으로 gel filtration하여 분리 정제하였으며, 정제된 단백질은 Laemmli등의 방법[25]에 따라 각각 0.1% SDS가 포함된 12.5% acryamide농도의 Separating gel과 4% acrylamide 농도의 stacking gel을 사용하여 SDS-PAGE gel 상에서 정제된 단백질을 최종 확인하였다.

항체제조와 western blot

순수분리된 혈전용해효소를 수컷의 토끼 피하지방에 환변에 200 µg씩 일주일 간격으로 세 번 주사한 후 마지막 주사 후 3일 뒤 부스팅하고 귀의 혈관을 통하여 혈액을 채취하였다. 혈액은 4°C에 overnight 시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻어 polyclonal 항체로 사용하였다. Western blot은 Towbin 등의 방법[25]을 이용하여 전기영동이 끝난 단백질을 nitrocellulose membrane (Millipore Co., USA)에 250 mA로 1시간 30분간 transfer하였다. 그 후 이 막을 pH 7.8의 phosphate buffer saline (PBS)에 5분씩 5회 세척한 후 1% skim milk가 함유된 PBS buffer에 1시간 30분간 blocking하여 불필요한 단백질의 부착을 억제시켰다. 그 후 1% skim milk를 포함하는 PBS buffer에 1:5,000 (v/v)의 비율로 primary antibody를 희석한 후 blotting wells에 넣어 rotator를 이용하여 상온에서 16시간동안 흔들면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 PBS buffer를 이용하여 15분씩 3회 세척하여 1% skim milk가 포함된 PBS buffer에 anti-rabbit IgG (Sigma Co., USA)를 1:2,000 (v/v)로 희석하여 4시간동안 상온에서 rotator를 이용하여 흔들면서 반응시켰다. 이를 PBS buffer로 15분간 3회 세척한 뒤 15 mg 4-chloro-1-naphthol, 45 ml Tris-Cl (pH 7.4), 90 µl H₂O₂로 구성된 발색용액에 10분간 반응시킨 후 증류수로서 세척하고 건조하여 생성된 band를 육안으로 관찰하여 사진 촬영하였다.

혈전용해효소생산 최적 pH 및 온도

혈전용해효소생산의 최적 pH와 온도를 측정하기 위하여

pH는 fibrin plate를 제조함에 있어서 fibrinogen 용액의 pH를 각각 5.0부터 9.0까지 조절한 후 thrombin 10 unit를 가하여 본 혈전용해효소를 적당량 loading한 후 37°C에서 6시간 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다. 이때 pH 4.0 이하와 10.0 이상에서는 강산과 강염기로 인해 fibrin plate가 만들어지지 않았다. 최적활성 온도는 최적 pH 7.0에서 20°C부터 40°C로 배지의 온도를 조절 후 6시간 반응시켜 용해된 분해면적을 측정하였다.

기질특이성 조사

정제된 혈전용해효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 각종 단백질인 skim milk, casein, gelatin, blood agar를 기질로 한 plate상에서 동량, 동시간 반응하여 기질의 분해양상을 비교하였다.

혈전분해 양상 조사

제조된 fibrin plate를 80°C에서 30분간 열처리하여 plasminogen을 불활성화 시킨 fibrin plate (plasminogen-free fibrin plate)와 열처리 하지 않은 fibrin plate plasminogen-rich fibrin plate)에서 FPLC에 의해 순수분리된 혈전용해효소를 반응시켜 그 분해 양상을 비교, 검토하여 plasminogen activator type인지 fibrin을 직접 분해하는 혈전용해효소인지 검토하였다.

결과 및 고찰

PCR에 의한 혈전용해효소 유전자의 크로닝 및 염기서열 결정

혈전용해효소를 강력하게 생산하는 *B. subtilis* BB-1(KFCC 11344P)의 chromosomal DNA를 분리한 후 *B. subtilis*로부터 이미 보고된 공통적인 혈전용해효소 유전자들의 연결순서 영역으로부터 forward와 backward의 primer를 각각 25mer씩 합성하여 1,145 bp의 PCR산물을 얻었다(Fig. 1). 앞서 설명한 것과 같이 5'과 3' 양쪽에 인위적인 제한효소 *Bam*H1과 *Eco*R1 자리를 이용하여 PCR 산물을 pBluescript II SK(-)에 subcloning한 후 재조합된 DNA를 agarose gel상에서 확인하였고(Fig. 2) 혈전용해효소의 유도적인 대량발현을 위하여 *Bacillus*와 *E. coli*의 shuttle vector인 pEB vector에 크로닝하여 대량발현계를 구축하였고(Fig. 3) *Bacillus* host인 *B. subtilis* 168에 형질전환 결과 Fig. 4과 같이 높은 혈전용해활성을 보였으며, 본 유전자를 BCF-1으로 명명하였다.

BCF-1의 염기서열 결정은 T7, T3 primer를 이용하여 양방향으로 염기서열을 확인하고 DNA assembly를 실시하여 최종 증폭되는 연결순서에 의해 전체적인 염기서열을 결정하였다(Fig. 5). 결정된 염기서열을 NCBI상의 Genbank를 통해 search한 결과 nattokinase와 유전자가 99 %이상 유사함을

확인하였다(Fig. 6). Nattokinase는 Sumi 등[22]이 이미 임상 실험에서 안전성 및 안정성을 보고한 바 있다. 이 효소를 natto에서 분리하여 실험을 이행하였고, 따라서 natto 자체를 상품화하여 판매되고 있지만 이 효소의 유전자를 크로닝하여 그 재조합 DNA를 대량 발현시키거나 혹은 의학적 이용은 전무한 실정으로 본 연구에서 이를 새롭게 크로닝하고 *Bacillus*에서 대량발현시키고자 하였다.

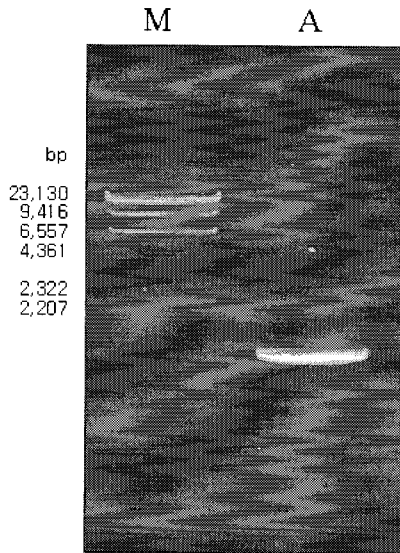


Fig. 1. PCR product of a fibrinolytic enzyme gene from chromosome of *Bacillus subtilis* BB-1. Probe sequences are 5'-CGG ATC CGT GAG AGG CAA AAA GGT G-3' and 5'-TGA ATT CIT AAT GTG CTG CTG CTT GTC C-3' . M lane: *Hind*III markers of λ DNA A lane: a PCR product of fibrinolytic enzyme gene

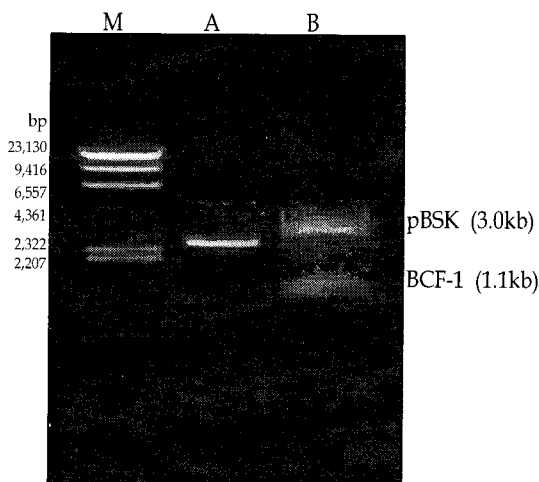


Fig. 2. Cloning of a fibrinolytic enzyme gene from *B. subtilis* BB-1. M lane: *Hind* III markers of λ DNA A lane: pBluescript II SK(-) containing fibrinolytic gene B lane: recombinant DNA digested with *Bam*H1 and *Eco*R1

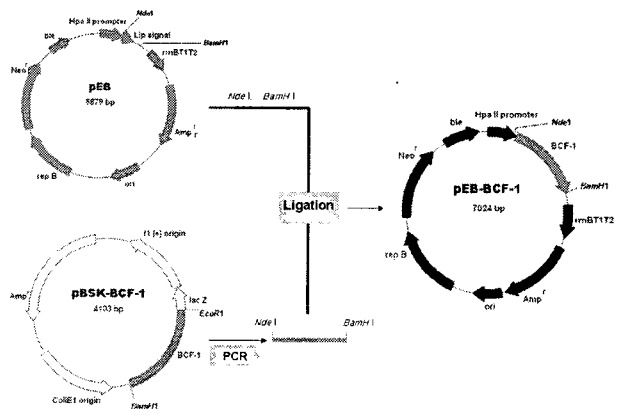


Fig. 3. Schematic diagram of recombinant plasmid, pEB-BCF-1.

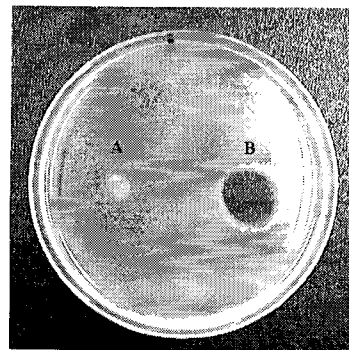


Fig. 4. Fibrinolytic activity of pEB-BCF-1. Fibrinolytic activity assay on the fibrin plate(0.4%) with the culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1. A: *B. subtilis* 168 containing pEB B: *B. subtilis* 168 containing pEB-BCF-1

재조합 균주 배양 및 분리발현

Bacillus 유래 유전자 발현 host인 168 strain은 protease 활성이 비교적 적은 host로 여기에 앞의 재료 및 방법에서 구축된 pEB-BCF-1을 형질전환 시켰다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 약 30 kDa의 protein이 배양상등액에 주 단백질로 생성됨을 확인 할 수 있었고 특히 배양 8시간 만에 대량으로 발현, 분리됨을 확인할 수가 있었다.

혈전용해효소 순수분리

재조합 균주에서 혈전용해효소는 배양상등액의 회수, 70 % ammonium sulfate를 이용한 침전, 투석 그리고 FPLC gel filtration의 4단계에 의하여 분리 정제하였다. 모든 과정은 4℃에서 실시하였으며, 12.5 % acrylamide gel의 SDS-PAGE 상에 전기영동을 실시한 결과 약 30 kDa의 단일 band로 순수분리 됨을 Fig. 8에서 확인할 수가 있었다.

항원-항체반응

순수분리된 혈전용해효소를 토끼를 통하여 항체를 제작하

```

1 TAGAACTAGT BamH I GGATCCGTGA GAGGCAAAAA GGTATGGATC
AGCTTGTGT TTGCGTTAAC
61 GTTAATCTTT ACATGCGGT TCAGCAACAT GTCTGCGCAG
GCTGCCGAA AAAGCAGTAC
121 AGAAAAGAAA TACATTGTGC GATTTAAGCA GACAATGAGT
GCCATGAGTT CCGCCAAGAA
181 AAAGGATGTT ATTTCTGAAA AAGGCGGAAA GGTTCAAAAG
CAATTAAGT ATGTTAACGC
241 GGCCGACGCA ACATTGGATG AAAAAGCTGT AAAAGAATTG
AAAAAAGATC CGAGCGTTGC
301 ATATGTGGAA GAAGATCATA TTGCACATGA ATATGCGCAA
TCTGTTCTTT ATGGCATTTC
361 TCAAAATAAA GCGCCGGCTC TTCACTCTCA AGGCTACACA
GGCTCTAACG TAAAAGTAGC
421 TGTATCGAC AGCGGAATTG ACTTCTCTCA TCCTGACTTA
AACGTCAGAG CCGGAGCAAG
481 CTTCGTTCT TCTGAAACAA ACCCATACCA GGACGGCAGT
TCTCACGGTA CGCATGTCGC
541 CGGTACGATT GCCGCTCTTA ATAACTCAAT CGGTGTTCTG
GGCGTAGCGC CAAGCGCATC
601 ATTATATGCA GTAAAAGTGC TTGATTC AAC AGGAAGCGGC
CAATATAGCT GGATTATTA
661 CGGCATTGAG TGGGCCATTT CCAACAATAT GGATGTTATC
AACATGAGCC TTGGCCGACC
721 TACTGGTTCT ACAGCGCTGA AAACAGTAGT TGATAAAGCG
GTTTCCAGCG GTATCGTCGT
781 TGTCGCCGCA GCCGGAACG AAGGTTATC CGGAAGCACA
AGCACAGTCG GCTACCTTGC
841 AAAATATCCT TCTACTATTG CAGTAGGTGC GGTAACAGC
AGCAACAAA GAGCTTCATT
901 CTCAGCGCA GGTCTGAGC TTGATGTAAT GGCTCCTGGC
GTGTCATCC AAAGCACACT
961 TCCTGGAGGC ACTTACGGCG CTTATAACGG AACGTCATG
GCGACTCTC ACGTTGCCGG
1021 AGCAGCAGCG CTAATCTTT CTAAGCACCC GACTTGACA
AACGCGCAAG TCCGTGATCG
1081 TTTAGAAAGC ACTGCAACAT ACCTTGAAG CTCTTCTAC
TATGGAAAAG GGTAAATCAA
1141 CGTACAAGCA GCAGCACATT AAGAATTCGA TATCAAGCTT
ATCGATACC EcoR I

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the cloned fibrinolytic enzyme gene from *B. subtilis* BB-1.

- The boxes are start codon and stop codon of the gene, respectively
- *Bam*HI and *Eco*R1 sites are underlined

였다. 이 항체를 이용하여 *B. subtilis* BB-1, 대량발현 vector에 크로닝된 *B. subtilis* 168 균과 순수분리된 단백질을 western blotting를 실시하였을 때 Fig. 9와 같이 약 30 kDa의 *B. subtilis* BB-1과 크로닝된 균 그리고 순수 분리된 단백질에서 동일한 band가 확인 되었다.

혈전용해효소 생산 최적 pH 및 온도

순수분리된 혈전용해효소 생산의 최적 pH와 온도를 검토한 결과 Fig. 10과 같이 pH 7.0, 온도 35°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

```

Bacillus subtilis clone YF038 nattokinase precursor, gene, complete cds
Length = 1327
Score = 2216 bits (1118), Expect = 0.0 Identities = 1136/1142 (99%), Strand
= Plus / Plus
Cloned gene : 17 gtgagagcaaaaaggtatggatcagcttgttggcttaacgttaactttacgatg 76
nattokinase : 182 gtgagaagcaaaaatgtggatcagcttgttggcttaacgttaactttacgatg 241
Cloned gene : 77 gcgttcagcaacatgtctgocgagcctgccgaaaaagcagtcagaaaaaatacatt 136
nattokinase : 242 gcgttcagcaacatgtctgocgagcctgccgaaaaagcagtcagaaaaaatacatt 301
Cloned gene : 137 gtccgatttaagcagacaatgatgcatgatgtccccaagaaaagattgttttct 196
nattokinase : 302 gtccgatttaagcagacaatgatgcatgatgtccccaagaaaagattgttttct 361
Cloned gene : 197 gaaaaagcggaagggttcaaaagcaatttaagtatttaacgcccgcagcaacattg 256
nattokinase : 362 gaaaaagcggaagggttcaaaagcaatttaagtatttaacgcccgcagcaacattg 421
Cloned gene : 257 gatgaaaaagctgtaaaagaattgaaaaagatccgagcgttgcatatgtggaagaagt 316
nattokinase : 422 gatgaaaaagctgtaaaagaattgaaaaagatccgagcgttgcatatgtggaagaagt 481
Cloned gene : 317 catattgacatgaatatgoccaactgttctcttatggcatttccaatataagccgoc 376
nattokinase : 482 catattgacatgaatatgoccaactgttctcttatggcatttccaatataagccgoc 541
Cloned gene : 377 gctcttcaacttcaaggctacacagccttaacgtaaaagtagctgttatcgacagcga 436
nattokinase : 542 gctcttcaacttcaaggctacacagccttaacgtaaaagtagctgttatcgacagcga 601
Cloned gene : 437 attgacttctctcatctgacttaaacgtcagagcgagcaagcttcttctcttga 496
nattokinase : 602 attgacttctctcatctgacttaaacgtcagagcgagcaagcttcttctcttga 661
Cloned gene : 497 acaaacccatacagagcagcagcttctcagctacgcatgtcccggtacgattgcgct 556
nattokinase : 662 acaaacccatacagagcagcagcttctcagctacgcatgtcccggtacgattgcgct 721
Cloned gene : 557 cttataactcaatcgggttctggcgtagcccaagcgcattatatacgatgaaa 616
nattokinase : 722 cttataactcaatcgggttctggcgtagcccaagcgcattatatacgatgaaa 781
Cloned gene : 617 gtgcttgattcaacaggaagcgccaatataagctgattatataacggcattgagtgggc 676
nattokinase : 782 gtgcttgattcaacaggaagcgccaatataagctgattatataacggcattgagtgggc 841
Cloned gene : 677 atttccaacaatatggatgttatcaacatgagccttggcgactactgtttctacagcg 736
nattokinase : 842 atttccaacaatatggatgttatcaacatgagccttggcgactactgtttctacagcg 901
Cloned gene : 737 ctgaaaacagtagttgataaagcggttccacggtatcgtctgtcgcagcagcggga 796
nattokinase : 902 ctgaaaacagtagttgataaagcggttccacggtatcgtctgtcgcagcagcggga 961
Cloned gene : 797 aacgaaggttcatccggaagcacaagcacagtcggctaccctgcaaaatacttctact 856
nattokinase : 962 aacgaaggttcatccggaagcacaagcacagtcggctaccctgcaaaatacttctact 1021
Cloned gene : 857 attgcagtaggtgoggtaaacagcagcaaccaagagcttcatctccagcgcagttct 916
nattokinase : 1022 attgcagtaggtgoggtaaacagcagcaaccaagagcttcatctccagcgcagttct 1081
Cloned gene : 917 gagcttgatgtaatggctcctggcgtgtccatccaagcacacttctggaggcacttac 976
nattokinase : 1082 gagcttgatgtaatggctcctggcgtgtccatccaagcacacttctggaggcacttac 1141
Cloned gene : 977 ggcgcttataacggaagctccatggcgactcctcactgttccggagcagcagcctaatt 1036
nattokinase : 1142 ggcgcttataacggaagctccatggcgactcctcactgttccggagcagcagcctaatt 1201
Cloned gene : 1037 ctttctaagcaccgacttggcaaacgcgcaagtcctgatcgtttagaagcactgca 1096
nattokinase : 1202 ctttctaagcaccgacttggcaaacgcgcaagtcctgatcgtttagaagcactgca 1261
Cloned gene : 1097 acataccttggagctcttctactatgaaaaaggttaatacagctacaagcagcagca 1156
nattokinase : 1262 acataccttggagctcttctactatgaaaaaggttaatacagctacaagcagcagca 1321
Cloned gene : 1157 ca 1158
nattokinase : 1322 ca 1323

```

Fig. 6. Sequence alignment between the BCF-1 and nattokinase in the Genbank.

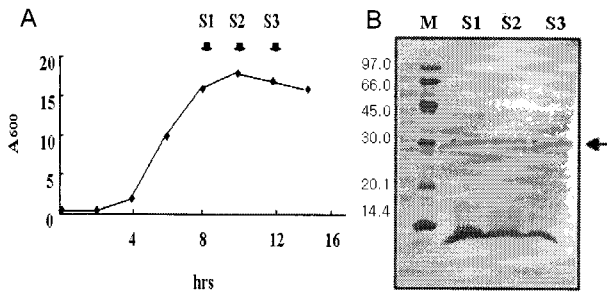


Fig. 7. Production of BCF-1 enzyme during the growth of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene.
 A: growth curve of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene
 B: electrophoresis analysis of the culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene

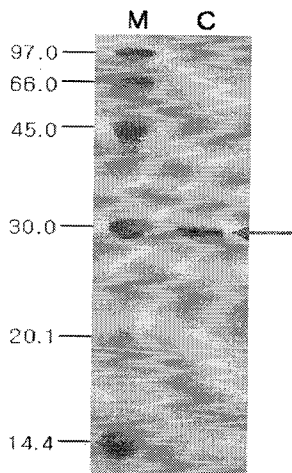


Fig. 8. SDS-PAGE analysis of the purified fibrinolytic enzyme, BCF-1.
 M: protein size markers, C: purified BCF-1 enzyme

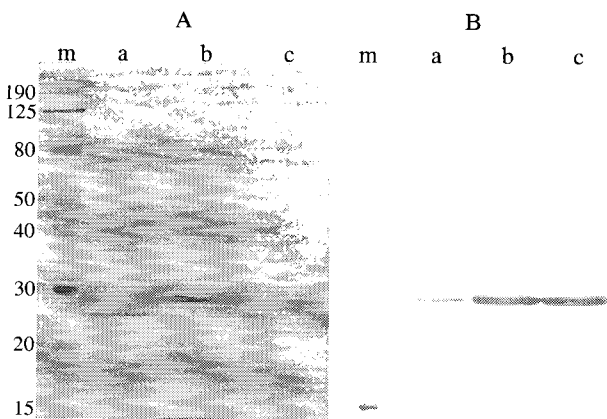


Fig. 9. Western Blot analysis of fibrinolytic enzyme.
 A: SDS-PAGE, B : western blot.
 m: western blot standard markers
 a: culture supernatant of *B. subtilis* BB-1
 b: culture supernatant of *B. subtilis* 168 containing BCF-1 gene
 c: purified BCF-1 enzyme

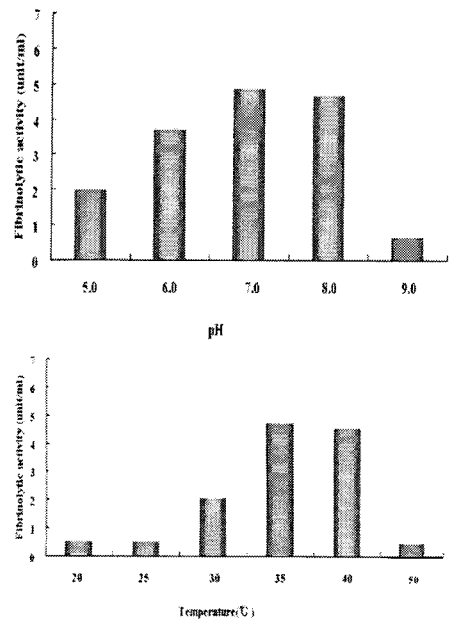


Fig. 10. Effect of various pHs and temperatures on the fibrinolytic activity of the fibrinolytic enzyme, BCF-1.

혈전용해효소 기질특이성 조사

Protease기질인 skim milk, casein, gelatin, blood agar를 이용하여 순수 분리된 혈전용해효소의 기질에 대한 특이성을 비교하였다. 동일한 양의 효소를 37°C에서 16시간 동안 반응시킨 후 분해율을 측정된 결과, Fig. 11에서 보는 바와 같이 skim milk에서 아주 약한 분해능을 보였으나, casein, gelatin, blood agar plate에서는 전혀 분해능을 보이지 않았다. 특히 blood agar plate에서의 분해가 전혀 없는 것으로 볼 때, 혈관 내에서 부작용으로 발생할 수 있는 적혈구 파괴 현상은 일어나지 않을 것으로 판단된다.

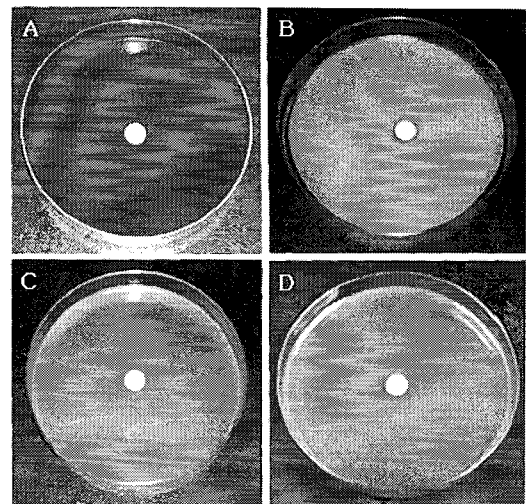


Fig. 11. Substrate specificity of the fibrinolytic enzyme BCF-1.
 A: blood agar plate, B: skim milk plate, C: casein plate, D: gelatin plate

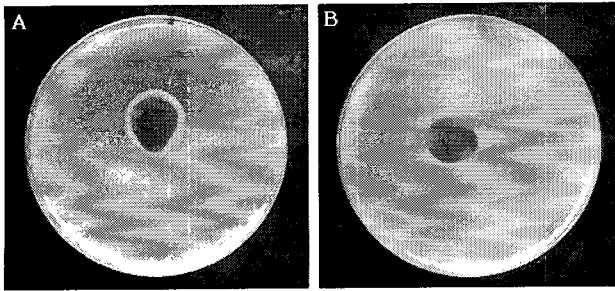


Fig. 12. Comparison of the fibrinolytic pattern of the fibrinolytic enzyme between plasminogen-rich fibrin plate and plasminogen-free fibrin plate.
 A: plasminogen-rich fibrin plate
 B: plasminogen-free fibrin plate

혈전분해 양상 조사

크로닝된 혈전용해효소가 fibrin을 직접적으로 분해하는 형태인 fibrinolytic enzyme인지 아니면 plasminogen을 plasmin으로 활성화하여 fibrin을 분해하는 plasminogen activator type 인지를 조사한 결과 Fig. 12과 같이 plasminogen이 있는 상태인 plasminogen-rich fibrin plate와 plasminogen-free fibrin plate에서 동시에 분해되는 것으로 보아 직접적으로 fibrin을 분해하는 fibrinolytic enzyme인 것을 알 수 있으며, 특히 plasminogen이 있을 경우가 없는 경우보다 fibrin의 분해능이 증가된 것을 관찰할 수 있는데 이것은 두 가지 type의 시너지 효과에 의한 것으로 생각된다.

요 약

흑두청국으로부터 분리된 혈전용해력이 우수한 *Bacillus subtilis* BB-1(KFCC 11344P)으로부터 혈전용해효소 유전자를 PCR법에 의해 크로닝하였고 이를 BCF-1으로 명명하였다. BCF-1의 DNA 염기서열결정 결과 1,145 bp 크기의 혈전용해효소로, 일본의 natto로부터 분리된 nattokinase 유전자와 99%의 상동성을 보임을 확인하였다. 혈전용해효소 유전자의 발현을 위하여 *Bacillus* 발현계인 *Bacillus-E. coli*의 shuttle vector인 pEB vector에 크로닝하고 host로서 *B. subtilis* 168에 형질전환시켜 대량 발현시켰다. 생산된 혈전용해효소의 최적활성 pH와 온도는 7.0과 35℃로 확인되었다. 기질에 대한 분해양상을 조사한 결과 fibrin에서만 특이적으로 강한 분해가 일어났으며, skim milk에서 아주 약한 분해능을 보였으나 blood agar, gelatin, casein에서는 전혀 분해능을 보이지 않았다. 특히 blood agar plate에서 분해능이 없는 것으로 보아 혈액 내에서의 적혈구 파괴현상과 같은 부작용에 대한 위험을 배제할 수 있을 것으로 사료된다. BCF-1에 의해 생산된 혈전용해효소는 fibrin 특이적으로 활성을 나타냄을 확인할 수 있으며, 이는 임상적이나 산업적으로 적용하였을 때 부작용에 대한 위험적인 문제는 배제될 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2003~2006년 농림부 첨단기술과제 생명공학분야 (203069-03-2-CG000)로 수행중이며, 이 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Astrup, T. and I. Stermdorff. 1956. The plasminogen activator in animal tissue. *ACTA physiol. scand.* **363**, 250.
2. Astrup, T., and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346.
3. Electricwala, A., R. T. Sawyer, J. C. Powell and T. Atkinson. 1991. Isolation of thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **2**, 83-91.
4. Fletcher, A. P. and A. J. Johnson 1975. Methods employed for purification of streptokinase. *Por. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 233.
5. Jeong, Y. K. W. S. Yang, J. O. Kang, I. S. Kong, J. O. Kim. 1995. Fibrinolysis of fermented kimchi. *Korean. J. Life Science* **5(4)**, 203-210
6. Kalu, D., E. J. Masoro, B. P. Yu, R. R. Hardin and B. W. Hallis. 1988. Modulation of age-related hyperparathyroid and senile bone loss in Fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* **122**, 1847.
7. Kim, B. N., J. D. Kim, S. S. Ham, Y. S. Choi and S. Y. Lee. 1995. Effects of spice added natto supplementation on the lipid metabolism in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24(1)**, 121-126.
8. Kim, B. N. and S. Y. Lee. 1995. Nattokinase γ -GTP protease activity and sensory evaluation of natto added with spice. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24(2)**, 228-233.
9. Kim, D. H. G. Y. Lee, N. M. Kim, J. S. Lee. 2003. Physiological functionality of various extracts from danmemil and legumes. *Korean J. Food Nutr.* **16(4)**, 347-352.
10. Kim, H. K. G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong and I. S. Kang. 1997. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermenter fish. *J. Ferment. Bioengin.* **84(4)**, 307-312.
11. Kim, J. S. and K. W. Hong. 2000. Optimum conditions for electro-transformation of *Bacillus subtilis* 168. *Food Engineering Progress* **4(3)**, 162-166.
12. Kim, K. J., M. K. Ryu and S. S. Kim. 1992. Chung kook Jang Koji fermentations with rice straw. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **14**, 301-308.
13. Kim S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of *Doen-jang*. *Korea Soybean Digest.* **15(1)**, 8-15.
14. Kim Y. T. W. K. Kim and H. S. Oh. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from chungkookjang. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(7)**, 2482-2488.
15. Krstensky, J. L., T. J. Owen, M. T. Yates and S. J. T. Mao

1990. The C-terminal binding domain of hirullin P19 Antithrombin activity and comparison to hirudin peptides. *FEMS Letters* **269**, 425-431.
16. Liu, J. G., J. M. Xing, Ruishen, C. L. Yang, H. E. Liu. 2004. Reverse micelles extraction from fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal* **21**, 273-278.
 17. Lee, S. K., J. H. Sohn, E. S. choi and S. K. Rhee. 1993. Screening and purification of anticoagulant proteins from korean leeches. *Kor. J. Biochem.* **26(3)**, 228-234.
 18. Lee. S. K. S. Heo, D. H. Bae and H. H. Choi. 1998. Medium optimization for fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* KCK-7 Isolated from korean traditional chung kookjang. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26(3)**, 226-231.
 19. Lijnen, H. R., Van Hoef, and D. Goolen. 1992. Interaction of staphylokinase with different molecular form of plasminogen. *Biochem. Biophys. ACTA* **144**, 1118.
 20. Mitsugu, F., N. Keiichi, K. S. Hong, I. Yae, A. Aki and N. Satoshi. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **197(3)**, 1340-1347.
 21. Plug, J and O. kieldgarrd. 1957. Urokinase an activator from buman urine. I. Isalation and proper ties. *Biochem. Biophys., ACTA* **61**, 624.
 22. Sumi, H., H. Hamada, H. Mihara, K. Nakanishi and H. Hiratani. 1990. Enhancement of the fibrinolytic in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haemat.* **84**, 139.
 23. Sumi H., H. Hamada, H. Tsushima and H. Mihara. 1998. A novel strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese "NATTO". *Fibrinolysis* **2(1)**, 67.
 24. Toki, N., H. Sumi, K. Sasaki, I. Boreisha and K. C. Robbins. 1995. Transport of urokinase across the intestinal tract of normal uman subjects with stimulation of synthesis and release of urokinase-type proteins. *J. Clin. Invest.* **75**, 1212
 25. Towbin H, T. Staehelin, J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitro-cellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
 26. 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(6)**, 507-514.
 27. Yoo, J. Y. 1997. Present status of industries and reseach activities of korean fermented soybean products. *The Microorganism and Industry* **23**, 13-30.
 28. Yudkin, J. 1957. Diet and coronary thrombosis; Hypothesis and fact. *Lancet.* **2**, 155.
 29. Zhang, Z. I. Z. Y. Zuo, Z. G. Liu, K. C. Tsai, A. F. Liu, G. I. Zou. 2005. Construction of a 3D model of nattokinase, a novel fibrinolytic enzyme *Bacillus natto* A novel nucleophilic catalyticmechanism for nattokinase. *J. Molecular Graphics and Modelling* **23**, 373-380.