

## *Bacillus amyloliquefaciens* 액화형 $\alpha$ -amylase 유전자의 클로닝 및 *Bacillus subtilis*에서의 발현

金思悅 · 宋邦鎬 · 李麟九\* · 徐正墳\*\* · 洪淳德\*\*

慶北大学校 師範大学 生物教育科

\*農科大学 農化学科 \*\*自然科学院 微生物学科

(1986년 10월 6일 수리)

## Cloning and Expression of A Liquefying $\alpha$ -Amylase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Bacillus subtilis*

Sa- Youl Ghim, Bang- Ho Song, In- Koo Rhee\*,  
Jung- Hwn Seu\*\* and Soon- Duck Hong\*\*

Dept. of Biology, Teachers College, \*Dept. of Agricultural Chemistry, Agricultural College,  
and \*\*Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Kyung pook University, Taegu, 634, Korea.

(Received October 6, 1986)

A 5200 basepair DNA fragment containing the *Bacillus amyloliquefaciens amyE* gene, encoding liquefying  $\alpha$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1), has been inserted into BamHI site of the pUB110 and the hybrid plasmid was designated as pSKS3. The pSKS3 was transformed into the *Bacillus subtilis* KM213 as a host which is a saccharifying  $\alpha$ -amylase deficient mutant of *Bacillus subtilis* NA64, and the plasmid in the transformed cell was expressed  $\alpha$ -amylase production and kanamycin resistance. The  $\alpha$ -amylase production of the transformed cell was reduced to one fifth of that of the donor strain. The *Bacillus subtilis* KM213 carrying pSKS3 indicated that the *amyE* gene product is a polypeptide which has the same electrophoretic mobility with that of the *Bacillus amyloliquefaciens*, but different from the saccharifying  $\alpha$ -amylase of *Bacillus subtilis* NA64. It means that the *amyE* gene of pSKS3 originates from the *Bacillus amyloliquefaciens*.

세포의 효소를 대량으로 생산하여 분비하는 고초균은 이들 효소단백이 생체막에 결합된 리보소ーム에서 합성되어 합성과 동시에 생체막을 통과하며, 이 과정에 신호배열이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이와같이 신호배열에 의하여 고분자 단백질이 생체막을 통과한다는 신호가설이<sup>(1-2)</sup> 성립되면서 대부분의 단백은 합성과 동시에 수송되는 코트란스레이션 수송(cotranslational export) 과정으로 세포외로 분비되는 것으로 알려지게 되었다<sup>(3)</sup>.

이러한 신호배열의 생체막에서의 단백의 수송기능이 알려지면서 여러가지 세포내재성 단백이나 균체경제상 부답이 되는 경우의 단백, 또는 cDNA의 산물인 인슐린, 인터페론등의 진핵세포 유래성 단백질을 세균세포에서 분비시키고자 할때 이들 단백의 유전자를 신호배열유전자와 융합시킴으로써 잡종단백을 만들어 인위적인 분비를 시도한 예가 보고되고 있다<sup>(4-5)</sup>.

이들 신호배열이 고초균에서 밝혀진 예를 들면,

*Bacillus amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase<sup>(6)</sup>, neutral protease<sup>(7)</sup>, alkaline protease<sup>(8)</sup>, *Bacillus subtilis*의  $\alpha$ -amylase<sup>(9)</sup>,  $\beta$ -glucanase<sup>(10)</sup>, levan-sucrase<sup>(11)</sup> neutral protease<sup>(12)</sup>, alkaline protease<sup>(13)</sup>, *Bacillus licheniformis*의  $\alpha$ -amylase<sup>(14)</sup>, penicillilase<sup>(15)</sup>, *Bacillus cereus*의 penicillinase<sup>(16)</sup>등의 분비단백에서 상세히 연구되었으며 최근 *B. subtilis*의 deoxycytidine-cytidine deaminase<sup>(17)</sup>도 이러한 배열이 있는 것으로 추측되었다.

본 연구에서는 *B. amyloliquefaciens*의 액화형  $\alpha$ -amylase (1, 4- $\alpha$ -D-glucan-glucanohydrolase E. C. 3.

2. 1. 1) 유전자로부터 31개의 아미노산으로 구성된 신호배열 유전자를 분리하여 유전자 응합에 의한 단백의 인위적 분비를 야기하고자  $\alpha$ -amylase 코딩 유전자의 클로닝을 시도하였다<sup>(18-19)</sup>. 아울러 본 유전자를 당화형  $\alpha$ -amylase 생산균주<sup>(20)</sup>에서 발현시킴으로써 동일한 세포로부터 액화형 및 당화형  $\alpha$ -amylase를 동시에 생산케 하여 산업적으로 다양쓰여지는 섬유의 흐발제나 전분의 액화제로서 효율높은 복합효소제제의 생산도 시도하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

$\alpha$ -amylase 코딩 유전자는 액화형  $\alpha$ -amylase를 강하게 분비하는 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 분리하였으며, 클로닝 속주로서는 *Bacillus subtilis* KM 107이 사용되었는데 이는 *B. subtilis* NA 64에 N-(methyl)-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)을 처리<sup>(21)</sup> 하여 얻은 당화형  $\alpha$ -amylase 결실변이주이었다. 이때 subcloning 주로서 *Bacillus subtilis* ED 107도 클로닝 속주로 사용하였으며 이들의 유전자형은 표 1과 같다.

Table 1. Used strains.

Strains	Genotypes	References
<i>B. amyloliquefaciens</i>	wild type	own collection
<i>B. subtilis</i> NA64	metB5, purB6, amyE AmyR2	K. Yamane
<i>B. subtilis</i> BD366	trpC2, thr5, Km <sup>r</sup> , pUB110	BGSC
<i>B. subtilis</i> ED107	r-M, m-M, leuA8, argl5	T. Uozumi
<i>B. subtilis</i> KM107	metB5, pur B6, amyR2, amyE <sup>-</sup>	this work
<i>B. subtilis</i> KM213	pSKS 3 carrying on <i>B. subtilis</i> KM107	this work

### 배지 및 균의 생육

균의 생육배지는 LB-broth(LB), Penassay broth(PAB), SPI·SP II 배지를 사용하였다<sup>(22-23)</sup>. SP I 배지는 Spizizen최소배지에 0.02% casamino acids, 0.1% yeast extract 및 영양요구성물질 (50  $\mu$ g/ml)을 가한 것이며, SP II 배지는 SP I 배지에 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>를 가한 것이다. 형질전환주의 선별에는 1.5% 한천과 5  $\mu$ g/ml kanamycin (Km) 함유된 LB-평판배지를 사용하였으며,  $\alpha$ -amylase 투명환 형성에는 1% 가용성 전분을 가하였다.

### DNA의 분리 및 정제

염색체 DNA의 분리는 Saito와 Miura<sup>(24)</sup>의 방법에 준하였다. 즉, *B. amyloliquefaciens*를 LB 배양액에서 하룻밤 종배양한 후, 이를 새로운 배지에 다시 2% 접종하여 37°C에서 대수증식기 말기까지 배양하였다. 회수된 균체를 saline-EDTA에 세척한 후 5 mg/ml의 리소zyme를 가하여 0°C에서 30분 처리 후 NaOH로 pH를 8.0으로 조정하여 아세톤-드라이아이스 혼액에 급냉시켜 -20°C에서 냉동보관 후 Tris-SDS 완충액 (pH 9.0)에 녹였다. 여기에 동량의 페놀을 가하여 세척(4°C, 20분)한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액의 에탄올 침전회분을 조정제 염색체 DNA로 사용하였다.

또한, pUB 110 플라스미드 DNA의 분리는 *B. subtilis* BD 366으로 부터 Cryczan<sup>(25)</sup> 및 Birnboim과 Doly<sup>(26)</sup>의 방법에 준하였으며 배양액에는 Km을 가하였다. 최종적으로 얻어진 에탄올 침전핵분은 Tris-EDTA용액 (pH 8.0)에 가용화한 후 -20°C에 보관하면서 DNA액으로 사용하였다. 경우에 따라서 염색체 DNA와 플라스미드는 다시 ethidium bromide (EtBr)가 함유된 cesium chloride (CsCl) 밀도구배 원심분리에 의하여 더욱 순수하게 정제하였다.

### DNA ligation

재조합플라스미드제작은 Palva 등<sup>(6)</sup> 및 Maniatis 등<sup>(27)</sup>의 방법에 준하였다. 즉, 분리된 *B. amyloliquefaciens* 염색체 DNA를 Mbo I (1U/20  $\mu$ l)으로 부분분해한 후 (37°C, 1시간), 한천전기영동젤에서 2-5kb의 단편을 분리하였다. 한편, pUB110은 BamH I 으로 완전분해 후 클로로포름으로 세한효소의 활성을 실활시켜 ligation 완충액에 혼탁하였다.

이 pUB 110과 염색체 DNA를 1:2.5의 비율로 ligation 완충액에서 섞은 후 T<sub>4</sub>DNA ligase (6U)를 가하여 16°C에서 하룻밤 반응시킨 후, 이 ligation 액을 *B. subtilis* ED 107 competent 세포에 반응시켜 1차적으로 Km 평판배지에서 내성균주를 분리

한 후 이들 내성균주로부터 재조합플라스미드를 분리하여 다시 2 차적으로  $\alpha$ -amylase 결실 변이주인 *B. subtilis* KM 107 주에 형질전환시켜 이들 균주를 전분 - 한천 평판배지상에 생육시켜  $I_2$  - KI를 가하였을 때 생성되는 투명환의 크기를 측정함으로써  $\alpha$ -amylase의 생산균주 즉 형질전환체를 선별하였다.

#### 형질전환

Exogenote를 삽입한 재조합플라스미드의 형질발현은 Sadaie와 Kada<sup>(23)</sup>의 방법에 따라 *B. subtilis* ED 107 및 *B. subtilis* KM 107 주의 competent 세포에서 시도하였다. PAB에서 37°C로 하룻밤 진탕 배양한 제한수식결손변이주를 SP I 배지에서 5% (vol/vol) 접종하여 대수증식기 말기까지 배양한 후 SP II 배지로 10배 희석한 다음, 90분 정도 더 배양하여 competence 농이 최대에 달하였을 때 전처리한 ligated plasmid (5.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 가하여 30분간 처리한 후, DNase (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 여분의 DNA를 분해한 다음 원심세척한 세포를 LB 한천평판 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Km 함유) 상에 도말하여서 37°C에서 48시간 배양하였을 때 생성되는 코로니를 분리하였다. 이들 Km 내성균주들로부터 분리한 재조합플라스미드를 동일한 방법으로 조제한 *B. subtilis* KM 107 주 즉  $\alpha$ -amylase 결손변이주에서 형질전환시켜 얻어진 코로니들 가운데 전분 - 한천 평판배지에서  $\alpha$ -amylase를 생성분비하여  $I_2$  - KI 반응에서 투명환 형성이 강한 코로니를 형질전환주로 선별하였다.

#### 전기영동

DNA의 동정 및 확인을 위한 전기영동은 Meyers 등<sup>(24)</sup>의 방법에 따라,  $\alpha$ -amylase의 단백밴드는 Song등<sup>(25)</sup>의 방법에 따라 검정하였다. DNA는 220V, 20mA로 전기영동하여 EtBr 용액 (0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 염색 후 UV-transilluminator 상에서 표준 DNA 밴드와 비교 확인하였다. 또  $\alpha$ -amylase 활성은 7.5% 폴리아크릴아미드 슬라브 젤에서 220V, 20mA로 4 ~ 6 시간 4°C에서 전기영동한 후, 전분을 흡착시켜 요오드반응으로 효소밴드를 검출하였으며, 이때 전개액은 Tris-glycine 완충액 (pH 8.3)이었다.

#### $\alpha$ -Amylase 역가측정

$\alpha$ -Amylase의 활성은 정지기 배양액의 원심상 등액을 효소원으로 사용하여 blue value 법으로 측정하였다. 2 mM 초산칼슘이 함유된 0.01M Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에 1% 가용성 전분을 용해하여 기질로 사용하였으며, 효소액 50  $\mu\text{l}$ , 기질액 200  $\mu\text{l}$ 를 37°C에서 10분간 반응시킨 후,  $I_2$  - KI 액 2.5ml로 반응을 정지시켜 700 nm에서의 흡광도를 측정하였다.  $\alpha$ -Amylase 1unit는 37°C에서 1분간 1 mg의 기질을 가수분해하는 역가를 나타내었다.

#### 제한효소

BamH I, Mbo I, HindIII 등 제한효소와 T<sub>4</sub> DNA ligase는 일본 Takara Shuzo Co. 제품, 그 외의 제한효소는 Boehringer 제, kanamycin은 Sigma Co. 제품을 사용하였다.

## 결 과

#### $\alpha$ -Amylase 결실변이주의 분리

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 당화형  $\alpha$ -amylase 생성균주인 *B. subtilis* NA 64에 처리하여  $\alpha$ -amylase 결실변이주를 분리하였다. NTG 처리에 의해 얻어진 약 2,000여 변이주로부터 전분평판배지 상에서 약 20여 주의  $\alpha$ -amylase 결실변이주를 분리하여 최종적으로 *B. subtilis* KM 107을 선별하여 클로닝 속주로 사용하였다. 이 때 친주로서 *B. subtilis* NA 64는 10.2 unit의  $\alpha$ -amylase 활성을 나타냄에 비해 변이주는 효소 활성이 거의 없었다.

#### 외래 DNA와 pUB110 플라스미드 DNA의 정제

조정제된 염색체 DNA와 pUB110 플라스미드를 더욱 정제하기 위하여 CsCl 밀도구배 원심분리를 하여 Fig. 1에서와 같이 분획하였다. B의 주된 밴드는 외래 DNA로 추정되고 covalently-closed-circular(ccc) pUB 110(A)은 염색체 DNA와 RNA pellet 사이의 중간층으로 추정되었다. 외래 DNA 및 플라스미드 밴드로 추정되는 부분을 분획하여 EtBr

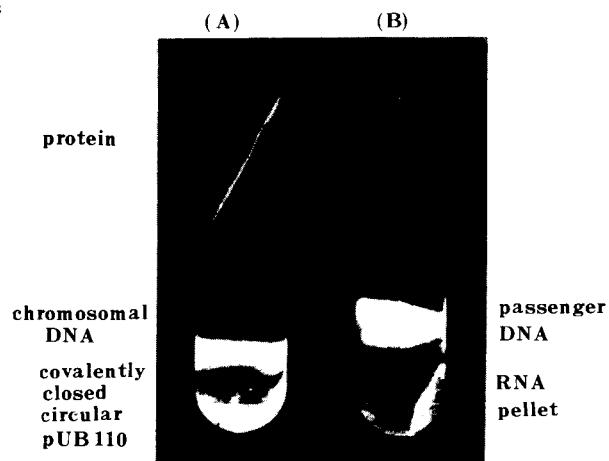
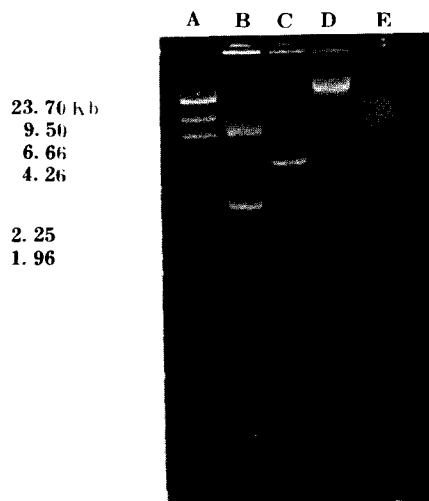


Fig. 1. Plasmid pUB110 and passenger DNA in CsCl-EtBr gradients.

Crude plasmid pUB110 (A) and passenger DNA solution (B) were mixed with CsCl and EtBr. Centrifugation was performed at 45,000 rpm for 40 hours at 20°C.; (A) - the fraction of pUB 110 plasmid; (B) - passenger DNA.



**Fig. 2. Restriction analysis of plasmid pUB110 and passenger DNA.**

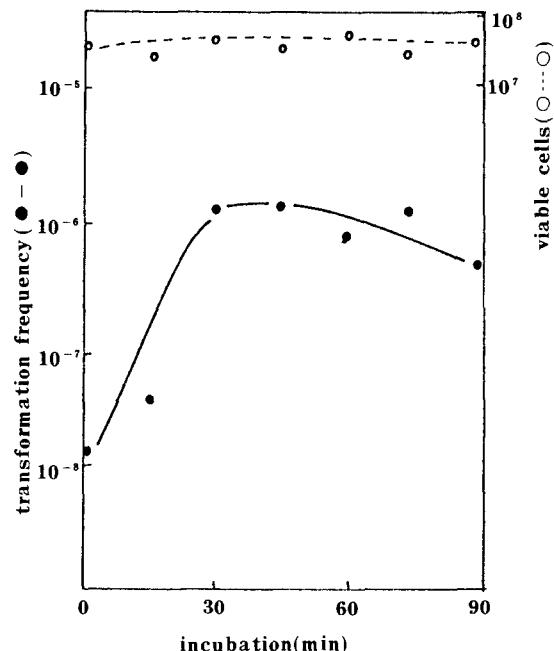
The purified plasmid pUB110 and passenger DNA were digested with restriction endonucleases as described in "Materials and Methods". The resultant restriction fragments were separated on a horizontal 0.7% agarose gel; lane A,  $\lambda$  DNA digested with HindIII; B, pUB110; C, pUB110 digested with BamHI; D, passenger DNA of *B. amyloliquefaciens*; E, passenger DNA digested with MboI.

과 염을 투석에 의해 제거한 후 MboI과 BamHI으로 각각 절단하였다. pUB110 플라스미드를 BamHI으로 분해하면 ccc DNA가 상실되고 선상 DNA가 증가하게 된다(Fig. 2). 외래 DNA는 MboI으로 부분분해한 후 2~5 kb 분획의 단편만을 전기영동추출로 분리하였다.

#### 형질전환주의 선별

2~5kb의 MboI으로 분해한 외래유전자를 BamHI으로 분해한 pUB110에 ligation시켜 형질전환시켰을 때의 조건 및 빈도를 검토하였다.

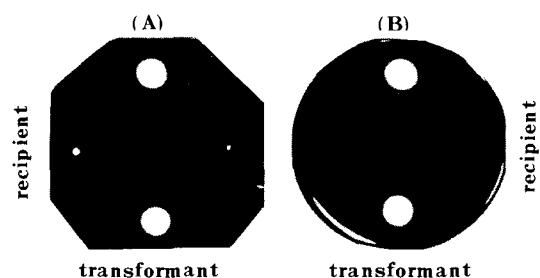
SPI 및 SP II 배지에서 형질전환의 극대화 조건을 알기 위하여 경시적으로 배양하면서 형질전환시킨 바 SPI 배지에서는 5~6시간, SP II 배지에서는 90분간 배양하였을 때 competence의 조건이 가장 좋았다. 또 competent 세포의 ligated plasmid와의 접촉시간은 30분 정도에서 극대화에 달하여 약 1시간 정도 지속하였으며(Fig. 3) 생존세포수는 90분까지 거의 변화가 없었다. 카나마이신에 대한 내성을 나타내는 형질전환 빈도는  $10^{-5} \sim 10^{-7}$  이었으며 이들 내성균 약 12,000개의 코로니로부터 전분-한 천평판배지에서  $\alpha$ -amylase의 분비능을 검토한 바 약 50%의 코로니가 극히 약한 투명환을



**Fig. 3. Optimal exposure condition of the hybrid plasmid to the transforming cells.**

An overnight cultured broth of cloning host strain in PAB was inoculated into SPI medium (5%). After 5~6 hours, a portion of the culture was diluted 10-fold into SP II medium and incubated for 90min. Competent cells were contacted at 37°C with the hybrid plasmid for various time intervals.

형성하였다. 그러나 이러한 약한 투명환을 형성하는 대부분의 코로니는 액체배양액에서 효소활성이 검출되지 않았다. 비교적 큰 투명환을 형성하는 코로니 가운데 재실험을 하여 가장 투명환이 큰 균 1주를 선별하여 *B. subtilis* KM213이라 명명하였다.



**Fig. 4.  $\alpha$ -Amylase halo formation on agar plates.**  
Transformed and recipient cells were patched on 1% starch agar plates with (A) or without Km (B) and incubated for 48 hours at 37°C. The halo formation indicates  $\alpha$ -amylase activity.

다. 이 형질전환주의 효소활성에 대한 투명화 형성은 전분(1%) - 카나마이신(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) - 한천평판상에서 Fig. 4 와 같다.

형질전환주는 카나마이신의 첨가에 관계없이 코로니를 형성하였으며  $\alpha$ -amylase의 투명화가 크게 나타났다. 그러나 클로닝 숙주세포인 *B. subtilis* KM 107 주는 카나마이신 첨가구에서 생육이 불가능하였음에 비해 비첨가구에서는 생육은 가능하였으나 효소활성의 투명화는 나타나지 않았다.

#### $\alpha$ -Amylase 코딩 유전자 단편의 삽입

형질전환주 *B. subtilis* KM 213으로부터 하이브리드 플라스미드를 분리하여 1% 한천 젤 전기영동하면 숙주세포에는 나타나지 않았던 새로운 플라스미드 밴드가 출현하였다. 이 하이브리드 플라스미드는 pUB 110 보다 훨씬 큰 밴드로서 pSKS3 이라 명명하였으며 이를 pUB 110에 결단부위가 한곳에만 존재하는 *Bgl* II로 절단한 바 단일밴드로서 약 10.2 kb로 추정되었다(Fig. 5). 이는 백터인 pUB 110 이 4.5 kb임을 감안할 때 5.7 kb의 exogenote가 삽입된 것으로 추정되었다.

#### pSKS3 $\alpha$ -amylase의 전기영동상

형질전환주 *B. subtilis* KM 213의 LB배양액으로부터 pSKS3 유래성  $\alpha$ -amylase를 분리하여 *B.*

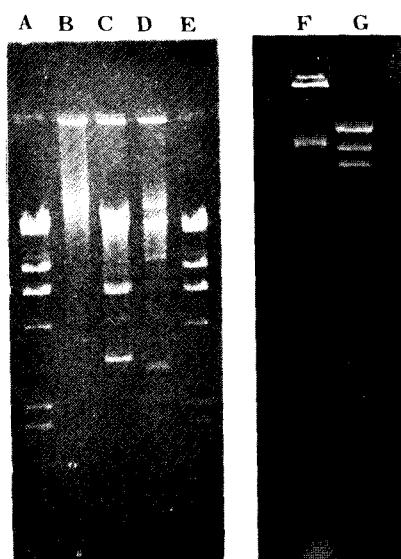


Fig. 5. Isolation of hybrid plasmid pSKS3 by agarose gel electrophoresis.

Hybrid plasmid was prepared with a rapid alkaline extraction method. Horizontal 0.7%-agarose gel electrophoresis was carried out for 3.5 hours at 220V, 20mA., lane A, E, G,  $\lambda$  DNA digested with *Hind* III (marker); B, recipient; C, pUB110; D, transformant, pSKS3 ; F, pSKS3 digested with *Bgl* II.



Fig. 6. Comparison of transformant  $\alpha$ -amylase with donor and recipient.

Bacteria were grown in LB-broth for 15 hours with vigorous aeration at 37°C. Cells were centrifuged and the supernatant portions (50  $\mu\text{l}$  each) were loaded per lane. The method of 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis was described in "Materials and Methods"; lane A - *B. amyloliquefaciens* (donor); B - *B. subtilis* NA64; C - amylose negative mutant (recipient); D - transformant.

*amyloliquefaciens*의 액화형 및 *B. subtilis* NA 64의 당화형  $\alpha$ -amylase와 동일한 영동상을 나타내는 가의 여부를 조사한 바 Fig. 6 과 같이  $R_{BPB} = 0.42$  의 액화형  $\alpha$ -amylase(lane A)는 pSKS 3 유래성  $\alpha$ -amylase(lane D)와 동일한 이동거리를 나타내었으나  $R_{BPB} = 0.27$ 의 당화형  $\alpha$ -amylase(lane B)와는 다른 영동상을 나타내었음을 볼 때 본 pSKS 3에 클로닝된 유전자는 외래 DNA로서 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase 코딩 유전자에 유래함을 알 수 있었다. 이때 클로닝 숙주로서 사용한 변이주 *B. subtilis* KM 107 주로부터는  $\alpha$ -amylase 밴드가(lane C) 나타나지 않음을 볼 때  $\alpha$ -amylase 결실변이주임을 확인할 수 있었다. 또 이때 형질전환주의  $\alpha$ -amylase 활성은 친주의 약 25% 정도이었다.

#### 고 찰

*Bacillus amyloliquefaciens*의 액화형  $\alpha$ -amylase는 monocistronic mRNA로부터 번역되는 것으로서 세포외로 분비된 exoamylase는 483아미노산으로 구성되어 M. W. 54,778로 되어 있으며 여기에 31아미노산으로 구성된 신호배열이 결합되면 514아미노산 잔기로 구성된 전구체(M. W. 58,427)가 된다. 이 유전자는 양 말단에 palindrome 구조가 형성되어 있으며 이는 말단구조에 티민 - 잔기가 연결되어 있어서 원핵세포에서 흔히 나타나는 전사종결 신호로

작용한다<sup>[18]</sup>.

이러한  $\alpha$ -amylase의 신호배열을 분리하여 세포내재성 단백질의 유전자와 융합시킴으로써 임의의 단백을 인위적으로 분비시키고자 하였다. 아울러 이러한 액화형  $\alpha$ -amylase를 코딩하는 유전자를 당화형  $\alpha$ -amylase 결실변이주인 *B. subtilis* KM 107 주에서 발현시킴으로써 *B. subtilis* NA 64로부터 액화형 및 당화형  $\alpha$ -amylase를 함께 생산함과 동시에  $\alpha$ -amylase의 신호배열을 분리하여 다른 유전자와 융합시킴으로써 임의의 단백을 인위적으로 분비시키고자 하였다.

4.5 kb의 pUB 110 플라스미드는 *Bacillus*에서 증식이 가능한 플라스미드로서 카나마이신 내성의 표식을 갖고 있다. 이 플라스미드는 BamH I 부위가 한곳에 있어서 BamH I으로 개열한 후 Mbo I으로서 부분분해한 *B. amyloliquefaciens*의 염색체 DNA 단편을 삽입시켰다. 이 융합된 플라스미드는 *B. subtilis*의 restriction negative 세포에서 subcloning 시킨 후 이 플라스미드를 분리하여 다시 당화형  $\alpha$ -amylase 결실변이주인 *B. subtilis* KM 107에서 형질발현시킨 결과  $\alpha$ -amylase의 활성이 나타났다. 형질전환체의 선별은 카나마이신 내성의 코로니를 분리한 후 전분-한천 평판배지상에서 옥도반응에 의한 투명환 형성의 강도로서  $\alpha$ -amylase의 생성여부를 판정하였다.

그 결과 최종적으로 얻어진 이 형질전환주 *B. subtilis* KM 213의  $\alpha$ -amylase의 활성은 *B. amyloliquefaciens*의 1/4 정도로 감소하였으나 이와 동일한 방법으로  $\alpha$ -amylase를 클로닝한 Palva 등<sup>[19]</sup>의 실험에서는 친주의 5 배 정도 증가되었음이 보고되었음은 융합된 플라스미드 벡터를 클로닝시킨 숙주의 차이에 기인된 결과로 추측된다. 즉, 본 실험에서 사용한 당화형  $\alpha$ -amylase 결실변이주 *B. subtilis* KM 107 주에서는 Palva 등이<sup>[19]</sup> 사용한 *B. subtilis* IA 289 (met B5, sacA 321, aro I 906, amy<sup>-</sup>) 주에서 보다 플라스미드의 복제가 불안정하였거나 숙주 제한조건 또는 이종단백의 전사 및 분비능이 제한되었기 때문이거나 *B. subtilis* 주에서의 복제수의 증가에 기인된 결과로 추측된다. pSKS 3 플라스미드 유래성의 효소단백질을 동정하기 위한 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에서 본 효소는 *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase와는 전기적 이동성이 같았으나 클로닝 숙주인 *B. subtilis* NA 64의 당화형  $\alpha$ -amylase와는 다른 점으로 미루어 보아 형질전환주에서 발현되는  $\alpha$ -amylase 유전자는 *B. amyloliquefaciens* 유래성임이 확인되었다.

클로닝된 플라스미드의 형질전환은 SPI 배지에서

6시간 배양한 후 SP II로 전이시키면서 90분 더 배양하였을 때 competence의 활성이 최대에 달하였음은 Sadaie와 Kada<sup>[20]</sup>의 형질전환 조건과 유사한 것으로 생각되었다. 그러나 competence 세포의 클로닝된 벡터와의 반응시간이 30분에서 극대화에 달하였음은 Anagnostopoulos와 Spizizen<sup>[21]</sup>의 90분에 비해 대조적이었으며 이때 형질전환 빈도가  $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 이었음은 다른 실험의 형질전환 빈도에 비해 비교적 낮은 편이었다.

pSKS 3에 삽입된 5.7 kb 단편의 제한효소지도작성 및 이 부위에 존재하는  $\alpha$ -amylase의 신호배열 분리는 현재 시도중에 있으나 31아미노산으로 구성된 신호배열에 의해 세포내재성 단백의 인위적 분비가 가능하여 진다면 산업적으로 효소의 대량생산이란 측면에서 유용하게 쓰여질 수 있으리라 믿어진다.

## 요약

*Bacillus amyloliquefaciens*가 생성하는 액화형  $\alpha$ -amylase의 구조유전자를 클로닝하기 위하여 이균주 염색체의 2~5 kb 회분을 분리하여 Mbo I으로 부분분해한 후 pUB 110 플라스미드의 BamHI부위에 삽입하여 hybrid vector pSKS 3를 제작하였다. 이 재조합플라스미드를 세한수식결손 세포인 *Bacillus subtilis* ED 107에서 subcloning한 후 당화형  $\alpha$ -amylase를 생성하는 *Bacillus subtilis* NA 64의  $\alpha$ -amylase 결실변이주 *Bacillus subtilis* KM 107 주에서 형질발현시켰다. 이때 형질전환빈도는  $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 정정도였으며 그중 약 50%가  $\alpha$ -amylase 분비능이 있었으나 거의 대부분이 쉽게 실활되었다. 최종선별과정에서  $\alpha$ -amylase<sup>[19]</sup>가 가장 강하게 생성하는 형질전환주 *Bacillus subtilis* KM 213으로부터 재 추출한 재조합플라스미드 pSKS 3는 5.7 kb의 삽입된 단편이 BamH I/Mbo I 부위에 결합되어 있었다.

pSKS 3에 클로닝된 유전자에 의해 발현되는  $\alpha$ -amylase 활성은 *B. amyloliquefaciens* 활성의 약 25%였으며, 이 pSKS 3에 의해 발현되는  $\alpha$ -amylase 단백은 *B. amyloliquefaciens*의  $\alpha$ -amylase와 동일한 전기영동성을 나타내었음을 볼 때 pSKS 3에 클로닝된 유전자는 *B. amyloliquefaciens*에서 유래함을 알 수 있었다.

## 사사

본 연구는 1984~85년도 한국과학재단의 학술연

구비에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 귀 재단의 연구지원에 감사합니다.

### 참고문헌

1. Silhavy, T.J., S.A. Benson and S.D. Emr.: *Microbiol. Rev.*, **47**, 313 (1983)
2. 송방호 : 유전자재조합 실용화기술, 한국생화학회, pp. 137~160 (1986).
3. Smith, W.P., P. Tei and B.D. Davis: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 814 (1978)
4. Yamane, K., T. Shiroza and T. Furusto: *Proteins, Nucleic Acids and Enzymes (Japan)*, **30**, 925 (1985)
5. 송방호 : '85국내외 한국과학기술자대회 workshop 논문집 (한국과학기술자연), pp. 178~184 (1985).
6. Parva, I., R.F. Pettersson, N. Kalkkinen, P. Lehtovaara, M. Sarvas, H. Söderlund, K. Takkinnen and L. Kääriäinen: *Gene*, **15**, 43 (1981).
7. Vasantha, N., L.D. Thompson, C. Rhodes, C. Banner, J. Nagle and D. Filupa: *J. Bact.*, **159**, 811 (1984)
8. Wells, J.A., E. Ferrari, D.J. Henner, D.A. Estell and E.Y. Chen: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 7911 (1983)
9. Yamasaki, H., K. Ohmura, A. Nakayama, Y. Takeichi, K. Otozai, M. Yamasaki, G. Tamura and K. Yamane: *J. Bact.*, **156**, 327 (1983)
10. Murphy, M., D.J. McConnell and B.A. Cantwell: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 5355 (1984)
11. Coq, D., P. Ratet, N. Steinmetz and P. Gay: *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, Acad. Press, NY, pp141-152 (1984)
12. Yang, M.Y., E. Ferrari and D.J. Henner: *J. Bact.*, **160**, 15 (1984)
13. Wong, S.L., C.W. Price, D.S. Goldfarb and R.H. Doi: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 1184 (1984)
14. Stephens, M.A., S.A. Ortlepp, J.F. Ollington and D.J. McConnell: *J. Bact.*, **158**, 369 (1984)
15. Chang, C.N., J.B.K. Nielson, K. Izui, G. Blobel and J.O. Lampen: *J. Biol. Chem.*, **257**, 4340 (1982)
16. Lampen, J.O., W. Wang, P.S.F. Mezes and Y.Q. Yang: *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, Acad. Press, NY, pp129-140 (1984)
17. Song, B.H. and J. Neuhardt: *Mol. Gen. Genet.*, submitted paper (1987)
18. Takkinnen, K., R.F. Pettersson, N. Kalkkinen, I. Palva, H. Söderlund and L. Kääriäinen: *J. Biol. Chem.*, **258**, 1007 (1983)
19. Cheng, H. and F. Friberg: *Biochem. J.*, **185**, 387 (1980)
20. Matsuzaki, H., K. Yamane, K. Yamaguchi, Y. Nagata, B. Maruo: *Biochem. Biophys. Acta*, **365**, 235 (1974)
21. Miller, J.H.: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Lab., NY, pp125-129 (1974)
22. Anagnostopoulos, C. and J. Spizizen: *J. Bact.*, **81**, 741 (1961)
23. Sadai, Y. and T. Kada: *J. Bact.*, **153**, 813 (1983)
24. Saito, H. and K. Miura, *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619 (1963)
25. Gryczan T.J., S. Contente and D. Dubnau: *J. Bact.*, **134**, 318 (1978)
26. Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979)
27. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory, NY, pp. 98-106 (1982)
28. Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell, S. Falkow: *J. Bact.*, **127**, 1529 (1976)
29. Song, B-H. and N-S. Lee: *J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**, 139 (1984)