

## 고초균(*Bacillus*) 염색체상에서 외래 유전자 Alkaline Elastase Gene의 증폭

김병문\* · 정봉현  
한국과학기술연구원 생명공학연구소

### Multiple Chromosomal Integration of a *Bacillus* Ya-B Alkaline Elastase Gene

Byung-Moon Kim\* and Bong-Hyun Chung

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,  
KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-333, Korea

**Abstract** — The alkaline elastase is an extracellular serine protease of the alkalophilic *Bacillus* strain Ya-B. To increase the gene copy number and the production level of the alkaline elastase Ya-B, we designed, on the *B. subtilis* chromosome, a gene amplification of the 10.6 kb repeating unit containing *amyE*, *aleE* (alkaline elastase Ya-B gene) and *tmrB*. The *aleE* was inserted between *amyE* and *tmrB*, and *B. subtilis* APT119 strain was transformed with this *amyE-aleE-tmrB*-junction region fragment. As a result, we succeeded in obtaining tunicamycin-resistant (Tm<sup>r</sup>) transformants (Tf-1, Tf-2) in which the designed gene amplification of 10.6 kb occurred in chromosome. The transformants showed high productivity of  $\alpha$ -amylase and alkaline elastase Ya-B. The copy number of the repeating unit (*amyE-aleE-tmrB*) was estimated to be 25, but plasmid vector (pUC19) was not integrated. The amplified *aleE* of chromosome was more stable than that of plasmid in absence of antibiotics.

유용 유전자를 *Bacillus*에서 증폭시키기 위해서는 plasmid vector를 이용하는 것이 일반적이지만 이 방법은 약제의 선택압(selective pressure of antibiotics)이 없는 plasmid의 탈락, 유용 유전자의 deletion 등이 일어나기 쉽다(1). 그러나, 염색체 상에서 유용 유전자를 integration한 뒤 증폭시키면 plasmid vector에 비하여 일반적으로 안정하다(2). 현재까지 진핵생물에서 원핵생물에 이르기까지 많은 생물종에서 염색체상에서의 유전자 증폭이 발견되었으며, 원핵생물에서는 대부분 약제 내성 균주에서 유전자 증폭이 발견되었다. 특히, 원핵생물 중에서는 *Bacillus*를 중심으로 integration vector로  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -lactamase, alkaline-protease 등의 유전자를 염색체 상에서 삽입, 증폭하여 대량 생산에 성공한 예가 다수 보고되었다(2-6).

*Bacillus*는 5  $\mu$ g/ml 정도의 tunicamycin에 대하여 높은 감수성을 나타내며 球型화, 連鎖화를 거쳐 용균된다. Hashikuchi 등은 *B. subtilis* NA64 균주를 nit-

rosoguanidine 변이처리하여 tunicamycin 내성 변이주(B7株)를 얻었다(3). 이 B7株는 10  $\mu$ g/ml의 tunicamycin에서도 내성이 있으며 親株보다 약 5배의  $\alpha$ -amylase 활성을 나타내었다. 이 B7株는 *amyE*, *tmrB*를 포함하는 약 16 kb의 영역이 염색체상에서 10 copy 증폭되었으며 이로 인해  $\alpha$ -amylase의 고생산과 tunicamycin의 내성을 가지게 되었다(7). 유전자증폭을 유도하는 *amyE-tmrB* 영역이 B7주의 염색체로부터 6.4 kb의 *EcoRI* 단편으로  $\lambda$  Charon4A에 cloning 되었다(8). 이 단편으로 유전자증폭을 유도하면 *amyE-tmrB* 영역이 8.7 kb로 줄어 염색체상에서 20 copy 증폭되었다.

Alkalophilic *Bacillus* Ya-B 균주가 생산하는 alkaline elastase는 높은 alkali 영역에 최적 pH를 가지고 있는 serine protease의 일종이다(9-11). Alkaline elastase는 硬蛋白質인 elastin을 잘 분해하므로, 식육의 연화제 및 세제로 이용할 수 있는 공업상 중요한 효소이다.

본 연구에서는 alkaline elastase의 유전자(*aleE*)를 *amyE*와 *tmrB* 사이에 삽입하여 *Bacillus*를 형질전환한 후 tunicamycin으로 chromosome 상에서 유전자의 in-

**Key words:** *Bacillus subtilis*, gene amplification, alkaline elastase

\*Corresponding author

tegration 및 증폭을 유도한 후,  $\alpha$ -amylase 및 alkaline elastase Ya-B의 생산량과 非選擇壓에서의 증폭 安定性을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid

유전자 증폭용 균주로서 *B. subtilis* APT119(*metB5 leuA8 lys-21 herM hsmM aroI906 amyE07*)를 사용했으며(8), plasmid의 안정성을 조사하기 위하여 *B. subtilis* DB104(*his-101 nprR2 npeE18  $\Delta$ aprE3*)를 사용하였다(12). Plasmid 구축용 균주로서는 *E. coli* JM 109를 사용하였다. pMM305는 6.4 kb의 *EcoRI* 단편 (*amyE-tmrB*-junction region)을 pUC19에 연결한 plasmid이며, pED103은 pUC18의 *HindIII*, *EcoRI* site에 *aleE*가 들어있는 *E. coli*용 plasmid이며, pEX301은 *B. subtilis*-*E. coli* shuttle vector인 pHY300PLK(*B. subtilis* Tc<sup>r</sup>, *E. coli* Tc<sup>r</sup> Ap<sup>r</sup>, Takara Shuzo, Kyoto Japan)의 *SalI*, *EcoRI* site에 *aleE*가 들어있는 alkaline elastase Ya-B의 발현 vector이다(9).

### 시약 및 제한효소

각종 제한효소 및 T4 DNA ligase, Mung Bean nuclease 등은 Boehringer Mannheim에서, ampicillin, tetracycline, elastin, tunicamycin은 Sigma에서, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP는 Amersham에서, Random Primer DNA Labeling Kit는 Takara에서, nylon membrane은 BIO-RAD에서 구입했다.

### 고초균의 competent cell 형질전환

Hass와 Yoshikawa의 방법에 따라 *B. subtilis* APT 119를 competent cell로 만든 후 직쇄상의 7 kb fragment(*amyE-aleE-tmrB*-junction region)로 형질전환시켰다(14).

### Soluble starch, elastin 및 skim milk plate

Soluble starch plate는 통상의 배양에 이용하는 한천배지에 가용성 전분을 종농도 1%로 첨가하고 고압 멸균하였다. *Bacillus*를 접종하여 37°C에서 40시간 배양한 후, 0.02N I<sub>2</sub> 용액을 plate에 spray하여 colony의 주변에 halo의 생성여부를 관찰하였다.

Elastin plate는 0.5% elastin를 포함하는 0.5% 한천배지를 고압 멸균 후 70°C까지 식힌 후, 별도 멸균한 10%(W/V) 탄산 나트륨을 1/10 용량 첨가하였다. 이것을 이미 굳어 있는 목적의 한천배지(0.8% nutrient broth, 1.5% agar, 10~40  $\mu$ g/ml tunicamycin 또는 20

$\mu$ g/ml tetracycline)에 重層하였다. Skim milk plate는 통상의 배양에 이용하는 한천배지를 고압 멸균 후 70°C까지 식힌 후, 별도 멸균한 skim milk(Difco)를 종농도 1%로 첨가하였다. elastin 및 skim milk plate에 *Bacillus*를 접종하여 37°C에서 40시간 배양한 후, colony의 주변에 halo의 생성여부를 관찰하였다.

### *B. subtilis* 염색체 DNA의 분리

Mori등의 방법에 따라 *B. subtilis*에서 염색체 DNA를 분리하였다(7).

### Southern hybridization 분석

*tmrB*의 probe로서 pMM305의 *SphI*과 *EcoRI*의 fragment(약 3 kb)를, *aleE*의 probe로서는 pED103의 *MluI*과 *SmaI*의 fragment를, vector의 probe로서는 pUC19의 *EcoRI* fragment를 사용하였으며, random primer DNA labeling 법으로 labeling 하였다. 약 4  $\mu$ g의 염색체 DNA를 제한효소로 완전히 분해하여 0.8% agarose gel에서 전기 영동한 후, Southern의 방법에 따라 nylon membrane에 transfer 하였다(15). Membrane을 6X SSC, 1X Denhardt's solution, 50  $\mu$ g denatured salmon sperm DNA ml<sup>-1</sup>에서 65°C로 prehybridization한 후, <sup>32</sup>P-labelled DNA probe로 65°C, 하룻밤 동안 hybridization하고 autoradiography를 하였다.

### 유전자 증폭된 균주의 증폭 number의 결정

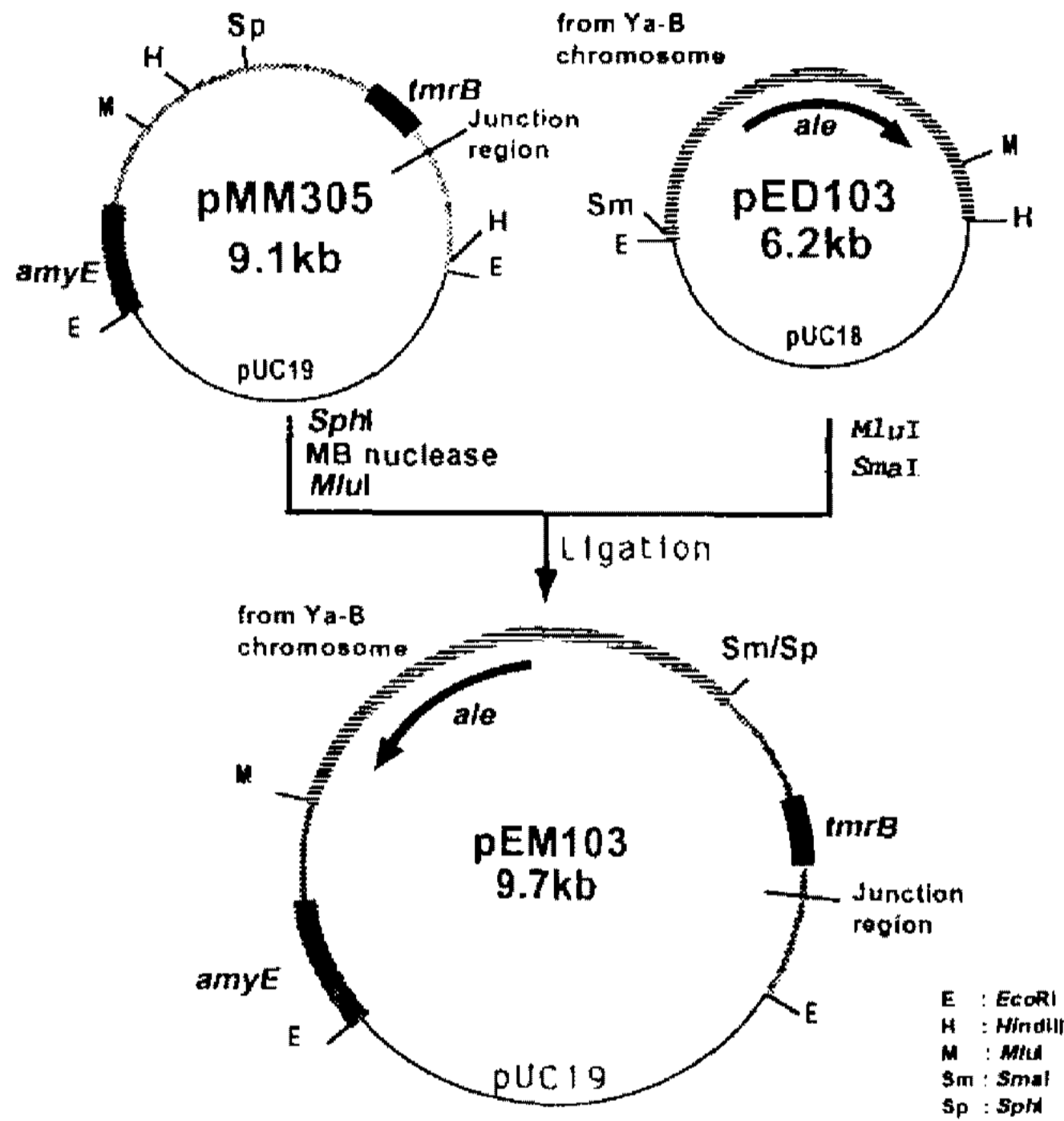
Hybridization한 membrane을 autoradiography한 후 liquid scintillation counter로 chromosome상의 1 copy의 *tmrB*(15 kb fragment)와 증폭된 부분의 *tmrB*(8.3 kb fragment)에 hybridize한 *tmrB* probe의 <sup>32</sup>P radioactivity를 측정하고 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### *aleE* 증폭용 integration plasmid vector의 구축

pMM305는 6.4 kb의 *EcoRI* 단편을 *E. coli*용 plasmid vector pUC19에 연결한 integration plasmid vector이며, *amyE*와 *tmrB* 사이에 *MluI* 및 *SphI* site를 가지고 있다. pED103에는 pUC18에 cloning된 *aleE*가 *SmaI*과 *MluI* site 사이에 들어있다. pMM305를 *SphI*으로 절단 및 Mung bean nuclease로 처리로 blunt end로 만든 후, *MluI*으로 절단하여 agarose gel 전기영동하고 gel로부터 7.5 kb의 fragment를 추출하였다. pED103을 *SmaI* 및 *MluI*으로 절단하여 *aleE*를

포함하는 2.2 kb의 fragment를 gel로부터 추출하였다. 이 두개의 fragment를 연결하여 pEM103을 구축하였다(Fig. 1). pEM103의 amyE와 tmrB 사이에는 aleE가 삽입되어 있으며 tmrB의 우측에는 증폭단위의 연결부분이 되는 junction region이 있다. 형질전환의 효율을 높이고, vector 부분(pUC19)의 혼입을 막기 위해 pEM103을 EcoRI로 절단하여 직쇄상의 7 kb fragment(amyE-aleE-tmrB-junction region)로 B. subtilis APT119를 형질전환시켰다.



Tm<sup>r</sup> Amy<sup>+</sup> AleE<sup>+</sup> 균주의 선택

10 µg/ml의 tunicamycin plate에서 200개의 colony를 얻었으며, 대부분의 colony가 40 µg/ml의 tunicamycin plate에서도 내성을 보였다. 그중 37 colony를 1% 가용성 전분, 40 µg/ml의 tunicamycin plate에서 배양한 결과 두개의 colony가 α-amylase 활성을 나타내었다(Fig. 2). 다시 이 두 colony를 2% elastin, 40 µg/ml의 tunicamycin plate에서 배양한 결과 모두 elastin 분해 활성을 나타내었으며(Fig. 3A), elastase 활성은 약 20 copy의 plasmid(pEX301)를 갖는 균주와 거의 같았다(Fig. 3B). Tm<sup>r</sup> Amy<sup>+</sup> AleE<sup>+</sup>를 나타내는 이 두 균주를 Tf-1, Tf-2로 명명하였다.

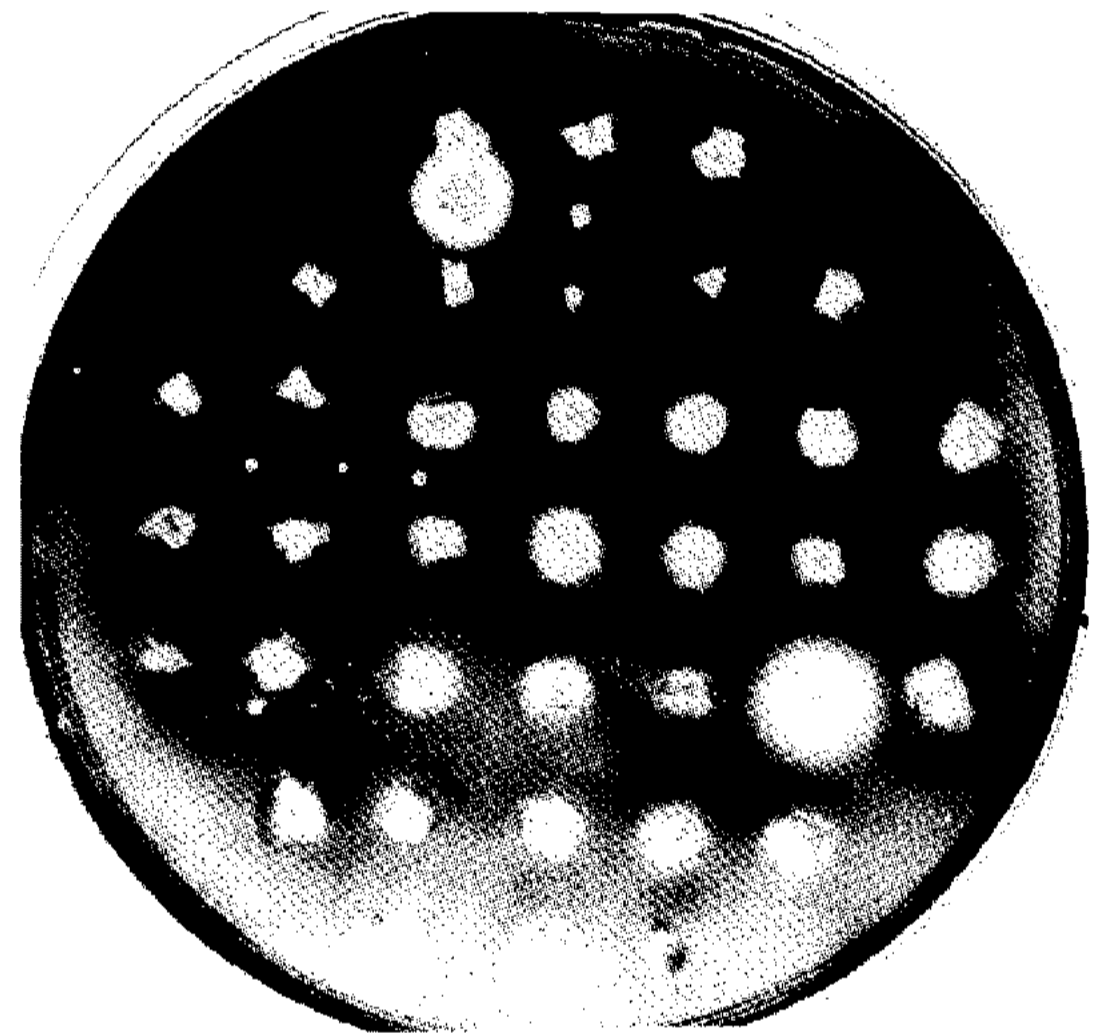


Fig. 2. Selection of Tm<sup>r</sup> Amy<sup>+</sup> strains in the plate containing 1% soluble starch and 40 µg/ml tunicamycin.

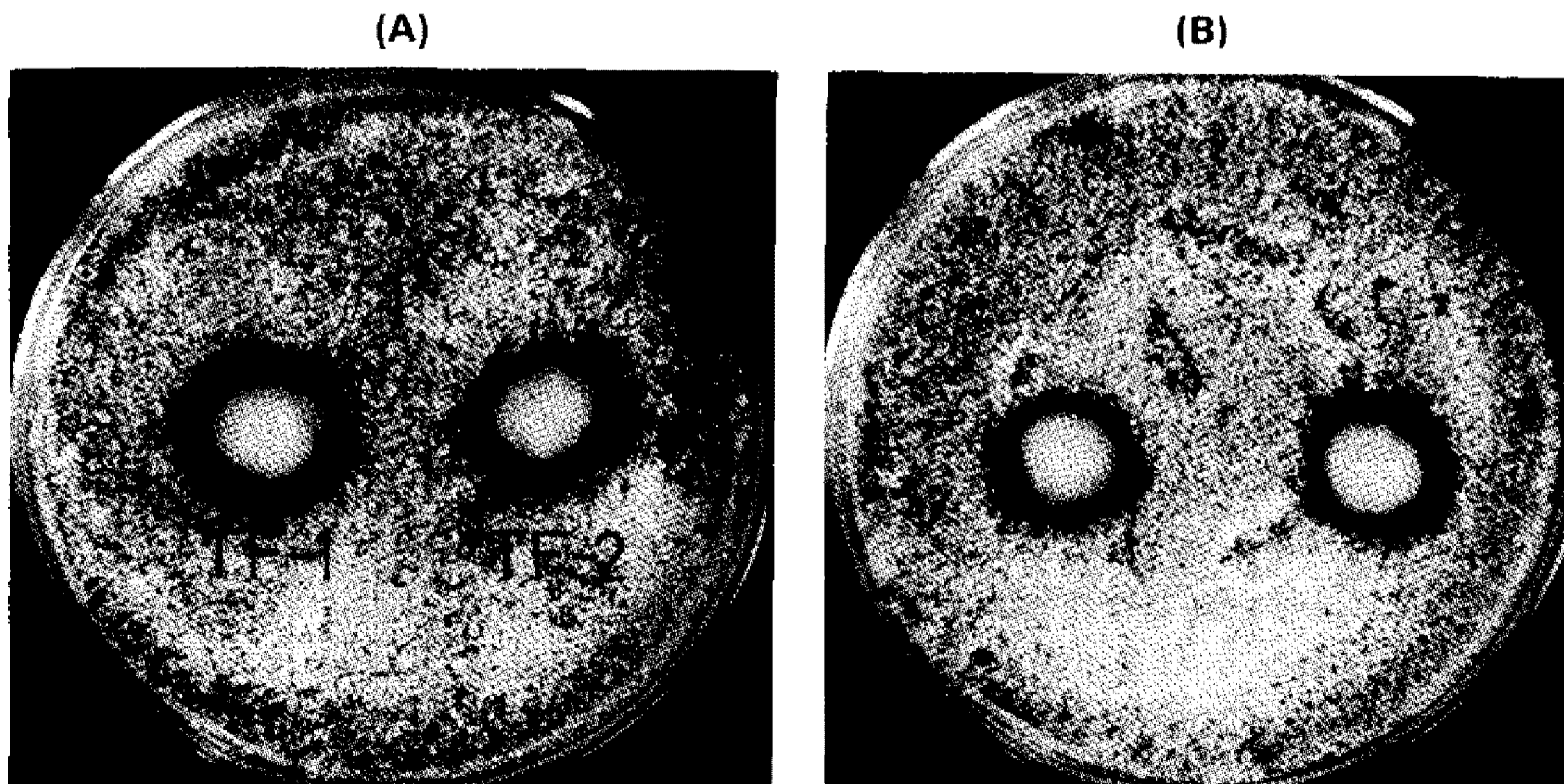
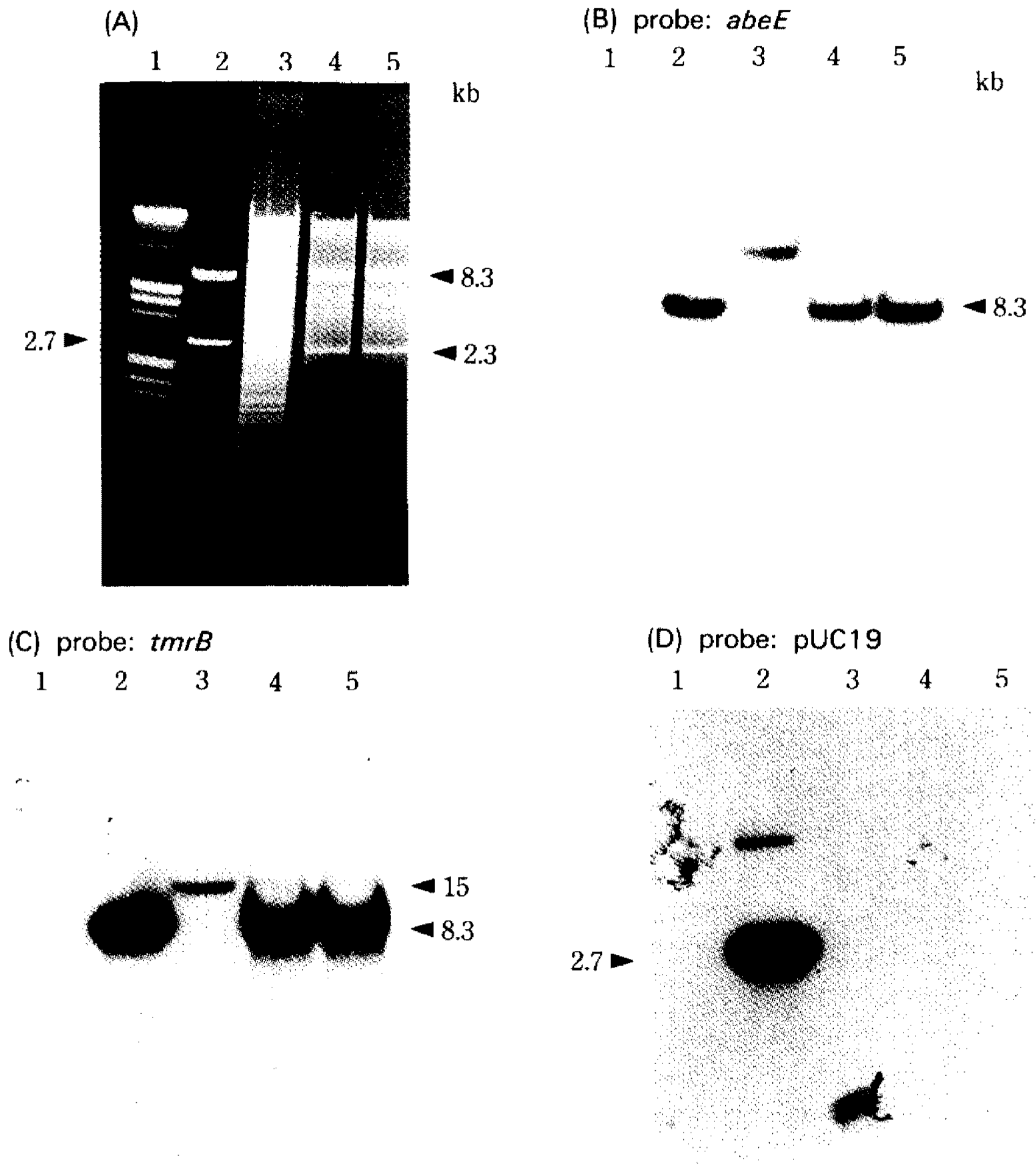


Fig. 3. (A) Alkaline elastase activity of gene amplified strains (Tf-2, Tf-2) in 0.5% elastin and 40 µg/ml tunicamycin plate. (B) Alkaline elastase activity of plasmid (pEX301)-containing strains B. subtilis DB104 in 0.5% elastin and 15 µg/ml tetracycline plate.



**Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern (A) and Southern hybridization patterns (B, C, D) of chromosomal DNA of *B. subtilis* strains completely digested with *EcoRI*.**

Lane 1, Marker  $\lambda$ /*HindIII-EcoRI*; Lane 2, *EcoRI* digestion of plasmid pEM103

Lane 3, *EcoRI* digestion of *B. subtilis* APT119 chromosome

Lane 4, *EcoRI* digestion of Tf-1 chromosome

Lane 5, *EcoRI* digestion of Tf-2 chromosome

#### Southern hybridization 분석 결과

Tf-1, Tf-2의 두 균주로부터 염색체 DNA를 조제하여 *EcoRI*으로 절단 후 agarose 전기 영동한 결과 친주(*B. subtilis* APT119)에 비하여 8.3 kb와 2.3 kb 부근에 증폭된 band가 검출되었다(Fig. 4A lane 4, 5). *abeE* probe로 Southern hybridization 분석을 한 결과 증폭된 band(8.3 kb)에 hybridize하였다(Fig. 4B lane 4, 5). 또 *tmrB* probe로 Southern hybridization 분석을 한 결과 역시 증폭된 band(8.3 kb)에 hybridize하였다(Fig. 4C lane 4, 5). 그러나 vector 부분(pUC19) probe로 Southern hybridization 분석을 한 결과 pEM

103의 2.7 kb plasmid vector의 band에 hybridize하였다(Fig. 4D lane 2). Fig. 4D의 lane 2에서 2.7 kb보다 높은 위치에 약한 band가 관찰되는데 이것은 완전히 분해되지 않은 pEM103의 band라 생각되며, agarose 전기영동(Fig. 4A lane 2)에서도 가장 윗 부분에 완전히 분해되지 않은 pEM103의 band가 존재한다.

본 실험의 형질전환은 1단계로 염색체와 도입된 7 kb fragment 사이에 不等非相同 再組合을 일으키고 2단계로 유전자 증폭이 일어나므로 vector의 배열이 integration되지 않았다. Agarose 전기영동 및 Southern hybridization 분석결과 Tf-1, Tf-2의 두 균주

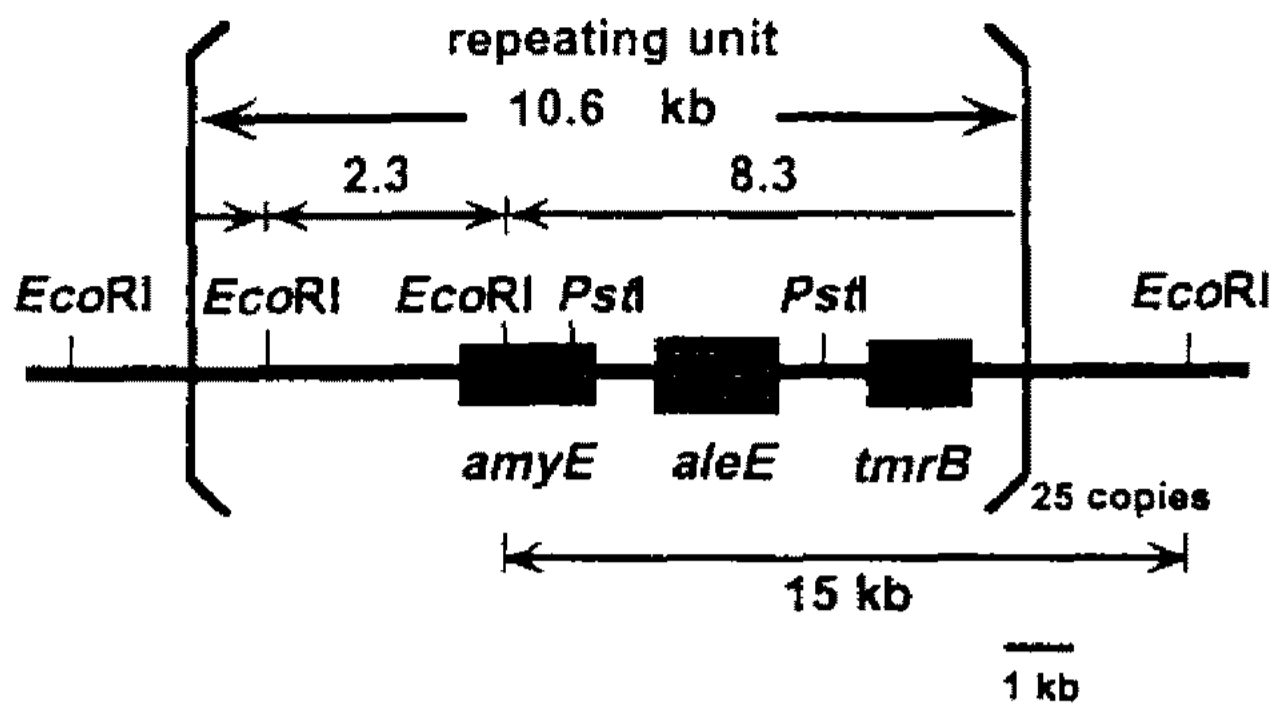


Fig. 5. Restriction map of the *amyE-aleE-tmrB* region and the proposed structure for the repeating unit.

로부터 검출된 증폭 단위를 Fig. 5에 나타내었다. 증폭 단위는 10.6 kb(8.3 kb+2.3 kb)로 예상한대로 *amyE*, *tmrB* 사이에 *aleE*가 삽입된 상태로 증폭이 일어났다.

#### 증폭단위의 copy number

친주 *B. subtilis* APT119의 염색체상에는 15 kb의 *EcoRI* 단편에 *tmrB*가 1 copy 존재하며, 이 단편에도 *tmrB* probe가 hybridize하였다(Fig. 4C lane 3). 이것과 Tf-1, Tf-2의 두 균주의 8.3 kb의 *EcoRI* 단편(Fig. 4C lane 4, 5)에 hybridize한 *tmrB* probe의  $^{32}\text{P}$  radioactivity를 비교한 결과 15 kb의 *EcoRI* 단편보다 8.3 kb의 *EcoRI* 단편이 약 25배 높게 나왔다. 이것은 10.6 kb(*amyE-aleE-tmrB*-junction region)의 증폭단위가 약 25 copy 증폭되었음을 의미한다. Fig. 4B의 lane 3에도 *aleE* probe와 hybridize한 band가 관찰되는데 이것은 염색체상의 *aleE*와 상동성이 있는 protease라 생각된다.

#### 증폭의 안정성

Chromosome에 증폭된 *aleE*를 가지고 있는  $\text{Tm}^r$   $\text{Amy}^+$   $\text{AleE}^+$  균주를 약제의 選擇壓이 없는 배지에서 480세대(1세대 : 20분) 배양한 결과 protease 활성은 떨어지지 않고 안정하였다(Fig. 6). 그러나 plasmid(pEX301)에 *aleE*를 가지고 있는 *B. subtilis* DB104는 초기의 것에 비하여 활성이 약해져 불안정하였다.

일반적으로 *Bacillus*에서 plasmid는 불안정하나, 염색체의 유전자증폭은 안정하다고 알려져 있다(16-19). Janniere등은 *Bacillus*의  $\text{Km}^r$  유전자를 포함하는 증폭단위를 kanamycin이 없는 배지에서 150세대 배양하여도 copy 수의 변화가 없다고 보고하였다(4). Van der Laan등은 *Bacillus* alkaline protease gene을 *Bacillus*의 염색체 상에 integration한 후 plasmid와 안정성을 비교하였다. Shaking flasks의 배양에서는 plasmid-containing strain과 chromosomal integrant

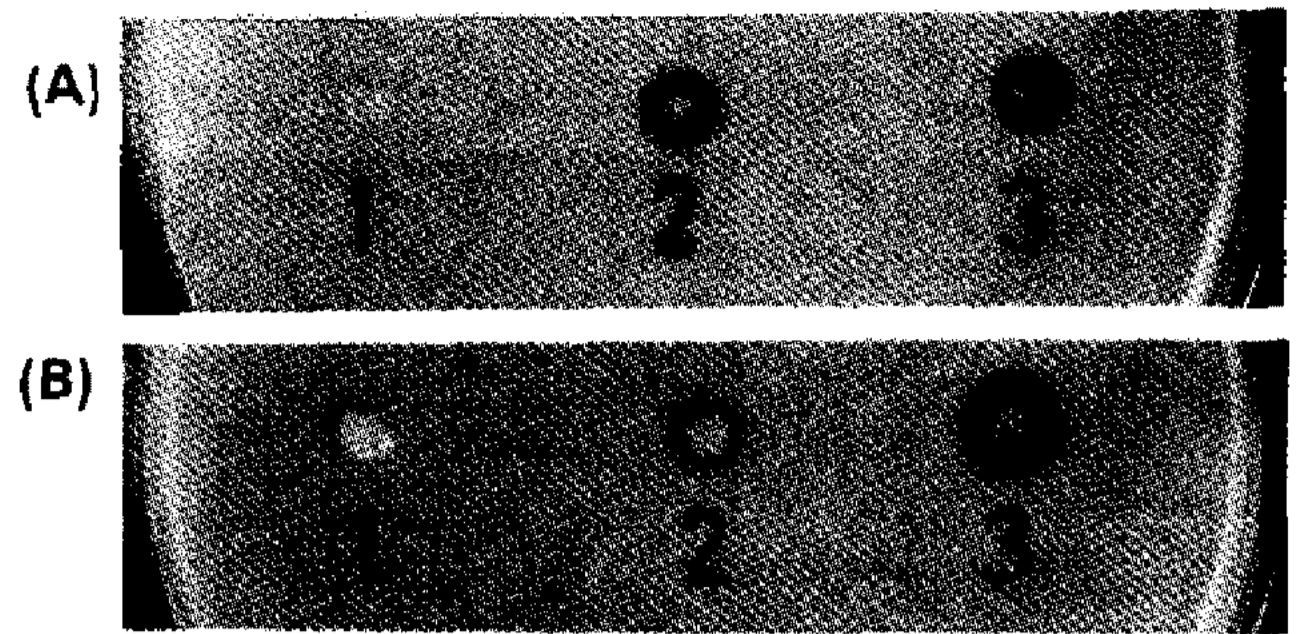


Fig. 6. Relative alkaline elastase production and stability of gene amplified strains and plasmid-containing strains after 480 generations without selective pressure of antibiotics.

(A) After 30 generation; (B) After 480 generations.

1, *B. subtilis* APT119

2, plasmid (pEX301)-containing strain *B. subtilis* DB104

3, gene amplified strain ( $\text{Tm}^r$   $\text{Amy}^+$   $\text{AleE}^+$ ).

모두 안정하였으나, 10-liter fermentation에서는 chromosomal integrant만이 안정하였다(2). 본 연구의 gene amplification에서는 amplification number가 plasmid의 copy number와 비슷하여 alkaline elastase의 발현 분비량을 늘이지는 못했지만 증폭 안정성은 대폭 증가하였다. 따라서 culture volume을 scale up한 대용량의 fermentation에 매우 적합할 것으로 사료된다.

## 요 약

*aleE* 증폭용 integration plasmid vector pEM103을 *EcoRI*로 절단하여 직쇄상의 7 kb fragment(*amyE-aleE-tmrB*-junction region)로 *B. subtilis* APT119를 형질전환시켰다.  $\text{Tm}^r$   $\text{Amy}^+$   $\text{AleE}^+$ 를 나타내는 두 균주를 Tf-1, Tf-2로 명명하고 Tf-1, Tf-2의 두 균주로부터 염색체 DNA를 조제하여 *EcoRI*으로 절단 후, agarose 전기 영동한 결과 친주에 비하여 8.3 kb와 2.3 kb의 증폭된 band가 검출되었다. *aleE*, *tmrB* probe로 Southern hybridization 분석을 한 결과 증폭된 band (8.3 kb)에 hybridize하였다. 증폭 단위는 10.6 kb(8.3 kb+2.3 kb)로 예상한대로 *amyE*, *tmrB* 사이에 *aleE*가 삽입된 상태로 25 copy 증폭이 일어났다.  $\text{Tm}^r$   $\text{Amy}^+$   $\text{AleE}^+$  균주를 약제의 選擇壓이 없는 배지에서 480세대 배양한 결과 protease 활성은 떨어지지 않고 안정하였다. 그러나 plasmid(pEX301)는 초기의 것에 비하여 활성이 약해져 불안정하였다.

## 참고문헌

1. Makino, O., T. Sato, T. Shibata, and T. Ando.

1986. Large scale production of a polypeptide by the recombinant DNA technique: a strain with the gene for a polypeptide on a multicopy plasmid and a strain with the gene on the chromosome. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 501-504.
2. Van der Laan, J.C., G. Gerritse, L.J. Mulleners, R.A. Van der Hoek, and W.J. Quax. 1991. Cloning, characterization, and multiple chromosomal integration of a *Bacillus* alkaline protease gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 901-909.
  3. Hashiguchi, K., A. Tanimoto, S. Nomura, S. Yamane, K. Yoda, S. Harada, M. Mori, T. Furusato, A. Takatsuki, M. Yamasaki, and G. Tamura. 1986. Amplification of *amyE-TmrB* region on the chromosome in tunicamycin-resistant cells of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 36-43.
  4. Jenniere, L., B. Niaudet, E. Pierre, and S.D. Ehrlich. 1985. Stable gene amplification in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Gene* **40**: 47-55.
  5. Sargent, M.G. and M.F. Bennett. 1985. Amplification of a major membrane-bound DNA sequence of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **161**: 589-595.
  6. Albertini, A.M. and J. Cullum. 1984. Amplification of a chromosomal region in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **162**: 1203-1211.
  7. Mori, M., A. Tanimoto, K. Yoda, S. Harada, N. Koyama, K. Hashikuchi, M. Obitana, M. Yamasaki, and G. Tamura. 1986. Essential structure in the cloned transforming DNA that induces gene amplification of the *Bacillus subtilis amyE-tmrB* region. *J. Bacteriol.* **166**: 787-794.
  8. Mori, M., K. Hashikuchi, K. Yoda, and M. Yamasaki. 1988. Designed gene amplification on the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Gener. Microbiol.* **134**: 85-95.
  9. Kaneko, R., N. Koyama, Y.C. Tsai, R.Y. Juang, K. Yoda, and M. Yamasaki. 1989. Molecular cloning of the structural gene for alkaline elastase YaB, a new subtilisin produced by an alkalophilic *Bacillus* strain. *J. Bacteriol.* **171**: 5232-5236.
  10. Takagi, H., S. Arafuka, M. Inouye, and M. Yamasaki. 1992. The effect of amino acid deletion in subtilisin E, based on structural comparison with a microbial alkaline elastase specificity and catalysis. *J. Biochem.* **111**: 584-588.
  11. Tsai, Y.-C., M. Yamasaki, Y. Yamamoto-Suzuki, and G. Tamura. 1983. A new alkaline elastase of an alkalophilic *Bacillus*. *Biochem. Int.* **7**: 577-583.
  12. Kawamura, F., and R.H. Doi. 1884. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
  13. Kim, B.M. 1992. PhD. Thesis, The University of Tokyo. Studies on the alkaline elastase of alkalophilic *Bacillus* sp. Ya-B.
  14. Hass, M. and H. Yoshikawa. 1969. Defective bacteriophage PBSH in *Bacillus subtilis*. 2. Intracellular development of the induced prophage. *J. Virol.* **3**: 248-260.
  15. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
  16. Bron, S. and E. Luxen. 1985. Segregational instability of pUB110 derived recombinants in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **14**: 234-244.
  17. Harington, A., T.G. Watson, M.E. Louw, J.E. Rodel, and J.A. Thomson. 1988. Stability during fermentation of a recombinant  $\alpha$ -amylase plasmid in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 521-527.
  18. Lopez, P., M. Espinoza, B. Greenberg, and S.A. Lacks. 1984. Generation of deletions in pneumococcal mal genes cloned in *Bacillus*. *Proc. Natl. Sci. USA* **81**: 5189-5193.
  19. Primrose, S.B. and S.D. Ehrlich. 1981. Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. *Plasmid* **6**: 193-200.

(Received 20 April 1995)