

대장균과 *Serratia marcescens*에서 *Serratia marcescens* Metalloprotease(SMP) 유전자의 발현

김기석 · 정재연 · 박군식 · 김태운¹ · 변시명² · 신용철*
경상대학교 미생물학과, ¹지산전문대학 임상병리과, ²한국과학기술원 생명과학과

Expression of *Serratia marcescens* Metalloprotease (SMP) Gene in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*

Ki-Seok Kim, Jae-Yeon Jung, Kun-Sik Park, Tae Un Kim¹,
Si Myung Byun² and Yong Chul Shin*

Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701

¹Department of Clinical Pathology, Jisan Junior College, Pusan 609-757

²Department of life Science, KAIST, Daejeon 305-701

Abstract — To investigate high-level expression of *Serratia marcescens* metalloprotease (SMP) in *Escherichia coli* and *S. marcescens*, we constructed various recombinant plasmids: pSP2, containing SMP gene and *lac* promoter; pKSP2, containing SMP gene and *tac* promoter; pTSP2, containing SMP gene, *trc99a* promoter, and *lacI*^q. The recombinant *E. coli* (pKSP2) strain expressed SMP to a high-level, about 36% of total cellular proteins but accumulated inactive SMP precursors intracellularly, which indicated that *E. coli* does not have activation and secretion system for SMP. To overproduce active SMP, we transformed *S. marcescens* with the recombinant plasmids by a modified CaCl₂ method. The recombinant *S. marcescens* ATCC27117 (pSP2) containing *lac* promoter for SMP transcription produced 530 U/ml of active SMP on LB broth, which is about 5.1 times of the SMP yield, 105 U/ml of a control strain, *S. marcescens* ATCC27117 (pUC19). However, *S. marcescens* ATCC27117 (pKSP2) containing *tac* promoter for SMP transcription did not grow healthy and hardly produced SMP. To overcome a harmful effect of the strong *tac* promoter, we constructed a regulatory plasmid pTSP2 containing a strong *trc99a* promoter and its repressor gene *lacI*^q. When *S. marcescens* ATCC27117 (pTSP2) was induced with 1.0 mM IPTG after 9 hr cultivation, 2,200 U/ml of SMP was obtained in LB broth, which is about 21 times of that of a control strain.

*Serratia marcescens*는 당이용성이 뛰어나 간단한 배지에서 빨리 성장하며 높은 균체수율을 보이기 때문에 대사산물의 발효생산에 적합한 균주로 평가받고 있다. *S. marcescens*는 1960년 이래로 일본의 Tanabe Seiyaku Co.에 의해서 여러가지 L-아미노산 생산균주로서 개발되어 왔으며(1-4), 최근에는 biotin 생산균주로서 개발이 진행되고 있다(5, 6). 또한 *S. marcescens*가 세포외로 분비하는 단백질 분해 효소로서 serine protease(SSP)(7), minor metalloprotease(8) 및 major metalloprotease(SMP)(9, 10)가 알려져 있는데, 그 중에서 SMP는 1970년경 일본 Takeda Chemical Co.에

의해서 소염제로 개발되어 현재 널리 사용되고 있다(11).

본 연구자들은 지난 몇년간 유전자조작에 의한 SMP 생산성 제고에 관한 기초연구를 수행하여 왔다(12, 13). 비교적 최근에 일본의 Nakahama 등(14)이 SMP 유전자를 처음으로 클로닝하였고 뒤이어 본 연구자들(13)과 프랑스의 Letoffe 등(15), 미국의 Braunagel 등(16)이 SMP 유전자를 클로닝하였다. 그러나 지금까지 SMP에 관한 연구는 대부분 세포외 분비기작에 관한 연구이며(7, 9, 15, 17-19), SMP 과잉생산에 관한 연구는 전혀 보고된 바가 없었다. 또한 SMP는 단백질 분해효소임에도 불구하고 자가분해되지 않으므로(12) 재조합 플라스미드에 의해서 과잉생산되더라도 분해되지 않고 세포외 배지중에 축적될

Key words: *Serratia marcescens*, metalloprotease, recombinant plasmids, overproduction.

*Corresponding author

것으로 기대된다. 이러한 연구배경에서 본 논문에서는 SMP 유전자를 대장균과 *S. marcescens*에 도입하여 과잉생산 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

시약 및 효소류

제한효소, T4 DNA ligase, calf intestinal alkaline phosphatase(CIP), Klenow fragment와 같은 DNA 변형효소 및 pTrc99A 발현벡터, pUC19 DNA는 New England Biolabs(Beverly, Mass., USA) 혹은 Pharmacia(Uppsala, Sweden)에서 구입하여 사용하였다. IPTG, ampicillin, azocasein 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louise, Mo., USA)에서 구입하여 사용하였다. 그외 기타 시약류는 일급 이상의 시약을 사용하였다.

사용균주, 플라스미드 및 배양조건

Metalloprotease(SMP) 유전자의 공여균주로는 *S. marcescens* ATCC21074를 사용하였고, 형질전환을 위한 숙주세포로는 *E. coli* JM109(*recA1 supE44 endA 1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB) F'[traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15]*), *S. marcescens* ATCC21074 및 *S. marcescens* ATCC27117을 사용하였다. 그리고 클로닝 및 발현벡터로서 pUC19, pKK223-3, pTrc99A를 사용하였다. 대장균은 37°C에서, *S. marcescens*는 30°C에서 배양하였으며 항생물질은 필요에 따라 ampicillin을 대장균은 50 µg/ml, *S. marcescens* ATCC27117의 경우는 200 µg/ml, *S. marcescens* ATCC21074의 경우는 1 mg/ml의 농도로 첨가하였다.

DNA 조작

SMP 발현 및 생산을 위해서 Fig. 1과 같은 재조합 플라스미드를 제조하였다. 재조합 플라스미드 pSP2는 pUC19 플라스미드의 HindIII 자리에 4.0 kb SMP

유전자 절편이 들어 있으며 SMP의 promoter 대신에 *lac* promoter를 가지고 있다. 고발현벡터를 제조하기 위해 pSP2로부터 HindIII로 절단한 4.0 kb SMP 유전자 절편을 HindIII로 절단한 pKK223-3에 T4 DNA ligase로 연결시켜 pKSP2를 제조하였고, pSP2로부터 HindIII로 절단한 4.0 kb SMP 유전자 절편을 Klenow fragment와 dNTP를 사용하여 채워 준 다음 SmaI로 절단한 pTrc99A에 T4 DNA ligase로 연결시켜 pTSP2를 제조하였다. pKSP2는 SMP 전사를 위해 *tac* promoter를 가지고 있고, pTSP2는 *trc99a* promoter와 이것을 억제할 수 있는 *lacI^q* 조절유전자를 가지고 있다. 대장균으로부터 소량의 플라스미드 분리는 rapid alkaline lysis 법을 이용하였고, 다량의 플라스미드 분리는 multiple precipitation 방법을 이용하였다(20). 그리고 *S. marcescens*로부터 플라스미드 분리는 대장균에서와 같이 rapid alkaline lysis 방법을 따라 분리하였으며 다만 nuclease 제거를 위해 세포를 한번 세척한 후 75°C에서 5분간 열처리하였고, phenol 추출을 3회 실시하였다. 기타의 방법은 Sambrook 등의 실험서(20)에 따라 실시하였다.

형질전환(Transformation)

재조합 플라스미드를 이용한 대장균의 형질전환은 Hanahan의 CaCl₂ 방법(21)을 사용하였다. *S. marcescens*는 CaCl₂ 방법에 따라서 형질전환을 수행하였는데, 다만 *S. marcescens*를 600 nm에서 흡광도가 약 0.4 값이 될 때까지 37°C에서 배양한 다음 원심분리하여 세포들을 회수하고 200 mM CaCl₂로 2회 세척한 후 다시 200 mM CaCl₂로 현탁하여 competent cell을 만들어 사용하였다. *S. marcescens* 형질전환체(transformant)는 ATCC27117의 경우 ampicillin이 200 µg/ml, ATCC21074의 경우 1 mg/ml 들어있는 LB 한천배지를 이용하여 선별하였다.

세포분획

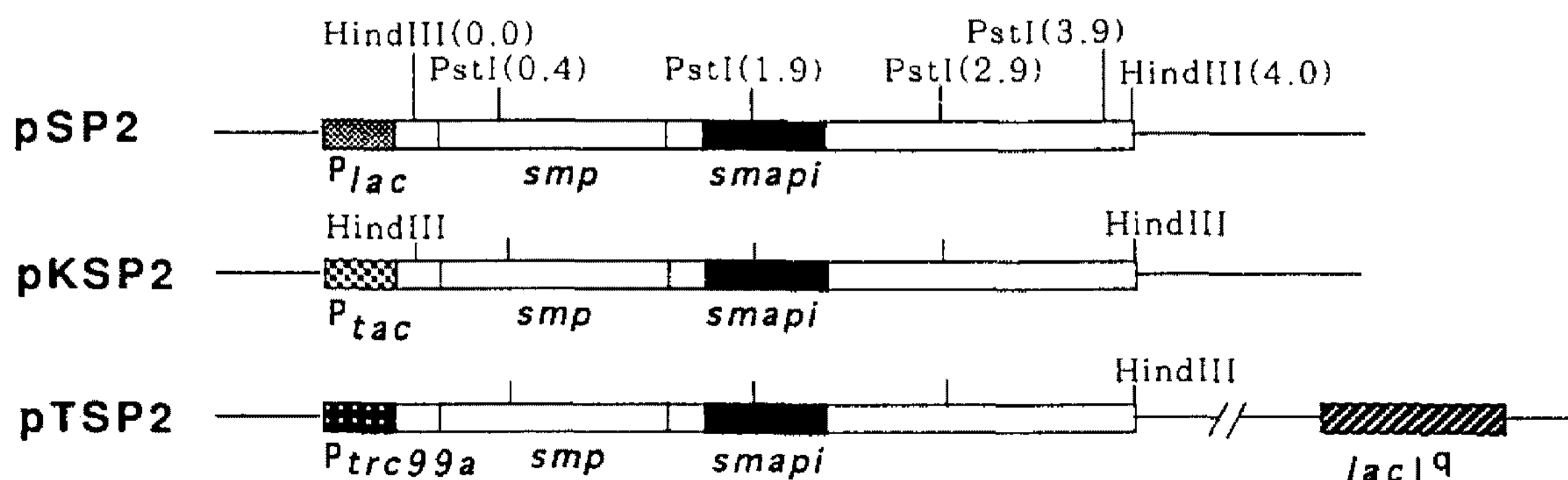


Fig. 1. Recombinant plasmids constructed for high-level expression of SMP in *E. coli* and *S. marcescens*.

세포분획은 Cornelis 등(22)의 방법에 따라 수행하였다. 대장균 혹은 *S. marcescens*를 LB 배지에서 흡광도(600 nm)가 1.0 값이 될 때까지 배양한 후 6,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 세포의 분획으로 하였다. 원심분리하여 회수한 세포를 25% sucrose가 든 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 두번 세척한 후 침전된 세포를 ice-cold water로 현탁시켜 얼음속에서 10분간 약하게 흔들었다. 다음에 10,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 모아 periplasm 분획으로 하였다. 남은 세포를 초음파 분쇄기로 파쇄시킨 후 10,000 ×g에서 20분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 세포내 분획으로 하였다. 세포내 분획을 100,000 ×g에서 30분간 원심분리하여 침전된 것을 sonication-insoluble 분획으로, 상등액을 sonication-soluble 분획으로 하였다.

SMP의 활성측정

SMP의 활성은 이미 보고한 Kim 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 간단히 나타내면, azocasein을 기질로 사용하여 반응결과 생성되는 적색색소의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다. SMP 활성도는 분당 흡광도 0.01 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

전기영동 및 Western blot

SDS-PAGE는 Laemmli(23)의 방법에 따라 12% gel을 사용하여 전기영동하였고, 0.125% Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하여 단백질 band를 확인하였다. Western blot은 이전에 보고한 Kim 등(13)의 방법에 따라 수행하였다. 간단히 나타내면, SDS-PAGE(12% gel) 후 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮기고, 토끼에서 뽑은 SMP antiserum과 horse radish peroxidase-labelled goat anti-rabbit IgG antiserum(Bio-Rad)을 이용하여 SMP를 확인하였다. 발색용액으로서 4-chloro-1-naphthol 0.03%(w/v)를 에탄올에 녹인 것 20 ml, 30% H₂O₂ 용액 36 μl, 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.6) 100 ml과 함께 섞어 사용하였다.

투사 전자현미경

16시간 키운 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 다음 멸균 증류수로 세척하고 균체를 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide(OsO₄)로 고정한 후 phosphate 완충액(pH 7.3)으로 세척하였다. 균체를 ethanol과 acetone으로 탈수시킨 다음, Epon resin에 embedding하여 LKB-ultratome으로 절단하여 Hitachi H-600 전자현미경으로 관찰하였다.

chi H-600 전자현미경으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

SMP 유전자의 대장균에서의 발현

SMP 유전자 절편에서 자신의 promoter 대신에 *tac* promoter를 가진 pKSP2 재조합 플라스미드를 실험에 사용하였다(Fig. 1). *E. coli* JM109(pKSP2)를 LB 배지에서 흡광도 600 nm에서 1.0 값이 될 때까지 배양한 다음 1 mM IPTG를 첨가하여 SMP의 발현을 유도하고 세포내, 외의 SMP 활성과 단백질 패턴을 SDS-PAGE로 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 세포내 단백질 중에서 분자량 52,000 Da 정도의 단백질이 IPTG에 의해서 유도되는 것을 SDS-PAGE gel 상에서 확인할 수 있었다. IPTG에 의해서 유도된 단백질은 *S. marcescens*에서 순수분리한 SMP보다 다소 분자량이 커서 Nakahama 등(14)이 예측한 SMP 전구체로 생각되었다. *tac* promoter에 의해서 과잉발현된 SMP 전구체를 densitometer(Pharmacia-LKB, Ultrosan XL, Sweden)로 분석한 결과 세포내 총 단백질의 36%를 차지하였다. 그러나 20배 농축된 세포내, 외의 분획에서 SMP 활성을 전혀 측정할 수 없었다. 세포밖 배지중에서 SMP 전구체가 SDS-PAGE gel 상에서 거의 발견되지 않았다. 이상의 결과에서 대장균에서 SMP 유전자를 과잉발현시키더라도 전혀 활성화되지 못하고 전구체 형태로 존재한다는 것을 알 수 있었다. 대장균내에서 SMP 전구체의 위치를 알아보기 위해서 *E. coli* JM109(pKSP2) 세포를

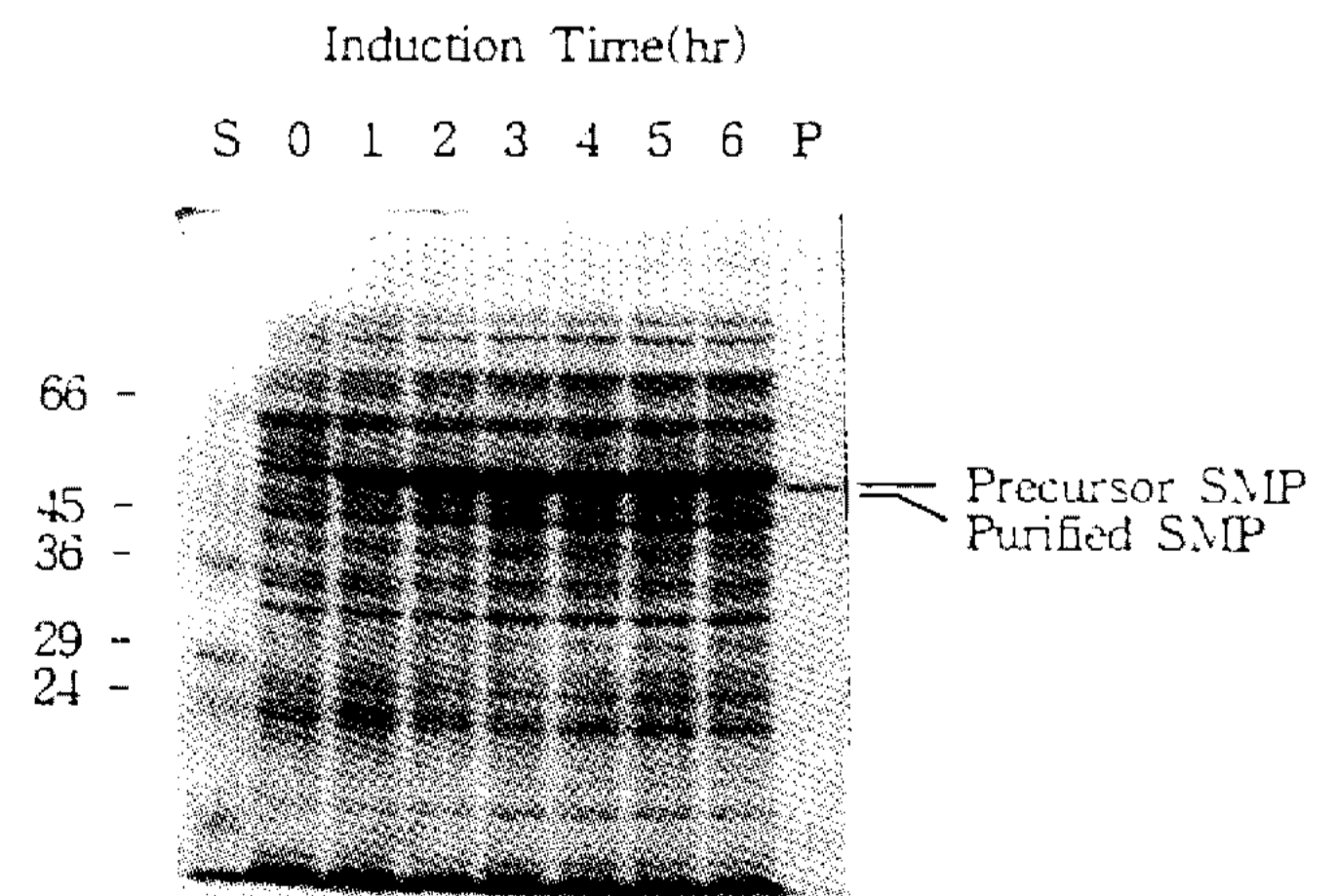


Fig. 2. Induction of SMP precursor from *E. coli* JM109 (pKSP2) with 1.0 mM IPTG. *E. coli* JM109 (pKSP2) was cultivated overnight and final 1.0 mM IPTG was added to culture broth. S and P represents the standard marker proteins (in kilodaltons) and the purified SMP from *S. marcescens*, respectively.

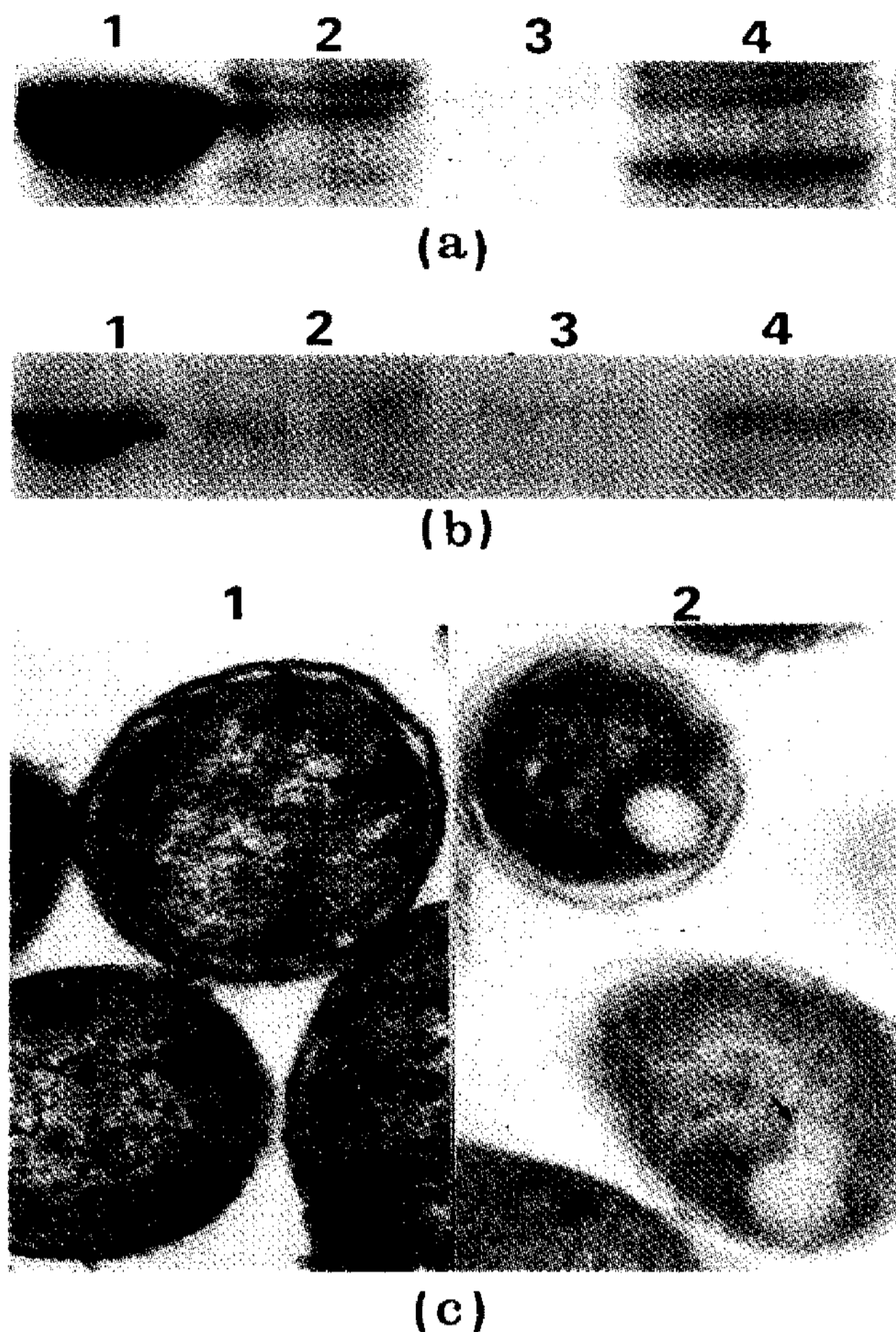


Fig. 3. Localization of SMP precursors in *E. coli* JM 109 (pKSP2). *E. coli* JM109 (pKSP2) was cultivated with 1.0 mM IPTG and cellular fractionation was carried out according to Materials and Methods.

(a) SDS-PAGE gel was visualized with Coomassie brilliant blue staining. (b) SDS-PAGE gel was immunoblotted with SMP anti-serum. Lanes: 1, sonication-insoluble precipitate of cells; 2, sonication-soluble precipitate of cells; 3, periplasmic protein of cells; 4, extracellular proteins. (c) *E. coli* JM109 (1) and *E. coli* JM109 (pKSP2) (2) cells were observed with a transmission electron microscope (TEM). Arrows indicate inclusion body of SMP precursors.

세포질, inclusion body, periplasm, 세포외 분획으로 나누어 SDS-PAGE와 immunoblot 방법으로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대부분의 SMP 전구체가 세포내에 inclusion body 형태로 존재하였으며, 세포질과 세포외에 soluble 형태로 아주 소량 존재하였다. SMP 전구체로 만들어진 세포내 inclusion body의 존재를 투사 전자현미경으로 확인할 수 있었다. 결론적으로 *S. marcescens*의 주된 세포외 단백질 분해 효소인 SMP는 대장균에서 활성화되지 못하고 전구체 형태로 세포질내에 축적된다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 대장균의 경우 SMP의

분비와 활성화에 필요한 system을 가지고 있지 않다는 것을 시사하였다. 우리는 대장균에서 발현된 SMP 전구체를 *in vitro*에서 활성화시켜 보고자 *S. marcescens*의 세포질 분획, periplasm 분획, 세포외 분획, cell extract 및 순수분리한 SMP를 처리하였으나 SMP 전구체를 활성화시킬 수 없었다. 이러한 결과로부터 SMP 전구체는 *S. marcescens* 세포의 정교한 활성화기구에 의해서 활성화되어 분비되는 것으로 추측되었다.

*S. marcescens*로의 플라스미드 DNA 도입

*S. marcescens*는 세포외로 nuclease를 분비하며 (24, 25), SmaI 제한효소를 가지고 있고, 또한 항생제 저항성이 비교적 높은 것으로(26) 보고되었다. 따라서 플라스미드 DNA를 *S. marcescens*로 효율적으로 도입하기 위해서는 위와 같은 문제를 고려하여 대장균과는 다른 새로운 방법이 필요하였다. 본 연구에서는 *S. marcescens* ATCC27117 균주를 이용하여 pUC19와 pKK223-3 플라스미드의 도입조건을 검토하였다. ATCC27117 균주의 경우 Shortle(27)의 방법에 따라 nuclease 활성을 조사해 본 결과 nuclease를 세포외로 분비하였으며 LB broth에서 50 µg/ml의 ampicillin에 저항성이 있음을 알 수 있었다. pUC19 플라스미드 DNA의 SmaI site를 HpaII methylase로 처리하여 메틸화시킨 후 형질전환시킨 결과 methylase 처리 유무에 상관없이 형질전환수율은 거의 차이가 없었다. 또한 *S. marcescens* 형질전환체로부터 분리한 pUC19는 SmaI 제한효소에 의해 쉽게 절단되는 것으로 보아 *S. marcescens* ATCC27117 균주의 경우 SmaI 제한효소를 가지고 있지 않는 것으로 판단되었다. Reid 등(26)은 nuclease 분해를 극복하기 위해서 competent cell 제조시 65°C에서 1분간 가열하였는데 본 연구의 결과에 의하면 이러한 열처리 방법은 형질전환수율을 오히려 감소시키는 효과를 주었다. 본 연구자들의 결과에 의하면 *S. marcescens* nuclease를 65°C에서 5분간 가열하여도 80% 이상의 효소활성이 남아 있어 비교적 열에 안정하였다(28). 따라서 세포의 열처리 방법은 효과적이지 못한 것으로 판단되었다. 대장균과 동일한 CaCl₂ 방법(21)을 기본으로 하여 *S. marcescens* 형질전환조건을 검토하여 보았다. 일반적으로 *S. marcescens*는 30°C가 생육적으로 알려져 있는데 Table 1에서 보는 바와 같이 동일한 균체성장 (Abs. 600 nm = 0.4~0.42) 하에서 30°C에서 최저의 형질전환 수율을 보였고 37°C에서 최대의 수율을 보였다. ATCC27117 균주의 균체 성장에 따른 형질전환 수율을 비교해 본 결과(Table 2) 균체성장이 낮을 때

Table 1. Effect of culture temperature on the transformation efficiency of *S. marcescens* ATCC27117

Culture temperature (°C)	Transformation efficiency (transformants/ μ g pUC19)
25	1.1×10^4
30	3.2×10^3
37	3.8×10^4

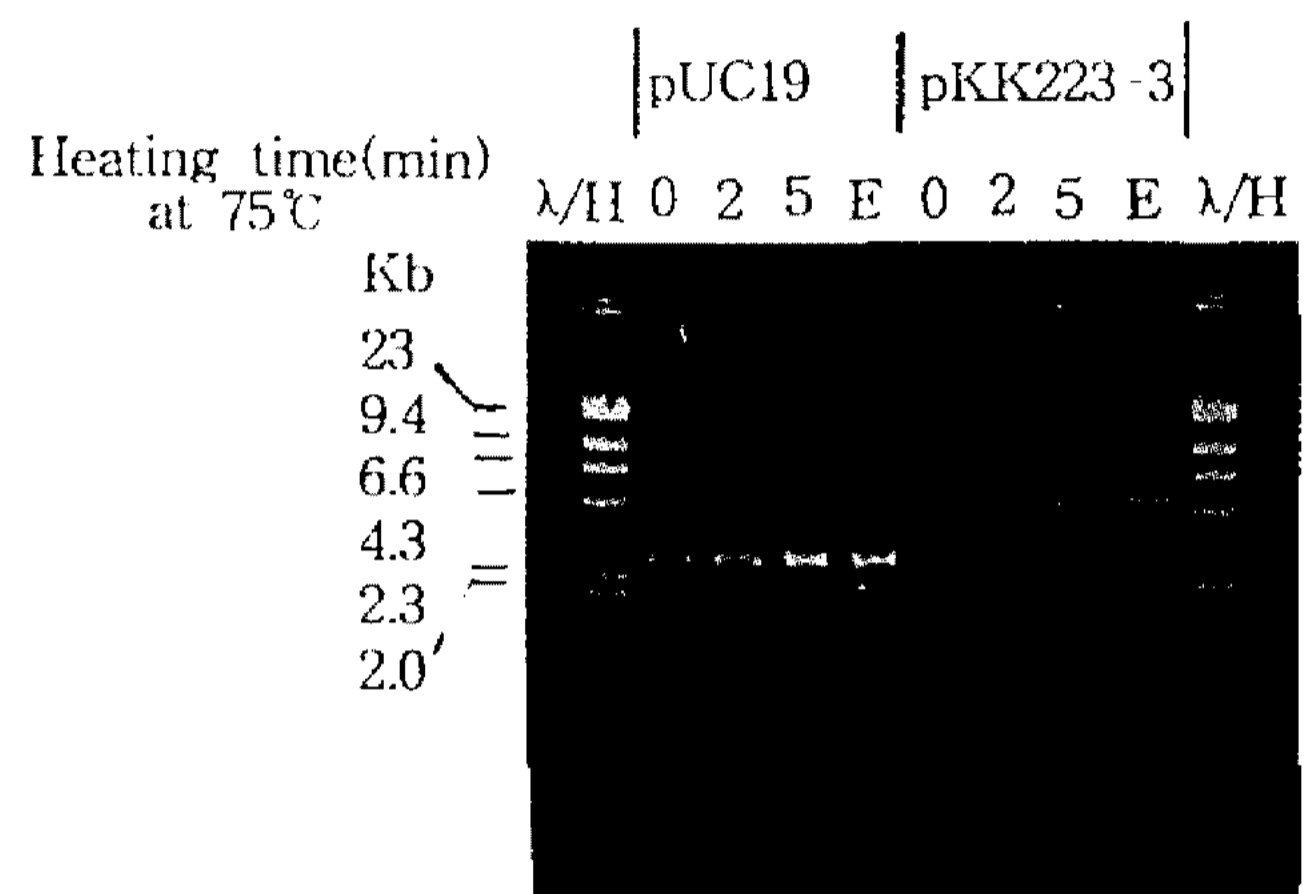
Table 2. Effect of cell growth on the transformation efficiency of *S. marcescens* ATCC27117

Cell growth (Abs. 600 nm)	Transformation efficiency (transformants/ μ g pUC19)
0.23	1.93×10^4
0.46	3.88×10^4
0.74	4.93×10^3
1.07	8.75×10^2

(Abs. 600 nm = 0.245~0.460) 약 $1.9 \times 10^4 \sim 3.9 \times 10^4$ transformants/ μ g pUC19의 비교적 높은 형질전환 수율을 얻을 수 있었으며 그 이상의 균체성장에서는 형질전환 수율이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다. Competent cell 제조시 CaCl_2 농도가 형질전환 수율에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 3) 200 mM CaCl_2 농도에서 최대의 수율을 보였다. 이상의 결과로부터 우리는 순수분리된 pUC19 플라스미드를 이용하여 약 $3.5 \sim 3.9 \times 10^4$ transformants/ μ g pUC19의 형질전환 수율을 얻을 수 있었다. 위의 결과는 대장균에서 분리한 플라스미드 DNA의 형질전환 수율을 나타낸 것이다. 그러나 *S. marcescens* transformants로부터 분리한 플라스미드 DNA(pUC19, pKK223-3, pSP2, pTSP2)를 사용하는 경우 대장균에서 분리한 DNA보다 $10^1 \sim 10^4$ 높은 *S. marcescens* 형질전환 수율을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 *S. marcescens*에 SmaI 제한효소 이외의 다른 제한효소와 modification enzyme이 존재하기 때문인 것으로 생각되었다. 앞으로 돌연변이 방법으로 *S. marcescens*의 제한효소를 없애므로써 더 높은 형질전환 수율을 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 지금까지 보고된 연구결과를 살펴보면 Takagi와 Kisumi(29)는 nuclease-deficient mutant를 이용하여 1.4×10^4 transformants/ μ g pACYC177 효율을 얻을 수 있었으며, Takata와 Aoyagi(30)는 돌연변이주를 이용하여 $5.2 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^5$ transforma-

Table 3. Effect of CaCl_2 concentration on the transformation efficiency of *S. marcescens* ATCC27117

CaCl_2 Concentration (mM)	Transformation efficiency (transformants/ μ g pUC19)
10	5.00×10^2
30	1.35×10^3
50	3.65×10^3
100	2.80×10^4
200	3.50×10^4
300	6.30×10^3

**Fig. 4. Effect of heat treatment on the rapid isolation of plasmid DNAs from *S. marcescens* ATCC27117 transformants. Cells were heated at 75°C for 0, 2, and 5 min and followed the alkaline lysis method. E represents the plasmid DNAs isolated from *E. coli* by the alkaline lysis method without heat-treatment.**

nts/ μ g pBR322의 효율을 얻을 수 있었다고 보고하였다. *S. marcescens* 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 rapid isolation 하였을 때 Fig.4와 같은 결과를 얻었다. *S. marcescens*의 경우 nuclease를 분비하기 때문에 균체를 회수한 다음 가열처리하지 않는 경우 플라스미드 DNA를 거의 분리할 수 없으며 75°C에서 5분 가열처리하는 경우 대장균과 비슷한 수준의 플라스미드 DNA를 분리할 수 있었다. pUC19와 pKK223-3 플라스미드에 대해서 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 분리되는 플라스미드 양이 *S. marcescens*와 대장균에서 서로 비슷한 것으로 보아 *S. marcescens*의 세포내 플라스미드 copy number가 대장균과 유사할 것으로 추측되었다. 이들 플라스미드 DNA를 함유한 *S. marcescens* ATCC27117 형질전환체를 200 μ g/ml ampicillin 농도하에서 배양하는 경우 배양시간에 따른 ampicillin 저항성을 조사한 결과 4일까지

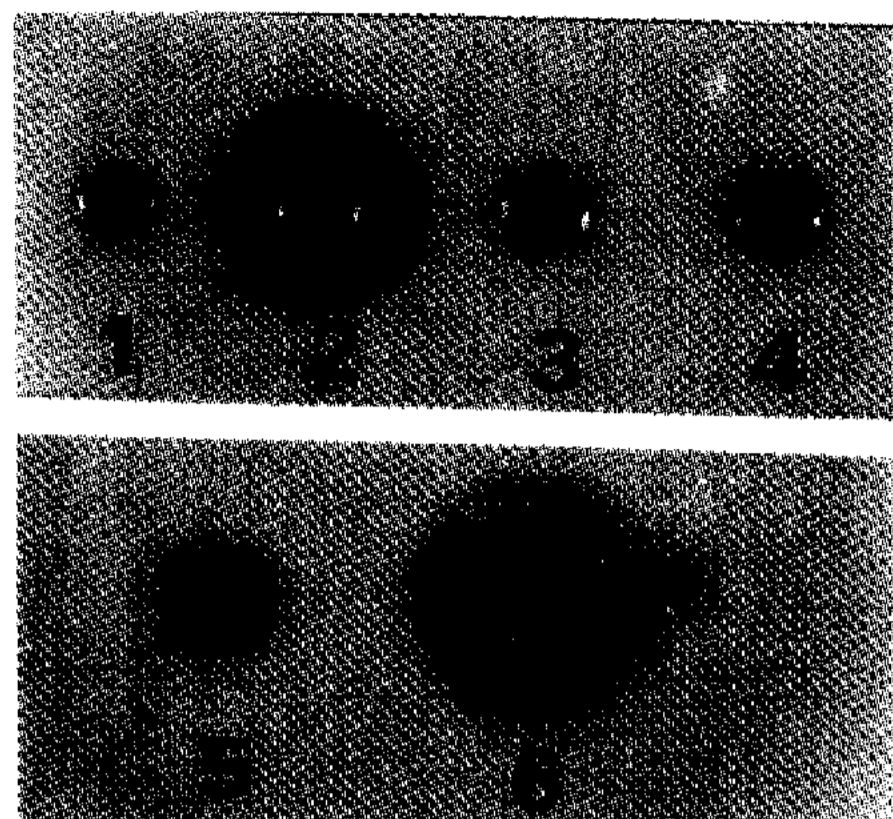


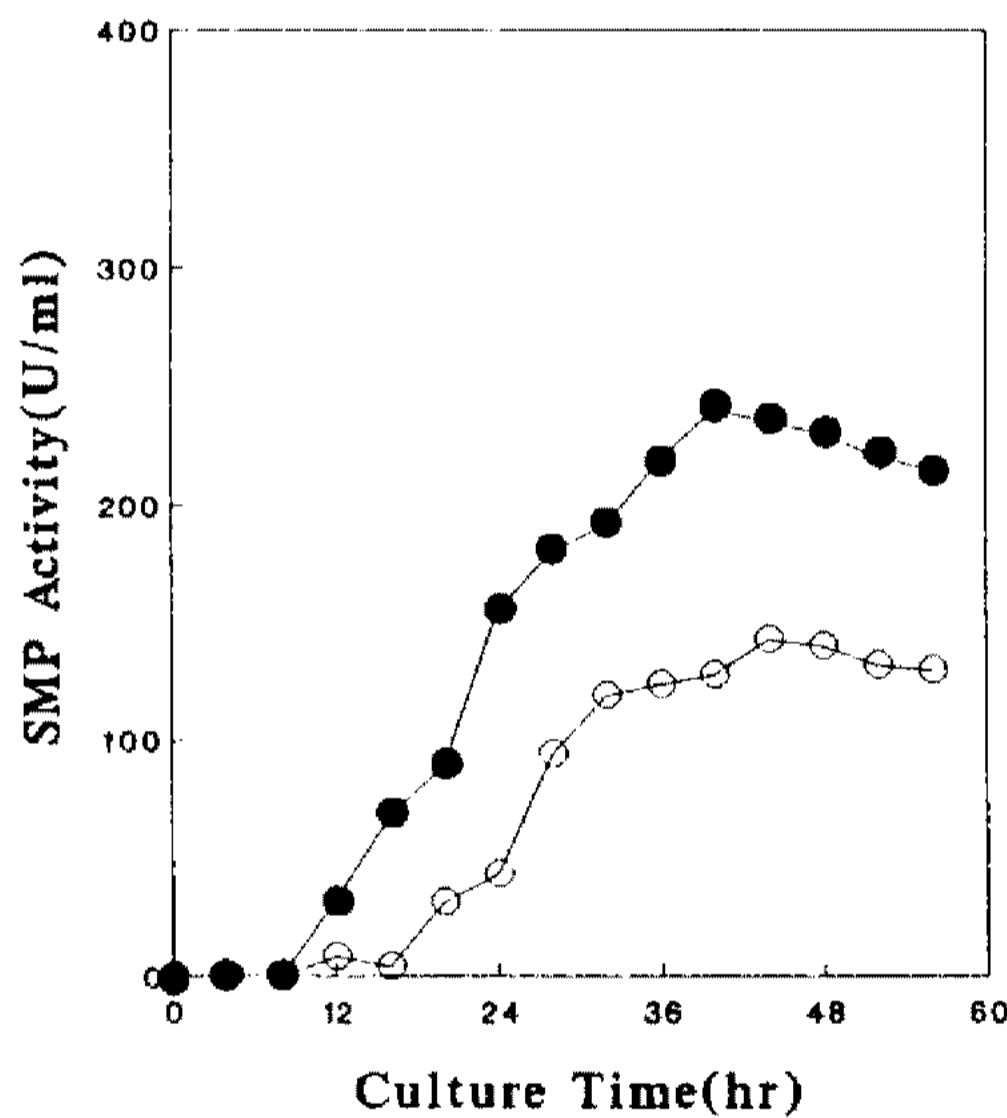
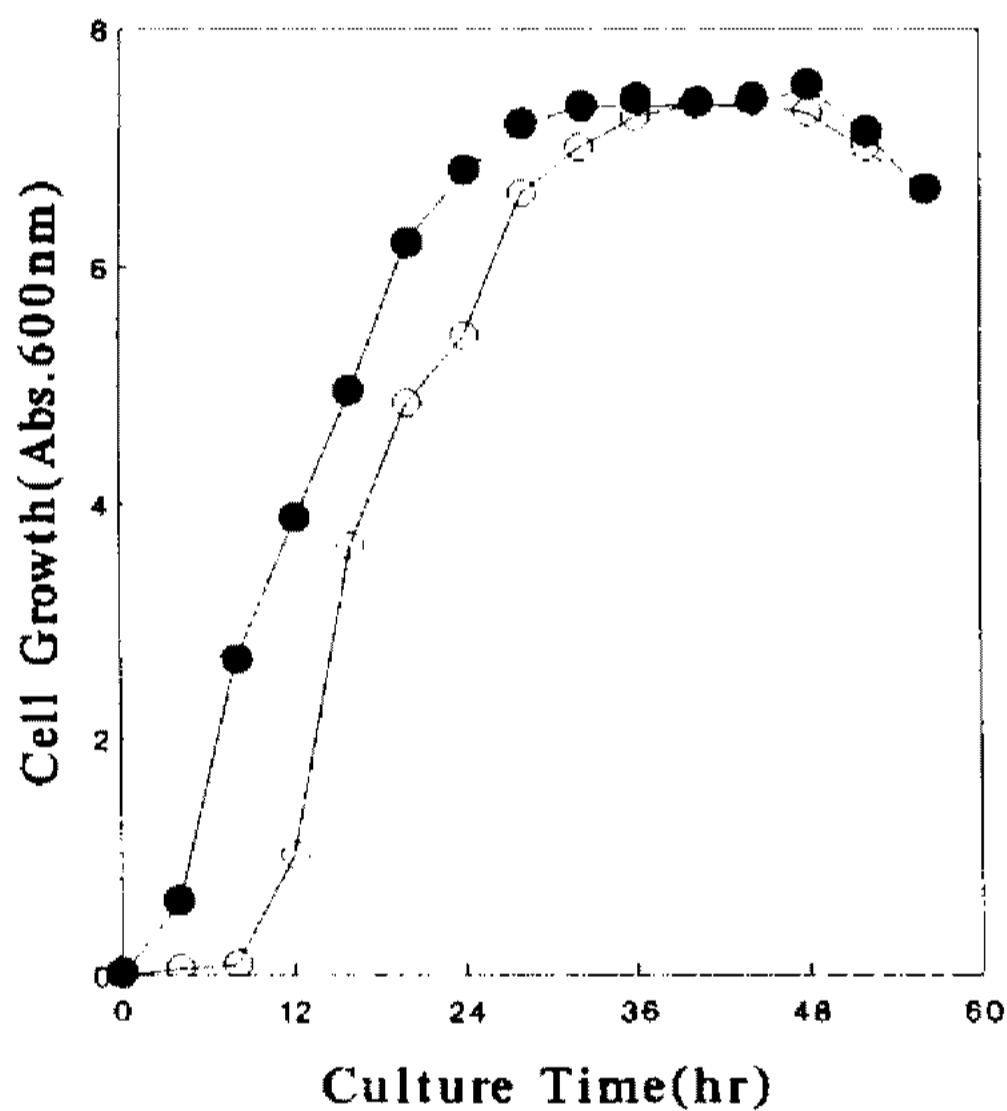
Fig. 5. Proteolytic activity of *S. marcescens* transformants on LB-skim milk agar plate.

1, *S. marcescens* (pUC19); 2, *S. marcescens* (pSP2); 3, *S. marcescens* (pKK223-3); 4, *S. marcescens* (pKSP2); 5, *S. marcescens* (pTrc99A); 6, *S. marcescens* (pTSP2).

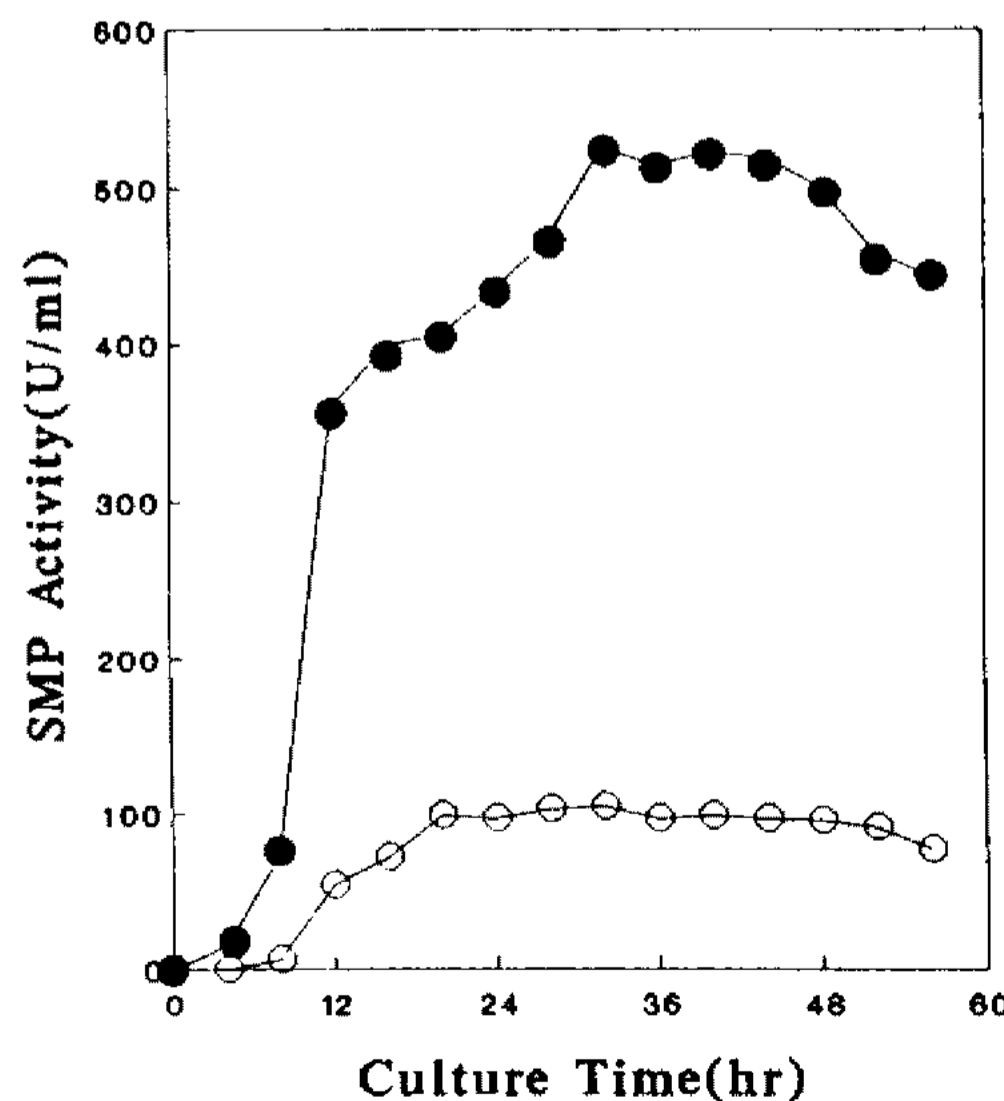
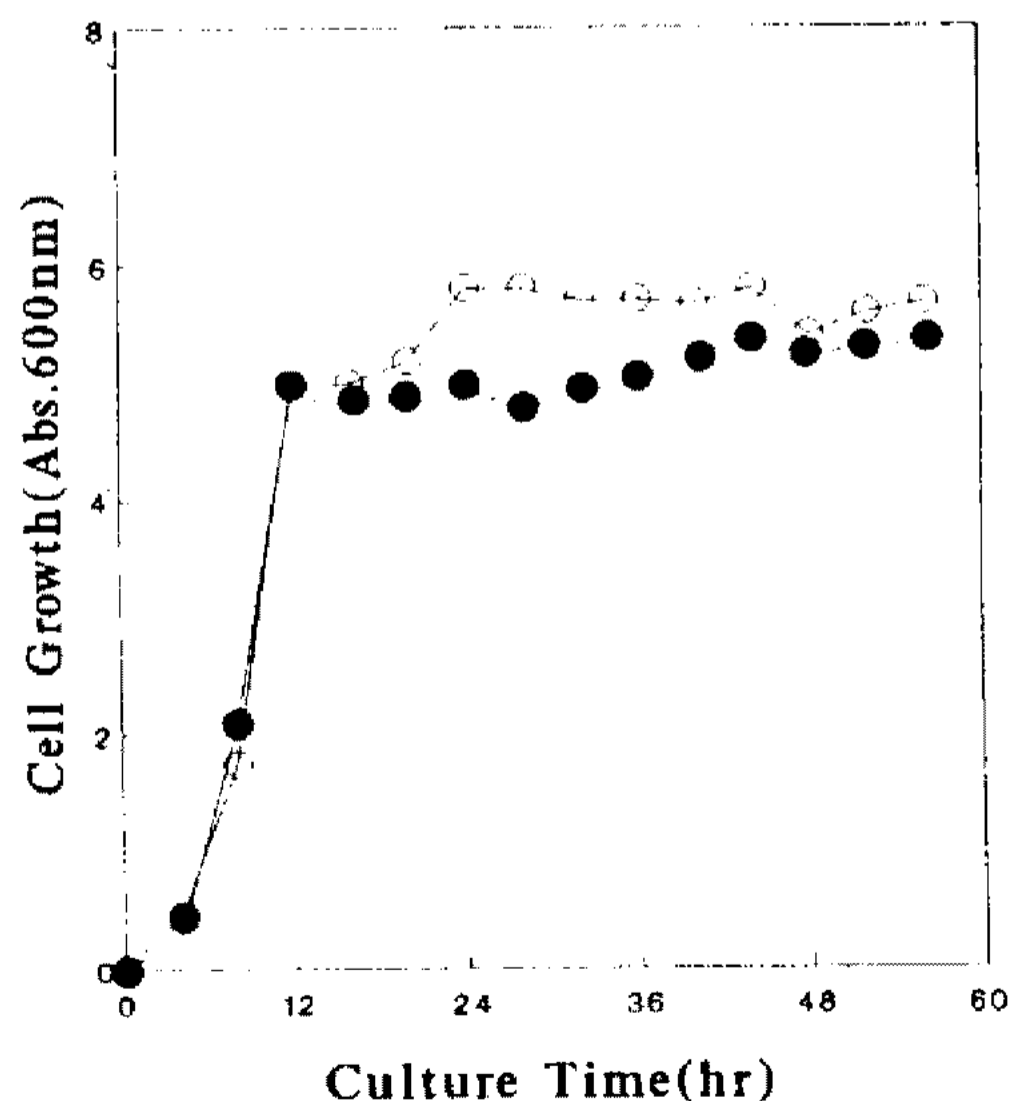
거의 100%가 200 µg/ml의 ampicillin 저항성을 나타내 플라스미드가 4일까지 안정하게 유지되는 것으로 생각되었다.

*S. marcescens*에서의 SMP 발현

재조합 플라스미드 pSP2, pKSP2 및 pTSP2를 *S. marcescens* ATCC27117로 형질전환시켜 skim milk 한천배지상에서 대조군주에 비해서 SMP 활성이 월등히 증가된 형질전환체를 선별할 수 있었다(Fig. 5). Fig. 6에서 보는 바와 같이 LB broth에서 재조합 *S. marcescens* ATCC27117(pSP2) 군주는 야생주와 거의 비슷한 균체성장을 나타내었지만 SMP 활성은 약 530 U/ml로서 야생주의 105 U/ml에 비해서 5.1배 정도 증가되었다. SMP 유전자 공여주였던 *S. marcescens*



(a)



(b)

Fig. 6. Cell growth and SMP production of *S. marcescens* ATCC21074 (a) and ATCC27117 (b) strains harboring pUC19 (○) and pSP2 (●) in LB broth.

Table 4. Effect of culture temperature on the production of SMP from the *S. marcescens* ATCC27117 (pSP2)^a

Culture temperature (°C)	Cell growth (Abs. 600 nm)	SMP activity (U/ml)
20	5.5	343
25	5.5	530
30	3.8	400
37	3.6	0

^aCells were grown in LB broth for 36 hr.

ATCC21074에 pSP2를 형질전환시켰을때 재조합 *S. marcescens* ATCC21074(pSP2) 균주의 균체성장은 야생주와 거의 동일하였으나 SMP 활성은 약 240 U/ml로 야생주의 143 U/ml에 비해서 1.7배 정도 증가된 결과를 보여주었다. SMP 유전자 공여주였던 ATCC 21074 균주의 경우 pSP2를 도입하였을 때 ATCC27117 균주에 비해 SMP 생산성이 떨어지는 것으로 나타났다. 재조합 *S. marcescens*에서 생산되는 SMP는 모두 세포외로 분비되었으며, 세포내에서는 전혀 축적되거나 SMP 활성이 나타나지 않았다. SMP 유전자 전사용으로 *lac* promoter를 가진 pSP2의 경우 *S. marcescens*(pSP2) 균주에서 SMP 유전자의 발현에 IPTG 유도 효과가 전혀 나타나지 않았다. 이러한 이유는 *S. marcescens*의 경우 *lac* operon을 가지고 있지 않아 *lac* promoter를 억제할 수 없기 때문인 것으로 해석되었다. 그러나 Fig. 6에서 보는 바와 같이 재조합 *S. marcescens*(pSP2)의 경우 세포성장 초기부터 SMP가 발현 생산되는 것이 아니라 어느 정도 균체성장이 지난 다음에 SMP의 생산이 증가되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 야생주 *S. marcescens* 경우의 SMP 생산패턴과 매우 유사하였다. *S. marcescens*(pSP2)의 경우 SMP가 constitutive 하게 세포성장과 일치하여 SMP가 생산되지 않고 야생균주와 유사하게 상당한 lag time이 있는 것은 숙주세포에서 SMP의 세포외 분비와 활성화에 필요한 system의 유도에 상당한 시간이 걸리기 때문인 것으로 생각되었다. *S. marcescens*(pSP2)의 경우 배양온도에 따라서 SMP의 생산성이 크게 영향을 받았다. Table 4에서 보는 바와 같이 균체성장은 20~25°C에서 최적이었으며 SMP 생산은 25°C에서 가장 높았다. 배양온도가 30°C 이상인 경우 SMP 생산성이 떨어졌으며 37°C인 경우 SMP는 전혀 생산되지 않았다. 본 연구자들의 결과에 의하면 SMP의 경우 열안정성이 낮아 37.5°C에서 변성되기 시작하여 endothermic peak가 43.2°C에서 나타났다

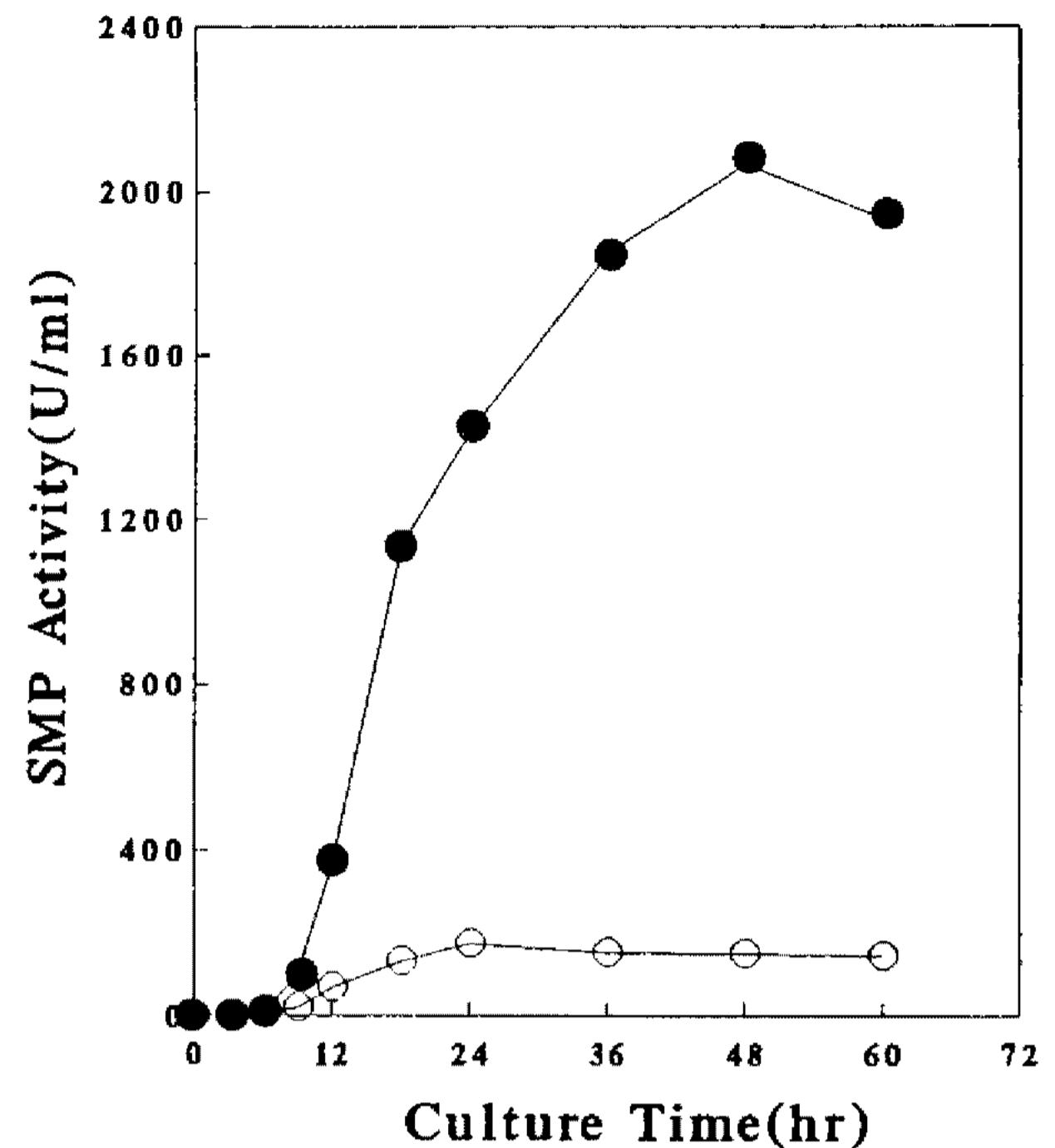


Fig. 7. SMP production from *S. marcescens* (pTSP2) in LB broth. SMP production from *S. marcescens* (pTSP2) was induced with 1.0 mM IPTG (●) after 9 hr cultivation. SMP production without IPTG induction is represented as open circle.

(12). 37°C에서 SMP가 전혀 생산되지 않은 것은 재조합 *S. marcescens*(pSP2)에서 생산된 SMP가 온도 안정성이 낮아 37°C 부근에서 분해되기 때문인 것으로 추측되었다. SMP의 생산성을 높이기 위해서 *tac* promoter를 가진 SMP 고발현 플라스미드인 pKSP2를 사용하였다. 그러나 pKSP2를 *S. marcescens*에 형질전환시키는 경우 형질전환수율이 매우 낮았으며, *S. marcescens*(pKSP2)의 경우 LB 액체배지에서 잘 자라지 못하였고 콜로니 색깔이 변하는 등 병든 세포의 증세를 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과는 *S. marcescens*(pKSP2)의 경우 강력한 *tac* promoter에 의해서 SMP가 조절없이 과잉생산되므로써 세포에 손상을 주기 때문인 것으로 생각되었다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 우리는 강력한 *trc99a* promoter와 이것의 조절유전자인 *lacI^q* 유전자를 가진 SMP 고발현 플라스미드 pTSP2를 제조하였다. pTSP2는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 IPTG에 의해서 SMP의 생산이 유도되었다. *S. marcescens*(pTSP2)의 경우 LB 배지에서 최고 2,200 U/ml의 SMP를 생산할 수 있었으며, 이것은 야생주의 105 U/ml에 비하여 21배 증가된 것이다. *S. marcescens*(pSP2)와 *S. marcescens*(pTSP2) 배양액을 SDS-PAGE로 분석한 결과 Fig. 8과 같은 결과를 얻었다. 세포밖 배지중에 SMP가 주된 단백

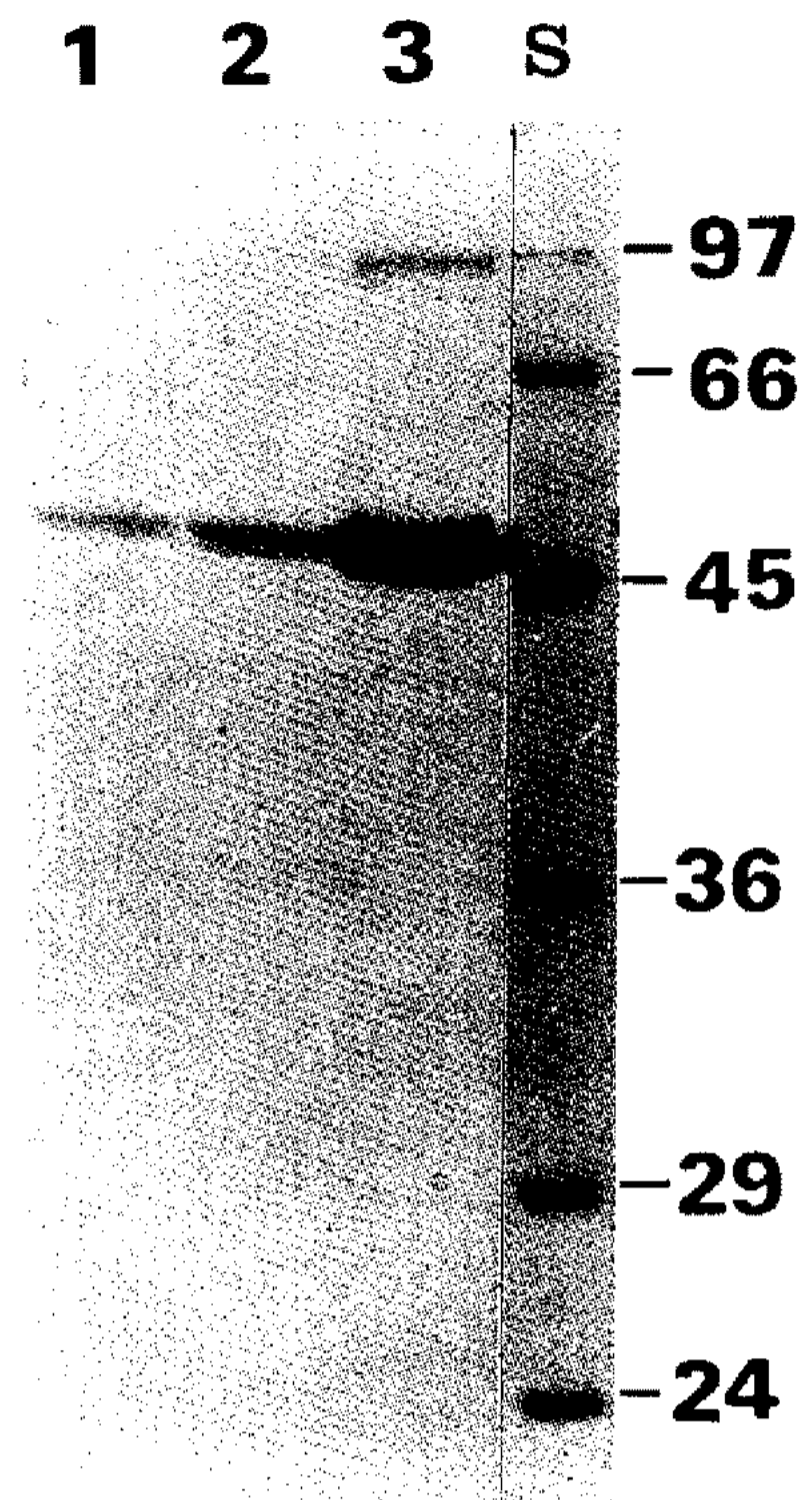


Fig. 8. SDS-PAGE of the culture supernatants of *S. marcescens* strains harboring various plasmids, grown in LB broth. Ten μ l of samples taken from 48 hr-cultures was analyzed with 12% SDS-PAGE gel.

Lanes: 1, from *S. marcescens* (pUC19); 2, from *S. marcescens* (pSP2); 3, from *S. marcescens* (pTSP2); S, standard marker proteins (in kilodaltons).

질로 생산되었으며 densitometer로 조사한 결과 전체 세포의 단백질의 90% 이상이 SMP인 것으로 나타났다. 또한 야생주에 비해서 재조합 *S. marcescens* 균주의 경우 SMP의 생산량이 현저히 증가된 것을 gel 상에서 확인할 수 있었다. 앞으로 조절플라스미드 pTSP2를 이용하여 배양조건의 최적화, *S. marcescens* 속주의 개량 등을 연구하므로써 더욱 SMP 생산성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

몇가지 재조합 플라스미드를 제조하여 *Serratia marcescens* metalloprotease(SMP)의 발현을 대장균과 *S. marcescens*에서 조사하였다. *tac* promoter를 갖는 SMP 고발현 플라스미드 pKSP2의 경우 대장균에서 SMP 유전자가 총 세포단백질의 36%로 고발현되었지만 전혀 활성이 없는 SMP 전구체로 세포내에 축적되었다. 활성이 있는 SMP를 생산하기 위해서 재조합 플라스미드를 *S. marcescens*로 transformation 시켰다. *lac* promoter를 갖는 pSP2의 경우 *S. marcescens*에서 대조균 *S. marcescens*(pUC19)보다 5.1배 높

은 530 U/ml의 SMP를 생산하였다. 그러나 강력한 *tac* promoter를 갖는 pKSP2의 경우 *S. marcescens* 균체 성장을 저해하였으며 또한 거의 SMP를 생산하지 못하였다. *S. marcescens*에서 조절이 가능한 플라스미드를 만들기 위해서 SMP 유전자에 *trc99a* promoter와 이것의 조절유전자 *lacI^q*를 도입하여 pTSP2를 제조하였다. *S. marcescens*(pTSP2)의 경우 9시간 배양 후 1.0 mM IPTG로 유도하는 경우 최종 2,200 U/ml의 SMP 수율을 얻을 수 있었으며 이것은 대조균의 21배에 해당하였다.

감사의 말

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학연구, 1992~1993)로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Sugita, T. and S. Komatsubara. 1989. Construction of a threonine-hyperproducing strain of *Serratia marcescens* by amplifying the phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 290-293.
2. Komatsubara, S., M. Kisumi, and I. Chibata. 1980. Transductional construction of an isoleucine-producing strain of *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* **119**: 51-61.
3. Chibata, I., M. Kisumi, M. Sugiura, and T. Takagi. 1984. Method for fermentative production of L-proline. *U.S. Patent* 4,455,372.
4. Kisumi, M.N., Nakanishi, T. Takagi, and I. Chibata. 1977. L-Histidine production by histidine less regulatory mutants of *Serratia marcescens* constructed by transduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 465-472.
5. Sakurai, N., Y. Imai, M. Masuda, S. Komatsubara, and T. Tosa. 1993. Construction of a biotin-overproduction strain of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2857-2863.
6. Sakurai, N., Y. Imai, M. Masuda, S. Komatsubara, and T. Tosa. 1993. Molecular breeding of a biotin-hyperproducing *Serratia marcescens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3225-3232.
7. Miyazaki, H., N. Yanagida, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1989. Characterization of the precursor of *Serratia marcescens* serine protease and COOH-terminal processing of the precursor during its excretion through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 6566-6572.
8. Kwon, Y.T., H.H. Lee, and H.M. Rho. 1993. Cloning, sequencing, and expression of a minor pro-

- tease-encoding gene from *Serratia marcescens* ATCC21074. *Gene* **125**: 75-80.
9. Braun, V. and G. Schmitz. 1980. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **124**: 55-61.
 10. Bromke, B.J. and J.M. Hammel. 1979. Regulation of extracellular protease formation by *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **25**: 47-52.
 11. Isono, M., K. Tomoda, K. Miyata, K. Maejima, and R. Kodama. 1972. Method for producing protease. *U.S. patent* 3,691,014.
 12. Kim, K.S., C.W. Lee, B.R. Lee, and Y.C. Shin. 1992. Autodigestion and stability of metalloprotease purified from *Serratia marcescens* ATCC 21074. *Kor. Jour. Microbiol.* **30**: 71-77.
 13. Kim, K.S., C.W. Lee, S.Y. Lee, B.R. Lee, and Y.C. Shin. 1993. Molecular cloning of *Serratia marcescens* metalloprotease gene into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 280-288.
 14. Nakahama, K., K. Yoshimura, R. Marumoto, M. Kikuchi, I.S. Lee, T. Hase, and H. Matsubara. 1986. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. *Nucleic Acids Res.* **14**: 5843-5855.
 15. Letoffe, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman. 1991. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Serratia marcescens* metalloprotease gene: Secretion of the protease from *E. coli* in the presence of the *Erwinia chrysanthemi* protease secretion functions. *J. Bacteriol.* **173**: 2160-2166.
 16. Braunagel, S.C. and M.J. Benedik. 1990. The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 446-451.
 17. Schmitz, G. and V. Braun. 1985. Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **161**: 1002-1009.
 18. Yanagida, N., T. Uozumi, and T. Beppu. 1986. Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**: 937-944.
 19. Suh, Y. and M.J. Benedik. 1992. Production of active *Serratia marcescens* metalloprotease from *Escherichia coli* by α -hemolysin HlyB and HlyD. *J. Bacteriol.* **174**: 2361-2366.
 20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 21. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In D.M. Glover ed., *DNA cloning. A Practical Approach*, Pp. 121-122. Vol. I. IRL Press.
 22. Cornelis, P., C. Digneffe, and K. Willemot. 1982. Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 507-511.
 23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 24. Nestlei, M. and W.K. Roberts. 1969. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. Bacteriol.* **244**: 5213-5218.
 25. 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.
 26. Reid, J.D., S.D. Stofer, and D.M. Ogrydziak. 1982. Efficient transformation of *Serratia marcescens* with pBR322 plasmid DNA. *Gene* **17**: 107-112.
 27. Shortle, D. 1983. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. *Gene* **22**: 181-189.
 28. Jeon, Y.H., K.H. Kim, H.Y. Kwon, Y.C. Shin, M.J. Cho, and S.Y. Lee. 1992. Properties of a plasmid-encoded extracellular nuclease of *Serratia marcescens* purified from *E. coli* JM107 transformant. *Korean Biochem. J.* **25**: 437-443.
 29. Takagi, R. and M. Kisumi. 1985. Isolation of a versatile *Serratia marcescens* mutants as a host and molecular cloning of the aspartase gene. *J. Bacteriol.* **161**: 1-6.
 30. Takata, R. and M. Aoyagi. 1984. Isolation of a *Serratia marcescens* mutants which is an efficient recipient for the *E. coli* episome. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 517-518.

(Received 3 February 1995)