

무당거미에서 분리한 *Serratia proteamaculans*에서 분비되는 단백질분해효소의 생화학적 특성

이기은¹ · 김철희¹ · 권현정 · 곽장열 · 신동하² · 박두상 · 배경숙 · 박호용*

한국생명공학연구원 곤충자원연구실, ¹충남대학교 생물학과, ²주인섹트바이오텍

거미의 중장에서 분리한 장내 세균인 *Serratia proteamaculans*는 우유 단백질 배지상에서 투명환을 형성하는 것으로 보아 세포 외로 분비되는 단백질 분해효소를 생산함을 알 수 있었다. Zymogram을 사용한 단백질 분획의 활성 염색 실험에서 세포 외로 분비된 분자량 52 KD의 단백질이 높은 단백질분해 활성을 가진 것으로 추정되었다. 이 단백질 분해효소의 배양 상등액을 여과, 이온교환, 크로마토그래피 등의 방법을 사용하여 순수 정제하였다. 정제된 단백질 분해효소는 pH 6.0과 10.0 사이와 넓은 온도범위에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 1,10-phenanthroline과 EDTA 등의 단백질분해효소 저해제를 처리하였을 때 단백질 분해 활성이 강하게 억제되며 Zn^{2+} 이나 Ca^{2+} 이온의 존재에 의해 단백질 분해효소의 활성이 증가되는 것으로 보아 이 효소가 금속성 단백질 분해효소임을 알 수 있었다.

Key words □ chromatography, metalloprotease, proteolytic activity, *Serratia proteamaculans*, zymogram

Serratia 속의 종들은 면역능이 저하된 환자들에 잘 감염하는 그람 음성 세균이며 장내에서 기생하는 기회적인 병원세균이다 (34). *Serratia*는 또한 많은 곤충으로부터 분리되었으며 공생관계를 가지거나 병원성 관계를 가지는 것으로 알려져 있기 때문에 많은 연구의 관심의 대상이 되고 있다(18, 38). *Serratia*는 단백질 가수분해효소(protease), 키틴 분해효소(chitinase), 지방 분해효소(lipase) 등 산업적으로 유용한 다양한 종류의 가수분해효소를 세포 외의 환경으로 분비한다(23, 24). 그 중에서도 serralysin 단백질 군에 속하는 금속성 단백질 분해효소(metalloprotease)는 bradykinin 과 histamine 등의 염증 유발성 물질에 대한 분해능이 높기 때문에 소염제로 널리 사용된다(12, 22, 40). 또한 serralysin 군의 단백질분해효소는 식품, 제약, 피혁가공, 환경, 그리고 세제 산업 다방면에 이용될 수 있는 가능성 때문에 많은 연구가 행해지고 있다.

대부분의 단백질 수송은 단백질의 세포막 이동전에 수용체에 의해 signal peptide가 인식되어지고, signal sequence를 가지고 있는 preprotein들은 여러 단백질들과 상호작용을 하며 세포막에 도달한 후, signal peptidase에 의해 특정 부위가 잘린 후 성숙한 형태의 단백질로 바뀌는 Type II protein secretion system을 이용하는데 serralysin metalloprotease는 단백질의 N 말단에 signal peptide가 발견되지 않으며 Type I protein secretion pathway라고 불리는 ATP-binding cassette (ABC) pathways에 의해서 세포외로 분비된다. 이 분비 체계는 세 가지의 단백질로 구성되어 있으며, ABC 단백질은 세포내에서 단백질 분해효소와 결합하여 전

달해주는 chaperone의 역할을 하며, 막 융합 단백질과 외부 막 단백질은 periplasm을 거치지 않고 직접 세포외로 이동시키는 역할을 한다(3). 이런 ABC pathway를 이용하는 세균으로 *Erwinia chrysanthemi*(28), *Escherichia coli*(15, 31), *Serratia marcescens* (1), *Pseudomonas fluorescens*(14), *Rhizobium leguminosarum*(39) 등이 있다.

이전의 연구에서 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 중장(midgut)으로부터 우유단백질(casein)을 높은 효율로 분해하는 단백질 분해효소를 분비하는 장내세균을 분리하였으며 계통분류와 수리분류학적인 분석으로 이 장내세균은 *Serratia proteamaculans*에 속하는 것으로 동정되었다(35). 본 연구에서는 이 *S. proteamaculans*에서 분비된 단백질 분해효소를 순수분리하고 그 생화학적 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 배양조건

본 연구에서는 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)에서 분리한 *Serratia proteamaculans* strain KCTC 2390를 야생형으로 사용하였다(35). 이 균주는 Luria-Bertani (LB), skim milk (skim milk 1%, yeast extract 0.1%, agarose 1.5%) 또는 TY 배지(Bacto tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.1%, KCl 0.05%, $CaCl_2$ 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%)에서 30°C로 16시간 동안 배양되었다(32).

효소 활성 측정

효소 활성 측정 방법은 Braun과 Schmitz(7)의 방법을 약간 변

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-860-4650, Fax: 82-42-860-4659
E-mail: hypark@kribb.re.kr

형하여 405 nm에서 분광광도계(Spectrophotometer DU-650, Beckman, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 0.3 ml의 2% azocasein (Sigma, USA) 용액(50 mM phosphate 완충용액, pH 7.6)에 조효소액 0.1 ml을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 정지시켰다. 미분해 azocasein을 제거하기 위하여 0.3 ml의 10% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하고 1시간동안 방치한 뒤, 13,000×g 로 5분간 원심분리해서 침전시켰다. 상등액에 15 µl의 10% NaOH를 첨가하고 최종 상등액은 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1 unit(U)는 위의 조건에서 30분 동안 405 nm 흡광도 값을 1.0 증가시키는 데 필요한 효소의 양으로 정하였다. 단백질은 BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford(6)의 방법에 따라 정량되었다.

효소의 정제

특별한 언급이 없는 한 모든 실험은 4°C에서 수행되었다. 세포의 분획은 배양액을 5,000×g 에서 10분간 원심분리하고 0.2 µm 여과지(Microfiltration, Fall Microza Hollow fiber, USA)로 여과해서 얻었다. 투석한 효소액을 50 mM potassium phosphate 완충액(pH 7.6)으로 세척한 DEAE-cellulose column(7×15 cm)에 넣고 비흡착 단백질을 충분히 씻어낸 후, 유속 400 ml/hr에서 0.1 M에서부터 0.5 M까지 NaCl의 농도 구배로 순차적으로 용출하였다. 분획은 10 kD cassette 막(Fall Microza Hollow fiber, USA)으로 농축한 뒤, 20 mM potassium phosphate 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-75 column에 유속 20 ml/hr으로 용출되었다. 단백질 분해효소 활성을 가진 분획은 10 kD cassette 막으로 농축한 뒤, 동결 건조 후 -20°C에 보관하였다.

효소활성 특성

pH에 대한 영향을 조사하기 위하여 5 mM ZnCl₂의 존재 하에 azocasein을 기질로 사용하여 pH 3.0 부터 pH 12.0 까지 단백질 분해활성을 측정하였다. pH 3.0~7.0 완충용액을 만들기 위해 25 mM citrate-phosphate를 사용하였고, pH 7.0~9.0 완충용액을 만들기 위해 25 mM sodium phosphate, pH 7.0~10.0 완충용액을 만들기 위해 25 mM Tris-HCl을, 그리고 pH 9.0~12.0 완충용액을 만들기 위해 glycine-caustic soda를 사용하였다. 활성은 완충용액에 효소를 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 측정되었다. 효소의 최적온도를 측정하기 위해, 효소를 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C 에서 1시간동안 미리 반응시킨 뒤, ZnCl₂의 존재 하에 50 mM phosphate 완충용액(pH 7.8)의 1% azocasein 에 첨가해서 37°C에서 30분 반응시킨 뒤, 단백질 분해효소의 역할을 측정하였다.

분자량 결정

SDS-PAGE(10%)는 Laemmli (27)의 방법으로 수행하였다. 사용한 분자량 측정 marker로는 phosphorylase b (103 kD), BSA (77 kD), ovalbumin (50 kD), carbonic anhydrase (34.3 kD), soybean trypsin inhibitor (28.8 kD), lysozyme (20.7 kD) (Prestained SDS-PAGE Standards, low range, Bio-Rad, USA) 등을 사용하였다.

금속이온과 단백질 분해효소 저해제의 효과

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 CaCl₂, MgSO₄, CoCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, CuSO₄, 그리고 K₂SO₄를 최종농도가 각각 1, 5, 10 mM이 되게 첨가한 뒤, 37°C에서 30분간 전처리를 한 다음 단백질 분해활성을 측정하였다.

단백질분해효소 저해제에 대한 효과를 알아보기 위해 aspartate protease의 저해제인 pepstatin A (Sigma, USA), trypsin의 저해제인 antipain hydrochloride (Sigma, USA), cystine protease의 저해제인 E-64(N-(trans-Epoxy succinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide) (Sigma, USA), chymotrypsin의 저해제인 chymostatin (Calbiochem, Germany), extracellular protease의 저해제인 leupeptin (Sigma, USA), serine protease의 저해제인 pefabloc SC (Roche, Germany), aprotinin (Sigma, USA), PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) (Sigma, USA), metalloprotease 저해제인 phosphoramidon disodium salt (Sigma, USA), EDTA (Sigma, USA), 1, 10-phenanthroline들을 각각 1 mM의 동일 농도로 37°C에서 5분간 전처리를 한 다음, 효소 활성을 측정하였다.

결 과

세포배양액으로부터 단백질 분해능 확인

이전의 연구에서 거미의 중장으로부터 분리한 장내세균은 skim milk 배지에 접종되었을 때 높은 분해환을 형성하는 것을 알 수 있었다(35). 16S rRNA의 염기서열을 이용한 계통분류학적 분석과 다양한 생리적 특성 분석을 이용한 수리 분류에서 이 장내 세균은 *Serratia proteamaculans*으로 동정되었다(35). 이 분비성 단백질분해효소를 확인하기 위하여 세포배양액과 정제한 단백질분해효소를 SDS-PAGE 와 zymogram을 사용하여 분석하였을 때 52 kD의 단백질이 강한 단백질 분해능을 가진 것으로 밝혀졌다(Fig. 1, Lane S).

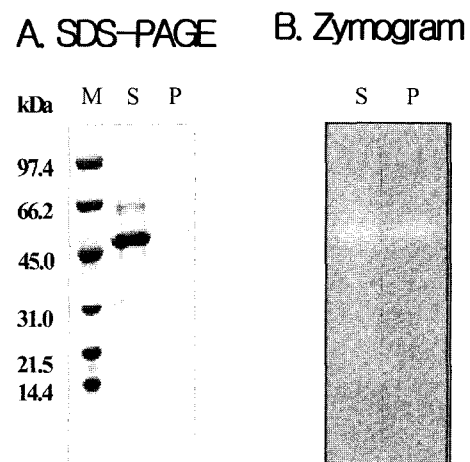


Fig. 1. Analysis of protease by SDS-PAGE and zymogram. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a 10% gel. The gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Zymogram gel was containing gelatin. Lanes: M, standards molecular weight; S, *S. proteamaculans* culture broth; P, purified protease.

Table 1. Purification step of the metalloprotease from *S. proteamaculans*.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Extracellular fraction	39.5	217.3	5.5	1	100
DEAE-Cellulose	5.1	176.3	34.7	6.3	81
Sephadex G-75	3.0	69.8	23.3	38.4	33

단백질분해효소의 분리

단백질분해효소의 특성을 규명하기 위하여 먼저 단백질 분해 효소를 배양액으로부터 filtration과 DEAE-cellulose 및 Sephadex G-75 크로마토그래피를 사용하여 순수 분리하였다. 0.15M 과 0.2M NaCl 농도의 분획에서 단백질의 분해능이 세포배양액과 비교하였을 때 6.3 배 높은 활성으로 분리되는 것으로 밝혀졌다. 활성을 가지는 분획을 다시 Sephadex G-75를 사용한 gel filtration 분리를 시도하였으며 38.4 배 높은 활성을 가지는 분획을 분리하였다(Table 1). SDS-PAGE로 분리하고 Coomassie Brilliant Blue R-250로 염색하고 densitometry를 사용하여 분석한 결과 최종 단계의 순수도는 95% 정도로 계산되었다(Fig. 1, Lane P). 분리된 효소를 SDS-PAGE 한 결과 zymogram으로 분석한 것과 마찬가지로 약 52 kD 정도의 크기를 가지는 것으로 계산되었다.

단백질 분해효소의 물리적 성질

*S. proteamaculans*에서 분리된 52kD 단백질 분해효소의 활성을 여러 가지 물리적인 조건에서 조사하였다. 단백질분해효소의 활성은 pH 8.0과 8.5에서 가장 높은 활성을 보였으며 pH 5.0과 12.0사이에서 최대 활성의 80% 정도를 가지고 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 2A). 효소활성의 최적온도를 조사하기 위하여 4 °C 와 80°C 사이에서 효소의 활성을 측정하였을 때 37°C에서 최대의 활성을 나타내었으며 45°C에서는 약 24% 및 70°C에서는 약 16%의 활성이 유지되는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2B). 그러나 4 °C 에서 15°C 사이에서는 최대 활성의 40% 정도의 활성을 유지했다(Fig. 2B).

단백질분해효소 저해제에 의한 효소활성

단백질분해효소의 작용기작을 이해하기 위해 다양한 종류의 단백질분해효소 저해제로 전처리한 후 단백질 분해능을 조사하였다. 먼저 순수 분리된 효소를 37°C에서 5분 동안 1 mM의 단백질 분해효소와 함께 배양한 후 단백질 분해능을 측정하였다. antipain, aprotinin, pefabloc SC, chymostatin, phosphoramidon, leupeptin, E-64, PMSF등은 주목할 만한 저해효과를 보이지 않았다(Fig. 3). 하지만 일반적인 metalloprotease의 저해제인 EDTA와 zinc metalloprotease의 저해제로 알려진 1, 10-phenanthroline은 높은 효율로 단백질분해효소의 작용을 저해하였다(Fig. 3). 금속 이온의 치환제인 EDTA와 EGTA가 단백질 분해능에 미치는 영향을 좀 더 자세히 조사하기 위하여 1, 5, 10, 20, 50 mM의 농도에서 전처리한 후 단백질 분해능을 조사하였다. 단백질 분해능의 EGTA에 의한 현저한 저해는 관찰되지 않았지만, 5 mM의 EDTA는 약 70% 정도의 분해능을 저해하였고 20 mM의 농도로

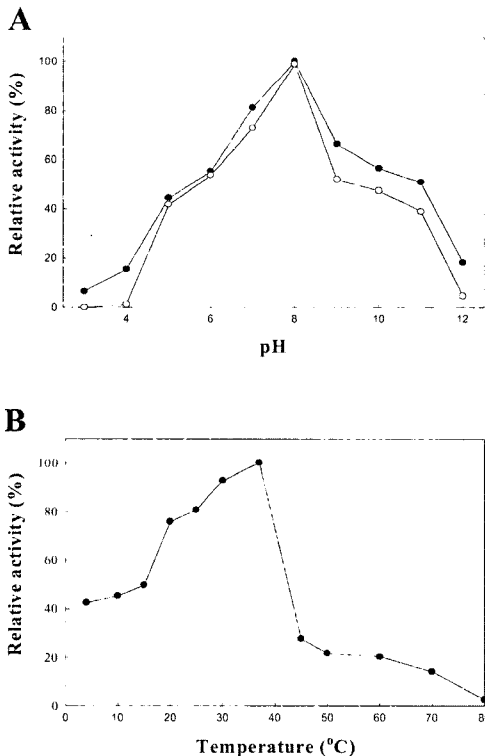


Fig. 2. (A) Effect of pH on the activity of protease. The enzyme solution were pre-incubated at 37°C for 30 min (●) and 120 min (○). (B) Effect of optimum temperature on the activity of protease. Relative activity was determined at pH 7.6 and at different temperature by a standard activity assay. The values obtained at 37°C were taken as 100%. Relative activities are the range for two independent experiments.

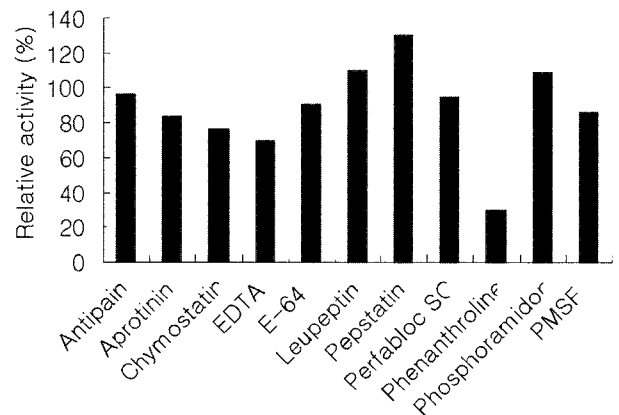


Fig. 3. Proteolytic activity of protease in the presence of protease inhibitors.

Table 2. Effect of protease inhibitors (EDTA and EGTA) in the activity protease.

	1 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM
EGTA	110	87	71	68	65
EDTA	85	31	9	.	.

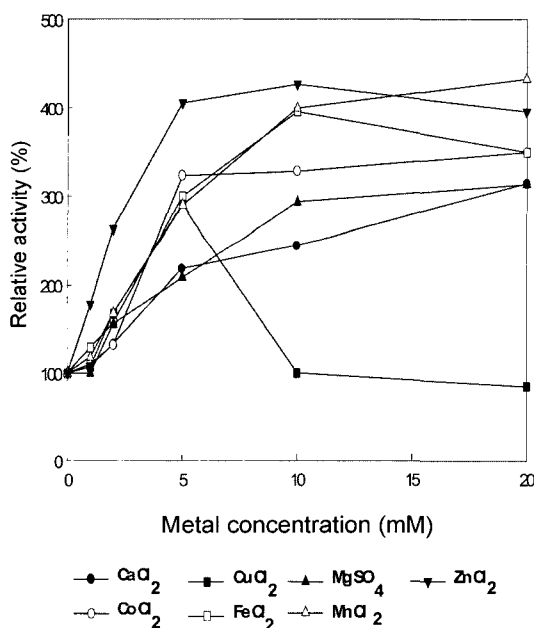
전처리한 경우에는 대부분의 단백질 분해능을 제거하였다(Table 2).

금속이온의 단백질 분해능에 대한 영향

금속 이온은 가수분해 반응을 촉진하는 금속성 효소의 중요한 조효소이다(11). 본 연구에서는 다양한 금속이온의 순수 분리된 효소의 단백질 분해능에 대하여 조사하였다. 1, 5, 10 mM의 농도로 다양한 금속 이온 Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 등과 같이 배양하였다. Cu^{2+} 를 제외한 모든 금속 이온이 효소의 단백질 분해능을 약 1.5 배 증가시켰다(자료미제시). 단백질 분해능에 대한 다양한 금속 이온에 대한 효과를 조사하기 위하여, 먼저 5 mM의 EDTA의 완충 용액에서 배양한 후 다시 금속 이온과 배양하고 분해능을 조사하였다. 0~20 mM의 농도로 Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 등을 처리하였을 때, 5 mM의 금속이온을 첨가한 경우 금속이온을 첨가하지 않은 조건에 비해 대부분 2~4 배 정도로 활성이 증가되었다. 특히 Zn^{2+} 와 Mn^{2+} 은 현저한 활성의 증가를 보였다(Fig. 4).

고 찰

*Serratia*속에서 속하는 세균은 지방분해효소, 키틴분해효소, 단백질 분해효소 등 많은 종류의 가수분해효소를 세포외로 분비한

**Fig. 4.** Reactivation of EDTA-treated protease by metal ions.

다. 본 연구에서는 거미의 중장에서 분리한 장내세균인 *S. proteamaculans*에서 분비되는 단백질분해효소의 생화학적 특성을 조사하였다. 순수 분리된 단백질분해효소는 여러 가지 생화학적 특성으로 인하여 이전의 많은 연구에서 이미 보고된 바 있는 *Serratia* 군에 속하는 단백질 분해효소로 사료된다. 첫째, 이 단백질의 분자량은 *Serratia* 군의 단백질분해효소와 같은 52kD로 SDS-PAGE에서 계산되었다. 둘째, 본 단백질분해효소는 세포외로 분비되는 효소이며 azocasein을 기질로 사용한 실험에서 다른 대부분 *Serratia* 군의 효소와 활성도가 비슷하였다. 셋째, 넓은 pH 범위와 넓은 온도범위에서 상대적으로 높은 활성을 가지고 있다. 넷째, 금속이온의 치환제인 EDTA에 의해서 활성이 현저히 저해를 받으며 Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} 등 금속 이온에 의해 활성이 증가된다. 또한 Zinc metalloprotease의 저해제인 1, 10-phenanthroline에 활성이 완전히 저해되는 금속성 단백질분해효소의 특성을 가지고 있기 때문이다. 이런 *Serratia* 군에 속하는 분비성 단백질분해효소는 *Pseudomonas aeruginosa* (13, 19, 20, 21), *Pseudomonas fluorescens* (25, 30), *Pseudomonas brassicacearum* (10), *S. marcescens* (8, 28, 36), *Erwinia chrysanthemi* (29), *Erwinia catarova* (33), *Photobacterium luminescens* (5) 등과 같은 미생물에서 보고된 바 있다.

곤충에서 분리된 *Serratia* 속 속하는 많은 세균들이 공생관계나 병원성을 가지는 것으로 알려져 있다(37). 거미가 포획한 먹이에 소화액을 주입하여 단시간에 분해시키는 강력한 소화효소를 분비한다는 습식습관을 볼 때, 이 거미의 장내 세균인 *S. proteamaculans*가 분비하는 금속성 단백질분해효소가 넓은 범위의 온도와 pH에서 활성이 높으며 거미의 소화를 도와주는 역할을 할 것이라 생각할 수 있다. 또한, 대부분의 장내 세균이 만들어내는 *Serratia* 군의 단백질분해효소는 그들의 숙주에 병원성으로 작용하는 것으로 보아(16, 17) 이 *S. proteamaculans*에서도 숙주와의 병원성 관계를 완전히 배제할 수는 없다. 일반적으로 *Serratia*와 유사한 장내세균으로 알려진 *Xenorhabdus*와 *Photobacterium*속 속하는 세균들이 토양선충들과 곤충병원성 공생관계를 가지는 것으로 보고되었다(2, 26). *Xenorhabdus nematophila*(9)와 *Photobacterium luminescens*(4, 5) 등은 곤충에 감염하여 심각한 성장 장애나 괴사를 유발하는 병원성도 동시에 가지고 있다.

감사의 말

본 연구는 2004년도 과학기술부 미생물유전체 활용기술개발사업의 연구비 지원으로 수행하였습니다(MGC0900413). 연구에 도움을 주신 (주)인섹트바이오텍에도 감사드립니다.

참고문헌

1. Akatsura, H., E. Kawai, K. Omori, and T. Shibatani. 1995. The three genes *lipB*, *lipC*, *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* 177, 6381-6389.

2. Akhurst, R. 1993. Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes—the power behind the throne. In *Nematodes and the Biological control of Insect Pests*, ed. R. Bedding, R. Akhurst, H. Kaya, pp. 127-135. Melbourne, Aust.
3. Binet, R., S., Letoffe, J.M. Ghigo, P. Delepelaire, and C. Wandersman. 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters—a review. *Gene* 192, 7-11.
4. Bowen, D., T.A. Rocheleau, M. Blackburn, O. Andreev, E. Golubeva, R. Bhartia, and R.H. French-Constant. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280, 2129-2132.
5. Bowen, D.J., T.A. Rocheleau, C.K. Grutzmacher, L. Meslet, M. Valens, D. Marble, A. Dowling, R. French-Constant, and M.A. Blight. 2003. Genetic and biochemical characterization of PrtA, an RTX-like metalloprotease from *Photorhabdus*. *Microbiology* 149, 1581-1591.
6. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
7. Braun, V. and G. Schmitz. 1980. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 124, 55-61.
8. Braunagel, S.C. and M.J. Benedik. 1990. The metalloprotease gene of *Serratia marcescens* strain SM6. *Mol. Gen. Genet.* 222, 446-451.
9. Caldas, C., A. Cherqui, A. Pereira, and N. Simoes. 2002. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1297-1304.
10. Chabeaud, P., A. de Groot, W. Bitter, J. Tommassen, T. Heulin, and W. Achouak. 2001. Phase-variable expression of an operon encoding extracellular alkaline protease, a serine protease homolog, and lipase in *Pseudomonas brassicacearum*. *J. Bacteriol.* 183, 2117-2120.
11. Christianson, D.W. and J.D. Cox. 1999. Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 33-57.
12. Claeson, G., J. Fareed, C. Larsson, G. Kindel, S. Arielly, R. Simonsson, H.L. Messmore, J.U. Balis. 1979. Inhibition of the contractile action of bradykinin on isolated smooth muscle preparations by derivatives of low molecular weight peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.* 120, 691-713.
13. Duong, F., A. Lazdunski, B. Cami, and M. Murgier. 1992. Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* 121, 47-54.
14. Duong, F., C. Soccia, A. Lazdunski, and M. Murgier. 1994. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol. Microbiol.* 11, 1117-1126.
15. Fath, M.J. and R. Kolter. 1993. ABC transporters; bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57, 995-1017.
16. Fernandez, L., P. Secades, J.R. Lopez, I. Marquez, and J.A. Guijarro. 2002. Isolation and analysis of a protease gene with an ABC transport system in the fish pathogen *Yersinia ruckeri*: insertional mutagenesis and involvement in virulence. *Microbiology* 148, 2233-2243.
17. Fernandez, L., J.R. Lopez, P. Secades, A. Menendez, I. Marquez, and J.A. Guijarro. 2003. In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7328-7335.
18. Grkovic, S., T.R. Glare, T.A. Jackson, and G.E. Corbett. 1995. Genes essential for amber disease in grass grubs are located on the large plasmid found in *Serratia entomopila* and *Serratia proteamaculans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2218-2223.
19. Guzzo, J., F. Duong, C. Wandersman, M. Murgier, and A. Lazdunski. 1991. The secretion genes of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease are functionally related to those of *Erwinia chrysanthemi* proteases and *Escherichia coli* α -haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5, 447-453.
20. Guzzo, J., J.M. Pages, F. Duong, A. Lazdunski, and M. Murgier. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* 173, 5290-5297.
21. Guzzo, J., M. Murgier, A. Filloux, and A. Lazdunski. 1990. Cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 942-8.
22. Hauck, G. 1976. Proceedings: Vitalmicroscopic investigations of the effects of thrombin, a snake venom enzyme and histamin effect on the mesenteric microvasculature of rabbit and cat. *Arzneimittelforschung* 26, 1233.
23. Hines, D.A., P.N. Saurugger, G.M. Ihler, and M.J. Benedik. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170, 4141-4146.
24. Kawai, E., H. Akatsuka, A. Idei, T. Shibatani, and K. Omori. 1998. *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* 27, 941-952.
25. Kawai, E., A. Idei, H. Kumura, K. Shimazaki, H. Akatsuka, and K. Omori. 1999. The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33. *Biochim. Biophys. Acta.* 1446, 377-382.
26. Kaya, H.K. and R. Gaugler. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annu. Rev. Entomol.* 38, 181-206.
27. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
28. Letoffe, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman. 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* α -haemolysin. *EMBO. J.* 9, 1375-1382.
29. 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.
30. Liao, C.H. and D.E. McCallus. 1998. Biochemical and genetic characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 914-921.
31. Mackman, N., J.M. Nicaud, V. Gray, and I.B. Holland. 1986. Secretion of hemolysin by *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125, 159-181.
32. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual, P. A2.2. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
33. Marits, R., V. Koiv, E. Laasik, and A. Mae. 1999. Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* strain SCC3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology* 145, 1959-1966.

34. Marty, K.B., C.L. Williams, L.J. Guynn, M.J. Benedik, and S.R. Blanke. 2002. Characterization of a cytotoxic factor in culture filtrates of *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 70, 1121-1128.
35. Moon, E.Y., H.Y. Oh, P.J. Maeng, and K.-S. Bae. 2001. Identification of enteric bacteria from *Nephila clavata*. *Kor. J. Microbiol.* 37, 1-8.
36. 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.
37. Sandstrom, J.P., J.A. Russell, J.P. White, and N.A. Moran. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol. Ecol.* 10, 217-228.
38. Schmitz, G. and V. Braun. 1985. Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 161, 1002-1009.
39. Walshaw, D.L. and P.S. Poole. 1996. The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that also influences efflux of solutes. *Mol. Microbiol.* 21, 1239-1252.
40. Wolz, R.L. and J.S. 1990. Phe(4-nitro)-bradykinin: a chromogenic substrate for assay and kinetics of the metalloendopeptidase merprin. *Anal. Biochem.* 191, 314-320.

(Received October 27, 2004/Accepted December 13, 2004)

ABSTRACT : Biochemical Characterization of an Extracellular Protease in *Serratia proteamaculans* Isolated from a Spider

Kieun Lee¹, Chul-Hee Kim¹, Hyun-Jung Kwon, Jangyul Kwak, Dong-Ha Shin², Doo-Sang Park, Kyung-Sook Bae, and Ho-Yong Park* (Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea, ¹Department of Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea, ²Insect Biotech Co., Ltd., Taejon 305-811, Korea)

Serratia proteamaculans isolated from the midgut of a spider formed big halos around the bacterial colonies, indicating that the bacterial strain produces an extracellular protease. Activity staining of the extracellular protein fractions using zymogram also demonstrated that the major protein with an estimated molecular mass of 52 kDa contained a high proteolytic activity. The protease was purified to near electrophoretic homogeneity from the culture supernatant after filtration and ion exchange and size exclusion chromatography. The purified enzyme had a relatively high proteolytic activity between pH 6.0 and 10.0 and at broad temperature range. The proteolytic activity of the enzyme was not inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride but strongly inhibited by 1, 10-phenanthroline and EDTA. The activity also was dependent on the presence of Ca⁺⁺ and Zn⁺⁺ ions. These observations indicate that the enzyme is a metalloprotease.