

## *Bacillus subtilis*의 단백질 분비기구 SecY의 유전자 수준의 조절이 단백질 분비에 미치는 영향

김상숙 · 김순옥 · 서주원\*  
명지대학교 생명과학과, 생명과학연구소

**Effect of the Gene Amplification of *Bacillus subtilis* Protein Translocator SecY on the Extracellular Protein Secretion.** Sang-Suk Kim, Soon-Ok Kim, and Joo-Won Suh\*. *Department of Biological Science, Biotechnology Research Institute, Myong Ji University, Yongin 449-728, Korea* — The SecY is a central component of the protein export machinery that mediate the translocation of secretory proteins across the plasma membrane, and has been known to be rate-limiting factor of secretion in *Escherichia coli*. In order to study the extracellular protein secretion in Gram-positive microorganism, we have constructed strains harboring more than one copy of the gene for SecY. Firstly, the gene for *B. subtilis* SecY and its promoter region was subcloned into pDH32 and the chimeric vector was inserted into *amyE* locus by homologous recombination. Secondly, low copy number vector, pCED6, was also used for subcloning the *secY* gene and for constructing a strain which harbors several copies of *secY*. The KH1 cell which harbor two copies of *secY* on the chromosome excreted more extracellular proteins than the wild type PB2. Moreover, the KH2 cells which harbor several copies of *secY* in pCED6 vector excreted more extracellular proteins than the KH1 cells. Here, we found that the capacity of protein secretion is partly controlled by the number of *secY* and it is suggested that SecY has also an important role in protein secretion in *B. subtilis*, a gram positive microorganism, as like in *E. coli*. This will promote the use of *B. subtilis* as a host for the expression of useful foreign gene and excretion of precious proteins.

그람 양성균인 *Bacillus subtilis*는 호기성 토양세균으로 생장 중 정지기에 들어가면 세포외부로 다양한 단백질을 분비하는 자연적인 분비체계가 있어 외부 유전자를 *B. subtilis*에서 발현시켜 배양액으로 분비시키고자 하는 것이 관심의 대상이 되어 왔다. 이러한 *B. subtilis*의 특징은 비병원성이며 endotoxin이나 toxicogenic 생산물이 없다는 것과 효소를 비롯한 산업적 유용물질과 식품의 생산을 위한 발효의 기술이 잘 알려져 있으며 그람 양성균 중 유전적 및 분자생물학적 연구가 가장 많이 이루어진 대표적인 균이며 생장속도가 빨라 속주균으로서의 사용에 많은 잇점이 있다는 것이다.

그러나 지금까지 원핵세포의 단백질 분비에 대한 연구는 주로 *Escherichia coli*를 중심으로 이루어져 왔고 최근에 박테리아의 간단한 구조적 특성과 발달한 유전자 조작기술의 도움으로 *E. coli*에서 단백질 분비에 관여하는 단백질인 SecA, SecB, SecD, SecE, SecY 등의 유전자들이 알려졌다. 이러한 단백질들은 세포내에서 합성된 단백질 전구체에 단계별로 binding 하는 것으로 알려졌다. 그 과정은 ATP를 가수분해하여 단백질 분비에 필요한 에너지를 제공하므로 translocation ATPase라 불린다(1, 2) SecA가 SecB와 단백질 전구체의 복합체를 인식하게 되고 SecB는 단백질 전구체가 막을

통과하기 용이한 형태로 3차 구조를 유지시켜 주는 antifolding 효과로 단백질의 구조를 안정화 시킨다. SecB가 binding 하여 안정된 구조를 갖는 단백질 전구체는 preprotein translocase라 정의되는 SecA, SecY/E로 구성된 receptor(translocase라고도 할 수 있는)에 결합하여 막에 안정하게 자리를 잡으면서 단백질의 수송이 일어난다. Translocation process에서 이러한 과정후에 작용하는 SecD, SecF의 역할도 보고되고 있다(3-5). 단백질 분비에 관여하는 여러 단백질 중에서도 특히 SecY는 protein translocation에 중요한 역할을 하고 inner membrane을 단백질이 통과할 때 translocator의 역할을 하는 것으로 알려졌다.

단백질이 세포막을 통과할 때 protein translocator의 역할을 하는 것으로 알려진 *E. coli*의 SecY는(sec은 secretion defective에서 유래) 49 kDa에 달하는 integral membrane protein으로 세포생장에 필수적이며 *secY24* 온도감수성 돌연변이는(temperature sensitive mutation) 그 제한조건(restriction condition)에서 여러 분비단백질을 분비하지 못하고 그 전구체를 세포질내에 축적하는 것이 확인되었다(6-8).

*E. coli*에서 SecY의 세포막내 topology는 SecY의 아미노산 염기서열에 관한 hydrophathic profile, protease에 의한 감응도, SecY-PhoA(alkaline phosphatase) fusion 단백질 분석등에 의해 NH<sub>2</sub>- 및 COOH- 말단들이 세포질로 향하고 그 가운데 부분이 세포막을 열번

\*Corresponding author.

Key words: *Bacillus subtilis*, SecY, protein secretory machinery, protein secretion

통과하여 결국 periplasm 쪽으로 나온 부분이 다섯 domain, 세포질 쪽으로 나온 부분이 여섯 domain이라는 것이 밝혀졌다(9). Watanabe와 Blobel(10)도 NH<sub>2</sub>- 및 COOH- 말단들에 작용하는 항체를 이용하여 이 두 말단이 세포질로 나와 있으며 이들이 세포막에 위치하여 signal sequence receptor의 역할을 수행할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 또한 Bieker와 Silhavy(11)는 LamB-LacZ hybrid protein을 이용한 실험에서 SecY가 단백질 분비 기구의 rate-limiting한 부분이며 분비단백질은 SecY를 통로로 하여 세포막을 통과할 것이라고 주장하였다.

하지만 유용 이중단백질의 발현 및 분비를 위한 숙주균으로 주목을 받고 있는 B. subtilis에서 secretory machinery에 대한 연구는 거의 전무한 상태였다. 최근에 Suh 등(12)은 E. coli에서 protein translocator의 역할을 할 것이라고 알려진 SecY 단백질 유전자에 상응하는 유전자를 B. subtilis에서 cloning 하는데 성공하였다. 분리된 B. subtilis secY 유전자는 E. coli의 secY 유전자와 상응하는 spc operon내에 위치하고 아미노산 서열도 E. coli와 보존적이며, 이와같은 유사성들은 그람 음성균과 그람 양성균에서 단백질 분비 기작이 비슷하다는 것을 시사해 주고 있다.

그러나 그람음성균인 E. coli와는 달리 자체의 promoter를 갖는 B. subtilis의 secY 유전자는 세포성장 중 지수기로 접어들어 두시간대에 그 전사활성이 가장 높으며 이들 두 개의 minor promoter는 secY 유전자 앞의 L15와 L30(ribosomal protein) 유전자지역에 위치한다는 것을 밝혀내었다(13).

본 논문에서는 세포의 생장에 필수적이며 단백질 분비기작 중 중요한 translocator의 역할을 하고 Bieker와 Silhavy(1989)가 E. coli에서 단백질 분비 과정의 rate-limiting 한 부분이라고까지 주장하고 있는 SecY에 대해 그람양성균인 B. subtilis에서 그 유전자 수준의 조절에 따른 단백질 분비 능력을 연구함으로써 순수 과학적 측면에서 SecY의 기능에 대한 확인과 함께 실용적으로 B. subtilis를 이중 단백질 발현 분비 숙주균으로서의 이용가능성 제고도 함께 타진해 보고자 하였다. 세포내 secY 유전자 증폭 조절에 따라 분비되는 단백질의 추적으로 그람양성균인 B. subtilis에서 SecY가 단백질 분비에 관여한다는 사실을 처음으로 밝혀내었으며 secY 유전자 증폭조절로 단백질 분비능력을 향상시킬 수 있음을 발견하였다. 이와같은 연구는 B. subtilis를 유용한 이중단백질 생산을 위한 숙주균주로 개발하는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 플라스미드

SecY 유전자 증폭을 위해서 사용한 균주는 Bacillus

subtilis wild type인 PB2(168 trpC2 ; 14)였고 유전자의 재조합과 증폭, 염기서열 결정을 위한 형질전환용 숙주로는 Escherichia coli DH5αF'(supE44ΔlacU169(φ80 lacZΔM15)hsdR17recA1endA1gyrA96thi-relA1)을 사용하였다.

사용한 vector로는 B. subtilis에서 homologous recombination을 유도하여 secY 유전자를 두개로 늘리기 위해 B. subtilis의 amyE 유전자를 포함하며 E. coli에서는 self replication이 가능하여 유전자 조작이 가능하나 Bacillus에서는 self replication이 일어나지 않도록 제작된 pDH32 vector(15, Fig. 1)를 사용하였다. 또한 secY 유전자를 10개 미만으로 늘리기 위해서는 E. coli와 B. subtilis shuttle vector이면서 low copy vector인 pCED6를 사용하였다(16).

#### E. coli와 B. subtilis의 형질전환

E. coli의 형질전환은 Sambrook 등(17)의 CaCl<sub>2</sub> 방법을 변형하여 사용하였다.

B. subtilis에서의 형질전환은 Sadaie와 Kada(18)의 방법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 30°C로 TBAB 고체 배지(Bacto Tryptose 10 g, Bacto Beef Extract 3 g, Sodium Chloride 5 g, Bacto Agar 15 g per liter)에서 밤새 배양한 single colony를 2 ml의 SP1 배지에(10×minimal salts 10 ml, H<sub>2</sub>O 85 ml, 10% glucose, 5% casamino acid 1 ml, 10% yeast extract 1 ml/10×minimal salts total volume 100 ml; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 g, sodium citrate 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g) 접종하여 12시간 이상 배양하였다. 12시간 이상 seed culture 한 배양액을 15 ml의 새 SP1 배지에

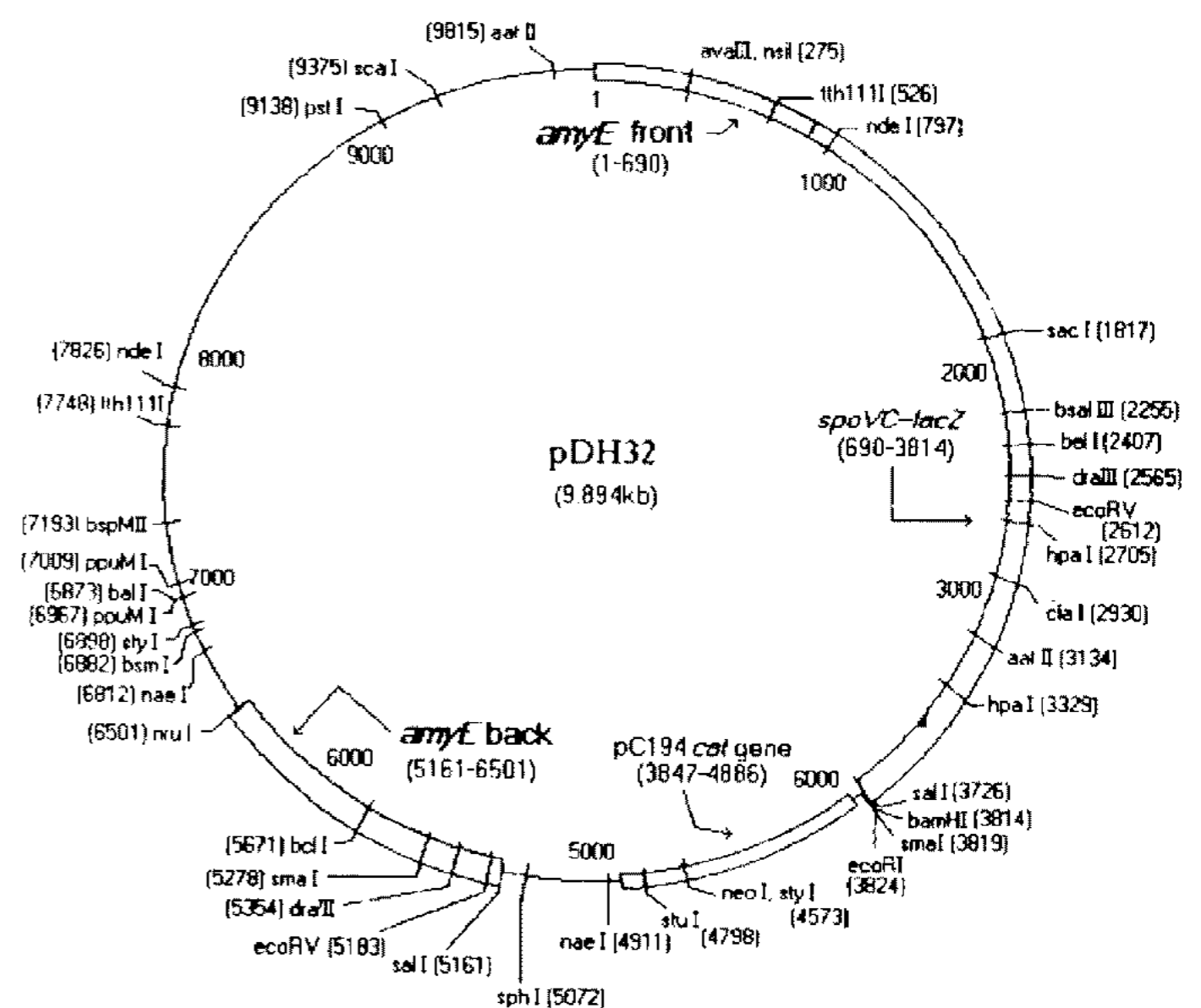


Fig. 1. Restriction map of pDH32.

pDH32 has cat gene as a antibiotic selection marker and various usable restriction enzyme sites. It has also B. subtilis amyE gene for homologous recombination.

접종하여 흡광도 600 nm에서 2.0까지 키운 후 90분간 더 배양하였다. 이때 SP1에서 충분히 자란 *B. subtilis* PB2를 10 ml의 SP2 배지에(SP1 20 ml, 0.05M CaCl<sub>2</sub> 0.2 ml, 0.1M MgCl<sub>2</sub> 0.5 ml) 10%로 접종하고 37°C shaking incubator에서 150 rpm 정도로 90분간 더 배양하였다. 배양액 0.9 ml와 약 1 µg의 DNA를 섞고 37°C incubator에서 30분간 정치한 후 각각 5 µg/ml의 chloramphenicol과 10 µg/ml의 kanamycin이 함유된 TBAB plate에 도말하여 37°C에서 배양하였다.

#### Homologous recombination의 확인

**Starch 배지를 사용한 α-amylase activity 측정** *secY* 유전자수를 2개로 늘리기 위해 제작한 chimeric vector pKH1이 PB2 chromosome에 integration될 때 chloramphenicol resistance 유전자가 함께 삽입되므로 일차적으로 chloramphenicol(5 µg/ml)이 함유된 배지에서 형질전환체를 확인한 후 다시 *amyE* locus에서 homologous recombination이 일어나 *amyE* 유전자를 불활성화시키므로 이러한 형질전환체의 확인을 위해 starch가 함유된 배지(0.3% beef extract, 0.5% peptone, 0.02% soluble starch, 1.5% agar)에서 생육시킨 후 요오드 반응(0.3% Iodine crystal, 0.7% Potassium iodine)으로 α-amylase의 활성 여부를 조사하여 확인하였다.

**Southern hybridization** 요오드 반응으로 검색하여 얻은 recombinant 균주내 *secY* 유전자가 homologous recombination으로 2개가 존재한다는 것을 확인하기 위해 Southern hybridization을 수행하였다.

*B. subtilis*에서 genomic DNA의 분리를 위해 PB2와 recombinant *B. subtilis*를 50 ml의 LB 액체배지에서 8시간 배양 후 3000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 버리고 침전물을 TE(10 mM Tris-cl pH 8.0, 1 mM EDTA) 0.5 ml에 완전히 녹여 lysozyme을 50 µg/ml이 되도록 첨가한 후 37°C water bath에서 30분간 반응시켰다. 그 반응액에 10% SDS 0.5 ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰고 1.8 ml의 5M NaCl와 1.5 ml의 CTAB/NaCl(10% CTAB, 0.7% NaCl)을 첨가하여 천천히 섞은 후 65°C에서 20분간 반응시켜 상온에서 서서히 식혔다. 완전히 식힌 반응액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol(24 : 1) 용액을 넣고 천천히 섞은 후 3500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 시험관에 옮겼다. 100% ethanol을 첨가한 후 유리봉으로 spool out 하여 70% ethanol로 세척한 후 RNase가 함유된 TE buffer(10 mM Tris-cl pH 8.0, 1 mM EDTA) 200 µl에 녹여 사용하였다.

준비된 genomic DNA를 제한효소 *Sma*I으로 완전히 자른 후 capillary blotting으로 nylon membrane에 transfer 하였다. Membrane에 transfer한 DNA는 120°C에서 30분간 baking하여 고정하였다. Probe는 pDH32 vector를 *Sma*I으로 처리하여 나온 1,459 bp(117 bp의

*amyE* 유전자 뒷부분과 pC194 *cat* 유전자 부위를 포함) DNA 단편을 정제한 후 Dig-random primer labeling kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였다. 68°C에서 hybridization한 후 Dig system에서 추천하는 방법에 따라 colormetric detection을 수행하여 확인하였다.

#### SecY 유전자 증폭 조절에 따라 분비되는 단백질의 분석

**Bradford Assay** *B. subtilis*의 PB2와 형질전환체 KH1, KH2의 단백질 분비정도를 비교 검증하기 위하여 다음과 같이 Bradford 분석법(19, 20)을 사용하여 분비되는 단백질의 양을 분석하였다.

20 ml의 LB 액체배지에 *B. subtilis* wild type(PB2)과 형질전환체(KH1, KH2)들을 밤새 배양하고 배양액을 LB 액체배지에 10% 접종하여 각 시간별로 생육을 OD<sub>600</sub>에서 측정하였다. 배양액을 원심분리하여 상등액 100 µl와 1 ml의 Coomassie Blue solution(0.05 g의 Coomassie brilliant blue G를 95% 에탄올 25 ml에 녹인 후 85% phosphoric acid 50 ml을 더하여 전체양이 500 ml이 되도록 한다.)을 넣어 vortex하여 2분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 양은 BSA(Bovine Serum Albumin)을 이용하여 standard curve를 작성한 후 계산하였다.

**SDS-PAGE를 이용한 분비 단백질의 분석** 50 ml의 LB 액체배지에 각각 PB2, KH1, KH2를 10시간 이상 배양하면서 세포의 생장을 측정하여 정지기까지 배양하고 1 ml의 배양액을 eppendorf tube에서 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 상층액인 세포외액을 새 tube에 옮겨 균체를 모두 제거한 세포외액 1 ml 당 100% TCA(Trichloroacetic Acid) 100 µl를 넣고 얼음에서 30분 이상 방치한 후 원심분리하여 침전된 조단백질을 말린 다음 30 µl의 0.1N NaOH 용액으로 중화시켰다. 그 다음 4×loading buffer(20% SDS, 1 ml ; β-mercaptoethanol, 0.5 ml ; 1M Tris-Cl, pH 7.0, 0.5 ml ; glycerol, 1 ml ; 0.5% BPB, 0.5 ml) 10 µl를 혼합하여 끓인 후 전기영동용 시료로 사용하였다(21). 준비된 단백질 sample을 7% SDS-polyacrylamide gel에 각 well당 20 µl와 10 µl씩을 loading하여 30A, 600V의 세기로 약 30분 동안 Xcell II Mini-Cell kit(novex)를 사용하여 수직 전기영동하여 0.05% Coomassie Blue R-250 solution (Coomassie Blue R-250 0.05% ; Methanol 50% ; Acetic Acid 10% ; 물 40%)으로 염색하여 세포외 단백질 band의 양을 비교 확인하였다.

#### 결과 및 고찰

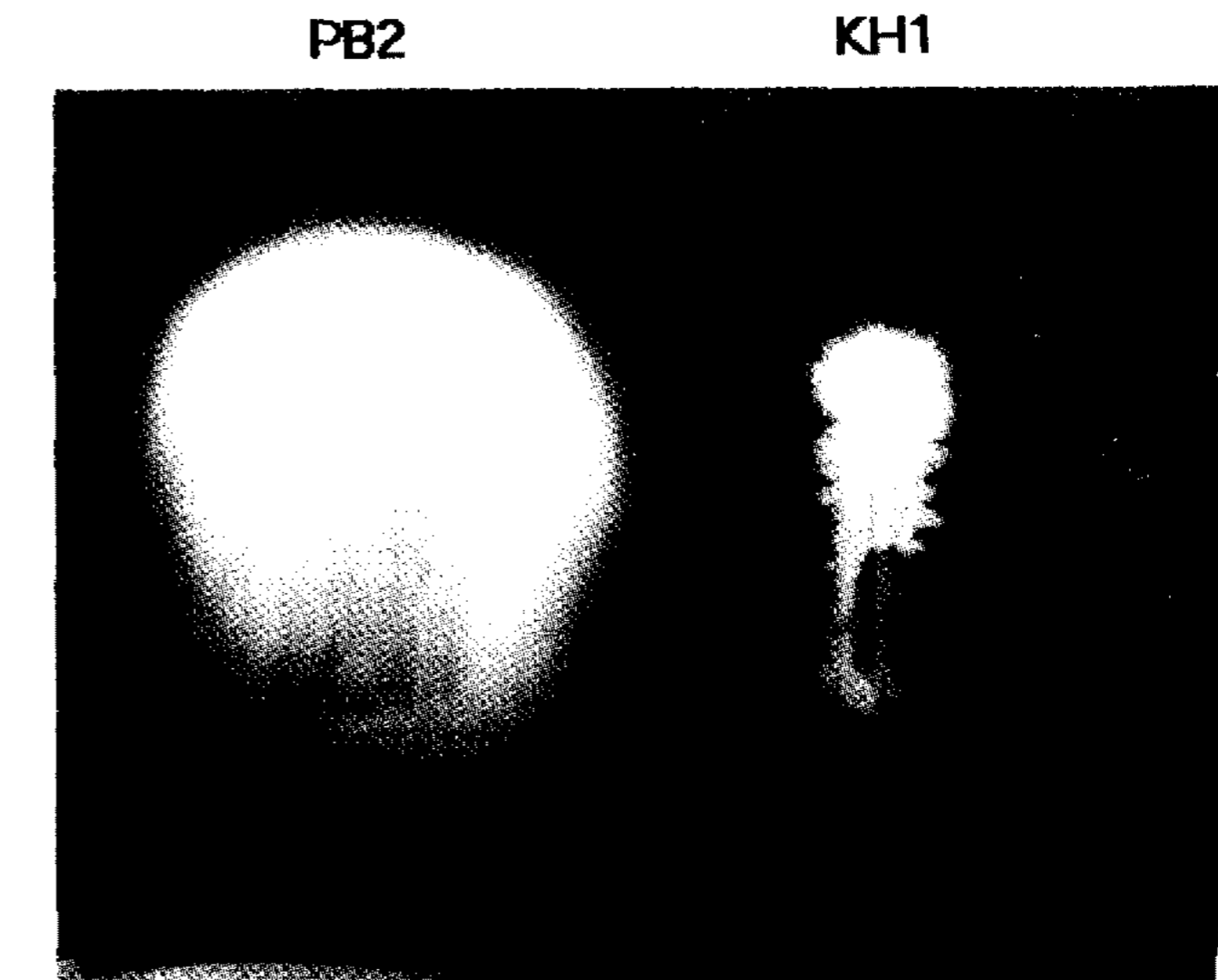
##### *secY* 유전자 증폭 세포의 제조

Chromosomal integration vector인 pDH32는 *B. su-*

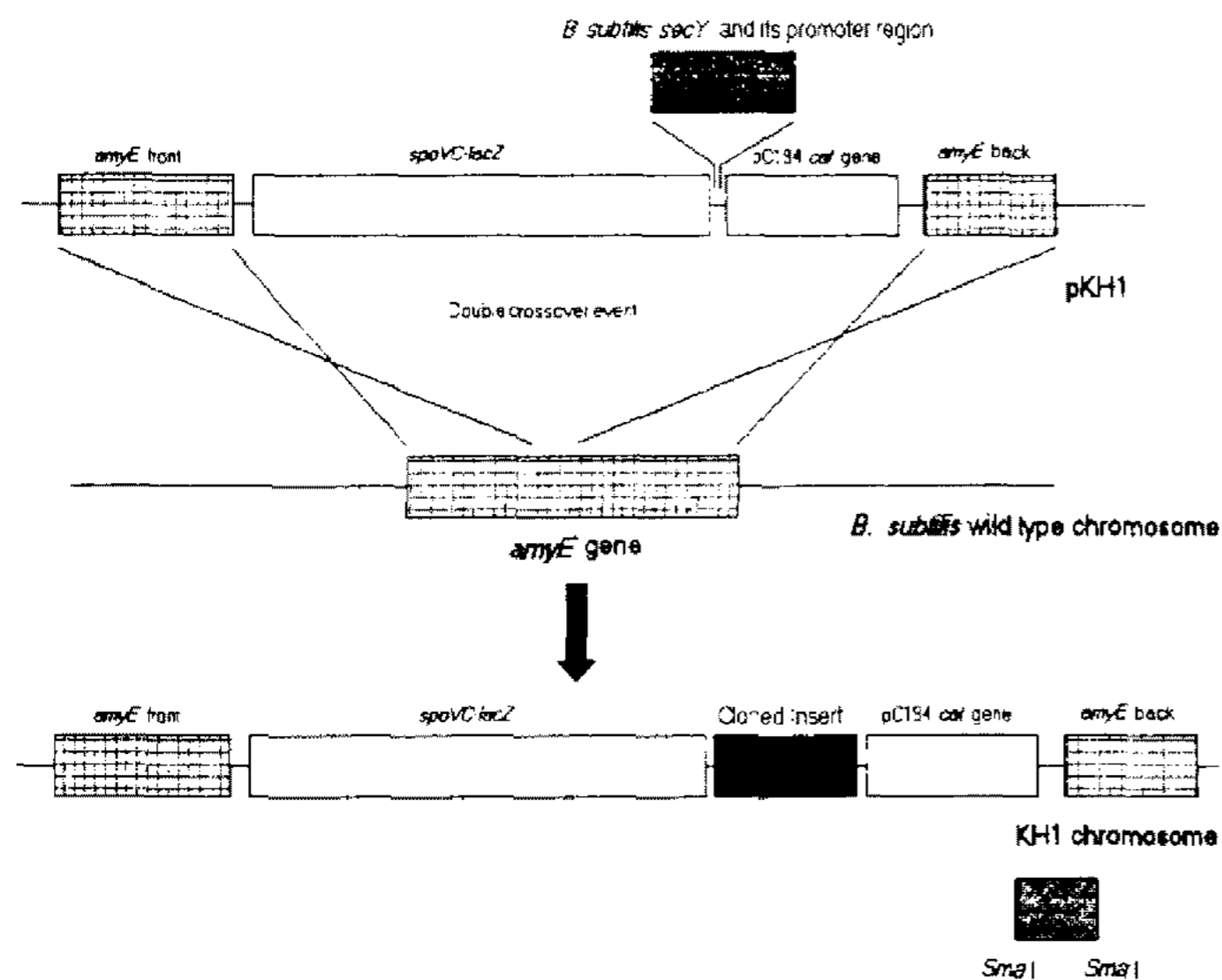
*B. subtilis*의  $\alpha$ -amylase 구조 유전자인 *amyE*와 selection marker로 chloramphenicol 내성 유전자(*cat*)가 포함되어 있어 *B. subtilis*에 형질전환시 *B. subtilis*의 *amyE* 유전자부위에서 homologous recombination이 일어나 *amyE* 유전자를 불활성화 시키면서 *cat* 유전자도 함께 삽입되게 된다. 이러한 single copy plasmid인 pDH32에 promoter 지역을 포함하는 *secY* 유전자를 subcloning 하여 *B. subtilis* wild type인 PB2에 형질전환하였을 때 chromosomal DNA의 *amyE* 유전자에 homologous recombination으로 삽입되어 *amyE* 유전자를 불활성화 시키면서 *secY* 유전자를 두개 갖게 되므로(Fig. 2) chloramphenicol이 함유된 배지에서 배양하여 선택된 형질전환체를 starch 배지에서 생육시켰을 때  $\alpha$ -amylase를 분비하지 못하여 요오드 반응으로 투명환이 생성되지 않음으로써 *amyE* 유전자가 불활성화된 recombinant를 얻었다(Fig. 3).

Starch 배지에서 확인한 homologous recombinant의 좀 더 확실한 검증을 위하여 Southern hybridization을 수행하였다. Probe 및 positive control은 pDH32 vector 내의 *amyE* 유전자의 뒷부분 일부가 포함된 1,459 bp의 *Sma*I 단편을 사용하였고 이 결과 recombinant인 KH1은 probe와 같은 위치인 1.46 kb 부근에서 그리고 wild type인 PB2는 다른 위치인 약 8 kb 부근에서 band가 나타남을 볼 수 있었다(Fig. 4). KH1은 homologous recombination으로 인해 vector의 일부가 삽입되었으며

probe로 사용한 pDH32 vector의 *amyE* 유전자의 뒷부분 일부와 pC194 *cat* gene의 일부분을 포함하게 되었다. 그러므로 같은 제한효소인 *Sma*I으로 처리하였을 때 probe와 같은 크기의 DNA 단편을 포함하게 되므로 positive control인 probe와 같은 위치에서 강하게 detection 되어 homologous recombination을 확인할 수 있었고 PB2는 *Sma*I으로 잘랐을 때 *amyE* 유전자내에 존재하는 *Sma*I site로 인해 두개로 잘라진 *amyE* 유전자

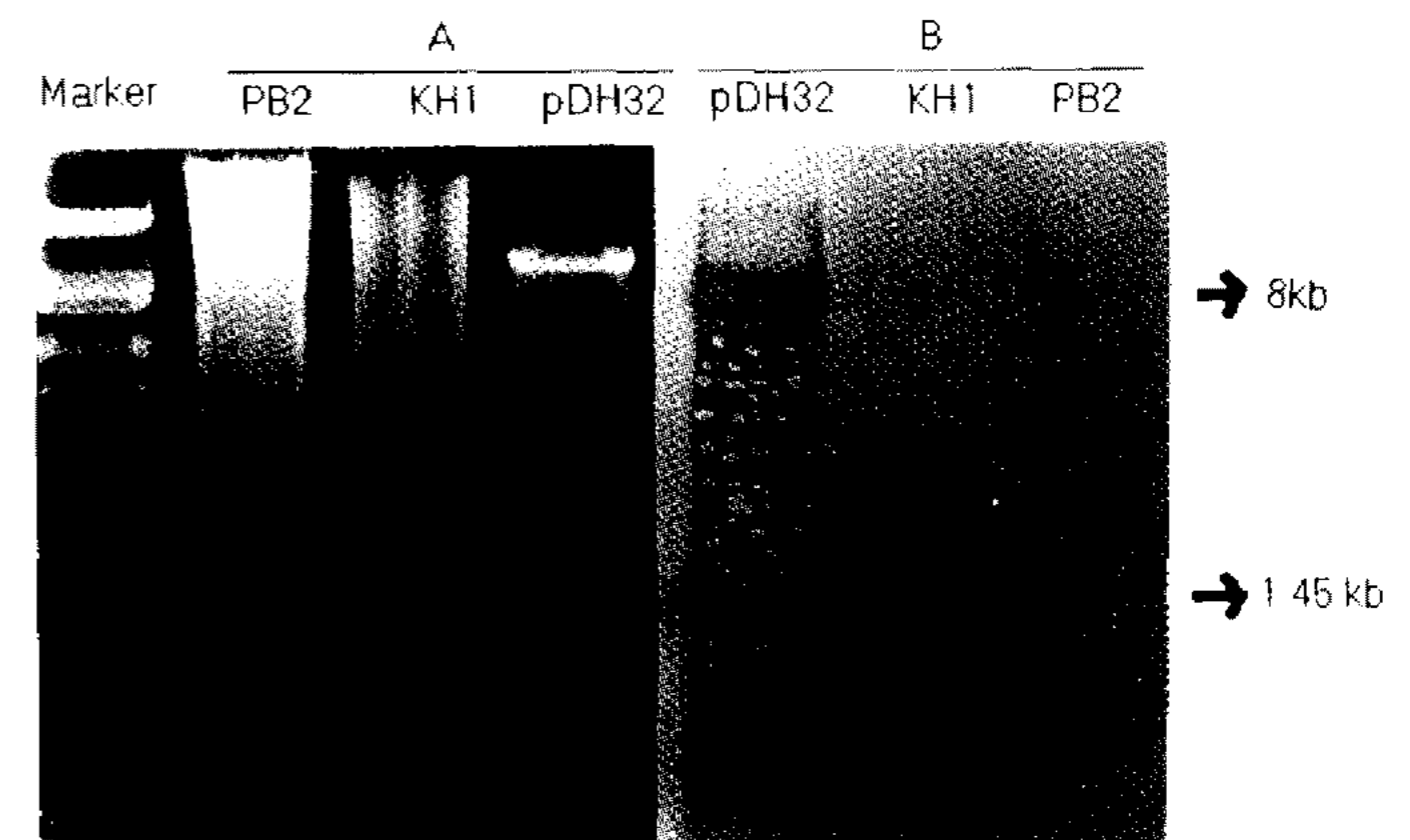


**Fig. 3.** Comparison of  $\alpha$ -amylase activity of *B. subtilis* wild type PB2 with transformant KH1 on starch agar medium. *B. subtilis* PB2 and KH1 were grown on LB-agar medium supplemented with 0.02% soluble starch. After overnight growing, I<sub>2</sub>-KI solution was overlaid on starch agar medium. PB2 showed clear large halo but KH1 did not. It was revealed that PB2 had a normal *amyE* gene but KH1 contained disrupted *amyE* gene due to integration of pKH1 via homologous recombination.



**Fig. 2.** Homologous recombination of pKH1 and *B. subtilis* PB2.

*B. subtilis secY* and its promoter region was subcloned into pDH32 and this recombinant plasmid was named pKH1. pKH1 was integrated into *amyE* gene in PB2 by homologous recombination. After integration, transformant could be selected by chloramphenicol resistancy and by losing  $\alpha$ -amylase activity. The area of *Sma*I-digested fragment used as a probe in Southern hybridization is represented by hatched box.



**Fig. 4.** Confirmation of chromosomal integration of pKH1 via homologous recombination.

The chromosomal DNA of *B. subtilis* PB2 and KH1 were digested with *Sma*I and hybridized with 1.45 kb *Sma*I-digested fragment from pDH32. A is agarose gel electrophoresis pattern and B is Southern hybridization pattern. *Bst*EII-digested  $\lambda$  DNA was used as a size marker.

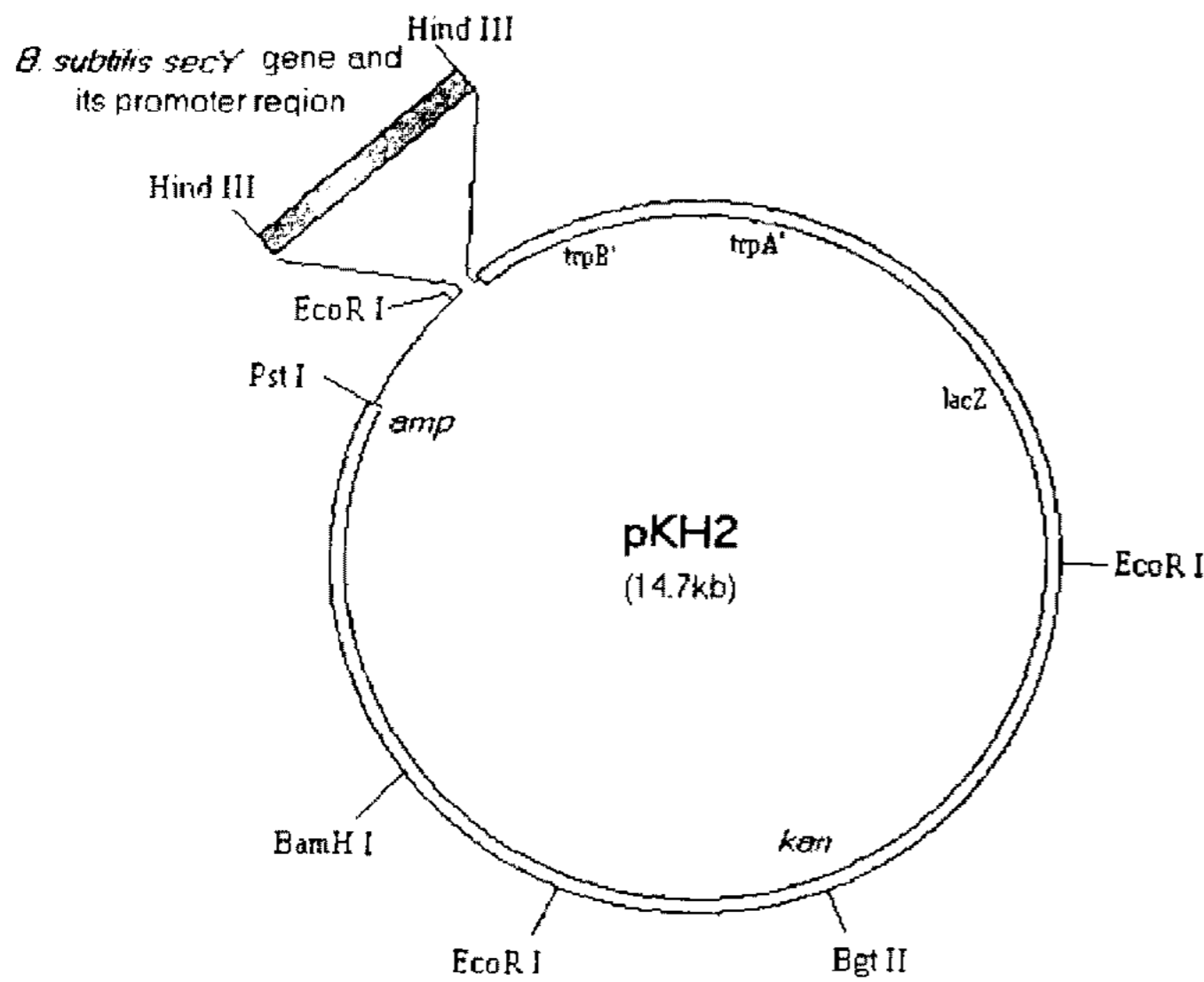


Fig. 5. Restriction map of pKH2.

*B. subtilis secY* gene and its promoter region (2.2 kb *Hind*III fragment) was subcloned into the unique *Hind*III site of low copy plasmid vector pCED6 to generate plasmid pKH2. *B. subtilis* harboring pKH2 was named KH2.

중 1.459 kb의 probe에 포함된 120 bp의 *amyE* 유전자의 뒷부분으로 인해 positive control 및 KH1과는 다른 위치에서 detection되는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 제작된 KH1 세포는 chromosomal DNA 상에 두 개의 *secY* 유전자를 갖게 되었음을 확인할 수 있었다.

또 다른 recombinant KH2는 *B. subtilis*에서 self replication이 가능한 *E. coli-B. subtilis* shuttle vector pCED6에 promoter 지역을 포함하는 *secY* 유전자를 삽입하여(pKH2) 이를 *E. coli*에서 확인한 후 제작된 pKH2 plasmid를 PB2에 형질전환하여 얻었다. 형질전환체는 pKH2 plasmid DNA를 추출하여 0.8% agarose gel에서 확인하였으며 KH1보다는 많은 수의 *secY* 유전자를 가진 세포가 제조되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 5).

### 분비 단백질의 분석

자연적인 분비 기작을 가진 *B. subtilis*에서 SecY 단백질 유전자의 copy수 변화에 따른 단백질 분비 정도를 조사하기 위해 *B. subtilis* wild type인 PB2와 제작한 *secY* 유전자 증폭 조절 세포 KH1과 KH2에서 *secY* 유전자 발현에 따른 extracellular protein의 양을 Bradford 방법과 SDS-PAGE를 사용하여 세포의 분비단백질 전체를 비교하였다.

6시간 까지 세포를 배양하면서 분비단백질의 양을 Bradford 법으로 측정된 결과 KH1은 6시간에서 7시간 사이에서, KH2는 11시간에서 12시간 사이에서 단백질 분비가 급속히 증가하였으며 대조군 PB2에 비해 KH1, KH2 모두 분비되는 단백질의 양이 많음을 볼 수 있었다. 특히 KH1은 homologous recombination으로

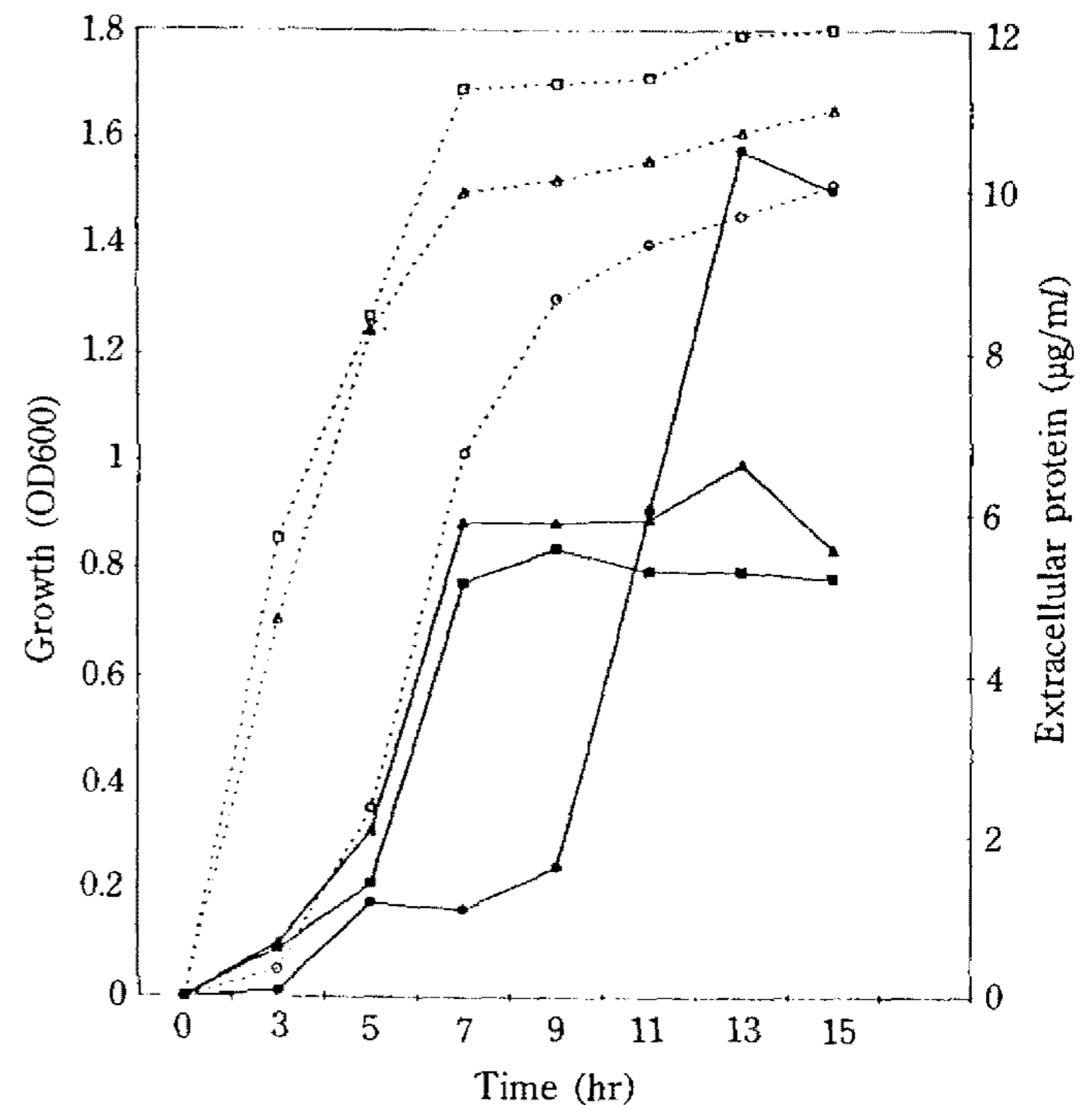


Fig. 6. The comparison of extracellular protein secretion during growth of wild type PB2, and *secY* amplified cell KH1 and KH2.

Total extracellular protein excreted into the medium was monitored using Bradford assay. KH1 containing two-copies of *secY*, secreted extracellular protein slightly more than wild type PB2. However, KH2 containing multi-*secY* in the low copy number vector pKH2 excreted significant amount of extracellular proteins than PB2 or KH1 in the late logarithmic growth phase. Empty symbol is for the growth and filled symbol is for the total extracellular protein.

—□—, —■—, PB2; —△—, —▲—, KH1; —○—, —●—, KH2

*amyE* 유전자가 불활성화되어  $\alpha$ -amylase를 분비하지 못함에도 불구하고 PB2보다 많은 양의 단백질을 분비하는 것을 볼 수 있었고 KH2는 좀 더 많은 수의 *secY* 유전자 증폭으로 인해 PB2와 KH1보다도 월등히 많은 양의 단백질을 분비함을 확인할 수 있었다. 아울러 KH2는 여러번의 반복실험 결과 PB2나 KH1보다 세포의 느린 성장을 보여 이는 *secY*의 overexpression이 세포의 성장에 부담을 주는 영향을 미친다는 본 연구 이전의 연구결과와 일치함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

SDS-PAGE를 이용하여 배지내의 extracellular protein을 본 결과 KH1과 KH2에서 분비되는 모든 단백질의 양이 전체적으로 증가하여 *secY* 유전자의 증폭에 따른 분비 단백질양의 증가는 어느 특정 단백질의 분비에만 영향을 미치는 것이 아니라 분비되는 모든 단백질의 양을 증가 시키므로 유용 이종 단백질 생산을 위한 숙주균으로의 활용 가능성을 높일 수 있는 계기가 되었고 증가되는 분비단백질의 양은 Bradford 방법에서 측정된 것과 마찬가지로 야생균주인 PB2보다는 *secY* 유전자가 2개로 증가된 KH1이, KH1보다는 *secY* 유전

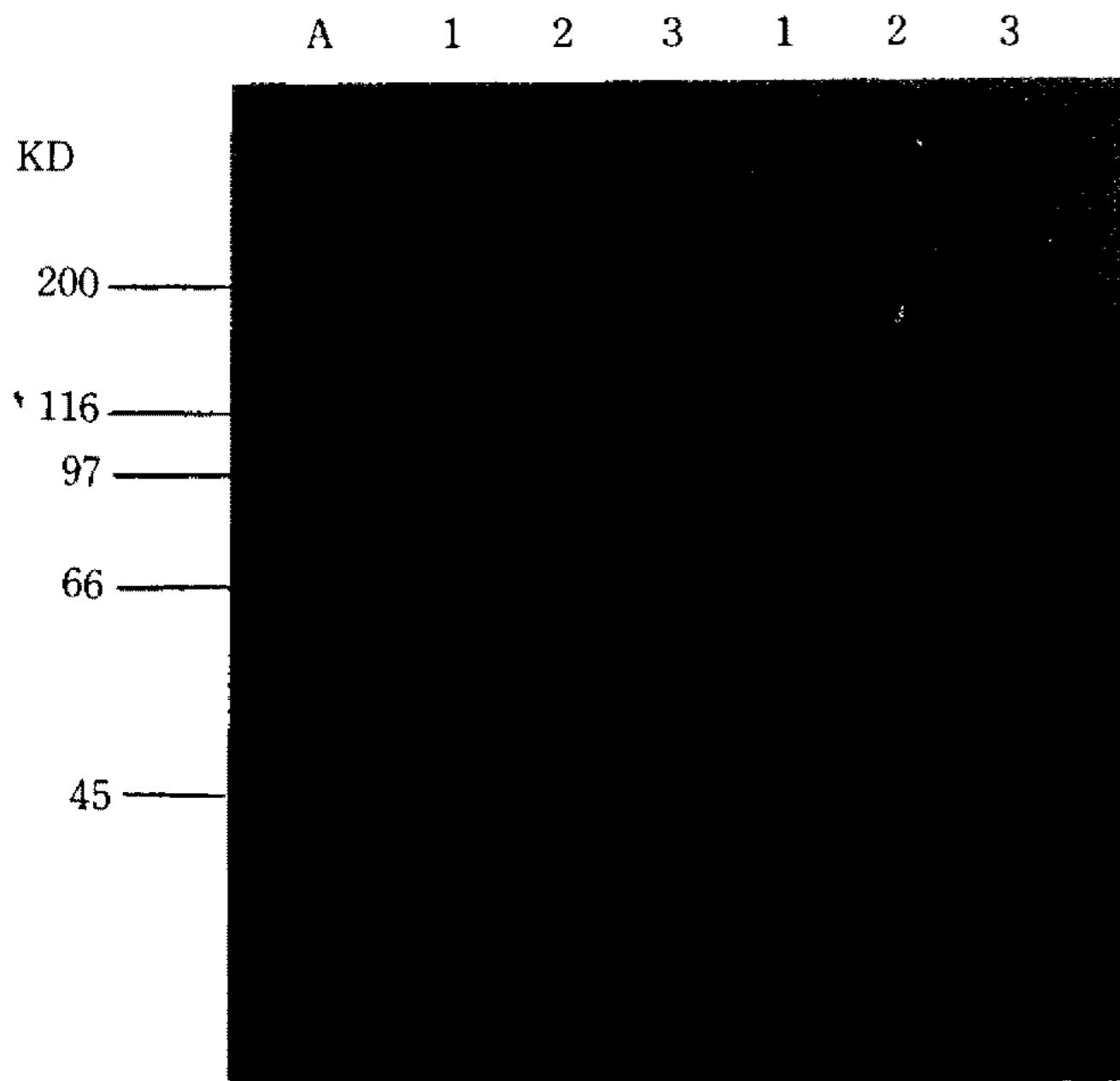


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of the total extracellular protein from PB2, KH1, and KH2.

Crude extract of extracellular protein were prepared after 10 hr growing and 1 ml of centrifuged supernatant was electrophoresed on a 7% SDS-PAGE gel in the presence of the mercaptoethanol.

Lane A: molecular weight marker, lane 1: *B. subtilis* wild type PB2, lane 2: recombinant KH1, lane 3: transformant KH2.

자가 다수로 존재하는 KH2에서 분비단백질의 양이 증가하는 것을 전기영동상 나타나는 band pattern으로 확인 할 수 있었다(Fig. 7).

이러한 결과를 통해 *E. coli*에서 단백질 분비 기구 중 rate-limiting한 부분으로 알려졌던 SecY가 그람 양성균인 *B. subtilis*에서도 단백질 분비에 중요한 역할을 한다는 것을 최초로 확인할 수 있었으며 SecY 단백질 유전자의 발현을 조절할 수 있는 세포의 제조로 secY 유전자의 발현정도에 따라 단백질 분비 능력의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이와 같은 현상의 발견은 앞으로 *B. subtilis*를 유용 단백질 생산을 위한 균주로 개발하는데 큰 도움을 주게 될 것으로 생각된다.

### 요 약

그람음성균인 *E. coli*에서 단백질이 세포막을 통과할 때 protein translocator의 역할과 단백질 분비기구 중 rate-limiting할 것이라고 알려진 SecY 단백질을 유전자를 그람양성균으로 자연적인 분비 체계를 갖고 있는 *B. subtilis*를 대상으로 SecY의 유전자 증폭에 따라 분비 단백질이 분비되는 것을 추적 연구 하였다.

secY 유전자의 증폭을 위해 두개의 secY 유전자를 갖는 세포와 low copy 수의(10개 미만) secY 유전자를 갖는 유전자 조절 세포를 제조 하였고 Bradford 분석

법과 SDS-PAGE를 이용한 실험에서 secY 유전자의 숫자에 따라 분비되는 단백질의 양이 다름을 알 수 있었다. 그 결과 low copy number vector를 이용해 제조된 secY 유전자 조절 세포가 homologous recombination으로 *B. subtilis*의 chromosomal DNA내에 2개의 secY 유전자가 포함된 세포나 원래 한개의 secY 유전자만을 갖는 wild type과 비교하여 가장 많은 양의 단백질을 분비함을 알 수 있었으며 SDS-PAGE를 통해 분비되는 단백질을 분리하여 비교하여 본 결과 분비되는 모든 단백질의 양이 증가함을 알 수 있었다. 이로서 secY가 그람 양성균인 *B. subtilis*에서도 대장균에서처럼 단백질 분비에서 중요한 역할을 하고 있음을 최초로 확인하였다. 이러한 연구결과는 *B. subtilis*의 secY 유전자 수준의 조절 세포를 이용하여 산업적으로 유용한 단백질의 세포외 분비를 증대 시킬 수 있는 숙주균으로의 활용이 기대된다고 하겠다.

### 감사의 말

이 연구는 한국과학 재단(KOSEF NO. 931-0500-009-2)과 과학재단 지원 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구센터)의 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Chen, L. and P.C. Tai. 1985. ATP is essential for protein translocation into *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 4384-4388.
2. Lill, R., K. Cunningham, L.A. Brundage, K. Ito, D. Oliver, and W. Wickner. 1989. SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **8**: 961-966.
3. Gardel, S.C., S. Benson, J. Hunt, S. Michaelis, and J. Beckwith. 1987. SecD, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 1286-1290.
4. Gardel, S.C., K. Johnson, and J. Beckwith. 1990. The secD locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO. J.* **9**: 3209-3216.
5. Ito, K. 1992. SecY and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation system. *Mol. Microbiol.* **6**: 2423-2428.
6. Ito, K. 1984. Identification of the secY gene product involved in protein export in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 204-208.
7. Shiba, K., K. Ito, and T. Yura. 1984. Mutation that suppresses the protein export defect of the secY mutation and causes cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 696-701.
8. Shiba, K., K. Ito, T. Yura, and D.P. Cerretti. 1984. A defined mutation in the protein operon of *Escheri-*

- chia coli*: Isolation and characterization of a new temperature-sensitive *secY* mutant. *EMBO J.* **3**: 631-635.
9. Akiyama, Y. and K. Ito. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6**: 3465-3470.
  10. Watanabe, M. and G. Blobel. 1989. Site-specific antibodies against the PrlA (SecY) protein of *Escherichia coli* inhibit protein export by interfering with plasma membrane binding of preprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1895-1899.
  11. Bieker, K.L. and T.J. Silhavy. 1989. PrlA is important for the translocation of exported of protein across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 968-972.
  12. Suh, J.-W., S.A. Boylan, S.M. Thomas, K.M. Dolan, D.B. Oliver, and C.W. Price. 1990. Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: Evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Molecular Microbiol.* **4**: 305-314.
  13. Suh, J.W., S.A. Boylan, S.H. Oh, and C.W. Price. 1996. Genetic and transcriptional organization of the *Bacillus subtilis* *spe-α* region. *Gene* **169**: 17-23.
  14. Piggot, P.J. 1973. Mapping of asporogenous mutations of *Bacillus subtilis*: a minimum estimate of the number of sporulation operons. *J. Bacteriol.* **114**: 1241-1253.
  15. Perego, M. Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.L. and Losick, R. (Eds), *Bacillus subtilis* and other gram positive bacterial. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1993. Pp. 615-624S.
  16. Donnelly, C.E. and A.L. Sonenshein. 1984. Promoter-probe plasmid for *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **157**: 965-967.
  17. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  18. Sadaie, Y., and T. Kata. 1983. Formation of competent *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **153**: 813-821.
  19. 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.
  20. Spector, T. 1978. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. *Anal. Biochem.* **86**: 142-146.
  21. Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. Protein Method. Wiley-Liss Ltd.

(Received 10 December 1995)