

토양 metagenome library로부터 혈전용해효소의 탐색

이선이 · 김보혜 · 강주형 · 조효진 · 공은희¹ · 문상욱² · 김영진 · 안순철*

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학 교실, ¹고신대학교병원 가정의학과, ²(주)퍼멘텍

Received January 31, 2006 / Accepted March 6, 2006

Screening of Fibrinolytic Enzymes from Soil Metagenome Library. Sun-Yi Lee, Bo-Hye Kim, Ju-Hyung Kang, Hyo-Jin Cho, Eun-Hee Kong¹, Sang-Wook Moon², Yeong-Jin Kim and Soon-Cheol Ahn*. *Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, Busan 602-739, Korea, ¹Department of Family Medicine, Kosin University Gospel Hospital, Busan 602-702, Korea, ²Fermentech Co. Ltd., Technology Innovation Center, Cheju National University, Ara 1-Dong, Cheju 690-756, Korea* – Fibrin clots of blood vessels are one of the serious factor caused cardiovascular disease. The development of a antithrombotic and thrombolysis solvent is necessary to prevent and treat these diseases. It has been reported that a strong fibrin-specific fibrinolytic enzyme was produced from a Korean fermented soybean paste similar to Japanese miso. We have been screened the known or novel fibrinolytic enzymes by activity-based and sequence-based screening from soil DNA metagenome library containing all kinds of environmental genomic DNA. The activity-based screening was determined the protease activity on 0.5% skim milk. For sequence-based screening, we designed a set of primer expanding gene sequence of fibrinolytic enzyme, performed PCR and selected clones showing the expected size of amplicons from metagenome library. Transformation of the gene encoding fibrinolytic enzyme was carried out with commercial vectors and their transformants were selected. Finally, we found 15 positive clones from metagenome library. Then each of sequences were analyzed and identified as similar or known the clones of nattokinase. We are going to perform full sequence of each clones, ligate with expression vector, transform into competent cells and then determine activity of expressed enzymes.

Key words – Fibrin, fibrinolytic, soil metagenome, screening, protease

혈전(fibrin)은 체내 상처들에 의한 혈액의 손실을 방지하기 위해 혈액을 구성하는 성분 중의 하나인 fibrinogen이 혈액 내의 활성화된 thrombin에 의하여 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성된다. 그러나 상처회복 후에도 분해되지 않고 혈관을 순회하게 되면 뇌혈관과 같은 아주 작은 모세혈관 벽에 잉여 혈전들이 침착하여 혈액의 흐름을 방해함으로써 혈전증(thrombosis)인 뇌경색, 심근경색 등 여러 가지 혈관에 관련된 질병을 유발시키게 된다[8]. 혈관에 침착되어 있는 혈전을 용해시켜 원활한 혈액순환을 돕는 물질로서는 혈전을 직접 용해시키는 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)와 혈액 중의 plasminogen을 활성화하여, 이미 생성된 plasmin으로 하여금 혈전을 분해시키도록 하는 plasminogen activator의 두 종류이며, 실제 사용되고 있는 치료제로는 streptokinase, urokinase, tissue-type plasminogen activator (tPA) 등이 있으나 비경제적이고, 반감기가 짧으며 urokinase를 제외하고는 경구 투여가 어려운 문제점을 가지고 있다[3,13].

따라서 현재 지렁이, 뱀 그리고 거머리 등을 대상으로 혈

전 용해물질의 분리에 대한 연구들이 수행되고 있으며, 이미 일본에서는 중풍 치료에 사용되어왔던 지렁이로부터 6가지의 혈전용해효소(lumbrikinase)를 분리하여 경구용 치료제로 만들었으나, lumbrikinase 또한 반감기가 짧고 가격이 비싼 단점이 있다[7,11]. 이에 따라 식품섭취를 통해 뇌졸중, 심근경색, 혈전증 등을 미연에 방지하거나 개선시킬 수 있는 새로운 물질을 찾기 위한 노력이 진행 중이다. 최근 전통 발효 식품에서 다수 분리되는 *Bacillus* 속의 균주들이 분비하는 serine protease, 즉 subtilisin이 단백질 분해능이 매우 뛰어나 가장 큰 대안으로 연구되고 있는 가운데 일본의 전통발효 식품인 natto로부터 분리된 *Bacillus subtilis* var. *natto*가 생산하는 subtilisin 즉 nattokinase가 fibrin 분해능이 뛰어날 뿐 아니라 antiplasminic agent의 저해를 받지 않는 것으로 보고된 바 있다[10].

한편, 자연계로부터 새로운 미생물을 분리, 배양 및 탐색하는 기술이 꾸준히 개발되고 있음에도 불구하고 기술적인 한계로 인해 지금까지 알려진 것은 지구상에 존재하는 전체 미생물 중 극히 일부분인 1% 미만에 지나지 않으며 나머지 약 99%의 미생물은 아직까지 미 발견 상태인 채로 자연계에 존재하는 것으로 추정되고 있다[5]. 또한 토양, 해수, 갯벌, 하천, 대기 그리고 가축의 대장 등 다양한 환경 속에 존재하는

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7735, Fax : +82-51-243-2259

E-mail : ahnsc@pusan.ac.krj

이들 미 발견 미생물들은 대부분 실험실에서 분리, 배양하기가 어려운 난 배양성 미생물이지만 유용물질로의 이용 가능성이 많으므로 이미 1990년대 초부터 항생물질을 생산하는 미생물의 유전체 정보를 활용한 생합성 저작 연구를 통한 새로운 생리활성물질의 개발이 시도되어 왔다[1,6,12].

따라서 토양과 같은 자연 환경으로부터 기존의 protease인 subtilisin과 같은 유용 유전자의 분리에 대한 보고[4,9,14]가 많기 때문에 본 연구에서는 산업적, 의학적으로 유용한 효소 자원인 새로운 혈전용해효소를 전통식품에서 분리하는 것과 달리 지금까지 배양되지 않은 다양한 미생물의 유전자를 포함하고 있는 자연 환경인 토양으로부터 혈전용해효소를 탐색하고자 metagenomics 기법을 적용하여 soil metagenome library를 제작하고, activity-based screening과 sequence-based screening을 각각 실시하였다.

토양으로부터 total genomic DNA를 분리하기 위하여 2003년 12월에 금정산에서 각각 다른 장소의 인적이 드문 큰 바위 밑, 오래된 나무뿌리 근처 등 지표에서 30~50 cm 아래로부터 2개의 토양시료를 채취하였고, 2004년 3월에는 금정산의 4곳의 다른 장소에서 동일한 방법으로 토양시료를 채취하여 그늘지고 통풍이 잘 되는 곳에서 하루 건조시킨 후, 거즈로 작은 돌과 나무뿌리, 나뭇잎 등의 이물질을 제거하여 사용하였다.

5 g의 토양시료를 DNA extraction buffer(100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1.5 M NaCl, 100 mM sodium EDTA [pH 8.0], 1% CTAB, 100 mM sodium phosphate [pH 8.0]) 13.5 ml와 50 μ l proteinase K(20 mg/ml)로 현탁한 후, 37°C에서 30분간 교반하여 혼합해 주고, 10% SDS 3 ml을 첨가하여 65°C에서 2시간 반응시킨 다음, 원심분리(4,000 rpm, 10 min, 4°C) 하였다. 계속해서 humic acid를 제거하기 위해 30% PEG 8,000을 포함한 1.6 M NaCl 용액을 전체 부피의 1/2 만큼 넣고 상온에서 2시간 반응시켜 원심분리 하였으며, 침전물을 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA [pH 8.0]) 1 ml로 재현탁하고 3M potassium acetate 200 μ l를 첨가하여 얼음에서 5분 동안 정치시켰다. 원심분리 후, 동량의 phenol/chloroform/ isoamylalcohol(25/24/1)를 넣고 vortex 한 뒤, 원심분리하여 상등액 0.6배의 isopropanol을 넣고 2시간 동안 상온에서 침전시켰다. 원심분리 후, 침전물을 증류수 500 μ l에 녹이고 DNA의 농도를 측정하였다.

분리된 genomic DNA를 제한효소 *Sau3A I*으로 부분 절단한 후, 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 3~7 kb의 DNA 절편을 분획하여 Gel extraction kit(Bioprogen, Daejeon, Korea)로 정제하였다. 분획된 DNA 절편을 insert로 하여 pWHM3 vector의 *Bam*HI site에 ligation 하였다. 토양 genomic DNA 단편이 포함된 재조합 plasmid는 heat shock(42°C)에 의해 *E. coli* DH5a competent cell에 형질전환시켰고, ampicillin(50 μ g/ml, Sigma, MO, USA), IPTG(20 μ

M, Sigma, USA) 그리고 X-gal(40 μ g/ml, Sigma, MO, USA) 등이 포함된 LB plate 상에서 재조합 colony를 선별하였다.

이상의 방법으로 토양 metagenome library (Korea Soil Library, KSL)를 제작한 결과, 토양 DNA 1 μ g당 약 300여 개의 clone을 얻어 현재 약 20,000여 개의 metagenome library가 확보되었으며 모든 clone들은 대장균에서 발현되는 유용 유전자원을 확보하기 위하여 high throughput screening (HTS)에 적용이 가능하도록 96 well plate에서 배양한 후 20% glycerol을 첨가하여 -70°C에 보관하였다. 또한 각 well plate의 clone을 따로 모아 clone pool의 형태로 하여 KSL1~133, 140, 141, 142로 각각 명명하여 총 136개의 clone pool을 20% glycerol이 함유된 vial에 보관하였다.

Metagenome library 중 혈전용해 활성을 가진 형질전환주에 대한 효율적인 screening을 위해 우선 단백질 분해 활성을 가진 형질전환주를 선별하고자 0.5% skim milk가 첨가된 LB plate에 tooth-pick로 접종하고 37°C에서 24시간 동안 항온기에서 배양하여 집락 주위에 나타나는 투명환의 생성유무를 기준으로 단백질 분해효소를 생산하는 활성 균주를 선별하였다. 특히, 단백질 분해 활성을 보이는 형질전환주에 대해서는 0.5% skim milk 대신 0.3% fibrin을 기질로 첨가한 LB plate 상에서 동일한 방법으로 혈전용해 활성을 조사하였다[3]. 0.5% skim milk가 포함된 LB plate에 형질전환주를 도말하여 조사한 결과, KSL16-1, KSL16-56, KSL28-76, KSL28-88 등 4개의 clone들이 투명환을 보여 단백질 분해효소를 생산하는 것으로 예상되었지만, 2차 확인 실험에서는 KSL28-76, 28-88 등 2개의 clone에서만 활성의 재현성이 나타났다(Fig. 1). 이에 단백질 분해 활성이 있는 KSL28-76과 KSL28-88 clone의 배양 상등액을 시료로 하여 0.3% fibrin 용액을 기질 [2]로 하여 가수분해 활성을 조사하였으나 fibrin(혈전)분해 활성은 보이지 않았다. 따라서 최종 선별된 KSL28-76과 KSL28-88 clone은 skim milk에 대한 단백질 분해 활성은 보였지만, 혈전용해 활성은 보이지 않는 것으로 보아 타 기질에 대한 추가적인 활성 조사가 필요할 것으로 생각된다.

한편, 새로운 혈전용해효소 유전자를 탐색하기 위해 기존의 nattokinase와 유사한 serine protease(subtilisin)를 생산하는 것으로 알려진 *Bacillus subtilis*, *B. subtilis* sp. *natto*, *Brevibacillus laterosporus*, *Geobacillus stearothermophilus*의 protease를 encoding하는 sequence를 alignment하여 conserved 된 부분을 확인한 후(Fig. 2), Pro 44F1(5'-CGC-WGC-CGG-AAA-CGA-AGG-TTC-3')와 Pro 419R1(5'-ACG-TGA-GGA-GTC-GCC-ATK-GAC-G-3'), Pro 771F2 (5'-CGT-TAA-TCT-TTA-CGA-TGG-CGT-TC-3')와 Pro 998R2(5'-CCG-CTG-TCG-ATA-ACM-GCT-AC-3') 등 2종류의 primer set를 제작하였다. PCR 반응을 위하여 총 20 μ l의 reaction mixture를 준비하였으며, 이 반응액은 약 100 ng의 KSL cell suspension, 20 nM primer, 2.5 mM dNTPs, 1U *Taq* polymerase(Solgent,

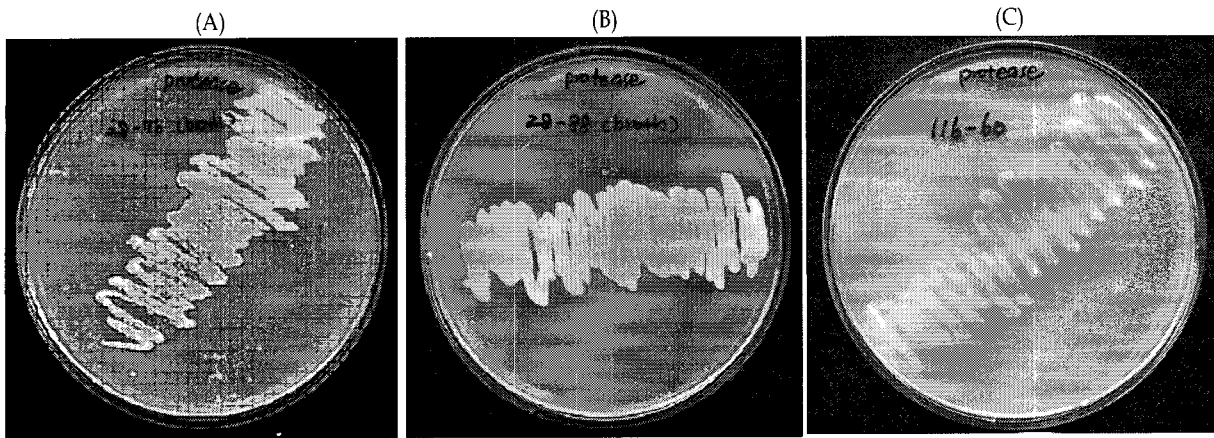


Fig. 1. Activity-based screening from metagenomic library on LB agar plate containing 0.5% skim milk. (A) KSL28-76, (B) KSL28-88, (C) KSL116-60 (as negative clone).

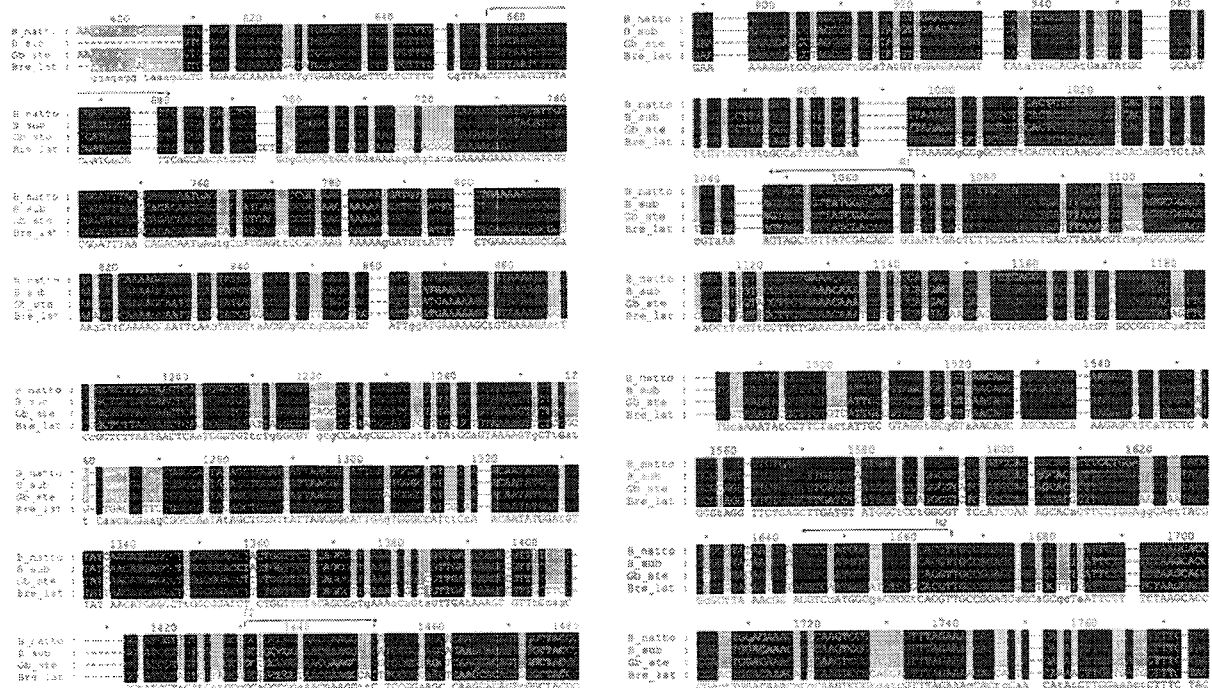


Fig. 2. Sequence alignment of the known proteases for primer design.

Daejeon, Korea), 그리고 10X *Taq* polymerase reaction buffer를 포함하고 있다. 증폭반응은 thermocycler(PTC-100, MJ Research)를 이용하여 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 50 cycle 동안 실시하였다.

혈전용효소와 관련된 유전자에 대한 PCR을 수행하여 각 PCR products를 2% agarose gel에서 전기영동 한 결과, 136개의 KSL 중에서 pro 44F1와 pro 419R1 primer set에 의한 products(376 bp)는 14개, pro 771F2와 pro 998R2 primer set에 의한 products(228 bp)는 6개, 그리고 pro 44F1와 pro 998R2 primer set에 의한 products(955 bp)는 13개를 보인 PCR product의 특이성으로 보아 새로운 유전자의 가능성을

제시하고 있다(Fig. 3). 이 중 가장 많은 수를 확보한 376 bp 크기의 product는 2% agarose gel 전기영동을 실시하여 분리된 각 bands를 정제하였다. 정제된 각 PCR products(50 ng/μl)는 pGEM-T vector(50 ng/μl, Promega, WI, USA)와 3:1의 비율(v/v)로 혼합한 후, 상온에서 1시간 동안 ligation 하였다. 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5a competent cell에 heat shock(42°C, 45 sec)을 이용한 형질전환 법으로 ampicillin(50 μg/ml), X-gal(40 μg/ml) 그리고 IPTG(20 μM)를 함유하고 있는 LB plate에 도말하여 재조합 colony를 선별하였다. 선별된 형질전환주는 다시 ampicillin(50 μg/ml)이 포함되어 있는 LB broth에서 37°C, 150 rpm의 조건으로 18시간

동안 액체배양 하였고 이를 DNA mini prep kit (BioproGen) 을 이용하여 재조합 plasmid DNA를 최종 분리하였다. PCR products의 삽입여부는 pGEM-T vector의 specific restriction enzyme sites인 *Pst* I 과 *Sph* I 을 이용하여 절단한 다음 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 PCR products가 삽입된 것으로 확인된 재조합 plasmid를 선별하였다. 분리된 재조합 plasmid를 기증에 보고된 혈전용해효소 유전자와 비교하기 위하여 pGEM-T vector에서 유래된 T7을 이용하여 DNA 염기서열 분석하였으며, 확보된 염기서열에 대해 clustal W (NCBI, USA) 등의 analytic tools를 이용하여 GenBank database(NCBI, USA)에 등재되어 있는 혈전용해효소의 DNA 염기서열과 비교·분석하였다. 그 결과, 형질 전환주 KSL 3, 10, 16, 18, 39, 47, 48, 50, 79, 97, 140, 141, 142의 염기서열은 기증에 보고된 *Bacillus subtilis* var. *natto* 유전

자의 염기서열과 99% 이상 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 4). 지금까지 혈관 질병에 관련된 치료제로서의 혈전분해효소를 다양한 전통발효식품이나 벌레, 토양 등에서 분리하였으나, 이러한 효소들은 치료제로서 경구투여의 어려움이 있고, 비경제적이며 반감기가 짧은 단점을 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 이러한 단점을 보완할 수 있는 혈전분해효소를 한정된 자원에서 찾기 보다는 다양한 미지의 자원을 포함하고 있는 자연 환경인 토양에서 분리하기 위하여, 무배양법에 의한 metagenome library를 구축하였고 이 library를 바탕으로 혈전용해 효소의 분리를 실시하였다. 비록 분리한 형질전환주는 기증에 알려져 있는 혈전용해효소를 생산하는 유전자와 유사한 결과를 보였지만, 무배양법에 의해 자연 환경의 metagenome으로부터 기존의 효소 작용 및 특성이 다른 natto-kinase 종류의 혈전용해효소를 분리할 수 있는 가능성을

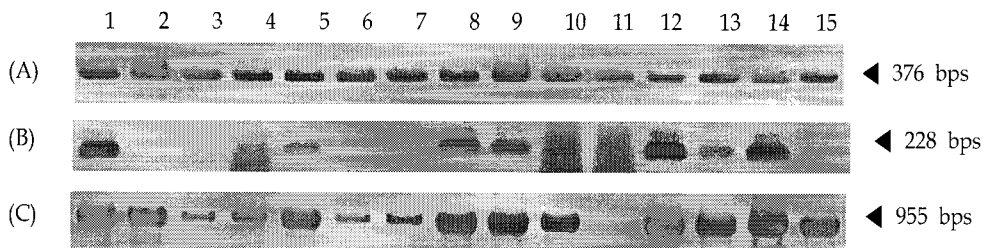


Fig. 3. Sequence-based screening from metagenomic library (KSL) by PCR using the each primer set. (A): Pro 44F1 and Pro 419R1 primer, (B): Pro 771F2 and Pro 998R2 primer, (C): Pro 44F1 and Pro 998R2 primer. Lane 1: *B. subtilis* sp. *natto* as a control, Lane 2: KSL3, Lane 3: KSL10, Lane 4: KSL16, Lane 5: KSL18, Lane 6: KSL39, Lane 7: KSL47, Lane 8: KSL48, Lane 9: KSL50, Lane 10: KSL79, Lane 11: KSL82, Lane 12: KSL97, Lane 13: KSL140, Lane 14: KSL141, Lane 15: KSL142.



Fig. 4. Multiple sequence alignment of transformants and known producer. (A) sequence of KSL 48, (B) sequence of pGEM-T natto-kinase, (C) known natto-kinase sequence of *B. subtilis* var. *natto*.

제시하였다. 이상의 결과를 토대로 하여 이미 확립된 토양 metagenome library에 대한 계속적인 screening 작업을 통해 새로운 혈전용해효소를 탐색하고 있으며, 기존에 확인된 결과에 대해서도 형질전환주가 발현하는 nattokinase에 대한 효소의 과발현 및 정제를 통한 효소의 특성에 대한 조사를 진행할 예정이다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업 (R01-2005-000-11128-0)과 산업자원부 2004년 지역특화기술개발사업 (지역산업공통기술사업 10017672)의 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Allsop, A. E. 1998. New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(5), 530-534.
- Astrup, T. and S. Millertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
- Ehrlich, H. J., N. U. Bang, S. P. Little, S. R. Jaskunas, B. J. Weigel, Lo E. Mattler and C. S. Harms. 1987. Biological properties of a kringless tissue plasminogen activator mutant. *Fibrinolysis* **1**, 75-77.
- Handelsman, J., M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy and R. M. Goodman. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**(10), 245-249.
- Hugenholtz, P. and N. R. Pace. 1996. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. *Trends Biotechnol.* **14**, 190-197.
- Kaerberlein, T., K. Lewis and S. S. Epstein. 2002. Isolating "Uncultivable" microorganism in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**, 1127-1129.
- Lee, H. S., C. K. Yoo, C. S. Lee and S. M. Kang. 2000. Variation of fibrinolytic enzyme activity produced from *Bacillus subtilis* by gene cloning. *Kor. J. App. Microbiol. Biotechnol.* **28**(1), 14-20.
- Lee, S. S., S. M. Kim, U. Y. Park, H. Y. Kim and I. S. Shin. 2002. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**(2), 283-289.
- MacNeil, I. A., C. L. Tiong, C. Minor, P. R. August, T. H. Grossman, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, T. Phillips, S. Narula, R. Sundaramoorthi, A. Tyler, T. Aldredge, H. Long, M. Gilman, D. Holt and M. S. Osburne. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2), 301-308.
- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki and M. Maruyama. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from earthworm, *Lubricus rubellus*. *J. Physiol.* **41**, 461-472.
- Najajima, N., H. Mihara and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Bioact. Biotech. Biochem.* **57**, 1726-1730.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R. M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(6), 2541-2547.
- Sumi, H., M. Maruyama, T. Yoneta and H. Mihara. 1983. Activation of plasma fibrolysis after intrarectal administration of high molecular weight urokinase and its derivative. *Acta Haematol.* **70**, 289-295.
- Torsvik, V., J. Goksoyr and F. L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 782-787.