

Tetrameric β -galactosidase를 이용한 고초균 포자에서의 미생물 표면 발현 모체 선별

김준형^{1*}, 반재구², 김병기³

Screening of Bacterial Surface Display Anchoring Motif Using Tetrameric β -galactosidase in *Bacillus subtilis* Spore

June-Hyung Kim^{1*}, Jae-Gu Pan², and Byung-Gee Kim³

접수: 2011년 5월 17일 / 게재승인: 2011년 6월 3일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Using tetrameric β -galactosidase as a model protein, anchoring motives were screened in *Bacillus subtilis* spore display system. Eleven spore coat proteins were selected considering their expression levels and the location in the spore coat layer. After chromosomal single-copy homologous integration in the *amyE* site of *Bacillus subtilis* chromosome, *cotE* and *cotG* were chosen as possible spore surface anchoring motives with their higher whole cell β -galactosidase activity. PAGE and Western blot of extracted fraction of outer layer of purified spore, which express CotE-LacZ or CotG-LacZ fusion verified the existence of exact size of fusion protein and its location in outer coat layer of purified spore. β -galactosidase activity of spore with CotE-LacZ or CotG-LacZ fusion reached its highest value around 16~20 h of culture time in terms of whole cell and purified spore. After intensive spore purification with lysozyme treatment and renografin treatment, spore of BJH135, which expresses CotE-LacZ, retained only 1~2% of

its whole cell β -galactosidase activity. Whereas spore of BJH136, which has *cotG-lacZ* cassette in the chromosome, retained 10~15% of its whole cell β -galactosidase activity, proving minor perturbation of CotG-LacZ, when incorporated in the spore coat layer of *Bacillus subtilis* compared to CotE-LacZ. Usage of *Bacillus subtilis* WB700, of which 7 proteases are knocked-out and thereby resulting in 99.7% decrease in protease activity of the host, did not prevent the proteolytic degradation of spore surface expressed CotG-LacZ fusion protein.

Keywords: surface display, *Bacillus subtilis*, spore, β -galactosidase

1. 서론

미생물 표면 발현 (Bacterial surface display)은 세포내에서 목적 단백질을 표면 발현 모체에 융합 발현시킨 후 숙주 세포의 단백질 분비 기구를 통하여, 미생물의 세포막이나 세포벽 등에 바깥쪽으로 노출시켜 고정화하는 방법이다. 1988년 최초로 보고된 이후 [1], 미생물 표면 발현 기술은 combinatorial polypeptide libraries screening [2], 표면 발현된 효소를 이용한 전세포 반응 (whole cell bioconversion by levansucrase) [3], 생백신 생산 (live vaccine production) [4], organophospho hydrolase의 표면 발현을 이용한 환경 정화 [5], 그리고, poly-His peptides와 중금속 흡착 단백질을 이용한 토양, 수계 환경에서의 중금속 흡착 [6] 등의 다양한 분야에 이용되어 왔다. 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 대장균을 비롯한 그람

¹동아대학교 화학공학과

¹Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea
Tel: +82-51-200-7719, Fax: +82-51-200-7728
e-mail: june0302@dau.ac.kr

²한국생명공학연구원

²Systems Microbiology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oundong, Yusong, Daejeon 305-333, Korea

³서울대학교 화학생물공학부

³School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

음성균에서는 표면 발현 모체로서, 주로 LamB, OmpA, PhoE 같은 outer membrane protein, 혹은 Lpp, TraT, peptidoglycan-associated lipoprotein PAL 등의 lipoproteins들이 주로 사용되었다. [7-8]. 두꺼운 세포벽을 가진 그람 양성균에서는 주로 세포벽과 관련이 있는 단백질들이 표면 발현 모체로 많이 이용되어 왔다. *Staphylococcus* 속에서는 protein A 혹은 M protien 기반의 표면 발현 모체가 많이 개발되었고 [9-10], 고초균에서는 세포막이나 (*dppE*) 세포벽 (*cwba*) 관련 단백질들이 표면 발현 모체로 많이 이용되었다.

지금까지 개발된 수많은 표면 발현 시스템이 존재함에도 불구하고, 아직까지 해결하지 못하는 다양한 문제점이 새로운 표면 발현 시스템의 개발을 요구하고 있다. 가장 큰 문제점 중의 하나는 외래 단백질이 표면 발현 모체와 융합되어 숙주 세포의 세포막 혹은 세포벽으로 함입될 때, 세포 성장의 저해나, 세포막의 불안정성을 야기하여 세포의 사멸을 유도한다는 것이다 [11,12]. 특히, 목적 단백질의 크기가 큰 경우 더욱 표면 발현이 어려우며 [13], 또한, alkaline phosphatase 와 같은 periplasmic proteins들의 경우에도 매우 힘든 것으로 알려져 있다 [12,14].

이러한 문제점들은 기존의 모든 표면 발현 시스템이 미생물의 원형질 내부에서 발현된 “발현모체-목적 단백질” 융합 단백질이 미생물의 단백질 분비기구를 이용하여, 미생물의 원형질막과 세포벽을 통해 분비되어야 한다는 공통적인 특성에서 기인한다고 할 수 있다. 위의 문제점 이외에도, 세포의 분비기구와 연관되어, 단일체가 아닌 multimer 형태의 목적 단백질 혹은, 조효소를 포함하는 단백질의 경우에도 표면 발현 자체에 어려움이 예상된다고 할 수 있다.

고초균 (*Bacillus subtilis*)은 생존환경에서 탄소 혹은 질소원의 고갈 및 다양한 종류의 외부 스트레스에 대해서 비대칭 세포 분화를 통한 내생 포자를 형성함으로써 그 유전적 물질을 다음 세대에 전해주는 생존전략을 가지고 있다. 비대칭 세포분화를 통해 형성된 mother cell은 pre-spore를 만입하고, mother cell 내부에서 만들어진 다양한 포자 형성 단백질 (spore coat protein)은 pre-spore의 바깥쪽으로 여러 개의 층을 만들면서 포자를 완성해 나간다. 포자가 충분히 완성되면, 역할을 마친 mother-cell은 분해되면서 포자를 외부 환경으로 배출하게 된다. 이렇게 완성되어진 고초균의 포자는 열, 건조, 다양한 화학물질 등에 매우 강한 저항성을 지니는 반면, 아미노산, 탄소원 등의 영양 성분에는 매우 민감하게 반응하여 새로운 life-cycle을 시작하는 특성을 가지고 있다.

올바른 포자 형성을 위해서는 약 150개 이상의 다양한 유전자의 발현이 순차적으로 정확하게 이루어지며, 이는 주로 mother-cell과 pre-spore의 유전자 발현에 관여하는 RNA polymerase의 sigma factor (σ^F , σ^E , σ^G 그리고 σ^K)들 사이의 정확한 신호 전달 체계에 의존하게 된다. 이러한 포자 형성 기구는 미생물 표면 발현의 관점에서 보면, 기존의 미생물표면 발현시스템이 제공하지 않았던 매우 큰 장점을 제공하게 된다. 만약, 목적 단백질을 포자 형성 단백질에 융합 발현하고, 이를 포자 형성 과정에서 포자의 표면으로 유도한 후, mother cell이 분해가 되어 완성된 포자가 방출된다면, 세포막이나, 세포벽을 통한 융합 단백질의 이동 없

이 포자에 목적단백질이 표면발현된 것과 같은 결과를 얻을 수 있다.

본 논문에서는 상기에서 기술된 기존 미생물 표면 발현 시스템의 여러 가지 문제점을 해결할 수 있는, 고초균의 포자를 이용한 표면발현 시스템 개발을 위해서 가장 중요한 표면 발현 모체를 선정하고자 한다. 표면 발현 모체 선정을 위한 목적 단백질로는 각각의 크기가 116 kDa인 monomer 단백질이 dimer 혹은 tetramer를 형성하여야만 효소의 활성을 가지는 β -galactosidase를 이용할 것이다 [15]. 이러한 크기와 tetramer를 이루는 특성은 일반적인 미생물의 세포막을 통해서 분비되기 힘들기 때문에 본 실험에 적합한 목적단백질이라 할 수 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양 조건

고초균 prototype I168, 두 개의 단백질 분해 효소가 제거된 DB104, 7개의 단백질 분해 효소가 제거된 WB700이 전 실험에 걸쳐 발현용 숙주로 사용되었다. 배양 배지로는 GYS 배지 ((NH₄)₂SO₄ 2 g, yeast extract 2 g, K₂HPO₄ 3.3 g/L, sodium citrate 0.1 g, glucose 0.1 g/L, MnSO₄ H₂O 0.1 g, CaCl₂ 0.16 g, MgSO₄ 7H₂O 0.82 g/L)를 사용하였으며, 37°C에서 진탕배양기를 통하여 배양하였다. 각각의 표면 발현모체와 lacZ cassette를 가진 고초균의 선별과 배양을 위해서 spectinomycin (100 mg/mL)를 사용하였다.

2.2. 유전자 증폭 (PCR amplification)

DNA 중합효소 (polymerase)는 Boehringer Mannheim (Expand Long Template PCR System, catalogue NO.1681834, Germany)사에서 구입하여 사용하였다. 표면 발현 모체인 고초균의 유전자 서열을 얻기 위해서는 *Bacillus subtilis* genome site (<http://www.pasteur.fr/Bio/subtiList.html>)의 정보를 이용하였다. PCR 증폭을 위한 DNA primer는 Genotech (Taejeon, Korea)에서 주문, 구입하였다. PCR 증폭을 위해서는 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, USA)을 사용하였다.

2.3. 유전자 조작 (DNA manipulation)

유전자 조작의 일반적인 방법은 Sambrook 등의 방법을 따랐다. 유전자 클로닝을 위해서는 대장균 JM109와 JM110을 사용하였다. 제한 효소, DNA ligase, 기타 필요한 시약은 Boehringer Mannheim에서 구입하였다. PCR 증폭단편 및 유전자 단편, plasmid vector의 정제를 위해서는 Quiagen 사의 제품을 이용하였다.

2.4. 고초균으로의 형질 전환 (Transformation into *Bacillus subtilis*)

완성된 11개의 발현벡터 pSDJH4~pSDJH14를 고초균으로 도입하기 위해서는 Two-step (SP I, SP II) 방법을 이용하였다 [16].

2.5. 고초균 포자 분리 및 정제 방법 (Purification of *Bacillus subtilis* spore)

실험에 사용된 고초균들을 37°C에서 16-20시간 배양하였다. 배양액에 포함된 vegetative cells, sporulating cells, spores 등은 lysozyme 처리 혹은 renografin (sodium diatrizoate, S-4506, Sigma)을 이용한 밀도차이로 분리하였다. 분리 정제된 포자는 현미경 관측을 통하여, 순수한 포자만 존재하는 것으로 확인되었다.

2.6. β -galactosidase 효소 역가 측정

고초균에서의 β -galactosidase 효소 역가 측정은 보고된 바와 같이 하였으며, Miller Unit으로 계산되었다. 1 Miller Unit은 1분간 420 nm에서의 흡광도 변화를 OD₆₀₀에서 측정된 세포의 O.D 값으로 나눈 것이다.

2.7. 고초균 포자의 outer coat layer 추출

고초균 포자의 outer coat layer 추출을 위해서는, 문헌에 나온 4% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 1 mM dithiothreitol, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% glycerol을 포함하는 용액에서 8분 동안 분리 정제된 고초균 포자를 가열하였다 [17].

3. 결과 및 고찰

3.1. β -galactosidase 발현벡터 제작 및 고초균 균주의 구축

고초균 포자를 이용한 표면 발현 시스템 개발을 위한 적절한 목적 단백질로 대장균의 β -galactosidase가 선정되었다. β -galactosidase는 α -complementation를 이용한 클로닝 시스템에서의 응용과 β -galactosidase 효소 활성을 이용한 다양한 reporter gene으로서의 활용으로 생물학 및 생물공학에서 가장 널리 이용되는 유전자 중의 하나이다. 서론에서 기술한 바와 같이 β -galactosidase의 큰 사이즈와 dimer 혹은 tetramer를 형성하여야만 효소의 활성을 가지는 특성은 일반적인 미생물의 세포막을 통해서는 분비되기 힘들기 때문에 본 실험에 적합한 목적단백질이라 할 수 있다.

β -galactosidase를 표면 발현시키기 위한 표면 발현 모체는 20가지 이상의 spore coat protein 중에서 높은 발현양과 고초균 포자 형성과정에서 포자의 바깥쪽 위치, 두 가지 기준으로 선정되었다. *cotA* (낮은 발현양), *cotF* (단백질의 2차 절단), *cotS*와 *cotT* (포자의 아래쪽 층에 위치) 등은 선별 대상에서 제외되었다 (Table 1).

각각의 DNA primer를 이용하여 11개 포자 형성 유전자를 PCR 증폭하였다. (*spoIVA*-P1-P2, *cotB*-P3-P4, *cotC*-P5-P6, *cotD*-P7-P8, *cotE*-P9-P10, *cotG*-P11-P12, *cotH*-P13-P14, *cotM*-P15-P16, *cotV*-P17-P18, *cotX*-P19-P20, *cotY*-P21-P22) (Table 2). *cotV*와 *cotX*의 경우 동일한 operon으로 구성되어 있기 때문에, P17과 P19의 DNA primer의 서열은 동일한 것을 확인할 수 있다 (Table 2). 포자 형성 과정과 융합 단백질의 발현을 동기화하기 위하여 각각의 포자형성 유전자의 구조유전자와 promoter가 함께 위치하도록 DNA primer를 설계하였다. 각각의 표면 발현 모체와 β -galactosidase의 융합

발현을 위해서는 고초균 염색체의 *amyE* site에 integration 될 수 있는 pDG1728 plasmid vector를 이용하였다. 융합 발현된 단백질은 표면 발현 모체 전체가 N-말단 15개의 아미노산을 제외한 전체 β -galactosidase에 별다른 linker 서열 없이 직접 연결되도록 설계되었다. 증폭된 각각의 PCR 단편과 pDG1728 vector를 제한효소 *BamH* I과 *Sal* I으로 절단한 후 ligation하였다. 완성되어진 발현 vector를 pSDJH4~pSDJH14라고 명명하였다 (Fig. 1).

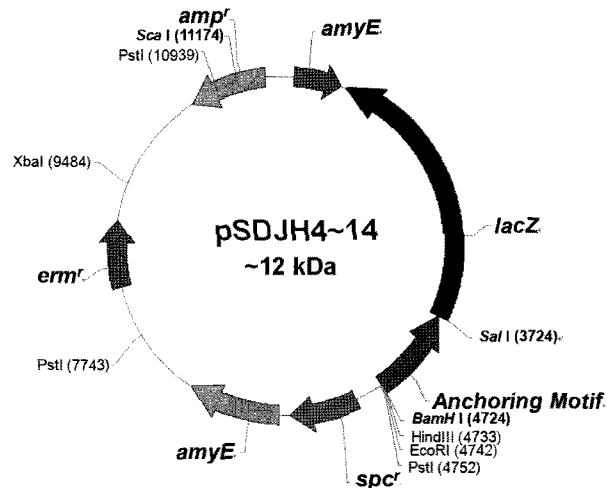


Fig. 1. Construction of pSDJH series vectors, which expresses Coat Anchoring Motif-LacZ fusion protein on the spore of *Bacillus subtilis*. Precise construction method is described in the main text.

Table 1. Summary of candidate anchoring motives for spore display system development

Gene	Size (kDa)	Expression ^a	Location ^b	Comment
<i>spoIVA</i>	55	σ^E	NCP	Attaches the precoat to the forespore
<i>cotB</i>	59	σ^K + GerE	OC	
<i>cotC</i>	12	σ^K + GerE	OC	
<i>cotD</i>	11	σ^K	OC	
<i>cotE</i>	24	σ^K, σ^K + SpoIID	OC	Required for outer coat assembly
<i>cotG</i>	24	σ^K + GerE	OC	Controls CotB assembly
<i>cotH</i>	43	σ^K	IC	Controls OC protein assembly
<i>cotM</i>	14	σ^K	OC	Controls outer coat assembly
<i>cotV</i>	14	σ^K, σ^K + GerE	Unknown	Putative coat protein
<i>cotX</i>	19	σ^K, σ^K + GerE	OC	Controls outer coat assembly
<i>cotY</i>	18	σ^K, σ^K + GerE	OC	Controls outer coat assembly

^a Only the sigma factors and major positive regulators for the expression are listed.

^b Assignments of coat proteins to coat layers have been directly demonstrated only for CotE.

Otherwise, the assignments are inferences. IC, inner coat; OC, outer coat; NCP, not considered as a coat protein.

완성된 11종류의 발현 vector는 vector의 *amp^r* 위치에 유일하게 존재하는 *Sca* I 제한효소로 처리하여 선형화한 후 I168, DB104, WB700 세 종류의 고초균에 각각 형질 전환되고 spectinomycin이 포함된 agar plate에서 선별되었다. 선형화된 vector는 고초균 염색체의 *amyE* 위치에 homologous

recombination에 의한 double cross-over 형태로 삽입되게 되며, 이는 고초균 *amyE* 유전자의 정상적인 발현을 방해한다. 완성된 모든 고초균은 starch plate에서 amylase가 발현되지 못하는 것을 확인하였다 (data not shown). 이렇게 구축되어진 고초균을 BJH114~BJH152라고 명명하였다 (Table 3).

Table 2. Primers used for the construction of expression vectors for spore display system development

No.	Name	Sequence (5' to 3')	Plasmid
P1	<i>spoIVA</i> 5'	GGC AGC GGA TCC ACA GTG ACA AGC CCA ATC	pSDJH4
P2	<i>spoIVA</i> 3'	TCTA GAC GTCGACAGGATGGCGATTAAGCCGC	
P3	<i>cotB</i> 5'	CCT CAT GGA TCC GTA TAA AAA GAA TGA TAT	pSDJH5
P4	<i>cotB</i> 3'	CCAT GAC GTCGACAAATTTACGTTTCCAGTGAT	
P5	<i>cotC</i> 5'	CTA CAC GGA TCC TCT ATG TCA ATG ATA GCC	pSDJH6
P6	<i>cotC</i> 3'	TTAA GAC GTCGACGTAGTGTTTTTTATGCTTTT	
P7	<i>cotD</i> 5'	AGC GGC GGA TCC TGT AAA ATG ACG TTA GTT	pSDJH7
P8	<i>cotD</i> 3'	GTTT GAC GTCGACGTAGTCGACGAAGGTTTTTC	
P9	<i>cotE</i> 5'	AAC CGG ATC CAC CTG CTG AAA GGG GAA ACC	pSDJH8
P10	<i>cotE</i> 3'	GTC CCT GTC GAC TTC TTC AGG ATC TCC CAA TA	
P11	<i>cotG</i> 5'	GCC TTT GGA TCC AGT GTC CCT AGC TCC GAG	pSDJH9
P12	<i>cotG</i> 3'	AAAA GAC GTCGACTTGTATTTCTTTTTGACTA	
P13	<i>cotH</i> 5'	TTT TGT GGA TCC GAG ATT TCT TGT GAG AGC	pSDJH10
P14	<i>cotH</i> 3'	TTTC GAC GTCGACTAAAATACTTAAATGATCTTTGA	
P15	<i>cotM</i> 5'	GGC AAA GGA TCC GGC TAT ATT GAA AAC GAC	pSDJH11
P16	<i>cotM</i> 3'	CTTT GAC GTC GACGCTGAGAGGAAATGAAGAG	
P17	<i>cotV</i> 5'	GCC AAT CAG GAT CCC TTC ACA TAT ATG CCA	pSDJH12
P18	<i>cotV</i> 3'	TGAA AGA TCT GTCGACAAGGACGTCAGTTCCTACTAA	
P19	<i>cotX</i> 5'	GCC AAT CAG GAT CCC TTC ACA TAT ATG CCA	pSDJH13
P20	<i>cotX</i> 3'	CTGT TGA TCA GTCGACGAGGACAAGAGTGATACTAG	
P21	<i>cotY</i> 5'	TCA TAG GGA TCC TAG TAT TCTCTC TTG TCC	pSDJH14
P22	<i>cotY</i> 3'	TTAC GAC GTCGACTCCATTGTGATGATGCTTTT	

Table 3. Strain used for spore display system development

Strain	Description	Note
<i>E. Coli</i>		
JM109	general cloning host	Lab. stock
JM110	<i>dam', dcm'</i>	Lab. stock
<i>Bacillus subtilis</i>		
BJH115	I168 $\Delta amyE::cotG-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH9 integration
BJH131	DB104 $\Delta amyE::spoIVA-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH4 integration
BJH132	DB104 $\Delta amyE::cotB-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH5 integration
BJH133	DB104 $\Delta amyE::cotC-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH6 integration
BJH134	DB104 $\Delta amyE::cotD-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH7 integration
BJH135	DB104 $\Delta amyE::cotE-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH8 integration
BJH136	DB104 $\Delta amyE::cotG-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH9 integration
BJH137	DB104 $\Delta amyE::cotH-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH10 integration
BJH138	DB104 $\Delta amyE::cotM-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH11 integration
BJH139	DB104 $\Delta amyE::cotV-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH12 integration
BJH140	DB104 $\Delta amyE::cotX-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH13 integration
BJH141	DB104 $\Delta amyE::cotY-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH14 integration
BJH152	WB700 $\Delta amyE::cotG-lacZ$ (<i>Sp</i>)	pSDJH9 integration

3.2. 표면 발현 모체- β -galactosidase 융합 단백질의 β -galactosidase 효소 역가 측정을 통한 최적의 발현 모체 선정
고초균 DB104를 기반으로 하여 만들어진 BJH131~BJH141,

모두 11종류의 균주를 GYS 배지에서 배양한 후, 배양 시간에 따른 두 가지의 샘플을 준비하였다 (16시간, 24시간). 11개의 발현 모체 중 가장 강한 β -galactosidase 효소 역가를 나타내는 융합 단백질을 선정하기 위하여, 상등액을 제외한 vegetative cell, developing spore, fully developed spore 모두를 포함하는 샘플을 이용하여 Miller assay를 수행하였다 (Fig. 2).

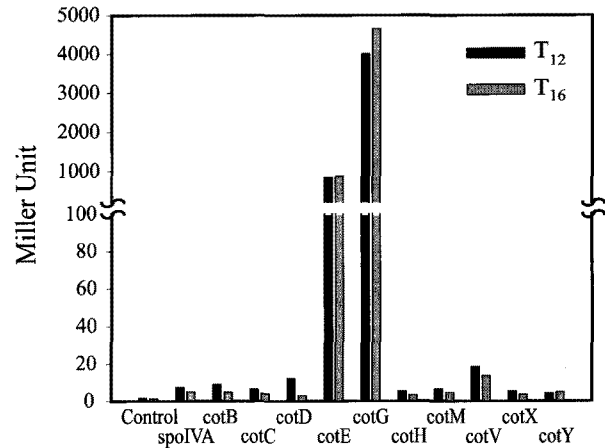


Fig. 2. Comparison of expressed β -galactosidase activity among various anchoring motif-lacZ fusions. Control is the background β -galactosidase activity of DB104. Each fusion motifs are indicated in x-axis. For example, cotG means the Miller unit of BJH136, which has *cotG-lacZ* cassette in the chromosome. y-axis is broken to display low-expressing strains in the same graph.

11개의 균주 중에서 CotE-LacZ를 발현하는 BJH135와 CotG-LacZ를 발현하는 BJH136이 다른 9개의 균주에 비해 월등히 높은 β -galactosidase 효소 역가를 나타내었다. BJH135의 경우, 800~1,000 units 정도의 β -galactosidase 효소 역가가 지속적으로 측정되었는데, 이는 문헌에 보고된 6,000 units과는 상당한 차이가 나는 값이다 [18]. BJH136의 경우, 4,000 units 정도의 β -galactosidase 효소 역가가 지속적으로 측정되었는데, 이 또한 문헌에서 보고된 40~250 units과는 상당한 차이가 나고 있다 [17,19].

BJH135와 BJH136의 *cotE*와 *cotG*의 promoter와 구조 유전자 부위의 염기서열 확인을 해 보았으나, 문헌에 보고된 서열과 차이가 나지 않았다 (data not shown). 문헌 값과 본 실험에서의 β -galactosidase 효소 역가 차이는 배양 조건, 혹은 발현 모체와 β -galactosidase 사이의 융합 방식이 다른 점 등을 추론할 수 있다.

*cotE*는 543개의 염기서열로 이루어진 20.8 kDa의 크기를 가진, 고초균 포자의 형성과정에서 매우 중요한 역할을 하는 유전자이다. *cotE*는 포자 형성 초기에 발현되어, sporulation septum이 형성된 후, 고초균 포자의 inner coat layer와 outer coat layer 사이에 존재하는 것으로 알려져 있다. *cotE* knock-out 변이주의 경우, 올바른 포자형성이 방해받으며, 완성된 포자는 lysozyme 등의 처리에 매우 민감한 특성을 가지는 것으로 보고되어 있다. *cotG*는 585개의 염기서열로 이루어진 23.8 kDa의 크기를 가진, 고초균 포자의 형성

과정에서 outer coat layer를 형성하는 것으로 알려진 유전자이다. 상기 융합 발현된 β -galactosidase 효소 역가 측정 결과에 따라, BJH135와 BJH136가 향후 지속적인 연구를 위해 선정되었다.

3.3. PAGE와 Western Blot을 이용한 CotE-LacZ와 CotG-LacZ 융합 단백질의 표면 발현 확인

발현된 단백질의 PAGE (Polyacrylamide gel electrophoresis) 분석을 통해서 목적인 융합 단백질의 발현 여부와 함께, 세포 혹은 포자의 위치별 분획 샘플 분석을 통하여 발현된 위치에 대한 정보도 얻을 수 있다.

BJH135와 BJH136의 포자를 분리, 정제한 후, 고초균 포자의 outer coat layer를 추출하여 6% SDS PAGE로 분석하였다 (Fig. 3). 대조 샘플로 사용된 β -galactosidase (LacZ)는 대장균에서 발현, 분리, 정제하여 사용하였다. (lane 1: 116 kDa). BJH135와 BJH136의 포자에서 추출된 단백질에서 CotG-LacZ (lane 2: 138 kDa)와 CotE-LacZ (lane 3: 135 kDa)의 예상된 크기의 융합 단백질의 존재를 확인하였다. 반면, 대조 샘플로 사용한, 동일한 방법으로 처리된, DB104의 고초균 포자에서는 어떤 크기의 단백질도 발견되지 않았다. 위의 결과는 실험에 사용된 두 가지의 고초균 BJH135와 BJH136 포자의 outer coat layer에서 계획한 바와 같이 정확한 크기의 CotE-LacZ와 CotG-LacZ의 융합 단백질이 표면 발현되었음을 증명하는 것이다. β -galactosidase의 항체를 이용한 Western blot 실험에서도 정확한 크기의 융합단백질의 존재를 확인할 수 있었다 (data not shown).

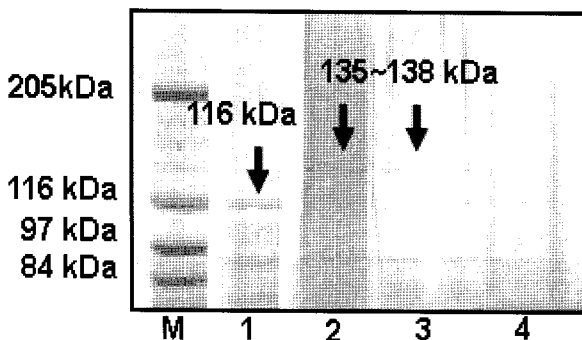


Fig. 3. Expression of CotE-LacZ and CotG-LacZ fusion analyzed by 6% SDS-PAGE. High molecular weight protein size marker (lane M), wild-type β -galactosidase expressed from *E. coli* (lane 1), spore of BJH136 with *cotG-lacZ* cassette (lane 2), BJH135 with *cotE-lacZ* cassette (lane 3) and DB104 (negative control) (lane 4).

3.4. 고초균 포자위에 표면 발현된 β -galactosidase의 분석

고초균 DB104, BJH135, BJH136에 대해서, 배양시간에 따른 세포의 성장, 발현된 β -galactosidase의 배양 시간에 따른 전체 효소 활성, 포자 위에 발현된 효소 활성 등을 살펴보았다. 세포 성장의 초기에는 DB104, BJH135, BJH136의 비성장 속도에는 차이가 없었다. 이는 *cotE-lacZ*와 *cotG-lacZ* 융합 유전자의 발현이 각각 *cotE*와 *cotG* promoter에 의해 결정되기 때문에 세포의 성장이 포자형성과정에 돌입하기 이전에는 영향을 미치지 않는 것으로 이해할 수 있다. 그러나, 포자

형성과정이 계속 진행되면서 세포 성장의 말기에 이르게 되면 (16 h), BJH135의 세포농도가 DB104나 BJH136에 비교하여 급속하게 떨어지는 현상이 관찰된다 (Fig. 4(a)). BJH136의 경우 세포성장 말기의 세포량 감소가 DB104에 비하면 거의 미미한 수준이었다.

이러한 포자형성기 혹은 그 이후 시기의 세포의 사멸, 혹은 정상적인 포자 형성의 미비로 인한 균체량의 감소는 고초균의 경우 포자를 제대로 형성하지 못하는 포자형성 변이주 (*ΔspoIIIG* or *ΔspoIIIC*)의 경우 흔히 관측되는 현상이다 [20]. 이것에 비추어 보면 BJH135의 경우, 발현된 CotE-LacZ 융합 단백질이 포자 형성과정에 포자의 coat layer에 끼어들면서, 이후 포자의 정상적인 발달을 방해하는 것으로 생각할 수 있다. 비록 사용된 고초균의 염색체 내에 온전한 *cotE* 유전자가 있지만, 발현된 CotE-LacZ 융합 단백질과 정상적인 CotE 단백질이 포자 형성 과정에서 서로 경쟁적으로 coat layer에 포함될 것으로 보인다. CotG-LacZ 융합 단백질의 coat layer로의 합입은 상대적으로 포자 형성 과정에 미치는 영향이 작은 것으로 이해할 수 있다.

BJH135와 BJH136, 두 균주 모두 세포 성장에 따른 β -galactosidase 효소 활성 정도는 거의 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 4(b)). 두 균주 모두 배양시간 10시간을 지나면서, β -galactosidase 효소 활성이 나타나기 시작하였고, 16~20시간 정도의 구간에서 가장 높은 β -galactosidase 효소 활성을 나타내었다. 이후 배양 시기에서 효소 활성이 감소하는 것은 고초균이 분비하는 다양한 단백질 분해효소에 의한 작용으로 해석이 된다. 이는 고초균 숙주 중 더 많은 단백질 분해효소가 제거된 균주에 의해서 어느 정도 보완될 수 있을 것이라 생각된다.

DB104, BJH135, BJH136, 세 가지 균주의 배양 샘플 중, lysozyme 처리와 renografin 방법에 의해서 vegetative cells과 developing spore를 완전히 제거하고, 완성된 포자만을 얻어 포자에서 발현되는 β -galactosidase 효소 활성의 정도를 측정하였다 (Fig. 4(c)). BJH136의 경우, 반복된 실험에서 전체 세포에서 발현된 β -galactosidase 효소 활성의 10~15% 정도가 분리, 정제된 포자에서 활성을 나타내는 것을 배양의 전 과정에서 확인할 수 있었다. 이것은 발현된 CotG-LacZ의 많은 부분 (85~90%)이 포자 형성 과정이나, 포자의 분리, 정제 과정에서 소실됨을 의미한다. 고초균 BJH136의 경우에도 염색체 상에 온전한 *cotG* 유전자가 존재하며 여기서 발현된 CotG가 CotG-LacZ에 비해 포자 형성 과정에서 합입될 확률이 더욱 높다고 할 수 있기 때문에, 10~15% 정도의 β -galactosidase 효소의 잔존 활성은 적절한 값으로 보인다. *cotG*의 경우 완전히 제거된다고 하더라도 포자형성과정에서 치명적인 영향을 미치지 않는 것으로 알려져 있기 때문에, *cotG* knock-out 변이주를 제작한다면, 포자 형성 과정에 CotG-LacZ 합입량의 증가를 예상할 수 있고, 이는 표면 발현된 목적 단백질의 양을 증가시킬 수 있는 방법이라 생각한다.

BJH135의 경우, lysozyme 처리와 renografin 방법에 의한 포자의 분리, 정제 후에는 전체 세포에서 발현된 β -galactosidase 효소 활성의 1~2% 정도만의 잔존 활성이 관측되었다. *cotE* 유전자가 변이된 고초균의 경우, 완성된 포자에

는 오직 inner coat layer만 존재하며, lysozyme에 대한 저항성이 매우 낮아지며, germination 능력이 상당히 감소하는 것으로 보고되어 있다 [21]. BJH135의 경우, 온전한 CotE 단백질이 발현되기는 하지만, 함께 발현된 CotE-LacZ 융합 단백질의 spore coat layer로의 함입이, 이후 포자 형성과정에 상당한 영향을 끼치는 것으로 보인다.

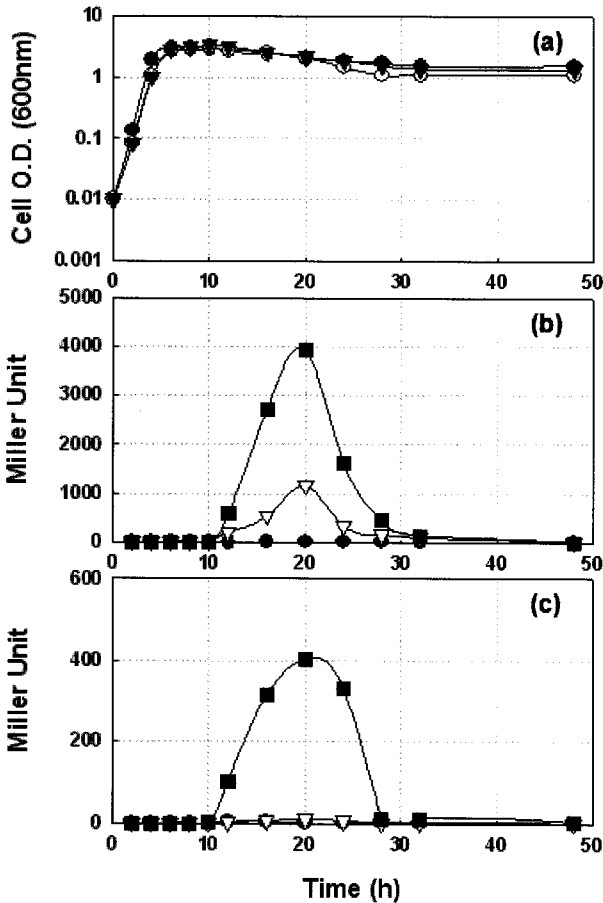


Fig. 4. Time course of β -galactosidase expression of spore displayed fusion protein. (a) Cell growth, (b) β -galactosidase activity of total cell (c) β -galactosidase activity of purified spore. DB104 (negative control) (●), BJH135 with *cotE-lacZ* cassette (▽), BJH136 with *cotG-lacZ* cassette (■).

3.5. 융합 단백질의 포자 표면 발현과 특성에 미치는 다양한 고초균 속주의 영향

고초균에서 분비되는 단백질 분해 효소의 CotG-LacZ 융합 단백질의 포자 표면 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 고초균 야생주인 I168, 두 개의 단백질 분해 효소가 제거된 DB104, 7개의 단백질 분해 효소가 제거된 WB700, 세 가지의 균주를 준비하고, 이에 CotG-LacZ를 발현할 수 있도록 선형화된 pSDJH9 plasmid를 형질 전환하여, 균주를 구축하였다 (BJH115, BJH136, BJH152 in Table 3).

I168, DB104, WB700 기반의 세 균주 모두 세포 성장에는 차이가 없었지만 (Fig. 5(a)), 전체 세포와 분리 정제된 포자에서 발현되는 β -galactosidase 효소 활성화에는 상당한 차이가 있었다 (Fig. 5(b),(c)). 예상한 바와 같이 측정되는 β -galactosidase

효소 활성화는 고초균 속주에서 단백질 분해 효소가 가장 많이 제거된 WB700 기반의 균주에서 제일 높게 측정되었다. 이는 발현량의 차이보다 발현된 후, 세포 내의 단백질 분해 효소에 의해 제거되는 양이 작아지기 때문에 나타나는 현상이라고 이해할 수 있다. 그러나, 고초균이 가진 분비 단백질의 99.7%가 제거되었다고 알려진 WB700 기반의 균주인 BJH152인 경우도 관측되는 발현양 및 발현지속 시간 등이 야생주와 별로 차이가 나지 않는다는 점은 고초균 혹은 그 포자를 이용한 표면 발현 시스템에서 앞으로 극복해야 할 단점이라고 할 수 있다.

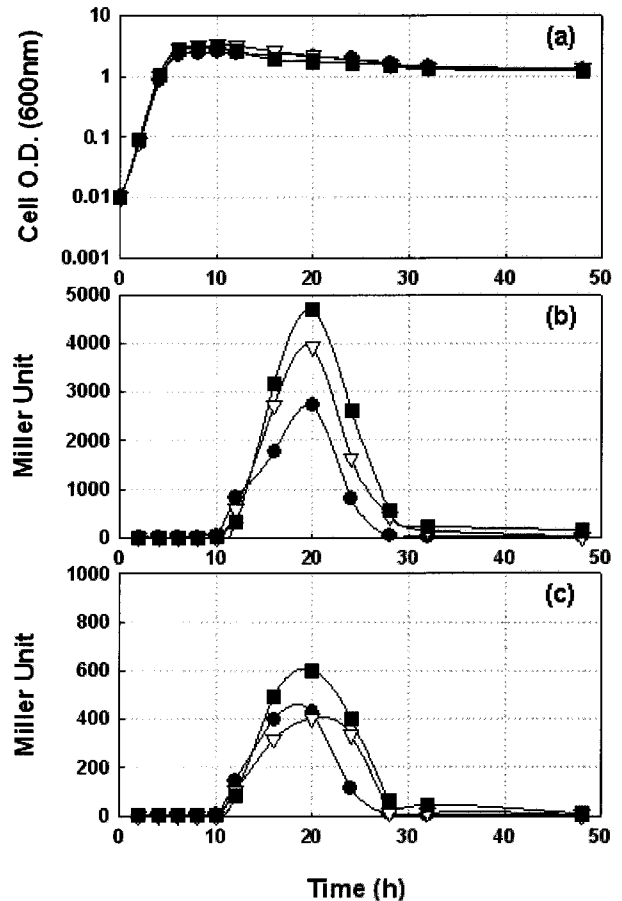


Fig. 5. Time course of β -galactosidase expression of spore displayed fusion protein with protease deficient *Bacillus subtilis*. (a) Cell growth, (b) β -galactosidase activity of total cell (c) β -galactosidase activity of purified spore. BJH115 with *cotG-lacZ* cassette (●), BJH136 (DB104 with *cotG-lacZ* cassette) (▽), BJH152 with *cotG-lacZ* cassette (■).

4. 결론

본 연구에서는 기존의 미생물 표면 발현 시스템이 가진 문제점을 해결하기 위하여, 고초균 포자를 이용한 표면 발현 시스템 개발을 위한 적절한 표면 발현 모체가 선정되었다. 주로 고초균 포자 형성 단백질을 대상으로 하여 선별한 결과 *cotE*와 *cotG* 유전자가 목적 단백질인 β -galactosidase의 표면 발현에 가장 효과적인 것으로 판명이 되었다. 그러나, *cotE* 발현

모체의 경우, 고초균의 포자 형성 과정에서 중요한 역할을 하는 단백질이기 때문에, CotE-LacZ 융합 단백질의 발현이 포자 형성의 후반부를 저해하는 것으로 해석이 되었고, lysozyme 처리와 renografin 방법에 의한 포자의 분리, 정제 후에는 포자 표면에서 대부분의 β -galactosidase 효소 활성이 사라진 것을 확인하였다. 본 연구에서는 β -galactosidase 표면 발현을 위해서는 *cotG*가 가장 우수한 표면 발현 모체로 판명이 되었으며, PAGE 분석에서 포자의 outer coat layer에서 CotG-LacZ 융합 단백질이 계획한 대로 발현되었음이 증명되었다. 7개의 단백질 분해 효소가 제거된 WB700 기반의 고초균 숙주에서도 발현된 CotG-LacZ 융합 단백질의 분해는 계속되어 앞으로 더 나은 숙주개발이 요구된다고 할 수 있다.

본 논문에서 서술된, 고초균의 포자를 이용한 표면 발현 시스템은, 기존의 미생물 표면 발현 시스템이 해결하지 못했던 다양한 문제점들을 극복함과 동시에, 고초균 포자가 태생적으로 가지는 외부 환경에 대한 저항성 및 안정성, 그리고 여러 생물학적인 응용에 대한 GRAS (Generally Regarded As Safe) 균주로서 그 응용범위를 넓혀갈 것이다 [22].

감사

이 논문은 2007년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2007-331-D00135).

References

- Charbit, A., A. Molla, W. Saurin, and M. Hofnung (1988) Versatility of a vector for expressing foreign polypeptides at the surface of gram-negative bacteria. *Gene* 70: 181-189.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15: 553-557.
- Jung, H. C., J. M. Lebeault, and J. G. Pan (1998) Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* 16: 576-580.
- Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson, and R. Curtiss (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* 15: 29-34.
- Richins, R. D., I. Kaneva, A. Mulchandani, and W. Chen (1997) Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat. Biotechnol.* 15: 984-987.
- Sousa, C., A. Cebolla, and V. de Lorenzo (1996) Enhanced metaladsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* 14: 1017-1020.
- Agterberg, M., H. Adriaanse, A. van Bruggen, M. Karperien, and J. Tommassen (1993) Outer-membrane PhoE protein of *Escherichia coli* K-12 as an exposure vector: possibilities and limitations. *Gene* 88: 37-45.
- Dhillon, J. K., P. D. Drew, and A. J. Porter (1999) Bacterial surface display of an anti-pollutant antibody fragment. *Let. Appl. Microbiol.* 28: 350-354.
- Hansson, M., S. Stahl, T. N. Nguyen, T. Bachi, A. Robert, H. Binz, A. Sjolander, and M. Uhlen (1992) Expression of recombinant proteins on the surface of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus xylosus*. *J. Bacteriol.* 174: 4239-4245.
- Pozzi, G., M. Contorni, M. R. Oggioni, R. Manganelli, M. Tommasino, F. Cavalieri, and V. A. Fischetti (1992) Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of *Streptococci*. *Infect. Immun.* 60: 1902-1907.
- Georgiou, G., D. L. Stephens, C. Stathopoulos, H. L. Poetschke, J. Mendenhall, and C. F. Earhart (1996) Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng.* 9: 239-247.
- Stathopoulos, C., G. Georgiou, and C. F. Earhart (1996) Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'OmpA (46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 112-119.
- Steidler, L., E. Remaut, and W. Fiers (1993) LamB as a carrier molecule for the functional exposition of IgG-binding domains of the *Staphylococcus aureus* protein A at the surface of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 236: 87-192.
- Kornacker, M. G. and A. P. Pugsley (1990) The normally periplasmic enzyme beta-lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol. Microbiol.* 4: 1101-1109.
- Kaneshiro, C. M., C. A. Enns, M. G. Hahn, J. S. Peterson, and F. J. Reithel (1975) Evidence for an active dimer of *Escherichia coli* beta-galactosidase. *Biochem. J.* 151: 433-434.
- Harwood, C. R. and S. M. Cutting (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. pp. 67. A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, England.
- Henriques, A. O., L. R. Melsen, and C. P. Moran Jr. (1998) Involvement of superoxide dismutase in spore coat assembly in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 2285-2291.
- Zheng, L. and R. Losick (1990) Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 212: 645-660.
- Sacco, M., E. Ricca, R. Losick, and S. Cutting (1995) An additional GerE-controlled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 372-377.
- Kim, J. H. and B. G. Kim (2000) Application of LFH-PCR for the Disruption of SpoIIIE and SpoIIIG of *B. subtilis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5: 327-331.
- Zheng, L., W. P. Donovan, P. C. Fitz-James, and R. Losick (1988) Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev.* 2: 1047-1054.
- Kim, J. and W. Schumann (2009) Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66: 3127-3136.