

*Bacillus megaterium*에서 발견된 Penicillin G Acylase 유전자의 염기서열과 그 효소의 특성

강주현·김성재¹·박용춘¹·황 영·유옥준·김영창^{*1}

한국과학기술원 생명과학과, ¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Bacillus megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자의 염기배열을 결정하였다. 이 유전자에는 2,406 염기쌍으로 이루어진 하나의 open reading frame이 존재하는데, 개시코돈의 5' 위치에서 Shine-Dalgarno 배열과 promoter로 여겨지는 부분을 발견하였으며, 종결코돈의 3' 아래쪽에서 rho-independent한 전사종결체와 유사한 구조를 발견하였다. 염기배열로부터 폴리펩티드의 아미노산 배열을 유추하였다. 이 폴리펩티드의 분자량은 91,983 Da이었으며, 아미노 말단 부위에 signal sequence가 존재하였다. 이 아미노산 배열을 여러 다른 penicillin G acylase의 아미노산 배열과 비교하고 분리 정제한 효소를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과로부터 이 효소는 92 kDa의 전구체로 해독된 후 processing 과정을 거쳐 각각 25 kDa과 61 kDa의 α -, β -단위체로 구성됨을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ *Bacillus megaterium*, penicillin G acylase, nucleotide sequence

Penicillin G acylase는 penicillin G의 가수분해 (deacylation) 또는 합성 (acylation) 반응을 촉매하는 효소로서, 제약산업분야에서 반합성 β -lactam계 항생제 제조의 원료물질로 널리 사용하는 6-amino-penicillanic acid (6-APA)를 효소적으로 생산하는데 이용되고 있으며 또한 이 원료물질에 다른 잔기를 효소적으로 붙여 새로운 항생물질을 제조하는 목적으로도 이용되고 있다.

최근까지 penicillin G acylase에 관한 연구는 효소의 생산, 정제, 고정화 그리고 촉매적 특성에 관한 것이 대부분이었다. 그러나 최근 유전공학의 발달로 관심의 초점이 옮겨지게 되어 지금까지 *Escherichia coli* ATCC 11105 (11, 15, 16, 22), *Kluyvera cryocrescens* ATCC 21285 (3, 9; 예전에는 *K. citrophila*라고 하였음), *Providencia rettgeri* ATCC 31052 (8, 14; 예전에는 *Proteus rettgeri*라고 하였음), *Alcaligenes faecalis* ATCC 19018 (European patent number: 0453047A1), *Arthrobacter viscosus* (17, GenBank accession number L04471) 등에서 penicillin G acylase 유전자가 클로닝되어 염기배열이 완전하게 밝혀졌다. 이들의 염기배열과 효소의 아미노산배열을 비교 분석함으로써 penicillin G acylase들은 signal peptide- α 단위체-spacer peptide- β 단위체로 구성된 하나의 전구체 폴리펩티드로 만들어지고, 단계적인 proteolytic processing을 거쳐서 hydrophobic interaction으로 결합한 α -, β - 두개의 단위체로 구성된다 (4, 5, 6, 18)는 공통점이 확인되었다.

Bacillus megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase에 대해서는 그 단백질의 분자량에 대한 보

고는 있었으나 (7, 10) 효소나 유전자의 구조에 대하여는 자세한 보고가 없었다. 또한 *B. megaterium*의 penicillin G acylase는 세포 밖으로 분비되기 때문에 분리 정제하기 쉬우며 (7), 7-ADCA 등 수종의 cephalosporin 계열의 항생제를 효소적으로 합성할 수 있다는 특성이 있다 (10). 따라서 이 효소는 상업적으로 이용될 수 있다고 판단되었다. 본 연구에서는 *B. megaterium* ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자와 그 주위의 완전한 염기배열을 밝혀내고, 지금까지 알려진 다양한 penicillin G acylase들의 아미노산 배열들과 비교 분석하여 구조적 특성을 알아 보았다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

Escherichia coli HB101, JM83, 또는 JM103을 transformation의 숙주균으로 사용하였다. Plasmid pBR322와 pUC19를 cloning과 subcloning vector로 이용하였고, M13 mp18과 mp19 RF (replicative form)을 sequencing 하기 위한 subcloning vector로 이용하였다. Penicillin G acylase를 세포 밖으로 분비 생산하도록 함으로써 효소의 분리 정제를 용이하게 하기 위하여 *Bacillus subtilis* DB104와 plasmid pUBC73 (10)을 사용하였다.

배지와 배양조건

E. coli HB101 균은 LB (Luria-Bertani) 배지에 필요에 따라 ampicillin (100 μ g/ml)과 tetracycline (12.5 μ g/ml)을 각각 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

Difco 회사에서 구입한 MacConkey agar를 *E. coli* JM83 형질전환균의 선택배지로 사용하였다. M9 최소액체배지 (6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 0.5 g NaCl , 1 g NH_4Cl , 0.5 g MgSO_4 , 0.01 g CaCl_2 , 2 g glucose, per liter, pH 7.4)에 thiamine을 첨가하여 *E. coli* JM103의 배지로 사용하였다. *B. subtilis* (pUBC73)은 LB 배지에 kanamycin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

효소의 분리와 정제

B. megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자를 가지고 있는 *B. subtilis* (pUBC73)을 LB 배지 8 liter에 배양하였다. A_{600} 이 9.0 일때 원심 분리하여 균체를 제거한 액체배지에 산으로 세척한 Celite (No. 560, Johns-Manville Co.)를 섞고, 아세트산으로 pH 6.4를 유지하면서 4°C에서 5시간 동안 저어 주었다. Celite에 흡착된 효소를 24% (w/v) ammonium sulfate로 추출하고 이것을 다시 75% ammonium sulfate 침전으로 농축시켰다. 농축한 단백질을 dialysis하여 carboxymethyl (CM) Sepharose column에 흡착시킨 후 0.02~1.0 M의 NaCl 농도 기울기를 주면서 분획하였다. 이 때 penicillin G acylase는 NaCl 농도 0.35 M에서 용출되었다. 활성을 나타낸 분획들을 모아 투석하고 다시 DEAE Sepharose column (2.2×5 cm)으로 역시 0.02~1.0 M의 NaCl 농도 기울기를 주면서 분획하였더니 0.4 M NaCl 농도에서 용출되었다. 이 부분을 모아 다시 투석하여 농축시켰다. 분리 정제한 penicillin G acylase의 subunit 구성과 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였는데, Laemmli (13)의 방법에 따라 0.1% SDS를 포함하는 10% polyacrylamide gel을 이용하였다. 효소의 활성은 Balasingham 등 (1)의 방법으로 측정하였다.

DNA 추출 및 조작

제한효소, T4 DNA ligase, BAL31, 그리고 S1 nuclease 등은 New England Biolabs, Boehringer Mannheim, Promega에서 구입하였으며 반응 조건은 제조회사의 처방에 따랐다. 여러가지 재조합 DNA의 제조, M13 mp18, 19를 이용한 subcloning 및 형질전환 등의 DNA 조작은 기본적으로 Sambrook 등 (19)의 방법에 따랐다.

염기배열 결정

B. megaterium ATCC 14945에서 penicillin G acylase 유전자를 클로닝한 pUCSE59와 pCSE94 (10)를 이용하여 다양한 제한효소로 *pga* 유전자 부위를 pUC19와 M13 mp18, 19에 subcloning하였다. 이들을 주형으로 사용하고, Sequenase version 2.0 kit (USB Co.)와 [α - ^{32}P]dATP (NEN Co.)를 사용하여 Sanger 등 (20)의 dideoxy-mediated chain termination 방법으로 sequencing하였다. M13/pUC vector의 universal forward/reverse primer와

함께 밝혀진 배열을 토대로 화학합성한 다양한 primer들을 사용하였다. 염기배열은 양쪽 DNA 가닥을 2회 이상 sequencing하여 결정하였다.

염기배열의 컴퓨터 분석

NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)의 E-mail Server를 이용하여 다양한 penicillin G acylase 유전자의 염기배열에 관한 정보를 얻었다. 이 정보를 분석이 가능한 형태의 자료로 가공하기 위하여 GENet (Y.C. Kim, Chungbuk National University)를 이용하였으며, 염기배열과 아미노산 배열의 분석은 DNASIS/PROSIS (Hitachi Co.)를 이용하였다. ClustalV 프로그램 (D. Higgins, European Molecular Biology Laboratory)으로 배열을 정렬한 후 Boxer 프로그램 (Y.C. Kim, Chungbuk National University)으로 이를 분석하고 자료를 도표로 출력하였다.

염기배열 수납번호

본 논문에서 결정한 염기배열은 GenBank, DDBJ, EMBL의 염기배열 데이터베이스에 수납번호 (accession number) U07682로 등록되었다.

결과 및 고찰

Penicillin G acylase 유전자의 구조

B. megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자 (*pga*)의 구조를 알아보기 위하여 그 염기배열을 결정하였다. 우선 *pga* 유전자가 클로닝되어 있는 pUCSE59와 pCSE94의 상세한 제한효소 지도 (Fig. 1)를 작성한 후, 이를 이용하여 다양한 subclone들을 제조하고 sequencing하였다. *pga* 유전자와 그 downstream 부분의 염기배열은 pUCSE59를 이용하여 결정하였으며, pUCSE59에서 *pga* 유전자의 upstream 부분이 pBR322에서 유래된 부분이었기 때문에 upstream 부위의 염기배열은 pCSE94를 이용하여 결정하였다. 이렇게 하여 *B. megaterium*의 *pga* 유전자를 포함하는 2,908 bp의 염기배열을 결정할 수 있었다 (Fig. 2). 이 염기배열을 분석한 결과 염기번호 301부터 2706까지 하나의 open reading frame (ORF)이 존재함을 알 수 있었는데, 이 ORF는 802개의 아미노산을 암호화하고 있고 (Fig. 2), 여기서 해독된 폴리펩티드의 분자량은 91,983이었다. 301-303번의 ATG 개시코돈 12 nt 앞에는 ribosome 결합부위라고 생각할 수 있는 GGAGGTG 배열이 있었다. 이 Shine-Dalgarno (SD) 배열의 마지막 G에서 개시코돈까지의 거리는 11 nt로서, *B. subtilis*의 유전자에서 보통 8~9 nt 정도인 것 (2)에 비하면 약간 멀지만, 이 배열이 *B. subtilis*와 *E. coli*의 16S rRNA의 3'-말단 (각각 3'-UCUUUCCUCCACUAG-5', 3'-AUUCCUCCA-CU-5')와 완전히 상보적이었다. SD 배열의 5' 위쪽 부위는 A/T 염기가 많기 때문에 *B. subtilis*의

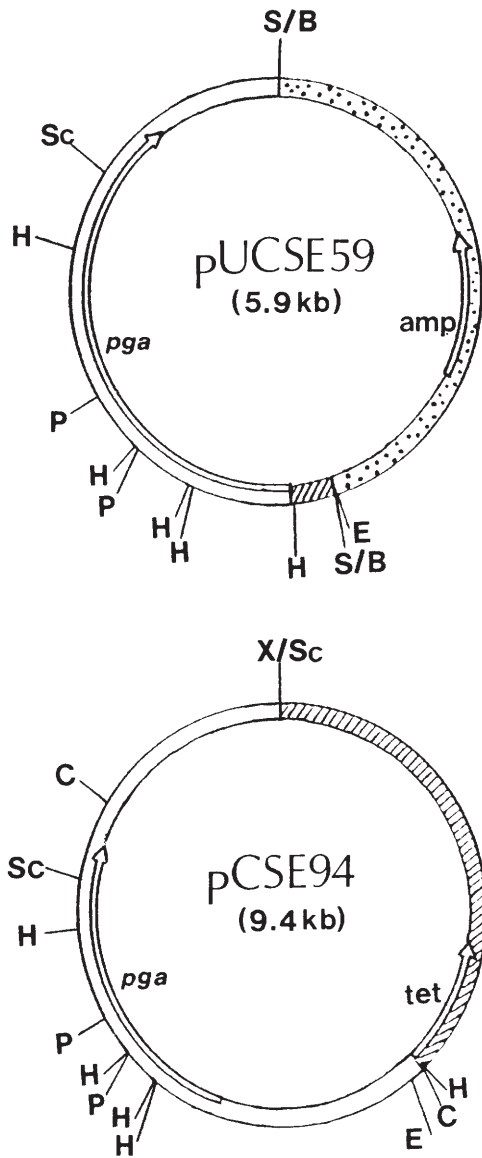


Fig. 1. Restriction maps of pUCSE59 and pCSE94. A hatched part of a map is originated from pBR322, and dotted parts from pUC19. *pgA* represents the penicillin G acylase gene from *B. megaterium* ATCC 14945. Arrowheads indicate the direction of transcription. E, *EcoRI*; C, *ClaI*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; S, *Sau3AI*; P, *PvuII*; Sc, *ScaI*; X, *XhoI*.

promoter와 유사한 부위를 여러 곳에서 발견할 수 있었지만, Fig. 2에서 밑줄로 나타낸 -35부분 (TGGAGA)과 -10 부분 (TAAAT)이 가장 유사한

것으로 나타났다. 이 promoter의 -35와 -10 sequence 사이의 거리는 18 nt이었다. 그러나 정확한 promoter를 알아내기 위해서는 전사개시점을 밝혀 내야만 한다. 전형적인 종결코돈 (TAG)의 61 bp 아래쪽으로 25 bp의 inverted repeat 염기배열을 발견할 수 있었는데, 이 부위는 stem-loop 구조와 T-stretch를 형성할 수 있기 때문에 *pgA* 유전자의 전사종결체로 작용할 것으로 생각된다.

Penicillin G acylase의 구조

*B. megaterium*의 penicillin G acylase의 구조를 알아보기 위하여 염기배열로부터 유추한 폴리펩티드의 아미노산 배열을 이미 밝혀져 있는 다른 효소들의 아미노산 배열과 비교하여 보았다. Ohashi 등 (17)은 *A. viscosus* ATCC 15294에서 분리한 효소의 α -단위체와 β -단위체를 각각 아미노산 sequencing을 실시하여 N 말단의 아미노산 배열을 밝혀낸 바 있다. *B. megaterium*의 *pgA* 유전자가 암호화하고 있는 802개의 아미노산 배열 중에서 27번과 67번 사이의 아미노산은 *A. viscosus* ATCC 15294의 α -단위체의 아미노 말단을 이루는 41개의 아미노산과 완전히 일치하였고, 266번과 303번 사이의 아미노산은 β -단위체의 아미노 말단을 이루는 38개의 아미노산과 완전히 일치하였다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 *B. megaterium*의 penicillin G acylase도 92 kDa의 전구체로 해독된 후 proteolytic processing 과정을 거쳐 α -와 β -단위체로 구성됨을 보여주는 것이다.

*B. megaterium*의 penicillin G acylase가 실제로 서로 다른 두개의 단위체로 구성되어 있는지를 확인하기 위하여 효소를 분리 정제하였다. Fig. 3의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과에서 보는 바와 같이 Celite 추출 (lane 1), CM-Sepharose (lane 2), DEAE-Sepharose column chromatography (lane 3)를 통해 거의 순수하게 효소를 분리 정제할 수 있었다. Fig. 3의 4번 lane에서 보는 바와 같이 *B. megaterium*의 penicillin G acylase도 각각의 분자량이 25 kDa와 61 kDa 정도인 두개의 단위체로 이루어져 있음을 확인하였다. 아미노산 배열로부터 계산한 β -단위체의 분자량은 61,397 Da으로서 전기영동 결과와 일치하였다. 그러나 아미노산 번호 27번과 265번 사이의 배열로부터 계산한 분자량은 27,568 Da으로 전기영동 방법으로 측정한 α -단위체의 분자량 25,000 Da보다 2,568 Da 정도 컸다. 이것은 다른 penicillin G acylase의 경우와 마찬가지로 *B. megaterium*의 효소도 α -단위체와 β -단위체 사이에 proteolytic processing에 의해 잘려져 나가는 20여 개의 spacer peptide가 존재함을 시사한다. 이를 확인하기 위해서는 α -단위체의 C-말단의 아미노산 배열을 결정해야만 할 것이다. 이상에서 살펴본 바와 같이 *B. megaterium*의 penicillin G acylase는 분자량이 25 kDa와 61 kDa인 두개의 단위체로 이루어져 있는데, 이러한 결과는 효소의 분자량이 120 kDa이

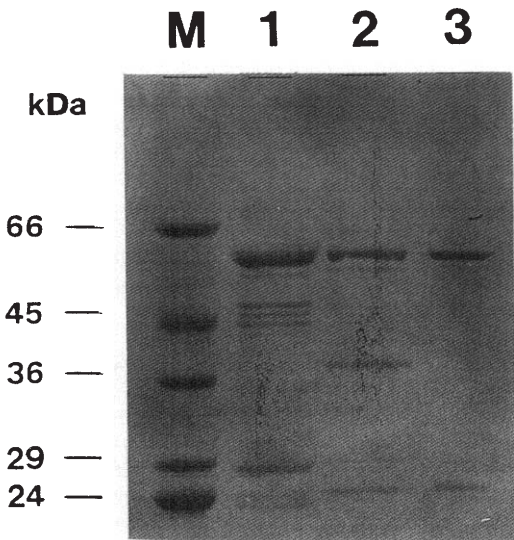


Fig. 3. Monitoring the penicillin G acylase protein by SDS-PAGE showing that it has two distinct subunits.

The penicillin G acylase protein was traced in the patterns of 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the active fractions obtained during purification by Celite (lane 1), CM-Sepharose (lane 2) and DEAE-Sepharose (lane 3) column chromatography. The samples containing approximately 10 μ g of protein were boiled for 3 min, cooled quickly in ice bath and loaded on a 1.5 mm thick and discontinuous slab-gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Standard protein markers (lane M) used were bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and trypsinogen (24 kDa).

β -단위체 간의 상호 결합에 S-S 결합이 사용되지 않음을 알 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 *B. megaterium*의 peni-

Table 1. The G+C content of the chromosomal DNA and penicillin G acylase gene from various penicillin G acylase-producing strains

Strains	mol% G+C	
	Chromosome ^a	<i>pga</i> gene
<i>B. megaterium</i>	36.5~47.4	36.8
<i>A. viscosus</i>	59.4	36.7
<i>A. faecalis</i>	55.9~59.4	57.9
<i>E. coli</i>	48 ~52	48.1
<i>K. cryocrescens</i>	55 ~57	57.3
<i>P. rettgeri</i>	39 ~42	40.8

^a data from Krige *et al.* (12) and Sneath *et al.* (21).

illin G acylase 역시 signal peptide- α 단위체-spacer peptide- β 단위체로 이루어진 하나의 전구체로 해독된 후 processing을 거쳐서 만들어지는 두개의 단위체로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다.

진화적 고찰

GenBank의 accession number L04471로 실린 *A. viscosus*의 *pga* 유전자의 염기배열과 *B. megaterium*의 염기배열을 비교해본 결과 97.9%의 identity가 있음을 발견하였다. Enterobacteriaceae에 속하는 *E. coli*, *K. cryocrescens*, *P. rettgeri*의 *pga* 유전자들 사이에서도 identity가 60~77% 밖에 되지 않는데 비하면 *B. megaterium*과 *A. viscosus*의 *pga* 유전자 사이에 identity가 97.9%나 된다는 것은 매우 놀랍다. 염기 배열로부터 유추한 아미노산 배열도 두 종류 모두 802개의 아미노산으로 되어 있으며 이 중에서 불과 24개의 아미노산만이 다르다 (97.0% identity). 특히 활성을 가진 효소 분자에는 존재하지 않는 signal peptide와 spacer peptide 부위도 각각 한개의 아미노산만이 다를 정도로 identity가 매우 크다. 이러한 결과는 *B. megaterium*과 *A. viscosus* 사이에서 *pga* 유전자가 최근에 전이되었음을 시사한다.

따라서 이들 사이의 *pga* 유전자 전이가 plasmid에 의하여 일어났을 가능성을 조사하기 위하여 plasmid의 존재 유무를 확인하였으나 두 균주에서 모두 plasmid DNA는 검출되지 않았다 (자료 미제시). 그

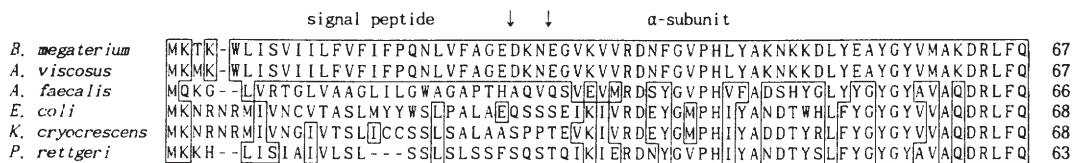


Fig. 4. Alignment of N-terminal amino acid sequences of precursor polypeptides from various penicillin G acylase-producing strains.

The residues identical to the penicillin G acylase from *B. megaterium* are enclosed in boxes. Vertical arrowheads indicate two distinct N-terminal amino acids found in the α -subunit from *A. viscosus* (17). Numbers indicate the amino acid positions of adjacent amino acids. Dashes indicate sequence gaps.

러나 chromosome에 삽입되어 있는 plasmid에 의하여 전이되었을 가능성은 배제할 수 없다.

유전자의 전이 방향을 알아보기 위하여 penicillin G acylase를 생산하는 균주들의 G+C 함유율(12, 21)과 *pga* 유전자의 G+C 함유율을 조사 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 *A. viscosus*를 제외한 5종의 균주에서 모두 *pga* 유전자의 G+C 함유율이 chromosomal DNA의 G+C 함유율과 비슷하였다. 따라서 이들 균주에서 *pga* 유전자는 종의 분화 단계에서부터 계속 존재하여 왔으며 chromosome과 함께 진화되어 왔을 가능성이 매우 높다. 그러나 *A. viscosus*의 *pga* 유전자의 G+C 함유율은 36.7%로 chromosomal DNA의 G+C 함유율 59.4%와는 상당한 차이가 있었다. *A. viscosus*에 존재하는 *pga* 유전자의 배열이 *B. megaterium*의 *pga* 유전자와 매우 유사하다는 점과 이 유전자의 G+C 함유율이 *A. viscosus* 보다는 *B. megaterium*의 chromosomal DNA와 유사하다는 점은 *B. megaterium*의 *pga* 유전자가 최근에 *A. viscosus*로 전이되었다는 것을 시사한다.

감사의 말

본 논문은 1992년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, and M.D. Lilly, 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **276**, 250-256.
- Band, L. and D.J. Henner, 1984. *Bacillus subtilis* requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA* **3**, 17-21.
- Barbero, J.L., J.M. Buesa, G.G. de Buitrago, E. Mendez, A. Perez-Aranda, and J.L. Garcia, 1986. Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene from *Kluyvera citrophila*. *Gene* **49**, 69-80.
- Bock, A., R. Wirth, G. Schmid, G. Schumacher, G. Lang, and P. Buckel, 1983. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 consists of two dissimilar subunits. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**, 135-139.
- Bock, A., R. Wirth, G. Schmid, G. Schumacher, G. Lang, and P. Buckel, 1983. The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* **20**, 141-144.
- Bruns, W., J. Hoppe, H. Tsai, H.J. Brüning, F. Maywald, J. Collins, and H. Mayer, 1985. Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: A periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.* **3**, 36-44.
- Chiang, C. and R.E. Bennett, 1967. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **93**, 302-308.
- Daumy, G.O., J.A. Williams, A.S. McColl, T.J. Zuzel, and D. Danley, 1986. Expression and regulation of the penicillin G acylase gene from *Proteus rettgeri* cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **168**, 431-433.
- Garcia, J.L. and J.M. Buesa, 1986. An improved method to clone penicillin acylase genes: Cloning and expression in *Escherichia coli* of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *J. Biotechnol.* **3**, 187-195.
- Kang, J.H., Y. Hwang, and O.J. Yoo, 1991. Expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* **17**, 99-108.
- Kim, Y.C., Y.B. Koo, S.J. Oh, and H.S. Kang, 1983. Studies on the structure and expression of the penicillin G acylase gene: I. Cloning of the penicillin G acylase gene of *E. coli* ATCC 11105. *Kor. J. Microbiol.* **21**, 95-102.
- Krige, N.R. and J.G. Holt, 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**, 680-685.
- Ljubijankic, G., M. Konstantinovic, and V. Glisin, 1992. The primary structure of *Providencia rettgeri* penicillin G amidase gene and its relationship to other gram negative amidases. *DNA Sequence* **3**, 195-200.
- Mayer, H., J. Collins, and F. Wagner, 1979. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids, p. 459-470. In K.N. Timmis and A. Puhler (ed.). Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Oh, S.J., Y.C. Kim, Y.W. Park, S.Y. Min, I.S. Kim, and H.S. Kang, 1987. Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking region, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 87-97.
- Ohashi, H., Y. Katsuta, T. Hashizume, S. Abe, H. Kajiura, H. Hattori, T. Kamei, and M. Yano, 1988. Molecular cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2603-2607.
- Oliver, G., F. Valle, F. Rosetti, M.G. Pedrozo, P. Santamaria, G. Gosset, and F. Bolivar, 1985. A common precursor for the two subunit of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Gene* **40**, 9-14.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977.

- DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
21. **Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt**, 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
22. **Schumacher, G., D. Sizmann, H. Haug, P. Buckel, and A. Bock**, 1986. Penicillin acylase from *E. coli*: Unique gene-protein relations. *Nucl. Acids Res.* **14**, 5713-5727.

(Received March 21, 1994)

(Accepted April 22, 1994)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence of the Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* and Characteristics of the Enzyme

Kang, Joo Hyun, Seong-Jae Kim¹, Yong-Chjun Park¹, Young Hwang, Ook Joon Yoo, and Young-Chang Kim^{*1} (Department of Life Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-606, and ¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

The complete nucleotide sequence of the cloned *pga* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945 and its 5'- and 3'-flanking regions was determined. The sequence revealed only one large open reading frame (2,406 bp) of the penicillin G acylase (*pga*) gene. Upstream from ATG of the *pga* gene, there was a putative ribosome binding site, Shine-Dalgarno sequence. The promoter-like structure, -10 and -35 sequences, was also found. Following the stop codon, TAG, a structure reminiscent of the *E. coli rho*-independent transcription terminator was present. The amino acid sequence was deduced from the nucleotide sequence. The molecular mass of the polypeptide was 91,983 Da. There was a potential signal sequence in its amino-terminal region. A comparison of its deduced amino acid sequence with other characterized penicillin G acylases and the result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme showed that a precursor polypeptide of 92 kDa was processed into two dissimilar α - and β -subunits of 25 and 61 kDa.