

Streptomyces griseus ATCC10137에서 Trypsin 유전자 *sprT*의 주변 유전자군 분석

지원재 · 김미순 · 김종희 · 강대경¹ · 홍순광*

명지대학교 생명과학과, ¹(주)이지바이오시스템 중앙연구소

Streptomyces griseus trypsin(SGT)을 코딩하는 *sprT* 유전자를 포함하여 약 6.7 kb의 DNA 단편을 *Streptomyces griseus* ATCC 10137의 염색체 DNA로부터 클로닝 하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열 분석 결과, 염색체 DNA를 *EcoRI-HindIII* 제한효소로 완전 분해하여 클로닝한 약 6.7 kb의 단편에는 *sprT* 유전자를 포함하여 총 6개의 완전한 ORF (open reading frame)와 1개의 불완전한 ORF가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 순서대로 ORF1, SGT, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6로 명명 하였다. 예상 단백질의 아미노산 서열 분석 결과, ORF1은 oxidoreductase, ORF3는 ArsR family의 transcription regulator, ORF4는 *Listeria monocytogenes*의 LPXTG motif를 갖는 peptidoglycan bound protein, ORF5는 transmembrane helix를 갖는 막단백질, ORF6는 *Streptomyces avermitilis*에서 보고된 lipoprotein과 높은 상동성을 보였으며, ORF2는 기능을 예측 할 수 없었다. 이와 같은 분석 결과, *sprT* 유전자 주위에는 세포막 이나 세포벽 구성성분을 코딩하는 유전자가 존재하고 있으며, 따라서 SGT protease는 이러한 세포막 또는 세포벽 합성이나 분해과정에서 어떤 기능을 담당할 가능성이 있는 것으로 추측 되었다.

Key words □ ArsR, oxidoreductase, lipoprotein, peptidoglycan bound protein, SGT, transmembrane protein

*Streptomyces griseus*는 다양한 이차대사산물과 단백질 분해효소를 생산한다. 특히, 본 균주의 streptomycin 생산과 형태분화에 이르는 조절 기구는 가장 자세히 연구되어 있으며, 미생물 호르몬으로 불리는 A-factor(2-isocapryloyl-3-R-hydroxy-methyl- γ -butyrolactone)가 이러한 형태분화와 이차대사 생산을 positive하게 조절하고 있는 것으로 보고되었다(11). 이와 함께, 몇 종의 protease의 생산도 A-factor에 의해 조절 받으며, 본 균주의 형태분화에 어떤 기능을 담당할 것으로 생각되고 있다(14, 22).

Streptomyces griseus trypsin (SGT)은 *Streptomyces griseus*가 생산하는 bacterial serine protease로 포유동물이 생산하는 trypsin과 유사하다. 이를 코딩하는 *sprT* 유전자(Genebank accession No. M64471)는 *S. griseus* ATCC 10137의 유전자 library로부터 클로닝되어 보고되었다(17). 이후, *sprT* 유전자의 *S. lividans* TK24에서의 대량 발현 조건에 대한 연구 및 정제된 SGT의 효소학적 특성 연구가 보고 된 바 있다(18).

sprT 유전자의 도입은 *S. lividans*의 이차대사 산물 생산에는 영향을 주지 않았으나, 형태분화에는 큰 영향을 나타내었고, 따라서 SGT가 방선균의 형태분화에서의 어떤 기능을 할 것으로 예상 되었다(5). 또한, SGT는 강력한 gelatinase 활성을 갖고 있으며, manganese에 의해 SGT 활성이 2.6배 증가하는 것으로 밝혀 졌다(6). 이러한 사실은 manganese의 존재가 *S. griseus* 와 *S.*

*coelicolor*에서 포자형성과 이차대사 생산을 촉진한다는 결과와 어떤 상관성이 있음을 시사하고 있다(5).

보고된 *sprT* 유전자의 세포내 기능을 연구하기 위하여, *sprT* 유전자를 포함하는 6.4 kb 크기의 *EcoRI-HindIII* 단편을 *S. griseus* ATCC10137의 염색체 mini library로부터 클로닝 하여 분석하였다. *sprT* 유전자를 포함한 그 주변에 존재하는 유전자 6개의 정보 분석결과를 본 논문에서 설명하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

S. griseus ATCC 10137은 American Type Culture Collection (USA)에서 구입하였고, 대장균은 *E. coli* DH5 α F'를 사용하였다. 클로닝을 위한 벡터는 pUC19, pBluescript, pGEM-T easy 등을 사용하였다(20). *E. coli* DH5 α F'는 M9 minimal agar에서 보존하였고, 일반적으로는 LB배지에서 37°C로 배양하였다(20). *Streptomyces* 균주의 고체배지는 R2YE agar 배지, 액체배지는 R2YE 액체배지를 사용하였고 28°C에서 배양하였다(10). R2YE 배지는 1 리터당, sucrose 103 g, K₂SO₄ 0.25 g, MgCl₂·6H₂O 10.12 g, glucose 10 g, casamino acid 0.1 g, yeast extract 5 g, 0.5% K₂HPO₄ 10 ml, 3.68% CaCl₂·2H₂O 80 ml, 20% L-proline 15 ml, 5.73% TES [pH 7.2] 100 ml, trace elements 용액 2 ml를 포함한다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-6198, Fax: 031-335-8249
E-mail: skhong@mju.ac.kr

DNA 추출 및 조작

대장균에서의 DNA 조작은 Sambrook 등의 방법(20)을 이용하였고, 방선균에서의 DNA 추출 및 조작은 Hopwood 등의 방법을 따랐다(10). DNA의 제한 효소 처리 및 ligation 등은 공급회사의 지침에 따랐으며, DNA 분석은 TAE buffer를 이용한 agarose 전기영동을 사용하였다(20).

염색체 DNA로부터 *sprT* 유전자 함유 단편 클로닝 및 분석

S. griseus ATCC 10137로부터 Hopwood 등의 방법에 따라 염색체 DNA를 분리하여 사용하였다(10). 기존에 보고된 *sprT* (Genbank accession no. M64471) 유전자 정보를 기초로 하여, 탐침으로 이용할 프라이머를 구성하였다(17). 정방향 프라이머는 5'-ACTTCCTGCGTGCCTGAAG-3', 역방향 프라이머는 5'-CGGGCGAGCCGTAGCCCCG-3'의 배열을 갖도록 고안하였고, 프라이머 제작은 AtmanBioScience 사에 의뢰하였다. *S. griseus* ATCC 10137의 염색체 DNA를 주형으로 사용하여 위의 프라이머와 중합효소 연쇄반응으로 약 700 bp 크기의 증폭산물이 확인되었고, pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 후 염기서열을 결정 한 결과, 목표로 한 트립신 단백질인 *sprT* 유전자의 염기서열과 동일함을 확인 할 수 있었다. 이것을 *EcoRI* 제한 효소로 절단하여 Dig-labelling을 실시하고 Southern hybridization을 위한 탐침용 DNA로 사용하였다.

염색체 DNA (10 µg)를 *EcoRI-HindIII*로 자른 후, agarose gel에서 전기 영동을 실시하고, nylon membrane (Hybond N; Amersham)에 옮긴 후, 상기의 탐침용 DNA로 Southern hybridization을 실시하였다(20). 그 결과, signal을 보인 부분의 DNA band를 agarose gel에서 회수하고, *EcoRI-HindIII*로 자른

pUC19 vector와 ligation 하고, *E. coli* DH5αF에 형질전환 하였다. 상기에 제작한 동일 primer로 PCR을 실시하여 각 colony를 스크리닝하고, 얻어진 후보 colony로부터 plasmid DNA를 추출하여, ABI model 373 DNA sequencer (Applied Biosystems Inc., USA)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다.

분석된 염기서열을 기초로 코드된 단백질의 아미노산 서열을 추론하였으며, GenBank database (National Center for Biotechnology Information, USA)의 BLAST algorithm을 이용하여 염기서열 및 아미노산 서열의 상동성을 조사하였다. 아미노산의 multiple sequence alignment는 ClustalW program을 사용하여 실시하였다(21).

결과 및 고찰

S. griseus ATCC 10137로부터 *sprT* 함유 단편의 cloning

S. griseus ATCC 10137의 염색체 DNA를 *EcoRI-HindIII*로 완전히 자른 후 Southern hybridization을 실시하였다. 그 결과 6-8 kb 정도의 단편에서 positive signal을 관찰하였으며, 해당 부분을 agarose gel로부터 회수하여 *EcoRI-HindIII*로 자른 pUC19 벡터에 ligation 시키고 *E. coli* DH5αF에 형질 전환 하였다. 앞서 설명한 primer를 이용한 PCR방법으로 형질전환체로부터 6.7 kb 크기의 단편을 갖고있는 positive clone을 획득하였다. 이 clone의 restriction map을 Fig. 1에 표시하였다.

염기서열 결정 및 frame-plot 분석

S. griseus ATCC 10137 염색체 DNA로 cloning된 6.7 kb *EcoRI-HindIII* 단편의 염기서열을 완전하게 분석하였다. 분석한

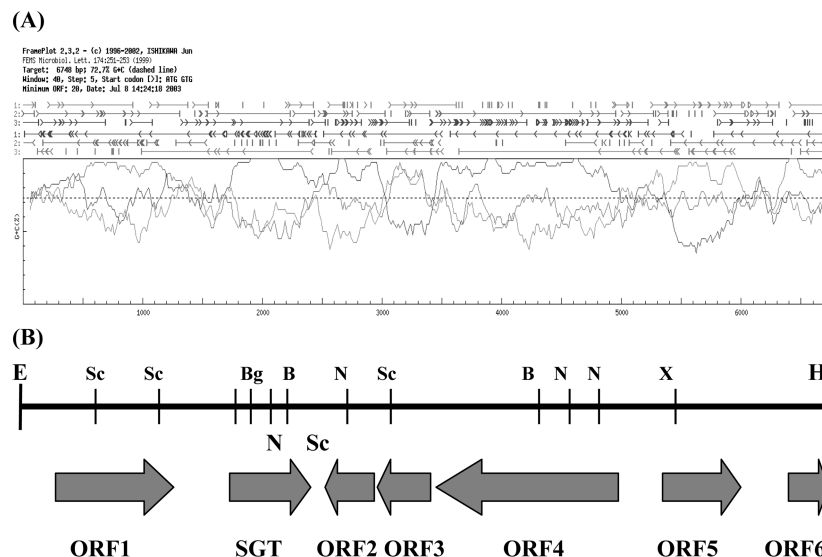


Fig. 1. Frameplot analysis and restriction map of the DNA fragment including *sprT* gene. (A) FRAME analysis of the 6.7kb DNA fragment including *sprT* gene. The arrowheads on the lines above and below the graph indicate translational start codons and their orientations; vertical bars crossing the lines represent translational stop codons. (B) Restriction map of the clone. The thick solid bar shows the extent of the sequenced DNA fragment. The sizes and orientations of the genes indicated by arrows were deduced from the nucleotide sequence. Restriction site abbreviations are: E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*; Sc, *SacI*; N, *NheI*; Bg, *BglII*; X, *XhoI*.

Table 1. Relevant features of the clone containing sprT deduced from DNA sequence

ORF	RBS	*Start/Stop	G+C	Residues/MW	Predicted functions
ORF1	GGAG	³⁷⁷ ATG/TGA ¹³¹⁵	75.3%	312/33	Oxidoreductase
SGT	GAAAGAAGG	¹⁶¹⁴ GTG/TGA ²³⁹⁶	70.5%	260/28	Trypsin-like protease
ORF2	GAGG	³⁰¹⁶ GTG/TGA ²⁵⁰⁷	70.6%	169/17.7	Unknown
ORF3	GGTAA	³⁴⁰⁸ ATG/TGA ³⁰¹³	74%	131/14.3	Transcription regulator
ORF4	GAGG	⁵⁰¹⁴ GTG/TGA ³⁵⁶⁶	71.3%	482/50.13	Peptidoglycan bound protein
ORF5	GGAG	⁵³⁸⁰ GTG/TGA ⁶⁰⁰⁹	70%	209/22.8	Membrane protein
ORF6	GAGG	⁶⁴⁵² GTG/	72.7%	98/9.8	Lipoprotein

*Numbers indicate the first and last nucleotide of the start and stop codons, respectively.

염기서열을 이용하여 Frame-plot analysis (ver. 2.3.2)를 실시한 결과 sprT 유전자를 포함하는 총 7개의 open reading frames (ORFs)을 동정할 수 있었다. 이중, ORF1, SGT, ORF5, ORF6는 한 쪽 strand에, ORF2, ORF3, ORF4는 반대편 strand에 존재하였다. 단편의 총 길이는 6,748bp이고 평균 GC content는 72.7%로 분석되었다 (Fig. 1). 6.7 kb EcoRI-HindIII DNA 단편의 자세한 구조는 GenBank (GenBank accession no. AY588948)에 등록하였고, Table 1에 유전자 위치를 정리하였다.

sprT 유전자 주변 유전자의 비교 분석

첫번째 open reading frame (ORF1)은 377번째 nucleotide (nt)에서 start codon(ATG)이 시작하고 1,315번째 nt에서 종결된다 (Fig. 2). ORF1은 312 개의 아미노산으로 구성된 분자량 33

kDa, pI 10.21의 염기성 단백질을 코딩하는 것으로 추정된다. 또한, 152-180번째 아미노산 서열에 short-chain dehydrogenases/reductases family motif를 갖고 있다. BLASTP(2) search 결과, ORF1은 *Streptomyces avermitilis* MA-4680의 putative oxidoreductase (307개의 아미노산으로 구성된 분자량 32.8 kDa, 예상 pI 10.08의 단백질)와 70.51% 일치(12), *Streptomyces coelicolor* A3 (2)의 putative oxidoreductase (292개의 아미노산으로 구성된 분자량 30.6 kDa, pI 9.97의 단백질)와 50.32% 일치(3)를 보이는 것으로 조사되었다. 상동성 계산은 Clustal W program 을 사용하였다 (22).

두번째 open reading frame 은 1,614 nt 에서 start codon (GTG)이 시작되어 2,396 nt에서 종결되며 *Streptomyces griseus* trypsin (SGT)를 코딩하는 sprT 유전자로 밝혀졌다(Fig. 3). SGT

ORF1	MHHSPDGS HGRVP GGPLHGRVAVVTGAARGVGEGLARSLSDAGMHVALLGRERATLRET
SAV699	MRD I GSVGGHSSPPGTPLRGRVAVVTGAARGVGEALAQRLSAAAGMLVALLGREEETLRRR
SC07389	MTDS-----PLQNRTVVVTGAARGLGAALARACALRGAR I ALLGLEKPRLDAL
	* ** : * : * : * : * : *
ORF1	AASLSGPS I CVECD I DRTALADAARRVETGLGPASVVVANAG I AVSGPFORTD GELWQR
SAV699	AASLPNRN I YEADVTDHAALEDAAARHVDNELGPASVVVANAG I AAGGPFTRTAADLWQR
SC07389	AADLPTPALAVEADVTDPAALADAAGETRRRLGRPSVVVANAGVAHGGPFATSDPAEWGR
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : *
ORF1	V I D V N L T G S A N T A R A F L P Q L T A T R G Y F L Q I A S T A A F G A A P M M S A Y C A S K A G A E S F A L A L R
SAV699	V I D V N L V G S A N T A R A F L P Q L T H T R G Y F L Q I A S T A A F G S A P M M S A Y C A S K A G A E S F A Q A L R
SC07389	V V D V N L T G S A H T A R A F L P D L L D T A G Y H L Q I A S L A S L G A A P M M S A Y C A S K A G V E A F A H S L R
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
	Dehydrogenase/Reductase motif
ORF1	GEVEPDGVRVG I AYLHWTGTDMLTG I DDDPVLEALRRNQPRPARRVHSSAQVAQWLTRG I
SAV699	GEVERDGI TVG I AYLHWTGTAMVAG I DDHPVLQALRRNQPRFARRVHTPAQVADWLTTG I
SC07389	AEVAHRGVAVG I AYLNW I D T D M I R D A D R H P V L R E L R A H M P P P A R R T F S A D D V A A R L V R A L
	. ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
ORF1	ARRSRN I YAPPCVRWCQPLRPLFPVLVARAARRELRARPSRELSAPVEVLGAGGRADWSS
SAV699	THRAHH I YAPPWLWCQPLRPLFPVAVAR I TRRELRTSHTELAADVTVL GAGGLADWNS
SC07389	ERRRTAVYVPGWLR L VQLGRASLPVVARLSRELPRLEAEELGPTGPLGAGGRAGHAA
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
ORF1	YRASRSGPPADG
SAV699	FLSRKHL-----
SC07389	GTRT-----

Fig. 2. Amino acid comparison of three oxidoreductase sequences. The top sequence is from this work. Others are the oxidoreductase gene products from *S. avermitilis* (GenBank accession no. NP821874) and *S. coelicolor* (CAB76290), respectively. A putative dehydrogenase motif is indicated by dots below the amino acid sequence.

```
SGT          ---VHFLRLALKRCSAVATVAIASRRPPARHPRPPTTRVVGGTRAQQGEFFPMVRLSM
Trypsin      MQLKNTLVRLAKRFAAVGAVVLAASVLQPTSASAAP---VVGGTAAQGEFFPMMVRLSM
Tip          MLTVTTLLVQLMKRTLAVGAVALAASVLQPGTATAGPAP---VVGGTAAQGEFFPMMVRLSM

              . :.: :** .. *. *   *   . *. * *****:*****

SGT          GCGGALYAQD|VLTAACHVSGSGNNTS|TATGGVDLQSSSAVKVRSTKVLQAPGYNGTG
Trypsin      GCGGSLLTPQ|VLTAACHVSGSGNNTS|TATAGVDLQSGSAIKVRSTKVLQAPGYNGSG
Tip          GCGGALYTQQ|VLTAACHVSGSGNNTS|TATAGVDLNSSAIKVKSTKVLQAPGYNGKG

****.* : :*****.*****:*.**:*****.*
           Serine protease motif (Histidine active site)

SGT          KDWALIKLAQP|NQPTLK|IATTAYNQGFTFVAGWGANREGGSQQRYLLKANVPFVSDA
Trypsin      KDWALIKLAQP|NLPLTN|IATTAYNSGFTFVAGWGANREGGSQQRYLLKAQVPFVS DAT
Tip          KDWALIKLAKP|NLPTLK|ADTKAYDNGFTFVAGWGAAREGGGQQRYLLKANVPFVS DAS

*****:*** ***:** *.*:..***** ***,*****:*****

SGT          CRSAYGNELVANEEICAGYPD TGGVDTCQGDSGGPMFRKDNADEWI|QVG|VSWGYGCARP
Trypsin      CQQSYR-ELIPSEEMCAGYT-SGGTDTCQGDSGGPMFRDAAGAWI|QVG|VSWGYGCARP
Tip          CQSSYGSDLVPSEEICAGLP-QGGVDTCQGDSGGPMFRDNNAWI|QVG|VSWGEGCARP

*.:.* :*:.:**. **.....*. . ****
           Serine protease motif (Serine active site)

SGT          GYPGVYTEVSTFASAI|ASAARTL
Trypsin      NYPGVYTEVSTFASAIKSAAATL
Tip          NYPGVYTEVSTFAAIKSAAAAM

*****:** *** :
```

Fig. 3. Amino acid comparison of the SGT and two trypsin proteases. Trypsin, trypsinogen precursor from *S. fradiae* (BAA04089); Tlp, trypsin-like protease from *S. exfoliatus* (AAQ88430). The histidine active site (LTAAH) and the serine active site (DTCQGDSGPMF) are underlined.

는 260개의 아미노산으로 구성되어 있는 분자량 27 kDa, 예상 pI 9.43의 단백질로 이미 보고된 바 있다(17). 세포외로 분비된 mature SGT는 223개의 아미노산으로 구성된 23kDa의 분자량을 갖는 것으로 예상되고 있으나, SDS-PAGE에서는 28 kDa정도의 크기로 나타난다(18). 잘 보존된 serine protease motifs로 LTAAHC (70~75번 아미노산)와 DTCQGDSGPMF (203~214번 아미노산)가 존재한다. 첫번째 motif는 histidine active site ([LIVM]-[ST]-A-[STAG]-H-C)이고, 두 번째 motif는 serine active site ([DNS TAGC]-[GSTAPIMVQH]-x(2)-G-[DE]-S-G-[GS]-[SAPHV]-[LIV MFYWH]-[LIV MFYSTANQH])에 해당한다(9). SGT는 *S. fradiae*

ATCC 14544의 trypsin protease (259 아미노산으로 구성된 분자량 26.7 kDa, 예상 pI 9.2인 단백질)와 75.7% 일치(15), *S. exfoliatus* SMF13의 trypsin-like protease (260 아미노산으로 구성된 분자량 26.6 kDa, 예상 pI 8.9인 단백질)와 75% 일치를 보인다(16).

세 번째 open reading frame (ORF2)은 3,016 nt 에서 start codon (ATG)이 시작하여 2,507 nt에서 종결된다 (GenBank accession no. AY588948). ORF2는 169 아미노산으로 구성된 분자량 18.7 kDa, 예상 pI 4.67의 단백질을 코딩하고 있으며, *Micromonospora echinospora* NRRL15839 에서 보고된 CalU16

```

ORF3      MSYQYGVDPFDALADPVRRLDLLRALASGPARVVDLAARHPISRPAVSKHLRVLTEAGLVT
Msr3770   MMFS---DAFMAIADPNRRHLLLEELRRGPKTVNELAAGLPVSRPAVSQHLKVLLDAGLVN
SMc03998  MTIA---DPFDAIADPNRRHLLLEELRRAPRTVNELAAGLPISRPAVSQHLKALLDCNLVS
          *      * . * * : * * * * . * . * . * : * * * : * * * * * : * : . * . * .
          Helix-turn-Helix motif region

ORF3      VEDRGRERHYALARAGLAPVRALLDELAARRPPIPESAFDALDLEVRRTVHRRAGADAA
Msr3770   AKAEGTRRVYTVSNAGFLRLNIWLDQFWEA-----
SMc03998  VSTSGTRRIYAINRPGFDRNLNLWDQFWS-----
          ..  * . * * : : . * : : . * * : :

ORF3      PDAVRPQEESA
Msr3770   -----
SMc03998  -----

```

Fig. 4. Amino acid comparison of the ORF3 amino acid and two transcription regulatory protein. Msr3770, transcription regulator from *Mesorhizobium loti* (NP104804); SMc03998, hypothetical transcription regulator from *Sinorhizobium meliloti* (NP386888). The sequence alignment obtained using the ClustalW program. The helix-turn-helix motif is indicated.

(186 아미노산으로 구성된 분자량 20.1 kDa, 예상 pI 4.53인 단백질) 와 22.51% 일치(1)를 보이고는 있으나 기능을 예측할 수 없었다 (자료 미제시).

네 번째 open reading frame (ORF3)는 3,408번째 nt에서 ATG start codon이 시작하여 3,013번째 nt에서 종결된다 (Fig. 4). ORF3 단백질은 131개의 아미노산으로 구성된 분자량 14.3 kDa, 예상 pI 6.92로 추측되며, Arsenical Resistance Operon Repressor (ArsR) family에 속하는 *Mesorhizobium loti* 의 regulatory protein 과 31.3% 일치(13), *Sinorhizobium meliloti* 에서 보고된 transcription regulator protein 과도 30.53% 일치를 보인다(4). 이들은 모두 DNA에 결합 할 수 있는 helix-turn-helix motif(7)를 갖고 있다.

다섯번째 open reading frame (ORF4)은 GTG start codon 이 5,014번째 nt에서 시작하며, 3,566번째 nt에서 TGA stop codon을 갖고 있다(Fig. 5). ORF4는 482 아미노산으로 구성되며, 분자량

50.13 kDa, 예상 pI 4.94의 단백질로 추측된다. 단백질내에는 cell wall anchor domain (LPXTG)이 101-105 (LPSTG)번째 서열에서 발견되며, transmembrane helix motif (FFGTAPYVE)가 187-195 아미노산 서열에서 발견된다(19). ORF4 산물은 *Listeria monocytogenes* EGD-e의 putative peptidoglycan bound protein (분자량 60.46 kDa, 예상 pI 5.15)과 22.2% 일치(8)를 보이고 있는데, cell wall anchor domain이 C-terminal에 위치하는 것이 ORF4와 다른 점이다.

여섯번째 open reading frame (ORF5)은 GTG start codon이 5,380번째 nt에서 시작하며 6,007번째 nt에서 끝난다 (GenBank accession no. AY588948). ORF5는 205개의 아미노산으로 구성된, 분자량 22.8 kDa, 예상 pI 8.11의 단백질을 코딩하는 것으로 추정된다. *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 putative membrane protein (155 아미노산으로 구성된 분자량 16.2 kDa, 예상 pI 11.2인 단백질)과 28.10% identity(3), *Mesorhizobium loti* 의

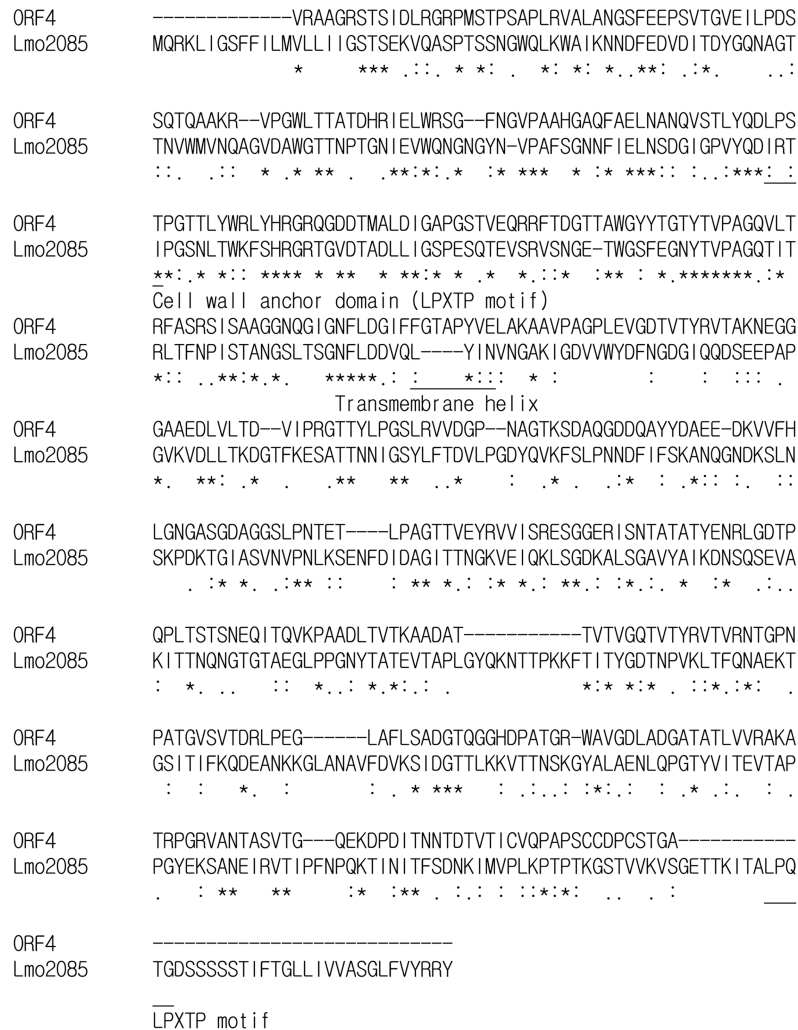


Fig. 5. Alignment of the deduced amino acid sequence of *S. griseus* ATCC 10137 ORF4 with another peptidoglycan bound protein. Lmo2085 is a putative peptidoglycan bound protein from *Listeria monocytogenes* (NP465609). The LPXTG motifs and transmembrane helix region are indicated by underline.

putative membrane protein (210 아미노산으로 분자량 23.3 kDa, 예상 pI 9인 단백질)와 25.58% 일치) (13)를 보인다 (자료 미제시). ORF5에는 5개 영역에 putative transmembrane helices가 존재하는 것으로 추정된다(19).

불완전한 일곱번째 open reading frame (ORF6)은 GTG start codon이 6,452 nt에서 시작한다 (GenBank accession no. AY 588948). 전체 ORF는 아니지만, 밝혀진 아미노산 서열로만 비교했을 때, *Streptomyces avermitilis* MA-4680 의 putative lipoprotein (423 아미노산으로 구성된 분자량 44.2 kDa, 예상 pI 5.7 인 단백질) 과 높은 상동성을 보여 주었다(12).

이상, *S. griseus* ATCC 10137 균주로부터 *sprT* 유전자를 포함하는 6.7 kb 단편을 클로닝하여 *sprT* 유전자 주위에 존재하는 6 개의 ORFs의 기능에 대하여 추론하여 보았다. 본 연구진은 *S. griseus*에서 serine-protease를 코딩하는 *sprA*, *sprB*, *sprC*, *sprD*, *sprU* 및 *sprT*의 유전자의 기능에 대하여 연구하여 왔다. 최근, AdpA (A-factor dependent protein A) 단백질은 *sprA*, *sprB*, *sprD*, *sprU* 및 *sprT*의 promoter 상류 영역에 결합하여 각 유전자의 전사를 positive 하게 조절하고 있는 것으로 보고되었다 (14, 22). A-factor는 AdpA의 발현을 유도하여, *S. griseus*의 형태 분화 및 이차대사에 관여하는 유전자군의 조절 유전자들을 positive 하게 조절하는 global regulator 이다. 따라서, A-factor regulon을 구성하고 *sprA*, *sprB*, *sprD*, *sprU* 및 *sprT* 유전자 산물도 단순히 단백질을 분해하는 기능의 protease가 아닌, 형태 분화나 이차대사에서 기능을 담당할 가능성이 있는 것으로 생각된다. 따라서, 이와 같은 protease를 코딩하는 유전자 주변에 존재하는 유전자의 기능을 규명함으로써 protease의 기능을 유추하려 하였다. 본 연구결과 밝혀진 *sprT* 주변 유전자의 아미노산 배열을 기준으로 판단하면, ORF4, ORF5, ORF6는 세포막 또는 세포벽 구성성분과 관련이 있고, ORF2 와 ORF3 는 주변 유전자의 발현에 관련된 조절 유전자일 가능성이 있는 것으로 추측되었다. 이런 점에서, SGT는 세포막 또는 세포벽의 합성이나 분해 과정에서 어떤 특별한 기능을 담당할 가능성이 높은 것으로 추론 된다. 실제 *sprT* 유전자의 발현이 형태분화가 시작되는 배양 후기에 시작되고, 배양 후기에 기지균사가 용해되어 분해된 세포로부터 유리된 영양물질이 기균사 형성에 재이용된다는 보고를 참고하면, 위의 가정이 상당히 설득력이 있다(5, 14). 이와 같은 SGT의 기능에 관한 가설을 검증하는 연구가 추후의 연구를 통해 밝혀지기를 기대한다.

감사의 글

The research was supported by the Driving Force Project for the Next Generation of Gyeonggi Provincial Government in Republic of Korea.

참고문헌

1. Ahlert, J., E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa,

- B.O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Csisny, R.E. Whitwam, C.M. Farnet, and J.S. Thorson. 2002. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* 297, 1173-1176.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
3. Bentley, S.D., K.F. Chater, A.M. Cerdano-Tarraga, G.L. Challis, N.R. Thomson, K.D. James, D.E. Harris, M.A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hronsby, S. Howarth, C.H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B.G. Barrell, J. Parkhill, and D.A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141-147.
4. Capela, D., F. Barloy-Hubler, J. Gouzy, G. Bothe, f. Ampe, J. Batut, P. Boistard, A. Becker, M. Boutry, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, T. Godrie, A. Goffeau, D. Kahn, E. Kiss, V. Lelaure, D. Masuy, T. Pohl, D. Portetelle, A. Puehler, B. Purnelle, U. Ramsperger, C. Renard, P. Thebault, M. Vandenbol, S. Weidner, and F. Galibert. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiotic *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9877-9882.
5. Chi, W.-J., J.-M. Kim, S.-S. Choi, D.-K. Kang, and S.-K. Hong. 2001. Overexpression of SGPA and SGT induces morphological changes in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 1077-1086.
6. Chi, W.-J., Y.-H. Kim, J.-H. Kim, D.-K. Kang, S.-S. Kang, J.-W. Suh, and S.-K. Hong. 2003. *Streptomyces griseus* Trypsin (SGT) has gelatinase activity and its proteolytic activity is enhanced by manganese. *J. Microbiol.* 41, 289-294.
7. Dodd I.B., and J.B. Egan. 1990. Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 18, 5019-5026.
8. Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakrabrotty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durand, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fishi, F. Garica-Del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Karst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. Mata Vicente, F. Ng, G. Kurapkat, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Perez-Diaz, B. Remmel, M. Rose, C. Rusniok, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*. 294, 849-852.
9. von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic. Acids. Res.* 14, 4683-4690.
10. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H. M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, and J.M. Ward. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : a laboratory manual, *The John Innes Foundation, Norwich, England*.
11. Horinouchi S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* 7, 2045-2057.
12. Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura. 2003. Complete

- genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 21, 526-31.
13. Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K., Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 331-338.
 14. Kato J.-Y., W.-J. Chi, Y. Ohnishi, Soon-Kwang Hong, and S. Horinouchi. 2005. Transcriptional Control by A-Factor of Two Trypsin Genes in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 187, 286-295.
 15. Katoh, T., N. Kikuchi, K. Nagata, and N. Yoshida. 1995. Cloning and expression of trypsin-like enzyme from *Streptomyces fradiae* for comparative analysis of functional regions of *Streptomyces* and mammalian trypsins. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 440-445.
 16. Kim, I.S. and Lee, K.J. 1996. Chymotrypsin-like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiology* 142, 1797-1806.
 17. Kim, J.C., S.H. Cha, S.T. Jeong, S.K. Oh, and S.M. Byun. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Streptomyces griseus* trypsin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 707-713.
 18. Koo, B.J., K.H. Bae, S.M. Byun, and S.-K. Hong. 1998. Purification and characterization of *Streptomyces griseus* trypsin overexpressed in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 333-340.
 19. Rost B., R. Casadio, P. Fariselli, and C. Sander. 1995. Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* 4, 521-533.
 20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. maniatias. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ndEdn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 21. Thompson, J.D., D.G Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
 22. Tomono, A., Y. Tsai, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi. 2005. Three chymotrypsin genes are members of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *J. bacteriol.* 187, 6341-6353.

(Received November 29, 2005/Accepted December 9, 2005)

ABSTRACT : Molecular Cloning and Analysis of the Genes in the Vicinity of *Streptomyces griseus* Trypsin (SGT) Gene from *Streptomyces griseus* ATCC10137
Won-Jae Chi, Mi-Soon Kim, Jong-Hee Kim, Dae-Kyung Kang¹, and Soon-Kwang Hong*.
 (Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 449-728, Korea and ¹Bio-Resources Institute, Easy Bio System Inc., Chonan 330-820, Korea)

A 6.7kb DNA fragment containing the *sprT* gene encoding *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) was cloned from *Streptomyces griseus* ATCC 10137, and the complete nucleotide sequence was determined. Nucleotide sequence and deduced amino acid of the *EcoRI-HindIII* fragment revealed the presence of the six complete ORFs containing the *sprT* gene and one incomplete ORF, which were named ORF1, SGT, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, and ORF6, respectively. ORF1 has homology with the oxidoreductases from several organisms. ORF2 and ORF3 show similarity with unknown proteins and transcription regulator that belongs to the ArsR family, respectively. ORF4 and ORF5 show homology with the peptidoglycan bound protein with LPXTG motif from *Listeria monocytogenes* and the membrane protein with transmembrane helix from several organisms, respectively. The last ORF, ORF6, shows homology with the lipoprotein from *Streptomyces avermitilis*.