

## *Streptomyces coelicolor* (Müller)로 부터 두가지 Catalase 유전자의 분리 및 분석

조유희 · 노정혜\*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구센터

*Streptomyces coelicolor* (Müller)로부터 catalase 유전자를 클로닝하기 위하여, 진핵생물과 몇몇 원핵생물의 전형적인 catalase (monofunctional catalase)들 사이에 보존된 부위를 이용하여 PCR primer를 제조하였다. 게놈 DNA를 PCR로 증폭한 결과, catalase 유전자로부터 유래할 수 있는 276 bp의 절편이 관찰되었다. 이를 클로닝한 뒤 염기서열을 분석하였다. 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열의 상동성 검색 결과, 전형적인 catalase의 유전자로부터 유래한 것이 확인되었으며, 이를 탐침으로 *S. coelicolor*의 파아지  $\lambda$  genomic DNA library를 screening하였다. 그 결과 4.5 kb의 삽입체를 가지는 한 개의 클론을 얻었으며, PCR 산물과 hybridization하는 부위를 중심으로 부분적인 염기서열을 결정하였다. 이 클론은 PCR 산물과 동일한 염기서열을 가지고 있었으며, 전형적인 catalase의 ORF를 전부 가지고 있는 것으로 추정된다. 이 catalase 유전자를 *catA*로 명명하였다. PCR 산물을 탐침으로 게놈 DNA의 Southern hybridization을 약간 낮은 stringency에서 수행하면, 2~4개의 절편이 검출되는데, 이 중 *SaII*으로 절단된 약 5.8 kb의 절편을 colony hybridization에 의해 클로닝하였다. 부분적인 염기서열 분석 결과, 이 절편도 전형적인 catalase들과 높은 상동성을 보였으며, *catA*와는 전혀 다른 염기서열을 가지는 또 다른 종류의 catalase 유전자임을 알 수 있었다. 이 유전자를 *catB*라 명명하였다. 본 결과는 *S. coelicolor*에 여러 가지 catalase가 존재하며, 이들의 발현 양상이 환경에 따라 변화한다는 보고와 부합되며, catalase 유전자들의 발현이 어떻게 조절되는지를 밝힐 수 있는 기반을 마련하게 되었다.

**KEY WORDS** □ *S. coelicolor* (Müller), typical (monofunctional) catalase, catalase genes, PCR, Southern hybridization

Catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소로, 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 대한 방어 기작에 중요한 역할을 한다. *E. coli*를 비롯하여 (9, 10), *Bacillus subtilis* (23, 24), *Streptomyces coelicolor* (16, 17), *Saccharomyces cerevisiae* (31, 32) 등 많은 종류의 원핵 생물과 진핵 미생물은, 두 가지 혹은 그 이상의 catalase를 가지고 있다는 것이 생화학적으로 알려진 바 있다. 그러나 각 균속에서 두 가지 이상의 catalase 유전자가 모두 클로닝되어 보고된 것은, 1994년 10월 현재 *E. coli*와 *S. cerevisiae*에서 뿐이다.

원핵 생물로서, catalase의 조절이 가장 많이 연구되어 온 것은 *E. coli*로서, 두 종류의 catalase인 HPI와 HPII는, 그 합성의 조절 기작이 매우 다르다. HPI는 OxyR 조절군의 일원으로서 과산화수소에 의해 합성이 증가되는 반면 (8, 27), HPII는 KatF 조절군의 일원으로서, 세포가 정체 성장기에 들어가거나 TCA 중간 산물을 이용해서 성장할 때 발현이 유도됨이 알려졌다 (22). 효소의 생화학적 특성에 있어서도, HPI는 과산화수소에 대한  $K_m$ 이 낮고, bifunctional catalase로서 peroxidase 활성을 가지고 있는 반면, HPII는 monofunctional catalase (전형

적인 catalase)로서 비교적 높은  $K_m$ 을 가진다. 뿐만 아니라, cofactor인 heme group의 스펙트럼도 약간 다르며 (9, 10), 유전자의 1차 구조에서부터 유추되는 효소의 기능에 중요한 잔기나 진화적 유연 정도에 있어서도 많은 차이를 보인다 (34, 35).

*E. coli*와 함께 많은 연구가 되어온 *B. subtilis*에서도, catalase-1과 catalase-2의 두 종류가 순수 분리되었다. 그들의 조절에 관해서는 *E. coli*에 비해 많은 연구가 되어 있지는 않지만, catalase-1이  $H_2O_2$ 에 대해 반응한다는 점과, catalase-2가 HPII와 구조적으로 유사하고, 포자 생성 단계의 stage V에서만 발현이 증가된다는 점 (23, 24) 등이 *E. coli*의 두 catalase에 대응되는 유사한 특징이라 할 수 있다. 클로닝된 catalase-1 유전자의 염기서열이 고등 생물의 전형적인 catalase와 비슷하다는 것이 알려졌다 (7). HPI와 비록 그 조절 양상은 유사하지만 적어도 1차 구조나 진화적 유연관계는 다르다고 할 수 있다.

*Streptomyces*는 그람 양성 세균으로서, 고등 균류와 유사한 형태 분화 과정을 거쳐 균사체를 형성하는 방선균에 속하며 그 생리적인 분화 과정도 형태 분화 못지 않는 다양성을 보여 여러 가지 유용한 2차 대사

산물의 생성과 밀접한 관련을 가지므로 많은 관심의 대상이 되어 왔다. 그 중 유전학적으로 많은 연구가 되어온 *S. coelicolor* A3(2)의 경우, 포자 형성을 위해 산소를 꼭 필요로 하지만, 형태 분화 과정에 있어서는 산소의 역할에 대하여 밝혀진 바가 없다. 그러나, 최근 *S. coelicolor*에서 과산화수소에 의한 산화적 스트레스에 대해 적응 현상이 관찰된 것 (19)과 각종 산화제에 의해 분화 과정이 억제된다는 연구결과들 (정혜정·윤홍덕, 미발표 결과)은 산소가 생리적 분화에서도 중요한 요인이 될 수 있다는 가능성을 보여준다.

Kim 등 (16, 17)은 *S. coelicolor*에서 여러 종류의 catalase 활성때를 관찰하였는데, 그 중에는 *E. coli*나 *B. subtilis*에서처럼,  $H_2O_2$ 에 반응하는 활성때도 있었고, 정제 성장기에만 특이적으로 출현하는 활성때도 있었다. 두가지 이상의 catalase가 서로 다른 방식으로 세포의 생존을 위해 조절되는 기작을 연구하기 위하여 본 연구에서는 우선 catalase 유전자들을 클로닝하여 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균주, 파라이지, 플라스미드 및 배양 조건

*Streptomyces coelicolor* A3(2)와 *S. coelicolor* Müller (ATCC 10147)를 사용하여, R2YE (14)에서 얻은 포자를 종균 배양용 배지 (glucose 0.3%, soytone 1.7%, peptone 0.3%,  $CaCO_3$  0.4%)나 YEME에 적당량 접종하여 30°C, 120 rpm에서 24 시간 동안 배양한 후, 종균으로 사용하였다. 발아한 종균을 4%로 YEME에 접종하여 48시간 배양한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 균체를 수확하였다.

플라스미드 벡터로는 pGEM3Zf(+) (Promega)와 pUC18을 사용하였다. 형질 전환용 숙주로는 *E. coli* DH5 플. λZAPII (Stratagene) 계통 DNA library의 숙주로는 XL1-Blue를 사용하였다.

### DNA의 분리 및 정제

*Streptomyces* 계통 DNA의 분리는 Hopwood 등의 방법 (13, 14)을 변형하여 사용하였다. 플라스미드 DNA는 alkaline lysis 방법으로 대량 분리하였다 (5). 형질 전환체로부터 재조합 DNA를 miniprep하는 경우도 alkaline lysis 방법을 사용하였으며, 콜로니에서 직접 DNA를 얻는 경우는 Barnes의 방법 (3)을 따랐다. 분리된 DNA는 PEG를 사용하여 침전시켰으며 (20), 페놀: 클로로포름 추출로 정제를 반복한 뒤 사용하였다.

### DNA 재조합 및 형질 전환

DNA 재조합에 사용된 여러 종류의 제한 효소는, 제철 화학, BM (Boehringer-Mannheim), NEB 등에서 구입하였으며, alkaline phosphatase (calf intestine)와 ligase (T4)는 BM에서 구입하였다. 특정 DNA 절편을 gel에서 elution할 때는, DEAE-membrane 방법 (Schleicher & Schuell, NA45 사용), freeze-squeeze 방법 (33)을 사용하거나 Glass

Milk를 사용하였다 (BIO101, GeneClean kit II).

재조합의 기본 과정은 Sambrook 등의 방법 (29)을 따랐는데, PCR 산물을 재조합하는 경우는 Lorenz의 방법 (25)을 변형하여 사용하였다. 대개 삽입체와 벡터의 비를 1:1~2 정도로 하여 150 ng의 벡터를 10  $\mu$ l에서 반응시켰다.

### Polymerase chain reaction (PCR)

Taq DNA polymerase (제철 화학)를 사용하였고, typical catalase에 대한 primer인 PH (5'-TTCCG-ACCGSGAGCGSATCCCCGAC-3')와 PN (5'-GATGAAGAAGAYSGGSGTGTGTTGTT-3')은 모두 degeneracy가 8이 되도록 고안한 뒤 (12), 미국 Oligo사에서 합성하였다. 증폭 반응은 Perkin-Elmer Cetus사의 DNA thermal cycler를 사용하여 수행하였다. 최적 증폭 조건은 실험적으로 결정하였는데,  $MgCl_2$ 는 1.5 mM로 고정하였고, annealing이나 extension 조건은, 첫번째 5 cycle (94°C 1분, 50°C 1.5분, 72°C 30초), 두번째 3 cycle (94°C 1분, 40°C 2분, 65°C 1분), 세번째 23~30 cycle (94°C 1분, 44°C 1.5분, 72°C 45초)에 이은 최종 extension (72°C 10분)의 순서로 수행하였다 (15, 26).

### 염기서열의 결정 및 유사 서열의 탐색

대부분의 염기서열 결정은 Sanger 등의 방법 (30)을 이용하였다. 증폭 산물을 직접 template로 사용하는 경우는, APCR (asymmetric PCR, 1)에 의해 단선 DNA를 얻은 뒤,  $\gamma$ - $^{32}P$ 로 표지한 limiting primer로 annealing하였고 (18), 플라스미드에 클로닝되어 있는 DNA를 사용하는 경우는 NaOH 변성화에 의해 단선 DNA를 얻고 universal primer (NEB)로 annealing하였다 (29). Annealing된 DNA-primer 복합체는 USB (United States Biomedical)의 Sequenase version 2.0을 사용하여 연장하였다.

유사 서열을 탐색하기 위하여, 미국 NCBI의 BLAST (basic local alignment search tools) 프로그램 (2)을 사용하여 GenBank와 EMBL의 데이터 베이스를 검색하였다.

### Southern hybridization

계통 DNA를 각종 제한효소로 절단한 뒤, 10  $\mu$ g씩 0.65% agarose gel에서 전개하였다. 전개한 gel을 0.25 M HCl 용액에서 15분, 변성 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에서 45분, 중화 용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.0)에서 30분 동안 처리하고 blotting하였다. 주로 nylon membrane (Amersham, Hybond-N+)을 사용하였으며, 20 Torr 이하의 약한 진공을 이용한 진공 blotting과 모세관 현상을 이용한 capillary blotting을 병행하였는데, blotting 및 그 이후의 과정은 Sambrook 등의 방법 (29)을 따랐다. 건조된 blot은 70~80°C에서 2시간 이상 baking하였다. Blocking 용액 (Amersham, ECL detection system)이나 5×Denhardt's 용액에서 1~3시간 이상 blocking (pre-hybridization)하고, [ $\alpha$ - $^{32}P$ ]dATP (Amersham)와 Klenow 효소 (제철 화학)를 이용하여

표지하거나 (29), ECL direct system (Amersham)을 이용하여 표지한 탐침으로 12시간 이상 hybridization하였는데, hybridization 용액은  $5\times$  SSC를 사용하였다. Hybridization 반응은, 동위 원소를 사용한 경우  $65^{\circ}\text{C}$ 로 수행하였고, ECL을 사용한 경우는  $42^{\circ}\text{C}$ 로 수행하였다. 동위 원소를 이용한 경우  $58\sim 60^{\circ}\text{C}$ 에서 낮은 stringency로 hybridization하기도 하였다. 세척은, ECL의 경우 제조 회사에서 추천하는 방법에 따라 수행하였으며, 동위 원소로 표지한 경우는  $2\times$  SSC, 0.1% SDS 용액으로 상온에서 10~20 분간 1~2회 세척하고,  $0.2\times$  SSC, 0.1% SDS 용액으로 10분간 상온에서 세척하였는데, background를 없애기 위해, 온도를 높여가면서 세척을 수행하였다.

동위원소 사용 시는, direct autoradiography (Agfa Curix XP 100AFW)나 Molecular Image Analyzer (Bio-Rad, GS-250 Molecular Imager)로 감광시켰고, ECL 사용시는 제조 회사에서 추천하는 방법에 따라 상온에서 5~20분간 감광시켰다.

#### Plaque hybridization

$\lambda$ ZAPII에 평균 크기 약 4~5 kb 정도의 *S. coelicolor* (Müller) 게놈 DNA를 삽입시킨 library로부터 약  $1.5\times 10^6$ 개의 plaque를 screening하였다. Plaque는 직경 0.5 mm 정도 될 때까지 키운 다음, nitrocellulose membrane (Gelman Sciences, Bio-Trace NT 또는 Schleicher & Schuell, BA-85)로 5분 동안 흡착하고, 변성 용액에서 3분, 중화 용액에서 10분 동안 처리하고  $2\times$  SSC로 세척한 뒤,  $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 이상 baking하였다. 이후 hybridization이나 세척은 Southern hybridization에서와 같이 하였고, hybridization은 4시간 정도로 짧게 수행하였다.

#### Colony hybridization

Sambrook 등의 방법 (29)에 따라, membrane (nitrocellulose 또는 nylon)을 얇은 LA 평판 배지 위에 단일 콜로니들을 이주시개로 옮겨 12시간 이상 배양하여 얻은 콜로니들을, 10% SDS에서 3분, 변성 용액에서 5분, 중화 용액에서 10분 동안 처리하고,  $2\times$  SSC로 세척한 뒤,  $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 이상 baking하였다. 이후 hybridization이나 세척은 plaque hybridization에서와 같이 수행하였다.

## 결과 및 고찰

#### Catalase의 보존 부위와 primer의 design

Entrez/Sequences Database (Release 7.0, 1993년 10월)로부터 얻은 catalase는 모두 33종인데, 그 중 식물이나 동물 그리고 균류를 포함하는 진핵 생물체의 catalase가 22종, 원핵 생물체의 catalase가 11종이었다. Meyers와 Miller의 알고리즘 (PC/GENE Release 6.01)에 의해 아미노산 서열의 상동성을 분석해 본 결과, 진핵 생물은 22종 모두가  $450\sim 550$  aa 정도로 비슷한 크기를 보였고 서로 매우 높은 상동성을

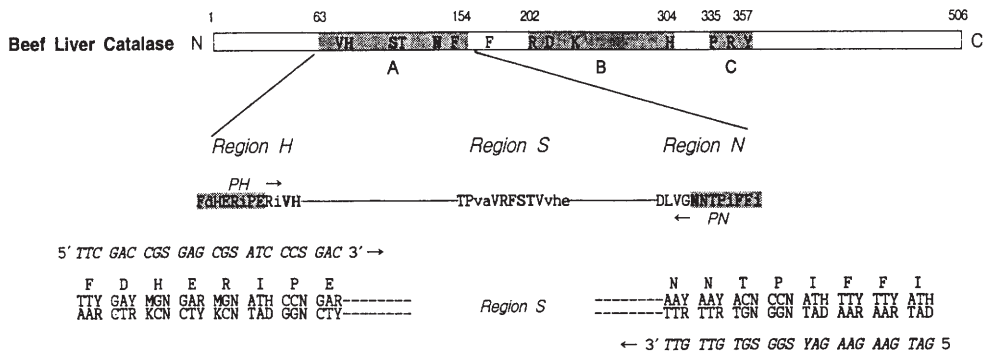
보였다. 실제로, 옥수수의 Cat2 유전자와 *Candida tropicalis*의 peroxisomal catalase 유전자가 클로닝되면서 진핵 생물체 catalase의 보존성에 관해 보고 되었으며 (4, 28), 이 후 클로닝된 여러 진핵 생물체의 catalase는 예외없이 기존의 진핵 생물체 catalase와 높은 상동성을 보였다. 그 중 *Bos tauros* (beef) liver catalase는 그 구조가 잘 알려져 있는데 (11), catalase의 작용 기작에 중요할 것이라고 생각되는 주요 아미노산 잔기로서 활성 부위의 His74, Ser113, Asn147들과, heme의 distal site와 결합할 것이라고 생각되는 Val73, Thr114, Phe152들이 있다. 이들이 서로 인접해 있다는 점이 특징적이며 (Val과 His, Ser와 Thr, 그리고 Asn과 Phe), 이들 부근의 1차 구조가 잘 보존되어 있다 (35, Fig. 1).

반면 원핵 생물체의 catalase 11종은 1차 구조의 차이에 의해 2개의 부류로 분류할 수 있다. 진핵 생물체의 catalase와 비슷한 크기와 높은 상동성을 보이며 peroxidase 활성이 없는 (monofunctional) 7종의 전형적인 catalase 부류와 peroxidase 활성을 가지면서 (bifunctional) 크기도 700 aa 이상이고, catalase가 아닌 peroxidase와 높은 상동성을 보이는 4종의 peroxidase-catalase 부류이다. 이 중 *E. coli*의 HPII (KatE)는 735 aa으로 구성되어 있으면서 진핵 생물체의 catalase와 서열 상의 상동성을 보이고 (35), *S. venezuelae*의 bca 유전자 산물인 bromoperoxidase-catalase는 peroxidase 활성이 있음에도 불구하고 진핵 생물체의 catalase와 크기나 아미노산 서열이 유사하다는 것이 예외적이다.

아미노산 서열 상에서 2개의 부류는 뚜렷하게 다른 특성을 보이며 동일 부류 내에서는 서열상의 상동성이 매우 높으므로, 각각 다른 계통으로부터 진화하였을 것이라고 생각할 수 있다 (21). 전형적인 catalase의 경우는 알려진 예도 많고, 그 활성 부위를 중심으로 보존성이 높는데, 가장 보존성이 높은 부분인 domain A 중에서 Val73과 His74, Ser113과 Thr114, Asn147과 Phe152를 포함하고 있는 보존 부위를 각각 H 부위 (region H), S 부위 (region S), N 부위 (region N)라 명명하였다 (Fig. 1). 이 중 domain A의 양끝에 해당하는 H 부위와 N 부위에서 각각 8개의 아미노산을 선택하여 PCR primer인 PH, PN primer쌍을 제조하였다 (Fig. 1). PH, PN primer쌍에 의해 증폭되는 부위의 예상되는 길이는 종의 차이 없이 276 bp (*Micrococcus* spp.의 경우만 273 bp)로서 그 중간에 또 하나의 보존 부위인 S 부위를 가지고 있을 것이므로, catalase 유전자로부터의 증폭에 대한 지표로 사용할 수 있다.

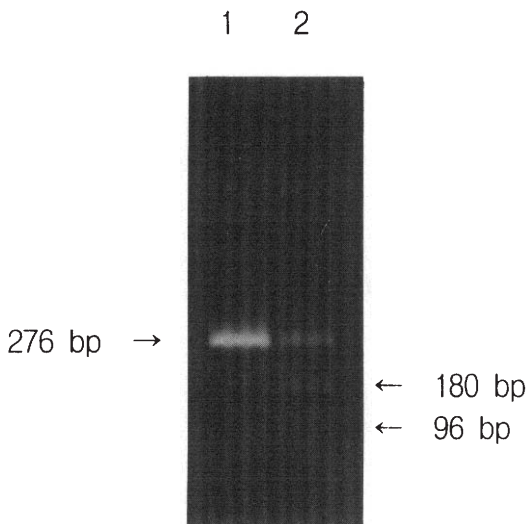
#### 게놈 DNA의 증폭

PH와 PN을 이용한 게놈 DNA의 Southern hybridization을 수행한 결과, PN은 강한 결합을 보이는데 반하여, PH는 거의 결합되지 못함을 확인하였다 (결과 미제시). 따라서 H 부위와 N 부위의 보존 정도가 다르다고 추측하여, primer annealing의



**Fig. 1.** Domain structure of typical catalase and the design of PCR primers.

The average size of a typical (monofunctional) catalase is about 500 aa with slight deviations. Three functionally important domains (A, B, and C) were shown (shaded) with their core amino acids indicated. The residue numbers on top are from beef (*Bos tauros*) liver catalase, the best-characterized catalase. Domain A contains the distal heme binding site (V73, T114, F152, F160) and the active site (H74, S113, N147). Domain B contains a putative NADPH binding site (R202, D212, K236, H304), whereas domain C contains the proximal heme binding site (P335, R353, Y357). The most significant conservation is found within domain A, which enabled the design of two primers named PH (sense orientation) and PN (anti-sense orientation), considering the codon usage in *S. coelicolor*. The ambiguity codons were indicated as recommended by the commission of the IUPAC-IUB; R (A/G), Y (C/T), M (A/C), S (G/C), K (G/T), D (A/G/T), H (A/C/T), N (A/G/C/T).



**Fig. 2.** PCR product and its *Bgl*III cleavage pattern. The reaction product from PCR amplification was loaded onto a 2% agarose gel (lane 1). The product was treated with restriction enzyme *Bgl*III (lane 2). The sizes of fragments were indicated.

차별을 두고 증폭하였다. PN만 annealing될 수 있는 조건으로 5 cycle (94°C 1분, 50°C 1.5분, 72°C 30초) 수행 후에, 좀 낮은 annealing의 3 cycle (94°C 1분,

40°C 2분, 65°C 1분), 그리고 나서 23~30 cycle (94°C 1분, 44°C 1.5분, 72°C 45초)을 수행하였다. 이 증폭 조건에서 약 280 bp의 절편이 증폭되는 것이 관찰되었다 (Fig. 2).

증폭된 DNA를 pUC18의 *Hinc*II 자리를 이용하여 재조합시키고 *E. coli*에 형질 전환하여, 7개의 전환체를 얻었다. 얻어진 7개의 재조합 플라스미드들 중 한 개의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열과 그것으로부터 추정된 아미노산 서열의 검색 결과, 진핵 생물체의 catalase 계열과 높은 상동성을 보였으므로, 전형적인 catalase의 유전자에서 유래한 것임을 알 수 있었다 (결과 미제시, Fig. 6 참조).

**PCR 증폭 절편을 탐침으로 하는 게놈 DNA의 Southern hybridization**

클로닝된 PCR 증폭 절편을 탐침으로 이용하여 *S. coelicolor* (Müller)의 게놈 DNA에 대한 Southern hybridization을 수행하였다. 60°C에서 hybridization하고 낮은 stringency 세척을 수행한 결과, *Sal*I 절편 중에는 4개 (MS1~MS4), *Pvu*II 절편 중에서 2개 (MP1, MP2)의 절편에 결합함을 관찰하였다 (Fig. 3). Phage DNA library의 screening 및 *cat*A의 클로닝

*S. coelicolor* (Müller) 게놈 DNA를 *Hae*III로 부분적으로 절단하여 약 4~5 kb 정도의 DNA를 얻은 뒤, *Eco*RI linker를 붙여 λZAPII에 클로닝한 게놈 DNA의 library로부터 약 1.5×10<sup>5</sup>개의 plaque를 screening하였다. 21개의 candidate를 선별하였고, 그 중 10개의 DNA를 분석한 결과, 길이만 조금 다를 뿐 모두 같은 제한 효소 지도를 가지고 있음을 확인



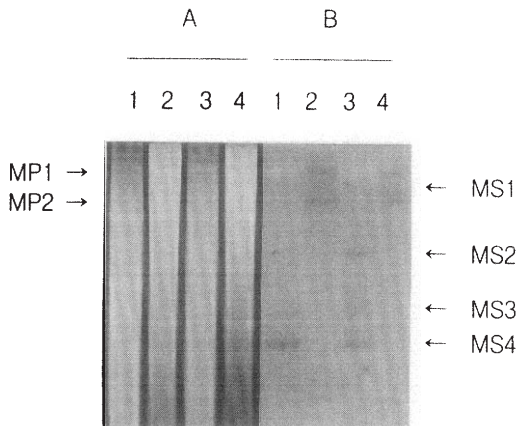


Fig. 3. Genomic Southern hybridization with the cloned PCR product.

Genomic DNAs from *S. coelicolor* (Müller) (lanes 1, 2) or A3(2) (lanes 3, 4) strains were digested with either *Sal*I (lanes 1, 3) or *Pvu*II (lanes 2, 4) restriction enzymes. The digested DNAs were electrophoresed on 0.65% agarose gel for 14 hrs at 20 V (panel A) and blotted onto nylon membrane and hybridized with the cloned PCR product as previously described (panel B). The position of hybridized bands was indicated, where MS and MP denote *Sal*I and *Pvu*II fragments, respectively.

하였다(결과 미제시). 그 중 4.5 kb의 삽입체를 가지고 있는 파아지 클론의 DNA를 제한 효소 지도와 Southern 분석을 행한 결과 catalase로서의 ORF를 전부 포함하며, 클로닝된 PCR product와 동일한 염기서열을 가지는 cognate template임을 알 수 있었다(Fig. 4). 이 catalase 유전자를 *catA*라고 명명하고 부분적으로 결정된 염기서열로부터 추측되는 아미노산의 서열을 다른 catalase들과 비교하였다(Fig. 5). 대개 전형적인 catalase가 가지는 500 aa (약 60~70 kDa)의 길이에 있어서 N 말단 extended arm의 길이가 40~50 aa로 60 aa 미만인 반면(6), *E. coli* HP11의 경우만 유일하게 143 aa로 길다. CatA의 경우는 60 aa로 전형적인 catalase와 비슷한 크기의 ORF를 가질 것이라고 생각된다(Fig. 5).

#### 5.8 kb *Sal*I에 대한 sub-library의 제조 및 *catB*의 클로닝

*S. coelicolor*에 여러 종류의 catalase가 존재한다는 연구 결과(16, 17)와 낮은 stringency hybridization에서 PCR 산물과 반응하는 절편이 여러 가지라는 사실(Fig. 3)로부터, *catA* 이외에 또 다른 종류의 catalase가 존재한다고 생각할 수 있다. 따라서 결합한 *Sal*I 절편 중 길이가 가장 긴 5.8 kb의 절편(MS1, Fig. 3)을 클로닝하기로 하였다. *S. coelicolor* (Müller)의 게놈 DNA 약 100 µg 정도를 *Sal*I으로 완전히 절단하여, 0.65% agarose gel에서 전기 영동한 후 5.8 kb 주변을 elution하였다. Elution한 5.8 kb 절편을 pUC18에 연결하여 sub-library를 제조하였다. PCR

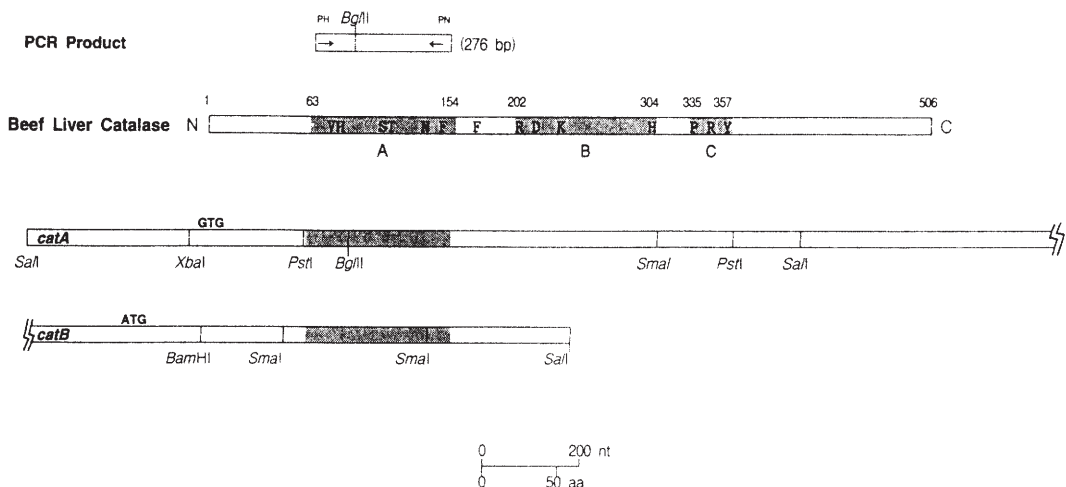


Fig. 4. Restriction maps of two catalase gene fragments.

The maps were aligned with the typical catalase ORF. The *Sal*I site of *catB* shown is at one end of the 5.8 kb MS1 fragment whereas there are two *Sal*I sites within the 4.5 kb phage DNA containing *catA*. The shaded regions are homologous to the cloned PCR product. Each prospective initiation codon (GTG for *catA* and ATG for *catB*) was also shown. Considering the alignment of domain A, the full ORF of *catA* is expected to reside on the 4.5 kb phage insert, whereas *catB* ORF is truncated at *Sal*I site.

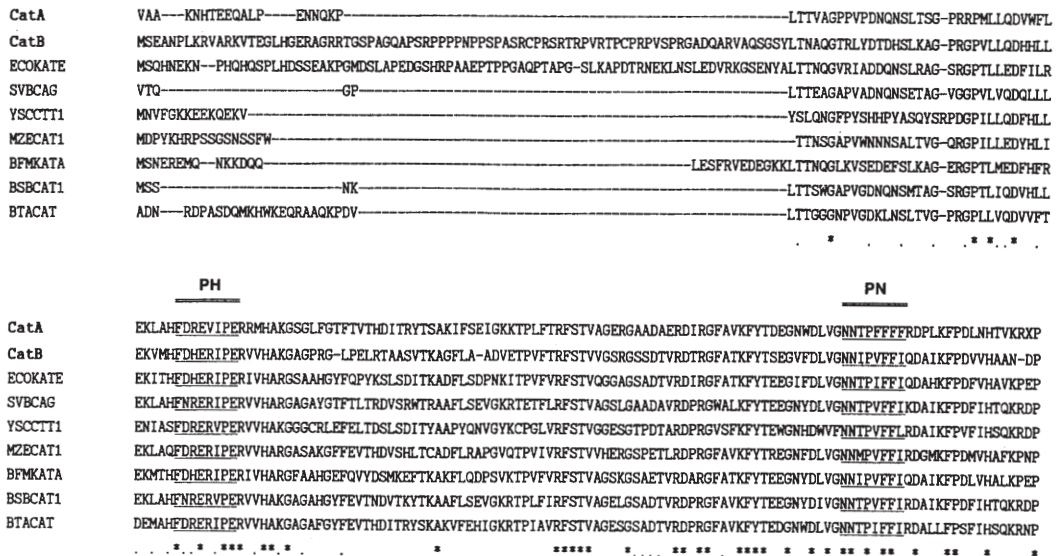


Fig. 5. Deduced amino acid sequences of CatA and CatB within N terminal domain (including domain A) and their homology with other typical catalases.

Sequences from *E. coli* HP11 (KatE; ECOKATE), *Streptomyces venezuelae* bromoperoxidase catalase (Bca; SVBCAG), *Saccharomyces cerevisiae* typical catalase (CTT; YSCCT1), *Zea mays* Cat1 (MZECAT1), *Bacillus firmus* catalase (BFMKATA), *B. subtilis* vegetative catalase (KatA; BSBCAT1), beef (*Bos taurus*) liver catalase (BLC; BTACAT) were shown and aligned with CatA and CatB from *S. coelicolor*. The position of the two PCR primers (PH and PN) were shown above the sequences. The conserved residues were indicated with \* (identical) or (almost identical).

중복 산물을 탐침으로, 콜로니 hybridization을 수행하여 1, 2차 검색을 통해 양성 반응을 보이는 12개의 클론을 선별하였고, 3차 검색을 통해 1개의 클론을 선별하였다. 클로닝된 MS1 절편을 *Bam*HI와 *Sma*I를 이용하여, 대략의 제한 효소 지도를 결정하였고, Southern 분석을 통해 그 중 한 쪽 끝에 PCR 증폭 산물과 반응하는 부위가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 반응 부위를 중심으로 부분적인 염기서열을 결정한 결과, MS1은 *catA*와는 다르지만, 전형적인 catalase의 보존 부위와 상동성이 높은 서열을 가진 것을 확인할 수 있었다. 따라서, MS1은 전형적인 catalase를 coding하며, 프로모터 등의 조절 부위를 포함하여, ORF의 약 600 nt 정도의 N 말단 부위를 가지고 있는 클론이라고 판단된다. MS1을 template로 PH와 PN primer에 의해 PCR을 수행하면 template에 특이적인 약 280 bp의 산물이 증폭되고, 이것은 계놈 DNA의 PCR 증폭 산물과는 달리 *Bgl*III에 의해 절단되지 않았다 (결과 미제시). 따라서 *catA*와는 다르나 분명한 catalase의 보존 부위를 가지는 이 유전자를 *catB*라 명명하였다. 결정된 CatB의 예상되는 아미노산 서열로부터, N 말단의 extended arm이 HP11의 143 aa과 유사한 146 aa임을 알 수 있고, 이것은 *catA*에 비해 분자량이 훨씬 큰 catalase일 수 있다 (Fig. 5).

클로닝된 각각의 catalase 유전자가 *S. coelicolor* (Müller)의 염색체 절편 중 어느 부위에서 유래하였는가를 재확인하기 위하여 높은 stringency로 계놈 DNA Southern hybridization을 수행하였다 (Fig. 6). Fig. 6A에서 보듯이, 4.5 kb의 *catA* 탐침은 *Pvu*II, *Sal*I와 *Bam*HI의 절편 중 한 개의 부위와 반응하였고, *Bgl*III와 *Sma*I의 절편에는 2개의 부위와 반응하였다. 이는 Fig. 4에 제시된 *catA*의 제한 효소 지도와 일치하는 결과이다. *catA*는 높은 stringency 조건에서 *catB*와 hybridization하지 않았으나 (lane 1), domain A에 해당하는 클로닝된 PCR 산물과는 반응함을 다시 확인하였다. 클로닝된 *catB* 절편 (5.8 kb MS1)을 탐침으로 hybridization을 수행할 경우 (Fig. 6B)의 결과는, *Pvu*II 절편 1개, *Sal*I 절편 1개가 hybridization됨을 보이고 있으며, *Bgl*III 절편 중에는 크기가 큰 부위에서 반응하는 것을 알 수 있다. *Sma*I 절편 2개와 *Bam*HI 절편 3개는 클로닝된 MS1의 제한 효소 지도와 부합된다 (결과 미제시). *catB* 절편이 결합한 *Sal*I 절편은 클로닝된 MS1 절편과 동일한 위치에서 관찰이 되며, (lane 1과 4), *catB*는 PCR 증폭 산물 과도 결합함이 확인되었다 (lane 2).

Fig. 6의 결과를 Fig. 3의 결과와 비교하면, Fig. 3에서 보여진 *Pvu*II 절편 두가지 (MP1과 MP2)가 각각 *catA*와 *catB*에 해당함을 확인할 수 있으며, *Sal*I

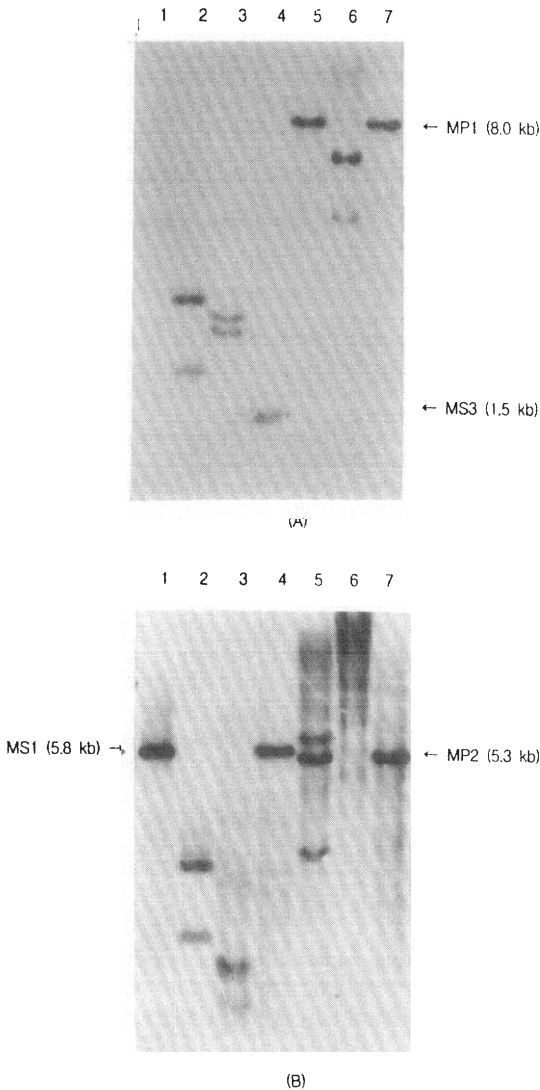


Fig. 6. Genomic Southern hybridization with two catalase gene fragments.

*S. coelicolor* (Müller) genomic DNA was digested with various restriction enzymes and was hybridized with either 4.5 kb phage DNA containing whole *catA* gene (panel A) or 5.8 kb MS1 containing *catB* gene (panel B). Hybridization was carried out at high stringency as described in Materials and Methods. Restriction enzymes used were *Sma*I (lane 3), *Sal*I (lane 4), *Bam*HI (lane 5), *Bgl*II (lane 6) and *Pvu*II (lane 7) in both panels A and B. As positive controls, the cloned MS1 fragment (lane 1, 5.8 kb) and pUC18 plasmid containing PCR product (lane 2, 3.0 kb, linearized) were included.

절편 중 MS1은 *catB*에 MS3는 *catA*에 해당함을 확인할 수 있다. 현재로서는 PCR product를 탐침으로 하는 낮은 stringency의 hybridization에서 나타나는 *Sal*I의 다른 절편(MS2와 MS4)에 대한 정확한 결론은 내릴 수 없으나, MS2와 MS4가 또다른 catalase 유전자를 포함할 가능성은 있다.

## 결론

*S. coelicolor*가 성장기에 따라 다르게 발현하는 catalase는 비변성 전기영동 후 활성 염색할 경우 6개의 띠로 분리된다(Cat1~Cat6). 그 중 주된 catalase는 Cat4이며, 순수 분리된 Cat4는 생화학적으로 전형적인 catalase라는 것이 알려져 있다(17). 본 논문에서는, 대부분의 전형적인 catalase들간에 보존된 아미노산 서열을 이용하여 제조된 PCR primer에 의해 게놈 DNA로부터 증폭되는 산물이 catalase의 활성 부위 잔기 서열을 가지고 있음을 확인하였다. 이를 이용하여 증폭 절편의 cognate template인 *catA*를 클로닝하였고, PCR product와 유사한 염기서열을 가진 다른 catalase 유전자인 *catB*의 일부를 클로닝하였다. CatA와 CatB는 보존된 부위(domain A)에서 매우 높은 상동성을 보이며 CatB는 CatA보다 N 말단이 86 aa이나 더 길었다. CatB의 N 말단 길이는 *E. coli*의 HP11과 비슷하나 아미노산의 상동성은 적었다. 앞으로 이들 두 유전자의 발현이 *S. coelicolor*의 분화 과정과 산화적 환경에 따라 어떻게 조절되는가를 밝히는 연구가 필요하며, 본 논문의 결과는 이러한 연구의 토대를 제공한다.

## 사사

본 연구는 과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비 지원을 받아 수행되었다. 조유희 군은 학술진흥재단의 신진연구인력 연구장려금의 수혜를 받았다.

## 참고문헌

1. Allard, M.W., D.L. Ellsworth, and R.L. Honeycutt, 1991. The production of single-stranded DNA suitable for sequencing using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10, 24-26.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tools. *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
3. Barnes, W.M., 1977. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science* 195, 393-396.
4. Bethards, L.A., R.A. Skadsen, and J.G. Scandalios, 1987. Isolation and characterization of a cDNA clone for the Cat2 gene in maize and its homology with other catalases. *Proc. Natl. Acad.*



- Sci. USA* **84**, 6830-6834.
5. Birnboim, H.C. and J. Doly, 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
  6. Bishai, W.R., H.O. Smith, and G.J. Barcak, 1994. A peroxide/ascorbate-inducible catalase from *Haemophilus influenzae* is homologous to the *Escherichia coli* *katE* gene product. *J. Bacteriol.* **176**, 2914-2921.
  7. Bol, D.K. and R.E. Yasbin, 1991. The isolation cloning and identification of a vegetative catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene* **109**, 31-37.
  8. Christman, M.F., R.W. Morgan, F.S. Jacobson, and B.N. Ames, 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* **41**, 753-762.
  9. Claiborne, A. and I. Fridovich, 1979. Purification of the *o*-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**, 4245-4252.
  10. Claiborne, A., D.P. Malinowski, and I. Fridovich, 1979. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* **254**, 11664-11668.
  11. Fita, I. and M.G. Rossmann, 1985. The active center of catalase. *J. Mol. Biol.* **185**, 21-37.
  12. Hiller, L. and P. Green, 1991. OSP, A computer program for choosing PCR and DNA sequencing primers. *PCR* **1**, 124-128.
  13. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, and T. Kieser, 1987. Plasmid and phage vectors for gene cloning and analysis in *Streptomyces*. *Methods Enzymol.* **153**, 116-166.
  14. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf, 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich.
  15. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White, 1989. PCR Protocols. Academic Press, London.
  16. Kim, H.-P., J.-S. Lee, Y.-C. Hah, and J.-H. Roe, 1992. Multiple catalases of *Streptomyces coelicolor*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 291-298.
  17. Kim, H.-P., J.-S. Lee, Y.-C. Hah, and J.-H. Roe, 1994. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147. *Microbiology*, in press.
  18. Kusakawa, N., T. Uemori, K. Asada, and I. Kato, 1990. Rapid and reliable protocols for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **9**, 66-72.
  19. Lee, J.-S., Y.-C. Hah, and J.-H. Roe, 1993. The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1013-1018.
  20. Lis, J.T., 1980. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* **65**, 347-353.
  21. Loewen, P.C., 1992. Regulation of bacterial catalase synthesis, p. 96-116. In J. Scandalios (ed.), Molecular biology of free radical scavenging systems. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
  22. Loewen, P.C. and J. Switala, 1987. Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **65**, 939-947.
  23. Loewen, P.C. and J. Switala, 1987. Purification and characterization of spore-specific catalase-2 from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Cell. Biol.* **66**, 707-714.
  24. Loewen, P.C. and B.L. Triggs-Raine, 1984. Genetic mapping of *katF*: A locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**, 668-675.
  25. Lorens, J.B., 1991. Rapid and reliable cloning of PCR product. *PCR* **1**, 140-141.
  26. McPherson, M.J., P. Quirke, and G.R. Taylor, 1991. PCR, a practical approach. Oxford University Press, London.
  27. Morgan, R.W., M.F. Christman, F.S. Jacobson, G. Storz, and B.N. Ames, 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8059-8063.
  28. Okada, H., M. Ueda, T. Sugaya, H. Atomi, S. Mozaffar, T. Hishida, Y. Teranish, K. Okazaki, T. Takechi, T. Kamiryo, and A. Tanaka, 1987. Catalase gene of the yeast *Candida tropicalis*. *Eur. J. Biochem.* **170**, 105-110.
  29. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
  30. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
  31. Seah, T.C.M. and J.G. Kaplan, 1973. Purification and properties of the catalase of baker's yeast. *J. Biol. Chem.* **248**, 2889-2893.
  32. Seah, T.C.M., A.R. Bhatti, and J.G. Kaplan, 1973. Novel catalatic proteins of baker's yeast: I. An atypical catalase. *Can. J. Biochem.* **51**, 1551-1555.
  33. Tautz, D. and M. Renz, 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* **132**, 14-19.
  34. Triggs-Raine, B.L., B.W. Doble, M.R. Mulvey, P.A. Sorby, and P.C. Loewen, 1988. Nucleotide sequence of *katG*, encoding catalase HPI of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 4415-4419.
  35. von Ossowski, I., M.R. Mulvey, P.A. Leco, A. Borys, and P.C. Loewen, 1991. Nucleotide sequence of *Escherichia coli* *katE*, which encodes catalase HPII. *J. Bacteriol.* **173**, 514-520.

(Received November 25, 1994)

(Accepted December 5, 1994)



---

**ABSTRACT: Cloning and Characterization of Two Catalase Genes from *Streptomyces coelicolor* (Müller)**

**Cho, You-Hee and Jung-Hye Roe\*** (Department of Microbiology, College of Natural Sciences and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

Conservation of domains in all eucaryotic and several procaryotic typical (monofunctional) catalases enabled the design of two PCR primers to amplify catalase gene fragments. We observed the production of a single DNA fragment amplified when *Streptomyces coelicolor* (Müller) genome was used as the template for PCR. This PCR fragment had a significant sequence homology to other typical catalases. *S. coelicolor* genomic phage library was screened using the PCR product as a probe, and several positive clones were isolated. One clone contained 4.5 kb insert, the partial sequence of which revealed the identical sequence to the PCR product. The size of this clone is sufficient to contain the whole ORF of a typical catalase, which was named *catA*. When genomic restriction fragments were hybridized with the PCR product as a probe at low stringency, 2~4 fragments were detected. Among them, 5.8 kb *SalI* fragment was cloned from the sub-library and sequenced partially. It was distinctly different from *catA* sequence but still showed a remarkable homology to other typical catalases. This gene was named *catB*. The finding of two different catalase genes is consistent with our previous observations that there exist more than two catalases in *S. coelicolor* whose level is regulated differently by growth phases and oxidative treatment.