

*Streptomyces lividans*에서 *secE* 유전자의 클로닝과 염기서열 결정

김순옥 · 서주원*

명지대학교 자연과학 연구소, 생명과학과

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of the *secE* Gene from *Streptomyces lividans* TK24. Soon-Ok Kim and Joo-Won Suh*. Department of Biological Science, Natural Science Research Institute, Myong-Ji University, Yongin 449-728, Korea - The *secE* gene of *Streptomyces lividans* TK24 was cloned by the polymerase chain reaction method with synthetic oligonucleotide primers designed on the basis of the nucleotide sequences of *Streptomyces coelicolor secE-nusG-rplK* operon. The deduced amino acid sequences of the SecE were highly homologous to those of other known SecE protein, that is 36.8%, 30.4%, 80.0%, and 80.9%, similarity to *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces virginiae* SecE, respectively and exactly same with *Streptomyces coelicolor* SecE. It means that in spite of evolutionary differences, the genes for protein translocation machinery are highly conserved in eubacteria. The gene organization of *secE-nusG-rplK* is also similar to that of *E. coli*, *B. subtilis*, and streptomycetes.

방선균, *Streptomyces*류는 같은 균내에서 화학적으로 다른 여러가지 항생물질을 생산하기도 하며 분류학적으로 완전히 다른 종에서 같거나 유사한 항생물질을 생산하기도 한다. 또 유전학적으로 가장 많이 밝혀진 대장균보다 훨씬 많은 종류의 가수분해효소를 생산함으로써 배양과 발효에 대한 기술은 많이 축적되어 있으나 지금까지 외래 유전자 산물의 대량생산이나 분비에 관한 연구는 주로 대장균, 고초균, 효모 등을 통해 이루어져 왔다. 그러나 이러한 균주에서 이중단백질의 생산은 유전자 발현후 정제나 숙주균이 세포의 protease를 분비해 원하는 단백질을 분해하는 것 등으로 인해 여러 가지 해결해야 할 난제들이 남아있다. 따라서 자연적으로 많은 종류의 단백질을 분비하는 분비체계를 가지고 있는 *Streptomyces*를 이용하기 위해 그 분비기구에 대한 유전학적인 연구가 필요하다.

단백질분비기구에 관한 연구는 대장균에서 가장 많이 진전되어 있고 *Bacillus subtilis*에서 단백질분비의 translocator로 알려진 SecY에 상응하는 유전자가 분리됨(1)을 시발로 *Micrococcus luteus*(2), *S. coelicolor*(3), *S. lividans*(4) 등의 그람양성균에서도 단백질분비기구에 대한 유전자가 분리, 보고되고 있다. 단백질의 분비에 관여하는 기구는 몇 개의 서로 다른 단백질의 연속적인 상호작용에 의해 이루어진다는 것이 여러 가지 유전적, 생화학적 연구에 의해 밝혀지고 있으며 prokaryotes와 eukaryotes간에 매우 유사한 단백질 분비기구를 가지며 구조적 기능적으

로도 유사한 막단백질을 보유하고 있고 또한 세포외로 분비되는 단백질은 거의 아미노 말단에 소수성의 signal sequences를 가지고 있다는 것이 알려져 있다. 대장균에서 가장 많이 또 먼저 분리, 연구되어 있는 이러한 단백질의 분비기구에 관여하는 유전자로서는 *secA*(5), *secB*(6), *secD*(7), *secE*(8), *secF*(9), *secG*(10), *secY*(11)가 알려져 있으며 이들은 유전적으로 상당히 서로 보존적이다. 이중 *secA*, *E*, *Y* 유전자는 각종 변이주를 이용한 연구에 의해 단백질 분비에 특히 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다(12, 13). *secE* 유전자 산물은 이미 protein translocator로 알려진 *secY* 유전자 산물과 복합체 (SecY/E)를 이루며 전구체 단백질의 translocase로 작용하여 세포막으로 수송하며 세포의 분비과정에 필요불가결한 유전자이다. 이러한 *secE* 유전자는 *Escherichia coli*(14), *Bacillus subtilis*(15), *Streptomyces coelicolor*(16), *Streptomyces griseus*(17), *Streptomyces virginiae*(18), *Staphylococcus carnosus*(19) 등에서 분리되어 있으나 산업상 중요한 방선균 유전자의 형질발현이나 여러 분자유전학적인 연구의 숙주세포로 사용되고 있는 *Streptomyces lividans*에서 *secE* 유전자에 대한 보고는 아직 없으며 분비기구에 대한 연구도 거의 없는 실정이다. 따라서 이 유전자를 PCR을 이용하여 cloning하였으며 *secE-nusG*와 *rplK* 일부가 포함된 1.7 kb 단편중 *secE* 유전자의 염기배열을 분석하여 보고하는 바이며 이는 이미 본 연구실에서 cloning한 *S. lividans secY*(4) 유전자와 더불어 방선균의 분비기구를 이해하는데 도움이 될 것으로 생각되며 또 이 유전자를 이용하여 방선균에서 단백질 분비에 유용한 균주 개발 가능성도 타진 할 수 있을것으로 기대된다.

*S. lividans*는 형질전환이 다른 방선균보다 용이한 관계

*Corresponding author

Tel. 82-335-30-6190, Fax. 82-335-36-0870

E-mail: jwsuh@bioserver.myongji.ac.kr

Key words: *Streptomyces lividans*, *secE*, protein translocation machinery, PCR

로 많은 유전적 연구의 숙주세포로 사용되고 있다. 따라서 이러한 균주의 단백질분비에 필요불가결한 유전자 즉 *secE*와 *secY* 유전자를 이용해 분비단백질의 균체의 분비량의 증가나 막단백질의 막중 함량 증가, 예를들면 산화 환원 효소와 같은 막단백질의 함량증가에 의해 높은 활성을 가진 고성능 생체촉매 균체를 이용해 여러 가지 물질 생산에 응용하는 것이 가능할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

secE 유전자 cloning을 위한 방선균 균주로는 *Streptomyces lividans* TK24를 사용하였으며 plasmid transformation host와 DNA sequencing을 위한 M13 phage의 증식을 위해서는 *E. coli* DH5 α F' (*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17recA1endA1gyrA96thi-relA1*)를 사용하였다. PCR product의 cloning을 위해 pT7Blue-T vector (Ap^r, Novagen)를 사용하였다.

배지, 배양조건 및 DNA조작

방선균 배양을 위한 배지로는 YEME나 R2YE배지를 사용하여 30°C에서 2-3일간 배양하였으며 그 배지 조성은 Hopwood방법(20)에 준하였다.

방선균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood방법을 수정 사용하였으며 대장균에서의 plasmid 분리, 형질전환, DNA 재조합 등은 Sambrook 등(21)의 방법에 따라 수행하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR)

*secE*와 *nusG* gene을 함유한 1.7 kb DNA 단편을 PCR을 이용해 증폭하였으며 이때 사용한 primer 로는 E-1 (5'AAGAATTCCAAAGGGTCGTACCTCAATTGG), E-2 (5'AATCTAGAACTCCATGATGTTGACGCCG)로 *S. coelicolor*의 sequences를 토대로 합성하였다(16). PCR반응은 *S. lividans* chromosomal DNA 50 ng을 template로, primer를 각각 50 pmole, 0.25 mM dNTPs를 사용해 Takara 사의 Taq polymerase (Takara Co., Japan)를 사용해 98°C에서 3분간 denature한 후 94°C에서 20초간, 68°C에서 4분간의 2 step으로 30회 반복하여 증폭 후 72°C에서 10분간 completion한 후 4°C에 저장 하였다. 사용한 PCR machine은 Perkin Elmer Cetus 사의 Thermal cycler 480을 사용하였다.

염기서열 결정 및 분석

PCR 산물의 염기서열 결정을 위해 먼저 1.7 kb PCR 산물을 PCR vector pT7Blue-T에 cloning한 후 양 말단을 sequencing하여 Blast program으로 상동성을 확인한

다음 여러 가지 제한효소로 처리하여 제한효소지도 작성 후 M13 mp18, 19 phage vector에 subcloning하였다.

DNA sequencing은 [α -³²P] dATP와 *Bacillus caldotenax* YT-G의 DNA polymerase를 사용하는 Takara dideoxy sequencing kit를 사용하여 65°C에서 수행하였다. 염기서열 분석은 DNASIS와 PROSIS (Hitachi Software Engineering Co. Ltd), Genbank의 Blast program을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Streptomyces lividans TK24로부터 *secE* 유전자의 cloning

S. lividans chromosomal DNA로부터 *secE* 유전자를 cloning 하기 위해 디자인한 primer로 PCR을 수행하여 Fig. 1과 같은 1.7 kb 크기의 증폭단편을 얻었다. 이는 cloning하고자 한 *secE*가 포함된 *secE-nusG* operon이 함유하는 크기였으며 *secE* 유전자의 염기서열 분석을 위해 pT7Blue-T vector에 cloning하여 제한효소 지도를 작성

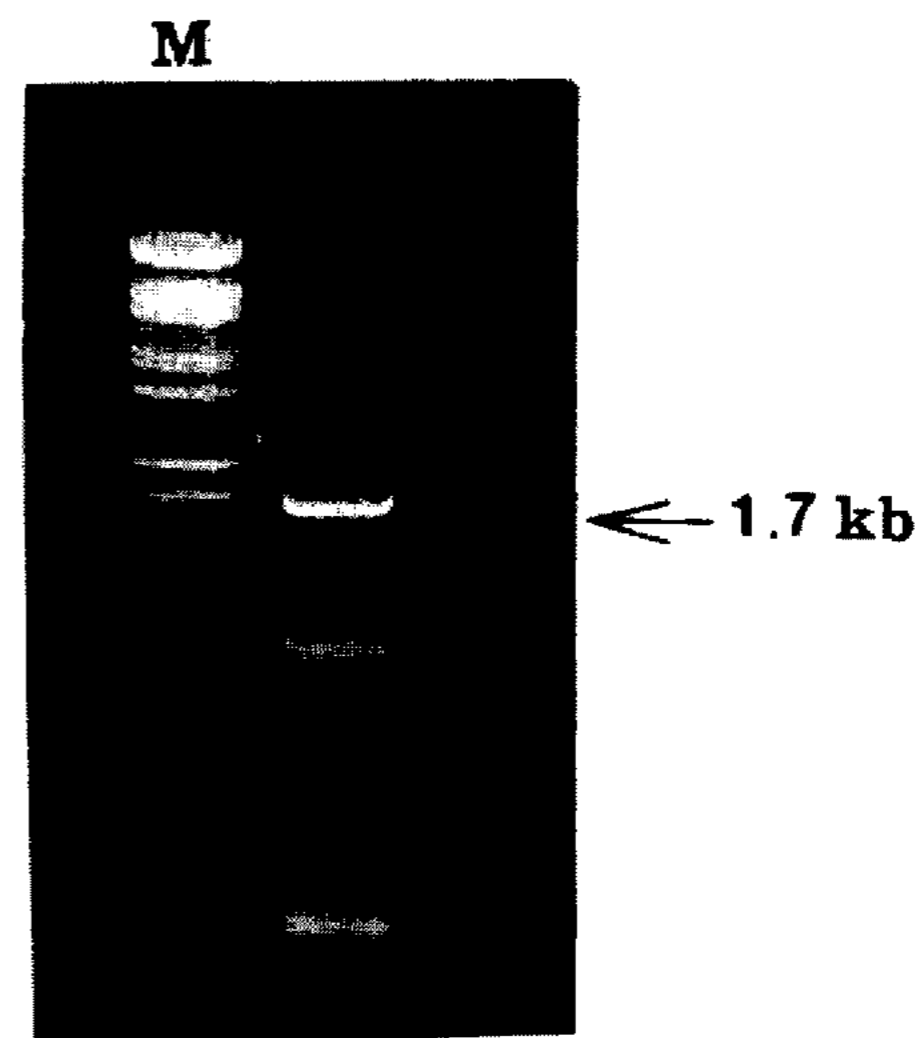


Fig. 1. PCR product of *S. lividans* DNA.

1.7 kb DNA fragment was amplified with synthetic oligonucleotide primers E-1 and E-2. λ -DNA digested with *Bst*EII was used as a size marker.

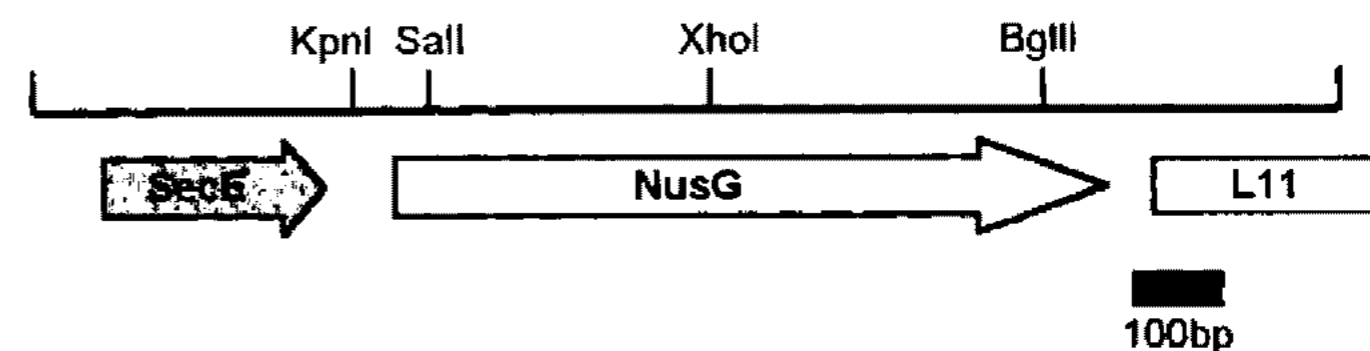


Fig. 2. Restriction endonuclease map of the 1.7 kb cloned DNA fragment harboring the *secE-nusG* gene from *S. lividans* TK 24.

Arrows indicate the coding regions for SecE, NusG, and the ribosomal protein L11 (*rplK*) which are similar to those of other *Streptomyces*. Black box is *secE* gene which is described in this paper.

하였다(Fig. 2).

secE 유전자의 염기서열 분석

제한효소 지도를 작성한 후 염기서열 분석을 위해 각 단편을 M13mp18, 19 phage vector에 subcloning한 후 sequencing하여 Blast program으로 분석한 결과 *S. coelicolor*와 동일한 *secE*와 같은 ORF가 나타났고 1.7 kb 양말단의 일부 염기서열 분석결과로 각각 *secE*, *rplK*

유전자와 유사성을 가지는 것으로 확인되었다. 이로써 *S. lividans*에서도 다른 bacteria에서와 유사한 *secE-nusG-rplK* operon을 가지는 것으로 확인할 수 있었다. PCR vector내 *SalI*과 PCR 증폭단편 내의 *KpnI*으로 자른 500 bp 단편을 먼저 sequencing한 결과 다른 *secE*와 상동성을 나타내고 있었다. 이는 GTG 코돈을 번역개시 코돈으로 사용하고 있으며 TGA 종결코돈까지 282 bp 크기로 93개의 아미노산으로 이루어진 작은 peptide였다. GTG 개시코돈으로부터 -10 위치로 추정되는 부위에 GTCCCT, -35 위치에는 TGGTCT가 존재하는 것으로 보이나 이는 추후의 promoter에 대한 실험으로 확인 할 예정이다(Fig. 3). GC함량이 70% 이상인 방선균의 전형적인 염기분포였으며 DNA 염기서열로 추정된 아미노산을 비교해 본 결과 *E. coli*, *B. subtilis* SecE 와 각각 36.8%, 30.4%의 유사성을 보였으며 같은 방선균류에서는 아미노산 크기도 유사했으며 *S. griseus*, *S. virginiae*와는 80.0%, 80.9%의 유사성을 보였고 *S. coelicolor*와는 완전히 동일한 것으로 나타났다. 이것은 단백질 분비기구에 관여하는 다른 유전자 즉 *secA*와 *secY(4)*에서도 두 균주 간에 동일한 sequences를 가지고 있는 것으로 Genbank data로 확인할 수 있었으며 이는 두 균주가 분류학적 계통수에서 가장 가까운 분지점을 가지는 것에 기인하는 것으로 보인다. 즉 유전적, 생태학적으로 다른 분류군으로 진화되어오는 과정에서도 단백질 분비기구에 관여하는 유전자들은 상당히 보존적이며 같은 protein secretion mechanism을 가지는 것으로 알려진 결과를 뒷받침하는 것으로 생각된다. Clustal-W program을 이용하여 SecE protein의 multiple alignment를 조사 해 본 결과 *E. coli*의 SecE보다는 상당히 작은 그러나 *B. subtilis*보다는 조금 큰 단백질로 *E. coli* SecE의 C-말단 부위와 비슷한 것으로 나타났으며 방선균내에서는 서로 유사

1	AAG AAT TCC AAA GGG TCG TAG CTC AAT TGG TAG AGC ACT GGT CTC CAA	48
	E-1 primer -35	
49	AAC CAG CGG TTG GGG GTT CAA <u>GTC OCT</u> CCG GCC CTG CTA CAC ACA CCT	96
	-10	
97	ACG CCA GGA TGT GTG CGC ATG TAC GTA CAG CAA TGC ACC GCC GTG CGG	144
145	CTC CAA CCG GGC GCG GCA CCG CCA CGA CCC GGA ATC AGG TGA <u>GGA</u> CGA	192
	RBS	
1	M T D A V G S I D M P D A Q D E	16
193	GTG ACG GAC GCC GTG GGC TCC ATC GAC ATG CCT GAT GCC CAG GAC GAG	240
17	A P D S K K S R K G G K R G K K	32
241	GCG CCG GAC TCC AAG AAG TCC CGC AAG GGC GGC AAG CGA GGC AAG AAG	288
33	G P L K R L A L F Y R Q I V A D	48
289	GGC CCG CTG AAG CGG CTC GCG CTC TTC TAC CGC CAG ATC GTT GCG GAC	336
49	V R K V V W P S R N Q L T T Y T	64
337	GTG CGC AAG GTC GTC TGG CCC AGT CGC AAC CAG CTG ACG ACG TAC ACC	384
65	T V V I I F V V I M I G L V T L	80
385	ACC GTG GTG ATC ATC TTC GTG GTC ATC ATG ATC GGC CTG GTG ACT CTG	432
81	I D Y G F S H A A K Y V F G *	95
433	ATT GAC TAT GGC TTC TCT CAC GCC GCC AAG TAC GTC TTC GGC TGA GTC	480
481	GAG AGC GAA GGG CGC CGA GGT ACC	

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *secE* gene of *S. lividans*.

Putative ribosomal binding site, -10 and -35 regions of putative promoter are indicated by underline and stop codon is marked by an asterisk.

<i>S. lividans</i>	-----MTDAVGSIDMPDAQDEAPDSKK-----SRKGGKRGKKGPKRLRLLALFYRQI
<i>S. coelicolor</i>	-----MTDAVGSIDMPDAQDEAPDSKK-----SRKGGKRGKKGPKRLRLLALFYRQI
<i>S. griseus</i>	-----MTDAVGSIDMPDAEDEAPESKKK-----SRKGGKRGKKGPKLGRLLALFYRQI
<i>B. subtilis</i>	-----MRIMKFFKDV
<i>E. coli</i>	MSANTEAQQSGRGLAMKVVVVVALLLVAVGNVLYRDIPLRLLALAVVILIAAAGGVALLTTKGKATVAFAREA
	*
<i>S. lividans</i>	VADVRKVVWPSRNQLTTYTTVVVIFVVIMIGLVTLIDYGFSHAAYVFG-----
<i>S. coelicolor</i>	VADVRKVVWPSRNQLTTYTTVVVIFVVIMIGLVTLIDYGFSHAAYVFG-----
<i>S. griseus</i>	VAELRKVVWPTSQLTTYTSVVIVVVVIMIGLVTVLDIGFARVVKYVFG-----
<i>B. subtilis</i>	GKEMKVSWPKGKELTRYTITVISTVIFVIFVIFALLDTGISQLIRLIVE-----
<i>E. coli</i>	RTEVRKVIWPTROETLHTTLIVA AVTAVMSLILWGLDGLVRLVVSFITGLRF-----
	... ** ** * *

Fig. 4. Amino acids comparison of the SecE proteins.

Identical amino acids in all sequences are shown by asterisk. With multiple alignment using Clustal-W program, it can be known that *Streptomyces* SecE have only one membrane spanning segment which is corresponding to the third segment of *E. coli* SecE.

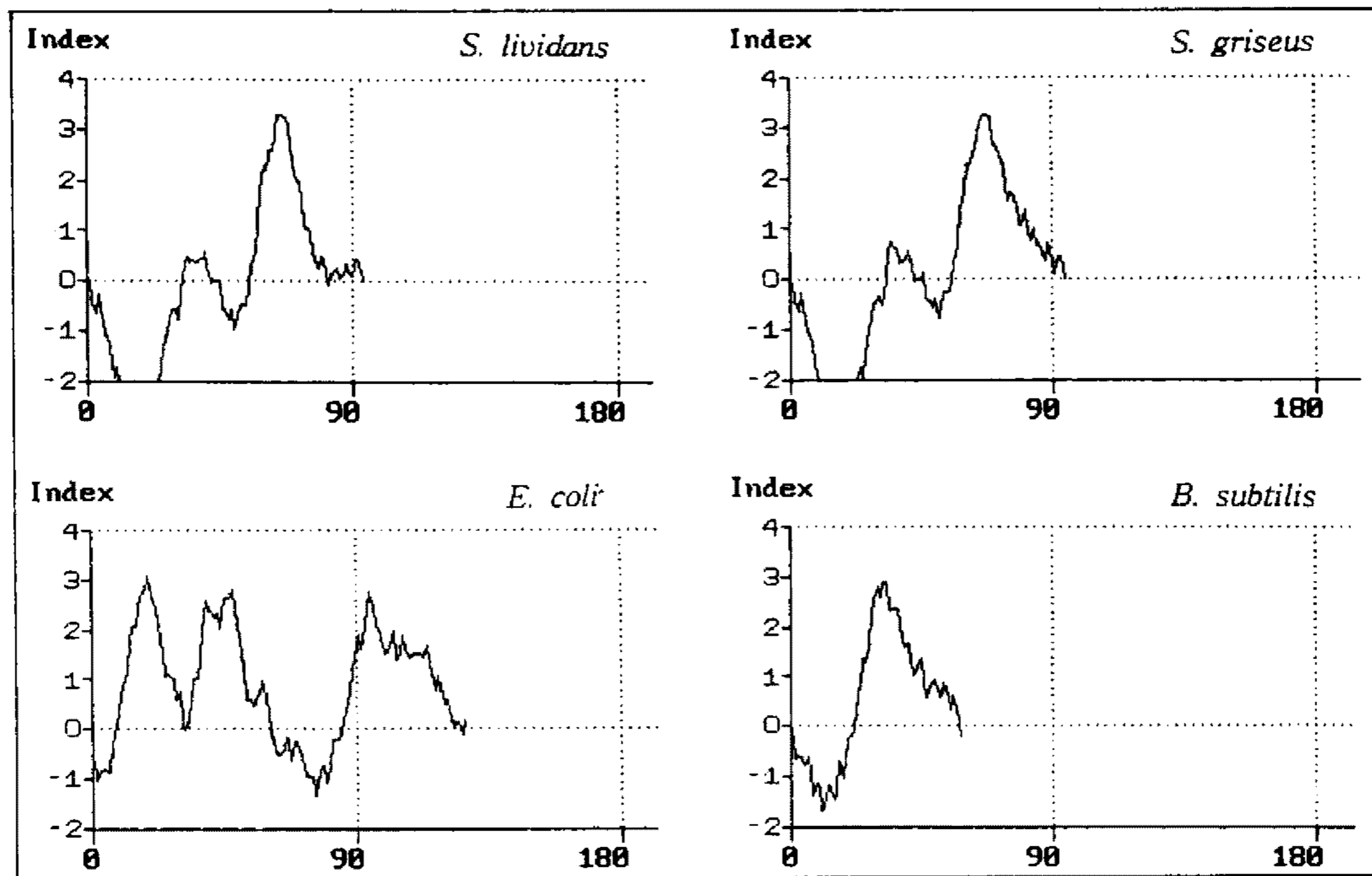


Fig. 5. Comparison of the hydrophobicity profiles of the *S. lividans*, *S. griseus*, *B. subtilis* and *E. coli* SecE proteins.

It can be predicted that *Streptomyces* SecE has only one large membrane-spanning sequence following with small spanning sequence like that of *Bacillus*, but *E. coli* SecE has 3 membrane spanning segments.

한 단백질이라는 것을 알수 있었다. *E. coli*에서는 3개의 segment가 소수성 세포막을 통과하는 막단백질 구조로 알려져 있으나(8, 14) 방선균류에서는 두개의 segment를 가지는 것으로 보인다(Fig. 4, 5).

Hydrophobicity analysis

본 실험에서 분리한 *secE* 유전자의 아미노산 서열을 이용하여 소수성 분석을 하여 소수성 세포막에 걸쳐져 있는 막단백질 SecE의 구조를 예측해 본 결과(Fig. 5) *E. coli*에서는 3개의 cytoplasmic membrane spanning segment를 가지고 있는 반면 방선균에서는 2개의 membrane spanning segment 즉 *E. coli*의 3번째 segment에 해당하는 부분과 유사한 것으로 보인다. 즉 아미노 말단이 세포질로 나와 있는 상태로 작은 segment가 살짝 막에 걸쳐져 있고 이어 큰 segment가 막에 걸쳐져 있는 상태로 존재하는 것으로 보인다.

요 약

Streptomyces lividans TK24에서 *secE* 유전자를 PCR로 cloning하였다. PCR primer는 보고된 여러 방선균의 *secE* 유전자가 함유된 operon 내의 *secE* 상류부위와 *nusG* 하류부위 *rplK* N-말단을 primer로 디자인하여 *Streptomyces coelicolor*의 sequence를 기준으로 합성하였다. 제한효소 mapping후 500 bp의 단편을 sequencing한 결과 *secE* 유전자임을 확인하였으며 *E. coli*, *B. subtilis*,

S. griseus, *S. virginiae*의 SecE와는 각각 36.8%, 30.4%, 80.0%, 80.9%의 상동성을 보였으며 *S. coelicolor*와는 동일한 것으로 나타났다. 이는 단백질분해 기구에 관련된 유전자들이 진화적인 차이에도 불구하고 여러 eubacteria간에 유전적으로 상당히 보존적인 것으로 보인다. 또한 합성한 primer로 증폭되고 양 말단 sequencing 결과로 보아 유전자구성도 이미 보고된 여러 방선균에서처럼 *secE-nusG-rplK*로 이루어져 있는 것으로 추정된다.

감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

참고문헌

1. Suh, J. W., S. A. Boylan, S. M. Thomas, K. M. Dolan, D. M. Oliver, and C. W. Price. 1990. Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Molecular Microbiol.* 4(2): 305-314.
2. Ohama, T., A. Muto, and S. Osawa. 1989. Spectinomycin operon of *Micrococcus luteus*: Evolutionary implications of organization and novel codon usage. *J. Mol. Evol.* 29: 381-395.
3. 김상숙, 현창구, 김영민, 이주현, 정인권, 김대명, 서주원. 1995. *Streptomyces coelicolor*에서 *secY* 유전자의 클로닝과 염기서열 결정. *한산미지.* 23(6): 678-686.

4. 김순옥, 서주원 1997. *Streptomyces lividans*에서 *secY* homolog의 클로닝과 분석. 투고준비중.
5. Oliver, D. B. and J. Beckwith. 1982. Identification of a new gene(*secA*) and gene product involved in the secretion of envelope proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **150**: 686-691.
6. Kumamoto, C. A. and J. Beckwith. 1983. Mutations in a new gene, *secB*, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **154**: 253-260.
7. Gardel, S. C., S. Benson, J. Hunt, S. Michaelis, and J. Beckwith. 1987. *secD* a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 1286-1290.
8. Schatz, P. J., P. D. Riggs, A. Jacq, M. J. Fath, and J. Beckwith. 1989. The *secE* gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**: 1035-1044.
9. Gardel, C., K. Johnson, A. Jacq, and J. Beckwith. 1990. The *secD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **13**: 9: 3209-3216.
10. Nishiyama, K., M. Honda, and H. Tokuda. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J.* **13**: 3272-3277.
11. Ito, K., M. Wittekind, M. Nomura, K. Shiba, T. Yura, A. Miura, and H. Nishimoto. 1983. A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell.* **32**: 789-797.
12. Flower, A. M., R. S. Osborne, and T. J. Silhavy. 1995. The allele-specific synthetic lethality of *prlA-prlG* double mutants predicts interactive domains of SecY and SecE. *EMBO J.* **14**: 884-893.
13. Pohlschroder, M. C. Murphy, and J. Beckwith. 1996. *In vivo* analyses of interactions between SecE and SecY, core components of the *Escherichia coli* protein translocation machinery. *J. Biological. Chem.* **271**: 19908-19914.
14. Downing, W. L., S. L. Sullivan, M. E. Gottesman, and P. P. Dennis. 1990. Sequence and transcriptional pattern of the essential *Escherichia coli secE-nusG* operon. *J. Bacteriol.* **172**: 1621-1627.
15. Jeong, S. M., H. Yoshikawa, and H. Takahashi. 1993. Isolation and characterization of the *secE* homologue gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**: 133-142.
16. Puttikhunt, C., T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the *nusG* gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2), which encodes a putative transcriptional antiterminator. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 118-122.
17. Miyake, K., H. Onaka, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1994. Organization and nucleotide sequence of the *secE-nusG* region of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1217**: 97-100.
18. Katayama, M., Y. Sakai, S. Okamoto, F. Ihara, T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. *Streptomyces virginiae* VbrA gene for NusG like protein, SecE like protein and ribosomal protein, aspartate aminotransferase and adenosine deaminase. Genbank data.
19. Meens, J., M. Klose, and R. Freudl. 1994. The *Staphylococcus carnosus secE* gene: cloning, nucleotide sequence, and functional characterization in *Escherichia coli secE* mutants strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**: 113-119.
20. 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, England.
21. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

(Received 30 March 1997)