

세균성 리파제의 분자생물학적 고찰

김 형 권

생명공학연구소 환경생물소재연구실

그룹I 리파제

리파제는 Eberle(1834년)과 Bernard(1856년)에 의해서 처음으로부터 처음 발견되었고, 그 후 아밀라제 및 프로타제와 함께 3대 소화효소로 널리 사용되어 왔으며, 의학, 생리학 및 효소생화학등의 분야에서 폭넓게 연구되어 왔다. 리파제(EC 3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolase)의 생체 내 주기능은 여러 가지 지방질의 가수분해이지만, 반응기에서의 효소반응 조건에 따라서, 그 역반응인 에스터 합성반응과 트랜스에스터화 반응 등을 촉매하는 특성을 갖고 있다. 현재까지 많은 종류의 리파제가 동물, 식물, 곰팡이 그리고 세균으로부터 발견되었는데, 그 중에서도 미생물(곰팡이 및 세균)이 생산하는 리파제가 다양한 기질특이성, 내열성, 내알칼리성, 유기용매내성, 그리고 입체특이성 등의 특성을 갖고 있는 것으로 밝혀져서 산업적으로 널리 이용되고 있다.

영국 Leicester대학의 Gilbert박사는(1993년) *Pseudomonas* 균이 생산하는 21가지 리파제에 대한 생화학적 특성을 비교 정리하였으며 [1], 그 중에서 14가지 리파제 유전자에 대한 아미노산 서열을 비교하였다. 흥미롭게도, *P. fluorescens* 균이 생산하는 리파제는 크기 면이나, 아미노산 서열의 상동성 면에서 다른 *Pseudomonas* 리파제와 전혀 다른 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다. Gilbert박사는 이러한 차이점을 근거로 해서, *Pseudomonas* 리파제를 크게 2개의 그룹으로 구분하였다. 독일의 Ruhr대학의 Jaeger박사는(1994년) 'Bacterial lipases'라는 논문을 통해서 *Pseudomonas* 리파제를 비롯한 모든 세균성 리파제를 종합 정리하였고[2], 분자생물학적 특성에 따라서 크게 5개의 그룹으로 구분하였다. 그룹I, II에는 Gilbert박사의 그룹I *Pseudomonas* 리파제가 크기와 생화학적 특성에 따라서 다시 세분되었고, 그룹III, IV, V에는 *P. fluorescens* 리파제 및 *Bacillus* 리파제 그리고 *Staphylococcus* 리파제가 각각 해당되었다. 최근에 미국 Maryland대학의 Colwell박사는(1999년) 각 리파제의 아미노산 서열을 근거로 한 계통발생학적 연구를 통해서 Jager박사가 언급한 그룹I, II에 해당되는 리파제를 다시 4개의 아그룹으로 세분하였다[3].

표1에서는 현재까지 보고된 세균성 리파제를 분자생물학적 특성과 생산균주에 따라서 정리하였다. 본 글에서는 이와 같은 세균성 리파제를 크게 4개의 그룹으로 나누어 살펴보고자 한다.

Pseudomonas fluorescens 리파제를 제외한 모든 *Pseudomonas* 리파제가 그룹I에 속한다. 그 외에도 *Acinetobacter calcoaceticus* 리파제, *Proteus vulgaris* 리파제, *Vibrio cholerae* 리파제가 효소 단백질의 아미노산 서열의 상동성을 근거로 *Pseudomonas* 리파제와 함께 그룹I에 속한다. 그룹I에 속하는 리파제 중에서 *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. sp. 109*, *V. cholerae* 리파제들 간에는 아미노산 서열의 상동성이 매우 높아서(60% 이상), 하나의 독립된 아그룹을 형성한다. 이 그룹의 대표적인 효소는 *P. aeruginosa* 리파제로서, 분자량이 30,000 Da 정도이며, 분자 구조내에 1개의 이황화(disulfide)결합을 갖고 있다. 특히 이 그룹에 속하는 리파제는 효소분자의 폴딩기작과 분비 과정에 Lif(lipase-specific foldase)이라는 단백질을 필요로 하는데 Lif 단백질에 대해서는 뒤에 설명하기로 한다. 또한 세포 외로 분비되는 과정에서 세포벽의 한 성분인 LPS(lipopolysaccharide)와 결합하여 리파제-LPS 미셀(micelle)을 형성하는 것으로 보고되었다[4,52,53]. *P. pseudoalcaligenes* 리파제의 경우, 알칼리 조건에서의 높은 활성과 내성으로 인해 가정용 세제에 널리 이용되고 있다[54,55].

아그룹II로 분류되는 리파제에는 *P. glumae*, *P. cepacia*, *P. sp. KWI-56* 리파제가 있다. 최근 들어서 균주의 속명이 *Burkholderia*로 불려지고 있어서 *Burkholderia* 리파제 그룹으로 불려지기도 하는데, 이 그룹에 속하는 효소의 아미노산 서열의 상동성은 80% 이상으로 매우 높다. 리파제 단백질의 분자량이 33,000 Da 정도이고, 분자구조 내에 1개의 이황화결합을 갖고 있으며, 효소단백질의 폴딩과 분비과정에 Lif 단백질을 필요로 하는 점이 아그룹I 리파제와 유사한 점이다. 이 그룹에 속하는 리파제도 비교적 넓은(broad) 기질특이성을 갖고 있어서 가정용 세제등에 효소첨가제로 이용되고 있다[56]. 특히 현재까지 X선 결정구조가 밝혀진 세균성 리파제는 모두 이 그룹에 속하는 *P. glumae*, *P. cepacia* 리파제로 국한되어 있다[57-59].

아그룹III에 속하는 리파제는 그룹I의 다른 리파제와 상당히 다른 특성을 갖고 있다. *P. fragi* 리파제와 *Proteus vulgaris* K80 리파제가 이 그룹에 속하며, 서로간의 아미노산 상동성은

표 1. 세균성 리파제의 분자생물학적 특성

Source of lipase	Gene cloned and sequenced	Signal sequence (aa)	Helper protein	Molecular mass (kDa)	Substrate specificity	Specific features	References
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1/PAC1R	yes	yes 26	yes	30	broad	forming high <i>Mr</i> aggregates with LPS	4-6
<i>P. aeruginosa</i> TE3285	yes	yes 26	yes	30	n.d.	no	7,8
<i>P. species</i> 109	yes	yes 26	n.d.	30	preference for C4,6-FA	catalyzes formation of lactones	9
<i>P. aeruginosa</i> EF2	no	n.d.	n.d.	29	1,3 position C18-FA	forming high <i>Mr</i> aggregates	10
<i>P. aeruginosa</i> YS7	no	n.d.	n.d.	40	n.d.	active in 99.5% DMSO	11
<i>P. pseudoalcaligenes</i> M-1	yes	yes 24	yes	31	1,3 position C12-C18-FA	alkalophilic LIPOMAX™	12
<i>P. fragi</i> IFO-12049	yes	no	n.d.	30	broad	stable at pH 9 and 50°C	13-15
<i>P. glumae</i> PG1	yes	yes 39	yes	33	broad	contains calcium-binding site	16
<i>P. cepacia</i> DSM3959	yes	yes 44	yes	33	broad	no	17
<i>P. species</i> KW156	yes	yes 44	yes	33	n.d.	no	18
<i>P. species</i> ATCC21808	no	n.d.	n.d.	35	C8-C10-FA	very hydrophobic	19
<i>P. fluorescens</i> B52	yes	no	no	50.2	n.d.	no	20
<i>P. fluorescens</i> SIKW1	yes	no	no	48	1,3 position C6-C8-FA	activation by calcium ABC secretion	21-23
<i>S. marcescens</i>	yes	no	yes	65	n.d.	ABC secretion	24
<i>P. putida</i>	no	n.d.	n.d.	45	n.d.	stable at 75°C	25
<i>Proteus vulgaris</i> K80	yes	no	no	31	preference for C8-FA	stable at pH 5-11	26,27
<i>Vibrio cholerae</i> E1 Tor	yes	yes	yes	33 (30)	n.d.	no	28
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413	yes	n.d.	yes	32.1	n.d.	no	29
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	yes	yes 26	yes	37 (32.5)	n.d.	no	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	yes	yes 48	no	71.8	preference for C6,8-FA	no	30
<i>Xerorhabdus luminescens</i>	yes	yes 24	no	68.1	n.d.	no	31
<i>Moraxella species</i>	yes	no	no	34.7	n.d.	active at 4°C	32-34
<i>Propionibacterium acnes</i>	no	n.d.	no	41.2	broad	forming high <i>Mr</i> aggregates	35
<i>Chromobacterium viscosum</i>	yes	n.d.	no	33	broad	active in aqueous and organic solvents	36
<i>Bacillus subtilis</i> 168	yes	yes 31	no	19.4	1,3 position C8-FA	stable at pH 12	37,38
<i>B. pumilis</i>	yes	n.d.	no	20	n.d.	no	39
<i>B. thermocatenulartus</i>	yes	yes 29	no	43		thermoalkalophilic	40-42
<i>B. stearothermophilus</i> L1	yes	yes 29	no	43	C3-4,12-FA	stable up to 65°C	43
<i>Staphylococcus aureus</i> PS54	yes	yes 37	no	76	preference for short FA	synthesized as preproprotein	44
<i>S. aureus</i> NCTC8530	yes	yes 35	no	77	preference for short FA	synthesized as preproprotein	45,46
<i>S. epidermidis</i> RP62	yes	yes 35	no	77	C4-FA	stable at low pH	47
<i>S. epidermidis</i> 9	yes	yes 35	no	77	C4-FA	stable at low pH	48
<i>S. hyicus</i>	yes	yes 38	no	71	broad	phospholipase activity	49,50
<i>S. haemolyticus</i> L62	yes	yes 60	no	80	C4,C14-FA	detergent activated	51

n.d.; not determined.

49%로 비교적 낮은 편이고, 단백질 분자량은 31,000 Da 정도이며, 분자구조내에 이황화결합을 갖고 있지 않다. 이들 효소의 특이한 점은 N말단에 신호연속부분(signal sequence)를 갖

고 있지 않고, 단백질의 폴딩과 분비과정에서 Lif 단백질을 필요로 하지 않는다는 점이다. 또한 이들 단백질의 C말단에 ABC 분비기작(ABC 분비기작에 대해서는 뒤에 언급하기로

Pa PAO1	-----VKKILLIPLAFAASLAWFVWLEPSPAPETAPPASPOAGAVHAPFAASAGEAVPAPQVMPAKVAPLPTSFRGTSVDGSFS	80
Pa TE3285	-----MKKILLIPLAFAASLAWFVWLEPSPAPETAPPASPOAGADRAPFAASAGEAVPAPQVMPAKVAPLPTSFRGTSVDGSFS	80
Vc E1 Tor	-----MKKIAWSLGLIYVIGALCAIVWPSWYPSRPLVTT	34
Ac RAG-1	-----MSGKPIHMKTIYVGGVITSVLLLLLLLYVFKPKAQTQNMIMTQTTPKMTVLESAFANNKQKGLPTLAASL-----QGTEDICPTIQ	82
Ac BD413	-----MNGSKKIYLGIGLVALLMIFIYWLMPKD-----TANASSQIESTMASAIATSPOQQNQLSENTTFFGVS-----SQHDTQVWCQLQ	77
Pc 3959	-----MTARGGRAPLARRAVVYGAVGLAAIAGVA-----MWSGAGRHGGTASGEPPDASAARGPAAAPQAAVFPAS-TSLPPSLAGSS-APRLP	83
P sp KWI	-----MTSREGRAPLARRAVVYGAVGLAAIAGVA-----MWSGAGWHHATGASGESPEASVAGGVSVPAPQAAVFPAS-TGLPPSLAGSS-APRLP	83
Pg PGI	MAQADRPARGGGLAARPMRGASFALAGLVACAACAVALWLRPAAPSPAPAGAVAGGPAAGVP--AAASGAAEAAMFLP-AALPGALAGSH-APRLP	92
Pa PAO1	VDASGNLLITRDINRFLDYFLSAVGGKFLQQLDRLRAYIAELQEP-ARGQALALMQQYIDYKKEVLVLERDLP---RLADLDALRQREAAVKA	171
Pa TE3285	VDASGNLLITRDINRFLDYFLSAVGGKFLQQLDRLRAYIAELQEP-ARGQALALMQQYIDYKKEVLVLERDLP---RLADLDALRQREAAVKA	170
Vc E1 Tor	PSQADIQADSSPRDLLEYFLSGLGETSLPVIQVQRY-----EQENQGLIDSSLPAQYVQYKAALSELTLPAQSGG--LSTQEWQLHQSLLD	123
Ac RAG-1	VDANGKILITVGIKSCFDYFSSLGKTEARLVDIRQYLLATLPEP-ASNYAIYLLDQYVYMHALQNLKPNAGF--KSNMVDALQKVVQDMAK	174
Ac BD413	LNAANHLIVNEQTRNCFEYPLTQYGEKSLTQIDQIKNYFPQSLPQP-ARDQAQLWQRYLYREELGNLK-EPAT--AKTDIAYTRAVPTSRQM	168
Pc 3959	LDAGGHLAKARAVRDFDYCLTAQSDLSAAGLDAPVMRILAAQLDGTVAQAEALDVWHRITRAYLDALAKLRDAGAV--DKSGLGALQLALDQRAS	176
P sp KWI	LDAGGHLAKSRAVRDFDYCLTAQSDLSAAGLDAPVMRILAAQLDGTVAQAEALDVWHRITRAYLDALAKLRDAGAV--DKSGLGALQLALDQRAS	176
Pg PGI	LAAGGLARTRAVREFDYCLTAQSGELTPAALDALVRRRIAAQLDGSFAQAEALGVWRRITRAYFDALAQLPDGVGLGDKLDPAMQLALDQRAA	187
Pa PAO1	LRARIFSNKAVHVAFFADEKTYNQPTLERLAIHQDGLSAAEKAAAIDRLRASLPEDQDESVPQLQ-SELQQQTAALQAAGAGPEAIRQMRQQLV	265
Pa TE3285	LRARIFSNKAVHVAFFADEKTYNQPTLERLAIHQDGLSAAEKAAAIDRLRASLPEDQDESVPQLQ-SELQQQTAALQAAGAGPEAIRQMRQQLV	264
Vc E1 Tor	LQARIFSAKQQ-ALFAKRWLRLELAIEKRIYEQYGGSEKAAQRAQALL-----DQPDFIQRSEATAQLLPQLT--QAGGGTQQRILARVALV	210
Ac RAG-1	VQQQFFMAAKINALFGMERHMQFMLEQMRINANKLITQEKATELAKLIDELPPALADGVRVSMQFAELQQLTKEIQAKGSSAQDLRSMRESLL	269
Ac BD413	LQRFPSATEIAGLFGSEDIYNYQYTLERMAIHNKSLSEIEKAKLKAFLDQLPQDKNANLQSLKIDDLKQLTTSIKKMGSSAQDLRSMRESLL	263
Pc 3959	IAYRWLGDWS-QFFFGAKQWRQYDLARLKIADQFALDQAERLAALAEQQMPADERAAQQRVDRQRAAIDQIAQLQKSGATPDAMRAQLTQTL	270
P sp KWI	IAYRWLGDWS-QFFFGAKQWRQYDLARLKIADQFALDQAERLAALAEQQMPADERAAQQHIDQORAAIDQIAQLQKSGATPDAMRAQLTQTL	270
Pg PGI	LADRTLGEWA-EFFFGDEQRQRHDLERIRIANDTTLSPEQKAARLAALDAQLTDPDERAQQAALHAQQDAVTKIADLQKAGATPDQMRQAQTL	281
Pa PAO1	GAEATRLRQLDRQSAWKGRLDDYFAKRSRIEHWGAGLSEADRRAAVERLAERFSE-QERLRLGALQMRQAEQR	340
Pa TE3285	GAEATRLRQLDRQSAWKGRLDDYFAKRSRIEHWGAGLSEADRRAAVERLAERFSE-QERLRLGALQMRQAEQR	339
Vc E1 Tor	GEQGAQRLELDDSRATFQQQFDYQARRAAILVWNAELSSASEQQTQIQQLREQHF-APQWRRIDALERLKDNGE	284
Ac RAG-1	GPEAARDLEKVDQEAQVQVWQYLSARDQIL-KSDANDASKQQSIAELRHSFPGTKEDLLRAQSYEVMDQKSKGS	346
Ac BD413	GHDATARLEQLDVERSNNKSNVTQYLDERQYIL-MSNMSDTAKONAI SALRSKNFTAPQVQIRVQAFESAQDQGSLLPFSE	343
Pc 3959	GPEAAARVAQMDDASWQRRYADYAAQRAQIE-SAGLSPOQRDRAQIAALRQRVPTKPEAVRAASLDRGAGSAR	344
P sp KWI	GPEAAARVAQMDDASWQRRYADYAAQRTQIE-SAGLSPOQRDRAQIAALRQRVPTKPEAVRAASLDRGAGSAR	344
Pg PGI	GPEAAARVAQMDDAEAWQTRYQATAAERDRIA-AQGLAPQRDRARIAQLRQQTFTAPGEAIRAASLDRGAGG	353

그림 2. 그룹I 리파제 chaperone의 아미노산 서열 비교.

그룹I 리파제의 chaperone을 그림1에서와 동일한 방법으로 비교 배열하였다. Pa PAO1, *P. aeruginosa* PAO1; Pa TE3285, *P. aeruginosa* TE3285; Vc E1 Tor, *Vibrio cholerae* E1 Tor; Ac RAG-1, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1; Ac BD413, *A. calcoaceticus* BD413; Pc 3959, *P. cepacia* 3959; P sp KWI, *P. species* KWI; Pg PGI, *P. glumae* PGI.

노산 서열이 잘 보존되어 있다.

그림에서 나타난 아미노산 서열을 통해서 각 아그룹간의 분명한 차이점을 다시 한번 확인할 수 있다. 첫째로 효소반응에 관련된 활성 세린 부위의 아미노산 서열을 살펴보면, *P. aeruginosa* 리파제 그룹과 *Acinetobacter* 리파제 그룹의 경우에는 GHSHG 서열을 갖고 있는 반면에 *Burkholderia* 리파제 그룹과 *P. fragi* 리파제 그룹의 경우에는 GHSQG 서열을 갖고 있다. 둘째로 *P. glumae* 리파제 그룹의 경우에는 β-병풍7과 β-병풍8이 β머리핀(hairpin) 구조를 이루는데 반해, *P. aeruginosa* 리파제 그룹과 *Acinetobacter* 리파제 그룹에는 이 구조가 전혀 없고, *P. fragi* 리파제 그룹에서는 β-병풍7만이 존재한다. 셋째로 활성부위의 아스파르트산을 대신할 수 있다고 추정되는 글루탐산(*P. glumae* 리파제의 글루탐산 288번)이 *P. fragi* 리파제 그룹에는 없는 반면에 다른 모든 리파제에는 해당되는 글루탐산이 존재한다.

아미노산 서열의 상동성을 근거로 해서 분류된 4개의 아그룹 리파제간에는 위에서 언급한 구조적 특성에 의해서 차이를 보일 뿐만 아니라, 각 리파제 단백질의 폴딩과 분비에 관여하는 Lif 단백질의 작용여부와 그 아미노산 서열의 상동성에 의해서도 차이를 보인다(그림 2).

F. fragi/*Pv. vulgaris* 리파제를 제외하고, 그룹I에 속하는 모든 리파제의 폴딩과 분비에 Lif 단백질이 필수적으로 요구된다. 흥미롭게도 각 Lif 단백질의 아미노산 서열을 통해 구한

계통발생학적 거리는 전체적으로 리파제 단백질들간의 거리와 유사하게 나타났다[30]. 단, *Acinetobacter* 그룹내의 Lif 단백질간의 상동성이 크지 않으며, *V. cholerae* E1 Tor Lif 단백질이 *P. aeruginosa* 그룹의 Lif 단백질과 상동성이 크지 않은 점 등에 예외가 있다.

Lif 단백질에 대한 연구는 *P. cepacia*[60], *P. aeruginosa* [8], *P. glumae*[61,62], *A. calcoaceticus*[3,29] 리파제를 중심으로 이루어져 왔는데, 여기에서는 *P. cepacia* 리파제와 Lif 단백질과의 관계를 예로 들어 Lif 단백질의 세포내 기능을 구체적으로 살펴보기로 한다. *P. cepacia* 리파제와 Lif 단백질 유전자는 덴마크 Novo Nordisk사의 Jørgensen박사에 의해 (1991년) 처음으로 밝혀졌다[17]. 앞에서 언급한 바와 같이 *P. cepacia* 리파제 단백질의 발현이 Lif 단백질(*LimA*)에 의해 조절되는데, *LimA*는 344개 아미노산으로 구성된 단백질로서, 그 유전자(*limA*)가 *lipA* 유전자의 3'쪽에 위치하고 있으면서, *lipA*의 발현에 직접적으로(in cis and in trans) 조절작용을 수행하였다. 게다가 *lipA*의 촉진유전자자리(promoter), 리보소결합부위(rbs) 및 신호연속부분에 해당되는 유전자 부위를 그림 2의 것으로 치환한 경우에도, *lipA*의 발현이 *limA*에 절대적으로 의존하는 것이 보고되었다.

아일랜드 Trinity대학의 Hobson박사는 *limA*가 없는 경우에도 *P. cepacia lipA*의 전사와 *lipA* mRNA의 번역(translation)이 정상적으로 진행되지만, 활성이 없는 LipA가 합성되는 것

을 밝혔다[60]. 그는 이어서, 8 M 요소에 의해 변성된 LipA 단백질이 LimA 단백질 존재하에서 투석되면, 리파제 활성을 회복하는 것을 밝혔으며, LipA와 LimA의 항체를 이용한 면역학적 실험을 통해서 LipA와 LimA 단백질이 복합체를 형성함을 밝혔다. 이러한 사실을 근거로 해서 Hobson박사는 LimA 단백질이 LipA에 특이적인 chaperone으로 작용함을 처음으로 제안하였다. 그 후에 같은 연구실의 Aamand박사는 대장균에서 *lipA*와 *limA*의 독립적인 발현체계를 개발함으로써, LimA 단백질이 이미 합성된 불활성 LipA 단백질을 활성화시킬 수 없으며, 먼저 합성된 LimA 단백질이 작용할 수 있는 LipA 단백질 분자수가 한정되어 있음을 밝혔다[63]. 또한 면역학적 방법을 통해서 LipA와 LimA 단백질이 1:1 복합체를 형성함을 증명하였다.

P. cepacia 이외에도 *P. glumae*와 *P. aeruginosa*의 Lif 단백질에 대해서도 연구가 수행되어 왔다. 이상의 3가지 경우를 종합해보면, Lif 단백질은 i) 리파제 단백질이 번역되는 과정이나 번역직후에 작용하며, ii) 비공유결합적으로 작용하며, iii) 리파제의 구조적 폴딩에 관여하며, iv) 리파제 단백질의 화학적 변성 후 활성화시킬 수 있는 능력을 갖고 있다.

Jørgensen박사는 Lif 단백질의 아미노산 서열로부터, 이 단백질이 막단백질이라고 추정하였고[17], Frenken박사는 LipB 단백질(*P. glumae*의 Lif 단백질)이 세포의 내막과 주변세포질(periplasm)에 걸쳐 있음을 밝혔다[61]. 이상에서 언급한 사실들을 근거로 해서 네덜란드의 Slater연구소의 Hellingwerf박사는 *A. calcoaceticus* BD413 리파제의 2단계 분비과정의 모델을 제시하였다[64]. 그림 3에서 볼 수 있듯이 리파제 단백질은 신호연속부분의 작용으로 내막에 삽입되게 되며, 내막을 통과하

는 리파제 단백질은 내막과 주변세포질에 삽입되어 있는 Lif 단백질의 도움으로 정확한 구조적 폴딩을 수행한 후, 외막의 XcpQ, T, U, V 등의 단백질을 통해 세포 밖으로 분비된다.

한편, 그룹I에 속하는 Lif 단백질 의존형 리파제를 대장균에서 대량생산하기 위해 많은 시도가 있었지만, 대부분의 경우, 불활성 리파제(inclusion body)형태로 만들어졌다. 이것은 이 그룹에 속하는 리파제가 대장균에서 대량 발현되기 위해서는 각 해당 Lif 단백질도 동시에 적절하게 발현되어야 하기 때문이다. 최근에 독일 Stuttgart대학의 Schmid박사는 5'쪽의 GC-다제 부분과 막삽입에 관련되는 부위를 제거한 *lif* 유전자와 리파제 유전자로 대장균을 형질전환시킴으로써 *P. cepacia* 리파제의 대량생산에 성공하였다[65].

그룹II 리파제

그룹II 리파제에 해당되는 리파제에는 *P. fluorescens*, *S. marcescens* 리파제가 속해 있다. 이들 리파제는 약 475개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량이 50,000 Da 정도로 다른 *Pseudomonas* 리파제에 비해 분자량이 크다. *P. fluorescens* 균주는 그룹I에 속하는 *Pseudomonas* 균주와 rRNA의 상동성이 크지만, *P. fluorescens*가 생산하는 리파제는 3가지 측면에서 그룹I 리파제와 차이를 보인다. (i) 단백질 N말단의 신호연속부분이 없다는 점이다. 대신에 C말단부위에 양친성(amphipathic) α -나선구조와 여러번 반복되는 'GGXGX_D' 서열을 갖고 있다. (ii) 분자내 이황화결합을 이루는 시스테인이 없으며, (iii) 단백질의 폴딩과 분비과정에 Lif 단백질을 필요로 하지 않는다는 점이다. 이러한 특성으로 인해서 그룹II 리파제는 앞에서 기술한 2단계 분비과정을 통해 세포밖으로 분비되는 것이 아니라, 대장균의 α -hemolysin의 분비 시스템과 마찬가지로 ABC(ATP-binding-cassette) 분비 시스템을 통해 분비된다[66,67]. ABC 분비 시스템을 통해 단번에 분비되는 단백질로는 대장균의 α -hemolysin, *Erwinia chrysanthemi*의 단백질가수분해효소, *P. aeruginosa*의 알칼리성 단백질가수분해효소, *P. fluorescens*의 리파제[68,69], *S. marcescens*의 리파제[70,71]등이 알려져 있다. 표2에서 각 ABC 분비 시스템의 구성단백질을 보여주고 있다. ABC 분비 시스템에 관여하는 단백질의 유전자들은 보통 나란히 연결되어 있다. 예를 들면, 대장균의 α -hemolysin의 경우, α -hemolysin의 유전자(*hlyA*)와 ABC 분비 시스템을 구성하는 유전자인 *hlyB*, *hlyD*, *tolC*가 함께 모여 있다[72]. 이중에서 HlyB는 내막 단백질로서 ABC 단백질이며, HlyD는 내막과 외막에 걸쳐있는 단백질로서 단백질 이동의 통로를 형성하며(AF, accessory factor), TolC는 외막에 위치하여(OMF, outer membrane factor) α -hemolysin의 세포외 분비를 수행하는 단백질이다[66].

ABC 분비 시스템의 특징 중의 하나는 ABC 분비 시스템을

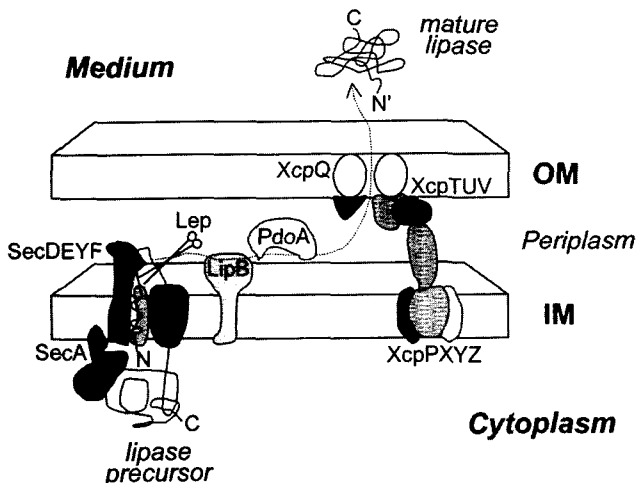


그림 3. *A. calcoaceticus* 리파제의 2단계 분비과정 모델. *A. calcoaceticus* 리파제는 Sec 단백질과 Xcp 단백질의 도움으로 주변세포질까지 운반된 후, LipB 단백질에 의해 활성효소로 폴딩되어 세포 밖으로 분비된다. IM, inner membrane; OM, outer membrane; Lep, leader peptidase (scissors); PdoA, disulfide oxidoreductase.

표 2. 박테리아의 ABC 분비 시스템

Transported protein	ABC ^a homolog	Translocator structural organization				Organism
		ABC	MSD ^b	AF ^c	OMF ^d	
HlyA (α -hemolysin)	HlyB	HlyB-C	HlyB-N	HlyD	TolC	<i>Escherichia coli</i>
HlyA (α -hemolysin)	HlyB	HlyB-C	HlyB-N	HlyD	TolC	<i>Proteus vulgaris</i>
HlyA (α -hemolysin)	HlyB	HlyB-C	HlyB-N	HlyD		<i>Morganella morganii</i>
AppA (hemolysin)	AppB	AppB-C	AppB-N	AppD		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
AshA (hemolysin)	AshB	NAe	NA ^c	AshD		<i>Actinobacillus suis</i>
LktA (leukotoxin)	LktB	LktB-C	LktB-N			<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
LktA (leukotoxin)	LktB	LktB-C	LktB-N	LktD		<i>Pasteurella haemolytica</i>
CyaA (cyclolysin)	CyaB	CyaB-C	CyaB-N	CyaD	CyaE	<i>Bordetella pertussis</i>
PrtABC (protease A,B,C)	PrtD	PrtD-C	PrtD-N	PrtE	PrtF	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
AprA (alkaline protease)	AprD	AprD-C	AprD-N	AprE	AprF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TliA (lipase)	TliD	TliD-C	TliD-N	TliE	TliF	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
LipA (lipase)	LipB	LipB-C	LipB-N	LipC	LipD	<i>Serratia marcescens</i>

^aABC, ATP-binding cassette; ^bMSD, membrane spanning domain; ^cAF, accessory factor; ^dOMF, outermembrane factor; ^eNA, not applicable.

통해 분비되는 단백질들간에 서로 분비 시스템을 공유할 수 있다는 점이다. 예를 들면, *P. aeruginosa*의 알칼리성 단백질 가수분해효소의 분비 시스템인 AprDEF를 이용해서 *P. aeruginosa* 균이나 대장균에서 *P. fluorescens* 리파제를 효율적으로 분비할 수 있으며[68], *Erwinia chrysanthemi*의 단백질 가수분해효소의 분비 시스템을 이용해서 대장균에서 *S. marcescens* 리파제를 분비하였다[2]. 앞으로 ABC 분비 시스템에 대한 연구가 더욱 진행되면, 여러 가지 유용한 효소를 원하는 균주에서 발현·분비시킬 수 있으리라 기대된다.

현재까지 ABC 분비 시스템을 이용하는 것으로 보고된 세균성 리파제는 약 3가지 정도이다. 우선 *P. fluorescens* B52 리파제의 경우, 아직까지 ABC 분비 시스템에 해당되는 유전자가 밝혀지지 않았지만, 앞에서 언급한 바와 같이 *P. aeruginosa*의 알칼리성 단백질가수분해효소 ABC 분비 시스템을 이용해서 세포밖으로 분비될 수 있다. *S. marcescens*의 경우, 리파제의 ABC 분비 시스템이 밝혀졌으나, 리파제 유전자와 염색체상에서 떨어져 있을 뿐만 아니라, 리파제 외에도 단백질가수분해효소와 S-layer 단백질의 분비에 관여하는 것으로 밝혀졌다. 최근에 *P. fluorescens* SIK W1의 리파제 유전자와 ABC 분비 시스템 관련 유전자가(tliDEF) 염색체 상에서 나란히 위치하고 있는 것이 보고되었다[69]. 이것은 리파제가 ABC 분비 시스템과 기능적으로 뿐만 아니라, 유전자 구조적으로도 직접 관련되어 있다는 최초의 보고인 셈이다.

그룹 III 리파제

그룹III에는 *Bacillus* 리파제만으로 구성되어 있다. 현재까지 *B. subtilis* 168, *B. pumilis*, *B. thermocatenulatus*, *B. stearothermophilus* 리파제에 대해 많은 연구가 진행되어 왔다. *Bacillus* 리파제의 특징 중에는 다른 리파제와 다른 점이

하나 있다. 다른 리파제의 경우에는 그 활성 세린 부위의 서열이 G-X-S-X-G로 되어 있는 반면에 *Bacillus* 리파제는 그 아미노산 서열이 A-X-S-X-G로 되어 있다 [38]. 또한 대부분의 *Bacillus* 리파제는 그 최적 pH가 알칼리로 보고되었으며, 리파제의 특징 중의 하나인 ‘계면활성화 (interfacial activation)’ 현상이 나타나지 않는다는 점이다[37].

독일의 Stuttgart대학의 Schmid박사는 *B. thermocatenulatus* 균이 생산하는 두개의 리파제(BTL-1, BTL-2)에 대해 보고하였다[41]. 특히 BTL-2 리파제는 45,000 Da 크기로서 내열성과 내알칼리성을 동시에 갖고 있어서 산업적으로 이용가능성이 큰 효소이다[40]. 모든 *Bacillus* 리파제는 단백질의 폴딩과 분비에 Lif 단백질을 필요로 하지 않으며, ABC 분비 시스템에 의해 분비되지도 않는다. Schmid 박사는 이점을 이용하여, OmpA의 신호연속부분을 붙인 OmpA-BTL2 단백질을 대장균에서 대량 발현시키는 데에 성공하였다 [42].

B. stearothermophilus 리파제는 BTL-2와 94%의 상동성을 보이며, BTL-2와 유사한 내열성과 내알칼리성을 갖고 있다. 그러나 이와 같은 높은 상동성에도 불구하고 수용액에서 효소 집합체(aggregate) 형태로 존재하지 않는 점과 기질특이성, PMSF에 대한 감수성 등의 측면에서 BTL-2와 차이가 있는 것으로 보고되었다[43].

그룹 IV 리파제

그룹IV 리파제에는 *Staphylococcus* 리파제가 포함된다. 1985년 독일 München대학의 Götz 박사에 의해 *S. hyicus* 리파제 유전자[49]가 밝혀진 이후에 현재까지 *S. aureus* PS54와 NCTC8530, *S. epidermidis* RP62와 9, *S. haemolyticus* L62 리파제의 유전자가 밝혀졌다[44-48,51]. *Staphylococcus* 리파제의 가장 큰 특징은 처음에 80,000 Da 크기의 프레프로(pre-

리파제의 구조

1990년대에 들어서 채장 리파제의 X선 결정구조[77,78]가 밝혀진 이후에 *Rhizomucor miehei*[79], *Geotrichum candidum* [80], *Candida rugosa* [81]등의 곰팡이 유래의 리파제 구조가 연이어 밝혀졌으며, 세균성 리파제로서는 현재까지 *Pseudomonas glumae*[57]와 *P. cepacia* 리파제[58,59]의 구조가 밝혀졌다. 지금까지 밝혀진 리파제 구조의 공통점은 그 기본 구조가 β 평판 구조를 중심으로한 $\alpha\beta$ 구조로 이루어져 있다는 점이다. 또한 리파제의 활성부위가 세린계열의 단백질가수분해효소의 경우와 마찬가지로 세린-히스티딘-아스파르트산으로 이루어져 있으며, 활성 세린 부위의 아미노산 서열이 G-X-S-X-G임이 밝혀졌다. 리파제의 구조가운데 특이한 점은 활성 부위를 한 개 또는 두개의 양친성 α 나선구조가 리드(lid)로 막고 있으며, 효소단백질이 기질과 만나면 뚜껑이 열리면서 기질이 효소의 활성부위로 들어가서 가수분해된다는 점이다. 이러한 구조가 밝혀짐에 따라서 리파제가 지방질 계면에서 활성이 크게 증가하는 '계면활성화' 현상이 분명하게 설명되었다. 또한 리파제의 리드가 변형되면, 효소활성 뿐 아니라 광학활성특이성까지 바뀌는 것이 밝혀졌다[82,83].

앞서 서술한 바와 같이 세균성 리파제 가운데에서는 그룹I의 아그룹II에 속하는 두개의 리파제 구조만이 규명되었다. 리파제 구조가 $\alpha\beta$ 구조를 기본으로 하고 있으며, 활성부위가 잘 보존되어 있지만, 세균성 리파제의 각 그룹간에 또는 한 그룹내에서 많은 특성의 차이가 관찰되기 때문에 효소단백질의 국부적인 구조에 큰 차이가 있으리라고 추정되고 있다. 예를 들면, (i) 효소단백질의 폴딩과 분비시에 Lif 단백질의 작용여부,

(ii) ABC 분비 시스템을 이용하는 그룹II 리파제에서 알려진 분자내 C말단 부위에 존재하는 신호연속부분의 구조, (iii) 계면활성화 현상여부, (iv) 칼슘결합부위의 위치적 차이, 그리고 (v) 아미노산 서열의 높은 상동성에도 불구하고 기질특이성에서 큰 차이를 보이는 점등이 세균성 리파제 효소의 분자생물학적 다양성만큼이나, 각 리파제 그룹간 또는 그룹내에서 효소단백질의 구조적 차이가 있음을 의미한다.

현재에도 신규 세균성 리파제가 계속 밝혀지고 있는 상황에서, 이상에서와 같이 분자생물학적 특성과 효소생화학적 특성에 의해 다양한 세균성 리파제를 체계적으로 분류한다면, 리파제 단백질의 구조와 기능 연구를 보다 효과적으로 수행하는데 도움이 될 뿐만 아니라, 효소산업체에서 요구하는 특성을 갖고 있는 최적의 리파제 효소를 정확하게 선별하여 산업적으로 신속하게 이용할 수 있으리라 판단된다.

참고문헌

1. Gilbert, E. J. 1993. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 634-645.
2. Jaeger, K. E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel, and O. Misset. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 29-63.
3. Sullivan, E. R., J. G. Leahy, and R. R. Colwell. 1999. Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone-encoding genes from *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, and redefinition of a proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. *Gene.* **230**: 277-285.
4. Stuer, W., K. E. Jaeger, and U. K. Winkler. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**: 1070-1074.
5. Wohlfarth, S., C. Hoesche, C. Strunk, and U. K. Winkler. 1992. Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1325-1335.
6. Jaeger, K. E., S. Wohlfarth, and U. K. Winkler. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Lipase: Structure, Mechanism and Genetic Engineering* (L. Alberghina, R. D. Schmid, and R. Verger, Eds.), GBF-Monographs Vol. 16, pp. 381-384, Verlag Chemie, Weinheim.
7. Chihara-Siomi, M., K. Yoshikawa, N. Oshima-Hirayama, K. Yamamoto, Y. Sogabe, T. Nakatani, T. Nishioka, and J. Oda. 1992. Purification, molecular cloning, and expression of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 505-513.
8. Oshima-Hirayama, N., K. Yoshikawa, T. Nishioka, and J. Oda. 1993. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Production in *Escherichia coli* and activation in vitro with a

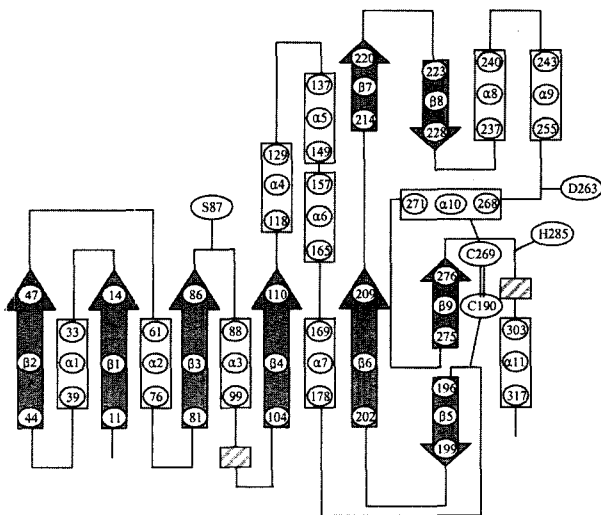


그림 5. *P. glumae* 리파제의 2차 구조. *P. glumae* 리파제의 11개의 α -나선(opened rectangles)과 9개의 β 평판구조(gray arrows)를 DSSP 프로그램에 따라 표시하였다. 촉매-삼작용기구조와 두개의 3_{10} helix구조(hatched boxes) 및 이황화결합을 이루는 시스템들을 표시하였다.

- protein from the downstream gene. *Eur. J. Biochem.* **215**: 239-246.
9. Ihara, F., Y. Kageyama, M. Hirata, T. Nihira, and Y. Yamada. 1991. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. *J. Biol. Chem.* **266**: 18135-18140.
 10. Gilbert, E. J., A. Cornish, and C. W. Jones. 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2223-2229.
 11. Shabtai, Y. and N. Daya-Mishne. 1992. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 174-180.
 12. Cox, M. M., G. Gerritse, and W. J. Quax. 1994. Cloning and expression of a lipase modulator gene from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Patent WO 9402617-A*.
 13. Aoyama, S., N. Yoshida, and S. Inouye. 1988. Cloning, sequencing and expression of the lipase gene from *Pseudomonas fragi* IFO-12049 in *E. coli*. *FEBS Lett.* **242**: 36-40.
 14. Nishio, T., T. Chikano, and M. Kamimura. 1987. Purification and properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 181-186.
 15. Nishio, T., T. Chikano, and M. Kamimura. 1987. Substrate specificity and mode of action of the lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2525-2529.
 16. Frenken, L. G. J., M. R. Egmond, A. M. Batenburg, J. W. Bos, C. Visser, and C. T. Verrips. 1992. Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3787-3791.
 17. Jørgensen, S., K. W. Skov, and B. Diderichsen. 1991. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J. Bacteriol.* **173**: 559-567.
 18. Iizumi, T., K. Nakamura, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga, and T. Fugase. 1991. Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2349-2357.
 19. Kordel, M., B. Hofmann, D. Schomburg, and R. D. Schmid. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *J. Bacteriol.* **173**: 4836-4841.
 20. Tan, Y. and K. J. Miller. 1992. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1402-1407.
 21. Chung, G. H., Y. P. Lee, O. J. Yoo, and J. S. Rhee. 1991. Overexpression of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 237-241.
 22. Chung, G. H., Y. P. Lee, G. H. Jeohn, O. J. Yoo, and J. S. Rhee. 1991. Cloning and nucleotide sequence of a thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2359-2365.
 23. Lee, Y. P., G. H. Chung, and J. S. Rhee. 1993. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1169**: 156-164.
 24. Akatsuka, H., E. Kawai, K. Omori, S. Komatsubara, T. Shibatani, and T. Tosa. 1994. The *lipA* gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* **176**: 1949-1956.
 25. Sebastian, J. and P. E. Kolattukudy. 1988. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch. Biochem. Biophys.* **263**: 77-85.
 26. Kim, H. K., J. K. Lee, H. Kim, and T. K. Oh. 1996. Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**: 117-121.
 27. Kim, H. K., Y. S. Park, H. Kim, and T. K. Oh. 1996. Partial interfacial activation of *Proteus vulgaris* lipase overexpressed in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1365-1367.
 28. Ogierman, M. A., A. Fallarino, T. Riess, S. G. Williams, S. R. Attridge, and P. A. Manning. 1997. Characterization of the *Vibrio cholerae* E1 Tor lipase operon *lipAB* and a protease gene downstream of the *hly* region. *J. Bacteriol.* **179**: 7072-7080.
 29. Kok, R. G., J. J. van Thor, I. M. Nugteren-Roodzant, M. B. W. Brouwer, M. R. Egmond, C. B. Nudel, B. Vosman, and K. J. Hellingwerf. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter clacoocticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Mol. Microbiol.* **15**: 803-818.
 30. Anguita, J., L. B. Rodriguez-Aparicio, and G. Naharro. 1993. Purification, gene cloning, amino acid sequence analysis, and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2411-2417.
 31. Wang, H. and B. C. A. Dowds. 1993. Phase variation in *Xenorhabdus luminescens*: Cloning and sequencing of the lipase gene and analysis of its expression in primary and secondary phases of the bacterium. *J. Bacteriol.* **175**: 1665-1673.
 32. Feller, G., M. Thiry, J. L. Arpigny, M. Mergeay, and C. Gerday. 1990. Lipases from psychrotrophic antarctic

- bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 239-244.
33. Feller, G., M. Thiry, and C. Gerday. 1991. Nucleotide sequence of the lipase gene *lip2* from the Antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144 and site-specific mutagenesis of the conserved serine and histidine residues. *DNA Cell Biol.* **10**: 381-388.
 34. Feller, G., M. Thiry, and C. Gerday. 1991. Nucleotide sequence of the lipase gene *lip3* from the Antarctic psychrotroph *Moraxella* TA144. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**: 323-324.
 35. Ingham, E., K. T. Holland, G. Gowland, and W. J. Cunliffe. 1981. Partial purification and characterization of lipase (EC 3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. *J. Gen. Microbiol.* **124**: 393-401.
 36. Taipa, M. A., P. Moura-Pinto, and J. M. S. Cabral. 1994. Identification and characterization of *Chromobacterium viscosum* lipase. *Biotechnol. Tech.* **8**: 27-32.
 37. Lesuisse, E., K. Schanck, and C. Colson. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**: 155-160.
 38. Dartois, V., A. Baulard, K. Schanck, and C. Colson. 1992. Cloning, nucleotide sequence and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**: 253-260.
 39. Möller, B., R. Vetter, D. Wilke, and B. Foullois. 1991. Alkaline *Bacillus* lipases, coding DNA sequences therefor and Bacilli which produce these lipases, *Patent application No WO 91/16422*.
 40. Schmidt-Dannert, C., M. L. Rua, H. Atomi, R. D. Schmid. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta* **1301**: 105-114.
 41. Schmidt-Dannert, C., M. L. Rua, R. D. Schmid. 1997. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: screening, purification, cloning, overexpression, and properties. *Methods Enzymol.* **284**: 194-220.
 42. Rua M. L., H. Atomi, C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid. 1998. High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 405-410.
 43. Kim, H. K., S. Y. Park, J. K. Lee, and T. K. Oh. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 66-71.
 44. Lee, C. Y. and J. J. Iandolo. 1986. Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a genome into the lipase structural gene. *J. Bacteriol.* **166**: 385-391.
 45. Nikoleit, K., R. Rosenstein, H. M. Verheij, F. Gotz. 1995. Comparative biochemical and molecular analysis of the *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus aureus* and a hybrid lipase. Indication for a C-terminal phospholipase domain. *Eur. J. Biochem.* **228**: 732-738.
 46. Simons, J. W., H. Adams, R. C. Cox, N. Dekker, F. Gotz, A. J. Slotboom, and H. M. Verheij. 1996. The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Escherichia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. *Eur. J. Biochem.* **242**: 760-769.
 47. Simons, J. W., M. D. van Kampen, S. Riel, F. Gotz, M. R. Egmond, H. M. Verheij. 1998. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *Eur. J. Biochem.* **253**: 675-683.
 48. Farrell, A. M., T. J. Foster, and K. T. Holland. 1993. Molecular analysis and expression of the lipase of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Gen. Microbiol.* **1139**: 267-277.
 49. Gotz, F., F. Popp, E. Korn, and K. H. Schleifer. 1985. Complete nucleotide sequence of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* cloned in *Staphylococcus carnosus*. *Nucleic Acids Res.* **13**: 5895-5906.
 50. van Kampen, M. D., N. Dekker, M. R. Egmond, H. M. Verheij. 1998. Substrate specificity of *Staphylococcus hyicus* lipase and *Staphylococcus aureus* lipase as studied by in vivo chimeragenesis. *Biochemistry* **37**: 3459-3466.
 51. Oh, B. C., H. K. Kim, J. K. Lee, S. C. kang, and T. K. Oh. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: Biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* in press.
 52. Jaeger, K. E., F. J. Adrian, H. E. Meyer, R. E. Hancock, U. K. Winkler. 1992. Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* is an amphiphilic protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1120**: 315-321.
 53. Jaeger, K. E., A. Kharazmi, N. Hoiby. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa*: biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function in vitro. *Microb. Pathog.* **10**: 173-182.
 54. Andreoli, P. M., M. M. J. Cox, F. Farin, and S. Wohlfahrt. 1989. European patent 0334462.
 55. Kloster, F. 1993. European patent 0 574 050 A1.
 56. Frenken, L. G., M. R. Egmond, A. M. Batenburg, C. T. Verrips. 1993. *Pseudomonas glumae* lipase: increased proteolytic stability by protein engineering. *Protein. Eng.* **6**: 637-642.
 57. Noble, M. E., A. Cleasby, L. N. Johnson, M. R. Egmond, L. G. Frenken. 1993. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. *FEBS Lett.* **331**: 123-128.
 58. Kim, K. K., H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open

- conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* **5**: 173-185.
59. Schrag, J. D., Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, J. Day, and A. McPherson. 1997. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **5**: 187-202.
 60. Hobson, A. H., C. M. Buckley, J. L. Aamand, S. T. Jorgensen, B. Diderichsen, and D. J. McConnell. 1993. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 5682-5686.
 61. Frenken, L. G., A. de Groot, J. Tommassen, C. T. Verrips. 1993. Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol. Microbiol.* **9**: 591-599.
 62. Frenken, L. G., J. W. Bos, C. Visser, W. Muller, J. Tommassen, C. T. Verrips. 1993. An accessory gene, *lipB*, required for the production of active *Pseudomonas glumae* lipase. *Mol. Microbiol.* **9**: 579-589.
 63. Aamand, J. L., A. H. Hobson, C. M. Buckley, S. T. Jorgensen, B. Diderichsen, and D. J. McConnell. 1994. Chaperone-mediated activation in vivo of a *Pseudomonas cepacia* lipase. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 556-564.
 64. Kok, R. G., J. J. van Thor, I. M. Nugteren-Roodzant, B. Vosman, and K. J. Hellingwerf. 1995. Characterization of lipase-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: identification of a periplasmic lipase chaperone essential for the production of extracellular lipase. *J. Bacteriol.* **177**: 3295-3307.
 65. Quyen, D. T., C. Schmidt-Dannert, R. D. Schmid. 1999. High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 787-794.
 66. Fath, M. J. and R. Kolter. 1993. ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**: 995-1017.
 67. Binet, R., S. Letoffe, J. M. Ghigo, P. Delepelaire, and C. Wandersman. 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters-a review. *Gene* **192**: 7-11.
 68. Duong, F., C. Soscia, A. Lazdunski, and M. Murgier. 1994. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol. Microbiol.* **11**: 1117-1126.
 69. Ahn, J. H., J. G. Pan, J. S. Rhee. 1999. Identification of the *iliDEF* ABC transporter specific for lipase in *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. *J. Bacteriol.* **181**: 1847-1852.
 70. Akatsuka, H., E. Kawai, K. Omori, and T. Shibatani. 1995. The three genes *lipB*, *lipC*, and *lipD* involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *J. Bacteriol.* **177**: 6381-6389.
 71. Kawai, E., H. Akatsuka, A. Idei, T. Shibatani, and K. Omori. 1998. *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* **27**: 941-952.
 72. Felmler, T., S. Pellett, and R. A. Welch. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* **163**: 94-105.
 73. Rollof, J. and S. J. Normark. 1992. In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. *J. Bacteriol.* **174**: 1844-1847.
 74. Ayora, S., P. E. Lindgren, and F. Gotz. 1994. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. *J. Bacteriol.* **176**: 3218-3223.
 75. Simons, J. W., F. Gotz, M. R. Egmond, and H. M. Verheij. 1998. Biochemical properties of staphylococcal (phospho)lipases. *Chem. Phys. Lipids* **93**: 27-37.
 76. Simons, J. W., M. D. van Kampen, I. Ubarretxena-Belandia, R. C. Cox, C. M. A. dos Santos, M. R. Egmond, and H. M. Verheij. 1999. Identification of a calcium binding site in *Staphylococcus hyicus* lipase: generation of calcium-independent variants. *Biochemistry* **38**: 2-10.
 77. Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, and U. Menge. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* **343**: 767-770.
 78. Winkler, F. K., A. D'Arcy, and W. Hunziker. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature* **343**: 771-774.
 79. Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. W. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Høge-Jensen, S. A. Patkar, and L. Thim. 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**: 491-494.
 80. Schrag, J. D., Y. G. Li, S. Wu, and M. Cygler. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**: 761-764.
 81. Grochulski, P., Y. Li, J. D. Schrag, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, and M. Cygler. 1993. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* **268**: 12843-12847.
 82. Dugi, K. A., H. L. Dichek, and S. Santamarina-Fojo. 1995. Human hepatic and lipoprotein lipase: the loop covering the catalytic site mediates lipase substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **270**: 25396-25401.
 83. Martinelle, M., M. Holmquist, I. G. Clausen, S. Patkar, A. Svendsen, and K. Hult. 1996. The role of Glu87 and Trp89 in the lid of *Humicola lanuginosa* lipase. *Protein Eng.* **9**: 519-524.