

## 해수에서 분리한 *Photobacterium* sp. Strain HA-2가 보유하는 요소분해효소 유전자의 유전적 특징

김태옥 · 박권삼\*

군산대학교 식품생명공학과

### Genetic Characterization of the Urease Gene Cluster in *Photobacterium* sp. Strain HA-2 Isolated from Seawater

Tae-Ok Kim and Kwon-Sam Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Gunsan 54150, Korea

In this study, we cloned and sequenced the 15,204-bp DNA region containing the gene cluster for urease production from the chromosome of the environmental *Photobacterium* sp. strain HA-2. We identified 15 open reading frames (ORFs) and the G+C content was 40.3%. The urease gene cluster of *Photobacterium* sp. strain HA-2 consisted of seven genes, namely, *ureDABCEF* and *ureG*. There were five ORFs of urease genes in the opposite direction, which were homologous to the nickel transport operons (*nik*) of *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia coli*. The genetic organization and sequences of the urease genes of *Photobacterium* sp. strain HA-2 resembled those found in *Vibrio fischeri* and *V. parahaemolyticus*.

Key words: *Photobacterium* sp., Urease, Gene, Open reading frame, Sequence

#### 서 론

Urease (urea amidohydrolase; EC 3.5.1.5)는 요소를 암모니아와 이산화탄소로 분해하는 효소로 식물, 세균, 진균 및 조류 등 다양한 생명체에 존재한다(Mobley et al., 1995). 세균의 경우 urease 유전자의 염기서열은 1989년 *Proteus mirabilis* (Jones and Mobley, 1989)에서 처음으로 밝혀진 후 다양한 세균에서 보고되었다(Mulrooney and Hausinger, 1990; Labigne et al., 1991; De Koning-Ward et al., 1994; Park et al., 2000; Orth et al., 2006). 일반적으로 세균의 urease는 7개 이상의 유전자로 구성되어 있으며 유전자의 구조적 배열은 매우 유사하다(Mobley et al., 1995). Urease는 효소활성의 중심 역할을 담당하는 구조단백질(UreA, UreB 및 UreC)과 구조단백질에 Ni<sup>2+</sup>를 운반 및 조합을 담당하는 보조단백질(UreD, UreE, UreF 및 UreG)로 나뉜다. 일부 세균에서는 특이적으로 urease 유전자의 전사를 조절하는 전사조절단백질인 UreR (Nicholson et al., 1993; Park et al., 2000) 및 세포 내로 Ni<sup>2+</sup>를 운반하는 NixA과 UreH 등의 보조단백질도 보고되어 있다(Maeda et al., 1994;

Mobley et al., 1995). Urease 유전자의 발현에는 몇 가지 메커니즘이 보고되어 있는데 *Klebsiella aerogenes*는 질소원이 제한된 조건에서 발현되며(Macaluso et al., 1990), *P. mirabilis*와 *V. parahaemolyticus*는 기질인 요소가 존재하는 조건에서 발현이 유도되며(Nicholson et al., 1993; Park et al., 2000), *Streptococcus salivarius*는 pH에 의해 발현이 조절된다(Sissons et al., 1990). 세균 유래의 urease는 병원성에 직, 간접적으로 관여한다고 보고되어 있다(Mobley et al., 1995; Coker et al., 2000; Konieczna et al., 2012; Steyert et al., 2012; Feder et al., 2015).

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela*은 자리돔의 병원균으로 처음에는 *Vibrio damsela*로(Love et al., 1981), 후에 *Listonella*로 속명이 변경되었으며(MacDonell and Colwell, 1985), 현재는 *P. damsela* subsp. *damsela* (Trüper and De'Clari, 1997)로 통용되고 있다. 이 균은 양식어류(방어류, 가자미류, 무지개 송어, 도미류 및 해산베스), 어류(상어) 및 포유류(돌고래 및 사람) 등에 질병을 유발하는 병원성 세균으로 알려져 있다(Botella et al., 2002). 최근 Pedersen et al., (2009)의 연구결과에 의하면 무지개송어 양식장에서 분리한 *P. damsela*

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2015.0639>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 48(5) 639-643, October 2015

Received 27 August 2015; Revised 1 October 2015; Accepted 6 October 2015

\*Corresponding author: Tel: +82. 63. 469. 1822 Fax: +82. 63. 469. 7448

E-mail address: parkks@kunsan.ac.kr

subsp. *damselae* 16개 균주 중 15개 균주는 urease 양성으로 판명되었으며, Botella et al. (2002)은 어류 양식장에서 분리한 *P. damsela* subsp. *damselae* 71개 균주 중 45%는 urease 양성 균주로 판명되었다는 연구결과가 있으며, *P. damsela* subsp. *damselae*는 urease 활성과 *ureC* 유전자를 보유하고 있는 반면 *P. damsela* subsp. *piscicida*에서는 urease 활성 및 유전자가 존재하지 않기 때문에 종간의 동정에 유용하게 이용될 수 있다는 보고도 있다(Osorio et al., 2000).

최근 우리는 전북 곰소만 해역의 상층 해수에서 urease 양성 균주를 분리하여 생화학적 특성 및 16S rRNA 유전자 분석결과 이 균은 *P. damsela* subsp. *damselae* strain CCRC15428 균주와 99.67% 상동성이 있는 것으로 밝혀져 이 분리 균주를 *Photobacterium* sp. Strain HA-2로 명명하였으며, PCR assay로 *ureC* 유전자 일부를 클로닝하여 염기서열을 결정하였다(Kim et al., 2009). 본 연구에서는 *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 urease gene cluster를 포함하는 약 15 kb의 DNA 영역을 클로닝 및 염기서열을 결정하여 이 유전자의 유전학적 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주, plasmid 및 시약

유전자 조작에는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , DNA의 cloning 및 subcloning을 위한 plasmid는 pUC119 vector를 사용하였다. PCR assay, cloning, ligation 등의 유전자 조작에 사용된 효소는 Takara (Japan)사의 제품을 사용하였으며, plasmid DNA는 QIAprep Spin Mini prep kit (Qiagen, USA) 및 agarose gel에서 DNA는 QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, USA)를 사용하여 추출하였다.

### 염기서열 결정 및 분석

DNA염기서열 결정은 ABI310 sequencers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 결정하였으며, 분석에는 DNASIS MAX v3.0프로그램(Hitachi Software, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 유전자 상동성 검색은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

### Digoxigenin (DIG)-labeling probe 준비

*ureC* (Kim et al., 2009) 유전자의 상, 하류 영역 DNA 클로닝을 위한 probe 준비용 primer는 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였으며 DNA oligonucleotide는 다음과 같다. 상류용 probe, UP-F (5'-TCAACAATAACCTGAGC-GCCT-3')와 UP-R (5'-ATCAGATTTGCTTAACCATGG-3') 및 하류용 probe, Do-F (5'-AGCAAGCCAAAATGGTAGA-GA-3')와 Do-R (5'-TGGAAGGTGAACGCTAATTCT-3'). PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 3분간 열 변성 후 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30

초, 72 $^{\circ}$ C 30초를 30회 반복하여 DNA를 증폭하고 정제한 다음 DIG-labeling kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 상기의 PCR 조건 중 annealing 온도만 5 $^{\circ}$ C 낮은 50 $^{\circ}$ C에서 PCR 반응을 실시하여 DIG-labeling probe를 작성하였다.

### Southern blot hybridization

클로닝을 위하여 다양한 제한효소로 절단한 염색체 DNA는 0.8% agarose gel에 apply하여 1 $\times$ TBE buffer [0.09 M Tris-borate, 2 mM EDTA (pH 8.0)]를 사용하여 전기영동 후 nylon membrane (GeneScreen Plus, PerkinElmer, Inc. USA)에 전이하였다. DNA는 GS Gene Linker UV chamber (Bio-Rad, USA)로 고정하였으며, hybridization은 42 $^{\circ}$ C의 수조에서 하룻밤 실시하여 phosphatase-labeled anti-DIG monoclonal 항체 (Boehringer Mannheim, Germany)로 검출하였으며, 필름은 TQX-120 Automatic Film Processor[동양 메디칼 시스템(주)]로 현상하였다.

## 결과 및 고찰

### *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 urease gene cluster의 클로닝

Urease 활성을 보유하고 있는 *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 urease gene cluster를 포함하는 DNA영역을 클로닝하기 위하여 염색체DNA를 11종의 제한효소로 처리한 후 urease의 구조단백질의 일종인 *ureC* probe (Kim et al., 2009)를 사용하여 Southern blot hybridization을 실시하였다. 그 결과, 제한효소 *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Sac*I, *Sal*I 및 *Xho*I로 절단한 DNA는 약 15 kb 이상의 DNA 단편에 probe가 반응하였으며, *Bgl*II 및 *Hinc*II로 처리한 DNA는 약 5.7 kb의 단편에 probe가 반응하였다. 또한, *Hind*III, *Pst*I 및 *Xba*I로 절단한 DNA는 약 1.0, 2.3 및 2.2 kb의 DNA 단편에 probe가 반응하였다(결과 미제시). Southern blot hybridization 결과 제한효소에 따라 DNA 단편이 너무 커서 클로닝이 어렵거나 또는 단편이 작아 효율성이 떨어질 것으로 판단되어 적절한 크기인 *Bgl*II 및 *Hinc*II 제한효소로 절단한 단편을 대상으로 클로닝을 진행하였다. 결과적으로 DNA를 제한효소 *Bgl*II로 절단하여 pUC119 vector에 삽입 및 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질 전환한 clone 중에서 *ureC* probe와 반응한 clone (pTO1)을 획득하였다(Fig. 1). Clone에 내포되어 있는 plasmid DNA의 크기는 약 5.7 kb이며 plasmid DNA의 염기서열을 결정하여 양 말단의 염기서열을 이용하여 새로운 probe를 작성하여 상류 및 하류영역의 DNA를 클로닝하였다. 상류 및 하류영역의 DNA를 클로닝하기 위하여 염색체 DNA는 *Hinc*II, *Hind*III, *Pst*I 및 *Xba*I 제한효소로 절단하여 Southern blot hybridization 한 결과, 상류영역의 probe는 약 8.5, 8.6, 8.5 및 6.0 kb의 단편에 반응하였으며, 하류영역의 probe는 약 9.5, 5.4, 2.0 및 7.0 kb의 단편에 반응하였다(결과 미제시). 상류

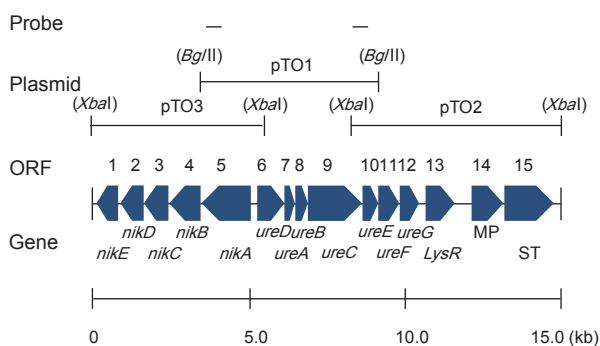


Fig. 1. Schematic representation in the region containing the urease gene cluster and open reading frame assignment.

및 하류영역 DNA 클로닝은 제한효소 *Xba*I 단편의 약 6.0 kb (pTO3) 및 7.0 kb (pTO2)의 DNA 단편을 포함한 clone을 획득하였다(Fig. 1). 각 clone의 DNA는 개략적인 제한효소 지도를 작성한 후 pUC119 vector의 해당 제한효소 자리에 subcloning 한 후 DNA 염기서열을 결정하였다.

#### 염기서열 결정 및 urease gene clusters의 유전학적 특징

DNA 염기서열이 결정된 15,204-bp 영역에는 15개의 open reading frame (ORF)이 존재하였다. 15개 ORF의 위치, 구성 아미노산의 수, 예상분자량 및 상동성 결과 등은 Table 1에 나타

내었다. 전체 DNA의 GC 함량은 40.3%로 *P. damsela* subsp. *damsela*의 염색체 DNA의 GC 함량 40.6-41.4%와 거의 동일하였다(Thyssen et al., 2000).

ORF1은 198개의 아미노산으로 구성되어 분자량은 약 22.5 kDa으로 추정되며 상동성을 조사해 본 결과 *V. fischeri*의 *nikE* 유전자와 50.0%, *V. parahaemolyticus*의 *nikE* 유전자와 49.2%의 상동성을 나타내었다. ORF2는 231개의 아미노산으로 구성되어 있으며 예상분자량은 25.5 kDa이며 *V. parahaemolyticus*의 *nikD*와 40.0%의 상동성을 나타내었다. ORF3은 265개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 29.6 kDa이며 *V. parahaemolyticus*의 *nikC*와 24.4%의 상동성을 나타내며, ORF4는 324개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 36.0 kDa이며 *V. parahaemolyticus*의 *nikB*와 40.5%의 상동성을 나타내었다. ORF5는 524개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 58.8 kDa이며 *V. parahaemolyticus*의 *nikA*와 54.8%의 상동성을 나타내었다. ORF1에서 ORF5까지 5개 ORF는 그람 양성 및 음성의 다수 세균에서 보고되어 있는 ATP-binding cassette (ABC) transporter의 operon과 유사한 형태를 나타내는데 ORF2 및 ORF1에는 Walker 등이 제한한 ATP-binding motif, A (GX<sub>2</sub>GXGKS) 및 B (DEX<sub>4</sub>LD)가 적절한 위치에 존재하고 있었다(Walker et al., 1982). 따라서 ORF1에서 ORF5까지 5개의 ORF는 urease gene cluster와 인접한 영역에 존재한다는 점과 *E. coli*, *V. parahaemolyticus* 및 *V. fischeri*의 *nik* operon (Navarro et al., 1993; Park et al., 2000)과 상동성이 있다는

Table 1. Open reading frames (ORFs) identified in the region containing the urease gene cluster of environmental *Photobacterium* sp. strain HA-2

ORF	Gene	position		No. of aa <sup>a</sup>	Homologous ORFs in database		
		5'	3'		Accession no.	% Identity	Note (origin)
1	<i>nikE</i>	783	190	198	EHN70902	50	NikE ( <i>V. fischeri</i> )
2	<i>nikD</i>	1,471	779	231	BAB13781	40	NikD ( <i>V. parahaemolyticus</i> )
3	<i>nikC</i>	2,255	1,461	265	WP_017222126	48	DppC ( <i>M. dasanensis</i> )
4	<i>nikB</i>	3,227	2,255	324	BAB13783	40	NikB ( <i>V. parahaemolyticus</i> )
5	<i>nikA</i>	4,779	3,208	524	BAB13784	55	NikA ( <i>V. parahaemolyticus</i> )
6	<i>ureD</i>	5,300	6,145	282	Q03285	59	UreD ( <i>E. coli</i> )
7	<i>ureA</i>	6,173	6,472	100	WP_039033550	88	UreA ( <i>Shewanella</i> sp. EC-SMB14102)
8	<i>ureB</i>	6,485	6,796	104	KLU17508	77	UreB ( <i>P. mirabilis</i> )
9	<i>ureC</i>	6,802	8,502	567	WP_023603684	90	UreC ( <i>A. logei</i> )
10	<i>ureE</i>	8,523	8,978	152	WP_050550651	74	UreE ( <i>V. parahaemolyticus</i> )
11	<i>ureF</i>	9,011	9,673	221	WP_023603686	69	UreF ( <i>A. logei</i> )
12	<i>ureG</i>	9,689	10,306	206	WP_005499462	94	UreG ( <i>V. parahaemolyticus</i> )
13	<i>LysR</i>	10,423	11,325	301	WP_021706754	58	LysR ( <i>V. proteolyticus</i> )
14	membrane protein	12,223	13,152	310	WP_048897435	84	Membrane protein ( <i>P. swingsii</i> )
15	sodium transporter	13,170	14,627	486	WP_045039969	80	SLC5sbD ( <i>P. iliopiscarium</i> )

<sup>a</sup>aa, amino acid(s).

점에서 세포외부에서 세포질로 nickel ion을 흡수하는 nickel transport system의 막단백질로 작용 할 가능성이 높다고 판단되어 *nik* 유전자로 명명하였다.

282개의 아미노산으로 구성되어 있는 ORF6의 분자량은 32.1 kDa으로 추정되며 다른 urease 양성 균주의 UreD 유전자와 상동성은 55% 이상이다. ORF7는 100개의 아미노산으로 구성되어 분자량은 11.1 kDa로 urease 양성 균주의 UreA와 80% 이상의 높은 상동성을 나타내었다. ORF8은 104개의 아미노산으로 구성되어 분자량은 11.8 kDa이며 urease 양성 균주의 UreB와 70% 이상의 상동성을 나타내었다. ORF9은 567개의 아미노산으로 구성되어 분자량은 61.1 kDa이며 urease 양성 균주의 UreC와 85% 이상의 높은 상동성을 나타내었다. *K. aerogenes* UreC 단백질의 134, 136 및 249번째 잔기에 존재하는 histidine는 nickel ion을 결합하는 위치로 알려져 있으며, UreA의 97번째 histidine 잔기 및 UreB의 39와 41번째 histidine 잔기도 urease 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Park and Hausinger, 1993). *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 UreC에도 134, 136 및 246번째 위치에 histidine 잔기가 보존되어 있으며, UreB에는 41 및 43번째 잔기 및 UreA에는 96번째 잔기에 histidine이 위치하고 있었다. 또한 urease 활성부위에 존재하는 아미노산 공통서열(MVCHHLD) (Martin and Hausinger, 1992)도 *Photobacterium* sp. Strain HA-2 UreC 단백질의 317-323 위치에 존재하고 있었다.

ORF10은 152개 아미노산으로 구성되어 예상분자량은 16.8 kDa이며 다른 urease 양성 균주의 UreE와 67% 이상의 상동성을 나타내었다. UreE 단백질의 C-말단에는 polyhistidine 잔기가 존재하며 polyhistidine 잔기는 nickel ion을 binding하여 apoenzyme에 nickel ion을 결합하는 역할을 하는 것으로 알려져 있는데(Mulrooney et al., 2005), *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 UreE 말단에는 4개 histidine 잔기가 존재하는데 이는 urease 활성이 강한 *P. mirabilis* 및 *K. aerogenes* 보다는 histidine 잔기 수가 적은 편이다. 이전 연구에서 *Photobacterium* sp. Strain HA-2는 *V. parahaemolyticus* AQ4673 균주에 비해 urease 활성이 매우 낮았는데(Kim et al., 2009), 이는 UreE C-말단에 존재하는 histidine 잔기가 적어 apoenzyme에 nickel ion을 결합하는 능력 저하로 인해 urease 활성이 낮은 원인으로 작용 할 가능성이 있다고 판단된다.

ORF11는 221개의 아미노산으로 구성되어 예상분자량은 25.0 kDa이며 다른 urease 양성 균주의 UreF와 64% 이상의 상동성을 나타내었다. ORF12은 206개의 아미노산으로 구성되어 예상분자량은 22.4 kDa이며 urease 양성 균주의 UreG와 90% 이상의 높은 상동성을 나타내었다. 다른 균주에서 발견되는 ATP/GTP binding site (Sriwanthana et al., 1993)가 *Photobacterium* sp. Strain HA-2의 UreG 19번에서 26번 잔기에 보존되어 있었다. 따라서 ORF12는 urease assembly 또는 nickel ion 삽입 시 에너지를 공급해 주는 단백질로서 작용하고 있음을

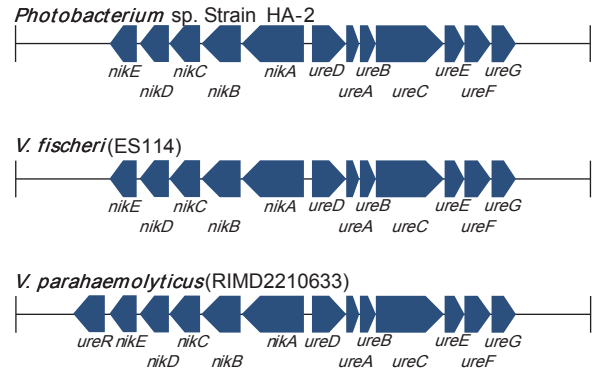


Fig. 2. Comparison of genetic organization of urease gene cluster between *Photobacterium* sp. strain HA-2, *V. fischeri*, and *V. parahaemolyticus*.

시사한다. 301개 아미노산으로 구성되어 분자량이 33.8 kDa인 ORF13은 다수의 *Vibrio* 속에서 보고되어 있는 전사조절단백질 LysR과 상동성이 검색되었다. *P. mirabilis* 및 *V. parahaemolyticus*에 존재하는 urease의 전사조절단백질인 UreR과 비교하면 분자량이 크고 상동성이 매우 낮기 때문에 UreR일 가능성은 낮은 것으로 판단된다. ORF14는 310개의 아미노산으로 구성되어 분자량이 32.7 kDa이며 다수의 균주에서 보고되어 있는 막단백질과 상동성이 검색되었다. ORF15는 486개의 아미노산으로 구성되어 예상분자량은 52.5 kDa이며 sodium symporter 유전자와 상동성이 검색되었다. ORF13에서 ORF15까지 3개 유전자는 urease 활성화와는 무관한 유전자라고 판단되며, 나머지 urease 활성화와 관련성이 있는 12개 ORF의 유전자적 구성은 *V. fischeri* 및 *V. parahaemolyticus*와 유사하였다(Fig. 2). 앞으로 urease 관련 유전자 결손균주를 작성하여 병원성 관련성 여부 등의 연구는 필요하다고 판단된다.

## 사 사

본 연구는 2015년도 군산대학교 수산과학연구소의 학술연구 보조비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

## References

- Botella S, Pujalte MJ, Macian MC, Ferrus MA, Hernandez J and Garay E. 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. J Appl Microbiol 93, 681-688. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01748.x>.
- Coker C, Poore CA, Li X and Mobley HLT. 2000. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect 2, 1497-1505. [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01304-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01304-6).
- De Koning-Ward TF, Ward AC and Robins-Browne RM. 1994.

- Characterization of the urease-encoding gene complex of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 145, 25–32.
- Feder V, Kmetzsch L, Staats CC, Vidal-Figueiredo N, Ligabue-Braun R, Carlini CR and Vainstein MH. 2015. *Cryptococcus gattii* urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS J* 282, 1406-1418. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13229>.
- Jones BD and Mobley HLT. 1989. *Proteus mirabilis* urease: nucleotide sequence determination and comparison with jack bean urease. *J Bacteriol* 171, 6414-6422.
- Kim KJ, No AR and Park KS. 2009. Isolation and identification of urease-positive *Photobacterium* sp. strain HA-2 from sea water. *Kor J Fish Aquat Sci* 42, 531-536.
- Konieczna I, Zarnowiec P, Kwinkowski M, Kolesinska B, Fraczyk J, Kaminski Z and Kaca W. 2012. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci* 13, 789-806. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203711213080008>.
- Labigue A, Cussac V and Courcoux P. 1991. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol* 173, 1920-1931.
- Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmer JJIII, Hickman FW and Fanning GR. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214, 1139-1140.
- Macaluso A, Best EA and Bender RA. 1990. Role of the nac gene product in the nitrogen regulation of some NTR-regulated operons of *Klebsiella aerogenes*. *J Bacteriol* 172, 7249-7255.
- MacDonell MT and Colwell RR. 1985. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and recommendation of two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Syst Appl Microbiol* 6, 171-182.
- Maeda M, Hidaka M, Nakamura A, Masaki H and Uozumi T. 1994. Cloning, sequencing, and expression of thermophilic *Bacillus* sp. strain TB-90 urease gene complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 432-442.
- Martin PR and Hausinger RP. 1992. Site-directed mutagenesis of the active cysteine in *Klebsiella aerogenes* urease. *J Biol Chem* 267, 22024-22027.
- Mobley HLT, Island MD and Hausinger RP. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev* 59, 451-480.
- Mulrooney SB and Hausinger RP. 1990. Sequence of the *Klebsiella aerogenes* urease genes and evidence for accessory proteins facilitating nickel incorporation. *J Bacteriol* 172, 5837-5843.
- Mulrooney SB, Ward SK and Hausinger RP. 2005. Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE metal-binding domain, a functional metallochaperone of urease. *J Bacteriol* 187, 3581-3585. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.10.3581-3585.2005>.
- Navarro C, Wu LF and Mandrand-Berthelot MA. 1993. The nik operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. *Mol Microbiol* 9, 1181-1191.
- Nicholson EB, Concaugh EA, Foxall PA, Island MD and Mobley HL. 1993. *Proteus mirabilis* urease: transcriptional regulation by UreR. *J Bacteriol* 175, 465-473.
- Orth D, Grif K, Dierich MP and Würzner R. 2006. Prevalence, structure and expression of urease genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from humans and the environment. *Int J Hyg Environ Health* 209, 513-520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.06.003>.
- Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL and Barja JL. 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis Aquat Org* 40, 177-183.
- Park IS and Hausinger RP. 1993. Site-directed mutagenesis of *Klebsiella aerogenes* urease-identification of histidine residues that appear to function in nickel ligation, substrate binding, and catalysis. *Protein Sci* 2, 1034-1041.
- Pedersen K, Skall HF, Lassen-Nielsen AM, Bjerrum L and Olesen NJ. 2009. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *J Fish Diseases* 32, 465-472. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01041.x>.
- Sissons CH, Perinpanayagam HER, Hancock EM and Cutress TW. 1990. pH regulation of urease levels in *Streptococcus salivarius*. *J Dent Res* 69, 1131-1137.
- Sriwanthana B, Island MD and Mobley HLT. 1993. Sequence of the *Proteus mirabilis* urease accessory gene *ureG*. *Gene* 129, 103-106.
- Steyert SR and Kaper JB. 2012. Contribution of Urease to Colonization by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 80, 2589-2600. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00210-12>.
- Thyssen A, Van Eygen S, Hauben L, Goris J, Swings J and Ollevier F. 2000. Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1013-1019.
- Trüper HG and De'Clari L. 1997. Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int J Syst Bacteriol* 47, 908-909.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ and Gay NJ. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1, 945-951.