

*Streptomyces coelicolor*에서 *secY* 유전자의 클로닝과 염기서열 결정

김상숙 · 현창구 · 김영민¹ · 이주현¹ · 정인권¹ · 김대명² · 서주원*

명지대학교 생명과학과, 생명과학연구소

¹연세대학교 이과대학 생물학과, 생물산업소재연구센터

²청주대학교 유전공학과

Molecular Cloning and Sequence Analysis of the Gene for SecY from *Streptomyces coelicolor* (Müller)

Sang-Suk Kim, Chang-Gu Hyun, Young-Min Kim¹, Joo-Hun Lee¹, In-Kwon Chung¹, Dae-Myung Kim² and Joo-Won Suh*

Department of Biological Science, Biotechnology Research Institute, Myong Ji University, Yongin 449-728, Korea

¹Department of Biology, College of Engineering and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Department of Genetic Engineering, Cheongju University, Cheongju 360-1702, Korea

Abstract — SecY is a central component of the protein export machinery that mediate the translocation of secretory proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. In order to study the mechanism of protein secretion in *Streptomyces*, we have done cloning and sequencing of the *Streptomyces coelicolor secY* gene by using polymerase chain reaction method. The nucleotide sequence of the gene for SecY from *S. coelicolor* showed over 58% identity to that of *M. luteus*. The deduced amino acid sequences were highly homologous to those of other known SecY polypeptides, all having the potential to form 10 transmembrane segments, and especially second, fifth, and tenth segments were particularly conserved, sharing greater than 75% identity with *M. luteus* SecY. We propose that the conserved membrane-spanning segments actively participate in protein export. In *B. subtilis* and *E. coli*, the *secY* gene is a part of the *spc* operon, is preceded by the gene coding for ribosomal protein L15, and is likely coupled transcriptionally and translationally to the upstream L15 gene. In the other hand, *secY* gene of *S. coelicolor* and *M. luteus* have its own promoter region, are coupled translationally with *adk* gene and presented in *adk* operon.

그람 양성 진정세균군에 속하는 *Streptomyces*는 토양에서의 분리가 쉬우며 산업적으로 여러가지 유용한 2차대사산물을 생산하는 균주로 잘 알려져 있다. 이 *Streptomyces*는 영양환경의 변화에 따라 기저균사(substrate mycelium)의 형태로 성장하다가 영양분이 고갈되면서 기균사(aerial mycelium)를 형성하고 기균사내에 격벽이 생겨 여러개의 포자(spore)로 분화하게 된다(1, 2). 이와같은 세포분화는 세포생장기에서 정지기에 더욱 활발해지며 이때 유용한 물질로 사용되는 항생제등의 이차대사산물을 생성한다. 최근의 분자생물학적 연구에 따르면 이차대사산물로 일컬어지는 유용물질의 생산은 세포생장기중 세포분화반응이 북

잡하게 일어나는 정지기에서 주로 생합성되고 이러한 단계에서 발현되는 유전자에 변이가 생길 경우 항생물질 생산능과 포자착생능을 동시에 잃어버리는 현상이 빈번하게 관찰되어 *Streptomyces*에서의 2차대사 및 형태분화는 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되며 이러한 이유로 인해 환경요인에 의한 세포분화와 이차대사산물의 생산에 대한 조절기작연구가 동시에 이뤄지고 있는 추세이다(3).

*Streptomyces*에서 기저균사로 성장시 분비되는 여러가지 가수분해효소들의 분비기작은 원핵세포에서 단백질 분비기작을 알고자 하는 학문적 측면과 방선균을 이용한 유용효소 생산을 위한 실용적 측면에서 지대한 관심사가 아닐 수 없다. 특히 최근에는 항생제 생산을 위한 발효공정조절 지식이 축적됨으로 인하여 *Streptomyces*를 이종단백질 발현의 숙주균으로 이용

Key words: *Streptomyces coelicolor*, SecY, protein export, polymerase chain reaction

*Corresponding author

하고자 하는 시도도 이루어지고 있다(4, 5). 그러나 원핵세포의 단백질 분비기구에 대한 연구는 지금까지 대장균을 대상으로 어느 정도 진전이 있으나(6-9) 그람 양성균에서는 Suh 등(1990)이 수행한 *B. subtilis*로부터 protein translocator로 지목되는 *secY* 유전자의 분리와 *Escherichia coli*에서와는 달리 이 유전자의 발현에 중요한 역할을 하는 minor promoter 지역 결정(11), *secY* 유전자를 조절하는 세포를 제작중인 것(12)과 *Micrococcus luteus* 등 몇 개의 다른 균주에서 *secY* 유전자를 분리하였다는 것 외에는 실용적 관심에도 불구하고 연구는 아주 미미한 상태이다(13-17).

SecY는 단백질 분비에 중요한 역할을 하는 막단백질로 *E. coli*에서는 *secY* 유전자에 mutation이 일어난 균주의 경우 단백질을 분비하지 못하고 그 전구체를 세포내에 축적하는것이 관찰 되었다(18). 이러한 SecY는 공통적으로 세포막내에서 NH₂- 및 COOH- 말단들이 세포질로 향하고 그 가운데 부분이 세포막을 열번 통과하는 topology를 갖고 있다(19-22). SecY의 아미노산 서열을 비교해 보았을 때 그람 음성균인 대장균과 그람 양성균인 *B. subtilis* 간에도 상관관계가 아주 높게 보존되어 있었으며 10개의 membrane-spanning segment 중 특히 보존이 잘 되어 있는 지역을 볼 수 있었다. 이 지역은 SecY 단백질 중에서 단백질 분비기작에 필수적인 역할을 하는 지역임을 알 수 있었다.

이러한 *secY* 유전자를 방선균에서 분리하기 위해 여러균주들의 SecY 아미노산 서열 중 보존율이 뛰어난 두번째와 다섯번째 segment에서 두개의 primer를 제작하였고 이제까지 밝혀진 대부분의 *secY* 유전자는 모두 *spc* operon에 존재하고 주변의 gene organization 역시 유사하였으므로 *secY* 유전자 양 옆의 ribosomal protein L15와 adenylate kinase 지역에서 두개의 primer를 제작하여 PCR 실험을 수행하였다. 이러한 실험에서 우리는 *S. coelicolor*와 *S. peucetius* ATCC 29050으로 부터 예상 크기인 약 1.1 kb와 1.9 kb의 PCR 산물을 얻을 수 있었다.

본 연구에서는 *B. subtilis*, *M. luteus*와 같은 그람 양성균으로 자연적 단백질 분비체계가 발달되어 있다는 공통점이 있으며 여러가지 유용한 이차대사산물을 생산하고 분자 생물학적으로 방선균 연구의 model system으로 이용되고 있는 *S. coelicolor*로 부터 세포외 단백질 분비를 위해 translocator의 역할을 하는 것으로 알려진 SecY 단백질의 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하였다. 분리된 유전자는 이제까지 밝혀진 *secY* 유전자 염기서열과 상동성 여부, genetic organization, 아미노산 서열의 상동성과 hyd-

rophobicity analysis 등으로 *secY* 유전자임을 확인할 수 있었다.

유용 이중단백질 발현 및 분비 숙주균주로서 이미 몇몇 외국의 회사들이 주목하고 있는 방선균에서의 *secY* 유전자의 분리는 아직 밝혀지지 않은 방선균의 단백질 분비 기작 규명과 유용 단백질 분비조절에 대한 연구에 중요한 시발점을 마련할 수 있을 것이다.

실험재료 및 방법

균주 및 plasmid

균주로는 *Streptomyces coelicolor*(Muller)와 *Escherichia coli* DH5 α F'(supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15)hsdR17recA1endA1gyrA96thi-relA1)을 사용하였다. Plasmid는 PCR product의 cloning을 위해 pGEM-T vector(Ap^r, Promega)를 사용하였고 염기서열 결정을 위해 pBluescriptII SK(+)(Ap^r, Stratagene)를 사용하였다.

배지 및 배양조건

*S. coelicolor*의 배양을 위해 고형배지인 R₂YE 배지(Sucrose 103 g, K₂SO₄ 0.25 g, MgCl₂·6H₂O 10.12 g, Glucose 10 g, Casamino acid 0.1 g, Yeast extract 5 g, TES 5 g, Trace element<0.5% KH₂PO₄ 1 ml, 1M CaCl₂·2H₂O 2 ml, 20% L-Proline 1.5 ml, 1N NaOH 0.7 ml per 100 ml>2 ml, Agar 25 g per 1 l)를 사용하였고 *S. coelicolor*의 chromosomal DNA 분리를 위해서는 YEME broth(Yeast extract 3 g, Peptone 5 g, Malt-extract 3 g, Glucose 10 g, Sucrose 340 g, autoclave 후에 2.5M MgCl₂·6H₂O 2 ml per 1 l)를 사용하여 30°C에서 2~3일간 배양하였다.

제한효소 및 시약

DNA 재조합을 위해 사용한 제한효소, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase, calf intestine alkaline phosphatase 등은 Poscochem사에서 구입하여 사용하였다. X-gal, IPTG는 Promega에서 구입하여 사용하였고 각종 시약 및 항생제는 Sigma 제품을 사용하였다. Agarose gel에서의 DNA의 분리를 위해서는 Fisher 사의 dialysis bag을 사용하였다.

DNA 분리 및 재조합

*S. coelicolor*의 chromosomal DNA의 분리를 위해서는 Hopwood 등(23)의 방법을 수정하여 사용하였으며 전체 DNA 분리과정은 다음과 같다. *S. coelicolor*를 YEME broth 배지 50 ml에 2~3일간 배양 후

8,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 버리고 균체를 lysis buffer(15% Sucrose, 25 mM Tris-cl pH 7.5, 25 mM EDTA)로 일회 세척 후 다시 8,000 rpm으로 원심분리하였다. Lysozyme이 5 mg/ml로 녹아 있는 lysis buffer 20 ml로 균체를 현탁시켜 37°C에서 1 시간동안 반응한 후 10% SDS 1 ml를 넣고 70°C에서 30분간 방치한 후 동량의 phenol/chloroform을 처리하여 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 새 tube에 옮겨 2배의 ethanol과 0.1배의 5M potassium acetate를 넣어 glass rod로 spool out 하였다. 70% ethanol로 세척 후 말려서 TE buffer(10 mM Tris-cl pH 7.5, 1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다. *E. coli*에서의 plasmid 분리, DNA 재조합 및 형질전환은 Maniatis 등(24)의 방법에 따라 수행하였다.

Polymerase Chain Reaction

PCR primer의 제작 *E. coli*, *B. subtilis*와 *M. luteus*의 spectinomycin(*spc*) operon중 L15 유전자와 *secY* 지역, adenylate kinase(*adk*) operon중 *adk* 지역에서 특히 보존이 잘 되어 있는 지역의 아미노산 서열을 비교하여 primer 합성을 위한 아미노산 서열을 유추하고 *Streptomyces*의 GC 비율(70~74%)과 codon 사용빈도를 고려하여 PCR primer의 염기서열을 결정하였다. 제작된 PCR primer는 L15- 30 mer : 5' ggcttcgagggtggccagatgccctccac 3', SP1- 27

mer : 5' ggcacgcccgtacatcaccgccagc 3', SP2- 27 mer : 5' gaagatcagcagggacatgccgttgcc 3'와 Adk- 30 mer : 5' ctgcgttcctttcccgcaccaggeggccc 3'로서 Pharmacia 사의 DNA 합성기를 사용하여 제작하였다(Fig. 1).

PCR 반응 Atlas, R.M.과 Bej, A.K의 방법(25)에 따라 총 50 µl의 부피에 template 50 ng, 10X Taq DNA polymerase, 2.5 mM dNTP 4 µl, 각각의 primer 50 pmol, 25 mM MgCl₂ 5 µl, Taq DNA polymerase 1 µl의 혼합액을 94°C에서 1분 30초동안 denaturation 시키고, 55°C에서 30초동안 primer를 annealing 시킨 후, 72°C에서 2분 20초 동안 extention 시켰다. 이를 35회 반복시키고 72°C에서 15분간 extention 반응 시킨 후 1% agarose gel에서 product를 확인하였다. Perkin Elmer Cetus 사의 PCR machine을 사용하였다.

염기서열 결정 및 분석

PCR product의 염기서열 결정을 위해 *Pst*I, *Sma*I, *Pvu*II, *Kpn*I, *Sac*I의 제한효소를 사용하여 제한효소 지도를 작성하였고 제한효소 지도에 따라 작은 단편들을 얻어 pBluescriptII SK(+)에 subcloning 하여 Pharmacia 사의 Auto sequencer를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

염기서열 분석은 DNA/Protein Sequence 분석 소

<i>spc</i> -operon	5'		3'	
	L15	SecY	Adk	
	L15 primer	SP1 primer SP2 primer	Adk primer	
	→	→ ←	←	
	conserved region			
L15	ML VRAGFEGGQLPLQMLPK BS VRPGFEGGQMPLFQRLPK EC VRRGFEGGQMPLLYRLPK			
SP1		ML RALGIMPYITASIIIVOL BS LAMGIMPYITASIIIQL EC EALGIMPYISASIIIQL		
SP2		ML NGVGNMSLLIETSIAA BS HGVNGISIIIFAGIVA EC RGIGNGISIIIFAGIVA		
Adk			ML MLLMGPPGSGKGTQATRI BS LVLMLPGAGKGTQGERI EC IILLGAPGAGKGTQAQFI	

Alignment of the amino acid sequences of the ribosomal protein L15, SecY, and Adk from *Micrococcus luteus* (ML), *Bacillus subtilis* (BS) and *E. coli* (EC). Boxed regions were considered to design the primers.

Fig. 1. Amino Acid Sequence of conserved regions in *spc* operon.

소프트웨어 DNASIS/PROSIS(Hitachi Softwear Engineering Co., Ltd)와 GeneBank의 자료를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

S. coelicolor(Müller)의 chromosomal DNA를 이용한 PCR

*S. coelicolor*로 부터 분리한 chromosomal DNA로 부터 *secY* 유전자를 cloning하기 위해 제작한 PCR primer 네가지(L15, SP1, SP2, Adk primer)를 조합하여 PCR을 수행하여 그 중 Fig. 2와 같은 두개의 증폭 단편을 얻었다. 두 개의 증폭 단편은 L15와 Adk primer를 사용하였을 때 예상되던 크기인 약 1.9 kb



Fig. 2. PCR products of *S. coelicolor* genomic DNA with four primers.

Lane 1: size marker (λ -DNA digested with *BstEII*)

Lane 2: PCR product with L15 and Adk primer

Lane 3: PCR product with L15 and SP2 primer

(pLA1.9)와 L15와 SP2 primer를 사용하였을 때 예상되던 크기인 약 1.1 kb(pLS1.1)의 증폭단편으로 실험전 design한 바대로 정확하게 얻었으며 이는 우리가 cloning 하고자 하는 *secY* 유전자를 포함하고 있을 것으로 예상되어 염기서열 분석을 위해 pGEM-T vector에 subcloning하였다.

secY 유전자의 염기서열 분석

제한효소 지도를 작성하여 평균 700~800 bp 정도로 작은 단편을 얻어 pBluescript II SK(+) vector에 subcloning하여 염기서열을 결정하였다(Fig. 3). 결정된 염기서열을 DNASIS로 분석하여 단백질을 암호화하는 영역을 탐색하여 하나의 완전한 ORF의 존재를 확인하였다. 이 ORF는 GTG 번역시작 코돈으로부터 -10 위치에 AGGA와 -35 위치에 TTGACG 염기서열이 존재하는데 이는 *Streptomyces erythraeus*의 내성유전자인 *ermE* promoter 지역의 염기서열인 GAGGAT/TTGACG와 유사한 것으로 이 지역이 *secY* 유전자의 promoter 지역이라 여겨지며 ORF로부터 -10 region 부근에 ribosomal binding site인 GG-AGG 염기서열이 위치하고 있었다(26). *secY* 유전자는 GTG 개시코돈으로부터 TGA 종결코돈까지 1314 bp이며 438개의 아미노산으로 이루어져 있고 GC 함량은 70% 이상으로 방선균의 전형적인 모습을 나타내고 있었다(Fig. 4). DNASIS를 이용한 분석은 예상 하였던 것처럼 GC content가 유사한 *M. luteus*와의 염기서열 비교에서도 58%의 높은 유사성을 보였고, GC 함량이 45%로 낮은 *B. subtilis*와는 40% 정도의 유사성을 보인 반면 아미노산서열의 비교에서는 38.7%로 높은 보존성을 나타냄으로서 방선균의 편중된 코돈 사용을 확인할 수 있었다. 즉 방선균은 평균 GC가 70% 이상이면서도 아미노산 지정에 거의 영향을 주지 못하는 코돈의 세번째 염기에는 90%, 아미노산 지정에 결정적인 역할을 하는 두번째 염기에는 50% 정도의 G나 C를 포함함으로써 합성되는 세포내 단백질의 아미노

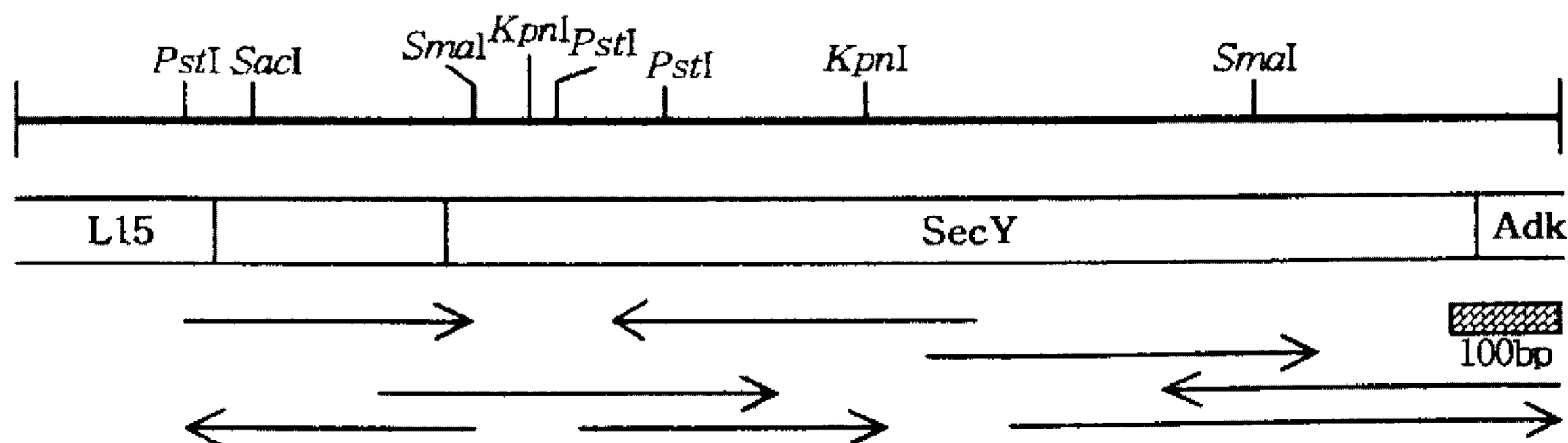


Fig. 3. Restriction map of cloned region from *S. coelicolor*.

The arrows indicate the direction of sequence analysis.

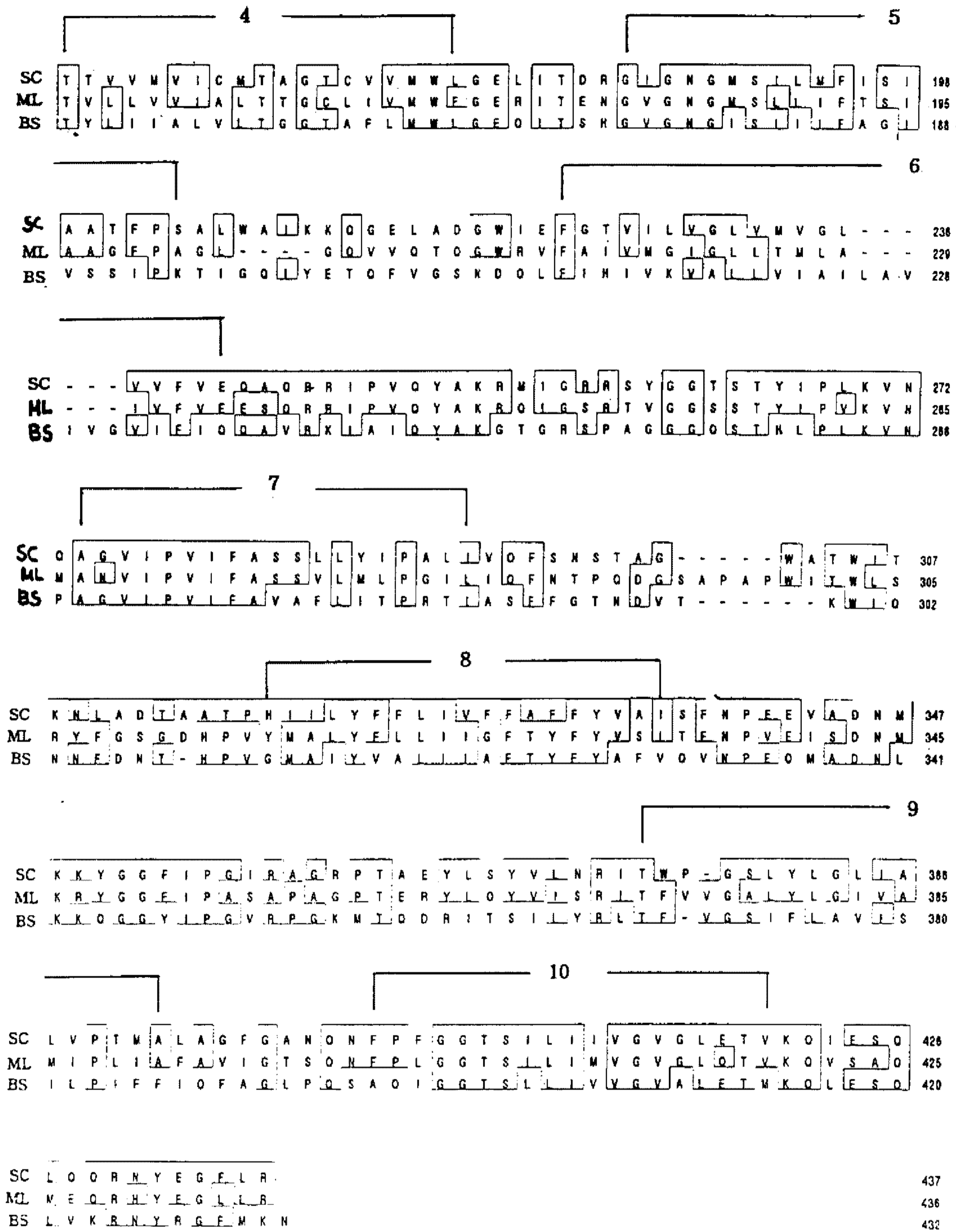


Fig. 5. Continued

산의 편중성을 줄이고 있다(27). 그러므로 *B. subtilis* *secY*와 *S. coelicolor* *secY* 사이에 염기서열상의 보존성은 40% 정도이지만 아미노산 서열상으로는 38.7%라는 비교적 높은 동질성을 나타내는 것이다(Fig. 5, 6).

***S. coelicolor* SecY의 Hydrophobicity Analysis**
 그람음성세균인 *E. coli* 그리고 그람양성균인 *B.*

*subtilis*와 *M. luteus* SecY 단백질은 모두 NH₂- 및 COOH- 말단들이 세포질로 향하고 그 가운데 부분이 세포막을 10번 통과하여 결국 cytoplasm 바깥쪽으로 나온 부분이 다섯 domain, 세포질쪽으로 향한 부분이 여섯 domain인 막단백질로 알려져 있다.

본 실험에서 분리한 유전자가 *secY* 유전자임을 다시 확인하기 위해 아미노산 서열을 이용하여 hydrophobicity를 분석하였다. 아미노산 서열의 분석 결과 *S.*

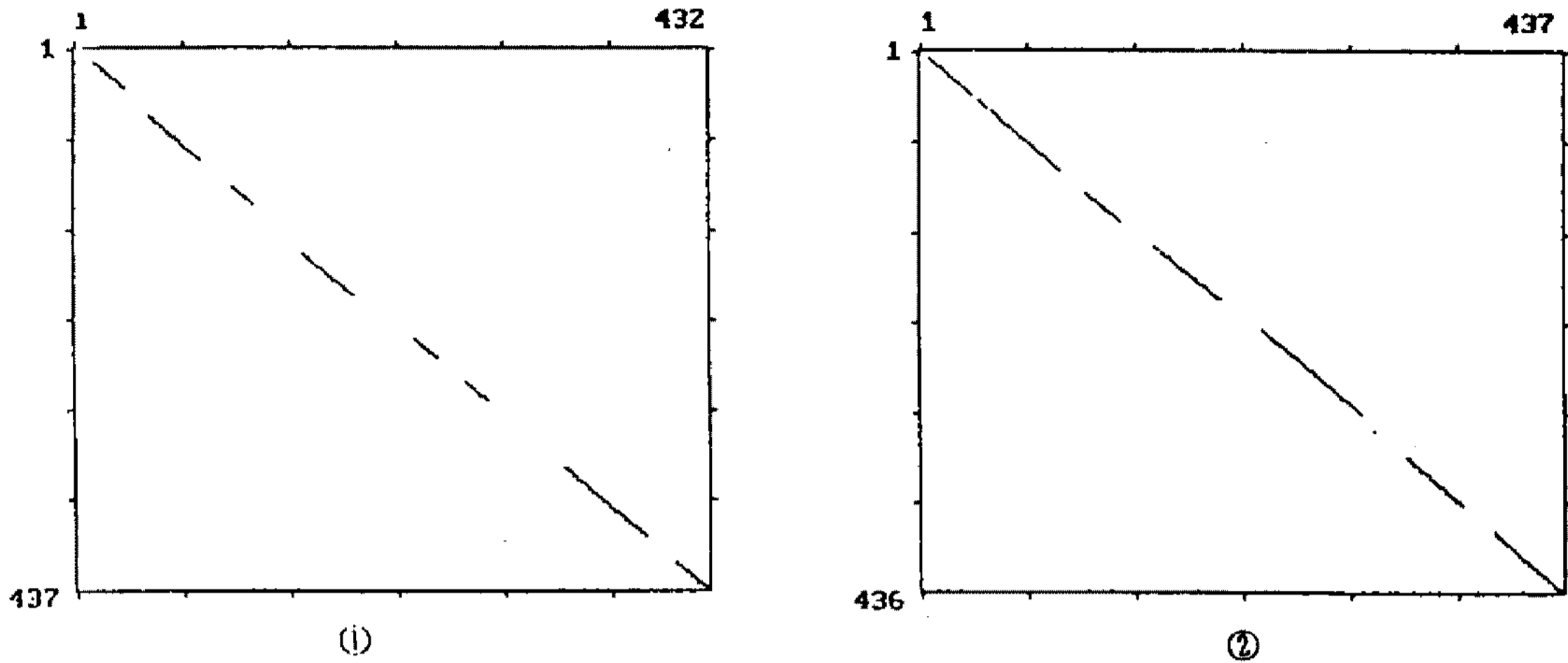


Fig. 6. Homology plot of the predicted SecY protein. (window size, a stringency)
 ① *S. coelicolor* versus *B. subtilis* (20, 14), ② *M. luteus* versus *S. coelicolor* (20, 14)

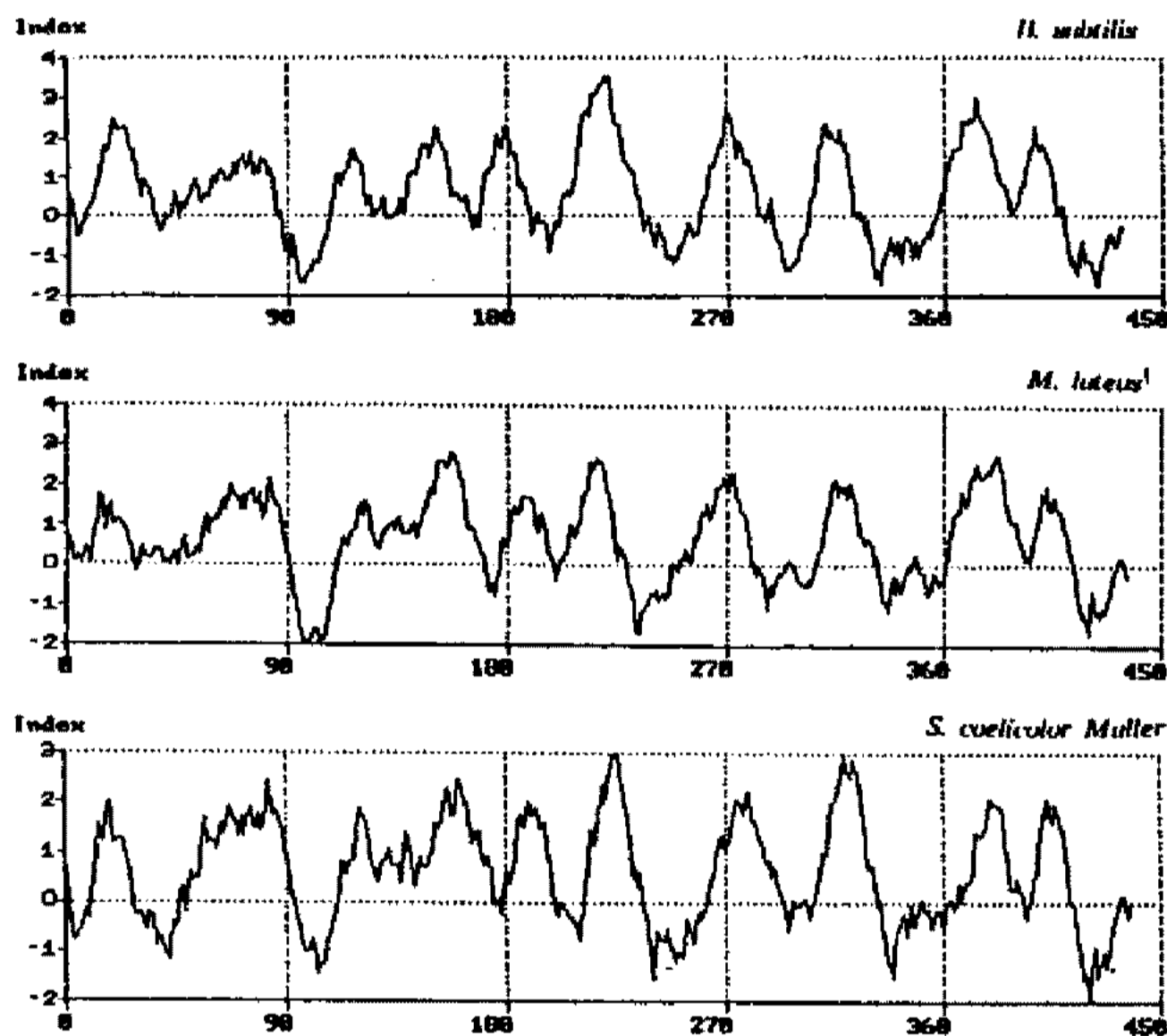


Fig. 7. Comparison of the hydrophobic profile of *B. subtilis*, *M. luteus* and *S. coelicolor* SecY protein. Kyte-Doolittle plots using window of 14 showed strikingly similar hydrophobic profiles of *B. subtilis*, *M. luteus*, and *S. coelicolor* SecY, each containing 10 potential membrane-spanning segments.

coelicolor SecY 단백질의 분자량은 47.41 kD이고 Fig. 7에서와 같이 그람양성균인 *B. subtilis* 및 *M. luteus*와 매우 유사한 양상으로 열 개의 hydrophobic 지역을 갖고 있으므로 *S. coelicolor*의 SecY 단백질 역시 세포막을 열번 통과하는 transmembrane protein임을 알 수 있었으며 *M. luteus*와는 열 개의 membrane-spanning segment 중에서도 두번째, 다섯번째, 열번째 지역이 특히 잘 보존되어 있어 단백질 분비에 중요한 역할을 하는 지역이라 예상 할 수 있었다(Fig. 8).

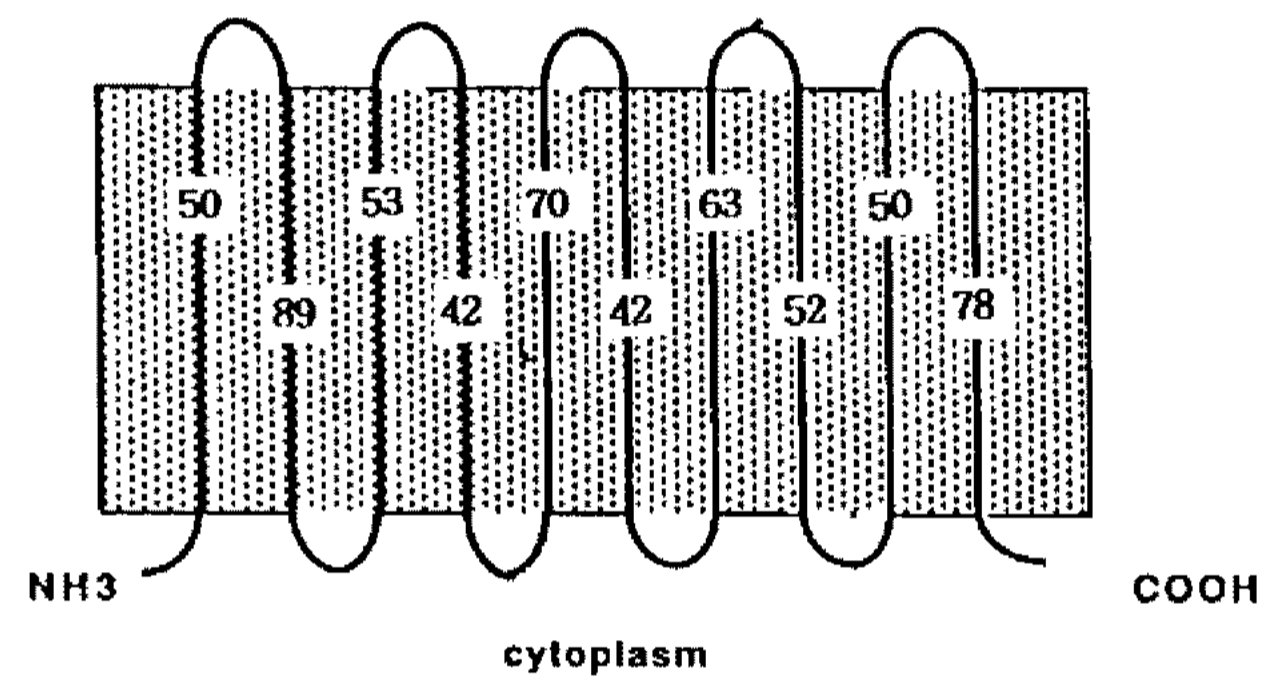


Fig. 8. *S. coelicolor* and *M. luteus* SecY cytoplasmic region and membrane-spanning segments are highly conserved.

Transmembrane segments are represented by hatched box. We show configuration of SecY, with 10 transmembrane segments, five regions outside of the cytoplasmic membrane, and six cytoplasmic regions, which include the NH₂- and COOH- terminal regions. The value given for each region indicate the percentage of amino acid identity shared with the corresponding region predicated from *S. coelicolor*.

E. coli, *B. subtilis*, *M. luteus*, 그리고 *S. coelicolor* secY 유전자의 genetic organization의 비교 결과 그람음성균인 *E. coli*의 경우 L15-secY- α operon(RNA polymerase α subunit를 포함하는 ribosomal proteins operon)으로 되어 있었고 그람양성균인 *B. subtilis*, *M. luteus*, 그리고 *S. coelicolor*는 L15-secY-*adh* operon- α operon으로 구성되어 있었다. 이 중 같은 genetic organization을 갖는 그람양성균에서도 *B. subtilis*는 L15와 translationally coupling될 수 있는 구조를 이루고 있었고 실제로 *spc* operon 내에 존재하는 ribosomal protein들은 서로 30 bp 내외의 사이를 두고 있었으나 L15와 SecY의 경우에는 1bp의 간격을 두고 있었고 *adh* 유전자와는 75bp로 다소

Genetic organization의 비교분석

떨어져 있었으며 또한 *B. subtilis*의 *secY*는 본 실험실에서 *secY* 유전자 앞에 세포 성장기 중 지수기에 접어들면서 발현되는 minor promoter들을 발견한 바 있으나 전체적으로는 *E. coli*와 유사하게 *spc* operon 내에 존재하는 것으로 보인다. 그러나 Ohama, T. 등 (15)은 *M. luteus*의 *secY*인 경우에는 L15와 162 bp, *adk* 유전자와는 52 bp의 간격으로 *secY* 앞에는 자체의 promoter를 포함하고 있으며 *adk* 유전자에는 아직까지 밝혀진 적절한 ribosomal binding site가 존재하지 않으므로 오히려 *adk* operon에 속하는 것으로 보고 하였다(15). 같은 그람양성균이면서 비슷한 GC content를 갖는 *S. coelicolor*는 *M. luteus*와는 또 다르게 L15와는 257 bp의 큰 간격을 두고 있으면서 *adk* 유전자와는 *secY* 유전자의 종결코돈이 *adk* 유전자의 개시코돈과 염기 하나를 공유하며 translationally coupling된 구조를 갖고 있어 *S. coelicolor* *secY*는 좀더 분명하게 *spc* operon이 아닌 *adk* operon 내에 속하는 것으로 보여진다.

이러한 분석을 정리하면 그람음성세균인 *E. coli*의 *secY* 유전자는 *spc* operon 내에 존재하며 *secY* 하위 지역에 *adk* operon이 아닌 α -operon이 위치하고 있고 그람양성세균중 *B. subtilis*인 경우 이 *secY* 유전자가 *spc* operon 내에 존재하지만 자체의 minor promoter를 가지고 하위지역에 *adk* 유전자가 위치하고 있다. 그러나 *M. luteus*와 *S. coelicolor*인 경우에는 L15-*secY*-*adk*로 순서면에는 *B. subtilis*와 동일하지만 *secY* 유전자가 자체의 promoter 지역을 가지고 *spc* operon과는 떨어져 오히려 *adk* operon과 가깝게 위치하고 있었으며 본 실험결과에서는 *S. coelicolor*인 경우에는 *adk* 유전자와 하나의 염기를 공유하며 translationally coupling된 구조를 이루고 있는 것으로 보아 좀더 확실히 *secY* 유전자가 *spc* operon 내에 포함되는 것이 아니라 오히려 *adk* operon에 포함되는 것으로 볼 수 있다. 이와 같은 *secY* 유전자 주변의 유전적 구조는 리보솜 구성요소로서 필수적인 단백질들과 단백질 분비 그리고 에너지 저장요소로서 ATP 형성 단백질 등 세포의 필수적 구성성분들로 오랜 세월동안 형태적, 생리적으로 달라져 온 균들의 분류적 구분으로도 중요한 의미를 내포하고 있다고 할 수 있다.

요 약

단백질 분비기작에서 translocator의 역할을 하는 것으로 알려진 *secY* 유전자는 *E. coli*에서는 어느 정도의 연구가 이루어지고 있지만 산업적으로 유용한

그람양성 균주에서의 *secY* 유전자에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 그러므로 현재 사용되는 항생제의 60% 정도를 생산하며 자연적인 단백질 분비체계를 갖고 있는 *S. coelicolor*에서의 *secY* 유전자의 분리는 유용 이중단백질 생산균주로서 *Streptomyces*를 이용하고자 하는 연구에 기폭제가 될 수 있을 것이다.

지금까지 분리된 *secY* 유전자 중 *E. coli* *secY*를 제외한 모든 *secY* 유전자는 모두 spectinomycin(*spc*)-operon 내의 L15과 *adk* 유전자 사이에 존재하며 높은 상동성을 보이고 있으므로 우리는 이 지역에서 4개의 primer를 제작하여 PCR 실험을 수행하였고 PCR 산물의 염기서열 결정 결과 아미노산 서열상에서 *B. subtilis*와 37.8%, *M. luteus*와 56% 정도의 동질성을 보였으며 *secY* 유전자의 양 옆으로 *spc*-operon 내의 *rplO*(ribosomal protein인 L15 유전자)와 *adk*-operon의 *adk* 유전자와 상동성을 보이는 지역을 확인할 수 있어 *S. coelicolor*로 부터 *secY* 유전자를 cloning 하였음을 알 수 있었다. 또한 hydrophobicity analysis 결과 매우 유사한 양상이 나타나는 것으로 보아 *S. coelicolor* *secY* 유전자 역시 *E. coli*, *B. subtilis*, *M. luteus*와 같은 topology를 갖는 단백질임을 알 수 있었다.

그러나 *S. coelicolor*의 *secY* 유전자는 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 L15와 translationally coupling 되어 있는 것과는 대조적으로 자신의 promoter 지역을 가지고 있고 오히려 *adk* 유전자와 translationally coupling된 구조를 이루고 있는 것으로 보아 *adk* operon에 포함되어 존재하고 있다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 1994년도 교육부 기초과학육성 연구비(BSRI-94-4419)의 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Chater, K.F. 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In "Microbial Development". Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York. pp. 89-115.
2. Sonenshein, A.L., Hoch, J.M. and Losick, R. 1993. *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria. American Society for Microbiology. 83-99.
3. Chater, K.F. 1989. Sporulation in *Streptomyces*. In "Regulation of prokaryotic development", American Society for Microbiology, Washington

- D.C. pp. 277-299.
4. Kluepfel, D., Shareck, F., Senior, D.J., Bernier, R.L. and Morosoli, R. 1993. Homologous Gene Expression and Secretion of Hemicellulase by *Streptomyces lividans* and Their Potential Use in Bleaching of Paper Pulps. *Industrial Microorganism*. pp. 137-142.
 5. Babcock, M.J. and Hale, V.A. 1993. Expression and Secretion of a *Streptomyces scabies* Esterase. *Industrial Microorganism*. pp. 127-135.
 6. Saier, M.H., P.J. Werner, and M. Muller. 1989. Insertion of proteins into bacteria membranes: Mechanism, characterization, and comparison with the eukaryotic process. *Microbiol. Rev.* **53**: 333-366.
 7. Shultz, J., Silhavy, T.J., Berman, M.J., Fill, N. and Emr, S.D. 1982. A previously unidentified gene in the *spc* operon of *Escherichia coli* K12 specifies a component of the protein export machinery. *Cell* **31**: 227-235.
 8. Bieker, K.L. and Silhavy, T.J. 1989. PrlA is important for the translocation of exported of protein across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 968-972.
 9. Cerretti, D.P., D. Dean, G.R. Davis, M. Bedwell and N. Nomura. 1983 The *spc* ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: Sequence and cotranscription of the ribosomal protein genes and a protein export gene. *Nucl. Acids. Res.* **9**: 2599-2615.
 10. Suh, J.-W., Boylan, S.A., Thomas, S.M., Dolan, K.M., Oliver, D.B. and Price, C.W. 1990. Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: Evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Molecular Microbiol.* **4**(2): 305-314.
 11. Suh, J.-W., Boylan, S.A., Oh, S.H. and Price, C.W. 1995. Genetic and transcriptional organization of the *Bacillus subtilis* *spc- α* region. *Gene*, in press.
 12. Kim, S.S., S.O. Kim, and J.-W. Suh. unpublished data.
 13. Gorlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, I.U. and Rapoport, T.A. 1992. A Mammalian Homolog of SEC61p and SECYp Is Associated with Ribosomes and Nascent Polypeptides during Translation. *Cell.* **71**: 489-503.
 14. Gu, L., Remacha, M., Wenman, W.M. and Kaul, R. 1994. Cloning and characterization of a *secY* homolog from *Chlamydia trachomatis*. *Molecular General Genetics* **243**: 482-487.
 15. Ohama, T., Muto, A. and Osawa, S. 1989. Spectinomycin Operon of *Micrococcus luteus*: Evolutionary Implications of Organization and Novel Codon Usage. *J. Mol. Evol.* **29**: 381-395.
 16. Auer, J., Spicker, G. and Bock, A. 1991. Presence of a gene in the archaeobacterium *Methanococcus vanielii* homologous to *secY* of eubacteria. *Biochemie.* **73**: 683-688.
 17. Koivuta, T., Palva, I. and Hemilase, H. 1991. Nucleotide sequence of the *secY* gene from *Lactococcus lactis* and identification of conserved regions by comparison of four SecY proteins. *FEMS Let.* **288**: 114-118.
 18. Shiba, K., Ito, K. and Yura, T. 1984. Mutation that suppresses the protein export defect of the *secY* mutation and causes cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **160**: 696-701.
 19. Akiyama, Y. and Ito, K. 1987. Topology analysis of the Sec Y protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6**: 3465-3470.
 20. Shiba, K., Ito, K., Yura, T. and Cerretti, D.P. 1984. A defined mutation in the protein operon of *Escherichia coli*: Isolation and characterization of a new temperature-sensitive *secY* mutant. *EMBO J.* **3**: 631-635.
 21. Saier, M.H., Werner, P.J. and Muller, M. 1989. Insertion of proteins into bacteria membranes: Mechanism, characterization, and comparisons with the eukaryotic process. *Microbiol. Rev.* **53**: 333-366.
 22. Taura, T., Akiyama, Y. and Ito, K. 1994. Genetic analysis of SecY: additional export-defective mutations and factors affecting their phenotype. *Molecular General Genetics* **243**: 261-269.
 23. Hoopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M. and Schrempf, H. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces* a Laboratory Manual. The John Innes Foundation.
 24. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 25. Gerhardt, P., Murry, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. 1994. *Method for General and Molecular Bacteriology*. pp. 418-435.
 26. Bibb, M.J., Jessen, G.R. and Ward, J.M. 1986. Cloning and analysis of the promoter region of the erythromycin resistance gene (*ermE*) of *Streptomyces erythraeus*. *Gene.* **41**: E357-E368.
 27. Bibb, M.J., Findlay, P.R. and Johnson, M.W. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene.* **30**: 157-166.

(Received 5 August 1995)