

## Streptomyces lividans TK24에서 secY homolog의 클로닝과 분석

김순옥 · 서주원\*  
명지대학교 생명과학과

**Molecular Cloning and Characterization of the secY Homolog from Streptomyces lividans TK24.**  
**Kim, Soon-Ok and Joo-Won Suh\***. Department of Biological Science, Myong Ji University, Yongin 449-728, Korea - The secY gene of Streptomyces lividans TK24 was cloned by the PCR method with synthetic oligonucleotide primers designed on the basis of the conserved regions of L15-secY-adk operon from E. coli, B. subtilis, and M. luteus. The deduced amino acid sequences of the SecY are highly homologous to those of other known SecY. It has 46%, 43%, 57%, 44%, 42%, 56%, 90% similarity to Escherichia coli, Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Bacillus licheniformis, Staphylococcus carnosus, Brevibacterium flavum, Streptomyces scabies, respectively and almost the same with Streptomyces coelicolor. The gene organization of L15- SecY-Adk is also similar to those of other bacteria. SecY and Adk are very likely translationally coupled that is overlapping stop codon of SecY and start codon of Adk with one base pair, which is common structure among high GC content strains of gram positive bacteria.

**Key words:** Streptomyces lividans, secY, translocase, PCR

그람양성균인 Streptomyces lividans는 비병원성 토양세균으로 기저균사를 형성하여 영양생장을 하는 단계에서 세포주위의 영양원을 흡수하기 위해 protease, amylase, cellulase, lipase, nuclease 등과 같은 다양한 가수분해효소를 분비한다. 자연적으로 발달된 이러한 단백질 분비능력을 가진 Streptomyces는 유전공학적 기법을 이용하여 산업적으로 유용한 이종의 단백질이나 효소들의 대량생산을 위한 이용으로 관심의 대상이 되고있으나 그 근간이 되는 세포의 단백질 분비기작이나 분비기구에 대한 연구가 거의 전무한 상태이다.

단백질 분비현상에 대한 많은 mechanism은 원핵 및 진핵세포에서 서로 유사하며 그 유전자도 잘 보존되어 있다. 세포질 바깥부위에서 작용하는 분비단백질은 구조적, 기능적으로 유사한 소수성의 아미노말단 즉 presequence를 구조단백질 외 여분으로 가지면서 합성된다. 이러한 presequence 구조를 가지는 분비단백질이 소수성 세포막을 통과하는 기작에 대한 연구가 박테리아의 간단한 구조적 특성과 발달한 유전자 조작기술의 도움으로 단백질 수송에 관련된 중요한 단백질과 그 유전자들이 밝혀지기 시작하였다.

지금까지 원핵세포의 단백질 분비에 대한 연구는 주로 Escherichia coli를 중심으로하여 이루어져 왔으며 Bacillus subtilis[26], Bacillus licheniformis와 Staphylococcus carnosus[28], Micrococcus luteus[20], Thermus

aquaticus[16], Brevibacterium flavum[12], Streptomyces scabies[19]에서 secY 유전자가 클로닝되어 그 염기서열이 보고되어 있다. 대장균 세포에서 단백질이 세포막을 통과할 때 protein translocator의 역할을 하는 것으로 알려진 SecY의 유전자는 처음에는 prlA 유전자로 알려졌으나 이 둘은 같은 유전자로 정상세포에서는 signal sequence에 돌연변이가 생겨 분비되지 못하는 LamB 단백질을 분비 시켜 줄 수 있는 suppressor mutant를 얻음으로 해서 알려졌다[7, 8, 25]. E. coli의 SecY는 49 kDa에 달하는 integral membrane protein으로 세포생장에 필수적이며 secY24 온도감수성 돌연변이는 그 제한조건에서 여러 분비단백질을 분비하지 못하고 그 전구체를 세포질내에 축적하는 것이 확인 되었으며[15, 24] 또한 LamB-LacZ hybrid protein을 이용한 실험에서 분비단백질은 SecY를 통로로 하여 세포막을 통과할 것이라는 보고로 인하여 SecY가 단백질 분비 기구의 중요한 translocator로 인정되었다[3].

E. coli에서 SecY의 세포막내 topology는 SecY의 아미노산 염기서열에 관한 hydrophobic profile, protease에 의한 감응도, SecY-PhoA (alkaline phosphatase) fusion 단백질 분석 등에 의해 아미노 말단과 카르복실 말단이 세포질로 향하고 그 가운데 부분이 세포막을 열번 통과하는 10개의 membrane spanning segment로 이루어져 있다는 것이 밝혀졌다[1].

한편 secY 유전자외에도 단백질분비에 관여하는 다른 유전자도 밝혀지기 시작했다. 즉 secY 유전자의 연구와 함께 온도 감수성 돌연변이인 secY24에서 나타난 단백질

\*Corresponding author  
Tel. 82-335-30-6190, Fax. 82-335-36-0870  
E-mail: jwsuh@wh.myongji.ac.kr

분비 기능 장애는 세포질 단백질인 SecA를 과량으로 넣어줌으로써 suppression된다는 것이 *E. coli*의 세포막으로부터 만든 inverted vesicles를 이용한 실험에서 밝혀져 SecA가 SecY와 직접적으로 관련한다는 것이 알려졌다. SecA는 각 domain이 세포질, 세포막, periplasm에 노출되어 있는 단백질로 존재하며, 분비단백질 전구체와 SecB와의 복합체에 강하게 결합한다. SecA는 ATP를 가수분해하여 단백질 수송에 필요한 에너지를 제공하므로 translocation ATPase라 불리운다[4, 9]. SecB는 단백질 수송에 반드시 필수적이라고는 할 수 없으나, 단백질 전구체가 막을 통과하기 용이한 형태로 3차 구조를 유지시켜주는 즉 prepromature한 상태에서 folding이 일어나지 않게 하는 antifolding 효과를 가진다. 다시말해서 단백질들이 정확한 위치에 수송되어, 안정하게 자리잡기 이전에 잘못된 형태로 응집되거나 다른 부위와 잘못 연결되는 것을 막아주는 역할을 한다고 믿어지며 자신 이외의 단백질들의 folding 및 assembly를 도와주는 chaperone 단백질로 간주된다[5, 29].

단백질 분비기구에 대한 가장 핵심적인 단백질은 SecY/E 두 단백질이다. 이 두 단백질은 그 기능이 현재까지 아직 밝혀지지 않은 또 하나의 단백질인 SecG과 함께 복합체로서 막에 존재하며[6] *secY/E*, 이 두 유전자에 변이가 있는 돌연변이체는 단백질 분비에 심각한 결손이 나타난다는 보고가 있다. SecY는 소수성의 세포막을 10개의 membrane spanning segments가 막을 통과하면서 걸쳐져 있고 SecE는 이보다 훨씬 작은 단백질로 3개의 membrane spanning segments를 가지는 구조로 되어있다[10, 22]. SecA와 아직 다 완성되지 않은 단백질로 이루어진 복합체가 SecY/E에 결합되므로써 막에 대한 투과가 일어나므로 SecA, SecY/E를 합하여 preprotein translocase라 정의 할 수 있다. SecY/E 복합체가 leader peptide에 직접 결합하는 것은 돌연변이를 이용한 유전학적 방법으로 입증되었으며, 그 후 translocation process에서의 SecD, SecF의 역할도 연구되었다[11, 21].

상기의 단백질들이 cascade로 binding한다는 것이 설명되고 있으며[13] 그 과정은 SecA가 SecB 단백질 전구체의 복합체를 인식하게 되고 SecB는 단백질의 구조를 안정화 시키고 SecB-단백질 전구체의 복합체가 SecA, SecY/E로 구성된 translocase라고도 할 수 있는 receptor에 결합하여 막에 안정하게 자리를 잡으면서 단백질의 수송이 일어난다. 이 중에서 SecY는 protein translocation에 중요한 역할을 한다. 이는 inner membrane을 단백질이 지날때 translocator와 같은 역할을 한다고 알려졌다.

또한 대표적인 그람양성 원핵세포인 *Bacillus subtilis*에서도 *E. coli*에서 단백질이 세포막을 통과할 때 protein translocator의 역할을 할 것이라고 알려진 SecY 단백질

유전자에 상응하는 *B. subtilis secY* 유전자가 클로닝되어 있으며 그 promoter에 대한 연구도 이미 보고되어 있다[26, 27]. *B. subtilis*의 *secY*는 *E. coli*의 *secY*와 상응하는 *spc* operon내에 위치하고 아미노산 서열도 *E. coli*와 보존적이라는 이와같은 유사성들은 그람 음성균과 그람 양성균에서 단백질 분비 기작이 비슷하다는 것을 시사해 주고 있다.

그러나 방선균은 *B. subtilis*와 같이 그람양성균으로 다양한 유용효소를 분비하고 또 많은 종류의 항생물질을 생산함으로써 배양과 발효에 대한 기술이 많이 축적되어 있고 이들의 산업적 생산에 대한 연구는 어느정도 수행되어져 왔으나 아직도 이들 효소의 세포의 분비기작에 대한 연구는 미미한 상태이나 본 연구자들에 의해 방선균 *S. lividans secE*와 *S. coelicolor secY* 유전자가 각각 분리, 보고되어 있다[17, 18].

따라서 방선균중 분자유전학적인 연구와 유용효소 생산의 숙주균으로 가장 많이 쓰이고 있는 *Streptomyces lividans*로부터 단백질 분비기구 구성요소 유전자중 protein translocator로 알려진 *secY* 유전자를 분리하여 보고된 여러 다른 균주의 *secY* 유전자와 비교분석하고 방선균의 분비기작 연구의 기반을 마련함과 동시에 유용단백질의 대량생산을 위한 방선균의 유전학적인 연구의 기반을 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmid

*secY* 유전자 cloning을 위한 방선균 균주로는 *Streptomyces lividans* TK24를 사용하였으며 plasmid transformation host와 DNA sequencing을 위한 M13 phage의 증식을 위해서는 *E. coli* DH5 $\alpha$ F'(supE44 $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15)hsdR17recA1endA1gyrA96thi-relA1)를 사용하였다. PCR product의 cloning을 위해 pGEM-T vector(Ap<sup>r</sup>, Promega)를 사용하였다.

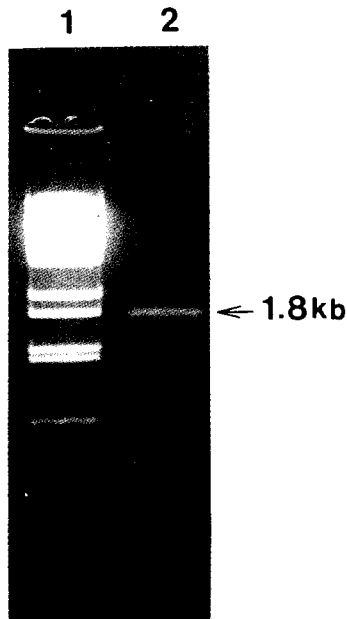
### 배지, 배양조건 및 DNA조작

방선균 배양을 위한 배지로는 YEME나 R2YE배지를 사용하여 30°C에서 2-3일간 배양하였으며 그 배지조성은 Hopwood방법[14]에 근거하였다.

방선균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood방법을 수정 사용하였으며 대장균에서의 plasmid 분리, 형질전환, DNA 재조합 등은 Sambrook 등[23]의 방법에 따라 수행하였다.

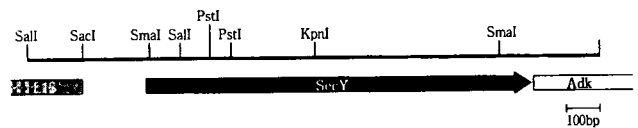
### Polymerase Chain Reaction(PCR)

*E. coli*, *B. subtilis*와 *M. luteus*의 *secY*가 함유되어 있는 *spc* operon 중 ribosomal protein L15 유전자와 *adk*



**Fig. 1. PCR product of *S. lividans* genomic DNA.** 1.8 kb DNA fragment was amplified with primer L15 and *adk*. Lane 1 is  $\lambda$ -BstEII as a size marker.

(adenylate kinase) operon의 *adk* 유전자 지역내 보존이 잘되어 있는 부분의 아미노산을 비교하여 primer합성을 위한 염기서열을 결정하였다. 제작된 PCR primer L 15는 5'-GGCTTCGAGGGTGGCCAGATGCCCTC-CAC-3'이며 *Adk* primer는 5'-CTGCGTTCCTTTC-CCGCACCAGGCGGCC-3'이다. PCR반응은 *S. lividans* chromosomal DNA 50 ng을 template로, primer를 각각 50 pmole, 0.25 mM dNTPs와 1 unit의 Taq polymerase(Kosco Co., Korea)를 사용해 94°C에서 1분간 denature한 후 53°C에서 1분간 annealing 72°C에서 5분간 30회 반복하여 증폭한 후 4°C에 저장 하였다.



**Fig. 2. Restriction endonuclease map of the 1.8kb cloned DNA fragment harbouring *secY* gene from *S. lividans* TK24.** Gene organization, L15-*secY*-*adk* operon, is similar to that of gram positive bacteria, *B. subtilis*, *M. luteus*, and *S. scabies*.

1	GT CGA CGC CGT CTC CGG CTC CGC CAA GGA GAA GAT CAC CGC	41	214	E L A D G W I E F G T V I L	227
42	CGC CGG TAC CCG TCA CCG AGC TCG TCT GAA CCA CTC GGA CGT	83	966	GAG CTG GCC GAC GGC TGG ATC GAG TTC GGC ACG GTC ATC CTC	1007
84	GTC GAT GAC ATG AGC GAT CCC GAC CGG GGA TGC CCC ACA AAA	125	228	V G L V M V G L V V F V E Q	241
126	GGG GTA TCC CCG GTT GGT CGT TCC AAG GGG AGT GCT CCC GCC	167	1008	GTC GGC CTG GTC ATG GTC GGC CTG GTG GTC TTC GTG GAG CAG	1049
168	GGT AAG GTG GCC TGC GCT GCC CTC TTT CAC GGG TGC GTC ACA	209	242	A Q R R I P V Q Y A K R M I	255
210	TGA GGC ACT CTT GAC GGC GGT TCA GCG TTA TTC CCT TAG CCG	251	1050	GCC GAC CGC CGC ATC CCC GTG CAG TAC GCG AAG CGC ATG ATC	1091
252	TCC ACT TAT CAG TCG TCA GTC GAA CCT CAA GAC CGT CAC CCI	293	256	G R R S Y G G T S T Y I P L	269
294	TGA CGC AGT AGC GCG GGG GTC GCA GGA GGC ACC GTG CTC ACC	335	1092	GGC CGC CGC TCC TAC GGC GGC ACC TCG ACG TAC ATC CCG CTC	1133
336	GCG TTC GCC CGG GCG TTC AAG ACG CCC GAC CTG CGC AAG AAG	377	270	K V N Q A G V I P V I F A S	283
378	L L F T L G I I V V Y R L G	419	1134	AAG GTG AAC CAG GCG GGT GTC ATC CCC GTC ATC TTC GCC TCG	1175
420	T H I P I P G V D Y K N V Q	455	284	S L G L Y I P A L I V Q F S N	297
462	GAG TGC GTG GAC CAG GCG TCC GGC AAC CAG GGC CTC TTC GGC	503	1176	TCG CTG CTC TAC ATC CCG GCA CTG ATC GTC CAG TTC TCG AAC	1217
504	L V N M F S G G A L L Q I T	545	298	S T A R G W A T W I T K N L A	311
546	V F A L G I M P Y I T A S I	587	1218	TCG ACG GCG GGC TGG GCC ACC TGG ATC ACG AAG AAT CTC GCG	1259
588	I L O L L T V V I P R L E A	629	312	D T A A T P H I C L Y F F T T C	325
630	L K K E G Q A G T A K I T Q	671	1260	GAC ACC CCG GCG ACG CCG CAC ATC ATC CTG TAC TTC TTC CTG	1301
672	Y T R Y L T V A L A I L Q G	713	326	I V F F A F F V V A I S F N	339
714	TAC ACC CGC TAC CTG ACC GTC GCG CTC GCC ATT CTC CAG GGC	755	1302	ATC GTC TTC TTC GCC TTC TTC TAC VTG GCC ATC CTC TCG AAC	1343
756	G C T V A G Q I V P D Q A I	797	340	P E E V A D N M K K Y G G F	353
798	F T T V V M V I C M T A G T	839	1344	CCC GAG GAA GTC GCG GAC AAC ATG AAG AAG TAT GGT GGC TTC	1385
840	C V V M W L G E L I T D R G	881	354	I P G G I R A G R P T A E Y L	367
882	I G N G M S I L M F I S I A	923	1386	ATC CCG GGC ATC CCG GCT GGC CGA CCG ACC GCT GAG TAT CTG	1427
924	A T T P S A L T W A I K K Q G	965	368	S V V L N R I T W P G S L Y	381
			1428	AGC TAC GTA CTC AAC CCG ATC ACC TGG CCG GGT TCG CTG TAC	1469
			382	L G L I A L V P T M A L A G	395
			1470	TTG GGT CTG ATC GCT CTC GTC CCG ACA ATG GCG TTG GCT GGT	1511
			396	F G A N Q N F P F G G T S I	409
			1512	TTC GGG GCA AAC CAG AAC TTC CCG TTC GGT GGC ACC AGC ATC	1553
			410	L I I V G V G L E T V K Q I	423
			1554	CTG ATC ATC GTG GGT GTC GGT CTC GAG ACG GTG AAG CAG ATC	1595
			424	E S Q L Q Q R N Y E G F L R	437
			1596	GAG AGC CAG CTC CAG CAG CCG AAT TAC GAA GGG TTC CTC CGC	1637
			438	TGA TGC GAA TCG TCC TCG TCG GGC CTC CGG GTG CCG GAA AGG	438
			1638	Adk start	1679
			1680	GAA CGC AGG CCA CCC GCC TTG CCG AGA CGC TGC ACA TTC CGC	1721
			1722	ACA TCT CCA CCG GCG ACC TGT TCC GCG CGA ACA TCA GCC AGC	1763
			1764	AGA CCG AAC TGG GCA AGC TCG CGA AGT CCT ACA TGG ACG CCG	1805
			1806	GCA ATC TCG TGC CGG ACG AGG TCA CCA TCG CCA TGG ACA GGA	1847
			1848	CCG CAT GGA GCA GCC CGA CGC CGA GGG CCT	1877

**Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of a 1.8kb DNA fragment from the *S. lividans* *secY* region.** Putative RBS(ribosomal binding site), -10 and -35 regions of promoter are indicated by underline. Stop codon which is sharing with start codon of *adk* is marked by an asterisk, that is transaltionally coupled structure. Different sequences with *S. coelicolor* is marked with rectangle and described in lower line.

Perkin Elmer Cetus 사의 Thermal cycler 480을 사용하여 PCR 하였다.

**염기서열 결정 및 분석**

PCR 산물의 염기서열 결정을 위해 먼저 1.8 kb PCR 산물을 PCR vector pGEM-T에 cloning한 후 양 말단을 sequencing하여 Blasta program으로 상동성을 확인한 다음 여러 가지 제한효소로 처리하여 제한효소지도 작성 후 M13 mp18, 19 phage vector에 subcloning하였다.

DNA sequencing은 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP와 *Bacillus caldoteanax* YT-G의 DNA polymerase를 사용하는 Takara di-deoxy sequencing kit를 사용하여 65°C에서 수행하였다. 염기서열 분석은 DNASIS와 PROSIS(Hitachi Software Engineering Co. Ltd), Genebank의 Blast program을 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

***S. lividans* TK24로부터 secY 유전자의 클로닝**

*S. lividans* genomic DNA로부터 *secY* 유전자를 클로닝 하기 위해 그람 음성균으로 대장균, 그람 양성균으로 *Bacillus subtilis*와 *Micrococcus luteus*의 *secY*가 함유되어 있는 *spc* operon 중 ribosomal protein L15 유전자와 *adk* operon 중 *adk* 유전자내 conserved된 지역을 primer로 제작하여 PCR 증폭후 약 1.8 kb 단편을 얻었다(Fig. 1). 이는 *secY*와 L15 하류말단과 *adk* 상류말단을 함유하는 크기이며 PCR vector pGEM-T에 클로닝 후 염기서열 분석을 위해 제한효소지도를 작성하였다(Fig. 2).

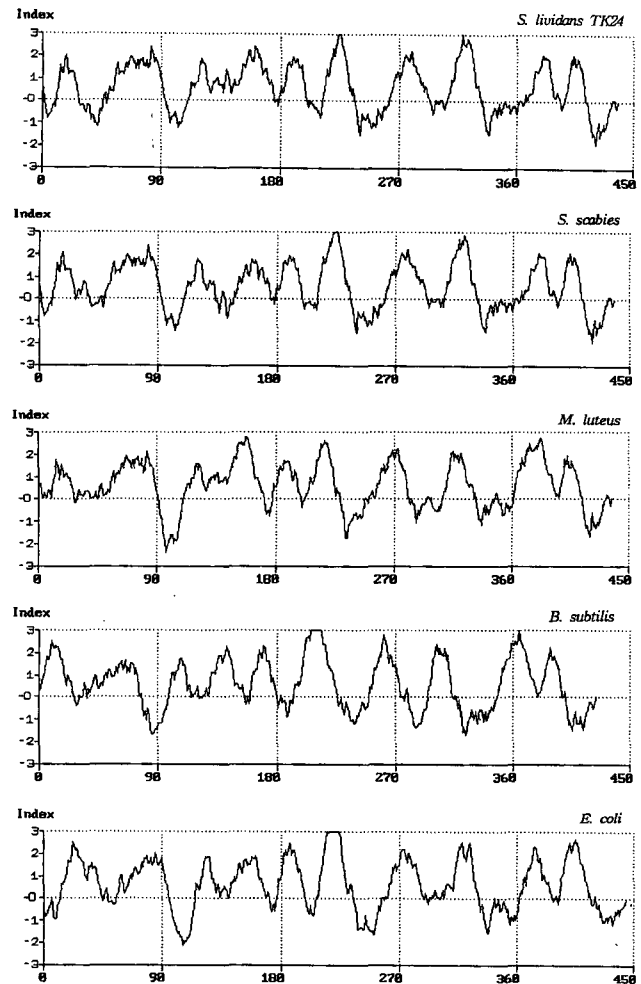
**secY 유전자의 염기서열 분석**

제한효소 지도 작성후 nucleotide sequencing용 vector M13mp18, 19에 각 단편을 클로닝하여 sequencing 한 후 Blast program으로 분석한 결과 보고된 다른 *secY* 유전자와 거의 유사한 ORF(open reading frame)가 나타났으며 양 말단도 primer를 디자인하여 예상한 대로 ribosomal protein L15를 coding 하는 *rplO* 유전자와 adenylate kinase를 coding 하는 *adk* 유전자의 일부가 각각 *secY* 유전자 상류와 하류부위에 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 *S. lividans*에서도 역시 다른 그람 양성 세균류와 동일한 L15-SecY-Adk 순의 유전자 구성을 가지는 것으로 나타났다.

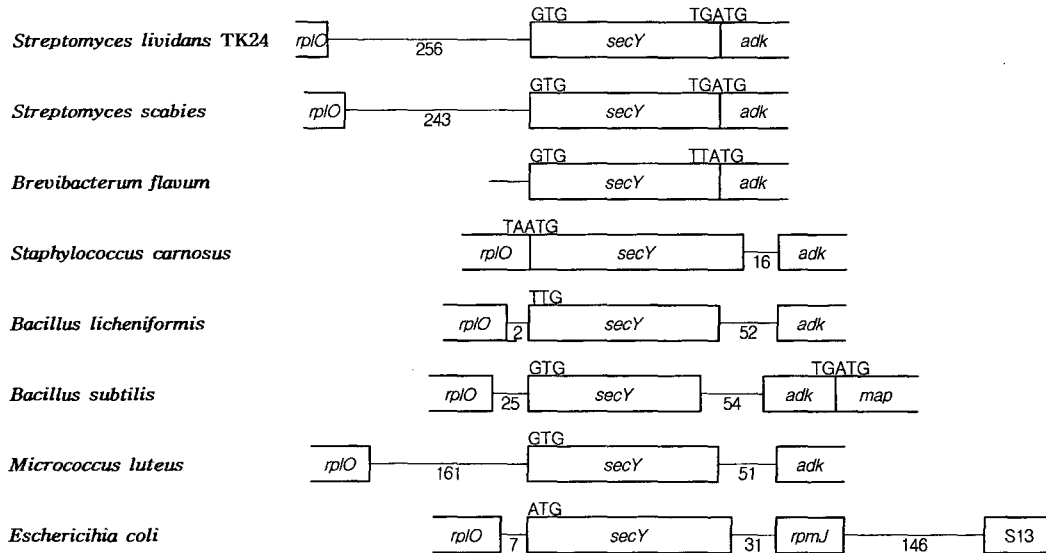
이는 방선균류에서 자주 보이는 GTG를 역시 개시코돈으로 하며 TGA 종결코돈까지 1314 bp이며 438개의 아미노산을 코딩하고 GC함량 역시 70%이상인 전형적인 방선균 염기조성을 가지고 있었다. Promoter 부위는 GTG 개시코돈으로부터 -10, -35 region 그리고 ribosomal binding site(RBS)가 -10위치와 거의 동일한

것으로 추정하였다(Fig. 3). 그러나 *B. subtilis* 경우 한 개의 minor promoter가 L15 유전자 앞에 위치하며 두 개의 minor promoter가 *secY* 유전자 앞에 존재하고 있다는 것이 밝혀져 있으므로 정확한 promoter의 위치, promoter의 최대 활성시기 등은 추후 promoter에 대한 실험이 수행되어야 할 것이다.

*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus carnosus*, *Brevibacterium flavum*, *Streptomyces scabies*의 SecY와 *S. lividans* TK24 *secY* 유전자의 deduced amino acid와의 상동성을 비교 해 본 결과 각각 46%, 43%, 57%, 44%, 42%, 56%, 90%의 유사성을 보이는 것으로 나타났다. 한편 *Streptomyces coelicolor*의 *secY*와 비교해본 결과 전체 ORF에서 오직 한 부분에서만 염기서열의 차이가 보였으나 아미노산에서는 변화가 보이지 않는 똑같은 단백질이



**Fig. 4. Comparison of the hydrophobicity profiles of the SecY proteins from the several eubacteria.** It is appeared that each SecY protein has similar and very well conserved 10 cytoplasmic membrane spanning segments. Kyte-Doolittle plots was used in Prosis program.



**Fig. 5. Genetic organization of the *secY* flanking regions in several eubacteria.**

The genetic organization of *S. lividans secY* coding sequence relative to upstream and downstream was compared with other prokaryotic organisms. Boxed ORFs are linked by line that indicate non-coding segments of DNA and numeral letter below the line indicates the number of base pair after the stop codon of one reading frame to the start codon of next reading frame. Translationally coupled structure which stop codon shares with the start codon have been found in the phylogenetically related organisms.

었다. 이는 *S. lividans*와 *S. coelicolor*가 같은 분류학적 군에서 분지된 것으로 두 균주에서 *secE* 유전자를 cloning 해 본 결과에서도 동일한 양상을 나타냈으며[18], 국제 방선균 genome project에서도 두 균주가 매우 유사한 염기서열을 가지는 것으로 보고[2]하고 있는 것으로 보아 분명한 *secY* 유전자임을 확인 할 수 있었다. 이와같이 단백질 분비에 관여하는 *sec* 유전자는 진정 세균류들 사이에서 상당히 보존적이라는 것을 알수 있었으며 이에 따라 그 단백질 분비기작도 유사하리라고 생각된다.

**SecY 단백질의 소수성 분석**

단백질 분비기구에 대한 연구가 가장 많이 수행되어온 *E. coli*에서 SecY 단백질이 10개의 소수성 membrane spanning segments를 가짐으로 세포막을 10번 통과하면서 막에 걸쳐져 있다는 것이 이미 보고되어 있다. 따라서 *S. lividans*의 *secY* 유전자의 아미노산 서열을 이용하여 막단백질 SecY의 소수성 분석을 해 본 결과(Fig. 4) *S. lividans*에서도 역시 다른 여러 균주에서와 같이 10개의 소수성 segments를 가지는 것으로 나타났으며 그 profile 역시 매우 유사한 모양을 하고 있으므로 이들이 세포질막에 걸쳐 존재하는 양상이 비슷하다는 것을 추론할 수 있었다.

**Genetic organization**

Nucleotide sequence data로 본 결과 *secY* 유전자는 L15 유전자(*rplO*)와 256 bp 떨어져 있으며 *adk* 유전자의 개시코돈과 *secY* 종결코돈이 엮기하나를 공유하는

translational coupling 구조를 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 아마 전사단계에서도 *secY*의 promoter를 이용하여 polycistronic mRNA로 *secY-adk*가 동시에 전사되는 것이 아닐까 추측된다. *secY* 유전자가 클로닝되어 있는 여러균주에서 이 유전자가 함유되어 있는 operon의 구조를 비교해 본 결과(Fig. 5) 코돈이 중복되는 translational coupling 구조는 *S. lividans*, *S. scabies*, *B. flavum*과 같은 GC 함량이 높은 그람 양성균에서 공통적으로 발견되었으며 GC함량이 높으나 분류학적으로 거리가 있는 *M. luteus*에서는 오히려 *Bacillus*와 유사한 유전자 구조를 갖고 있었다. 따라서 그람 음성세균인 *E. coli*를 제외한 그람양성 세균에서는 모두 *S. lividans*와 동일하게 coding region이 L15-SecY-Adk의 순으로 된 유전자 구조를 가지고 있었다. 이와같은 genetic organization에서 ribosome 구성요소와 단백질 분비작용의 구성의 요소, 그리고 ATP 합성에 관여하는 인자들은 다 함께 세포의 성장과 발육에 상호연관되어 발현되는 것으로 사료된다.

**요 약**

몇가지 그람양성 세균에서 *secY* 유전자가 함유된 operon의 구성이 *rplO*(L15)-*secY-adk*라는 결과를 토대로 L15와 *adk* 유전자일부를 primer로 제작하여 *Streptomyces lividans* TK24에서 *secY* 유전자가 함유된 1.8kb 단편을 PCR로 증폭하여 얻은 후 *secY* 유전자를 cloning하였다. 전 단편을 sequencing하여 추론한 아미

노산으로 상동성을 조사해 본 결과 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus carnosus*, *Brevibacterium flavum*, *Streptomyces scabies*의 SecY와 각각 46%, 43%, 57%, 44%, 42%, 56%, 90%의 유사성을 보이는 것으로 나타났으며 SecY의 소수성 profile 또한 서로 유사하고 10개의 membrane spanning segment를 동일하게 가지는 것으로 나타났다. 유전자 구조도 다른 그람양성균에서와 같이 L15-SecY-Adk 순이었으며 *secY* 유전자의 종결코돈과 *adk* 유전자의 개시코돈이 한 염기를 공유하는 상태의 translational coupling 구조를 하고 있었다. 이와같이 단백질분비에 관여하는 유전자와 ribosome 구성요소, 그리고 ATP 합성에 관여하는 요소는 세포성장에 상호 연관 작용이 있는 것으로 사료된다.

### 감사의 말

본 연구는 서울대학교 분자미생물연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다.

### 참고문헌

- Akiyama, Y. and K. Ito. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **6**: 3465–3470.
- Abstracts Book, Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes (ISBA). 1997. May 27–30, Beijing, China.
- Bieker, K. L. and T. J. Silhavy. 1989. PrlA is important for the translocation of exported protein across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*. **86**: 968–972.
- Cabelli, R. J., L. Chon, P. C. Tai, and D. B. Oliver. 1988. SecA protein is required for secretory protein translocation into *E. coli* membrane vesicles. *Cell* **55**: 683–692.
- Collier, D. N., V. A. Bankaitis, J. B. Weiss, and P. L. Bassford. 1988. The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose binding protein. *Cell* **23**: 79–88.
- Economou, A., J. A. Pogliano, J. Beckwith, D. B. Oliver, and W. Wickner. 1995. SecA membrane cycling at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* **83**: 1171–1181.
- Emr, S. D., S. Hanley-way, and T. J. Silhavy. 1981. Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* **23**: 79–88.
- Emr, S. D. and P. J. Bassford. 1982. Localization and processing of outer membrane and periplasmic proteins in *Escherichia coli* strains harbouring export-specific suppressor mutations. *J. Biol. Chem.* **257**: 5852–5860.
- Fandl, J. P., R. Cabelli, D. Oliver, and P. C. Tai. 1988. SecA suppresses the temperature sensitive SecY24 defect in protein translocation in *Escherichia coli* membrane vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **85**: 8953–8957.
- 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.
- Gardel, C., S. Benson, J. Hunt, S. Michaelis, and J. Beckwith. 1988. *secD*, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 1286–1290.
- Hale, V. A., I. O'Brien, and J. L. Schottel. 1995. Cloning and sequencing of a *secY* homolog from *Streptomyces scabies*. *Gene* **163**: 87–92.
- Hartl, F-U., S. Lecker, E. Schiebel, J. P. Hendrick, and W. Wickner. 1990. The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**: 269–279.
- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kiesser, C. J. Bruton, H. M. Kisser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrepf. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Ito, K., D. P. Cerretti, H. Nashimoto, and M. Nomura. 1984. Characterization of an amber mutation in the structural gene for ribosomal protein L15, which impairs expression of the protein export gene, *secY* in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **3**: 2319–2324.
- Jahn, O., R. K. Hartmann, and V. A. Erdmann. 1991. Analysis of the *spc* ribosomal protein operon of *Thermus aquaticus*. *Eur. J. Biochem.* **197**: 733–740.
- Kim, S. S., C. G. Hyun, Y. M. Kim, J. H. Lee, I. K. Chung, D. M. Kim, and J. W. Suh. 1995. Molecular cloning and sequence analysis of the gene for SecY from *Streptomyces coelicolor*(Muller). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 678–686.
- Kim, S. O. and J. W. Suh. 1997. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the *secE* gene from *Streptomyces lividans* TK24. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 253–257.
- Kobayashi, M., N. Fugono, Y. Asai, M. Inui, A. A. Vortes, Y. Kurusu, and H. Yukawa. 1994. Cloning and sequencing of the *secY* homolog from coryneform bacteria. *Gene* **139**: 99–103.
- 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.
- Pogliano, J. A. and J. Beckwith. 1994. SecD and SecF facilitate protein export in *Escherichia coli*. *EMBO. J.* **13**: 554–561.
- Pohlschroder, M., C. Murphy, and J. Beckwith. 1996. *In vivo* analyses of interaction between SecE and SecY, core components of the *Escherichia coli* protein translo-

- cation machinery. *J. Biol. Chem.* **271**: 19908–19914.
23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
24. Shiba, K., K. Ito, and T. Yura. 1984. Mutation that suppresses the protein export defect of the *secY* mutation and causes cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 696–701.
25. Shultz, J., T. J. Silhavy, M. J. Berman, N. Fill, and S. D. Emr. 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.
26. Suh, J. W., S. A. Boylan, S. M. Thomas, K. M. Dolan, D. B. Oliver, and C. W. Price. 1990. Isolation of a *secY* homologue from *Bacillus subtilis*: Evidence for a common protein export pathway in eubacteria. *Mol. Microbiol.* **4**: 305–314.
27. Suh, J. W., S. A. Boylan, S. H. Oh, and C. W. Price. 1996. Genetic and transcriptional organization of the *Bacillus subtilis* *spc-α* region. *Gene* **169**: 17–23.
28. Tschauder, S., A. J. M. Driessen, and R. Freudl. 1992. Cloning and molecular characterization of the *secY* genes from *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus carnosus*: Comparative analysis of nine members of the SecY family. *Mol. Gen. Genet.* **235**: 147–152.
29. Watanabe, M. and G. Blobel. 1989. Site-specific antibodies against the PrlA(SecY) protein of *Escherichia coli* inhibit protein export by interfering with plasma membrane binding of preproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci(USA)*. **86**: 1895–1899.

(Received January 19, 1998)