

## 해양 발광 박테리아 *Photobacterium* Species의 Riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들의 발현

이 찬 용

을지의과대학 의예과

발광 박테리아인 *Photobacterium* 종들의 *lux* 오페론 하부 영역에서 riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들(*ribI*, *II*, *III*, *IV*)이 발견되었다. *Photobacterium phosphoreum*의 *lux* 유전자와 *rib* 유전자를 포함하는 intergenic 영역의 단일사슬 DNA가 *P. phosphoreum*의 mRNA에 의하여 S1 nuclease digestion에서 손상받지 않았으며, *ribI*에 의하여 암호화되는 *P. phosphoreum*의 riboflavin synthase의 활성도가 *lux*-specific한 효소들인 luciferase 혹은 fatty acid reductase 활성도와 같이 bioluminescence intensity의 발현과 함께 대수기 말기에서 증가하는 박테리아 발광반응의 특이한 조절 체계인 'autoinduction' 양상을 보였다. 또한 *P. leiognathi*의 *luxB*로부터 *ribII*까지 포함하는 DNA를 강력한 *lux* 프로모터와 reporter(chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 유전자 사이에 삽입하고 접합(conjugation)의 방법으로 *P. leiognathi*에 유전자 전이(gene transfer)시켜 CAT reporter 유전자의 발현을 *P. leiognathi*에서 조사한 바, 그 유전자의 발현 정도에 큰 차이가 없었을 뿐만 아니라 이 구조에서 *lux* 프로모터를 제거하게 되면 CAT reporter 유전자의 발현이 전혀 나타나지 않았다. 이들 실험 결과들은 *lux* 유전자와 *rib* 유전자의 intergenic 영역에 *lux* 오페론의 전사 종결 구조(transcriptional terminator)가 존재하지 않으며 riboflavin 생합성 유전자들이 그들 고유 프로모터에 의하여 전사되는 것이 아니라 *lux* 오페론의 프로모터에 의하여 발현됨을 나타내는 것으로, 이는 *Photobacterium* 종들에서 *lux* 유전자와 *rib* 유전자들은 공동의 발현 조절 체계를 갖는 것으로 요약된다.

Key words □ bioluminescence, *lux*, *Photobacterium*, riboflavin

### 서 론

생물발광(bioluminescence)이라 함은 생명체내에서 효소가 매개하는 발열 화학 반응(exergonic chemical reaction)을 통하여 빛을 내는 것을 일컬으며(7, 8), 박테리아에서부터 곰팡이, 조류(algae), 곤충, 어류 등에 이르기까지 다양한 종의 발광생물체가 발견된다(8). 이들 중 발광 박테리아(bioluminescent bacteria)는 대부분 해양 박테리아이며 크게 *Vibrio*와 *Photobacterium* 속으로 구분된다(6,8). 발광 박테리아에서 빛을 내는 반응은 FMNH<sub>2</sub>(reduced flavin mononucleotide)와 긴사슬의 지방산-알데히드(long chain fatty-aldehyde)가 산소 분자(O<sub>2</sub>)에 의하여 산화됨으로써 청록색의 빛을 띠게 되는데(6,14), 이 반응은 혼합된 기능의 산화효소(mixed function oxidase)인 bacterial luciferase에 의하여 촉매되며 그 반응의 한 기질(substrate)인 긴 사슬의 지방산-알데히드는 발광 박테리아에 특유한 지방산-환원 효소 복합체(fatty acid reductase complex)에 의하여 합성된다(14). 발광 박테리아에서 빛을 내는 반응에 관여하는 효소들을 암호화하는 유전자들(*lux* genes)은 한 유전자군(operon)에 존재하는데, *lux* 오페론은 luciferase의  $\alpha, \beta$  subunits을 암호화하는 *luxAB* 유전자와 지방산-환원 효소 복합체의 reductase, transferase,

synthetase subunits을 암호화하는 *luxCDE* 유전자들로 구성된다(15). *Photobacterium phosphoreum*의 *lux* 오페론에서는 부가적으로 luciferase의  $\beta$  subunit과 낮은 아미노산 상동성이 있는 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 *luxF* 유전자가 발견되며(13), 모든 해양 발광 박테리아에서 *luxE* 유전자 하부영역에 *luxG* 유전자가 존재하는데 이것은 flavin 기질의 재생산에 관여하는 flavin reductase를 암호화하는 것으로 알려져 있다(1).

또한 *Photobacterium* 종들의 *lux* 오페론에 인접한 chromosome 상에서 riboflavin 생합성에 관여할 것으로 생각되는 여러 유전자들이 저자의 연구(11,12)에 의하여 발견되어 그 유전자들의 염기서열과 그것들이 암호화하는 단백질들의 기능들이 부분적으로 밝혀졌다. Vitamin B<sub>2</sub>로 널리 알려진 riboflavin은 이것의 생리적으로 활성화된 형태인 FMN(flavin mononucleotide)와 FAD(flavin adenine dinucleotide)는 조효소로서, 호흡에 관여하는 여러가지 flavo-protein 등 대사작용에서 많은 부분을 차지하는 산화-환원 반응에서 electron carrier의 역할(4,19)을 하게 되는 생화학적, 생리학적 중요성에도 불구하고 아직 riboflavin의 생합성 경로가 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다. 해양 박테리아에서의 발광반응은 지방산-알데히드 뿐만 아니라 또 다른 기질로서 FMNH<sub>2</sub>의 산화(6,14)가 관여됨에도, 이제까지 이 반응의 지방산-알데히드 기질에 대한 효소학적 혹은 분자생물학적인 많은 연구가 성공적으로 이루어져 왔으나(14,15) flavin 기질에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않은 실정이다.

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel: 042-259-1698, Fax: 042-259-1047  
E-mail: cylee@emc.eulji.ac.kr

Riboflavin은 FMN(riboflavin 5'-phosphate)의 전구체(precursor)이므로 riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들의 발현을 연구하는 것은 박테리아 발광반응을 위한 flavin 기질의 제공과 대사 과정의 조절에 관한 주요한 정보를 줄 수 있을 것으로 사료되어, *Photobacterium* 종들의 *lux* 유전자들과 인접한 riboflavin 유전자들의 발현 양상을 S1 nuclease protection assay, riboflavin synthase 활성도의 측정, CAT(chloramphenicol acetyl transferase) assay의 방법 등으로 조사하였다.

## 재료 및 실험방법

### 재료

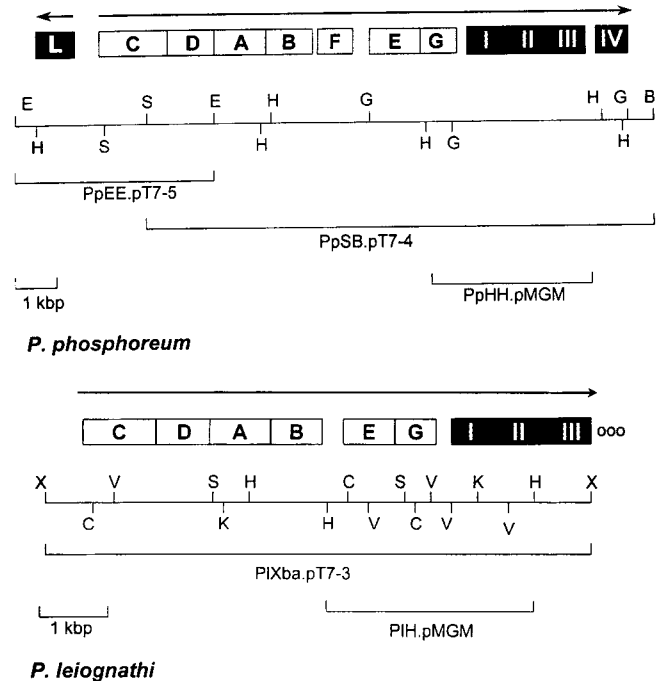
제한효소, T4 DNA ligase, [<sup>14</sup>C]-chloramphenicol(57 mCi/mmol) 등은 Amersham-Pharmacia biotech(Uppsala, 스웨덴), riboflavin, ampicillin, rifampicin 등은 Sigma Chemical Company(St. Louis, 미국)로 부터 구입하였고, 유기화학적으로 합성된 lumazine(6,7-dimethyl-8-ribityllumazine)은 영국 University of Strathclyde의 H. Wood 교수로부터 얻었다.

### 균주 및 벡터

본 연구 실험에 쓰여진 주요한 박테리아 균주들은 *Photobacterium phosphoreum*(NCMB 844), *Photobacterium leiognathi*(ATCC 25521), *Escherichia coli* K38-1, *E. coli* HB101, *E. coli* 43R 등이며 플라스미드로는 pT7-4, pT7-5(21), 그리고 pKT230로부터 유도된 pMGM(16) 등이 클로닝 벡터로서 사용되었다. 본 연구에 쓰여진 *lux* 유전자 혹은 riboflavin 유전자를 포함하는 *Photobacterium* DNA 재조합 플라스미드들은(Fig. 1) PIXba.pT7-3(10)과 PpSB.pT7-4(13)로 부터 제한효소로 절단하여 적절한 플라스미드로 subcloning하여 얻었다. *P. phosphoreum*은 20°C의 제한된 공기주입 상태에서 1 liter 당 5 g의 Difco yeast extracts, 2 ml의 glycerol, 30 g의 NaCl, 3.7 g의 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g의(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 g의 MgSO<sub>4</sub>를 함유하는 복합 배지에서 배양시켰다. 그밖의 세포 취합과 분쇄 등은 보고된 방법에 따랐다(18). 해양 발광 박테리아의 배양은 660 nm에서의 OD(optical density) 값이 0.05에서 부터 시작되었으며, 발광 세기(luminescence intensity)는 OD 1 unit 당 LU(light unit)의 증가분으로 나타냈다. 이때 660 nm에서의 OD 1 unit은 1 ml에 약 5×10<sup>8</sup>개의 세포를 포함하며, 또한 1 LU은 Hasting과 Weber의 표준몰로서(5) 약 9.9×10<sup>10</sup> quanta/sec와 동등한 값을 갖는다.

### 효소 활성도

효소 활성도는 시간의 경과에 따라 박테리아가 배양됨에 따른 동등한 양의 세포를 취합하여(ml of culture×OD<sub>660</sub>=20) 측정하였다. Luciferase와 fatty acid reductase 효소 활성도 측정은 약 22±2°C 정도 내외의 온도에서 이루어졌으며 luciferase 활성도 측정을 위하여 세포 추출물에 0.2% bovine serum albumin을 포함하고 있는 1 ml의 50 mM phosphate(pH 7) 완충용액에 0.002% dodecanal을 첨가시킨 후 1 ml의 5×10<sup>-5</sup> M FMNH<sub>2</sub>를



### *P. leiognathi*

**Fig. 1.** Physical map of the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum* and *Photobacterium leiognathi*. The downstream of *ribIII* of *P. leiognathi* has not been determined. Restriction sites are labeled as follows: B, *Bam*HI; C, *Cl*al; E, *E*coRI; G, *B*gIII; H, *H*indIII; K, *K*pnI; S, *S*acI; V, *E*coRV; X, *X*baI. The downstream of *ribIII* of *P. leiognathi* has not determined. The map were organized based on the sequence data from the previous reports (10-13).

주입할때 나타나는 최대 발광세기로 luciferase 활성도를 결정하였다. Fatty acid reductase의 활성도는 A 용액(50 mM phosphate, pH 7.0, 0.25 mM dithiothreitol, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, and 10% Glycerol)(18)에서 luciferase-coupled assay 방법으로 측정하였다. 세포 추출물과 4 μg의 *P. phosphoreum* luciferase, 5 μM의 tetradecanoic acid, 0.5 mM ATP, 그리고 0.1 mM NADPH와 혼합시킨 효소 활성도 혼합용액 1 ml에 FMNH<sub>2</sub>(최종 농도 2.5×10<sup>-5</sup> M)를 주입시켜 fatty acid reductase의 활성도를 측정하였다. Riboflavin synthase의 활성도는 Hitachi F3010 형광분광계(Tokyo, 일본)를 사용하여 lumazine으로 부터 전환되는 특이하게 530 nm(480 nm excitation)에서 형광을 내는 riboflavin의 양으로 결정하였다. Riboflavin의 생성량은 50 mM phosphate pH 7.0 완충용액에서 riboflavin의 형광 표준곡선으로 결정하였으며 riboflavin의 농도는 445 nm의 이것의 흡광 계수 12,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>로부터 계산하였다.

### S1 nuclease protection assay

S1 nuclease protection assay는 100 μg RNA를 hybridization에 사용한 것을 제외하곤 보고(20)된 방법에 따랐다. 3.8 kbp의 크기를 갖는 *Hind*III로 절단된 *P. phosphoreum* 이중사슬 DNA 절편(PpHH.pMGM in Fig. 1)를 *P. phosphoreum* mRNA와 함께 침전시킨 후, 그 침전물을 hybridization 완충용액(80%

formamide, 40 mM PIPES, pH 6.6, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA)으로 현탁시켜, 75°C에서 10 분 동안 가열한 다음 50°C 까지 냉각한 후 12~16 시간 동안 방치하였다. 그 hybridization 혼합물에 30 µl의 10×S1 nuclease buffer(0.3 M NaOAc, pH 4.6, 1 M NaCl, 10 mM Zn(OAc)<sub>2</sub>, 50% Glycerol)을 가한 후 H<sub>2</sub>O로 희석시켜 최종 부피를 0.3 ml로 조정하고 S1 nuclease를 첨가시켜 37°C에서 30 분간 반응시켰다. 반응 생성물은 phenol 추출과, ethanol 침전을 시킨 후, 10 µl의 50 mM NaOH-1 mM EDTA 용액으로 재현탁시키고 2 µl의 6 × alkaline load buffer(300 mM NaOH, 6 mM EDTA, 18% Ficoll(Type 400 Pharmacia), Bromophenol Blue, 0.25%)를 가하였다.

### Southern transfer

1%의 agarose gel을 전개용액(50 mM NaOH-1 mM EDTA)에 담근 후, S1 nuclease assay 시료를 gel에 주입하여 25 V에서 4 시간 동안 전개시킨 후, 중화용액(1 M Tris 7.6-1.5 M NaCl)에서 45 분간 gel을 교반시키며 중화시키고, ethidium bromide가 포함된 TBE 용액에 옮겼다. 이것을 상온에서 10× SSC로 16 시간 동안 Hybond-Nylon에 capillary transfer하였으며 전이가 끝난 membrane은 UV cross-linker를 사용하여 DNA를 고정시켰다. Membrane은 pre-hybridization 완충용액(6× SSC, 5× Denhardt 용액, 0.05% sodium pyrocarbonate, 100 µg/ml salmon spermine DNA, 0.5% SDS)에서 1 시간 pre-hybridization 시킨 후 [<sup>32</sup>P]CTP(0.1 pmol, 1.2×10<sup>6</sup> cpm/pmol)로 표지된 *P. phosphoreum* Sall-BamHI DNA fragment와 65 °C 에서 24 시간 동안 hybridization 시켰다.

### 전사 종결 분석(Transcriptional termination assay)

전사 종결에 관한 분석은 Miyamoto 등(16)이 개발한 "in vivo" 유전자 발현의 방법을 이용하여 측정하였다. *P. leiognathi*의 *luxB* 유전자에서부터 *ribI* 유전자의 중간 부분까지를 포함하는 3.4 kbp의 *Hind*III DNA 절편을 *lux* 프로모터와 CAT(Chloramphenicol acetyl transferase) 유전자 사이에 *Hind*III로 절단된 pMGM 플라스미드에 삽입되었다(PIH.pMGM in Fig. 1). 이들 재조합 플라스미드는 *E. coli* MM294에 형질전환시킨 후, 유전자 전이 효율을 높여주는 kanamycin 저항성과 ColE1 replicon의 RK2 전이체제(2)를 지닌 접합성 플라스미드인 pRK2013과 함께 접합의 방법으로 *P. leiognathi*에 유전자 전이시켜, ampicillin(100 µg/ml), kanamycin(30 µg/ml), 그리고 streptomycin(25 µg/ml)이 포함된 LB 고체 배지에서 pMGM이 확실하게 전이된 *P. leiognathi* colony를 선택할 수 있었으며(*P. leiognathi*, Amp<sup>r</sup>; pMGM, Km<sup>r</sup>; and/or Sm<sup>r</sup>; pRK2013; Km<sup>r</sup>) CAT assay는 보고된 방법(16)에 따라 수행하였다.

## 결과 및 고찰

해양 박테리아인 *Photobacterium* 종의 *luxG* 하부 영역에서 riboflavin 생합성에 관련되는 일련의 유전자들이 저자의 연구에 의해 발견되고 그 유전자들의 염기서열이 결정되었다(11,12). *P.*

*leiognathi*의 경우 클로닝된 부분까지(Fig. 1) 염기서열이 밝혀진 3 개의 유전자들이 암호화하는 단백질은 5 개의 유전자들로 구성된 *Bacillus subtilis*의 riboflavin 생합성 유전자군(*rib operon*)의 2, 3, 4 번째 유전자들이 암호화하는 단백질과 아미노산 상동성이 있었으며(11), *P. phosphoreum*의 경우에는 *luxG* 하부에 4 개의 유전자들이 존재하였는데(Fig. 1), 처음의 세 유전자는 *B. subtilis*의 *rib* 오페론의 2, 3, 4 유전자들과 관련되었으나 4 번째 유전자는 흥미롭게도 *B. subtilis*의 *rib* 오페론의 3 번째 유전자가 암호화하게 되는 단백질의 C-말단 영역과 아미노산 상동성이 있었다(12).

Vitamin B<sub>2</sub>로서 널리 알려진 riboflavin은 이것의 생리적, 생화학적인 중요성 뿐만 아니라 발광 박테리아에서는 발광반응의 기질인 reduced FMN의 전구체(precursor)이기 때문에 riboflavin 생합성의 조절에 특별한 관심을 갖게 된다. 따라서 *lux* 오페론에 인접한 위치에서 발견된 riboflavin 생합성 유전자들이 그들 고유의 프로모터를 갖고 그것들에 의하여 발현되는 지의 여부, 혹은 *lux* 오페론의 마지막 유전자인 *luxG* 다음에 전사 종결구조(transcriptional terminator)가 존재하는지 여부를 조사하는 것은 매우 의미있는 일이다. *luxG*와 첫 번째 riboflavin 생합성 유전자인 *ribI* 사이에 intergenic sequence로서 *P. phosphoreum*과 *P. leiognathi*의 경우 각각 168 bp, 108 bp가 존재하게 되는 데

### *P. phosphoreum*

```

          SnaBI
 1  TAC GTA CCT GTT TTG GAA AAC TTT GAC AAT AAT TGG TAC GGA AAA AAA
   Y V P V L E N F D N N W Y G K K
 49 GGC AAT GTT ATT GAT GCA ATA ATA GAG GAC TTT GGT GAT TTA TCA GAA
   G N V I D A I I E D F G G D L S E
 97 TTT GAT ATC TAT GTT TGC GGC CCT CAA GGT ATG ACA CGT AGT GTT CGT
   F D I Y V C G P Q G M T R S V R
 145 GAA AAG TTA ACA TCA CTT AAA AAA GCT GAT TCT GAT AAA ATG TTT GCC
   E K L T S L K K A D T D K M F A
 193 GAT GCT TTT GCA TAT ATG TGA TACTAATTTAAATTAATAATTAACCTAAGATACC
   D A F A Y M *
 249 TTAAGTITATCTGAAGGTATATTGAATTAATAATTAACTCTATTTTTGGTTCGTAATCTC

          ribI
 312 ACCATAAATAGAGTTATCACCAGACTTTAATTAACCTTAAACTAAGAGTTGAAT ATG
   M
 384 TTT ACC GGA ATT ATT GAG GCT GGT GGT AAT ATA TCG GCC ATC ACT TCA
   F T G I I E A V G N I S A I T S

```

### *P. leiognathi*

```

          EcoRV
 1  GAT ATC TAT GTC TGC GGG CCA TTT GGT ATG AGC CGG ACT GCG AAA GAT
   D I Y V C G P F G M S R T A K D
 49 ATT CTG ATC TCA CAG AAA AAG GCG AAT ATA GGA AAA ATG TAT TCT GAT
   I L I S Q K K A N I G K M Y S D
 97 GCA TTT AGC TAT ACG TAA TTAATAATCATTTTAACTCTAAATAAACCCTTTATTA
   A F S Y T *
 154 TTTTTGCAGCTACTTATCTGGGTACTGATAATTAGTACCCAATAGATAGTTCATTATTATAGG

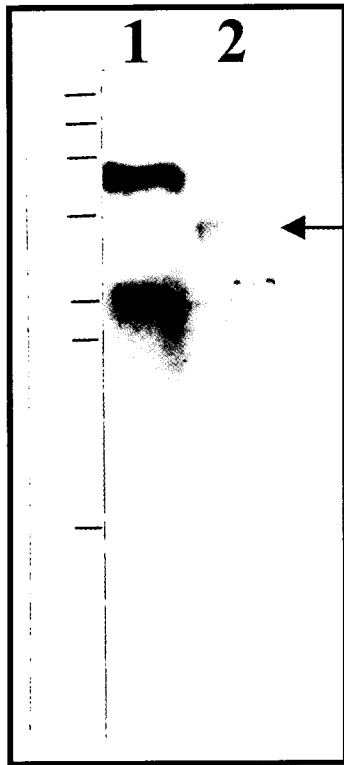
          ribI
 217 GATATT ATG TTT ACA GGA ATA ATA GAG TCT ATA GGT AAT ATA GGC GCA
   M F T G I I E S I G N I G A

```

Fig. 2. Intergenic DNA sequence between *luxG* and *ribI* from *P. phosphoreum* and *P. leiognathi*. The number of nucleotide sequence starts from *Sna*B1 and *Eco*RV site, respectively. The DNA sequences were obtained from GenBank Data Bank with accession number M63594 (11) and L11391 (12).

(Fig. 2), 이들 DNA 염기서열의 이차구조를 분석한 결과 6 개 정도의 T-stretches가 이어지는 GC 비율이 높은 줄기-고리 구조 (stem-loop structure)로 구성되는 전형적인  $\rho$ -independent한 전사 종결구조(transcriptional terminator) 형성할 만한 염기서열은 없는 것으로 나타났다.

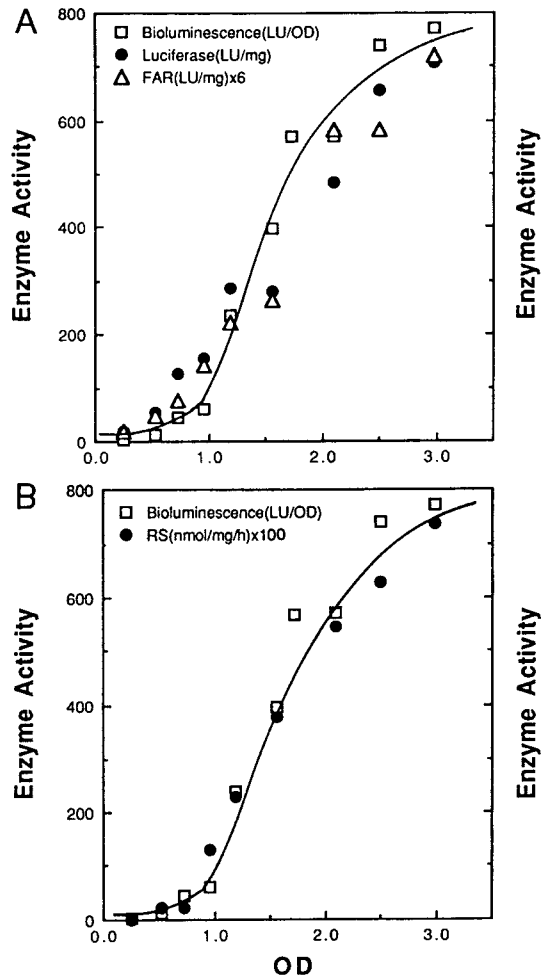
따라서 *lux*와 *rib* 유전자들이 한 전사단위에 의하여 발현되는 지를 확인하기 위하여 *lux* 유전자와 *rib* 유전자 사이의 168 bp의 intergenic region을 포함하는 *P. phosphoreum* DNA(PpHH in Fig. 1)를 이용하여 S1 nuclease protection assay를 수행하였다. 만일 이 intergenic 영역에 전사 종결구조가 존재한다면 2.8 kbp 및 1.0 kbp에 해당되는 두 개의 bands가 나타날 것으로 예상되나, Fig. 3의 lane 2에서 보는 바와 같이 약 3.8 kbp에 해당되는 단일 band가 나타나는 것으로 보아, *luxG*에서부터 *ribI*까지 포함되는 *P. phosphoreum*의 단일 사슬 DNA가 S1



**Fig. 3.** S1 nuclease protection assay of *P. phosphoreum*. The single stranded DNA containing the intergenic region of *luxG* and *ribI* (PpHH) as well as 5' region of the structural gene from the *lux* operon containing *luxCDA* (PpEE) were tested for RNA protection by S1 nuclease. lane 1, PpEE hybridized with *P. phosphoreum* mRNA; lane 2, PpHH hybridized with *P. phosphoreum* mRNA. The position of the each DNA fragment of  $\lambda$ HindIII DNA markers (23.7, 9.5, 6.7, 4.3, 2.3, 2.0, and 0.6 kbp) is shown on the left. The PpEE DNA was used as a positive control for S1 nuclease mapping assay. The labelled band of 2.6 kbp in lane 1 was generated owing to the protected single-stranded DNA by the *P. phosphoreum lux* mRNA starting from the front of *luxC* gene. The difference of the intensities of the labelled bands between lane 1 and 2 might be due to the amount of mRNA transcribed by the DNA in *lux* operon. Further experimental details for S1 nuclease mapping are as described in the text.

nuclease 절단으로부터 *P. phosphoreum* mRNA에 의하여 보호 받고 있음을 나타내고 있다. 즉 이 실험 결과는 *P. phosphoreum*의 *lux* 유전자와 *rib* 유전자 168 bp의 intergenic region에 전사 종결 구조가 존재하지 않는다는 것을 나타낸다.

발광 박테리아 발광반응의 조절에서 가장 큰 특징중의 하나는 autoinduction 현상(9)으로 *P. phosphoreum*의 발광 세기는 대수기의 말기 혹은 정지기에서 급격히 증가하는 양상을 보인다(18). 이것은 autoinducer라 통칭되는 조그만 화학 신호 전달 물질(3,9)이 박테리아가 생육되면서 세포수가 증가함에 따라 autoinducer 농도가 증가하면서 DNA 결합 단백질인 이것의 receptor와 복합체를 형성하여 특정 유전자 혹은 오페론의 조절 영역 DNA에 결합함으로써 일부 유전자들의 발현을 급증시키게 된다(3,14). 이전에 보고된 저자의 연구(12)에 의하면 *P. phosphoreum ribI*이 riboflavin synthase, *ribII*가 dihydroxy-4-butanone synthase, *ribIII*가 lumazine synthase, 그리고 *ribIV*가

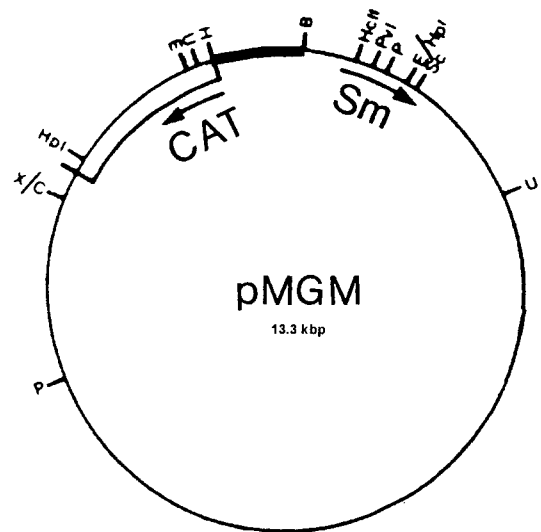


**Fig. 4.** Coinduction of riboflavin synthase and *lux*-specific enzymes during the development of bacterial bioluminescence. A) Expression of luciferase and fatty acid reductase (FAR) activities and luminescence *in vivo* during the growth of *P. phosphoreum*. B) Induction of riboflavin synthase (RS) activity during the development of bioluminescence of *P. phosphoreum*.

GTP cyclohydrolase II를 암호화하게 되는 유전자로 동정되었다. 본 연구에서는 riboflavin synthase의 활성도를 *P. phosphoreum*에서 직접적으로 검출해 내고, *P. phosphoreum*의 생육 곡선 및 발광 세기의 진행에 따른 riboflavin synthase의 활성도를 비교하여 보았다.

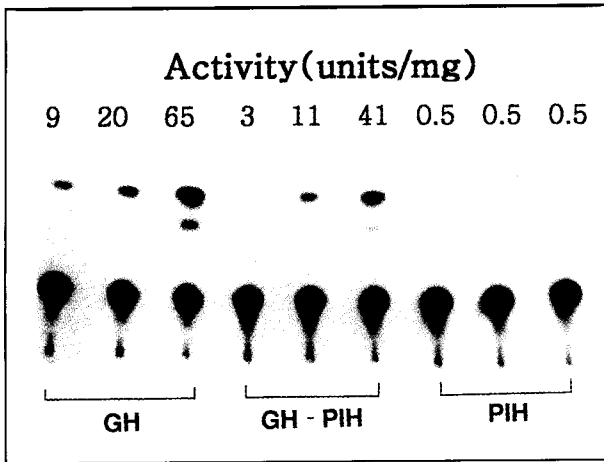
Fig. 4에서 보는 바와 같이 riboflavin synthase의 활성도는, 생물발광에 관여하는 효소들(luciferase와 fatty acid reductase)이 발광세기의 진행 정도에 따라 대수기 말기 혹은 정지기에서 coinduction 되는 것과 같은 양상을 보였다. 발광 반응에 직접적으로 관여하는 발광 박테리아에 특유한 효소들인 luciferase와 fatty acid reductase가 luminescence intensity와 함께 발현된다는 이전의 보고(18)와 이들 luciferase(LuxAB)와 fatty acid reductase complex(LuxCDE)의 각 subunit을 암호화하게 되는 유전자(LuxCDABE)들이 한 오페론에 존재함을 고려할 때 riboflavin의 생합성 효소들의 발현이 luciferase와 fatty acid reductase와 같은 조절 체계하에 조정됨을 나타내고 있으며, 이는 *ribI*, II, III, IV 유전자들과 *lux* 유전자들이 한 전사 단위 안에 존재하게 된다는 것을 보여준 앞의 Fig. 3의 실험 결과를 지지하여 준다. *Photobacterium* 종들의 *luxG* 다음의 첫 번째 유전자가 암호화하는 단백질이 riboflavin synthase 라는 사실은 분자 유전학적으로 흥미를 자아내는 데 그것은 발색단으로 riboflavin synthase의 효소작용 기질인 6,7-dimethyl-8-ribityl lumazine과 결합하여 *Photobacterium* 종들의 최대 발광세기를 단과장으로 이동시키는 것(17)으로 알려진 lumazine protein과 아미노산 상동성이 있을 뿐만 아니라 *luxL*이 *luxC* upstream에 존재하게 되며 *lux* 유전자들과는 반대 방향으로 전사되기 때문이다(C.Y. Lee, unpublished data)(Fig. 1). 본 연구 실험에서 *P. phosphoreum*의 *luxG*와 *ribI*을 포함하는 단일 사슬 DNA가 S1 nuclease에 의한 절단에서 *P. phosphoreum*의 mRNA에 의하여 보호되는 결과를 얻었으며(Fig. 3), *P. phosphoreum*의 riboflavin synthase의 활성도가 luciferase의 활성도와 함께 coinduced되는 양상이 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 *lux* 유전자와 *rib* 유전자가 같은 mRNA 혹은 같은 프로모터에 의하여 전사됨을 보여 주는 훨씬 심도있는 연구가 수행되어야 할 것이다. 특히 *luxG*와 *ribI* 영역의 DNA에 의하여 직접적으로 전사된 polycistronic mRNA를 얻을 필요가 있음을 절감하나, *P. phosphoreum*의 RNase minus mutant를 얻을 수 없고 *lux* probe를 이용한 Northern blot에서 모든 *lux* 유전자들이 포함되는 polycistronic mRNA를 얻을 수 없었다. *lux* operon에서의 polar mutation을 유도하는 것도 *P. phosphoreum*의 유전학적 연구가 부족한 데다, 이 유전자를 다시 *P. phosphoreum* 세포내로 전이시키는 것이 어려워 불가능했다. 현재까지 DNA를 *P. phosphoreum*에 접합시키는 것이 매우 낮은 효율로 이루어지며 형질전환 혹은 형질도입에 의한 유전자 전이는 성공되지 않은 상태이다.

이런 제한성의 연유로 본 연구에서는 *Photobacterium* 종들의 *lux* 유전자와 *rib* 유전자가 한 전사 단위 인지의 여부를 알아보기 위한 또 다른 실험 방법으로 발광 박테리아인 *Vibrio harveyi*의 강력한 *lux* 프로모터를 포함하는 DNA(*Bgl*III-*Hind*III in GH in Fig. 5)와 reporter 유전자인 CAT(chloramphenicol



**Fig. 5.** Restriction map of the vector pMGM derived from pKT 230. Abbreviations: CAT, the gene coding for Chloramphenicol Acetyl Transferase; Sm, gene conferring resistance to streptomycin; P, *Pst*I; X, *Xho*I; C, *Cla*I, *Pv*I, *Pvu*I; H, *Hind*III; B, *Bam*HI; HcII, *Hinc*II; E, *Eco*RI; Hpl, *Hpa*I; Sc, *Sac*I; U, *Pvu*II. The *V. harveyi* DNA digested into *Bgl*III-*Hind*III containing strong promoter activities for *lux* genes was inserted into *Bam*HI-*Hind*III sites of pMGM (GH). The 3.4 kbp *Hind*III DNA fragment containing from the end of *luxB* to the middle of the *ribII* gene from *P. leiognathi* was inserted into the recombinant plasmid GH (GH-PIH). The pMGM inserting *P. leiognathi* *Hind*III DNA but missing the strong *lux* promoter (PIH) was constructed by taking out with *Bam*HI restriction fragment in *Bgl*III-*Hind*III DNA fragment of GH-PIH.

acetyl transferase)를 암호화하게 되는 유전자 사이에 *luxG*와 riboflavin 유전자들을 포함하는 DNA(PIH.pMGM in Fig. 1)를 삽입시켜 재조합 pMGM 플라스미드(GH-PIH)를 만들고 이것을 접합(conjugation)의 방법을 이용하여 최초로 *P. leiognathi*에 유전자 전이시키는 데 성공함으로써, CAT 유전자의 발현 정도로 측정하여 앞의 의문에 대한 해답을 내릴 수 있는 체제를 구축하였다. *luxB*로 부터 *ribII* 까지 포함되어 있는 *P. leiognathi* DNA(PIH.pMGM in Fig. 1)를 *lux* 프로모터와 CAT reporter 유전자 사이에 끼워넣은 재조합 pMGM 플라스미드(GH-PIH in Fig. 5)를 *P. leiognathi*에 전이시켜 각기 다른 생육시기에서 CAT의 specific activity를 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 CAT reporter 유전자의 발현 양상이 세포의 생육에 따라 induce되는 경향을 보였을 뿐만 아니라 *P. leiognathi* *luxB*에서 부터 *ribII*까지 포함되는 DNA가 삽입된 경우(GH-PIH) 강력한 *lux* 프로모터에 의한 CAT reporter 유전자의 발현(GH)에 비해 약간 감소하였으나, 이는 다른 해양 발광 박테리아인 *V. harveyi*와 *V. fischeri*에서 *lux* 오페론의 전사 종결구조(transcriptional terminator)가 포함되는 DNA가 삽입된 경우에 CAT 발현이 1% 이하로 현저하게 감소되는 결과들(16, 20)과 비교할 때 p-factor에 무관한 전사 종결구조가 이 영역에 존재하지 않는다는 것을 나타내고 있다. 또한 Fig. 5의 재조합 pMGM 플라스미드(GH-



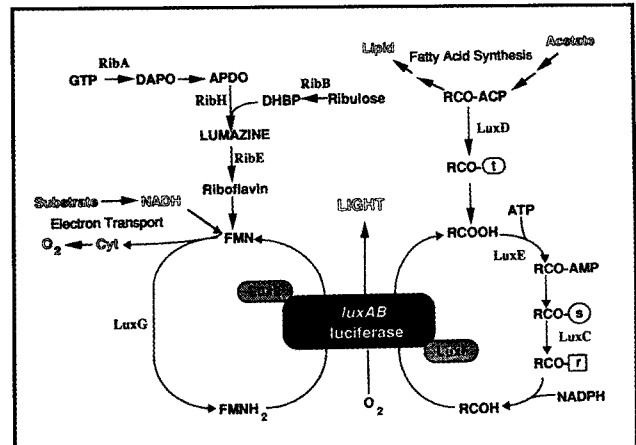
**Fig. 6.** Fluorography of the  $^{14}\text{C}$ -labelled substrates and products in the CAT assay resolved by thin layer chromatography. CAT activity was assayed from extracts of *P. leiognathi* containing **GH** (at  $\text{OD}_{660}$ =1.2, 2.0, 3.5), **GH-PIH** (at  $\text{OD}_{660}$ =1.2, 2.1, 3.6) and **PIH** (at  $\text{OD}_{660}$ =1.1, 2.0, 3.6), respectively. Assay for CAT activity were performed with an incubation time of 15 min. One unit of CAT activity in this paper corresponds to 1 nmol of chloramphenicol acetylated per min at  $37^\circ\text{C}$  under optimal assay conditions.

**PIH**에서 *lux* 프로모터를 포함하고 있는 DNA 절편(*Bg*III-*Hind*III site)이 제거된 구조(**PIH** in Fig. 6)에서는 CAT 유전자의 발현이 전혀 관찰되지 않는 것은 *rib* 유전자들 고유의 프로모터가 없음을 나타내며, 따라서 이 실험 결과들은 *lux* 유전자들과 riboflavin 유전자들이 하나의 오페론에 존재하여 polycistronic하게 발현되고 있음을 알려주고 있다.

발광반응에 관여하는 여러 화합물들과 이것들을 합성해 내는 효소들을 Fig. 7에 정리하였다. 그림에서 보는 바와 같이 riboflavin은 박테리아에서의 발광반응 기질인 reduced FMN의 전구체로서 riboflavin 합성에 관여하는 유전자들이 *lux* operon과 함께 조절되는, 즉 riboflavin 유전자들이 *lux* 유전자들과 같은 전사 단위(transcriptional unit) 안에 포함될 경우, *lux* operon은 박테리아의 발광반응에 참여하는 모든 기질(fatty aldehyde와 flavin)을 합성하는 효소들과 직접적으로 반응에 참여하는 효소(luciferase)들을 암호화하게 되는 유전자들로 이루어지는 복잡한 구조(complex operon)로 이루어지게 되며 이러한 측면에서 *lux* 오페론상에서 발견된 riboflavin 유전자들의 발현 양상을 조사한 본 연구 실험은 미래에 수행되어질 박테리아에서의 발광반응의 flavin 기질 공급의 조절에 관한 분자 유전학적 혹은 미생물 생리학적인 연구에 주요한 정보를 제공하여 줄 것이다.

### 감사의 말

이 연구는 1997년도 한국학술진흥재단의 연구비 지원(1997-003-D00173)에 의하여 이루어졌으며, 본 연구 수행에 있어서 실험실 공간 및 실험 재료를 제공하여 준 캐나다 McGill University 생화학과의 E. Meighen 교수께 감사드립니다.



**Fig. 7.** The genes and enzymes involved in bacterial bioluminescence reaction and the riboflavin synthesis in the *lux* operon of *Photobacterium* species. LuxAB,  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of luciferase; LuxC, acyl-CoA reductase; LuxD, acyl-transferase; LuxE, acyl-protein synthetase; LuxF, nonfluorescence flavoprotein; LuxG, flavin reductase; LuxL, lumazine protein; RibA, GTP cyclohydrolase II, RibB, DHBP synthase; RibE, riboflavin synthase; RibH, lumazine synthase; APDO, 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidinedione; Cyt, Cytochrome; DAPO, 2,5-diamino-6-(5'-phosphoribosylamino)-4-pyrimidineone; DHBP, 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate; Lumazine, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine; Ribulose, ribulose 5'-phosphate.

### 참고문헌

- Andrew, S.C., D. Shipley, J.N. Keen, J.B.C. Findlay, P.M. Harrison, and J.R. Guest. 1992. The haemoglobin-like protein (HMP) of *Escherichia coli* has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin  $\text{NADP}^+$  reductases. *FEBS Lett.* 302, 247-252.
- Figurski, D.H. and D.R. Hellinski. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1648-1652.
- Fukaya, C., S.C. Winans, and E.P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystem: the *luxR*-*luxI* family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727-751.
- Gilman, A.G. 1990. Water Soluble Vitamin. pp. 1534-1536. In Gilman, Rall, Nies, and Tayler (ed), *The pharmacological basis of therapeutics*. 8th ed. Pergamon press, New York.
- Hastings, J.W. and G. Weber. 1963. Total quantum flux of isotropic sources. *J. Opt. Soc. Am.* 53, 1410-1415.
- Hastings, J.W., C.J. Potrikus, S.C. Gupta, M. Kurfurst, and J.C. Makemson. 1985. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26, 235-291.
- Herring, P.J. 1978. *Bioluminescence in Action*. Herring (ed.), Academic Press. New York.
- Herring, P.J. 1987. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1, 147-163.
- Kaplan, H.B. and E.P. Greenberg. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.*, 163, 1210-1214.

10. Lee, C.Y., R.B. Szttnner, and E.A. Meighen. 1991. The *lux* genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. *Eur. J. Biochem.* 201, 161-167.
11. Lee, C.Y. and E.A. Meighen. 1992. The *lux* genes in *Photobacterium leiognathi* are closely linked with genes corresponding in sequence to riboflavin synthesis genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 690-697.
12. Lee, C.Y., D. O'Kane, and E.A. Meighen. 1994. Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. *J. Bacteriol.* 176, 2100-2104.
13. Mancini, J.A., M. Boylan, R.R. Soly, A.F. Graham, and E.A. Meighen. 1988. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique *lux* gene organization. *J. Biol. Chem.* 263, 14308-14314.
14. Meighen, E.A. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 151-176.
15. Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
16. Miyamoto, C., E. Meighen, and A. Graham. 1990. Transcriptional regulation of the *lux* genes transferred into *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 172, 2046-2054.
17. O'Kane, D.J., B. Woodward, J. Lee, and D.C. Prasher. 1991. Borrowed proteins in bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1100-1104.
18. Riendeau, D. and E. Meighen. 1980. Coinduction of fatty acid reductase and luciferase during development of bacterial luminescence. *J. Biol. Chem.*, 254, 7488-7490.
19. Singleton, P. and P. Sainsbury. 1987. Riboflavin. pp. 765-766. In Dictionary of microbiology and molecular biology, John Wiley-Son, 2nd ed. New York.
20. Swartzman, E., C. Miyamoto, A. Graham, and E. Meighen. 1990. Delineation of the transcriptional boundaries of the *lux* operon of *Vibrio harveyi* demonstrates the presence of two new *lux* genes. *J. Biol. Chem.* 265, 3513-3517.
21. Tabor, S. and C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase-promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.

(Received November 25, 1999/Accepted February 21, 2000)

---

**ABSTRACT : Expression of the Genes Involved in the Synthesis of Riboflavin from *Photobacterium* species of Bioluminescent Marine Bacteria**

**Chan Yong Lee** (Department of Premedicine, Eulji Medical College, Taejon 301-112, Korea)

The genes involved in riboflavin synthesis (*ribI*, II, III, and IV) were found immediately downstream of *luxG* in the *lux* operon from *Photobacterium* species. The single stranded DNA containing the intergenic region of *lux* genes and *rib* genes from *Photobacterium phosphoreum* was fully protected by *P. phosphoreum* mRNA from the S1 nuclease mapping assay suggesting that a transcriptional terminator was not present in the region. In addition, the levels of riboflavin synthase activity in *P. phosphoreum* was increased during the development of bacterial bioluminescence in the same fashion as the luciferase and fatty acid reductase activities. Insertion of the *Photobacterium leiognathi* DNA extending from *luxB* to *ribII*, between a strong *lux* promoter and a reporter gene (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) and transferred by conjugation into *P. leiognathi*, did not affect expression of reporter gene. Moreover the CAT gene was not expressed in an analogous construct missing the *lux* promoter indicating that a promoter was not present in this region. Based on the data here, it can be concluded that the *lux* genes and *rib* genes in *Photobacterium* species are under common regulation.