

## 형광 Peptide를 이용한 *Streptomyces griseus* IFO 13350의 인산화 단백질 동정

허진행 · 정용훈 · 김종희 · 신수경<sup>1</sup> · 현창구<sup>1</sup> · 강상순<sup>2</sup> · 천재순<sup>2</sup> · 강대경<sup>3</sup> · 홍순광\*  
명지대학교 이과대학 생명과학과, <sup>1</sup>(주)아트만바이오사이언스 기술연구소, <sup>2</sup>충북대학교 과학교육과

**Identification of a Protein Kinase using a FITC-labelled Synthetic Peptide in *Streptomyces griseus* IFO 13350.** Her, Jin-Haeng, Yong Hoon Choeng, Jong-Hee Kim, Soo-Kyung Sin<sup>1</sup>, Chang Gu Hyun<sup>1</sup>, Jaesun Chun<sup>2</sup>, Sang Soon Kang<sup>2</sup>, Dae-Kyung Kang<sup>3</sup>, and Soon-Kwang Hong\*. Department of Biological Science, College of Natural Science, Myongji University, Yongin, Kyonggido 449-728, Korea, <sup>1</sup>AtmanBioScience Inc., Department of Biological Science, Myongji University, Yongin, Kyonggido 449-728, Korea, <sup>2</sup>Division of Science Education, Chungbuk National University, Chongju 361-763, Korea, Bio-Resources Institute, Easy Bio system Inc., Chonan, Chungnam 330-820, Korea – *Streptomyces* is a group of Gram-positive soil bacteria that grow as a branching vegetative mycelium leading to the formation of spores, and display a physiological differentiation related to the synthesis of many secondary metabolites including antibiotics. Their complex life cycle and multicellular differentiation require various levels of regulation and types of signal transduction systems including eukaryotic-type serine/threonine protein kinases and prokaryotic-type histidine/aspartic acid protein kinases. Akt kinase that was found in cells is a serine/threonine kinase controlling signal pathway for multitude of important cellular events. The activation or inactivation of Akt kinase in the cell is one of the critical regulatory points to deliver cell proliferation, differentiation, survival or apoptosis signal. To find the regulatory protein homologous to Akt in *Streptomyces*, the fluorescein-labeled synthetic peptide (FITC-TRRSR-TESTIT) was designed from the consensus sequence of target proteins for Akt kinase. From the difference of the mobility between the nonphosphorylated and phosphorylated synthetic peptides on Agarose gel electrophoresis, the Akt-phosphorylating activity was monitored. The cell-free extract prepared from *Streptomyces griseus* IFO 13350 and the Akt homologous protein was purified by ammonium sulfate fractionation and many steps of column chromatographies such as, DEAE-Sephrose, Mono Q, Resource Phenyl-Superose and Gel permeation column chromatographies. As a result, the protein phosphorylating the fluorescein-labeled Akt substrate was identified and its molecular weight was estimated as 39 kDa on SDS-PAGE.

**Key words:** *Streptomyces*, Akt kinase, FITC-labelled synthetic peptide

방선균은 토양속에 분포하는 Gram 양성세균으로 원핵생물 중 가장 진화된 것으로 알려져 있다. 방선균은 1개의 포자가 발아하여 영양세포가 연결된 상태의 균사모양의 성장을 보이며, 진핵생물과 같이 선형 염색체를 갖고 환경의 변화에 따라 생리학적·형태학적 분화를 한다. 이와 같은 특징은 원핵생물에서 발견되는 진핵생물적 생명현상이라는 점에서 학문적으로 큰 의의를 갖고, 실제로 분자생물학적 연구 결과 방선균에는 진핵생물에서 발견되는 신호전달기구가 존재하고 있고, 이들이 방선균 내에서 일어나는 상기의 진핵생물적 속성을 조절하고 있는 것으로 생각되고 있다[17].

방선균의 형태 분화 및 생리적 분화를 조절하는 신호전달기구의 규명은 그 자체가 형태 분화 및 항생제를 비롯한 각

종 이차 대사물의 생산과 매우 밀접하게 연관되어 있다. 따라서 방선균에서 지금까지 밝혀진 신호 전달 기구는 항생제 생합성 기구와 매우 연관성 있게 연구되어 왔으며, 그 예로 A-factor에 의한 *Streptomyces griseus*에서의 streptomycin 생합성 및 세포 분화에 관한 제어기구가 자세히 연구되어 있고[5,18], *Streptomyces coelicolor*에서는 진핵 세포성 ser/thr/tyr 계의 인산화 단백질의 신호 전달기구를 포함하는 AfsR/AfsK[7, 8, 10] 및 전형적인 bacterial two-component regulatory system인 AfsQ1/Q2 계 등이 보고되어 있다[1,3, 17]. 이외에도 *S. coelicolor*에서 보고된 global한 조절유전자에는 *abaA*, *absA*, *absB*, *afsB*, *bldA*, *B*, *D*, *G*, *H*, *I*, *bldE*, *F*, *mia* 등의 많은 유전자들이 보고되었지만[17], 이들이 암호화하고 있는 조절단백질에 관한 직접적인 연구는 상술한 바와 같이 진핵세포성 신호전달체계 (ser/thr/tyr kinase)를 구축하는 AfsR/AfsK 및 원핵세포성 신호전달체계인 his/asp kinase를 구성하는 AfsQ1/AfsQ2 외에는 전무하다.

본 연구실에서는 오랫동안 *S. griseus*의 분화 조절 기구에

\*Corresponding author  
Tel. 031-330-6198, Fax. 031-330-8249  
E-mail: skhong@mju.ac.kr

관하여 연구를 실시하여 왔으며, 최근에는 동균주가 생산하는 몇종의 protease가 동균주의 세포분화 및 이차대사 생산에 큰 영향을 미치고 있음을 발표 한 바 있다[3,4,13]. 이러한 결과는 다른 방선균에서 보고된 결과와도 일치성을 보이고 있어 원핵생물의 분화과정에도 진핵생물처럼 protease가 중요함을 시사하고 있다[12,16]. 본 연구는, 방선균이 많은 점에서 진핵생물적 특성을 보이는 점과 방선균의 신호전달 시스템이 일반적인 원핵생물보다는 진핵생물에 가까운 점을 감안하여 고안되었다. Akt(Protein Kinase B)는 동물 세포에서 세포의 분화 및 생존에 중요한 역할을 하는 단백질이며 목적 단백질의 ser 잔기나 thr 잔기를 인산화하여 세포사를 차단하고 세포의 암화를 유발한다[11,15]. 본 연구에서는 Akt kinase에 의하여 활성화되는 목적 단백질의 인산화 부위에 존재하는 보존 영역으로부터 고안된 FITC로 표식한 형광 peptide를 이용하여, 방선균에도 Akt와 유사한 기질 활성을 갖는 ser/thr protein kinase가 존재한다는 사실을 확인하였으며, 합성기질의 인산화를 추적하여 이를 인산화 하는 단백질을 정제하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 방선균 *S. griseus* IFO 13350 균주는 aminoglycoside계 항생물질인 streptomycin을 생산하는 균주로 동경대학의 S. Horinouchi 교수로부터 제공받았으며, 이 균주는 spore 상태로 20% glycerol에 넣어 -70°C에 냉동 보관하여 사용하였다[18]. *S. griseus*의 배양은 R2YE 배지[9]를 사용하였으며, R2YE 배지는 1 L당 sucrose 103 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.12 g, glucose 10 g, casamino acid 0.1 g, yeast extract 5 g, 0.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 ml, 3.68% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 80 ml, 20% L-proline 15 ml, 5.73% TES [pH 7.2] 100 ml, trace elements 용액 2 ml를 포함하고 있으며, 고체배지의 경우에는 2.2% agar를 첨가하여 제조하였다. 단백질 정제 실험을 위해 R2YE 액체 배지 200 ml에 *S. griseus* IFO 13350을 접종하여 28°C에서 3일간 전 배양 한 후 10 L 배지에 접종하여 동일 조건(28°C, 250 rpm)으로 3일간 본 배양을 실시하였다.

### 균체 추출액 조제 및 Ammonium Sulfate 분획 침전

균주 배양 후 원심분리를 통해 분리된 균체에 1,000 ml의 lysis buffer (50 mM Tris-HCl[pH 7.5], 10 mM EDTA, 1 mM DTT)를 첨가하여 균체를 세척한 후, 다시 1,000 ml의 lysis buffer에 균주를 현탁시키고 lysozyme을 최종 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 4°C에서 1시간 처리 한 후, 30초 간격으로 5회 sonication을 실시하여 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 20,000 X g에서 30분간 원심분리 하여 고형물질을 분리한 후 상등액만을 취하여 40-70% ammonium sulfate 농축을 하였다. Ammonium sulfate 농축시 단백질의 회수는

20,000 X g에서 1시간 원심분리를 실시하여 얻은 침전물을 사용하였다.

### DEAE-Sepharose FFQ Ion Exchange Chromatography

DEAE-Sepharose FFQ resin 200 ml를 직경 5 cm의 유리 column에 채운 후 Buffer A(20 mM Tris-HCl[pH 7.2], 1 mM EDTA, 1 mM DTT)로 충분히 씻어 안정화 시킨 후, ammonium sulfate 농축을 통해 회수된 단백질을 500 ml의 Buffer A에 녹인 후, 동일 buffer에 평형화 시킨 column 내에 주입하였다. 단백질 주입 후, Buffer A로 세척한 후 1,000 ml의 Buffer A에 NaCl을 각각 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 1 M이 되도록 첨가하여 유속 5 ml/min로 염 농도에 따른 단계별 용출을 실시하였으며, 각 fraction 당 10 ml씩 분획을 실시하였다. 각 염 농도에서 분리된 각각의 sample fraction을 분광광도계를 사용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하고, 이를 기준으로 단백질을 함유하고 있는 분획을 선정하여 Akt 기질 peptide에 대한 protein kinase assay를 시행하였다.

### Mono Q Column Chromatography

Mono Q HR 5/5 column을 이용하여 FPLC (Amersham-pharmacia Inc.)를 수행하였다. Mono Q resin을 0.1 M NaCl을 함유한 Buffer A로 세척한 후 동일한 원충액에 평형화 시킨 단백질을 주입하여 동일 buffer로 세척한 후, 0.1 M에서 0.6 M까지의 NaCl을 함유한 Buffer A로 염 농도에 따른 gradient elution을 실시하였다. 용출 시 유속은 1 ml/min로 조정하였고, 각 분획당 1 ml씩을 분취하였다. 분리된 각 fraction을 이용하여 Akt 기질peptide에 대한 protein kinase assay를 실시하였고 이중 활성을 보이는 fraction을 모아 dialysis 후 정제에 사용하였다

### Phenyl-Superose Column Chromatography

Phenyl-Superose column은 소수성을 이용한 방식으로 이 역시 FPLC system을 사용하였다. Resource Phenyl-Superose resin을 1 M ammonium sulfate를 함유하는 Buffer A로 세척한 후 동일 용액으로 평형화시킨 단백질용액을 column내에 주입하고 충분한 양의 동일 원충액으로 세척한 후 0.5 ml/min 유속으로 Buffer A에 대한 reverse gradient 방식의 용출을 실시하였다. 각 분획은 0.5 ml/min씩 취하였으며 이를 이용하여 Akt 기질peptide에 대한 protein kinase assay를 실시하였고, 이중 활성을 보이는 fraction을 취하여 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE)를 하였으며, Amicon filter(분자량 10,000)로 단백질을 농축하여 Gel Permeation Chromatography를 하였다.

### Gel Permeation Chromatography

Superdex HR 75 column을 이용하여 FPLC로 분자량에

따른 단백질 분리를 실시 하였다. Superdex HR 75 column 을 0.15 M NaCl을 함유한 Buffer A로 세척하여 평형화 시킨 후 농축된 단백질을 주입 후, 유속 0.5 ml/min의 속도로 단백질을 분리하였다. 각 분획은 0.5 ml씩 취하였으며 이를 이용하여 Akt 기질 peptide에 대한 protein kinase assay를 실시하여 이중 활성을 보이는 fraction을 SDS-PAGE로 분석하여 단백질의 양상을 분석하였다.

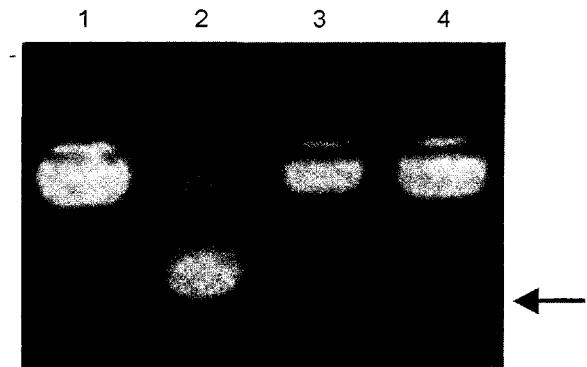
#### Protein Kinase Assay 및 SDS-PAGE

Protein kinase assay는 형광 물질인 FITC 가 부착된 기질 (FITC-TRRSRTESIT)을 이용하여 실험하였다[11, 15]. 반응액은 FITC-peptide 5  $\mu$ g, 2 X Reaction buffer(40 mM HEPES[pH 7.2], 20 mM  $MgCl_2$ , 20 mM  $MnCl_2$ , 2 mM DTT, 40 mM ATP, 2  $\mu$ g phosphatidyl serine as a PKC activator) 10  $\mu$ l, sample protein 5  $\mu$ l, 증류수를 혼합하여 총 부피를 20  $\mu$ l로 조정하고, 30°C에서 30분 반응한 후 95°C에서 10분간 열처리로 반응을 정지시킨 sample을 0.8% agarose gel에서 전개하여 활성을 확인하였다. 또한 활성 있는 단백질의 양상을 확인하기 위하여 4-20% gradient (Komabio Tech.)을 이용하여 실험하였다. 각 실험중의 단백질 정량은 Bradford 분석법을 이용하였으며, 표준품으로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다[2].

### 결과 및 고찰

#### 합성 peptide를 이용한 방선균의 인산화 활성

원핵 세포에서 진핵 세포에 이르기까지 살아 있는 개체 또는 그 구성 단위인 세포가 가지는 중요한 특성 중 하나는 생명 현상을 이어나가고 보다 적합한 상태를 유지하기 위하여 수시로 변화하는 환경에 적응 또는 대응하는 능력이다. 따라서, 세포간 또는 세포를 구성하는 요소들간의 상호 협조가 필요하며 이들의 통합을 위해 신호전달기구의 필요성이 있게 된다. 즉, 세포의 신호전달계는 끊임없이 변화하는 주위환경에 세포가 적절하게 대응하게 함으로써 세포 성장, 분화, 이동, 대사, 사멸, 생존 등에 이르는 생명현상의 모든 과정을 조절하며, 이러한 신호 전달에는 인산화 과정이 필수적이다. 방선균 역시 성장 및 분화 과정에 관련된 신호 전달 기전이 밝혀지고 있으며, 특히 이차 대사 및 형태 분화에 연관된 신호 전달 단백질들이 보고되고 있다. 또한 방선균의 경우 진핵세포에 특이적으로 존재하는 ser/thr/tyr protein kinase들이 보고된 바 있다[6,10,17]. 본 연구에서는 특히 진핵 세포에서 성장, 분화, 생존에 중요한 역할을 하고 있는 Akt와 유사한 기능의 인산화 단백질을 *S. griseus* IFO 13350로부터 동정하고 이를 분리, 정제하고자 하였다. Akt kinase는 동물세포에서 세포 성장, 분화, 암 세포의 생존에 필수적인 ser/thr kinase로 특정 phosphorylation site를 갖는 (xxRxxS/TX, X: hydrophobic amino acids) 단백질을 기

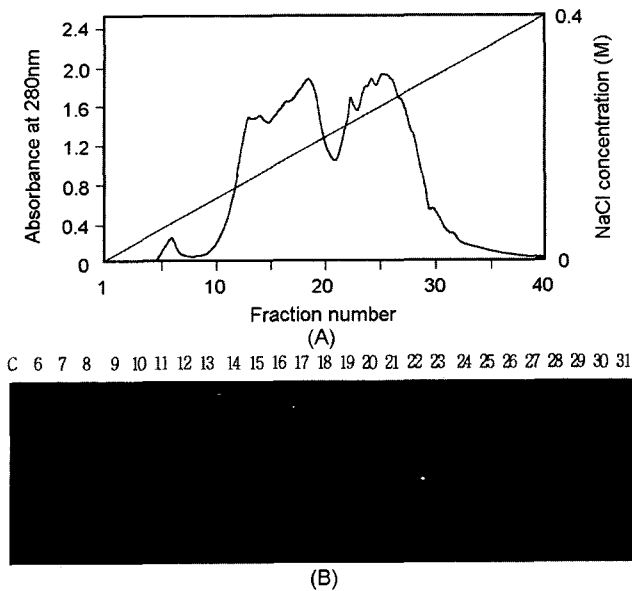


**Fig. 1. Phosphorylation of the FITC-labelled synthetic peptide by the cell-free extract prepared from *S. griseus* IFO13350.** The reaction mixtures were prepared as described in Materials and Methods. Lane 1 represents the substrate used in this study, and lane 2 and 3 represent the reactions with a intact cell-free extract (lane 2) and a heat inactivated cell-free extract (lane 3), respectively. The negative control without kinase source was loaded in lane 4. The arrow indicates the phosphorylated peptide that migrates faster than that of nonphosphotrylated form on Agarose gel electrophoresis.

질로 인식하여 인산화 시킴으로써 다양한 생리 활성을 유도한다[11, 15]. 따라서 Akt-specific phosphorylation site를 갖는 peptide에 형광 물질인 FITC를 부착시켜 합성한 FITC-peptide를 기질로 하고, *S. griseus* IFO 13350를 액체 배양하여 균체를 파쇄 한 후 얻은 crude extract를 kinase source로 이용하여 kinase assay를 실시하였다. 그 결과 Akt를 인산화 시키는 강한 활성이 *S. griseus* IFO 13350의 cell free extract로부터 확인되었으며, 이 활성은 열처리에 의하여 소멸되는 사실로부터 단백질에 기인한 것으로 판단되었다 (Fig. 1). 이러한 활성은 *S. griseus* IFO 13350 및 변이주 *S. griseus* HHI(A-factor deficient mutant, Streptomycin negative, sporulation negative)뿐만 아니라 *S. coelicolor*에도 존재하는 것으로 확인되었으며(data not shown), 일반적으로 다른 방선균에도 존재하고 있을 것으로 추정되었다.

#### 인산화단백질의 분리

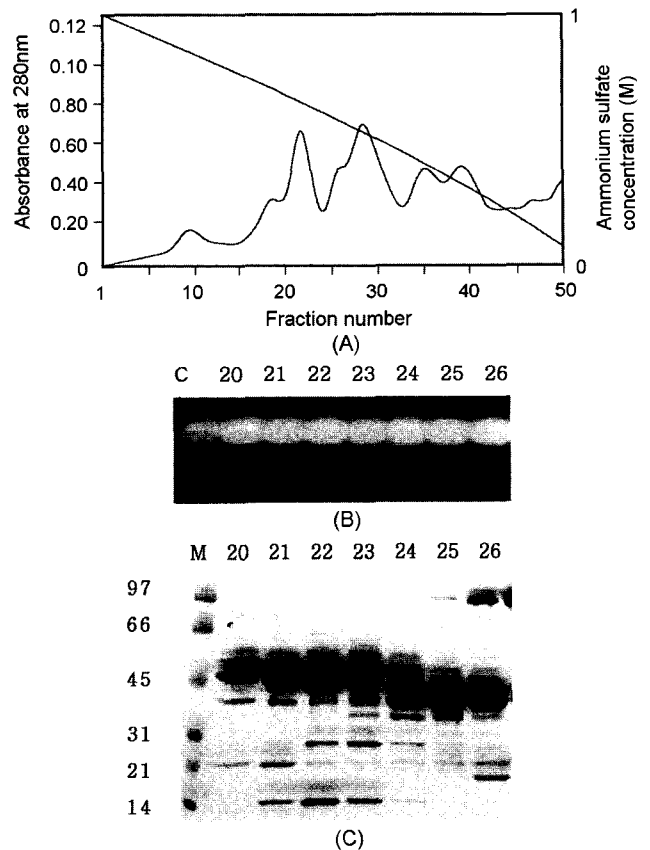
인산화 단백질의 분리 정제를 위하여 *S. griseus* IFO 13350를 10 L 분 배양하고, 원심분리기로 균체만을 회수하여 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄 하고 다시 원심분리기로 cell free extract를 조제하였다. 조제한 세포 추출액에 ammonium sulfate를 첨가하여 40-70% ammonium sulfate 농도에서 침전하는 단백질을 원심분리기로 회수하였으며, 이를 다시 DEAE-Sepharose ion exchange column chromatography를 수행하였다. 단백질 용출은 동일 원추액에 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 M 의 농도가 되도록 NaCl을 첨가한 용출액을 사용하여 단계적으로 용출을 실시하였다. 각 염 농도에서 얻어진 분획중 단백질이 존재하는 부분만을 모아 인산화 시험을 실시 한 결과, 0.2 M NaCl을 함유한 용출액에



**Fig. 2.** The elution profile (A) and the kinase activity of each fraction (B) obtained from Mono Q anion-exchange column chromatography after 40-70% ammonium sulfate fractionation and DEAE-Sepharose FFQ Ion exchange chromatography. The fractions (fraction number from 13 to 30) that have the strong kinase activity were pooled and used for the next purification step.

서 활성을 확인하였다. 활성이 강한 용출액만을 모아 투석을 실시한 후 Mono Q column을 이용한 FPLC를 수행하였다. 단백질 분리 시 유속은 1 ml/min로 수행하였고, 0.1 M에서 0.6 M사이의 NaCl 염 농도 구배를 사용한 용출 방법을 사용하였다. 용출된 각 분획을 인산화 시험으로 활성을 확인하였고(Fig. 2), kinase 활성을 보이는 부분만을 모아 소수성 column인 Resource Phenyl-Superose column chromatography(Fig. 3)와 Gel permeation column chromatography (Fig. 4)를 수행하였다. 단백질 정제를 통해 얻은 각 분획 중 활성을 나타내는 분획과 활성이 없는 분획을 SDS-PAGE로 전기영동을 실시하였고, 나타나는 단백질의 분자량의 차이를 비교 조사한 결과, kinase로 예상되는 두 종의 단백질을 확인할 수 있었다(Fig 3, 4). 예상되는 두 종의 단백질을 칼로 잘라내어 1 M Tris-Cl[pH 7.2] 용액에서 2시간씩 2회 평형화 시킨 후 겔을 잘게 부수고 완충액으로 함유 단백질을 용출시켜 이를 인산화 단백질로 사용하여 kinase assay를 실시한 결과, 약 39 kDa의 분자량을 갖는 단백질만이 인산화 활성을 나타내고 있음을 확인하였다. 이전의 인산화 저해제를 이용한 보고에서, *S. griseus*의 인산화 단백질 16종 중 진행생물 인산화 단백질 저해제에 의하여 저해 받는 단백질이 상당수 있는 것으로 판명되었으며, 이 중의 1개가 동일한 분자량을 갖는 것으로 판단된다[6].

세포로부터 조제한 cell-free extract를 100,000 X g에서 90분간 원심분리하여 세포막 분획과 세포질 분획을 분리하여



**Fig. 3.** The elution profile (A) and the kinase activity of each fraction (B) obtained from Resource Phenyl hydrophobic chromatography. The fractions that show the phosphorylating activity were analyzed by 4-20% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (C). C in (B), control reaction without kinase; lanes 20-26 in (B) and (C), same fractions as numbered in (A); M in (C), low molecular weight size marker.

Akt kinase 활성을 측정하였다. 그 결과, 세포질과 세포막 분획 양쪽 모두에 활성이 나타났으나, 세포질 분획보다는 세포막 분획에서 훨씬 강력한 활성을 보여주었다(data not shown). 본 결과로부터 방선균에는 세포질과 세포막에 각각 상존하는 적어도 2가지 이상의 ser/thr kinase가 존재하는 것으로 추측되며, 본 연구에서 동정한 kinase는 세포질에 존재하는 kinase 중의 한 개로 추측된다. 또한, 배양 시간에 따른 Akt kinase 활성을 조사한 결과 활성은 전반적인 성장에서 모두 나타나고 있으나, 배양 40시간 이후인 stationary phase에서 강하고 이후 80시간까지는 동일한 것으로 관찰되었다(data not shown). 따라서, ser/thr kinase는 세포의 성장 후기에 더욱 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 사료되며, 본 결과는 이들 진행생물적 인산화 단백질이 원핵생물의 분화과정에 주로 관여할 것이라는 이전의 보고와 일치한다[6, 7, 8]

**분리된 인산화단백질의 N-말단 해석**

분리된 분자량 39 kDa의 단백질이 Akt kinase 와 유사한

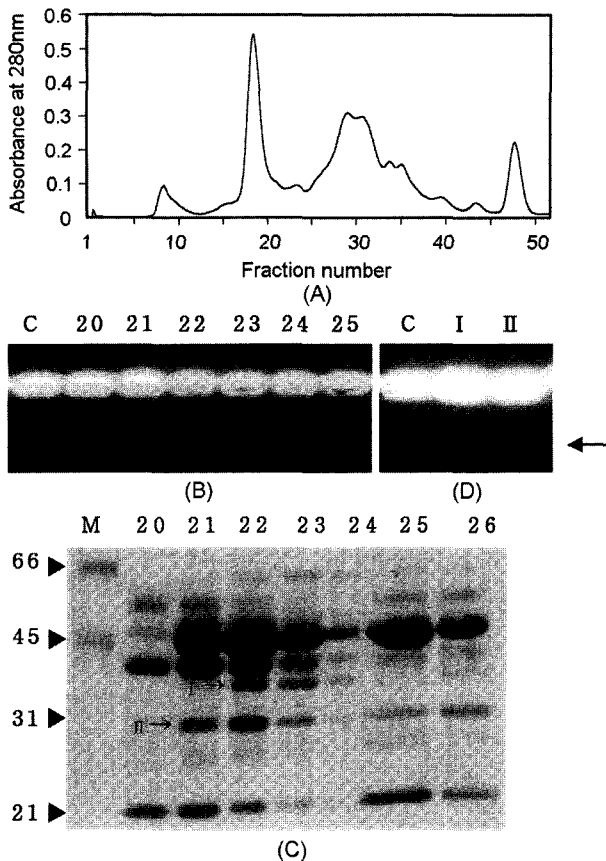


Fig. 4. The elution profile (A) and the kinase activity of each fraction (B) obtained from Superdex HR 75 gel permeation chromatography. The fractions that show the phosphorylating activity were analyzed by 4-20% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and two proteins (protein I and II) were expected as candidates for the kinase (C). The candidates for the kinase were cut and recovered from the gel in their renatured forms as described in Materials and Methods. Protein I with a molecular weight of 39 kDa gave the phosphorylating activity for the designed FITC-labelled synthetic peptide (D). The numbers in (B) and (C) means the fraction number, and the roman numbers I and II in (D) represent two protein bands in (C), respectively.

기질특성을 갖는 인산화 단백질인 것으로 추정되어 이에 대한 연구를 진행하기 위하여 단백질의 N-terminal sequencing을 실시하였다. 우선 SDS-PAGE로 전개한 단백질 밴드를 Western transfer과정으로 PVDF membrane에 옮긴 후, 해당 밴드만을 잘라 3차 증류수로 충분히 씻은 후, 상온에서 건조하여 분석을 의뢰하였다. 분석결과 N-terminal이 blocking되어 있는 것으로 추정 되었으며, 아미노산 서열을 결정할 수 없었다. 내부 아미노산 배열을 결정하기에는 세포 내에 존재하는 조절 단백질의 양이 적고 다단계의 분리 단계를 거쳐 최종적으로 얻어지는 단백질의 양이 너무 적어 많은 시도를 하였으나 이 이상의 실험은 불가능 한 것으로 판단되었다.

## 요 약

방선균은 토양속에 서식하는 그람 양성 세균으로 세포성장의 어느 시기에 영양세포가 이어져 연쇄상의 기균사를 형성하고 그 끝에 포자를 형성하는 동시에 생리학적 분화로 표현되는 다양한 이차대사물질을 생산한다. 이들의 복잡한 생활사에 따른 분화에는 진핵생물의 ser/thr protein kinase와 원핵생물의 his/asp acid protein kinase 등과 같은 다양한 신호전달 단백질들이 조절을 담당하고 있다. Akt kinase는 진핵생물에서 보고된 ser/thr kinase로 세포내의 다양한 신호전달기구를 조절하고 있으며, 세포내의 Akt kinase의 활성화 또는 불활성화가 세포 증식, 분화, 생존, 세포사등의 신호전달에 결정적인 역할을 담당한다. 방선균으로부터 Akt kinase와 유사한 기능을 갖는 신호전달 단백질을 규명하기 위하여, Akt kinase의 target 단백질들의 인산화 부위 보존영역으로부터 나타나는 아미노산의 consensus sequence를 기초로 하여 형광물질로 라벨시킨 합성 peptide(FITC-TRRSRTESIT)를 제작하였다. 제작한 기질 peptide에 인산화가 일어나면 아가로스 전기영동상에서의 운동성에 차이가 나타나고, 이를 자외선하에서 형광 peptide를 관찰하는 방법으로 인산화 assay를 실시하였다. *S. griseus* IFO 13350을 배양한 cell-free extract로부터 ammonium sulfate fractionation과 DEAE-Sephacrose, Mono Q, Resource Phenyl-Superose, Gel permeation 등 수 단계의 column chromatography를 통하여 Akt 유사 단백질을 정제하였다. 그 결과 방선균에도 고등생물의 Akt와 유사한 기질특이성을 갖는 인산화 단백질이 존재하는 것으로 판단되었으며, 그 중의 하나는 분자량이 39 kDa 정도의 크기를 갖는 단백질로 판명되었다. 지금까지의 인산화 단백질 연구는 활성측정법이 어려워 연구자들에게 많은 제한을 주어 왔지만, 본 연구에서 사용한 합성 peptide를 이용하는 방법을 보다 다양한 인산화 단백질에 대하여 적용한다면, 인산화 단백질 및 조절물질 개발에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 예상된다.

## 감사의 글

본 연구는 과학재단 목적기초연구(R01-2000-00109) 연구비 지원에 의하여 행하였으며 지원에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Bourret, R. B., K. A. Borkovich, and M. I. Simon. 1991. Signal transduction pathways involving protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 401-441.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

3. Chi, W.-J., J.-M. Kim, S.-S. Choi, D.-K. Kang, and S.-K. Hong. 2001. Overproduction of SGPA and SGT Induces Morphological Changes in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1077-1086.
4. Choi, S.-S., W.-J. Chi, J. H. Lee, S.-S. Kang, B. C. Jeong, and S.-K. Hong. 2001. Overexpression of the *sprD* Gene encoding *Streptomyces griseus* protease D stimulates actinorhodin production in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol.* **39**: 305-313.
5. Distler, J., K. Mansouri, G. Mayer, M. Stockmann, and W. Piepersberg. 1992. Streptomycin biosynthesis and its regulation in *Streptomyces*. *Gene* **115**: 105-111.
6. Hong, S.-K., A. Matsumoto, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1993. Effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **236**: 347-354.
7. Hong, S.-K., M. Kito, T. Beppu, and S. Horinouchi. 1991. Phosphorylation of the AfsR product, a global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **173**: 2311-2318.
8. Hong, S.-K. and S. Horinouchi. 1998. Effects of protein kinase inhibitors on *in vitro* protein phosphorylation and on secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. of Microbiol. Biotechnol.* **8**: 325-332.
9. Hong, Y.-S., C. K. Hwang, S.-K. Hong, Y. H. Kim, and J. J. Lee. 1994. Molecular cloning and characterization of the aklavinone 11-hydroxylase gene of *Streptomyces peucetius* sub sp. *caesius* ATCC 27952. *J. Bacteriol.* **176**: 7096-7101.
10. Horinouchi, S., K. Miyake, S.-K. Hong, D. Vujaklija, K. Ueda, and T. Beppu. 1991. Regulation by A-factor and afsR of secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Actinomycetologica* **5**: 119-125.
11. Kang, S.S., T. Kwon, D. Y. Kwon, and S. I. Do. 1999. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase V subunit. *J. Biol. Chem.* **274**: 13085-13090.
12. Kim, I. S. and K. J. Lee. 1996. Chymotrypsin-like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiology* **142**: 1797-1806.
13. Kim, J.-M. and S.-K. Hong. 2000. *Streptomyces griseus* HH1, an A-factor deficient mutant, produces diminished level of trypsin and increased level of metalloproteases. *J. Microbiol.* **38**: 160-168.
14. Kwon, H.-J., S.-S. Lee, S.-K. Hong,, U. Park, and J.-W. Suh. 1999. Cloning and characterization of a heterologous gene stimulating antibiotic production in *Streptomyces lividans* TK24. *J. Microbiol.* **37**: 101-110.
15. Kwon, T., D. Y. Kwon, J. Chun, J. H. Kim, and S. S. Kang. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J. Biol. Chem.* **275**: 423-428.
16. Moncheva, P. A., S. T. Danova, S. K. Antonova, and I. V. Ivanova. 1997. Physiological role of extracellular proteases and calcium ions in the processes of differentiation and antibiotic production by *Streptomyces albogriseolus* 444. *Antibiot. Khimioter.* **42**: 14-19.
17. Park, U. and S.-K. Hong. 1998. Regulatory factors involved in physiological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Actinomycetologica* **12**: 134-140.
18. Vujaklija, D., K. Ueda, S.-K. Hong, T. Beppu, and S. Horinouchi 1991. Identification of an A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 119-128.

(Received Apr. 15, 2002/Accepted July 20, 2002)