

Streptomyces somaliensis가 생산하는 세포의 Phospholipase D의 유전자 서열 분석과 Transphosphatidyltion 활성 특성

정수진 · 이선희 · 임태봉*

전북대학교 자연과학대학 생물과학부

세포의 phospholipase D (PLD)를 과량 생산하는 균주 JE-11을 토양으로부터 분리하였다. 16S rDNA에 의한 분석과 형태적, 생리적 특성을 조사한 결과 이 균은 *Streptomyces somaliensis*로 동정되었다. 선발한 *S. somaliensis*로부터 PLD를 암호화하는 유전자(sspld)를 분리하고 염기서열을 조사하였다. Open reading frame을 분석한 결과 33개의 아미노산으로 이루어진 분비 signal peptide와 505개의 아미노산으로 구성된 PLD 단백질을 암호화하는 것으로 예상되었다. 또한, sspld의 염기 서열로부터 유추된 단백질 서열은 기존에 보고된 다른 *Streptomyces* PLD들과 70-88%의 서열 유사성을 보였다. 이 PLD는 96-98%(mol/mol)의 수율로서, phosphatidylcholine을 glycerol과 serine을 기질로 하여 각각 phosphatidylglycerol과 phosphatidylserine으로 전환을 하였으나, 알코올 공여체인 inositol과 ethanolamine과는 반응하지 않았다.

Key words: phospholipase D, *Streptomyces somaliensis*, transphosphatidyltion

서 론

Phospholipase D (PLD, EC 3.1.4.4)는 물의 존재 하에서 phosphatidylcholine (PC)을 phosphatidic acid (PA)와 choline으로 가수분해를 촉매하거나, PC의 choline기와 알코올 공여체 간의 교환을 촉매하는 효소이다. 이 효소는 세포내 신호 전달에 중요한 효소이기 때문에 대부분 생물체에서는 극미량으로 발견되지만 일부 식물들의 종자와 특정 종류의 *Streptomyces* spp.에서는 상당량 생산하는 것으로 알려져 있다. 특히, *Streptomyces* PLD는 식물 기원 PLD에 비해 더 높은 효소 활성과 transphosphatidyltion 전환 특성을 보이는 것으로 보고되고 있다(5). 최근 광우병 파동과 동물 바이러스의 감염위험 때문에 동물 조직으로부터 인지질의 추출이 어려워 졌으므로, 콩에 풍부히 존재하는 PC로부터 값비싼 인지질인 phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI)로 의 PLD에 의한 효소적 전환이 시도되고 있다. 이들 인지질들은 신호전달 물질일 뿐 아니라 세포막의 필수 성분으로서 뇌, 간 및 신경 섬유에 높은 농도로 존재하며 약리적, 영양학적 효과 때문에 식품, 화장품, 의약품, 건강보조 식품 등에 널리 사용되고 있다. 한 예로, PS와 PG는 노화에 의한 퇴행성 기억력 감퇴 억제 및 인지능력 상승 효과(1)와 노화 시 일어나는 망막 상피의 고사 억제 효과(14)들과 같은 중요한 생리적 효과들이 알려지고 있으므로 앞으로 기능성 약품이나 식품 등에서 이들 인지질의 수요량이 급증할 것으로 예상된다. 이전의 연구에서 PLD를 다량 생

산하는 *Streptomyces*의 선별을 위해 GenBank (NCBI)에 등록된 7종의 *Streptomyces* PLD들의 유전자 서열들과, *Streptomyces* sp.의 X-ray 결정 구조의 결과들을 고려하면서 표면에 위치하는 epitope들을 조사하였다(18). 이들 중, 적절하다고 판단된 한 epitope를 골라 합성한 뒤 이 peptide에 대한 항체를 만들었고, 이 항체를 사용하는 효소결합면역측정법(ELISA)를 통하여 PLD를 생산하는 58종의 *Streptomyces* 균들을 분리할 수 있었다.

이 연구는 수집한 균주들 중 가장 높은 PLD 가수 분해 활성(40U/ml 배양액)을 나타내어 산업적 잠재성이 큰 것으로 평가된 균을 대상으로 이 균의 동정과 PLD의 유전자 서열 분석 및 transphosphatidyltion 활성을 조사한 것이다.

재료 및 방법

미생물 균주의 선별 및 사용 시약

전주일원에서 얻은 토양 샘플들을 물에 희석한 뒤 nutrient agar에 30°C에서 48시간 배양하고 콜로니 모양으로부터 *Streptomyces*로 추정되는 균들을 1차 분리하였다. 24 well microplate well 각각에 1 ml의 Bennett 액체 배지(6)를 넣고 균들을 접종시킨 다음 30°C에서 72시간 교반하면서 배양하였다. 배양 후 배양액은 따로 모으고, PBS로 well을 세척한 다음 Uhm 등(18)의 방법에 따라 ELISA를 하였다. 발색된 well에 해당하는 배양액에 대해 choline oxidase-catalase assay(4)를 한 뒤 PC에 대한 가수분해 활성이 높았던 JE-11을 이 실험의 균주로 사용하였다. PC, PG, PS, PI, PA는 argon gas로 충전된 98-99% 순도의 제품(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)이었다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 063-270-3439, Fax: 063-270-3362
E-mail: tbuhm@chonbuk.ac.kr

16S rDNA의 부분 서열 분석

JE-11을 배양한 후 genomic DNA isolation kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용해 chromosomal DNA를 분리하였다. 16S rDNA내의 가변 부위를 PCR로 증폭하기 위하여 16S rDNA에서 일반적으로 사용하는 두 universal primers (27F [5'-AGAGTTTG ATCATGGCTCAG-3'], 1492R [5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3'])를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분간 변성하고, 95°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초씩 30번 반복하여 DNA를 증폭시키고 마지막으로 72°C에서 8분간 연장하여 PCR 반응을 종료시켰다. Agarose gel 전기영동 결과에서 약 1,400 bp의 증폭된 DNA를 분리한 뒤 이를 PCR cloning vector (Qiagen, Hilden, Germany)에 넣었다. 16S rDNA내의 가변 부위의 서열은 BLASTN Search Program (NCBI)를 통하여 GenBank의 database들과 비교 분석하였다. 16S rDNA의 서열에 대한 다중 정렬 분석은 CLUSTAL W (16)를 사용하였고, 거리 행렬에 기초한 근접군 연결법(12)에 의해 분지도를 작성하였다.

PLD 유전자의 클로닝과 유전자 서열 분석

BLASTN 프로그램을 사용하여 GenBank에 등록된 *Streptomyces* PLD들의 유전자 서열들을 비교한 뒤 이들 간에 잘 보존된 영역에 대해 PCR primer를 제작하였다. 선택한 보존 영역에 대한 두 primer는 다음과 같다. Forward primer, 5'-GTCTGA CGAACCACTCCAAGCT-3'; Reverse primer, 5'-CCGAAGTCC TGSAGCCA-3'. PCR 조건은 95°C에서 3분간 DNA를 변성한 다음, 95°C에서 1분, 50°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고 마지막으로 72°C에서 5분간 연장하여 PCR 반응을 종결시켰다. Agarose gel 전기영동 결과 900 bp에 해당하는 증폭된 DNA를 얻었고 이를 정제한 뒤 DIG DNA labelling kit (Roche, Mannheim, Germany)로 표식을 하여 Southern 및 colony hybridization을 위한 탐침으로 사용하였다(13). 탐침의 유전자 서열을 BLASTN에서 비교했을 때 GenBank에 보고된 7종의 *Streptomyces* PLD들과 71-89%의 서열이 일치하였다. JE-11을 배양하여 chromosomal DNA를 분리한 뒤 *Xho*I과 *Sal*I으로 각각 처리하고 1% agarose gel에 전기영동하여 1.5-3.5kb 분획을 elution하였다. 이를 동일한 제한 효소로 처리한 각 pBluescript SK (-) vector (Stratagene, La Jolla, USA)와 ligation시킨 뒤 competent cell인 *E. coli* DH5에 형질 전환시켜 2 종류의 genomic DNA library를 만들었다. Colony hybridization을 한 후 탐침을 이용하여 PLD 유전자가 삽입된 colony를 분리하였고, 플라스미드를 분리한 후 유전자 서열 분석을 하였다. *Xho*I으로 처리한 genomic DNA library에서 PLD 함유 transformant를 고르고 이의 PLD 서열을 분석한 결과 3'-말단 전에서 끊어져 있었으므로 *Sal*I으로 처리한 다른 genomic DNA library로부터 같은 방법으로 PLD 함유 플라스미드를 분리한 뒤 나머지 부분의 서열을 연결하였다. 정확한 PLD유전자 서열을 얻기 위하여 양방향 서열 분석을 하였고 정확하지 않은 부분들은 internal primer들을 이용하여 재분석을 하였다.

효소 활성의 측정

PLD의 transphosphatidylolation 활성 분석을 위해, 1 ml diethyl ether에 녹인 2.67 mmol 달걀 노른자 PC와 0.495 ml 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)에 녹인 0.5 mmol 또는 1.5 mmol의 알코올 공여체, 5 µl 조효소를 4 ml 반응유리병에 넣고 magnetic bar로 교반을 하면서 30°C에서 반응시켰다. 조효소는 배양 상등액을 80% ammonium sulfate로 침전시킨 후 protease inhibitor cocktail (Roche, Mannheim, Germany)이 첨가된 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0)에 용해시켜 조제하였으며 가수분해 활성은 4 U/µl 이었다. 가수분해 반응의 경우에는 알코올 공여체가 들어있지 않은 citrate buffer를 사용한 것 이외는 transphosphatidylolation 반응과 같았다. 일정 시간 반응 후 PLD의 가수분해 활성과 transphosphatidylolation활성은 HPLC에 의해 분석되었다. 컬럼은 Alltima silica column (3 µm, 100×4.6 mm) (Alltech, Deerfield, USA), 용매는 solvent A (isopropanol (IPA):n-hexane:H₂O:NH₄OH=57.8:40:2:0.2, v/v)와 solvent B (IPA:n-hexane:H₂O:NH₄OH=51.8:40:8:0.2, v/v)가 사용되었다. 용출 조건은 A 100%로 부터 B 100%까지 10분 간 농도 경사를 건 후 B 100%의 농도에서 12분간 유지하였으며 유속은 1 ml/min 이었다. 컬럼을 통과한 인지질은 Alltech 2000 증기 광 산란 검출기(Alltech, Deerfield, USA)로 검출하였으며, drift tube온도는 80°C, N₂ gas flow는 2.0 L/min이었다. 반응 산물은 표준물질의 용출 시간과 비교하여 확인하였고, 각 인지질의 양은 peak 면적을 구한 후 표준물질 정량 직선으로부터 계산되었다. 가수분해 활성과 transphosphatidylolation 활성단위로써 1 unit (U)는 상기 반응 조건에서 1분 당 1 ml diethyl ether에서 1 µmol의 인지질의 생산을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다.

EMBL 접속번호

선발 균주 JE-11이 생산하는 *Streptomyces* PLD의 유전자 서열은 European Bioinformatics Institute (EMBL)에 제출하였다 (accession no: EMBL AJ657582).

결과 및 고찰

균의 동정

전주일원의 토양에서 채취한 균주들 중 ELISA 분석에 의해 PLD를 생산하는 균들을 선발하였다. 이들 중 한 균이 다른 균들에 비해 높은 PLD 가수 분해 활성을 가지고 있었기 때문에 이 균의 동정을 위해 16S rDNA분석을 시도하였다. 16S rDNA의 variable region에 대한 염기 서열 분석 결과 총 1,465개의 염기로 이루어져 있었으며(결과는 보이지 않았음) 이를 BLASTN program (NCBI)에서 서열 유사성을 조사하였다. 높은 염기 서열 일치도를 나타낸 균주들은 모두 *Streptomyces* 들로만 검색되어 분리한 균이 *Streptomyces*에 속한다는 것을 예상할 수 있었다. 서열 일치도 순으로 나타난 100개의 *Streptomyces* 균주들 중 서열 유사성이 가장 높게 검색된 것은 *S. somaliensis* strain M29 (GenBank accession no. AJ007401)로 1,465개의 염기 서열 중

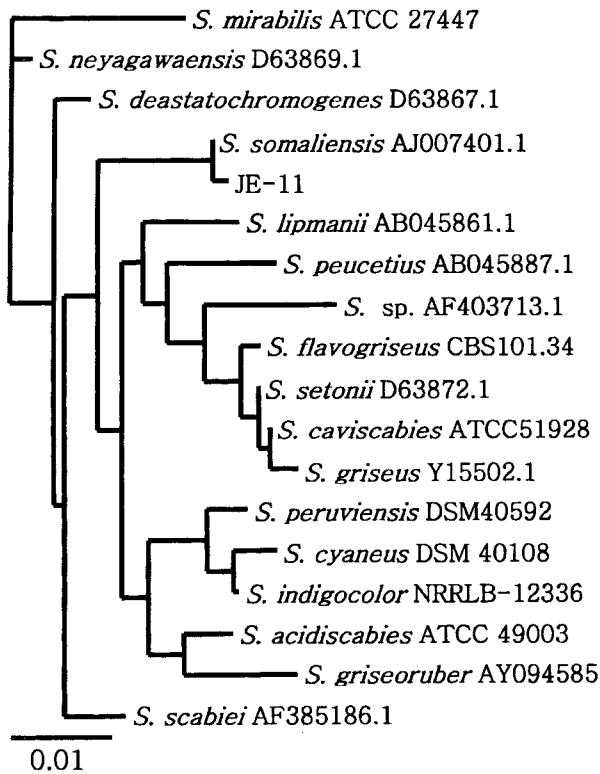


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the relationships among *Streptomyces* sp. JE-11 is the strain selected in this study for the production of phospholipase D. Scale bar represents 1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides.

같은 위치의 2개 염기에서 차이를 제외한(568번째 C가 T로, 590 번째 A가 G로 치환) 나머지 1,463개의 염기 서열은 정확하게 일치하였다. 16S rDNA 서열에 의한 균 동정의 정의(15)에 따르면 이와 같이 높은 서열 유사성을 보이는 이 균은 *S. somaliensis*일 가능성이 매우 높다. 계통학적 분지도 결과에서도 JE-11이 *S. somaliensis*와 가장 유사하다는 것을 보여주었다(Fig. 1). 보다 정확한 동정을 위하여 Bergey's manual (8)과 Trujillo 등(17)의 방법에 따라 일반적인 동정 분석을 하였고 그 결과는 Table 1에 요약되었다.

16S rDNA의 서열 결과와 함께, Table 1의 결과들은 *S. somaliensis*가 가지는 형태적, 영양학적, 생화학, 생리적인 특성들과 매우 잘 부합하였으므로 JE-11 균을 *S. somaliensis*로 동정하였다. *S. somaliensis*는 드문 예이기는 하지만 다른 *Streptomyces* 균들 같이 얇게 인간의 피하조직 내에 종양 형태의 덩어리 (actinomycetoma)를 형성할 수 있는 것으로 보고되어 있다(10). 정확한 기작은 현재까지 알려져 있지 않으나, 이 균이 조직 내로 침투와 조직에서 균사체성장을 하기 위해서는 세포 조직들의 와해와 영양소 공급이 필요 할 것이다. 세포외로 다량의 PLD를 분비하는 *S. somaliensis*의 생리적 특성을 고려해 볼 때 피부 조직에서 침투와 생존에 PLD가 중요한 역할을 할 수 있으리라 추측된다.

Table 1. Morphological, biochemical and cultural characteristics of the selected strain, JE-11.

Test	JE-11	<i>S. somaliensis</i>
Cultural characteristics	Aerobic	Aerobic
Growth shape and size in liquid culture	Opt. temp 28°C Yellowish beads; 0.5-2 mm D.	Yellowish beads
Growth on the plates		
Substrate mycelium	+	+
Colony size	2-3 mm	
Colony surface	velvet, yellow	
Nutritional tests		
Sole carbon and energy sources (1%, v/v)		
D(+)-arabinose	-	-
D(-)-fructose	+	+
D(+)-galactose	-	-
D(+)-glucose	-	-
D(+)-lactose	-	-
D(+)-maltose	-	-
D(+)-melibiose	-	-
D(+)-raffinose	+	+
L(+)-rhamnose	-	-
D(+)-ribose	-	-
D(+)-trehalose	-	-
D(+)-xylose	-	-
Glycerol	+	+
D(-)-mannitol	-	-
Glutamine	-	-
Glycogen	-	-
Glucosamine	-	-
Physiological tests		
Growth in the presence of phenyl ethanol (0.2%)	-	-
Growth at pH 11	-	-
Growth in the presence of carbenicillin (90 ug/ml)	-	-
Endopeptidase test		
CBZ-L-arginine-7-amono-4-methyl coumarine	+	+

PLD 유전자의 서열 분석

PLD를 암호화하는 유전자 *sspld*를 찾기 위하여 GenBank에 이미 보고된 세포외 PLD를 생산하는 8종의 *Streptomyces* 유전서열들을 BLASTN에서 비교하였다. 그 결과, 매우 잘 보존된 염기서열 영역이 있음을 알았고 이 부분에 대한 PCR을 하여 *sspld*를 찾는 probe로 사용하였다. *sspld*를 함유하는 insert의 제한 효소 지도와 1,836bp의 염기 서열 결과는 Fig. 2와 3과 같다. Open reading frame (ORF)은 종결코돈이 끝나는 133번째 염기 서열 뒤에서부터 종결코돈이 시작되는 1,791번째 앞까지 1,657bp로 구성되어 있었으나 ORF내에서 ATG로 시작되는 개시코돈을 찾을 수 없었다. 이러한 현상은 *Streptovercillium cinnamoneum*의 PLD 유전자(11) 뿐만 아니라 다른 gram positive 세균의 유전자에서도 보고되었다(9). *Streptovercillium cinnamoneum*의 PLD유전자가 개시코돈으로서 TTG를 사용하는 것을 고려하면서 잠재적인 리보솜 결합 부위(Shine-Dalgarno sequence)와 signal peptide의 위치를 조사하였다. 그 결과 163-170번째에 잠재적인 리보솜 결합

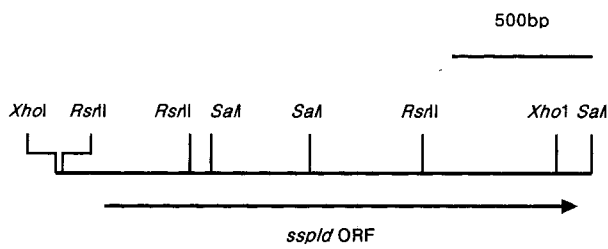


Fig. 2. Restriction map of a 1.836-kbp fragment containing the *sspld* gene. The location and direction of the *sspld* ORF is indicated.

부위가 있으면서, SignalP V1.1 프로그램으로 부터 signal sequence 시작이 예상되는 176번째 위치의 TTG가 개시코돈으로서 가장 적합하였다. 이 경우, PLD는 505개의 아미노산 잔기로 구성되며 유전자 서열로부터 유추된 단백질 분자량은 53,635 Da 을 나타낸다. BLASTP (NCBI)를 이용, 기존에 보고된 단백질 서열과의 유사성을 조사하였는데 오직 *Streptomyces* PLD들과 광범위

한 서열 일치성을 보였다. *Streptovercillum cinnamomeum* PLD인 경우 505개 아미노산 서열 중 88%(11), *S. sp* PLD에서는 504개 아미노산 중 81%(7), *S. septatus* PLD는 501개 중 81%(3), *S. halstedii* sub. *scabies* PLD(GenBank accession no. AB074305)는 501개 중 75%, *S. antibioticus* PLD 495개 중 73 % (5), *S. halstedii* PLD (GenBank accession no AB062136) 505개 중 70%, *S. sp* P821 PLD (GenBank accession no AY148098) 503개 중 70%의 서열 일치도를 나타냈다. 또한 *S. somaliensis*의 이 유전자는 모든 PLD에서만 공통으로 나타나는 2개의 HxK(x)₄D motif 인 HSKLLVVD (167-174번째), HHKMVSVD (439-446번째)를 가지고 있었다. 이러한 결과들로 볼 때 *sspld* 유전자는 분명히 PLD를 암호화하는 것으로 판단된다. 이를 증명하기 위하여, *sspld*를 발현벡터에 넣어 대장균에서 PLD를 발현시키고, 정제한 PLD를 이용하여 단백질의 N-말단 서열 및 단백질내의 펩타이드 서열을 확인하는 연구가 요구된다.

2	GGTCATACGCGAGACGTACGGCGCGGAGCGGACCGGAGGGCGCCCTCGGGAGGGGCGCTGACCGGAATCCGCCGGTGGGACCGACGTG	91
92	TCCTGTTCAACTGTTGACAACCTGATAAATCTCCGCGTGTGATCTCCGTTCCGCGGAATCGTTCCTCGTTTAAGGATGCACAAITGCTC	181
1		L L 2
182	CGCCACCGGCTCCGCGCTTACGCGCTCTCACCGCAGTGGGACGGTCTCTGCCGTGGTCCCTCCCGCGGCCCCCGGCTTC	271
2	R H R L R R L R R L T R S A T V S A V V L A A L P A A P A F	32
272	GCAAGCTCCTCGCGACCCCGCACCTCGACCGCGTCGAGAAGACGCTGCGTCAAGTCTCGCCCGGCTCGAAGGTGACATCTGGACGCG	361
32	A S S S P T P H L D A V E K T L R Q V S P G L E G D I W Q R	62
362	ACCGCGGTAACAAGCTGGACGCTCCGCGCGGACCCCTCCGACTGGCTCCTGCGAGGCCCGGTTGCTGGGGCGACGCCACGTGCGCG	451
62	T A G N K L D A S A A D P S D W L L Q S P G C W G D A T C A	92
452	GACCGCGCCCGCACCAAGCGGCTGCTCGCGAAGATGACCGAGAATCATCCAAAGCGAAGCGCACGCTCGACATCTCCACCCTCGCGCC	541
92	D R P G T K R R L L A K M T E N I S K A K R T V D I S T L A P	122
542	TTCCCGGACGCGCGTTCAGGACGCGATAGCGCGCGTCTCAAGCGCTCGGTGGAGTCCGGGAACAAGCTGCGCGTCCGCGTCTCGGT	631
122	F P D G A F Q D A I A A G L K A S V E S G N K L R V R V L V	152
632	GGCGCGCGCGGCTACACCATGAACGCTCTGCCACGAAGTACCGGGACGACCTCAAGCGCGTCTCGGCAAGCGCGCACGGGACATC	721
152	G A A P V Y H M N V L P T K Y R D D L K A R L G K A A D G I	182
722	ACGCTGAACGTCGCGTCAATGACCCAGTCAAGACCAAGCTTCTCTGGAACCACTCGAAGCTCCTCGTGGACGCGGACGTCGCGCATC	811
182	T L N V A S M T T S K T S F S W N H S K L L V V D G E S A I	212
812	ACCGCGGATCAACAGCTGGAAGGGGACTACCTCGACACCTCGCACCGGTCAGGACGTCGACATGGCCCTCACCGCGCGCGCGCG	901
212	T G G I N S W K G D Y L D T S H P V T D V D M A L T G P A A	242
902	AGCACCGCGGACGCTACCTGGACGCTCTGGACCTGGACGTCGCCGAACAAGACCAATCGCCAGCGTCTGGTTCGCGCGCTCGGGC	991
242	S T A G R Y L D T L W T W T C R N K S N I A S V W F A G S G	272
992	GGCGAGTGCATGCCACGATGGAGAAGGACGCCAACCCACCCCGCGCGCGGACGCGGACGTCGCCGATGCGCGTCCGCGGACTC	1081
272	G E C M P T M E K D A N P T P A A P T G D V P V I A V G G L	302
1082	GGCGTGGGATCAAGGACTTTGACCCCGCTCGAAGTTCACCCCGGACGCTGCCGACCCCGCGGACCAAGTGGTGGTGGTGGG	1171
302	G V G I K D F D P A S K F T P Q L P T A P D T K C V V G L P	332
1172	GACAAGACCAACCGGACCGTGAATACGACACGCTCAACCCGAGGAGCGCGCTGCGGGCCCTGGTGGCCAGCGCGGACCGCCAGATC	1261
332	D K T N A D R D Y D T V N P E E S A L R A L V A S A D R Q I	362
1262	GTGATCTCCAGCAGGACCTCAACGCCACCTGCCCGCCATCGCCGCTACGACATCGCCCTACGACGCCCTCGCGCCAGAGTGGCG	1351
362	V I S Q Q D L N A T C P P I A R Y D I R L Y D A L A A K M A	392
1352	GCCGGCGTGAAGTCCGATCGTCAAGCAGCCCGCCAAACCGCGCGCGGTCGGCAGCGCGGCTACTCGCAGATCAAGTCCCTGGCG	1441
392	A G V K V R I V V S D P A N R G A V G S G G Y S Q I K S L A	422
1442	GAGATCAGCGACACCTCCGACGCGCCTCGCCCTGGTACC3GGACACGAGAGGCCAAGGCCGCGATGTGCTCCACCTCCAGCTG	1531
422	E I S D T L R S R L A L V T G D Q Q K A K A A M C S T L O L	452
1532	GCCACCTTCCGACGCTCGCGCGGCGCCACCTGGGCGGACGCGAAGCGTACGCGCTGACCCACAAGATGGTGTCCGTTGGACGCTCCGCC	1621
452	A T F R S S P G A T W A D G K P Y A L H H K M V S V D S S A	482
1622	TTCTACATCGGCTCCAAGAACCTCTACCCCTCGTGGCTGCAAGTCTCGGCTACATCGTGGAGGCCGGAAGCCGCAAGCAGCTCGAG	1711
482	F Y I G S K N L Y P S W L Q D F G Y I V E S P E A A K Q L E	512
1712	GCCAAGTGTGACCCCGCTGGACGTACTCGCAGGCGCGCCGACGTTGCACTACGCGCGCGGCTGCTGCTGCGCTGAGCCCGGAC	1801
512	A K L L D P A W T Y S Q A A A T F D Y A R G V C S A *	539
1802	CACCGCGGTTTTCGCGGACGCCAAAGCGGGGAG	1836

Fig. 3. Nucleotide sequence (EMBL accession no. AJ627582) of the *S. somaliensis* phospholipase D gene and the deduced amino acid sequence. Putative Shine-Dalgarno sequence (nucleotides 163-170) is shown in boldface. The signal sequence (nucleotides 176-274) is underlined. Asterisk indicates stop codon.

Table 2. Effect of the donor on the transphosphatidylolation activity of *S. somaliensis* phospholipase D and its conversion yield.

Substrate	Alcohol donor	Donor conc. (M)	Activity ^{a,c} (U)	Conversion ^{b,c} (% , mol/mol)	PA ^{b,c} (% , mol/mol)
PC	Serine	1	73	89	10
		3	167	96	3
	Glycerol	1	134	99	trace
		3	200	99	trace
	Ethanol-amine	1	0	0	0
		3	0	0	0
	Inositol	1	0	0	30
		3	0	0	2

^aAverage enzyme activity (mol PC disappeared/min ml diethyl ether) during the initial 10 min under the standard assay conditions.

^b100% means the conversion of 2.67 mmol of PC to 2.67 mmol of other phospholipids.

^cAverage values obtained from three separate HPLC runs.

Transphosphatidylolation 활성

PLD의 transphosphatidylolation 특성은 PC로부터 상업적 가치가 있는 다른 인지질로의 효소적 전환에 매우 중요하다. 조효소 5 ul(4U 가수분해 활성/ul)의 촉매하에서, diethyl ether에 녹은 PC와 수용액에 녹아있는 알코올 공여체 사이의 효소 반응 결과는 Table 2와 같다. 4가지 알코올 공여체에 대해 관찰된 초기 반응 속도는 3M 농도의 glycerol에서 200U의 transphosphatidylolation 활성을 나타내 물에서 반응(가수분해) 속도인 20U보다 10배가 더 컸으며 거의 100%(mol/mol)의 PG로 전환율을 보였다. 이 경우 물의 농도(52.45M)는 glycerol 농도보다 훨씬 높음에도 불구하고 반응 후 물에 의한 transphosphatidylolation 산물인 PA는 거의 발견되지 않았다. 이것은 D'Arrigo 등(2)의 결과와 배치되는데 그 이유는 *S. somaliensis* PLD가 알코올 공여체로서 물보다 glycerol에 높은 친화성을 갖고 있기 때문으로 해석된다. 한편, 3M의 L-serine의 농도에서 transphosphatidylolation 활성은 167U로서, 같은 농도의 glycerol 반응보다 낮았고, 물과의 반응 때문에 부산물로 생기는 PA는 3% (mol/mol)가 생성되어 효소에 대한 serine의 친화도가 glycerol보다는 떨어지는 것으로 보인다. 또한, 알코올 공여체로 inositol을 사용한 경우 PA만 30% (mol/mol)가 생성되었고, inositol 농도를 증가했을 경우에는 PA의 생성량은 오히려 떨어졌다. 또한 공여체로 ethanolamine을 사용한 경우 PE뿐 아니라 PA도 생성되지 않는 것으로 봐서 ethanolamine은 이 효소를 저해하는 것 같다. 이들 효소의 기질 친화도 및 반응 기작에 대한 자세한 연구는 효소 kinetics 연구를 통해 앞으로 밝혀질 필요가 있다.

*S. somaliensis*는 많은 양의 PLD를 세포외로 분비하며, 이 효소가 PC를 PG와 PS로 96-99% 이상 전환하는 것으로 볼 때 산업적 잠재성이 매우 큰 균주로 생각된다. 앞으로 균 배양 조건의 최적화 및 효소 정제조건의 개발이 요구된다.

감사의 말

본 연구는 2001년도 전북대학교 지원연구비(엄태봉)와 한국과학재단 연구비(R05-2003-000-12021-0(2003))의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Crook, T.H., J. Tinklenberg, J. Yesavage, W. Petrie, M.G. Nunzi, and D.C. Massari. 1991. Effects of phosphatidylserine in age-associated memory assessment. *Neurology* 41, 644-649.
- D'Arrigo, P., L. de Ferra, V. Piergianni, A. Selva, S. Servi, and A. Strini. 1996. Preparative transformation of natural phospholipids catalyzed by phospholipase D from *Streptomyces*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 21, 2651-2656.
- Hatanaka T., T. Negishi, M. Kubota-Akizawa, and T. Hagishita. 2002. Purification, characterization, cloning and sequencing of phospholipase D from *Streptomyces septatus* TH-2. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 233-241.
- Imamura, S. and Y. Horiuchi. 1978. Enzymatic determination of phospholipase D activity with choline oxidase. *J. Biochem.* 83, 677-680.
- Iwasaki Y., H. Nakano, and T. Yamane. 1994. Phospholipase D from *Streptomyces antibioticus*: cloning, sequencing, expression, and relationship to other phospholipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 290-299.
- Jones, K.L. 1949. Fresh isolates of *Actinomycetes* in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J. Bacteriol.* 57, 141-145.
- Leiros I., F. Secundo, C. Zambonelli, S. Servi, and E. Hough. 2000. The first crystal structure of a phospholipase D. *Structure Fold. Des.* 8, 655-667.
- Locci, R. 1989. The *Actinomycetes* II, p. 2340. In S.T. Williams and M.E. Sharpe (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
- Lofdahl, S., B. Guss, M. Uhlen, L. Philipson, and M. Lindberg. 1983. Gene for *Staphylococcal* protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 697-701.
- Nasher M., D. Wethered, R.J. Hay, E.S. Mahgoub, and S.A. Gumaa. 1987. The ultrastructure of actinomycetoma grains caused by *Streptomyces somaliensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 174-179.
- Ogino C., Y. Negi, T. Matsumiya, K. Nakaoka, A. Kondo, S. Kuroda, S. Tokuyama, S. Kikkawa, T. Yamane, and H. Fukuda. 1999. Purification, characterization, and sequence determination of phospholipase D secreted by *Streptomyces cinnamomeum*. *J. Biochem.* 125, 263-269.
- Saitou N. and M. Nei. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.

13. Sambrook J. and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., p. 6-33. Cold Spring Harbor, New York, New York.
14. Shaban H., C. Borrás, J. Vina, and C. Richter. 2002. Phosphatidylglycerol potently protects human retinal pigment epithelial cells against apoptosis induced by A2E, a compound suspected to cause age-related macula degeneration. *Exp. Eye Res.* 75, 99-108.
15. Stackebrandt E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849.
16. Thompson J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
17. Trujillo M. and M. Goodfellow. 2003. Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic *Sporoactinomycetes* and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 39-68.
18. Uhm T.B. and S.H. Lee. 2003. A peptide antibody for rapid screening of *Streptomyces* species producing phospholipase D. *Biotechnol. Lett.* 25, 883-886.

(Received July 7, 2004/Accepted August 10, 2004)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence of an Extracellular Phospholipase D Gene from *Streptomyces somaliensis* and Transphosphatidylation Activity of Its Enzyme

Sujin Jeong, Sun-Hee Lee, and Tai-Boong Uhm* (Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

A bacterial strain JE-11 found to produce active extracellular phospholipase D (PLD) was selected from the soil isolates. It was identified as *Streptomyces somaliensis* on the basis of 16S rDNA sequence analysis, morphological and physiological characteristics. The gene (*sspld*) encoding *S. somaliensis* PLD was isolated and characterized. The open reading frame was suggested to encode 538 amino acids with a signal peptide of 33 amino acids. The deduced amino acid sequence of the *sspld* shared a sequence similarity of 70-88% with PLDs of other *Streptomyces* sp. so far reported. The PLD converted phosphatidylcholine to phosphatidylglycerol or phosphatidylserine with the yield of 96 to 99% (mol/mol), but did not act on inositol or ethanolamine as a transphosphatidylation donor.