

발광 박테리아 *Photobacterium phosphoreum*의 Lumazine Protein을 코드 하는 유전자의 염기 서열 분석 및 발현

우영은 · 김소영 · 이찬용*

충남대학교 자연과학대학 생화학과

Lumazine protein은 *lux operon*의 하류 영역에 존재하는 riboflavin synthase와 아미노산 상동성을 보일 뿐만 아니라, riboflavin synthase의 기질인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (lumazine)과 결합하여 청록색의 형광을 내게 하는 형광 단백질이다. 발광세균 *Photobacterium phosphoreum*의 lumazine protein을 코드하는 유전자의 염기서열을 결정하였는데, 이 유전자는 *lux operon*의 656 bp 상류의 영역에 존재하며, *lux operon*과는 서로 반대 방향으로 전사되는 것으로 나타났다. 중합효소 연쇄 반응(PCR: Polymerase Chain Reaction)의 방법으로 아미노-말단 절반 lumazine protein을 코드하게 되는 유전자(*lumP-N*)를 클로닝하여 형질전환의 방법으로 대장균에 유전자를 전이시켜 이들의 유전자의 발현 양상을 조사하여 보았는바, *lumP* 전체 유전자(*lumP-W*)가 삽입되어 있는 제조합플라스미드에서는 발현이 매우 미약한 반면에 아미노-말단(*lumP-N*)이 들어있는 경우는 과발현됨을 보였다.

Key words □ bioluminescence, lumazine protein, riboflavin synthase, *Photobacterium phosphoreum*, vitamin B₂

발광 박테리아는 자연에 가장 많이 존재하는 발광 생명체 (luminescent organism)로서 일부는 육지에 서식하기도 하나 대부분 어류와 공생체를 이루는 해양 박테리아이다(5, 15). 현재까지 집중적으로 연구가 되어진 대표적인 발광 박테리아는 *Photobacterium (P.) phosphoreum*, *P. leiognathi*, *P. (Vibrio) fischeri*, *Vibrio harveyi* 등이다. 박테리아에서의 발광반응은 아래의 반응식에서 보는 바와 같이 긴 사슬의 fatty aldehyde와 환원된 riboflavin 5'-phosphate (FMNH₂)가 발광 박테리아의 luciferase에 의하여 각각 FMN 및 RCOOH로 산화됨으로써 청록색의 빛이 나타나게 된다(16, 17).



Photobacterium 에서 정제된 luciferase가 *in vitro* 반응에서 내는 방출 스펙트럼은 495 nm 영역이나 실제의 *in vivo*에서 내게 되는 최대의 발광 광도는 단파장으로 이동되어 약 475 nm인 것으로 알려지고 있다(4, 13, 19). 이것은 lumazine protein이라 불리는 단백질이 luciferase와 상호작용하기 때문인 것으로 알려져 있으며 이 단백질의 청색을 띠게 하는 발색단으로 작용하는 ligand가 riboflavin 전구체인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (lumazine)으로 동정된 이후 lumazine protein으로 명명되었다(6). 만일 이 lumazine protein을 *in vitro* 반응에 첨가시킨다면 생물발광의 스펙트럼은 단파장으로 이동되어 lumazine protein의 농도가 10 μM 되었을 때 *in vivo* 생물발광 스펙트럼과 일치하게 되는 것

로 보아(19, 20) lumazine protein이 sensitization 기능을 지니고 있음을 강력히 시사해 주고 있으나(13, 23) 이 기능의 작용 기전은 아직 명확하게 규명되어 있지 않은 상태이다.

지금까지 *P. leiognathi* 741과 *P. phosphoreum* A13에서 lumazine protein을 코드하게 되는 유전자가 클로닝 되었는데, 그 유전자는 *lux operon*의 약 700 여 bp 상류 영역에 위치하며 *lux operon*과 반대 방향으로 전사되는 것으로 밝혀졌다(14, 21). Lumazine protein은 riboflavin synthase의 기질인 lumazine과 형광 발색단으로서 결합하게 되며, 정제된 riboflavin synthase의 peptide 서열분석 결과 이들 두 단백질이 1차 구조에서 아미노산 상동성을 보였다(22, 24). 이 뿐만 아니라 lumazine protein 유전자와 riboflavin synthase 유전자는 *lux operon* 영역의 상류와 하류에 각각 존재하며 서로 반대 방향으로 전사될 것으로 사료되어 생화학적으로나 분자유전학적 측면에서 흥미를 유발시키고 있다(11). 따라서 본 단보에서는 저자의 전의 연구(9, 26)에 의하여 *lux operon*의 하류 영역에서 riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들이 존재하는 것으로 알려진 *P. phosphoreum* NCMB844에서 lumazine protein을 코드 하는 유전자에 대한 염기서열 분석 및 PCR을 통한 아미노-말단 절반만을 가진 유전자를 제조하여 대장균에서의 발현 양상을 조사하여 보았다.

재료 및 방법

재료

제한효소, T4 DNA ligase, DNA polymerase의 Klenow fragment는 New England Biolab 혹은 Pharmacia에서 구입하였으며, 그 밖의 riboflavin, ampicillin, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-821-5482, Fax: 042-821-7547
E-mail: cylee@cnu.ac.kr

(IPTG) 등은 Sigma 제품을 사용하였다.

균주 및 vector

본 연구 실험에 쓰여진 주요한 세균 균주들은 *P. phosphoreum* (NCMB844), *Escherichia coli* M15 등이며, 플라스미드로는 pNCO113 (25)이 cloning vector로 쓰였다. *P. phosphoreum* DNA가 포함되어 있는 재조합 플라스미드를 지닌 *E. coli* XL-1은 100 µg/ml의 ampicillin을 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배양액에서 자라게 하였다.

DNA 염기서열분석

P. phosphoreum lumP 유전자의 DNA 염기 서열은 dideoxy chain termination 방법을 응용한 자동 염기서열 분석 장치에 의하여 결정되었다.

중합효소 연쇄 반응 (PCR, Polymerase Chain Reaction)

*P. phosphoreum*의 *lumP* 유전자의 아미노-말단 도메인 (PplumP-N) 혹은 전체 *lumP* 유전자 (PplumP-W) 만을 포함하는 DNA 절편의 증폭은 다음과 같은 방법에 의하여 이루어졌다. 독일 MWG사에서 합성된 5'GGAGAAATTAACCATGTTCAAAGGTATTGTTTC3'(lump1)와 5'GTCCTGCAGTTAACCTTTCCCAA GGAGTGATC3'(lump3) 혹은 5'GTCCTGCAGTTATAAAGGATC ATATTTATATG3'(lump5)에 의한 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 시켜 PCR 산물을 정제한 후, 제한 효소 인식부위를 만들기 위해 5' 말단에 *EcoRI* 인식 부위를 포함하고 있는 프라이머 ACACA GAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATG (MF)와 제한 효소 *PstI* 인식 부위를 지닌 위의 lump3 혹은 lump5 프라이머를 써서 다시 한 번 중합효소 연쇄 반응을 시켰다. 최종 혼합물 50 µl에는 polymerase를 위한 표준 완충용액에 50 pmol의 프라이머들, 300 ng의 주형 DNA로 쓰여진 재조합 플라스미드 PpEE.pT7-5 (11), 각각의 농도가 1.25 mM인 4 종류의 dNTP, 그리고 0.25 U의 Vent DNA polymerase (New England Biolabs)가 첨가되었다. 중합효소 연쇄반응은 자동 thermal cycler에서 95°C에서 1 분간의 변성, 55°C에서 1 분간의 복원, 그리고 72°C에서 1 분간의 신장 과정을 35 회 반복하였다. 아미노-말단 *lumP* 유전자 혹은 전체 유전자를 포함하는 이 DNA 절편을 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단하여 같은 제한 효소로 절단된 벡터 pNCO113에 연결시켜 재조합 플라스미드 PplumP-N.pNCO 혹은 PplumP-W.pNCO를 제조하였다.

P. phosphoreum lumP 유전자의 대장균에서의 발현

P. phosphoreum lumP 유전자만을 대장균에서 특정하게 발현시키기 위하여 *P. phosphoreum lumP* 유전자가 포함된 재조합 플라스미드 PplumP-N.pNCO과 PplumP-W.pNCO를 *E. coli* XL-1에 전이시킨 다음, 형질 전환체를 37°C에서 660 nm의 OD값이 0.6 까지 되도록 배양한 다음, IPTG를 최종농도 1 mM 첨가한 후 4 시간 더 배양시켰다.

결과 및 고찰

저자의 전의 연구 결과에 의하여 *P. phosphoreum* NCMB 844의 *lux* operon의 하류 영역에서 4 개의 riboflavin 합성에 관련된 유전자가 발견되었고(8, 9), 그 기능이 동정되었다(Fig. 1A) (12). *P. phosphoreum*의 *luxG* 다음의 첫 번째 유전자가 코드 하는 단백질이 riboflavin synthase라는 사실은 분자유전학적 측면에서 흥미를 갖게 하는데, *P. phosphoreum* A13에서 클론된(21) lumazine protein과 riboflavin synthase와 약 30%의 아미노산 상동성이 있을 뿐 만 아니라, *P. phosphoreum* A13의 *lumP* 유전자가 *luxC* 유전자와는 반대 방향으로 전사되었기 때문이다(Fig. 1A).

Riboflavin 생합성 유전자가 발견된 *P. phosphoreum* NCMB 844에서의 *lumP* 유전자에 대한 정보를 얻기 위해 저자의 전의 연구 결과(10, 11)에 의하여 *lux* 유전자의 클로닝 및 서열 분석에서 얻어진 *lux* operon을 포함하고 있는 DNA가 pT7 플라스미드에 삽입되어 있는 일련의 재조합 플라스미드를 조사한 결과, 그 중 pT7-5에 삽입되어 있는 *P. phosphoreum*의 *HindIII*-*BamHI* DNA 절편 (PpHB.pT7-5 in Fig. 1A)는 *luxC* 상류로부터 약 2 kbp 정도까지 뻗어 있었다(Fig. 1B). Lumazine protein 유전자가 *luxC* DNA 상류 영역으로부터 700여 bp 분리되어 있는 *P. leiognathi* 741 및 *P. phosphoreum* A13의 경우와 같이 (14, 21) *P. phosphoreum* NCMB844에서도 이 영역에 lumazine protein을 코드 하는 유전자가 있음을 발견하고 이들에 대한 DNA 염기 서열 결정을 완료하였다.

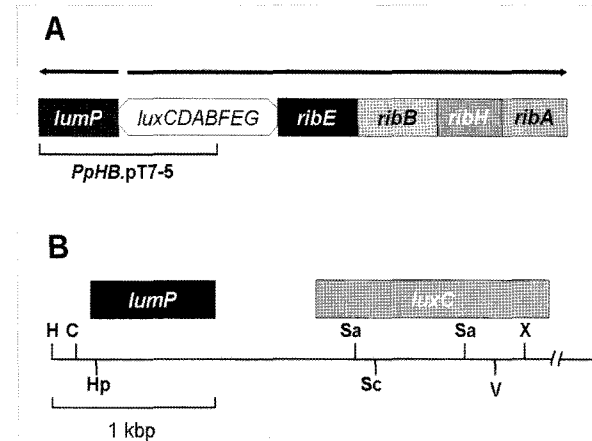


Fig. 1. (A) Gene organization of *lux* operon region of *P. phosphoreum*. The functions of the gene products are as follows: *lux* CDABFEG coding for *lux* proteins (luciferase and fatty acid reductase complex) involved in bacterial bioluminescence reaction, *lumP* for lumazine protein, *ribE* for riboflavin synthase, *ribB* for dihydroxy butanone 4-phosphate synthase, *ribA* for GTP cyclohydrolase II, and *ribH* for lumazine synthase (12). Arrow indicates the direction of transcription. (B) Physical map of the upstream of *lux* operon from *P. phosphoreum* (11). C, *ClaI*; H, *HindIII*; Hp, *HpaI*; Sa, *SalI*; Sc, *SacI*; V, *EcoRV*; X, *XbaI*.

Fig. 2 에서 보는 바와 같이 *lumP* 유전자는 예측대로 *luxC* 유전자의 656 bp 상류의 영역에 존재하였으며 *lux* operon과는 반대 방향으로 전사됨을 알 수 있었다. *lumP*의 initiation codon ATG로부터 6 bp 상류 DNA에 빈도가 높은 Shine-Delgarno 염기서열인 AGGAG가 존재하였으며, open reading frame의 종결 코돈 바로 아래에 ρ factor에 독립적인 전사 종결 요소로 작용하게 될 것으로 사료되는 전형적인 poly T strings가 이어져 있는 stem-loop 구조를 발견하였으며 Fig. 2에서 화살표로 표시하였다.

*P. photobacterium*의 *lumP* 유전자를 번역한 폴리펩타이드를 분

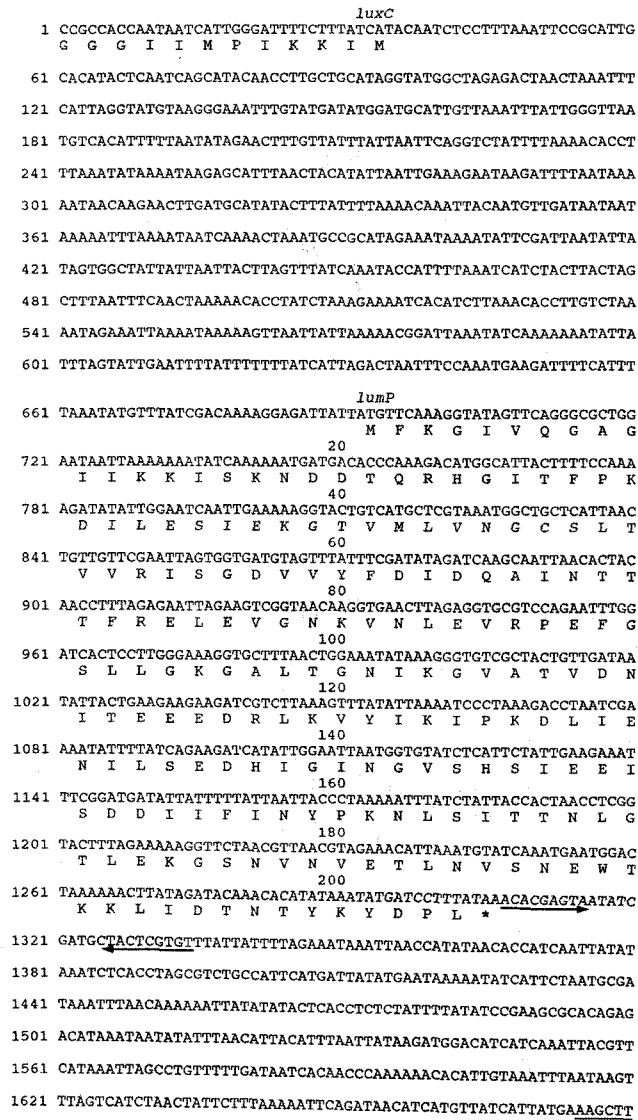


Fig. 2. Nucleotide sequence and corresponding translated amino acid sequences of the DNA containing *lumP* gene from *P. phosphoreum*. The nucleotide sequence (accession number L21989) was also found from the author's previous paper of *luxC* sequencing paper (11). The arrows are the sequences that could serve as part of ρ -independent termination site. The nucleotide sequence of *Hind*III restriction, AAGCTT are underlined.

석한 Fig. 3 에서 보는 바와 같이 이미 발견된 다른 발광 박테리아의 lumazine protein에 비하여 약 15 개의 아미노산이 많은 open reading frame으로 구성되어 있으며, codon usage를 분석한 결과 발광 박테리아에서 추출한 유전자가 *E. coli*에서 발현될 때의 한 요소로 작용되는(11) *E. coli*에서의 사용빈도가 0.2%로 매우 낮게 나타나는 Ile를 코드하게 되는 AUA codon이 205 codon 중 6 번 나타나 2.9%의 매우 높은 출현 빈도를 보였으며, *E. coli*에서 전체 Ile의 codon중 AUA codon이 약 2.8%가 나타나는 것으로 알려지고 있는데 lumazine protein 유전자에서는 40%의 출현 빈도를 나타냈다. Fig. 3에서는 여러 균주의 riboflavin synthase와 lumazine protein 혹은 yellow fluorescent protein과의 아미노산 상동성을 비교하였다. *B. subtilis*와 *Photobacterium* species의 riboflavin synthase는 45%의 아미노산 상동성이 있었으며, *Photobacterium* species의 riboflavin synthase와 lumazine protein과는 30% 정도의 아미노산 상동성을 보였다. 또한 여러 *Photobacterium* species의 lumazine protein은 자체적으로 상호간에 대략 80%의 아미노산 상동성을 보였으며, lumazine protein과 yellow fluorescent protein 그리고 riboflavin synthase와 yellow fluorescent protein은 각각 약 30%의 낮은 아미노산 상동성을 나

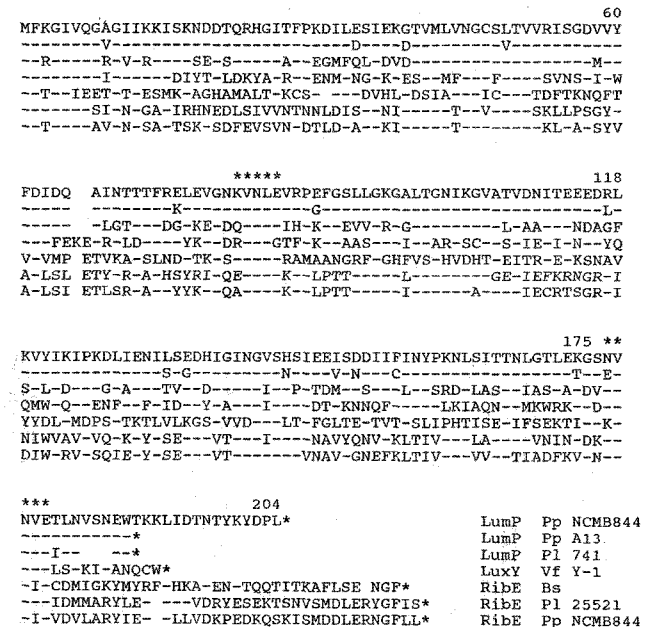


Fig. 3. Alignment of the predicted peptide sequences of lumazine protein (LumP), yellow fluorescent protein (LuxY), and riboflavin synthase (RibE), from different organisms. A horizontal dash indicates an amino acid identical to riboflavin synthase from *B. subtilis*, and gaps have been introduced at a few places to give maximum alignment. Asterisks indicate the potential lumazine binding sites. Lumazine protein from *P. phosphoreum* NCMB 844 (this study), lumazine protein from *P. leiognathi* 741 (14), lumazine protein from *P. phosphoreum* A13 (21) yellow fluorescent protein from *V. fischeri* Y-1 (2), riboflavin synthase from *B. subtilis* (18), riboflavin synthase from *P. leiognathi* ATCC 25521 (8), and riboflavin synthase from *P. phosphoreum* NCMB 844 (9).

타냈다. 그러나 Fig. 3에서 보는 바와 같이 약한 아미노산 상동성과 이들 단백질에 결합하는 ligand가 상이함에도 불구하고 아미노산 상동성이 매우 높게 보존된 영역이 존재함을 발견할 수 있었다.

또한 *Vibrio fischeri* Y-1에서 발색단으로 FMN과 결합하여 발광되는 빛을 청녹색에서 황색으로 변화시키는 것으로 알려진 yellow fluorescent protein 역시 riboflavin synthase과 약한 아미노산 상동성을 보이고 있어(2) 이들 lumazine protein과 yellow fluorescent protein을 코드 하는 유전자들은 riboflavin synthase를 코드 하는 유전자로부터 gene duplication에 의하여 생성되었으며, 이들 단백질들은 발광 박테리아의 빛을 내는 반응에 직접적으로 관여하는 luciferase 혹은 발광 반응의 기질들이 중합된 높은 에너지의 flavin-aldehyde 중간체와 상호 작용함으로써 발광되는 색을 변화시키는 것으로 추측 된다(22).

Riboflavin synthase에 의하여 촉매 되는 반응은 효소와 기질인 두 분자의 lumazine 사이의 ternary complex의 형성이 관여되는 것으로 인식되고 있으며 두 도메인에 lumazine 결합 자리일 것으로 생각되는 consensus sequence가 발견되었다(24). 본 연구에서 클로닝된 *P. phosphoreum*의 lumazine protein 유전자로부터 번역된 단백질의 아미노산 서열을 분석한 Fig. 4에서 보는 바와 같이, riboflavin synthase의 경우와 유사하게 이 단백질의 아미노-말단과 카르복시-말단 도메인 간에 내부의 아미노산 상동성이 있음을 보였다. 아미노-말단과 카르복시-말단 간에 상동성을 보이는 아미노산들은 검정색 박스로 표기하였으며, 유사한 성질을 갖는 아미노산들은 회색 박스로 나타냈다.

또한 lumazine protein을 코드 하는 *lumP* 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 아미노 말단 절반만을 포함하는 truncated *lumP* 및 전체 *lumP* 유전자를 포함하는 DNA 절편을 PCR 방법으로 증폭시켜 보았다. PCR 증폭에서 얻은 DNA 조각을 1.2 %의 agarose gel에서 분석한 결과 287 및 615 bp의 크기를 갖는 DNA를 확인할 수 있었다(lanes 1 and 2 in Fig. 5). 이 DNA 조



Fig. 4. Internal sequence homology between N-terminal and C-terminal of lumazine protein from *P. phosphoreum*. Upper. Domain of N-terminal half, amino acid residue 1-96. Bottom. Domain of C-terminal half, amino acid residue 97-204. Identical residues are dashed.

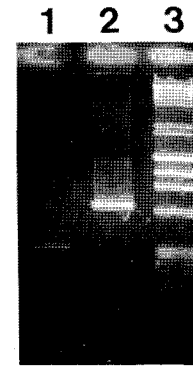


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of PCR-based amplified lumazine protein gene fragment. After PCR reaction, an aliquot (10 μ l) of PCR mixture was resolved by electrophoresis on 1.2% agarose (Nu-Sieve) gel in Tris-borate-EDTA buffer containing 0.5 μ g ethidium bromide per ml. The DNA fragment, produced by PCR was restricted at the *EcoRI* and *PstI* sites and ligated into pNCO113 digested at the same restriction site. Lane 1, PCR product of the DNA fragment containing the amino terminal half gene coding for the lumazine protein (*PplumP-N*); Lane 2, PCR product of the DNA fragment containing whole lumazine protein gene (*PplumP-W*); Lane 3, Lambda DNA/*HindIII* size marker (23.1, 9.4, 6.7, 4.3, 2.3, 2.0, 1.0, 0.8, 0.6 and, 0.3 kbp)

각을 에탄올 침전의 방법으로 세척시킨 다음 *EcoRI*와 *PstI* 제한 효소로 절단하여, 같은 제한효소로 절단된 pNCO113 벡터에 연결시켜 제조한 플라스미드 *PplumP-N*, pNCO 및 *PplumP-W*, pNCO를 제조하였다.

lumP 유전자의 발현 양상을 보여주는 Fig. 6의 4와 5 lane에서

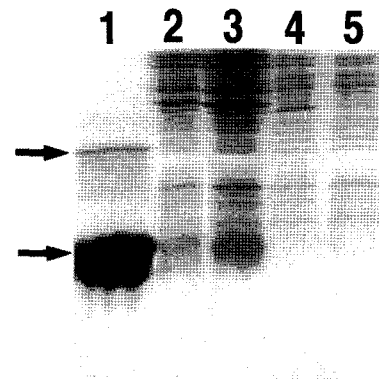


Fig. 6. Specific expression of the *lumP* gene from *P. phosphoreum* in *E. coli*. Transformed *E. coli* containing *PplumP-N*, pNCO plasmid (lane 2 and 3) and *PplumP-W*, pNCO (lane 4 and 5). Cell extracts from the supernatant were loaded on lane 2 and 4, and the pellets were on lanes 3 and 5, respectively. The partially purified 11 kDa N-terminal riboflavin synthase (C.Y. Lee *et al.*, unpublished data) from *E. coli* is shown in lane 1 by arrow in the bottom. The upper arrow in lane 1 indicates 22 kDa peptide of dimeric form of N-terminal domain of riboflavin synthase. The SDS/PAGE was performed by using the system of Laemmli (7) with 18% polyacrylamide resolving gel and 5 % stacking gel.

보는 바와 같이 전체 유전자를 포함하고 있는 PplumP-W. pNCO 재조합 플라스미드가 포함된 *E. coli* 내에서의 발현 정도는 매우 낮았다. 그러나 아미노 말단 절반만을 포함하는 PplumP-N. pNCO이 형질전환 된 *E. coli* 세포 추출물에서는 Fig. 6의 lane 2와 3에서 보는 바와 같이 약 10 kDa의 크기를 갖는 과발현된 아미노-말단 lumazine protein을 관찰할 수 있었다. Fig. 6의 lane 1에서는 부분 정제 상태로 분리된 (이찬용 등, 미발표 결과) 동일한 크기를 갖는 아미노-말단 절반의 riboflavin synthase를 marker로써 함께 전개시켰다. 아미노 말단의 riboflavin synthase는 쉽게 이량체를 형성되는 것으로 보고(3) 되었는데, 약 20 kDa 부근에서 이량체의 형태를 지닌 단백질이 관찰되었다.

대부분의 그램 음성세균들의 병원성 세균들은 비타민을 외부에서 얻을 수 없기 때문에 세균내의 생합성에 절대적인 의존성을 보이게 된다. 이러한 이유로 vitamin B의 생합성 경로는 화학제제 항생제의 개발 가능성의 타깃으로써 지대한 관심을 끌고 있으며 (1) riboflavin 생합성 효소에 관한 연구는 항생활성도 (antibacterial activity)를 지닌 합리적인 효소 저해제의 출발점을 제시할 수 있을 것이다. 본 논문의 lumazine protein 및 다른 발광 박테리아에서 발견된 yellow fluorescent protein들은 gene duplication에 기인하여 과생된 riboflavin synthase의 superfamily 일 것으로 추리되고 있다 (22).

그러므로 riboflavin synthase 효소 활성도가 소실된 채로 형광을 띠게 되는 lumazine protein과 riboflavin synthase의 binding site 및 active site를 함께 비교하고 분석하는 것은 매우 중요하고 요긴하다. 따라서 본 논문에서 제시된 lumazine protein의 아미노산 서열 분석 및 발현에 관한 자료는, riboflavin synthase 혹은 lumazine protein의 단백질-단백질 상호작용 영역, riboflavin synthase와 lumazine protein에서 발색단과 결합하는 아미노산 등, 기능적으로 작용하는 특정 아미노산 잔기(들)을 동정하고자 하는 위치지정 돌연변이등과 같은 가까운 미래에 수행되어야 할 실험의 기초 자료가 될 것이다.

감사의 말

본 논문은 한국과학재단의 국제협력연구과제(20025-209-07-2)에 의하여 이루어 졌으며, 본 연구 수행에 있어서 실험실 공간 및 실험 재료를 제공한 독일 문헨공대 A. Bacher 교수께 감사드립니다.

참고문헌

- Bacher, A. 1990. Biosynthesis of flavins. In *Chemistry and Biochemistry of flavoenzymes* (Muller, F. ed.) vol. I, CRC press, Boca Raton, FL., pp. 215-259.
- Baldwin, T.O., M.L. Treat, and S.C. Daubner. 1990. Cloning and expression of *luxY* gene from *Vibrio fischeri* in *Escherichia coli* and complete amino acid sequence of yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 29, 5509-5515.
- Eberhardt, S., N. Zingler, K. Kempter, G. Richter, M. Cushman, and A. Bacher. 2001. Domain structure of riboflavin synthase. *Eur. J. Biochem.* 268, 4315-4323.
- Gast, R and J. Lee. 1978. Isolation of in vivo emitter in bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 833-837.
- Hastings, J.W. and K.H. Neelson. 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 549-545.
- Koka, P. and J. Lee. 1979. Separation and structure of prosthetic group of the blue fluorescent protein from the bioluminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3068-3072.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of the structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, C.Y. and E.A. Meighen. 1992. The *lux* genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. *Eur. J. Biochem.* 201, 161-167.
- Lee, C.Y., D.J. O'Kane, E.A. Meighen. 1994. Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. *J. Bacteriol.* 176, 2100-2104.
- Lee, C.Y. 2000. Expression of the genes involved in the synthesis of riboflavin from *Photobacterium* species of bioluminescent marine bacteria. *Kor. J. Microbiol.* 36, 1-7.
- Lee, C.Y. and E.A. Meighen. 2000. The expression and DNA sequence of the gene coding for the *lux* specific fatty acyl-CoA reductase from *Photobacterium phosphoreum*. *J. Microbiol.* 38, 80-87.
- Lee, C.Y. and J.H. Im. 2002. The functions of riboflavin genes in the *lux* operon from *Photobacterium* species. *Kor. J. Microbiol.* 38, 173-179.
- Lee, J. 1993. Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence. *Biophys. Chem.* 48, 149-158.
- Lin, J. W., Y.F. Chao, and S.F. Weng. 1993. The lumazine protein-encoding gene in *Photobacterium leiognathi* is linked to *lux* operon. *Gene* 126, 153-154.
- Meighen, E.A. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 151-179.
- Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
- Meighen, E.A. 1994. Genetics of bacterial of bioluminescence. *Annu. Rev. Genet.* 28, 117-139.
- Mironov, V.N., M.L. Chikandas, A.S. Kraev, A.I. Stepanov, and K.G. Skryabin. 1989. Operon organization of genes of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 312, 237-240.
- O'Kane, D.J., A.J. Karle, and J. Lee. 1985. Purification of lumazine protein from *Photobacterium leiognathi* Normal *Photobacterium phosphoreum*: Bioluminescence properties. *Biochemistry* 24, 1454-1455.
- O'Kane, D.J., and J. Lee. 1985. Chemical characterization of lumazine protein from *Photobacterium leiognathi*: Comparison with lumazine protein from *Photobacterium phosphoreum*. *Biochemistry* 24, 1467-1475.
- 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.
- O'Kane, D.J. and D.C. Prasher. 1992. Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol. Microbiol.* 6, 443-449.
- Petushkov, V.N., B.G. Gibson, and J. Lee. 1995. Properties of recombinant fluorescent protein from *Photobacterium leiognathi* and their interaction with luciferase intermediates. *Biochemistry* 34, 3300-3309.
- Schott, K., J. Kellerman, F. Lottspeich, and A. Bacher. 1990. Ribo-

- flavin synthase of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequence of the α subunit. *J. Biol. Chem.* 265, 4204-4209.
25. Stuber, D., H. Matile, and G. Garotta. 1990. System for high level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins. Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure function analysis. In *Immunological Methods* IV (Lefkovits, I. and Pernis, P., eds), pp 121-152.
26. Sung, N.D. and C.Y. Lee. 2004. Coregulation of *lux* genes and riboflavin genes in bioluminescent bacteria of *Photobacterium phosphoreum*. *J. Microbiol.*, 42, 194-199.

(Received September 15, 2005/Accepted November 16, 2005)

ABSTRACT: Generation and Expression of Amino-Terminal Domain of the Gene Coding for the Lumazine Protein from *Photobacterium phosphoreum*

Young-Eun Woo, So-Young Kim, and Chan-Yong Lee*(Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

In this study, the amino-terminal half truncated *lumP* and the whole *lumP* genes from *Photobacterium phosphoreum* coding for the lumazine protein were cloned by polymerase chain reaction and expressed in *Escherichia coli*. To identify of the binding site of the ligand or substrate, the amino acid identities from the sequences of the lumazine protein, yellow fluorescent protein, and riboflavin synthase from different organisms were also compared and analyzed.