

Anti-Phosphoserine/Phosphothreonine/Phosphotyrosine Antibody Immunoaffinity Column Chromatography를 이용한 *Streptomyces griseus*의 인산화 단백질 동정

정용훈 · 김종희^{1*}

명지대학교 이과대학 생명과학정보학부, ¹서울대학교 식품영양과

Identification of Protein Kinases by Anti-phosphoserine/Phosphothreonine/Phosphotyrosine Antibody Immunoaffinity Column Chromatographies in *Streptomyces griseus*. Choeng, Yong Hoon and JongHee Kim^{1*}. Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ¹Department of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea – Protein kinases play very important role for maintaining viability in prokaryote and eukaryote. The metabolism of prokaryotic cell is generally regulated by bacterial two-component regulatory systems that are composed of histidine and aspartic acid kinases, however, some eukaryotic signal transduction system such as, serine and threonine kinases, have been also found to be involved in the regulation of morphogenesis and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Streptomyces griseus*, a streptomycin producer, was expected to have various types of eukaryotic-type serine/threonine protein kinases, controlling morphogenesis. Thus, many steps of chromatographies were applied to isolate serine and threonine kinases from *S. griseus* IFO13350. The immunoaffinity steps using anti-phosphoserine, anti-phosphothreonine, and anti-phosphotyrosine agarose column chromatographies were successfully introduced to identify eukaryotic protein kinases from *S. griseus* IFO13350. Eight proteins with the expected molecular weight of 14, 29, 31, 35, 40, 52, 56, and 60 kDa, were identified on SDS-PAGE, and the their kination activity was confirmed by nonradioactive protein kination assay using FITC-labeled peptide as the substrate.

Key words: protein kinase, *Streptomyces*, immunoaffinity column chromatography

서 론

방선균은 토양속에 주로 서식하는 그람양성세균이며, 원핵생물 중에서는 가장 진화된 형태의 균으로 알려져 있다. 그 이유는 방선균의 경우 1개의 포자가 발아하여 영양세포가 되고, 영양세포가 분열하여 이들이 연결된 상태의 mycelia를 형성하며, 이로부터 기균사가 공중으로 뿜어나와 그 끝에 구슬모양의 포자를 형성하는 형태학적 분화(morphological differentiation)를 거치는 생활사를 보이기 때문이다[1]. 또한, 특이하게도 방선균은 진핵생물과 유사하게 선형 염색체를 갖고 있으며, 환경의 변화에 따라 다양한 이차대사산물을 생산하는 생리학적 분화(physiological differentiation)를 한다는 점에서 진핵생물적 특징을 보인다[2]. 따라서 방선균의 이와 같은 특징은 원핵생물에서 발견되는 진핵생물적 생명현상이라는 점에서 학문적으로 큰 의의를 갖고며, 실제로 분자유전학적 연구 결과, 방선균에는 진핵생물에서 발견되는 신호전달기구가 존재하고 있고, 이들이 방선균내에서 일어나는 상기의 진핵생물적 속성을 조절하고 있는 것으로 생각되고 있다[15].

방선균의 형태 분화 및 생리적 분화를 조절하는 신호전달기구의 규명은 원핵생물을 대상으로 하여 진핵생물성 신호전달기구를 연구할 수 있다는 장점이 있다. 실제로 방선균에서 지금까지 밝혀진 신호 전달 기구에는 항생제 생합성 기구와 매우 연관성 있게 연구되어 왔으며, 그 예로 *S. coelicolor*에서는 진핵 세포성 serine/threonine계의 인산화 단백질의 신호 전달기구가 개입된 AfsL/AfsK/AfsR 및 전형적인 미생물의 two-component system인 AfsQ1/Q2계 등이 보고되어 있다[9, 16]. AfsL/AfsK/AfsR 단백질은 기존의 원핵 생물계에서 보고된 two-component signal transduction system의 구성 성분인 histidine kinase/aspartic acid kinase와는 아무런 상동성이 없고[3], 진핵생물계에서 보고되는 protein kinase C 또는 tyrosine kinase 들의 conserved region과 부분적으로 높은 상동성을 보인다[16]. 또한, AfsL/AfsK/AfsR이 구성하고 있는 phospho-relay는 serine/threonine-type의 kinase 임이 밝혀져, 이들과 같은 진핵생물계의 신호전달기구가 방선균에서도 존재하고 있음을 보여주었다[7, 16]. 최근, 보고된 *S. coelicolor* 유전체 정보로부터, *S. coelicolor* 유전자 중에는 이와 같은 진핵세포성 인산화 단백질이 40여종 존재하는 것으로 유추되었다.

Streptomycin 생산균주인 *S. griseus*는 미생물 호르몬으로 알려진 A-factor를 중심으로하는 세포분화 조절기구에 관해

*Corresponding author

Tel: 82-2-490-7508, Fax: 82-2-490-7507

E-mail: jonghee@seoil.ac.kr

자세히 밝혀져 있다[5, 10, 11, 14]. 또한 다양한 protein kinase inhibitor를 사용한 연구결과, *S. griseus*에도 다양한 serine/threonine/tyrosine-type의 진핵생물성 kinase들이 본균의 세포분화와 같은 진핵생물적 특성을 조절하고 있음을 발견하고[8], 본균을 대상으로 protein kinase에 관한 연구를 실시하였다.

Akt(Protein Kinase B)는 동물 세포에서 세포의 분화 및 생존에 중요한 역할을 하는 단백질이며 목적 단백질의 serine 잔기나 threonine 잔기를 인산화하여 세포사를 차단하고 세포의 암화를 유발한다[12, 13]. 이에 본 연구그룹은 Akt kinase에 의하여 활성화되는 목적 단백질의 인산화 부위에 존재하는 보존 영역으로부터 고안된 FITC로 표식한 형광 peptide를 이용하여, 방선균에도 Akt와 유사한 기질 활성을 갖는 serine/threonine protein kinase가 존재한다는 사실을 확인하였으며, 합성기질의 인산화를 추적하는 nonradioactive protein kination assay 법을 개발하여 *S. griseus* 세포추출액으로부터 인산화 단백질을 정제하여 보고하였다[6]. 하지만 재래적인 인산화 단백질 정제과정은 너무 길고 복잡하여, 최종적으로 분리된 단백질의 양이 너무 적은 어려움이 있었다. 이에 본 연구에서는 진핵생물성 인산화 단백질의 분리 정제를 위해 anti-phospho:threonine/phosphoserine/phosphotyrosine antibody를 이용하여 immunoaffinity column chromatography를 실시하였으며, 효과적으로 인산화 단백질을 동정할 수 있었다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 실험에 사용된 방선균 *S. griseus* IFO13350 균주는 동경대학의 Sueharu Horinouchi 교수로부터 제공받았으며, spore 상태로 20% glycerol에 넣어 -70°C에 냉동 보관하여 사용하였다[18]. *S. griseus*의 배양은 R2YE 배지[6]를 사용하였으며, R2YE 배지는 1 L당 sucrose 103 g, K₂SO₄ 0.25 g, MgCl₂ · 6H₂O 10.12 g, glucose 10 g, casamino acid 0.1 g, yeast extract 5 g, 0.5% K₂HPO₄ 10 ml, 3.68% CaCl₂ · 2H₂O 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.

균체 추출액 조제

단백질 정제 실험을 위해 R2YE 액체 배지 200 ml에 *S. griseus* IFO13350를 접종하여 28°C에서 3일간 전 배양 한 후, 10 L 배지에 접종하여 동일 조건 (28°C, 250 rpm)으로 3일간 본 배양을 실시하였다. 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 현

탁시키고 lysozyme을 최종 2 mg/ml의 농도로 첨가하여 4°C에서 1시간 처리한 후, 30초 간격으로 5회 sonication을 실시하여 균체를 파쇄하였고, protease 활성을 저해하기 위해 PMSF를 최종 0.2 mM 농도로 첨가하였다. 파쇄된 균체는 20,000 × g에서 30분간 원심분리하여 고형물질을 분리한 후 상등액만을 취하여 0.45 μm millipore filter로 여과하였다.

Ammonium Sulfate 분획 침전

상기의 여과된 균 추출액을 필요에 따라 40-70% 농도의 ammonium sulfate로 분획을 하였다. Ammonium sulfate 농축 시 단백질의 회수는 20,000 × 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, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 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 완충액에 평형화시킨 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 분취 하였다. 분리된 각 fraction을 이용하여 Akt 기질 peptide에 대한 protein kinase assay를 실시하였고 이중 활성을 보이는 fraction을 모아 dialysis 후 정제에 사용하였다

Immunoaffinity column chromatography

Anti-phosphothreonine(Sigma사, A-7951), anti-phosphoserine(Sigma사, A-8076), anti-phosphotyrosine(Sigma사, A-1806) agarose resin 각 1 ml씩을 이용하여 column chromatography를 하였다. 각 각의 resin을 polypropylene-column(PIERCE)

에 packing 한 후 50배 부피의 Buffer A(50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 충분히 세척하여 안정화 시킨 후 0.45 μm syringe filter로 여과한 단백질을 column 내에 주입하였다. 단백질 주입 후 50배 부피의 Buffer A로 세척하고, Buffer B(0.05 M glycine, 0.5 M NaCl, pH 2.7)를 이용하여 염 농도와 pH 변화에 따른 농도 구배 방식으로 단백질을 분리하였다. 각 용출액은 50 ml 씩 적용하였으며, buffer의 유속은 1 ml/min이고, 분리된 sample은 0.22 μm syringe filter로 여과한 후 Amicon filter를 이용하여 ultrafiltration을 실시 하였다.

Protein Kinase Assay 및 SDS-PAGE

Protein kinase assay는 형광 물질인 FITC 가 부착된 기질 (FITC-TRRSRTESIT)을 이용하여 실험하였다[6, 12]. 반응액은 FITC-peptide 5 μg , 2 \times Reaction buffer(40 mM HEPES [pH 7.2], 20 mM MgCl_2 , 20 mM MnCl_2 , 2 mM DTT, 40 mM ATP, 2 mg phosphatidyl serine as a PKC activator) 10 ml, sample protein 5 ml, 증류수를 혼합하여 총 부피를 20 ml로 조정하고, 30°C에서 30분 반응한 후 95°C에서 10분간 열처리로 반응을 정지시킨 sample을 0.8% agarose gel에서 전개하여 활성을 확인하였다.

정제된 단백질의 SDS-PAGE 분석 및 N-terminal sequencing

활성 있는 단백질의 양상을 확인하기 위하여, 0.1% SDS-12% PAGE를 실시하였다. 각 실험중의 단백질 정량은 Bradford 분석법을 이용하였으며, 표준품으로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다[4]. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution(0.1% coomassie blue R-250, 45% methanol, 10% glacial acetic acid)과 destaining solution (10% methanol, 10% acetic acid)를 이용하여 단백질 band를 확인하였다. 확인된 단백질 band는 transfer buffer(20 mM Tris base, 192 mM glycine, 20% methanol)를 사용하여, PVDF membrane으로 transfer(60V, 3시간 이상) 하였다. Transfer가 끝난 PVDF membrane으로부터 단백질 band를 잘라 상온에서 세척 및 건조한 후 N-말단 아미노산 서열 분석을 의뢰하였다.

결과 및 고찰

방선균의 복잡한 생활사에 따른 형태분화에는 진핵생물성의 serine/threonine protein kinase와 원핵생물성의 histidine/aspartic acid protein kinase 등과 같은 다양한 신호 전달 단백질들이 관여하고 있다[15]. Akt kinase는 진핵생물에서 보고된 serine/threonine kinase로 세포내의 다양한 신호 전달기구를 조절하고 있으며, 세포내의 Akt kinase의 활성화 또는 불활성화가 세포 증식, 분화, 생존, 세포사 등의 신

호전달에 결정적인 역할을 담당한다[12, 13]. 본 연구진은 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[6]. 제작한 기질 peptide에 인산화가 일어나면 아가로스 전기영동상에서의 운동성 차이가 나타나고, 이를 자외선하에서 형광 peptide를 관찰하는 방법으로 nonradioactive protein kination assay 방법을 고안하였다. 이러한 간편한 인산화 반응 assay를 이용하여 *S. griseus* IFO13350을 배양한 cell-free extract로부터 ammonium sulfate fractionation과 DEAE-Sepharose, MonoQ, Phenyl-Superose, Gel permeation 등 수 단계의 column chromatography를 통하여 Akt 유사 단백질을 정제하였다. 그 결과 방선균에도 고등생물의 Akt와 유사한 기질특이성을 갖는 인산화 단백질이 존재하고, 그 중의 하나는 분자량이 39 kDa 정도의 크기를 갖는 단백질을 밝힌 바 있다[6]. 이러한 이전의 연구를 기반으로, 인산화 단백질을 보다 간단히 정제할 수 있는 방법을 고안하였다. 따라서, phosphoserine과 phosphothreonine, phosphotyrosine에 특이적인 항체를 부착시킨 resin을 column에 충전하여 immunoaffinity column chromatography를 실시하였고, 이들의 인산화 기능을 nonradioactive protein kination assay로 추적하여 다양한 방법으로 인산화 단백질의 정제를 시도하였다(Fig. 1).

단백질 정제를 위하여 *S. griseus* IFO13350를 1 L 본 배양하고 sonication을 이용해 cell lysis한 후 분리한 단백질을 anti-phosphothreonine, anti-phosphoserine, anti-phosphotyrosine antibody를 이용한 affinity column chromatography

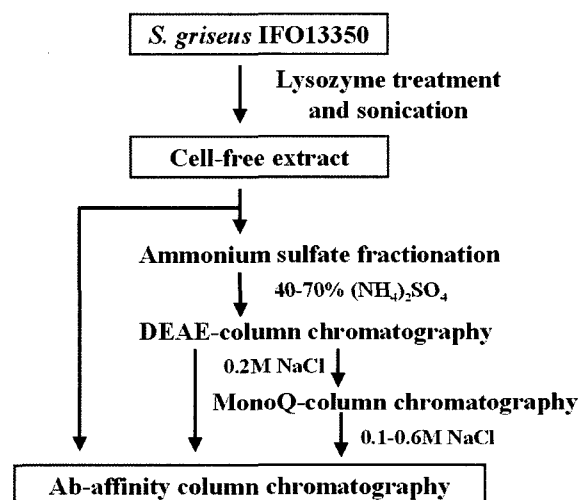


Fig. 1. Purification scheme for eukaryotic-type protein kinases by using anti-phosphoserine, anti-phosphothreonine, and anti-phosphotyrosine antibody column chromatographies from *Streptomyces griseus* IFO13350.

를 수행하였다. 컬럼에서 용출시킨 단백질은 pore size 10 kDa의 Amicon filter(Centricon)를 이용하여 ultrafiltration 농축을 하였고, 형광 peptide를 이용하여 농축된 단백질을 protein kinase assay를 실시하였다. 또한 이 단백질을 SDS-PAGE 하여 단백질의 양상을 비교 조사하였다. 컬럼에서 용출된 단백질 농축액은 형광 peptide를 인산화 시키는 것이 확인되었으며(data not shown), 동일 샘플의 SDS-PAGE 분석으로부터 14, 31, 40, 52, 60 kDa 정도의 분자량을 갖는 5종의 단백질이 동정되었다(Fig. 2). 이중 60 kDa 단백질은 세 컬럼에서 동시에 검출되었고, 14 kDa 단백질은 anti-phosphothreonine 및 anti-phosphotyrosine 컬럼에서, 52 및 40 kDa 단백질은 anti-phosphotyrosine 컬럼에서 주로 검출되었다. 이외에도 anti-phosphothreonine specific band 등도 약하게 검출되었는데, 이와 같은 사실로부터 한 개의 인산화 단백질의 인산화 부위가 간단히 serine, threonine, tyrosine 한 개로 한정되기 보다는 여러개의 잔기가 혼용되어 multiple phosphorylation이 일어나는 것으로 추정된다. 실제로 *S. coelicolor*에서 보고된 AfsL/AfsK/AfsR 단백질은 serine 및 threonine 잔기에 공통적으로 인산화가 일어나는 것으로 밝혀졌다. *S. griseus*에서 인산화 저해제를 사용한 이전의 연구에서 tyrosine phosphorylation을 저해하는 herbimycin 및 radicicol에 특이하게 sensitive한 단백질이 있는 것으로 확인되었고, 그 중 한 단백질의 분자량이 14 kDa에 해당할 것으로 예상되어 serine 및 threonine kinase 이외에 tyrosine kinase도 방선균에 존재할 것으로 예상된다[8].

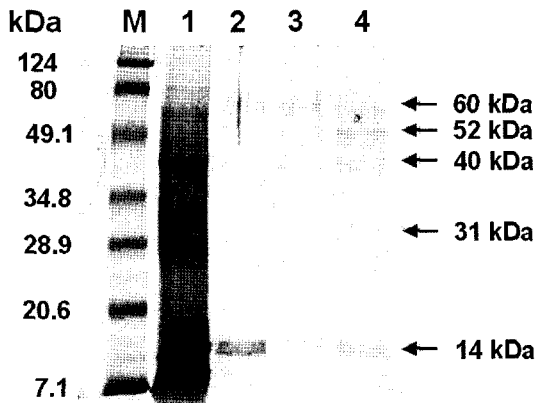


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the proteins isolated from immunoaffinity column chromatography. The cell-free extract of *S. griseus* IFO 13350 was applied to anti-phosphoserine, anti-phosphothreonine, and anti-phosphotyrosine affinity column. The eluates were concentrated by ultrafiltration and analyzed on SDS-PAGE, and applied onto nonradioactive protein kination assay. The arrow indicates the identified proteins on SDS-PAGE with the expected molecular weight. M, molecular weight standard; 1, total cell lysate; 2, eluate from anti-phosphothreonine column chromatography; 3, eluate from anti-phosphoserine column chromatography; 4, eluate from antiphosphotyrosine column chromatography.

세포추출액을 전처리없이 immunoaffinity column에 사용하는 방법은 효율성이 적다는 판단하에, 전처리 단계를 거쳐 단백질 정제를 시도하였다(Fig. 1). 세포추출액을 40-70% ammonium sulfate 분획을 실시하고, DEAE-column chromatography를 실시하여 0.2M NaCl로 용출된 샘플을 준비하였고, anti-phosphothreonine/phosphoserine/phosphotyrosine resin을 모두 섞어 한 컬럼에 섞어 채우고 immunoaffinity column chromatography를 실시하였다. 그 결과 14, 29, 31, 40, 52 kDa에 해당하는 5개의 단백질이 동정 되었다(Fig. 3). 또한, DEAE-column chromatography에서 얻은 샘플을 다시 MonoQ-column chromatography를 실시하였고 형광 peptide를 이용하여 인산화 assay를 실시하여 활성을 나타내는 부분을 분석한 결과 14, 29, 35, 40, 52, 60 kDa 정도의 6개의 단백질을 동정할 수 있었다(Fig. 4A). 또한 확인된 6종의 단백질을 nonradioactive protein kinase assay를 실시한 결과 강한 인산화 활성이 나타남을 알 수 있었다(Fig. 4B). 따라서 이들 각각의 단백질의 특성을 규명하기 위해, 비교적 많은 양을 확보한 분자량 14, 35, 52, 60 kDa의 단백질을 PVDF membrane에 transfer하여 아미노산 서열 분석을 실행하였으나, 정제된 단백질의 N-말단이 blocking되어서 아미노산 서열 분석에는 실패하였다.

기술한 바와 같이 본 연구에서는 진핵생물성의 serine/threonine protein kinase가 존재할 것으로 예상되는 *S. griseus* IFO13350으로부터, 진핵생물의 인산화 단백질 연구에 많이 사용하고 있는 anti-phosphoserine, anti-phospho-

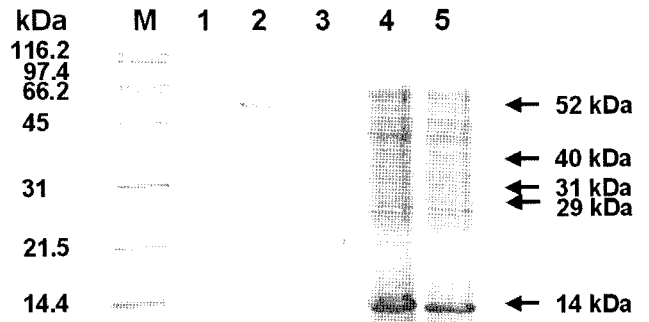


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the proteins eluted from mixed antibody column chromatography. The cell-free extract of *S. griseus* IFO 13350 was fractionated by 40-70% of ammonium sulfate and the precipitated protein was applied on DEAE column chromatography. The active fraction from DEAE column was concentrated and applied to the column mixed with three kinds of immunoaffinity resin. The eluates were concentrated by ultrafiltration and analyzed on SDS-PAGE. The arrow indicates the identified proteins on SDS-PAGE with the expected molecular weight. M, molecular weight standard; 1, protein sample eluted from the mixed antibody column and passed through the ultramembrane; 2, protein sample eluted from the mixed antibody column and concentrated by the ultramembrane; 3, washed buffer of the column after loading the protein sample; 4, protein sample before column chromatography; 5, protein sample after column chromatography.

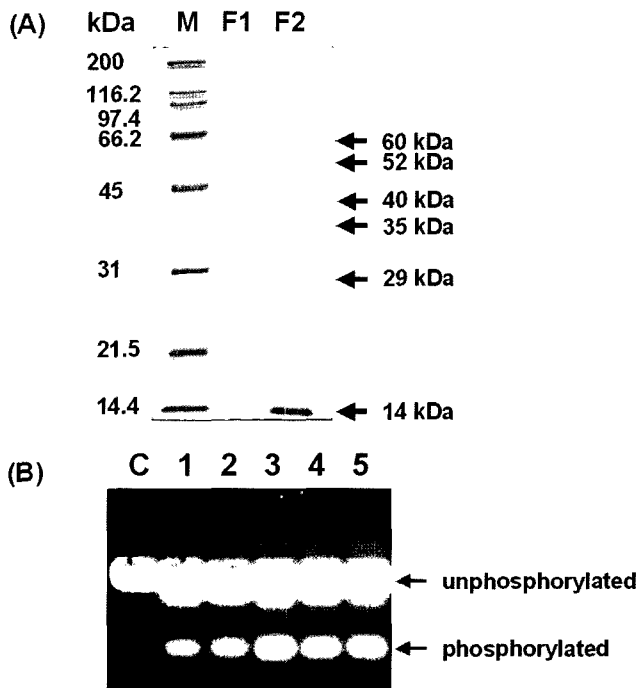


Fig. 4. SDS-PAGE analysis (A) and nonradioactive protein kination assay (B) of the proteins eluted from mixed antibody column chromatography. (A) SDS-PAGE analysis of the proteins. The active fractions from DEAE-column chromatography were combined and applied onto MonoQ Sepharose column chromatography. The active fractions from MonoQ column was concentrated and applied to the mixed resin of three kinds of immunoaffinity column. The eluates were concentrated by ultrafiltration and analyzed on SDS-PAGE. The arrow indicates the identified proteins on SDS-PAGE with the expected molecular weight. M, molecular weight standard; 1, protein sample from the first 50 ml eluate; 2, protein sample from the second 50 ml eluate. (B) Phosphorylation of the FITC-labelled synthetic peptide by the protein samples isolated from *S. griseus* IFO13350. The reaction mixtures were prepared as described in materials and methods. C, FITC-labelled peptide (substrate) only without kinase; 1, reaction with an intact cell-free extract; 2, reaction with the active fraction from DEAE column chromatography; 3, reaction with the active fraction from MonoQ column chromatography; 4, reaction with the sample concentrated from the first fraction from immunoaffinity column chromatography; 5, reaction with the sample concentrated from the second fraction from immunoaffinity column chromatography. The arrow indicates the phosphorylated peptide that migrates faster than that of nonphosphorylated form on agarose gel electrophoresis.

threonine, anti-phosphotyrosine antibody를 이용한 immunoaffinity column chromatography 방법으로 간편하게 인산화 단백질을 동정하게 되었다. 각각 서로 다른 방법으로 적용한 chromatography 과정에 따라 동정된 단백질의 분포를 Table 1에 정리하였다. 결과적으로 총 8가지의 단백질이 동정되었고, 이들은 대체적으로 컬럼에 사용한 인산화 잔기에 특이성을 보이고 있었다. 비록 단백질의 N-terminal blocking으로 단백질의 정보확보에는 실패하였지만, 이와 같은 방법이 방선균을 비롯한 다양한 개체에서의 인산화단백질 동정에 많은 도움이 될 것으로 사료된다. 특히, 진핵생물의 Akt kinase로부터 고안된 형광 peptide를 사용한 nonradioactive protein kinase assay 법도 다양하게 사용될 수 있음을 보여 주었다. 특히, 본 연구를 통해 방선균에도 tyrosine kinase가 존재할 것으로 예상되어 향후 이에 대한 연구가 필수적일 것으로 판단된다.

요 약

Protein kinase는 진핵생물과 원핵생물을 포함하는 모든 생명체에서 세포생존에 절대적으로 중요한 조절 기능을 담당한다. 일반적으로 원핵생물은 histidine 과 aspartic acid kinase로 구성된 bacterial two-component regulatory system에 의하여 환경변화에 따른 유전자의 발현이 조절되지만, 방선균을 비롯한 고등 원핵생물에서는 진핵생물성의 serine/threonine kinase들이 세포분화와 같은 분화과정을 조절하고 있다. Streptomycin 생산균인 *Streptomyces griseus* 균주에서도 다양한 serine/threonine kinase들이 존재하는 것으로 추정되며, 이들의 기능을 밝히는 것은 생명현상을 이해하는 중요한 열쇠를 제공해 줄 것으로 기대된다. 따라서, *S. griseus*로부터 protein kinase 를 동정하는 연구를 실시하였으며, 기존의 복잡한 chromatography 법의 단점을 보완하기 위해 anti-phosphothreonine, anti-phosphoserine, anti-phosphotyrosine antibody를 이용한 immunoaffinity column chromatography 방법을 도입하였다. 실험 결과 약 14, 29, 31, 35, 40, 52, 56, 60 kDa의 단백질을 효과적으로 동정할 수 있었으며, nonradioactive protein kination assay 방법으로 이들의 인산화능을 확인하였다.

Table 1. Comparison of proteins identified by various combinations of column chromatography.

Expected Mw (kDa)	14	29	31	35	40	52	56	60
Anti-phosphoserine	+	no	no	no	+	+	no	+
Anti-phosphothreonine	+++	no	no	no	no	no	+	+
Anti-phosphotyrosine	+++	no	+	no	++	+++	no	+
DEAE → Ab affinity	+++	+	+	no	+	+++	no	no
MonoQ → Ab affinity	+++	+	no	++	+	++	no	++

+, the number of + signature indicates the amount of detected proteins
no, not detected

감사의 글

본 논문은 2006년도 서일대학 학술연구비에 의해 연구되었으며, 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Babcock, M. J. and K. E. Kendrick. 1990. Transcriptional and translational features of a sporulation gene of *Streptomyces griseus*. *Gene* **95**: 57-63.
2. Beppu, T. and S. Horinouchi. 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica* **57**: S44-S47.
3. 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.
4. 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.
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. Her, J.-H., Y. H. Cheong, J.-H. Kim, S.-K. Sin, C. G. Hyun, J. Chun, S. S. Kang, D.-K. Kang, and S.-K. Hong. 2002. Identification of a protein kinase using a FITC-labelled synthetic peptide in *Streptomyces griseus* IFO13350. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 235-240.
7. 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. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 325-332.
8. 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.
9. 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.
10. Horinouchi S. 2002. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front Biosci.* **7**: 2045-2057.
11. 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.
12. 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 subunit. *J. Biol. Chem.* **274**: 13085-13090.
13. 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.
14. Ohnishi Y., H. Yamazaki, J. Y. Kato, A. Tomono, and S. Horinouchi. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 431-439.
15. Park, U. and S.-K. Hong. 1998. Regulatory factors involved in physiological differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Actinomycetologica* **12**: 134-140.
16. Sawai R., A. Suzuki, Y. Takano, P. C. Lee, and S. Horinouchi. 2004. Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **334**: 53-62.

(Received Mar. 28, 2007/Accepted Apr. 19, 2007)