

보 문

## *Streptomyces subbrutilus* P5가 생산하는 철 함유 superoxide dismutase의 분비

박재승 · 김재현\*

단국대학교 미생물학과

## Secretion of the iron containing superoxide dismutase of *Streptomyces subbrutilus* P5

Jae-seung Park and Jae-heon Kim\*

Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Republic of Korea

(Received May 26, 2015; Accepted June 15, 2015)

**ABSTRACT:** We tried to analyze the growth time for secretion of the iron containing superoxide dismutase by comparing the intra- and extracellular enzyme activity from *Streptomyces subbrutilus* P5 and analyze possible genetic information for this enzyme secretion. The mycelial dry weights and glucose concentrations in culture filtrates were determined during growth. Glucose was consumed rapidly during logarithmic growth phase and almost exhausted at 24 h of cultivation. While the intracellular activity of iron containing superoxide dismutase was first appeared at three hours, the extracellular activity of this enzyme appeared from 7.5 h of cultivation, early logarithmic growth phase. This early presence of the superoxide dismutase might not be the result of cell lysis but active secretion pathway. There was no information for signal peptide responsible for the enzyme secretion in *sodF*. However, we found a type three secretion box in the promoter region of *sodF* that has been known for the genes of type III secreted proteins in other bacteria. This is the first report on the possible existence of type III secretion in *Streptomyces*.

**Key words:** *Streptomyces*, extracellular secretion, superoxide dismutase, type III secretion

*Streptomyces*는 호기성 그람양성 세균으로써 기저균사체나 공중균사체 및 포자를 형성하는 독특한 형태적 특징이 있다. *Streptomyces*에 의해서 streptomycin, tetracycline 등 잘 알려진 항생물질의 대부분이 대사산물로써 생산되며(Hale and Schottle, 1996), 더욱이 actinomycin, adriamycin, promycin 등의 항암물질도 생산되기 때문에 *Streptomyces*는 의약품의 보고로 알려져 있다(Bibb, 2013). Superoxide dismutase (SOD)는 금속을 함유하는 효소로 superoxide 라디칼 혹은 활성산소속에 의한 산화적 손상으로부터 생체분자를 보호하는 역할을 한다. 이 효소는 산화환원능이 있는 metal center를 필요로 하는데 금속 이온의 종류에 따라 FeSOD, MnSOD, NiSOD, CuZnSOD 네 종류가 알려져 있는데(Chung *et al.*, 1999) *Streptomyces*에

서는 FeSOD와 NiSOD가 발견되어 있다(Youn *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1999; Leclere *et al.*, 1999). 이들 SOD는 서로 배타적으로 발현되는데 Ni<sup>2+</sup>에 의해서 FeSOD 생산이 전사과정에서 억제되고 NiSOD 생산이 유도된다고 알려져 있다. 우리 실험실에서는 중금속으로 오염된 폐금광의 토양에서 중금속 내성균인 *S. subbrutilus* P5를 분리하였고, 이 균주에 의해 세포외로 분비된 FeSOD가 높은 중금속 흡착능을 가지며, 이것이 중금속 내성의 원인이 될 수 있음을 보고하였다(So *et al.*, 2001). 이어서 *S. subbrutilus* P5의 FeSOD 유전자를 보유한 *E. coli*는 중금속 내성을 지닌다는 것을 알아내었다(Kim *et al.*, 2014).

거의 모든 원핵생물의 분비 단백질은 N-말단에 존재하는 signal sequence 혹은 leader sequence에 의해 세포막으로 보내지거나 세포 외로 분비된다. Signal peptide는 양전하를 띤 N-도메인, 소수성 H-도메인, signal peptidase의 인식부위가 포함된 C-도메인 등으로 구성되어 있다. 단백질이 세포막을 통과

\*For correspondence. E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr;  
Tel.: +82-41-550-3452; Fax: +82-41-551-9229

하는 메커니즘은 Sec 시스템에 의해서 이루어진다. 이 시스템은 단백질이 3차 구조로 접히지 않은 상태에서 일어난다 (Lammertyn and Anné, 1998). 이외에 twin-arginine dependant translocation (Tat) 시스템이 있다. 이 시스템은 세포막의  $\Delta pH$ 에 의해서 3차 구조로 완전히 접힌 단백질도 세포막을 통과하는 것으로 알려져 있다(Widdick *et al.*, 2006). 본 연구에서는 *S. subbrutillus* P5의 성장에 따른 세포내·외의 FeSOD 활성을 비교분석 함으로써, FeSOD의 분비 시점을 확인하며, 분자적 수준에서 FeSOD 분비에 관련된 signal 존재 여부를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주와 배지

*S. subbrutillus* P5를 시험균주로 사용하였다. 균의 배양을 위하여 ISP (International *Streptomyces* Project) No. 2 배지인 yeast extract-malt extract 배지[YEME; yeast extract (Difco) 4 g, malt extract (Difco) 10 g, dextrose (Difco) 2 g, 탈이온수 1 L, pH 7.2]를 사용하였다. 필요한 경우에 한천을 첨가하여 사용하였다. 유전자 클로닝과 형질전환에 사용한 균주는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 이며, LB 배양액 또는 LB 평판배지를 사용하였다.

### 건체중량 측정

YEME 평판 배지에 *S. subbrutillus* P5를 도말 한 후 30°C에서 약 7일간 배양하였다. 균체가 자라면서 생성된 하얀색의 포자를 적당량 백금으로 긁어서 50 ml의 YEME 배양액에 접종한 후 30°C에서 200 rpm으로 48시간 배양하였다. 배양된 균체를 취하여 550 nm에서의 흡광도가 2.3-2.4 되는 것을 확인하였고 균체 배양액 700  $\mu$ l ( $1.18 \times 10^7$  CFU/ml)를 50 ml의 새로운 YEME 배양액에 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 3시간에서부터 36시간까지 배양하였으며, 각 시점에 따라 세 번을 하였다. 각 배양 시점의 배양액을 Whatman No. 2 로 여과하여 얻은 균체를 60°C에서 약 24시간 건조한 후 중량을 측정하였다.

### Glucose 정량

Glucose정량은 Glucose (GO) Assay Kit (Sigma)를 사용하여 수행하였다. 시료는 배양액을 Whatman No. 2 여과지와 0.2  $\mu$ m syringe filter (Sartorius)를 사용하여 균체를 제거하여 준비하였다. 구입처에서 발행한 실험법을 따라 처리하고 측정된 540 nm의 흡광도를 이용하여 glucose농도를 계산하였다.

### FeSOD 조효소 제조

**세포내 FeSOD:** 배양액을 원심분리하여 수획한 균체를 50 mM potassium phosphate (pH 7.2)에 재부유시켰다. 재부유된 균체를 VCX-750 tip-type sonicator (Hitachi)를 이용하여 초음파 분쇄한 후 4°C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거한 세포추출액을 FeSOD 조효소로 사용하였다.

**세포외 FeSOD:** 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 상층액을 취하여 0.2  $\mu$ m syringe filter (Sartorius)에 여과하였다. 여과액에  $Pb(NO_3)_2$ 가 최종농도 1 mM이 되도록 첨가 한 후 Rotamix RM1 (Seoulin)을 이용하여 혼합하면서 4°C에서 40분간 반응시켰다. 반응물을 4°C에서 원심분리하여 침전물을 얻었고 상층액 제거 후 10 mM MES (pH 5.0)로 두 번 세척하였다. 침전물은 최종적으로 150 mM EDTA이 첨가된 10 mM MES (pH 5.0)에 용해시켜 세포외 FeSOD 조효소로 사용하였다 (So *et al.*, 2001).

**FeSOD 활성염색:** SOD활성 염색을 위하여 비변성 전기영동을 10% 겔에서 실시한 후 겔을 0.2% nitrobluetetrazolium (NBT) 용액에 실온에서 30분간 방치한 후 0.028 M *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)과  $2.8 \times 10^{-5}$  M riboflavin이 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) 용액에 담근 후 형광등을 쬐어서 SOD 활성 부위를 제외한 배경이 일정하게 푸른 빛을 나타나도록 하였다 (Beauchamp and Fridovich, 1971).

**단백질 정량:** 단백질은 Bradford법을 이용하여 정량하였다.

### 염색체 DNA 분리

YEME 배양액에서 수획된 *S. subbrutillus* P5균체를 현탁시키고 lysozyme (10 mg/ml)과 RNase A (10 mg/ml)를 넣고 37°C에서 현탁액이 맑아질 때까지 반응시켰다. 균체가 맑아지면 guanidine solution과 *N*-laurylsarcosine를 넣어 염색체 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 탈이온수에 녹인 후 -20°C에 보관하였다 (Pitcher *et al.*, 1989).

### 프라이머 제작 및 PCR

*sodF* 상류지역을 증폭하기 위한 프라이머를 제조하였다. *Streptomyces*의 *sodF* 상류에 공통적으로 존재하는 amino acid permease 유전자와 *S. subbrutillus* P5 *sodF* 내부의 322번부터 340번까지의 염기서열을 선택하여 프라이머를 디자인하고 Bioneer Co.에 제조의뢰하였다 (Table 1). PCR 반응은 The MiniCycler™ (MJResearch Inc.)를 이용하여 수행하였다. 초

**Table 1.** The primers for the amplification of the upstream region of *sodF* of *S. subrutilus* P5

Primers	Sequence
aaPermease F	5'-GAAGCTGGTCGTGCGSATGTG-3' (Tm 62.2°C, 21mers)
sh R	5'-AGCCGAAGGACTCGGTGAT-3' (Tm 55.7°C, 19mers)

aaPermease F : forward primer based on the base sequence of an amino acid permease gene  
sh R : reverse primer based on the base sequence of central part (322 ~ 340 nt) of *sodF* of the strain P5

기변성은 94°C에서 4분, 변성은 94°C에서 1분, 정렬은 68°C에서 1분, 신장은 71°C에서 4분으로 30회 반복하였다. 그리고 마지막 71°C에서 10분 동안 반응시킨 후 4°C에 보관하였다. 증폭된 PCR 반응 산물은 1% 아가로스 겔에 전개하여 확인하였다. 필요한 PCR 반응물을 아가로스 겔에서 추출하여 pGEM-T easy vector (Promega)의 T-overhang 부위에 삽입하고 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. PCR 산물의 클로닝을 위한 형질전환, 플라스미드 추출 등은 일반적으로 사용되는 분자생물학적 실험방법에 따라 수행되었다. 염기서열은 Macrogen에 의뢰하여 결정하였다.

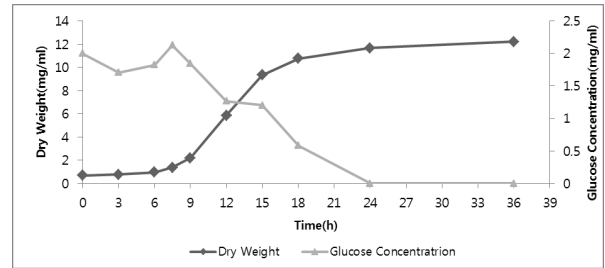
### 생물정보학적 분석

*Streptomyces* 종들의 *sodF* 상류 염기서열은 Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)를 사용하여 배열하였다. 미국 NCBI GenBank에서 *S. coelicolor* (accession number AL645882.2)와 *S. avermitilis* (accession number BA000030.3)의 genome sequence와 유전자 정보로부터 transcription start site를 기준으로 -50 ~ +5 염기서열을 customized Perl script로 추출하였다. 추출된 프로모터 서열에서 GTGAGCT motif의 존재 여부를 FIMO tool (<http://meme.ncr.net/meme/tools/fimo>)을 사용하여 Match *P-value* < 0.001 기준으로 검색하였다. Motif logo는 WEBLOGO (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 툴을 사용하여 만들었다.

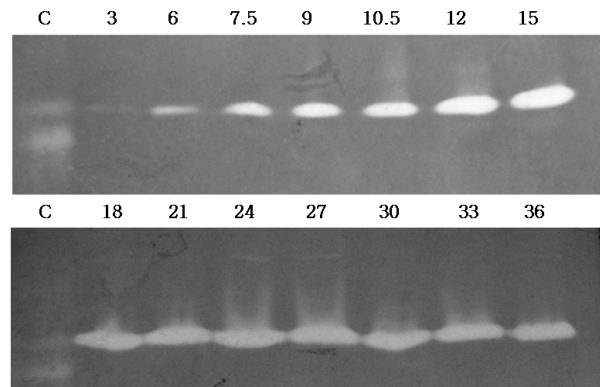
## 결 과

### *S. subrutilus* P5의 성장곡선과 glucose 소모

YEME 배양액에 *S. subrutilus* P5를 접종 후 30°C에서 3시간에서부터 36시간까지 배양하면서 전체중량의 변화를 추적한 결과 전형적인 시그모이드 형태의 성장곡선을 나타내었다 (Fig. 1). 균체 접종 직후의 전체중량은 0.69 mg/ml이었고 6시



**Fig. 1.** Growth and glucose consumption during the shaking incubation of *S. subrutilus* P5. ISP No. 2 (yeast extract-malt extract) liquid media were inoculated with the activated mycelia and incubated at 30°C, 200 rpm. At the indicated culture times, mycelia were harvested for dry weight measurement and the culture filtrates were used for glucose assay.

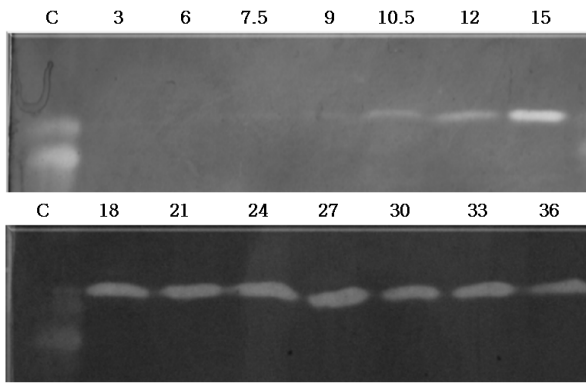


**Fig. 2.** The activity staining of intracellular FeSOD during growth of *S. subrutilus* P5. C, control SOD activity band (*S. coelicolor* A3(2)); lane number, culture time (h). Mycelia were harvested by centrifugation (4°C, 20,000 × g), resuspended in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.2), and disrupted by sonication (4°C). The homogenates were centrifuged at 4°C, 13,000 rpm and the supernatants were used for the activity staining on 10% native gel. The SOD activity bands were appeared as clear zones on deep blue background which was developed by light induced reaction in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.2), containing 28 μM riboflavin-0.1% nitro blue tetrazolium.

간까지는 적응기가 유지되다가 그 이후부터 18시간까지 지수생장기를 나타낸 다음 정체기(12 mg/ml)에 돌입하였다. YEME 배양액의 glucose 농도는 7.5시간까지 2 mg/ml 내외의 농도를 유지하다가 그 이후 계속적으로 감소하였다. 즉 glucose는 지수생장기에 접어들면서 소모되기 시작했고 접종 후 24시간에 이르러서는 완전히 고갈되었다.

### 세포내 FeSOD 활성

세포내 FeSOD 활성은 배양 3시간부터 희미하게 나타나서 6시간부터 18시간까지 증가하는 양상을 보였다. 그 이후의 활성은 일정하게 유지되었다(Fig. 2). 즉 세포내 FeSOD는 배양 초기부터 생산되며 지수생장기와 일치된 시간에 활성 증가를



**Fig. 3.** The activity staining of intracellular FeSOD during growth of *S. subrutilus* P5.

C, control SOD activity band (*S. coelicolor* A3(2)); lane number, culture time (h). Mycelium-free culture filtrate was obtained by centrifugation (4°C, 20,000 × g) and microfiltration using syringe filter (0.2 μm). SOD was precipitated by 1 mM Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, washed with MES buffer (10 mM, pH 5.0), and redissolved in MES buffer containing 10 mM EDTA. Native gel electrophoresis and activity staining were performed as described in Fig. 2.

나타낸다고 할 수 있다.

### 세포의 FeSOD 활성

세포의 FeSOD 활성은 7.5시간부터 희미하게 나타나기 시작하여 18시간까지 증가하고 그 이후에는 일정한 수준으로 유지하였다(Fig. 3). 즉 세포내 FeSOD가 출현하고 약 4시간 후에 세포외로 분비된다고 할 수 있다. 이 시기는 지수생장기 초기에 해당되며 이후의 지수생장기를 거치며 더욱 강한 세포의 SOD 활성이 나타났다(Fig. 3). 배양액의 단백질농도는 배양 초기(3시간)에 0.022 μg/ml에서 지수생장기 후기(15시간)에 0.034 μg/ml까지 높아졌지만 이후에는 서서히 감소하여 배양 말기(36시간)에 0.015 μg/ml를 나타내었다. 세포의 단백질의 증가는 세포의 SOD 효소활성의 증가시기와 일치하는 것으로 생각되며 정체가 이후에 세포의 단백질의 농도가 감소되지만 세포의 SOD 효소활성은 일정한 수준을 유지하는 것을 알 수 있었다.

### *sodF* 상류 분석

위에서 설명한 바와 같이 *S. subrutilus* P5의 FeSOD는 지수생장 초기에 세포내에서 생산되지만 곧 세포밖으로 분비된다. 따라서 단백질의 분비기작이 작동해야 한다는 것을 예상할 수 있다. 일반적으로 분비단백질의 아미노 말단에는 분비기작에 필요한 signal peptide가 존재하는 것으로 알려져 있지만 *sodF*에는 signal peptide에 필요한 유전정보는 존재하지 않는다

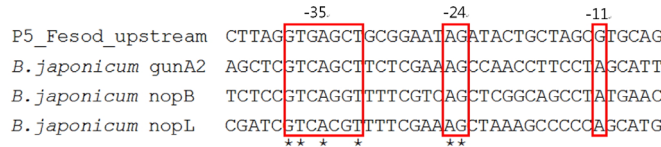
(Kim *et al.*, 2014). 질소고정세균인 *Bradyrhizobium japonicum*에서는 type III 분비기작을 따르는 단백질 유전자의 프로모터에 type three secretion (*tts*) 박스라는 특정 염기서열을 갖고 있는 것이 알려져 있다(Zehner *et al.*, 2008). 본 실험에서도 *sodF*의 상류지역에서 이와 유사한 특이 서열이 존재하는지 여부를 조사하였다. *Streptomyces* 균주들의 *sodF* 상류지역의 공통적 유전자 배열을 검색한 결과 *S. coelicolor* (SCO2633)와 *S. avermitilis* (SAV\_5413)의 *sodF* 상류지역에서 공통적으로 amino acid permease 유전자가 *sodF*와 같은 전사방향으로 존재하는 것을 알게 되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp>). Amino acid permease와 superoxide dismutase 유전자 염기서열로부터 프라이머를 제조하고 PCR을 수행하여 얻은 DNA 산물의 염기서열을 분석하여 약 350 bp 정도의 *sodF* 상류지역을 결정하고(GenBank FJ005091) 그 염기서열을 이미 알려진 다른 균주들과 비교하였다. *S. coelicolor* A3 (2)의 경우에는 *sodF*와 amino acid permease 사이에 transposase 유전자가 위치하는데 반해서 *S. subrutilus* P5의 *sodF* 바로 앞에는 amino acid permease 유전자가 위치하며 이것은 *S. avermitilis*와 같은 배열이었다(Fig. 4). 그리고 *Streptomyces*의 *sodF*에서 알려진 cis-역반복서열(TTGCAN<sub>7</sub>TGCAA)이 -2 ~ +15 지역에서 발견되었다(Fig. 4). 이 역반복서열은 Ni<sup>2+</sup>에 의한 *sodF*의 전사억제와 관련될 것으로 생각되고 있다(Kim *et al.*, 2000). 그밖에 -10 부위, 전사개시부위(+1) 및 라이보솜 인식부위(RBS) 등이 결정되었다(Fig. 4). 한편 -35 (GTGAGCT)을 비롯한 -24 (AG) 및 -11 (A) 지역은 *B. japonicum*의 뿌리혹 형성 관련 유전자에서 밝혀진 *tts* 박스와 거의 일치하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이 사실로부터 *S. subrutilus* P5의 FeSOD의 분비 역시 type III 분비 기구에 의한 것으로 추측할 수 있었다. *S. avermitilis*를 비롯한 다른 *Streptomyces*의 *sodF*에서는 이러한 염기서열 배열이 존재하지 않았다. Type III 분비 기구는 뿌리혹 생성균 뿐만 아니라 병원성 세균에 의한 숙주 세포 침투에서도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Tseng *et al.*, 2009).

### *Streptomyces*에서의 *tts* 박스 검색

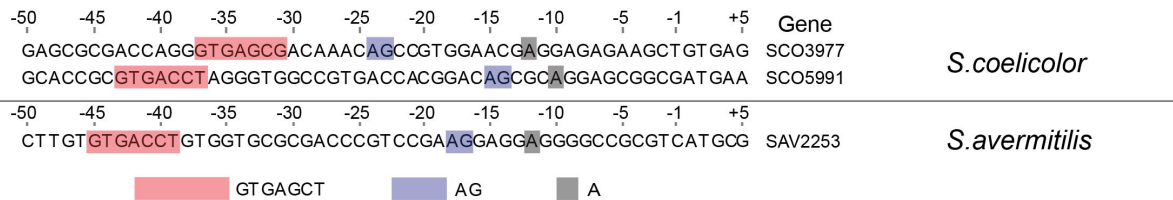
미국 NCBI genome sequence 정보로부터 *S. coelicolor* (accession number AL645882.2)와 *S. avermitilis* (accession number BA000030.3) 유전체로부터 *tts* 박스와 유사한 염기서열을 갖고 있는 분비단백질 유전자를 검색하였다(match  $P < 0.001$ , <http://meme.nbcr.net/meme/tools/fimo>). Fig. 6에서 보는 바와 같이 *S. coelicolor*의 2개의 유전자(SCO3977, SCO5991)와 *S. avermitilis*의 SAV2253에서 *tts* 박스가 존재할 것으로 예



**Fig. 4.** Base sequence alignment of the *sodF* upstream regions of *S. subtrtilus* P5 and *S. avermitilis*. \*, identical; RBS, ribosome binding site; arrows, inverted repeat; +1, transcription start. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolresult.ebi?jobId=clustalw2-120150522-033618-0091-84508974-pg>



**Fig. 5.** Sequence similarity of the *sodF* upstream region of *S. subtrtilus* P5 to the upstream of nodulation genes of *B. japonicum*. \* indicates identical base. Box indicates type III secretion box motif.



**Fig. 6.** Type III secretion box motifs in the *Streptomyces* genomes. Sequence information was extracted from NCBI GenBank (BA000030.3 for *S. avermitilis*, AL645882.2 for *S. coelicolor* A3(2)). Type III secretion motif (GTGAGCT/AG/A) was searched using FIMO tool (<http://meme.nbcr.net/meme/tools/fimo>) with Match *P*-value < 0.001.

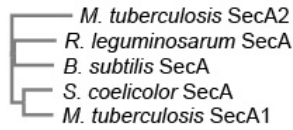
상되었으나 SCO3977 (putative protease)의 경우에만 염기서열 및 세부지역 분포양상이 *tts* 박스와 가장 유사하였다. 이러한 결과는 비록 적은 수의 유전자이지만 *Streptomyces* 균주에서 *tts* 박스와 그에 따른 단백질 분비시스템이 존재할 가능성을 제시한다고 생각한다.

### 고찰

*S. subtrtilus* P5의 FeSOD는 지수성장기 초기부터 배양액에서 관찰된다. 이 시기에는 균체의 자가분해는 거의 일어나지 않기 때문에 이 시기의 세포의 FeSOD는 무작위적으로 세포밖으로 용출되었다기 보다는 분비기작의 결과일 가능성이 높다. 또한 세포의 단백질의 농도가 15시간 후에 급격하게 감소되지만 세포의 FeSOD 활성은 강하게 유지되었다. 그러나 *sodF*의 염기서열에는 signal sequence에 부합되는 유전정보가 존재하지 않는다. 따라서 FeSOD의 분비는 N-말단에 signal peptide를 갖는 일반적인 분비시스템과는 다른 기작으로 분비

될 것이라 사료된다(Kondo *et al.*, 1994; Ananthalakshmy and Gunasekaran, 1999; Park *et al.*, 2003). 많은 종류의 단백질들이 이러한 비전형적인 분비기작을 따르는 것으로 알려져 있다 (Bendtsen *et al.*, 2005).

*Mycobacterium tuberculosis*에서는 signal sequence 없는 SOD가 SecA2라는 단백질에 의해서 세포밖으로 분비된다고 제시되었다(Braunstein *et al.*, 2003). 본 실험실에서 아미노산 서열에 입각하여 얻은 Clustal W dendrogram에 의하면 *S. coelicolor*의 SecA (WP\_003975807.1)는 *M. tuberculosis*의 SecA2 (WP\_003409221.1) 보다는 SecA1 (AFN51245.1)에 상응하는 단백질로 여겨진다(Fig. 7). SecA1는 signal peptide가 필요한 분비기작을 따른다(Braunstein *et al.*, 2003). 현재까지 *Streptomyces*에서 SecA2와 유사한 단백질이 보고된 바는 없으므로 본 실험의 *S. subtrtilus* P5에서도 FeSOD가 SecA2와 관련된 분비가 일어날 가능성은 낮은 것으로 생각된다. 한편 *Rhizobium leguminosarum*의 SodA가 signal peptide는 없지만 N-말단 10개의 아미노산 잔기가 필요한 새로운 형태의



**Fig. 7.** A dendrogram constructed based on the amino acid sequences of various SecA proteins using Clustal W2. *M. tuberculosis* SecA1 (AFN51245.1), *M. tuberculosis* SecA2 (WP\_003409221.1), *S. coelicolor* SecA (WP\_003975807.1), *Bacillus subtilis* SecA (BAA01122.1), and *R. leguminosarum* SecA (WP\_029871116.1).

SecA에 의해서 분비되는 것으로 보고되었다(Krehenbrink *et al.*, 2011). *S. subtrutilus* P5와 *S. coelicolor*에서 밝혀진 FeSOD의 N-말단 아미노산 서열은 *R. leguminosarum*의 SodA와는 다르고(Kim *et al.*, 2014), *Streptomyces*와 *Rhizobium*간의 SecA 유사성도 낮게 나타난다(Fig. 7). 그러므로 signal peptide 없는 SecA 분비기작이 *S. subtrutilus* P5에 존재하지는 않을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 *sodF* 상류지역에서 *tts* 박스가 존재하므로 type III 분비기구를 이용한 FeSOD 분비 가능성을 제시하였다. Type III 분비기구는 주로 *E. coli* 등의 그람 음성 세균에서 알려져 있지만 *Streptococcus pyogenes*과 같은 그람 양성 병원성 세균의 세포독성 단백질의 분비도 관련되어 있음이 보고되었다(Madden *et al.*, 2001). 현재까지 type III 분비기구가 *Streptomyces*에서 보고되지는 않았으나 이 논문에서는 유전체 검색을 통하여 *Streptomyces*에서도 분비단백질 유전자가 *tts* box를 갖는 경우가 있음을 밝혔다. 감자옴(scabies)의 원인균으로 잘 알려진 *Streptomyces scabies*가 숙주세포에 병원성을 유발하는 기작은 잘 밝혀져 있지 않다. 최근의 연구에서는 Tat 분비기작과 감자옴 발생이 관련됨을 밝혔지만 앞으로 type III 분비기작과의 관련성을 밝히는 것도 흥미로운 연구가 될 것이다(Joshi *et al.*, 2010). 또한 비병원성인 *S. subtrutilus*가 SOD 분비하는 것이 다른 미생물들과의 길항작용에서 어떤 장점을 부여하는지도 앞으로의 연구에서 밝혀야 할 것이다.

## 적 요

본 연구에서는 *Streptomyces subtrutilus* P5의 성장과 세포 내의 철 함유 superoxide dismutase 활성을 비교·분석하여 철 함유 superoxide dismutase의 분비 시점을 확인하고 분자 수준에서 이 효소의 분비에 관여하는 유전정보를 확인하고자 하였다. *Streptomyces subtrutilus* P5의 균체 생장은 전체 중량을 측정하여 결정하였다. Glucose는 log phase에서 급격히 소모되어 24시간 후에 이르러 완전히 고갈되었다. 세포내의 철 함유

superoxide dismutase는 배양 후 3시간에 나타나며 세포외 철 함유 superoxide dismutase는 배양 후 7.5시간부터 나타난다. 따라서 superoxide dismutase는 용균에 의해서가 아니라 능동적인 분비기작에 의해서 세포 외로 분비된 것으로 추측할 수 있다. *Streptomyces subtrutilus* P5의 *sodF*에는 signal peptide 유전정보가 존재하지 않았다. 그러나 *sodF*의 상류지역에서 다른 세균의 type III 분비단백질 유전자와 유사한 type III 분비상자가 발견되었다. *Streptomyces* 균주에서 type III 분비단백질이 존재할 가능성이 있음을 처음으로 제시하였다.

## 감사의 말

이 논문의 생물정보학적 분석을 도와 주신 단국대학교 미생물학과 강근수 교수님께 진심으로 감사드립니다.

## References

- Ananthakshmy, V.K. and Gunasekaran, P. 1999. Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 109-115.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
- Bendtsen, J.D., Jensen, L.J., Blom, N., Heijne, G.V., and Brunak, S. 2005. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 349-356.
- Bibb, M.J. 2013. Understanding and manipulating antibiotic production in actinomycetes. *Biochem. Soc. T.* **41**, 1355-1364.
- Braunstein, M., Espinosa, B., Chan, J., Belisle, J.T., and Jacobs Jr., W.R. 2003. SecA2 functions in secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **48**, 453-464.
- Chung, H.J., Kim, E.J., Suh, B., Choi, J.H., and Roe, J.H. 1999. Duplication genes Fe-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **231**, 87-93.
- Hale, V.A. and Schottle, J.L. 1996. Mutational analysis of the *Streptomyces scabies* esterase signal peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 189-198.
- Joshi, M.V., Mann, S.G., Antelmann, H., Widdick, D.A., Fyans, J.K., Chandra, G., Hutchings, M.I., Toth, I., Hecker, M., Loria, R., *et al.* 2010. The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* **77**, 252-271.
- Kim, J., Han, K., Jung, H., and Lee, J. 2014. Iron containing superoxide dismutase of *Streptomyces subtrutilus* P5 increases bacterial heavy metal resistance by sequestration. *Korean J. Microbiol.*

- 50, 179–184.
- Kim, J.S., Jang, J.H., Lee, J.W., Kang, S.O., Kim, K.S., and Lee, J.K.** 2000. Identification of *cis* site involved in nickel-responsive transcriptional repression of *sodF* gene coding for Fe- and Zn-containing superoxide dismutase of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1493**, 200–207.
- Kondo, Y., Toyoda, A., Fukushi, H., Yanase, H., Tonomura, K., Kawasaki, H., and Sakai, T.** 1994. Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 526–530.
- Krehenbrink, M., Edwards, A., and Downie, J.A.** 2011. The superoxide dismutase SodA is targeted to the periplasm in a SecA-dependent manner by a novel mechanism. *Mol. Microbiol.* **82**, 164–179.
- Lammertyn, E. and Anné, J.** 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 1–10.
- Leclere, V., Boiron, P., and Blondeau, R.** 1999. Diversity of superoxide-dismutases among clinical and soil isolates of *Streptomyces* species. *Curr. Microbiol.* **39**, 365–368.
- Madden, J.C., Ruiz, N., and Caparon, M.** 2001. Cytolysin-mediated translocation (CMT): A functional equivalent of type III secretion in Gram-positive bacteria. *Cell* **104**, 143–152.
- Park, B.S., Vladimir, A., Kim, C.H., Rhee, S.K., and Kang, H.A.** 2003. Secretory production of *Zymomonas mobilis* levansucrase by the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Enzyme Microb. Technol.* **34**, 132–138.
- Pitcher, D.G., Saunders, N.A., and Owen, R.J.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**, 151–156.
- So, N.W., Rho, J.Y., Lee, S.Y., Hancock, I.C., and Kim, J.H.** 2001. A lead-absorbing protein with superoxide dismutase activity from *Streptomyces subbrutillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **194**, 93–98.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., and Sebutal, J.C.** 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the gene ontology. *BMC Microbiol.* **9**(Suppl 1), S2.
- Widdick, D.A., Dilks, K., Chandra, G., Bottrill, A., Naldrett, M., Pohlschröder, M., and Palmer, T.** 2006. The twin-arginine translocation pathway is a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 17927–17932.
- Youn, H.D., Kim, E.J., Roe, J.H., Hah, Y.C., and Kang, S.O.** 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem. J.* **318**, 889–896.
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., and Göttfert, M.** 2008. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**, 1087–1093.