

## *Serratia marcescens* Nuclease의 *Escherichia coli*에서의 분비

신용철 · 이상열<sup>1</sup> · 김기석

경상대학교 자연과학대학 미생물학과

<sup>1</sup>경상대학교 자연과학대학 생화학과

### Secretion of the Cloned *Serratia marcescens* Nuclease in *Escherichia coli*

Shin, Young Chul, Sang Yeol Lee<sup>1</sup>, and Ki Seok Kim

Department of Microbiology, Colleges of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, chinju 660-701, Korea

**ABSTRACT:** Secretion of *Serratia marcescens* nuclease by *E. coli* harboring pNUC4 was investigated. 29.2, 54.2 and 16.6% of total nuclease were observed in culture medium, periplasm, and cytoplasm of *E. coli*, respectively. To investigate the secretion mechanism of *Serratia* nuclease by *E. coli*, secretion kinetics of nuclease was examined in the presences of sodium azide, an energy metabolism inhibitor; procaine, an exoprotein processing inhibitor; and chloramphenicol, a protein synthesis inhibitor. In the presence of sodium azide, periplasmic nuclease was gradually decreased and the extracellular nuclease was linearly increased according to the incubation time. Similar results were obtained in presences of procaine and chloramphenicol. From these results, we concluded that two transport processes are involved in nuclease secretion: secretion of nuclease through the inner membrane is occurred by an energy-dependent process and probably requiring precursor processing; secretion of nuclease through outer membrane does not require energy, de novo protein synthesis, and precursor processing.

**KEY WORDS** □ *Serratia marcescens*, nuclease, secretion in *E. coli*

세포질에서 합성된 단백질이 작용부위로 정확히 이동되는 현상은 세포의 중요한 기본적 작용 중의 하나이다. protein localization 중에서 특히 단백질의 세포의 분비기작에 관하여 원시핵세포에서나 진핵세포에 있어서 많은 연구가 이루어져 왔다. 그람음성 세균은 세포의 inner membrane과 outer membrane을 통하여 단백질의 분비가 이루어져야 하므로 그람음성세균이나 동, 식물세포와는 다른 단백질의 세포의 분비기작이 필요하다. 그람음성세균에 있어서 주로 *E. coli*를 대상으로 연구되어 왔는데 (Benson *et al.*, 1985), 현재까지의 연구를 종합해 보면 *E. coli* chromosome에서 유래된 gene product가 세포외로 분비되는 경우는 없으며 다만 plasmid와 같은 extra-chromosomal DNA에서 유래된 gene product는 세

포외로 분비되는 것으로 알려졌다 (Goebel and Hedg-peth, 1982 ; Jakes and Model, 1979 ; Mackman and Holland, 1984 ; Mock and Schwartz, 1978 ; Pugsley and Schwartz, 1985). Plasmid에서 유래된  $\alpha$ -hemolysin, bacteriocins, toxins 등이 세포외로 분비되기 위해서는 다른 gene products가 필요하며 이것을 coding하고 있는 보조유전자들은 세포의 분비단백질 유전자와 같은 plasmid DNA상에 위치하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 보아 *E. coli* chromosome에서는 기본적으로 세포의 분비체계가 없는 것으로 생각되며 그람음성세균에 있어 단백질의 세포외 분비를 연구하기 위해서는 다른 그람음성세균을 대상으로한 연구가 필요하다.

*Pseudomonas aeruginosa* (Liu, 1973), *Serratia ma-*

*rscens*(Eaves and Jeffeies, 1963; Heller, 1979; Braun and Schmitz, 1980; Bromke and Hamml, 1979; Monreal and Reese, 1969)들은 lipase, protease 등을 세포외로 분비하는 것으로 알려져 그람 음성세균의 세포외 단백질 분비에 좋은 모델이 되고 있다. *P. aeruginosa*의 경우 돌연변이 연구를 통하여 적어도 4개의 보조유전자가 세포외 단백질 분비에 필요한 것으로 나타났으며 이런 유전자의 변이는 pleiotropic effect를 보여 대부분의 세포외 단백질들이 세포내에 축적되는 것으로 나타났으나 alkaline protease처럼 계속 분비되는 것도 있어 *P. aeruginosa*에 있어 단백질의 세포외 분비는 한 가지 이상의 경로가 있는 것으로 추정된다(Filloux *et al.*, 1987; Willret-lind and Pavlovskis, 1984). 최근에는 *P. aeruginosa*의 단백질 유전자와 보조유전자들의 cloning 및 이들의 상호작용에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다(Bally *et al.*, 1989; Filloux *et al.*, 1989). *S. marcescens*는 *E. coli*와 같은 enteric group bacterium이면서도 nucleases, chitinases, protease, lipase를 세포외로 분비할 뿐만 아니라 *E. coli*에서 적용되는 여러 가지 실험 조작들이 *S. marcescens*에서도 잘 적용되어 단백질의 세포외 분비에 좋은 연구대상이 되고 있다(Reid *et al.*, 1982; Takagi and Kisumi, 1985; Takata Aoyagi, 1984). *S. marcescens*의 경우 세포외 분비단백질 유전자들의 cloning과 돌연변이 연구를 통하여 세포외 단백질들의 분비에 필요한 여러 가지 보조유전자가 있음을 확인할 수 있었으나 *P. aeruginosa*처럼 한 보조 유전자의 돌연변이가 pleiotropic effect를 보여 여러 가지 분비단백질들의 세포내 축적을 일으키는 경우는 없었으며 제각기 분비에 독자적인 보조유전자가 필요한 것으로 나타났다(Ball *et al.*, 1987; Hines *et al.*, 1988). 이러한 사실들은 그람음성세균에 있어 세포외 단백질의 분비기작이 각 분비단백질마다 독특한 경로를 통하여 일어난다는 것을 시사해 주고 있으며 현재까지 세포외 분비단백질들에 대한 공통된 분비 경로가 알려져 있지 않다. 여러 가지 세포외 분비단백질들의 inner membrane과 outer membrane을 통한 분비과정과 보조단백질들의 역할 등을 규명하므로써 분자수준에서 그람음성세균의 분비기작을 밝혀 낼 수 있을 것으로 생각된다.

*S. marcescens*가 세포외로 분비하는 nuclease는 DNA와 RNA를 분해시키는 효소로서 현재까지 그 분비기작에 관하여 거의 연구가 이루어지지 않았으며 또한 세포외 분비를 도와주는 다른 보조유전자들의 관여도 알려져 있지 않다. 최근 이 유전자를 *E. coli*에 클로닝한 결과 signal sequence를 가지고 있었으며 *E. coli*에서 세포외로 분비되는 것으로 보고되었다(Ball *et al.*, 1987). 본 연구에서는 *S. marcescens*의 세포외 분비단백질인 nuclease가 *E. coli*에서 어떻게

분비되는 가를 밝히기 위해서 *S. marcescens* nuclease 유전자의 *E. coli*에서의 발현, nuclease localization 및 nuclease의 세포막 통과에 있어서 에너지 대사 저해제인 sodium azide, signal peptide processing 저해제인 procaine, 단백질합성 저해제인 chloramphenicol 등의 영향을 살펴보았기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

효소의 활성도를 측정하기 위해서 calf thymus DNA, *p*-nitrophenyl phosphate, *o*-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactoside 등의 기질과 chloramphenicol, isopropyl thiogalactoside(IPTG), procaine, sodium azide 등은 Sigma Chemical Co. (U.S.A.)에서 구입하였다. *S. marcescens*의 세포외 nuclease 유전자를 가진 플라스미드 pNUC4는 M.J. Benedik으로부터 제공받았다(Ball *et al.*, 1987). pNUC4 플라스미드는 pUC18의 SmaI 자리에 1.4 Kilobase(Kb) *S. marcescens* 세포외 nuclease 유전자가 삽입된 것으로 lac promoter와 nuclease 자신의 promoter가 들어있다.

### 미생물의 배양 및 분비연구

*E. coli* HB101 균주를 host로 사용하여 플라스미드 pNUC4를 transformation시켜 *E. coli* HB101(pNUC4) 균주를 만들어 실험에 사용하였다. *E. coli* HB101(pNUC4) 균주를 50  $\mu$ g/ml ampicillin이 든 LB배지를 이용하여 37°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. Nuclease 유전자의 발현을 유도하기 위해  $1 \times 10^{-4}$  M IPTG를 첨가하였다. Nuclease 분비기작을 연구하기 위해서 *E. coli* HB101(pNUC4) 균주를 ampicillin이 든 5 ml LB배지에서 종배양한 다음 1 ml를 ampicillin과 IPTG가 든 100 ml의 새로운 배지에 접종하여 약 4시간 배양하여 600 nm에서의 흡수도가 1.0-1.5가 되었을 때 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 LB배지로 두번 세척한 다음 2 ml LB배지에 현탁시킨 후 1 ml를 ampicillin과 IPTG가 든 50 ml LB배지에 접종하고 시간에 따라서 1 ml씩 시료를 채취하여 세포외, 세포내, periplasm으로 분획하고 nuclease 활성을 측정하였다.

### 효소의 활성도 측정

Nuclease 활성도는 Nestle과 Roberts(1969)의 방법을 사용하였다. 각 반응액은 0.5 mg DNA, 50 mM Tris-HCl(pH 8.2), 1mM MgCl<sub>2</sub>와 효소액 100  $\mu$ l를 혼합하여 최종 부피를 0.5 ml로 하여 37°C에서 20분 반응시켰다. Perchloric acid(8%)를 0.5 ml 첨가하여 반응을 중지시키고 얼음속에서 20분 방치한 다음 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 모아 260 nm에서 흡수도를 측정하였다. 효소의 활성도는

37°C에서 20분 반응 하였을 때 흡수도의 증가로써 표시하였다.  $\beta$ -Galactosidase의 활성도는 0.1 ml의 효소액과 0.9 ml의 50 mM 인산완충용액(pH 7.0), 및 0.2 ml의 o-nitrophenyl  $\beta$ -d-galactoside를 섞은 반응액을 37°C에서 incubation하여 노란색이 나타날때 420 nm에서 흡수도를 재었다.  $\beta$ -Galactosidase의 활성도는 반응조건 하에서 분당 흡수도의 증가로 표시하였다. Alkaline phosphatase의 활성도는 0.1 ml 효소액과 0.9 ml 1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.0), 0.1 ml p-nitrophenyl phosphate(10 mg/ml)를 섞은 반응액을 37°C에서 incubation하여 노란색이 나타날 때 420 nm에서의 흡수도를 측정하였다. Alkaline phosphatase의 활성도는 반응 조건 하에서 분당 흡수도의 증가로 표시하였다.

**세포의 분획**

Cornelis 등(1982)의 방법을 이용하여 세포를 분획하였다. 시료 1 ml를 원심분리하여 상등액을 세포외 분획으로 하였다. 침전된 세포를 25% sucrose가 든 10 mM Tris-HCl완충용액(pH 7.5)으로 두번 세척하고 25% sucrose와 1 mM EDTA가 든 10 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 1 ml에 현탁시켜 10분 동안 상온에 둔 다음 원심분리하여 세포를 모아 ice-cold water 1 ml에 현탁시키고 잘 섞은 후 얼음속에서 10분간 약하게 흔들었다. 이것을 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 모아 periplasm 분획으로 하였다. 침전된 세포에 10 mM Tris-HCl완충용액(pH 7.5) 1 ml를 넣고 Minibead beater(Biospec products, Bartlesville, OK, U.S.A.)로 세포를 깨뜨린 후 10,000 rpm에서 20분 원심분리하여 상등액을 세포내 분획으로 하였다. 1 ml 배양액으로 부터 각각 1 ml 부피의 분획을 얻고 적당히 희석한 후 nuclease 활성을 측정하여 각 분획의 nuclease 활성은 효소액 100  $\mu$ l에 대한 260 nm에서의 흡수도 증가로 나타내었다.

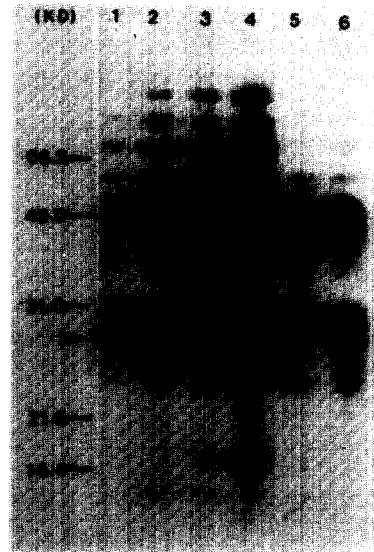
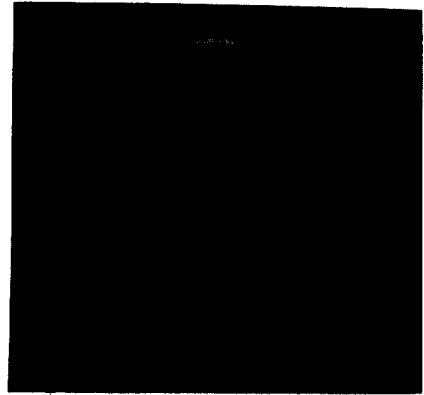
**Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)**

세포의 각 분획을 SDS-PAGE로 분석하기 위해서 5 ml의 배양액을 앞에서와 같은 방법으로 분획한 후 trichloroacetic acid를 10% 농도로 처리하여 얼음에 1시간 두었다. 이것을 10,000rpm에서 10분 원심분리하여 침전된 단백질을 모으고 100  $\mu$ l의 sample buffer에 녹인 후 20  $\mu$ l의 포화 Tris 용액을 첨가한 후 전기영동 하였다. 전기영동 방법은 10% acrylamide gel을 사용하여 Laemmli 방법(1970)으로 수행하였다.

**결과 및 고찰**

***E. coli*에서 *Serratia* Nuclease의 발현과 분비**

플라스미드 pNUC4를 *E.coli* HB 101에 transformation시켜 nuclease 활성을 갖는 *E.coli* HB 101(pNUC



**Fig. 1.** Nuclease activity of *E. coli* HB101(pNUC4) on nuclease test agar and SDS-PAGE of cell fractions. (a) *E. coli* cells were streaked on nuclease test agar composed of nutrient agar containing 2 mg/ml of DNA, 50  $\mu$ g/ml of methyl green, and 50  $\mu$ g/ml of ampicillin. 1: *E. coli* HB191(pNUC4), 2: *E. coli* HB101(pUC18), 3: *E. coli* JM107(pNUC4), 4: *E. coli* JM107(pUC18). (b) *E. coli* cells were cultivated for 8 hr at 37°C in the presence of IPTG(lanes 3-6) or absence of IPTG(lanes 1 and 2) and fractionated and the protein precipitate of each fraction was analyzed by SDS-PAGE as described in Materials and Methods. Lanes 1-4 were extracellular fractions of *E. coli* HB101(pUC18)(lanes 1 and 3) and *E. coli* HB101(pNUC4)(lanes 2 and 4). Lanes 5 and 6 were periplasmic fractions of *E. coli* HB101(pUC18) (lane 5) and *E. coli* HB101(pNUC4)(lane 6). Arrow indicates the nuclease band.

**Table 1.** Expression and Localization of *S. marcescens* nuclease in *E. coli*. Cells were grown in LB medium containing 50 µg/ml ampicillin and  $1 \times 10^{-4}$ M IPTG at 37°C for 8 hr and fractionated by the method described in Materials and Methods. Parenthesis represents the percentage of enzyme activity. a: *E. coli* HB101(pNUC4), b: *E. coli* HB101(pUC18).

Fraction	Nuclease		Alkaline phosphatase	β-Galactosidase
	pNUC4 <sup>a</sup>	pUC18 <sup>b</sup>		
Growth medium	7.0 (29.2)	0.22	$0.5 \times 10^{-3}$ (11.1)	$0.9 \times 10^{-2}$ (8.6)
Periplasm	13.2 (54.2)	0.02	$4.0 \times 10^{-3}$ (88.9)	$0.17 \times 10^{-2}$ (1.6)
Cytoplasm	4.0 (16.6)	0.02	— (0.0)	$9.40 \times 10^{-2}$ (89.8)

4) clone을 선별하였고 이 균주가 pNUC4를 함유하고 있었으며 Fig.1(a)에서 보는 바와 같이 nuclease test agar plate에서 nuclease 활성을 손쉽게 확인 할 수 있었다. *E. coli* HB 101에서의 pNUC4의 발현과 분비를 살펴보기 위해 *E. coli*를 배양하여 세포를 분획한 후 nuclease 활성을 측정하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. Host로 사용한 *E. coli* HB 101의 경우 세포내, periplasmic space, 세포의 배지 중에서 매우 낮은 nuclease 활성이 관찰되었다. 그러나 *S. marcescens*의 nuclease 유전자를 가지고 있는 *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주는 *E. coli* HB 101균주에 비해서 높은 nuclease 활성을 나타내었다. *Serratia* nuclease 유전자는 *E. coli*에서 잘 발현되었으며 특히 *S. marcescens*에서 배지 중으로 분비되는 이 단백질은 *E. coli*에서도 전체 nuclease 활성의 29.2%가 세포외로 분비되었다. 그리고 54.2%의 nuclease가 periplasm에 존재하는 것으로 나타났으며 16.6%의 nuclease 활성이 세포내에서 측정되었다. 이러한 결과로 보아 *Serratia* nuclease 유전자는 *E. coli*에서 발현되어 inner membrane을 통과한 후 periplasm에 대부분 축적되며 이 중 상당량이 outer membrane을 통해서 세포밖으로 분비되는 것으로 보인다. 세포의 nuclease 활성이 세포의 용균 때문인지를 알아보기 위해서 alkaline phosphatase와 β-galactosidase 활성을 측정하였을 때 Table 1에 나타난 바와 같이 제각기 periplasm과 cytoplasm에서 주로 발견되는 것으로 보인다. 그러나, 약 10% 정도의 β-galactosidase와 alkaline phosphatase 활성이 세포 외에서 측정되는 것으로 보아 일부의 세포들이 용균 되는 것으로 보인다. Nuclease 단백질을 확인하기 위해서 SDS-PAGE를 수행한 결과는 Fig.1(b)와 같다. *E. coli* HB 101 균주는 세포외 분비 단백질이 없는 것으로 알려져 있으나 Fig.1에서 보듯이 많은 세포외 단백질 band가 발견되는데 이것은 일부 세포의 용균에 의한 세포단백질의 방출에 기인한 것으로 생각

된다. Host로 사용한 *E. coli* HB 101 균주에 비해서 *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주는 세포외에 더 진한 단백질 band를 보여 nuclease 유전자가 들어가므로써 세포가 약해진 것으로 보인다. *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주는 *E. coli* HB101(pUC18)과는 달리 size marker로 사용한 분자량 31 KDa의 carbonic anhydrase band 바로 아래에 진한 단백질 band를 보였으며 이것은 Ball 등(1987)의 연구에서 nuclease 유전자 sequencing을 통하여 계산한 분자량 26.8 KDa과 일치하였다. pUC18 플라스미드가 *E. coli*에 들어가는 경우 세포의 분획에서 분자량 30 KDa 근처에서 β-lactamase로 추정되는 band가 나타났으며 pNUC4가 들어가는 경우 β-lactamase와 바로 아래 위치에 nuclease로 추정되는 band가 합쳐져서 굵고 진한 단백질 band를 보였다. periplasm 전기영동 패턴을 살펴볼때 nuclease로 추정되는 band가 세포외와 같은 위치에서 매우 진하게 나타났으며 세포내의 경우는 전기영동 band가 서로 비슷해서 현재로서는 세포내 단백질 중에서 어느 것이 정확히 nuclease 단백질인지 알 수 없었다.

*Serratia* nuclease가 *E. coli*에서 배양시간에 따라 분비되는 양상을 조사하기 위해 *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주를 LB배지에서 배양하면서 1 ml씩 시료를 채취하여 세포 농도와 세포내, 세포외, periplasm의 nuclease 활성을 측정하였다. Fig.2에서 보는 바와같이 배양초기에는 주로 nuclease 활성이 periplasm에서 나타났으며 이에 반해 세포외에서는 비교적 낮은 nuclease 활성이 관찰되었다. *E. coli*의 배양시간이 증가함에 따라서 periplasm에서 nuclease 축적이 일어났으며 점차적으로 세포외 nuclease와 세포내 nuclease 활성이 증가되는 경향을 보였다. 이 결과는 *Serratia* nuclease가 *E. coli*에서 합성되어 효율적으로 inner membrane을 통과하여 periplasm으로 이동하고, periplasm에 축적된 nuclease의 상당량이 outer

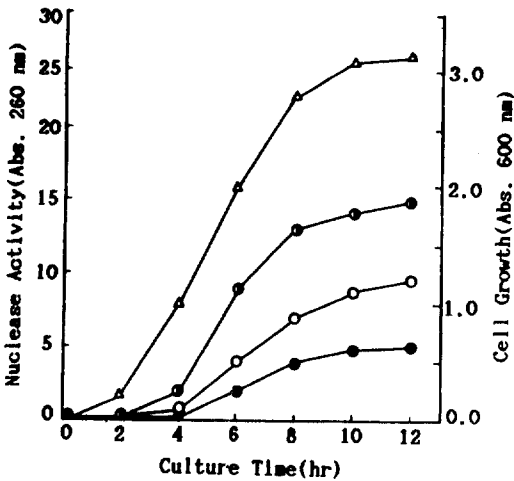


Fig. 2. Secretion of *S. marcescens* nuclease by *E. coli* during the growth of cells.

Cells were grown in LB broth containing 50 μg/ml ampicillin and 1 × 10<sup>-4</sup>M IPTG. Symbols: Δ, cell density; ●, intracellular nuclease; ○, periplasmic nuclease; ○, extracellular nuclease.

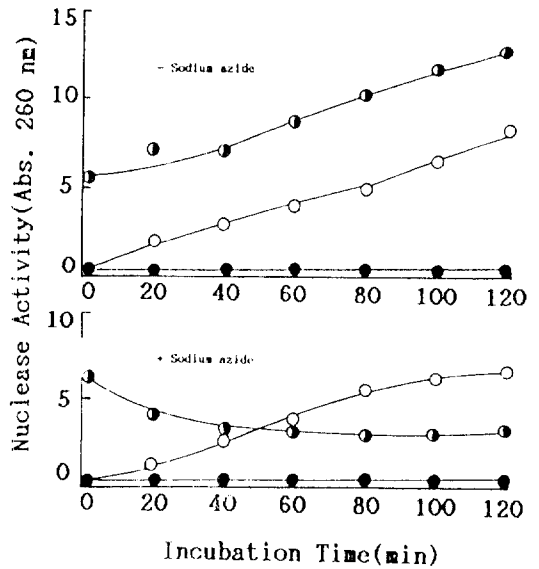


Fig. 3. Effects of sodium azide on the secretion of *S. marcescens* nuclease by *E. coli*.

Cells were grown, harvested, and transferred to a fresh medium, as described in Materials and Methods. Symbols are the same as those of Fig. 2.

membrane을 통하여 세포밖으로 분비되는 것을 시사해 준다. periplasm에 nuclease가 축적되는 것으로 보아 *E. coli*에 있어 *Serratia* nuclease 분비는 inner membrane과 outer membrane의 융합부위(Bayer's junction)를 통하여 일어나기 보다는 inner membrane, periplasm, outer membrane을 차례로 통과하여 일어나는 것으로 보인다. *Serratia* nuclease의 막을 통한 분비기작을 조사하기 위해서 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol, 에너지 대사 저해제인 sodium azide, signal peptide processing 저해제인 procaine 등을 사용하여 nuclease의 secretion kinetics를 조사하였다.

**Sodium azide가 Nuclease 분비에 미치는 영향**

*Serratia* nuclease가 *E. coli*의 두 세포막을 통과하는데 에너지가 필요한 과정인지를 알아보기 위해서 *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주를 배양한 후 세척한 다음 sodium azide를 처리하여 에너지 대사과정을 저해하였다. Fig.3의 결과에서 보듯이 nuclease의 세포의 분비는 sodium azide의 첨가 유무에 상관없이 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. periplasmic nuclease의 활성은 sodium azide를 처리하지 않은 경우는 incubation 시간이 증가함에 따라 조금씩 증가하였다. 실험조건하에서 sodium azide의 첨가에 상관없이 세포내 nuclease 활성은 매우 낮았으며 거의 비슷한 수준을 유지하였다. 이러한 결과로 볼때 *Serratia* nuclease가 periplasm에서 outer membrane을 통과하여 세포밖으로 방출되는 과정은 세포의 에너지

대사과정과는 무관하게 일어나는 것으로 추정된다. 또한 sodium azide를 처리하는 경우 periplasm의 nuclease 총활성이 떨어지는데 이것은 세포내에서 합성되는 nuclease가 inner membrane를 통하여 periplasm으로 이동되지 않았기 때문인 것으로 보인다. 이러한 사실로 nuclease의 inner membrane 통과 과정은 energy-dependent process인 것으로 추정된다. *Serratia* nuclease의 *E. coli*에서의 분비과정은 에너지 대사와 연관된 inner membrane 통과 과정과 에너지 대사와는 무관한 outer membrane 통과 과정으로 되어있는 것으로 생각된다.

**Procaine과 Chloramphenicol이 Nuclease 분비에 미치는 영향**

국부마취제인 procaine은 *E. coli*에서 세포막의 인지질에 작용하여 막 유동성을 변화시키므로써 *E. coli*의 outer membrane 단백질의 signal peptide processing을 저해함으로써 inner membrane 통과를 저해하는 것으로 알려졌으며 또한, 단백질 합성은 저해하지 않고 trypsin과 같은 protease를 competitive inhibition하는 것으로 알려진 물질이다(Gayda et al., 1979.; Lazdunski et al., 1979). *E. coli* HB101(pNUC 4)에 procaine을 처리하여 단백질 분비에 필요한 signal peptide processing을 억제시켰을때 *Serratia* nuclease의 분비되는 양상은 Fig.4와 같다. Nuclease의 세포의 분비는 procaine의 존재유무와 상관없이 거의

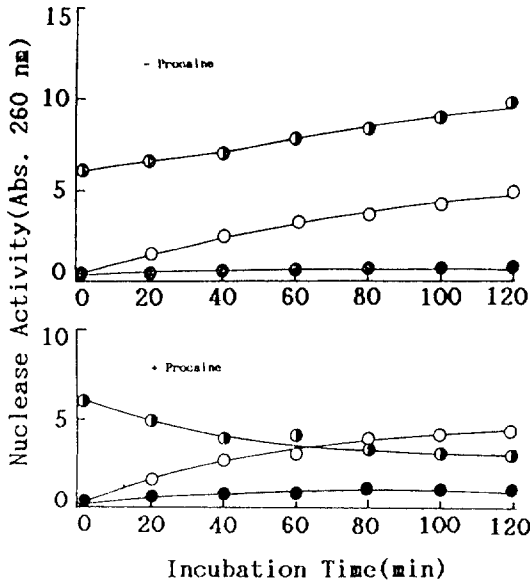


Fig. 4. Effects of procaine on the secretion of *S. marcescens* nuclease by *E. coli*.

Cells were grown, harvested, and transferred to a fresh medium, as described in Materials and Methods. Symbols are the same as those of Fig. 2.

비슷한 양상을 보여 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 이 결과로 보아 periplasmic nuclease가 outer membrane을 통과하는 데에는 procaine에 의해 저해 받지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 사실은 *Serratia* nuclease 단백질이 *E. coli*의 outer membrane을 통과할 때 processing없이 스스로 통과 한다는 것을

시사해준다. Procaine을 처리할 때 periplasmic nuclease는 줄어드는 결과를 보이는데 이것은 세포내에서 합성된 nuclease 전구체가 inner membrane을 통과 할 때 signal peptide processing이 억제되어 periplasm으로 이동되지 못하였기 때문에 일어난 결과로 해석된다. 단백질합성 저해제인 chloramphenicol을 *E. coli* HB 101(pNUC4) 균주에 처리하였을 때 procaine을 처리한 경우와 비슷한 nuclease 분비 패턴을 보였다. 즉 periplasmic nuclease 총활성의 감소와 함께 세포의 nuclease 활성의 증가가 나타나는데 이것은 periplasmic nuclease가 protein 생합성과는 무관하게 세포밖으로 분비됨을 보여준다. 이상의 결과에서 periplasmic nuclease의 outer membrane 통과는 sodium azide, procaine, chloramphenicol의 처리와는 상관없이 일어나는 것으로 나타났다. 그러나 nuclease가 periplasm으로 부터 세포밖으로 분비되는 것이 농도구배에 의한 단순확산인지 export channel을 통하여 일어나는 지는 알 수 없었으며  $\alpha$ -hemolysin이나 colicin과는 달리 *E. coli*에 있어서 세포의 분비에 특정한 보조유전자가 필요없이 스스로 outer membrane을 통과하는 것으로 보인다. 결론적으로 *Serratia* nuclease는 *E. coli*에서 signal peptide processing을 통하여 inner membrane을 통과한 후 periplasm에 축적되고 이 단백질은 에너지 대사저해제나 transport processing 저해제에 상관없이 outer membrane을 스스로 통과하는 것으로 보인다. *Serratia* nuclease의 outer membrane 통과는 self-secretion mechanism을 따르는 것으로 보이며 앞으로 계속적인 연구를 통하여 그람 음성세균에 있어서 단백질의 세포막 통과기작을 밝히는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 적 요

*Serratia marcescens*가 세포외 배지 중으로 분비하는 nuclease 유전자를 포함하고 있는 pNUC4 플라스미드를 *E. coli*에 transformation하여 *E. coli*에서의 분비에 관하여 연구하였다. *E. coli*에서 *Serratia* nuclease 활성이 세포내, periplasm, 세포밖 배지 중에서 각각 16.6%, 54.2%, 29.2%로 측정되었다. 배양시간에 따라서 nuclease는 먼저 periplasm에 축적 되었으며 점차적으로 세포외 배지 중으로 분비되었고 세포내에서는 낮은 효소활성이 점차 증가되는 경향을 보였다. 분비기작을 연구하기 위해서 에너지대사 저해제인 sodium azide, signal peptide processing 저해제인 procaine, 단백질 합성 저해제인 chloramphenicol을 처리하였다. sodium azide 존재시 periplasmic nuclease 활성이 줄어들고 세포의 nuclease 활성이 증가되는 경향을 보였으며 procaine과 chloramphenicol을 처리했을 때도 이와 비슷한 결과를 보였다. 이 결과로 부터 *E. coli*에 있어 *Serratia* nuclease의 분비는 energy-dependent process이면서 precursor processing이 필요한 inner membrane 통과와 이것과는 무관한 outer membrane 통과로 이루어져 있는 것으로 사료되었다.

## 사 사

본 논문은 문교부 기초과학연구소 학술조성연구비 (1989-1990)에 의해 수행 되었음.

## REFERENCES

1. Ball, T.K., P.N. Sauruger and M.J. Bendik, 1987. The extracellular nuclease gene of *Serratia marces-*

- cens* and its secretion from *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 183-192.
3. **Bally, M., B. Wretlind and A. Lazdunski**, 1989. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular cloning and characterization of xcp-1 gene. *J. Bacteriol.*, **171**, 4342-4348.
  3. **Benson, S.A., M.N. Hall and T.J. Silhavy**, 1985. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli* K12. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 101-134.
  4. **Braun, V. and G. Schmitz**, 1980. Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.*, **124**, 55-61.
  5. **Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemot**, 1982. Cloning and expression of a *Bacillus coagulans* amylase gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 507-511.
  6. **Bromke, B.J. and J.M. Hammel**, 1979. Regulation of extracellular protease formation by *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 47-52.
  7. **Eaves, G.N. and C.D. Jebbries**, 1963. Isolation and properties of an extracellular nuclease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **85**, 273-278.
  8. **Filloux, A., M. Murgier, B. Wretlind and A. Lazdunski**, 1987. Characterization of two *Pseudomonas aeruginosa* mutants with defective secretion of extracellular proteins and comparison with other mutants. *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**, 159-163.
  9. **Filloux, A., M. Bally, M. Murgier, B. Wretlind and A. Lazdunski**, 1989. Cloning of xcp genes located at the 55 min region of the chromosome and involved in protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, **3**, 261-265.
  10. **Gayda, R.C., G.W. Henderson and A. Markovitz**, 1979. Neuroactive drug inhibits trypsin and outer membrane protein processing in *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2138-2142.
  11. **Goebel, W. and J. Hedgpeth**, 1982. Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determination of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **151**, 1290-1298.
  12. **Heller**, 1979. Lipolytic activity copurified with the outer membrane of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **140**, 1120-1122.
  13. **Hines, D., P.N. Saurugger, G.M. Ihler and M.J. Benedik**, 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, **170**, 4141-4146.
  14. **Jakes, K.S. and P. Model**, 1979. Mechanisms of export of colicin E1 and E3. *J. Bacteriol.*, **138**, 770-778.
  15. **Laemmli, U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
  16. **Lazdunski, C., D. Baty and J.M. Pages**, 1979. Procaine, and local anesthetic interacting with the cell membrane, inhibits the processing of precursor forms of periplasmic proteins in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **96**, 49-57.
  17. **Liu, P.V.**, 1973. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, **130**, 94-99.
  18. **Mackman, N. and I.B. Holland**, 1984. Secretion of 107 KDalton polypeptide into the medium from a haemolytic *E. coli* K12 strain. *Mol. Gen. Genet.*, **193**, 312-315.
  19. **Mock, M. and M. Schwartz**, 1978. Mechanism of colicin E3 production in strains harboring wild-type or mutant plasmids. *J. Bacteriol.*, **136**, 700-707.
  20. **Monreal, J. and E.T. Reese**, 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689-696.
  21. **Nestle, M. and W.K. Roberts**, 1969. An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **244**, 5213-5218.
  22. **Pugsley, A.P. and M. Schwartz**, 1985. Export and secretion of proteins by bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 3-38.
  23. **Reid, J.D., S.D. Stoufer and D.M. Ogrzyziak**, 1982. Efficient transformation of *Serratia marcescens* with pBR322 plasmid DNA. *Gene*, **17**, 107-112.
  24. **Takagi, T. and M. Kisumi**, 1985. Isolation of a versatile *Serratia marcescens* mutant as a host and molecular cloning of the aspartase gene. *J. Bacteriol.*, **161**, 1-6.
  25. **Takata, R. and M. Aoyagi**, 1984. Isolation of a *Serratia marcescens* mutant which is an efficient recipient for the *E. coli* episome. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 517-518.
  26. **Wretlind, B. and O.R. Pavlovskis**, 1984. Genetic mapping and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in the formation of extracellular proteins. *J. Bacteriol.*, **158**, 801-809.

(Received July 31, 1990)

(Accepted December 27, 1990)