

Bacillus megaterium에서 발견된 Penicillin G Acylase 유전자의 염기서열과 그 효소의 특성

강주현·김성재¹·박용춘¹·황 영·유옥준·김영창¹

한국과학기술원 생명과학과 ¹충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Bacillus megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자의 염기배열을 결정하였다. 이 유전자에는 2,406 염기쌍으로 이루어진 하나의 open reading frame이 존재하는데, 개시코돈의 5' 위치에서 Shine-Dalgarno 배열과 promoter로 여겨지는 부분을 발견하였으며, 종결코돈의 3' 아래쪽에서 rho-independent한 전사종결체와 유사한 구조를 발견하였다. 염기배열로부터 폴리펩티드의 아미노산 배열을 유추하였다. 이 폴리펩티드의 분자량은 91,983 Da이었으며, 아미노 말단 부위에 signal sequence가 존재하였다. 이 아미노산 배열을 여러 다른 penicillin G acylase의 아미노산 배열과 비교하고 분리 정제한 효소를 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과로부터 이 효소는 92 kDa의 전구체로 배양된 후 processing 과정을 거쳐 각각 25 kDa과 61 kDa의 α -, β -단위체로 구성됨을 알 수 있었다.

KEY WORDS □ *Bacillus megaterium*, penicillin G acylase, nucleotide sequence

Penicillin G acylase는 penicillin G의 가수분해 (deacylation) 또는 합성 (acylation) 반응을 촉매하는 효소로서, 제약산업분야에서 반합성 β -lactam계 항생제 제조의 원료물질로 널리 사용하는 6-aminopenicillanic acid (6-APA)를 효소적으로 생산하는데 이용되고 있으며 또한 이 원료물질에 다른 잔기를 효소적으로 붙여 새로운 항생물질을 제조하는 목적으로도 이용되고 있다.

최근까지 penicillin G acylase에 관한 연구는 효소의 생산, 정제, 고정화 그리고 촉매적 특성에 관한 것이 대부분이었다. 그러나 최근 유전공학의 발달로 관심의 초점이 옮겨지게 되어 지금까지 *Escherichia coli* ATCC 11105 (11, 15, 16, 22), *Kluyvera cryocrescens* ATCC 21285 (3, 9; 예전에는 *K. citrophila*라고 하였음), *Providencia rettgeri* ATCC 31052 (8, 14; 예전에는 *Proteus rettgeri*라고 하였음), *Alcaligenes faecalis* ATCC 19018 (European patent number: 0453047A1), *Arthrobacter viscosus* (17, GenBank accession number L04471) 등에서 penicillin G acylase 유전자가 클로닝되어 염기배열이 완전하게 밝혀졌다. 이들의 염기배열과 효소의 아미노산배열을 비교 분석함으로써 penicillin G acylase들은 signal peptide- α 단위체-spacer peptide- β 단위체로 구성된 하나의 전구체 폴리펩티드로 만들어지고, 단계적인 proteolytic processing을 거쳐서 hydrophobic interaction으로 결합한 α -, β - 두개의 단위체로 구성된다 (4, 5, 6, 18)는 공통점이 확인되었다.

Bacillus megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase에 대해서는 그 단백질의 분자량에 대한 보

고는 있었으나 (7, 10) 효소나 유전자의 구조에 대하여는 자세한 보고가 없었다. 또한 *B. megaterium*의 penicillin G acylase는 세포 밖으로 분비되기 때문에 분리 정제하기 쉬우며 (7), 7-ADCA 등 수종의 cephalosporin 계열의 항생제를 효소적으로 합성할 수 있다는 특성이 있다 (10). 따라서 이 효소는 상업적으로 이용될 수 있다고 판단되었다. 본 연구에서는 *B. megaterium* ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자와 그 주위의 완전한 염기배열을 밝혀내고, 지금까지 알려진 다양한 penicillin G acylase들의 아미노산 배열들과 비교 분석하여 구조적 특성을 알아 보았다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

Escherichia coli HB101, JM83, 또는 JM103을 transformation의 숙주균으로 사용하였다. Plasmid pBR322와 pUC19를 cloning과 subcloning vector로 이용하였고, M13 mp18과 mp19 RF (replicative form)을 sequencing 하기 위한 subcloning vector로 이용하였다. Penicillin G acylase를 세포 밖으로 분비 생산하도록 함으로써 효소의 분리 정제를 용이하게 하기 위하여 *Bacillus subtilis* DB104와 plasmid pUBC73 (10)을 사용하였다.

배지와 배양조건

E. coli HB101 균은 LB (Luria-Bertani) 배지에 필요에 따라 ampicillin (100 μ g/ml)과 tetracycline (12.5 μ g/ml)을 각각 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

Difco 회사에서 구입한 MacConkey agar를 *E. coli* JM83 형질전환균의 선택배지로 사용하였다. M9 최소액배지 (6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 0.5 g NaCl, 1 g NH₄Cl, 0.5 g MgSO₄, 0.01 g CaCl₂, 2 g glucose, per liter, pH 7.4)에 thiamine을 첨가하여 *E. coli* JM103의 배지로 사용하였다. *B. subtilis* (pUBC73)은 LB 배지에 kanamycin (10 µg/ml)을 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

효소의 분리와 정제

B. megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자를 가지고 있는 *B. subtilis* (pUBC73)을 LB 배지 8 liter에 배양하였다. A₆₀₀이 9.0 일때 원심분리하여 균체를 제거한 액체배지에 산으로 세척한 Celite (No. 560, Johns-Manville Co.)를 섞고, 아세트산으로 pH 6.4를 유지하면서 4°C에서 5시간 동안 저어 주었다. Celite에 흡착된 효소를 24% (w/v) ammonium sulfate로 추출하고 이것을 다시 75% ammonium sulfate 침전으로 농축시켰다. 농축한 단백질을 dialysis하여 carboxymethyl (CM) Sepharose column에 흡착시킨 후 0.02~1.0 M의 NaCl 농도 기울기를 주면서 분획하였다. 이 때 penicillin G acylase는 NaCl 농도 0.35 M에서 용출되었다. 활성을 나타낸 분획들을 모아 투석하고 다시 DEAE Sepharose column (2.2×5 cm)으로 역시 0.02~1.0 M의 NaCl 농도 기울기를 주면서 분획하였더니 0.4 M NaCl 농도에서 용출되었다. 이 부분을 모아 다시 투석하여 농축시켰다. 분리 정제한 penicillin G acylase의 subunit 구성과 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였는데, Laemmli (13)의 방법에 따라 0.1% SDS를 포함하는 10% polyacrylamide gel을 이용하였다. 효소의 활성은 Balasingham 등 (1)의 방법으로 측정하였다.

DNA 추출 및 조작

제한효소, T4 DNA ligase, BAL31, 그리고 S1 nuclease 등은 New England Biolabs, Boehringer Mannheim, Promega에서 구입하였으며 반응 조건은 제조회사의 처방에 따랐다. 여러가지 재조합 DNA의 제조, M13 mp18, 19를 이용한 subcloning 및 형질전환 등의 DNA 조작은 기본적으로 Sambrook 등 (19)의 방법에 따랐다.

염기배열 결정

B. megaterium ATCC 14945에서 penicillin G acylase 유전자를 클로닝한 pUCSE59와 pCSE94 (10)를 이용하여 다양한 제한효소로 *pga* 유전자 부위를 pUC19와 M13 mp18, 19에 subcloning하였다. 이들을 주형으로 사용하고 Sequenase version 2.0 kit(USB Co.)와 [α -³²S]dATP (NEN Co.)을 사용하여 Sanger 등 (20)의 dideoxy-mediated chain termination 방법으로 sequencing하였다. M13/pUC vector의 universal forward/reverse primer와

함께 밝혀진 배열을 토대로 화학합성한 다양한 primer들을 사용하였다. 염기배열은 양쪽 DNA 가닥을 2회 이상 sequencing하여 결정하였다.

염기배열의 컴퓨터 분석

NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA)의 E-mail Server를 이용하여 다양한 penicillin G acylase 유전자의 염기배열에 관한 정보를 얻었다. 이 정보를 분석이 가능한 형태의 자료로 가공하기 위하여 GENet (Y.C. Kim, Chungbuk National University)를 이용하였으며, 염기배열과 아미노산 배열의 분석은 DNASIS/PROSIS (Hitachi Co.)을 이용하였다. ClustalV 프로그램 (D. Higgins, European Molecular Biology Laboratory)으로 배열을 정렬한 후 Boxer 프로그램 (Y.C. Kim, Chungbuk National University)으로 이를 분석하고 자료를 도표로 출력하였다.

염기배열 수납번호

본 논문에서 결정한 염기배열은 GenBank, DDBJ, EMBL의 염기배열 데이터베이스에 수납번호 (accession number) U07682로 등록되었다.

결과 및 고찰

Penicillin G acylase 유전자의 구조

B. megaterium ATCC 14945의 penicillin G acylase 유전자 (*pga*)의 구조를 알아보기 위하여 그 염기배열을 결정하였다. 우선 *pga* 유전자가 클로닝되어 있는 pUCSE59와 pCSE94의 상세한 제한효소 지도 (Fig. 1)를 작성한 후, 이를 이용하여 다양한 subclone들을 제조하고 sequencing하였다. *pga* 유전자와 그 downstream 부분의 염기배열은 pUCSE59를 이용하여 결정하였으며, pUCSE59에서 *pga* 유전자의 upstream 부분이 pBR322에서 유래된 부분이었기 때문에 upstream 부위의 염기배열은 pCSE94를 이용하여 결정하였다. 이렇게 하여 *B. megaterium*의 *pga* 유전자를 포함하는 2,908 bp의 염기배열을 결정할 수 있었다 (Fig. 2). 이 염기배열을 분석한 결과 염기번호 301부터 2706까지 하나의 open reading frame (ORF)이 존재함을 알 수 있었는데, 이 ORF는 802개의 아미노산을 암호화하고 있고 (Fig. 2), 여기서 해독된 폴리펩티드의 분자량은 91,983이었다. 301-303번의 ATG 개시코돈 12 nt 앞에는 ribosome 결합부위라고 생각할 수 있는 GGAGGTG 배열이 있었다. 이 Shine-Dalgarno (SD) 배열의 마지막 G에서 개시코돈까지의 거리는 11 nt로서, *B. subtilis*의 유전자에서 보통 8~9 nt 정도인 것 (2)에 비하면 약간 멀지만, 이 배열이 *B. subtilis*와 *E. coli*의 16S rRNA의 3'-말단 (각각 3'-UCUUUCCUCCACUAG-5', 3'-AUUCCUCCACU-5')과 완전히 상보적이었다. SD 배열의 5' 위쪽 부위는 A/T 염기가 많기 때문에 *B. subtilis*의

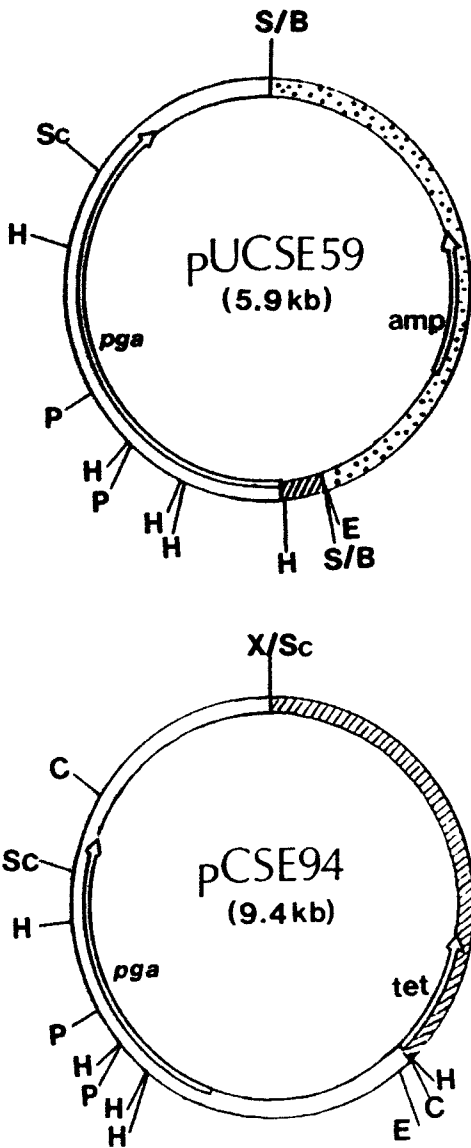


Fig. 1. Restriction maps of *pUCSE59* and *pCSE94*. A hatched part of a map is originated from *pBR322*, and dotted parts from *pUC19*. *pga* represents the penicillin G acylase gene from *B. megaterium* ATCC 14945. Arrowheads indicate the direction of transcription. E, *EcoRI*; C, *Clal*; B, *BamHI*; H, *HindIII*; S, *Sau3AI*; P, *PvuII*; Sc, *Scal*; X, *XhoI*.

promoter와 유사한 부위를 여러 곳에서 발견할 수 있었지만, Fig. 2에서 밑줄로 나타낸 -35부분 (TGGAGA)과 -10 부분 (TAAAAT)이 가장 유사한

것으로 나타났다. 이 promoter의 -35와 -10 sequence 사이의 거리는 18 nt이었다. 그러나 정확한 promoter를 알아내기 위해서는 전사개시점을 밝혀 내야만 한다. 전형적인 종결코돈 (TAG)의 61 bp 아래쪽으로 25 bp의 inverted repeat 염기배열을 발견할 수 있었는데, 이 부위는 stem-loop 구조와 T-stretch를 형성할 수 있기 때문에 *pga* 유전자의 전사종결체로 작용할 것으로 생각된다.

Penicillin G acylase의 구조

*B. megaterium*의 penicillin G acylase의 구조를 알아보기 위하여 염기배열로부터 유추한 폴리펩티드의 아미노산 배열을 이미 밝혀져 있는 다른 효소들의 아미노산 배열과 비교하여 보았다. Ohashi 등 (17)은 *A. viscosus* ATCC 15294에서 분리한 효소의 α-단위체와 β-단위체를 각각 아미노산 sequencing을 실시하여 N 말단의 아미노산 배열을 밝혀낸 바 있다. *B. megaterium*의 *pga* 유전자가 암호화하고 있는 802개의 아미노산 배열 중에서 27번과 67번 사이의 아미노산은 *A. viscosus* ATCC 15294의 α-단위체의 아미노 말단을 이루는 41개의 아미노산과 완전히 일치하였고, 266번과 303번 사이의 아미노산은 β-단위체의 아미노 말단을 이루는 38개의 아미노산과 완전히 일치하였다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 *B. megaterium*의 penicillin G acylase도 92 kDa의 전구체로 해독된 후 proteolytic processing 과정을 거쳐 α-와 β-단위체로 구성됨을 보여주는 것이다.

*B. megaterium*의 penicillin G acylase가 실제로 서로 다른 두개의 단위체로 구성되어 있는지를 확인하기 위하여 효소를 분리 정제하였다. Fig. 3의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 결과에서 보는 바와 같이 Celite 추출 (lane 1), CM-Sepharose (lane 2), DEAE-Sepharose column chromatography (lane 3)를 통해 거의 순수하게 효소를 분리 정제할 수 있었다. Fig. 3의 4번 lane에서 보는 바와 같이 *B. megaterium*의 penicillin G acylase도 각각의 분자량이 25 kDa과 61 kDa 정도인 두개의 단위체로 이루어져 있음을 확인하였다. 아미노산 배열로부터 계산한 β-단위체의 분자량은 61,397 Da으로서 전기영동 결과와 일치하였다. 그러나 아미노산 번호 27번과 265번 사이의 배열로부터 계산한 분자량은 27,568 Da으로 전기영동 방법으로 측정된 α-단위체의 분자량 25,000 Da보다 2,568 Da 정도 컸다. 이것은 다른 penicillin G acylase의 경우와 마찬가지로 *B. megaterium*의 효소도 α-단위체와 β-단위체 사이에 proteolytic processing에 의해 잘려져 나가는 20여 개의 spacer peptide가 존재함을 시사한다. 이를 확인하기 위해서는 α-단위체의 C-말단의 아미노산 배열을 결정해야만 할 것이다. 이상에서 살펴본 바와 같이 *B. megaterium*의 penicillin G acylase는 분자량이 25 kDa과 61 kDa인 두개의 단위체로 이루어져 있는데, 이러한 결과는 효소의 분자량이 120 kDa이

```

1  AAGTCGTCCTCTTTTAAATAATGAGCATTTCATCACTCTCTGAAATTAATAAAGGCTAATTTGGCTGTTAATTTGGAGAAAATTTATTTTAAATAAT-35ATAAATATGCTG
121 AAATTAAGGAATACTACATGACTAAGCGATTTAGAACAAAAGTTGGATAGAGTAAGATAAAAACATAATATATTCCTGAAGGTTCTAAATATTTAAATATTCTCTGAAATGAT
241 AACGCGAAGGTTATGATTCGTGATATAAGTGTTATAAAAAGTGGAGTGGGAAGTGAATTAATAAGACGAAGTGGCTAATATCAGTCATAATGCTATTTGTTTTCATTTTTCCTCAAAAT
1  M K T K W L I S V I L F V I F P Q N
361 CTAGTTTTGCTGGGAGGATAAGAATGAAGGCTCAAGTAGTACGTGATAATTTGGAGTACCCCATTTATACDCTAAAATAAAAAGATTTATATGAGCGGTATGGATATGTTATG
21  L V F A G E D K N E G V K V R D N F G V P H L Y A K N K K D L Y E A Y G Y V M
481 GCAAAGGATCGACTATTTCACTGGAAATGTTCCGTCGCGAAATGAGGGGACCGTTTCAGAAAATTTTGGAGAAGATTATCTTTCAAAGATGACCAATCCAGAGAGATGGATATAGT
61  A K D R L F Q L E M F R R G N E G T V S E I F G E D Y L S K D E Q S R R D G Y S
601 AATAAGAAATTAATAAATGATGACGGTCTGGATGTCAGCCAAAAGAAATTAATAGCAAAAATTTGCGAAGGTATTCACGTTATGTAAGTGAAGCTTTAAAAGATCCAGATGATAAG
101  N K E I K K M I D G L D R Q P K E L I A K F A E G I S R Y V N E A L K D P D D K
721 CTTTCGAGGAGTTTCATGAATATCAGTTTTTACCCAAAATGGACTTCAACAGATGTTGGCGTTTATATGGTATCCATGACCTATTTTGGATAATCAGCAGAGATTAATAAAC
141  L S K E F H E Y Q F L P Q K V T S T D V V R V Y M V S M T Y F H D N H Q E L K N
841 GCAGAGATCTGCAAAGCTAGACATGAATATGGACAGAAGTTTCCGGGAAAATGTTGGATGATTTAGTGGGAAAATGATCTAGCCCTCTCAACAAGATTTGAGCGAGGGGAAA
181  A E I L A K L E Y G T E V S R K M F D D L V W K N D P S A P T S I V S E G K
961 CCAAAAAGGACTGCTTCTCAATCCCTCAAATCTGCTTCCAGCTGAATCAAAGCTTCTGAAAAGTGGGAAAGGAAAGGAAATTTTCCCAAGACTCTGAGAACCTGGGATTA
261  P K R D S S Q L Q I L S S A V I K A S E K V G K E R E N F Y G V G E L G L
1081 CCGTTAAGATAGCCAGTAATCCGCCATATGTCGGTCCGAGAAATCTCAACAGGAAATGCTTTATTTACGATGACCAAGAGTGGTTTGTTCCTCTGGATTTTGTAGGAGTA
281  P L K I G L S N A A I V G S E K S A T G N A L L F S G P Q V G F V A P G F L Y E V
1201 GGTTCGATGCGCCAGGTTTGATATGGGAAGTTCAGATTCAATAGCTATCCCTTTCATCTGTTGGAGCCAACTCACTTTCTAAGTCAAGCTGACGCTGGTACCGGATAACC
301  G L N A P G F D M E G S G F I G Y P F I M F G A N N H F A L S A T A G Y G N V T
1321 GATATCTTTGAGGAAAATTAATGCGAAGAATCTTCCAGTATTTTACAAGGAAATGGAGAGACATGGAAAAGGAGGAAATCTTTTCAGCTCAAGAGGACAAATGGAGAAAG
341  D I F E E K L N A K N S S Q Y L Y K G K V R D M E K R K E S F T V K G D H G E K
1441 AAAACAGTAGAAAAGATTATTAATGAGACATGATGCTGTATTAATGATAGAGTAAGAAAATAAAGTGGCTTACAGTAAGTGGTGTCTTCGCTGGAACTGAAGCCCAAGCATG
581  K T V E K I Y R E Y T E V S R K M F D D L V W K N D P S A P T S I V S E G K
1561 TGCCCTACATGAAAGCAATTTGGCCAAAACCTTAAAGAATTTGAGAAATGCAACAGTAAATGATGATGCTTTGAATTTGATATTTCGAGTAAGAAAGGATGATATGACCTGATT
421  S A Y N L K E F E N A A S E Y T M S L N W Y A D K K G D I A Y Y
1681 CATGTAGGAGATATCCAGTAAAGAACAAGCAAAATGATGAAGAATCCCTACACCAGGACAGGAGAAATGAGTGGAAAGGTTTATTCCTTTTAAAGAGAACCCTCATGTAATCAAT
461  H V G R Y P V R N S K I D E R I P T P G T G E Y E W K G F I P F K E N P H V I N
1801 CCGAAGAATGGCTATGTAGTAAATGGACATAAGCCTTCAAGAGTGGGAAATGATGATATAGTATTTTATGGGAGGAGTAATGGAAATATATCAATGGATGGAA
501  P K N G Y V V N W N N K P S K E V V N G E Y S F Y W G E D N R V Q Q Y I N G E
1921 GCGAGAGGAAAGTTACATAGAAGATTAATGAATTAATGACGCAAGCTTTCACAGCTGGAGCAAACTCTTAAACAGTTATGGTTGATGTTGGACAGAGATAATCA
541  A R G K V L E D I N E I N Y T A S F A Q L R A N L F K Q L L D K N K S
2041 ACCAAGCGAATACATCTATTTAATGAAAACCTGGAAGAATGGAATAATCTAAAAGAGAGCAAAAATAAGATGGATATTAATGAGCAGGATTCGCGCTATTCTTGAATGAGGTTG
581  T N G N Y I Y L I E K L E E W N N L K E D E N K D G Y Y D A G I A A F F D E W
2161 AATATCTCCATGATAAACTTTTATGGATGATTTGGAGACTCTATGGAATAACGAAAGAAATTCAGGATCAATCCGCTATGGGCTCATAGGATATAAATAATTAACAAGGAAATCT
621  N N L H D K L F M D E L G D F Y G I T K E I T D H R Y G A S L A Y K I L N K E S
2281 ACAAACATAAATGGTGAAGCTAGATCAGGAAAATAATAATGGAAAGCACAATGAAGTACTTCTAAATTCGCAATCAGAAAAGGTTGAAGCAGAAAATGGCTATGCTCAT
661  T N Y K W V N V D O E K I I M E S T N E V L A K L Q S E K G L K A E K W R M P I
2401 AAACCGTACTTTGGTGAATAATCATTGGATTCGCGGCGGATGGCTCAATGACTCAATATGGAATGAATGGGAGGAGTAATGAAATCATTATATGAAATGAAATGAAATGAAATGAA
701  K T M T F G E K S L I G I P R G Y G S M T P I I E M N R G S E N H Y I E M T P T
2521 GCGCGAGTGGCTTAAACATCACACCGCTGGTCAAAATGGATTTGTAATAAAGATGGAAAGTAAAGTGAACACTATGATGACCAACTAGTTTGGTCCCGGAATGGAAATCAAGCCA
741  G P S D G F N I P P G Q I G F V K R D G T I S D H Y D Q L L M F A E W K F K P
2641 TACTTATTAAACAGAAAGATATAAATAACAGCTAAAATATGATGCAATAAATGATGAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAGTAAAG
781  Y I L F N K K D I N K A A K N V S A L N M S K
2761 AITGATGCTGTGACCTCGATTGTAATCGGGTCAATTTTGTAAATCCCACTGTATGATGACCTTCAAAGATAGGTTACAACAAAACCCGGCGCAAGGGAAATCTTACTCCGGCAA
2881  TATATTAAGAAATAATGGGAGATGATCT

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene from *B. megaterium* ATCC 14945. The total sequence of 2,908 bp containing the penicillin G acylase gene is presented. The open reading frame composed of 2,406 bases from the nucleotide number of 301 to 2,706 was found. The deduced amino acid sequence is shown in the one-letter code below the nucleotide sequence. The asterisk indicates a stop codon. A potential ribosome binding site is underlined and marked as SD. The putative promoter is also underlined and marked as -35 and -10. A possible transcription terminator is shown by arrow-headed lines below the nucleotide sequence. Two end-bracketed lines under the amino acid sequence represent two regions identical to the N-terminal amino acid sequences identified in the α - and β -subunits, respectively, of the penicillin G acylase from *Arthrobacter viscosus* ATCC 15294 (17).

며 (7), homodimer로 이루어져 있다 (10)는 전보의 결과와는 상이하였다.

전구체의 N-말단에는 효소를 세포 밖으로 분비하는데 관여할 것으로 생각하는 26개의 아미노산으로 구성된 signal peptide가 존재하는데, 여기에는 basic한 아미노 말단 (Lys2와 Lys4)이 있었으며 7번과 20번 사이에 소수성 아미노산으로 이루어진 core 부분도 포함되어 있었다 (Fig. 4). 그러나 Ala24, Gly25, Glu26이 전형적인 signal peptidase 절단부위는 아니었다. *A. viscosus* ATCC 15294의 α -단위체의 아미노 말단이 33%의 효소는 Asp27이며 나머지 67%는

Glu30이라는 보고 (17)로 미루어 볼 때, α -단위체의 N-말단 부위가 processing된다는 사실을 알 수 있고, 따라서 signal peptidase가 24~26번 보다 앞쪽을 절단하고 이어 N-말단의 아미노산 잔기가 몇개 제거되었을 가능성도 있다. 여러 α -단위체의 N-말단 부위를 비교하여 보면 Fig. 4에서 보는 바와 같이 상동성이 매우 낮다는 것을 알 수 있는데 이는 N-말단 부위의 몇개의 아미노산은 그리 중요한 역할을 수행하지 않으며, 따라서 여러 단계로 processing될 수 있는 것으로 추측된다. 그리고 *B. megaterium*에서 cysteine이 한개도 나타나지 않으므로 α -단위체와

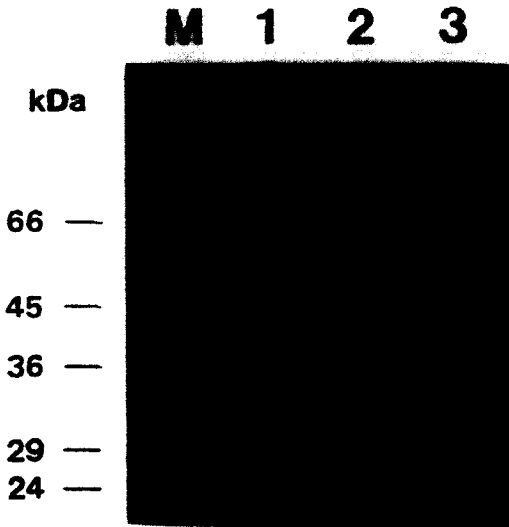


Fig. 3. Monitoring the penicillin G acylase protein by SDS-PAGE showing that it has two distinct subunits.

The penicillin G acylase protein was traced in the patterns of 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the active fractions obtained during purification by Celite (lane 1), CM-Sepharose (lane 2) and DEAE-Sepharose (lane 3) column chromatography. The samples containing approximately 10 µg of protein were boiled for 3 min, cooled quickly in ice bath and loaded on a 1.5 min thick and discontinuous slab-gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Standard protein markers (lane M) used were bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and trypsinogen (24 kDa).

β-단위체 간의 상호 결합에 S-S 결합이 사용되지 않음을 알 수 있었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 *B. megaterium*의 penicillin G acylase 역시 signal peptide-α 단위체-spacer peptide-β 단위체로 이루어진 하나의 전구체로 해독된 후 processing을 거쳐서 만들어지는 두개의 단위체로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 1. The G+C content of the chromosomal DNA and penicillin G acylase gene from various penicillin G acylase-producing strains

Strains	mol% G+C	
	Chromosome ^a	<i>pga</i> gene
<i>B. megaterium</i>	36.5~47.4	36.8
<i>A. viscosus</i>	59.4	36.7
<i>A. faecalis</i>	55.9~59.4	57.9
<i>E. coli</i>	48 ~52	48.1
<i>K. cryocrescens</i>	55 ~57	57.3
<i>P. rettgeri</i>	39 ~42	40.8

^a data from Krige *et al.* (12) and Sneath *et al.* (21).

penicillin G acylase 역시 signal peptide-α 단위체-spacer peptide-β 단위체로 이루어진 하나의 전구체로 해독된 후 processing을 거쳐서 만들어지는 두개의 단위체로 구성되어 있다는 것을 알 수 있었다.

진화적 고찰

GenBank의 accession number L04471로 실린 *A. viscosus*의 *pga* 유전자의 염기배열과 *B. megaterium*의 염기배열을 비교해본 결과 97.9%의 identity가 있음을 발견하였다. Enterobacteriaceae에 속하는 *E. coli*, *K. cryocrescens*, *P. rettgeri*의 *pga* 유전자들 사이에서도 identity가 60~77% 밖에 되지 않는데 비하면 *B. megaterium*과 *A. viscosus*의 *pga* 유전자 사이에 identity가 97.9%나 된다는 것은 매우 놀랍다. 염기 배열로부터 유추한 아미노산 배열도 두 종류 모두 802개의 아미노산으로 되어 있으며 이 중에서 불과 24개의 아미노산만이 다르다 (97.0% identity). 특히 활성을 가진 효소 분자에는 존재하지 않는 signal peptide와 spacer peptide 부위도 각각 한개의 아미노산만이 다를 정도로 identity가 매우 크다. 이러한 결과는 *B. megaterium*과 *A. viscosus* 사이에서 *pga* 유전자가 최근에 전이되었음을 시사한다.

따라서 이들 사이의 *pga* 유전자 전이가 plasmid에 의하여 일어났을 가능성을 조사하기 위하여 plasmid의 존재 유무를 확인하였으나 두 균주에서 모두 plasmid DNA는 검출되지 않았다 (자료 미제시). 그

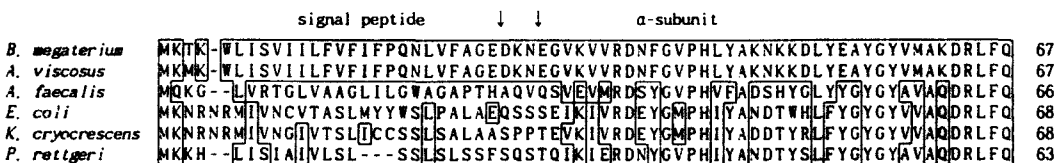


Fig. 4. Alignment of N-terminal amino acid sequences of precursor polypeptides from various penicillin G acylase-producing strains.

The residues identical to the penicillin G acylase from *B. megaterium* are enclosed in boxes. Vertical arrowheads indicate two distinct N-terminal amino acids found in the α-subunit from *A. viscosus* (17). Numbers indicate the amino acid positions of adjacent amino acids. Dashes indicate sequence gaps.

러나 chromosome에 삽입되어 있는 plasmid에 의하여 전이되었을 가능성은 배제할 수 없다.

유전자의 전이 방향을 알아보기 위하여 penicillin G acylase를 생산하는 균주들의 G+C 함유율(12, 21)과 *pga* 유전자의 G+C 함유율을 조사 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 *A. viscosus*를 제외한 5종의 균주에서 모두 *pga* 유전자의 G+C 함유율이 chromosomal DNA의 G+C 함유율과 비슷하였다. 따라서 이들 균주에서 *pga* 유전자는 종의 분화 단계에서부터 계속 존재하여 왔으며 chromosome과 함께 진화되어 왔을 가능성이 매우 높다. 그러나 *A. viscosus*의 *pga* 유전자의 G+C 함유율은 36.7%로 chromosomal DNA의 G+C 함유율 59.4%와는 상당한 차이가 있었다. *A. viscosus*에 존재하는 *pga* 유전자의 배열이 *B. megaterium*의 *pga* 유전자와 매우 유사하다는 점과 이 유전자의 G+C 함유율이 *A. viscosus* 보다는 *B. megaterium*의 chromosomal DNA와 유사하다는 점은 *B. megaterium*의 *pga* 유전자가 최근에 *A. viscosus*로 전이되었다는 것을 시사한다.

감사의 말

본 논문은 1992년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Balasingham, K., D. Warburton, P. Dunnill, and M.D. Lilly, 1972. The isolation and kinetics of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 250-256.
- Band, L. and D.J. Henner, 1984. *Bacillus subtilis* requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA* 3, 17-21.
- Barbero, J.L., J.M. Buesa, G.G. de Buitrago, E. Mendez, A. Perez-Aranda, and J.L. Garcia, 1986. Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase gene from *Kluyvera citrophila*. *Gene* 49, 69-80.
- Bock, A., R. Wirth, G. Schmid, G. Schumacher, G. Lang, and P. Buckel, 1983. The penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 consists of two dissimilar subunits. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 135-139.
- Bock, A., R. Wirth, G. Schmid, G. Schumacher, G. Lang, and P. Buckel, 1983. The two subunits of penicillin acylase are processed from a common precursor. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 141-144.
- Bruns, W., J. Hoppe, H. Tsai, H.J. Brüning, F. Maywald, J. Collins, and H. Mayer, 1985. Structure of the penicillin acylase gene from *Escherichia coli*: A periplasmic enzyme that undergoes multiple proteolytic processing. *J. Mol. Appl. Genet.* 3, 36-44.
- Chiang, C. and R.E. Bennett, 1967. Purification and properties of penicillin amidase from *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 93, 302-308.
- Daumy, G.O., J.A. Williams, A.S. McColl, T.J. Zuzel, and D. Danley, 1986. Expression and regulation of the penicillin G acylase gene from *Proteus rettgeri* cloned in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168, 431-433.
- Garcia, J.L. and J.M. Buesa, 1986. An improved method to clone penicillin acylase genes: Cloning and expression in *Escherichia coli* of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. *J. Biotechnol.* 3, 187-195.
- Kang, J.H., Y. Hwang, and O.J. Yoo, 1991. Expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biotechnol.* 17, 99-108.
- Kim, Y.C., Y.B. Koo, S.J. Oh, and H.S. Kang, 1983. Studies on the structure and expression of the penicillin G acylase gene: I. Cloning of the penicillin G acylase gene of *E. coli* ATCC 11105. *Kor. J. Microbiol.* 21, 95-102.
- Krige, N.R. and J.G. Holt, 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685.
- Ljubijankic, G., M. Konstantinovic, and V. Glisin, 1992. The primary structure of *Providencia rettgeri* penicillin G amidase gene and its relationship to other gram negative amidases. *DNA Sequence* 3, 195-200.
- Mayer, H., J. Collins, and F. Wagner, 1979. Cloning of the penicillin G acylase gene of *Escherichia coli* ATCC 11105 on multicopy plasmids, p. 459-470. In K.N. Timmis and A. Puhler (ed.), Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Oh, S.J., Y.C. Kim, Y.W. Park, S.Y. Min, I.S. Kim, and H.S. Kang, 1987. Complete nucleotide sequence of the penicillin G acylase gene and the flanking region, and its expression in *Escherichia coli*. *Gene* 56, 87-97.
- Ohashi, H., Y. Katsuta, T. Hashizume, S. Abe, H. Kajiura, H. Hattori, T. Kamei, and M. Yano, 1988. Molecular cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2603-2607.
- Oliver, G., F. Valle, F. Rosetti, M.G. Pedrozo, P. Santamaria, G. Gosset, and F. Bolivar, 1985. A common precursor for the two subunit of the penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. *Gene* 40, 9-14.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977.

- DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
21. **Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt**, 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
22. **Schumacher, G., D. Sizmann, H. Haug, P. Buckel, and A. Bock**, 1986. Penicillin acylase from *E. coli*: Unique gene-protein relations. *Nucl. Acids Res.* 14, 5713-5727.

(Received March 21, 1994)

(Accepted April 22, 1994)

ABSTRACT: Nucleotide Sequence of the Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* and Characteristics of the Enzyme

Kang, Joo Hyun, Seong-Jae Kim¹, Yong-Chjun Park¹, Young Hwang, Ook Joon Yoo, and Young-Chang Kim^{*1} (Department of Life Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-606, and ¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

The complete nucleotide sequence of the cloned *pga* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945 and its 5'- and 3'-flanking regions was determined. The sequence revealed only one large open reading frame (2,406 bp) of the penicillin G acylase (*pga*) gene. Upstream from ATG of the *pga* gene, there was a putative ribosome binding site, Shine-Dalgarno sequence. The promoter-like structure, -10 and -35 sequences, was also found. Following the stop codon, TAG, a structure reminiscent of the *E. coli rho*-independent transcription terminator was present. The amino acid sequence was deduced from the nucleotide sequence. The molecular mass of the polypeptide was 91,983 Da. There was a potential signal sequence in its amino-terminal region. A comparison of its deduced amino acid sequence with other characterized penicillin G acylases and the result of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified enzyme showed that a precursor polypeptide of 92 kDa was processed into two dissimilar α - and β -subunits of 25 and 61 kDa.