

Streptomyces coelicolor A3(2)에서 *hrdA* 유사 Sigma 인자 유전자의 클로닝

한지숙 · 조은정 · 노정혜*

서울대학교 자연과학대학 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

세균의 RNA 중합효소에서 여러 σ 인자들 간에 보존된 아미노산 서열중 2.3 부위와 4.2 부위의 아미노산 서열로부터 유추하여 두가지의 PCR primer를 제작하였다. 이들을 이용하여 PCR을 수행하였을 때, *E. coli*와 *Streptomyces coelicolor*의 DNA로부터 예상되었던 480 bp 정도의 DNA가 증폭되는 것을 관찰하였다. *E. coli* DNA에서 증폭된 DNA를 클로닝하여 염기서열을 결정 한 결과 *E. coli*의 *rpoS* 유전자로부터 유래하였음을 알았다. 이를 탐침으로 *S. coelicolor*에서 genomic DNA hybridization을 수행하였을 때, *PvuII* 절편 두가지 (3.5 kb, 2.0 kb) 와 *SalI* 절편 두가지 (3.4 kb, 1.5 kb)에 탐침이 결합하는 것을 관찰하였다. 3.5 kb의 *PvuII* 절편을 sublibrary로부터 클로닝하고, 탐침이 결합하는 1.0 kb의 *BamHI/HincII* 절편의 염기서열을 분석하였다. 부분적으로 결정된 염기서열을 BLAST 프로그램을 이용하여 GenBank와 EMBL, PDB 등의 data library의 유전자들과 비교하여 본 결과 *Streptomyces*속의 σ 인자들뿐만 아니라 *Synechococcus*종, *Anabaena*종, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stigmatella aurantica* 등의 주된 σ 인자와 높은 유사성을 보였다. 현재까지 1.2 부위와 4 부위에 해당하는 부분의 염기서열을 결정하였는데, 이 부분은 *S. coelicolor*에서 알려진 다섯가지의 σ 인자 유전자 중 *hrdA*와 가장 높은 유사성을 보이며, 아미노산의 유사성이 1.2 부위에서는 88%, 4 부위에서는 75%인 것으로 나타났다.

KEY WORDS □ *Streptomyces coelicolor* A3(2), RNA polymerase σ factor, *hrdA*-like σ factor, *Escherichia coli* *rpoS*, PCR

세균의 RNA 중합 효소는 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 의 다섯개 단위체로 구성되어 있는데 이 중 σ 인자는 프로모터의 특정 염기서열을 인지해 RNA 중합 반응의 개시에 특이성을 부여하는 기능을 한다 (3, 7, 10). 따라서, 한 개체 내에 두 종류 이상의 σ 인자가 존재할 경우 σ 인자는 성장에 필요한 유전자의 발현이라는 일반적인 기능을 할 뿐 아니라, 유사한 프로모터 구조를 가진 유전자군을 특이적으로 발현시켜 환경의 변화에 대한 적응, 또는 세포의 분화를 매개하는 중요한 조절 인자로서 작용하게 된다.

*Streptomyces*는 성장과정 중 진행생물인 균류와 유사한 독특한 형태분화와 생리적 변화 과정을 거치는 Gram 양성 세균으로 유전자 발현조절에 있어 σ 인자가 중요한 역할을 담당하리라 생각되고 있는데, 현재까지 최소한 7개의 σ 인자가 *Streptomyces coelicolor*에서 보고되어 있다 (5). *B. subtilis*의 *veg*와 *ctc* 프로모터 및 *S. coelicolor*의 *dagA* 프로모터 네 종류를 주형으로 한 *in vitro* transcription을 통해, *veg* 프로모터를 인지하는 σ^{35} (17), *ctc*와 *dagAp3*를 인지하는 σ^{40} (17, 4), *dagAp2*를 인지하는 σ^{38} (4) 등의 σ 인자의 존재가 알려졌으며, *S. coelicolor*의 *gal* 오페론의 두 프로모터인 *galp1*과 *galp2* 중 *galp2*는 σ^{38} 에 의해, *galp1*은 기존에 알려진 것과는 다른 인자에 의해 인

지됨이 알려졌다 (18). *dagAp4*를 인지하는 σ^{66} 은 유전학적 연구가 진행된 후 순수 분리되어 N 말단의 아미노산 서열을 분석한 결과 *hrdB* 유전자의 산물임이 밝혀졌고 (2), *veg* 프로모터를 인지하는 것으로 알려진 σ^{35} 는 σ^{66} 의 분해 산물이라 생각되고 있다. 이와 같이 생화학적으로 σ 인자의 다양성을 규명하는 작업과 더불어 유전자 수준에서의 연구가 진행되어, 현재까지 6종류의 σ 인자 유전자가 *S. coelicolor*에서 클로닝되어 있다.

*Streptomyces*의 분화 과정에서 기균사로부터 포자가 형성되는 과정이 저해된 돌연변이체의 연구를 통해 알려진 8개의 유전자 중 *whiG*가 포자형성에 관여하는 σ 인자임이 밝혀졌고 (6, 11), *E. coli*의 σ^{70} (*RpoD*)과 *B. subtilis*의 σ^A 에서 보존된 아미노산 서열로부터 유추하여 합성한 oligonucleotide를 탐침으로 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* (homologs of *rpoD*)가 클로닝되었다 (14, 15, 16). 각 유전자에 대한 돌연변이체를 이용한 실험에서 *hrdB*만이 성장에 필수적이라는 사실로써 *hrdB*가 *S. coelicolor*의 주된 σ 인자임이 밝혀졌으나 *hrdA*, *hrdC*, *hrdD*의 기능에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 이와 같이 *Streptomyces*에서 σ 인자의 연구는 다양성 규명의 측면에서는 어느 정도 진전이 되었지만, 그 σ 인자들에 대한 기능적 접근은

아직 미미하다. 이미 생화학적으로 존재가 확인된 σ^{49} , σ^{24} 등의 minor σ 인자들이 실제로 어떠한 조건에서 어떠한 유전자들의 발현을 조절하는지 알아내기 위해서는 그러한 σ 인자들의 유전자를 클로닝하는 일이 선행되어야 할 것이다. 본 연구에서는 *E. coli*로부터 증폭된 *rpoS* 유전자 절편을 탐침으로 *S. coelicolor* 에서 새로운 σ 인자 유전자의 클로닝을 시도하였다. 그 결과, *S. coelicolor*의 *hrdA*와 유사한 염기서열을 가진 새로운 유전자를 클로닝하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

σ 인자 유전자의 클로닝을 위하여 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 변종인 M145 strain을 사용하였다 (영국 John Innes Institute, Dr. Hopwood 제공) Hopwood 등의 방법(8)으로 얻은 포자를 YEME 배지 (0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 0.3% malt extract, 1% glucose, 34% sucrose, 5 mM MgCl₂·6H₂O) 에 접종하여 30°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 2일간 배양하였다. *E. coli*의 genomic DNA는 MG1655 strain에서 분리하였으며, 형질전환을 위한 균주로는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였고 Luria broth에서 37°C로 배양하였다.

DNA의 분리 및 정제

Streptomyces genomic DNA의 분리는 Hopwood 등의 방법 (8)을 수정하여 사용하였다. 지수성장기까지 배양한 균체를 2,500 rpm에서 20분간 원심 분리하여 수확한 후, TE 완충용액으로 한번 씻고 다시 원심 분리하여 약 1g의 균사당 5 ml의 TE 완충용액에 재현탁한 후, lysozyme을 20 mg/ml의 농도로 30°C에서 1시간 처리하였다. 0.1 M EDTA, 0.2 mg/ml pronase, 1% SDS를 처리하여 37°C에서 2시간 이상 반응시킨 후, 페놀/클로로포름, 클로로포름/아이소아밀알코올로 추출을 반복하여 DNA를 분리하고 에탄올로 침전시켰다. 침전을 재용해하여 RNaseA를 처리한 후 다시 정제하고 TE에 녹여 4°C에 보관하였다. *E. coli* genomic DNA를 분리하기 위하여는 100 ml LB 배지에서 배양한 세포를 2000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, 5 ml의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA 용액에 현탁하여 -20°C에서 30분간 얼렸다. Lysozyme 용액 [lysozyme 5 mg, 0.25 M Tris-HCl (pH 8.0)] 을 넣고 잘 섞으면서 녹인 후, 얼음에 45분간 넣어두고 STE [0.5% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.4 M EDTA] 1 ml과 pronase (1 mg/ml)를 넣은 다음 50°C에서 1시간 반응시켰다. DNA의 정제는 *S. coelicolor*와 동일한 방법으로 행하였다. 플라스미드 DNA의 분리는 alkaline lysis방법 (1)을 이용하였고 염기서열 결정을 위한 DNA는 PEG 침전법 (9)을 이용하여 정제하였다.

PCR

Primer로 사용한 P1 primer (22 mer: 5' CACS

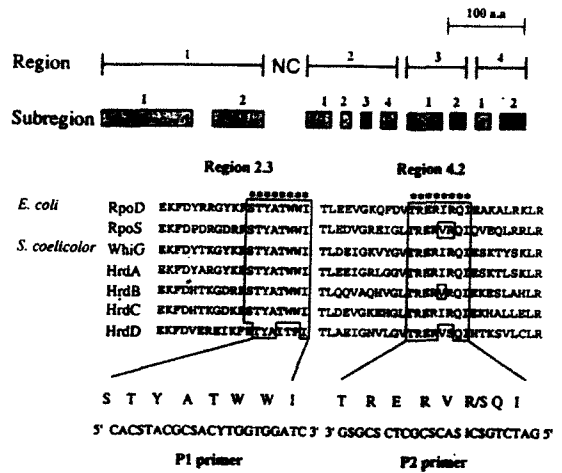


Fig. 1. Design of factor specific primers from amino acid sequences conserved among various σ factors of *E. coli* RpoD family. Conserved regions in sigma factors of *E. coli* RpoD family were shown as described by Lonetto *et al.* (10). NC represents nonconserved region. Alignment of amino acid sequences of 7 σ factors corresponding to regions 2.3 and 4.2 were shown. Sequences with upper asterisks were used to design the primers shown at the bottom.

TACGCSACYTGGTGATC 3')와 P2 primer (23 mer: 5' GATCTGSCISACSCGCTCSCGSG 3')는 Oligos Etc. Inc.와 기초과학연구원 지원센터에 주문하여 제작하였다 (Fig. 1 참조). Michael (12) 등의 방법에 따라 Taq DNA polymerase (KOSCO)를 사용하여 *E. coli*와 *S. coelicolor*의 genomic DNA를 주형으로 하고, 제작한 P1 과 P2를 primer로 하여 PCR 반응을 수행하였다. 총 100 μ 부피로 genomic DNA 50 ng, P1 primer (250 pmol)와 P2 primer (250 pmol) 각 2 μ l, 10 \times Taq polymerase buffer 10 μ l, 2 mM dNTP 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 6 μ l, Taq DNA polymerase (1 u/45 μ l) 1 μ l를 혼합한 후 DNA thermocycler (Perkin Elmer)에서 95°C 1분, 40°C 1분, 72°C 1분 30초의 조건으로 30주기를 반응시켰다. 증폭된 DNA에 S1 nuclease와 Klenow DNA polymerase를 처리하여 무딘 말단으로 만든 후 T4 DNA ligase (Boehringer Mannheim)를 사용하여 *Sma*I로 절단한 pUC18과 연결시켰다. 반응용액 중 3 μ l를 electroporater (Bio-Rad) 를 사용하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환한 후 증폭된 DNA 절편을 가지고 있는 클론을 골라내었다.

DNA 염기서열 결정

Sanger의 dideoxy-chain termination 방법을 사용하였다 (19). 효소 및 시료는 Sequenase version 2.0

kit (USB)를 사용하였다.

Southern hybridization

적당한 제한효소로 자른 DNA를 0.8% agarose 겔에서 전기영동한 후 0.25 M HCl 용액에서 15분간 depurination하고 (genomic Southern의 경우), 변성 용액 (0.5 M NaOH, 0.15 M NaCl)과 중화용액 [0.5 M Tris-HCl (pH 7.7), 0.15 M NaCl]에서 각각 30분 처리한 후, High Bond N membrane (Amersham)에 진공 또는 모세관현상을 이용하여 부착시켰다. DNA가 부착된 membrane을 2×SSC로 5분간 씻은 후 잘 말려 UV로 crosslink하였다. 때로는 중화용액 까지 처리한 겔을 60°C에서 말려 hybridization에 직접 사용하기도 하였다. Oligonucleotide를 탐침으로 사용할 경우, [γ -³²P]ATP (Amersham)와 T4 polynucleotide kinase (KOSCO)를 이용하여 5' 말단을 표지하였고 size marker로는 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단한 파아지 λ DNA를 [α -³²P]dATP와 Klenow DNA polymerase (KOSCO)를 이용하여 5'과 3' 말단을 표지하여 사용하였다. 복선 DNA의 표지에는 random primer 와, P1 또는 P2 primer를 Klenow DNA polymerase로 연장하는 방법을 사용하였다. 준비된 membrane을 hybridization tube에 넣고, prehybridization 용액 (6×SSC, 0.5% SDS, 1×Denhardt's solution, 50 mg/ml herring sperm DNA)에서 42°C로 2시간 동안 prehybridization한 후, 표지한 DNA를 10⁶cpm/ml의 농도로 첨가하여, oligonucleotide 탐침의 경우 42°C, 500 bp 이상의 DNA 탐침의 경우 50~65°C에서 hybridization하였다. 복선 DNA 탐침의 경우 100°C에서 3분간 가열하여 사용하였다. 16~18시간 hybridization한 후, 상온에서 2×SSC로 15분, 0.1×SSC로 5분 정도 씻은 후 autoradiography를 하였다.

Genomic sublibrary의 제조 및 클론의 선별

*S. coelicolor*의 genomic DNA를 *Pvu*II로 절단한 후 0.8% agarose 겔에서 20 V로 14시간 전기영동한 후, 3.5 kb 부분을 약 3 mm 두께로 잘라내어 gene clean (Bio 101)으로 용출 하고, *Hinc*II로 절단하여 dephosphorylation시킨 pUC18에 연결한 후 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하였다. X-gal배지에서 IPTG로 유도하여 선별한 흰색의 콜로니를 LA 고체 배지에 얹은 nitrocellulose filter (Gelman)와 또다른 LA 고체 배지에 동시에 찍어 37°C에서 14시간 배양한 후, filter는 콜로니 hybridization에 사용하고, 다른 배지에 자란 콜로니는 4°C에 보관하였다. Filter를 변성용액 (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)에 5분, 중화용액 [1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)]에 5분간 담근 후 2×SSC로 5분간 씻어 잘 말려 80°C에서 진공상태로 2시간 동안 구웠다. Filter를 6×SSC에 5분간 담근 후, prewashing 용액 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS]을 넣고 42°C에서 1시간 씻어주고, prehybridization 용액을 넣어 42°C에서 2시간 prehy-

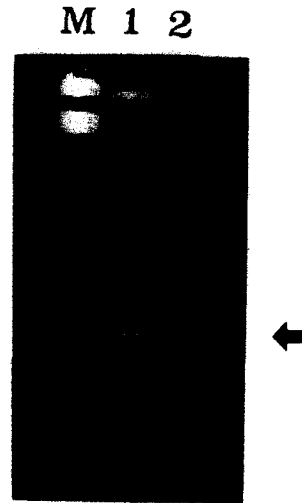


Fig. 2. PCR amplification of *E. coli* and *S. coelicolor* genomic DNA with σ factor specific synthetic primers, P1 and P2.

PCR products from *S. coelicolor* (lane 1) and *E. coli* (lane 2) genomic DNA were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Lane M contained *Pvu*II digested phage λ DNA as size markers. Amplified band of approximately 480 bp was indicated by an arrow.

bridization한 후, 탐침을 넣어 55°C에서 18시간 hybridization하였다. Hybridization 결과와 4°C에 보관해 두었던 콜로니들을 비교하여 탐침이 결합하리라 예상되는 몇개의 콜로니를 고른 후, mini prep하여 *Eco*RI과 *Hind*III로 절단하여 삽입된 DNA를 벡터와 분리한 후, Southern hybridization을 통해 최종적으로 클론을 선별하였다.

결과 및 고찰

*E. coli*와 *S. coelicolor* genomic DNA를 이용한 σ 인자 유전자의 PCR 증폭

*E. coli*의 주된 σ 인자인 RpoD와 유사한 σ 인자들은 아미노산 서열상의 유사성에 의해 크게 네 부분으로 구분되며 이는 다시 둘 또는 네 부분으로 세분된다 (10). 그 중 보존정도가 가장 높은 2.3 부위와 4.2 부위의 아미노산 서열로부터 유추하여 P1 (22 mer: coding strand)과 P2 (23 mer: noncoding strand) primer를 제작하였다. σ 인자의 2.3과 4.2 부위는 각각 전사개시 과정에서 DNA의 melting에 관여하거나 프로모터 -35 부위의 인지기능을 하는 것으로 알려져 있다. σ 인자의 네 부위 (region)와 각 소부위 (subregion) 및, primer 제작시 고려한 *E. coli*와 *S. coelicolor* σ 인자의 2.3 과 4.2 부위에서 보존된 아미노산 서열을 Fig. 1에 제시하였다. *E. coli*

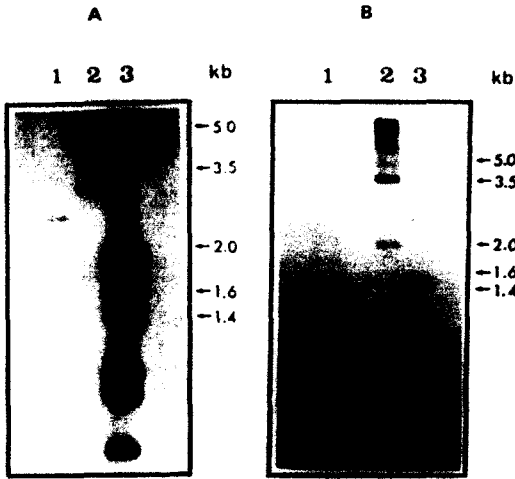


Fig. 3. Genomic Southern hybridization analysis using 486 bp *rpoS* fragment as a probe.
 A. *E. coli* genomic DNA digested with *KpnI* (lane 1) or *PvuII* (lane 2) were electrophoresed and hybridized with ³²P-labeled *rpoS* fragment. Lane 3 contained *EcoRI/HindIII* digested phage λ DNA. B. *S. coelicolor* genomic DNA digested with *PvuII* (lane 2) or *Sall* (lane 3) were hybridized with the same labeled probe. Lane 1 contained the unlabeled probe itself. The sizes of marker DNAs were shown by arrows on the right.

MG1655와 *S. coelicolor* M145로부터 genomic DNA를 분리하여 P1 과 P2 를 primer로 사용하여 PCR을 수행하였을 때, 예상되었던 480 bp 정도의 DNA가 두 세균에서 모두 증폭되었다(Fig. 2). 이 중 *E. coli*에서 증폭된 DNA를 무딘 말단으로 만든 후, pUC18에 클로닝하여 골라낸 한 클론의 염기서열을 분석한 결과, 이미 알려진 *rpoS* (13)의 466에서 951 까지 486 bp의 염기서열과 완전히 일치함이 밝혀졌다. 또한 PCR 반응산물을 클로닝하지 않고 Asymmetric PCR을 통해 단선으로 만든 후 직접 염기서열을 분석하였을 때, *rpoS*와 *rpoD*의 염기서열이 모두 관찰되었는데, 이 사실로서 *E. coli*에서 증폭된 DNA는 *rpoS*와 *rpoD* 유전자로부터 유래한 것임을 알 수 있다. *S. coelicolor*에서 증폭된 DNA에 대한 분석은 수행하지 않았으나, 최소한 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* 유전자로부터 증폭된 DNA를 모두 포함하고 있으리라 생각된다.

***E. coli*의 *rpoS* 절편을 이용한 genomic Southern hybridization**

PCR을 통해 *E. coli*로 부터 증폭되어 클로닝된 *rpoS* 절편을 이용하여 *E. coli*와 *S. coelicolor*의 genomic DNA와 Southern hybridization을 수행하였다. *E. coli*의 genomic Southern hybridization에

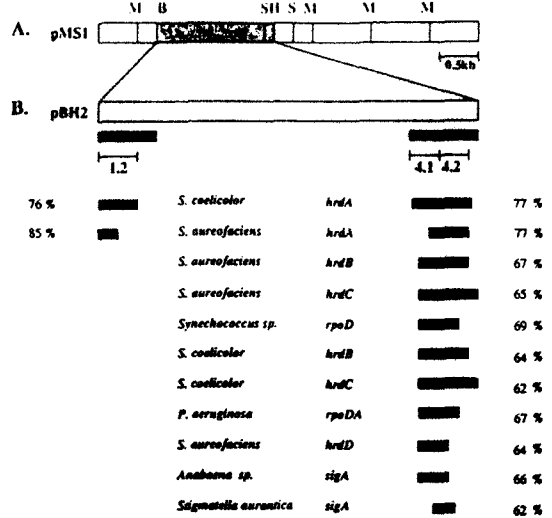


Fig. 4. Sequence homology of the cloned *S. coelicolor* putative σ factor gene with other known bacterial genes.

A. Restriction map of the cloned 3.5 kb *PvuII* fragment from *S. coelicolor*. B. *Bam*HI; *S*, *Sall*; *M*, *Sma*I; *H*, *Hinc*II.

B. The regions of determined sequences and their nucleotide sequence similarity to other bacterial sigma factor genes. The regions where the nucleotide sequences were determined in subclone pBH2 were indicated as black strip. Regions of homology found in several bacterial sigma factor genes were also shown as black strips.

서는 *rpoS* 유전자에 해당하는 3.2 kb의 *PvuII* 절편과, 2.3 kb의 *KpnI* 절편에 탐침이 결합하는 것을 확인하였다(Fig. 3, A). 한편, 동일한 탐침으로 *S. coelicolor*에서 genomic Southern hybridization을 수행하였을 때, 3.5 kb와 2.0 kb의 *PvuII* 절편과, 3.4 kb와 1.5 kb의 *Sall* 절편에 탐침이 결합하는 것을 관찰하였다(Fig. 3, B). 이는 이미 보고된 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* (15) 와 *whiG* (11)와는 다른 크기의 DNA band에 해당하므로 새로운 σ 인자 유전자일 가능성이 존재한다.

***S. coelicolor* 3.5 kb *PvuII* 절편의 클로닝**

*S. coelicolor*에서 *rpoS* 절편에 결합하는 두개의 *PvuII* 절편 중 3.5 kb의 DNA를 클로닝하였다. *S. coelicolor* M145의 genomic DNA를 *PvuII*로 절단하여 전기영동한 후, 3.5 kb 주위의 DNA를 gel로부터 분리하여 *Sma*I으로 절단한 pUC18에 연결하고 *E. coli* DH5α에 형질전환하여, DNA가 삽입된 약 600 개의 형질전환체를 대상으로 *rpoS* 절편을 탐침으로 콜로니 hybridization을 수행하였다. 그 결과, *rpoS* 절편과 결합하는 3.5 kb의 삽입체를 가진 두개의 클

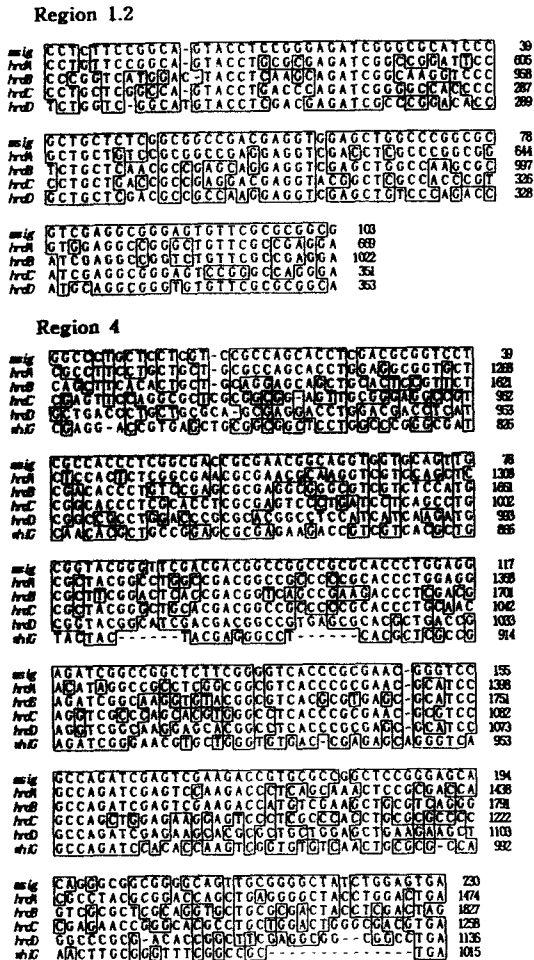


Fig. 5. Multiple alignment of nucleotide sequences of *S. coelicolor* σ factor genes in regions 1.2 and 4.

Partial nucleotide sequences of pBH2 (MSIG) and five known factor genes of *S. coelicolor* were aligned. The boxed regions represent the same sequences as MSIG.

론을 찾아내었고, 두 클론에 대해 BamHI, HincII, KpnI 등의 제한효소에 대한 절단 양상을 비교해본 결과, 동일한 클론으로 판명되었으며 이 클론을 pMS1이라 명명하였다.

pMS1의 염기서열 분석

pMS1을 여러 제한효소로 절단하여 P1, P2 및 rpoS절편을 탐침으로 hybridization을 하였을 때, 세 탐침 모두 1.0 kb의 BamHI/HincII 절편에 결합 하는 것을 확인하였다. 탐침이 결합하는 1.0 kb의 BamHI/HincII 절편을, 같은 제한효소로 절단한 pUC18에 subcloning한 후 (pBH2), 염기서열을 분석하였다.

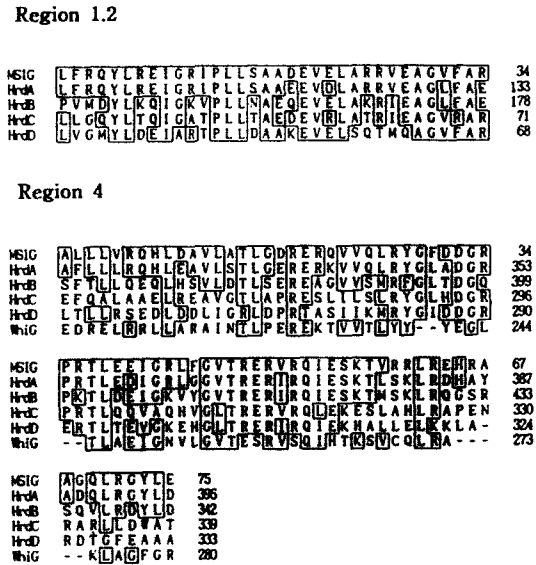


Fig. 6. Multiple alignment of amino acid sequences of *S. coelicolor* σ factors in regions 1.2 and 4.

Amino acid sequences translated from partially determined nucleotide sequences of pBH2 (MSIG) and five known σ factors of *S. coelicolor* were aligned. The boxed regions represent the same sequences as MSIG.

현재까지 BamHI 위치로부터 약 150 bp, HincII 위치로부터 약 280 bp의 염기서열을 결정하였는데, 부분적으로 밝혀진 염기서열을 BLAST 프로그램을 이용하여 PDB, GenBank, GBUupdate, EMBL, EMBLupdate의 data library와 비교하여 유사한 염기서열 및 아미노산 서열을 가진 유전자들을 조사하였다. 조사결과 염기서열은 기존에 알려진 Streptomyces속의 여러 σ 인자와 Synechococcus속의 rpoD1, Pseudomonas aeruginosa rpoDA, Stigmatella aurantiaca의 sigA, Anabaena속의 sigA 등과 높은 유사성을 나타냈으며, 아미노산 서열은 E. coli와 B. subtilis를 포함한 더욱 많은 종류의 σ 인자들과 유사한 것으로 밝혀졌다 (Fig. 4). pBH2의 BamHI 위치 쪽이 아미노산 서열상의 N 말단에 해당하는데, BamHI 위치 쪽에서 염기서열이 결정된 약 100 bp 정도가 1.2 부위에 해당하는 부분이며, HincII 쪽에서 염기서열이 결정된 부분은 4.1과 4.2 부위에 해당한다. 4.1 부위는 HincII 위치에서 약 280 bp 위쪽에서 시작되어 105 bp의 길이로 존재하며, region 4.2는 130 bp 정도의 길이에 해당한다. HincII 위치에서 약 50 bp 위쪽에 stop codon (TGA)이 존재하며, stop codon의 66 bp 위쪽에 P2에 해당하는 염기서열이 위치하고 있다. 그 위치의 염기서열은 P2와 하나의 염기만 제외하고

모두 일치하였다. BamHI 자리의 윗부분은 σ 인자들 간에 거의 보존되지 않은 1.1 부위에 해당하는 부분으로 pMS1의 0.6 kb BamHI/HindIII 절편 (HindIII 위치는 vector 내부에 존재) 을 subcloning하여 염기서열을 분석 하였으나 유사한 염기서열을 가진 유전자를 data library로부터 찾아내지 못하였다. 이 유전자의 크기 및 전사개시위치 등에 대한 정보를 얻기 위해서는 pMS1 insert의 완전한 염기서열의 결정이 이루어져야 할 것이다. 염기서열이 결정된 1.2와 4 부위의 염기서열 및 아미노산 서열을 이미 알려진 *S. coelicolor*의 다섯가지 σ 인자 (*hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*, *whiG*)와 비교하여 보았다. *whiG*의 경우 region 1.2는 거의 보존되어 있지 않으므로 1.2 부위의 비교에서는 제외하였다. 염기서열의 경우, pMS1 insert는 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*와 1.2 부위에서 각각 80%, 67%, 67%, 65%, 4 부위에서는 각각 78%, 63%, 60%, 57%의 높은 유사성을 보였고 *whiG*와는 51%의 유사성을 보였다 (Fig. 5). 아미노산 서열의 경우, 1.2 부위에서는 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*와 pMS1 insert가 각각 88%, 56%, 65%, 62%, 4 부위에서는 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* 및 *whiG*와 각각 75%, 52%, 37%, 36%, 44%의 유사도를 보여, 염기 서열과 아미노산 서열 모두 *hrdA*와 가장 유사한 것으로 나타났다 (Fig 6).

위의 결과로 부터, 클로닝된 pMS1이 *S. coelicolor*의 새로운 σ 인자 유전자를 포함하고 있다고 생각되며, 유사한 염기 서열을 보이는 *hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD* 유전자의 ORF 크기가 1.0 kb 에서 1.8 kb 정도인 것을 고려하면 이 클론 내에 완전한 유전자가 포함되어 있으리라 생각되지만 확실한 결론을 내리기 위해서는 유전자의 완전한 염기서열 결정이 필요하다. 또한 현재까지 이루어진 염기서열 분석의 결과에 의하면 클로닝된 σ 인자 유전자가 *E. coli* RpoD 계열의 σ 인자 유전자와 높은 유사성을 보이지만 RpoD 계열의 σ 인자 유전자에서 공통적으로 나타나는 BamHI 절단 자리 (PI 결합위치 내부에 존재)가 존재하지 않는 차이점을 가지고 있다. 앞으로 계속적인 연구를 통하여 이 유전자에 대한 보다 상세한 정보를 조사할 예정이며, 이 유전자에 대한 돌연변이체의 유도 및 이 유전자의 세포내에서의 과량 발현 등을 통해 기능적인 규명을 시도할 예정이다.

감사의 말

S. coelicolor M145 균주를 제공한 Hopwood 교수와 본 논문의 연구에 조언을 주신 서주원 교수에게 감사드린다. 본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자생명화학연구센터)의 연구비 지원에 의하여 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Birnboim, H.C. and J. Doly, 1979. A rapid

alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.

2. Brown, K.L., S. Wood, and M.J. Buttner, 1992. Isolation and characterization of the major vegetative RNA polymerase of *S. coelicolor* A3(2): Renaturation of a sigma subunit using GroEL. *Mol. Microbiol.* 6, 1133-1139.
3. Burgess, R.R., A.A. Travers, J.J. Dunn, and E.K.F. Bautz, 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 221, 43-46.
4. Buttner, M.J., A.M. Smith, and M.J. Bibb, 1988. At least three different RNA polymerase holoenzymes direct transcription of the agarase gene (*dagA*) of *S. coelicolor* A3(2). *Cell* 52, 599-607.
5. Buttner, M.J., 1989. RNA polymerase heterogeneity of *S. coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 3, 1653-1659.
6. Chater, K.F., C.J. Burton, K.A. Plaskitt, M.J. Buttner, C. Mendez, and J.D. Helmann, 1989. The developmental fate of *S. coelicolor* A3(2) hyphae depends upon a gene product homologous with the motility σ factor of *B. subtilis*. *Cell* 59, 133-143.
7. Helmann, J.D. and M.J. Chamberlin, 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 839-872.
8. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Burton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf, 1985. Genetic manipulation of *S. coelicolor*: A laboratory manual. The John Innes Foundation, England.
9. Lis, J.T., 1980. Fractionation of DNA fragment by PEG induced precipitation. *Methods Enzymol.* 65, 347-353.
10. Lonetto, M., M. Gribskov, and C.A. Gross, 1992. The σ^{70} family: Sequence conservation and evolutionary relationship. *J. Bacteriol.* 174, 3843-3849.
11. Mendez, C. and K.F. Chater, 1987. Cloning of *whiG*, a gene critical for sporulation of *S. coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 169, 5715-5720.
12. Michael, A.I., H.G. David, J.S. John, and J.W. Thomas, 1989. PCR protocols: A guide to methods and applications. pp. 1-20. Academic Press, New York.
13. Mulvey M.R. and P.C. Loewen, 1989. Nucleotide sequence of *katF* of *E. coli* suggests KatF protein is a novel sigma transcriptional factor. *Nucl. Acids Res.* 17, 9979-9991.
14. Shiina, T., K. Tanaka, and H. Takahashi, 1991. Sequence of *hrdB*, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *S. coelicolor* A3 (2): Homology to principal sigma factors. *Gene* 107, 145-148.
15. Tanaka, K., T. Shiina, and H. Takahashi, 1988. Multiple principal sigma factor homologs in eubacteria: Identification of the '*rpoD* Box'. *Science* 242, 1040-1042.

16. Tanaka, K., T. Shiina, and H. Takahashi, 1991. Nucleotide sequence of genes *hrdA*, *hrdC*, and *hrdD* from *S. coelicolor* A3(2) having similarity to *rpoD* genes. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 334-340.
17. Westpheling, J., M. Ranes, and R. Losick, 1985. RNA polymerase heterogeneity in *S. coelicolor*. *Nature* **313**, 22-27.
18. Westpheling, J. and M. Browner, 1989. Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. *J. Bacteriol.* **171**, 1355-1361.
19. Williams, S.A., B.E. Slatko, L.S. Moran, and S.M. Desimore, 1986. Sequencing in the fast lane; a rapid protocol for [α - 35 S]dATP dideoxy sequencing. *Biotechnology* **4**, 138-147.

(Received May 30, 1994)

(Accepted July 18, 1994)

ABSTRACT: Cloning of a *hrdA*-like Sigma Factor Gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Hahn, Ji-Sook, Eun-Jung Cho, and Jung-Hye Roe* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

A gene coding for a novel putative σ factor of RNA polymerase has been identified from *Streptomyces coelicolor* A3(2) using *Escherichia coli* *rpoS* gene fragment as a probe. The 486 bp *rpoS* gene fragment was amplified from *E. coli* genomic DNA by PCR with two synthetic oligonucleotides, the sequences of which were deduced from the amino acid sequences in the regions 2.3 and 4.2 conserved among various bacterial factors. When *E. coli* genomic DNA fragments were hybridized with cloned *rpoS* probe, only one band corresponding to *rpoS* gene (3.2 kb *PvuII* fragment or 2.3 kb *KpnI* fragment) was detected. In *S. coelicolor*, however, two bands were detected both in *PvuII* digested DNA and *SalI* digested DNA. 3.5 kb *PvuII* fragment which binds the *rpoS* gene probe was cloned (pMS1) from the sublibrary, and the nucleotide sequences of 1.0 kb *BamHI/HincII* subclone (pBH2) was partially determined. The nucleotide sequences revealed extensive similarity to other σ factor genes of *S. coelicolor* (*hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*), *S. aureofaciens* (*hrdA*, *hrdB*, *hrdC*, *hrdD*), *Synechococcus* species, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stigmatella aurantiaca*, and *Anabaena* species. The nucleotide sequences in regions 1.2 and 4 were compared with the corresponding regions of 5 known σ factor genes of *S. coelicolor* by multiple alignment. It turned out that the cloned gene is most closely related to *hrdA* showing 88% amino acid similarity in region 1.2 and 75% in region 4.