

## Photobacterium Species의 lux 오페론에서 발견된 Riboflavin 생합성 유전자들의 기능

이찬용\* · 임종호<sup>1</sup>

을지의과대학교 자연과학교실, <sup>1</sup>약리학교실

발광 박테리아인 *Photobacterium species*의 lux 오페론에서 발견된 riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들(ribI, II, III, IV)의 기능을 조사하였다. 대장균에서 이들 유전자가 포함된 재조합 플라스미드를 발현시켰을 때 상당량의 riboflavin이 합성되는 것을 확인하였으며, 또한 이들 유전자들(ribI, II, III, IV)의 기능을 riboflavin에 대하여 종속 영양체인 대장균 돌연변이주(BSV 11, 18)를 이용한 유전학적인 방법과 생화학적인 방법으로 분석한 결과, 이들은 각각 riboflavin synthase, 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate (DHBP) synthase, lumazine synthase, GTP cyclohydrolase II 활성도를 갖는 단백질을 코딩하는 것으로 밝혀졌다. 이는 *Photobacterium species*의 riboflavin 유전자 체계가 riboflavin 생합성에 관여하는 모든 5개의 유전자들이 한 오페론에 존재하는 *Bacillus subtilis*와 주요 riboflavin 유전자들이 분리되어 있는 대장균과는 다른, 중간적인 형태를 갖는다는 것을 나타낸다.

**Key words:** bioluminescence, lux, photobacterium, riboflavin

생물발광(bioluminescence)이라 함은 생명체내에서 효소가 매개 하는 발열 화학 반응(exergonic chemical reaction)을 통하여 빛을 내는 것을 일컫으며(11,12), 박테리아에서부터 곰팡이, 조류(algae), 곤충, 어류 등에서 빛을 내는 생물체가 발견되었다(12). 이들 중 발광 박테리아(bioluminescent bacteria)는 대부분 바다에 서식하는 해양 박테리아로서 크게 *Vibrio*와 *Photobacterium* genus로 구분된다. 발광 박테리아에서 빛을 내는 반응은 FMNH<sub>2</sub> (reduced flavin mononucleotide)와 긴사슬의 지방산-알데히드(long chain fatty-aldehyde)가 산화됨으로써 청록색의 빛을 띠게 된다(10,17). 이 반응은 혼합된 기능의 산화효소(mixed function oxidase)인 bacterial luciferase에 의하여 촉매되며, 그 반응의 한 기질(substrate)인 긴 사슬의 지방산-알데히드는 발광 박테리아에 특유한 지방산-환원효소(fatty acid reductase complex)에 의하여 제공되어진다(17).

발광 박테리아에서 빛을 내는 반응에 관여하는 효소들을 코딩하게 되는 유전자들(lux genes)은 한 유전자군(lux operon)에 존재하게 되는 데 lux 오페론은 luciferase의  $\alpha$ ,  $\beta$  subunits을 코딩하게 되는 luxAB 유전자와 fatty acid reductase complex의 reductase, transferase, synthetase subunits을 코딩하게 되는 luxCDE 유전자들로 구성되어 있다(18). 발광 박테리아인 *Photobacterium species*의 lux 오페론에 인접한 chromosome 상에 riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) 생합성에 관여할 것으로 생각되는 여러 유전자들의 발견되었다(14,15).

Vitamin B<sub>2</sub>로 널리 알려진 riboflavin은 이것의 생리적으로 활성화된 형태인 FMN (flavin mononucleotide)과 FAD (flavin adenine dinucleotide)가 조효소로서, 호흡에 관여하는 여러가지 flavo-protein 등 대사작용에서 많은 부분을 차지하는 산화-환원 반응에서 electron carrier의 중요한 임무를 띠는 중요성에도 불구하고(25) 아직 그 생합성 경로가 아직 완전히 밝혀지지 않아 그 효소 체계가 확립되지 않은 상태이며, 또한 임상적으로 riboflavin이 결핍되었을 경우에 설염, 구순증, 구내염, 각막염등의 증후를 보일 수 있음이 보고되었다(9).

박테리아에서의 발광반응은 산소 분자와 fatty-aldehyde의 산화 뿐 만 아니라 또 다른 기질(substrate)로서 FMNH<sub>2</sub>의 산화가 관여된다(10). 이제까지 이 반응의 fatty-aldehyde 기질에 대한 효소학적 혹은 분자생물학적인 많은 연구가 성공적으로 이루어져 왔으나(17,18) flavin 기질에 관한 연구는 전혀 이루어지지 않은 실정이다. Riboflavin은 FMN (riboflavin 5'-phosphate)의 전구체(precursor)이기 때문에 riboflavin 생합성에 관여할 것으로 생각되는 유전자들의 lux 오페론에 인접한 위치에서의 발견은 박테리아 발광반응의 flavin 기질의 제공과 대사과정의 조절에 관한 주요한 단서를 줄 것으로 기대된다. 본 연구에서는 lux 오페론에 인접한 이들 유전자들이 코딩하게 되는 단백질의 기능을 생화학적인, 유전학적으로 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

제한효소와 T<sub>4</sub> DNA ligase는 Pharmacia로부터, riboflavin, ampicillin, rifampicin 등은 Sigma Chemical Company (St.

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 042-259-1698, Fax: 042-259-1047  
E-mail: cylee@eulji.ac.kr

Louis, USA)로 부터 구입하였고, 유기화학적으로 합성된 lumazine (6,7-dimethyl-8-ribityllumazine)은 University of Strathclyde의 H. Wood 교수로부터 얻었다.

### 균주 및 vector

본 연구 실험에 쓰여진 주요한 박테리아 균주들은 *Photobacterium leiognathi* (ATCC 25521), *Photobacterium phosphoreum* (NCMB 844), *Escherichia coli* K38-1, *E. coli* HB101 and *E. coli* 43R 등이며 플라스미드로는 pT7-4, pT7-5(27), 그리고 pKT230로부터 유도된 pMGM (20) 등이 클로닝 벡터로써 사용되었다. Riboflavin 종속영양체로 *E. coli*의 돌연변이주들인 BSV11 (*ribB*에 Tn5 삽입)과 BSV18 (*ribA*에 Tn5 삽입) (3)이 complementation 시험에 사용되었다. 이들 돌연변이주들은 University of Illinois의 R. Tuveson 교수의 후의로 얻을 수 있었다. *Photobacterium* DNA가 포함되어 있는 재조합 플라스미드를 지닌 *E. coli* K38-1은 50 µg/ml의 ampicillin과 50 µg/ml의 kanamycin를 가한 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양시켰다. Riboflavin 종속영양체 *E. coli*를 배양시키기 위하여는 kanamycin (50 µg/ml)과 riboflavin (10 µg/ml)이 추가로 배양액에 가하여 졌다. 본 연구에 쓰여진 *lux* 유전자 혹은 riboflavin 유전자를 포함하는 *Photobacterium*의 DNA 재조합 플라스미드들은(Fig. 2) PLXba.pT7-3 (13)과 PpSB.pT7-4 (16)로부터 제한 효소로 절단하여 적절한 플라스미드에 subcloning하여 얻었다.

### *E. coli*에서 *P. phosphoreum* species의 *rib* 유전자만의 특정한 발현

*E. coli*로 형질전환된 세포가 ampicillin 및 kanamycin이 포함된 LB 배양액에서 660 nm에서의 optical density가 0.3 정도까지 자라게 한 다음 42°C에서 몇 분간 가열하여 T7 polymerase 유전자가 유도되게 하였다. 그외의 자세한 *rib* 유전자의 발현을 위한 T7 system은 다음의 참고문헌에 기술되어 있다(16).

### 효소 활성도 조사

Riboflavin synthase의 활성도는 형광분광광도계(F3010, Hitachi, Tokyo, Japan)로 lumazine으로 부터 전환된 530 nm (480 nm excitation)에서 특이하게 형광을 내는 riboflavin의 양으로부터 결정되었다. Riboflavin의 생성량은 50 mM phosphate buffer pH 7.0의 riboflavin의 형광 표준곡선으로부터 결정되었으며 riboflavin의 농도는 445 nm에서 이것의 몰 흡광계수  $\epsilon_{445} = 12,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 로부터 결정되었다.

### Lumazine 및 Riboflavin의 확인

Cell-free 추출물의 분석에서 lumazine 기질과 riboflavin 생성물은 3%의 수용성  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 로 전개시킨 silica-gel (Silica Gel IB2, Baker, Phillipsburg, USA) thin layer chromatography로써(21) 확인하였다.

### Riboflavin 종속영양체 *E. coli*를 이용한 유전학적 시험

*E. coli* 돌연변이주(BSV11과 BSV18)를 OD<sub>660</sub> 값 0.3 까지 자

라게 한 다음 그 cell을 모아 LB 배양액으로 두번 세척한 다음 50 mM  $\text{CaCl}_2$ 로 처리하여 competent cell을 만들었다. *P. phosphoreum* 혹은 *P. leiognathi* DNA를 포함하는 재조합 플라스미드를 BSV11 혹은 BSV18에 형질전환시켰으며, 형질전환된 재조합 pT7 DNA를 포함하는 세포들은 ampicillin (50 µg/ml)과 kanamycin (50 µg/ml)을 넣은 LB 고체 배지에서, 재조합 pMGM 플라스미드를 포함하는 형질전환된 세포들은 streptomycin (25 µg/ml)과 kanamycin (50 µg/ml)을 넣은 LB 고체 배지에서 선택되었다.

## 결 과

발광 박테리아인 *P. leiognathi*의 경우 *luxG* 다음에 바로 3 개의 유전자들이 발견되었는데, 그 3 개의 유전자들은 gene organization과 amino acid 상동성(identity)에서 *Bacillus subtilis*의 riboflavin 생합성 오페론(*rib* operon)의 2, 3, 4 번째 유전자들과 관련이 있었으며(14) (Fig. 1), *P. phosphoreum*의 경우 *luxG* 다음에 4 개의 유전자들이 존재하였는데 처음의 세 유전자는 앞의 것들과 일치하였으나 4 번째 유전자는 흥미롭게도 *B. subtilis*의 *rib* operon의 3 번째 유전자가 코드하게 되는 단백질의 C-말단 영역과 amino acid 상동성이 있었다(15) (Fig. 1). 또한 *Vibrio harveyi* *lux* operon의 마지막 유전자 *luxH* 또한 *B. subtilis*의 riboflavin operon의 3 번째 유전자의 N-말단 영역과 상동성이 있는 것으로 보아 *luxH*가 코드하게 되는 단백질 역시 riboflavin 생합성에 관여할 것으로 보여진다(26) (Fig. 1).

이들 유전자들이 과연 riboflavin 생합성에 관여하는 효소를 코드하는 지를 확인하기 위하여 처음 수행한 실험은 4 개의 riboflavin 유전자를 포함하고 있는 *P. phosphoreum* 재조합 DNA

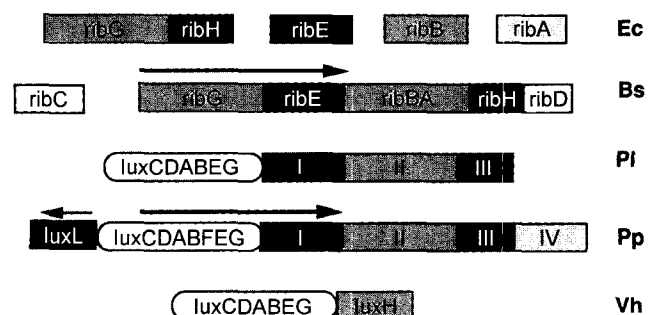
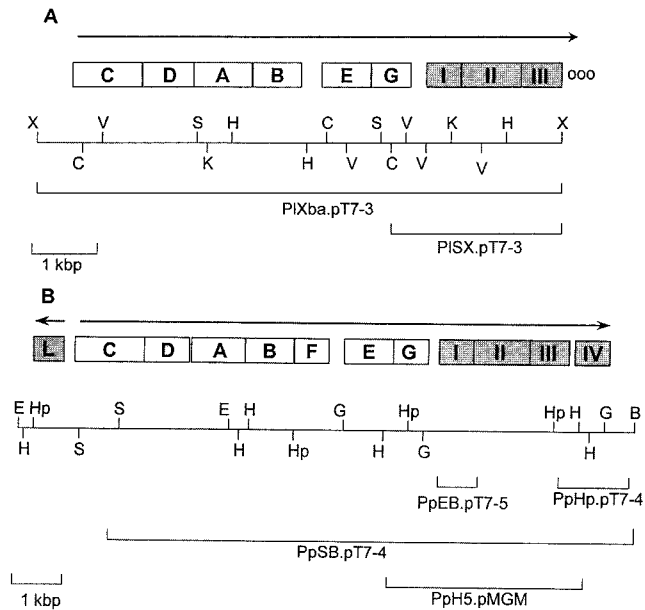


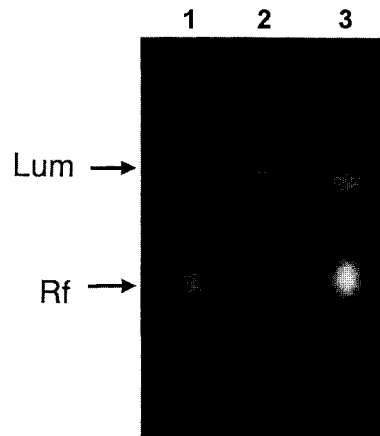
Fig. 1. Organization of riboflavin genes. Ec, *E. coli*; Bs, *B. subtilis*; Pl, *P. leiognathi*; Pp, *P. phosphoreum*; ribE, riboflavin synthase; ribB, 3,4-dihydroxy butanone 4-phosphate (DHBP) synthase; ribA, GTP cyclohydrolase II; ribH, lumazine synthase. The riboflavin synthesis genes in *E. coli* are neither clustered in a operon nor regulated in a coordinated manner (3, 29). The function of the gene product of *ribG* and *ribD* are supposed to be involved in deamination and reduction of pyrimidine ring (23). Proteins coded by two consecutive open reading frames (*musII* and *musIII*) were found to have significant identity with RibG (42%) and RibH (53%), respectively of *B. subtilis* (28). *ribC* codes for a regulatory protein. The downstream of *ribIII* in *P. leiognathi* has not been determined.



**Fig. 2.** Physical map of the lux operon of *Photobacterium leiognathi* (A) and *Photobacterium phosphoreum* (B). Restriction sites are labeled as follows: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI, G, *Bgl*II; H, *Hind*III; Hp, *Hpa*I; K, *Kpn*I; S, *Sac*I, V, *Eco*RV; X, *Xba*I.

를 대장균에서 발현시켰을 때 riboflavin을 합성해내는 지의 여부를 확인하는 것이었다. Bacteriophage T7 RNA polymerase는 그 고유의 promoter에 대하여 매우 선택적이기 때문에 관련성이 없는 DNA에 대하여서는 결합하지 않고, T7 RNA polymerase는 매우 활발하여 *E. coli* RNA polymerase 보다 사슬연장 속도가 5 배 이상 빠르기 때문에 이 system (T7 RNA polymerase/promoter)으로 *E. coli*에서 삽입된 유전자만을 직접적으로 발현시킬 수 있는 장점이 있다(27). 본 연구에서는 발광 박테리아인 *Photobacterium* species의 luxG 아래에서 발견되는 riboflavin 생합성 관련 유전자를 위 벡터(pT7)에 집어 넣고 T7 RNA polymerase가 포함된 helper 플라스미드(pGP1-2)와 함께 발현시킴으로써 삽입된 유전자들이 코딩하는 단백질의 riboflavin 생합성에서의 역할을 알아보았다. 위의 방법을 이용하여 riboflavin 생성여부를 Thin Layer Chromatography로 확인해 본 결과, 4 개의 riboflavin 유전자를 함유하고 있는 재조합 DNA 플라스미드 (PpSB.pT7-4 in Fig. 2)를 *E. coli* K38-1에 형질전환시켜 배양시킨 cell extracts가 lumazine과 riboflavin, 특히 riboflavin의 생성량(lane 3 in Fig. 3)이 재조합 플라스미드(PpSB.pT7-4)를 포함하지 않은 *E. coli* K38-1 cell extract (lane 2 in Fig. 3)에서 보다 훨씬 높은 것으로 나타났다. 이것은 *P. phosphoreum* luxG 아래의 DNA 영역에 존재하는 유전자에 의하여 riboflavin이 생성됨을 확인시켜주는 것이라 할 수 있을 것이다.

*Photobacterium* species의 luxG 아래 영역의 DNA에서 발견되는 첫번째 유전자는 amino acid의 상동성과 첫 번째 유전자만을 포함하는 DNA를 PCR의 방법으로 증폭시켜 재조합 플라스미드를 제조하여 그 유전자의 발현으로 생성된 단백질의 기능을 분석해 본 결과 riboflavin 합성의 마지막 단계인 lumazine을



**Fig. 3.** Identification of riboflavin products by TLC after enzyme reaction. Lane 1, a mixture of lumazine and riboflavin; lane 2, reaction mixture from extract of *E. coli* K38-1; lane 3, reaction mixture from extract of *E. coli* K38-1 transformed with PpSB.pT7-4. Lum, lumazine; Rf, riboflavin.

```
MNI IQGNLVGTGLKIGIVVGRFNDFITSKLLSGAEDALLRHG VDTNDIDVAWVPGAFEI
-K-MK-VDCTSCC -A--IA---S--NEN-----IN--Q-K-Q-KAEN-T-IRC---Y-L
-KV-E-AI-APNA-VA--IA---S--NES-----L-T-K-Q-Q-SYDN-TIIRC---Y-L
----EA-VATPDARVA-TIA---N--NDS--E--I---K-I-Q-KDEN-T-V-----Y-L
```

```
PFAAKKMAETKKYDAIITLGTVIRGATPHYDYVCAEAAGKIAQAANTGVPVIFGIVTTE
-L--QOI-KQGN-----AI-A----G-P-F-F-AGDCN--L--V-LEYQT--A--VL-VD
-LV-QLT-KSDR-----AL-S-----G--FE--AS-CN--L--V-LDYNI--A--VL-VD
-L--GAL-K-G-----V-A---K---G-A-FE--AGG-SN-L-HV-QDSEI--A--VL---
```

```
NIEQAIERAGTKAGNKGVDCAVSAIEMANLNRSE*      B. subtilis
S-----M-----EEA-L-L.....              P. leiognathi
YL-----AEA-LMLL--V-ILAQV-S*                P. phosphoreum
S-----AEA-LT-L--I-VLKAIKA*                  E. coli
```

**Fig. 4.** Comparison of the amino acid sequence of *B. subtilis* RibH with *P. leiognathi* RibIII, *P. phosphoreum* RibIII and *E. coli* nusIII. Residues that are identical to the corresponding amino acid of RibH of *B. subtilis* are given by a horizontal bar. The sequence of *P. leiognathi* ribIII is incomplete (14). Amino acids missing at the carboxy-terminal of *P. leiognathi* RibIII are denoted as dots. Comparison of RibH and the *P. phosphoreum* RibIII and *P. leiognathi* RibIII indicating that the lumazine synthase sequence has been strongly conserved.

riboflavin으로 전환시키는 효소(riboflavin synthase)로 밝혀졌으며 (15), 세 번째 유전자 코딩하는 단백질의 amino acid의 상동성으로 볼 때 lumazine을 합성해 내는 효소(lumazine synthase)로 추정된다(Fig. 4). 이 세 번째 유전자가 lumazine synthase를 코딩하는지를 알아보기 위하여, 본 연구에서는 riboflavin synthase 유전자(ribI)만을 포함하는 DNA를 위 pT7 벡터에 집어넣은 재조합 plasmid (PpEB.pT7-5)를 대장균에서 발현시킨 cell extracts의 lumazine으로부터 riboflavin으로의 전환 정도를 측정한 효소의 활성도와, lumazine synthase 유전자일 것으로 생각되는 ribIII가 포함된 재조합 플라스미드(PpSB.pT7-4)가 발현된 상태의 cell extracts의 riboflavin synthase 활성도의 열적안정도를 비교하여 보았다(Fig. 5). Fig. 5에서 보는 바와 같이 50°C에서 30분간 있을 때 ribI만을 포함하는 PpEB.pT7-5를 지니는 *E. coli* cell extracts의 경우는 riboflavin synthase의 활성도가 20% 정도의 밖에 남지 않았으나 4 개의 riboflavin 유전자(ribI, II, III, IV)를 포

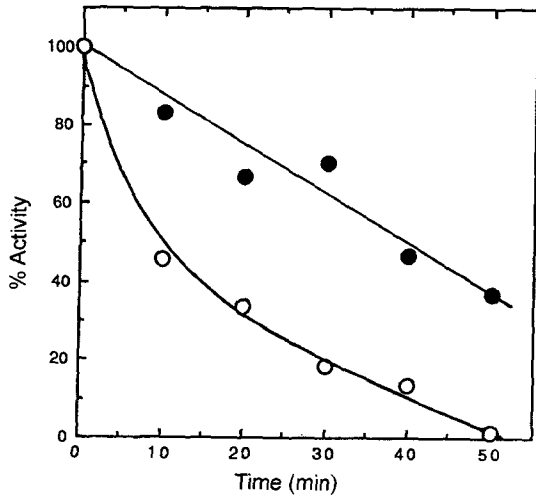


Fig. 5. Comparison of the thermal stability at 50°C of riboflavin synthase activity in different extracts. Extracts of *E. coli* containing PpEB.pT7-5 (○) and PpSB.pT7-4 (●) were incubated at 50°C for the indicated periods of time and the activities recorded as percentage of the controls incubated at 0°C.

합하는 PpSB.pT7-4를 지니는 *E. coli*의 cell extracts는 70% 정도 이 효소의 활성도가 보존되어 있었으며, 50 분이 지난 후에도 PpEB.pT7-5의 cell extract의 경우는 3%의 효소 활성도만 남았으나 PpSB.pT7-4의 cell extracts에는 40%의 효소 활성도가 보존되는 양상을 얻었다.

이 실험 결과는 *B. subtilis*의 riboflavin synthase ( $\alpha$ )가 lumazine synthase ( $\beta$ )와 매우 특이한 quaternary structure ( $\alpha_3\beta_6$ )를 갖음으로써 riboflavin의 활성도가 lumazine synthase의 존재하에 열적안정화가 이루어진다는 연구 실험 결과(1)에 비추어 볼 때, 3개의 부가적인 유전자들(*ribII*, III, 그리고 IV) 중의 한 유전자가 lumazine synthase를 코드한다는 간접적인 증거가 될 수 있으며, 또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *Photobacterium* species의 *ribIII*가 코드하는 단백질이 *E. coli*에서 분리-정제되어 amino acid sequencing된 lumazine synthase와 50% 이상의 amino acid 상동성을 갖는 것으로 보아 *ribIII*가 lumazine synthase를 코드하게 됨을 추리할 수 있다.

*Photobacterium* species *lux* 오페론의 *luxG* 아래의 2 번째와 4 번째 유전자는 *B. subtilis*의 *rib* 오페론에서 발견되는 유전자와 체계가 다를 뿐 만 아니라(Fig. 1), 그 유전자가 코드하게 되는 단백질과는 그 크기가 상이하어 관심을 끌고 있다(Fig. 6). Fig. 6은 *B. subtilis*의 세 번째 유전자가 코드하는 단백질(DHBP synthase/cyclohydrolase)과 *E. coli*의 DHBP synthase 및 GTP cyclohydrolase II, *Vibrio harveyi*의 *LuxH*, 그리고 *P. leiognathi*와 *P. phosphoreum*의 *ribII*가 코드하는 단백질과의 아미노산 배열을 보여주고 있다. *Photobacterium* species의 *ribII*가 코드하는 단백질의 N-말단 부분의 아미노산 상동성은 약 44-50%를 보였으나 (Table 1, A), *Photobacterium* species RibII의 C-말단 영역은 *E. coli*의 GTP cyclohydrolase II와 *P. phosphoreum*의 4 번째 유전자가 코드하는 단백질과는 17-28%의 매우 낮은 아미노산 상동성



Fig. 6. Alignment of the amino and carboxyl terminal domains of the *B. subtilis* bifunctional DHBP synthase/cyclohydrolase with rib proteins. 1, *B. subtilis* DHBP synthase/cyclohydrolase; 2, *P. leiognathi* RibII; 3, *P. phosphoreum* RibII, 4, *V. harveyi* LuxH, 5, 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *E. coli* (RibB); 6, *P. phosphoreum* RibIV; 7, GTP cyclohydrolase II of *E. coli* (RibA). Horizontal dash indicates an amino acid identical to *B. subtilis* DHBP synthase/cyclohydrolase.

Table 1. Amino acid identities (%) of proteins related in sequence to the proteins coded by gene II of *P. phosphoreum* and *P. leiognathi*

		Pp II	Pl II	Bs	Ec RibB
A)	Vh LuxH	48	44	45	62
	Ec RibB	49	50	49	-
	Bs	50	49	-	48
		Pp II	Pl II	Bs	Ec RibA
B)	Pp IV	17	20	49	50
	Ec RibA	27	28	54	-
	Bs	29	30	-	57

A) The amino-terminal region of proteins coded by *P. phosphoreum* ribII, *P. leiognathi* ribII and the bifunctional DHBP synthase/cyclohydrolase gene of the *B. subtilis* rib operon are compared to *V. harveyi* LuxH and *E. coli* RibB. B) The carboxyl-terminal regions of the same proteins are compared to the proteins coded by *P. phosphoreum* IV and GTP cyclohydrolase II of *E. coli* (Ec RibA). Pp, *P. phosphoreum*; Pl, *P. leiognathi*; Bs, *B. subtilis*; Ec, *E. coli*; Vh, *V. harveyi*.

Table 2. Complementation of *E. coli* rib mutants<sup>a</sup>

Plasmid <sup>b</sup>	BSV11 <sup>c</sup>	BSV18 <sup>c</sup>
PpHp.pT7	10	5,000
PpSB.pT7	120	150
PpH5.pMGM	800	ND <sup>d</sup>
PISX.pT7	4,000	20

<sup>a</sup>Frequency of transformation of *rib* mutants of *E. coli* using 1 μg of plasmid DNA containing *rib* genes. <sup>b</sup>Locations of the DNA inserts are given in Fig. 2. <sup>c</sup>*E. coli* BSV11 cells are missing DHBP synthase activity and *E. coli* BSV18 cells are missing GTP cyclohydrolase II activity. <sup>d</sup>ND, not detectable.

을 보였다(Table 1, B). 두 번째, 네 번째 *P. phosphoreum*의 riboflavin 생합성 유전자들이 코드하게 되는 단백질의 기능을 알아보기 위하여 두 번째, 네 번째 유전자가 함께 혹은 개별적으로 포함된 DNA 절편을 재조합 플라스미드에 삽입하여 DHBP synthase (BSV11) 혹은 GTP cyclohydrolase II (BSV18) 활성도가 결핍된 돌연변이주 *E. coli*에 형질전환시켜 complementation 되는지의 여부를 알아보는 유전학적 연구실험을 수행하였다.

4 개의 *P. phosphoreum* 유전자(*ribI-IV*)를 포함하고 있는 재조합 DNA (PpSB.pT7-4, Fig. 2)를 두 돌연변이주 BSV11과 BSV18에 complementation시켰을 경우에 두 돌연변이주가 riboflavin의 첨가없이도 자라게 되는 것으로 보아(Table 2), 이 영역의 DNA에는 DHBP synthase와 GTP cyclohydrolase II를 code하게 되는 유전자가 포함되어 있음을 추리할 수 있었다. 반면에 유전자 *ribI*에서 *ribIII* 유전자까지를 포함하게 되는 조금 작은 크기의 DNA 절편(PpH5.pMGM, Fig. 2)을 complementation시켰을 경우에 있어서는 BSV11 만 자라게 되고 BSV18는 자라지 않았다. 비슷하게 *ribI*과 *ribII* 유전자를 포함하게 되는 *P. leiognathi*의 재조합 plasmid (PISX.pT7-3, Fig. 2)를 complementation시켰을 경우에도 BSV18 보다 BSV11으로의 형질전환이 200배 이상의 빈도로 나타났다. 이와는 대조적으로 단지 유전자 *ribIV*만을 포함하고 있는 재조합 플라스미드(PpHp.pT7-4, Fig. 2)의 경우에 있어서는 BSV18으로의 형질전환 빈도가 BSV11 보다 500 배 이상 나타나는 결과를 보였다(Table 2). 이 결과를 근거로 하면 유전자 *ribII*는 DHBP synthase를 코드하게 되고, 유전자 *ribIV*는 GTP cyclohydrolase II를 코드하게 되는 것으로 사료된다.

### 고 찰

1935년 독일의 Kuhn에 의하여 riboflavin이 처음으로 유기화학적으로 합성된(9) 이후, 수용성 vitamin의 한 종류로서 생리학적으로 그 역할이 매우 중요한 riboflavin의 유기화학적, 유전학적, 혹은 영양학적인 연구가 활발히 진행되어 왔으며 riboflavin의 생합성 경로가 아직 완전히 해명된 상태가 아니나 그 대략적인 경로를 살펴 보면 다음과 같다(2) (Fig. 7).

Riboflavin 생합성의 과정은 첫 단계에서 GTP 의 imidazole

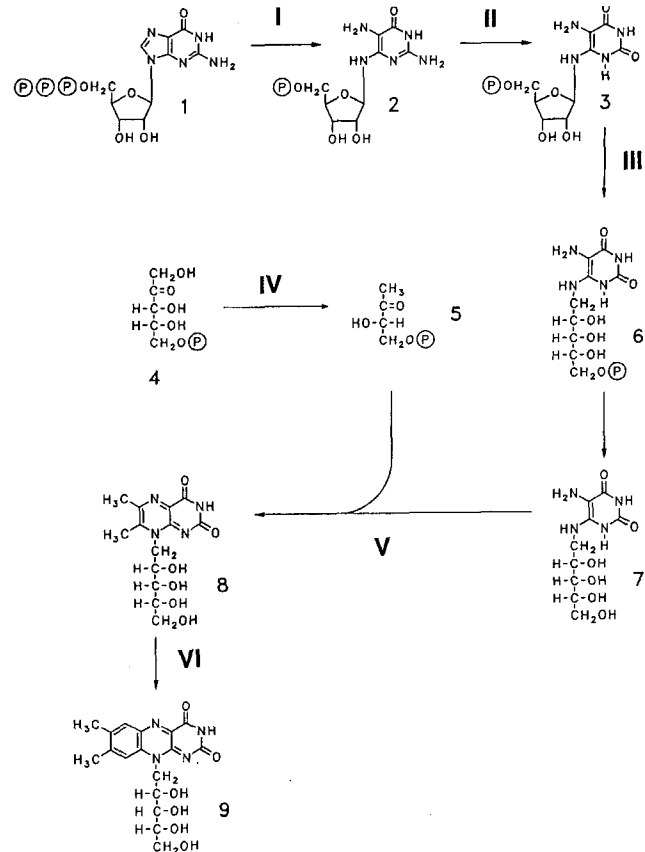


Fig. 7. Riboflavin synthesis pathway in bacteria. The enzymes and intermediates involved are, I, GTP cyclohydrolase II; II, deaminase; III, reductase; IV, DHBP synthase; V, lumazine synthase; VI, riboflavin synthase; 1, GTP; 2, 2,5-diamino-6-(5'-phosphoribosylamino)-4-pyrimidineone; 3, 5-amino-6-(5'-phosphoribosylamino)-2,4-pyrimidinedione; 4, ribulose 5'-phosphate; 5, 1,3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate (DHBP); 6, 5-amino-6-(5'-phosphoribitylamino)-2,4-pyrimidinedione; 7, 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidinedione; 8, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (Lumazine); 9, riboflavin. ⊕ indicates PO<sub>3</sub>.

group이 개열(opening)되어 pyrimidine intermediate가 형성되고 이것이 deamination과 reduction 과정을 거쳐 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidinedione으로 변환된다. 이 pyrimidinedione 유도체와 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate의 축합반응에 의하여 lumazine이 합성되고, riboflavin이 lumazine의 dismutation 과정에 의하여 만들어지게 된다. Brown group에서는 riboflavin 합성의 첫 단계인 GTP에서 formate를 방출하는 효소인 GTP cyclohydrolase II를 *E. coli*에서 분리 정제했고(8) 두번째 단계인 pyrimidine compound에서 2번 탄소의 deamination과 ribosyl amino group을 ribityl amino group으로 환원시킬 것으로 생각되는 deaminase와 reductase를 분리 정제하였다(7). Riboflavin생합성의 마지막 단계인 lumazine 합성과 lumazine으로부터 riboflavin으로 전환시키는데 관여하는 효소들인 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate (DHBP) synthase와 heavy riboflavin synthase ( $\alpha_3\beta_{60}$ )는 Bacher Group에 의하여 분리 정제가 되어 그것

들의 유기 생화학적 반응메카니즘을 규명하는 데 많은 노력을 경주해 왔다(22,24). 또한 *Bacillus*, *Saccharomyces*와 *E. coli*에서 riboflavin 생합성 대사과정이 결여된 일련의 돌연변이주들이 러시아의 유전학자들에 의하여 얻어졌고(3,5,6), 최초로 *B. subtilis*에서 riboflavin 생합성에 관여하는 유전자들이 모인 *rib* 오페론이 cloning 되고, sequencing 되었다(19). 그러나 그들은 clone 된 유전자들을 발현시켜 그 단백질들이 갖는 생화학적 기능등을 규명하는데 미진하였다.

*Photobacterium* species의 *luxG* 다음의 첫 번째 유전자가 코드하는 단백질이 riboflavin synthase라는 사실은 분자 유전학적으로 흥미를 자아내는 데 그것은 발색단으로서 riboflavin synthase의 기질인 lumazine과 결합하여 *Photobacterium* species의 최대 발광 세기를 단과장으로 이동시키는 것으로 알려진(18) lumazine protein (*LuxL*)과 아미노산 상동성이 있을 뿐만 아니라 *luxI*이 *luxC* 상류에 존재하게 되며 *lux* 유전자들과는 반대 방향으로 전사되기 때문이다(C.Y. Lee, unpublished data) (Fig. 1).

*Photobacterium* species의 두 번째 riboflavin 유전자(*ribII*)는 *B. subtilis*의 *rib* operon의 세 번째 유전자가 코드하는 단백질과 같이 N-말단에서는 DHBP-synthase 그리고 C-말단에서의 GTP cyclohydrolase II의 두 기능을 갖는 것(4)이 아니라, 단지 N-말단의 DHBP synthase의 기능만을 갖는 단백질을 코드하는 것으로 나타났다. *Photobacterium* species의 *RibII* (40 kDa)는 *B. subtilis*의 riboflavin operon의 세 번째 유전자가 코드하는 단백질(44 kDa)과 비슷한 크기를 갖으나, C-말단 영역에서의 아미노산 상동성이 매우 낮고 30 amino acid가 없다는 단백질의 1차 구조 분석결과(Fig 6)는 위의 연구 결과를 지지하여 준다. *Photobacterium* species의 세 번째 유전자 *ribIII*는 이것이 코드하는 단백질의 amino acid 상동성(Fig. 4) 그리고 riboflavin synthase의 thermostability를 증가시키는 것으로 보아 lumazine synthase를 코드하는 단백질로 확신되며, 네 번째 유전자 *ribIV*는 *ribII*의 C-terminal 영역이 상실했던 GTP cyclohydrolase II 기능을 갖는 단백질을 코드 하게 되는 특이한 gene organization을 보였다. *ribIV*는 gene duplication에 기인하여 생성된 유전자로 추정되며, *Photobacterium* species는 주요한 riboflavin 생합성 유전자가 한 오페론에 모여 있고, 세 번째 유전자가(*ribBA*) 두가지의 기능을 갖는 단백질을 코드하는 *B. subtilis*와, riboflavin 유전자가 chromosome 상에 분리되어 있고 DHBP synthase와 GTP cyclohydrolase II를 각각 코드하는 유전자가 별개로 존재하는 *E. coli*와는 다른 중간 단계의 riboflavin의 gene organization 체계를 갖음을 알 수 있었다.

Riboflavin은 박테리아에서의 발광반응 기질인 reduced FMN의 전구체(precursor)이다. 따라서 riboflavin 합성에 관여하는 유전자들이 *lux* 오페론과 함께 조절이 되는, 즉 riboflavin 유전자들이 *lux* 유전자들과 같은 전사 단위(transcriptional unit) 안에 포함될 경우, *lux* 오페론은 박테리아의 발광반응에 참여하는 모든 기질(fatty aldehyde와 flavin)을 합성하는 효소들과 직접적으로 반응에 참여하는 효소(luciferase)들을 코드하게 되는 유전자들로 이루어지는 복잡한 구조(complex operon)로 구성되게 된다. 이를 확

인하기 위한 연구실험이 곧 진행되어야 할 것으로 사료되며, 이는 박테리아에서의 발광반응의 flavin 기질 공급 조절에 주요한 정보를 제공하여 줄 것이다.

## 참고문헌

1. Bacher, A., R. Baur, U. Eggers, H. Harders, M.K. Otto, and H. Schnepfle. 1980. Riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. Purifications and properties. *J. Biol. Chem.* 255, 632-637.
2. Bacher, A. 1994. Biosynthesis of flavins, pp. 215-259. In F. Muller(ed.), Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, CRC Press, Boca Raton, FL.
3. Banadrin, S.V., P.M. Ravinovich, and A.I. Stepanov. 1983. Three linkage groups of genes for riboflavin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Genetika* 19, 1419-1415.
4. Boretiskii, I., I.E. Drobinskaia, N.V. Batchikova, V.E. Bidnenko, and P.M. Rabinovich. 1991. Subcloning and study of the GTP cyclohydrolase gene of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Microbiol. Virusol.* 7, 22-25.
5. Bresler, S.E., D.A. Perumov, T.P. Chernik, and A.P. Skvortsova. 1976. Investigation of the riboflavin operon of *Bacillus subtilis*. Determination of the type of regulation by the dominance test for operator constitute and regulator constitute mutations. *Genetika* 12, 124-127.
6. Bresler, S.E., D.A. Perumov, E.A. Glazunov, T.N. Shevchenko, and T.P. Chernik. 1978. Investigation of the operon of riboflavin synthesis in *Bacillus subtilis*. Study of the operator-constitutive mutants. *Genetika* 14, 1530-1534.
7. Burrows, R.B. and G.M. Brown. 1978. Presence in *Escherichia coli* of deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* 136, 657-674.
8. Foor, F. and G.M. Brown. 1975. Purification and properties of guanosine triphosphate cyclohydrolase II from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 250, 3545-3551.
9. Gilman, A.G. 1990. Water Soluble Vitamin. pp1534-1536. In Gilman, Rall, Nies and Tayler (ed), The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. Pergamon press, New York.
10. Hastings, J.W., C.J. Potrikus, S.C. Gupta, M. Kurfurst, and J.C. Makemson. 1985. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26, 235-291.
11. Herring, P.J. 1978. Bioluminescence in Action. Herring (ed.), Academic Press. New York.
12. Herring, P.J. 1987. Systematic distribution of bioluminescence in living organisms. *J. Biolumin. Chemilumin.* 1, 147-163
13. Lee, C.Y., R.B. Szittner, and E.A. Meighen. 1991. The *lux* genes of the luminous bacterial symbiont, *Photobacterium leiognathi*, of the ponyfish. *Eur. J. Biochem.* 201, 161-167.
14. Lee, C.Y. and E.A. Meighen. 1992. The *lux* genes in *Photobacterium leiognathi* are closely linked with genes corresponding in sequence to riboflavin synthesis genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 690-697.
15. Lee, C.Y., D. O'Kane, and E.A. Meighen. 1994. Riboflavin synthesis genes are linked with the *lux* operon of *Photobacterium phosphoreum*. 176, 2100-2104.
16. Mancini, J.A., M. Boylan, R.R. Soly, A.F. Graham, and E.A. Meighen. 1988. Cloning and expression of the *Photobacterium phosphoreum* luminescence system demonstrates a unique *lux* gene organization. *J. Biol. Chem.* 263, 14308-14314.

17. Meighen, E.A. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 42, 151-176.
18. Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
19. Mironov, V.N., M.L. Chikandas, A.S. Kraev, A.I. Stepanov, and K.G. Skryaben. 1989. Riboflavin biosynthesis genes of riboflavin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 312, 237-240.
20. Miyamoto, C., E. Meighen, and A. Graham. 1990. Transcriptional regulation of the *lux* genes transferred into *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 172, 2046-2054.
21. Plaut, G.W.E. and R.A. Harvey. 1971. The enzymatic synthesis of riboflavin. *Meth. Enzymol.* 18B, 515-538.
22. Richter, G., R. Volk, C. Kreger, H.W. Lahm, U. Rothlisberger, and A. Bacher. 1992. Biosynthesis of riboflavin: Cloning, sequencing and expression of the gene coding for 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 4050-4056.
23. Richter, G., M. Fischer, C. Krieger, S. Eberhardt, H. Lutgen, I. Gerstenschlager, and A. Bacher. 1997. Biosynthesis of riboflavin: Characterization of bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 2022-2028.
24. Schott, K. R. Landenstein, A. Konig, and A. Bacher. 1990. The lumazine synthase and riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 265, 12686-12689.
25. Singleton, P. and P. Sainsbury. 1987. Riboflavin. pp765-766. *In* Dictionary of microbiology and molecular biology, John Wiley-Son, 2nd ed. New York.
26. Swartzman, E., C. Miyamoto, A. Graham, and E. Meighen. 1990. Delineation of the transcriptional boundaries of the *lux* operon of *Vibrio harveyi* demonstrates the presence of two new *lux* genes. *J. Biol. Chem.* 265, 3513-3517.
27. Tabor, S. and C.C. Richardson. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase-promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
28. Taura, T., C. Ueguchi, K. Shiba, and I. Koreaki. 1993. Insertational disruption of *musB* (*ssyB*) gene leads to cold sensitive growth of *Escherichia coli* and suppression of the *secY24* mutation. *Mol. Gen. Genet.* 234, 429-432.
29. Tresler, G.E. and G.M. Shavlovskii. 1983. Localization of the genes coding GTP cyclohydrolase II and riboflavin synthase on the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Genetika* 17, 54-56.

(Received May 24, 2002/Received September 11, 2002)

#### ABSTRACT: The Functions of the Riboflavin Genes in the *lux* Operon from *Photobacterium* Species

Chan Yong Lee, and Jong Ho Im<sup>1</sup> (Dept. of Natural Sciences, <sup>1</sup>Dept. of Pharmacology, Eulji University School of Medicine, Daejeon 301-832, Korea)

The functions of riboflavin synthesis genes (*ribI*, II, III and IV) found immediately downstream of *luxG* in the *lux* operon from *Photobacterium* species were identified using the biochemical and genetical analysis. The *ribI*-III gene codes for protein corresponding to that coded by the second (riboflavin synthase), third (3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase/GTP cyclohydrolase II) and fourth (lumazine synthase) gene, respectively, of *Bacillus subtilis* *rib* operon with the respective gene product sharing 41-50% amino acid sequence identity. Unexpectedly, the sequence of the *ribIV* product of *Photobacterium phosphoreum* does not correspond in sequence to the protein encoded by the fifth *rib* gene of *Bacillus subtilis*. Instead the gene (*ribIV*) codes for a polypeptide similar in sequence to GTP cyclohydrolase II of *Escherichia coli* and the carboxy terminal domain of the third *rib* gene from *Bacillus subtilis*. Complementation of *Escherichia coli* riboflavin auxotrophs showed that the function of the gene products of *ribII* and *ribIV* are DHBP synthase and GTP cyclohydrolase II, respectively. In addition the experiment, showing that increase in thermal stability of riboflavin synthase coded by *ribI* on coexpression with *ribIII*, provided indirect evidence that the latter gene codes for lumazine synthase.