

## *Brevibacterium ammoniagenes*의 DNA Polymerase I 유사 유전자의 분석

오영필 · 윤기홍\*

우송대학교 식품생명과학부

**Analysis of a Putative DNA Polymerase I gene in *Brevibacterium ammoniagenes*.** Oh, Young Phil and Ki-Hong Yoon\*, School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea – The sequence of 3,221 nucleotides immediately adjacent to *rpsA* gene encoding 30S ribosomal protein S1 of *Brevibacterium ammoniagenes* was determined. A putative open reading frame (ORF) of 2,670 nucleotides for a polypeptide of 889 amino acid residues and a TAG stop codon was found, which is located at a distance of 723 nucleotides upstream from *rpsA* gene with same translational direction. The deduced amino acid sequence of the ORF was found to be highly homologous to the DNA polymerase I of *Streptomyces griseus* (75.48%), *Rhodococcus* sp. ATCC 15963 (56.69%), *Mycobacterium tuberculosis* (55.46%) and *Mycobacterium leprae* (53.99%). It was suggested that the predicted product of the ORF is a DNA polymerase I with three functional domains. Two domains of 5 → 3 exonuclease and DNA polymerase are highly conserved with other DNA polymerase I, but 3 → 5 exonuclease domain is less conserved.

**Key words:** *Brevibacterium ammoniagenes*, DNA polymerase I, gene, nucleotide sequence

DNA polymerase는 세포내 DNA의 복제와 회복과정에 중요한 역할들을 수행하고 있다. 진정세균과 진핵생물에 있어서 DNA 복제기작에 대한 연구가 진행되어 다수의 DNA의 종적 DNA polymerase가 밝혀지고, *Escherichia coli*의 3종류 DNA polymerases와의 아미노산 잔기배열의 유사도를 기본으로 하여 4개의 부류로 분류된다[8]. *E. coli*를 포함한 모든 진정세균의 DNA polymerase I, 일부 진정세균의 파아지 DNA polymerases와 미토콘드리아의 DNA polymerase가 family A에 속하며, family B에는 *E. coli*의 DNA polymerase II, 몇몇 파아지 DNA polymerases, 진핵생물 DNA polymerases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ 와  $\epsilon$ ) 및 진핵생물성 바이러스와 플라스미드 유래 효소가 포함된다. Family C에는 오직 진정세균의 DNA polymerase III가 포함되며, 진핵세포의 DNA polymerase  $\beta$ 는 family X로 분류한다[4,20].

DNA polymerase를 코딩하는 유전자에 대한 정보가 밝혀지면서 그로부터 추론되는 아미노산 잔기배열간의 상동성과 함께 단백질의 도메인과 motif 지역이 밝혀졌다. 현재 진정세균의 Actinomycetales목에 속하는 균주 중 8균주의 DNA polymerase I의 유전자 염기서열과 아미노산 잔기배열이 보고되었는데, 그 중 Corynebacterineae과에 속하는 5종류와 Streptomycineae과에 속하는 3종류의 균주에서 DNA polymerase I의 유전자와 단백질 정보가 <http://www.sanger.ac.uk/>

software/pfam에 각각 보고되어 있다.

*Brevibacterium ammoniagenes*는 Corynebacterineae과의 *Brevibacterium*속에 미생물로서 조미성 핵산물질을 생산하는 산업균주로 사용되고 있으며, 아미노산의 생산균주로 사용되는 *B. flavum*, *B. lactofermentum*[17], *Corynebacterium glutamicum*[10,11]과 함께 코리네형 그람양성균이다[12]. 본 연구에서는 *B. ammoniagenes*[18] 총 염색체 DNA의 cosmid library를 만들어 염색체상에서 glucose permease 유전자와 30S 리보솜 단백질 유전자[19]의 옆에 존재하는 DNA polymerase I을 코딩하는 것으로 추정되는 유전자가 *Corynebacterium* 속과 *Brevibacterium* 속의 균주에서 처음으로 발견되어 그 염기서열을 결정하고 이로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열을 다른 미생물의 것과 비교하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물 균주와 플라스미드 및 배지

*B. ammoniagenes* ATCC 6872는 유전자 제공원으로 사용되었고 유전자조작을 위한 숙주균으로는 *E. coli* JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacΔM15]*)와 *E. coli* XL-1 blue (*hsdR17 supE44 recA1 endA1 gyrA46 relA1 thi lac F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15::Tn10 (tet<sup>r</sup>)]*)가 각각 사용되었다. *B. ammoniagenes*의 *ptsG*와 *rpsA* 유전자를 포함하며 크기가 약 40 kb인 염색체 DNA를 함유한 재조합 cosmid Cos13-27이 *B. ammoniagenes* DNA polymerase I

\*Corresponding author  
Tel. 042-630-9742, Fax. 042-636-2676  
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

유전자의 염기서열을 결정하기 위해 사용되었다. 플라스미드 pUC19는 subcloning을 위한 유전자 운반체로 사용되었다. *B. ammoniagenes*와 *E. coli*의 배양을 위해서는 LB 배지 (5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)가 사용되었고 *E. coli*의 형질전환시 SOB 배지 (2% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>), MacConkey 배지 등이

사용되었으며 형질전환주를 선별하기 위해서는 ampicillin (50 µg/ml)이 첨가된 평판배지가 사용되었다.

DNA 분리와 조작

*E. coli*로부터 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Birboim과 Doly 방법과 [2] Qiaprep kit(Qiagen)를 이용하였다. 재조합 플라스미드의 제조는 상법에 준하여 행하였으며

TCTAGAAACCGCGCTGCGCGCAGCAATTGCCGCCATTGGCGCATACGTTGCCGCTAGTCAAACAACGAAAAATCCCCAGCAACTTCAAGGAA 96  
 GCTGGAGGAATTTTCTATCGTGCCCTGGTGAAGTCTGCAACTCAGACTGACCGGGTTTGAATCCGTTGCCTCGCCAATTGGGCTACAGGGGCTG 192  
 ACATGAAAGATACTATCTTAAGTAGTTCGCAAAAATAAAATCGTGCCCTACACTGGTAAACGTGACTTCAAAGCTACTTCTTATTGACGGCCAT 288  
MRK N K I V P S T L V N V T S K L L L I D G H  
 TCCATGGCATTTCGGCGTCTACGCCTTGCCGGTGGTAAGTCTCTACTCCGGCGGCAACACACCAATGCTGTCTATGGATTTCATGTCATG 384  
 S M A F R A F Y A L P V D K F S T S G G Q H T N A V Y G F M S M  
 ATGGCGAGTCTGCTGAGTGAGGAAAAACAGATTCCATTGCCGTTGCCCTTTCAGCGTAGGCCGCAAGACTTTCGCGACGGAATGTTCCCGAATAC 480  
 M A S L L S E E K P D S I A V A F D V G R K T F R T E M F P E Y  
 AAGGCTCAGCGTGAATCCGCGCCGAGGAATTAAGGGCCAGTAAACCATCAITTCGGACCTTAGACAAAGCTGGGATTACTTACTTTCACCGC 576  
 K A Q R E S A P E E F K G Q V T I I R D L L D K A G I T T L S R  
 GAGAATTCGAGCCGATATATTTGGCAACCTTGGTACCAGGCCAGGACATGTCGGGGTTTGAACCTCTCATCGTCACTGGCGGACCGTGAC 672  
 E N F E A D D I L A T L A T R P A T C R G L K L S S S L A D R D  
 TACCTGCAGCTGGTGTGACTCCACCAGGTGTGTACCCATGCAGGGCGTATCAAGCTGCACCGCTTACCCCGGAGGCGAGTGGAGGAAAA 768  
 Y L Q L V D D S T T V L Y P M Q G V S K L H R F T P E A V E E K  
 TAGCGGCTGACGCGCTCAGCAGTACCCAGATTACGCGCGCTGCGTGGTATAATTCCGATAACCTCCAGCGCGTCCCAAGTCCGGGAGAAAACT 864  
 Y G L T P Q Q Y P D Y A A L R G D N S D N L P G V P K V G E K T  
 GCGCTGAAATGGATTTCGAGTACAACGACTTAGAAAACTGCTTAAACACGCGGATGAAATCAAGGGTGTGGTGGCAATAACCTGCGCGAGCGC 960  
 A L K W I L Q Y N D L E N L L K H A D E I K G V V G N N L R E R  
 ATTGAACAGGTGCGCCTTAAACCGCAGCTGACGAGATGATACCAATATGACTTAGAAGTCGGGCGCAGACTTGGCGTTCGCGCCGTTGAG 1056  
 I E Q V R L N R T L T Q M I T N M D L E V G P A D L A F R P V E  
 AGCGCTACCATCGCAGAGCTTTTCGATGAGCTTGAATTGGCGGCAACCTGCAGCGCGCTGCTGGATGCTTCCCGAATATCGAAGGCAGCATG 1152  
 S A T I A E L F D E L E F G G N L R E R V V D A F P N I E G S M  
 CCGGAGCCGAAAAACGAGCTCAAGGTCAAGCTCAGCTGACAAAAGCGTTCGAGTGGCTTCAGGATAAAAGCGGTGGCCATGTTATACCGGG 1248  
 P E P E N D V K V S V T D K S V E W L Q D K S G V A M F I T G  
 GACGGGCTGCTGCGCAAGGTGACCCAGGACTTCACTTGTGATGCACTTTTACGCGCTGCACATTGAGCTTGGCGACTCAGCGCCGAA 1344  
 D G R P G Q G D A T S I S L V D A T F D G L H I E L A D L S A E  
 GATGATAAAGCTCTTCAACCTGGTGAATCGGATGCAGAGAAATTCCTGCAGCAAGCCAAAGCGGCGCACCATGCTCAAAGCCGCGCATC 1440  
 D D K A L A T W L E S D A E K F L H E A K A A H H M L K G R G I  
 GAACTAAACGGCATCGCGCAGCACTGCGCTTGGCGCATACTTGGTGGCCAGCTTACCTATGAGCTTCCCGATGCTATCAGCGACAC 1536  
 E L N G I A H D T A L A A Y L L R P G Q R T Y E L P D V Y Q R H  
 CTGCGCAAGCCCTGGAAGCTTCTAGTGAGCAGTGTGCGCTTCTCGATGCAACCGCGCGCTGATTCCGAGCCGCAATGGAAGCTTACAGT 1632  
 L R K T L E A S S E Q L A I N H P H P F L D H L L A H R E Y K L K  
 GAGCTAACGAAGCTTCTGCAAGAAATCGAATCCTACCAGCTCTATCCGAGCTGGAGATTCCACTGGTGTCCATCTTGCCAAGATGGAAGCCACC 1728  
 E L T K L L Q E I D S Y Q L Y A E L E I P L V S I L A K M E A T  
 GGCTTCCGCTCGATATCGATACCTTGGAAATCCAGCAGGAAGTCTTGTCAACCGTGGAGCCGGAAGAAAAGTCCGCGCTTGGCTCGCTGGC 1824  
 G I A V D I D T L E S Q Q E V F A N H V E A E E K S A R E L A G  
 GATGAGAACTCAACTTAAATTCGCCAAGCAGCTCCAAACCGCTTATTCGAGACTTGGACCTGCCAAGACGAAAGAAAACCAAGACTGGTTAT 1920  
 D E K L N L N S P K Q L Q T V L F E T L D L P K T K K T G Y  
 TCCACCGCAGCGAAGAAATGAGCAGCTGGCTATCAATCAACCGCAGCTTTTGGACCACTGCTTGGCAGCGTGAACAAAAGCTCAAA 2016  
 S T A A K E I E Q L A I N H P H P F L D H L L A H R E Y K L K  
 ACCAGCTTGAAGGTTGATTAAAGCCGTGCACTCCGAGCGCGTATCCACACCGTAAATCAGACCGTGGCGTGCAGGGACGTTGTCTTCCG 2112  
 T T L E G L I K T V Q S D G R I H T T F N Q T V A S T G R L S S  
 ACGGATCGGAACCTCGCAGAACCTCCGCTTGGTACTGAAATCCGAGCTGAAATCCGAGCGCTGCACTCATGCTGGCGAAGGCTACGAAACCTACTG 2208  
 T D P N L Q N I P V R T E S G R T I R S A F I V G E G Y E T L L  
 ACGGCTGACTACTCGCAGATGAAATGCGGTTATGGCGACCTGCCCCAAGACCGGTTGATTGAGGCATACAAGGAAGCGGAGGACCTACAC 2304  
 T A D Y S Q I E M R V M A H L S Q D P G L I E A Y K E G E D L H  
 AACTACGTCGGCTCCCGCTTCTCGATGTGCCAGTTGACCAAGTACCCGAGACTACCGCCGCGCTCAAGGCTATGCTCTATGGCTAGTCTAT 2400  
 N Y V G S R V F D V P V D Q V T P E L R R R R V K A M S Y G L V Y  
 GGCTTTCCGCTTCCGTTATCCAGCAGCTGTCCATTCCAGCGGCGAAGCAAGATCATGGAAGCCTACTTCGACCGCTTGGTGGGCGTG 2496  
 G L S A F G L S Q Q L S I P A G E A K K I M E A Y F D R F G G V  
 AAGAAGTACCTCGCGGATGTTGTTGAACAGGCCGTAAGGACCGCTATACCGCCACCGTCTTGGTGTGCGCGCTACTGCCGGAAGTACCTCT 2592  
 K K Y L A D V V E Q A R K D G Y T A T V F G R R R Y L P E L T S  
 GATAACCGCTCGCAGCGGAGATGCTGAGCGCGCAGCGCTAAACGCAACATCCAAAGCACCAGCGGACATCAAGGTCCGGATGATCCGC 2688  
 D N R L A R E N A E R A A L N A P I Q G T A A D I I K V A M I R  
 TCGACAAATGCCCTCGAAGGCTTCAAGTCCGCTGTCTTTGCGAGGTGCATGACGAATGGTGTGCGAAATGCTCCTGGTGGCTGCGCGAGGTG 2784  
 V D N A L E G G F K S R V L L Q V H D E L V V E I A P G E L A E V  
 CGGGAGATTGTGGAGCGGAGATGGATGCATGATAAGCTTGGCTGTCCTGAGGCTCTGCGCGCACCGGTGATAAATGGGACGCTGCTGGC 2880  
 R E I V E R E M D A S I S L R V P L E V S A G T G D N W D A A A  
 CACTAGGAAATCTGTAGCTGGCAGGAATTAAGCGCATCTTGGTGTGATAAATTCGCGCGCCCTGACTAGTATCCACTGGGGTGGCTCCACCA 2976  
 H  
 TGGTCTTAGCGAAGTAAATCGAATGGATGCTGCGGAAAGCCGAAGATAGATAGCCGAGCATGGCCACGATGGTGGGCTCAACGTAGGGAATGCCGA 3072  
 ATGCTGCGAGGACGTCAGAGGATCCAGCTGTTGCGAATCCGCGGATGTTGTGTAGCCCGGTTAATCGAGATGATTCCAGCTGCAGCGACCACT 3168  
 TGCCCAACGAGGTTCCAGCGGCTTCGACAATGGTGGCTAGCCGAAAAAG 3221

Fig. 1. Nucleotide sequence of the putative DNA polymerase I gene and deduced amino acid sequence in *B. ammoniagenes*. The underlined sequence preceding the GTT start codon of the DNA polymerase I gene is a putative ribosome-binding site. The predicted amino acid residues are described below the nucleotide sequences. The numbers at the end of each line correspond to the nucleotide positions.

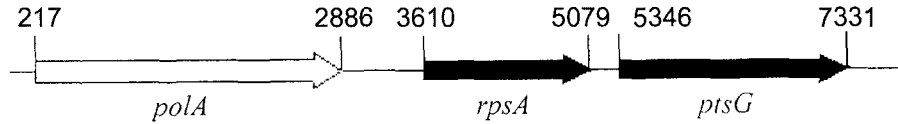


Fig. 2. Organization of the genes encoding the DNA polymerase I (*polA*), 30S ribosomal protein S1 (*rpsA*), and glucose-specific Enzyme II (*ptsG*) in *B. ammoniagenes* chromosomal DNA. The arrows indicate the direction of transcription. The numbers indicate the nucleotide positions on the sequenced chromosomal DNA.

[15] *E. coli* JM109의 형질전환은 Hanahan 방법에 의해 실시하였다[6].

#### DNA 염기서열, 아미노산 서열 및 도메인 분석

염기서열을 결정할 *B. ammoniagenes* 염색체 부분을 제한 효소로 절단하여 이들을 pUC19에 도입함으로써 재조합 플라스미드를 제조하였다. 이때 염기서열을 결정할 부위가 중복되어 판독될 수 있도록 재조합 플라스미드를 제조하였으며 염기서열은 재조합 플라스미드를 template DNA로 하고 universal primer와 reverse primer를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법을[16] 이용하여 Automatic DNA sequencer(ABI, model 373A, version 2.0.1S)로 결정하였다. DNA의 염기서열과 단백질의 아미노산 배열은 DNASIS (Hitachi Software Engineering, Japan) program을 이용하여 분석하였다. 도메인 분석은 <http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/>에서 수행하였다.

### 결과 및 고찰

#### DNA polymerase I 유전자의 염기서열

*B. ammoniagenes*의 염색체 유전자 약 40 kb 정도를 가지는 재조합 플라스미드 Cos13-27의 염기서열을 밝히는 과정에서 *ptsG* 유전자[17,18]와 *rpsA* 유전자[19]는 이미 보고되었다. 따라서 그 주변의 총 3,221 bp 염색체 DNA의 염기서열을 새로이 밝히고(Fig. 1) 염기서열로부터 추론되는 단백질의 아미노산 배열을 BLAST 조사 프로그램을 사용하여 [1] NCBI database에 있는 기존에 알려진 단백질 및 유전자 산물의 것과 비교한 결과 DNA polymerase I의 아미노산 잔기 배열과 상동성이 높은 것으로 확인되었다.

염기서열에서 추론된 단백질의 개시코돈은 정제된 효소로 아미노 말단의 아미노산 배열을 결정하지 않아 불확실하지만 이미 보고된 DNA polymerase I들과의 상동성을 비교한 결과를 토대로 할 때 217~219번째 염기 GTT가 개시코돈으로 추측된다. *Streptomyces griseus*은 AAT, *Rhodococcus* sp. ATCC 15963는 ACG, *Mycobacterium tuberculosis*는 GTG, *M. leprae*는 GTG, *S. coelicolor*는 GTG를 각각 DNA polymerase I의 개시코돈으로 사용하는 것으로 보고되어 ATG가 개시코돈으로 사용되지 않는 것으로 나타났다. 실제 이들 균주에서 개시코돈의 예상은 리보솜 결합위치와 떨

어진 정도에 따라 이루어진 것이다. *B. ammoniagenes*의 DNA polymerase I으로 예상되는 *orf*의 개시코돈에서 위쪽으로 13 nucleotides 떨어진 염기서열 위치 197~203 지점에서 리보솜 결합부위로 예상되는 퓨린염기가 많은 염기서열이 발견되었다. 그러므로 Fig. 1에서 나타난 염기서열 위치 217~2,886 지역에 해당하는 2,670 bp 크기가 *orf*로 판단된다. 이러한 *orf*는 밝혀진 *ptsG* 유전자와 *rpsA* 유전자의 위 부분에 존재하고, 이들 유전자와 동일한 방향으로 전사되도록 배열되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

DNA polymerase I 유전자로 예상되는 *orf*에서 추정된 단백질은 분자량이 98,400이며 889개 아미노산으로 구성되어 있고 종결코돈으로 TAG를 사용하고 있다. 이러한 DNA polymerase I 유전자는 염색체상에서 30S 리보솜 단백질 S1의 유전자간에는 723 bp가 떨어져 있는 것으로 확인되었다. 또한 DNA polymerase I의 구조유전자의 GC 조성은 55.3%인데 비해 코돈의 3번째 염기의 GC 조성은 약 64.6%로 나타나 대장균과는 달리 3번째 염기에 G와 C의 염기가 선호적으로 사용되고 있는 것을 알 수 있다. 한편 종결코돈 뒤쪽에서는 *rho*-비의존적인 전사종결을 일으키도록 회문형 구조를 이룰 수 있는 염기서열이 발견되지 않았다.

#### DNA polymerase I의 아미노산 배열 비교

유전자의 염기서열에서 유추된 *B. ammoniagenes*의 DNA polymerase I의 아미노산의 배열은 세균의 DNA polymerase I과 유사성을 보여 family A에 속하는 효소로 판단된다. 특히 세균 중에서도 *Corynebacterium* 속 세균이 속하는 Actinomycetales 목에서 보고된 DNA polymerase I과 유사성이 높은 것으로 나타났다. *S. griseus*의 DNA polymerase I과 75.48%로 가장 높은 상동성을 보였으며, *Rhodococcus* sp. ATCC 15963, *M. tuberculosis*, *M. leprae*와 *S. coelicolor*의 DNA polymerase I과도 각각 56.7%, 55.5%, 54.0%와 52.0%의 상동성을 보였다(Fig. 3). *B. ammoniagenes*의 염색체상에서 DNA polymerase I의 유전자와 인접해 있는 30S 리보솜 단백질 S1은 *M. tuberculosis*[3], *M. leprae*와[5] *S. coelicolor*[14]의 것과는 75% 이상의 높은 상동성을 보인 것과 비교해 볼 때 이들 균주 사이에서 DNA polymerase I은 30S 리보솜 단백질 S1의 상동성보다 약 20% 이상 낮았고 이로부터 세균간 DNA polymerase I의 보존성은 30S 리보솜 단백질 S1보다 낮은

BAMD POLI	MRKNKIVPSTLVNVTSK-----LLLDIGHSMARAFYALPVDKFSTSGGQHTNAVYGFMSMMASLLSEEKPSDIAVA	72
AAG43108	*SACFSRGMQVTTNQPR-----*****NL*****L*LSNIVA**A**A***	72
AAG43103	*----SPAT*TRSS* TASAGTTGADDRPLM*****L*****AEN*K*HS**A*****T*LIN**RD*Q*THL*A*	82
L11920	*VTTASA*-EDRAKPT-----*M*L**N*L*****AEN*K*R*LT*****TA*LIN**RD*A*TH**A*	71
Z466257	*SAAMTAEVCEDEHTKPM-----*M*L**N*L*****TEN*K*R*LT*****TA*LIN**R**A*TH**A*	72
BAMD POLI	FDVGRKTFRTEMFPYKQRESAPEEFKQVTIIRDLLDKAGITLSRENFEADDILATLATRTPATCRGLKLSSSLADRDYLQVLD	158
AAG43108	*****D*****A*****DL**EV*EVL*****EAQDYET*---IVTG*****N	155
AAG43103	**S*Q**ADL*****AK**D****ID*TK*V*GAL**PVMAE*G*****VI***-TQ*EAL*YRVLVVTG**S****T	167
L11920	**S*Q**LQRY*****N*S*T**D****ID*TK*E*V*GAL**V**EPG*****L]*****-Q*ENE*YRVLVVTG**A****S	156
Z466257	**S*****S*CYAG**N*S*I*A**H**ID*TK*E*V*GAL**V*FAEAG*****L]*****-Q*ENE*YRVLVVTG**A****S	157
BAMD POLI	DSTTVLPYMQGVSKLHRFTPEAVEEKYGLTPQQYPDYAALRGDSDNLPVGPVKVEKTKALKWILQYNDLENLKHADKIGVWGNV	244
AAG43108	E*****K**T*****S*****A*****F*****P*****I*****T*****VK*G*AS*VE*****	241
AAG43103	**NV*****K**A**T*****S**S**A*****F*****P*****I**G*****T*****RE*****QG*VDNV*K*V**K**DS	253
L11920	*DV*****R**K**E**T*****V*****R*****F*****P*****I**G*****A*****AE*GS*RS*VDNV*AVR**K**DA	242
Z466257	NDV*****R**K**E**T*****I*****V*****A*****L*****P*****I**G*****A*****VD*GS*QG*VDNV*VSR**K**EA	243
BAMD POLI	LRERIEQVRLNRTLQMITNMDLEVGPADLAFRPVESATIAELFDELEFGGNLRRRVVDAFPNIEGSMPEPENDVKVSVT---DKS	327
AAG43108	F*****QM**K*****D*****N**K*EAKV*DV*AK**D*****TS**D**LA*I**DGACAA*QAE*Q*E*LE*VID*EP	327
AAG43103	**N*LAN*L**Q**E**VR**V*P*PYT*EQ*VLA*WDR*E**K*H**A**D*****D*****-K*LRDR*LF*ATL**SS**A*E*E*G*F*S*---*DA	330
L11920	**AN*LAS**VR**E**DL*VRD*V*P*AQT*DT*RLQ*WDR*H**R**D*****D*****-RV**D**LF*TL*AAAG*---*VDE*G*F*RG*G*---*ALA	322
Z466257	**TH*LAS**VR**E**EL*V*D*V*P*V*Q*TS*DT*RLQ*WDR*H**R**D*****N*****-RV**D**L*FE*LAA*AGER*V*VDE*G*F*RG*G*---*LLE	325
BAMD POLI	---VSEWLQ---DKSGVAMFITGDGR-----PGQGATSISLVDA*TFDGLHIELADLSA---EDDKALATWLES-DAE--	390
AAG43108	---L*Q**P---GREH**V*Y*Q**E*N-----**S**A**AF**Q*ERH**Q*V**G**G**G**---*****Q**A**-*TP--	390
AAG43103	---LAPGAV---AAWLD*HAR**ERH*GV*LT*TRT---FA**V*-A*AI*AS**E*CA*YI*AST*ATP**EA**G*D*-A---*SQP	403
L11920	---PGTVR*---WLAEH*---**RAGLTV*V*G*THL*HG*****AM*VAA*DGE*AYLDT*TP*TP---D**A**A**AD-P**K*P	393
Z466257	SGT*GR**AKHAD*GRRSGLA*V*THL-----*HG*****AL*VAA*DG*N*GY*DT*ML*TP---D**D**A**ADP**NP--	396
BAMD POLI	KFLHEAKAAHMLKGRGIELNGIAHDTALAAYLLRPGQRTYELPQVYQRHLRKTLEASS---EQ---LSLLDGTGGLD-----	462
AAG43108	*YF*****F**A*****A*****A*****Q**S*AT---*---*****N*SS*LV*---	462
AAG43103	*A*****W*I**A**R**W**T*G*#LTS*****V*****S*FN**D*LSL*Y*KRE**R*ETS*G*G*---*****D*EQ**A*E*A*E*T*AM	486
L11920	*A*****V**D*A**W**T*E*V*TS*****V*****S*FN**D*LSL*Y*RE**R*ET---P*Q*Q*G*G*Q*I*R*D*A*E*A	468
Z466257	*A*****L**M*D**A**W**T*G*#TS*****V*****S*FN**D*LSL*Y*RE**R*ET*PEQ*---F*****N*V*E*V*---	471
BAMD POLI	-S-----AA-----AIMELTVELTKLQELDSYQLYAELEIPLVSI*LAKMEATGIAVQIDTLESQQEVFANHVEAEKES	530
AAG43108	-Q-----**-----*AER**AE*****FE**TD**L**T**R*****V*I**T**K*DA*VE*Q*AE*Q*RA	530
AAG43103	LS-----*Q-----*VLD*AAA*GTE*E*E*E*K*E*#LSDM*L*TI*E**Q*I*****V**S*AH*HDL*SR**S*Q*ADAAN*	555
L11920	-ETIQTTILR*#R-----*VID*ADA*DAE*AR**TA*LG*M*L*V*Q*RV*****S*A*****L*P*M*TEL*SQ*G*Q*G*I*R*D*A*E*A	544
Z466257	-K-----*Q*I*Q*TL*LL*RR*V*V*D*AAA*DAE*DL**TS*LG*M*L*V*Q*V**D**K*A*****L*RL*TEL*SQ*G*Q*G*I*R*D*A*E*A	548
BAMD POLI	ARELAGDEKLNLSPKQLQTVLFFETLDPKTKTKTGYSTAAKEIEQLAINHPHPFLDHLAHREYQKLTTEGLIKTVQSDGRI	616
AAG43108	*****D*****FE*****AKN*****K**M*****P****	616
AAG43103	*Y*-V**K*Q**G*****V*****E**M*****D*EAL*Q*G*F*DK*TG**E*****D*AT*RM*V*V*DG*L*A*AE****	640
L11920	*Y*G*V**I**K*Q**G*****V*****D*E*G*M*****R*****T*W*D*DAL*Q*S*F*DK*TG**Q*****D*V*TR**V*V*D**L*Q*AA****	629
Z466257	*Y*AVI**K*Q**S*****V*****E**G*M*****R*****T*W*D*DAL*Q*S*F*CK*TE**Q*****T**D*V*TR**V*V*D**L*NA*AA****	633
BAMD POLI	HTTFNQTVASTGR*LS*SD*PN*QNI*PVR*TES*GRT*IR*SA*F*V*G*E---GYETLLTADYSQIEMRVMAHLSQDPGLI*EAYKGEGLHN*YV	699
AAG43108	*****E*****A*****Q*****D---*FDE**M*****A*****	699
AAG43103	*****A*****N*DA**E**DG*V*#Q---*FDV*****I**V*G*E*****F*NT*****S*F*	723
L11920	*****I**A*****E*****I**DA**R**D**V*#D---*AE**M*****I*****G*E*****F*NT*****S*F*	712
Z466257	*****I**T*****E*****I**N*#*Q**D**V*#*SEN**T*E**M*****I*****S*R**E*****F*NT*****S*F*	719
BAMD POLI	GSRVFDVPVDQVTP*EL*RR*RV*KA*MS*Y*GL*V*G*L*SA*F*G*SQ*LSI*P*AGE*AK*K*E*Y*F*DR*F*G*G*V*K*Y*LA*V*V*E*Q*ARK*G*Y*TA*V*F*G*RRR	785
AAG43108	*****S*****S*****E*****D*E**A*****L****	785
AAG43103	**A*G**I*E*E*****A*****Y**A*S**K*ST*E**Q*Q*DA**A*****RD**H**A*****S*LY*****	809
L11920	A**A*G**I*E*E*G*****A*****Y**A*S**K*ST*E**N*E*Q*Q*DA**A*****RD**R**A*****R*****S*L****	798
Z466257	A**A*G**I*E*E*I*****A*****Y**A*T**K*ST*E**L*Q*Q*DA**A*****RD**M*****S*****S*L****	805
BAMD POLI	YLP*EL*TS*DN*RL*ARE*NA*E*RA*AL*NA*P*IQ*GA*ADI*IK*V*AM*IR*V*DN*ALE--GFK--SRVLLQVHDELVEI*APG*EL*AE*V*REI*VER*EM*DA	867
AAG43108	*****N*****Q---*M*---*****V*****AD*****L*****SA	867
AAG43103	**D**N*****Q**R*****V*****N*Q**K*ADA*L*---*M*****L*V*V*AS**E**T*AL**K*DK*ATA	893
L11920	*****D**S**Q**V**A*****S*****Q**K**N---EAQLA**M*****L*F*****R*ER*EAL**R*DK**G*GA	882
Z466257	*****D**S**Q**I**A*****S*****A**K**K---QA*LA**M*****L*F*V**I**R*EQ*IE*AM*RE*Q**G*SA	889
BAMD POLI	ISLRVPLEVSAGTGDNDWDAAAH	889
AAG43108	*E*N*****A**K*D*****	889
AAG43103	*E*S**D**V**R**S**S**	915
L11920	Y*P**D**V**Y**R**S**	904
Z466257	Y*P**D**V**V**F**R**S**G**	911

Fig. 3. Comparison of *B. ammoniagenes* DNA polymerase I (BAMD POLI) with other DNA polymerase I of *S. griseus* (AAG43108), *Rhodococcus*. sp. ATCC 15963 (AAG43103), *M. tuberculosis* (L11920), and *M. leprae* (Z466257). The amino acid sequences of the five polypeptides are shown by a one-letter code and have been aligned by introducing gaps (hyphens) to maximize the similarities. The residues identical to the DNA polymerase I amino acid sequence of *B. ammoniagenes* are indicated by asterisks in all other sequences. The numbers at the end of each line correspond to the amino acid positions in the proteins.

**Table 1. Amino acid sequence homologies in the domains of DNA polymerase I between *B. ammoniagenes* and others**

Accession No. <sup>a</sup>	Strains	3 → 5 exonuc	5 → 3 exonuc	polA
-	<i>B. ammoniagenes</i>	100	100	100
Q9F179	<i>S. griseus</i>	63.9	75.3	85.5
Q9F192	<i>Rhodococcus</i> . sp.	- <sup>b</sup>	55.7	66.3
Q07700	<i>M. tuberculosis</i>	-	54.6	64.0
P46835	<i>M. leprae</i>	-	52.8	62.6
Q9S2K0	<i>S. coelicolor</i>	-	54.2	63.2
Q9F176	<i>R. erythropolis</i>	27.1	36.9	45.0
Q50391	<i>M. smegmatis</i>	NS <sup>c</sup>	NS <sup>c</sup>	44.0
Q9X8B4	<i>S. coelicolor</i>	NS <sup>c</sup>	NS <sup>c</sup>	22.6

<sup>a</sup>pFam accession number.

<sup>b</sup>Amino acid sequence of the domain was not determined.

<sup>c</sup>not sequenced.

것으로 추측된다.

*B. ammoniagenes*의 DNA polymerase I의 아미노산 서열을 Protein families database(Sanger center)에서 분석한 결과 family A의 DNA polymerases와 같이 3 도메인으로 구성된 것으로 나타났으며 아미노산 서열 번호 16~286 지역은 5→3 exonuclease 도메인, 314~479 지역은 3→5 exonuclease 도메인, 508~887 지역은 5→3 DNA polymerase 도메인에 해당된다.

#### *B. ammoniagenes* DNA polymerase I의 도메인 분석

*B. ammoniagenes*의 DNA polymerase I을 구성하는 기능성 도메인의 아미노산 잔기배열을 각각 Actinomycetales목의 속하는 8 균주의 DNA polymerase I의 도메인과 비교한 결과를 Table 1에서 나타난 바와 같이 polymerase 도메인은 다른 도메인 보다 유사도가 높게 나타났으며, 이와 반대로 DNA polymerase I의 교정기능을 담당하는 3→5 exonuclease 도메인은 다른 도메인에 비해 DNA polymerase I 단백질들 사이에 상동성이 낮거나[7], 발견되지 않은 DNA polymerase I도 있었다[9]. 이것은 유사성이 높은 DNA polymerase 도메인은 DNA polymerase I의 필수적 기능을 담당함에 비해 DNA 복제상에 오류를 교정하지 못하더라도 생존에 직결되지 않기 때문에 DNA polymerase I에서 3→5 exonuclease 도메인은 균주간에 다양성을 보이기 때문으로 판단된다. 이는 3→5 exonuclease 도메인이 완전히 없는 *Taq* DNA polymerase I과 *Richettsia* 속 DNA polymerase I의 존재에서도 알 수 있다[9].

DNA polymerase 도메인에는 아미노산 배열의 보존성이 매우 높은 3 motifs가 존재한다. Patel 등은 *Thermus aquaticus* DNA polymerase I의 변이를 통해 motif A 지역

인 DYSQIELR의 아미노산을 변환시키고 효소활성을 조사함으로써 원래 효소활성의 10%~200% 정도를 유지하는 변이효소에서는 D와 E가 다른 아미노산으로 변환되지 않는다는 사실을 보고하였다[13]. 이로 보아 motif A의 아미노산 중 D와 E는 DNA polymerase 활성화에 필수적인 역할을 하는 것을 알 수 있는데 *B. ammoniagenes*와 Fig. 3에서 비교된 균주들의 DNA polymerase I에서도 motif A 지역에서 D와 E는 모두 동일하게 존재하였다. 그러나 Actinomycetales목에 속하는 이들 균주들의 motif A는 *E. coli*, *Thermus* 속 균주, *Rickettsia* 속 균주들의 motif A 아미노산 배열과는 달리 L이 M으로 존재하여 DYSQIEMR 배열을 하고 있는 것으로 확인되었다. 세균간에 아미노산 배열 보존성이 매우 높은 motif A에서도 세균간 유연정도에 따라 아미노산 배열의 보존성에 차이가 있는 것으로 판단된다.

## REFERENCES

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Birboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1515-1523.
- Cole, S. T., 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- David, R. E., H. -P. Klenk, and W. F. Doolittle. 1997. Gene duplications in evolution of archaeal family B DNA polymerases. *J. Bacteriol.* **179**: 2632-2640.
- Fsihi, H. and S. T. Cole. 1995. The *Mycobacterium leprae* genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel polA locus associated with genomic variability. *Mol. Microbiol.* **16**: 909-919.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Huang, Y. -P., J. A. Downie, and J. Ito. 1999. Primary structure of the DNA polymerase I gene of an alpha-Proteobacterium, *Rhizobium leguminosarum*, and comparison with other family a DNA polymerases. *Curr. Microbiol.* **38**: 355-359.
- Kornberg, A. and T. A. Baker. 1992. DNA replication, 2nd ed. W. H. Freeman & Co., New York, USA.
- Lawyer, F. C., S. Stoffel, R. K. Saiki, K. Myambo, R. Drummond, and D. H. Gelfand. 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* **264**: 6427-6437.
- Lee, J. -K., M. -H. Sung, K. -H. Yoon, J. -G. Pan, J. -H. Yu, and T. -K. Oh. 1993. Cloning and expression of the gene encoding mannose enzyme II of the *Corynebacterium glutamicum* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*

- 3: 1-5.
11. Lee, J. -K., M. -H. Sung, K. -H. Yoon, J. -H. Yu, and T. -K. Oh. 1994. Nucleotide sequence of the gene encoding the *Corynebacterium glutamicum* mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 137-146.
  12. Liebl, W., M. Ehrmann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 255-260.
  13. Patel, P. H. and L. A. Loeb. 2000. DNA polymerase active site is highly mutable: Evolutionary consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 5095-5100.
  14. Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapate, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, and D. A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.
  15. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  16. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
  17. Yoon, K. -H., H. Yim, and K. H. Jung. 1998. Cloning, expression, and nucleotide sequencing of the gene encoding glucose permease of phosphotransferase system from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 214-221.
  18. Yoon, K. -H., K. -N. Lee, J. -K. Lee, and S. C. Park. 1999. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Characterization of *ptsG* Gene Encoding Glucose-specific Enzyme II of Phosphotransferase system from *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 582-588.
  19. Yoon, K. -H., M. -S. Lee, Y. P. Oh, and J. H. Choi. 2000. Nucleotide sequence of the putative gene encoding 30S ribosomal protein S1 from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 147-151.
  20. Yoshizumi, I., K. Komori, I. K. O. Cann, and Y. Koga. 1998. A novel DNA polymerase family found in *Archaea*. *J. Bacteriol.* **180**: 2232-2236.

(Received Mar. 26, 2002/Accepted Apr. 29, 2002)