

Methylophaga aminosulfidovorans SK1 *bfmo* 오페론의 클로닝 및 구조 분석

임현숙¹ · 구재환² · 김리현¹ · 김시옥² · 조은희*

조선대학교 생물교육과, ¹조선대학교 교육대학원, ²조선대학교 환경공학부

Methylophaga aminosulfidovorans SK1 (KCTC 10323 BP)은 단일 탄소원, 질소원 그리고 에너지원으로 난분해성 화합물인 트리메틸아민을 이용할 수 있다. *M. aminosulfidovorans* SK1는 진핵세포의 flavin-containing monooxygenase와 유사한 유전자(bFMO)를 지니고 있으며 대장균에서 발현된 재조합 단백질은 강력한 트리메틸아민 산화활성을 보인다. 본 연구에서는 bFMO의 기능과 조절 메커니즘을 연구하기 위하여 *bfmo*의 상단부 및 하단부 유전자의 염기서열을 결정하였다. *bfmo* 상단부의 세 개의 열린해독들은 잘 보존된 nitrate/nitrite response regulators와 methyl accepting protein 유사단백질을 암호화하였다. 하단부의 두 개의 작은 열린해독들은 기능은 알려져 있지 않지만 진정세균계에서 잘 보존된 단백질의 일종으로 나타났다. 역전사효소 중합효소중폭반응을 통하여 여섯 개의 유전자는 세 개의 독립된 오페론으로 구성되어 있음을 확인하였다. *bfmo*의 상단부에 위치하는 세 개의 조절유전자는 두 개의 프로모터에서 전사되었다. 그리고 이와 독립적으로 *bfmo*와 두 개의 하단부 유전자가 하나의 전사단위를 이루고 있다.

Key words □ bacterial operon, flavin-containing monooxygenases(FMO), *Methylophaga*, methylotrophs, RT-PCR

메틸영양세균(methylotrophic bacteria)은 메탄(methan), 메탄올(methanol), 메틸아민(methylated amine)과 같은 일탄소 화합물을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있다(6, 13). 메틸영양세균은 그 수가 매우 제한되어 있으나 분류학적으로 다양하여 진정세균영역의 프로테오박테리아문(phylum proteobacteria)의 알파, 베타 및 감마 프로테오박테리아강에 널리 분포하고 있다(21, 23). 감마 프로테오박테리아강에 포함되는 *Methylophaga* 속은 다양한 수서 및 육상 환경에서 발견된다(13). *Methylophaga* 속은 염화나트륨에 내성을 지니며 메탄올, 메틸아민의 탄소를 유일한 탄소원과 에너지원으로 사용할 수 있어 질소와 황 그리고 할로젠을 포함하는 탄소순환에 중요한 역할을 한다(2). 탄소동화는 리블로스 인산 경로를 이용하며 메탄은 이용하지 못한다. 다탄소 복합물인 과당은 생장기질로 이용할 수 있다. 이들의 G+C 함유율은 43-49%이다(24). *Methylophaga* 속은 모두 11종이 발견되었다. 지금까지 6 종(*M. alcalica*, *M. marina*, *M. murata*, *M. natronica*, *M. sulfidovorans*, *M. thalassica*)에 대한 연구가 보고되었다(7, 8, 9, 14, 29).

목포 해안에서 분리된 *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1 (KCTC 10323 BP)는 메탄올, 메틸아민, 디메틸설피드를 이용하여 생장할 수 있으나 메탄은 이용하지 못하며 젓당과 포도당과 같은 다탄소 복합물도 생장기질로 이용할 수 있다(16). 메틸아민을 이용하는 대부분의 세균이 메틸아민 및 다이메틸아민

(dimethylamine, DMA)만을 분해할 수 있는 반면 이 균주는 트리메틸아민(trimethylamine, TMA)도 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있다(5). TMA는 해양어류에 존재하는 베타인(betaine) 또는 TMA N-oxide와 콜린을 분해하는 미생물의 활동에 의해 발생되며 생선이 부패될 때 발생하는 악취의 원인이 되는 물질이다(4, 19, 26). TMA는 난분해성으로 DNA, RNA, 단백질과 같은 거대분자의 합성을 억제하는 독성을 지닌다(11). *Paracoccus*와 *Methylophaga*는 호기적 상태에서 TMA를 대사할 수 있으나, *Paracoccus* 속의 한 종은 호기적 상태와 혐기적 상태 모두에서 TMA 산화효소와 TMA 탈수소효소를 이용하여 TMA를 대사분해 할 수 있다는 사실이 보고되었다(15).

M. aminosulfidovorans SK1에 대해서는 지금까지 메탄올 산화 과정에 대한 연구가 주로 진행되었다. 메탄올탈수소효소(methanol dehydrogenase, MDH)의 촉매로 일어나는 메탄올 산화를 메탄올을 산화하여 포름알데히드를 생성한다. 포름알데히드는 메탄올산화세균의 물질대사에서 이화와 동화작용의 중간산물로 작용한다(25). 최근에는 *M. aminosulfidovorans* SK1에서 포유류의 플라빈 함유 단일산화효소(flavin-containing monooxygenases, FMO)와 유사한 세균성 플라빈함유 단일산화효소(bacterial flavin-containing monooxygenases, bFMO)가 발견되었다(5). 포유류의 FMO는 NADPH-의존성 경로를 통해 지용성의 난분해성물질을 산화하여 친수성의 대사산물로 전환한다(27, 28). 이 산화과정을 통하여 독성물질의 제거가 촉진된다. 포유동물에서와는 다르게 식물에서 발견된 여러 종류의 FMO는 식물호르몬인 옥신의 전구체인 트립토판 산화를 촉매한다(27). *M. aminosulfidovorans* SK1으로부터

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 062-230-7370, Fax: 062-232-8122
E-mail: ehcho@chosun.ac.kr

분리한 bFMO의 유전자는 진핵생물의 FMO 유전자군에 뚜렷하게 보존된 서열을 지니며 진핵생물에서처럼 TMA와 티오우레아(thiourea) 산화활성을 지닌다(5).

본 연구는 *M. aminosulfidovorans* SK1이 난분해성 물질인 TMA를 산화하는 과정에서 bFMO가 어떤 역할을 하는지 규명하고자 수행되었다. 앞의 연구에서 *M. aminosulfidovorans* SK1의 *bfmo* 유전자를 대장균에 형질전환하였을 때 그 유전자 산물이 TMA를 산화하는 활성을 높인다는 사실이 밝혀졌다(5). 본 연구에서는 먼저 *M. aminosulfidovorans* SK1 유전체에서 *bfmo* 유전자의 상단부와 하단부 염기서열을 결정한 다음, 이 부분의 유전자가 실제로 발현되는지 확인하고 상단부에 인접해 존재하는 잠재적 조절유전자와 하단부에서 *bfmo* 유전자와 공동으로 전사되는 유전자를 확인하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

실험에 사용된 균주인 *M. aminosulfidovorans* SK1(KCTC 10323 BP)은 3%(w/v)의 NaCl이 포함된 기본무기배지(standard mineral base medium, SMM)에 탄소원 및 에너지를 첨가한 다음 호기적인 상태에서 30°C로 배양하였다(16). 탄소 및 에너지 원으로는 최종농도 1%(v/v)의 메탄올(Merck), 또는 0.03%(v/v)의 TMA를 사용하였다. 필요한 경우 0.03%(v/v) TMA에 효모추출물(yeast extract, BBL)을 최종농도 0.5%(v/v)가 되도록 첨가하였다. TMA는 휘발성이 강하므로 12시간마다 최종농도가 0.03%(v/v)가 되도록 재투여 하였다.

플라스미드, 형질전환 된 세균의 배양

클로닝 벡터로는 pGEM[®]-T Easy Vector(Promega)와 pET28a(+)(Novagen) 플라스미드를 이용하였다. 재조합된 플라스미드는 *E. coli* DH5 α 균주 또는 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에 형질전환하였다. 대장균의 배양에는 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하였다. 항생제는 필요에 따라 암피실린(최종농도 100 mg/ml) 또는 카나마이신(최종농도 50 mg/ml)을 첨가하였다.

M. aminosulfidovorans SK1의 *bfmo* 오픈 클로닝

M. aminosulfidovorans SK1의 *bfmo* 유전자 상단부 및 하단부 DNA 절편은 PCR을 이용하여 클로닝하였다. 염기서열을 알고 있는 *bfmo* 유전자서열에서 제한효소자리를 분석한 후, 제한효소자리를 기준으로 양쪽 방향을 향하는 올리고뉴클레오티드를 합성하였다. *M. aminosulfidovorans* SK1의 염색체 DNA를 적절한 제한효소로 자른 후 DNA 조각의 양 말단을 연결시켜 원형 DNA를 만들어 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 이때 서열을 알고 있는 부위의 제한효소자리를 기준으로 양쪽 방향을 향하는 올리고뉴클레오티드 2개를 프라이머로 사용하여, 특이적 산물이 충분히 생성되는 조건의 잡종 DNA 형성 온도를 결정하였다(Fig. 1).

PCR 산물을 정제하여 pGEM[®]-T Easy 벡터에 재조합시킨 후

재조합된 플라스미드는 *E. coli* DH5 α 균주에 형질전환하였다. 형질전환된 세균은 암피실린이 포함된 LB 고체배지에서 선별한 다음, 플라스미드를 정제하여 염기서열을 결정하였다. 매번 3개의 클론을 독립적으로 선별하여 각각의 염기서열을 결정함으로써 PCR을 이용한 클로닝 과정에서의 오류를 최소화 하였다. 염기서열은 한국기초과학지원연구원(광주분원)에 의뢰하여 결정하였으며 염기서열은 GenBank에 등록하였다(GenBank accession number AY772018).

DNA 염기서열 및 단백질의 아미노산서열 분석

재조합플라스미드를 이용하여 DNA 염기서열이 결정되면 EnCyclon[®](www.encyclon.net)의 ORFinder를 이용하여 ORF를 찾은 후 염기서열을 아미노산서열로 번역하였다. 번역된 아미노산 서열은 Basic Local Alignment Search Tool (PHI- and PSI-BLAST, 1) 데이터베이스를 이용하여 유사한 단백질 서열을 조사하였으며 다른 생물과의 유연관계를 분석하였다. DNA 염기서열과 단백질의 아미노산서열 다중정렬(multiple alignment)에는 European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI, www.ebi.ac.uk) 웹사이트에서 제공하는 공개 소프트웨어인 CLUSTAL W(22)를 이용하였다.

RT-PCR

M. aminosulfidovorans SK1의 RNA를 추출하기 위해 메탄올-배지에서 30°C에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 200 ml 배양액에서 5 ml를 원심분리(14,000 rpm, 4°C, 1분)하여 *M. aminosulfidovorans* SK1을 회수하였다. 총 RNA는 Invitrogen의 trizol reagent 방법으로 정제하였다. cDNA합성을 위해 각각의 유전자 서열 중 적절한 부위에 28mer 정도 길이의 상보적인 서열을 지닌 역방향프라이머를 작성하였다. cDNA 합성은 Bioneer사의 AccuPower RT PreMix를 사용하였으며 제조사의 실험방법을 따랐다. 합성된 cDNA와 정방향 및 역방향프라이머를 PCR preMix 튜브에 20 pmole을 투여한 후 멸균된 증류수로 최종부피를 20 μ l로 맞추었다. PCR 반응시 정방향 프라이머와 주형 DNA와의 혼성온도를 적절하게 조절하여 수행하였다. PCR 산물은 1.8% 아가로스 젤전기영동으로 확인하였다.

결 과

M. aminosulfidovorans SK1의 *bfmo* 오픈 클로닝

M. aminosulfidovorans SK1의 *bfmo* 유전자 상단부 및 하단부 서열은 Fig. 1과 같은 방법으로 클로닝하였으며 이 때 사용한 프라이머 및 증폭된 DNA 산물의 크기는 Table 1에 나타내었다. 유전체 DNA를 분리하여 *Eco*RI로 절단한 다음 양 끝을 이어 만든 원형 DNA를 주형으로, 서로 반대방향을 향하는 B-FMO와 A-FMO를 프라이머로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 그 결과 1,409bp 길이의 *bfmo* 유전자 상단부 DNA 절편이 증폭되었다(Fig. 2A, Fig. 3A). 또한 *Sph*I를 이용하여 만든 원형 DNA와 I-FMO와 J-FMO를 프라이머로 PCR 증폭 반응을 시킨 결과

Table 1. Nucleotide sequences of primer sets used for cloning.

Oligo-nucleotids	Direction	Sequences	PCR products ¹⁾
E-FMO	forward	5'-GCAGGATCAATGGTACAGC-3'	ME
M-FMO	reverse	5'-GGTTGTCACCTTTCATGGTC-3'	
B-FMO	forward	5'-GAAAAAGCCGGCGTCAGAAA-3'	AB
A-FMO	reverse	5'-CCGGAATACCCGTAATGGTT-3'	
J-FMO	forward	5'-CCGTGACCACTCATACCGTTCACCTGATG-3'	IJ
I-FMO	reverse	5'-CACCTGGTAGGTGTACATTTCTTCAGC-3'	

¹⁾Each product was depicted in Figure 3.

1,907bp 길이의 하단부 DNA 절편을 얻을 수 있었다(Fig. 2B, Fig. 3A).

위의 과정에서 증폭된 DNA 절편의 염기서열을 결정한 다음 *EcoRI* 절편 내에 존재하는 제한효소 *SalI* 인식자리를 이용하여 만든 원형 DNA 주형과 M-FMO 및 E-FMO 프라이머로 PCR 반응을 하여 3,201bp 길이의 DNA 절편을 증폭하였다(Fig. 2C, Fig. 3B).

PCR에 의해 증폭된 DNA 절편은 정제하여 각각 pGEM[®]-T Easy 벡터에 클로닝하였으며, 이를 *E. coli* DH5 α 균주에 형질전환시킨 후 원하는 클론을 선별하였다. E-FMO와 M-FMO 프라이머에 의해 증폭된 DNA 절편이 포함된 플라스미드를 pME, B-FMO와 A-FMO 프라이머에 의해 증폭된 DNA 절편이 포함된 플라스미드를 pAB, J-FMO와 I-FMO 프라이머에 의해 증폭된 DNA 절편이 포함된 플라스미드를 pIJ로 명명하였다. *M. aminosulfidovorans* SK1 유전자 절편이 클로닝 되어 있는 재조합 플라스미드(pME, pAB, pIJ)를 정제하여 *bfmo* 유전자를 포함하여 총 8,120bp의 염기서열을 결정하였다.

M. aminosulfidovorans SK1 *bfmo* 오페론의 ORF 분석

재조합플라스미드(pME, pAB, pIJ)에서 염기서열을 결정한 후, EnCyclon[®](www.encyclon.net)의 ORFinder를 이용하여 *M. aminosulfidovorans* SK1 *bfmo* 유전자의 상단부 및 하단부 ORF를 분석하였다. pAB와 pME에 재조합된 DNA의 염기서열을 결정하여 조합한 결과 *bfmo* 유전자 상단부에 네 개의 ORF가 존재함을 확인 할 수 있었다. 하단부에 위치하는 유전자는 pIJ에 재조합된 DNA의 염기서열을 결정하여 세 개의 ORF를 확인하였다. 따라서 염기서열이 결정된 DNA는 *bfmo* 유전자를 포함하여 모두 8,120bp이며 8개의 ORF로 이루어져 있음을 알 수 있었다. 상단부 ORF는 *bfmo*에 가까이 위치한 유전자부터 차례로 *ua*, *ub*, *uc*, *ud*로 명명하였으며 하단부 ORF는 *da*, *db*, *dc*라고 명명하였다. *uc*, *ub*, *ua*, *bfmo*, *da*, *db* 유전자는 모두 같은 방향으로 암호화되어 있으며, 양끝에 위치하는 *ud*와 *dc*유전자는 이들과 역 방향으로 암호화되어 있다.

ua 유전자에 의해 발현되는 단백질은 259개의 아미노산으로 구성되어 있으며 *Methanosarcina mazei* Go1의 메틸기 수용 화

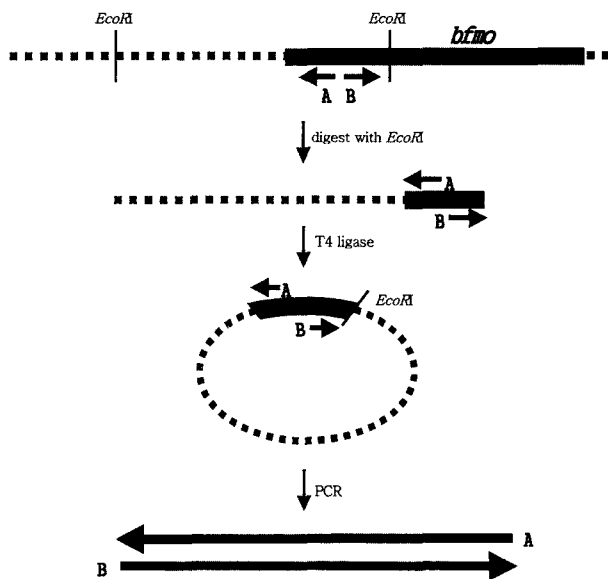


Fig. 1. Cloning strategy. Solid lines indicate regions of known sequences and dotted lines indicate unknown sequences. The arrows designated as A and B represent primers used for PCR amplification.

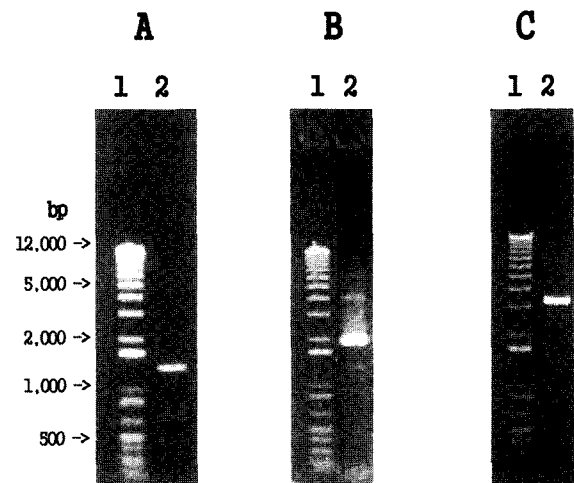


Fig. 2. Agarose gel(1.8%) electrophoresis of PCR products. (A) lane 1, 1 kbp DNA plus Ladder(Invitrogen); lane 2, PCR products of circularized *EcoRI* fragments by A-FMO and B-FMO primers. (B) lane 1, 1 kbp DNA plus Ladder(Invitrogen); lane 2, PCR products of circularized *SphI* fragments by I-FMO and J-FMO primers. (C) lane 1, 1 kbp DNA plus Ladder(Invitrogen); lane 2, PCR product of circularized *SalI* fragments by M-FMO and E-FMO primers.

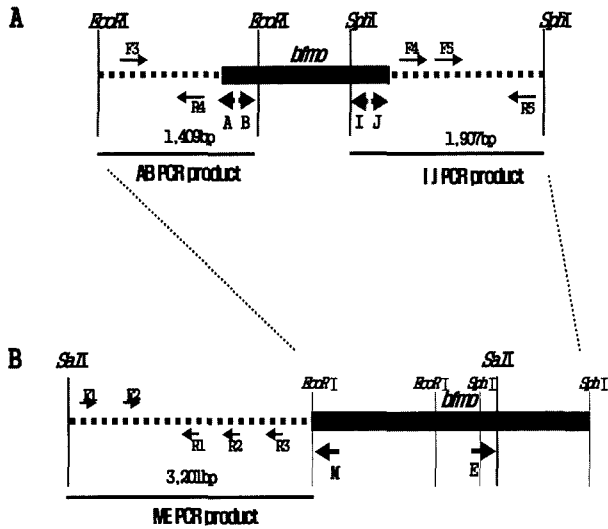


Fig. 3. Restriction enzyme sites and oligonucleotides used for cloning and sequencing. (A) The first step for cloning upstream and downstream regions of the *bfmo* gene in *M. aminosulfidovorans* SK1. Genomic DNA of *M. aminosulfidovorans* SK1 was digested with *EcoRI* or *SphI*. Each restriction fragment was circularized by T4 DNA ligase. DNA fragments upstream to the *bfmo* gene were amplified by PCR using a primer sets, A and B. *EcoRI* treated DNA as templates. Downstream region was amplified by PCR using I and J as primers and *SphI* treated DNA as templates. (B) The second step for cloning of the upstream region of the sequences identified from step (A). Genomic DNA was treated *SalI* and T4 DNA ligase. PCR amplification was performed using primer sets, M and E. Solid lines represent sequences regions and dotted lines represent unknown sequences. Oligonucleotides represented by thick arrows(A, B, I, J, M, E) are used for PCR amplification and thin arrows(F1 to F5 and R1 to R5) indicated oligonucleotides used for sequencing.

학구성 단백질(methyl-accepting chemotaxis protein)의 일부와 34%의 일치도를 보이나 단백질 전체의 유사도는 높지 않은 것으로 나타났다. *ua* 유전자의 상단부에 위치하는 *ub* 및 *uc* 유전자에 의해 발현되는 단백질은 *E. coli* K12에서 질산 및 아질산 농도를 감지하는 2-인자 시스템(two component system)과 유사하였다. *ud* 유전자는 역방향으로 암호화되어 있으며, 아미노말단에서부터 683개의 아미노산이 확인되었으며 종결코돈은 서열이 결정된 부분에서 확인되지 않았다. *bfmo* 유전자의 하단부에 위치하는 *da* 및 *db* 유전자는 각각 115 및 164개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 암호화하였다. 이들 두개의 유전자가 암호화하는 작은 단백질은 아직 기능은 밝혀지지 않았으나 세균계에 잘 보존된 단백질의 일종으로 나타났다. *dc* 유전자는 *bfmo* 유전자와 반대방향으로 암호화되어 있으며, 206개의 아미노산으로 구성된 단백질을 암호화하였다.

RT-PCR을 이용한 *M. aminosulfidovorans* SK1 *bfmo* 오픈론의 구조 분석

RT-PCR의 역방향 프라이머로 이용할 올리고뉴클레오티드는

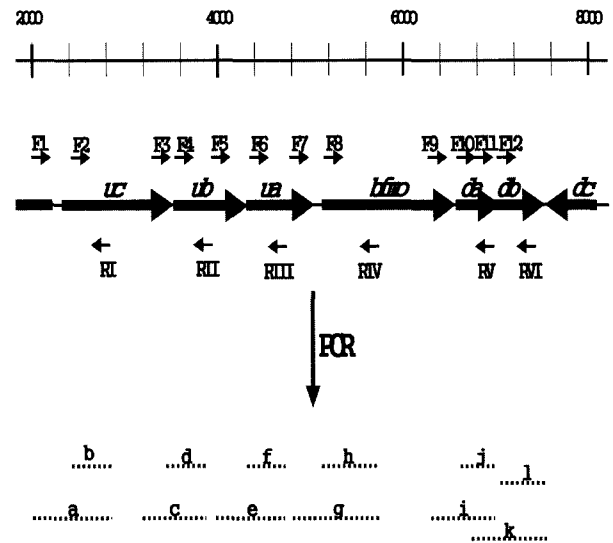


Fig. 4. Oligonucleotides used for reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). Dotted lines represent predicted RT-PCR products. Oligonucleotides were shown by arrows; forward primers were from F1 to F12 and reverse primers was from R1 to R6.

각각의 ORF 개시코돈에서 하단부 방향으로 약 300-400bp 떨어진 위치에서 28mer의 길이로 합성하였다. 역방향 프라이머의 위치가 정해지면 유전자와 유전자 사이를 PCR하기 위해 역방향 프라이머가 위치하는 유전자의 상단부 유전자를 정방향 프라이머를 위한 올리고뉴클레오티드의 주형으로 이용하였다. 증폭될 DNA 절편의 길이가 약 700bp 정도 되도록 유전자의 3'말단부위에서 정하였다. 유전자내를 PCR하기 위해 역방향프라이머가 위치하는 유전자의 개시코돈 부근에서, 증폭될 DNA 절편의 길이가 300bp 정도 되도록 정방향 프라이머의 위치를 정하였다(Fig. 4).

M. aminosulfidovorans SK1에서 분리한 총 RNA를 주형으로 cDNA를 합성한 후 이 cDNA를 주형으로 PCR 반응을 수행하여 *M. aminosulfidovorans* SK1에서 발현되는 RNA를 증폭하였다. PCR 반응에 의해 증폭된 DNA는 아가로스 젤 전기영동으로 확인하였다. 이 세균의 유전체 DNA를 양성대조군으로 사용하였으며, 이 경우 PCR 반응 결과 모든 유전자내와 유전자간에서 예측된 크기의 DNA 밴드가 나타났다(Fig. 5). *M. aminosulfidovorans* SK1에서 전사된 RNA를 주형으로 각 ORF의 유전자의 내부를 PCR 반응 시킨 결과 모두 예측된 크기의 DNA 밴드가 나타났다. 유전자와 유전자 사이를 증폭한 반응에서는 *uc*와 *ub* 사이, *fmo*와 *da* 사이, *da*와 *db* 사이에서 예측된 크기의 DNA 절편이 증폭되었다(Fig. 5). 이와 같은 RT-PCR의 결과로 *uc* 유전자와 *ub* 유전자는 동일한 전사단위로 구성되고, *ua* 유전자는 독립적으로 전사되는 것을 확인하였다. 또한 *bfmo* 유전자는 하단부에 위치하는 두 개의 유전자(*da*와 *db*)와 함께 동일한 오픈론으로 전사됨을 알 수 있었다. 유전자내와 유전자간에서 RT-PCR에 의한 DNA 절편이 증폭된 것으로 보아 *M. aminosulfidovorans* SK1의 *bfmo*를 포함한 여덟 개의 ORF가 모두 기능을 지닌 단백질을 암

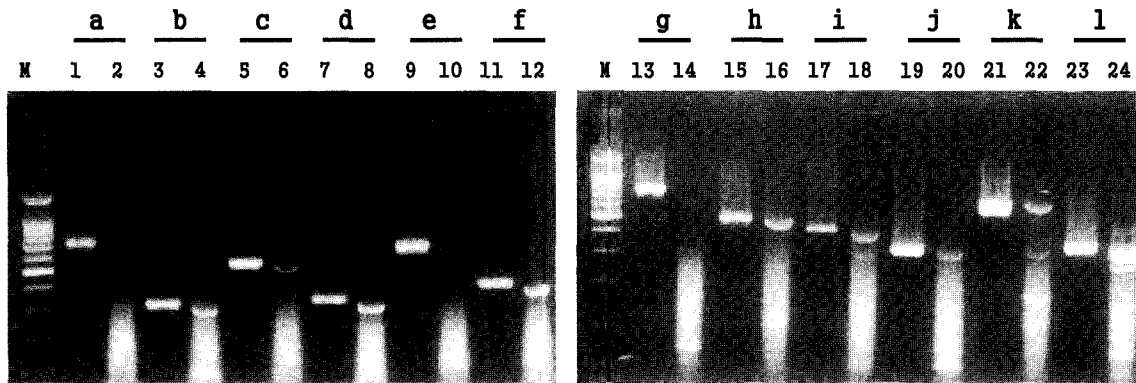


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. Odd numbered lanes contain PCR fragments amplified from genomic DNA and even numbered lanes showed RT-PCR products. Lane M is 100bp DNA Ladder (Promega).

호화하고 있는 것으로 판단된다.

고찰

M. aminosulfidovorans SK1의 유전체에서 *bfmo* 유전자의 상단부 및 하단부에 존재하는 유전자 염기서열을 분석한 결과 *bfmo*와 동일한 방향으로 전사되는 여섯 개의 ORF가 세 개의 전사단위로 발현됨을 확인하였다(Fig. 6). 이들 ORF가 각기 고유한 전사단위를 이루며 mRNA로 전사되는 것은 이들 유전자가 *M. aminosulfidovorans* SK1에서 기능적인 유전자임을 보여준다.

이 가운데 같은 전사 단위를 이루는 *uc*와 *ub*는 각기 *E. coli*에서 2-인자 질산/아질산 인지 단백질군의 *narQ* 및 *narL*과 유사하였다. *E. coli*에서 NarQ는 막통과단백질로 세포막 밖에 존재하는 아미노산 영역이 외부의 자극을 감지하면, 세포질 내부에 존재하는 히스티딘 단백질 인산화효소 영역이 자가인산화된다(12, 17). 이렇게 활성화된 NarQ는 세포질에 존재하는 NarL의 아미노말단 영역에 인산기를 전달한다. 인산화된 NarL 단백질은 구조가 변하면서 DNA 서열에 결합함으로써 유전자 발현을 조절하게 된다(10, 17, 18, 20). *M. aminosulfidovorans* SK1의 UC는 NarQ의 외부 자극을 감지하는 영역 및 막통과부위에 해당되는 아미노말

단의 105개 아미노산은 존재하지 않으나, 세포질에 존재하는 히스티딘 단백질 인산화효소 영역은 대장균의 NarQ와 유사하였다. UB는 대장균의 NarL과 같이 인산화되는 아미노말단 조절영역과 Helix-Turn-Helix 모티프를 지니는 DNA 결합 영역으로 구성되어 있다. 따라서 외부의 자극을 인지하는 다른 단백질이 존재하여 자극인지 막단백질에 의해 UC의 히스티딘 단백질 인산화효소 활성이 조절될것으로 추측된다. UC 히스티딘 단백질 인산화효소가 UB의 아미노말단 영역에 인산기를 전달해주면, 인산화된 UB가 H-T-H 모티프를 이용하여 DNA에 결합함으로써 관련 유전자 발현을 조절하는 것으로 생각된다. *ua* 유전자는 *ub*와 *uc* 유전자와 독립된 전사단위를 이루나 *E. coli*에서 인지형 단백질(sensor-type protein)의 메틸기 수용영역과 유사한 것으로 미루어 UA 또한 UB, UC와 함께 세포의 신호전달과정에 관여할 것으로 생각된다.

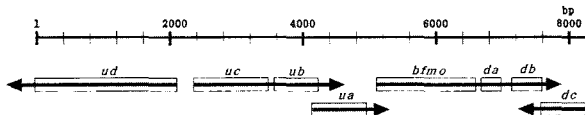
M. aminosulfidovorans SK1에서 *bfmo* 유전자 하단부에 위치하는 유전자인 *da* 및 *db*유전자는 *bfmo*와 함께 하나의 전사단위를 이룬다. DA는 세균에서 유래하여 사람을 포함한 진핵생물계에도 널리 존재하는 금속 이온의 수용부위인 cupin superfamily에 속하며, DB는 기능은 밝혀지지 않았으나 세균계에 잘 보존된 단백질의 하나로 나타났다. DA와 DB는 정확한 기능은 알 수 없으나 bFMO와 같은 전사단위로 발현되며 *M. aminosulfidovorans* SK1의 bFMO와 유연관계가 높은 단백질을 지니는 *Mesorhizobium loti* 및 *Sinorhizobium meliloti*에서도 유사한 단백질이 존재하는 것으로 보아 bFMO와 함께 생체이물질의 산화에 관여할 가능성을 추측해 볼 수 있다.

감사의 말

이 연구는 2002학년도 조선대학교 교내학술연구구성비의 지원으로 연구되었음.

참고문헌

1. Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang,



ORF no	Start	End	Direction	Size	Predicted functions
ud	4132	-	L	-	Metabolism (carbamoyltransferase)
uc	2311	3123	R	813	Sugar transduction (histidine protein kinase)
ub	3527	1201	R	227	Gene regulation (DNA binding protein)
ua	1224	1983	R	760	Sugar transduction (Methyl-accepting protein)
bfmo	5136	6526	R	1391	Metabolism (flavin reductase monooxygenase bFMO)
da	6931	6961	R	31	Unknown
db	6937	7431	L	495	Unknown
dc	7139	8092	R	953	Metabolism (phthalate aminotransferase)

¹ Number of amino acid residues

Fig. 6. Predicted functions of upstream and downstream ORFs to the *bfmo* gene in *M. aminosulfidovorans* SK1 identified in this study.

- W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
2. Anthony, C. 1982. The Biochemistry of methylotrophs. Academic press, New York.
 3. Baikalov, I., I. Schroder, M. Kaczor-Grzeskowiak, K. Grzeskowiak, R.P. Gunsalus and R.E. Dickerson. 1996. Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry.* 35, 11053-1161.
 4. Barrett, E.L. and H.S. Kwan. 1985. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu Rev Microbiol.* 39, 131-149.
 5. Choi, H.S., J.K. Kim, E.H. Cho, Y.C. Kim, J.I. Kim, and S.W. Kim. 2003. A novel flavin-containing monooxygenase from *Methylophaga sp* strain SK1 and its indigo synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res. Commun.* 306(4), 930-936.
 6. Dahl, J.S., Mehta, R.J. and Hoare, D.S. 1972. New obligate methylotroph. *J. Bacteriol.* 109(2), 916-921.
 7. Doronina, N.V., T.D. Darmaeva, and Y.A. Trotsenko. 2003. *Methylophaga alcalica sp. nov.*, a novel alkaliphilic and moderately halophilic, obligately methylotrophic bacterium from the East Mongolian saline soda lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 223-229.
 8. Doronina, N.V., T.D. Darmaeva, and Y.A. Trotsenko. 2003. *Methylophaga natronica sp. nov.*, a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylotrophic bacterium from Soda Lake of the Southern Transbaikalian Region. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 382-389.
 9. Doronina, N.V., T.D. Li, E.G. Ivanova, O.V. Rodionova, and Y.A. Trotsenko. 2004. *Methylophaga murata sp. nov.* - haloalkalotolerant aerobic methylotroph from destroyed marble. Unpublished (as of 20 August 2004)
 10. Eldridge, A.M., H.S. Kang, E. Johnson, R. Gunsalus, F.W. Dahlquist, 2002. Effect of phosphorylation on the interdomain interaction of the response regulator, NarL. *Biochemistry.* 41, 15173-15180.
 11. Guest, I. and D.R. Varma, 1992. Teratogenic and macromolecular synthesis inhibitory effects of trimethylamine on mouse embryos in culture. *J. Toxicol Environ Health.* 36, 27-41.
 12. Härtig, E., U. Schiek, K.U. Vollack, and W.G. Zumft, 1999. Nitrate and nitrite control of respiratory nitrate reduction in denitrifying *Pseudomonas stutzeri* by a two-component regulatory system homologous to NarXL of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 3658-65.
 13. Janvier, M. and P.A.D. Grimont, 1995. The genus *Methylophaga*, a new line of descent within phylogenetic branch γ of Proteobacteria. *Microbiol Paris.* 146, 543-550.
 14. Janvier, M., C. Frehel, F. Grimont, and F. Gasser, 1985. *Methylophaga marina gen. nov., sp. nov.* and *Methylophaga thalassica sp. nov.*, marine methylotrophs. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35, 131-139.
 15. Kim, S.G., H.S. Bae, and S.T. Lee, 2001. A novel denitrifying bacterial isolate that degrades trimethylamine both aerobically and anaerobically via two different pathways. *Arch Microbiol.* 176, 271-277.
 16. Koh, M., C.S. Kim, Y.A. Kim, H.S. Choi, E.H. Cho, E. Kim, Y.M. Kim and S.W. Kim, 2002. Properties of electron carriers in the process of methanol oxidation in a new restricted facultative marine methylotrophic bacterium, *Methylophaga sp.* MP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 476-482.
 17. Lee, A.I., A. Delgado, and R.P. Gunsalus, 1999. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *J. Bacteriol.* 181, 5309-5316.
 18. Maris, A.E., M.R. Sawaya, M. Kaczor-Grzeskowiak, M.R. Jarvis, S.M. Bearson, M.L. Kopka, I. Schroder, R.P. Gunsalus, and R.E. Dickerson, 2002. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator. *Nat. Struct. Biol.* 9, 771-8.
 19. Moune, S., N. Manac'h, A. Hirschler, P. Caumette, J.C. Willison, and R. Matheron, 1999. *Haloanaerobacter salinarum sp. nov.*, a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 Pt 1, 103-112.
 20. Schroder, I., R. Cavicchioli, and R.P. Gunsalus, 1994. Phosphorylation and dephosphorylation of the NarQ, NarX, and NarL proteins of the nitrate-dependent two-component regulatory system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176, 4985-92.
 21. Stackebrandt, E., R.G.E. Murray, and H.G. Trtiper, 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38, 321-325.
 22. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
 23. Tsuji, K., H.C. Tsien, R.S. Hanson, S.R. DePalma, R. Sehoitz, and S. LaRoche, 1990. 16S ribosomal RNA sequence analysis for determination of phylogenetic relationship among methylotrophs. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1-10.
 24. Urakami, T. and K. Komagata, 1987. Characterization of species of marine methylotrophs of the genus *Methylophaga*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 402-406.
 25. Vedenina, I. and N.I. Govorukhina, 1988. Formation of a methylotrophic denitrifying biocenosis in a system of sewage treatment for nitrates. *Mikrobiologia.* 57, 320-328.
 26. Yancey, P.H., W.R. Blake, and J. Conley, 2002. Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133, 667-76.
 27. Zhao, Y., S.K. Christensen, C. Fankhauser, J.R. Cashman, J.D. Cohen, D. Weigel, and J. Chory, 2001. A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science.* 291, 306-309.
 28. Ziegler, D.M. 1988. Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab. Rev.* 19, 1-32.
 29. de Zwart, J.M.M., P.N. Nelisse, and J.G. Kuenen, 1996. Isolation and characterization of *Methylophaga sulfidovorans sp. nov.*: an obligately methylotrophic, aerobic, dimethylsulfide oxidizing bacterium from microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20, 261-270.

(Received January 12, 2005/Accepted February 22, 2005)

ABSTRACT: Cloning and Structural Analysis of *bfmt* Operon in *Methylophaga aminosulfidovorans* SK1

Hyun Sook Lim¹, Jae Whan Goo², Lee Hyun Kim¹, Si Wouk Kim² and Eun Hee Cho*
(Department of Biology Education, ¹Graduate School of Education, ²Department of Environmental engineering, Chosun University, Gwangju, 501-759, Korea)

Methylophaga aminosulfidovorans SK1 (KCTC 10323 BP) can utilize trimethylamine as a sole carbon, nitrogen, and energy source. The bacterial flavin-containing monooxygenase (bFMO) gene was identified in the strain and the recombinant enzyme expressed in *E. coli* oxidized trimethylamine. To study the function and regulation of the *bfmt*, over 8,000 nucleotide sequences of the neighboring regions including the *bfmt* were determined. Three open reading frames preceding to the *bfmt* gene encoded analogues to highly conserved nitrate/nitrite sensing two-component system regulators and a methyl accepting protein. Two small open reading frames just downstream of the *bfmt* gene showed no similar proteins of known functions but the sequences were conserved among other bacteria. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis showed that the six putative genes consisted of three transcription units. The three regulatory genes located upstream of the *bfmt* gene formed two separate transcription units. The *bfmt* and the two downstream genes were transcribed from a single promoter.