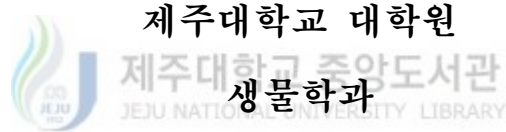


박사학위논문

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* S1에서
Catalase Gene Cluster의
분자생물학적 특성분석



이 동 현

2002년 12월

광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* S1에서
Catalase Gene Cluster의
분자생물학적 특성분석

지도교수 오 덕 철

이 동 헌

이 논문을 이학박사학위 논문으로 제출함

2002년 12월



이동헌의 이학 박사학위 논문을 인준함.

심사위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

제주대학교 대학원

2002년 12월

Molecular Biological Characterization of a
Catalase Gene Cluster from the Photosynthetic
Bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1

Dong-Heon Lee

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)

A DISSERTATION SUBMITTED IN PARTIAL
FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE
DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

DEPARTMENT OF BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

December, 2002

Abstract

This study was focused on molecular biological characterization of catalases expressed and produced in *Rhodospirillum rubrum* S1. PCR process using a degenerate primer set designed on the basis of the conserved sequences of known amino acid sequences of catalases from bacterial strains resulted in the production of 245 bp DNA fragment. Southern hybridization using the total genomic DNAs with the catalase DNA fragment demonstrated that at least two signal intensities were observed in *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III fragments. Each fragment showing the signal intensity was recovered from the gel and ligated into the cloning vector, pBluescript SK(+), and transformed into *E. coli* UM255. A transformant clone containing a catalase gene cluster which is 7.4 Kbp in molecular size was found. Sequence analysis of the catalase gene cluster revealed four complete ORFs encoding proteins similar to putative glucokinase, putative restriction endonuclease, putative methyltransferase, catalase, and two truncated ORFs encoding proteins similar to trehalose-6-phosphate synthase and AraC family of bacterial transcriptional regulators. It was organized into putative trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, and probable AraC-type transcriptional regulator in the order.

The putative trehalose-6-phosphate synthase cloned in this study was a gene fragment of the *otsA* encoding the enzyme found in other bacteria, and shared 47.8% similarity in deduced amino acid sequences with that of *Salmonella typhirium*.

The putative glucokinase was located immediately downstream of the putative trehalose-6-phosphate synthase, and one open reading

frame which consists of 978 bp encoding 326 amino acids. The molecular weight of the enzyme was 33,865 Da, and isoelectric point was 7.18. Comparative analysis of amino acid sequences revealed that the glucokinase from *R. rubrum* S1 shared 50% similarity with those found in *Helicobacteria pylori* J99. N-terminal region of putative glucokinase containing a potential ATP binding site.

The putative restriction endonuclease was located downstream and in opposite direction of the putative glucokinase, and one open reading frame which consists of 1284 bp encoding 428 amino acids. The molecular weight of the enzyme was 45,987 Da, and isoelectric point was 6.395. The putative methyltransferase was also one open reading frame which consists of 1836 bp encoding 611 amino acids. The molecular weight of the enzyme was 64,003 Da, and isoelectric point was 9.329. Comparative analysis of amino acid sequences revealed that the restriction endonuclease and methyltransferase from strain S1 shared 50% and 52% similarity with those found in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and 49% and 54% similarity with those found in *Rhizobium leguminosarum*, respectively.

Analysis of upstream sequence of methyltransferase revealed an intergenic space consisting of 326bp. The putative catalase was located immediately close to the intergenic space and in opposite direction of the putative methyltransferase, and one open reading frame which consists of 1455 bp encoding 485 amino acids. The molecular weight of the enzyme was 54,316 Da, and isoelectric point was 6.468. Catalase cloned from *R. rubrum* S1 in this study shared 85% and 84% similarity in deduced amino acid sequences with those found in *Brucella melitensis* and *Sinorhizobium meliloti*. The active-site residues, proximal and distal heme-binding ligands, and NADPH-binding residues of the bovine liver catalase were highly

conserved in *R. rubrum* catalase.

The putative transcriptional regulator was located 59 bp downstream and in opposite direction of the putative catalase, and a DNA fragment of the enzyme which consists of only 426 bp. Alignment analysis of the 142 amino acid sequences revealed that it shared 49.3% similarity with those found in *Pseudomonas aeruginosa*. The deduced amino acid sequences of transcriptional regulator resembles C-terminal region containing a potential helix-turn-helix DNA-binding domain a group of the AraC family transcriptional regulator found in bacteria.

The catalase from *R. rubrum* S1 was overproduced in *E. coli* UM255 and purified through several protein purification steps for elucidating their characteristics in protein level. The purified catalase had an estimated molecular mass of 189kDa, consisting of three or four subunits of 61 kDa. It exhibited 74% activity in the presence of 3-amino-1,2,4-triazole and 80% activity in the presence of organic solvents, while its activity significantly decreased by salicylic acid. The enzyme had a broad pH optimum and was inhibited by cyanide, azide, hydroxylamine. K_m value and V_{max} of the catalase for H_2O_2 were 110 mM and 50000 U/mg. The ratio of A_{406} to A_{280} for the catalase was 0.97, and reduction of the enzyme by addition of dithionite was not observed. Spectroscopic analysis indicated the presence of ferric heme. The results obtained suggest that this catalase belongs to one of typical monofunctional catalases.

In conclusion, the catalase gene cluster was first cloned from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1 in this study. Six genes in the gene cluster, trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, and the *AraC*-type transcriptional regulator were completely sequenced

and characterized. Besides, the catalase overexpressed in *E. coli* UM255 was biochemically and physiologically characterized in response to several environmental factors.



Key words : *Rhodospirillum rubrum* S1, Catalase, Catalase gene cloning, Catalase gene cluster,

목 차

Abstract	i
목차	v
List of Tables	viii
List of Figures	ix
약어	xii
1. 서 론	1
1.1. 연구배경	1
1.2. 연구목적	5
2. 광합성세균 <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1에서 catalase gene cluster의 분리 및 특성분석	6
2.1. 서 론	6
2.2. 재료 및 방법	8
2.2.1. 균주 및 시약	8
2.2.2. 균주 배양조건	8
2.2.2.1. <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1의 배양조건	8
2.2.2.2. <i>Escherichia coli</i> 의 배양조건	11
2.2.3. DNA 분리 및 정제	11
2.2.3.1. <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1의 게놈 DNA 분리	11
2.2.3.2. Plasmid의 분리	11
2.2.4. PCR에 의한 catalase 유전자의 증폭	12
2.2.5. DNA 재조합 및 형질전환	12
2.2.5.1. 특정 DNA 절편의 순수 분리	12

2.2.5.2. 재조합 및 형질전환	14
2.2.6. Southern 혼성화 반응	14
2.2.6.1. 탐침 DNA의 분리 및 표지	14
2.2.6.2. Genomic hybridization	15
2.2.7. Catalase 유전자 library 제작	15
2.2.8. 염기서열의 결정 및 분석	16
2.3. 결과 및 고찰	18
2.4. 요약	38
3. <i>E. coli</i> 에서 발현된 Catalase의 생화학적 특성분석	40
3.1. 서론	40
3.2. 재료 및 방법	42
3.2.1. 사용기기 및 시약	42
3.2.2. 균주의 배양조건	42
3.2.3. <i>Escherichia coli</i> 에서 발현된 재조합 catalase 정제	42
3.2.3.1. 세포추출액의 준비	42
3.2.3.2. 황산암모늄 분획	43
3.2.3.3. Phenyl-Sepharose CL-4B 소수성 상호작용 크로마토그래피	43
3.2.3.4. Prep-cell electrophoresis	43
3.2.4. Catalase 활성 염색법	44
3.2.5. 단백질 정량	44
3.2.6. 재조합 효소의 활성화 측정	44
3.2.7. 재조합 효소의 분자량 측정	44
3.2.8. 재조합 효소의 특성조사	45
3.2.8.1. 효소의 활성화에 대한 온도 및 pH의 영향	45

3.2.8.2. 효소의 활성도에 대한 저해제들의 효과	45
3.2.8.3. 효소와 기질의 반응성	46
3.2.8.4. 효소의 분광학적 분석	46
3.3. 결과 및 고찰	47
3.4. 요약	60
4. 종합고찰	61
Appendices	69
Appendix I	70
Appendix II	81
참고문헌	93
적 요	108



List of Tables

Table 2-1. The bacterial strains and plasmids used in this study	9
Table 2-2. PCR and sequencing primers used in this study	10
Table 3-1. Purification of the <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase from <i>Escherichia coli</i> UM255	48
Table 3-2. The effect of chemical inhibitors on catalase activity	55
Table 3-3. The effect of metal inhibitors on catalase activity	56
Table 3-4. Comparison of amino acid compositions of catalases from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 and other organisms	67
Table 3-5. Comparison of the enzymatic properties of <i>Rhodospirillum</i> <i>rubrum</i> S1 catalase with those of eukaryotic catalase and <i>Rhodobacter capsulatus</i> catalase-peroxidase	68

List of Figures

- Fig. 2-1. Oligonucleotides, Cat1F and Cat1R were degenerate primers designed based on the conserved sequences of catalases from other organisms. 13
- Fig. 2-2. Cloning of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase gene into pBluescript SK(+) plasmid vector. 17
- Fig. 2-3. Agarose gel electrophoresis (2%) of the catalase PCR product. 19
- Fig. 2-4. Southern hybridization using total genomic DNA from *Rhodospirillum rubrum* S1. 20
- Fig. 2-5. Expression profiles of the catalase genes from *Rhodospirillum rubrum* S1. 22
- Fig. 2-6. Profiles of restriction fragments of the recombinant plasmid pSCAT02 containing the catalase gene cluster from *Rhodospirillum rubrum* S1. 24
- Fig. 2-7. Restriction enzyme map for the catalase gene cluster from *Rhododspirillum rubrum* S1. 25
- Fig. 2-8. DNA sequencing strategy used for the *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase gene cluster. 26

Fig. 2-9. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences of trehalose-6-phosphate synthase from bacteria.	28
Fig. 2-10. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences of glucokinase from bacteria.	31
Fig. 2-11. Hydropathy profile of amino acid sequence deduced from nucleotide sequence of the catalase from <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1.	34
Fig. 2-12. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences of catalases from bacteria.	35
Fig. 2-13. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences of transcriptional regulator from bacteria.	37
Fig. 3-1. Nondenature polyacrylamide electrophoresis for <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255 by overexpression of the catalase gene in pSCAT025.	49
Fig. 3-2. Determination of the molecular weight of <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255.	51
Fig. 3-3. Effect of pH on the activity of <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255.	52

Fig. 3-4. Effect of temperature on the activity of <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255.	53
Fig. 3-5. Lineweaver-Burk plot of the reaction velocity of <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255	57
Fig. 3-6. Absorption spectra of <i>Rhodospirillum rubrum</i> S1 catalase purified from <i>Escherichia coli</i> UM255	59



약 어

bp	basepair(s)
BSA	bovine serum albumin
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
IPTG	isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside
kb	kilobase pair(s)
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
OD	optical density
ORF	open reading frame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
pI	isoelectric point
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	saline sodium citrate
TE	tris-EDTA
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactoside



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1. 서 론

1.1. 연구배경

지구상의 대기를 이루고 있는 기체들 중 반응성이 매우 큰 산소(O_2)는 전체 대기의 약 21%정도를 차지하고 있으며 호기성 생물은 이렇게 풍부한 산소를 전자수용체로 하는 호기성 호흡을 통해 에너지를 획득한다. 그러나 산소는 생명유지와 생장에 절대적으로 필요하지만 superoxide anion (O_2^-), 과산화수소 (H_2O_2), hydroxyl radical ($HO\cdot$) 등과 같은 활성 산소종(active oxygen species)을 형성하게 되면 생물에 치명적인 독성물질로 작용하는 양면성을 지니고 있다(Halliwell, 1987; Halliwell and Gutteridge, 1989). 이러한 활성 산소종의 생성경로는 정상적인 대사 과정의 일부인 호흡과정 동안에 산소의 불안정한 환원에 기인한 요인, 광합성에서 산소를 생성하게 되는 경우와 같이 세포 내에서 자연적으로 발생하는 내적 요인, 숙주의 식세포(phagocyte)가 감염균을 퇴치하기 위해서 산화성 물질을 생성하는 경우와 같은 생리적 방어 요인(Hasstt and cohen, 1989), 높은 산소분압, 오존(ozone), γ -선, 자외선 등의 노출에 의한 물리적인 요인(Gregorg and Fridovich, 1993), 그리고 paraquat, plumbagin 등의 redox-cycling agent의 첨가에 의한 화학적 요인 등이 있다(Halliwell and Gutteridge, 1989).

활성 산소종들은 반응성이 대단히 크기 때문에 생체의 핵산, 단백질, 지질에 직접적인 손상을 입히거나, DNA의 인산 골격을 끊어 복제를 불가능하게 하며, 염기와 반응하거나 thiol 등을 산화시켜 효소의 기능을 마비시킨다(Demple *et al.*, 1986; Imlay and Linn, 1988). 일반적으로 hydroxyl radical이나 singlet oxygen이 직접적인 손상의 원인인 것으로 알려져 있으며, superoxide radical이나 과산화수소는 생체 내에서 다른 형태의 활성 산소종으로 전환될 수 있어서 간접적으로 작용한다고 알려져 있다 (Sies, 1991; Scandalios, 1992). 이처럼 활성 산소종이 생물의 대사활동에 미치는 영향을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 하며, 생물은 산화제나 이들 전구물질

(pro-oxidant)이 항산화물질(anti-oxidant)보다 과다하게 존재함으로써 발생하는 산화적 스트레스를 극복할 수 있는 다양한 효소적, 비효소적 방어기작을 가지고 있다. 효소적 방어 기작에는 superoxide dismutase, catalase, catalase-peroxidase, peroxidase 등과 glutathione reductase, glutathione peroxidase, ascorbate peroxidase, NAD(P)H-dehydrogenase, thiol transferase 등이 관여하고 있다(Scandalios, 1997).

비효소적 방어기작에는 전자공여체인 ascorbate, glutathione, thioredoxin, vitamin E, carotenoid, α -tocopherol 등이 알려져 있으며, 특히 ascorbate와 glutathione은 항산화 효소들과 복합체를 형성해 활성이 상대적으로 높은 활성 산소들을 낮은 활성 산소종으로 전환시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다(Scandalios, 1997).

산화적 스트레스에 대한 방어에 필요한 단백질과 그것을 암호화하는 유전자들에 관한 연구는 동·식물에서보다는 세균에서 많은 연구가 진행되어 왔으며, 특히 *Escheichia coli*와 *Salmonella typhimurium*에서 이에 대한 방어 기작이 많이 규명되었다(Farr and Kogoma, 1991; Tartaglia *et al.*, 1991).

그 첫 번째 기작이 산화적 손상을 사전에 예방하는 것인데, *E. coli*의 NAD-dependent DNA ligase는 세포내의 NAD의 양을 낮춤으로써 Fenton reaction을 촉진시키는 NADH가 고갈되어 hydroxyl radical의 생성을 억제하는 기능을 한다(Imlay *et al.*, 1988). 또 다른 기능은 생성된 활성 산소종을 불활성화 시키는 기능으로 *E. coli*에서 알려진 *sodA*와 *sodB*의 발현산물인 Mn 또는 Fe를 함유한 superoxide dismutase (Carlioz and Touati, 1986), *katG*와 *katE*의 발현산물인 HP I형 또는 HP II형 catalase (Loewen *et al.*, 1985), *ahp*의 발현산물인 alkylhydroperoxide reductase, *gshAB*의 발현산물인 glutathione synthetase, 그리고 *gor*의 발현산물인 glutathione reductase가 있다. 한편 위와 같은 방어체계에서 막지 못한 손상은 두 번째 기작에 속하는 복구과정에 의해서 복구된다. Exonuclease III, endonuclease IV, DNA polymerase, excision nuclease 등과 같이 손상된 DNA를 복구하는 효소(Demple *et al.*, 1986)나 glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADH dehydrogenase 등과 같이 세포내의 산화 환원 상태를 조절하는 효소

들이 복구작용을 한다고 알려져 있다.

이들 유전자들의 발현을 조절하는데는 여러 가지 조절 단백질들이 작용한다. 특히 *E. coli* 등의 세균은 일련의 연관된 유전자 체계가 다양한 스트레스에 의해 각각 유도되는데 이들을 자극 유전자군(stimulon)이라 부른다(Neidhardt *et al.*, 1987). 과산화수소 등의 스트레스를 받은 세포들은 자극 유전자군을 발현시키므로써 자극에 대한 저항성을 획득하게 된다(Tartaglia *et al.*, 1991). 자극 유전자군에 포함되는 유전자의 발현은 조절단백질(regulator)에 의해 조절되고 같은 조절단백질의 영향을 받는 단백질들은 하나의 조절군(regulon)을 형성하게 된다 (Neidhardt, 1987).

산화적 스트레스에 대한 조절군으로는 superoxide radical을 생성하는 친 전자성 퀴논 물질에 의해서 발현되는 *sodA*, *nfo*, *zwf*, *acnA*, *fumC*, *fur*, *micF*, *acrAB*, *tolC*, *fpr*, *fipA*, *ribA*, *inaA*, *pqi5* 등이 있는데 이들은 SoxRS 조절군에 의해 발현이 조절된다(Greenberg *et al.*, 1990; Tsaneva and Weiss, 1990; Liochev and Fridovich, 1992; Chou *et al.*, 1993; Wu and Weiss, 1992; Koh *et al.*, 1996; Koh and Roe, 1996; Aono *et al.*, 1998; Rosner and Slonczewski, 1994), 과산화수소에 의해 발현이 유도되는 유전자로는 *katG*, *ahpCF*, *gorA*, *grxA*, *dps*, *oxyS* 등이 있는데 이들은 OxyR 조절군이라는 능동 조절인자의 조절을 받는다 (Christman *et al.*, 1985, 1989; Morgan *et al.*, 1986; Tartaglia *et al.*, 1989; Altuvia *et al.*, 1994; Tao, 1997; Martinez and kolter, 1997), 그리고 세포가 정체 성장기나 영양결핍에 직면할 때 유도되는 *katE*, *xthA*, *katG*, *fumC*, *acnA*, *gorA*, *dps*, *sodC* 등 일련의 유전자들의 발현을 조절하는 RpoS 조절군 (Mulvey *et al.*, 1988; Schellhorn and Hassan, 1988; Mulvey and Loewen, 1989) 등이 있다. 이러한 산화적 스트레스에 대한 조절군에 의해 유도되는 단백질 중에는 고온이나 다른 스트레스에 의해 유도되는 것들도 있는데, 이러한 현상을 교차 저항성(cross-resistance)이라 하며 산화적 스트레스를 비롯한 여러 스트레스 사이에 교차저항성이 있는 것으로 알려졌다(Greenberg and Demple, 1989; Jenkins

et al., 1988; Morgan *et al.*, 1986; Van Bogelen *et al.*, 1987).

Catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 일종의 산화환원효소 (oxidoreductase)로서, 과산화수소에 직접 작용하여 과산화수소에 의한 산화적 스트레스의 사전방어 기작에 중요한 역할을 하는 효소로 많은 생물에서 연구되어 왔다. 지금까지 원핵생물의 catalase 종류는 1차 구조의 차이에 의해 2개의 그룹으로 분류되어 오고 있다. 한 그룹은 진핵생물의 catalase와 크기가 비슷하고 높은 아미노산 서열의 상동성을 보이며 peroxidase 활성이 없는 (monofunctional) 8종의 catalase이고, 다른 하나는 peroxidase 활성을 가지면서 (bifunctional) 크기도 700 아미노산 이상으로 catalase보다는 peroxidase와 높은 상동성을 보이는 4종의 catalase이다. 2개의 그룹은 아미노산 서열에서 매우 낮은 상동성을 나타내나, 같은 그룹에서는 상당히 높은 아미노산 상동성을 나타내는 것으로 미루어 보아, 두 그룹은 서로 다른 계통으로부터 진화하였을 것으로 추정되고 있다(Loewen, 1992). Typical catalase의 경우는 많은 예가 알려졌으며 위에서 언급한 BLC(BTACAT)의 활성부위와 heme distal부위를 포함한 여러 부위(domain A Region H, S, N)에서 보존성 (H부위-N부위; 92 a.a. 단 *Micrococcus* spp. 경우 91 a.a.)을 보이는 반면에, catalase-peroxidase는 알려진 4개 이외에 peroxidase로서 많은 연구가 되어있는 효모의 cytochrome C peroxidase가 알려져 있다 (Heym *et al.*, 1993).

이와 같이 여러 미생물에서 두 가지 이상의 서로 다른 catalase 존재하는 것으로 알려져 있고 미생물에 따라 발현 양상과 생물학적 기능이 다르게 나타난다. 특히 *E. coli*에서 catalase의 조절에 관한 많은 연구가 되어져있다 (Farr and Kogoma, 1991). 이들은 두개의 catalase HPI (*katG*)과 HPⅡ (*katE*)가 존재하며 HPI는 81kDa의 소단위체로 구성된 tetramer로서 두 개의 protoheme IX group을 가지고 있으며(Claiborne and Fridovich, 1979), OxyR 조절균에 조절되는 *katG* 유전자에 의해 발현되는 반면 *katE*에 의해 발현되는HPⅡ는 93 kD의 동일한 분자량을 가지는 소단위체로 구성된 hexamer이며(Lowen and Switala, 1986), 소단위체 당 1개의 heme d 그

를 가지고 있다 (Chiu *et al.*, 1989). 그리고, 산화적 스트레스에 대한 방어 기능을 가지고 있지만 OxyR 조절군에 포함되지 않고, 세포가 정체 성장기에 들어가거나 TCA회로의 중간산물을 이용하여 성장할 때 합성이 유도되는 것으로 알려져 있다 (Loewen *et al.*, 1985). 한편, 발현 시에는 *katF*라는 유전자의 산물이 필요한데 *katF*의 염기서열은 RNA 중합효소의 sigma subunit (RpoS, σ^s, σ^{38})와 유사하다는 것이 알려졌다 (Mulvey and Loewen, 1989).

1.2. 연구목적

비 유황 홍색 광합성세균인 *Rhodospirillum rubrum*은 대사능력이 매우 다양하여 환경조건에 따라 광합성, 호기성 호흡, 발효, 혐기성호흡 중 해당 대사과정을 선택하여 성장한다. 비 유황 홍색 광합성 세균들에서 질소고정, 이산화탄소고정, 그리고 광합성 기구의 조절들이 산소에 의해 조절 된다는 연구가 활발히 진행되어 왔다(Eraso and Kaplan, 1994; McEwan, 1994). 대사능력이 매우 다양한 *Rhodospirillum rubrum*은 통성 혐기성 세균으로 호기적으로 성장하는 동안 산소의 독성효과를 중화시키는 방어시스템이 필요할 것이다. 산화적 스트레스에 대한 방어 기작에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 다양한 대사능력을 가진 광합성세균인 *Rhodospirillum rubrum* S1에서 발현되는 catalase 및 관련유전자를 cloning하고, 그 유전자들의 구조 및 분자생물학적 특성을 알아 보고자 실시하였다. 또한, 클론된 catalase 유전자의 대량발현으로 얻어진 catalase의 생화학적 특성을 알아보고자 실시하였다.

2. 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* S1에서 Catalase Gene Cluster의 분리 및 특성분석

2.1. 서 론

생물은 다양한 환경 변화 속에서 살아가기 때문에 환경의 변화 속에서도 세포 내를 일정한 상태로 유지시켜 줄 수 있는 기작이 요구된다. 여기에는 많은 유전자들이 관여하는데, 생물은 특정한 환경 변화에 대해 필요한 유전자들을 적절한 시기에 발현시키는 조절 기작을 필요로 한다. 특히 세균의 경우 급격한 환경 변화에 직접적으로 노출되어 있기 때문에, 이와 관련된 유전자들을 보다 효율적으로 조절하기 위하여 동일한 상황에서 필요로 하는 일련의 유전자 군의 발현을 동시에 조절하는 기작을 가지고 있다. 이들의 발현을 조율함으로써 환경의 변화에 적절히 대응하게 된다(Neidhardt, 1987)

산소가 존재하는 환경에서 자라는 생명체는 정상적인 호흡 과정의 부산물에 의해 생성되거나 외부에 존재하는 산화제에 노출되었을 때 생성되는 활성 산소종에 의해 산화적 스트레스를 받게 된다.

산화적 스트레스에 대한 반응에 필요한 많은 단백질과 그것을 암호화하는 유전자들은 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (Farr and Kogoma, 1991; Storz and Imlay, 1990)에서 잘 밝혀졌다. 특히, *E. coli*에서 catalase의 조절에 관한 연구가 되어있다(Farr and Kogoma, 1991). 이들은 두 가지의 catalase, 즉 HP I (*katG*)과 HP II (*katE*)를 가지고 있으며 HP I은 OxyR 조절군에 조절되는 *katG* 유전자에 의해 발현되는 반면 *katE*에 의해 발현되는 HP II는 산화적 스트레스에 대한 방어기능을 가지고 있지만 OxyR 조절군에 포함되지 않고, 세포가 정체 성장기에 들어가거나 TCA 회로의 중간산물을 이용하여 성장할 때 합성이 유도되는 것으로 알려져 있다(Loewen *et al.*, 1985). 한편, 발현 시에는 *katF*라는 유전자의 산물이 필요한데 *katF*의 염기서열은 RNA 중합효소의 sigma subunit (RpoS, σ^s , σ^{38})와

유사하다는 것이 알려졌다 (Mulvey and Loewen, 1989).

*Bacillus subtilis*는 3 종류의 monofunctional catalase를 가지고 있으며 *cat1* (*katA*)는 과산화수소, 영양결핍 또는 금속이온에 의해 유도되는 영양세포 catalase (Bol and Yasbin, 1991, 1994; Chen *et al.*, 1995) KatA의 발현은 PerR 억제인자에 의해 매개된다. Catalase 2 (KatE)는 *E. coli* HPⅡ와 유사하며, 정체 성장기 또는 염, 열, ethanol 스트레스, glucose 고갈에 의해 유도되며, σ^B 에 의해 조절된다 (Engelmann *et al.*, 1995). Catalase 3 (KatX)는 휴면세포에서 발현되며, σ^F 에 의해 조절된다 (Bagyan *et al.*, 1998).

*Streptomyces coelicolor*는 두 종류의 monofunctional catalase, CatA와 CatB가 존재하며, CatA는 주로 영양세포 catalase로서 과산화수소에 의해 유도된다. 그리고 CatB는 정체 성장기에 특이하게 유도되며, 삼투 스트레스에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다(Cho *et al.*, 2000; Cho and Roe, 1997). 그리고 두 종류의 catalase-peroxidase를 갖고 있으며 CatC는 세포가 균사체를 형성 할때 유도되며(Lee, 1995; Hahn *et al.*, 2000), Sc-catC 유전자는 상류 부위에 *furA* 유전자를 포함하는 오페론으로 구성되어 있으며, 정체 성장기에 유도되며 금속이온과 산화-환원 양상에 따라 FurA에의 조절된다고 알려져 있다.

*Pseudomonas aeruginosa*는 편성 호기성 세균으로 두 종류의 catalase를 가지고 있다(Brown *et al.*, 1995; Hassett *et al.*, 1999). KatB는 세포질 부분에 존재하며, 고농도의 과산화수소에 의해서만 발현된다. KatA는 세포질과 주변세포질 부분에 존재하며 호기적 성장 또는 철을 이용 할때 민감하게 발현된다.

산화적 스트레스에 대한 방어기작은 다양한 세균에서 잘 알려져 있지만 광합성 세균 Rhodospirillaceae에서는 stress에 대한 방어 기작은 *Rhodobacter spheroides*에서 charperonines Cpn10과 Cpn 60에 대한 연구 (terlesky and Tabita, 1991)와 oxidative stress에 대한 연구(Terzenbath and Blaut, 1998)외에는 전무한 실정이다.

본 연구에서는 다양한 대사능력을 가진 광합성세균인 *Rhodospirillum rubrum*

S1에서 발현되는 catalase 및 관련유전자를 cloning하고, 그 유전자들의 구조를 분석하였다.

2.2. 재료 및 방법

2.2.1. 균주 및 시약

본 연구에 사용한 균주와 plasmid는 Table 2-1에 표시하였고, PCR 및 sequencing primer는 Table 2-2에 나타내었다. 여러 가지 제한효소 및 DNA ligase, Klenow fragment 등과 PCR 수행을 위한 *Taq* polymerase은 Bioneer(Daejeon, Korea)또는 Promega(Madison, WI, USA)에서, DNA sequencing kit와 Hybond-N nylon membrane은 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)에서 구입하였고, DNA 표지를 위한 Dig DNA labelling and immunodetection kit는 Roche(Mannheim, Germany)에서 각각 구입하여 사용하였다. 배지는 Difco(Detroit, MI, USA)의 제품을, 그 밖의 시약은 Sigma(St Louis, Mo, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2.2. 균주의 배양조건

2.2.2.1. *Rhodospirillum rubrum* S1의 배양조건

Rhodospirillum rubrum ATCC 11170(S1)을 Bose등(1962)의 배지에서 2,000 Lux, 30°C, 5 ~ 7일간 혐기적으로 정지 배양하였다. 기본배지 조성은 다음과 같다. D.W. 1 L당 KH₂PO₄, 600 mg; K₂HPO₄, 900 mg; MgSO₄ · 7H₂O, 200 mg; CaCl₂ · 2H₂O, 75 mg; FeSO₄ · 7H₂O, 11.8 mg; 미량원소용액(D.W., 100 mL; H₃BO₃, 280 mg; MnSO₄ · 4H₂O, 210 mg; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 75 mg; ZnSO₄ · 7H₂O, 24 mg; Cu(NO₃)₂ · 2H₂O, 4 mg), 1 mL; EDTA, 20 mg; biotin, 15 µg;(NH₄)SO₄, 1.25 mg.여기에 탄소원으로 3 g malate를 첨가하였다.

Table 1. The bacterial strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Genotype or characteristics	Source or reference
Strains		
<i>Rhodospirillum rubrum</i> S1	Wild type	ATCC
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 recA1 thiΔ(lac-proAB)</i>	
UM255	<i>pro leu rpsLhsdM endI lacY katG2 katE12::Tn10 recA</i>	Loewen(1988)
Plasmids		
pGEM-T Easy	Cloning vector(Ap ^r) for PCR fragments	Ppromega
pBluescript SK+	Cloning vector(Ap ^r)	Stratagene
pSCAT020	pBluescript SK+ with 7.4 kb <i>EcoRI-EcoRI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT021	pBluescript SK+ with 5.1 kb <i>BamHI-EcoRI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT022	pBluescript SK+ with 2.3 kb <i>EcoRI-BamHI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT023	pBluescript SK+ with 6.3 kb <i>HindIII-EcoRI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT024	pBluescript SK+ with 1.1 kb <i>HindIII-EcoRI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT025	pBluescript SK+ with 2.5 kb <i>NotI-EcoRI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT026	pBluescript SK+ with 2.3 kb <i>BamHI-NotI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study
pSCAT027	pBluescript SK+ with 0.37kb <i>NotI-NotI</i> fragment from <i>R. rubrum</i>	This study

Table 2-2. PCR primers and sequence primers used in this study

Primer name	Sequence
Cat1F	5'-CCNGARMGNGTNGTNCAAYGC-3'
Cat1R	5'-AYNGGNGTRTTRTTNCCNAC-3'
pSCAT021(BE1)	5'-CAGCGCCTGCTCATTGGTC-3'
pSCAT021(BE1-1)	5'-GATTGCCGACCACCAGATCGAAG-3'
pSCAT021(EB1)	5'-CATGGCCTCGGCGATATTG-3'
pSCAT021(EB1-1)	5'-GACCTCGATCAGCGGAAAATC-3'
pSCAT022(EB1)	5'-GAATACCGGCGCCTGCGCGA-3'
pSCAT022(BE1)	5'-GATCGCCTCGCTCAGCCAAACAG-3'
pSCAT024(HE1)	5'-CTCGGCGAAGGCGCCTTTCTC-3'
pSCAT025(NE1)	5'-GTCGCCGATAATCAAACAG-3'
pSCAT026(NB1)	5'-GAACCGCTATAAGGGCCAG-3'



2.2.2.2. *Escherichia coli*의 배양조건

형질 전환용 숙주세포로는 *E. coli* JM109와 UM255를 사용하였다. 형질 전환된 *E. coli* 균주인 JM109 또는 UM255는 Luria-Bertani (Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g per liter) 배지로 37°C에서 배양하였다. pGEM-T Easy vector 또는 pBluescriptSK(+) vector로 형질전환된 JM109 또는 UM255를 접종할 때에는 ampicilin농도가 50 µg/mL이 되도록 LB배지에 첨가하였다(Sambrook, *et al.*, 1989).

2.2.3. DNA 분리 및 정제

2.2.3.1. *Rhodospirillum rubrum*의 게놈 DNA 분리

2-1과 같이 배양한 *Rhodospirillum rubrum* S1을 4°C, 10,000 × g로 10분간 원심분리하여 균체를 수확하였으며, 9.5 mL의 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁 시켰다. 10% SDS를 0.5 mL, proteinase K(20 mg/mL)를 50 µL씩 각각 넣고 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 5 M NaCl 용액 1.8 mL, CTAB/NaCl 용액(10% CTAB; cetyltrimethylammonium bromide, 0.7 M NaCl) 1.5 mL씩 첨가한 후 65°C에서 20분간 정치시켰다. 0.5 volume의 phenol과 0.5 volume의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1)로 1회 추출한 뒤 상정액을 새 튜브로 옮겨 동량의 chloroform/ isoamylalcohol (24 : 1)로 다시 1회 추출하였다. 상정액을 0.6 volume의 isopropylalcohol로 침전시킨 다음 70% ethanol로 세척하였다. 공기 중에서 건조시킨 후 3 mL의 TE 완충용액에 완전히 DNA를 용해시켰다. 녹인 DNA 용액에 RNase A (100 µg/mL)을 첨가하여 30분 반응시킨 후 phenol/chloroform으로 2회 이상 추출하여 흡광도비 (A_{260}/A_{280})가 1.8이상이 되게 하였다.

2.2.3.2. 플라스미드의 분리

플라스미드 DNA 분리는 alkaline lysis방법으로 다음의 순서에 따라 분리 하였다(Sambrook *et al.*, 1989). 30 mL의 대장균 배양액을 12,000 rpm

에서 5분간 원심분리하여 대장균을 가라앉힌 후 상정액을 제거하고 4 mL의 GTE 완충용액[50 mM glucose, 25 mM Tris-HCL (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)]을 첨가하여 현탁시켰다. 현탁액에 0.5 mL의 lysozyme 용액 (10 mg/mL)을 첨가하여 실온에서 10분간 방치하였다. 5 mL의 alkaline-SDS 용액(0.2N NaOH, 1%(w/v) SDS)을 첨가하여 얼음에 10분간 방치한 후 3.75 mL의 3M potassium acetate를 첨가하고 얼음에 10분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상정액에 0.6 부피의 isopropylalcohol을 첨가하여 상온에 10분간 방치하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 플라스미드 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA를 70%(v/v) ethanol로 세척하여 말린 후 2 mL의 TE완충액을 첨가하여 녹였다.

플라스미드의 확인과 형질전환체 및 클로닝 여부를 확인하기 위한 DNA 소량분리는 Wizard SV Mini-Prep DNA purification system(Promega Co., Madison, WI, USA)을 이용하였으며 제조회사의 지침에 따라 사용하였다.

2.2.4. PCR(Polymerase chain reaction)에 의한 catalase 유전자의 증폭

R. rubrum 게놈 DNA에 대한 catalase 유전자를 증폭하기 위해 *Taq* DNA polymerase를 사용하였고, degenerate primer는 기존에 알려진 세균의 catalase의 아미노산 서열을 기초하여 보존 부위가 높은 부위로 선택 고안하여 Bioneer사에서 합성한 것을 사용하였다(Fig. 2-1). degenerate primer (CatF와 CatR) set와 함께 100ng의 게놈 DNA를 사용하였으며 증폭반응은 Gene Cyler PCR 기기 (Bio-Rad Co., California, USA)를 사용하였으며, 증폭조건은 95°C에서 5분간 변성 후 95°C, 1분-55°C, 1분-72°C, 1분의 주기로 33번 순환한 후 최종 72°C에서 10분간 extension하였다.

2.5. DNA 재조합 및 형질전환

2.5.1. 특정 DNA 절편의 순수 분리

증폭된 PCR 산물과 Southern 혼성화반응에서 나타나는 DNA 절편을

Cat1F		
71	RI	PERVVHARGTGVKGEFTASADISDL SKA <i>Pseudomonas syringae</i>
45	LI	PERRMHA KGAGAYGTF TV THDI TRYTKA <i>Rhizobium sp. SNU003</i>
116	RI	PERVVHA KGWGAFGSLKI TGDI SQYTRA <i>Rhizobium meliloti</i>
47	VI	PERRMHA KGSGAYGTF TV THDI TKYTRA <i>Bacteroides fragilis</i>
48	RI	PERAVHA KGWGAYGTL TI TGDI SRYTKA <i>Brucella melitensis</i>
121	RI	PERI VHARGSAAHGYFQP YKSLSDI TKA <i>E.coli K12</i>
56	VI	PERRMHA KGSGAFGTF TV THDI TKYTRA <i>Haemophilus influenzae</i>
67	RI	PERVVHA KGAGAFGYFEV THDI TRYSKA Bovine liver
47	RV	PERVVHA KGAGAHGYFEV TNDVTKYTKA <i>Bacillus subtilis</i>
81	RI	PERVVHARGYGVHGF FETYESLAAYTRA <i>Sinorhizobium meliloti</i>

Cat1R		
130	DP	HGFATKFYTADGNWDL VGNNFP TFFI RD <i>Pseudomonas syringae</i>
105	DI	RGFAVKFYTDEGNWDL VGNNTP VFFFRD <i>Rhizobium sp. SNU003</i>
175	DV	RGFALKFYTDEGNWDL VGNNTP VFFI RD <i>Rhizobium meliloti</i>
107	DI	RGFAMKFYTEEGNWDL VGNNTP VFFLRD <i>Bacteroides fragilis</i>
107	DV	RGFALKFYTQEGNWDL VGNNTP VFFVRD <i>Brucella melitensis</i>
181	DI	RGFATKFYTEEGIFDL VGNNTP IFFI QD <i>E.coli K12</i>
116	DI	RGFALKFYTEEGNWDL VGNNTP VFFLRD <i>Haemophilus influenzae</i>
127	DP	RGFAVKFYTEDGNWDL VGNNTP IFFI RD Bovine liver
107	DP	RGFAVKFYTEEGNYDI VGNNTP VFFI RD <i>Bacillus subtilis</i>
141	HV	RGFAVKIYTKEGNWDL VGNNI PVFFI QD <i>Sinorhizobium meliloti</i>

Fig. 2-1. Oligonucleotides, Cat1F and Cat1R are degenerate primers designed based on the conserved sequences of catalases from bovine liver and prokaryotes. Amino acids chosen for the synthesis of PCR primers are boxed.

겔에서부터 회수할 때는 Electro-elution 방법(Sambrook *et al.*, 1989)을 또는 QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN Hilden, Germany)를 이용하여 제조회사의 지침에 따라 사용하였다.

2.5.2. 재조합 및 형질 전환

Catalase 유전자를 재조합하기 위한 재조합의 기본과정은 Sambrook 등의 방법(1989)을 따랐으며, 삽입체와 벡터의 몰비는 1 : 1로 하였다. PCR 산물을 재조합하기 위해서 pGEM-T Easy vector(Promega Co., Madison, WI, USA)에 증폭된 PCR 산물 7 μ L, vector 1 μ L(10 ng), 10 \times reaction buffer 1 μ L, T4-ligase 1 μ L(3u/ μ L)을 혼합시킨 후 최종 부피가 10 μ L되게 한 후 16 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 반응시켰다. Southern 혼성화 절편의 재조합은 inset DNA 3 μ L, 제한효소로 절단된 pBluescript SK(+) vector 3 μ L, 10 \times reaction buffer 1 μ L, T4-ligase 1 μ L(3u/ μ L), D.W 2 μ L을 혼합시킨 후 최종 부피가 10 μ L되게 하여 14 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. 형질전환에 사용한 균주는 *E. coli* JM109와 *E. coli* UM255 균주를 사용하였으며, 형질전환 방법으로는 *E. coli* JM109 균주인 경우 CaCl₂ 방법(Hanahan, 1986)과 *E. coli* UM255 균주인 경우 Gene pulser(Bio-rad Co., California, USA)를 사용하였다.

2.2.6. Southern 혼성화 반응

2.2.6.1. 탐침 DNA 의 분리 및 표지

Catalase 유전자의 검정에 쓰인 탐침 DNA는 PCR에 의해 증폭된 *R. rubrum*의 게놈 DNA부분을 사용하였다. 분리한 탐침 DNA는 Dig-DNA labeling(Roche Co., Mannheim, Germany)의 사용지침에 의거하여 표지하였다. 먼저 25 μ g의 PCR 산물을 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 변성화 시키고 Hexanucleotide Mix, dNTP labeling Mix, Klenow enzyme을 첨가하여 총 15 μ L 반응용액을 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시킨 후 반응액에 0.2 M EDTA (pH 8.0) 0.2 μ L를 첨가 하거나 65 $^{\circ}$ C로 가열하여 반응을 중지시

켰다.

2.2.6.2. Genomic hybridization

Catalase 유전자의 copy 수와 존재를 알아보기 위해 *R. rubrum* S1의 게놈 DNA 15 μg 에 각각 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sal*I을 2.5 U/ μg 으로 처리한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 부분 절단하였다. 절단된 DNA시료를 0.8% agarose 수평 겔에서 20V의 전압을 주어 18시간 동안 전기영동하였다. 전기영동한 겔을 Southern(1975)의 방법에 따라 사진촬영 후 변성용액(0.2 M NaOH, 1.5 M NaCl)에서 30분씩 2번, 그리고 증류수로 가볍게 씻어내고, 중화용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4)에서 45분씩 2회 처리 후 positively charged nylon membrane에 capillary transfer 방법으로 DNA를 옮겼다. 이때 transfer buffer는 20× SSC buffer(3M sodium citrate, 1.5 M NaCl, pH 7.5)를 이용하여 18시간 동안 전이시켰다. Nylon membrane에 옮겨진 DNA는 UV-crosslinker(Bio-Rad Co., California, USA)를 이용하여 DNA를 고정하고, 실온에서 건조시킨 후 다음의 방법에 따라 혼성화 반응을 수행하였다. Nylon membrane의 면적 100 cm² 당 20 mL의 전 혼성화 반응용액을 넣고, 진탕 항온수조에 42°C에서 4시간 동안 전 혼성화반응을 수행한 후 탐침 DNA를 넣고 42°C에서 18시간 혼성화반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후 nylon membrane을 꺼내 200 mL의 2× SSC/0.1%SDS 세척용액으로 실온에서 5분씩 2번 세척하고 다시 0.5× SSC/0.1%SDS 용액으로 55°C에서 각각 15분씩 2번 세척하여 비 특이적 결합을 제거한 후 immunodetection을 하였다. Immunodetection은 Dig-labelling kit(Roche Co., Mannheim, Germany)의 지침서에 따라 실시하였다

2.2.7. Catalase 유전자 library 제작

게놈 DNA의 Southern 혼성화반응에서 반응을 보인 절편 부위를 선택하여 이들에 대한 library를 제작하였다. 게놈 DNA 2.5 μg 을 *Eco*RI으로 절단한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 약 7.5 kb 절편부위를 2회에 걸쳐서 회수하였다. 회수한 DNA 단편들을 *Eco*RI으로 절단한 pBluescript

SK(+) vector에 적절한 조건으로 재조합하여 *E. coli* UM255에 형질전환 시킨 후 X-gal/IPTG/Ampicillin가 포함된 LB 고형배지에서 흰색 균체만 선발한 후 이들을 다시 LB 고형배지에 배양하였다. *E. coli* UM255는 katE와 katG 유전자 부위에 돌연변이된 균주이므로 3% 과산화수소를 떨어 뜨리면 거품이 생성되지 않는다. 따라서 kat 유전자를 포함하는 유전자 절편이 숙주 세포인 *E. coli* UM255에 형질 전환되어 kat 유전자가 발현되면 complementation이 일어나서 3% 과산화수소를 떨어뜨리면 거품이 생성되는 특징을 이용하여 균주를 선발하였다(Fig. 2-2). 이들을 액체배지에서 배양하여 수확한 세포로부터 분리한 플라스미드 DNA를 재조합할 때 사용한 효소인 *EcoRI*으로 절단하고 inserts의 삽입여부는 전기영동하여 agarose gel 전기영동으로 확인하였다. 이들 gel상의 유전자 절편들을 주형으로 하고, PCR을 통해서 얻어진 catalase 유전자 단편을 탐침자로 이용하여 Southern 혼성화를 실시하였고, 재조합 signal을 띄는 클론을 선발하였다.

2.2.8. 염기서열의 결정

염기서열 분석은 ALFexpress II DNA sequencer(Pharmacia Co., USA)와 ABI 377 automatic sequencer (ABI Prism Inc.)를 사용하여 분석하였다. PCR 산물을 pGEM-T Easy cloning vector에 삽입한 후 삽입된 DNA는 Cy5-labeled vector inner primer인 M13-40 primer와 M13 reverse primer를 포함하고 있는 Cy5 Autocycle Sequencing Kit(Pharmacia, USA)와 제작된 sequence primer를 이용하여 ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing kit(PE Biosystems, Foster City, CA, USA)를 제조사의 지침서에 따라 반응시킨 후 염기서열을 결정하였다.

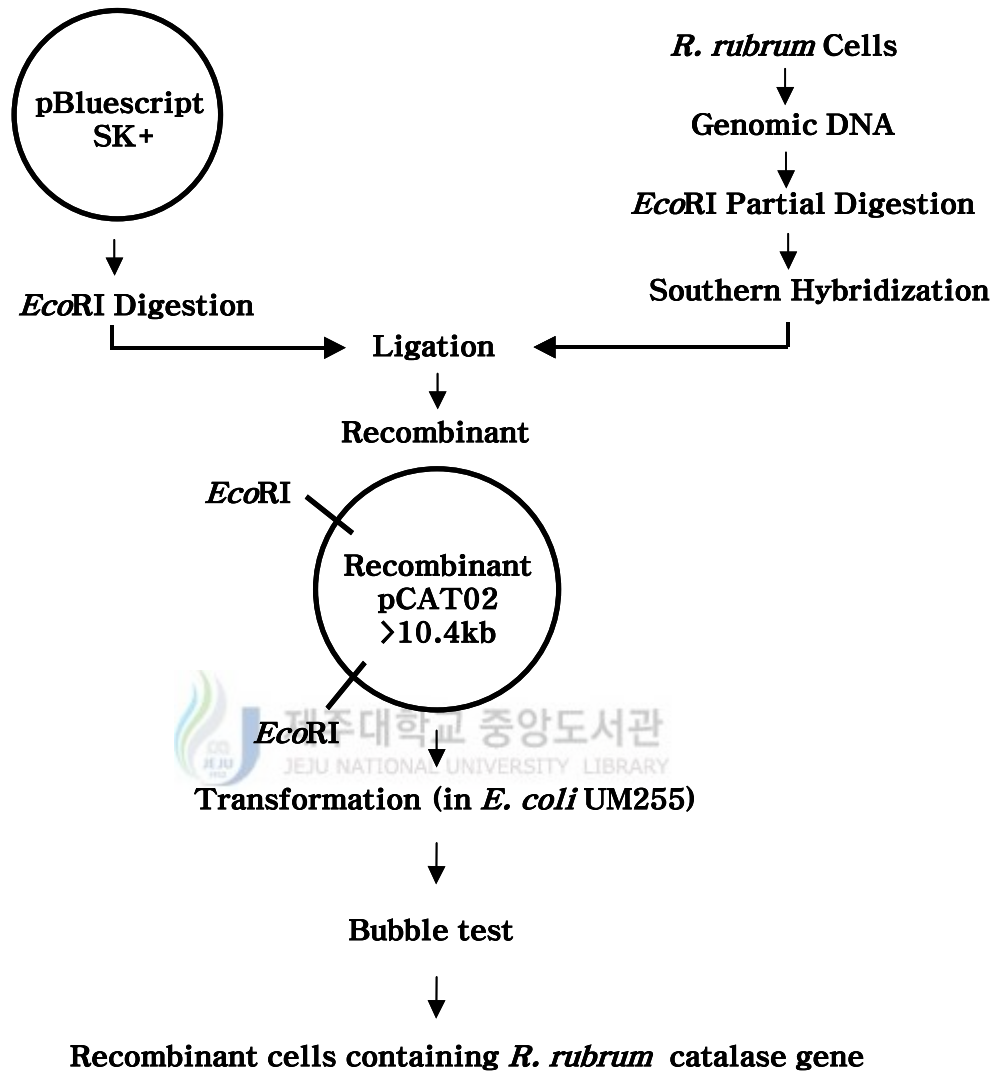


Fig. 2-2. Cloning of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase gene into pBluescript SK(+) plasmid vector.

2.3. 결과 및 고찰

2.3.1. 게놈 DNA의 PCR 증폭 및 PCR 산물의 염기서열 결정

Catalase는 활성 부위를 중심으로 보존성이 높는데, 가장 보존성이 높은 부분인 Val73, His74, Ser113과 Thr114, Asn147, Phe152을 포함하고 있는 부위를 중심으로 하여 degenerate primer를 제작하여 *R. rubrum*의 게놈 DNA를 증폭한 결과 245 bp의 증폭된 PCR 산물이 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2-3). 증폭된 DNA의 염기서열을 결정한 결과를 바탕으로 아미노산 서열을 다른 생물의 catalase와 다중 비교한 결과 *Mesorhizobium loti*의 catalase와는 76%, *Shinirhizobium meliloti*의 CatC와는 73%, *Xanthomonas campestris*의 KatE와 *Pseudomonas aeruginosa*의 HPⅡ와는 61%, *Deinococcus radiodurans*의 catalase와는 57%, *Caenorhabditis elegans*의 Cat1과는 54%으로 상동성이 높게 나타났다. 이상의 결과로 *R. rubrum* S1의 genomic DNA로부터 증폭된 PCR 산물은 catalase 유전자의 일부분임을 확인할 수 있었다.

2.3.2. PCR 산물을 탐침으로 하는 게놈 DNA의 Southern hybridization

R. rubrum S1의 catalase 유전자의 copy 수와 존재를 알아보기 위해 Southern hybridization을 수행한 결과 *Bam*HI 절편중에는 크기가 약 20 kbp 와 6.5 kbp, *Eco*RI 절편 중에서는 약 7.5 kbp와 1.0 kbp, *Hind*Ⅲ 절편 중에 약 8.5 kbp와 6.0 kbp의 절편에 결합함을 관찰되었다(Fig. 2-4). 이는 *R. rubrum* S1 균주에는 적어도 2개의 catalase 유전자가 존재할 것으로 판단된다.

2.3.3. DNA 절편에 대한 sublibrary의 제조 및 클로닝

Southern hybridization의 결과를 바탕으로 *Bam*HI 절편(6.5 kbp), *Eco*RI 절편(7.5 kbp), 그리고 *Hind*Ⅲ 절편(6.0 kbp)을 sublibrary를 제작한 후 *E. coli* UM255으로 형질전환한 결과, 약 500개의 형질전환체를 얻을 수 있었다. 형질전환체중 *R. rubrum* S1의 catalase 유전자의 발현을 확인하기 위해 colony에 3% 과산화수소를 떨어뜨린 결과, 약 500개의 형질전환체들중

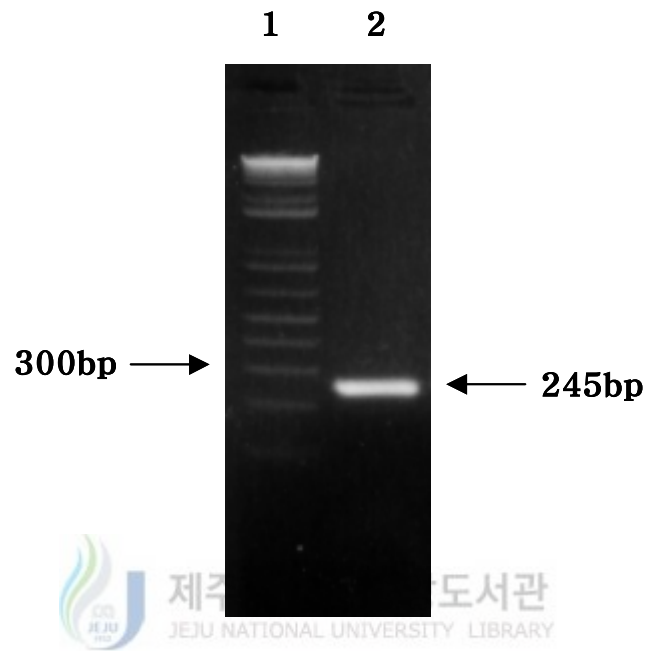


Fig. 2-3. Agarose gel electrophoresis (2%) of the catalase PCR product. The PCR process was carried out by using genomic DNA from *Rhodospirillum rubrum* S1 and a set of forward and reverse primers. The amplified catalase fragment of 245 bp is indicated by an arrow. Lane 1, DNA size marker(Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder); lane 2, the PCR product of a catalase gene from *R. rubrum* S1.

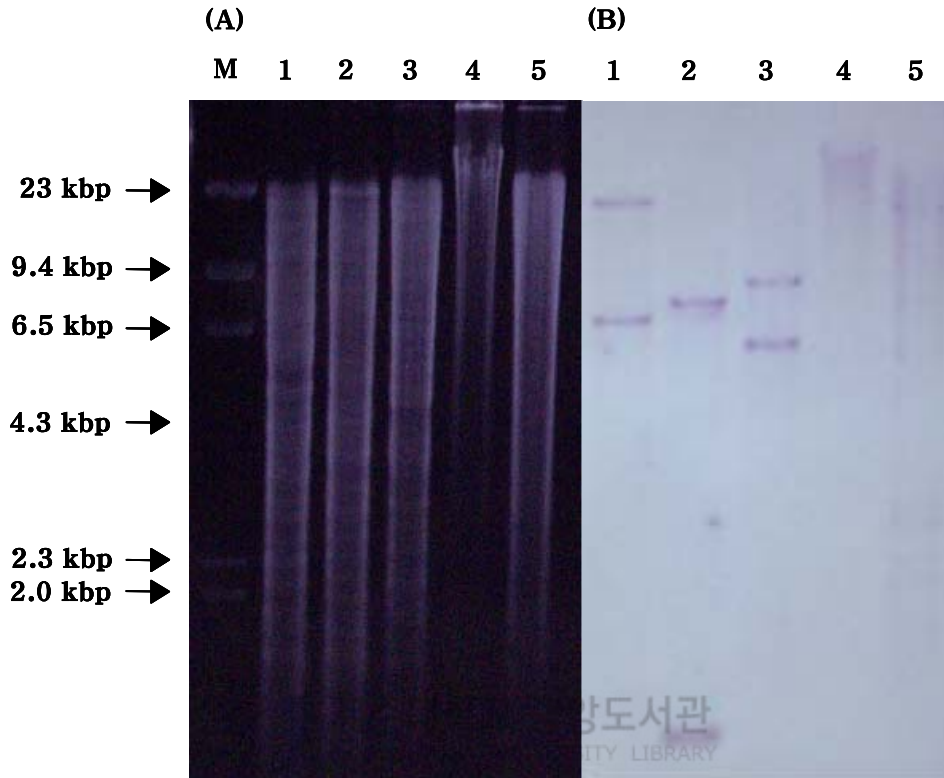


Fig. 2-4. Southern hybridization of catalase gene using total genomic DNA from *Rhodospirillum rubrum* S1. The DNA fragments digested with several restriction enzymes were hybridized with the catalase DNA fragment obtained from the PCR process. Electrophoresis pattern of total genomic DNA from *Rhodospirillum rubrum* S1 digested with several restriction enzymes is shown in left panel (A). The signal indicating catalase gene by Southern hybridization with the catalase probe labeled with Dig DNA labeling kit is shown in right panel (B). Lane: M, DNA size marker(λ DNA digested with *Hind*III); 1, DNA digested with *Bam*HI, 2, DNA digested with *Eco*RL; 3, DNA digested with *Hind*III; 4, DNA digested with *Pst*I; 5, DNA digested with *Sal*I.

7개의 형질전환체에서 거품이 생성되었다. 선발된 균주로부터 재조합 플라스미드를 추출하여 제한효소를 처리한 결과 7개의 형질전환체 모두 *EcoRI* 절편이 삽입되어 있음을 알 수 있었고, 이들 중 거품이 강하게 발생하는 형질전환체 1개를 선발하여 이로부터 재조합 유전자를 추출하여 "pSCAT02"로 명명하였다. *E. coli* UM255(pSCAT02)의 세포 추출물을 비변성 PAGE 전기영동을 수행한 후 활성 염색한 결과(Fig. 2-5), *R. rubrum* S1 catalase 유전자가 삽입된 pSCAT02를 갖고 있는 *E. coli* UM255 균주에서 강하게 발현됨을 알 수 있었고, pBluescript SK(+) vector를 함유하고 있는 *E. coli* UM255는 catalase 활성이 나타나지 않으므로 *R. rubrum* S1의 catalase 유전자에 의해 발현되었음을 알 수 있었다. *R. rubrum* S1은 호기적으로 성장할 때 5종류의 catalase, 혐기적 상태에서 광합성을 할 때는 2종류의 catalase(Cat 2, Cat 4)가 존재한다(Lim *et al.*, 2001). 이들 중 Cat 4 band와 전기영동상 같은 위치에서 강하게 발현된 *R. rubrum* S1의 catalase는 Cat 4로 판단되며, *lac* promotor 유도제인 IPTG가 없는 상태에서 *E. coli*에서 강하게 발현되는 것은 *R. rubrum* S1의 catalase 유전자가 독립적으로 발현되는 것으로 클론된 *R. rubrum* DNA에 존재하는 promotor에 의해 전사되는 것으로 사료된다.

2.3.4. pSCAT02에 대한 제한효소 지도 결정 및 southern hybridization

pSCAT02에 삽입된 절편의 기능을 유추하기 위해 여러 제한효소로 절단하여 제한효소 지도작성과 Southern hybridization을 수행하였다. 제한효소를 처리한 결과 *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Not*I, *Sal*I, *Xho*I 자리가 존재하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-6A) 이를 바탕으로 catalase 유전자의 위치를 파악하기 위해 PCR 산물로 Southern hybridization을 수행한 결과, *Eco*RI-*Ap*aI 절편은 약 2.3 kbp 크기, *Eco*RI-*Bam*HI 절편은 약 5.0 kbp 크기, *Eco*RI-*Eco*RV 절편은 약 3 kbp 크기, *Eco*RI-*Hind*III 절편은 약 6.0 kbp, *Eco*RI-*Not*I 절편은 약 3 kbp 크기, *Eco*RI-*Sal*I 절편은 약 3.5 kbp 크기, *Eco*RI-*Xho*I 절편은 약 3 kbp 크기에서 신호가 감지됨을 알 수 있었다(Fig. 2-6B).

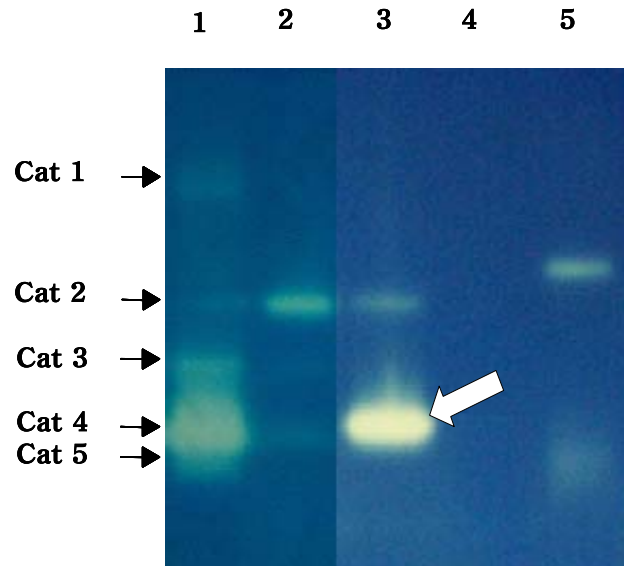


Fig. 2-5. Expression profiles of the catalase genes from *Rhodospirillum rubrum* S1. Nondenaturing PAGE was carried out using cell lysates from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1 and *Escherichia coli* grown under different conditions. Lane 1. Aerobically grown cells of *R. rubrum* S1. Five different catalases are shown; 2. Anaerobically grown cells of *R. rubrum* S1. Two different catalases are shown; 3. *E. coli* UM255 harboring pSCAT02. Expressed catalase coincides with cat4 of *R. rubrum* S1; 4. *E. coli* UM255 (HP I⁻, HP II⁻; pBluescript SK⁺); 5, *E. coli* JM109 (HP I⁺,HP II⁺).

2.3.5. pSCAT02 제한효소 절편에 대한 subcloning 및 염기서열 결정

pSCAT02에 대한 subcloning한 결과, *EcoRI*-*Bam*HI(2.3 kbp), *Bam*HI-*Eco*RI(5.1 kbp), *Eco*RI-*Hind*III (6.3 kbp), *Hind*III-*Eco*RI (1.1 kbp), *Not*I-*Eco*RI (2.7 kbp), *Bam*HI-*Not*I (2.4 kbp) 절편이 삽입된 재조합 플라스미드들을 얻었으며, 이들을 각각 pSCAT021, pSCAT022, pSCAT023, pSCAT024, pSCAT025, pSCAT026이라 명명하였다. 재조합 플라스미드들을 *E. coli* UM255로 형질전환 시킨 후 각각에 3% H₂O₂를 떨어뜨려 거품생성 유·무를 확인한 결과, pSCAT021, pSCAT023, pSCAT025가 포함된 형질전환체에서 거품이 생성됨으로 pSCAT021, pSCAT023, pSCAT025 재조합 플라스미드에 *R. rubrum* S1 catalase 유전자가 삽입되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-7).

염기서열을 결정하기 위해 각각의 재조합 플라스미드들을 숙주세포 JM109에 형질전환 시킨 후 plasmid를 분리한 후 T7/T3 promotor primer를 이용하여 염기서열을 수행하였다. 각종 subclone들의 염기서열을 분석한 결과, 부분적으로 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, endonuclease, methyltransferase, catalase, *araC* family transcription regulator와 유사성이 있는 유전자임을 추정할 수 있었다(Fig. 7). pSCAT02에 대한 전체 염기서열을 분석한 결과 pSCAT02 클론은 염기서열 크기가 약 7.4 kbp인 6개의 ORF로 구성되어 있고 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, endonuclease, methyltransferase, catalase, AraC family transcription regulator 유전자 순으로 배열되어 있음을 확인하였다(Fig. 2-8)

2.3.6. Trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 염기 및 아미노산 서열 분석

pSCAT02에 대한 전체 염기서열을 분석한 결과, ORF1는 5'-말단쪽으로 약 250 bp의 염기가 결정되지 않는 1092 bp의 염기로만 구성된 유전자 단편임을 알 수 있었다 (Appendix I). 밝혀진 염기 서열을 근거로 이 ORF를 암호화하고 있는 폴리펩타이드는 trehalose-6-phosphate synthase로 밝혀졌다. 염기 서열을 근거로 아미노산 서열을 다중 비교한 결과(Appendix II),

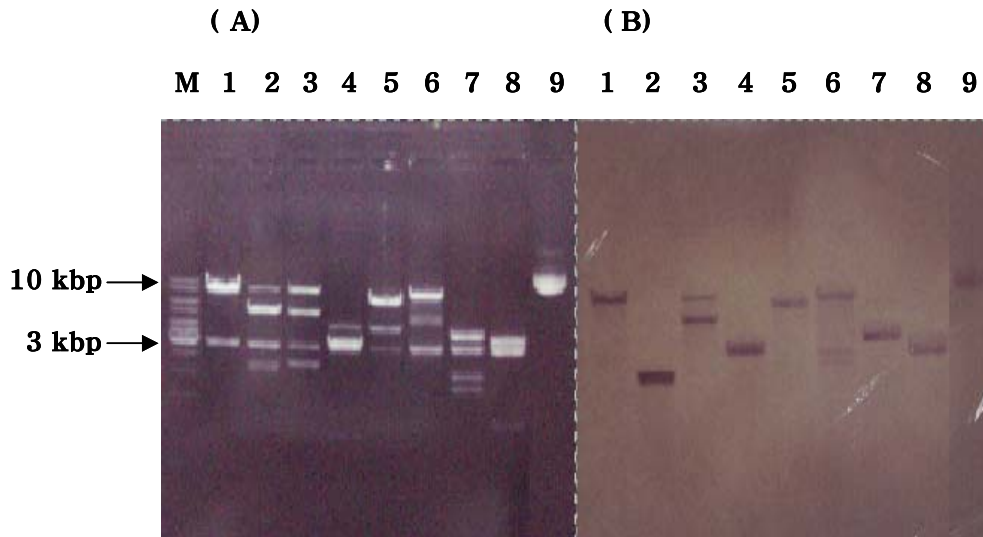


Fig. 2-6. Profiles of restriction fragments of the recombinant plasmid pSCAT02 containing the catalase gene cluster from *Rhodospirillum rubrum* S1. The restriction fragment patterns originated from pSCAT02 is shown in left panel (A). The signal indicating catalase gene by Southern hybridization with the catalase probe labeled with Dig kit is shown in right panel (B). Lane M, DNA size marker(Gene RulerTM 1 kb DNA ladder); 1, *EcoRI*; 2, *EcoRI*-*ApaI*; 3, *EcoRI*-*BamHI*; 4, *EcoRI*-*EcoRV*; 5, *EcoRI*-*HindIII*; 6, *EcoRI*-*NotI*; 7, *EcoRI*-*Sall*; 8, *EcoRI*-*XhoI*; 9, undigested

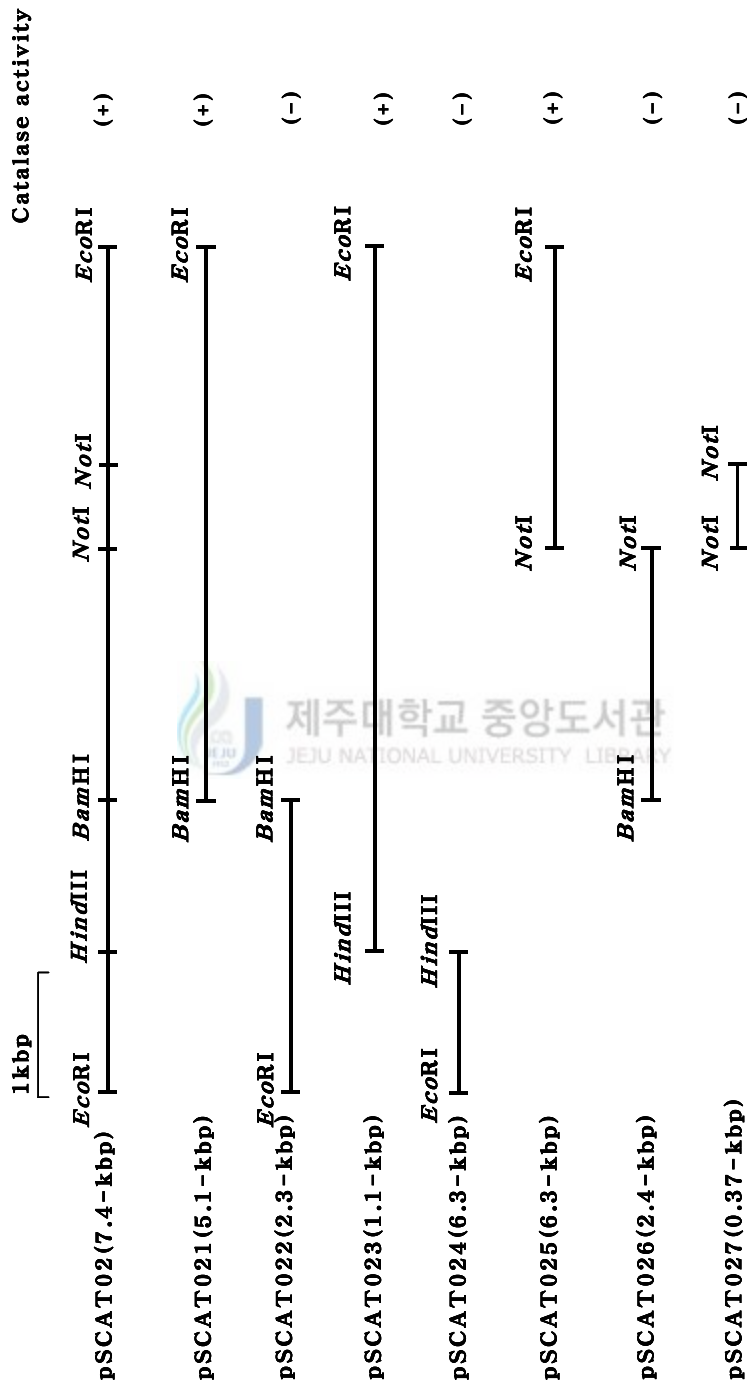


Fig. 2-7. Restriction enzyme map for the catalase gene cluster from *Rhodospirillum rubrum* S1. Catalase activity was determined by bubble test as described in Materials and Methods. The positive (+) marks indicate the catalase activity was observed in clones.

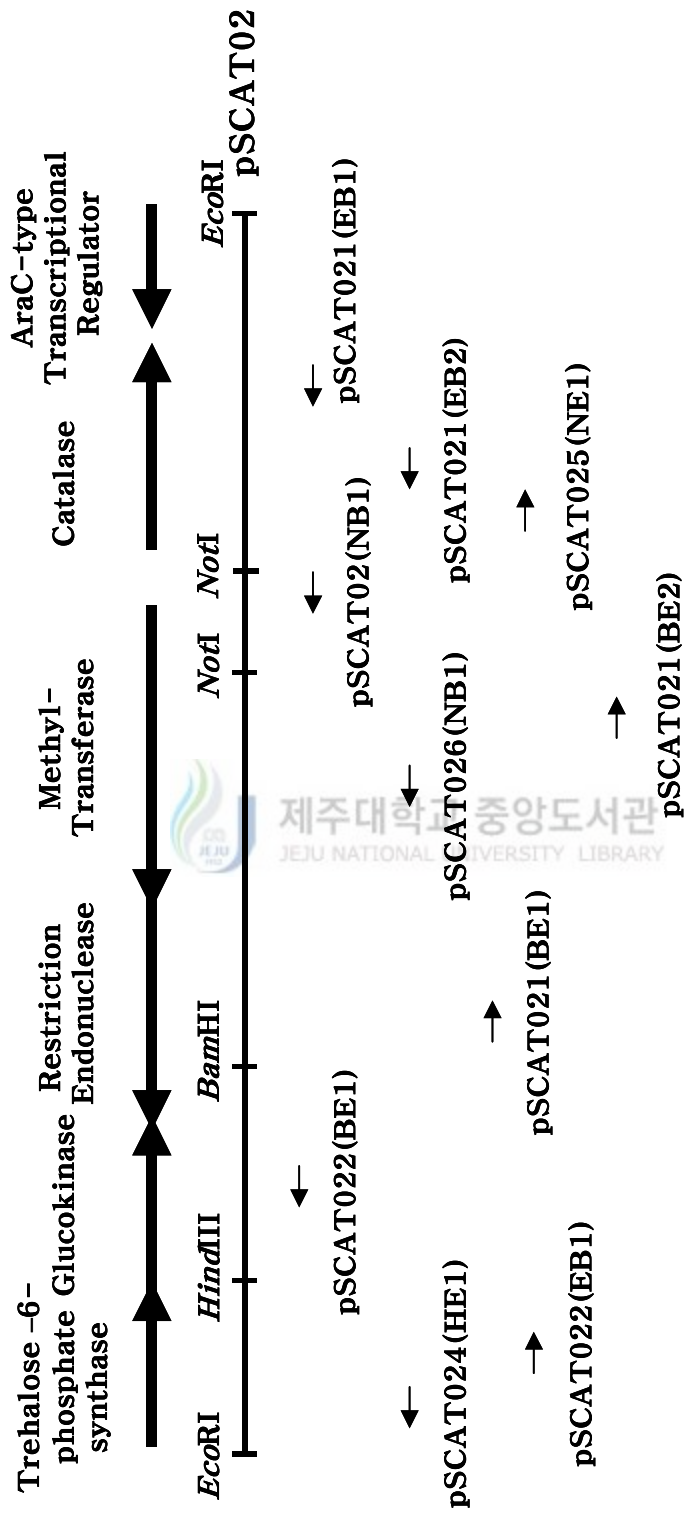


Fig. 2-8. DNA sequencing strategy used for the *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase gene cluster. The directions and extents of sequencing reactions are shown as solid arrows.

*Salmonella typhirium*의 trehalose-6-phospahte synthase 유전자인 *otsA*와는 47.8%, *Escherichia coli*의 *otsA*와는 47.7%, *Rhizobium* sp. NGR234의 *otsA*와는 41.9%, *Sinorhizobium meliloti*의 *otsA*와는 41.7%, *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306의 *otsA*와는 41.4%, *Ralstonia solanacearum*의 *otsA*와는 36.5%의 상동성을 보였다(Fig. 2-9).

Trehalose는 세균, 곰팡이, 효모, 식물, 곤충, 동물등 다양한 생물에서 발견되는 비환원성 2당류로서(Elbein, 1974), 세포내의 저장물질 또는 영양분 고갈 상태, 고온, anhydrobiosis, osmotic shock등과 같은 환경 스트레스에 대한 방어기작에 관여한다고 알려 있다(Van Laere, 1989; Wiemken, 1990).

*E. coli*에서 trehalose의 생합성은 UDP-glucose와 glucokinase-6-phosphate로부터 합성된다. 첫 번째 단계에서 trehalose-6-phosphate synthase (*otsA* 발현산물)에 의해 trehalose-6-phosphate를 생성한다. 두 번째 단계에서 treshalose-6-phosphate는 trehalose-6-phosphate phosphatase (*otsB* 발현산물)에 의해 탈인산화된다. Trehalose 생합성에 관여하는 *otsA*와 *otsB* 유전자는 *E. coli*의 linkage map의 42 min자리에 위치하고 있다. *E. coli*에서는 삼투 스트레스에 의해 유도되고(Larsen *et al.*, 1987; Giaver *et al.*, 1988; Arguelles, 2000), yeast에서는 trehalose를 축적하므로 산화적 스트레스에 저항성이 높다고 알려져 있다(Alvarez-peral, 2002). 광합성 세균에서는 trehalose가 compatible solute로 저장된다고 알려있다(Welsh *et al.*, 1998).

R. rubrum S1은 저장물질 및 삼투 스트레스 또는 산화적 스트레스등 다양한 스트레스에 대한 방어 수단으로서 trehalose 생합성에 관여하는 trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 존재가 필요할 것으로 판단된다.

2.3.7. Glucokinase 유전자의 염기 및 아미노산 서열분석

Trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 하류부위에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 978 bp의 염기로 이루어지며 326개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF가 위치하고 있음을 확인하였고, 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)으로 구성되었다. Trehalose-6-phosphate synthase를

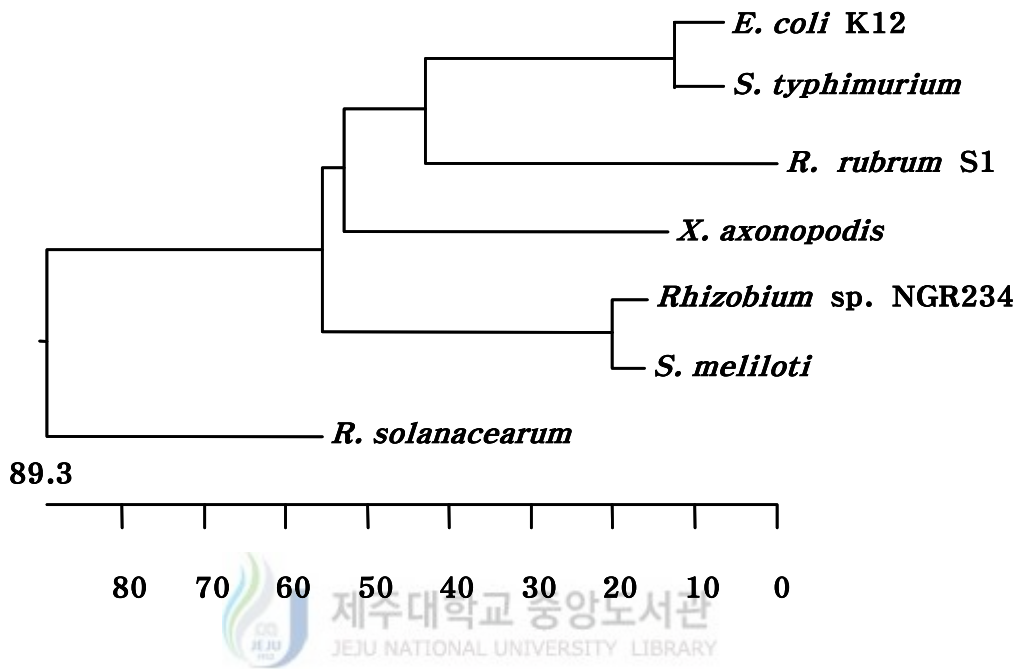


Fig. 2-9. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences deduced from nucleotide sequences of the putative trehalose-6-phosphate synthases from bacteria. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

암호화하는 유전자 말단의 6 bp는 glucokinase를 암호화하는 유전자의 개시 코돈과 중복되어 있음을 알 수 있었다. 유전자의 염기서열로부터 유추한 단백질의 분자량은 33,865 Da 이었으며 등전점이 7.18인 glucokinase로 확인되었다(Appendix I). 염기 서열을 근거로 아미노산 서열을 다중 비교한 결과, N-말단 서열부위에 ATP-binding(잔기 13에서 17) 부위 즉 phosphate-1 motif가 포함되어 있음을 알 수 있었다(Appendix II). 다른 생물의 glucokinase 아미노산 서열과 비교한 결과 *Helicobacteria pylori* J99와는 35%, *Neisseria meningitidis* MC58와는 34.7%, *Salmonella enterica*와는 34.6%, *Escherichia coli* K-12와는 34%, *Microbulbifer degradans* 2-40와는 33.3%의 상동성을 보였다(Fig. 2-10). Glucokinase는 인산기 공여체로 ATP 또는 polyphosphate를 이용하여 glucose의 인산화를 촉매하는 효소로서 대부분의 생물에 존재하고 있다. 당 수송에 관여하는 효소로 세균에서는 당이 존재하면 억제된다고 알려져 있다(Angell *et al.*, 1992). *glcK*에는 ATP binding site인 전형적인 AIDLGGT motif를 포함하고 있다(Arora *et al.*, 1990). 이 N-terminal ATP-binding motif은 glucose kinase와 hexokinase에 상당히 보존되어 있다(Schwab and Wilson, 1991). 세균 glucokinase의 단백질 분자량은 33~34 kDa으로 크기와 N-말단 서열의 ATP 결합 부위가 잘 보존되어 있는데(Concha and Leon, 2000), *R. rubrum* S1의 glucokinase에서도 단백질 분자량은 33.8 kDa이고 N-말단 서열에 ATP 결합부위(DIGGT)가 존재하는 것과 일치한다.

Pseudomonas aeruginosa(Cuskey, *et al.*, 1980)와 *Zymomonas mobilis* (Barnell, *et al.*, 1990)의 glucokinase 유전자는 포도당 수송과 대사에 관여하는 유전자들과 cluster를 이루는 것으로 밝혀졌으나 *R. rubrum* S1의 경우는 그렇지 않음이 밝혀졌다. *R. rubrum* S1의 glucokinase는 trehalose-6-phosphate synthase와 연계하여 trehalose 합성에 관여하는 것으로 판단된다.

2.3.8. Restriction endonuclease와 methyltransferase 유전자의 염기 및 아미노산 서열 분석

Glucokinase의 하류에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 restriction endonuclease와 methyltransferase가 연속으로 놓여 있음을 확인하였다. Restriction endonuclease는 1284bp의 염기로 구성되어 428개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었고, 개시코돈(ATG)와 종결코돈(TAA)으로 구성되어 있었다. Glucokinase를 암호화하는 유전자 말단의 4 bp는 restriction endonuclease를 암호화하는 유전자의 종결코돈(TAA)과 중복되어 있었다(Appendix I). 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 45,987Da 이었으며, 등전점은 6.395였다. 이 restriction endonuclease 의 상류에 바로 인접하여 또다른 하나의 ORF가 존재함을 확인하였고, 1836 bp의 염기서열로 이루어지며 611개의 아미노산을 암호화하는 methyltransferase로 확인되었다(Appendix I). 이 methyltransferase 유전자는 개시코돈(GTG)과 종결코돈(TGA)으로 구성되어 있었으며, restriction endonuclease 유전자의 개시코돈과 31 bp가 중복되어 있었다.

Methyltransferase사이에 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 64,003 Da이었으며 등전점은 9.329였다. 그리고 다른 생물의 아미노산 서열과 비교한 결과, restriction endonuclease는 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*와 50%의 상동성을, *Rhizobium leguminosarum*와 49%의 상동성을 보여주었고, methyltransferase는 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*와 52%의 상동성을, *Rhizobium leguminosarum*와 49%, 54%의 상동성을 보여주었다. Type II 제한효소의 구조는 비교적 간단하며, 대부분 30 ~ 65 kDa의 분자량을 가지고 있고, 한 가지의 소단위체로 이루어진다. Type II 제한효소는 4 ~ 8 bp의 비교적 짧은 palindromic sequence를 인식하여, 그 서열 안에서 또는 가까이에서 endonuclease 절단작용을 일으키며, adenine 이나 cytosine site에 methylation되는 기본적인 특징을 가지고 있다. DNA methylation은 원핵생물에서는 주로, 외부 DNA를 구별하기 위한 R-M system이나 mismatch repair system에서 작용하며, 진핵생물에서는 유전자 발현 조절, 발생 조절, mutagenesis 등에서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Cheng *et al.*, 1993). Type II 제한 효소는 지금까지 3000가지의 제한효소들이 다양한 세균으로부터 발견되었으며 (Pingoud and Jeltsch, 2001), 약 50

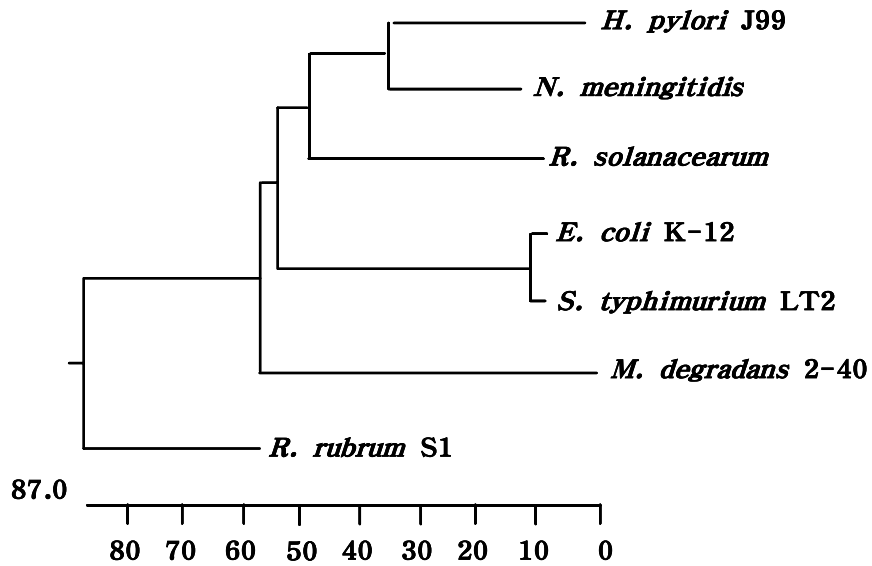


Fig. 2-10. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences deduced from nucleotide sequences of the putative glucokinase from bacteria. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

여개의 유전자들이 염기서열이 결정되었다(Wilson, 1991). Type II 제한효소는 상응하는 methylase나 다른 종류의 endonuclease와 어떠한 상동성도 보이지 않는다는 특성이 있으며 진화상으로 다른 근원에서 출발하였을 것이라는 가설이 제시되었다. endonuclease와는 달리 methylase는 다른 Type II methylase와 유사한 아미노산 서열을 갖고 있다. Type II 제한효소의 유전자는 DNA상에 cluster를 이루어 존재하고 있다. R-M gene cluster내에 유전자 발현 조절에 관여하는 controller를 coding하는 ORF가 존재한다는 사실이 새롭게 발견되었으며, 이 C단백질이 helix-turn-helix DNA binding motif를 갖는 것으로 보아 transcriptional repressor나 activator로 작용할 것으로 보인다(Anderson, 1993). *Rhodospirillum rubrum* S1의 restriction endonuclease와 methylase 유전자는 Type II R-M system에 속하며, cluster를 이루고 있음을 알 수 있었다, 그리고 helix-turn-helix DNA binding motif가 없는 것으로 판단된다.

2.3.9. Catalase 유전자의 염기 및 아미노산 서열 분석

Methyltransferase 유전자의 상류에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 326 bp로 이루어져 있는 intergenic space가 존재하고 있고, catalase 유전자가 역방향으로 위치해 있음을 확인하였다. 이 catalase 유전자는 개시 코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)을 포함하여 1455 bp 염기로 이루어지며 484개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 개시코돈(ATG)의 6 bp 상류에 ribosomal binding site(GGAGA)가 존재하고 있었다(Appendix I). 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 54,316 Da 이었으며 등전점은 6.468였다. 아미노산 서열을 분석한 결과, 활성부위의 H53, S92, N126들과, heme의 distal site와 결합할 부위는 V94, T116, F131들이었으며, 그리고 Y336, R343 잔기는 heme의 proximal site로 상동성 잘 보존되어 있다(Appendix II). 아미노산 서열을 바탕으로 hydropathy profile상에서 소수성 domain을 형성하게 된다 (Fig. 2-11). 다른 생물에서 분리된 catalase의 아미노산을 비교한 결과, *Brucella melitensis*와는 85%, *Sinorhizobium meliloti*와는 84%, *Neisseria meningitidis* MC58와는 72%,

Haemophilus influenzae KW20와는 72%, *Pseudomonas putida*와는 70%, *Proteus mirabilis*와는 69%, *Bacillus subtilis*와는 68%, *Bacteroides fragilis*와는 68%, *Desulfovibrio vulgaris*와는 66%로 높은 상동성을 보여 보존되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-12). Catalase의 구조적 연구는 bovine liver에서 활발히 연구되었는데 위에서 언급한 결합 부위외에 NADPH와 물분자 결합 부위가 존재한다. 이 부위는 monofunctional catalase를 true catalase (typical catalase)와 atypical catalase로 구분할 수 있는 구조적 특징을 나타내는 것으로 알려졌다. NADPH와 물분자가 결합하는 부위의 아미노산 잔기들을 보면 His304 부위는 NADPH의 pyrophosphate기의 결합부위, His214, Lys236, Try214는 물분자가 결합하는 부위로서 typical catalase에서 잘 보존되어 있다(Ossowski *et al.*, 1991). *R. rubrum* S1에 존재하는 catalase 아미노산 서열을 분석한 결과 His263 부위를 포함하는 NADPH의 결합부위, His193, Lys195, Try173를 포함하는 물분자 결합하는 부위가 잘 보존되어 있으므로 *R. rubrum* S1의 catalase는 typical catalase로 판단된다.

2.3.10. Transcriptional regulator 유전자의 염기 및 아미노산 분석

Catalase 유전자의 1455 bp의 하류에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 catalase 유전자의 종결코돈로부터 69 bp 위치에 transcriptional regulator 유전자의 종결코돈(TAA)이 있었고 3' -말단으로부터 426 bp의 단편 ORF로 구성된 염기서열이 결정되었다(Appendix I). 아미노산 서열을 분석한 결과, C-말단 부위에 helix-turn-helix DNA binding domain이 포함되어 있어 AraC 집단에 속하는 transcriptional regulator와 유사함을 알 수 있었다(Appendix II). 이 transcriptional regulator 유전자의 아미노산 서열을 다른 종의 것과 비교 분석한 결과(Fig.21), *Pseudomonas aeruginosa*의 probable transcriptional regulator와는 49.3%, *Xanthomonas campestris*의 AraC transcriptional regulator와는 49.2%, *Streptomyces coelicolor*의 probable transcriptional regulator와는 48%, *Agrobacterium*의 AraC transcriptional regulator와는 42.6%, *Yersinia pestis*의 transcriptional

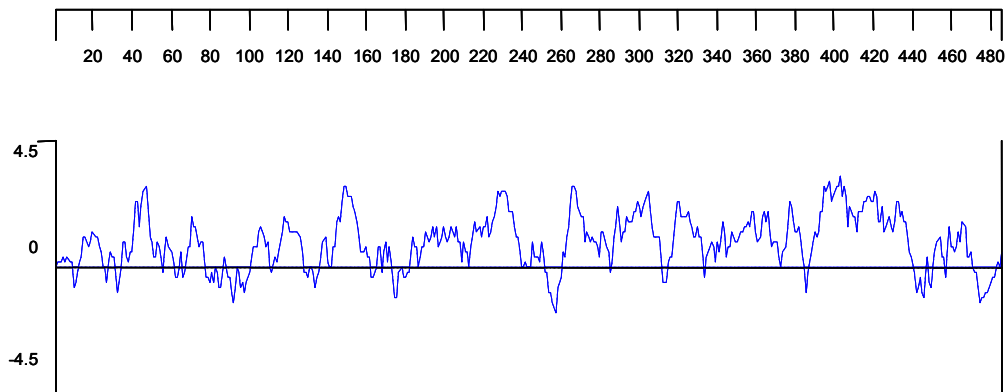


Fig. 2-11. Hydropathy profile of amino acid sequence deduced from nucleotide sequence of the putative catalase from *Rhodospirillum rubrum* S1. The hydropathy value of each amino acid was calculated by the algorithm of Kyte & Doolittle(1982). Values above the horizontal line indicate the hydrophobic regions, and those below the horizontal line indicate the hydrophilic regions.

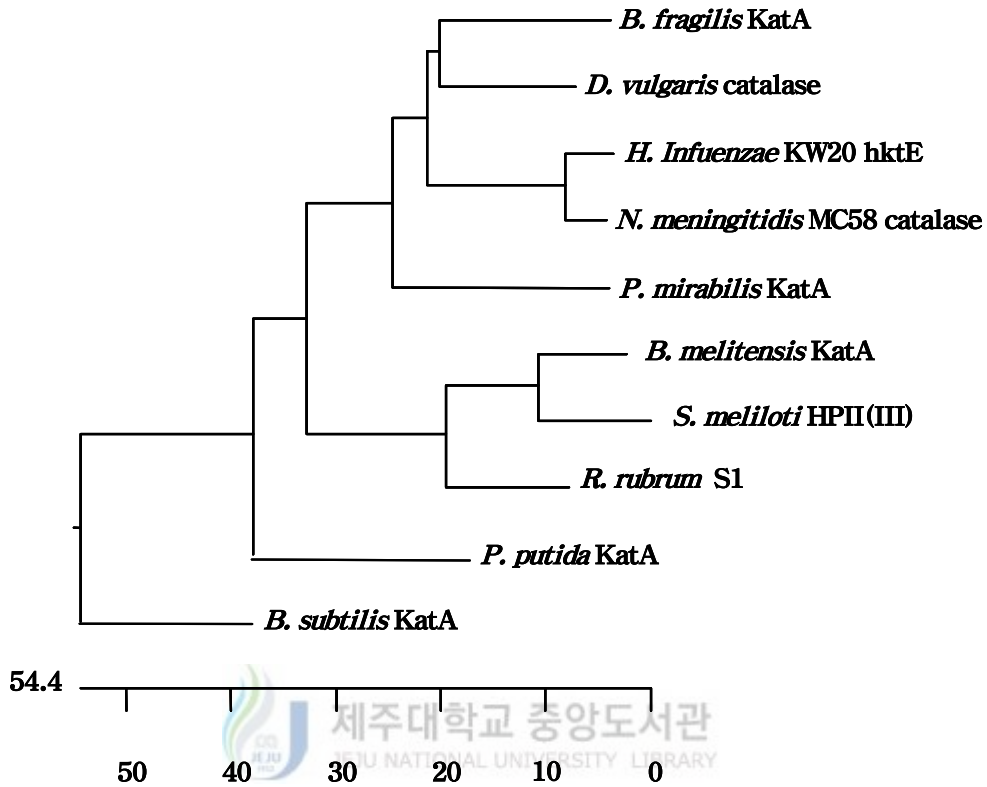


Fig. 2-12. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences deduced from nucleotide sequences of the putative catalase from bacteria. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

regulator와는 42%의 상동성을 보였다 (Fig. 2-13).

전사 조절인자의 정확한 기능은 알 수 없으나 다양한 세균, 특히 *E. coli*에서 AraC/XylC 집단에 속하는 단백질의 종류를 해보면 AraC 비롯하여 당 대사에 관여하는 전사 조절인자, MarA, SoxS, 등 산화적 스트레스에 관여하는 전사 조절인자들이 포함되어 있다(Gallegos *et al.*, 1997).



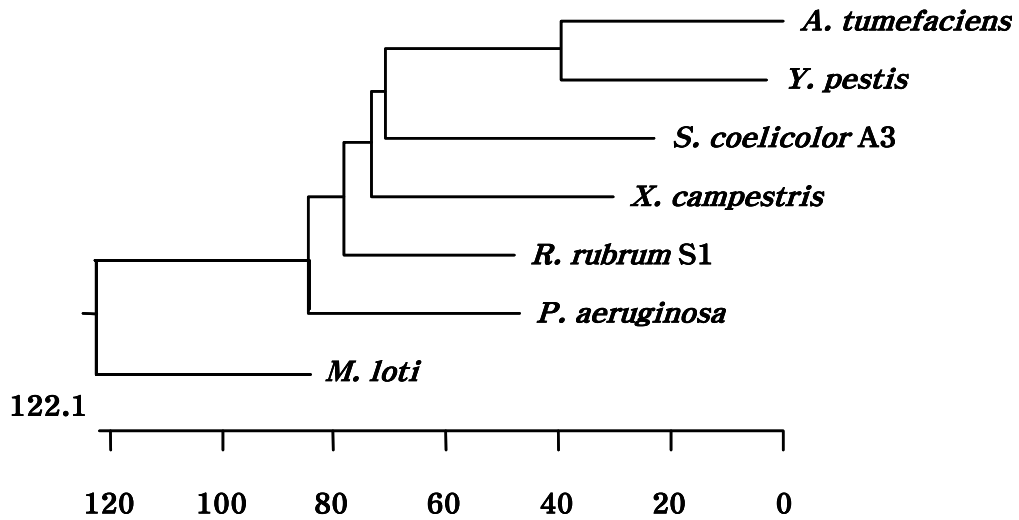


Fig. 2-13. Phylogenetic tree based on multiple alignment of amino acid sequences deduced from nucleotide sequences of putative transcriptional regulator from bacteria. The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events.

2.4. 요약

다양한 대사능력을 가진 광합성세균인 *Rhodospirillum rubrum* S1에서 발현되는 catalase 및 관련유전자를 분석하기 위해 분자생물학적 기술을 이용하여 catalase gene cluster를 cloning하고, 그 유전자들의 구조 및 분자생물학적 특성을 분석하였다. *R. rubrum* S1의 게놈 DNA를 증폭하여 245 kbp의 PCR산물을 얻었고, 이 PCR 산물을 탐침으로 하여 Southern hybridization을 실시한 후 catalase 유전자가 함유한 재조합 플라스미드를 cloning하여 *E. coli* UM255에 형질전환한 후 발현시켰다. 그 결과 7.4 kbp의 삽입체를 가지는 한 개의 clone을 얻었으며, 이 clone을 pSCAT02라 명명하였다. pSCAT02에 대해 염기 서열을 분석한 결과 6개의 ORF으로 구성되어 있고 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, transcriptional regulator 유전자 순으로 배열되어 있음을 알 수 있었다. trehalose-6-phosphate synthase 유전자는 5'-말단쪽으로 약 250 bp의 염기가 결정되지 않는 1092 bp의 염기로만 구성된 유전자 단편임을 알 수 있었고, *Salmonella typhirium*의 trehalose-6-phospahte synthase 유전자인 *otsA*와는 47.8%, *Escherichia coli*의 *otsA*와는 47.7%의 상동성을 보였다. Glucokinase 유전자는 trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 하류에 있으며, 978 bp 염기서열로 이루어지며 326개의 아미노산 서열로 구성되어 있었다. 염기서열로부터 유추한 단백질의 분자량은 33,865 Da 이었으며 등전점이 7.18이며, N-말단 서열 부위에 ATP-binding(잔기 13에서 17) 부위가 포함되어 있음을 알 수 있었다. *Helicobacteria pylori* J99와는 35%, *Neisseria meningitidis* MC58와는 34.7%의 상동성을 보였다. Restriction endonuclease 유전자는 1284 bp의 염기서열로 구성되어 있으며, 428개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 45,987 Da 이었으며, 등전점은 6.395였다. 이 restriction endonuclease의 상류에 바로 인접하여 또다른 하나의 ORF가 존재함을 확인하였고, 1836 bp의 염기서열로 이루어지며 611개의 아미노산을 암호화하는 methyltransferase로 확인되었

다. 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 64,003 Da이었으며 등전점은 9.329였다. Restriction endonuclease는 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*와는 50%, *Rhizobium leguminosarum*와는 49%의 상동성을 보였고, methyltransferase는 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*와는 52%, *Rhizobium leguminosarum*와는 54%의 상동성을 보여주었다.

Methyltransferase 유전자의 upstream상에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 326 bp로 이루어져 있는 intergenic space가 존재하고 있고, catalase 유전자가 역방향으로 위치해 있음을 확인하였다. 이 catalase 유전자는 1455 bp 염기서열로 이루어지며 484개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)으로 구성되어 있으며, 개시코돈(ATG)의 6 bp upstream에 ribosomal binding site(GGAGA)가 존재하고 있었다. 염기 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 54,316 Da 이었으며 등전점은 6.468였다. 아미노산 서열을 분석한 결과, 활성부위의 H53, S92, N126들과, heme의 distal site와 결합할 부위는 V94, T116, F131들이었으며, 그리고 Y336, R343 잔기는 heme의 proximal site로 상동성이 잘 보존되어 있다. *Brucella melitensis*의 catalase와는 85%, *Sinorhizobium meliloti*와는 84%로 높은 상동성을 보여 상당히 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. AraC transcriptional regulator 유전자는 catalase 유전자의 1455 bp의 하류에 위치하고 있으며, catalase 유전자의 종결코돈로부터 69 bp 떨어져 종결코돈(TAA)이 있었고 3'-말단으로부터 426 bp의 단편 ORF로 구성된 염기서열이 밝혀졌다. 아미노산 서열을 분석한 결과, C-말단 부위에 helix-turn-helix DNA binding domain이 포함되어 있었고, *Pseudomonas aeruginosa*의 probable transcriptional regulator와는 49.3%, *Xanthomonas campestris*의 AraC transcriptional regulator와는 49.2%의 상동성을 보였다.

3. *Escherichia coli*에서 발현된 Catalase의 생화학적 특성분석

3.1. 서 론

산소가 풍부한 환경에서 존재하는 생명체들은 호기성 대사를 하는 동안, superoxide radical, hydroxyl radical, 그리고 hydrogen peroxide와 같은 활성산소들은 산소분자의 불완전한 환원의 결과로 발생하며, 또한 다양한 내인성 또는 환경적인 요인에 의해서도 나타난다(Hassan and Fridovich, 1979; Fridovich, 1986; Farr and Kogoma, 1991; Salin, 1991). 이에 대하여 모든 호기성 생물체는 hydroperoxidase라고 일컬어지는 heme 단백질 group을 생산하여 superoxide radical, hydroxyl radical, 그리고 hydrogen peroxidase와 같은 활성산소를 억제하는 효소계를 가지고 있다. 이들은 두 그룹의 단백질로 구성되어 있는데, 여기에 catalase와 peroxidase가 포함되어 있다.

Catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 일종의 산화환원효소(oxidoreductase)로써, 지금까지 모두 70여종이 알려져 있으며, 미생물에서 동·식물에 걸쳐 광범위하게 존재한다. 이 중 식물이나 동물 그리고 균류를 포함하는 진핵 생물의 catalase가 약 45종이고, 원핵 생물의 catalase가 약 29종으로 효소적 특성에 따라 typical catalase (monofunctional), catalase-peroxidase (bifunctional), manganese catalase(non-heme) 3개의 그룹으로 구분할 수 있다. typical catalase는 동·식물 및 미생물에서 발견되는 서로 유사한 특징을 가진 catalase 그룹으로 동일한 크기의 소단위 4개로 구성되어 있으며, 각 소단위 당 하나의 ferric heme prosthetic group(protoporphyrin IX)을 가지고 있고, 분자량은 225~270 kDa 범위에 해당된다. pH 5~10의 범위에서 같은 정도의 효소활성을 나타내고(Schonbaum and Chance, 1976), 억제물질인 3-amino-1,2,4-triazole에 대

하여 특이적으로 비가역적인 억제를 나타낸다(Magoliash *et al.*, 1960). 그리고 ethanol/chloroform 처리에 안정하고 (Nadler *et al.*, 1986), phenyl-sepharose 에 흡착하는 소수성을 가지고 있다(Nahmias and Bewley, 1984).

Catalase-peroxidase는 typical catalase와 달리 지금까지 미생물에서만 발견되는 것으로서 한 효소가 catalase 활성과 peroxidase 활성을 동시에 가지며 typical catalase와는 다르게 분자량이 다양하고, 이는 특정 pH에서 최적의 활성을 나타내며, 억제물질인 3-amino-1,2,4-triazole에 활성이 억제되지 않는다, 또한 Ethanol/Chloroform 혼합용액 처리에 불안정하고 온도에 대해서도 typical catalase보다 더 민감하다. 전반적으로 typical catalase보다 여러 가지 자극에 대해서 불안정하다(Hochman and Goldberg, 1991). 이와 같이 여러 미생물에서 두 가지 이상의 서로 다른 catalase 존재하는 것으로 알려져 있고 미생물에 따라 발현 양상과 생물학적 기능이 다르게 나타난다.

*E. coli*에서는 두개의 catalase HPI 과 HPⅡ가 존재하며 HPI은 81kDa의 소단위체로 구성된 tetramer로서 두 개의 protoheme IX group을 가지고 있으며(Claiborne and Fridovich, 1979), HPⅡ는 93 kD의 동일한 분자량을 가지는 소단위체로 구성된 hexamer이며(Lowen and Switala, 1986), 소단위체 당 1개의 heme d 그룹을 가지고 있다 (Chiu *et al.*, 1989). 그리고, 세포가 정체 성장기에 들어가거나 TCA회로의 중간산물을 이용하여 성장할 때 합성이 유도되는 것으로 알려져 있다 (Loewen *et al.*, 1985).

광합성 세균에서의 catalase에 대한 연구는 *Rhodobacter spheroides* (Terzenbach and Blaut, 1998)와 *Rhodobacter capsulatus* (Hochman *et al.*, 1992)등에서 보고되었다.

본 연구는 환경조건에 따라 다양한 대사능력을 지닌 광합성 세균인 *R. rubrum* S1의 클론된 catalase 유전자를 *E. coli*에서 대량발현시켜 얻어진 catalase를 정제하여 생화학적 특성을 분석하고자 실시하였다.

3.2. 재료 및 방법

3.2.1. 사용기기 및 시약

효소의 분리과정에는 chromatography system과 Model 491 prep cell (Bio-Rad Co., California, USA)를 효소의 활성 측정과 흡광 스펙트럼을 얻기 위해서는 UV/Visible Spectrophotometer(Hewlett packard, USA)를, 세포를 수확하기 위해서는 원심분리기 Supra 22K(Hanil, Korea)를, 세포를 파쇄하기 위해서는 Ultrasonicator(Bandelin sonopuls HD2070, Germany)를, 분석용 전기영동 장치는 Mini-PROTEIN II(Bio-Rad Co., California, USA)와 SE600(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)를 사용하였다. 표준 단백질은 Bio-Rad (California, USA)의 제품을, Phenyl-sepharose CL-4B resin의 기타 시약들은 Sigma Chemical(St Louis, USA)와 Merck(Germany), Junsei Chemical(Japan)사의 제품을 사용하였다.



3.2.2. 균주 및 배양조건

형질 전환용 숙주세포로는 *E. coli* UM255를 사용하였다. 형질 전환된 *E. coli* 균주인 UM255는 ampicillin(50 μ g/mL)이 함유된 LB (Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g per liter) 배지 5 L에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하였다(Sambrook, 1989).

3.2.3. *E. coli*에서 발현된 재조합 catalase 정제

3.2.3.1. 세포추출액의 준비

Rhodospirillum rubrum S1의 catalase gene이 재조합된 plasmid(pSCAT025)를 함유하고 있는 *E. coli* UM255 세포를 16시간 배양한 배양액을 냉동원심분리기로 4 $^{\circ}$ C에서 10,000 \times g으로 30분간 원심분리하여 세균을 수확한 후 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 3 ~ 4회 세척하였다. 수확된

균은 초음파 파쇄기를 이용하여 1분씩 15회, 총 15분간 파쇄시켰다. 파쇄된 균은 다시 4°C에서 1시간 동안 12,000 × g으로 원심분리한 후 상정액을 수집하여 조효소액으로 하였다.

3.2.3.2. 황산암모늄 분획

조효소액에 황산암모늄을 30%되도록 처리하여 4°C에서 1시간동안 방치한 후, 4°C, 30분간 12,000 × g에서 원심분리한 후 상정액을 취하고 여기에 다시 황산암모늄을 더 첨가하여 70% 포화용액이 되도록 처리하여 4°C에서 1시간동안 방치한 후, 4°C, 30분간 12,000 × g에서 원심분리하여 침전물을 만들었다. 이 침전물에 1 mM EDTA가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)을 넣어 현탁시켰다.

3.2.3.3. Phenyl-Sepharose CL-4B 소수성 상호작용 크로마토그래피

현탁시킨 시료를 1M 황산암모늄이 포함된 완충용액(1 mM in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0)으로 미리 평형화시킨 phenyl-Sepharose CL-4B column (2.5 × 10 cm)에 얹고, 50 mL의 동일용액으로 먼저 용출한 후 1 M ~ 0 M 황산암모늄이 포함된 완충용액(1 mM EDTA in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8)를 일정농도 기울기로 용출시켰다. 용출속도는 1 mL/min이고, 5 mL씩 분획물을 받았고 catalase 활성이 있는 분획물을 모아 ultrafiltration (Amicon YM-10, USA)을 하여 농축한 후 4°C에서 18시간 동안 투석시켰다.

3.2.3.4. Prep-cell electrophoresis

Bio-Rad Model 491 prep cell column(3.7×14 cm)에 7.5%의 분리용 겔을 만들어(11 cm) 4°C에서 서서히 굳힌 후, stacking gel을 11 cm정도 올린다. Stacking 겔 위에 염색액과 혼합된 시료를 얹고 high pH continuous buffer system으로 전기영동하였다. 전기영동의 조건은 200 V, 40 mA로 4°C에서 행하였고, 용출속도는 0.5 mL/min으로 8 mL씩 분획물을 받았다. catalase 활성이 높은 분획물을 7.5% PAGE하여 순수정제 여부를 확인하였다.

3.2.4. Catalase 활성 염색법

Mini-PROTEIN II system을 이용하여 7.5% nondenaturing polyacrylamide slab gel상에서 전기영동을 수행하였다. 활성 염색은 Wayne과 Diaz(1986)가 사용한 ferricyanide 염색법을 이용하였다. 겔을 증류수로 두·세 차례 행군 다음, 증류수 100 mL에 30% H₂O₂를 50 μ L 녹인 용액에 담그고 10분 동안 흔들었다. 용액을 버리고 증류수로 한 차례 행군 다음, 2% ferric chloride, 2% potassium ferricyanide 용액을 각각 25 mL씩 부은 후, light box에서 천천히 흔들어 주었다. Catalase 활성을 보이는 위치만 제외하고 겔 전체가 초록색으로 음성 염색이 이루어졌다.

3.2.5. 단백질 정량

단백질의 양은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다. Column fraction의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도를 이용하였다.



3.2.6. 재조합 catalase의 활성도 측정

10 mM H₂O₂를 포함한 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8)에 적당량의 효소시료를 넣고, 240 nm에서의 흡광도 감소로 활성도를 계산하였다. 효소의 활성 단위는 1분 동안 1 μ mol의 H₂O₂ ($\epsilon_{240}=43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다(Beers and Sizer, 1952).

3.2.7. 재조합 효소의 분자량 측정

효소의 소단위체 분자량을 측정하기 위해 Laemmli(1970)의 방법에 따라 실시하였다. 전기영동은 12.5% SDS-polyacrylamide running과 4% stacking gel로 구성된 vertical slab gel 장치를 사용하여 stacking gel에서는 80V, running gel에서는 100V의 전압으로 수행하였다. 전기영동 시료는 시료용 완충 용액(60mM Tris-HCl pH 6.8, 0.02% bromophenol blue, 2% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM β -mercaptoethanol)과 혼합하여 5분간 중

탕하여 사용하였다. 분자량을 측정하기 위한 표준 단백질로는 phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean tyrosin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa)등을 사용하였다.

효소의 전체 분자량은 표준완충액으로 미리 평형화한 superose-12HR 10/30 column을 이용한 gel filtration 방법으로 결정하였다. 분자량을 측정하기 위한 표준 단백질로는 ferrin(386 kDa), catalase(209 kDa), aldolase(179 kDa), bovine serum albumin(66 kDa), carbonic anhydrase(29.4 kDa)등을 사용하였다.

3.2.8. 제조합된 효소의 특성조사

3.2.8.1. 효소의 활성화에 대한 온도와 pH의 영향

정제된 효소의 활성화에 대한 온도의 영향을 알아보기 위해 각 효소 활성 측정용액을 20℃ ~ 70℃까지 5℃간격으로 준비하여 각각의 온도에서 10분동안 처리한 후 catalase 활성을 측정하였다.

정제된 효소의 활성화에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 3.0 ~ 7.0), 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0 ~ 9.0), 50 mM carbonate buffer(pH 10.0 ~ 11.0)을 0.5단위로 준비하여 효소에 기질을 넣고, 상온에서 10분 간 반응시킨 후 catalase 활성을 240 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다.

3.2.8.2. 효소의 활성화도에 대한 저해제들의 효과

3-amino-1,2,4-triazole을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)에 10 mM이 되도록 녹인 후, 적당량의 효소 시료를 넣고 10분간 상온에서 보관한 후, catalase활성을 측정하였다. 유기용매에 대한 효과는 효소시료, ethanol, chloroform을 10 : 5 : 3으로 혼합시킨 후, 실온에서 10분 동안 혼합하여 각각 catalase 활성을 각각 240 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다. 금속 저해제들에 대한 효과는 농도별로 준비한 sodium cyanide, sodium

azide, hydroxylamine을 각각 효소 시료와 섞어 2분간 반응시킨 후 활성을 측정하여 표준곡선을 작성함으로써 50% 억제 농도를 구하였다.

3.2.8.3. 효소와 기질의 반응성

K_m 값을 결정하기 위해서 catalase 활성에 대해 5, 10, 30, 40, 50, 60 mM의 H_2O_2 농도를 준비한 후 효소의 반응속도를 측정하였다.

3.2.8.4. 효소의 분광학적 분석

흡광스펙트럼측정은 UV/Visible Spectrophotometer를 사용하였으며, 1 cm quartz cuvette를 사용하여 250 nm~800 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 환원은 동일한 효소의 양에 $Na_2S_2O_4$ 를 최종농도가 1 mM이 되도록 처리하였고, CN-ligated form은 KCN을 10 mM이 되도록 처리하여 사용하였다.



3.3. 결과 및 고찰

3.3.1. *E. coli*에서 catalase 유전자의 대량발현 및 효소의 순수 분리

*E. coli*에서 대량발현된 *R. rubrum* S1 catalase를 여러 단계의 정제 절차에 따라 순수 분리한 결과, catalase의 정제 단계에 사용된 조효소의 총 단백질량과 총 활성도는 각각 1000 mg과 2915000 U로 나타났으며, 최종 정제된 catalase는 5.3 mg과 123853 U였다. 그리고 비활성도는 조효소에서 146 U/mg로, 정제된 효소에서는 13273 U/mg으로 나타났고, 그리고 catalase의 수율은 4.2%였으며, 정제 배수가 91배로 증가한 효소시료 5.3 mg을 얻을 수 있었다(Table 3-1). 분리된 효소의 순도를 알아보기 위해서 SDS-Polyacrylamide 겔 전기영동 및 nondenature PAGE 전기영동을 하였다. 그 결과 오직 한 종류의 폴리펩타이드 밴드만 관찰되었는데, 이로써 분리한 재조합 catalase가 순수하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3-1).

3.3.2. *E. coli*에서 정제된 catalase 효소의 분자량 결정

효소의 소단위체의 분자량을 결정하기 위해 12% SDS-polyacrylamide 겔 전기 영동을 실시한 결과, 재조합 catalase 소단위체의 위치를 다른 표준 단백질의 위치와 비교해 본 결과, 분자량은 약 61 kDa이었다 (Fig. 3-2A). Superose 12HR 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 결정된 native catalase의 분자량은 189 kDa으로 나타났고(Fig. 3-2B).

일반적으로 catalase는 동일한 크기의 4개의 소단위체로 구성되어 있고 분자량은 225 kDa에서 270 kDa정도이지만, 세균에서는 여러 가지 종류의 catalase를 갖고 있다. *Proteus mirabilis*의 경우 240 kDa의 catalase를 갖고 있고(Jouve *et al.*, 1983), *E. coli*의 경우 HP I 은 81 kDa 크기의 subunit가 4개로 구성되어 있으며(Calborne and Fridivoch, 1979), HP II는 93kDa 크기의 subunit가 6개로 구성되어 있다고 보고되어 있다(Loewen and Switala, 1986). *Desulfovibrio gigas*는 분자량이 186 kDa으로 3개의 동일한 소단위체(Wagner *et al.*, 2000), *Bacteroides fragilis*는 분자량이 130 kDa인

Table 3-1. Purification of recombinant *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase from *E. coli* UM255

Step	Total Protein (mg)	Total Activity(U)	Specific Activity (U/mg of protein)	Yield	Purification (fold)
Crude extract	1000	2915000	146	100	1.0
30%~70% ammonim sulfate	413	1539251	220	53	1.4
Phenyl sepharose CL-4B	70	377370	3412	13	23.4
Electroelution	5.3	123853	13273	4.2	91

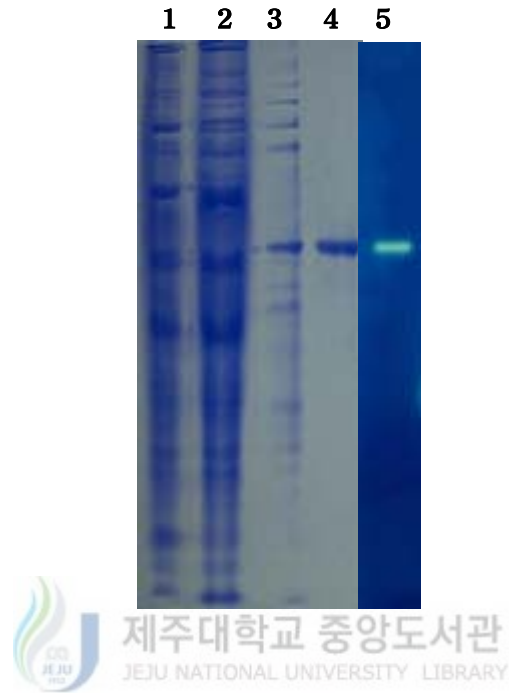


Fig. 3-1. Nondenature polyacrylamide gel electrophoresis for *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255 by overexpression of the catalase gene in the recombinant plasmid pSCAT02. Lane; 1,2,3,4 show total peptide profiles stained with Coomassie Brilliant R-250 at each catalase purification step. Lane; 1, crude extract; 2, 30% ~ 70% ammonium sulfate cut; 3, phenyl-sepharose fraction; 4, prep-cell electrophoration fraction. Lane; 5 shows one catalase band observed by activity staining.

2개의 동일한 소단위체(Rocha and Smith, 1995) *Desulfovibrio vulgaris*는 분자량이 232 kDa인 4개의 동일한 소단위체(Hatchikian *et al.*, 2000), Bovine liver는 분자량이 240 kDa인 4개의 동일한 소단위체로(Deisseroth and Dounce, 1970), *Rhodobacter spheroides*는 분자량이 143 kDa인 75 kDa and 68 kDa 소단위체로 이루어져 있다(Terzenbath and Blaut, 1998). *R. rubrum* S1 catalase는 61 kDa 크기의 동일한 소단위체가 3~4개로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

3.3.3. *E. coli*에서 정제된 효소의 활성화에 대한 pH와 온도의 영향

정제된 효소의 활성화에 대해 pH와 온도의 영향을 살펴본 결과, catalase 활성이 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 보였고 pH 5.5 ~ pH 11.0까지 넓은 범위의 pH에 대해 높은 활성을 보였고(Fig. 3-3), 효소 활성화에 대한 온도의 영향은 20°C에서 5°C간격으로 70°C까지 10분간 반응시킨 후 효소 활성을 조사 해 본 결과 catalase의 활성은 30°C에서 최적이었으나 70°C에서는 거의 활성을 나타나지 않았다. 그리고 20°C에서 60°C까지 효소의 활성이 안정한 것을 알 수 있었다(Fig. 3-4). 이는 전형적인 catalase들의 활성이 넓은 범위의 pH와 온도에 대해 높은 활성을 나타내는데 특히 *K. pneumoniae*의 typical catalase인 KpT(Hochman and Goldberg, 1991), *R. rubrum*의 catalase(Nadler, *et al.*, 1986), *E. coli*의 HPⅡ(Nadler, *et al.*, 1986), *Vibrio rumoiensis*의 catalase(Yumoto, *et al.*, 2000)들이 넓은 범위의 pH와 온도에 대해 활성을 보이는 결과와 같이 *E. coli*에서 정제된 catalase도 넓은 범위의 pH와 온도에 대해 활성을 갖는 특성을 보이므로 전형적인 catalase로 판단된다.

3.3.4. *E. coli*에서 효소의 활성화에 대한 저해제의 효과

정제된 catalase에 전형적인 catalase의 저해제인 3-amino-1,2,4-triazole(AT)로 처리한 결과, 효소의 활성이 74%정도 유지되었다. 유기용매에 대해 80%정도 활성이 유지되는 반면. 식물체에서의 catalase의 저해제로 알려진 salicylic acid에 대해서는 상당히 활성이 감소되었다(Table 3-2). Typical catalase는

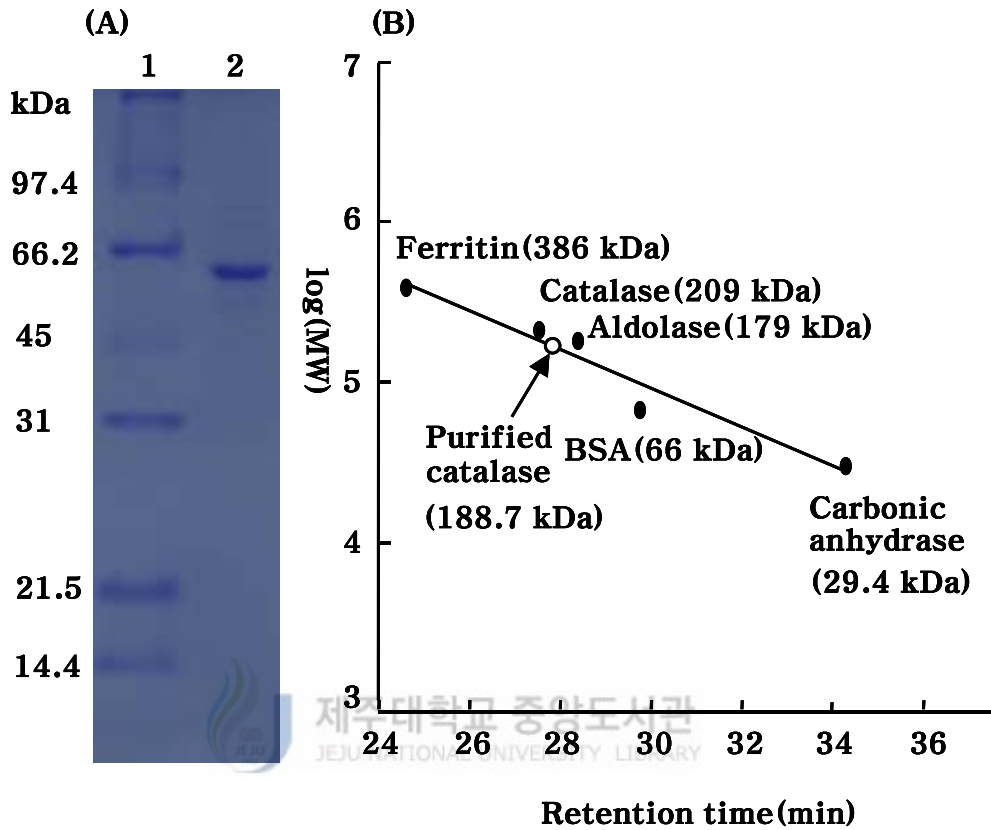


Fig. 3-2. Determination of the molecular weight of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. Left panel(A) shows denaturing SDS-PAGE of *R. rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. The protein was stained with Coomassie Brilliant R-250. Lane; 1. The protein marker; phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa); 2, purified enzyme. Right panel(B) shows molecular weight of native *R. rubrum* S1 catalase purified by gel filtration Superose 12HR.

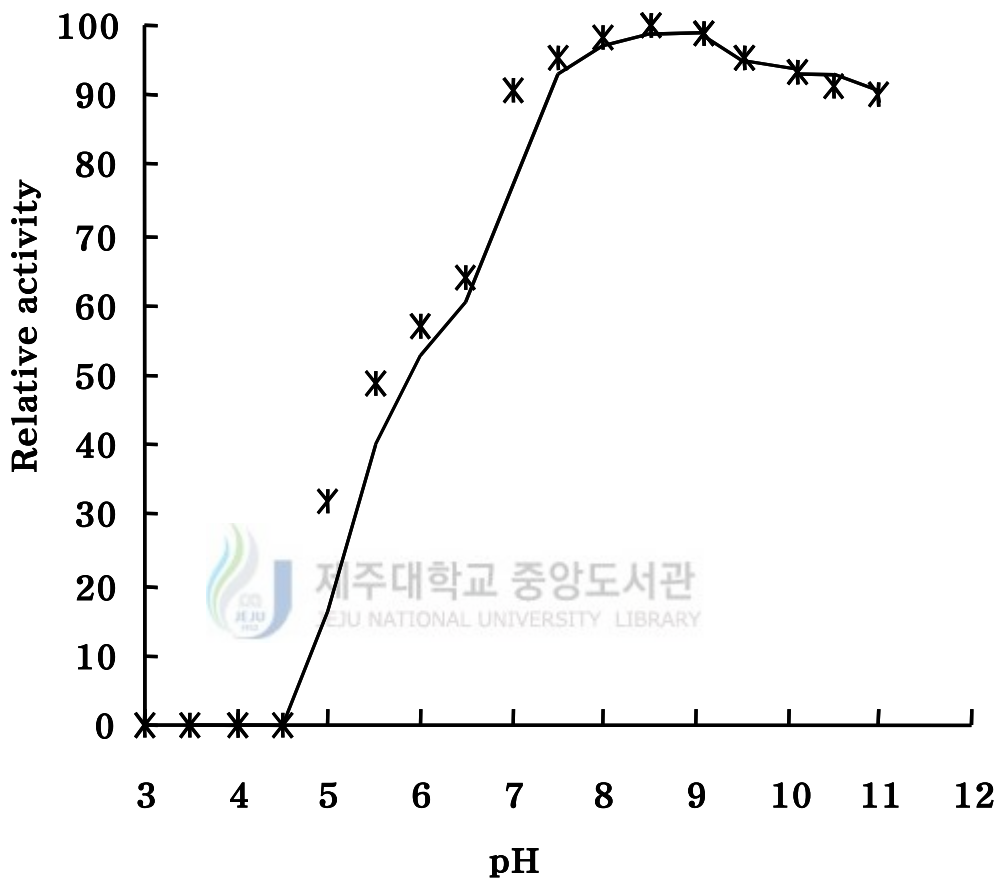


Fig. 3-3. Effect of pH on the activity of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. Purified catalase was incubated for 10min at 25°C prior to incubation of the reaction. Different buffer systems were used according to pH ranges; 50mM citrate-phosphate buffer for pH 3.0 ~ 6.0, 50 mM potassium phosphate buffer for pH 6.0 ~ 7.0, 50 mM Tris-HCl buffer for pH 7.0 ~ 9.0, 50 mM carbonate buffer for 9.0~10.0.

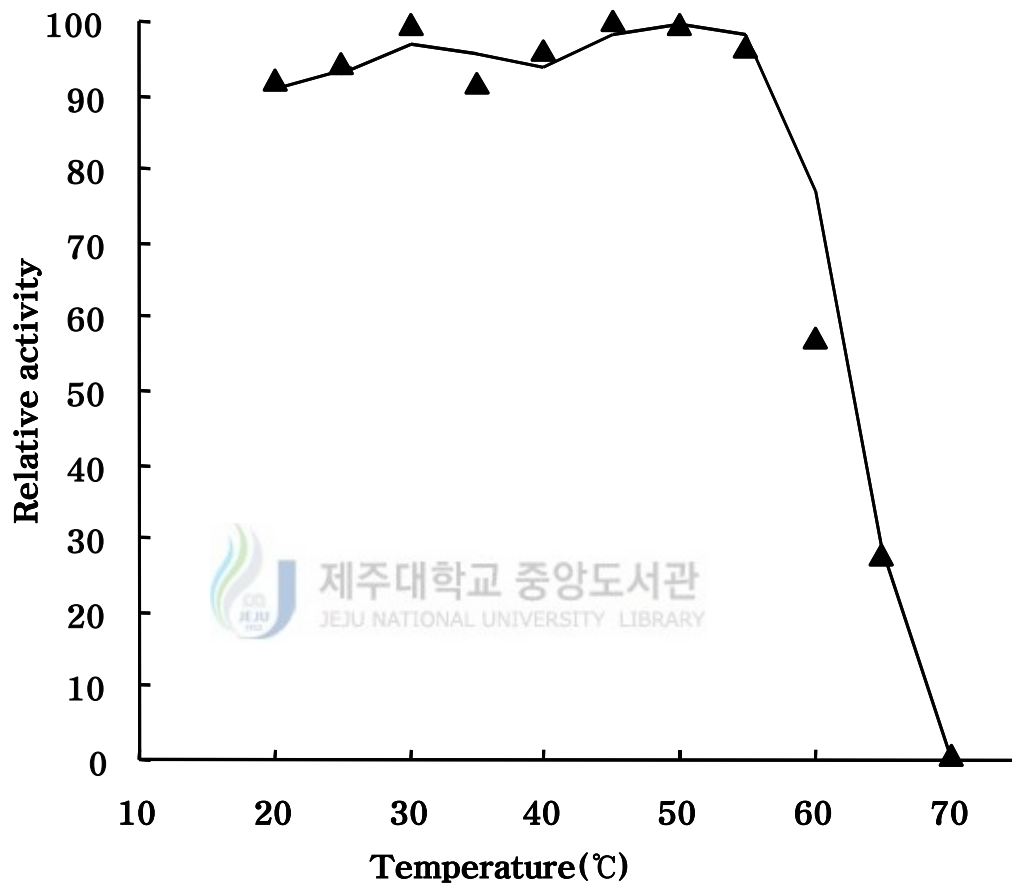


Fig. 3-4. Effect of temperature on the activity of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. Purified catalase was incubated for 10min at the indicated temperatures prior to the initiation of the reaction.

AT에 의해 억제되고, 유기용매에 의해서는 억제되지 않는다(Nadler, *et al.*, 1986)결과와 일치한다.

전형적인 heme 단백질 효소들의 저해제로 알려진 NH_2OH , NaCN, NaN_3 을 농도별로 처리하여 효소의 활성을 측정하여 각각에 대한 표준곡선을 그린 후, 각 활성이 50% 억제되는 농도를 구하였다. NH_2OH 에서는 4.4×10^{-6} M, NaCN에서는 8.87×10^{-6} M, NaN_3 에서는 4.0×10^{-7} M 농도에서 50%억제되는 것을 알 수 있었다(Table 3-3). 이는 Catalase가 cyanide, azide, hydroxylamide에 매우 민감함을 보여주는데 특히 Barker's yeast의 typical catalase가 저해제에 민감하다는 결과와 일치한다(Yumoto *et al.*, 1990).

3.3.5. *E. coli*에서 정제된 효소와 기질의 반응성

Lineweaver-Burk plot를 작성한 결과 정제된 효소의 K_m 은 110 mM, V_{max} 값은 50000 U/mg으로 밝혀졌다(Fig. 3-5). 일반적으로 typical catalase는 K_m 값이 40 mM ~ 80 mM정도로 높은 반면, catalase-peroxidase는 K_m 값이 1 ~ 10 mM(Claiborne and Fridowich, 1979; Yumoto *et al.*, 1987)로 상대적으로 낮다고 알려져 있다. 여러 생물에서 나타나는 K_m 값과 비교해보면, 특히 *K. pneumoniae*의 경우 typical catalase인 KpT의 H_2O_2 에 대한 K_m 값은 50 mM인데 비해 catalase-peroxidase인 KpCP의 K_m 값은 6.5 mM로 밝혀졌다(Hochman and Goldberg, 1991). Typical catalase group에 속하는 것으로 *B. subtilis*의 catalase-1과 catalase-2의 H_2O_2 에 대한 K_m 값은 40.1 mM과 70 mM로 각각 밝혀졌다(Loewen and Switala, 1987a;b). 이와 같이 *E. coli*에서 정제된 효소는 높은 K_m 값을 나타내므로 전형적인 catalase의 특성을 보이고 있다.

Table 3-2. The effect of chemical inhibitors on the activity of recombinant *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *Escherichia coli* UM255

Chemical inhibitors	Specific activity(u/mg)	Relative activity(%)
None	9133	100
Organic solvent ^a	7284	79.8
3-Amino-1,2,4-triazole ^b	6712	73.5
Salicylic acid ^c	3350	36.7

^aThe enzyme solution was mixed with organic solvents to give a final composition (enzyme solution : ethanol : chloroform = 10 : 5 : 3), and then vortexed for 10 min at room temperature.

^bThe enzyme solution was incubated in 10 mM 3-amino-1,2,4-triazole for 10min.

^cThe enzyme solution was incubated in 1 mM salicylic acid for 10 min.

Table 3-3. The effect of metal inhibitors on the activity of recombinant *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *Escherichia coli* UM255

Metal inhibitors	Metal inhibitor concentration(M) required for 50% inhibition of the enzyme activity
NH ₂ OH	4.4×10^{-6}
NaCN	8.77×10^{-6}
NaN ₃	4.0×10^{-7}

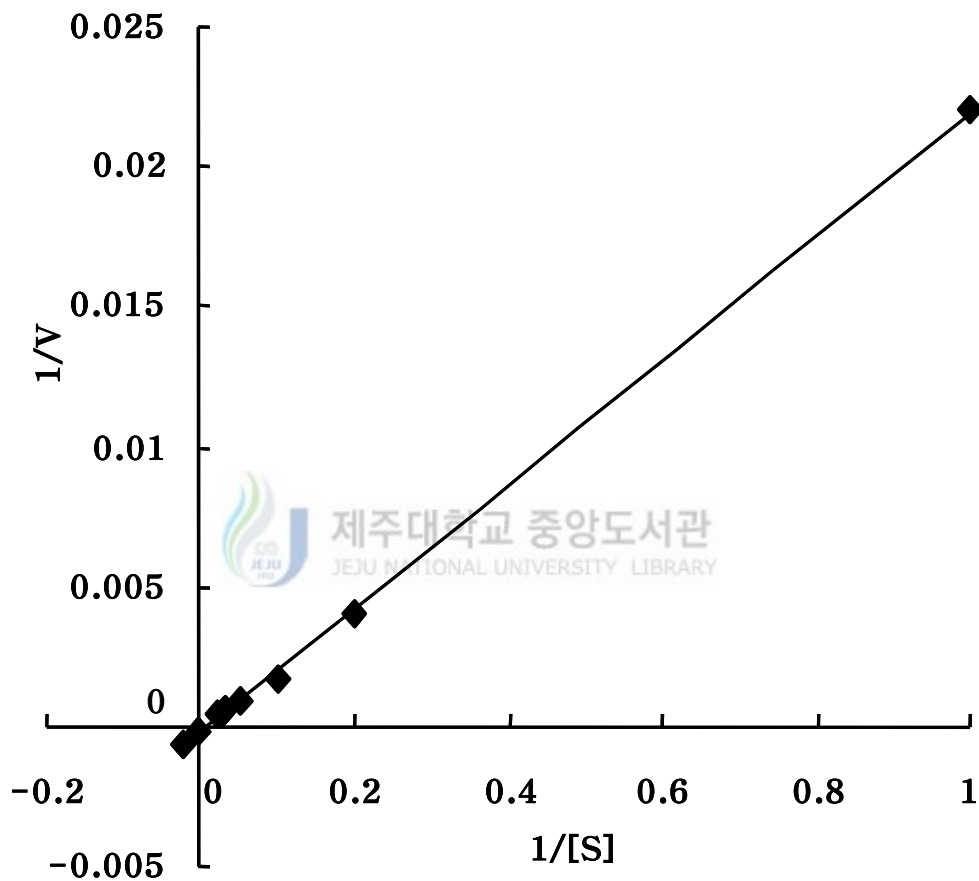


Fig. 3-5. Lineweaver-Burk plot of the reaction velocity of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. The enzyme assay was performed at various concentrations of hydrogen peroxide under standard assay conditions as described in Materials and Methods.

3.3.6. *E. coli*에서 정제된 효소의 흡광스펙트럼

정제된 효소의 흡광스펙트럼을 살펴본 결과, 406 nm에서 최고의 흡광도를 나타내며 630 nm에서도 작은 peak가 나타나며, 520 nm와 580 nm에서 shoulder가 존재한다. A_{406}/A_{280} 은 약 0.97의 값을 보였다, dithionite에 의한 효소의 환원은 이루어지 않았고, CN-ligated form의 흡수스펙트럼에서는 Soret band가 427 nm로 이동하였고, 550 nm에서 shoulder가 나타났다 (Fig. 3-6). Typical catalase는 A_{406}/A_{280} 비율이 약 1인 값을 가지며, sodium dithionite에 의해 환원되지 않다는 점과 일치하여 typical catalase의 특성을 보이고 있다 (Nadler *et al.*, 1986). Barker's yeast의 typical catalase의 A_{406}/A_{280} 은 0.93의 값을 (Yumoto *et al.*, 1990), *Vibrio rumoiensis*의 catalase인 경우 0.93(Yumoto, *et al.*, 2000), *Streptomyces coelicolor* ATCC10147은 0.93의 값을 보인다(Kim, *et al.*, 1994). 전형적인 catalase와 peroxidase의 heme iron이 5th ligand로 각각 tyrosine과 histidine을 가지는 것으로 알려져 있고, 정제된 효소의 흡광스펙트럼이 5th ligand로 tyrosine을 가지고 있는 high spin heme 단백질의 흡수스펙트럼 (Reid, *et al.*, 1981; Fita and Rossman, 1981; Vainshtein, *et al.*, 1980) 과 유사한 것으로 보아 이 효소 역시 tyrosine을 갖고 있는 것으로 사료된다. 또한 *E. coli*에서 정제된 catalase의 prosthetic group은 ferric heme을 갖는 protoporphyrin IX이라고 판단된다.

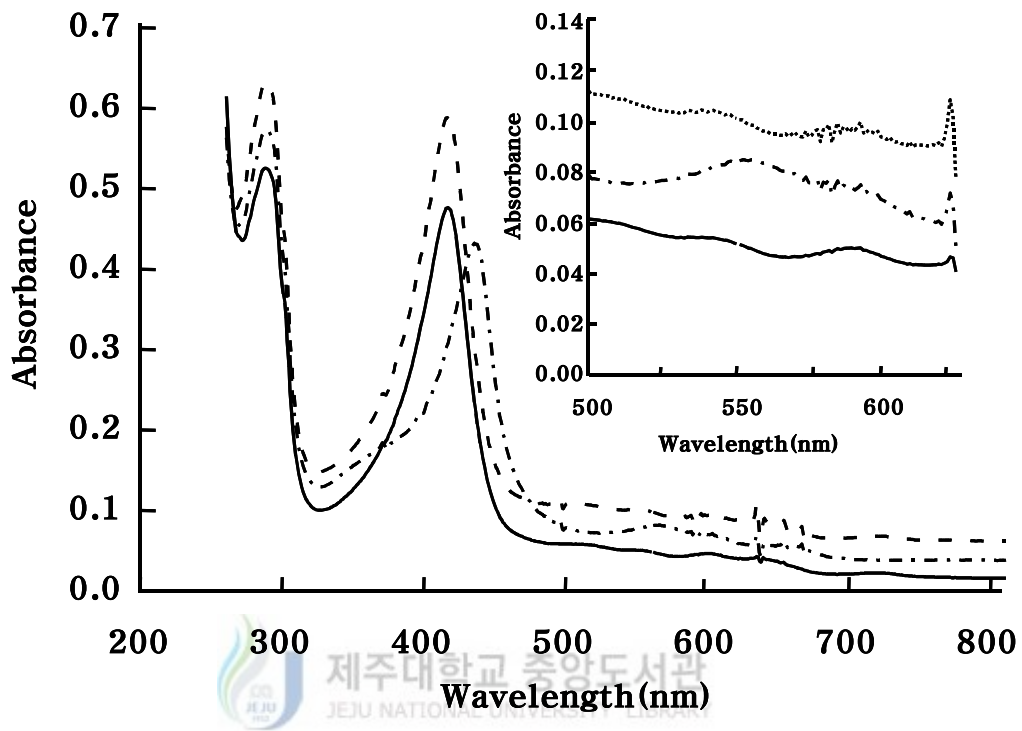


Fig. 3-6. Absorption spectra of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase purified from *E. coli* UM255. Enzyme was dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0). The reduced form(—) was obtained by the addition of 1 mM sodium dithionite to the native form (···). The cyano-adduct(- · -) was obtained by the addition of 30 mM KCN to the native enzyme.

3.4. 요약

*E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1 catalase를 여러 단계의 과정을 거쳐 순수 정제하여 생화학적 특성을 조사하였다. 정제된 catalase의 수율은 4.2%였으며, 정제 배수가 91배로 증가한 효소시료 5.3 mg을 얻을 수 있었다. 이 효소의 분자량은 189 kDa으로 61 kDa에 해당하는 동일한 소단위체 세 개~네 개로 이루어진 것으로 판단되었다. pH 5.5 ~ pH 11.0까지 넓은 범위의 pH에 대해 높은 활성을 보였고, 온도의 영향은 30°C에서 최적이었으나 70°C에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 그리고 20°C에서 60°C까지 효소의 활성이 안정함을 알 수 있었다. 저해제인 3-amino-1,2,4-triazole에 대해 활성이 74%정도 유지되었고, 유기용매에 대해 80%정도 활성이 유지되는 반면, salicylic acid에 대해서는 상당히 활성이 감소되었음을 알 수 있었다. 전형적인 heme 단백질 효소들의 저해제인 NH_2OH 에서 4.4×10^{-6} M, NaCN에서 8.779×10^{-6} M, NaN_3 에서 4.0×10^{-7} M 농도에서 50%억제되는 것을 알 수 있었다. H_2O_2 농도에 대한 catalase의 K_m 값은 110 mM로, V_{max} 값은 50000 U/mg으로 조사되었다. 효소의 스펙트럼을 보면 A406/A280 비율이 0.97의 값을 보이며, dithionite에 의한 효소의 환원은 일어나지 않았고, CN-ligated form의 흡수스펙트럼에서는 Soret band가 427 nm로 이동하였고, 550 nm에서 shoulder가 나타났다. *E. coli*에서 정제된 catalase의 prosthetic group은 ferric heme을 갖는 protoporphyrin IX으로 보인다. 이상의 결과로 *E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1의 catalase는 bovine liver catalase와 *Micrococcus luteus*의 catalase와 유사한 생화학적 특성을 보여 전형적인 catalase로 사료된다.

4. 종합고찰

다양한 스트레스에 대한 방어기작은 다양한 세균에서 잘 알려져 있지만 광합성 세균 Rhodospirillaceae에서는 환경 stress에 대한 방어 기작은 *Rhodobacter spheroides*에서 charperonines Cpn10과 Cpn 60에 대한 연구 (Terlesky and Tabita, 1991)와 oxidative stress에 대한 연구(Terzenbath and Blaut, 1998)외에는 전무한 실정이다. 대사능력이 매우 다양한 *Rhodospirillum rubrum*은 통성 혐기성 세균으로 호기적으로 성장하는 동안 산소의 독성효과를 중화시키는 방어시스템이 필요할 것이다.

본 연구에서 *R. rubrum* S1으로부터 catalase gene cluster의 염기 서열을 분석하기 위해 degenerate primer를 이용하여 *R. rubrum*의 게놈 DNA를 증폭하여 245 bp의 증폭된 PCR 산물을 얻었고 유전자 분석에 의해 다른 생물체의 catalase 유전자와 높은 상동성을 보였다. 이 PCR 산물을 탐침으로 이용하여 *R. rubrum* S1의 게놈 DNA에 Southern hybridization을 수행하여 신호가 감지된 2개의 절편을 얻었다. 이는 *R. rubrum* S1 균주에는 적어도 2개의 catalase 유전자가 존재할 것으로 판단된다.

신호가 감지된 절편들을 cloning하여 "pSCAT02"를 제작하여 *E. coli* UM255에 형질전환 한 후 *E. coli* UM255(pSCAT02) 추출액을 변성 PAGE 전기영동을 수행한 후 활성 염색을 한 결과(Fig. 2-5.), *R. rubrum* S1 catalase 유전자가 삽입된 pSCAT02를 갖고 있는 *E. coli* UM255 균주에서 강하게 발현됨을 알 수 있었고, pBluescript SK(+)를 함유하고 있는 *E. coli* UM255 균주에서는 catalase 활성이 나타나지 않으므로 이는 *R. rubrum* S1의 catalase 유전자에 의해 발현되었음을 알 수 있었다. *R. rubrum* S1 호기적으로 성장한 할 때 5종류의 catalase, 혐기적 상태에서 광합성을 할 때는 2종류의 catalase(Cat 2, Cat 4)가 존재한다(Lim, *et al.*, 2001). 이들 중 Cat 4 band와 전기영동상 같은 위치에서 강하게 발현된 *R. rubrum* S1의 catalase는 Cat 4로 판단되며, *R. rubrum* S1의 catalase 유전자가 *lac* promotor 유도제인 IPTG가 없는 상태에서 *E. coli*에서 강하게 발현되었다.

이는 삽입된 *R. rubrum* S1의 catalase 유전자가 독립적으로 발현되는 것으로 클론된 *R. rubrum* S1 DNA에 존재하는 promotor에 의해 전사되는 것으로 사료된다.

pSCAT02의 유전자를 분석한 결과 전체 염기서열은 약 7.4 kbp로 6개의 ORF로 구성되어 있었으며, 유전자 구성은 putative trehalose-6-phosphate synthase, putative glucokinase, putative endonuclease, putative methyltransferase, catalase, probable transcription regulator 유전자로 구성 있었다.

R. rubrum S1의 trehalose-6-phosphate synthase로 추정되는 유전자의 아미노산 서열을 다중 비교한 결과 *Salmonella typhirium*의 trehalose 6-phosphate synthase 유전자인 *otsA*(47.8%), *Escherichia coli*의 *otsA*(47.7%)와 상동성을 보였다.

Trehalose은 세균, 곰팡이, 효모, 식물, 곤충, 동물 등 다양한 생물에서 발견되는 비 환원성 2당류로서(Elbein, 1974), 세포내의 저장물질 또는 영양분 고갈 상태, 고온, anhydrobiosis, osmotic shock등과 같은 환경 스트레스에 대한 방어기작에 관여한다고 알려졌고(Van Laere, 1989; Wiemken, 1990), *E. coli*에서는 삼투 스트레스에 의해 trehalose-6-phosphate synthase 유전자가 유도되고(Larsen *et al.*, 1987; Giaver *et al.*, 1988; Arguelles, 2000), yeast에서는 trehalose를 축적하므로 고온, 산화적 스트레스에 저항성이 높다고 알려져 있다(Alvarez-peral, 2002). 광합성 세균에서는 trehalose가 compatible solute로 저장된다고 알려 있다(Welsh *et al.*, 1998).

R. rubrum S1에서 저장물질 및 삼투 스트레스 또는 산화적 스트레스 등 다양한 스트레스에 대한 방어 수단으로서 trehalose 생합성에 관여하는 trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 존재가 필요할 것으로 판단된다. Glucokinase에는 ATP binding site인 전형적인 AIDLGGT motif를 포함하고 있다고 알려져 있으며(Arora *et al.*, 1990), 세균 glucokinase의 단백질 분자량(33~34kDa) 크기가 잘 보존되어 있다(Concha and Leon, 2000). 이 N-terminal ATP-binding motif은 glucose kinase와 hexokinase에 상당히 보존되어 있다(Schwab and Wilson, 1991),

Pseudomonas aeruginosa (Cuskey, et al., 1980)와 *Zymomonas mobilis*(Barnell, et al., 1990)의 glucokinase 유전자는 당 수송과 대사에 관여하는 유전자들과 cluster를 이룬다. *R. rubrum* S1의 glucokinase 유전자를 분석한 결과 아미노산 서열의 N-말단 서열부위에 ATP-binding(잔기 13에서 17) 부위 즉 phosphate-1 motif가 포함되어 있고, 유전자의 염기서열로부터 유추한 단백질의 분자량이 33,865 Da로 나타나 단백질 분자량 크기가 잘 보존되어 있다.

Restriction-modification system(R-M system)은 세균에서 외부로부터 침입한 viral genome, plasmid와 같은 DNA를 선택적으로 제거하는 system으로 cell에 침투한 외부 DNA는 분해하지만 modification되어 있는 자신의 DNA는 절단하지 않는 효소기작이다(Pingoud and Jeltsch, 2001). Type II 제한효소는 상응하는 methylase나 다른 종류의 endonuclease와 어떠한 상동성도 보이지 않는다는 특성이 있으며 진화상으로 다른 근원에서 출발하였을 것이라는 가설이 제시되었다(Wilson, 1991). endonuclease와는 달리 methylase는 다른 Type II methylase와 유사한 아미노산 서열을 갖고 있다. Type II 제한효소의 유전자는 DNA상에 cluster를 이루어 존재하고 있다. R-M gene cluster내에 유전자 발현 조절에 관여하는 controller를 codon하는 ORF가 존재한다는 사실이 새롭게 발견되었으며, 이 C단백질이 helix-turn-helix DNA binding motif를 갖는 것으로 보아 transcriptional repressor나 activator로 작용할 것으로 보인다.

R. rubrum S1의 restriction endonuclease와 methyltransferase로 추정되는 유전자는 *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*와 *Rhizobium leguminosarum*의 restriction endonuclease와 methyltransferase와 상동성을 여주었다. *R. rubrum* S1은 Type II R-M system에 속하는 restriction endonuclease와 methylase 유전자를 갖고 있는 것으로 판단된다.

Transcriptional regulator 유전자는 catalase 유전자 염기서열로부터 59 bp 떨어져 정지코돈이 있고 3'-말단으로부터 426 bp의 단편 ORF로 이루어져 있음이 밝혀졌다. 이 transcriptional regulator의 아미노산 서열을 다른 종의 것과 비교 분석한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas*

campestris, *Streptomyces coelicolor*, *Agrobacterium*, *Yersinia*에서 밝혀진 regulatory 유전자와 높은 상동성을 보였다. 이러한 결과 *R. rubrum* S1의 transcriptional regulator 유전자는 AraC family 전사 조절인자로 생각된다. 다양한 세균, 특히 *E. coli*에서 AraC/XylC 집단에 속하는 단백질의 종류를 해보면 AraC 비롯하여 당 대사에 관여하는 전사 조절인자, MarA, SoxS 등 산화적 스트레스에 관여하는 전사 조절인자들이 포함되어 있다 (Gallegos *et al.*, 1997).

Methyltransferase 와 catalase 유전자에 326bp로 이루어진 intergenic space가 존재하고 있음이 밝혀져 두 유전자의 전사수준에서의 발현에 필요한 promoter부위일 것으로 추측되었다. Methyltransferase 유전자의 상류에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 326 bp로 이루어져 있는 intergenic space가 존재하고 있고, catalase 유전자가 역방향으로 위치해 있음을 확인하였다. 이 catalase 유전자는 개시코돈(ATG)과 종결코돈(TGA)을 포함하여 1455 bp 염기로 이루어지며 484개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 개시코돈(ATG)의 6 bp 상류에 ribosomal binding site(GGAGA)가 존재하고 있었다(Appendix I). 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 54,316 Da 이었으며 등전점은 6.468였다. 아미노산 서열을 분석한 결과, 활성부위의 H53, S92, N126들과, heme의 distal site와 결합할 부위는 V94, T116, F131들이었으며, 그리고 Y336, R343 잔기는 heme의 proximal site로 상동성 잘 보존되어 있다(Appendix II). 아미노산 서열을 바탕으로 hydropathy profile상에서 소수성 domain을 형성하게 된다 (Fig. 2-11). 다른 생물에서 분리된 catalase의 아미노산을 비교한 결과, *Brucella melitensis*와는 85%, *Sinorhizobium meliloti*와는 84%로 높은 상동성을 보여 주고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2-12).

Catalase의 구조적 연구는 bovine liver catalase에서 활발히 연구되었는데 위에서 언급한 결합부위 외에 NADPH와 물분자 결합 부위가 존재하는데 이 부위는 monofunctional catalase를 true catalase (typical catalase)와 atypical catalase로 구분할 수 있는 구조적 특징을 나타내는 것으로 알려졌다. NADPH와 물분자가 결합하는 부위의 아미노산 잔기들을 보

면 His304 부위는 NADPH의 pyrophosphate 기의 결합부위, His214, Lys236, Try214는 물분자가 결합하는 부위로서 typical catalase에서 잘 보존되어 있다(Ossowski *et al.*, 1991) *R. rubrum* S1에 존재하는 catalase 아미노산 서열을 분석한 결과 His283 부위는 NADPH의 결합부위, His234, Lys236, Try214가 잘 보존되어 있으므로 광합성 균주 *R. rubrum* S1의 catalase는 typical catalase로 판단된다.

R. rubrum S1 catalase 유전자의 염기 서열로 유추한 아미노산 조성을 Tabel 3-4에서 보듯이 다른 생물의 아미노산 조성이 거의 유사하게 나타났으나, proline 함량이 다른 생물보다 높게 나타났음 알 수 있었다.

진핵생물의 catalase 유전자들의 아미노산 서열에는 peroxisome안으로 이동하는데 관여하는 ATP 의존성 신호서열 Ser-Lys-Leu 즉 C-말단에 SKL 서열이 존재하는 것으로 밝혀졌다. *Rhizobium meliloti*와 *Brucella abortus* 등 동물·식물의 병원성 세균의 catalase에서 SKL 서열을 가지고 있어 주변세포질에 존재한다(Herouart *et al.*, 1996; Sha *et al.*, 1994).

Rhizobium SNU003(Kwon and An, 1999)는 cytoplasm catalase, *E. coli*의 HP I는 periplasm과 cytoplasm에 존재하고, HP II는 cytoplasm에 존재한다(Heimberger and Eisenstark, 1988). *R. rubrum* S1의 catalase 유전자로부터 추정된 아미노산 서열을 분석한 결과 SKL 서열이 존재하지 않으므로 *R. rubrum* S1의 catalase도 cytoplasm에 존재하는 것으로 판단된다.

원핵생물의 catalase 종류는 1차 구조의 차이에 의해 2개의 그룹으로 구분된다. 한 그룹은 진핵생물의 catalase와 크기가 비슷하고 높은 아미노산 서열의 상동성을 보이며, 동·식물 및 미생물에서 발견되는 서로 유사한 특징을 가진 catalase 그룹으로 동일한 크기의 소단위 4개로 구성되어 있으며, 각 소단위 당 하나의 ferric heme prosthetic group(protoporphyrin IX)을 가지고 있고, 분자량은 225 ~ 270 kDa 범위에 해당된다. pH 5 ~ 10의 범위에서 같은 정도의 효소활성을 나타내고(Schonbaum and Chance, 1976), 억제 물질인 3-amino-1,2,4-triazole에 대하여 특이적으로 비가역적인 억제를 나타낸다(Magoliash *et al.*, 1960). 그리고 Ethanol/Chloroform 처리에 안정하고

(Nadler *et al.*, 1986), phenyl-sepharos에 흡착하는 소수성을 가지고 있다 (Nahmias and Bewley, 1984).

Catalase-peroxidase는 typical catalase와 달리 지금까지 미생물에서 만 발견되는 것으로서 한 효소가 catalase 활성과 peroxidase 활성을 동시에 가지며 typical catalase와는 다르게 분자량이 다양하고, 어느 특정 pH에서 최적의 활성을 나타내며, 억제물질인 3-amino-1,2,4-triazole에 활성이 억제되지 않는다, 또한 Ethanol/Chloroform 혼합용액 처리에 불안정하고 온도에 대해서도 typical catalase보다 더 민감하다. 전반적으로 typical catalase보다 여러 가지 자극에 대해서 불안정하다(Hochman and Goldberg, 1991, Brown-Peterson and Salin, 1993; Fraaije, *et al.*, 1996; Maricinkeviciene, *et al.*, 1995; Nadler, *et al.*, 1986; Yumoto, *et al.*, 1990). Table 3-5에서 *R. rubrum* S1 catalase를 *Rhodobacter capsulata*의 bifunctional catalase-peroxidase(Hochman and Goldberg, 1991), 진핵생물의 typical monofunctional catalase(Deisseroth, *et al.*, 1970; Schonbaum and Chance, 1976)와 비교하면, 분자량, AT에 대한 저항성에서 다소 차이는 있지만 bifunctional catalase-peroxidase보다 typical monofunctional catalase의 특성과 거의 유사하므로 *E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1의 catalase는 typical monofunctional catalase로 판단된다.

본 연구를 통해 처음으로 광합성 세균 *R. rubrum* S에서 catalase 유전자를 포함하는 gene cluster를 분리하여 cloning을 하였다. 그리고 gene cluster에 포함된 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, and the *AraC*-type regulator 유전자의 염기서열을 결정하였다. *E. coli* UM255에서 발현된 catalase의 생화학적 특성을 규명하였다. 이상의 연구결과를 바탕으로 광합성세균 *R. rubrum* S1에서 다양한 환경 변화에 대한 catalase의 발현 양상과 생물학적 기능을 밝혀야 할 것으로 판단된다.

Table 3-4. Comparison of amino acid compositions of catalases from *Rhodospirillum rubrum* S1 and other organisms

Amino Acid	Concentration(mol %)			
	<i>R. rubrum</i> S1 ^a	<i>M. luteus</i> ^b	<i>H. influenzae</i> ^b	<i>V. rumoiensis</i> ^c
Ala	9.9	7.9	10.0	9.5
Arg	6.4	6.4	7.3	6.5
Asx	6.0	12.7	12.8	12.5
Cys	0.0	0.0	0.9	ND ^d
Glx	9.9	10.3	10.0	11.7
Gly	7.4	8.9	6.1	6.5
His	5.0	3.4	3.0	3.8
Ile	3.0	3.0	3.2	2.8
Leu	7.6	6.0	7.1	6.8
Lys	3.3	3.2	4.1	5.5
Met	1.9	1.6	2.2	1.9
Phe	5.8	5.4	6.3	5.7
Pro	7.4	5.2	6.1	6.5
Ser	4.8	6.0	4.5	4.0
Thr	5.8	6.8	5.3	5.4
Trp	1.7	2.2	2.2	ND
Tyr	3.5	3.2	3.2	3.5
Val	6.4	7.7	4.9	5.5
Arg/Arg+Lys	65.9	66.7	64.0	54.2

^aThe amino acid composition of *Rhodospirillum rubrum* S1 was deduced from gene sequences obtained from this study.

^bThe amino acid composition of *Micrococcus luteus* and *Haemophilus influenzae* were deduced from gene sequences obtained from the gene database.

^cThe amino acid composition of *Vibrio rumoiensis* was obtained from reference (Yumoto *et al.*, 2000).

^dND, not determined.

Table 3-5. Comparison of the enzymatic properties of *Rhodospirillum rubrum* S1 catalase with those of eukaryotic catalase and *Rhodobacter capsulatus* catalase-peroxidase

Characteristics	<i>R. rubrum</i> S1 catalase ^a	Eukaryotic catalase ^b	<i>R. capsulatus</i> catalase-peroxidase ^b
M_r	189,000	240,000	236,000
No. of subunits	3 or 4	4	4
Heme/tetramer	ND ^c	4	2.5-4
Soret peak(nm)	406	405	403
Specific activity	13,273	97,000	7,800
CN ⁻ and N ₃ inhibition	+	+	+
Aninotriazole inhibition	+	+	-
Optimum pH range	Broad	Broad	Narrow
H ₂ O ₂ stability	Stable	Stable	Unstable
Organic solvent stability	Stable	Stable	Unstable
Na ₂ S ₂ O ₄ reduction	-	-	+
Peroxidase activity	-	-	+
Glycoprotein	ND ^c	+	-
Isoelectric point	6.5	5.5	4.5

^aData are from this study.

^bData are from references(Hochman *et al.*, 1991; Nadler *et al.*, 1986).

^cND, Not determined.

Appendices



**Appendix I; Nucleotide and deduced amino acid sequence of
Rhodospirillum rubrum S1 Catalase Gene Cluster.**

Nucleotide sequence of the 7,421-bp DNA fragment containing the *R.rubrum* S1 Catalase Gene Cluster. The catalase gene cluster contains four complete (glucokinase, endonuclease, methyl-transferase, catalase gene) and two truncated (trehalose-6-phosphate synthase and probable transcriptional regulator gene) ORFs. The deduced amino acid sequence of the catalase gene cluster product is presented underneath the DNA sequence. The putative Shine-Dalgarno (SD) sequence and transcriptional start points are indicated by box and arrows. The sequencing primers and the restriction enzyme sites used in this study are underlined.



EcoRI
GAATTCCCCGCCAGGACTACAAAGGCTATATGCGGGTCAATACGGTTTTTCGCCGAGCAGC 60
 I P R Q D Y K G Y M R V N T V F A E Q L
otsA →

TTCAACCGCTGCTGACCGATGATGATCTGATCTGGGTCCATGATTATCACCTGATCCCGC 120
 Q P L L T D D D L I W V H D Y H L I P L

TGGGGGGAGAACTGCGCCGCTGGGGGCGCCAGCGCATGGGCATCTTCCTGCACACGC 180
 G G E L R R L G A R Q R M G I F L H T P

CCTTTCGGCGATGGAGGTATTGCTGGCCCTGACCCACCATCGCCGACTGGTTCGGTTCGC 240
 F P A M E V L L A L T H H R R L V G S L

TGTGCGCCTATGATGTCGTGCGCTTCCAGACCGAAAACGACCGGCGCTCGTTCCTTCGATT 300
 C A Y D V V G F Q T E N D R R S F F D Y

ACGTCTGCATGAAGCCGGCGGCTGGATTGGCGAGAACGGCCATGTCACCGTCTGGGGGC 360
 V L H E A G G W I G E N G H V T V W G R

SmaI ← pSCAT024 (HE1)
 GCTCGCTGGTCGCCGGGTTTATCCCATCGGCATCGAGAAAGGCGCCTTCGCCGAGGCCG 420
 S L V A R V Y P I G I E K G A F A E A A

CCCAGCGCGCCAGCGCACGGTCGCCTATCGCCGGCTGCGCGCCAGCCTGAACGGCCGCA 480
 Q R A Q R T V A Y R R L R A S L N G R K

AGCTGATGATCGGGTTCGAGCGCCTGGATTATTCCAAGGGCCTGCCCGAACGCTTCGAGG 540
 L M I G V E R L D Y S K G L P E R F E A

CTTTTTCGCGCCTGCTCGAAAGCATCCCGAGCATCGCGCCAAGGTCAGTTTCATGCAGGT 600
 F S R L L E S I P S I A P R S V S C R S

pSCAT022 (EB1) →
 CGCGCCAATTTCCCGCTCCGAGGTTCCCGAATACCGGCGCCTGCGCGAGGAACTCGAAAA 660
 R Q F P A P R F P N T G A C A R N S K S

GCCTGTCCGGCCAGATCAATGGCCAGTTCGGGCGATTACGATTGGGTGCCAATCTTCTA 720
 L S G P D Q W P V R A I T I G C Q S S T

CCTCACCCGCAACTTCGCCAGATCGGTCTGGCCGGTTTCTACCGACAAGGGGCCGTCGG 780
 S P A T S P D R S W P V S T D K G P S A

CGTTGTACGCCAATGCGCGATGCGCGATGGTATGAATCTTGTGGCAAAGAATAACGTTG 840
 L S R Q C A M R D G M N L V A K E Y V A

SmaI
 CCAGCCAGAATCCCAGGACCCCGGGTGCTGGTTCTTTTCGCGCTTCGCCGGGGCGGGCCC 900
 S Q N P Q D P G V L V L S R F A G A A R

GCGAACTGACAACGGCGCTTCAGGTCAACCCCTTCGACCGCGAGGATATGGCCGATGCCA 960
 E L T T A L Q V N P F D R E D M A D A M

NcoI
TGGACAGGGCCTTGGGCATGGCTTTGGACGAGCGCAAGGAGCGTTGGGTTGAAATGATGC 1020
D R A L G M A L D E R K E R W V E M M R

HindIII
GTATGGTCGATGAAAACCTCGCTGGAAAGCTTGGCGCGAGAAGTATCTGGCCGATCTGAACG 1080
M V D E N S L E A W R E K Y L A D L N A

EcoRV
CGGCGCCGTTCAATGGCTGAGCCGTTTCATTCCCGGATTGATCGCCGATATCGGCGGCACC 1140
A P F N G *
M A E P F I P G L I A D I G G T
glcK →

AACGCCCGCTTCGCCCTGACCACCCCGAGGGCGGCTGGCGCGACGAACGGGTTTACCGC 1200
N A R F A L T T P E G G W R D E R V Y R

TGCGCCGCCTTTCCCGGCCCGGCGAGGCGGCGGCCATTATCTGGCCGAGGTGCTGACC 1260
C A A F P G P A E A A A H Y L A E V L T

GCCTTTGAACCGCGCCCGATCGCGGGCGATCTGCGTGCCTGTCCGGTCAACGGCGAT 1320
A F E P R P D R G A I C V A C P V N G D

NcoI
CATCTGCCTTTGACCAACCCATGGGGCGTGGTCTTCTCGATCAGCGCGGTCCCCGACCGC 1380
H L P L T N H G A W S F S I S A V P D R

TTGGGTTTGGCCCTTTCCATGCGGTCAATGACTTCATCGCCAACGCCCTGGCCATCCCC 1440
L G L A P F H A V N D F I A N A L A I P

ApaI
CCCCTTGCCCCCTCCGGGCTGATCGAGATCGGCGGGCGGCCCGGACTTACCGGGGCCCCG 1500
P L A P S G L I E I G G G P G L T G A P

SmaI
ATCGCCGCAATCGGCCCGGCACCGGTCTGGGGGTGGCGATCCTCATCCCCGGTCCGGG 1560
I A A I G P G T G L G V A I L I P R S R

CGGCAACCGCACCAGCCCCCTGGCCACCGAGGGCGGCCATGTCACCCTGCCCGCCGCGA 1620
R Q P H Q P P G H R G R P C H P A P P R

CCGACCCGCGAGGCGGTGATCATCAGCGCCCTGCGCGCCATTACGGCCACGCCTCGGCC 1680
P T R E A V I I S A L R A I H G H A S A

← pSCAT022 (BE1)
GAGCGGGCGATTTCGGCCCCGGTCTGGTTTGGCTGAGCGAGGCGATCCGCGCCCGCGAT 1740
E R A I S G P G L V W L S E A I R A A D

PvuII
GGCTTGGAGCCGTTGCGAAACCCCGCCCTCGGTGATGGAAAAGGGCTTGGCGCGCAGC 1800
G L E P V A E T P P S V M E K G L A R S

SaI

TGCCCGGTTTGCGCCGAAGCCGTCGACACCTTTTACGCGCTGCTGGGCACGGTGGCGGGC 1860
C P V C A E A V D T F Y A L L G T V A G

AATCTGGTGTGAGCACCGGCGCCCAGGGCGGCGTTTACCTGATGGGAGGTATCCTGCCC 1920
N L V L S T G A Q G G V Y L M G G I L P

CGACACCCAGAGGCCTTGCGAACCTCGGCCTTCTGGCGCGCTTCCACGAAAAGGGCCGC 1980
R H P E A L R T S A F L A R F H E K G R

TTCCGCGATTACCTTGATGTCGTCCCCATTGCTTGGTCACCCACCCCTATCCGGCCTTC 2040
F R D Y L D V V P I R L V T H P Y P A F

ATCGGTCTGGCCGGGCTGGTCAGCGATTAGAGCAGCTCGGCCAGGGTGCGGGGATCGCCG 2100
I G L A G L V S D *
* L L E A L T R P D G

GCGCTGTCGTGCAGGCGCAAGAGCCGCTCGGGCTCGGACGCGAACCAAACGAAGCCGCCC 2160
CGCGACAGCACGTCCGCGTTCTCGGCGAGCCCAGCCTGCGCTTGGTTTGCTTCGGCGGG
A S D H L R L L R E P E S A F W V F G G

CAGCCCAATTGGCCGACGGTCTTGCGAAAGCCCGGCGACTGGCGGTCTGATAGCGGTC 2220
GTCGGGTAAACCGGTGCCAGAACGCTTTCGGGCCGCTGACCGCCAGGACTATCCGCCAG
W Q L Q G V T K R F G P S Q R D Q Y A T

AGGAACAGCACCTGGGCGGGCGAGAAACCGGCGGCTTCGGTCAGGGCGTGAATGGCCCGC 2280
TCCTTGTGTCGGACCCGCGCTCTTTGGCCGCGCAAGCCAGTCCCGCACTTACCGGGCG
L F L V Q A P S F G A A E T L A H I A R

*Bam*HI

TGGCGATGGGGGCTGAGCGCGCCATCGGTGGCGTTGACCTCGACGGGAGCCAGCAGCGGA 2340
ACCGCTACCCCGACTCGCGCGGTAGCCACCGCAACTGGAGCTGCCCTCGGTGTCGCGCT
Q R H P S L A G D T A N V E V P A L L P

TCCTTGGGGCCAAGTTCGGCCAGGATCAGGTCGGGCAGGGTTTTATCGGCTTCGATGCGC 2400
AGGAACCCCGGTTCCAGCCGGTCTAGTCCAGCCCGTCCCAAATAGCCGAAGCTACGCG
D K P G L D A L I L D P L T K D A E I R

AGGCCGATGGCATGGGCCAGGGCGTCTGTCGCGCAGCACCACCTTGTTCGCGCTTTCGCTG 2460
TCCGGCTACCGTACCCGGTCCCGCAGCAGCGCGTCTGTTGGTGAACAACGGCGAAAGCGAC
L G I A H A L A D D R L V V K N G S E S

AGCCACAGCACCCCGGCGCCGCAAGAAAGCGGGGGCGAAAACCTCGACCACCGCCTGG 2520
TCGGTGTGTCGGCGGCCGCGGCGTTCTTTCGCGCCCCGCTTTTGGAGCTGGTGGCGGACC
L W L V A P A A L F R P A F V E V V A Q

*Pvu*II

GCGATGATCGAACTGGGGCCGGGCGCCAGCTGGCGGGTCTCGCCGCTGGGAAAGCGCACCC 2580
CGCTACTAGCTTGACCCCGGCCGCGGTTCGACCGCCAGAGCGGCGACCCTTTCGCGTGG
A I I S S P G P A L Q R T E G S P F R V

AGCACCCCCTCGGCCCCGGCGGTGGCGCCAGCGCGCATGATCGCCACGCGGGCCAGGGCG 2640
 TCGTGGGGGAGCCGGGGCCGCCACC GCGGTTCGCGCGTACTAGCGGTGCGCCCGTCCCGC
 L V G E A G A T A G A R M I A V R A L A

 CTACGGCTGAGGTGCGGGCCCTGGAAGGCGGCGATGGCGGCGTCCAGGGCCGGCCGTCA 2700
 GATGCCGACTCCACGCGCCGACCTTCGCGCTACCGCCGAGGTCCCGGCCCGGCAGT
 S R S L H A A Q F A A I A A D L A P G D
 AGCGCCGATCGAACAGGGCGGCGAAGGCAGCCTTCAGGGCATAGCGGGCTGGCCCGAG 2760
 TCGGGCCTAGCTTGTCCGCGCTTCCGTCGGAAGTCCCGTATCGCGCCGACCGGGCTC
 L A P D F L A A F A A K L A Y R P Q G S

 GTGGTCGGCAGATCGCCCCGGCGGATCACCGCGCCGATCGCCACCAGCCCGTTCGCGCAGG 2820
 CACCAGCCGTCTAGCGGGGCCGCTAGTGGCGCGGCTAGCGGTGGTCGGGCAGCGCGTCC
 T T P L D G R R I V A G I A V L G D R L

 GTTTCATCGCGGATCGGCTCGCGGGTGTATCGGCATACCAGCGGCTGCCGCTGATCCCG 2880
 CAAAGTAGCGCCTAGCCGAGCGCCACAATAGCCGTATGGTCGCCGACGGCGACTAGGGC
 T E D R I P E R T N D A Y W R S G S I G

pSCAT021 (BE1) —

 CCGCCCTTGGCGCAGCACCGCCAGACCATAGGCGAGGCGATCGGCTCGTCCGCCAACAGC 2940
 GCGGGAAACGCGTCTGGCGGTCTGGTATCCGCTCCGCTAGCCGGAGCAGGCGGTTGTG
 G G K R L V A L G Y A L R D A E D A L L

 →

GCCTGCTCATTGGTCATCCGGTAGACATGGACCGGCCCCAGAAAACCCGCGTCCCTCG 3000
 CGGACGAGTAACCACTAGGCCATCTGTACCTGGCCGGGGTCTTTGTGGGCGCAGGGAGC
 A Q E N T M R Y V H V P G W F C G R G E

 ACCGCGCCGATATAGAGTGCCTCGAACACGGAGATGGCGGCCAGATCGCGCACGCAATAG 3060
 TGGCGGGCTATATCTCACGGAGCTTGTGCCTCTACCGCCGTCTAGCGCGTGCCTTATC
 V A G I Y L A E F V S I A A L D R V C Y

 GTTCGGTTGGGCGTACCGGGCGGAAAGATCAGCGGCAGGCGCGCAGCGATCAGATCACGC 3120
 CAAGCCAACCCGATGGCCGCCCTTTCTAGTCGCCGTCCGCGCGTCTAGTCTAGTGGC
 T R N P T G A P F I L P L R A A I L D R

 GACGCATAGGGCGGTAGCGGCGGGCCGGGTTTCAGGAGCGAACGCCGGAGGTTCCCTTG 3180
 CTGCGTATCCCGCATCGCCGCGCGGCCCAAAGTCTCGCTTGGGCTCCAAAGGAAC
 S A Y P P L P A A P T E P A F A P P E K

 GCCTCCTTGGTCTCCTTGGGTTCCCTTGGGTTCCCTTGGGTTCCCTTGGGTTCC 3240
 CGGAGGAACCAGAGGAACCCAAGGAACCCAAGGAACCCAAGGAACCCAAGGAACCCAAGG
 A E K T E K P E K P E K P E K P E K P E

*Xho*I

 TTGGGTTCCCTTGGCCTCCTTGGTCTCCTTAGTCTCCTTGGGTTCCCTTGGCGCCCTCGAGC 3300
 AACCCAAGGAACCGAGGAACCAAGGAATCAGAGGAACCCAAGGAACCGCGGGAGCTCG
 K P E K A E K T E K T E K P E K A G E L

NcoI

CGCGAGAACAGATCCATGGTCAAAGCCCCTTCCCATAGAGCCGGGCGCATTTCGGCTTCGA 3360
GCGCTCTTGTCTAGGTACCAGTTTCGGGGAAGGGTATCTCGGCCCGCGTAAGCCGAAGCT
R S F L D M T L A G E W L A P R M
* L G K G Y L R A C E A E
← **endonuclease**

TGTCATCGCGCGGGGCGCCGGCGGCCACCAGGGCCGTACGCGGCCCCAGATCGCCGGCGG 3420
ACAGTAGCGCGCCCCGCGGCCCGGTGGTCCCGGCAGTCGCCGGGTCTAGCGGCCGCC
I D D R P A G A A V L A T L P G L D G A

CGGGCAGCGGCAGGGCTTCCAGTTCAAAGCCGATACGGCGACGCTACCGCTCATGCAGC 3480
GCCCCTCGCCGTCCCGAAGGTCAAGTTCCGGCTATGCCGCTGCGATGGCGAGTACGTCG
A P L P L A E L E F A S V A V S G S M A

GAAACACCTGATCGACAACGGCGCTGTTGAGCAGGGCCGCCACCACCGCCGGCGCCACCC 3540
CTTTGTGGACTAGCTGTTGCCGCGACAACCTCGTCCCGCGGTGGTGGCGGCCCGGTGGG
R F V Q D V V A S N L L A A V V A P A V

SmaI *NcoI*

GGGGGGTGGCCCTTGGCGCGCACCATGTTTCAGATGGTTCTCCACCACCACCCCGCCATGGC 3600
CCCCCACGGGAACCGCGCGTGGTACAAGTCTACCAAGAGGTGGTGGTGGGGCGGTACCG
R P T G K A R V M N L H N E V V V G G H

SacII

CGGCGACAAAAGCCGCGGCGAGTTCCGGCGCGATCAGCCGGCGGTGCTGTTCCCTTGGCGG 3660
GCCGCTGTTTTCCGGCGCCCGTCAAGCCGCCGCTAGTCGGCCGCCACGACAAGGAACCGCC
G A V F A A P L E A A I L R R H Q E K A

PstI

TGGTGCCTGGACCAGCAGCAGGGCTCGCCGACCAGAAGCGCGTCATCGCCGGCTGCA 3720
ACCACGCGACCTGGTTCGTGCGTCCCGAGCGGCTGGTCTTCGCGCAGTAGCGGCCGACGT
T T R Q V L V C P E G V L L A D D G A Q

GCTTGAAATAGGGCGCATGGTTGCGTTTGGCGGCGCGGAAAACAAAGCGGCCGTCCGCCG 3780
CGAACTTTATCCCGGTACCAACGCAAACCGCCGCGCCTTTTGTTCGCGGCAGGCGGC
L K F Y P A H N R K A A R F V F R G D A

←

TGACCGCCTCGGCCAGATCAGCGGATGAACCCGCTTGCCCGTCGGCCGGTTCGCGGAGCT 3840
ACTGGCGGAGCCGGTCTAGTCGCCTACTTGGGCGAACGGGCAGCCGGCCAGCGCCTCGA
T V A E A W I L P H V R K G T P R D R L

—— pSCAT026 (NB1) *SaII*

GGCCCTTATAGCGGTTCCACACCAAAGGCCCGTCCGACACCCCATAGCCCCACTCGGCCA 3900
CCGGGAATATCGCAAGGTGTGGTTTCCGGGCCAGCTGTGGGTATCGGGGTGAGCCGGT
Q G K Y R N W V L P G T S V G Y G W E A

NcoI *SmaI*

GTCGATGGCCCATGGCCCTCGAACCAGGCGACTAGGTGCCCTGGCCGGGATCGCGCGGCG 3960
CAGCTACCGGGTACCGGAGCTGGGCCCGCTGATCCACGGGGACCGGCCCTAGCGCGCCGC
L R H G M A E V R A V L H G Q G P D R P

CCAGCCAGGGGGCGCCGGCATCGGCGGGCAGGCCAATGGTGCCATTATGGGCGATCCGCG 4020
GGTCCGTCCCCCGCGGCCGTAGCCGCCCGTCCGGTTACACGGTAATACCCGCTAGGCGC
A L W P A G A D A P L G I T G N H A I R

CCCGCCCCCTCGCCAGGGTCAGATAATGAATGCGCACCCCGCCGGCTTGCCCGCCACGGC 4080
GGGCGGGGAGCGGGTCCAGTCTATTACTTACGCGTGGGCGGGCCGAACGGGCGGTGCCG
A R G E G L T L Y H I R V R G A Q G G R

GATAAAGCGCCAGCAGGGTTTTCTTGCAAAACATCCTCGAACACCCCTGGCGGGCATGGA 4140
CTATTTTCGCGGTCTCCCAAAGAACGTTTTGTAGGAGCTTGTGGGGGACCGCCCGTACCT
R Y L A L L T E Q L V D E F V G Q R A H

ClaI

CGAAATCGATCGACAGCGGGCGGCGCTTCCGCCCGCAGCAGTCCGCGCAAGGCGCCATAGT 4200
GCTTTAGCTAGCTGTCCGCCCGCGAAGGCGGGCGTCTCAGGCGCGTTCGCGGTATCA
V F D I S L P P A E A A L L G R L A G Y

AGCGCCCGCCAGAAAACCTGGTGGGGGTGAGATAGGCGATCAGCCCGCCCGGCGCCGTCC 4260
TCGCGGGCCGGTCTTTTGACCACCCCACTCTATCCGCTAGTCGGGCGGGCCGCGCAGG
Y R G A L F S T P T L Y A I L G G P A T

EcoRV

AGCGCAGGGCGATATCGGTGAACACCCCATACAGATTGGCATGGCCATACAGCCCGCGAC 4320
TCGCGTCCCGCTATAGCCACTTGTGGGTATGTCTAACCGTACCGGTATGTCCGGCGCTG
W R L A I D T F V G Y L N A H G Y L G R

CAAAGCGGGCGCGCTGGGCCGGGGTCAGGCCGACCCGTCATAGGGCGGATTGCCGACCA 4380
GTTTCGCCCCGCGACCCCGCCCCAGTCCGGCTGGGCAGGTATCCCGCCTAACGGCTGGT
G F R A R Q A P T L G V R G Y P P N G V

CCAGATCGAAGCTGGGATCGGCGGGGATTTCCAGGGTATCGGCCACCCGCAACACCACCG 4440
GGTCTAGCTTCGACCCTAGCCGCCCTAAAGGTCCCATAGCCGGTGGGCGTTGTGGTGGC
V L D F S P D A P I E L T D A V R L V V

GCGGCGGCCGTCCCGTTGGGCCAGATCGGCCAGAAGAATATCGAGCGCGGCCTGGGCCA 4500
CGCCGCCGGCAGGGCCAACCCGGTCTAGCCGGTCTTCTTATAGCTCGCGCCGGACCCGGT
P P P R G P Q A L A D L L I D L A A Q A

NotI

XhoI

SmaI

GGGCGGCCCGCCCTCGCATCGACCTCGAGCCCCAGCACCCGGGCGCCGATCCGCCCCAGGA 4560
CCCGCCGGCGGGAGCGTAGCTGGAGCTCGGGGTCGTGGGCCCCGCGGCTAGGCGGGGTCT
L A A A R A D V E L G L V R A G I R G L

TGAAGGCCGGTTTCGAGCCGGCCAAGGCGGCGGGATGCGGGCGACGGCGCCAGCAGAA 4620
ACTTCCGGCCAAGCGTCGGCCGGTTCGCCCGCCTACGCCGCTGCCGCGGGTCTCTT
I F A P E C G A L A A R I R A V A G L L

AGGCCCCGCCACCGGCGGCCGGATCAAGCAAACGCAGCCCGGCCCAATCGGCGCCCTCCT 4680
TCCGGGGCGGTGGCCCGGCCTAGTTCGTTTGCCTCGGGCCGGGTTAGCCGCGGGAGGA
F A G G G A A P D L L R L G A W D A G E

CGGTCGCGCGATCAAGCAGGCGCTCGACCAGGGCGATCGGCGTGTAAAAGGCGCCAGGG 4740
 GCCAGCGCGCTAGTTTCGTCCGCGAGCTGGTCCCCTAGCCGCACATTTTCCGCGGGTCCC
 E T A R D L L R E V L A I P T Y F A G L

CGCCGCGCTCGCGGGCGGGCAACAGCGCCGGATAGAGGCCGGTGATCAGATGCAGCGCCT 4800
 GCGGCGAGCGCCCGCCGTTGTTCGCGCCTATCTCCGGCCACTAGTCTACGTCGCGGA
 A G R E R A P L L A P Y L G T I L H L A

SmaI
 CGGCCAAAGGCAGCAGGGCGGGTCCCTCGCCGATCGCCTGGGCCACCCGGGCGCCGGCGT 4860
 GCCGGTTTCCGTCGTCCCGCCGAGGAGCGGCTAGCGGACCCGGTGGGCCCGCGGCCGA
 E A L P L L A A D E G I A Q A V R A G A

NotI
 GATCGAGGCGGCCCGCGGTCGGGCGAAACCGGGGCGGGCAACAGCCTCGACGCCGATCC 4920
 CTAGCTCCGCCGCGCGCCAGCCCGCTTTGGCCCCCGCCGTTGTTCGGAGCTGCGGCTAGG
 H D L R G R P R A F G P R A V A E V G I

← pSCAT025 (EN1)
 CCTTGCGCAGGGCCGCCATCGCGGCGGTGGTGAACAGCAAGGCCTGATCGGGCGCGCCGCG 4980
 GGAACGCGTCCCGCGGTAGCGCCGCCACCACTTGTCTGTTCCGGACTAGCCGCGCGGCGC
 G K R L A A M A A T T F L L A Q D A R R

SmaI
 CCGGCGTCAGGGTTTCAGCCCAGGCCCGGGCGACGACGCGGGCGCGCCAAATCGGACC 5040
 GGCCGAGTCCCAAAGTCGGGTCCGGGCCCGCTGCTGCGCCCGCGCGGGTTTAGCCTGG
 A P T L T E A W A R A V V R A R A L D S

SmaI
 GCGTCCCCTCGACCCCGGGCGACGGCGGCCCGCCAGGATCGGCGGATTTTTCCGGGG 5100
 CGCAGGGGAGCTGGGGCCCGCTGCCGCCGGGCCGGTCCTAGCGCCGCTAAAAGGCCCC
 R T G E V G P S P P G A L I A A S K E P

ACGTGGAAGCGGTCCCGCACGGCGTCACGACGTCATCTCCAAGCCAGTCCCCACCCCGT 5160
 TGCACCTTCGCCAGGGCGTGCCGCAGTGCTGCAGTAGAGGGTTCGGTCAGGGGTG
 S T S A T G C P T V V D D G L G T G M
← **Methyltransferase**

ApaI
 TGCCAGCCCGGCCGCCAGCCGGCCCCCAGGCTACAAGCGCCGCCCGCGATCCGCCACCA 5220

GTATCCATCGTTTCCGCTTTGTTTCGCGCAAACGAAGCCCGCCCTCCCCCTCAAGAAGCCC 5280

SmaI
 GCGCCTCCCGGGTATGGCGCCACCCCAGCTTGCCTTAAATCTAAAGACTATAACCTAA 5340

ClaI
 AGGTTCTACTTTGGCTAAAATATGATCGATTTAGTCACTCGAATAACCCAGTAAAGTTAT 5400

GTATTTCCGCTGATAGATCGCCTCTAGGATGAGGGGTATCGGATCACGCCCTTAGCGCCA 5460

TCCACTTTTCGGGGAGAGCCCATGACCACGCGCCTGACCACCACCGCCGGTGCCCCGGTC 5520
M T T R L T T T A G A P V
Catalase →

GCCGATAATCAAACAGCCTGACCGCCGGACCCCGGGGGCCGGTGCTGCTGCAGGATTAT 5580
A D N Q N S L T A G P R G P V L L Q D Y
SmaI *PstI*

CAGTTGATCGAGAAGCTGGCCACCAGAACCAGGGAACGCATTCCCGAACGCGTCGTCAC 5640
Q L I E K L A H Q N R E R I P E R V V H
pSCAT025(NE1)

→ *NcoI*
GCCAAGGGCTGGGGCGCCCATGGCACCTTGACCATCACCCATGACATCAGCCGCTATAACC 5700
A K G W G A H G T L T I T H D I S R Y T

CGAGCCAAGCTGTTCTCGGCGGTCGGCAAACGACACCGGTGCTCGCCCGCTTTTCGACG 5760
R A K L F S A V G K T T P V L A R F S T

GTGGCGGGCGAATTGGGGGGCGCCGACCGCAACGCGACGTGCGCGGCTTTTCGCTGAAG 5820
V A G E L G A A D A E R D V R G F S L K

TTCTATAACCGAGGAAGGCAACTGGGATCTGGCGGGCAACAACACCCCGGTGTTCTTCGTG 5880
F Y T E E G N W D L A G N N T P V F F V

CGCGATCCTTTGAAGTTTCCCGATTTTCATCCATACCCAGAAACGCCATCCGCGCACCCAT 5940
R D P L K F P D F I H T Q K R H P R T H

CTGCGCTCGCCACCGCCATGTGGGATTCTGGTCTGCTCAGCCCGAAAGCCTGCATCAG 6000
L R S P T A M W D F W S L S P E S L H Q

GTCACCATCTTGATGAGCGATCGCGGTCTGCCGCTTGATCCCATGCATATGAACGGCTAC 6060
V T I L M S D R G L P L D P M H M N G Y

GGCAGCCACACCTATTCTTCTGGAACGACCGCGGCGAGCGCTTTTGGGTGAAGTCCAC 6120
G S H T Y S F W N D A G E R F W V K F H

TTCAAGACCCAACAGGGCCATGCTCATCTGACCAATGCCGCGCCAAGGTCGTGGTCGGC 6180
F K T Q Q G H A H L T N A A A K V V V G

GAGTCGCGCGAAAGCTATCAGGAGGCGCTGTTTGGCACCATCGAGTCGGGTCACTTCCCG 6240
E S R E S Y Q E A L F G T I E S G H F P

CGCTGGACGCTGTTTGTGCAGATCATGGCCGAACGCGAGGCCGAAACCACCCCTATAAC 6300
R W T L F V Q I M A E R E A E T T P Y N

← pSCAT(021EB1-1)

CCCTTCGACCTACCAAGGTCTGGCCGACGGCGATTTTCCGCTGATCGAGGTCGGGGTG 6360
P F D L T K V W P H G D F P L I E V G V

CTGGAACTCAACCGCAACGCCGAGAACTATTTCCGCGAGATCGAGCAGGCGGCCTTTTCG 6420
L E L N R N A E N Y F A E I E Q A A F S

SmaI *SmaI*

CCGTCGAACGTCGTCCCGGGCATCGGCCATTGCCCCGACAAGATGCTTCAAGCCCCGGGTG 6480
P S N V V P G I G H S P D K M L Q A R V

TTGCCTATGCCGACGCCCATCGCTATCGCTGGGCACCCATTACGAGGCCCTGCCGGTG 6540
F A Y A D A H R Y R L G T H Y E A L P V

AACGCCCCGCTCAGCCCGGTCAATCACTACCACAAAGACGGGCCGATGCGCTTTTTCCCC 6600
N A P L S P V N H Y H K D G P M R F F P

AATAATCCCAACGCCGACGCCTATTACGAGCCCAACAGCTTCGGTGGACCCAAAGAGGAC 6660
N N P N A D A Y Y E P N S F G G P K E D

CCCTCGGTCAAGGAGCCGCCGCTGCGCATCAACGGCGATGCCGATCACTACAACCACCGC 6720
P S V K E P P L R I N G D A D H Y N H R

GAGGGCAACGACGATTACGTCCAGGTCGGCGCCCTCTTCGCCCTGTTTGACGAGGGCGAG 6780
E G N D D Y V Q V G A L F A L F D E G E

← pSCAT021 (EB1)

CGCCAGCGTCTGTTCTCCAATATCGCCGAGGCCATGGCCGGCGTGCCCGAGGAGATCATC 6840
R Q R L F S N I A E A M A G V P E E I I

CGCCGCCAGTTGGTCCATTTCCACCGCGCCGATCCGGCTTACGGCGAGGGCGTGGCCAAG 6900
R R Q L V H F H R A D P A Y G E G V A K

GCGCTGGGACTGGCCCCGGTTTCCCAACCGGCCTGACCGGCCCTCCATCCCACCACCAT 6960
A L G L A P V S Q P A *

SmaI

CTCAAGGGAGCGACCCGCCCGGGCCGCTCCTTTTTCTTAGCGGAAATAGGCCCCCCGGCGTC 7020
AATCGCCTTTTATCCGGGGGCGCAG
* R F Y A G P T

GTGCCGAGCAGCCGGCGGAACATGGCGATGAAGGCGCTGGGCTGGTTCGTAGCCCATATCA 7080
CACGGCTCGTCCGCCCTTGTACCGCTACTTCCGCGACCCGACCAGCATCGGGTATAGT
T G L L R R F M A I F A S P Q D Y G M D

AAGGCCACCGCCGTCACCGCCTCGCCGGCGCCAGTCGCTCCAAGGCGCCAGCAGGCGC 7140
TTCCGGTGGCGGCAGTGGCGGAGCGCCCGGTCAGCGAGGTTCCGCGGGTTCGTCGCG
F A V A T V A E G A A L R E L A G L L R

AGCCGCAACCGCCATTGGCCGAAGGTACGCCGAGTCGGCGCGGAAGGTCCGGGCCAGG 7200
TCGGCGTTGGCGGTAACCGGCTTCCAGTCGGCGTCAGCCGCGCTTCCAGGCCCGGTCC
L R L R W Q G F T L G C D A R F T R A L

GTGCGGGCCGAGGCCCGGCCCTCGCGCGCCATTCTCAAGCGCCGGCCATCGGCGGGA 7260
CACGCCCGGCTCCGGGGCCGAGCGCGGGTAAGGAGTTCGCGGCGGGTAGCCGCCT
T R A S A G A E R A W E E L P R G D A P

*Sma*I

TCGGCCTCCAGCGCCCTGGCCACCGCCAGGGCCCGGGGATCGCGCGGCCAGGGCAGATGC 7320
AGCCGGAGGTGCGGGGACCGGTGGCGGTCCCGGGCCCCTAGCGCGCCGGTCCCCTCTACG
D A E L A R A V A L A R P D R P W P L H

AGCGGCTGGGCGGCAGGGCGGCGATCTGGTCAAGCAGCACGCGCACCAAGCGGCCATCG 7380
TCGCCGACCCGGCCGTCCCGCCGCTAGACCAAGTTCGTGCGTGGTTCGCCCGGTAGC
L P Q A P L A A I Q D L L V R V L R G D

*Eco*RI

GCGCCGTCCTCATCGTAATCATCGGGACGACGGCCGAATC 7421
CGCGGCAGGAGTAGCATTAGTAGCCCTGCTGCCGGCTTAAG
A G D E D Y D D P R R G F E
← **Transcriptional Regulator**



Appendix II; Multiple alignment of deduced amino acid sequences of catalase gene cluster from *Rhodospirillum rubrum* S1 and other organism.

- A. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 trehalose-6-phosphate synthase with sequences of a bacterial trehalose-6-phosphate synthase. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Escherichia coli* K-12 (AAC74966), *Ralstonia solanacearum* (NP_522666), *Rhizobium* sp. GR234 (NP_444016), *Salmonella typhimurium* (AAF34582), *Sinorhizobium meliloti* (NP_435371), *Xanthomonas axonopodis* (NP_643519).
- B. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 glucokinase with sequences of a bacterial glucokinase. The postulated ATP binding sites are boxed. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Escherichia coli* K-12 (A65013), *Helicobacter pylori* J99 (NP_223746), *Microbulbifer degradans* 2-40 (ZP_00068168), *Neisseria meningitidis* MC58 (NP_274404), *Pseudomonas putida* KT2440 (AAN66636), *Ralstonia solanacearum*(NP_523116), *Salmonella typhimurium* LT2 (NP_461344).
- C. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 restriction endonuclease with sequences of a bacterial restriction endonuclease. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Rhizobium leguminosarum* (CAA67875), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (AAF22367)
- D. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 methyltransferase with sequences of a bacterial methyltransferase. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Rhizobium leguminosarum* (CAA67873), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (AAF22366).

E. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 catalase with sequences of a bacterial catalase. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Bacillus subtilis* (M80796), *Bacteroides fragilis* (A57262), *Brucella melitensis* (Q59170), *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki (Q9ZN99), *Haemophilus influenzae* KW20 (D64103), *Neisseria meningitidis* MC58 (NP_273273), *Proteus mirabilis* (P42321), *Pseudomonas putida* KT2440 (AAN66111), *Sinorhizobium meliloti* (NP_384870).

F. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 Transcriptional regulator with sequences of a bacterial AraC family Transcriptional regulator. Predicted HTH(helix-turn-helix) motif are boxed. The aligned sequences and their GenBank accession numbers are: *Agrobacterium tumefaciens* (AD3201), *Mesorhizobium loti* (NP_104387), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (C83167), *Streptomyces coelicolor* A3(2) (CAB92194), *Xanthomonas campestris* (NP_636770), *Yersinia pestis* (NP_406279).

A. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 trehalose-6-phosphate synthase with sequences of a bacterial trehalose-6-phosphate synthase.

	10	20	30	40	50	60	
1	RQDYKGYMRVNTVFAEQLQPLLTDDDLIVVHDYHLIPLGGELRRLGARQRMGIFLHTPFP						<i>R. rubrum</i> S1
1	RPAWDGYLRVNALLADKLLPLLQDDDIWIWDYHLLPFAHELRRKRGVNNRIGFFLHIPFP						<i>E. coli</i> K12
1	---FKAYEAVNRI LASHLRPMLRSDI LWWHDYHLI PFAQALRALGCTQRMGFFNHI PLP						<i>R. solanacearum</i>
1	RKEMAGYFRVNRFFAHRLAPLVKPDVIVVHDYPLIPLAAELRQMGLENRIGFFLHIPWP						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
1	RPWEGYMRVNALLADKLLPLIKENDIIVVHDYHLLPFASELRRKRGVNNRIGFFLHIPFP						<i>S. typhimurium</i>
1	RKEMAGYFRVNRFFAHRLAPLVKPDVIVVHDYHLIPLAAELRQMGLENRIGFFLHIPWP						<i>S. meliloti</i>
1	RATREGYMRVNRFFAEKLAPELLKSDTLVIVHDYHMIPLGAMLRRELGVGCKMGFFLHVPMP						<i>X. axonopodis</i>
	70	80	90	100	110	120	
61	AMEVLLALTHHRLVGS LCAYDVVGFQTENDRRSFFDYVLHEAGGWI GENGHV - TVWGRS						<i>R. rubrum</i> S1
61	-PEIFNALPTYDTLLEQLCDYDLGFGQTENDRLAFLDCLSNL TRVTTRS AKSH - TAWGKA						<i>E. coli</i> K12
58	SPDVI RRI PQRQLMRALASYDLVGMQSPRDVNLQRY - WDAENI AAQSERRHDSVHA - -						<i>R. solanacearum</i>
61	PADVLF TMPVHEEIMRGLSHYDVVGFQTDHDLNFASCLRREGI GDALGGGRL - SAYGRI						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
61	TPEIFNALPPHDELLEQLCDFDLGFGQTENDRLAFLDSLSSQTRVTTRS GKQH - I AWGKD						<i>S. typhimurium</i>
61	PADVLF TMPVHEEIMRGLSHYDVVGFQTDHDLNFAGCLRREGI GDELGGGRF - SAYGRV						<i>S. meliloti</i>
61	SADLVQAMPDHARLFS TFYAYDLVGFQTRDAERFKAYVRLFGGGRI LEGDLVEGPGGRR						<i>X. axonopodis</i>
	130	140	150	160	170	180	
120	LVARVYPI GIEKGAFAEAQAQRQRTVAYRRLRASLNGRKLMI GVERLDYSKGLPERFEAF						<i>R. rubrum</i> S1
119	FRTEVYPI GIEPKEIAKQAA - GPLPPKLAQLKAELKNVQNI FSVERLDYSKGLPERFLAY						<i>E. coli</i> K12
115	----FPI GIDVESLRALVPSPASQAVI DEVRGAAGRCVLMIGVDRLDYSKGI PTRLKAF						<i>R. solanacearum</i>
120	FKGGVYAI GIEAFAAEFAKKASTNS TVKKARESI ERRSLI IGVDRLDYSKGLTQRI EAF						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
120	FQTEVYPI GIEPDEIALQAA - GPLPPKLAQLKAELKNVQNI FSVERLDYSKGLPERFLAY						<i>S. typhimurium</i>
120	FKGGIYAI GIEAFAAEFAKKALTNKTVRKARESI EHRSLI IGVDRLDYSKGI TQRI DAF						<i>S. meliloti</i>
121	F TASSFPI GIDTDLI AHQAKASAGKQAVRDLRESLRGRQLAI GVDRLDYSKGLPERFQGF						<i>X. axonopodis</i>
	190	200	210	220	230	240	
180	SRLLESI PSIAPRS ----VSCRSR ----QFPAPRFPNTGACARNSKSLSGPDQW - PVRAI						<i>R. rubrum</i> S1
178	EALLEKYP-----						<i>E. coli</i> K12
170	RQLLQTHARMRSKVTLVQIAAPTRQSI PAYARLRDKTEQLVREI NRRFGT - GDWTPVMYF						<i>R. solanacearum</i>
180	ERFILANPAQRGRV TYLQI TPKSRSEVPEYEAMQRTVAEQAGRVNGALGAVD - WVPMRYI						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
179	EALLENYP-----						<i>S. typhimurium</i>
180	ERFILANPAQQGRV TYLQI TPKSRSEVPEYEAMQRTVAEQAGRVNGALGAVD - WVPI RYI						<i>S. meliloti</i>
181	ERYLERYPDQSGSL TYLQI APVSRGDVTEYRQLRSQLEQI AGHINGGHAEPD - WTPLRVY						<i>X. axonopodis</i>

A. Continued

	250	260	270	280	290	300	
231	TI GCQSS TSPATS PDRS WPVSTDKGPSALSRQCAMRDGMNLVAKEYVASQNPQDPGVLVL						<i>R. rubrum</i> S1
186	-----LRDGMNLVAKEYVAAQDPANPGVLVL						<i>E. coli</i> K12
229	S-----ESVDR TALPQLYRMSRVGVVT--PVADGMNLVAKEYVAAQAARDPGVLVL						<i>R. solanacearum</i>
239	N-----RSVGRRLAGLYRLGKVLVT--PLRDGKNLVAKEYVAAQDPDDPGVLVL						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
187	-----LRDGMNLVAKEYVAAQDPANPGVLVL						<i>S. typhimurium</i>
239	N-----RSVGRHI LAGLYRLGKVLVT--PLRDGMNLVAKEYVAAQDPDDPGVLVL						<i>S. meliloti</i>
240	N-----QNF SHATLTGFYRAASVCLVT--PLRDGMNLVAKEYVAAQDPADPGVLVL						<i>X. axonopodis</i>

	310	320	330	340	350	360	
291	SRFAGAARELTTALQVNPFDREDMADAMDRALGMALDERKERWVEMMRVDENSLEAWRE						<i>R. rubrum</i> S1
212	SQFAGAANELTSALI VNPYDRDEVAAALDRALTMSLAERI SRHAEMLDVI VKNDI NHWQE						<i>E. coli</i> K12
278	SRGAGAASQLRDALLVPSKNR ATADAYAQALSMPLEERKARHAGLMRNI ETEDLRWWRD						<i>R. solanacearum</i>
288	SRFAGAARELQGALLVNPYDI EGTANAMARSL SMPLEERQERWTTMMDQLEHDVSRWCR						<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
213	SQFAGAANELTSALI VNPYDRDDVAAALNRALTMPLAERI SRHAEMLDVI VKNDI NRWQE						<i>S. typhimurium</i>
288	SRFAGAARDLKGALLVNPYDI EGTANAMARALSMPLEERKDRWKTMMDHLEHDVSRWCR						<i>S. meliloti</i>
289	SLFAGAADMKEALLVNP HDLDGVADAI ATAASMP LASRI ERWHAMMDHLRKNNI NHWRQ						<i>X. axonopodis</i>

	370	
351	KYLADLNAAPFNG	<i>R. rubrum</i> S1
272	CFI SD-----L	<i>E. coli</i> K12
338	NYLKALACAPW	<i>R. solanacearum</i>
348	DFLNDL-TAS	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234
273	RFI HD-----L	<i>S. typhimurium</i>
348	DFLNDLATSP	<i>S. meliloti</i>
349	RYLQAL---S	<i>X. axonopodis</i>



B. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 glucokinase with sequences of a bacterial glucokinase.

		ATP binding site										
		10	20	30	40	50	60					
1	MA-----EPFI PGLI ADI GGTNARFAL--TTPEGGWRDER--VYRCAAFPGPAEAAAHY											<i>R. rubrum</i> S1
1	MTK-----Y-A-LVGDVGGTNARLALCDI ASGE---ISQAKTYSGLDYPSLEAVI RVY											<i>E. coli</i> k-12
1	MP----KTETY-PRLLADI GGTNARFGL-EVAPRQ---IECVEVLRCEDFESLSDAVRFY											<i>H. pylori</i> J99
1	MFM-----Y-PYI VADI GGTNARFALVTGKKGNAFNLEQI QI LNGSEFPRLQDAMQHY											<i>M. degradans</i> 2-40
1	MSSTPNKQAGY-PRLVADI GGTNARFAL-E TAPRV---IEKAAVLPCKDYDTVTDVAVRAY											<i>N. meningitidis</i> MC58
1	MNNDNKRSAGGLG-LVGD I GGTNARFAL-----WRGQRLESIEVLACADYPRPELAVRDY											<i>P. aeruginosa</i> PA01
1	MGSM-DDVTAY-PRLVGDVGGTNARFAL-EMAPMR---LAHIGVLAGDDYPSLEAAMRAY											<i>R. solanacearum</i>
1	MTK-----Y-A-LVGDVGGTNARLALCDI ASGE---ISQAKTYSGLDYPSLEAVRVY											<i>S. typhimurium</i> LT2
		70	80	90	100	110	120					
51	LAEVLTAFEPDRPDR-GAICVACPVNGDHLPLTNHGAWSFSISAVPDRLGLAPFHAVNDFI											<i>R. rubrum</i> S1
49	LEEHKVE-----VKDGCIAIACPI TGDWVAMTNTHT-WAFSIAEMKKNLGFSHLEIINDFT											<i>E. coli</i> k-12
52	LSKCKESLKLHPI-YGSFAVATPI MGDFVQMTNNH-WTFSIETTRQCLNLKLLVI NDFV											<i>H. pylori</i> J99
53	ID----TLGGEKPKAACVAIAGPI DGDNARMTNLN-WEFSQAAVKAEFGFDKYDTLNDFG											<i>M. degradans</i> 2-40
56	LNQSGATAVRHA----AFAI ANPILGDWVQMTNHH-WAFSIE TTRQTLGLDTLILLNDF T											<i>N. meningitidis</i> MC58
55	LARIGESVA--NIDSVCLACAGPVGAADFRTNNH-WVINRAAFREELGLDHL LLVNDFS											<i>P. aeruginosa</i> PA01
55	LAALPPEIAAAGVRHAAIGIANPVLGDQIRMTNRD-WAFSTEAMRQSLGFDTFVVLNDF A											<i>R. solanacearum</i>
49	LDEHSVS-----VEDGCIAIACPI TGDWVAMTNTHT-WAFSIAEMKKNLGFSHLEIINDFT											<i>S. typhimurium</i> LT2
		130	140	150	160	170	180					
110	ANALAI PRLAPSGLEI GGGPGLTGAPI AAI GPGTGLGVAI LI PRSRRQPHQPPGHRGRP											<i>R. rubrum</i> S1
103	AVSMANPMLKKEHLIQFGGAEPVEGKPI AVYGAGTGLGVAHLVHVDKRWW-SLPGE GGHV											<i>E. coli</i> k-12
110	AQAYAI SAMQENDLAQIGGI KCEI NAPKAILGPGTGLGVS TLI QNSDGS LKVLPGEGGHV											<i>H. pylori</i> J99
108	ALAVATSSLQADNLEIKAGTMDPKGNKAILGPGTGLGVA GLACAGDSWL-PI PSEG GHV											<i>M. degradans</i> 2-40
111	AQALAVTQTSSKDLMQVGGQKPVFAPKAVI GPGTGLGVSGLVHSHAGWW-ALAGEGGHT											<i>N. meningitidis</i> MC58
112	TMAWAASRLGADELVQVRAGSAQADRARLII GPGTGLGVSLLPLGGGRWEVLPCEGGHV											<i>P. aeruginosa</i> PA01
114	ALAHALPYLGADELEQVGGSTCVADAPRALLGPGTGLGVASLLPTQAGRFI AVAGEGGHV											<i>R. solanacearum</i>
103	AVSMAI PMLKKEHLIQFGGGEVVDGKPI AVYGAGTGLGVAHLVHVDKRWI-SLPGE GGHV											<i>S. typhimurium</i> LT2

B. Continued

	190	200	210	220	230	240										
170	CHPAPP	GP	TREAVI	I	SALRAI	HGHAS	AERAI	SGPGLVW	LEAI	RAADGL	-----	EPV	<i>R. rubrum</i> S1			
162	--DFAP	NSEEE	EAI	I	LEI	LRAEI	GHVS	AEACLS	GPGLV	NLYRAI	V-----	KADNRLPE	<i>E. coli</i> k-12			
170	--SFAP	FDL	EI	L	VWQY	ARSKF	NHVS	AERF	LSG	GLVLI	YEALS	KRKGL	--E	KVAKLSKA	<i>H. pylori</i> J99	
167	--NVAP	ATQ	LECE	VI	RAAMAE	HGHVS	AETFI	S	GPGL	VRLY	RALAT	---	VRGET	PKNYEPK	<i>M. degradans</i> 2-40	
170	--SFPP	FD	M	E	VLI	WQY	AKNKY	GHVS	AERF	LSG	AGLSL	VYE	ALAAKQ	-----	KAKP A	<i>N. meningitidis</i> MC58
172	--DLPV	TSP	PRDF	AL	WQGL	QARY	GHVS	AERALS	GNGL	LALYEI	SCALD	GV---	AVRASSAA		<i>P. aeruginosa</i> PA01	
174	--AFAP	MNDEE	VVI	WRF	ARERF	GHVS	AERLI	S	GMGLE	LELI	YEALG	ACFDL	WQQGP	AVRRAA		<i>R. solanacearum</i>
162	--DFAP	NSEEE	EAMI	LEI	LRAEI	GHVS	AERVLS	GPGLV	NLYRAI	V-----	KSDNRLPE				<i>S. typhimurium</i> LT2	

	250	260	270	280	290	300																
222	AETPPS	VMEKG-	LARSCP	VCAE	AVDTF	YALLG	TVAGN	LVLS	TGAQ	GGVYL	MGGI	LPRHPE	<i>R. rubrum</i> S1									
212	NLKPKDI	TERA-	LADSC	TDCRR	ALS	LF	CVI	MGRF	GGNL	ALNL	GT	FGGVFI	AGGI	VPRFLE	<i>E. coli</i> k-12							
226	ELTP	QI	I	SERA-	LNGD	YPI	CRL	TLDT	FC	SMLG	TLAAD	VAL	TLG	ARGGVY	LCGGI	I	PRFI	D	<i>H. pylori</i> J99			
222	DI	TAGAL	DG	TDDL	-----	CKE	TL	DLF	CSFI	GSLS	GNL	AL	TYG	AKG	GVYL	AGGV	L	PRFI	D	<i>M. degradans</i> 2-40		
220	KLMP	SEI	TEKA-	L	S	GASPL	CRQ	TL	DI	F	CAML	GT	VAS	NL	AL	TL	G	ARGGVY	LCGGI	I	PRVLE	<i>N. meningitidis</i> MC58
227	EVGAL	AMAG	DAQADA	-----	VLEHF	FL	WL	AR	VAG	NAVL	TVGAL	GGVYI	TGGI	VPRFLE							<i>P. aeruginosa</i> PA01	
232	DI	TAI	AL	GEMED	TAGD	HARC	RY	AVDTF	CAML	GT	VAA	NL	AV	TL	G	ARGGVYI	GGGI	VPRLGA				<i>R. solanacearum</i>
212	NLRPKDI	TERA-	LADSCI	DCRR	ALS	LF	CVI	MGRF	GGDL	AL	TMG	T	FGGVYI	AGGI	VPRFLE							<i>S. typhimurium</i> LT2

	310	320	330	340	350																																															
281	ALRTS	AF	LARF	HEKGR	FRD-	YLDV	VPI	RLV	TH	P	PAFI	GLAG	LVSD		<i>R. rubrum</i> S1																																					
271	FFKGS	GFRA	A	EDKGR	FKE	-YV	HDI	P	VYLI	V	H	DN	P	G	L	G	S	GAHL	R	Q	T	L	GHI	-L	<i>E. coli</i> k-12																											
285	YFKTS	PF	RAR	FET	TKGR	MGA-	F	L	ASI	P	VH	V	M	K	K	T	P	G	L	D	G	A	G	I	A	L	E	N	Y	L	L	H	D	R	I	<i>H. pylori</i> J99																
276	YFKS	SDF	V	KRF	SEK	GVMS	H-	Y	V	E	N	I	S	Y	E	T	A	F	V	G	A	A	W	L	D	Q-	-----	L						<i>M. degradans</i> 2-40																		
279	YFKTS	PF	R	S	R	F	E	N	K	G	R	F	E	A-	Y	L	A	A	P	V	Y	V	L	S	E	F	P	G	I	S	G	A	A	A	L	D	N	H	L	R	N	--	V	<i>N. meningitidis</i> MC58								
280	R	F	I	A	S	G	F	A	E	A	F	A	S	R	G	K	T	S	G	A	Y	L	Q	D	V	P	V	W	M	T	A	E	H	P	G	L	G	A	G	V	A	L	Q	Q	A	L	-	D	A	E	G	<i>P. aeruginosa</i> PA01
292	A	F	A	N	S	P	F	R	R	R	F	E	D	K	G	R	F	S	G-	Y	V	A	A	M	P	V	Y	V	I	H	A	P	Y	P	G	L	I	G	L	C	A	A	M	D	H	A	V	A	S	G	H	<i>R. solanacearum</i>
271	FFKAS	GF	R	G	F	E	D	K	G	R	F	KD-	YV	H	G	I	P	V	Y	L	I	V	H	D	N	P	G	L	L	G	S	GAHL	R	Q	T	L	G	H	I	-L							<i>S. typhimurium</i> LT2					

C. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 restriction endonuclease with sequences of a bacterial restriction endonuclease.

	10	20	30	40	50	60	
1	M-----						<i>R. leguminosarum</i>
1	M-----						<i>X. campestris</i>
1	MRPALWEGAL TMDLFSRLEGAKEPKETKETEKAKEPKEPKEPKEPKEPKETKEAKEP						<i>R. rubrum</i> S1
	70	80	90	100	110	120	
2	-----AGLPPVLPWQEVQKRLGMVYPQGT SARHRLVNDI ASKTVF TAI YI NAVDGS						<i>R. leguminosarum</i>
2	-----SLPPYVDRRTI HQRLPLI FQEGTPNRRNYCI REMAASAVF VMLYI GAVEGT						<i>X. campestris</i>
61	PAFAPETPAAPLPPYASRDLI AARLPLI FPAGTPNRTYCVRDLAAI SVFEALYI GAVEGR						<i>R. rubrum</i> S1
	130	140	150	160	170	180	
53	GI QLAPKHYRMTQE QSGLI TDAHRLAYATAI MKAGGHVDGERWYLDNTRESI RDDTSRE						<i>R. leguminosarum</i>
52	GRWLAPKHVMRMTVEQALLSDDAVREAYGLGAMKPGFRVAGQRWYEENSREPLRDETLRQ						<i>X. campestris</i>
121	GCFWGPVHVYRMTNEQALLADEADRLAYGLAVLRKGGGI SGRWYADNTREPI RDETLRD						<i>R. rubrum</i> S1
	190	200	210	220	230	240	
113	ALVATGAVI EDTTAATTS GKGRYALQAFAALMVPALQDEALDQAI NEWRGRYLTAGALA						<i>R. leguminosarum</i>
112	GFI TNNVAERTGLPTTSGLPYALKTDF AALFDPALAGDDLI AAI TAWQEAHLSASAMA						<i>X. campestris</i>
181	GLVAI GAVI RRGDLP TTSQQPRYALKAFAALFDPALDGPALDAAI AAFQAAHLSRSALA						<i>R. rubrum</i> S1
	250	260	270	280	290	300	
173	RVAI VRAGAAATGGTHVQVTFPNGETRRLKAGPSSVI TKDVI EVFSPRFLGDPAVLWVSES						<i>R. leguminosarum</i>
172	RI ALVRRGAAP TDEGVMVTFPNGETRRMAPGPSSVI SKAVI EEFAARFLTQPAVLWVSES						<i>X. campestris</i>
241	RVAI MRAGATAGAEGVLRVFPSETRQLAPGPSSI I AQAVVEVFAPRFLAAPAVLWVSES						<i>R. rubrum</i> S1
	310	320	330	340	350	360	
233	GNKVVARDEKLATAI GLSI QSDKDL PDI I LVDLKPAHP ---LLVFVEVVATDGPI GVRRK						<i>R. leguminosarum</i>
232	AAKVSRDDELAKSLK LKI TADRNL PDI I LVDLGGGGV TGFLLVFI EVVATDGPI TMQRR						<i>X. campestris</i>
301	GNKVVLRDDALAHAI GLRI EADKTL PDI I LADLGPKDP ---LLAPVEVNATDGALSPHRQ						<i>R. rubrum</i> S1
	370	380	390	400	410	420	
290	AALEKI AEDAGFDLQHVAFVTAYLDRS QSTFKRTAETLAWGTF AWFAGEPEHI VELSEG-						<i>R. leguminosarum</i>
292	EAFMQI AADAGFTPEAVAFVTAYLDRS HTAFKKTI AELAWRSFAWFASEPEHI I ALHNGA						<i>X. campestris</i>
358	RAI HALTEAAGFSPAQVLF LTAYQDRQSPGFRKTVGQLGWGGFVWFASEPERLLRLHDSA						<i>R. rubrum</i> S1
	430						
349	--RMLR						<i>R. leguminosarum</i>
352	TSPLPLGTLMHGV						<i>X. campestris</i>
418	GDPRTLAELL						<i>R. rubrum</i> S1

D. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum*

S1 methyltransferase with sequences of a bacterial methyltransferase

	10	20	30	40	50	60	
1	MLTD-----	KPSLQRKRL--	PRTI SAADAPVSLDACRAMARAWSEKI	DDRK			<i>R. leguminosarum</i>
1	MMT-----	LDTAANGLALRSEPPSPAELPSPS QL---	RAVLRTQSKATAERS				<i>X. campestris</i>
1	MGTGLGDDVVTPCGTASTSPEKSAAI	LAGPPSPGVEGTRSDLARARVVARAWAETLTPAR					<i>R. rubrum S1</i>
	70	80	90	100	110	120	
45	RQQAI W S F I A E A V Q A Y I E A S G C P A K S I P G A A S L A V A L T Y H L D A A A G L A Q T L G R E A S K L P						<i>R. leguminosarum</i>
46	QLAF A E A V T A H A V K A Y W E Q L G S G L A V Q P P R T R R A T - - - - F Q K A G R R A A I Q F G Q A I A R L S						<i>X. campestris</i>
61	RADQALLF TTAAMAALRKGI GVEAVARPGFARPRG- - - - RLDHAGARVAQAI GEDAALLP						<i>R. rubrum S1</i>
	130	140	150	160	170	180	
105	I E S A A F Q L S A C Y T A M L P Q D I R S E W G A F Y T P P A L T A R L M E L A Q E A G I D W R A A R V L D P A C G G						<i>R. leguminosarum</i>
101	V E D A A S N L G L L Y T A L L P S E W R S E R G V F Y T P P A L A E R L L D Q A E A A G L D W S R A H V L D P A A G A						<i>X. campestris</i>
117	L A E A L H L I T G L Y P A L L P A R E R G A L G A F Y T P I A L V E R L L D R A T E E G A D W A G L R L L D P A A G G						<i>R. rubrum S1</i>
	190	200	210	220	230	240	
165	G A F L L P V A L R M Q Q A L Q A L S P G E L L D H F A G H L S G F D I D P F A A Q L T Q T W L E I A F A S L S M Q T G						<i>R. leguminosarum</i>
161	G A F L V P A A R R L L K S L G D C S P A V A I H N L S A R L R G F E L D P F A A W M A Q V F V E A A A L P L I V A C G						<i>X. campestris</i>
177	G A F L L G A V A R I R A A L A G C E P A F I L G R I G A R V L G L E V D A R A A A L A Q A A L D I L L A D L A - Q P G						<i>R. rubrum S1</i>
	250	260	270	280	290	300	
225	R P F P A V I R V C N S L E Q P V S S K R F D L V I G N P P Y G R V R L N A R L R E R Y R R S L F G H A N M Y G L F T D						<i>R. leguminosarum</i>
221	R R P T A V L T V C D S L S I - T K S K G F D L V V G N P P F G R L K L A A E R R E Y F S R S L Y G H A N L Y G L F M D						<i>X. campestris</i>
236	R P P P V V L R V A D T L E I P A D P S - F D L V V G N P P Y G R V G L T P A Q R A R F G R G L Y G H A N L Y G V F T D						<i>R. rubrum S1</i>
	310	320	330	340	350	360	
285	L A L Q W A R K G G V V A Y V T P T G F L A G E Y F K A L R A L L A K D A P P F A I D F I T E R R G I F D D V L Q E A L						<i>R. leguminosarum</i>
280	L A V R L A K P D G L V S F L T P S S F L A G E Y F K N L R A V L H K E A P P V S L D F V T A R K G V F D D V L Q E T V						<i>X. campestris</i>
295	I A L R W T A P G G L I A Y L T P T S F L A G R Y Y G A L R G L L A A E A P P L S I D F V H A R Q G V F E D V L Q E T L						<i>R. rubrum S1</i>
	370	380	390	400	410	420	
345	L A T Y R R G S L G S P T V H Y F S V - N G T A - Q V T H A G E F H L P K D A S Q P W L A P R V P D D G V L V K Q L S						<i>R. leguminosarum</i>
340	L A T Y R K G A K R A R A V V S F I E A Q P G V P V K A E P A G H F T L P R K A T A P W F L P R H A D E A E L A K R L R						<i>X. campestris</i>
355	L A L Y R R G G Q A G R V R I H Y L T L G E G R A - R I A H N G T I G L P A D A G A P W L A P R D P G Q G H L V A R V E						<i>R. rubrum S1</i>
	430	440	450	460	470	480	
403	R L P S R L K D W G Y K V S T G P L V W N R F K D Q F R G R A - G K D T F P V I W A E A V S A D G K F S F R A E K R N H						<i>R. leguminosarum</i>
400	A M S A P L A D W G Y K V S T G P L V W N R F K P Q L C D S E E A - G T V P L V W A E S V T S D G R F V L R A E K R N H						<i>X. campestris</i>
414	A M G H R L A E W G Y G V S T G P L V W N R Y K G Q L R D R P T G K R V H P L I W A E A V T A D G R F V F R A A K R N H						<i>R. rubrum S1</i>
	490	500	510	520	530	540	
462	Q P H F K V R P E D Q W L E V S V P C V L L Q R T T S K E Q A R R L I A A E L P E A F I K A H G R V I V E N H L N M V K						<i>R. leguminosarum</i>
459	K P F L R L Q P G D D W L V V R K P C V L L Q R T T A K E Q A R R L I A A E M P A S F I K R H A G V T I E N H L N M M I						<i>X. campestris</i>
474	A P Y F K L Q A G D D A L L V G E P C V L V Q R T T A K E Q H R R L I A A E L P A A F V A G H G G V V E N H L N M V R						<i>R. rubrum S1</i>
	550	560	570	580	590	600	
522	P T A G K P R V S T A V V A A V L N S K I A D R A F R C I S G S V A V S A F E L E A L P L P K P E A L K A V G D L L A K						<i>R. leguminosarum</i>
519	P T V E N P A V S P A L L A A F L N S D A A D R A F R C M S G S V A V S A Y E L E N L P L P T A S D L K R - - - M V G S						<i>X. campestris</i>
534	A K - G T P R V A P A V A A L L N S A V V D Q V F R C M S G S V A V S A F E L E A L P L P A A G D L G P L T A L V A A						<i>R. rubrum S1</i>
	610	620					
582	H A D Q A V I D A A L E R L F L - - G A E						<i>R. leguminosarum</i>
576	K V T R A S V E K A C A K L Y A T E G E A						<i>X. campestris</i>
593	G A P R D D I E A E C A R L Y G - - K G L						<i>R. rubrum S1</i>

E. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1 catalase with sequences of a bacterial catalase.

	10	20	30	40	50	60		
1	MSSN-----	KLTTSWGAPV	GDNQNSMT	AGSRGPTLI	QDVHLL	EKL	AHFNRE	<i>B. subtilis</i>
1	MENKK-----	LTAANGRP	ADNQNSQ	TAGPRGPI	MLQDP	WLI	EKL	<i>B. fragilis</i>
1	MTDRP-----	IMTTSAGAP	PDNQNSL	TAGERGPI	LMQDY	QLI	EKL	<i>B. melitensis</i>
1	MTKHK-----	LTTNAGAP	VPDNQNS	NAMTAGR	GPMLLQ	DVWF	EKL	<i>D. vulgaris</i>
1	MS-SQCPF	SHLAATNL	TMGN	GAPVADN	QNSL	TAGPR	GPLLA	<i>H. influenzae</i> KW20
1	MTTSKCP	VTHL----	TMNNGAP	VADNQNS	L	TAGPR	GPLLA	<i>N. meningitidis</i> MC53
1	MEKKK-----	LTTAAGAP	VVDN	NNVITAG	PRGPM	LLQD	VWF	<i>P. mirabilis</i>
1	MS-K-----	ILTTASGAP	VADNQNS	RSAGPR	GPLLL	DDF	HLI	<i>P. putida</i>
1	MTDRP-----	TI	TTTAGAP	VPDNQNS	L	TAGPR	GGM	<i>Sr. meliloti</i> HPIII
1	MTTR-----	LTTTAGAP	VADNQNS	L	TAGPR	G	VLLQD	<i>R. rubrum</i> S1

Distal heme binding site

	70	80	90	100	110	120		
51	RVVHAKGAG	AHGYFEV	TNDVTKY	TKAALF	LSEV	GKRTPL	FI	<i>B. subtilis</i>
51	RRMHAKGS	GAYGTF	TVTHDI	TKYTRAA	ISQV	GKQTE	CF	<i>B. fragilis</i>
52	RAVHAKGW	GAYGTL	TITGDI	SRYT	KAKVL	QP	-	<i>B. melitensis</i>
51	RRMHAKGS	GAYGTF	TVTHDI	TSYT	KAALF	S	SKIGK	<i>D. vulgaris</i>
60	RRMHAKGS	GAYGTF	TVTHDI	TKYTRAK	ISEV	GKTE	MF	<i>H. influenzae</i> KW20
56	RRMHAKGS	GAYGTF	TVTHDI	TKYTRAK	ISEV	GKTE	MF	<i>N. meningitidis</i> MC53
51	RRMHAKGS	GAYGTF	TVTHDI	TKYTRAK	ISEV	GKTE	MF	<i>P. mirabilis</i>
50	RRVHAKGS	GAYGTF	TVTRDI	TGYT	SAKLF	E	QV	<i>P. putida</i>
52	RVVHAKGW	GAFGSL	KTITGDI	SQYTRAK	LQP	-	GAE	<i>Sr. meliloti</i> HPIII
50	RVVHAKGW	AHGTLTI	THDISRY	TRAKLF	SAV	GKTTP	V	<i>R. rubrum</i> S1

	130	140	150	160	170	180		
111	F	AVK	F	Y	T	E	E	<i>B. subtilis</i>
111	F	AMK	F	Y	T	E	E	<i>B. fragilis</i>
111	F	ALK	F	Y	T	E	E	<i>B. melitensis</i>
111	F	AI	K	F	Y	T	E	<i>D. vulgaris</i>
120	F	ALK	F	Y	T	E	E	<i>H. influenzae</i> KW20
116	F	ALK	F	Y	T	E	E	<i>N. meningitidis</i> MC53
111	F	ALK	F	Y	T	E	E	<i>P. mirabilis</i>
110	F	AVK	F	Y	T	E	E	<i>P. putida</i>
111	F	ALK	F	Y	T	E	E	<i>Sr. meliloti</i> HPIII
110	F	SLK	F	Y	T	E	E	<i>R. rubrum</i> S1

E. continued

	190	200	210	220	230	240	
171	SLHQVTI LMSDRGI PATLRHMHGFGSHTFKWTNAEGEGVWI KYHFKTEQGVKNLDVNTAA						<i>B. subtilis</i>
171	ALHQVTI TMSPRGI PASYRHMHGFGSHTYSFLNAENKRI WVKFHLKTMQGI KNLTDQEA						<i>B. fragilis</i>
171	SLHQVTI LMSDRGLPTDVRHI NNGYSHTYSF WNDAGERYWVKFHFKTMQGHKHWNAEAE						<i>B. melitensis</i>
171	ALHQVTIVVMSDRGI PASYRHMHGFGSHTFSFI SPDNQRYWVKFHLRTQQGI KNLTDAAEAE						<i>D. vulgaris</i>
180	ALHQVTIVVMSDRGI PASYRHMHGFGSHTYSF WNEAGERF WVKFHFRTQQGI KNLTDAAEAE						<i>H. influenzae</i> KW20
176	ALHQVTI VMSDRGI PAGYRHMHGFGSHTYSF WNEAGERF WVKFHFRTQQGI KNLTDAAEAE						<i>N. meningitidis</i> MC58
171	SLHQLTI DMSDRGLPLSYRFVHGFSGHTYSFI NKDNERF WVKFHFRCQQGI KNLMDDEAE						<i>P. mirabilis</i>
170	ALHQVTI LFSDRGI PDGYRHMHGFGSHTYSLI NAQGERTWVKWHFKTQQGI KNLAPADAA						<i>P. putida</i>
171	SLHQVTI LMSDRGLPQTPMHMNGYGSHTYSF WNDAGERYWVKFHFKTQQGHKFFTNEEGE						<i>Sr. meliloti</i> HPIII
170	SLHQVTI LMSDRGLPLDPMHMNGYGSHTYSF WNDAGERF WVKFHFKTQQGHAHLTNAAAK						<i>R. rubrum</i> S1

	250	260	270	280	290	300	
231	KI AGENPDYHTEDL FNAI ENGDYPAWKLYVQI MPLEDAKTYRFDPFVTKVWSQKDYPLI						<i>B. subtilis</i>
231	AI I AKDRESHQRDLYESI ERGDFPKWKVQI QLMTEEEADNYRI NPFDLTKVWPHKDFPLQ						<i>B. fragilis</i>
231	QVI GRTRESTQEDLFS AI ENGEF PKWKVQVQI MPELDADKTPYNPFDLTKVWPHADYPP						<i>B. melitensis</i>
231	AI VARDRESHQRDL YDSI ERGDFPRWTMYVQVMPEKDAEKLPHYHFDLTKVWFHKDCPLI						<i>D. vulgaris</i>
240	EI I ANDRESHQRDL YEAI ERGDFPKWTLFVQI MPEADA EKVPYHFDLTKVWSKDYPLI						<i>H. influenzae</i> KW20
236	KI I ADDRESSQRDL YEAI ERGEF PKWVQI QVMPEADA EKVPYHFDLTKVWPKDYPLI						<i>N. meningitidis</i> MC58
231	ALVGKDRRESSQRDLFEAI ERGDYPRWKLQI QI MPEKEASTVYHFDLTKVWPHADYPLM						<i>P. mirabilis</i>
230	RLAGTDPDYAQRDLFEAI ERGDYPRWTVCI QVMSEAEASRDENPFDVTKTWSQKDYPLI						<i>P. putida</i>
231	AVI GKTREGYQESL FYAI ENGEFPRWTVQVQI MPELDVEKTPYNPFDLTKVWPHADYPPV						<i>Sr. meliloti</i> HPIII
230	VVVGESRESYQEA LFGTI ESGHFPRWTLFVQI MAEREAETTPYNPFDLTKVWPHGDFPLI						<i>R. rubrum</i> S1

	310	320	330	340	350	360	
	----- Proximal heme binding site -----						
291	EVGRMVLDRNPENYFAEVEQATFSPGTLVPGI DVSPDKMLQGRLFAYHDAHRYRVGANHQ						<i>B. subtilis</i>
291	DVGI LELNRRNPENYFAEVEQSAFNPMNI VEGI GFS PDKMLQGRLF SYGDAQRYRLGVNSE						<i>B. fragilis</i>
291	DI GVMELNRRNPENYFTEVENAAFSPSNI VPGI GFS PDKMLQARI FSYADAHRHRLGTHYE						<i>B. melitensis</i>
291	EVGVLELNRNPENYFAEVEQAAFNPANVVPGI SFS PDKMLQGRLF SYGDAHRYRLGVNHH						<i>D. Vulgaris</i>
300	EVGEFELNRRNPENFFADVEQSAFAPS NLVPGI GAS PDRMLQARLF NYADAQRYRLGVCYR						<i>H. influenzae</i> KW20
296	EVGEFELNRRNPENFFADVEQSAFAPS NLVPGV GAS PDKMLQARLF NYADAQRYRLGVNFR						<i>N. meningitidis</i> MC58
291	DVGYFELNRRNPENYFSDVEQAAFSPANI VPGI SFS PDKMLQGRLF SYGDAHRYRLGVNHH						<i>P. mirabilis</i>
290	EVGVLELNRNPLNYFAEVEQAAFGPSNMVPGVGLSPDRMLQGRVFA YADAHRYRVGTNHQ						<i>P. putida</i>
291	EI GVLELNRNPENYFAEI ENAAFSPSNI VPGI GFS PDKVLQARI FSYADAHRYRLGTHYE						<i>Sr. meliloti</i> HPIII
290	EVGVLELNRNAENYFAEI EQAAFSPSNVVPGI GHSPDKMLQARVFA YADAHRYRLGTHYE						<i>R. rubrum</i> S1

E. continued

 370 380 390 410 420 430
 351 ALPI NRARNKVNNYQRDGGMR-FDDNGGGSV--YEPNSFGGP-KESPEDKQAAYPVQGI *B. subtilis*
 351 QI PVNKP RCPFHAFHRDGAMRV-DGNYGSAKG--YEPNSY-GEWQDSPEKKEPPLKVHGD *B. fragilis*
 351 SI PVNQPKCPVHHYHRDGQMNYYGGI KTGNDPDAYYEPNSFNG-PVEQPSAKEPPLCI SGN *B. melitensis*
 351 LI PVNAARCPVHSYHRDGAMRV-DGNHGS TLA--YEPNSY-GEWQEQPDFAEPLAI RGD *D. Vulgaris*
 360 QI PVNRP RCPVHSNQRDGGQRA-DGTYGSLPH--YEPNSF-SQWQQQPDFAEPLKI SGD *H. influenzae* KW20
 356 QI PVNRP RCPVHSNQRDGGQRA-DGNYGSLPH--YEPNSF-GQWQQQPDFAEPLKI NGD *N. meningitidis* MC58
 351 QI PVNAPKCPFHNYHRDGAMRV-DGNSNGI T--YEPNSG-GVFQEQQPDFKEPPLSI EGA *P. mirabilis*
 350 QLPVNAP RCPVNSYQRDGS MAT--GSYGSAPN--YEPNSYAAAPKQSPRHAEPALALNGS *P. putida*
 351 HI PVNQPKCPVHHYHRDGQMNYYGGI RTGNPDAYYEPNSFNG-PAEQPLAKEPPLRI DGD *Sr. meliloti* HPIII
 350 ALPVNAPLSPVNHYHKDGP MRF F P--NNPNADAYYEPNSFGG-PKEDPSVKEPPLRI NGD *R. rubrum* S1

440 450 480 500 510 520
 407 ADSVSY--DHNDHYTQAGDLYRLMSEDERTRLVENI VNAMKPVEKEEI KLRQI EHFYKAD *B. subtilis*
 408 VFNYNERYDDDDYSQP GDLFRLMPADEQQLLFENTARAMGDAE-LFI KQRHVRNICYKAD *B. fragilis*
 411 ADRYNHRI GNDDY-SQPRALFNLFDAAQKQLF SNI AAAMKGV P-GFI VERQLGHFKLI H *B. melitensis*
 407 AAHWNFRE-DADYDQPGRLFR L MTPQQQDEL F QNTARAMGDAP-EEI KRRHVG NCAKAD *D. Vulgaris*
 416 AAHWDYR TDDNDYFSQPRALF NLMNAEQKQSLFNNTAAAMGDAP-DFI KYRHI RNCHWCD *H. influenzae* KW20
 412 AAHWDYR QDDDDYFSQPRALF NLMNDAQKQALF GNTAAAMGDAP-DFI KYRHI RNCYRCD *N. meningitidis* MC58
 408 ADHWNHRE-DEDYFSQPRALYELLS DDEHQRMFARI AGEL SQAS-KE TQQRQI DLF TKVH *P. mirabilis*
 406 ADRYDHREDADYY-SHAGALFRLMSDEQKALLI SNI AGTMAGVS-ENVI QRQLQYFFKAD *P. putida*
 410 MSRYDHRVGNDDY-VQVRALFGLFDEGQKSR LFSNI AAAMGGVP-GEI I ERQLI HF ARVH *Sr. meliloti* HPIII
 407 ADHYNHREGNDDY-VQVGALFALFDEGERQLF SNI AEAMAGVP-EEI I RRQLVHFHRAD *R. rubrum* S1

530 540 550
 465 PEYGKRV A E G L G L P I K K D S *B. subtilis*
 457 PAYGTGVAQALGI DLEEALK-----E *B. fragilis*
 459 PEYEAGVRKALKDAHG YDANTI ALNEKI TAAE *B. melitensis*
 465 PAYGAGVARALG-----LK-----M *D. Vulgaris*
 475 AAYGEGVAKALGLTVEDALKARDTDPALGQGGLL *H. influenzae* KW20
 471 PAYGEGVAKALGLTVEDAQAARATDPALGQAGLL *N. meningitidis* MC58
 466 PEYGAGVEKAI KV-----LE GKDAK *P. mirabilis*
 464 PAYGEGI AKGLG-----I NL-----A *P. putida*
 468 PEYEAGVRQALKTAHG YEADTI S-----TAAE *Sr. meliloti* HPIII
 465 PAYGEGVAKALGLAP-----VSQPA *R. rubrum* S1

**F. Multiple alignment of deduced amino acid sequence of *R. rubrum* S1
Transcriptional regulator with sequences of a bacterial AraC family
Transcriptional regulator.**

	10	20	30	40	50	60			
1	GMPETACTLALSPLIKAIL	---	ADFAERRITVPQTEADR	--	RLAFVLVDQLLNAPRRESE		<i>A. tumefaciens</i>		
1	ELPDRCCCTLSISPLLRELI	I	-----	ELSDCAPDDARCAFLGSVLLAELPDM	VPVQQQLH		<i>M. loti</i>		
1	EFPRVPRGVMVSPLLRELI	VRAAGLPL	--	LYDERGREGR	---	LMAVLLDELEWSREQPLA	<i>P. aeruginosa</i> PA01		
1	EFGRRPDD	-----	YDEGDADGR	---	LVRVLLDQIAALPAQPLH		<i>R. rubrum</i> S1		
1	GLDS	-PAVLAVGPLLRELI	V	---	AYTLDPR	---	DTGPER	GRLAVLCDQLRASPPQPLR	<i>S. coelicolor</i> A3(2)
1	GLPARSGVIRLSGLAREVI	MRAASWPLSAMLAE	PVDPAR	-	QLAAVLLDEL	CQAPI	EHLH	<i>X. campestris</i> pv.	
1	ELPASPGMLMNVSPIFNAI	V	---	EDCFTRDLLMPETQQDR	-	RLAHVLI	DQLKVSPPVQRTY	<i>Y. pestis</i>	

Helix-turn-helix DNA binding domain

	70	80	90	100	110	120	
56	LPVSNDDLQPVIDALQADP	GDRRSISEWARLLQTTEK	TLRRFLGHLGVSFNEW	RQRLK			<i>A. tumefaciens</i>
53	LPI SSEPRLKRIAEALANDP	ADRSTLAEWGKRVALSESSLARL	VVKETGLSFGWR	RQQLH			<i>M. loti</i>
56	LPDPADRRLGRVCQALLENP	ADPRGLEEWARYVGASSR	TLARLFSELGVTFVHWR	HQVR			<i>P. aeruginosa</i> PA01
36	LPWFRDPRALAVARALEADP	ADGRPLEEWAREAGASAR	TLARTFRADCGLTFGQWR	LRLR			<i>R. rubrum</i> S1
53	LPTRDPRLAEVCALVHADP	ADTRTLAALGAATGTAERTLS	RFRREFGMTFPQWRT	QSR			<i>S. coelicolor</i> A3(2)
60	LPMPADRRLRLRIARQLLDTP	ADPRPLEAWATWGGLSPRSL	SRHF	RDETGLSFAQWR	QQR		<i>X. campestris</i> pv.
56	LPTSQDKKLSPILAALERCP	ADSTSLALWAKRVYTTERTLS	RRCQQLGMAFSEWR	QRLR			<i>Y. pestis</i>

	130	140	150	160	170	180		
116	LVASLSLIEDGKSVQSI	AKTLGYNSPSAFIAMFRRLL	TGTSPTNLRSTPART	----	I	KA	<i>A. tumefaciens</i>	
113	LI VAI RELASGASVQRVS	GDLGYESVTAFITMFKKAL	GKPPAQYLS	SI	ARNGGS	AFVA	<i>M. loti</i>	
116	AAAALPRLAAGEAVARI	AVDLGYQTPSAFSA	AMFRRLLTGSTPSRY	---	F	-----	AL	<i>P. aeruginosa</i> PA01
96	LLGALERLAAGEAVTAVAF	DMGYDQPSAFIAMFRRLL	GTTPGAY	---	F	-----	R	<i>R. rubrum</i> S1
113	LYHALRMLADDLPVTTVA	HRCGWSASAFIDVFRRAF	GCTPGTHNRRVGT	AHPPV	LV	TV	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	
120	LAEGLRRLSQGTAVAQVAD	QLGYSSPSAFVSFHRHF	GAPPARY	---	LAGGHARG	LASPA	<i>X. campestris</i> pv.	
116	FLHAI SLEQGKTVNSVAL	DVGYSSASAFIAMFQ	QISGTTPERFRG	-----	NS		<i>Y. pestis</i>	

참고문헌

- Altuvia, S., Almiron, M. Huisman, G. Kolter, R., and Storz, G. 1994. The promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and σ^S in stationary phase. *Mol. Microbiol* 13: 265-272.
- Aono, R., Tsukagoshi, N. and M. Yamamoto. 1998. Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the *mar-sox* regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 180: 938-944.
- Anderson, J. E. 1993. Restriction endonuclease and modification methylases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 24-30.
- Angell, S., Schwarz, E. and Bibb, M. J. 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3: its nucleotide sequence, transcription analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844.
- Arguelles, J. C. 2000. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* 174: 217-224.
- Arora, K. K., P. Shenbagamurhi, M. Franciulli, and P. L. Pedersen. 1990. Glucose phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 265: 5324-5328.
- Bagyan, I., Casilas-Martinez, L., Setlow, P. 1998. The *katX* gene which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by σ^F and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J. Bacteriol.* 180: 2057-2062.
- Barnell, W., K. Yi. and T. Conway. 1990. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. *J. Bacteriol.* 172:

7227-7240.

- Beers, Jr. R. F., and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195: 133-140
- Bol, D. K., and Yasbin, R. E. 1991. The isolation, cloning and identification of a vegetative catalase gene from *Bacillus subtilis*. *Gene* 109: 31-37.
- Bol, D. K., and Yasbin, R. E. 1994. Analysis of the dual regulatory mechanisms controlling expression of the vegetative catalase gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 6744-6748.
- Bose, S. K., H. Gest. and J. G. Ormerod. 1962. Light-activated hydrogenase activity in photosynthetic bacterium: A permeability phenomenon. *J. Biol. Chem.* 236, 13-14
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, S. M., M. L. Howell, M. L. Vasil, A. J. Anderson, and D. J. Hassett. 1995. Cloning and characterization of the *KatB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: Purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 177: 6536-6545.
- Chen, L., Keramati, L., and Helmann, J.D. 1995. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal iron. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8109-8197.
- Chiu. J. T., Loewen, P. C., Switala, J., Gennis, R. B., and Timkovich, R. 1989. Proposed structure for the prosthetic group of the catalase HPII from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 7046-7050.

- Cho, Y. H., Lee, E. J., and Roe, J. H. 2000. A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 35 :150-160.
- Cho, Y. H., and Roe, J. H. 1997. Isolation and expression of the *catA* gene encoding the major vegetative catalase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* 179: 4049-4052.
- Chou, J. H., Greenberg, J. T. and Dempfle, B. 1993. Post-transcriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: Positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* 175: 1026-1036.
- Christman, M. F., Morgan, R., Jacobson, F. S., and Ames, B. N. 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* 41:753-762.
- Chrisman, M. F., G., Storz, and B. N. Ames. 1989. *OxyR*, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory protein. *Proc. Natl. Acad. USA.* 86: 3484-3488.
- Claiborne, A., and Fridovich, I. 1979. Purification of the *o*-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. Physicochemical characterization and analysis of its dual catalatic and peroxidatic activities. *J. Bio. Chem.* 254: 4245-4252.
- Claiborne, D. A., and Fridovich. 1979. Purification of *o*-dianisidine peroxidase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.* 254: 4245-4252.

- Concha, M. I. and Leon, G. 2000. Cloning functional expression and partial characterization of the glucose kinase from *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol Lett.* 186: 97-101.
- Cuskey, S. M., Wolff, J. A., Phibbs, P. V. and R. H. Olsen. 1985. Cloning of specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 143: 529-530.
- Demple, B. Johnson, A. and Fung, D. 1986. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. USA.* 83: 7731-7735.
- Deisseroth, A. and Dounce, A. L. 1970. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 50: 319-375.
- Elbein, A. D. 1974. The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 30, 227-256.
- Engelmann, S., Lindner, C., and Hecker, M 1995. Cloning nucleotide sequence, and regulation of *katF* encoding a σ^B -dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 5598-5605.
- Eraso, J. M. and Kaplan, S. 1994. *pprA*, a putative response regulator invoved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in Rhodobacter spheroides. *J. Bacteriol.* 176: 32-43.
- Farr, S. B., and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 55: 561-585.
- Fridovich, I. 1986. Biological effects of superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.
- Gallegos, M. T., Schlieff, R., Bairoch, A., Hofmann, K. and Ramos, J. L. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microl.*

- Mol. Biol. Rev.* 61: 393-410.
- Glaever, H. M., Stryvold, O. B., Kaasen, J., and Strum, A. R. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170: 2841-2849.
- Goldberg, I., and A. Hochman. 1989. Three different types of catalase in *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 268, 124-128
- Greenberg, J. T. and Demple, B. 1989. A global response induced in *Escherichia coli* by redox-cycling agents overlaps with that induced by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 171: 3933-3939.
- Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D., and Demple, B. 1990 Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide generating agents in *Escherichia coli*. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6181-6185.
- Hahn, J. S., Oh, S. Y., and Roe, J. H. 2000. Regulation of the *furA* and *catC* operon, encoding a ferric uptake regulator homologue and catalasoperoxidase, respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol* 182: 3767-3774.
- Halliwell, B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364.
- Halliwell, B., and Gutteridge. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1-14
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1986 Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246:501-514.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1989. Free radicals in Biology and Medicine. 2nd. ed., Oxford University Press (London)
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1990 Role of free radicals

- catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.
- Hanahan, D. 1986. Techniques for transformation of *Escherichia coli*, In "DNA cloning: A Practical Approach" (D. M. Glover ed.), Vol.1, pp109-135, Oxford University Press (London)
- Hassan, H. M., and I. Fridovich. 1978. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 6445-6450.
- Hassan, H. M., and I. Fridovich. 1979. Intracellular production of superoxide redical and hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 196: 385-395.
- Hassett, D. J., Ma, J. F., Elkins, J. G., McDermott, T. R., Ochsner, U. A., West, S. E. H., Huang, C. T., Frederricks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., McFeters, G., Passador, L., and Iglewski, B. H. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.* 34: 1082-1093.
- Hatchikian, E. C., and Y. A. Henry. 1977. Significance of superoxide dismutase and catalase activities in the strict anaerobes, sulfate-reducing bacteria, pp159-172. In A. M. Michelson, J. M. McCord, and I. Fridovich (ed.), *Superoxide and superoxide dismutase*. Academic Press, London.
- Heym, B., Y. Zhang, S. Poulet, D. Young, and S. T. Cole. 1993. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 175: 4255-4259.
- Hochman A., and I. Goldberg. 1991. Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the

- bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1077, 298-307
- Hochman, A., and A. Shemesh. 1987. Purification and characterization of a catalase-peroxidase from the photosynthetic bacterium *Rhodoseudomonas capsulata*. *J. Biol. Chem.* 262: 6871-6876
- Imlay, J. A., and S. Linn. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 240: 1302-1309
- Jenkins, D. E., Schutez, J. E., and Matin, A. 1988. Starvation-induced cross-protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:3910-3914.
- Jouve, H. M., Lasauniere, C. and Pelmont, J. 1983. Properties of a catalase from a peroxide-resistant mutant of *Proteus mirabilis*. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 61: 1219-1227.
- Kim, H., Lee, J. H., Hah, Y. C., and J. H. Roe. 1994. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147. *Microbiology* 140, 3391-3397
- Koh, Y. S., and Roe, J. H. 1996. Dual regulation of paraquat-inducible gene *pqi-5* by *SoxS* and *RpoS* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 22: 53-61.
- Koh, Y. S., Choih, J., Lee, J. H. and Roe, J. H. 1996. Regulation of the *ribA* gene encoding GTP cyclohydrolase II by the *SoxRS* locus in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 251: 591-598.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lee, J. S., Y. C. Hah, and J. H. Roe. 1993. The induction of oxidative enzymes in *Streptomyces coelicolor* upon hydrogen peroxide treatment. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1013-1018.

- Lim, H. K., Kim, Y. M., Lee, D. H., Kahng, H. Y. and D. C. Oh. 2001. Analysis of catalases from photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1. *J. Microbiol.* 39: 168-176.
- Liochev, S. I., and Fridovich, I. 1992. Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon. *Proc. Natl. Acad. USA* 89: 5892-5896.
- Loewen, P. C., J. Switala and B. L. Triggs-Raine. 1985. Catalase HP I and HP II of *Escherichia coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.* 243: 144-149.
- Loewen, P. C., and J. Switala. 1986. Purification and characterization of catalase HP II from *Escherichia coli* K12. *Biochem. Cell Biol.* 64: 638-646.
- Loewen, P. C. 1992. Regulation of bacterial catalase synthesis, In "molecular Biology of free radical scavenging system" (J. Scanodalios ed). pp96-116. Cold Spring Harbor Laboratory Press(New York)
- Martinez, A. and Kolter, R. 1997. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol.* 179: 5188-5194.
- McEwan, A. G. 1994. Photosynthetic electron transport and anaerobic metabolism in purple nonsulfur phototrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 66: 151-164.
- Morgan, R. W., Christman, M. F., Jacobson, F. S., Storz, S. and Ames, B. N. 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 8059-8063.
- Mulvey, M. R. and Loewen, P. C. 1989. nucleotide sequence of *KatF* of *Escherichia coli* suggests *KatF* protein is a novel transcription factor. *Nucleic Acid Res.* 17: 9979- 9991.

- Mulvey, M. R., P. A. Sorby, B. L. Triggs-Rain, and P. C. Loewen. 1988. Cloning and physical characterization of *katE* and *katF* required for catalase HP Π expression in *Escherichia coli*. *Gene*. 73: 337-345.
- Neidhardt, F. C. 1987. Multigene systems and regulons, In "Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecular Biology" (F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger ed.), American Society for Microbiology (Washington, DC)
- Nadler, V., Goldberg, I., and A. Hochman. 1986. Comparative study of bacterial catalase. *Biochim. Biophys. Acta*. 82: 234-241
- Nahmias, J. A. and Bewley, G. C. 1984. Characterization of catalase purified from *Drosophila melanogaster* by hydrophobic interaction chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 355-364.
- Pingoud, A. and Jeltsch, A. 2001. Structure and function of type Π restriction endonucleases. *Nucleic Acid Res.* 29: 3705-3727.
- Rocha, E. R., and C. J. Smith. 1995. Biochemical and genetic analyses of a catalase from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 177: 3111-3119
- Rosner, J. and J. Slonczewski. 1994. Dual regulation of *inaA* by the multiple antibiotic resistance(*Mar*) and superoxide (*SoxRS*) stress response systems of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1994. 176: 6262-6269.
- Salin, M. L. 1991. chloroplast and mitochondrial mechanism for protection against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Commun.* 12-12: 851-858.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis. T. 1989. "Molecular Cloning: a laboratory manual" 2nd ed., Cold Spring Habor

- Laboratory Press (New York)
- Scandalios, J. G. 1992. "Molecular Biology of Free Radical Scavenging System", Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York)
- Schellhorn, H. E. and H. M. Hassan. 1988. Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 170: 4286-4292.
- Schwab, D. A., and J. E. Wilson. 1991. Complete amino acid sequence of the type III isozyme of rat hexokinase, deduced from the cloned cDNA. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 365-370.
- Shi, Q., and G. Jackowski. 1998. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In : Hames, B. D. (Ed), Gel Electrophoresis of proteins. A Practical Approach. 3rd Ed. pp. 1-52. Oxford University Press. N. Y.
- Sies, H. 1991. Oxidative Stress: oxidants and Anti-oxidants. Academic Press (London)
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-512.
- Tao, K. 1997: *OxyR*-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress. *J. Bacteriol.* 179: 5967-5970.
- Tartaglia, L. A., Storz, G. and Ames, B. N. 1989. Identification and molecular analysis of *oxyR*-regulated promoters important for the bacterial adaptation to oxidative stress. *J. Mol. Biol.* 210: 709-7191.
- Tartaglia, L. A., Storz, G., Farr, S. B. and Ames, B. N. 1991. The bacterial adaption to hydrogen peroxide stress. In "Oxidative Stress : Oxidants and Anti-oxidants" (H. Sies ed). pp155-169. Academic Press(London)
- Terlesky, D. P. and Tabita, M. B. 1991. Purification and

- characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter spheroides* ATH2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch. Microbiol.* 169: 503-508.
- Terzenbach, D. P., and M. Blaut. 1998. Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch. Microbiol.* 169: 503-508.
- Tsaneva, I. R., and B. Weiss. 1990. *SoxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 4197-4205.
- Van Bogelen, R. A., Kelley, P. M., Neidhardt, F. C. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidative stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 69: 26-32.
- Van Laere, A. 1989. Trehalose, reserve and/or stress metabolite. *FEMS microbiol. Rev.* 63: 201-210.
- Wagner, G., D. Santos, I. Pacheco, M. Y. Liu, M. Teixeira, A. V. Xavier, and Legall, J. 2000. Purification and characterization of a iron superoxide dismutase and catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J. Bacteriol.* 182: 796-804.
- Wayne, L. G., and G. A. Diaz. 1986. A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamid gels. *Anal. Biochem.* 157, 89-92
- Welsh, D. T., Guyone명, T., Caumette, P. 1998. Utilization of the compatible solutes sucrose and trehalose by purple sulphur and nonsulphur bacteria. *Can. J. Microbiol.* 4. 974-979.
- Wiemken, A. 1990. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Gen.*

- Microbiol.* 58. 209-217.
- Wilson, G. G. 1991. Organization of restriction-modification systems. *Nucleic Acid Res.* 19: 2539-2566.
- Wu, J., and Weiss, B. 1992. Two-stage induction of the *soxRS* (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174: 3914-3920.
- Yumoto, I., Fukumori, Y., and T. Yamnaka. 1990. Purification and characterization of caltalase from a facultative alkaliphilic *Bacillus*. *J. Biochem.* 108, 583-587
- Yumoto, I., D. Ichihashi, H. Iwata, A. Istokovics, N. Ichise, H. Matsuyama, H. Okuyama, and K. Kawasaki. 2000. Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1T exhibiting high catalase activity. *J. Bacteriol.* 182, 1903-1909



적 요

본 연구는 다양한 대사능력을 가진 광합성세균인 *Rhodospirillum rubrum* S1으로부터 catalase를 포함하고 있는 gene cluster의 분자생물학적 특성을 분석하고, *E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1 catalase의 생화학적 특성을 조사하였다. *R. rubrum* S1의 게놈 DNA를 PCR로 증폭한 결과, catalase 유전자 일부분인 245 kbp의 PCR산물을 얻었고, 이 PCR 산물을 탐침으로 southern hybridization을 실시한 결과 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III 절편에서 각각 2개의 신호가 감지됨을 알 수 있었다. 각각의 절편들을 cloninig 하여 *E. coli* UM255에 형질전환시켰다. 그 결과 7.4 kbp의 삽입체를 가지는 한 개의 clone에서 catalase 유전자가 발현됨을 확인하였고, 이 clone을 pSCAT02라 명명하였다. pSCAT02에 대해 염기 서열을 분석한 결과 6개의 ORFs으로 구성되어 있고 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, transcriptional regulator 유전자 순으로 배열되어 있음을 알 수 있었다.

Trehalose-6-phosphate synthase 유전자는 5'-말단쪽으로 약 250 bp의 염기가 결정되지 않는 1092 bp의 염기로만 구성된 유전자 단편임을 알 수 있었고, *Salmonella typhirium*의 trehalose-6-phospahte synthase 유전자인 *otsA*와는 47.8%의 상동성을 보였다. glucokinase 유전자는 trehalose-6-phosphate synthase 유전자의 하류에 있으며, 978 bp 염기서열로 이루어지며 326개의 아미노산 서열로 구성되어 있었다. 염기서열로부터 유추한 단백질의 분자량은 33,865 Da 이었으며 등전점이 7.18이며, N-말단 서열부위에 ATP-binding site가 포함되어 있음을 알 수 있었다. *Helicobacteria pylori* J99와는 35%의 상동성을 보였다. Restriction endonuclease 유전자는 1284 bp의 염기서열로 구성되어 있으며, 428개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 45,987 Da 이었으며, 등전점은 6.645였다. 이 restriction endonuclease의 상류에 바로 인접하여 또다른 하나의 ORF가 존재함을 확인하였고, 1836 bp의 염기서열로 이루어

지며 611개의 아미노산을 암호화하는 methyltransferase로 확인되었다. methyltransferase사이 에 아미노산 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 64,003 Da이었으며 등전점은 9.329였다. Restriction endonuclease는 *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli와 50%의 상동성을, *Rhizobium leguminosarum*와 49%의 상동성을 보여주었고, methyltransferase는 *Xanthomonas campestris* pv. phaseoli와 52%의 상동성을, *Rhizobium leguminosarum*와 49%, 54%의 상동성을 보여주었다.

Methyltransferase의 상류상에 위치한 유전자의 염기서열을 분석한 결과 326 bp로 이루어져 있는 intergenic space가 존재하고 있고, catalase 유전자가 역방향으로 위치해 있음을 확인하였다. 이 catalase 유전자는 1455 bp 염기서열로 이루어지며 484개의 아미노산을 암호화하는 하나의 ORF로 이루어져 있었다. 개시코돈(ATG)의 6 bp하류에 The putative Shine-Dalgarno (SD)sequence(GGAGA)가 존재하고 있었다. 염기 서열에서 추정된 단백질의 분자량은 54,316 Da 이었으며 등전점은 6.468였다. 아미노산 서열을 분석한 결과, *Brucella melitensis*의 catalase와는 85%, *Sinorhizobium meliloti*의 catalase와는 84%로 높은 상동성을 보여 상당히 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. bovine liver catalase에서 보이는 active-site residues, proximal 과 distal heme-binding ligands, 그리고 NADPH-binding residues가 상당히 보존되어 있음을 확인하였다.

AraC transcriptional regulator 유전자는 catalase 유전자의 하류에 위치하고 있으며, catalase 유전자의 종결코돈로부터 31bp 떨어진 위치에 종결코돈 (TAA)이 있었고 3'-말단으로부터 426 bp의 단편 ORF로 구성된 염기서열이 결정되었다. 아미노산 서열을 분석한 결과, C-말단 부위에 helix-turn-helix DNA binding domain이 포함되어 있었고, *Pseudomonas aeruginosa*의 probable transcriptional regulator와는 49.3%의 상동성을 보였다.

*E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1 catalase는 여러 단계의 정제 절차에 따라 순수 정제하여 생화학적 특성을 조사한 결과, 정제된 catalase의 수율은 4.2%였으며, 정제 배수가 91배로 증가한 효소시료 5.3 mg을 얻을 수 있었다. 이 효소의 분자량은 189 kDa으로 61 kDa에 해당하는 동일한 소단위체

네 개로 이루어 졌음 알수 있다. pH 5.5 ~ pH 11.0까지 넓은 범위의 pH에 대해 높은 활성을 보였고, 온도의 영향은 30℃에서 최적이었으나 70℃에서는 거의 활성을 나타나지 않았다. 그리고 20℃에서 60℃까지 효소의 활성이 안정함을 알 수 있었다. 저해제인 3-amino-1,2,4-triazole에 대해 활성이 74%정도 유지되었고, 유기용매에 대해 80%정도 활성이 유지되는 반면, salicylic acid에 대해서는 상당히 활성이 감소되었음 알 수 있었다. 전형적인 Heme 단백질 효소들의 저해제인 NH₂OH에서 4.4×10⁻⁶ M, NaCN에서 8.779×10⁻⁶ M, NaN₃에서 4.0×10⁻⁷ M 농도에서 50%억제되는 것을 알 수 있다. H₂O₂농도에 대한 catalase의 Km값은 110 mM로 Vmax 값은 50000 U/mg으로 조사되었다. 효소의 스펙트럼을 보면 A406/A280 비율이 0.97의 값을 보이며, dithionite에 의한 효소의 환원은 일어나지 않았고, CN-ligated form의 흡수스펙트럼에서는 Soret band가 427 nm로 이동하였고, 550 nm에서 shoulder가 나타났다. *E. coli*에서 정제된 catalase의 prosthetic group는 ferric heme을 갖는 protoporphyrin IX으로 보인다. 이상의 결과로 *E. coli*에서 발현된 *R. rubrum* S1의 catalase는 전형적인 catalase로 사료된다.

본 연구를 통해 처음으로 광합성 세균 *R. rubrum* S에서 catalase 유전자를 포함하는 gene cluster를 분리하여 cloning을 하였다. 그리고 gene cluster에 포함된 trehalose-6-phosphate synthase, glucokinase, restriction endonuclease, methyltransferase, catalase, and the AraC family transcriptional regulator 유전자의 염기서열을 결정하였다. *E. coli* UM255에서 발현된 catalase의 생화학적 특성을 규명하였다. 이상의 연구결과를 바탕으로 광합성세균 *R. rubrum* S1에서 다양한 환경 변화에 대한 catalase의 발현 양상과 생물학적 기능을 밝혀야 할 것으로 판단된다.

주요어 : *Rhodospirillum rubrum* S1, catalase, catalase gene cloning, catalase gene cluster