

Cloning and Identification of dTDP-*L*-Rhamnose Biosynthetic Gene Cluster from *Thermus caldophilus* GK24

Kichan Kim, Seungdon Lee, Juhee Han, JaeKyung Sohng and Kwangkyoung Liou
Department of chemistry, Sun Moon University, Asansi, Chung Nam 336-840, Korea
Tel. (041) 530-2246, FAX (123) 541-1724 (Seung-don Lee)

Abstract : PCR primers were designed based on consensus sequences of dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase, one of the enzymes involved in the biosynthesis of deoxysugar. The PCR product (360 bp) was obtained from *Thermus caldophilus* GK24. Colony hybridization was carried out to the cosmid library constructed from *T. caldophilus* GK24 genomic DNA by the PCR product DNA fragment. We isolated a cosmid clone (pSMTC-1) that was subcloned to call pKCB series plasmid (*Bam*HI fragments), partially sequenced and analyzed. pKCB80 (4.2 kb-*Bam*HI DNA fragment) of them showed ORFs that was *orfA*, *orfB*, *orfC* and *orfD*. The *orfABCD* gene cluster is the deosysugar biosynthetic gene ; *orfA* (glucose-1-phosphate thymidylytransferase), *orfB* (dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase), *orfC* (dTDP-4-keto-*L*-rhamnose reductase) and *orfD* (dTDP-4-keto-6-deoxy-*D*-glucose 3,5-epimerase). The gene cluster that was related in biosynthesis of dTDP-*L*-rhamnose was also identified by computer analysis, and we proposed that the biosynthetic pathway of deoxysugar analyzed from DNA sequencing of pKCB80 is from *D*-glucose-1-phosphate, dTDP-*D*-glucose, dTDP-4-keto-6-deoxy-*D*-glucose via dTDP-4-keto-*L*-rhamnose to dTDP-*L*-rhamnose.

Introduction

Thermus caldophilus GK24는 내열성 미생물로 여러 가지 효소를 만들어 내는데 보통 이러한 효소는 일반 균주가 생산하는 효소와 동일한 기능을 갖고 있으면서도 일반 균주가 갖지 못한 성질, 즉 고온과 같은 극한 상황하에서도 쉽게 활성을 잃지 않고 상당히 안정하기 때문에, 소량의 효소로서 장기간 사용이 가능하며, 고온에서 반응시키므로 반응시간도 단축할 수 있을 뿐 아니라, 다른 미생물의 증식방지 등 많은 장점을 갖고 있다. 이러한 이유로 학문적으로나 산업적으로 내열성 효소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁻²

본 연구는 주 목적물질로 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase의 유전자 분리 및 과다발현과 유전자의 기질특이성 및 효소 성질 특성을 연구의 내용으로 정한다. PCR primer로 사용될 이미 알려진 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase의 염기서열을 기초로 하여 제작될 이 유전자는 산화 환원 반응에 관여하는 효소로서 1차 물질대사

인 Glucose-1-phosphate에서 dTDP-D-glucose로 전환된 다음, KEY STEP인 dTDP-D-glucose에서 dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose로 전환되는 과정으로 이 과정은 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (EC4.2.1.46) 에 의해 전환되어 deoxyhexose 혹은 dideoxyhexose의 생합성 과정에 관여한다.(figure. 1)³⁻⁵

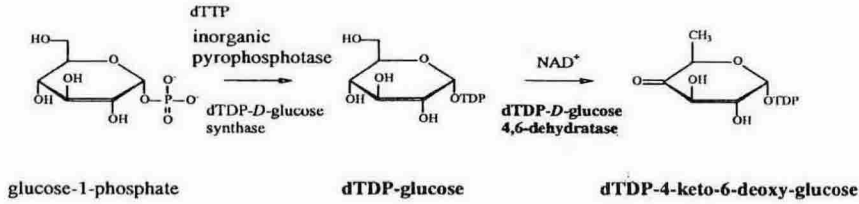


figure. 1 dTDP-D-glucose에서 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase에 의한 dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose로의 반응 메카니즘

그리고 본 연구는 또한 항생제의 다양한 glycone을 합성 할 수 있는 중간체인 4-keto-6-deoxy-D-glucose 합성에 관심을 갖고 있다. 4-keto-6-deoxy-D-glucose로부터 간단한 유기 합성에 의해 다양한 deoxysugar를 합성할 수 있으며, 다양한 glycone을 합성하는데 매우 중요한 중간체이다. 유기합성 방법에 의하면 중요한 중간체인 4-keto-6-deoxy-D-glucose를 합성하는데 6단계의 과정이 필요하고 수율도 극히 낮다. 그러나 생합성 과정을 거치게 되면 높은 수율과 짧은 과정을 통해 이를 얻을 수 있다.⁵

Materials and methods

Strains and vectors. *Escherichia coli* strain은 XL1-Blue MRF' (STRATAGENE, La Jolla, CA. USA) 와 BL21(DE3) (Stratagene, Heidelberg, Germany)를 gene cloning을 하는데 Host cell로 사용하였으며 배양시에는 LB medium과 2xYT medium pH 7.0을 사용하였다. *Thermus caldophilus* GK-24 는 생명공학연구소(KRIBB-Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)에 있는 Protein Engineering Lab에서 배양된 상태로 얻을 수 있었다. pOJ446 (*E. coli-Streptomyces* shuttle cosmid ; Eli Lilly Co.), pGEM-7Zf 그리고 pGEM-3Zf (PROMEGA. Inc.)는 DNA manipulation에 하는데 사용되었고 pRSETB(Invitrogen Co), pMAL(Novagen Co), pKKC223-3(Pharmacia Co.) 그리고 pET-32a(Novagen Co.)는 gene Expression하는데 사용되었다. 이때 Restriction enzyme, T₄ DNA ligase 그리고 Wizard miniprep DNA kit를 사용하였다. Polymerase chain reaction (PCR) 은 Pre-MixTM kit(Bioneer, Korea) 를 사용하였다. Agarose 과 low melting agarose(GIBCO BRL Products Co.) 재조합 확인을 위해 사용되었다.

Erase-a-base system을 이용한 sequence template 제조. 염기서열 분석에 이

용할 DNA 단편 39 μl (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 Erase-a base kit를 사용하여 template를 준비하고 이를 E.coli에 형질 전환하였다. Plasmid를 얻어 PvuII로 반응하여 agarose gel에 전기영동하여 관찰하였다.

염기서열 분석 및 유전자 분석. Template의 농도를 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 하고 염기서열 분석은 생명공학연구소(KRIBB)의 유전체 사업단에서 자동 염기서열분석장치를 사용하여 이루어졌다. 부분적인 염기서열의 연결은 Seq-man program를 통하여 연결하고 염기서열의 자료를 바탕으로 internet 상의 BLAST을 이용하여 Gene Bank상에 존재하는 유전자와 비교 되었다.

Result and Discussion

L-rhamnose 생합성 유전자 클론. PCR 방법으로 이미 알려진 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 유전자들의 유사부분을 primer (Dw11 (5' to 3' upstream primer) 5'-CAC-TTC-GGG-GGC-GAG-TCG-CAC-GT-3', Dw21 (5' to 3' upstream primer) 5'-TCC-ACG-GAC-GAG-GTC-TAC-GG-3', Dw32 (5' to 3' downstream primer) 5'-GGG-CCG-TAG-TTG-TTC-GAG-CA-3') 로 제작하여 *Thermus caldophilus* GK24를 template로 DNA를 증폭하였다. 증폭된 DNA를 정제하여 ^{32}P -CTP를 이용해서 probe를 radioactivity를 갖게 했다.

pKCB80(4.2kb 유전자 단편)의 유전자 분석. Colony hybridization을 통해 얻은 colony를 LB(apl) 액상배지에 37 °C overnight 배양하여 plasmid를 얻었고 이를 제한 효소 BamHI 으로 반응시켰다. pGEM7(+) cloning vector를 같은 제한 효소를 이용하여 반응시켜 이미 준비된 DNA 단편과 재조합하였다. 이것을 E. coli에 형질전환하여 9개의 각각 다른 plasmid를 얻었다.(Table. 1)(figure. 5) 각각 얻어진 plasmid를 pKCB10 부터 pKCB90 까지 명명하고 이를 Automatic sequencer에 의해 염기서열 분석을 하였다. 이중 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 가 재조합된 pKCB80 에 포함되어 있음을 알았다. 또한

이름	size
pKCB 90	7 kb
pKCB 80	4.4 kb
pKCB 70	3.5 kb
pKCB 50	2.5 kb
pKCB 40	2.5 kb
pKCB 30	2.1 kb
pKCB 20	1.6 kb
pKCB 10	1.2 kb

Table. 1 subclone된 단편과 크기

GCG program을 이용하여 4개의 orf를 찾아냈고 유사성을 조사한 결과 orfA는

glucose-1-phosphate thymidyltransferase, *orfB*는 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase *orfC*는 dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase, *orfD*는 dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glucose 3,5-epimerase와 유사성을 보이는 유전자임을 알수 있었다. 앞에서 말한 *orfABC*와 *D*는 L-rhamnose 의 생합성 유전자와 매우 높은 유사성을 보이고 있다. (figure 2)

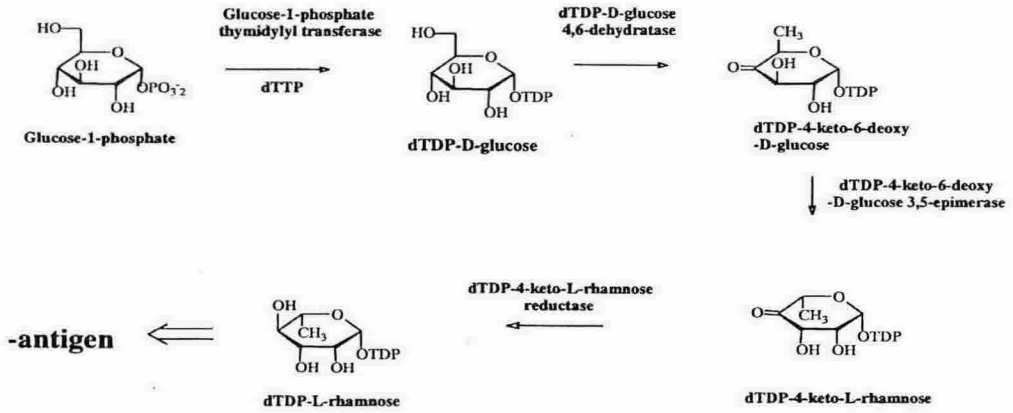


figure 2. dTDP-L-rhamnose의 생합성과정

그밖의 재조합된 단편 pKCB80을 제외한 나머지로 부터 다양한 이차 물질대사에 관여하는 유전자와 유사성을 가진다는 것을 알았다.

Gene expression. *orfA*, *orfB*, *orfC*의 발현을 위해 PCR primer를 제작하였고 제작된 primer로부터 PCR product를 얻었다. 각각의 PCR product는 발현 벡터 (pET 32a)에 재조합하여 E.coli BL21(DE3)에 형질 전환하였다. 그중 아래 그림은 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase gene을 각각 *EcoRI* 과 *HindIII* site로 pET 32a와 재조합하여 발현된 결과로서 전체 크기는 fusion prodein을 포함하여 이론적으로는 약 48000Da 이 나오고 결과와 일치함을 보여준다.(figure 3)(figure 4)

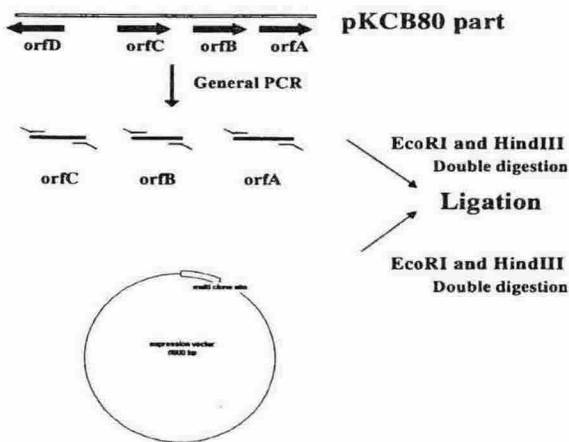


figure 3. 발현을 위한 재조합

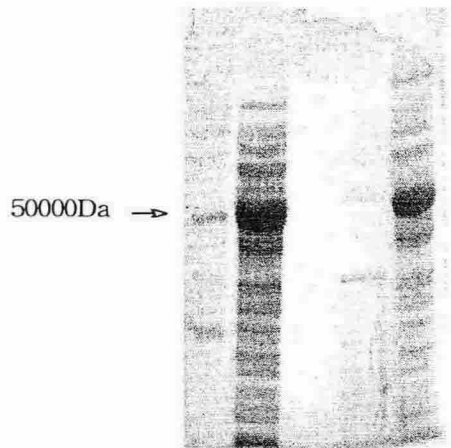


figure 4. TDP-glucose 4,6-dehydratse

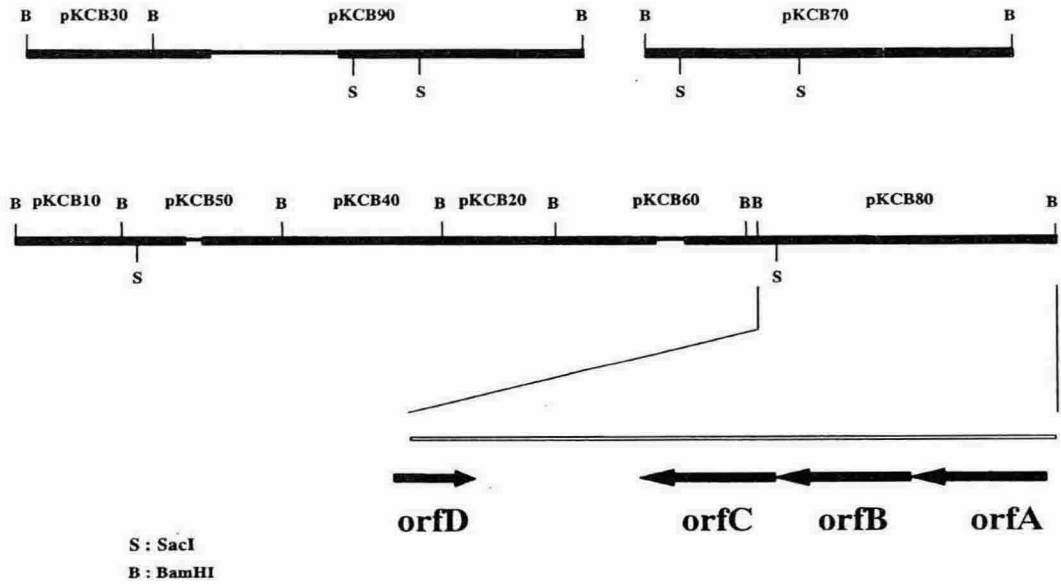


figure 5. map of sequence

현재 발견된 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase는 assay 중에 있으며 orfA와 orfC도 과다 발현 준비중에 있다.

국문요약

알려진 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase의 amino acid 서열로부터 primer를 제작하여 내열성 균주인 *Thermus caldophilus* GK24에서 colony hybridization 과정을 거쳐 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase를 포함하는 cosmid DNA를 얻었다. 유전자 분석을 위해 cosmid DNA를 subclone 하여 작은 크기로 분리하였다. 분리된 cosmid를 pSMTC-1 으로 명명하고 pSMTC-1를 *Bam*HI으로 반응시켜 *Bam*HI 단편 모두를 pGEM 7(+)를 이용하여 subclone 하였다. 각각의 이름은 크기에 따라 pKCB10(1.2kb-*Bam*HI), pKCB20(1.6kb-*Bam*HI), pKCB30(2.1kb-*Bam*HI), pKCB40(2.5kb-*Bam*HI), pKCB50(2.5kb-*Bam*HI), pKCB60(2.7kb-*Bam*HI), pKCB70(3.4kb-*Bam*HI), pKCB80(4.4kb-*Bam*HI), pKCB90(7.0kb-*Bam*HI) 으로 명명하였다. 각각의 subclone된 유전자를 분석하기 위해 Erase-a-base 방법을 이용하여 template를 준비하였고 이를 자동 염기서열 분석기를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열분석 결과 pKCB80(4.2kb)에 dTDP-*D*-glucose synthase(*orfA*) 유전자를 비롯하여 dTDP-*D*-glucose 4,6-dehydratase(*orfB*), *orfC* (dTDP-4-keto-*L*-rhamnose reductase) 그리고 *orfD*(dTDP-4-keto-6-deoxy-*D*-glucose 3,5-epimerase)와 유사한 유전자들이 있음이 확인 되었고 dTDP-*L*-rhamnose의 생합성 과정을 예상할 수 있었다.

Reference

1. 김중수, 1999, Biochemical and Genetic Analysis of UDP-sugar Pyrophosphorylase and Neighboring ORFs from *Thermus caldophilus* GK24. Thesis for Degree of Doctor
농화학과 고려대학교
2. 이대실, 1996, Genome Analysis of *T. caldophilus* 최종보고서, 4-12
3. 콧미선, 이승구, 정상철, 서승현, 이재홍, 전영중, 김영호, 성문희, 1999, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 184-190
4. Ko J-H, Kim C-H, Lee D-S, Kim Y-S, 1996, *Biochem. J.*, 319: 977-978
5. Sohng, J-K., Oh, T-J., and Kim, C-G., 1997, *J. Biochem. Mol. Biol.* 31:457.