

Mycobacterium tuberculosis H37 Rv2435c의 유전학적 연구

김세영, 류혜진, 배영민*

창원대학교 생물·미생물학과*

전화 (055) 279-7460, FAX (055) 279-7460

Abstract

cAMP는 사실상 모든 생물체에서 second messenger로서 역할을 한다. 그리고, adenylyl cyclase(AC)는 적어도 3개의 독립적인 Class가 존재한다. Class I AC는 *Escherichia coli*와 *Yersinia* 같은 bacteria에서 존재하고, Class II AC는 *Bordetella pertussis* 또는 *Bacillus anthracis*로부터 toxin을 가지며, Class III AC는 모든 phyla에서 존재한다. *Mycobacterium tuberculosis*의 완전한 genome에서 15개의 open reading frames(ORFs)를 가진다. 15개의 AC ORFs중에서 Rv1625c와 Rv2435c가 mammalian-type AC에 속한다.

우리는 이 두 개중에서 Rv2435c의 아미노산 sequence를 분석하였고, 아미노산의 소수성과 친수성에 대하여 아미노산 17개마다 분석하면 두 부분에서 소수성의 peak가 강하게 나왔다. 이것으로 Rv2435c를 두 부분으로 나누어 보는데 sequence의 상동성을 통하여 앞부분은 DcrH와 유사하고 뒷부분은 adenylyl cyclase 또는 guanylyl cyclase와 유사하였다. 환경변화(용존산소)에 대한 sensor를 가지고 이것을 통하여 methylation하여 활성화하는 역할을 가지는 것인데, 이것을 통하여 Rv2435c 역시 membrane에 붙어 어떠한 환경적인 요인을 sensor가 감지하면 뒷부분에 있는 adenylyl cyclase 또는 guanylyl cyclase에 활성을 주어 ATP를 cAMP 또는 GTP를 cGTP로 전환시킨다.

따라서, 우리는 Rv2435c의 기능과 역할을 알아보기 위해서 첫 번째, *Mycobacterium bovis* BCG chromosome으로부터 Rv2435c를 증폭 분리하기 위해서 PCR을 실행하였다. 따라서, 800bp의 Rv2435c가 순수분리 되었다. 두 번째, 우리의 조건을 충족시켜줄 수 있는 expression vector를 가지고, 약 4.2kb 정도의 pRv2435c가 구축되었다. 세 번째, 이 구축한 vector를 *E. coli* M15와 BL21에 transformation 시켜서 발현시켰고, 발현을 확인하기 위해서 SDS-PAGE와 western blotting analysis를 수행하였으나, SDS-PAGE에서는 약 29.5kDa의 발현된 단백질 band를 확인할 수 없었다. 하지만 western blotting analysis에서는 선명한 29.5kDa의 단백질 band를 확인할 수 있었다. 네 번째, 단백질을 발현한 *E. coli*에서 pRv2435c를 뽑아내어 cyclase 결핍된 균주인 *E. coli* DHT1에 transformation 시켜서 cyclase activity의 유무를 확인하기 위해서 indicator plate인 MacConkey 배지로 확인할 수 있었다. 더 나아가서 Rv2435c가 발현된 *E. coli*를 membrane과 원형질로 분리하여 정제하였을 때, Rv2435c가 어디에 존재하는지 또 부가적으로 *Mycobacterium bovis* BCG에서도 분리하여 정제했을 때, Rv2435c가 어디에 존재하는지를 연구할 계획이다.

References

1. **Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller.** "One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution" (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 2172-2175
2. **Dautin, N., G. Karimova, A. Ullmann, and D. Ladant.** "Sensitive genetic screen for protease activity based on a cyclic AMP signaling cascade in *Escherichia coli*" (2000), *J. Bacteriol.*, 182(24), 7060-7066.
3. **Linder, J. U., A. Schultz, and J. E. Schultz.** "Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain"(2000), *J. Biol. Chem.*, manuscript.
4. **McCue, L. A., K. A. McDonough, C. E. Lawrence, and J. E. Schultz.** "Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*"(2000), *Genome Res.*, 10, 204-219
5. **Reddy, S. K., M. Kamireddi, K. Dhanireddy, L. Young, A. Davis, and P. T. Reddy.** "Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv" (2001), *J. Biol. Chem.*, 276(37), 35141-35149.
6. **Ullman, A., and A. Danchin.** "Role of cyclic AMP in bacteria"(1983), *Adv. cyclic Nucleotide Res.*, 15, 1-53.
7. **Ying. L., T. Seebacher, U. Kurz, J. U. Linder and J. E. Schultz.** "Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*"(2001). *EMBO J.*, 20(14), 3667-3675.