

Cloning and Characterization of S-Adenosyl-L-methionine synthetase gene from *Saccharomyces cerevisiae*

Kwon-Hye Ko¹, Gee-Sun Yoon¹, Gi-Sub Choi¹, Joo-Won Suh² and Yeon-Woo Ryu¹,*

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, South Korea, 443-749.

²Department of Biological Science, Institute of Bioscience and Biotechnology, Myongji University, Yongin, Korea, 449-728. TEL:+82-31-219-2455, FAX:+82-31-216-8777

Abstract

S-Adenosyl-L-Methionine(SAM) has an important role for DNA methylation and cell signaling. SAM was synthesized from methionine and ATP by SAM synthetase and play an pivotal function in the primary and secondary metabolism of cells. Recent studies have revealed in the effect of SAM in case of morphological differentiation in both eukaryotes and prokaryotes. We isolated SAM gene from *Saccharomyces cerevisiae* and cloned it into expression vector for *E. coli* respectively. An 1.15 kb SAM-s gene fragment was isolated by Low-strigency PCR using ORF primer. By the analysed primary sequence deduced from DNA sequence, this gene included conserved domains similar with other well-known SAM synthetase. First of all, SAM synthetase gene cloned pGEM-T vector and subcloned into histidine tagging system to purify the expressed protein using metal chelating resin. Typical characteristic analysis of this enzyme is underway.

서론

SAM-s는 Cantoni에 의해 처음 알려진 후 그 기능적, 활용적 연구들이 이루어져 왔다. S-Adenosyl-L-methionine (SAM)은 기질로 ATP와 L-methionine을 이용하여 SAM synthetase 에 의해 만들어 진다. SAM-s은 단백질, 핵산, 탄수화물 등의 생합성 과정에 methyl group의 공여체로 작용한다. SAM 대사과장 중에 생성되는 homocystein은 glutation의 전구체로 이용된다. 지금까지 SAM의 생체 기능 연구는 동물, 식물, 미생물을 대상으로 유럽과 미국의 연구진에 의하여 주도되고 있으며 대표적인 연구로서, DNA를

methylation하는 gene silencing, 단백질의 methylation에 의한 유전자 발현을 조절, 생체 막의 유동성에 중요한 역할을 하는 phosphatidylcholine의 형성, 생리 활성을 가진 생체 저 분자 물질의 생합성 과정 중에 methylation의 co-factor로서의 작용 등이 있다. 현재 *E.coli* 를 host로 이용하여 활성이 있는 효소로 발현시키기 위한 연구를 진행하고 있다.

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 vector

본 연구에서 사용되는 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* 이며, YPD media(glucose 20g/L, Yeast extract 10g/L, Bacto peptone 10g/L) 배양액 조성으로 30°C에서 24시간 배양하여 chromosomal DNA를 분리하는데 이용하였다. Vector로는 pQE30 plasmid vector (Qiagen Co.USA)를 이용하였다.

2. *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s의 유전자 Cloning

SAM-s gene유전자를 분리하고 증폭하기 위해서 *Saccharomyces cerevisiae*의 chromosomal DNA 에서 *pst* I 과 *Bam*HI 의 제한 효소site를 가지는 Primer로 Forward primer는 5'-CGCGGATCCATGGCCGGTACATTTTTATTTCAC-3을, reverse primer는 5'-GAACTGCAGTTAGAAGTTCAAAGTCTTAGGCTTTTC-3'을 사용하였다. 유전자 증폭은 Low-Stringency PCR을 사용하여 denaturation 온도 95°C 7min, 94°C 1min, 43°C 1min 30s, 72°C 1min, 5 cycle. 94°C 1 min, 60°C 30s, 72°C 1min, 35 cycle, 72°C 5min.로 PCR Thermal cycler(Takara D-1528, Japan)을 사용하여 PCR을 수행하였다.

3. *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s의 활성 측정

*Saccharomyces cerevisiae*의 chromosomal DNA에서 분리한 1.15Kb의 SAM-s gene을 pQE 30 vector에 Cloning하여 *E.coli* host XL1-Blue에 transformation하여 단백질을 overexpression하였다. SAM-s의 단백질 분리는 Histidine tagged protein의 정제를 위해서 Ni-NTA superflow resin(Qiagen Co, USA)을 이용하여 순수 분리하였다. 순수 분리한 단백질은 SDS-PAGE로 발현을 확인하였다. SAM-s의 활성 측정을 위해 Tris/Hcl 100mM, KCl 200mM, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM, ATP 30mM, L-methionine 15mM의 기질 반응액에 분리된 효소를 100 μ l 첨가한 후 50mM EDTA로 반응을 정지시켰다. 반응 산물인 SAM을 측정하기 위해 TLC용매(butanol : acetic acid : water = 60 : 15 : 25)로 TLC(type 60 F254, Merck, USA)에 25 μ l씩spotting하여 254nm에서 측정하였다.

결과 및 토의

1. *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s 의 Cloning

Saccharomyces cerevisiae 의 chromosomal DNA를 분리 한 후, Low-Stringency PCR방법을 사용하여 알려진 *Saccharomyces cerevisiae*의 알려진 SAM-s의 ORF를 PCR primer로 제작 하여 1.15Kb에 해당하는 PCR fragment를 얻었다. 이 fragment DNA를 pQE30 plasmid vector에 Cloning 하였으며 PQE30-SAM 재조합 DNA를 제한효소 *pst* I 과 *Bam*H I 을 이용하여, enzyme cutting한 결과 삽입된 DNA fragment의 크기를 확인 하였다.

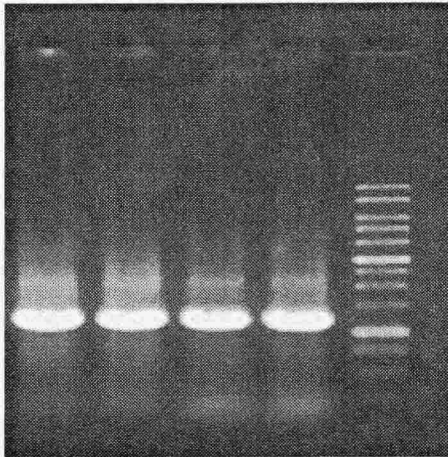


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product using ORF primer and status of LS-PCR.

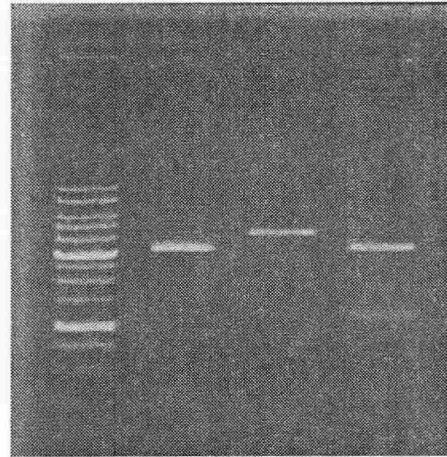


Fig 2. Lane M : DNA Mark
Lane 1 : recombinant DNA
Lane 2 : restriction enzyme 1-cut
Lane 3 : restriction enzyme 2-cut

2. *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s의 발현 및 활성화

pQE30 vector에 cloning한 SAM-s gene인 PQE-SAM을 *E.coli* host 인 *XL1-Blue*에 Transformation하고 overexpression 하여 그 발현 정도를 SDS-PAGE로 확인 하였다. 1mM IPTG를 넣고 2시간 30분 정도에서 가장 발현이 잘 되었다.

이미 보고 된 *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s gene의 알려진 ORF와 일치하는지 알아보기 위하여 염기서열을 분석하였고, nucleotide sequence로 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)검색을 수행한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* SAM-s과 99%일치함을 보였다. Conserved domain 검색 결과 S-Adenosyl-L-methionine synthetase는 C-terminal,

N-terminal 및 Central domain으로 나누어지고 domain에 ATP와 methionine binding 하는 부위가 구조적으로 안정해야 하므로 생물 간의 차이가 적은 것으로 사료된다.

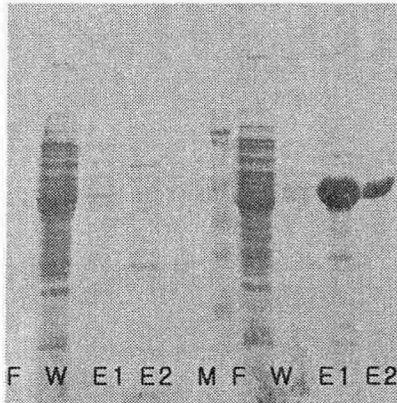


Fig 3. Lane M: Protein Mark
Lane:Flow,Washing,Elution1, Elution2.It were eluates of empty-vector(pQE30) Lane:Flow,Washing, Elution1,Elution2.It were eluates of SAM-s gene harboring vector

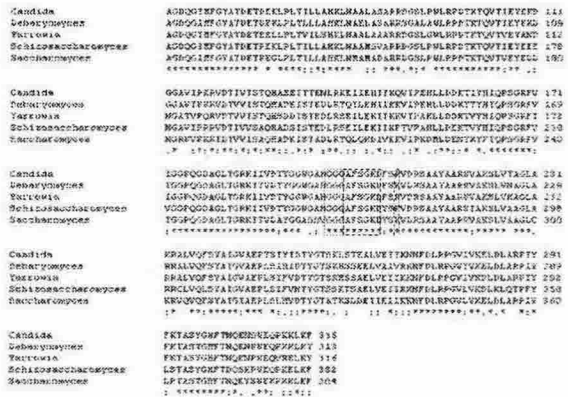


Fig 4. Multiple amino acid sequence alignment of Saccharomyces cerevisiae, MATK symbols ATP binding site, Mg+ binding site, K+ binding site.

Reference

1. Tabor CW, Tabor H. (1999) Methionine adenosyltransferase(S-adenosylmethionine synthetase and S-adenosylmethionine decarboxylase. Annu Rev Biochem. 68:1-32.
2. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, et al. (1996)S-Adenosylmethionine and methylation. Faseb J. 10:471-80.
3. Thomas CS, Bottiglieri T, Edeh J, Carney MW, Reynolds EH, Toone BK. (1987) The influence of S-adenosylmethionine (SAM) on prolactin in depressed patients. Int Clin Psychopharmacol. 2:97-102.
4. Pascale RM, Marras V, Simile MM, Daino L, Pinna G, Bennati S, et al. (1992) Chemoprevention of rat liver carcinogenesis by S-adenosyl-L-methionine: a long-term study. Cancer Res. 52:4979-86.