

티미딜산 생성효소 활성이 높은 메토트렉세이트-내성 균주의 검색

곽인영[#] · 이종수

배재대학교 이공대학 유전공학과

(Received July 8, 1992)

Screening of Methotrexate-Resistant Strains with High Thymidylate Synthase Activity

In-Young Kwak[#] and Jong Soo Lee

Department of Genetic Engineering, Pai-Chai University, Taejon 302-735, Korea

Abstract—Thymidylate synthase activity from extracts of various methotrexate-resistant strains was measured by spectrophotometric assay. Methotrexate-resistant strains of *Lactobacillus*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., HS-1, *Klebsiella pneumoniae*, *Cellulomonas fimi* and *Serratia marcescens* elevated thymidylate synthase levels, especially, *Pseudomonas* sp. KL-9 resistant to 10^{-9} M methotrexate have a 156-fold increase in thymidylate synthase, which suggests that *Pseudomonas* sp. is a convenient source of thymidylate synthase. Several methotrexate strains of yeast were tested, however, their enzyme activity was generally lower than that of bacteria tested.

Keywords □ Methotrexate-resistant bacteria, thymidylate synthase, *Pseudomonas* sp.

Thymidylate synthase(TS; EC 2.1.1.45)는 deoxyuridine monophosphate(dUMP)로부터 deoxythymidine monophosphate(dTMP)를 생합성하는 효소로서 이 반응에서 5, 10-methylenetetrahydrofolate은 7, 8-dihydrofolate으로 전환되면서 한개의 탄소단위를 제공한다.

다른 deoxyribonucleotide의 생합성 경로와는 달리 dTMP의 생합성은 전적으로 TS에 의해서만 가능하므로 이 반응은 DNA 생합성의 속도조절단계로 알려져있다. DNA의 생합성 속도가 정상세포에 비해 대단히 빠른 세포들에 대해 TS 작용의 선택적 억제는 dTMP의 합성을 저지하고 DNA의 합성을 차단하며, 따라서 RNA와 단백질의 합성에도 영향을 미치므로 TS는 암의 화학 요법제의 개발에 있어서 그 초점이 되고 있다.¹⁾

이 효소는 1979년에 그의 1차 구조가 밝혀진 이래²⁾

작용기작과 활성부위에 대한 연구가 꾸준히 계속되고 있으며, 근래에 와서는 유전공학적인 기법을 이용한 유전자 수준에서의 연구도 진행되고 있다.³⁻⁵⁾ 대부분의 세포 추출액에서의 낮은 효소 활성과, 추출된 효소의 불안정성은 효소의 작용기작에 대한 연구와 저해제의 개발연구에 문제점으로 대두되었고 이를 해결하기 위한 여러방법들이 모색되었다. 그中最 보편적인 방법은 세균을 이용하여 folate antagonist인 methotrexate(MTX) 혹은 그의 유사체들에 대한 내성을 유도한 다음 증폭된 효소를 분리 정제하는 방법이다.⁶⁾ 보고된 균주 가운데 *Lactobacillus casei*의 경우 MTX내성균주는 모균주에 비해 효소 활성이 수백배 증가되며, 순수 정제 과정을 거친 효소는 결정화되어 이로부터 여러 생화학적 연구들이 수행되었다.⁷⁾

본 연구에서는 효소의 원만한 공급을 위하여 높은 효소 활성을 갖는 MTX내성균주를 찾아내는데 그 목표를 두었다. *L. casei* 외에 실험실적으로 취급이 용

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

Table I—Composition of media and culture condition of strains used in this study

Medium	Composition	Culture condition
MRS	Bacto peptone 10.0g, Beef extracts 10.0g, Yeast extracts 5.0g, Glucose 20.0g, Sodium acetate 5.0g, Sodium citrate 3.0g, K ₂ HPO ₄ 2.0g, MgSO ₄ 7H ₂ O 100 mg, MnSO ₄ 50 mg, D.W 1,000 ml (pH 6.5)	<i>Lactobacillus</i> sp. 37°C
YM	Yeast extracts 5.0g, Bacto peptone 3.0g, Mannitol 25.0g, Meat extracts 5.0g, D.W 1,000 ml	<i>Acetobacter</i> sp. 30°C
NB	Meat extracts 10.0g, Bacto peptone 10.0g, NaCl 5.0g, D.W 1,000 ml (pH 7.2)	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Sarcina</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. (37°C) <i>Thiobacillus</i> sp. (30°C) <i>Serratia</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. <i>Halobacterium</i> sp. (37°C) <i>E. coli</i> , 37°C
SCG	Yeast extracts 10.0g, Casamino acid 7.5g, KCl 2.0g, Sodium citrate 3.0g, MgSO ₄ 7H ₂ O 20.0g, FeCl ₂ 0.023g, NaCl 110.0g, D.W 1,000 ml (pH 7.0)	<i>Cellulomonas</i> sp. 30°C
LB	Tryptone 10.0g, Yeast extract 5.0g, NaCl 10.0g, D.W 1,000 ml	<i>Pseudomonas</i> sp. 37°C
Basal medium	Yeast extracts 0.5g, Glucose 2.0g, NaNO ₃ 1.0g, K ₂ HPO ₄ 1.0g, KCl 0.5g, MgSO ₄ 7H ₂ O 0.5g, D.W 1,000 ml (pH 7.4)	<i>Rhizobium</i> sp. (26°C)
Fleish Ext. broth	Beef extracts 10.0g, Bacto peptone 10.0g, NaCl 3.0g, Na ₂ HPO ₄ 2.0g, D.W 1,000 ml	<i>Streptococcus</i> sp. (37°C)
BHI	Calf brains infusion from 200.0g, Beef heart infusion from 250.0g, Proteose peptone, Difco 10g, Bacto dextrose 2.0g, NaCl 5.0g, Na ₂ HPO ₄ 2.5g, D.W. 1,000 ml (pH 7.4)	<i>Yeasts</i> , 30°C
YPD	Yeast extracts 4.0g, Bacto peptone 5.0g, Dextrose 100.0g, D.W 1,000 ml	

이하거나 산업적으로 유용성이 큰 균주 또는 항생제 등에 자주 내성을 발휘하는 일련의 균주들을 선택하여 MTX에 내성을 유도하고 그의 TS 활성을 모균주와 비교 검토함으로써 TS의 대량생산을 위한 균주의 검색이 이루어졌다.

실험방법

시약 및 기기—(+)Amethopterin(Methotrexate : MTX), dUMP, tetrahydrofolic acid는 Sigma사에서 구입하였고, 배지에 사용된 기본시약은 Sigma와 Difco사로부터 구입하였으며, 그외의 기타 시약은 시중에서 구입할 수 있는 최고 순도의 것이었고, 물은 탈이온된 3차 중류수를 사용하였다. 세균의 파쇄는 Branson Ultrasonics사의 Branson 450 Sonifier에 의해서 이루어졌으며, 효소 활성을 Beckman사의 UV/VIS Scanning Spectrophotometer(DU-65)에 의해서 측정되었다. 세포의 수학 시 원심 분리는 Du Pont사의 Sorval High Speed Centrifuge에 의해 이루어졌다.

시험균주 및 배지—배재대학교 유전공학과에 보관 중인 각종 세균과 한국 종균협회 등에서 분양받은 47종의 균주를 실험에 사용하였다. 또한 배지로는 MRS, NB, LB, SCG, Basal medium, Fleish Ext., Broth, BHI 등을 사용하였으며 각 배지의 조성은 Table I과 같다.

MTX 내성균의 유도—각 시험균주의 최적 배지에 1.0×10^{-10} M MTX를 첨가하여 생육 최적 온도에서 배양시킨 후 생육을 조사하여 MTX 내성균주를 1차 선별한 후 내성균주를 1.0×10^{-9} M MTX가 함유되어 있는 배지에 접종하여 48시간 배양한 다음 배양액 일정량을 1.0×10^{-8} M MTX 함유배지에 접종, 배양하는 방법으로 순차적으로 MTX 농도를 높여 가면서 최고 내성 농도까지 균을 유도하였다. 내성 유무의 확실한 조사를 위하여 평판배양법을 병행하였다.

TS 활성 측정—내성 균주를 MTX함유 배지에 접종하여 대수기 증기까지 배양한 후 원심분리하여 이를 완충용액(0.05 M Tris, 0.04 M acetic acid, 0.01 M 2-mercaptoethanol, 0.001 M EDTA : pH 7.4)에 혼탁시

Table II - Thymidylate synthase activity of bacteria used in this study on methotrexate resistance

Strains	MTX resistance				Strains	MTX resistance			
	parents	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M		parents	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M
<i>Acetobacter aceti</i>	2.535	0.845	2.113	2.113*	<i>Serratina marcescens</i>	0.211	0.676	0.843	1.352
KFCC 32409	0.780	0.291	0.681	0.646**	KCCM 11880	0.160	0.258	0.284	0.404
<i>Bacillus subtilis</i>	5.324	0.676	0.676	1.775	<i>Streptococcus mutants</i>	0.254	0.296	0.319	0.338
CAM 11038	1.521	0.218	0.218	0.538	KCTC 3065	0.121	0.211	0.102	0.169
<i>Bacillus cereus</i>	5.450	0.465	0.930	2.028	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	0.210	—	—	—
	1.557	0.150	0.290	0.596		0.032	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i>	5.577	1.521	2.831	2.746	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.268	2.535	2.535	5.788
	1.593	0.475	0.885	0.808	IFO 13130	0.386	0.773	0.773	1.770
<i>Bacillus polymyxa</i>	1.211	0.951	0.631	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.493	3.296	2.775	2.789
ATCC 8523	0.721	0.534	0.263	—	KL-1	0.733	0.969	0.793	0.775
<i>Bacillus subtilis</i>	1.775	0.254	0.972	0.592	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.901	1.183	1.225	1.056
ATCC 6633	0.538	0.082	0.304	0.197	KL-2	0.560	0.348	0.340	0.293
<i>Bacillus megaterium</i> 32	1.901	0.423	0.296	0.225	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.521	3.887	3.127	1.563
	0.576	0.140	0.134	0.103	KL-3	0.447	1.143	0.868	0.434
<i>Bacillus thuringensis</i>	0.338	0.549	0.296	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	3.634	5.281	4.887	4.605
KCCM 11579	0.117	0.189	0.092	—	KL-4	1.069	1.553	1.277	1.245
<i>Cellulomonas fimi</i>	0.254	0.718	0.718	0.296	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.169	0.380	0.338	0.972
ATCC 484	0.077	0.221	0.224	0.090	KL-5	0.050	0.119	0.106	0.278
<i>Cellulomonas cartalyticum</i> ATCC 21681	—	—	—	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.380	0.803	1.437	1.775
<i>Escherichia coli</i>	0.042	0.127	2.915	8.197	KL-6	0.112	0.243	0.435	0.493
MC 1061	0.011	0.034	0.911	2.484	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.141	0.887	0.085	0.169
<i>Halobacterium</i> sp.	0.216	0.152	—	—	KL-7	0.336	0.261	0.025	0.050
511-2	0.065	0.051	—	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.352	0.465	0.369	0.338
<i>Klebsiella aerogenes</i>	2.451	0.930	0.803	0.755	KL-8	0.398	0.137	0.098	0.097
KCTC 2001	0.662	0.290	0.251	0.143	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.211	32.914	11.492	5.197
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.085	0.423	0.549	2.070	KL-9	0.066	9.680	3.380	1.528
	0.033	0.136	0.177	0.609	<i>Pseudomonas</i> sp.	17.576	20.409	17.281	5.281
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.254	0.338	0.549	1.437	KL-10	5.170	6.002	5.083	1.553
	0.080	0.099	0.162	0.423	<i>Pseudomonas</i> sp.	1.394	1.437	0.549	0.887
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0.296	0.338	—	—	KL-11	0.410	0.423	0.166	0.269
KCCM 11357	0.092	0.106	—	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.507	0.085	0.380	0.761
<i>Lactobacillus casei</i>	0.085	0.210	—	—	KL-12	0.149	0.026	0.115	0.230
	0.024	0.070	—	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	8.154	25.139	28.646	6.591
<i>Micrococcus</i> sp.	0.845	1.225	1.986	1.986	KL-13	2.265	7.183	8.185	1.939
HS-1	0.241	0.395	0.621	0.621	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.62	—	—	—
<i>Rhizobium meliloti</i>	0.152	0.120	—	—	KL-14	0.68	—	—	—
ATCC 4399	0.010	0.015	—	—	<i>Pseudomonas</i> sp.	2.197	2.704	3.169	1.183
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.268	0.423	0.845	1.268	KL-15	0.610	0.751	0.905	0.358
ATCC 65389	0.396	0.491	0.503	0.507					
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.380	0.296	0.211	0.169					
	0.346	0.269	0.176	0.188					
<i>Sarcina lutera</i>	4.521	0.338	1.394	1.521					
	1.292	0.113	0.450	0.461					

*: TS activity ($\times 10^{-3}$ U)**: Specific Activity (U/A280, $\times 10^{-3}$)

- : Not detected

친 다음, 세균은 Sonifier로 20 KC에서 10분간 파쇄시키고 효모는 glass bead로 5분간 강하게 Vortex mixing하여 세포를 파쇄시켰다. 세포파쇄액을 원심분리하여 얻은 상등액을 세포 추출액으로하여 Crusberg 등⁸⁾의 방법으로 분광 분석법에 의하여 TS의 활성을 측정하였다. 즉, 완충액(0.03 mM tetrahydrofolate, 12 mM formaldehyde, 21 mM MgCl₂, 0.04 mM dUMP, 110 mM 2-mercaptoethanol, 0.05 M Tris-acetate : pH 7.4)에 상기 세포 추출액 일정량을 가하여 30°C에서 반응 시간에 따른 340 nm의 흡광도를 분광분석기로 측정하였다. 여기서 흡광도 0.001의 증가는 분당 0.253 μm의 dTMP가 합성됨을 의미하며, 효소 단위는 세포 추출액(조 효소액) 1 ml가 1분 동안 1 μm의 dTMP를 합성하는 것을 1로 하였고, 효소 비활성을 편의상 효소 단위와 세포 추출액의 280 nm 흡광도와의 비로 나타내었다.

실험결과 및 고찰

세균과 *Pseudomonas* sp. 균주의 MTX 내성에 따른 TS 활성-Acetobacter aceti의 25주의 세균과 내성기작 연구의 목적으로 자연계에서 분리한 균주 중 gram negative의 간균이고 운동성이 있으며 oxidase, catalase, gelatin liquification, denitrification 등이 양성인 점과 37°C 호기적 조건에서 잘 자라는 특성 등으로 *Pseudomonas* sp.로 추정되는 15주에 대하여 MTX 내성을 유도한 후 이들의 TS 활성을 모균주와 비교한 결과는 Table II와 같다.

*Bacillus*속, *Staphylococcus*속, *Klebsiella aerogens*, *Sarcina lutea* 균들은 MTX 내성 부여로 TS 활성이 낮아지는 경향이었으나, *Lactobacillus*속, *Micrococcus* sp. HS-1, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Cellulomonas fimi*, *Serratia marcescens* 균들은 내성 증가에 따라 TS 활성이 증가하였고, 특히 *E. coli* MC 1061은 모균주 보다 10⁻⁶M 내성 세포에서 약 226배의 TS 활성 증가를 보였다. *Lactobacillus*속 균에서는 *L. acidophilus*가 다른균 보다 MTX 내성에 따른 TS 활성의 증폭이 커졌다. *L. casei*의 경우 10⁻⁹ M MTX 내성 세포가 모균주에 비해 약 2배의 활성증가를 나타내어 Crusberg 등⁸⁾의 결과보다 낮은 증가폭과 활성을 보였는데, 이는 균주간의 MTX 내성에 따른 TS의 특성으로 생각된다.

Table III—Thymidylate synthase activity of yeasts used in this study on methotrexate resistance

Strains	MTX resistance			
	parents	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.929	—	—	—*
T-71	0.249	—	—	—**
〃	0.169	0.465	2.535	2.493
(Sake) No. 7	0.045	0.125	0.724	0.733
〃	0.110	0.105	—	—
(Sake) No. 8	0.021	0.010	—	—
〃	0.210	—	—	—
(Sake) No. 10	0.031	—	—	—
<i>Candida albicans</i>	0.150	0.262	0.260	—
IFO 6258	0.025	0.035	0.031	—
<i>Hansenula anomala</i>	0.549	0.465	1.394	—
KCCM 11473	0.177	0.155	0.465	—

* : TS activity ($\times 10^{-3}$ U)

** : Specific Activity (U/A280, $\times 10^{-3}$)

— : Not detected

실험 균주들 가운데 가장 흥미로운 균주들은 *Pseudomonas* sp.로 대부분 MTX 내성부여로 TS 활성이 증가하는 경향이었고, 절대 활성도 타 세균보다 높았으며 특히 *Pseudomonas* sp. KL-10은 모균주의 TS 활성이 17.576×10^{-3} U로 모 균주 가운데 가장 높았으며 *Pseudomonas* sp. KL-9는 10⁻⁹M MTX 내성세포가 모 균주에 비해 약 156배의 활성 증가를 나타내고 시험균주중 최고의 활성인 32.914×10^{-3} U를 보였다. 이는 일반적으로 *Pseudomonas*속 균이 각종 항생물질이나 화학제에 대해 높은 내성을 갖는 경향⁹⁻¹¹⁾과 일치하는 결과로, MTX에 따른 추가의 내성기작을 규명하기 위하여 MTX 내성 *Pseudomonas*속 균들의 약리학적, 분자생물학적 연구가 요구된다. 또한 본 연구에서 목적한 TS 생성균주의 검색 차원에서 볼 때 MTX 내성 *Pseudomonas*속 균의 발견은 *L. acidophilus* 등 몇종의 균주들과 함께 TS 대량생산을 위한 Bacterial source로써의 가능성을 보여주었고, 실험실적으로 그 유용성이 크다고 하겠다.

몇 종 효모의 MTX 내성에 따른 TS 활성-시험효모 중 *S. cerevisiae* (Sake) 7호는 10⁻⁹M MTX 내성세포가 약 16배 활성 증가를, *Hansenula anomala*가 약 3배의 활성증가를 보였을 뿐이고 *S. cerevisiae* (T-71)와 (Sake)10호는 MTX 내성 부여시 활성이 거의

측정되지 않았으며 대부분 앞서의 세균보다 그 활성이 낮았다(Table III).

상기 시험주 이외의 광범위한 세균과 효모, Mammalian cell에 대한 MTX 내성에 따른 TS 활성에 대한 추가적인 시험이 이루어지고 있으며, MTX 내성균들로부터의 TS의 추출과 순수정제가 진행되고 있다. 아울러 MTX 내성에 따른 TS 증폭이 큰 균주에 대한 분자생물학적 연구도 진행되고 있으며 이의 결과는 다른 논문에서 다루어진다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 학술진흥재단의 자유공모과제(지방대학 육성과제)연구비에 의해 이루어진 연구의 일부분이며 연구비 지원에 감사하는 바이다.

문 헌

- 1) Santi, D.V.: Perspectives on the design and biochemical pharmacology of inhibitors of thymidylate synthetase. *J. Med. Chem.*, **23**, 103-111 (1980).
- 2) Maley, G.F., Bellisario, R.L., Guarino, D.U. and Maley, F.: The primary structure of *Lactobacillus casei* thymidylate synthetase. *J. Biol. Chem.*, **254**, 1301-1304 (1979).
- 3) Pinter, K., Davisson V.J and Santi, D.V.: Cloning, sequencing, and expression of the *Lactobacillus casei* thymidylate synthetase gene. *DNA*, **7**, 235-241 (1988).
- 4) Davisson, V.J., Sirawaraporn, W. and Santi, D.V.: Expression of human thymidylate synthetase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 9145-9148 (1989).
- 5) Climie, S., Ruiz-Perez, L., Gonzalez-Pacanowska, D., Praupunwattana P., Cho, S-W., Stroud, R. and Santi, D.V.: Saturation site-directed mutagenesis of thymidylate synthase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18776-18779 (1990).
- 6) Dunlap, R.B., Harding, N.G.L. and Huennekens, F.M.: Thymidylate synthetase from amethopterin-resistant *Lactobacillus casei*. *Biochem.*, **10**, 88-97 (1971).
- 7) Hardy, L.W., Moore, J.S., Montfort, W.R., Jones, M.O., Santi, D.V. and Stroud R.M.: Atomic structure of thymidylate synthetase. *Science*, **235**, 448-455 (1987).
- 8) Crusberg, T.C., Leary, R. and Kisliuk, R.L.: Properties of thymidylate synthetase from dichloromethotrexate-resistant *Lactobacillus casei*. *J. Biol. Chem.*, **245**(20), 5292-5296 (1970).
- 9) Bryan L.E. and Van Den Elzen, H.M.: Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *E. coli* and *P. aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **9**, 928-938 (1976).
- 10) Shulman, J.A., Terry, P.M. and Hough, C.E.: Colonization with gentamycin resistant *Pseudomonas aeruginosa*, pyocine type 5, in a burn unit. *J. Infect. Dis.*, **124**, suppl., S18-S23 (1971).
- 11) Tseng, J.T., Bryan, L.E. and Van Den Elzen, H.M.: Mechanism and spectrum of streptomycin resistance in a natural population of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agent Chemother.*, **2**, 136-141 (1972).