

*Bacillus stearothermophilus*의 Peptidyl Prolyl *cis-trans* Isomerase 유전자 분리 염기배열 및 발현

김 동 주

제주대학교 해양학과

Gene Cloning, Nucleotide Sequence and Efficient Expression of Peptidyl prolyl *cis-trans* Isomerase from *Bacillus stearothermophilus*

Dong-Ju Kim

Dept. of Oceanography, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

Abstract

A PPIase gene of *Bacillus stearothermophilus* was screened from a genomic library by plaque hybridization using the A-1 primer as a probe. A PPIase positive plaque contained a 3.0kb insert of the chromosomal DNA. A 3.0kb fragment was subcloned into pUC18, resulting pPI1-40. A DNA fragment encoding the N-terminal portion of the PPIase in pPi-40 was amplified by polymerase chain reaction(PCR) method using the A-1 and B-2 primers. The amplified fragment was cloned into the *Sma* I site of pUC18 and recombinant plasmid was designated as pSN-18. The nucleotide sequence of 167bp fragment was determined. The deduced amino acid sequence of PPIase was completely matched with the determined N-terminal amino acid sequence of PPIase *B. stearothermophilus*. The translated protein sequence of PPIase *B. stearothermophilus* was compared with sequence from periplasmic PPIase from *Escherichia coli* : homologies of 16 and 58%, respectively, were found. The cloned PPIase gene was over-expressed in *E. coli* cell using pUC19 as an expression vector. The enzyme was partially purified by heat treatment and column chromatography on DEAE-Sephadex CL-6B. The molecular weight of the enzyme was determined to be about 18.0 kDa by SDS-PAGE.

Key words : gene cloning, PCR, PPIase, expression in *Escherichia coli*

서 론

단백질의 고차구조 형성은 폴리펩티드의 열역학적인 법칙에 따라서 자발적으로 일어나는 것으로 알려져 왔다. 시험관내에서의 변성단백질의 재구성시는 풀린 폴리펩티드 간에 회합이 일어나기 쉽고, 입체구조의 접힘 반응시 침전되어 효율이 악화되기도 하고, 반응속도가 느려지므로 장시간을 필요로 하는 경우가 많다¹⁾. 일반적으로, 시험관내에서 일어나는 단백질의 접힘은 세포 내에서에 비해 매우 비효율적이고 반응속도가 느리다. 그러나 세포내에서는 접히지 않은 불안정한 중간체를 일시적으로 도입하여 불필요한 회합을 억제하며, 단백질의 접힘을 증가하는 사제론, peptidylprolyl *cis-trans* isomerase (PPIase)의 보조인자 등의 작용으로 문제를 해결하고 있다²⁻⁴⁾.

PPIase가 세포내에서 단백질 접힘에 관여한다는 직

접적인 증거는 없지만, 시험관 내에서 접힘 속도를 매우 증가시킨다. 예를 들면 RNase T1을 기질로 하여, 단백질 접힘 속도를 조사한 결과, 대장균의 PPIase는, 세포 내에 존재하는 농도에서 접힘 반응속도를 수백배 증가시켰다⁵⁻⁷⁾. 즉, 세포내에서 1시간 이상 필요한 접힘 반응속도를, PPIase는 수초동안에 완료시킨다. 최초로 분리된 PPIase는 돼지 신장의 효소이다⁸⁾. 정제 PPIase는 163개의 아미노산 잔기로 형성되었으며 분자량 18 kDa이다. 일차구조 해석결과, 소의 흉선에서 분리한 면역억제제인 cyclosporin A(CsA)의 결합 단백질인 cycophilin과 동일한 아미노산 배열을 하고 있는 것으로 밝혀졌다⁸⁾. 돼지 신장의 PPIase는, cyclosporin A(CsA)의 결합으로 활성이 완전히 저해된다²⁾. RNase T1을 기질로 하여 PPIase는 접힘효과를 촉진시킨다. 이러한 결과는, CsA의 면역억제 효과 및 그 외의 효과가 PPIase 활성의 저해에 의한 것으로 보는

가설을 제안하게 되었다^{2, 8)}.

RNase T1의 접힘 반응은, native 단백질 중에서 100% cis 형으로서 존재하는 두개의 프롤린 잔기인 Pro39와 Pro55의 이성화 반응으로 이루어진다. RNase T1의 재접힘 과정은, “매우 빠르게” 후에, “중간”, “매우 느리게” 라는 반응과정^{7, 9, 10, 11)}으로 이어진다. 전자는, Ser54-Pro55의 펩티드 결합의 *trans/cis* 이성화, 후자는, Tyr38-Pro39는 *trans/cis* 이성화가 관여하고 있는 것으로 보인다^{7, 10)}.

CsA의 결합 단백질이 PPIase라는 것이 분명하게 밝혀진 이후, 다른 면역억제인 FK506의 결합 단백질도 PPIase 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다^{12, 13)}. 면역 담당 세포에 대한 효과로, CsA, FK506는 T세포가 항원 자극을 받아서 림포카인 유전자의 활성화가 일어날때까지의 세포내의 정보전달과정에서, 전사레벨을 저해하는 것으로 볼 수 있다¹⁴⁻¹⁸⁾.

본 연구는, 호열균 *Bacillus stearothermophilus*로부터 정제한 PPIase를, Edman 분해법으로 N-말단 아미노산 배열을 분석하여 probe DNA로 하여 유전적 해석한 연구결과다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 플라스미드

내열성 PPIase를 생산하는 *Bacillus stearothermophilus*를 유전자 공여체로 사용했다. 본 실험에서, 재조합 플라스미드의 구축, 형질전환, subcloning, 염기배열 결정에 사용한 한가닥 DNA 조제는, *Escherichia coli* JM109를 숙주균으로서 사용하였다. PPIase 유전자 벡터 구축에는 EMBL3를 사용 했으며, phage vector M13 mp18 및 M13 mp19는, PPIase 유전자 염기배열 결정에 사용하였다¹⁹⁾.

2. 배지조성

B. stearothermophilus, *E.coli*는 L-broth (Trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g/l, pH 7.3) 배지로 배양하였다²⁰⁾. 고체배지는 L배지에 1.5% 한천을 첨가하여 만들었다. 또한, 플라스미드 균주에 사용한 선택배지는 항생물질 (ampicillin)을 최종농도 50 μ g/ml로 첨가하였다.

3. 올리고뉴클레오티드 합성

본 실험에 사용한 올리고뉴클레오티드는 Edman법으로 결정한 호열균 PPIase의 N-말단 아미노산 39 잔기로부터 Ala-Lys-Lys-Gly-Tyr-Ile-Leu-Met 영역을

선택하여 이에 대응하는 혼합올리고뉴클레오티드 (PHmer) 5'-GCNAAP_uAAP_uGGNTAP_vATP_v-CTTATG-3'과 현재까지 클론된 원핵, 진핵세포의 PPIase 1차 아미노산 배열로부터 Gly-Gly-Gln-Ile-Met-Phe-Gly-Pro-Ile-Val-Arg-His-Phe를 선택하여, 이 아미노산에 대응하는 혼합 올리고뉴클레오티드 배열 5'-NCCNCCP_vTGP_v(orT)ATCATP_uAANCCNGGP_u(orT)ATNACNCGP_vTGP_vAA-3' 2개의 primer A-1과 B-2를 디자인한 후 Gene Assembler Plus synthesizer (Pharmacia LKB Biotechnology)로 합성하였다.

4. DNA 조작

대장균의 형질전환은, CaCl₂ 법으로 competent 세포를 조제하였다²¹⁾. 플라스미드는 DNA^{22, 23)}법으로 조제하였으며, 필요에 따라 CsCl를 첨가하여 냉각 초고속 원심분리기로 정제하였다. 플라스미드 DNA 약 0.5-1 μ g을 함유한 반응액 40 μ l에 각제한효소 5 unit를 첨가하여, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 처리하였다.

5. DNA 염기배열 결정

DNA 염기배열은 sequece 키트를 사용하여 didoxy 법²⁴⁾으로 결정하였다. 한가닥 DNA는 M13 mp18.19²⁵⁾을 이용하여 조제하였다. 염기배열 결정시 dGTP를 뉴클레오티드 아날로그인 dITP로 치환하여 DNA의 이차구조에 의해 형성되는 불투명한 밴드를 완전히 저해시켰다. Exo /Mung bean nuclease를 사용하여 DNA 단편을 점차 축소화하여, 염기배열을 결정하였다.

6. Genomic library 구축

호열균 *B. stearothermophilus*의 염색체 DNA는 Harris-Warrick법으로 조제하였다. 조제한 DNA 0.5 μ g을 *Sau3* A1로 부분 소화한 후에 Lambda EMBL3의 *Bam* HI 부위에 삽입하였다. Genomic DNA 도서관을 구축하기 위하여 재조합 DNA는 Gigapack system (Stratagene Inc., California, USA)으로 package하였다. 그리고, 구축한 도서관으로부터 약 1 \times 10⁴ 재조합체를 얻었다(Fig. 1).

7. Polymerase 사슬반응 (PCR)

PCR 반응²⁵⁾은 호열균 *B. stearothermophilus* 염색체 DNA (1 μ g), primer(0.5_{pmol}), 2.5unit의 Vent DNA polymerase (Beverly, MA, USA), dNTPS (200 μ M), 100 μ l의 PCR 완충용액을 첨가하여, 변성이

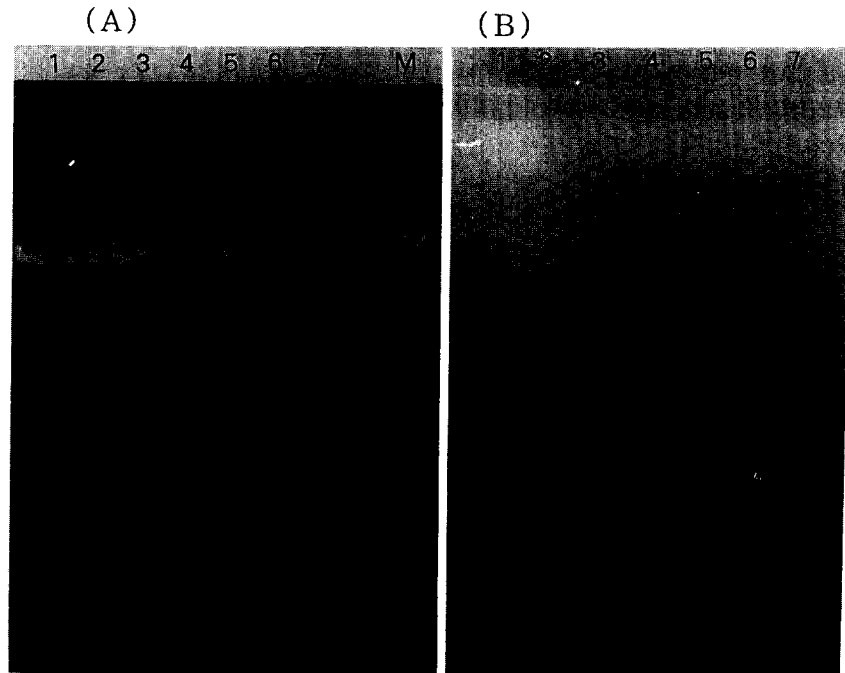


Fig. 1. Southern hybridization of phages clones digested with *Hind* III. (A) Agarose gel electrophoresis. (B) Southern hybridized pattern from pannel A. Lane M, λ DNA digested with *Hind* III; lanes 1-7, the phage DNA prepared from positive clones.

닐링, extention으로 목적 DNA를 온도 조절시스템 (PC-700)으로 증폭하였다.

8. Southern 하이브리드화

구축한 유전자 도서관에서 합성한 올리고뉴클레오티드를 T4 DNA polymerase를 이용하여 [α - 32 P] dCTP (Pharmacia, Sweden)로 표지하였다. 그리고, 플라그 하이브리다이징 방법으로 각 양성클론에 삽입된 DNA 단편을 확인한 후, pUC18, 19 플라스미드로서 브클로닝하여¹⁸⁾ 서틴 하이브리다이징 방법으로 유전자 위치를 결정하였다²⁶⁾.

9. 상동염기배열 분석

DNA 및 아미노산 염기배열의 상동성은 NEC PC-9810 컴퓨터 (Nippon Electric Co., Ltd., Tokyo)와 GENETYX (Software Development Co., Ltd., Tokyo)로 해석하였다.

10. SDS-PAGE

정제 단백질의 순도 및 단백질의 분자량은, SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동으로 결정하였다²⁷⁾. 마커는

electrophoresis calibration kit (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. PPIase의 N-말단 아미노산 영역에서의 primer 제작

호열균 *B. sterarothermophilus*를 55°C에서 대수증식기까지 배양한 배양세포를 파쇄한 액을 이온교환 크로마토그래피, 겔크로마토그래피 (FPLC)로 정제하여 PPIase를 얻고, 이를 Edman법으로 N-말단아미노산 39 잔기를 결정하였다²⁸⁾. 결정된 PPIase의 N-말단아미노산 배열은, 클로된 대장균의 PPIase (periplasm: PPI a, cytoplasm: PPI b) 아미노산 배열과 상동성을 갖고 있었다⁶⁾. 이 결과로부터 N-말단에서 상동성이 높게 보존된 영역 Glu-Phe을 선택하여 24mer의 올리고뉴클레오티드를 합성하였다.

2. 유전자 도서관 구축 및 스크리닝

B. sterarothermophilus 배양 세포에서 조제한 염색체 DNA를 *Sau* 3AI으로 부분 분해하여, *Bam* HI으로 분

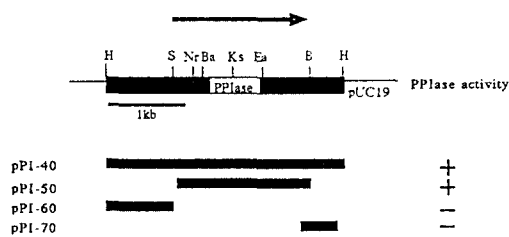


Fig. 2. Restriction endonuclease cleavage map of plasmid pPI-40 and its derivatives and the activity of PPIase production. The black region indicates the DNA from *B. stearothermophilus*. Abbreviations used are as follows; B, *Bam* HI; H, *Hind* III; S, *Sma* I; Nr, *Nar* I; Br, *Bal* I; Ks, *Kas* I; Ea, *Rag* I; + and - indicate PPIase activity in cell free extract of *E. coli* harboring the plasmid. The arrow indicates the coding region of the PPIase gene.

해한 λ EMBL4 파지벡터를 이용하여 약 1×10^4 염색체 유전자 도서관을 작성하였다. 그리고, 정제한 PPIase의 아미노산 배열로부터 합성한 올리고뉴클레오타이드 DNA를 32 P로 표지한 후 프로브 DNA로 plaque hybridization 방법으로 PPIase 유전자를 스크린하였다.

최종적으로 얻은 positive plaque에서 DNA를 정제하여, 제한효소 *Hind* III로 분해한 후, 서던 하이브리드화 분석 결과, 약 3.0kb, 7.0kb에서 하이브리드화하는 밴드를 취득하였다(Fig. 1). 그리고, 약 3.0kb에서 하이브리드화한 DNA 단편을 아가로스겔로부터, 회수 정제하여, pUC18, 19의 *Hind* III 부위에 클로닝하여 구축한 재조합 플라스미드를 pPI-40으로 명명하여, 제한효소 지도도를 작성한 후에 서던하이브리드화 분석으로 PPIase 유전자 위치를 결정하였다(Fig. 2).

3. PCR에 의한 N-말단 영역클로닝

재조합 플라스미드 pPI-40 으로부터 조제한 플라스미드 DNA를 *Hind* III 처리한 3.0k 단편을 아가로스겔로부터 회수하여, PPIase N-말단으로부터 합성한 프라이머 A-1과 왼쪽, 진핵세포로부터 클론화된 PPIase 아미노산 배열의 중축성을 고려하여 구축한 프라이머 B-2를 이용하여 PCR법으로 DNA(실제 염기배열의 결과 167bp)가 증폭되었다(Fig. 3B). PCR 법으로 증폭된 180bp DNA 단편을 pUC18, 19의 *Sma* I 부위에 클로닝 (pSN-18A)하여 대장균 JM109에 형질전환하여, 각 형질전환 체로부터의 삽입단편을 확인한 후에, 제한효소 지도도작성과 PCR에 사용된 프라이머에서 증폭된 180bp DNA단편을 서던분석으로 PCR 증폭 DNA

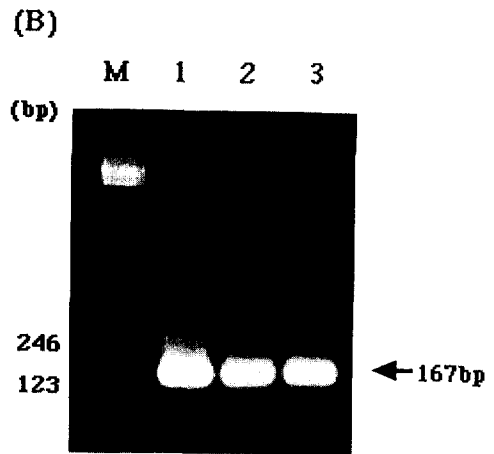
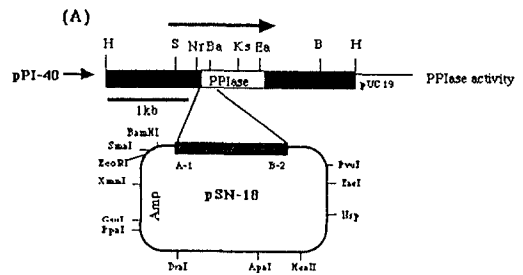


Fig. 3. (A) Construction scheme of the recombinant plasmid pSN-18 and (B) amplification of the N-terminal region of PPIase gene by PCR. (A) A-1, B-2: primers for PCR. (B) Agarose electrophoresis: for each sample, 5 μ l from a total 100 μ l reaction was run on a 2.0% NuSieve agarose gel at 75V for 2 hours, the minigel was then stained in ethidium bromide (0.5 μ g/ml), and DNA was visualized under UV. Lane M, molecular weight markers are DNA ladder; lanes 1-3, the N-terminal portion of the PPIase gene amplified by PCR using the A-1 and B-2 as primers (See Materials and Methods).

단편(180bp)임을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 180bp 단편을 32 P로 표지하여, 클로닝한 3.0kb 단편을 동일한 방법으로 분석한 결과 3.0kb 단편과 강하게 하이브리드화하였다. 이 결과로부터, PCR에 의해서 증폭된 DNA 단편은 프라이머가 증폭한 것으로 판명되었고 플로닝한 3.0kb DNA 단편 (pPI-40)은 전 PPIase 유전자를 보유하는 것으로 판단하였다.

4. PPIase 염기배열 결정

*B. stearothermophilus*의 PPIase N-말단 아미노산 배열을 코드하는 영역을 PCR법으로 증폭하여 얻은 180bp DNA 단편을 M13mp18, 19의 *Sma* I 부위에 서브

A-1

1 GC AAA GAA GGG TAC ATC CTT ATG GAA AAT GGC GGA AAG ATT GAA TTT

1 Lys Glu Gly Tyr Ile Leu Met Glu Asn Gly Gly Lys Ile Glu Phe

48 GAC CTG TTT CCA AAT GAG GCG CCG GTG ACG GTG GCC AAC TTT GAA AAA

16 Glu Leu Phe Pro Asn Glu Ala Pro Val Thr Val Ala Asn Phe Glu Lys

92 TAA GCG AAC GAA GGG TTT TAT AAT GGA CTG ACG TTC CAC CGG GTC ATT

36 Leu Ala Asn Glu Gly Phe Try Asn Gly Leu Thr Phe His Arg Val Ile

B-2

144 CCA GGG TTC ATG ATA CAG GGA GGA

48 Pro Gly Phe Met Ile Gln Gly Gly

Fig. 4. DNA sequence of the gene encoding PPIase from *B. stearothersophilus*. The deduced amino acid sequence is denoted below the nucleotide sequence in the standard. The N-terminal amino acid sequence of the PPIase determined by Edman degradation is underlined. Primers S-10 and E-20 indicate PCR primers used for the amplification of the N-terminal gene.

		10	20	30	40	50
BST-PPI 39	KEGYILMENG	GKIE	FELFPNE	APV TVAN	FEKLANEG	FYNGLT

Ecoli a	NYDYAEAP	RDGTFA	YRVSSL	DASL	NVSICH	KYKRQIR
	50	60	70	80	90	

		10	20	30	40	50
BST-PPI 39	GYILMENG	GKIEGEL	FPNEAP	VTVANF	E KLANEG	FYNGLT

Ecoli b	MVTFHT	NHGDIV	IKTFDD	KAPET	VKNFLD	YCR EGF
	10	20	30	40	50	

Fig. 5. Homologous region of the amino acid sequence of the PPIases. The PPIase amino acid sequence of the from *B. stearothersophilus* (BST-PPI39) was compared with those of (*E. coli* a) periplasmic and (*E. coli* b) cytoplasmic PPIases from *E. coli* ST249 cells. Double dots indicate Identical amino acids (:), and single dots indicate the same functional amino acid. (·).

클로닝하여, 염기배열을 결정하였다.

결정한 DNA 염기배열 정보로부터 해석한 결과, DNA 단편은 167bp로 형성되어 있고, 번역개시 코돈인 Met과 종지코돈이 결여된, 165bp의 55 아미노산 잔기를 코드하는 open readign frame (ORF)이 연속되어 있었다. 그리고 Lys으로 시작하여 Gly으로 형성된 이 배열 안에는 Edman 분해로 결정된 *B. stearothersophilus*의 PPIase B-말단 아미노산 배열이 완전하게 일치하고 있었다²⁸⁾. 167bp(아가로스 겔 전기영동상의 DNA단편 180bp; Fig3B) DNA단편 증폭에 사용한 각각의 프라이머 배열 또한 완전하게 보존되어 있었다(Fig. 4). PCR법으로 증폭된 DNA 단편의 ORF를 정제한 *B. stearothersophilus*의 PPIase의 분자량 18kDa과 비교해 보면, PPIase의 구조유전자 1/3영역을 코드하는 완전한 PPIase 유전자의 일부로 확인되었다.

5. PPIase 아미노산 상동성 분석

*B. stearothersophilus*의 PPIase 구조유전자 N-말단 영역을 코드하는 DNA 염기배열의 정보에서 얻어진, 아미노산 55잔기를 코드하는 165 염기의 ORF(Fig. 4)를 이용하여, 클론화된 대장균 페리플라즈의 PPIase a와 cytoplasm의 PPIase b와의 아미노산 해석결과로부터 상동성을 비교 분석하였다. 그 결과 각 아미노산은 16% (PPIase a), 58%(PPIase b)의 상동성을 나타냈다(Fig. 5).

6. 대장균에서 PPIase의 대량발현

PPIase 발현에는 *lac* 프로모터를 갖는 pUC 벡터를 이용하였다. PPIase 구조유전자를 갖는 3.0kb DNA 단편을 pUC vector *Hind* III 부위에 서브클로닝하여 구축한 재조합 플라스미드-I-40를 *E. coli* JM109로 형질전

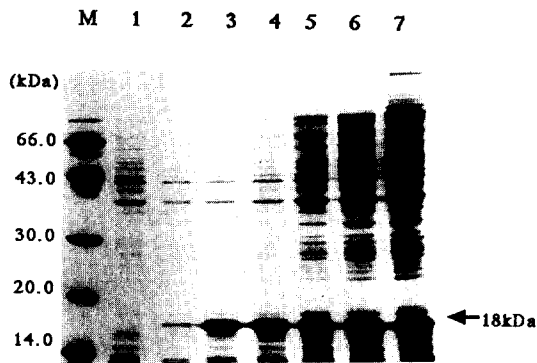


Fig. 6. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis of overproduced PPIase.

Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R250. *E. coli* JM109 with pPI-40 was grown in L-broth medium and gene expression was induced by IPTG. Sample of the crude cell extract from *E. coli* harboring pPI-40 was prepared by the time courses (lanes 2-7). Lane 1, crude cell-free extract from *E. coli* JM109 harboring pUC19. Lane 2, sample after 0.5h-cultured crude cell extract; lane 3, sample after 1h-cultured crude cell extract; lane 4, sample after 1.5h-cultured crude cell extract; lane 5, sample after 2h-cultured crude cell extract; lane 6, sample after 2.5h-cultured crude cell extract; lane 7, sample after 3h-cultured crude cell extract. M indicates molecular weight standards, from top to bottom: rabbit muscle phosphorylase (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), egg white ovalbumin (43 kDa), bovine erythrocyte carbonic anhydrase (30 kDa), soy bean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and bovine α -lactalbumin (14.4 kDa). The arrow head indicates the position of the PPIase.

환한 후, ampicillin (100 μ g/ml)을 첨가한 3ml L-broth배지에서 37 $^{\circ}$ C로 배양하였다. 대수 증식기 중기에 최종농도 1mM IPTG를 첨가하여 PPIase를 대량 발현시켰다. 배양후 균체를 집균 파쇄하여 얻은 조효소시료로부터 SDS-PAGE로 PPIase 분자량을 확인한 결과, *lac* 프로모터에 의해 PPIase 단백질이 대량 발현되었다 (Fig 6). pPI-40를 *E. coli* JM109에서 발현시킨 단백질은 호열균 *B. stearotheophilus*의 PPIase 단백질 분자량과 동일하였다²⁸⁾.

일반적으로 *in vivo* 에서 단백질은 다소 서로 다른 구조적 평형관계에 있는 2개 이상의 상태가 존재한다. 이러한 상태에서 특정 prolin imid결합의 이성체가, 서로 다른 구조상태에 대응하여, 평형 조절로 생물활성을 제어하고 있다고 생각할 수 있다. 이와 프롤린 이미드 prolin imid 결합의 이성화반응은 단백질의 활성체와

불활성체간의 미세구조 변화에 관여하며, 세포내의 단백질 고차형성에 관여한다²⁹⁾.

7. PPIase의 성질

본 논문의 연구 목적은 호열균 *B. stearotheophilus*의 PPIase 효소 유전자의 분자 클로닝과 고발현이다. 호열균 *B. stearotheophilus* 균체 추출 시료에 대하여 PPIase 활성을 조사하여, 이온교환 크로마토그래피, 겔 크로마토그래피로 분자량 18kDa의 PPIase를 정제하였다. 이 효소는 pH 7.5~8.0 사이에서 안정하였고, 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 열처리한 후에도 변성되지 않았다. 요소로 변성시킨 RNase TI단백질을 기질로 사용하여 PPIase 활성을 조사한 결과 현재까지 보고된 PPIase 활성과 동일하게 프롤린 잔기의 이성화를 촉진시켰다. PPIase 전영역을 코드하는 3.0kb의 재조합 플라스미드 pPI-40을 이용하여 숙주균 대장균 JM109로 하여 PPIase 단백질을 발현시킨 결과, 호열균 유래의 균체 내 PPIase 총단백질과 비교하여 50% 이상 발현하였다 (Fig. 6)²⁸⁾.

이 결과로부터, 클론화한 재조합 플라스미드 pPI-40으로부터 PPIase 구조유전자 전 영역의 염기배열 결정과, 그 염기배열의 정보를 중심으로한 유전해석의 결과로부터 고발현백터를 구축하여 PPIase 효소 단백질을 대량으로 발현시켰다.

요 약

호열균 *B. stearotheophilus*의 세포내 PPIase를 정제하여 Edman 법으로 N-말단 아미노산 배열을 결정하여 이를 바탕으로 합성한 올리고뉴클레오타이드의 프리머를 이용하여, 서던 분석하여 PPIase 유전자 약 3.0kb를 클로닝하였다 (pPI-40).

pPI-40으로부터 PPIase N-말단 배열을 코드하는 영역으로부터 합성한 프리머(A-1, B-2)를 이용하여, PCR법으로 PPIase N-말단을 코드하는 유전자를 증폭하여, 염기배열을 결정한 후, 그 정보에 따라 유전해석한 결과 PCR로 증폭된 단편 (pSN-18)은 165염기로부터 형성된 55 아미노산잔기를 코드하는 open reading frame (ORF)이 계속되고 있었고, Edman법으로 결정한 PPIase N-말단 아미노산 39 아미노산잔기가 완전히 일치하였다. 이 결과로부터 pSN-18의 ORF은 PPIase 구조 유전자의 약1/3에 해당하는 단편임을 확인하였다. 그리고, 이 ORF를 중심으로, 지금까지 클론화된 대장균의 PPIasea (cytoplasm)와 PPIase b (periplasm)의 아미노산 일차구조 해석으로부터 각각

58% (cytoplasm), 16% (periplasm)의 상동성을 나타냈다. PPIase 구조 유전자를 갖는 재조합플라스미드 pPI-40을 JM109로 형질전환하여 *Lac* 프로모터로 PPIase 단백질을 발현시켰다. 효소 분자량을 SDS-PAGE로 확인한 결과 약 18kDa으로 호열균 *B. stearothermophilus*로부터 정제한 단백질 분자량과 동일하다. 번역억제(CsA, FK506)와의 화학적인 반응은 대장균의 PPIase와 동일하게, 번역억제와는 비감수성으로 나타났다.

참고문헌

- Brandts, J. F. and Lin, L. L. : Proline isomerization studied with proteolytic isomerase. *Methods in Enzymology*, **131**, 107(1986).
- Fischer, G., Bang, H. and Mech, C. C. : Nachweis einer enzym katalyse fur die *cis-trans* isomerisierung der peptidebindung in prolinhaligen peptiden. *Biochim. Acta.*, **10**, 1101 (1984).
- Ellis, R. A. and Van der vies, S. M. : Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 321 (1991).
- Craig, E. A., Gimbill, B. D. and Nelson, R. J. : Heat shock protein : molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**, 402 (1993).
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Troeschug, M., Fischer, G. and Takahasi, N. : Cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630 (1991).
- Hayano, T., Takahasi, N., Kato, S., Maki, N. and Suzuki, M. : Two distinct forms of peptidyl prolyl-*cis-trans*-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, **30**, 3041 (1991).
- Schonbrunner, E. R., Mayer, S., Troeschug, M., Fischer, G. and Takahasi, N. : Cyclophilins from different species. *J. Biol. Chem.*, **266**, 3630 (1991).
- Takahasi, N., Hayano, T. and Suzuki, M. : Peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase is the cyclosporin : A binding protein cyclophilin. *Nature*, **337**, 473 (1989).
- Heinemann, U. and Saenger, W. : Specific protein nucleic recombination in ribonuclease T1-2' guanylic and complex : an X-ray study. *Nature*, **299**, 27 (1982).
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. : Folding of ribonuclease T1. 2. kinetic models for the folding and unfolding reaction. *Biochemistry*, **29**, 3062 (1990).
- Kiefhaber, T., Quaas, R., Hahn, U. and Schmid, F. X. : Folding of ribonuclease T1. 1. existence of multiple unfolded states created by proline isomerization. *Biochemistry*, **29**, 3053 (1990).
- Siekieka, J. J., Wiederrecht, G., Grulich, H., Boulton, D., Hung, S. H. Y., Cryan, J., Hodres, P. J. and Sigal, N. H. : The cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 is both a ubiquitons and highly conserved peptidyl *cis-trans* isomerase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21011 (1990).
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E. and Schreiber, S. L. : A receptor for the immunosuppressant FK506 is a *cis-trans* isomerase. *Nature*, **341**, 755 (1989).
- Heander, B., Keller, R., Hiestand, P. C., Kocher, H. P., Wegman, G. and Movva, N. R. : Yeast cyclophilin : isolation and characterization of the protein, cDNA and gene. *Gene*, **83**, 39 (1989).
- Emmel, E. A., Verweij, C. L., Durand, D. B. and Higgins, K. M., Lacy, E., Crabtree, G. R. : Cyclosporin a specifically inhibits function of nuclease protein involved in t cell activation. *Science*, **246**, 1617 (1989).
- Schreiber, S. : Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science*, **251**, 283 (1991).
- Friedman, J. and Weissman, I. : Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA. *Cell*, **66**, 799 (1991).
- Gething, M. J. and Sambrook, J. : Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33 (1992).
- Yanish-perron, C., Vieira, J. and Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains : nucleotide sequences of the M13 mp and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103 (1985).
- Zang, M., Nakai, H. and Imanaka, T. : Useful host vector systems in bacillus stearothermophilus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 3162 (1988).
- Hanahan, D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Biol.*, **166**, 557 (1983).
- Birnboim, H. C. and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513 (1979).
- Vieira, J. and Messing, J. : Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **153**, 3 (1979).
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977).
- Saiki, R. K., Geland, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, F. G., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. : Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487 (1988).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning 2ed ed: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. (1982).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970).
- Kim, D. J. : Purification and characterization of peptidyl prolyl *cis-trans* from *Bacillus stearothermophilus* SIC1. *Korean Fish. Soc.*, **28**, 728 (1995).