

Ribonucleotide reductase: 구조, 기능 및 응용

송방호^{1*} · 김복환² · 김사열¹

¹경북대학교 사범대학 생물교육과, ²한국방송통신대학교 보건위생학과

유전은 생명현상의 본질 가운데 하나이며, 그 본체는 DNA로 알려져 왔다. DNA는 그 합성의 원료로 deoxyribonucleotides가 이용된다. 생명체에서 이 deoxyribonucleotides는 ribonucleotides로부터 한 종류의 효소 즉 ribonucleotide reductase (RNR 혹은 RR)에 의하여 전환된다. RNR은 ribonucleotide의 2'-carbon에 결합된 OH기를 H기로 치환하는 효소로서 ribose에 결합된 4종류의 염기에는 비특이적으로 관여하나 결합된 인산기의 수에 따라 즉 di- 또는 tri-phosphate를 특이적으로 인식하여 어느 한 수준에서만 deoxy type의 nucleotides로 전환시키는 특징이 있다. 실제적으로 RNR은 purine 대사 경로에서는 ADP를 dADP로, GDP를 dGDP로 바꿔주며[1], pyrimidine 대사 경로에서는 CDP를 dCDP로, UDP를 dUDP로 전환시켜 주게 된다[2]. 이 효소의 존재는 기능적으로 RNA의 성분인 ribonucleotide를 DNA의 deoxyribonucleotide로 전환시키므로 RNA world에서 DNA world에로의 전환이 일어났다는 진화적 사실을 입증하는 결정적인 역할을 담당하고 있다[3].

그 동안 RNR에 관한 연구는 주로 *Escherichia coli* RNR을 표준형으로 하여 이루어져 왔다. 1970년대에 Thelander와 Reichard에 의하여 고안되었던 *E. coli* RNR의 가상적 모델[4]은 1990년대에 와서 구조생물학의 발전에 힘입어 그 구조가 정확하게 해명되었다[5, 6]. 최근에 와서는 RNR의 구조와 연관된 기능[7]과 조절[8]에 관해서도 소상히 알게 되었다. 그리고 RNR의 코드를 지정하는 nrd 유전자의 경우, 그 전체 크기가 대체로 3 kilobase 이상이고 기능적으로 세포의 생존에 필수적인 경우가 많아서 일단 해당유전자를 온전하게 확보하기가 어려웠고 연구에도 적지않은 제한이 뒤따라온 것이 사실이다. 그러나, 1995년 이후 genome sequencing project들이 속속 완결되면서 1997년 한해 동안에만 20여종 이상의 nrd 유전자의 확보가 용이해져서 그 연구에 박차를 가하게 되었다.

극한 환경을 포함한 어떤 환경에서도 생물은 유전정보의 본체로서 DNA(RNA를 본체로 하는 retrovirus의 경우는 예외로 간주됨)를 필수적으로 가지고 있음을 감안한다면 이 RNR은 모든 생물에서 동일한 한 종류의 효소로서만이 존재하여야 할 것으로 예측되어 왔다. 그러나, 실제 여러 종류의 생물에서 RNR을 검색하였던 바, 3가지의 다른 종류, 즉 tyrosine radical

에 산소를 요구하는 class I, radical generator에 adenosylcobalamin을 요구하는 class II, glycyl radical을 요구하는 class III이 진화과정에서 분화되었다고 해석되고 있기에 이들 다른 종류의 RNR의 존재에 대한 진화과정에서의 해석이 중요한 관심을 자아내게 되었다. RNR은 또한 거대분자 복합체 (supramolecular complex)의 일부로서 DNA 복제나 수복의 기능과 복합적으로 조절되면서 그 반응이 일어날 것으로 추정된다[3]. 이는 또한 항암 또는 항 virus활성의 target 효소이며 의약 및 생화학용 시약으로써 dNTP의 생산에도 산업적으로 중요한 의의를 갖는 효소이기도 하다. 본고에서는 이러한 RNR의 최근 연구결과를 종합적으로 고찰하여 보았으며, 특히 응용에 대한 가능성을 제시하고자 하였다.

종류, 구조 및 기능

Ribonucleotide reductase는 ribonucleotide를 deoxyribonucleotide로 전환시키는 효소로서 모든 생물의 핵산대사에 중심적인 역할을 나타낸다. 그러나 이들 효소는 그 활성단에 관여하는 필수적인 금속 보조인자가 진화적으로 보존되어 있지 않다는 점이다. 이 효소는 4종의 class로 나뉘어져 있다. Table 1에서 보는 바와 같이, class I은 tyrosine radical을 발생시키는 과정에 산소를 요구하며, 이는 Ia와 Ib로 나뉘어져 Ia는 diferric-tyrosyl radical[9], Ib는 manganese cluster-tyrosyl radical[10]을 발생시킨다. Class II는 class I과 III가 두 개의 분리된 단백질로 구성된 점에 비해 단일분자(single monomeric 또는 homodimeric 단백질)로 되어 있으며 adenosylcobalamin(AdoCb1)[11]을 radical generator로 요구한다. Class III은 편성 혐기성 균을 혐기적 조건에서 배양시 발견되며 glycyl radical[12]을 보조인자로 요구하는 혐기성효소이다.

Class I RNR은 R1과 R2 subunit로 구성되어 있으며, 그 입체구조를 밝힌 바[5, 6], R2는 diferric-tyrosyl radical cofactor를 가진 radical 발생장치로서 small homodimer이며, R1은 thiy radical로 되는 cysteine을 함유하여 catalytic 및 allosteric sites로 작용하는 large homodimer이다. Class I에는 Ia와 Ib 형으로 나뉘어져 있으며 Ia에는 *E. coli*의 nrdAB[13] 및 eukaryote의

Table 1. Characteristics of ribonucleotide reductases

Factor/function	Class I		Class II	Class III
	Ia	Ib		
Gene	<i>nrdAB</i>	<i>nrdEF</i>	<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
Molecular structure	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha(\alpha_2)$	$\alpha_2\beta_2$
Radical	Tyrosine	Tyrosine	Adenosyl-cobalamin	Adenosyl-methionine Glycine
Cofactor	Ferric	Ferric Manganese	Cobalt	Ferric Thiol
Reductant	Thioredoxin 1 Glutaredoxin	Thioredoxin 2 Glutaredoxin	Thioredoxin 1 Glutaredoxin	Formate
dATP	Inhibition	Stimulation	Stimulation	Inhibition
Oxygen	Aerobic	Aerobic	Aerobic Anaerobic	Anaerobic
Distribution	<i>E. coli</i> Eukaryote Virus	Eubacteria	Eubacteria Archaeobacteria	Strict-anaerobe Archaeobacteria

RNR이 포함된다. Ia class에 속하는 *Homo sapiens*[14], *Tripanosoma brucei*[15], *Saccharomyces cerevisiae*[16, 17], *E. coli*[13] 등을 대상으로 아미노산배열을 비교분석한 바, large subunit의 아미노산 배열 간에는 대체로 높은 상동성이 있었으나, small subunit에서는 그렇지 않았다. 구체적으로, large subunit의 아미노산 배열에서 진핵생물 간에는 55-58%의 상동성을 보여준 반면에, *E. coli*의 그것과는 24-25%의 상동성을 보여 주었다. Small subunit의 경우, *H. sapiens* RR2와 *T. brucei* RNR2 사이에는 64%의 매우 높은 상동성을 보여 주었고, *H. sapiens* RR2와 *S. cerevisiae* RNR2, *T. brucei* RNR2와 *S. cerevisiae* RNR2 사이에는 각각 44%, 43%의 높은 상동성이 있었으나 대조적으로 진핵생물과 *E. coli* 사이에는 비교적 낮은 13-18%의 상동성을 나타내었다.

Ib에는 *Salmonella typhimurium*에서 *nrdAB* 이외에 1994년에 새로이 발효된 *nrdEF*로써 염색체 선상에서 *nrdAB*와는 서로 다른 위치에 존재하며 크고 작은 두 개의 subunit를 구성하는 coding genes의 operon으로 각각 구성되어 있다[18]. *E. coli* 이외의 세균성 RNR이 여기에 포함되어 있으며 manganese 의존성으로 분류되고 있다. 아미노산의 상동성에서 Ia인 *nrdAB*와는 거리가 멀게 나타났으며 N말단의 51개의 아미노산 배열이 결실되어 있다[19]. *E. coli*의 Ia형 RNR인 *nrdAB*을 제외한 대부분의 세균성 RNR은 이 Ib형으로 분류되어 *nrdEF*로 표현되며, *E. coli*의 경우 Ia형은 타의 세균에 비해 극히 예외에 속하는 것으로 간주된다. 그람양성세균인 *Lactobacillus leichmannii*[11], *Corynebacterium ammoniagenes*[10]와 그람음성세균인 *Salmonella typhimurium*[18], *E. coli*[20] 등은 Ib class로서 그 large subunit인 NrdE를 대상으로 아미노산 배열을 비교분석한 결과, *C. ammoniagenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* 등의 상호간에는 66-67%의 높은 상동성을 보여 준 반면에, 이들과 *L. leichmannii* NrdE 간에는 10-12%의 아주 낮은

생물산업

상동성이 나타났다. Small subunit인 NrdF의 경우에는 *C. ammoniagenes*[10], *S. typhimurium*[18], *E. coli*[20] 등에서 65-87%라는 매우 높은 상동성을 보여 주었다.

Class II는 class I 및 III에 비해 분자의 크기가 작으며, *Bacillus subtilis*[21]와 *Mycobacterium tuberculosis*[22]에서 가장 많이 연구되었다. Single monomeric 또는 homodimeric 단백질로 구성되어 있고 S-adenosylcobalamin을 cofactor로 요구하는 성질이 특이적이며[23], class II 내에서는 배열상의 상동성이 높으나 class 간의 상동성은 거의 인정되지 않는 편이다. Class II에 속하는 *Pyrococcus furiosus*[24], *Pyrococcus horikoshii*[25], *Thermotoga maritima*[26], *M. tuberculosis*[22] 등의 RNR large subunit의 경우 동일한 archaeobacteria에 속하는 두 *Pyrococcus* 사이에는 53%, 나머지 것들 사이에는 32-38%의 의미있는 상동성이 나타났다. *Mycoplasma pneumoniae*[27]와 *B. subtilis*의 NrdE 사이에는 43%의 상동성을 보여 주었으나, 전자의 그룹과 후자의 그룹 간에는 20% 미만의 낮은 상동성을 보여 주었다. Small subunit의 경우, *M. tuberculosis*[22], *M. pneumoniae*[27]와 *B. subtilis*[21] NrdF 아미노산 배열 간에는 34-46%의 상동성을 보여 주었다.

Class III는 혐기적 조건에서 발현되는 RNR로써 *E. coli*를 혐기적으로 배양할 때 발현되며 *nrdDG*에 의해 코딩되는 단백질로 정의된다[28]. Monomeric polypeptide로 구성되어 있으며, S-adenosylmethionine을 cofactor로 요구한다. Large subunit 내의 산소 감수성 glycyl radical과 small subunit 내의 4Fe-4S cluster가 thiyl radical의 형성에 관여한다. External 환원제로써 small protein이 아닌 formate가 관여하는 점이 특이적이다. Class III에 속하는 ribonucleotide reductase의 아미노산 배열간에는 전체적으로 매우 낮은 상동성을 나타낸다. 즉, *Archaeoglobus fulgidus*[29], *Methanobacterium thermoautotrophicum*[30] 및 *Thermoplasma acidophilum*[31] 등의 RR 아미노산 배

열 사이에는 42-47%의 비교적 높은 상동성을 보인 반면에, 동일한 archaeobacteria에 속하는 *Aquefex aeolicus*의 그것[32]과는 21-22%, *E. coli* NrdD와는 5-12%라는 매우 낮은 상동성을 보여 주기 때문이다.

환원반응 촉매기구

*E. coli*의 class Ia RNR의 3차원 구조의 해석에서 예측되었던 RNR 기구가 입증되었다. Ia의 large subunit RI은 redox-active cysteine이 small subunit RII에는 안정한 tyrosyl radical이 함유되어 있다. Cys225와 Cys462의 redox-active cysteines은 Cys439의 thiyl radical에 의하여 ribose의 C-3'으로부터 분리한 전자를 끌어당기게 함으로써 C-2'의 환원을 시도하는 것으로 설명되고 있다[6]. Ib의 *L. leichmannii*에서도 Cys408의 thiyl radical과 Cys119 및 Cys419의 redox-active cysteines에서 동일한 반응이 일어나는 것으로 입증되었다. Class I에서는 large subunit의 thiyl radical이 small subunit의 tyrosyl radical을 원거리 전자 전이에 의해 발생시키고 있다. 즉, small subunit의 tyrosyl기와 large subunit의 결정적인 cysteine에 의해 모든 class I 단백질은 tyrosyl radical을 발생시키는데 요구되는 산소와 연결된 di-iron center를 small 단백질에 생성하는 것으로 생각된다[33]. Class II RNR에서는 이때 adenosylcobalamin이 thiyl radical을 발생시키는 것으로 생각된다[7]. Class III에서는 Nrd가 alpha, beta 구조를 갖고 있다. 안정한 잔기는 large subunit에 산소-감수성 glycyll 잔기 형태로 존재한다. 한편 small subunit은 4Fe-4S cluster를 class I의 Fe-O-Fe 대신에 함유하고 있다[34]. 또한 cofactor로써 S-adenosylmethionine이 radical generation에 요구된다(이 경우 class II는 adenosylcobalamin을 요구). 즉 class III는 class I과 class II 효소의 기능을 동시에 보유하고 있는 것으로 생각되나 상세한 기구는 더 연구가 진전되어야 확실하게 설명할 수 있으리라 생각된다.

Class III의 경우 *E. coli*의 *nrdDG* knock-out mutant는 절대 혐기조건하에서 성장할 수 없었다. *E. coli*의 경우 혐기적 조건이 되면 Fnr protein이 혐기성 유전자의 발현을 자극하며[35], ArcAB 단백질은 호기성 유전자의 발현을 전사레벨에서 감소시키는 기능을 갖고 있다[36]. 즉 *E. coli*를 혐기적 조건에서 배양하게 되면 *nrdAB* 시스템이 ArcAB에 의해 억제되면서 Fnr에 의해 *nrdDG*의 transcription이 활성화되어 class I에서 class III *nrd*의 발현으로 전환되는 것으로 해석된다[37].

*Lactobacillus lactis*의 *nrdEF* 유전자의 상류에는 *nrdH* 유전자가 있다[38]. 이는 NrdAB보다는 NrdEF에 대한 수소 공여체로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 즉, 이 *nrdH*는 *L. lactis*, *E. coli*, *S. typhimurium* 등에서는 인정이 되나, 최근 전 게놈이 밝혀진 *M. genitalium*에서는 *nrdEF*는 확인이 되었으나 *nrdH*는 그 존재가 확인이 되지 않았다[39]. *E. coli* NrdEF의 경우는 또

하나의 전자 공여체로써 NrdI를 요구하는 것으로 추측되나 그 중요성은 연구가 더 진전되어야 밝혀질 것으로 생각된다[40].

Ribonucleotide reductase의 진화학적 해석

세 가지 다른 종류의 ribonucleotide reductase 가운데 어느 class의 RNR이 가장 먼저 만들어진 것일까? 이의 해답은 지구 상에서의 산소의 출현과 병행하여 해석하지 않을 수 없다. 산소가 출현하기 이전, 즉 혐기적 조건하에서 생명체가 살기 위하여 당시 원시대기 중에 많이 존재하였던 iron-sulfur cluster를 이용하여 촉매에 glycyll radical을 generation하였을 것이며 이 때 adenosylcobalamin보다 구조가 간단한 adenosylmethionine을 cofactor로 이용한 class III RNR이 함유된 생명체가 가장 먼저 출현하였을 것이다[41]. 그 후 adenosylcobalamin을 cofactor로 요구하는 class II RNR이 하나의 polypeptide로 그 기능을 나타내었을 것이다. 그 후 가장 분화된 형의 class I RNR이 산소의 요구성을 나타내면서 최종적으로 출현하게 되어 현재의 모든 진핵세포에 존재하는 형태로 나타난 것으로 예측된다. Class II와 III간에는 요구하는 cofactor에서 현저한 차이가 있으며 또 산소의 요구성에도 차이가 있다. 절대 혐기성균에서만 출현하는 radical generating 기구는 먼저 pyruvate로부터 acetyl-CoA와 formate를 생성하는 pyruvate formate lyase로부터 도래되었을 것으로 추측되며[42], 이것이 class III RNR이 먼저 생성되었을 것이라는 이론적 근거의 하나이다. 이 반응은 혐기성균 대사의 필수적인 경로로써 ribonucleotide reduction보다 이전에 생성되었을 것으로 추측되기 때문이다. 그러나 이러한 진화의 설명가운데 iron-sulfur를 요구하는 class III의 RNR이 원시대기중의 혐기적 조건에서 가장 먼저 출현하였으며 산소의 존재하에서 발현되는 class I이 가장 늦게 출현하였다는 점은 설득력이 있으나, class II의 adenosylcobalamin이 class III의 adenosylmethionine에 대응하여 출현하였다는 점은 설명이 어렵다고 하겠다.

Replisome, supramolecular complex

대부분의 ribonucleotide reductase는 정제하면 그 활성이 DNA복제의 *in vivo* 활성에 비해 현저히 감소함이 알려졌다. 이는 본 효소가 dNTP나 DNA합성계 관련효소들의 세포내 구성이 supramolecular 구조체인 "replisome"의 개념으로 설명될 수 있다. 즉, 세포 내외에서 RNR 활성의 차이는 DNA 전구체의 생합성이나, DNA 복제, dNTP의 DNA 복제 개시점과 연관된 세포내 고농도의 국재성 등과 연계성을 갖는 관련효소들이 복합체의 형태로 세포내에 존재할 가능성을 제시하는 근거가 되리라 생각된다. 물론 이 replisome 복합체는 포유동물의 세포에서는 그 존재가 확인되지 않았으나, T4 phage가 감염된 대

장균에서 확인되었고, DNA복제가 multienzyme 복합체에서 일어남을 볼 때 그 가능성은 충분히 있다고 여겨진다[43]. 대부분의 RNR이 정제된 상태에서 그 활성이 상실됨은 multienzyme 복합체에서 단백질-단백질의 상호활성에 의한 해당 효소의 활성자극이 상실되었기 때문으로 생각된다. *B. subtilis*에서 replisome이 정제되면서[44], "replisome"의 개념이 아직도 중요한 매력적인 과제로 dNTP합성과 연관되어 해석될 수 있으리라 기대된다[45]. 특히 본 그룹에서 수행중인 nona-cis-tron으로 구성된 *atp* gene cluster에 의해 발현되는 ATPase의 연구에서도 RNR과의 복합체 형성에 의한 활성자극이 중요한 의미를 부여할 수 있을 것으로 생각된다[46; Song *et al.*, unpublished data].

Nucleotide reductase는 세포주기 의존성 효소

동물세포에서 dNTP의 생산에 관련된 효소들은 DNA 복제가 일어나는 DNA합성(S)기에 그 활성이 현저히 향진된다. Thymidine kinase나 RNR은 S기에 활성이 증가하며, deoxycytidine kinase는 어느기에서나 활성화되어 있는 반면 thymidylate synthase는 세포주기에 관계없이 그 활성이 아주 미약하다. *De novo* 또는 salvage 경로에 관련되는 효소의 활성은 세포 주기에 따라 아주 향진되는 경우도 있고 전혀 변화가 없는 경우도 있다. CEM 세포에서 RNR은 S기에 약 70배 정도의 활성증가가 나타났으나 deoxycytidine kinase는 그렇지 못하였다. [^3H]deoxycytidine의 dCTP로의 도입은 G1기나 S기에서 거의 동량으로 나타났다. 이는 G1기에서 DNA수복이나 mitochondrial DNA의 합성에 nucleotides가 사용되었기 때문으로 생각된다[47].

세포내 deoxyribonucleotide의 pool이 일정하게 유지되기 위하여는 cell cycle에서 ribonucleotide reductase의 정확한 조절에 의한 복제의 제어가 필수적이다. 이때의 조절에는 유전자의 발현, 번역 제어, 단백질의 안정성, 번역후 활성화 및 비활성화, 세포내 ATP 및 dNTP pool의 크기에 의한 효소활성의 allosteric control등이 관련되어 있다. Nucleotide pool은 salvage, 이화작용, substrate cycle 등에 의하여도 조절된다. Ehrlich ascites 세포를 다른 농도의 산소압, 즉 2%에서 0.02%로 산소압을 점차 하강시키면서 배양하였을 경우 free radical level이 점차로 하강하였다. 하강된 조건에서 다시 공기를 공급하였을 때 dCTP pool은 연쇄적으로 변화가 일어났으나 dATP 또는 dGTP는 변하지 않았고 dTTP는 약한 변화성을 나타내었다. Free radical 농도의 변화는 dCTP의 pool에 연쇄적인 변화를 가함을 알 수 있었으며 아울러 RNR이 변화된 세포내 dCTP의 pool을 제어함으로써 핵의 복제기구에 직접적인 영향을 미침을 알 수 있었다[48].

또한 각 class의 RNR은 allosteric effector에 대한 감수성이 동일하게 나타났다. ADP는 dGTP에 의해 dADP로의 환원

력이 저해되었다. GDP는 dTTP, CDP는 ATP 또는 dATP에 의해 환원성이 감소된다는 점은 세가지 class에서 동일한 현상으로 나타났다.

Resveratrol: 적 포도주에서 분리된 ribonucleotide reductase의 저해제

Resveratrol(3,5,4'-trihydroxystilbene, schime 1)은 식물성 phytoalexin으로써 적 포도주에서 환경적 스트레스 및 병원체의 공격에 대응하기 위하여 생산되며[49], radical scavenger 혹은 cyclooxygenase 활성저해효과도 있다[50]. 포유동물에서 DNA의 합성저해 및 ribonucleotide reductase의 저해제로 혈소판 응고방지작용, 항세포증식 및 암세포의 initiation, promotion, progression에 대한 저해효과로써의 응용도 기대된다. 이는 심장병에 대한 저해능이 탁월하며, 항 HIV제제로써의 synergistic 효과도 있어서 향후 진전된 연구 결과의 추이가 주목된다[51].

포유동물의 ribonucleotide reductase R2는 oncogene의 발현을 조절

R1과 R2로 구성된 포유동물의 RR은 DNA합성이나 수복에 중요한 조절인자로 작용한다. 세포주기에 따라 RR의 활성은 다르게 나타나는데 R1과 R2는 G0-G1기에는 활성이 낮으나, G1-S 경계기에는 활성이 현저히 향진되고 G2-M기에는 반대로 그 활성이 감소되며 이는 mRNA 레벨은 R2가 현격한 차이를 보이는 반면 R1은 온화한 변화를 나타내고 있음이 대부분의 포유동물세포에서 확인되었다[52]. 특히 R2는 주기의존성과 제한성이 강하며 DNA 복제기간 중에 RR효소의 활성을 조절하기도 한다. 주기제한성 R2성분의 고도 발현은 Raf-1 단백질의 활성이나 mitogen에 의하여 활성화된 protein kinase 활성을 향진시키고 H-ras나 rac-1의 협력에 의한 악성종양의 결정인자로 작용하기도 한다. 세포의 형질전환과정에 R2 성분이 관여하면 세포내 위치가 다르고 다른 기능을 지닌 다양한 oncogene에의 영향을 미치게 된다. *v-fms*, *v-src*, *A-raf*, *v-fes*, *c-myc* 및 *ornithine decarboxylase*로 형질전환된 세포의 anchorage-비의존성 성장이 과잉발현된 R2 존재시에는 현저히 향진되었다. R2 단백질은 RR의 주기제한성을 나타내면서 여러 가지 oncogene에 의한 세포의 형질전환이나 암원성 가능성을 부여하는 조절인자로 작용하고 있는 것으로 확인되고 있다[53].

Ribonucleotide reductase의 분포

Class I은 지구상에 산소가 충분히 존재시 분화된 것으로 예상되며, class Ia의 amino말단 50-60개의 아미노산 배열은 dATP에 의해 저해되는 조절기능이 있음이 알려져 있다. E.

Table 2. Classification of ribonucleotide reductases from various sources

Source	Class ^a				Reference
	Ia	Ib	II	III	
Archaeobacteria					
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>				○	30
<i>Archeoglobus fulgidus</i>				○	29
<i>Aquefex aeolicus</i>				○	32
<i>Thermoplasma acidophila</i>			○		31
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	○		○		25
<i>Pyrococcus furiosus</i>			○		24
Eubacteria					
<i>Thermotoga maritima</i>			○		26
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>			○		26
<i>Deinococcus radiodurans</i>			○		26
<i>Lactobacillus leichmannii</i>		○			11
<i>Salmonella typhimurium</i>		○			19
<i>Escherichia coli</i>		○		○	13, 20
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>		○			10
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>			○		56
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>			○		22
<i>Bacillus subtilis</i>			○		21
Eukaryote					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	○				57
<i>Trypanosoma brucei</i>					15
<i>Homo sapiens</i>	○				14

^a○ indicates organism has corresponding classes of ribonucleotide reductases.

*coli*의 경우 class Ib가 비활성화된 상태에서 Ia가 활성화됨은 생물속주에서의 수평적 전이에 의한 것으로 예측된다. *E. coli*의 *nrdAB*와 *S. cerevisiae*, mouse 등 대부분의 진핵세포에서는 class I의 RNR을 생성한다. Class II는 extreme thermophile이, class III는 Methanogen이 생성하는 것이다. Extreme thermophile중 전 계놈의 염기배열이 밝혀진 것은 *Methanococcus jannaschii*[54], *M. thermoautotrophicum*[30], *A. fulgidus*[29], *A. aeolicus*[32], *P. horikoshii*[25] 등의 균주들로서 이들은 class III의 RNR을 생성한다. 특히 class II에 속하는 RNR 생성균주들로는 *B. subtilis*[21]와 *M. tuberculosis*[22] 외에도 *T. maritima*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Deinococcus radiodurans* 등의 eubacteria[26]와 *P. furiosus*[24], *T. acidophila*, *Halobacterium cutirubrum*, *Haloferax volcanii* 등의 archaeobacteria [31]가 있다(Table 2). *B. subtilis*에서는 두 종류의 RR이 존재한다. 그 중 NrdEF는 염색체 상에서 168°에 위치하며 삽입돌연변이를 유발하면 세포가 치사하게 되므로 그 기능이 세포에 필수적임을 알게 되었다[22]. 다른 하나는 YosO와 YosP이며, 180° 상에 위치하고 있는데, *B. subtilis* NrdEF와 아미노산 배열 분석시 각각 77%, 86%의 상동성을 나타내었다[55]. 특별히 저도 *yosO*는 intein과 intron 구조가 각각 한 개씩 끼워져 있으며, *yosP*는 intron 구조를 한 개 포함하고 있다. 아마도 그것은 두 유전자가 위치하는 부위가 SPβ prophage인 것과 관련이 있을 듯하다.

*Pyrococcus*와 *Thermoplasma*의 RNR은 아미노말단의 100-150개의 아미노산 배열이 class III에 나머지 부분은 class Ia에 상동성이 높게 나타났다. Class II는 산소가 출현할 무렵에 분화 되었으므로 호기성 및 혐기성조건에서 발현되는 RNRs가 혼합되어 있다. Class II과 class III는 진정세균과 고세균에서 발견되고 있음은 이들이 둘로 분화되기 이전부터 이미 존재하였음을 의미한다. 모든 class III는 절대혐기성의 *M. jannaschii* 및 *M. thermoautotrophicum*[30, 54]에서 발견되어 carboxy말단에 RxxGYV/L이 있으며, glycyl radical을 형성하는 능력이 있다. 절대 혐기성의 극한 내열성균인 *P. furiosus*의 RNR은 구조내에 두 개의 intein 구조가 있다[24]. adenosylcobalamin을 요구하며 class II에 해당한다. 그러나 메탄 생성균주인 *M. jannaschii*은 class III에 해당된다[54]. 또 내열성 세균인 *T. acidophila*는 역시 adenosylcobalamin을 요구하면서 class II에 포함된다[31].

참고문헌

1. Nygaard, P. 1983. Utilization of preformed purine bases and nucleosides, pp. 27-93. In A. Munch-Petersen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms. Academic Press, London.
2. Mollgaard, H. and J. Neuhard. 1983. Biosynthesis of deoxythymidine triphosphate, pp. 149-201. In A. Munch-Petersen (ed.), Metabolism of nucleotides, nucleosides and nu-

- cleobases in microorganisms. Academic Press, London.
3. Reichard, P. 1997. The evolution of ribonucleotide reduction. *TIBS* **22**: 81–85.
 4. Thelander, L. and P. Reichard. 1979. Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 133–158.
 5. Nordlund, P. and H. Eklund. 1993. Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2. *J. Mol. Biol.* **232**: 123–164.
 6. Uhlin, U. and H. Eklund. 1994. Structure of ribonucleotide reductase protein R1. *Nature* **370**: 533–539.
 7. Licht, S., G. J. Gerfen, and J. Stubbe. 1996. Thiyl radicals in ribonucleotide reductases. *Science* **271**: 477–481.
 8. Ericksson, M., U. Uhlin, S. Ramaswamy, M. Ekberg, K. Regnstrom, B.-M. Sjoberg, and H. Eklund. 1997. Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* **5**: 1077–1092.
 9. Sjoberg, B. M. and P. Reichard. 1977. Nature of the free radical in ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **252**: 536–541.
 10. Fieschi, F., E. Torrents, L. Touloukhonova, A. Jordan, U. Hellman, J. Barbe, I. Gibert, M. Karlsson, and B.-M. Sjoberg. 1998. The manganese-containing ribonucleotide reductase of *Corynebacterium ammoniagenes* is a class Ib enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 4329–4337.
 11. Booker, S. and J. Stubbe. 1993. Cloning, sequencing, and expression of the adenosylcobalamin-dependent ribonucleotide reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8352–8356.
 12. Sun, X., R. Eliasson, E. Pontis, J. Andersson, G. Buist, B. M. Sjoberg, and P. Reichard. 1995. Generation of the glycy radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**: 2443–2446.
 13. Carlson, J., J. A. Fuchs, and J. Messing. 1984. Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4294–4297.
 14. Pavloff, N., D. Rivard, S. Masson, S. H. Shen, and A. M. Mes-Masson. 1992. Sequence analysis of the large and small subunits of human ribonucleotide reductase. *DNA Seq.* **2**: 227–234.
 15. Hofer, A., P. P. Schmidt, A. Graslund, and L. Thelander. 1997. Cloning and characterization of the R1 and R2 subunits of ribonucleotide reductase from *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 6959–6964.
 16. Elledge, S. J. and R. W. Davis. 1990. Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev.* **4**: 740–751.
 17. Hurd, H. K., C. W. Roberts, and J. W. Roberts. 1987. Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3673–3677.
 18. Jordan, A., I. Gibert, and J. Barbe. 1994. Cloning and sequencing of the genes from *Salmonella typhimurium* encoding a new bacterial ribonucleotide reductase. *J. Bacteriol.* **176**: 3420–3427.
 19. Jordan, A., E. Pontis, M. Atta, M. Krook, I. Gibert, J. Barbe, and P. Reichard. 1994. A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12892–12896.
 20. Jordan, A., E. Aragall, I. Gibert, and J. Barbe. 1996. Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol. Microbiol.* **19**: 777–790.
 21. Scotti, C., A. Valbuzzi, M. Perego, A. Galizzi, and A. M. Albertini. 1996. The *Bacillus subtilis* genes for ribonucleotide reductase are similar to the genes for the second class I NrdE/NrdF enzymes of *Enterobacteriaceae*. *Microbiology* **142**: 2995–3004.
 22. Yang, F., S. C. Cuttan, L.-S. Li, D. Avarbock, J. D. Graf, M.-M. Chua, G. Lu, J. Salem, and H. Rubin. 1997. Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. *J. Bacteriol.* **179**: 6408–6415.
 23. Reichard, P. 1993. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**: 1773–1777.
 24. Riera, J., F. T. Robb, R. Weiss, and M. Fontecave. 1997. Ribonucleotide reductase in the archaeon *Pyrococcus furiosus*: a critical enzyme in the evolution of DNA genomes? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 475–478.
 25. Kawarabayasi, Y. and 30 coauthors. 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (Supplement). *DNA Res.* **5**(Suppl.): 147–155.
 26. Jordan, A., E. Torrents, C. Jeanthon, R. Eliasson, U. Hellman, C. Wernstedt, J. Barbe, I. Gibert, and P. Reichard. 1997. B12-dependent ribonucleotide reductases from deeply rooted eubacteria are structurally related to the aerobic enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 13487–13492.
 27. Himmelreich, R., H. Hilbert, H. Plagens, E. Pirkl, B.-C. Li, and R. Herrmann. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4420–4449.
 28. Sun, X., J. Harder, M. Krook, H. Jornvall, B.-M. Sjoberg, and P. Reichard. 1993. A possible glycine radical in anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the cloned *nrdD* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 577–581.
 29. Klenk, H.-P. and 50 coauthors. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon

- Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**: 364–370.
30. Smith, D. R. and 36 coauthors. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135–7155.
 31. Tauer, A. and S. A. Benner. 1997. The B₁₂-dependent ribonucleotide reductase from the archaeobacterium *Thermoplasma acidophila*: an evolutionary solution to the ribonucleotide reductase conundrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 53–58.
 32. Deckert, G. and 14 coauthors. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* **392**: 353–358.
 33. Stubbe, J. 1998. Ribonucleotide reductases in the twenty-first century. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2723–2724.
 34. Ollagnier, S., E. Mulliez, J. Gaillard, R. Eliasson, M. Fontecave, and P. Reichard. 1996. The anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. Subunit structure and iron sulfur center. *J. Biol. Chem.* **271**: 9410–9416.
 35. Iuchi, S. and E. C. Lin. 1993. Adaptation of *Escherichia coli* to redox environments by gene expression. *Mol. Microbiol.* **9**: 9–15.
 36. Spiro, S. and J. R. Guest. 1990. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **6**: 399–428.
 37. Garriga, X., R. Eliasson, E. Torrents, A. Jordan, J. Barbe, I. Gibert, and P. Reichard. 1996. nrdD and nrdG genes are essential for strict anaerobic growth of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**: 189–192.
 38. Jordan, A., E. Pontis, F. Aslund, U. Hellman, I. Gibert, and P. Reichard. 1996. The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*: characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J. Biol. Chem.* **271**: 8779–8785.
 39. Fraser, C. M. and 28 coauthors. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397–403.
 40. Jordan, A., F. Aslund, E. Pontis, P. Reichard, and A. Holmgren. 1997. Characterization of *Escherichia coli* NrdH: a glutaredoxin-like protein with a thioredoxin-like activity profile. *J. Biol. Chem.* **272**: 18044–18050.
 41. Frey, P. A. 1993. Lysine 2,3-aminomutase: is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin? *FASEB J.* **7**: 662–670.
 42. Knappe, J., S. Elbert, M. Frey, and A. F. Wagner. 1993. Pyruvate formate-lyase mechanism involving the protein-based glycy radical. *Biochem. Soc. Trans.* **21** (Pt 3): 731–734.
 43. Young, J. P. and C. K. Mathews, 1992. Interactions between T4 phage-coded deoxycytidylate hydroxymethylase and thymidylate synthase as revealed with an anti-idiotypic antibody. *J. Biol. Chem.* **267**: 10786–10790.
 44. Laffan, J. J., I. L. Skolnik, D. A. Hadley, M. Bouyea, and W. Firshein. 1990. Characterization of a multienzyme complex derived from a *Bacillus subtilis* DNA-membrane extract that synthesizes RNA and DNA precursors. *J. Bacteriol.* **172**: 5724–5731.
 45. Harder, J. 1993. Ribonucleotide reductases and their occurrence in microorganisms: a link to the RNA/DNA transition. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 272–292.
 46. Kim, S.-O., J.-S. Chang, S. M. Lee, and B.-H. Song. 1995. Cloning of the nrd gene encoding nucleotide reductase in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Cells* **5**: 253–259.
 47. Bianchi, V., S. Borella, C. Rampazzo, P. Ferraro, F. Calderazzo, L. C. Bianchi, S. Skog, and P. Reichard. 1997. Cell cycle-dependent metabolism of pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in CEM cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 16118–16124.
 48. Brischwein, K., M. Engelcke, H.-J. Riedinger, and H. Probst. 1997. Role of ribonucleotide reductase and deoxynucleotide pools in the oxygen-dependent control of DNA replication in Ehrlich ascites cells. *Eur. J. Biochem.* **244**: 286–293.
 49. Soleas, G. J., E. P. Diamandis, and D. M. Goldberg. 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* **30**: 91–113.
 50. Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon, and J. M. Pezzuto. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**: 218–220.
 51. Fontecave, M., M. Lepoivre, E. Elleingand, C. Gerez, and O. Guittet. 1998. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Letters* **421**: 277–279.
 52. Kuo, M.-L. and T. J. Kinsella, 1998. Expression of ribonucleotide reductase after ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* **58**: 2245–2252.
 53. Fan, H., C. Villegas, A. Huang, and J. A. Wright. 1998. The mammalian ribonucleotide reductase R2 component cooperates with a variety of oncogenes in mechanisms of cellular transformation. *Cancer Res.* **58**: 1650–1653.
 54. Bult, C. J. and 39 coauthors. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058–1073.
 55. Ghim, S.-Y., S.-K. Choi, B.-S. Shin, and S.-H. Park. 1998. An 8 kb nucleotide sequence at the 3' flanking region of the sspC gene (184°) on the *Bacillus subtilis* 168 chromosome containing an intein and an intron. *DNA Res.* **5**: 121–126.
 56. Fagan, P. K., S. P. Djordjevic, G. J. Eamens, J. Chin, and M. J. Walker. 1996. Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. *Infect. Immun.* **64**: 1060–1064.
 57. Huang, M. and S. J. Elledge. 1997. Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 6105–6113.