

## *Nocardioides* sp. J-326TK의 Adenosine Deaminase Gene에 관한 연구

전홍기† · 백형석 · 정춘식

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

## Studies on the Adenosine Deaminase Gene from *Nocardioides* sp. J-326TK

Hong-Ki Jun†, Hyung-Suk Baik, and Choon-Sik Jeong

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

### Abstract

Adenosine deaminase gene from *Nocardioides* sp. J-326TK was cloned by polymerase chain reaction using primers (PI, PII and PIII) constructed from the highly conserved amino acid sequences among *Escherichia coli*, mouse and human. A PCR product of about 800bp, as expected from the sequence of *E. coli* adenosine deaminase gene, was obtained from *Nocardioides* sp. J-326TK chromosomal DNA double-digested with EcoRI and Pst I. DNA sequencing of the PCR product after cloning into pT7Blue T-vector shows 99.5% and 98.9% homologies in nucleotide and amino acid sequences, respectively, with the *E. coli* adenosine deaminase whereas 59.5% and 46.8% homologies with the human adenosine deaminase, indicating the evolutionarily relationship of these organisms.

*Key words* : Adenosine deaminase gene, *Nocardioides* sp. J-326TK,

### 서 론

purine nucleotide생합성에 관여하는 adenosine deaminase (adenosyl aminohydrolase, EC 3. 5. 4. 4.)는 hypoxanthine을 IMP로 전환시키는데 있어서 중요한 기능을 수행하는 효소로서 adenosine 과 2'-deoxyadenosine을 inosine과 deoxyinosine으로 탈아미노시키는 과정을 촉매한다. Adenosine deaminase는 동물과 미생물에 널리 분포되어 있으며, 특히 동물기원의 효소에 대해서는 많은 연구가

행하여져 왔다. 동물기원의 효소에 대한 연구들 중에서 송아지의 소장, 닭의 십이지장, 말미잘, 쥐 및 인체조직 등으로부터 효소가 순수 분리되어 그 성질이 보고되었다<sup>1,2)</sup>. 그리고 쥐의 add gene promoter fragment에 대한 염기배열도 보고되어있으며<sup>3)</sup> mouse cell로부터 adenosine deaminase의 overproduction에 관하여 보고된 바 있다<sup>4-6)</sup>. 특히 인체에 있어서 adenosine deaminase는 임파조직에서 최대활성을 나타내며 면역계의 기능을 발휘하는데 필수적인 효소로서, 이 효소가 유전적으로 결여된 사람의 경우 임파구 감소

† Corresponding author

증과 심각한 면역결핍증이 초래됨으로, 인체의 효소에 관해서는 많은 연구가 진행되어 왔으며 인체의 adenosine deaminase에 대한 DNA의 1차구조가 밝혀져 있다<sup>7-10</sup>.

미생물기원의 효소는 동물기원의 효소에 비해 상대적으로 연구가 부족한 편이며, 자연계에 존재하는 핵산분해물질의 생체에서의 재사용에 관한 물질대사의 측면에서 주로 연구되고 있다. 미생물기원의 효소에 관한 연구로서는 *Escherichia coli* 및 *Bacillus cereus* 등에서 adenine 유도체에 의한 효소의 유도가 보고되어 있으며<sup>11</sup>, *Aspergillus oryzae*, *Halobacterium cutirubrum*, *Micrococcus sodonensis* 및 *Pseudomonas iodinum*<sup>12</sup>, *Streptomyces* sp. J-845S, *Nocardioides* sp. J-326TK 등으로부터 adenosine deaminase가 분리되어 그 성질이 연구되어 왔으며, *Bacillus cereus*의 세포내 효소가 HPLC를 사용한 정제과정에 의해 순수하게 정제되어 그 성질이 연구되었다<sup>13</sup>. 1980년대에 들어와서 adenosine deaminase의 결손이 면역체계의 T, B-lymphocyte의 기능에 영향을 미쳐 Severe Combined Immuno Disease (SCID)를 유발시키는 원인의 하나로 확인되어 면역학적인 분야에서 많은 연구가 이루어졌다<sup>14-15</sup>. SCID는 lymphopenia, ahems 림프관의 hypoplasia, 세포와 호르몬적인 면역성의 결핍에 의해 특정 지워진다. 이 환자들은 고도로 유독성 세균(예를 들면 *Salmonella*)과 다소 독성이 있는 (예를 들면 *Candida albicans*, *Cytomegalovirus*, *Pneumocystis carinii*)의 광범위한 감염에 민감한 반응을 일으킨다. 이를 해결하기 위해 많은 연구가들은 쥐와 사람, 송아지 등의 adenosine deaminase gene을 분리해내어 염기서열과 조절<sup>16</sup>,

작용 mechanism<sup>17</sup>, mutation의 원인<sup>18,19</sup>, inhibitor 등에<sup>20,21</sup> 관한 연구들이 활발히 이루어졌다.

이와 같이 adenosine deaminase의 결손에 의해 야기되는 질병을 치료하기 위해서는 adenosine deaminase를 증폭시키는 cell line을 숙주 cell내부로 도입할 수 있는 전달체계를 개발함으로써 가능할 것이다. 실제로 이러한 실험은 1990년대에 접어들면서 많은 연구가 진행되고 있다<sup>22-24</sup>. 유전자치료의 일환으로 microcapsule에 의해 분비될 수 있는 adenosine deaminase의 전달에 관한 연구를 행하였는데 유전산물이 생체내에서 분비될 수 있도록 조작된 cell line을 이용하였다.

본 연구에서는 *Nocardioides* sp. J-326TK의 genomic DNA로부터 PCR을 이용하여 adenosine deaminase gene을 증폭한 다음 이를 cloning하고 그 염기의 서열을 밝혔으며 미생물과 mammalian과의 상호 연관관계를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmid

본 실험에 사용한 균주와 플라스미드들은 Table 1과 같다.

### 사용배지 및 완충용액

본 실험에 사용된 *Nocardioides* sp. J-326TK는 30°C의 진탕배양기에서 배지가 3ml가 들어있는 시험관 (1.5×15 cm)에 1백금이 접종하여 30시간 전배양시킨 후, 100ml

Table 1. Bacterial strain and plasmid

Strain and plasmid	Relevant characteristics	Source
Bacterial strain		
<i>E. coli</i> DH5α	<i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)</i>	Our Lap
<i>E. coli</i> φ3834	<i>rps L Δadd-uid-man metB guaA uraA Tn10</i>	Nygaard
Plasmid		
padd1.7	pBKS(+) included <i>add</i> gene of <i>E. coli</i>	Nygaard
pT7Blue T-Vector	Amp <sup>r</sup>	Novagen
pN20	pT7Blue T-vector included 560bp of PCR product, Amp <sup>r</sup>	This study
pN21	pT7Blue T-vector included 804bp of PCR product, Amp <sup>r</sup>	This study
pBluescriptKS(+) )	Amp <sup>r</sup> , phagemid	Stratagene

가 들어있는 500ml용 삼각플라스크에 1m접종하여 16시간 배양하였다. 배지의 조성은 glucose 0.5%, peptone 0.5%, yeast extract 1%, NH<sub>4</sub>Cl 0.5%를 첨가하고 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. *E. coli* DH5 $\alpha$ 는 37°C진탕배양기에서 Luria-Bertani(LB)배지에 접종하여 배양하였으며, 배지의 조성은 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%이다. 고체배지는 위의 배지조성에 agar를 1.5%되게 첨가하여 사용하였으며 항생제는 선별배지에 따라 ampicillin (50mg/ml)를 첨가하여 사용하였다.

PCR 산물의 선별을 위해 적절한 항생제가 들어있는 고체배지에 X-gal (20mg/ml) 40 $\mu$ l와 IPTG(isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside)(200mg/ml) 4 $\mu$ l를 첨가하였다.

#### 제한효소 및 시약

제한효소, T4 DNA Ligase, Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP), DNA polymerase I Large (Klenow) fragment, T4 Polynucleotide Kinase, *Taq* DNA polymerase는 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)와 PSOCOCHEM (Taejon, Korea)에서 구입하였고, Agarose gel에서 DNA fragment를 회수하기 위한 JETSORB DNA extraction kit는 미국의 GENOMED사의 제품을, DNA sequencing kit는 미국의 Amersham International plc.의 Sequenase™ Version 2.0 DNA Sequencing Kit를 사용하였다. 또한 방사선 동위원소인 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP와 hybridization에 이용된 Enhanced Chemiluminescence (ECL) kit는 미국의 Amersham International plc.에서 구입하였고 기타시약은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

#### Genomic DNA와 Plasmid DNA의 분리

배양한 *Nocardioides* sp. J-326TK의 genomic DNA의 분리는 Ausubel 등의 방법<sup>25)</sup>을 사용하였고, Plasmid DNA의 분리는 small scale DNA분리는 Ish Horowicz의 방법<sup>26)</sup>을 사용하였고 large scale DNA분리방법은 Birnboim과 Doly의 alkali lysis방법<sup>27)</sup>을 변형하여 사용하였다.

#### Primer design과 PCR

Adenosine deaminase gene을 증폭하기 위하여 *Escherichia coli*와 mamailan cell에서 보존적인 부위를 선정하여 primer를 합성하였는데 primer의 서열은 Fig. 1과 같았다.

#### Primer I.

5'-CAT-CGC-CAC-CTT-GAT-GGC-3'

#### Primer II.

5'-TTC-GCC-TGC-ATG-GAC-GGT-3'

#### Primer III.

5'-GGG-ATC-GTC-AGT-GTT-AAT-GCT-3'

Fig. 1. Primer sequences for polymerase chain reaction (PCR).

#### PCR 증폭 DNA의 cloning

PCR product의 cloning은 pT7Blue T-Vector를 이용하였다. pT7Blue T-Vector에 PCR product를 cloning하였으며, 반응액을 잘 혼합한 다음 16°C에서 16시간 배양하였다. Ligation 반응이 끝난 ligation mixture은 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation하였으며 cloning 유무를 일차적으로 LB/Ampicillin plate에서 Blue/White selection 법으로 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### PCR reaction

*Nocardioides* sp. J-326TK의 adenosine deaminase gene을 PCR로 증폭하기 위하여 이미 알려진 Human, *E. coli*와 Mouse의 염기서열로부터 보존적인 부위를 이용하여 primer PI, PII, PIII를 design하였다. PCR reaction결과 예상한대로 PI과 PII의 반응에서 약 560bp의 product가 생성되었고, PI과 PIII의 반응에서는 약 800bp의 product가 증폭되었으며 2% agarose gel에서 전기영동한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이 PCR산물을 대량으로 분리하기 위하여 PCR 산물의 cloning에 적합하게 고안된 pT7Blue T-Vector에 blunt end ligation시켰으며 그 scheme은 Fig. 3에 나타내었다. Ligation 된 recombinant를 competent cell인 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 transformation시켜 ampicillin과 X-gal이 포함된 plate에 도말하였다. Colony중의 white colony를 선별하여 plasmid를 분리하고 0.7% agarose gel에서 vector와 size를 비교하여 cloning 된 plasmid를 선택하였다. 분리한 plasmid가 목적으로 하는 PCR product를 포함하고

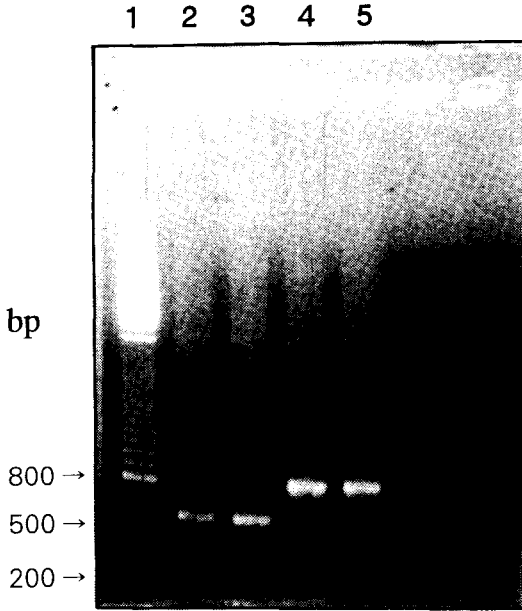


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products. Lane 1, 100-bp DNA molecular weight marker ; lane 2, padd1.7 PCR product used PI and PII ; lane 3, *Nocardioides* sp. 326-TK adenosine deaminase gene PCR product used PI and PII ; lane 4, padd PCR product used PI and PIII ; lane 5, *Nocardioides* sp. J-326TK adenosine deaminase gene PCR product used PI and PIII. A major PCR product of about 540bps as PI and PII, 800bp as PI and PIII.

있는지 확인하기 위하여 PCR로 증폭을 시켜 adenosine deaminase gene을 함유하고 있는 padd1.7의 PCR product와 비교한 결과, Fig. 4에서와 같이 padd1.7의 PCR 산물과 *Nocardioides* sp. J-326TK genomic DNA의 PCR 산물이 cloning된 pT7Blue T-Vector의 PCR 산물이 primer를 달리 사용하였을 때도 물론 560bp와 약 800bp 정도의 크기를 나타내어 목적 DNA가 바르게 cloning되었음을 알 수 있었다.

PI과 PII의 산물로 형성된 recombinant를 pTBN20, PI과 PIII의 산물로 형성된 recombinant를 pTBN21로 각각 명명하였다. 또한 cloning된 recombinant를 제한효소인 *EcoR* I과 *Xba* I으로 double digestion에 의하여 생성된 산물을 전기영동을 행하여 확인한 결과, PCR product와 size가 동

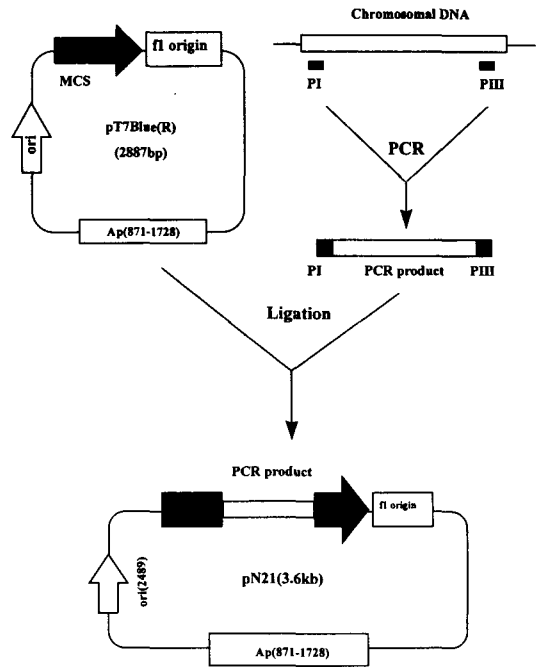


Fig. 3. Construction of recombinant plasmid containing PCR product.

일한 위치에서 확인되었으며 최종적으로 pTBN20과 pTBN21이 adenosine deaminase gene을 포함하는 clone인지를 확인하기 위해 padd1.7을 *Pst* I과 *Xba* I으로 절단하여 얻어진 insert (*E. coli*의 adenosine deaminase gene)를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 수행하였다. 그 결과 Fig. 5에서와 같이 pTBN20과 pTBN21 모두 강한 signal을 나타내어 *Nocardioides* sp. J-326TK 유래의 adenosine deaminase gene이 cloning된 것을 확인할 수 있었다.

#### *Nocardioides* sp. J-326TK adenosine deaminase gene의 cloning

분리한 *Nocardioides* sp. J-326TK의 genomic DNA로부터 adenosine deaminase의 전체의 gene을 확인하기 위하여 genomic DNA를 *Sau3A* I으로 partial digestion하여 전기영동하였다. 전기영동한 결과의 3~5kb의 DNA를 pBluescript KS(+)를 *BamH* I으로 절단한 vector와 cohesive end ligation에 의하여 cloning시켰다. Cloning된 recombinant를 adenosine deaminase gene deletion mutant인 *E.*

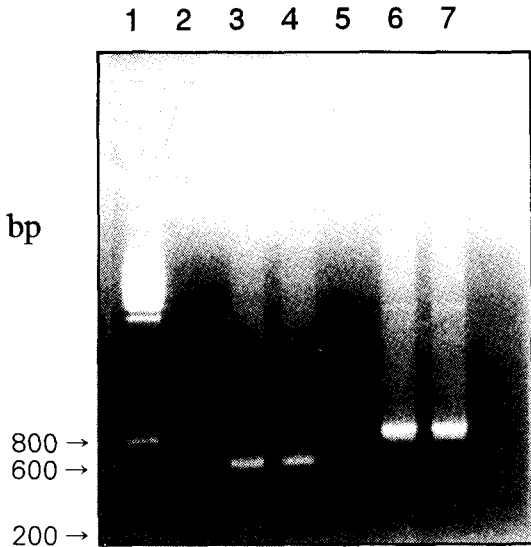


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis pattern of the pTBN20 and pTBN21 PCR product by PI, PII and PI, PIII.

Lane 1, 100-bp DNA molecular weight marker ; lane 2, PCR product of pT7 Blue T-Vector by PI and PII ; lane 3, PCR product of padd1.7 plasmid by PI and PII ; lane 4, PCR product of pTBN20 plasmid by PI and PII ; lane 5, PCR product of pT7 Blue T-Vector by PI and PIII ; lane 6, PCR product of padd1.7 plasmid by PI and PIII ; lane 7, PCR product of pTBN21 plasmid by PI and PIII.

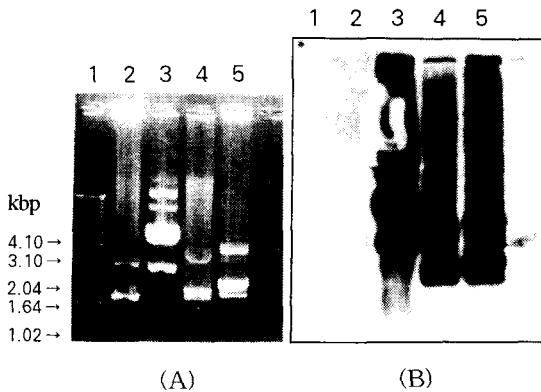


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis pattern (A) of the pTBN20, pTBN21 and corresponding southern blot analysis (B).

lane 1, 1kb ladder      lane 2, pTblue T-Vector  
lane 3, padd1.7        lane 4, pTBN20  
lane 5, pTBN21

*coli* Sφ3834의 competent cell에 transformation 시켰다. Recombinant plasmid를 분리하기 위하여 ampicillin과 X-gal이 포함된 plate에서 white colony를 선별하였다. White colony를 ampicillin이 포함된 plate에 toothpicking 하여 배양하여 형성된 colony로서 colony hybridization을 행하였다.

Colony hybridization에서 signal이 나타난 colony는 LB broth에 접종하여 alkaline lysis의 방법에 의하여 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid는 Dot blotting apparatus를 이용하여 nitrocellulose filter에 DNA를 흡착시켜 filter를 Enhanced Chemiluminescence(ECL) kit를 이용하여 hybridization을 행하였으며 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다. Dot blotting에서 강한 signal을 나타낸 하나의 plasmid는 PCR reaction에 의하여 확인하고 pSKN60이라 명

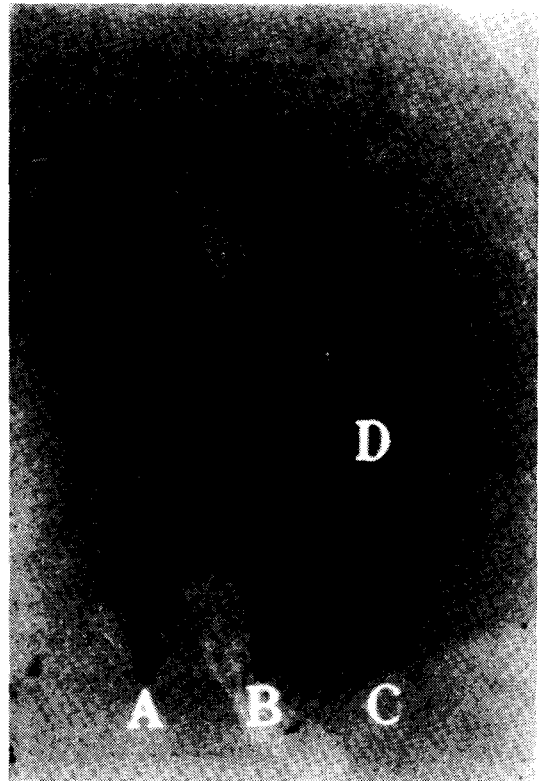


Fig. 6. Dot blotting of recombinant plasmid.

A ; padd1.7              B ; padd insert  
C ; pBluescript KS(+)    D ; pSKN60

명하였다. Recombinant plasmid pSKN60은 약 5kb가량의 DNA가 cloning되었고 이를 제한효소로 절단하여 Southern hybridization을 행하였는데 그 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서의 같이 padd1.7 insert를 probe로 사용하여 blotting 한 결과, pSKN60을 *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst* I, *Xba* I으로 각각 digestion한 경우 약한 signal을 보였지만 *E. coli* adenosine deaminase gene과 어느 정도의 homology를 가지는 것으로 나타났으며, 이로써 pSKN60에 *Nocardioiodes* sp. J-326TK의 adenosine deaminase gene이 cloning되어 있음을 확인할 수 있었다.

DNA Sequencing

PCR reaction에 의하여 분리된 pTBN21의 서열을 확인하기 위하여 DNA sequencing을 Sanger의 dideoynucleotide terminator method를 이용하여 행하였다. 즉 PCR reaction에 사용한 forward 및 reverse primer와 universal primer, M13 reverse primer를 이용하여 sequencing을 행하였다. Fig. 8에서의 같이 pTBN21에 cloning된 *Nocardioiodes* sp. J-326TK adenosine deaminase gene 중 804

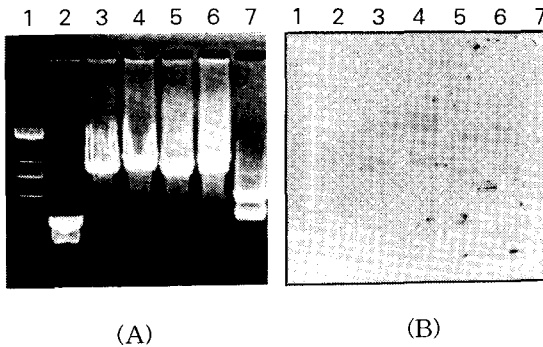


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis pattern of recombinant plasmid pSKN60 digested with restriction enzyme(A) and corresponding southern blot analysis(B).

- Lane 1, λ/Hind III DNA molecular weight marker
- Lane 2, pBluescript KS
- Lane 3, pKSN60 was digested with BamH I
- Lane 4, pKSN60 was digested with EcoR I
- Lane 5, pKSN60 was digested with Pst I
- Lane 6, pKSN60 was digested with Xba I
- Lane 7, pKSN60 was digested with EcoRI, PstI and Xba I

```

1-  ATCCGCAACCTTGACCAACATTGTCCTCCAGACCATTCTTGAACIT
    H R H L D G N I R P Q T I L E L
49-  GGCCGCCAGTATAATACCTCGCTTCTGCACAATCCCTGGAAACACTG
    G R Q Y N T S L P A Q S L E T L
97-  ATTCCCCACGTTCCAGGTTCATTGCCAACGAACCCGATCTGGTGAGCTTT
    I P H V Q V I A N E P D L V S F
145- CTGACCAAACCTGACTGGGGCGTTAAAGTTTCGCTCTCTTGTATGCC
    L T K P D W G V K V L A S L D A
193- TGTCCCGCGTGGCATTGAAAACATTGAAGATGCAGCCCGTCACGGG
    C R R V A F E N I E D A A R H G
241- CTGCACTATGTCGAGTTCGCTTTTACCAGGCTACATGGCAATGGCA
    L H Y V E L R F S P G Y M A M A
289- CATCAGTGCCTGTAGCCGGTGTTCGGAAGCGGTGATGATGGCGTA
    H Q L P V A G V V E A V I D G V
337- CGTGAAGTTGGCGCACCTTGGGTGTCGAGGCGAAGCTTATCGGCATT
    R E G C R T F G V Q A K L I G I
385- ATGAGCCGGACCTTCGAAGCCCGCTCGACGAAGAGCTGGAGCCCTT
    M S R T F E A A C Q Q E L E A F
433- TTAGCCACCCTGACCAGATTACCGCACTTGATTAGCCGGTGATGAA
    L A H R D Q I T A L D L A G D E
481- CTGTGTTCCCGGGAAGTCTGTTCCTTCTCACTCAACCCGCGCGGT
    L G F P G S L F L S H F N R A R
529- GATGGCGGCTGGCATATTACCTCCATGCAGCGGAAGCTGCCGGGGCG
    D A G W H I T V H A G E A A G P
577- GAAAGCATCTGGCAGGCGATTGTGTAACCTGGTGGGAGCGTATTGGA
    E S I W Q A I A E L G A E R I G
625- CATGGCTGAAAAGCCATTGAAGATCGGGCGCTGATGATTTCGCCC
    H G V K A I E D R A L M D F L A
673- GAGCGACAAATTTGATTTGAATCTGTCGACCTCCAATATTGAGACC
    E R Q I G I E S C L T S N I Q T
721- AGCACCGTAGCAGAGCTGGCTGCACATCCCGTGAACCGTTCCCTGAG
    S T V A E L A A H P L K T F L E
769- CATGGCATTCTGCCGCACTTACAGACGACGACCA-804
    H G I R A S I N T D D P
    
```

Fig. 8. Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of the *Nocardioiodes* sp. J-326TK adenosine deaminase gene. Marked nucleotides indicate primer PI and PIII used in PCR.

bp의 염기서열을 결정할 수 있었으며, PCGENE DNA analysis program (Ver. 7.0)으로 amino acid의 서열을 분석하였다.

이미 밝혀져 있는 human과 *E. coli*의 amino acid sequence와 비교 분석하여 진화학적으로 보존된 adenosine deaminase의 활성부위의 연관관계를 확인하였다(Fig. 9). *Nocardioiodes* sp. J-326TK와 *E. coli*와의 adenosine deaminase의 염기서열 비교에서 99.5%의 상동성을, amino acid에서 98.9%의 상동성을 나타내었고 human gene과는 각각 59.5%와 46.8%의 상동성을 나타내었다.

Adenosine deaminase의 active site로 예상되어지는 4개의 보존부위의 amino acid의 배열은 *Nocardioiodes* sp. J-326TK에서도 아무런 변이없이 잘 보존되어 있었으나 *E. coli* adenosine deaminase gene의 211번째와 237번째의

*Nocardiooides* sp. J-326TK의 Adenosine Deaminase Gene에 관한 연구

Human **HLIDC**SUKPETILYYGRRRGIALPANTAEGLL NVIGMDKPLTLTP  
*E. coli* **LIITG**NIRPQTILELGRQYNISLPAQSLETILPHVQVIANEPDLV  
*Nocar.* **LIITG**NIRPQTILELGRQYNISLPAQSLETILPHVQVIANEPDLV

DFLAKFDYYMPAIAAGCREAIKRIAYEFVEMKAKEGVVYVEVRY  
 SFLTCLDWGVKVLVA SLDACRRVAFENIEDAARHGLHYVELRFS  
 SFLTCLDWGVKVLVA SLDACRRVAFENIEDAARHGLHYVELRFS

PHLLANSKVEPIPNQAEGDLTPDEVVALVGGQLQGERDFGVK  
 PGYMAMAHQLP VA G VVEAVIDGVREGCRTEFGVQ  
 PGYMAMAHQLP VA G VVEAVIDGVREGCRTEFGVQ

ARSI LCCMRHQPNWSPKVVELCKKYQQQTVA**DIACDI**TIPG  
 AKLIGMSRTFEAACQQLAEFLAHRDQIT AL**DIACDI**LGF  
 AKLIGMSRTFEAACQQLAEFLAHRDQIT AL**DIACDI**LGF

SSLLPGHVQAYQEAVKSGIHR**LVVACG**IVGSAEVVKEAVDILKTE  
 GSLFLSH FN RARDAGWH**LVVACG**AAGPESIWQAIRELGA  
 GSLFLSH FN RARDAGWH**LVVACG**AAGPESIWQAIRELGA

RLGHGYHTLEDQALYNRLRQENMHFE**CPWSSY**LTGAWKPDTEH  
 RIGHGVKAIEDRALMDFLAEQQIGIES**SLTNS**IQTSTVAELAAH  
 RIGHGVKAIEDRALMDFLAEQQIGIES**SLTNS**IQTSTVAELAAH

AVIRLKNDAQYNSI**SLDDI**  
 PLKTFLEHGIRASI**SLDDI**  
 PLKTFLEHGIRASI**SLDDI**

Fig. 9. Amino acid sequence comparisons of Human, *E. coli* and *Nocardiooides* sp. 326-TK adenosine deaminase.

amino acid가 arginine과 glycine이었으며, human adenosine deaminase gene에서는 aspartate와 glutamic acid인 반면 *Nocardiooides* sp. J-326TK에서는 모두 alanine으로 대체되어 있었다. 이러한 결과로부터 adenosine deaminase의 active site로 예상되어지는 4개의 보존부위는 종에 관계없이 진화학적으로 매우 잘 보존되어지고 있음을 알 수 있었다.

요 약

*Nocardiooides* sp. J-326TK의 adenosine deaminase gene을 분리하기 위하여 genomic DNA를 제한효소로 무작위적으로 절단하여 pBluscript KS에 ligation시켰다. 또한 human과 mouse, *E. coli* 등의 adenosine deaminase gene의 보존적인 부위를 primer로 합성을 하여 PCR reaction을 행하였다. Genomic DNA를 cloning시킨 pKSN60은 5kb 정도의 DNA를 포함하고 있으며 southern hybridization 등의 여러 확인 실험을 통하여 adenosine deaminase gene을

포함하고 있다는 알았다. PCR product를 cloning시켜 형성된 recombinant plasmid를 PCR reaction의 primer로서 pTBN20를 sequencing을 행하였다. 그 결과를 다른 adenosine deaminase gene의 서열과 비교를 하였는데 미생물인 *E. coli*와는 nucleotide sequence는 99.5%, amino acid sequence는 98.9%의 homology를 나타내고 human과는 각각 59.5%, 46.8%의 homology를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 기초과학 연구소 학술연구조성비(과제번호 : BSRI-97-4410)에 의한 연구결과의 일부로서 지원하여 주심에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Wolfenden, R., Tomozawa, Y., and Bamman, B. : Takadiastase adenosine deaminase, calf duodenal adenosine deaminase, and rabbit muscle adenosine monophosphate deaminase. A comparison of physical properties and amino acid composition. *Biochemistry*. 7, 3965(1968).
2. Philips, A. V., Robbins, D. J., and Coleman, M. S. : Immunoaffinity purification and fluorescence studies of human adenosine deaminase. *Biochemistry*. 26, 2983(1987).
3. Ackerman, S. L., Minden, A. G., Williams, G. T., Bobonis, C., and Yeung, C. Y. : Functional significance of an overlapping consensus binding motif for Sp1 and Zif268 in the murine adenosine deaminase gene promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 7523(1991).
4. Yeung, C. Y., Ingolia, D. E., Bobonis, C., Dunbar, B. S., Riser, M. E., Siciliano, M. J., and Kellems, R. E. : Selective overreproduction of adenosine deaminase in cultured mouse cells. *The journal of biological chemistry*. 258, 8338(1982).
5. Kaufman, R. J., Murtha, P., Ingola, D. E., Yeung, C. Y., and Kellems, R. E. : Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 3136(1986).
6. Yeung, C. Y., Frayne, E. C., Al-Ubaidi, M. R., Hook, A. G., Ingolia, D. E., Wright, D. A., and Kellems, R. E. : Amplification and molecular cloning of murine adenosine deaminase gene sequences. *The journal of*

- biological chemistry*. 258, 15179(1983).
7. Chinsky, J. M., Maa, M. C., Ramamurthy, V., and Kellems, R. E. : Adenosine deaminase gene expression. *The journal of biological chemistry*. 264, 14561 (1989).
  8. Akesson, A. L., Wiginton, D. A., Dusing, M. R., States, J. C., and Hutton, J. J. : Mutant human adenosine deaminase alleles and their expression by transfection into fibroblast. *The journal of biological chemistry*. 263, 16291(1988).
  9. Orkin, S. H., Daddona, P. E., Shewach, D. S., Markham, A. F., and Kelley, W. N. : Molecular cloning of human adenosine deaminase gene sequences. *The journal of biological chemistry*. 258, 12753(1983).
  10. Bhaumik, D., Medin, J., Gathy, K., and Coleman, M. S. : Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase. *Journal of biological chemistry*. 268, 5464(1993).
  11. Chang, Z., Per Nygaard, Craig Chinault, A., and Kellems, R. E. : Deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues : Implication for catalytic function. *Biochemistry*. 30, 2273(1991).
  12. Sakai, T., and Jun, H. K. : Purification and crystallization of adenosine deaminase in *Pseudomonas iodinum* IFO 3558. *Feps letters*. 86, 174(1978).
  13. Gabellieri, E., Bernini, S., Piras, L., Cioni, P., Balestrieri, E., Cercignani, G., and Felicioli, R. : Purification, stability and kinetic properties of highly purified adenosine deaminase from *Bacillus cereus* NCIB 81 22. *Biochimica et Biophysica Acta*. 884, 490(1986).
  14. Kameoka, J., Tanaka, T., Nojima, Y., Schlossman, S. F., Morimoto, C. : Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*. 261, 466(1993).
  15. Hirschhorn, R., Nicknan, M. N., Eng, F., Yang, D. R., and Borkowsky, W. : Novel deletion and a new missense mutation (Glu 217 Lys) at the catalytic site in two adenosine deaminase alleles of a patient with neonatal onset adenosine deaminase-severe combined immunodeficiency. *The journal of Immunology*. 149, 3107(1992).
  16. Yeung, C. Y., Iglia, D. E., Roth, D. B., Shoemaker, C., Al-Ubaidi, M. R., Yen, J. Y., Ching, C., Bobonis, C., Kaufman, R. J., and Kellems, R. E. : Identification of functional murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *Escherichia coli*. *The journal of biological chemistry*. 260, 10299(1985).
  17. Wilson, D. K., and Quiocho, F. A. : A pre-transition-state mimic of an enzyme : X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-Deazaadenosine and Zinc-activated water. *Biochemistry*. 32, 1689 (1993).
  18. Adrian, G. S., Wimginton, D. A., and Hutton, J. J. : Structure of adenosine deaminase mRNAs from normal and adenosine deaminase-deficient human cell line. *Molecular and cellular biology*. 4, 1712(1984).
  19. Hirschhorn, R., Tzall, S., and Ellenbogen, A. : Hot spot mutation in adenosine deaminase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 6171(1990).
  20. Jones, W., Kurz, L. C., and Wolfenden, R. : Transition-state stabilization by adenosine deaminase : 1, 6-Addition of water to purine ribonucleoside, the enzyme's affinity for 6-hydroxy-1,6-dihydropurine ribonucleoside, and the effective concentration of substrate water at the active site. *Biochemistry*. 28, 1242(1989).
  21. Wilson, D. K., Rudolph, F. B., and Quiocho, F. A. : Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog : Understanding catalysis and immunodeficiency mutation. *Science*. 252, 1278(1991).
  22. Van Beusechem, V. W., Kukler, A., Heidt, P. J., and Valerio, D. : Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkeys transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 7640(1992).
  23. Medin, J. A., Hunt, L., Gathy, K., Evans, R. K., and Coleman, M. S. : Efficient, low-cost protein factories : Expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87, 2760(1990).
  24. Morgan, R. A., Couture, L., Elroy-Stein, O., Ragheb, J., Moss, B., and Anderson, W. F. : Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry site : development of a polycistronic gene transfer system and application to human gene therapy. *Nucleic acid research*. 20, 1293(1992).
  25. Asubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. : Current Protocols in molecular Biology. Wiley-Interscience press. 1987.
  26. Ish-Horowitz, D., and Burke, J. F. : Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic acid research*. 9, 2989(1981).
  27. Birnboim H. C., and Doly, I. : 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acid research*. 7, 1513(1979).