

## Gene Family Shuffling을 이용한 Cytidine Deaminase 활성 증가

홍 식 · 김경동 · 송방호<sup>1</sup> · 정경화<sup>2</sup> · 김사열\*

경북대학교 미생물학과, <sup>1</sup>생물교육과, <sup>2</sup>아미코젠(주) 제노믹스 연구실

**Enhanced Activity of Cytidine Deaminase by Gene Family Shuffling.** Hong, Shik, Kyoung-Dong Kim, Bang-Ho Song<sup>1</sup>, Kyung Hwa Jung<sup>2</sup>, and Sa-Youl Ghim\*. Department of Microbiology and <sup>1</sup>Department of Biology Education, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, and <sup>2</sup>Genomics Laboratory, Amicogen Inc., Jinju 660-852, Korea. – A family shuffling associating PCR-based and *in vitro* recombination and expression in *Escherichia coli* *cdd* mutant was carried out. Two *cdd* genes encoding cytidine deaminases (CDase) from thermophilic *Bacillus caldolyticus* and *B. stearothermophilus* were shuffled. Around 150 viable mutant colonies screened on AB minimal medium without uracil by *E. coli* *cdd* complementation were selected for cytidine deaminase assay and 4 candidates (SH1067, SH1077, SH1086, and SH1118) were chosen for the detailed study. The nucleotide sequence analyses of 4 selected mutants revealed that they have several point mutations and recombinations. Surprisingly, the SH1067 showed 770 fold more specific CDase activity at 80°C than that of T101 from parental *B. stearothermophilus*.

**Key words:** *Bacillus caldolyticus*, *B. stearothermophilus*, cytidine deaminase, family shuffling.

Cytidine deaminase(CDase, cytidine/2'-deoxycytidine amino-hydrolyase; EC 3.5.4.5)는 *cdd* 유전자의 산물로 cytosine nucleoside, cytidine/2'-deoxycytidine을 uridine nucleoside, uridine/2'-deoxyuridine으로 각각 만드는 탈아미노화 촉진 효소이다. 1989년 *Bacillus subtilis*에서 *cdd* 유전자의 지도작성과 염기배열이 최초로 결정된 이래[17], 대장균에서 homodimer를 생성하는 시티딘 디아미나제의 3차원 구조[3, 21]와 *B. subtilis*에서 homotetramer를 형성하는 시티딘 디아미나제 입체구조가 차례로 보고되었다[9].

AIDS 치료제로써 저독성 제제로 각광을 받는 라미부딘(Lamivudine, (-)-β-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine: 3TC)이 본 효소에 의하여 생산 가능함이 알려졌다. 이 효소의 생산 자원을 극한 내열성균의 유전자를 이용하였을 때 그 생산비가 절감된다는 사실이 보고되면서[19], CDase의 산업화에 대한 가능성이 알려지게 되었다. 이러한 필요성으로 인해 고온성 세균인 *B. caldolyticus*, *B. stearothermophilus* 유래의 CDase를 확보하고 이용하려는 시도가 있었다[6, 19, 20].

현재까지 알려진 방법 중에서 가장 효율적으로 유전자의 mutation library를 구축할 수 있는 것으로 family shuffling이 잘 알려져 있다[8]. 그것은 *in vitro*에서 recombination을 통하여 분자 진화적 과정을 촉진하는 과정으로 특정 효소의 orthologous parent gene 중에서 상동성이 높은 두 가지 이상의 유전자를 모유전자로 하여 이들의 활성을 조합하여 새

로운 mutation library를 구축하는 것이다[8, 17]. 예를 들자면, TEM-1 β-lactamase의 활성을 3차례의 shuffling을 통하여 32,000배의 resistance 향상이 된 새로운 β-lactamase(ST-2)를 얻을 수 있었으며[18], 유기 용매에 대한 pNB esterase의 안정성을 증가시키기 위해 방향적 진화를 시도하여 50~60 배 정도 안정성이 증대된 효소를 얻을 수 있었다[15]. 또한 뉴클레오티드 수준에서 58~82%의 상동성을 가지는 4개의 orthologous parent gene을 이용하여 family shuffling을 실시한 결과 cephalosporinases의 활성이 270~540배나 증가하였으며 부수적으로 새로운 기질에 대한 활성 향상을 얻을 수 있었다[8]. 낮은 활성을 갖는 single gene을 이용하여 shuffling 하였을 시에도 다양성의 증가로 인하여 thymidine kinase의 활성이 증가한 보고도 있었다[10]. 이와 같이 family shuffling은 새로운 기능적 성질을 가진 효소를 얻을 수 있을 뿐 아니라 두 가지 이상의 유익한 성질을 한 효소 안에 조합시킬 수 있음을 근거로 하여[1, 12, 13, 16], 본 연구에서는 *B. caldolyticus*, *B. stearothermophilus* 유래의 CDase를 이용하여 family shuffling을 통하여 고온성 능력과 효소 활성을 동시에 높이도록 시도하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주 및 배양

시티딘 디아미나제 결핍 균주인 *Escherichia coli* JF611 (*cdd1*, *pyrE60*, *thi1*, *argE3*, *his3*, *proA2*, *thr1*, *leu6*, *mdl1*, *xyl5*, *ana14*, *galK2*, *lacY*, *str31*, *λ-supE44*)을 cloning host로 하였다. 고온성 균주인 *B. caldolyticus* DSM 405와 *B.*

\*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

*Stearothermophilus* IFO 12550 유래의 *cdd*를 모유전자로 하였다. 대장균 배양은 LB 배지[2] 또는 0.2% glucose, 0.2% vitamin-free casamino acid, thiamine(1 µg/ml), cytidine(40 µg/ml)와 ampicillin(100 µg/ml)을 첨가한 AB 배지[7]에서 37°C 조건 하에 실시하였다.

#### PCR을 이용한 유전자 확보 및 클로닝

*B. caldolyticus* DSM 405와 *B. stearothermophilus* IFO 2550 유래의 *cdd* 유전자를 각각 cloning하여 구축한 *E. coli* JF611/pCJH53[20]과 *E. coli* JF611/pJSC101[6]을 제공받아 실험에 사용하였다. 이 두 균주로부터 AccuPrep Plasmid Extraction Kit(Bioneer, Korea)로써 분리한 plasmid를 주형으로 P1 primer, P2 primer를 사용하여 PCR을 실행하여 약 800 bp 크기의 *cdd* 유전자를 포함하는 DNA 단편을 얻었다. 이를 pGEM-T Easy Vector systems(Promega, USA)으로써 cloning하여 T53, T101이라 각각 명명하였다.

P1 primer (5'-ACAGGATCCAATCTAAATTTTCTGTTACATTTTG-3': *Bam*HI)와 P2 primer(5'-ACACTGCAGGATTTCCTACGTTCCGGTCTT-3': *Pst*I)를 사용했으며, PCR 조건은 denaturation(95°C, 1분), annealing(63°C, 1분), elongation(72°C, 1분) 단계를 35회 반복한 후 incubation(72°C, 10분) 하였다.

#### Two-parent *cdd* 확보

유전자 확보를 위하여 T53, T101을 주형으로 하여 M13-F primer(5'-CAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3'), M13-R primer(5'-CACAGGAAACAGCTATGACCATG-3')를 사용하였다.

Denaturation(95°C, 1분), annealing(60°C, 1분), elongation(72°C, 1분) 단계를 35회 반복한 후 incubation(72°C, 10분) 하는 PCR 실행으로 약 800 bp 크기의 증폭된 DNA 단편을 확보하였다.

#### DNaseI 처리 및 회수

확보된 약 800 bp의 DNA 단편을  $Mn^{2+}$  존재 하에서 0.06 U의 DNase I(Roche, USA)으로써 15°C에서 10분간 처리하여 무작위로 잘랐다[14]. 이를 0.5 M EDTA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, Gel Extraction Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 다양한 크기로 분해된 DNA fragment 중 50~200 bp 크기의 단편만을 회수하였다.

#### PCR을 통한 family shuffling

Family shuffling은 재조합과 증폭을 위하여 2단계의 PCR 과정을 거친다. 첫 번째 PCR 과정인 재조합은 primer 없이 DNaseI에 의해 50~200 bp 크기로 분해된 DNA 단편을 1:1로 섞은 후 그것을 주형으로 하여 denaturation(95°C, 30초), annealing(46°C, 30초), elongation(72°C, 45초) 단계를 60회 반복한 후 incubation(72°C, 10분)을 수행하였다. 두 번째

PCR 과정인 증폭은 재조합에서 얻어진 PCR 산물을 주형으로 P1, P2를 primer로 사용하여 수행하였으며, 이를 다시 pGEM-T Easy Vector Systems을 이용하여 라이브러리를 제작하였다.

#### 효소 활성 측정 및 단백질 정량

Cytidine deaminase assay는 기질인 cytidine을 spectrophotometric system으로 290 nm에서 측정하는 Hammer-Jespersen 등의 방법[11]을 이용하였다.

Tris-Mg(pH 7.5인 100 mM Tris-Cl 완충액 2.35 ml와 0.2 M  $MgCl_2$  50 µl) 250 µl, 0.05 M cytidine 10 µl, diluted enzyme (total cell extract) 100 µl의 반응 혼합액을 선택한 여러 가지 온도에서 3분, 6분, 9분의 간격으로 반응시켰다. 100 µl의 반응 산물을 0.5 N perchloric acid 900 µl에 섞어 반응을 정지시키고, 이것을 원심 분리하여 290 nm에서 흡광도의 감소량을 측정하였다. 단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준 단백질로 하였다.

## 결과 및 고찰

#### 모 유전자 확보 및 분석

본 연구에서 family shuffling시 모유전자로 사용한 *cdd*를 포함하는 DNA 단편은 고온성 균주인 *B. caldolyticus*와 *B. stearothermophilus* 유래이다. Table 1에서와 같이 *E. coli* JF611/pCJH53, *E. coli* JF611/pJSC101에서 각각 플라스미드를 추출하여 주형으로 삼고 P1, P2 primer를 사용하여 PCR을 수행한 후 cloning하여 *B. caldolyticus*와 *B. stearothermophilus* 유래의 *cdd* 유전자를 포함하는 플라스미드인 T53 혹은 T101을 각각 구축하였다. 이를 nested PCR과 효소 활성 측정시 이용하기 위하여 *E. coli* JF611/T53과 *E. coli* JF611/T101을 확보하였으며 비교적 효소 활성이 낮은 후자를 대조구로 사용하였다. 이들 T53과 T101이 각각 가지는 모유전자의 경우 뉴클레오티드 수준에서 86%의 상동성을 나타내어 DNA shuffling이 가능함을 확인하였다(Table 2).

#### Family shuffling 및 확인

Fig. 1에서와 같이 pGEM-T Easy Vector에 cloning한 후 얻게된 T53, T101을 주형으로 하고 M13-F, M13-R을 primer로써 PCR을 실행하여 약 800 bp 크기의 PCR 산물을 각각 확보하였다. 이 2가지 산물을 모유전자로 하여 1:1의 비율로 섞은 후  $Mn^{2+}$  촉매 하에 DNaseI을 처리하여 blunt end의 random fragment를 얻었다. 이를 재조합 과정에서 800 bp 근처의 다양한 크기의 PCR product로 생성시켰다[14]. 이렇게 얻어진 다양한 크기의 PCR 산물 중에서 P1, P2 primer를 이용한 증폭 과정을 실시하여 원하는 크기의 최

**Table 1. Cytidine deaminase activity from various bacteria.**

Strain/plasmid <sup>1</sup>	Relevant genotype	Specific activity (nm/min/mg protein)	Source
<i>E. coli</i> JF611	<i>cdd1, pyrE60, thi1, argE3, his3, proA2, thr1, leu6, mdl1, xyl5, ana14, galK2, lacY, str31, λ-supE44</i>		J. Feiesen
<i>E. coli</i> JF611/pCJH53	<i>cdd/pcdd<sub>Bc</sub><sup>+2,3</sup></i>	6713 (at 65°C)	B.-H. Song
<i>E. coli</i> JF611/pJSC101	<i>cdd/pcdd<sub>Bs</sub><sup>+2,3</sup></i>	1188 (at 60°C)	B.-H. Song
<i>E. coli</i> JF611/T53	<i>cdd/pcdd<sub>Bc</sub><sup>+2,3</sup></i>	3421 (at 60°C)	This work
<i>E. coli</i> JF611/T101	<i>cdd/pcdd<sub>Bs</sub><sup>+2,3</sup></i>	435 (at 60°C)	This work
<i>B. caldolyticus</i> DSM 405	<i>cdd<sup>+</sup></i> (wild type)	129 (at 65°C)	DSM <sup>4</sup>
<i>B. stearothermophilus</i> IFO 1255	<i>cdd<sup>+</sup></i> (wild type)	56 (at 60°C)	KCTC <sup>5</sup> 1752

<sup>1</sup>Strain was grown in minimal medium containing 0.2% glucose, 0.2% casamino acid and 40 µg/ml deoxycytidine.

<sup>2</sup>Bc: *B. caldolyticus*; Bs: *B. stearothermophilus*.

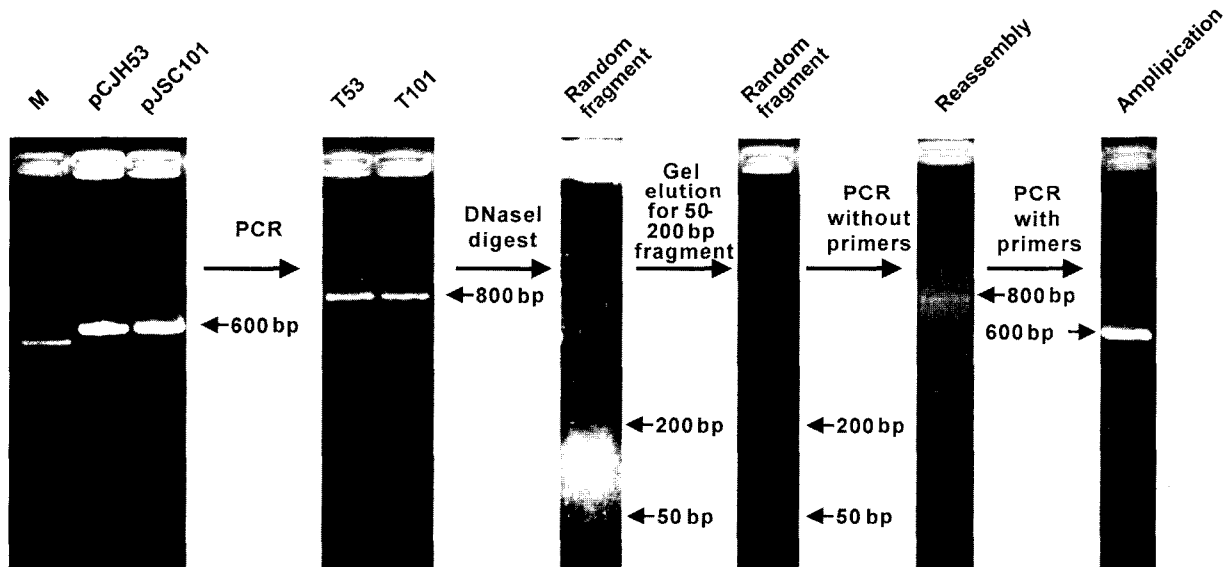
<sup>3</sup>*pcdd* indicates plasmid containing the *cdd* genes from *B. caldolyticus* or *B. stearothermophilus*.

<sup>4</sup>DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zell Kulturen, Braunschweig, Germany.

<sup>5</sup>KCTC: Korean Collection for Type Culture, KRIBB, Korea.

**Table 2. Homology comparison of two *Bacillus cdd* genes.**

Source (optimal growth temperature)	No. of amino acid	Nucleotide homology (%)	Amino acid homology (%)	Deduced MW (dalton)	G+C%	Reference
<i>B. stearothermophilus</i> (55°C)	132	100	100	14,346	54.4	[6]
<i>B. caldolyticus</i> (72°C)	132	86	87	14,235	56.1	[20]



**Fig. 1. Gene family shuffling of the cytidine deaminases encoded by the *B. caldolyticus* and *B. stearothermophilus cdd* genes.** A single round of family shuffling consists of amplifying pCJH53 and pJSC101 genes encoding cytidine deaminases (CDase) from thermophilic *Bacillus caldolyticus* and *B. stearothermophilus* by PCR, respectively, cutting the PCR products into random fragments with DNaseI, purifying small fragments, reassembling the fragments in a PCR without primers, amplifying the reassembled product by standard PCR. Other procedures were performed as described in Materials and Methods.

중 산물인 600 bp 크기의 shuffled *cdd* 유전자를 확보할 수 있었다.

**형질전환 균주의 선별**

시터딘 디아미나제 결핍 돌연변이주인 *E. coli* JF611은

uridine이 없는 AB 배지에서 CDase 활성을 가진 유전자가 삽입된 플라스미드 DNA가 형질전환 되어야만 생육할 수 있는데, 이를 통하여 CDase 활성이 없는 shuffled product를 원천적으로 배제할 수 있도록 하였다. 이러한 균주 선별 과정을 통하여 CDase 활성이 있다고 추정되는 150여 개의 형



**Fig. 2.** Multiple alignment of the nucleotide sequences of the *cdd* genes from *B. caldolyticus*, *B. stearothermophilus*, and shuffled products. The P1 and P2 primers, promoter region, and ribosome binding site (RBS) are underlined. Transcriptional start and stop sites are indicated with **START** and **STOP**. The DNA sequences derived from *B. caldolyticus*[20] and *B. stearothermophilus*[6] are shown in dark shading and no shading, respectively. The shades of gray represent point mutations.

질 전환된 콜로니를 확보하였으며, 65°C에서 각 시료 당 3회 이상 효소 활성을 측정하였다.

대체적으로 *E. coli* JF611/T101보다 *E. coli* JF611/T53의 CDase 활성이 8배 정도 높은 것으로 확인할 수 있었다. 또한 약 50%의 형질전환 콜로니가 *E. coli* JF611/T101에 비하여 최소한 8배의 CDase 활성 증가를 보였다. 65°C에서 *E. coli* JF611/T101에 비하여 80배 이상의 CDase 활성이 증가된 10개의 콜로니를 선택하여 연구에 사용하였다.

**Shuffled DNA 단편의 염기서열 분석**

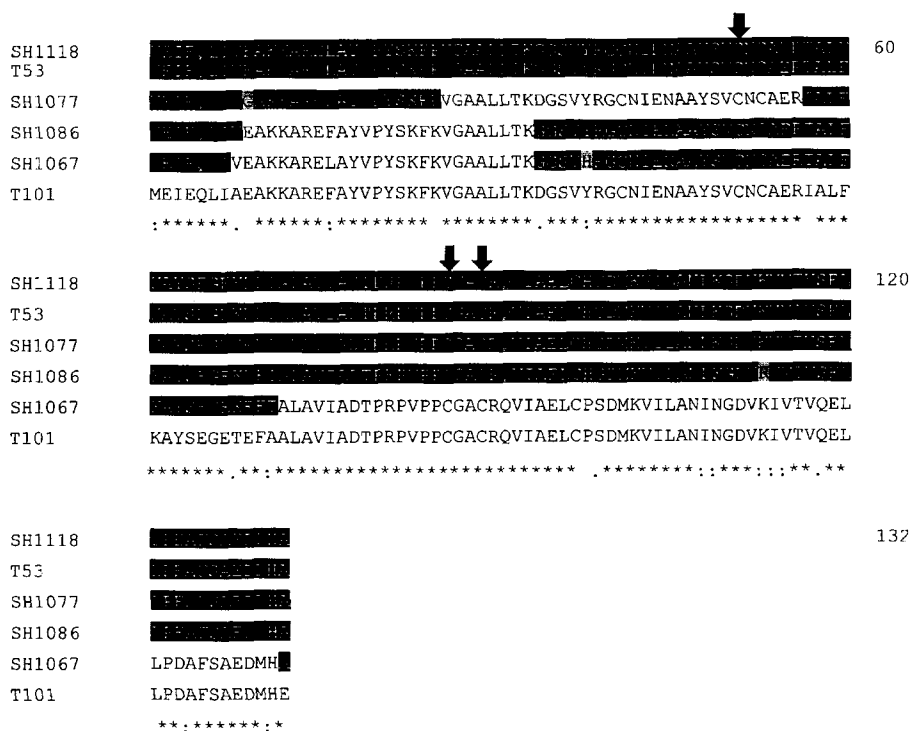
*B. stearothermophilus* 유래(*E. coli* JF611/T101)보다 80배 이상 CDase 활성이 증가된 것으로 분석된 10개의 돌연변이주 콜로니로부터 플라스미드를 각각 추출하여 shuffled *cdd* 부분을 양방향으로 염기서열을 결정하였다. 얻어진 염기서열 데이터로부터 뉴클레오티드 수준에서의 변화를 알아보기 위하여 multiple alignment를 실시하였다(Fig. 2). SH1067의 경우 2회의 point mutation과 1회의 recombination, SH1077의 경우 1회의 point mutation과 3회의 recombination, SH1086의 경우 3회의 point mutation과 2회의 recombination, SH1118의 경우 1회의 point mutation과 2회의 recombination 등이 발생하였음을 확인할 수 있었다(Table 4).

**Shuffled CDase의 분석**

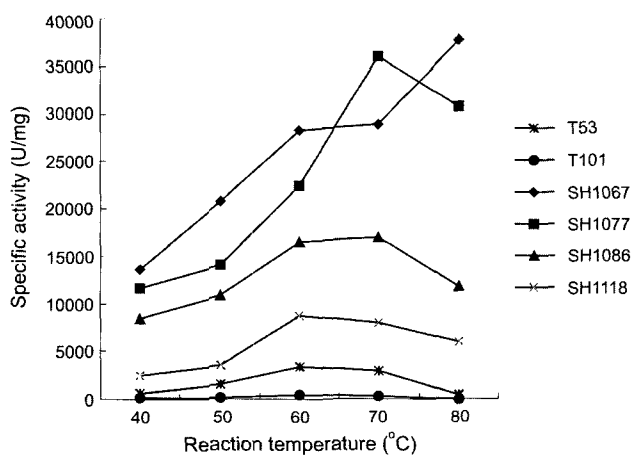
CDase 활성이 뛰어나거나 multiple alignment시 그 염기서열이 특징적인 것으로 나타난 SH1067, SH1077, SH1086, SH1118등을 40°C~80°C상에서 10°C 간격으로 온도를 선택하여 그 활성을 3회 이상 정밀하게 반복 측정하였다. Table 4에서 볼 수 있듯이, 모든 시료가 대조구인 *E. coli* JF611/T101의 CDase 활성과 비교하여 20~770배의 활성이 증가하였음을 보여주었다(Table 4).

SH1118의 경우 공여 시료중 하나인 T53과 아미노산 수준에서 100%의 상동성을 보여주었으나, 프로모터로 추정되는 -35, -10 region은 T101 유래였으며, 동시에 ribosome binding site 상류에서 2회의 point mutation이 유도된 것으로 확인되었다. 이를 통하여 SH1118의 경우는 활성의 증가가 효소구조 변화를 통한 것이 아니라 발현량이 약 2.5배 증가한 것으로 추정할 수 있다(Fig. 2).

SH1067, SH1077, SH1086의 경우 효소구조 변화와 발현량 증가가 동시에 일어난 것으로 보인다. 실제로 동일한 양의 단백질 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과 SH1118을 제외 한 나머지 3개의 발현량이 유사한 것으로 확인되었다(data not shown). 이들 중 T53과 아미노산 수준에서 비슷한 SH1077의 경우 2개의 아미노산 서열만이 달라졌으며(E9G,



**Fig. 3.** Multiple alignment of the deduced amino acid nucleotide sequences of the cytidine deaminases from *B. caldolyticus*, *B. stearothermophilus*, and shuffled products. Exposed regions indicate active domains and arrows denote the conserved cysteines involved in Zn<sup>+2</sup> binding. The DNA sequences derived from *B. caldolyticus* [20] and *B. stearothermophilus* [6] are shown in dark shading and no shading, respectively. The shades of gray represent point mutations.



**Fig 4.** Effects of temperature on cytidine deaminase activities for parental or shuffled *cdd* genes. Enzyme in Tris-buffer (50 mM, pH 7.5) incubated at various temperatures was assayed by the standard assay method[11].

G34D), SH1086의 경우 3개의 아미노산 서열만이 달라졌다 (L16F, P25K, K113R)(Table 3). 특별히 SH1067의 경우 shuffling에 의하여 recombination과 point mutation이 다수 일어남으로써 *B. caldolyticus*와 *B. stearothermophilus*에서 유래한 각각의 *cdd* 유전자의 서로 다른 장점과 beneficial mutation으로 인하여 CDase의 아미노산 배열의 변화 혹은

**Table 3.** Amino acid mutations identified in the 4 shuffled mutants in comparison with those of the parental sources.

Position <sup>1</sup>	Parent		Mutant <sup>2</sup>			
	T53	T101	SH1067	SH1077	SH1086	SH1118
8	V	A	V	V	V	V
9	E	E	E	E → G	E	E
16	L	F	L	L	F	L
25	P	K	K	P	K	P
34	G	D	G	D	G	G
38	Y	Y	Y → H	Y	Y	Y
57	T	I	T	T	T	T
68	K	T	K	K	K	K
71	T	A	T	T	T	T
98	H	P	P	H	H	H
99	G	S	S	G	G	G
108	L	I	L	L	L	L
109	K	N	N	K	K	K
113	K	K	K	K	K → R	K
114	V	I	I	V	V	V
115	M	V	V	M	M	M
118	S	Q	Q	S	S	S
123	E	D	D	E	E	E
130	L	M	M	L	L	L
132	A	E	A	A	A	A

<sup>1</sup>Amino acid position from the methionine encoded by the first translational codon ATG/GTG.

<sup>2</sup>The unique amino acid substitutions by point mutation are written in bold with arrows.

Table 4. Comparison of cytidine deaminase specific activities.

Strain	CDase specific activity (U/mg) <sup>1</sup>					Shuffled	
	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C	Recombination	Point mutation
JF611/T53	668	1488	3422	2891	428	—	—
JF611/T101	107	174	435	320	49	—	—
JF611/SH1067	13544	20700	28229	28926	37782	2	1
JF611/SH1077	11548	14115	22384	36071	30653	1	3
JF611/SH1086	8447	10800	16431	16966	11762	3	2
JF611/SH1118	2424	3529	8697	8002	5915	1	2

<sup>1</sup>One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme which deaminated 1 mmol of cytidine per minute at 65°C.

발현량의 증가로 인하여 그 활성이 증가하였음을 추정할 수 있다. 앞으로 이러한 shuffled product에 대한 3차원 입체구조 분석을 통하여 그 정확한 이유를 밝힐 수 있게 될 것이다. 이와 같이 본 연구에서는 family shuffling을 통하여 분자 진화적 과정을 단시간에 촉진하여 열 안정성과 효소 활성을 높인 시티딘 디아미나제를 얻었으며, 아미노산 서열의 비교분석을 통하여 기존에 알려진 CDase의 활성 domain[5, 9]과는 전혀 다른 곳에서 mutation이 발생하여 CDase의 활성 및 열 안정성이 높아졌음을 확인 할 수 있었다는데 본 연구의 상당한 의의가 있다고 하겠다. 그뿐 아니라, 이전에 고온에서의 활성이 높았던 것으로 보고된 *B. caldolyticus* 유래의 CDase에 비해서도 80°C에서 최고 88배의 활성이 증가된 효소를 얻을 수 있었다. 이를 사용하여 저독성 AIDS 치료제로써 각광을 받는 라미부딘을 생산할 시, 획기적인 생산비 절감 및 생산 시간 단축의 이중효과[4, 19]를 기대할 수 있을 것이다.

## 요 약

PCR 방법을 기본으로 한 *in vitro* recombination과 대장균 *cdd* 돌연변이주에서의 발현을 통하여 family shuffling이 수행되었다. 고온성 *Bacillus caldolyticus*와 *B. stearothermophilus* 유래의 시티딘 디아미나제를 코드하는 *cdd* 유전자를 shuffling하였다. 이것을 대장균 *cdd* 돌연변이주에 형질전환시킨 후 uracil이 없는 AB 배지에서의 생존을 통하여 150개의 돌연변이 균주를 얻을 수 있었으며, 그 중 연구를 위하여 4주(SH1067, SH1077, SH1086, 및 SH1118)를 선택하였다. 선택한 4주의 염기서열을 분석한 결과, 수 회의 point mutation과 recombination이 각각 일어났음을 확인 할 수 있었다. 특히 SH1067의 경우, 80°C에서 *B. stearothermophilus*에서 유래한 T101의 시티딘 디아미나제 활성과 비교하여 770배 이상의 증가를 보여주었다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년도 경북대학교의 연구비에 의하여 연구

되었음.

## REFERENCES

1. Back, K. and J. Chappell. 1996. Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6841-6845.
2. Bertani, G. 1951. Studies of lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
3. Betts, L., S. Xiang, S. A. Short, R. Wolfenden, and C. W. Carter. 1994. Cytidine deaminase, the 2.3 Å crystal structure of an enzyme transition state analog complex. *J. Mol. Biol.* **235**: 635-56.
4. Campbell, R. K., E. R. Bergert, Y. Wang, J. C. Morris, and W. R. Moyle. 1997. Chimeric proteins can exceed the sum of their parts: implications for evolution and protein design. *Nat. Biotechnol.* **15**: 439-443.
5. Carlow, D. C., C. W. Carter, N. Jr Mejlhed, J. Neuhard, and R. Wolfenden. 1999. Cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* compensating effects of changing zinc coordination and quaternary structure. *Biochemistry* **38**: 12258-12265.
6. Chang, J.-S., H.-K. Bac, S.-O. Kim, S.-M. Lee, and B.-H. Song. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus cdd* gene encoding thermostable cytidine/deoxycytidine deaminase (personal communication).
7. Lark, D. J. and O. Maaloe. 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **23**: 99-112.
8. Cramer, A., S. A. Raillard, E. Bermudez, and W. P. Stemmer. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291.
9. Eva, J., M. Nina, N. Jan, and L. Sine. 2002. Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution. *Biochemistry* **14**: 2563-2570.
10. Christians, F. C., L. Scapozza, A. Cramer, G. Folkers, and W. P. Stemmer. 1999. Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling. *Nat. Biotechnol.* **17**: 259-264.
11. Hammer-Jespersen, K., A. Munch-Petersen, P. Nygaard, and M. Schwarz. 1971. Induction of enzymes involved in the

- catabolism of deoxyribonucleosides in *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **19**: 533-538.
12. Harayama, S. 1998. Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol.* **16**: 76-82.
  13. Kimura, N., A. Nishi, M. Goto, and K. Furukawa. 1997. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *J. Bacteriol.* **179**: 3936-3943.
  14. Lorimer, I. A. J. and I. Pastan. 1995. Random recombination of antibody single chain Fv sequences after fragmentation with DNaseI in the presence of Mn<sup>2+</sup>. *Nucleic Acids Res.* **23**: 3067-3068.
  15. Moore, J. C. and F. H. Arnold. 1997. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous organic solvents. *Nat. Biotechnol.* **14**: 458-467.
  16. Ness, J. E., M. Welch, L. Giver, M. Bueno, J. R. Cherry, T. V. Borchert, W. P. Stemmer, and J. Minshull. 1999. DNA shuffling of subgenomic sequences of subtilisin. *Nat. Biotechnol.* **17**: 893-896.
  17. Song, B.-H. and J. Neuhard. 1989. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. *Mol. Gen. Genet.* **216**: 462-468.
  18. Stemmer, W. P. 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
  19. Woo, J.-H., H.-J. Shin, T.-H. Kim, S.-Y. Ghim, L.-S. Jeong, J.-G. Kim, and B.-H. Song. 2001. Lamivudine production via enantioselective deamination by thermostable *Bacillus caldolyticus* cytidine deaminase. *Biotechnol. Lett.* **23**: 131-135.
  20. Woo, J.-H., N.-J. Heo, S.-Y. Ghim, J.-G. Kim, and B.-H. Song. 2002. Purification and characterization of thermostable cytidine deaminase encoded by the *Bacillus caldolyticus* *cdd* gene. *Enzyme Microb. Technol.* **30**: 153-160.
  21. Yang, C., D. Carlow, R. Wolfenden, and S. A. Short. 1992. Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cytidine deaminase (*cdd*) gene. *Biochemistry* **31**: 4168-4174.

(Received Aug. 2, 2002/Accepted Sep. 10, 2002)