

세균 게놈 유래성 *PyrR* Orthologue의 기능 분석

조현수 · 설경조 · 박승환¹ · 김사열*

경북대학교 미생물학과, ¹한국생명공학연구원 미생물유전체연구실,
¹Both authors contributed equally to this work

Characterization and Functional Study of *PyrR* Orthologues from Genome Sequences of Bacteria. Cho, Hyun-Soo, Kyung-Jo Seoul, Seung-Hwan Park¹ and Sa-Youl Ghim*. Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ¹Laboratory of Microbial Genomics, KRIBB, Taejeon 305-600, Korea, Both authors contributed equally to this work – The regulation of pyrimidine nucleotide synthesis has been proved to be controlled by a regulatory protein *PyrR*-mediated attenuation in the Gram-positive bacteria. After several bacterial genome sequencing projects, we have discovered the *PyrR* orthologues in the databases for *Haemophilus influenzae* and *Synechocystis* sp. PCC6803 genome sequences. To investigate whether these *PyrR* orthologue proteins regulate pyrimidine nucleotide synthesis as well as the cases of *Bacillus*, the *PyrR* regions of each strains were amplified by PCR and cloned with pUC19 or T-vector in *Escherichia coli* and with a shuttle vector pHPS9 for *E. coli* and *B. subtilis*. For the regulation test of the *PyrR* orthologues, the aspartate-transcarbamylase (ATCase) assay was carried out. From the results of the ATCase assay, it was confirmed that *Synechocystis* sp. PCC6803 could not restore by pyrimidines to a *B. subtilis*, *PyrR* but *H. influenzae* *PyrR* could. For purification of *PyrR* orthologue proteins, *PyrR* orthologue genes were cloned into the expression vector (pET14b). Over-expressed product of *PyrR* orthologue genes was purified and analyzed by the SDS-PAGE. The purified *PyrR* orthologue proteins from *H. influenzae* and *Synechocystis* sp. PCC6803 turned out to be molecular mass of 18 kDa and 21 kDa, respectively. The result of uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase) assay with purified *PyrR* orthologue proteins showed that *H. influenzae* *PyrR* protein only has UPRTase activity. In addition, we could predict several regulatory mechanisms that *PyrR* orthologue proteins regulate pyrimidine de novo synthesis in bacteria, through phylogenetic analysis for *PyrR* orthologue protein sequences.

Key words: *PyrR* orthologue, UPRTase, ATCase, expression, phylogenetic tree

DNA와 RNA로 구성되어 있는 핵산은 생명 유지에 필요한 유전정보의 저장 및 발현을 담당하고 있으며, 또한 아미노산, 지방산, 탄수화물과 같은 대사 에너지의 저장 및 합성에서도 중요한 역할을 한다[25]. 이러한 생물학적 중요성으로 인하여 산업적 분야에서 핵산 대사관련 연구가 활발하게 진행되고 있다. 핵산의 2가지 종류 중 하나인 피리미딘의 생합성은 진핵생물뿐 아니라 원핵생물에서도 유사하게 일어나는 과정으로서 글루타민과 2 ATP, bicarbonate, PRPP(5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate)와 효소가 반응하여 생합성 과정의 마지막 산물인 UMP를 생산한다[11]. 이 과정에는 여러가지 효소가 관여하며, *Bacillus caldolyticus*에서 *PyrR* 단백질이 이 효소군의 생성량을 조절한다는 것이 처음으로 밝혀졌다[12]. *PyrR* 단백질은 *pyr* 유전자군의 발현을 조절하는 조절 단백질로서의 역할과 uracil phosphoribosyltransferase

(UPRTase)의 활성을 동시에 가지는 양기능 단백질(bifunctional protein)이다. 전자와 관련하여, 조절 단백질로서 *PyrR*은 세포 내의 UMP 농도에 의존하여 UMP가 *PyrR* 단백질에 co-regulator로 작용한다. 전사시 *pyr* operon 앞쪽의 선도 염기서열(leader sequence) 부분에 형성되는 stem-loop 구조에 *PyrR* 단백질이 결합하여 *pyr* 유전자들의 발현을 억제함으로써 세포 내의 피리미딘 농도를 일정하게 유지하도록 한다. 또한 후자와 관련하여, *PyrR* 단백질은 세포 내에서 외부로부터 들어온 uracil을 UMP로 바꾸어 주는 UPRTase 기능을 수행한다[1,4,12,21,22,34].

1995년 지구상의 생명체중 처음으로 *Haemophilus influenzae*의 전체 염기서열이 밝혀졌다[10]. 뒤이어 *Synechocystis* sp. PCC6803의 염기서열도 밝혀지게 되었다[16]. 공개된 게놈 정보 중에서 *Bacillus* *PyrR* 단백질의 아미노산 서열과 유사성이 높은 open reading frame의 정보가 이 두 균주에서 발견되었다. 그러나 이들 *PyrR* orthologue 유전자의 선도 염기서열 부분을 조사한 결과 이제까지 다른 종류에서 밝혀진 조절 관련 구조체가 전혀 없음이 보고되었다[32]. 따라서

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522
E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain/plasmid	Reference or source	Relevant genotype
Strain		
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Wild type	ATCC ¹
<i>Hemophilus influenzae</i>	Wild type	R. L. Switzer
<i>Bacillus subtilis</i> DB104	<i>His nprR2 nprE18ΔaprA3</i>	17
<i>B. subtilis</i> DB104ΔpyrR	<i>His nprR2 nprE18ΔaprA3, pyrB⁺Spec^cΔpyrR</i>	34
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>HsdR17, supE44, recA1, endA1, gryA46, thi, rel A1, lac/F</i> <i>[proAB+, lacIq, lacZΔM15::Tn10(ter^r)]</i>	7
<i>E. coli</i> BL21	<i>F⁻, ompT, hadS_B (rB- mB-), gal(λc1857, ind1, Sam7, lacUV5-T7gene1)</i> <i>dcm (DE3)</i>	Takara
pUC19	Ap ^R , ColE1, <i>lacI</i> , φ80dlacZ	36
pKH1	0.98 kb insert with <i>Syn. PCC6803 pyrR</i> in pUC19 <i>kpnI</i> and <i>HindIII</i> site	This work
pKH2	0.53 kb insert with <i>Syn. PCC6803 pyrR</i> in T-vector <i>SmaI</i> site	This work
pHPSK1	0.55 kb insert with <i>H. influenzae pyrR</i> in pUC19 <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> site	This work
pHPSK2	1.83 kb insert with <i>H. influenzae pyrR</i> in pUC19 <i>EcoRI</i> and <i>BamHI</i> site	This work
pHPS9	Cm ^R Er ^R <i>cat-86::lacZα</i> PT1060-pUC9 derivative	14
pKH3	0.98 kb insert with <i>Syn. PCC6803 pyrR pyrR</i> in pHPS9 <i>SmaI</i> site	This work
pKH4	0.53 kb insert with <i>Syn. PCC6803 pyrR pyrR</i> in pHPS9 <i>SmaI</i> site	This work
pHPSK3	0.55 kb insert with <i>H. influenzae pyrR</i> in pHPS9 <i>SmaI</i> site	This work
pHPSK4	1.83 kb insert with <i>H. influenzae pyrR</i> in pHPS9 <i>SmaI</i> site	This work
pET14b	Ap ^R , His-tag fusion protein vector with T7 promoter	Novagen
pKH5	0.53 kb insert with <i>Syn. PCC6803 pyrR</i> in pET14b <i>NdeI</i> and <i>XhoI</i> site	This work
pHPSK5	0.55 kb insert with <i>H. influenzae pyrR</i> in pET14b <i>NdeI</i> and <i>XhoI</i> site	This work

¹American Type Culture Collection. Manassas, Virginia, USA.

본 연구는 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질을 *B. subtilis* *pyr* system에서 그 기능을 분석하고, UPRTase의 활성 유무를 확인하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양 조건

사용균주 및 plasmid는 Table 1에 표시하였다. *Synechocystis* sp. PCC6803 균주는 BG-11 배지(NaNO₃ 1.5 g, K₂HPO₄ 0.04 g, MgSO₄·7H₂O 0.075 g, CaCl₂·2H₂O 0.036 g, citric acid 6.0 mg, EDTA 1.0 mg, Na₂CO₃ 0.02 g, ferric ammonium citrate 6.0 mg, Trace Metal Mix A5 (H₃BO₃ 2.86 g, MnCl₂·4H₂O 1.81 g, ZnSO₄·7H₂O 0.222 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.39 g, CuSO₄·5H₂O 0.079 g, Co(NO₃)₂·6H₂O 49.4 mg, distilled water 1.0 L) 1.0 ml, 1차 증류수 1.0 L, pH 7.1)에서 배양하였다. 그 최적 온도는 26°C이며 형광등을 이용하여 2,000~3,000 렉스의 빛을 제공하였다. *Escherichia coli*와 *B. subtilis*는 Luria-Bertani 배지[2]를 이용하여 37°C에서 배양하였다. *B. subtilis*의 최소 영양배지로는 Spizizens Minimal Salt (SMM)배지[31]를 사용하였다.

Table 2. Primers employed in this study

PCR primers	Length (bp)
SypyrR1_F: 5'-GGGGTACCCCGTTATTGATGGAATG-3'	25
SypyrR1_R: 5'-CCAAGTTGGGCCCGCAGACAGGATTG-3'	25
SypyrR2_F: 5'-CCCGGGATGGCGGCCAG-3	19
SypyrR2_F: 5'-CCCGGGATTAACCTTTAATT-3'	20
SypyrR_F: 5'-CATATGGCGGCCAGAT-3	17
InfpyrR_F: 5'-CATATGGAAAAAATTATT-3'	18
SypyrR_R: 5'-CTCGAGATTAACCTTTAA-3	18
InfpyrR_R: 5'-CTCGAGTTATTTCCCTA-3'	17

PyrR 유전자 클로닝

GenBank를 통하여 *Synechocystis* sp. PCC6803의 *PyrR* orthologue 염기서열을 확인한 후 그것을 기초로 하여 Table 2에서와 같이 primer를 합성하였다. *Synechocystis* sp. PCC 6803의 chomosomal DNA를 분리한 후[27] 그것을 주형으로 하여 다음과 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. Pre-denaturation(94°C, 3분) 시킨 후, denaturation(94°C, 1분), annealing(60°C, 30초), elongation(72°C, 42초) 단계를 42회

반복하였다. 증폭된 PCR 산물을 전기영동 후 DNA Prep mate™(Bioneer, Korea)를 이용하여 회수하였다. 회수한 PCR 산물과 pUC19 벡터를 *KpnI*과 *HindIII*로 처리한 후 T4 DNA ligase를 이용하여 16°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 이것을 *E. coli* XL1-blue에 형질 전환시켜 100 µg/ml의 ampicillin이 포함된 LB 고체 배지 상에 도말하였다.

Plasmid DNA 분리 및 세균의 형질전환

대장균으로부터 plasmid DNA 분리는 Plasmid Extraction Kit(Bioneer, Korea)를 이용하였으며, *B. subtilis*로부터 plasmid DNA 분리는 Kawamura의 방법[18]을 사용하였다. 또한 *E. coli*와 *B. subtilis*의 형질전환은 Sambrook 등[29]과 Boylan 등[5]에 의하여 제시된 방법을 각각 사용하였다.

Shuttle 벡터 클로닝

*B. subtilis*에서 *PyrR* 단백질을 생성시키기 위하여 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 모두 복제가 가능한 pHPS9 shuttle 벡터를 이용하였다[14]. 먼저 *Synechocystis* sp. PCC6803의 *PyrR* orthologue 유전자가 포함된 pKH1과 pKH2를 각각 *KpnI*과 *HindIII*, *SmaI*으로 처리한 후, 전기영동을 통하여 gel 상에서 *FyrR* orthologue 유전자가 포함된 DNA 단편을 분리하였다. pHPS9 벡터에 클로닝 하기 위하여 pKH1에서 분리한 DNA 단편을 mung bean nuclease(Takara, Japan)를 이용하여 양 말단을 blunt end로 만들었다. 이 때, pHPS9 벡터를 *SmaI*으로 절단한 후 calf intestinal alkaline phosphatase로 처리하여 self-ligation을 방지하였다. 절단된 pHPS9 벡터와 *PyrR* orthologue 유전자가 함께 포함된 시료를 T4 DNA ligase을 사용하여 16°C에서 16시간 동안 처리한 후 *E. coli* XL1-blue에 형질 전환하여 5 µg/ml의 chloramphenicol이 포함된 LB 고체 배지 상에 도말 하였다. *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 유전자가 포함된 pHPSK1과 pHPSK2를 각각 *EcoRI*과 *BamHI*으로 처리한 후, pKH1과 pKH2 구축시 사용한 것과 동일한 방법으로 pHPS9 벡터에 클로닝 하였다.

pET14b 벡터 클로닝

Synechocystis sp. PCC6803과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 단백질을 정제하기 위하여 pET14b(Novagen, USA) 벡터에 클로닝을 시도하였다. 먼저 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue region으로 추정되는 시작 코돈과 종결 코돈 부위를 대상으로 하여 Table 2에서와 같이 primer를 합성하였다. pKH1과 pHPSK1를 주형으로 하여 PCR을 실시한 후 pGEM-T Easy Vector systems (Promega, USA)을 이용하여 각각 클로닝 하였다. 클로닝된 벡터와 pET14b 벡터에 *NdeI*과 *XhoI*를 처리한 후, 전기영동을 통하여 gel 상에서 분리하였다. 분리된 단편과 pET14b 벡터를 T4 DNA ligase을 이용하여 16°C에서 16시간 동안

처리한 후 *E. coli* BL21에 형질 전환하여 100 µg/ml의 ampicillin이 포함된 LB 고체 배지 상에 도말 하였다.

PyrR orthologue 단백질의 과다발현 및 정제

pET14b에 *H. influenzae*와 *Synechocystis* sp. PCC6803의 *PyrR* orthologue 부위만 ligation하여 *E. coli* BL21에 형질 전환을 실시하였다. 형질 전환된 균주를 ampicillin이 100 µg/ml 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 배양한 후 동일한 배지에 전배양액 5%를 접종하여 37°C에서 배양하였다. 이때 600 nm에서 흡광도를 측정하여 측정값이 0.6이 될 때까지 배양 후 0.1~0.25 mM IPTG를 첨가하여 과다 발현을 유도하였다. 균체를 5,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 집균하였다. 이때 단백질을 native 상태로 정제하기 위해서 lysis buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 넣어 현탁 후 sonicator를 이용하여 균체를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 10,000×g에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 분리하였으며, *PyrR* orthologue 단백질을 정제하기 위하여 Ni-NTA agarose(Qiagen, Germany)를 이용하였다. Ni-NTA agarose 100 µl에 상등액 700 µl를 넣고 2시간 결합시킨 후 Glass Econo-Column (Bio-rad, USA)에 충전하였다. Imidazole의 농도가 서로 다른 wash buffer B(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 8.0)와 wash buffer C(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 8.0)로 2번씩 씻어낸 후 마지막으로 elution buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0)를 이용하여 Ni-NTA agarose에 붙어 있는 *PyrR*-His tag 접합 단백질을 회수하였다. 과다 발현된 *PyrR* orthologue 단백질의 확인을 위하여 SDS-PAGE를 수행하였으며[20], 0.1% Coomassie brilliant blue R250(BIO BASIC INC., Canada)로 염색한 다음 methanol:acetic acid:water(1:1:8) 용액으로 탈색하여 단백질 밴드를 확인하였다.

ATCase와 UPRTase 활성측정

PyrR 단백질의 활성을 간접적으로 확인하기 위하여 *PyrR*에 의하여 조절된다고 알려진 aspartate transcarbamylase(ATCase)의 효소 활성을 측정하였다. 이 ATCase의 활성을 측정하기 위하여 Bond 등의 방법[3]을 사용하였다. 또한 정제된 *PyrR* orthologue 단백질의 UPRTase의 활성 유무를 측정하기 위하여 아래와 같이 Rasmussen등의 방법[26]을 변형하여 측정하였다. 정제된 *PyrR* orthologue 단백질을 dilution buffer(0.1 M Tris-acetate, pH 8.0, 1 mg/ml bovine serum albumin, 10 mM β-mercaptoethanol)에 희석하였다. 희석된 *PyrR* 단백질과 reaction mixture (0.25 M Tris-acetate(pH 8.0) 500 µl, 10 mM Tris-acetate, pH 8.0에 녹인 12 mM PRPP 250 µl, 0.1 M MgCl₂ 125 µl, 멸균되어진 2차 증류수 125 µl, 25 mM β-mercaptoethanol)와 섞은 후,

37°C에서 5분 동안 free heating 시켰다. 여기에 마지막 농도가 0.5 mM이 되도록 start mixture(0.5 mM, 4 μ Ci/ μ mol uracil; 12.4 mM uracil(10 mM Tris-acetate, pH 7.5) 38 μ l, 50 μ Ci/500 μ l (63 mCi/mmol) 14 C-uracil 20 μ l, 멸균된 2차 증류수 942 μ l를 넣은 후 10분 동안 반응을 유지하였다. 반응의 정지를 위하여 끓는 물에 1분 동안 담구어 두었다. 반응이 정지된 각각의 시료를 5 μ l씩 두 번 DEAE cellulose chromatography paper(Whatman International Ltd., England) 상에서 loading 하였다. 시료를 완전히 말린 후 멸균 2차 증류수와 methanol을 이용하여 각각 두 번씩 씻었다. 다시 말린 후 chamber에 methanol을 넣고 DEAE cellulose chromatography paper의 원점으로부터 2 cm 정도 위쪽 방향으로 전개시켰다. Chamber에 멸균 2차 증류수를 넣고 시료를 다시 전개시켰다. 완전히 말린 DEAE cellulose chromatography paper 상에서 loading spot을 중심으로 하여 1.5 cm \times 1.5 cm의 원을 자른 후 5 ml의 scintillation liquid (Ultima gold, Packard, USA)가 든 vial에 넣었다. 잘 섞은 후 시료가 들어있는 vial을 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit (Pierce, USA)로써 실시하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준 단백질로 사용하였다[6].

Phylogenetic tree 작성

여러 세균의 *PyrR* orthologue 단백질 아미노산 서열의 정보를 GenBank를 통하여 얻을 수 있었다. 이들의 계통 관계를 살펴 보기 위하여 clustal X[33]를 이용하여 multiple alignment를 실시한 후 MEGA program[19]을 이용하여 Neighbour-joining method[28]를 수행하였다.

결과 및 고찰

Synechocystis sp. PCC6803 *PyrR* orthologue 유전자의 클로닝

Synechocystis sp. PCC6803을 배양한 후 그 염색체 DNA를 분리하였다. 분리된 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 실시한 후 각각 pUC19와 T 벡터에 클로닝을 실시하여 pKH1과 pKH2 플라스미드로 명명하였다. Robert L. Switzer (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA)로부터 제공 받은 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 유전자가 포함된 시료(pPSH12, pGHIGZ36)는 pUC19에 클로닝하여 각각 pHPSK1과 pHPSK2로 명명하였다. 또한 pKH1, pKH2, pHPSK1, pHPSK2의 벡터에 제한효소를 처리하여 얻은 단편을 shuttle 벡터인 pHPS9에 클로닝 한 후 각각 pKH3,

pKH4, pHPSK3, pHPSK4로 명명하였다. M13 primer를 이용하여 각각의 염기서열을 결정 한 결과 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 단백질을 포함하는 부분임을 확인하였다.

ATCase 활성측정을 통한 *PyrR* orthologue의 피리미딘 생합성 기능 확인

*B. caldolyticus*와 *B. subtilis*의 *PyrR* 단백질은 uracil이 다량 존재하는 환경에서는 피리미딘 생합성에 관여하는 유전자의 발현을 억제하게 된다. 피리미딘 생합성 과정의 대표적 유전자의 산물인 ATCase 활성 측정을 통하여 *PyrR* 단백질의 기능을 예측하기 위한 목적으로 배지속에 uracil이 첨가되었을 때와 uracil이 첨가 되지 않았을 때의 ATCase 활성의 비율을 비교하여 *PyrR* orthologue의 기능을 확인할 수 있는 것으로 알려져 있다[12,34]. 이러한 사실을 기초로 하여 *PyrR* 유전자가 염색체 상에서 제거된 *B. subtilis* DB104 Δ *PyrR* 돌연변이체에 pHPS9, pKH3, pKH4, pHPSK3, pHPSK4를 각각 형질전환시켰다. 형질전환 후 uracil(50 μ g/ml)이 첨가된 SMM 배지와 첨가되지 않은 SMM 배지에 접종하여 배양하였다. 파쇄된 균체 시료를 원심분리를 통하여 상등액을 취하였으며, 이 상등액을 가지고 ATCase 활성을 측정하였다. ATCase 활성을 측정한 결과 *Synechocystis* sp. PCC6803 *PyrR* orthologue 유전자가 들어간 pKH3와 pKH4 모두 ATCase의 활성을 조절하지 않는 것으로 나타났다. 그렇지만 *H. influenzae* orthologue *PyrR* 유전자는 ATCase 활성을 조절하였다. 구체적으로 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 유전자의 부분만을 포함한 pHPSK3는 ATCase의 활성을 조절하였지만, *PyrR* orthologue 유전자의 앞쪽 선도 부분까지 포함되어 있는 pHPSK4는 ATCase 활성을 조절하지 않는 것으로 나타났다(Table 3). 이것은 아마도 *H. influenzae*의 *PyrR*

Table 3. ATCase assay for *H. influenzae* and *Synechocystis* sp. *pyrR* orthologue proteins

Strain/plasmid	<i>pyrR</i> gene ^a	ATCase activity		
		-Uracil	+Uracil ^b	-Uracil/ +Uracil ^c
DB104	+	2.630	0.304	8.65
DB104 Δ <i>pyrR</i>	-	28.50	22.84	1.24
DB104 Δ <i>pyrR</i> /pHPS9	-	18.72	11.10	1.68
DB104 Δ <i>pyrR</i> /pHPSK1	+	32.50	7.96	4.08
DB104 Δ <i>pyrR</i> /pHPSK2	+	33.75	29.60	1.14
DB104 Δ <i>pyrR</i> /pKH1	+	34.75	33.25	1.04
DB104 Δ <i>pyrR</i> /pKH2	+	34.68	24.79	1.39

^aCultures were grown in the presence or absence of 50 μ g of uracil per ml.

^bnmol \cdot ng \cdot min.

^cSpecific activity without/specific activity with uracil.

orthologue 유전자 앞쪽 부분에 *PyrR* orthologue 유전자의 전사를 억제하는 구조가 있어서 그러하리라 추정되었다. 반면에 *Synechocystis* sp. PCC6803 *PyrR* orthologue 단백질은 *B. subtilis*의 피리미딘 생합성의 조절시스템에서는 전혀 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Synechocystis sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질의 과다발현 및 정제

Synechocystis sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 부분을 pET14b 벡터에 클로닝한 후 pKH5과 pHPSK5으로 각각 명명하였다. T7 primer을 이용하여 클로닝된 부분의 염기서열을 결정 한 결과 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 부분임을 확인하였다. 용해성 단백질을 분리하기 위한 조건을 잡기 위하여 IPTG 농도를 0.1 mM에서부터 0.25 mM까지 첨가한 후 발현을 유도하였으며, induction 시간도 30°C와 37°C에서 각각 30분에서 2시간까지 30분 간격으로 처리하였다. SDS-PAGE를 통하여 용해성 단백질의 유무를 확인한 결과 *Synechocystis* sp. PCC6803 *PyrR* orthologue 단백질은 0.25 mM의 IPTG를 첨가한 후 30°C에서 1시간 동안 발현하였을 때, *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질은 0.1 mM의 IPTG를 첨가한 후 30°C에서 2시간 동안 발현하였을 때 각각 가장 많은 용해성 단백질을 획득할 수 있었다(data not shown). 이 조건을 기초로 하여 Ni-NTA agarose를 이용하여 affinity chromatography를 실시한 결과 native 형태의 *PyrR* orthologue를 분리할 수 있었다. *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질의 분자량은 약 18 kDa과 21 kDa을 각각 나타내었다(Fig. 1).

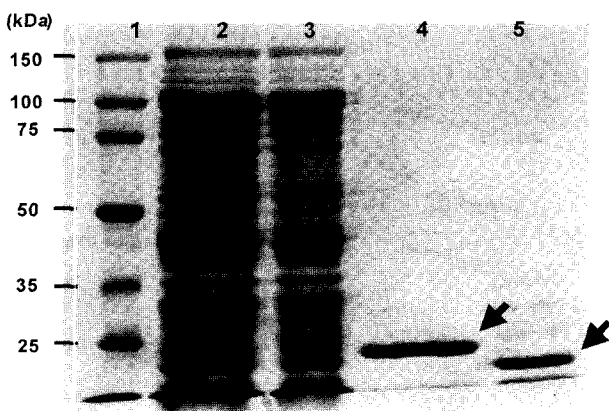


Fig. 1. Purification of the *PyrR* expressed in *H. influenzae* and *Synechocystis* sp. PCC6803. lane 1, protein molecular weight standard lane 2, supernatant of sonicated *E. coli* BL21 ; lane 3, supernatant of sonicated *E. coli* BL21/pET14b; lane 4, purified *H. influenzae* *PyrR* orthologue expressed in *E. coli* BL21/pHPSK5; lane 5, purified *Synechocystis* sp. PCC6803 *PyrR* orthologue expressed in *E. coli* BL21/pKH5 (all samples were treated in heat before SDS-PAGE).

Table 4. UPRTase activity of purified *PyrR* orthologues

Uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase) Specific Activity ^a	
<i>H. influenzae</i> <i>PyrR</i> orthologue	31.8
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 <i>PyrR</i> orthologue	< 0.1

^anmol/ mg · min

^bReaction pH 8.0

Table 5. UPRTase activity of the purified *PyrR* proteins at different reaction pH

Source	Uracil phosphoribosyltransferase (UPRTase) specific activity ^a			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
<i>H. influenzae</i> <i>PyrR</i> orthologue	< 0.1	36.99	34.23	27.98
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 <i>PyrR</i> orthologue	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1

^anmol/ mg · min

Synechocystis sp. PCC6803과 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질의 UPRTase 활성 및 특성

*B. caldolyticus*의 *PyrR* orthologue 단백질의 기능에 관한 연구에서 이 단백질이 피리미딘 생합성의 조절 작용뿐 아니라 UPRTase 활성을 가지고 있음이 보고 되었다[12]. 이러한 특성을 토대로 native 형태로 정제된 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 단백질이 UPRTase 활성을 가지고 있는지 측정하였다. 그 결과, *Synechocystis* sp. PCC6803의 정제된 *PyrR* orthologue 단백질은 UPRTase 활성을 나타내지 않았으며, *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질은 높은 UPRTase 활성을 나타내었다(Table 4). 또한 여러 가지 pH 범위에서 UPRTase의 활성을 측정한 결과 *Synechocystis* sp. PCC6803의 정제된 *PyrR* orthologue 단백질은 모든 pH 범위에서 UPRTase 활성을 나타내지 않았으며, *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 단백질은 pH 5에서 가장 높은 UPRTase 활성을 나타내었다(Table 5). 이러한 결과를 통하여 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질은 *Bacillus*의 *PyrR* 단백질처럼 UPRTase 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

Phylogenetic analysis를 통한 피리미딘 생합성 조절 기작 예측

GenBank를 통하여 기존의 등록된 18종의 *PyrR* 아미노산 서열 정보를 획득한 후 MEGA program을 이용하여 phylogenetic tree를 그렸다(Fig. 2). 매우 특이하게도, phylogenetic tree 상에서 크게 2가지 큰 그룹으로 나뉘어지는 것을 확인할 수 있었다. 그것은 피리미딘 생합성 조절 기작이 알려진 것과 연결하여 해석해 볼때, transcriptional attenuation의 방식(*B. caldolyticus*[12], *B. subtilis*[34], *Enterococcus faecalis*[13], *Lactobacillus plantarum*[9], *Lactococcus lactis*

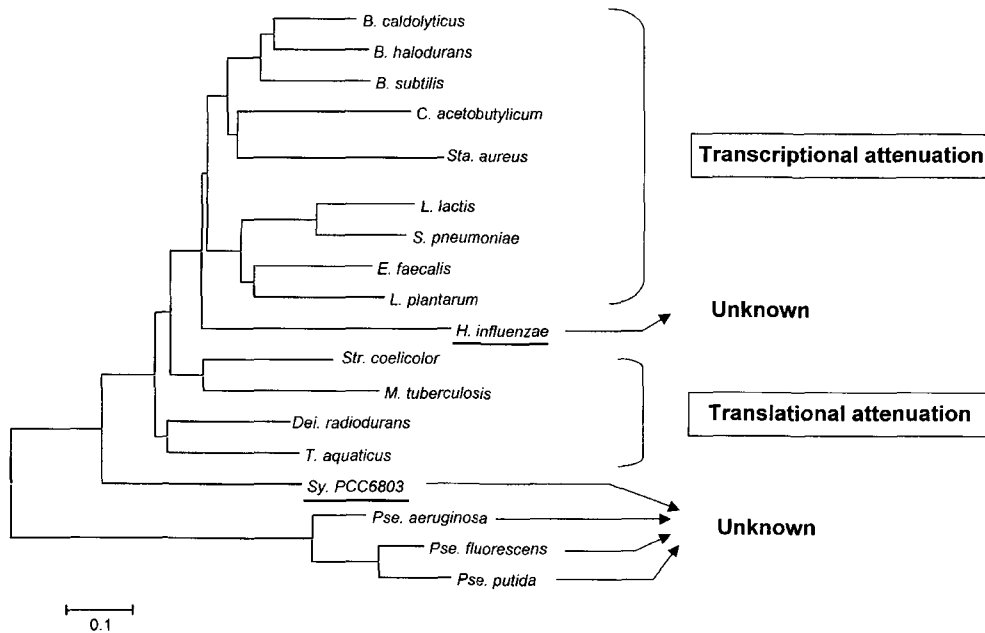


Fig. 2. Phylogenetic relationship among bacterial PyrR sequences. *Bacillus caldolyticus* [S38892], *B. halodurans* [NP_243407], *B. subtilis* [NP_389430], *Clostridium acetobutylicum* [NP_348731], *Staphylococcus aureus* [NP_374314], *Lactococcus lactis* [CAB89869], *Streptococcus pneumoniae* [NP_358749], *Enterococcus faecalis* [AAC12929], *Lactobacillus plantarum* [CAA91001] *Haemophilus influenzae* [NP_438620], *Streptomyces coelicolor* [CAB93368], *Mycobacterium tuberculosis* [NP_215896], *Deinococcus radiodurans* [NP_294834], *Thermus aquaticus* [CAA70728], *Synechocystis* sp. PCC6803 [NP_442335], *Pseudomonas aeruginosa* [NP_249094], *P. fluorescens* [AAG15557], *P. putida* [AAN68845].

[23] *Streptococcus pneumoniae*[32], *Clostridium acetobutylicum*[24]과 translational attenuation(*Thermus* sp. ZO5 [35], *Mycobacterium tuberculosis*[8])의 방식으로 유연 관계가 서로 나뉘짐을 알 수 있었다. 잘 알려져 있듯이, *PyrR* 단백질이 피리미딘 생합성을 조절하기 위해서는 *PyrR* 단백질이 결합되는 보전적 결합부분이 *PyrR* 유전자 앞쪽 선도서열의 mRNA부분에 존재하게 된다[4,12]. 이 부분에 대한 secondary structure 분석결과를 바탕으로 *B. halodurans*와 *Staphylococcus aureus*의 *PyrR* orthologue 유전자는 phylogenetic tree 상에서와 같이 transcriptional attenuation 방식으로 조절될 것으로 예측되었다. 또한 동일한 방식으로 *Deinococcus radiodurans*, *Streptomyces coelicolor*의 *PyrR* orthologue 유전자의 leader 부분 mRNA를 분석한 결과 translational attenuation 방식으로 조절될 것으로 예측되었다 (data not shown). Phylogenetic tree 분석을 통하여 아직 *PyrR* 유전자의 조절작용이 밝혀지지 않은 *H. influenzae* *PyrR* orthologue 단백질은 transcriptional attenuation이나 translational attenuation군의 중간에 위치하였으나, *Synechocystis* sp. PCC6803의 *PyrR* orthologue 단백질은 아마도 translational attenuation 방식 중에서 이제까지 밝혀지지 않은 새로운 메카니즘으로 조절 할 것으로 예상된다. 또한 *Pseudomonas* sp.[30]에서 발견된 *PyrR* orthologue 단백질은 이제까지 발견되어진 *PyrR* 단백질과의 유사성이 가장 낮은 것으로 보아 기존의 알려진 피리미딘 생합성의 조절 기작과

는 완전히 다른 새로운 메카니즘의 조절 방식으로 피리미딘 생합성을 조절할 것으로 예상된다. 이러한 분석 결과를 통하여 특정 단백질에 대한 아미노산 서열의 비교 분석만으로도 그 단백질에 의한 조절 기작을 예측할 수 있음도 가능하다고 본다. 물론, 이러한 접근 방법은 추후의 보완 연구가 뒤따라야 할 것이다.

요 약

그람 양성세균에서 *PyrR* 단백질에 의하여 피리미딘의 생합성이 조절된다는 발견을 바탕으로 하여, *Synechocystis* sp. PCC6803과 *Haemophilus influenzae*의 *PyrR* orthologue 유전자를 *Bacillus subtilis*에서 형질전환 시켜 피리미딘 생합성의 조절 유무를 조사하였다. *Synechocystis* sp. PCC6803과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 유전자를 pUC19과 T-vector에 클로닝 한후 pKH1, pKH2, pHPSK1, pHPSK2으로 각각 명명하였다. 이것을 다시 *Escherichia coli*와 *B. subtilis*용 shuttle vector인 pHPS9에 클로닝 하여 pKH3, pKH4, pHPSK3, pHPSK4로 각각 명명하였다. *B. subtilis* DB104Δ *PyrR*에 pKH3, pKH4, pHPSK3, pHPSK4을 형질전환후 ATCase 활성을 측정결과 pHPSK3을 가진 균주만 피리미딘에 의한 조절작용이 일어난다는 사실을 통하여, *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 유전자의 선도 부분에 조절에 관여하는 미지의 부분이 있음을 예측할 수 있었다. 서로 다른 유래의

PyrR orthologue 단백질을 정제하기 위하여 pET14b에 클로닝 후 pKH5, pHPSK5으로 각각 명명하였다. SDS-PAGE로 분석한 결과 각각 약 18 kDa과 21 kDa의 분자량을 나타내었다. 정제된 *PyrR* orthologue 단백질의 UPRTase 활성을 측정 한 결과 *H. influenzae*의 *PyrR* orthologue 단백질은 UPRTase 활성을 나타내었으며 다양한 pH 에서 측정 한 결과 pH 5에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 반면에, *Synechocystis* sp. PCC6803의 *PyrR* orthologue 단백질은 UPRTase 활성을 나타내지 않았다. 여러 가지 균주의 *PyrR* 아미노산 서열을 비교한 계통수 분석은 *PyrR* 단백질의 조절 기작과 어느 정도 연관됨을 시사해 주었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발사업 중 미생물유전체활용기술개발사업 (MG02-0201-001-2-2-1) 지원으로 진행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Aldritt, S. M., P. Tien, and C. C. Wang. 1985. Pyrimidine salvage in *Giardia lamblia*. *J. Exp. Med.* **161**: 437-445.
- Bertani, G. 1951. Studies of lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
- Bond, R. W., A. S. Field, and R. W. Switzer. 1983. Nutritional regulation of degradation of aspartate transcarbamylase and of bulk protein in exponentially growing *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **153**: 253-258.
- Bonner, E. R., J. N. D'Elia, B. K. Billips, and R. L. Switzer. 2001. Molecular recognition of *pyr* mRNA by the *Bacillus subtilis* attenuation regulatory protein PyrR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 4851-4865.
- Boylan, R. J., N. H. Mendelson, D. Brooks, and F. E. Young. 1972. Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J. Bacteriol.* **110**: 281-290.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braunegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-3-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29-37.
- Cole, S. T., and 41 coauthors. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Elagoz, A., A. Abdi, J. C. Hubert, and B. Kammerer. 1996. Structure and organisation of the pyrimidine biosynthesis pathway genes in *Lactobacillus plantarum*: a PCR strategy for sequencing without cloning. *Gene* **182**: 37-43.
- Fleischmann R. D., and 39 coauthors. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Ghim, S.-Y. 1993. The *pyr* operon of the thermophile *Bacillus caldolyticus* encodes both *de novo* and salvage enzymes for UMP synthesis, Ph. D. thesis, University of Copenhagen, Denmark.
- Ghim, S.-Y, and J. Neuhard. 1994. The pyrimidine biosynthesis operon of the thermophile *Bacillus caldolyticus* includes genes for uracil phosphoribosyltransferase and uracil permease. *J. Bacteriol.* **176**: 3698-3707.
- Ghim, S.-Y, C. C. Kim, E. R. Bonner, J. N. D'Elia, G. K. Grabner, and R. L. Switzer 1999. The *Enterococcus faecalis pyr* operon is regulated by autogenous transcriptional attenuation at a single site in the 5' leader. *J. Bacteriol.* **181**: 1324-1329.
- Haima, P., D. Van Sinderen, H. Schotting, S. Bron, and G. Venema. 1990. Development of a -galactosidase -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* **86**: 63-69.
- Justesen, J. and J. Neuhard. 1975. *pyrR* identical to *pyrH* in *Salmonella typhimurium*: control of expression of the *pyr* genes. *J. Bacteriol.* **123**: 851-854.
- Kaneko, T., A. Tanaka, S. Sato, H. Kotani, T. Sazuka, N. Miyajima, M. Sugiura, and S. Tabata. 1995. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome. *DNA Res.* **2**: 153-166, 191-198.
- Kawamura, F. and R. H. Doi. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. *J. Bacteriol.* **160**: 442-444.
- Kawamura, F., L. F. Wang, and R. H. Doi. 1985. Catabolite-resistant sporulation (*crsA*) mutations in the *Bacillus subtilis* RNA polymerase sigma 43 gene (*rpoD*) can suppress and be suppressed by mutations in *spo0* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 8124-8128.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 1994. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **10**: 189-191.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lu, Y., R. J. Turner, and R. L. Switzer. 1996. Function of RNA secondary structures in transcriptional attenuation of the *Bacillus subtilis pyr* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14462-14467.
- Lu, Y. and R. L. Switzer. 1996. Transcriptional attenuation of the *Bacillus subtilis pyr* operon by the PyrR regulatory protein and uridine nucleotides *in vitro*. *J. Bacteriol.* **178**: 7206-7211.
- Martinussen, J., J. Schallert, B. Andersen, and K. Hammer. 2001. The pyrimidine operon *pyrRPB-carA* from *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **183**: 2785-2794.
- Nolling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova,

- Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, and D. R. Smith. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 4823-4838.
25. Nygaard, P. 1993. Purine and pyrimidine salvage pathways. pp. 359-378. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American society for Microbiology, Washington, D. C.
26. Rasmussen, U. B., B. Mygind, and P. Nygaard. 1986. Purification and some properties of uracil phosphoribosyltransferase from *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta* **881**: 268-275.
27. Porter, R. D. 1998. DNA transformation. *Methods in Enzymology*. **167**: 705-714.
28. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
29. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed., p.116. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
30. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saie, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.
31. Spizizen, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **44**: 1072-1078.
32. Switzer, R. L. and R. J. Turner. 1998. A widespread and mechanistically versatile regulator of bacterial *pyr* genes. *Paths to pyrimidines* **6**: 45-52.
33. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
34. Turner, R. J., Y. Lu, and R. L. Switzer. 1994. Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J. Bacteriol.* **176**: 3708-3722.
35. Van de Castele, M., P. Chen, M. Roovers, C. Legrain, and N. Glansdorff. 1997. Structure and expression of a pyrimidine gene cluster from the extreme thermophile *Thermus* strain ZO5. *J. Bacteriol.* **179**: 3470-3481.
36. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

(Received Jan. 30 2003/Accepted Apr. 9, 2003)