

Streptomyces coelicolor A(3)2에서 Mycothiol 생합성에 관여하는 Inositol Monophosphatase 유전자의 클로닝 및 발현

¹김진권 · ¹최학선 · ²김성준 · †¹김시욱
¹조선대학교 공과대학 환경공학부, ²전남대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2004. 11. 29., 게재승인 : 2004. 12. 23.)

Cloning and Expression of Inositol Monophosphatase Gene from *Streptomyces coelicolor* A(3)2

Jin Kwon Kim¹, Hack Sun Choi¹, Seong-Jun Kim², and Si Wouk Kim^{1†}

¹Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
¹Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2004. 11. 29., Accepted : 2004. 12. 23.)

Mycothiols (MSH), a low molecular antioxidant thiol compound, was purified and analyzed from *Streptomyces coelicolor* A(3)2 by the monobromobimane fluorescence detection method modified by this lab. Through HPLC chromatogram, MSH fraction was obtained following the elution time of standard MSH (donated by Dr. Robert C. Fahey). That MSH showed the highest concentration among the thiol compounds contained in the cell indicated that MSH was the key thiol compound having antioxidant activity. To understand the role of gene of inositol monophosphatase (I-1-Pase) involved in the MSH biosynthesis, it was isolated from *S. coelicolor* A(3)2 and cloned and overexpressed in the *Escherichia coli*. The expressed I-1-Pase was purified through Ni-NTA column. The soluble protein consisted of 281 amino acids, and the molecular weight was 32 kDa. I-1-Pase of *S. coelicolor* A(3)2 had the sequence homology with those of human and *E. coli* by 24 and 25%, respectively, and had two conserved domains (motif A and motif B) which were typical of I-1-Pase.

Key Words : Mycothiol, *Streptomyces coelicolor* A(3)2, monobromobimane fluorescence detection method, inositol monophosphatase (I-1-Pase)

서론

Mycothiols (MSH)은 1-d-*myo*-inosityl-2-(*N*-acetyl-l-cysteinyl)amido-2-deoxy- α -d-glucopyranoside의 구조를 가지고 있다(Fig. 1A)(1). 이 물질은 다른 박테리아나 진핵세포에서는 생성되지 않고 오직 방선균에서만 생성되는 *myo*-inositol과 *N*-acetylcysteine 그리고 glucosamine 등으로 이루어진 신규 화합물이다.

의학적으로 중요한 mycobacteria를 포함해 방선균들은 산소 독성이나 친수성 독성물질에 대한 방어기작에서 중요하게 작용하는 조효소인 glutathione (GSH)을 생성하지 않는다(2, 3). MSH는 GSH보다 자동산화(autoxidation)에 대해서 더 높은 방

어능력을 가지고 있으며 세포내에서 millimolar 수준으로 존재하고 있다(4). 이것은 GSH를 생산하는 세포에서의 GSH와 매우 유사한 기능을 방선균에서는 MSH가 갖는다는 것을 의미한다. 한 예로 방선균인 *Amycolatopsis methanolytica*에서 MSH가 NAD/factor-dependent form-aldehyde dehydrogenase의 factor로 작용하며 이것은 이미 잘 알려져 있는 NAD/GSH-dependent formaldehyde dehydrogenase의 GSH 기능과 유사하게 작용한다는 것이 보고되었다(5, 6).

MSH를 합성하기 위해서는 먼저 *myo*-inositol이 합성되어야 한다. 첫 단계로 inositol-1-phosphate (I-1-P) synthase (EC 5.5.1.4)에 의해 glucose-6-phosphate로부터 I-1-P가 합성되고 다음에 inositol monophosphatase (I-1-Pase; EC 3.1.3.25)에 의해 I-1-P가 탈인산화됨으로써 *myo*-inositol이 합성된다. 이러한 de novo 경로는 세포로 free inositol을 공급하게 되며 포유동물세포나 식물세포의 이차신호 전달 경로에 관여하는 것으로 보고되었다(7-10). 생성된 inositol은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 여러 단계의 효소 반응을 거쳐서 MSH를

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-6754, Fax : +82-62-225-6040
E-mail : swkim@chosun.ac.kr

생성하는 것으로 알려졌다(Fig. 1B).

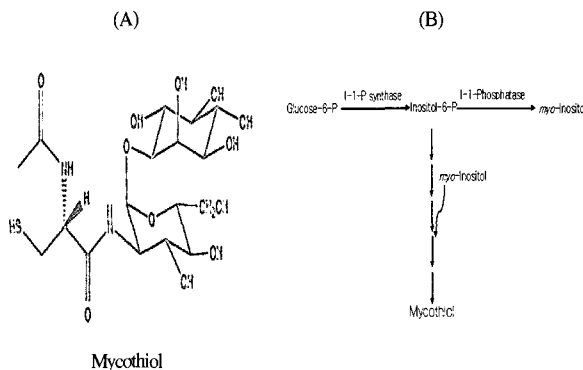


Figure 1. (A) Mycothiol structure (B) Mycothiol biosynthetic pathway from glucose-6-phosphate. I-1-P synthase catalyzed the conversion of glucose-6-phosphate to inositol-1-phosphate. I-1-Pase catalyzed the dephosphorylation of inositol phosphate.

MSH는 Sakuda등에 의해 *Streptomyces*에서 처음으로 발견되었지만(11), 생체내 기능은 밝혀지지 않았다. 그 후 Newton등에 의해 처음으로 *Streptomyces clavuligerus*에서 MSH가 분리/분석되어 항산화 기능을 갖는 thiol물질이라는 것이 규명되었다(4). MSH는 여러 actinomycetes에서 계속해서 확인되었고 특히 MSH 대사에 관련된 효소들이 결핵균 및 다른 mycobacterium 감염증 치료에 적용될 수 있는지에 대한 연구가 진행되고 있다(1, 4, 12, 13). myo-inositol 생합성에 관련된 I-1-Pase는 yeast와 포유류에도 존재하고 있으며 최근에 고세균인 *Methanococcus*에서도 발견되었다(14).

본 연구에서는 방선균 *Streptomyces coelicolor* A(3)2를 이용하여 MSH 합성에 관련된 I-1-Pase 유전자의 클로닝과 발현에 대하여 연구하였다. 또한 세포내에 들어있는 MSH를 간편한 방법으로 분리, 정량화할 수 있는 방법도 모색하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

실험에 사용한 방선균은 *Streptomyces coelicolor* A3(2)로 YEME배지에서 30°C로 배양하였다(15). 대장균은 *Escherichia coli* DH5a 및 BL21(DE3)을 사용하였고, 항생제 (ampicillin; 50 µg/ml 또는 kanamycin; 25 µg/ml)를 포함하는 LB배지에서 배양하였다. 대장균에 사용한 클로닝 벡터 및 발현 벡터는 pUC19와 pET26b(+)를 사용하였다.

DNA 조작

제한효소, T₄ ligase, Taq polymerase는 Takara Suzo Co.에서 구입하여 사용하였고, 클로닝과 발현 등 유전자조작은 Sambrook등의 방법에 따라서 수행하였다(16).

HPLC chromatogram을 이용한 MSH 분석

S. coelicolor A3(2) 200 mg (wet wt.)에 50% acetonitrile이 들어있는 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0) 1 ml과 thiol 화합물에만 결합하는 monobromobimane을 최종농도가 2 mM이

되도록 첨가한 후 60°C에서 20초간 초음파로 파쇄하였다. 파쇄물을 암실에서 60°C로 15분간 방치한 다음 2 N의 methanesulfonic acid를 12.5 µl 첨가하였다. 10,000 ×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 -70°C에서 보관하면서 필요에 따라 HPLC (WISP Model 710B, Waters)로 분석하였다. 용매조건은 A 완충액으로 0.25% acetic acid (pH 3.5)를, B 완충액으로 원액의 methanol을 사용하였으며 A 완충액에 대한 B 완충액의 농도를 15%에서부터 시작하여 30%까지 농도 구배로 용출하였다. 이때 유속은 분당 1.2 ml로 하였으며, MSH 검출은 형광모니터 (LDC Fluoromonitor III, Milton Roy)를 이용하였다 (excitation 파장: 360 nm, emission 파장: 460 nm). 표준물질 MSH-bimane derivative는 UC San Diego의 Robert C. Fahey 교수로부터 제공받아 실험을 수행하였다.

Inositol-1-phosphatase 유전자의 클로닝과 발현

S. coelicolor 염색체로부터 I-1-Pase 유전자를 클로닝하기 위해 NCBI의 Blast Search를 통해 homology가 높은 방선균의 I-1-Pase 유전자 domain을 찾은 후 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다(upstream : GTCGACCCGGTCGACGGGACC, downstream: AAGACCGGCCGCGTGGTCCCA). 증폭된 단편조각은 pGemT-easy에 삽입한 후 대장균 DH5a에 형질전환 하여 ampicillin이 포함된 LB agar plate에서 16시간동안 배양하였다. 염기서열 분석을 통하여 I-1-Pase 유전자를 결정하였다.

확보된 I-1-Pase 유전자 단편조각을 probe로 사용하여 전체 ORF를 획득하였으며 I-1-Pase 유전자를 과발현 시키기 위해서 다음과 같이 primer를 제작하여 PCR을 수행하였다(Nde I : TATCATATGATCGAGGACAACGAAACC, Xho I : ATT CTCGAGGGCCTCGCCCGACAGGG). 증폭된 단편을 Nde I 과 Xho I 으로 절단하여 pET26b(+)에 삽입한 후 대장균 DH5a에 형질전환 하여 형질 전환체를 확인하였으며, 대장균 발현 숙주 BL21(DE3)에서 단백질을 발현시켰다. 삽입된 유전자가 과도 발현하여 C 말단 부위에 6개의 histidine 잔기가 포함된 I-1-Pase 효소를 만들도록 하였다. I-1-Pase 단백질을 발현시키기 위해 I-1-Pase 유전자를 가지고 있는 대장균을 16시간 배양한 다음 새로운 배지에 1% 접종하여 3시간 배양하였고, 그 후 최종 농도 1 mM의 IPTG를 첨가하여 2시간 더 배양하여 단백질을 발현시켰으며, 이들 단백질의 발현정도를 SDS-PAGE로 확인하였다.

발현된 inositol-1-phosphatase 정제

C-말단 부위에 6개의 histidine 잔기가 포함된 I-1-Pase 효소를 과도발현 시켰다. 발현된 대장균을 모아서 원심분리한 후 초음파로 파쇄하고, 15,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. Histidine 잔기를 Ni-NTA column에 결합시키기 위해 600 µl lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)로 Ni-NTA column을 평형화시켰다. 이후 700 ×g 로 2분간 원심분리하여 lysis buffer를 제거하였다. 준비된 Ni-NTA column에 600 µl의 단백질을 넣은 후 700 ×g로 2분간 원심분리하여 column에 결합하지 않은 단백질을 제거하였다. 20 mM imidazole이 첨가된 wash buffer (50 mM NaH₂PO₄,

300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 두 번에 걸쳐 column에 용출시킨 후 elution buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole, pH 8.0)를 200 μl 가하여 Ni-NTA column에 강하게 결합되어진 단백질을 2분간 원심 분리하여 탈착/정제하였다.

결과 및 고찰

세포내 thiol의 분석

기존의 방법을 이용하여 *S. coelicolor*에 존재하는 MSH를 분석하기 위해서는 많은 시간과 노력이 필요하기 때문에 기존에 발표된 방법을 변형하여 간단하고 단순한 방법으로 MSH의 분리/분석을 시도하였다(4). 즉, 기존의 방법에서는 중금속 킬레이트 또는 높은 pH 상태에서 thiol의 산화에 문제가 발생함으로써 분석에 영향을 받을 수 있으나 본 실험의 방법으로 이를 최소화할 수 있다. 본 실험에서는 thiol 화합물에만 결합하는 monobromobimane을 최종농도가 2 mM이 되도록 첨가하고 세포를 60°C에서 20초간 초음파로 파쇄하여 thiol-bimane 결합체를 합성하였다. 그리고 합성된 thiol-bimane 결합체를 HPLC로 분리하고 형광분석법으로 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 표준물질인 MSH-bimane과 동일하게 16분에서 용출되는 분획을 확인함으로써 MSH가 세포내에 존재한다는 것이 판명되었다. 이로부터 MSH가 *S. coelicolor*내에 포함되어 있는 thiol 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 결과적으로 본 실험을 통하여 간단하게 MSH를 분리 정제하고 정량화 할 수 있는 방법을 제시하였다.

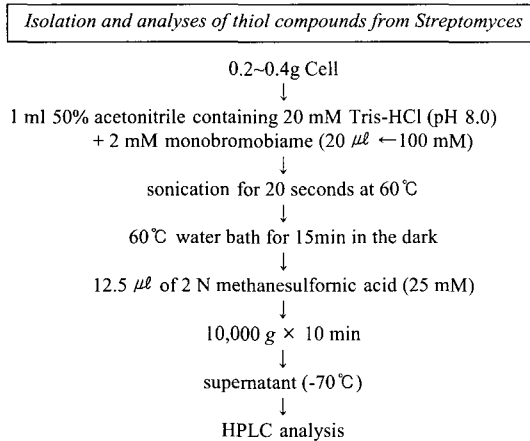


Figure 2. Isolation and analyses of thiol compounds from *Streptomyces*.

Inositol-1-Phosphatase 유전자의 클로닝 및 발현

NCBI의 Blast Search를 통하여 mycobacterium의 I-1-Pase 염기서열을 분석한 후 *S. coelicolor*로부터 I-1-Pase 유전자를 분리하였다. 염기서열분석을 통하여 분리된 유전자가 I-1-Pase 유전자인 것을 확인하였으며, 이것을 probe로 이용하여 *S. coelicolor*의 I-1-Pase 유전자 ORF를 획득할 수 있었다. 획득된 I-1-Pase 유전자를 대장균에서 과도 발현시키기 위해서, T7 프로모터를 이용하는 pET26b(+) 벡터를 사용하였다. 방선균

I-1-Pase 유전자에 해당하는 ORF에 *NdeI* 과 *XhoI* 제한효소 부위를 삽입하고 유전자 증폭기술을 이용하여 I-1-Pase 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 *NdeI* 과 *XhoI* 제한효소로 절단한 후 단편조각을 pET26b(+)에 삽입하였다.

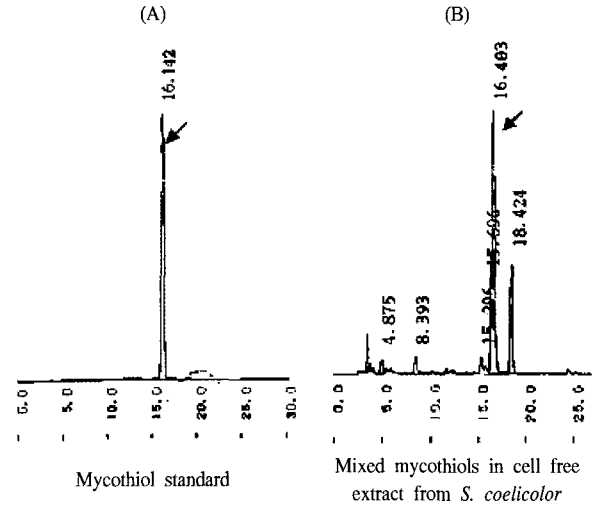


Figure 3. HPLC chromatograms of standard mycothiol (A) and mixed mycothiols (B) in cell free extract of *S. coelicolor*.

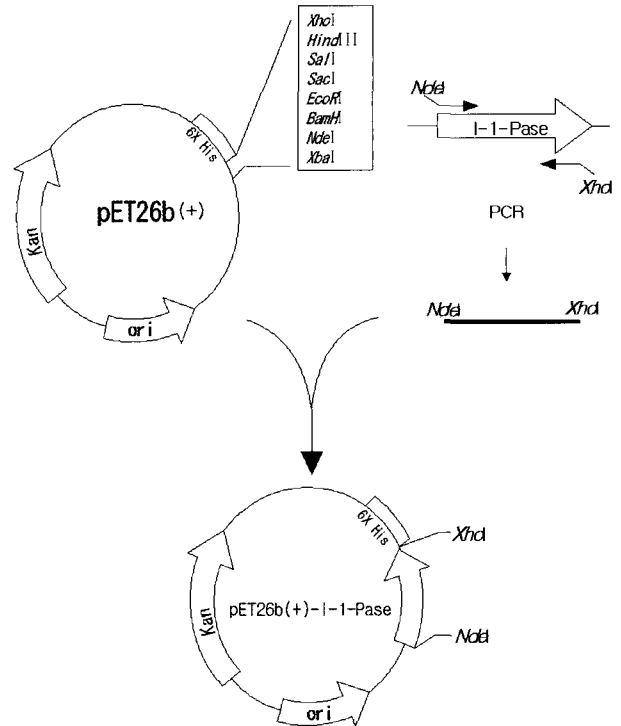


Figure 4. Construction of plasmid pET26b(+)-I-1-Pase. I-1-Pase gene with *NdeI* and *XhoI* restriction sites at both ends was synthesized by PCR and cloned into pET26b(+) previously digested with the same restriction enzymes.

C 말단 부위에 6개의 histidine 잔기가 포함된 I-1-Pase 효소를 과도 발현시켰다(Fig. 4). pET26b(+) 발현 벡터에 클로닝한 I-1-Pase 유전자는 1 mM IPTG에 의해 유도되어 다량의 단백질을 발현하였고, 이들 대부분은 soluble 단백질이었다.

I-1-Pase를 정제하기 위해 효소를 Ni-NTA column에 흡착시킨 후 20 mM imidazole 완충액으로 불순물을 제거하였고 imidazole이 200 mM 포함된 elution buffer로 원하는 I-1-Pase 효소를 정제하였다. 이 과정을 통해 대부분의 불순물이 제거됨으로써 정제효율이 약 98%를 나타내었다. 정제된 I-1-Pase는 281개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 32 kDa으로 기존에 밝혀진 I-1-Pase (대장균, 고세균 및 인간)와 분자량이 거의 유사하였다(Fig. 5). I-1-Pase 효소활성은 반응 후 I-1-P로부터 유리되는 inorganic phosphate 농도를 비색 측정 방법으로 측정하여 결정하였다. I-1-Pase는 Mg²⁺에 농도에 따라 활성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 1 mM부터 10 mM까지 농도를 올리면서 발현된 I-1-Pase의 활성변화를 측정할 결과, 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 이후 보다 많은 연구를 통해 이 효소의 특징을 파악하면 MSH 생합성 연구 및 산화 스트레스에 많은 자료를 제공해주리라 사료된다.

I-1-Pase의 아미노산 서열 비교

S. coelicolor A3(2)의 I-1-Pase는 281개의 아미노산으로 구성되어 있으며, Blast Search 결과 인간 및 대장균의 I-1-Pase와 각각 24와 25%의 sequence homology를 보였다. 일반적으로 I-1-Pase는 특징적인 아미노산 서열을 가지고 있다. 즉, I-1-Pase motif A는 DPVDGT 아미노산 서열을, motif B는 WDF AAG 아미노산 서열을 가지고 있다. I-1-Pase motif A는 활성부위로, motif B는 inositol 결합부위로 알려져 있다(Fig. 6). *S. coelicolor*의 I-1-Pase도 motif A와 motif B 아미노산 서열을 가지고 있는 것으로 보아 기존의 I-1-Pase와 유사한 구조 및 기능을 갖는 것으로 판단된다.

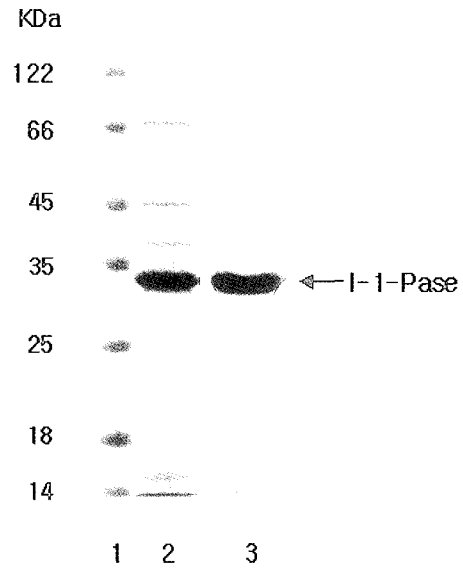


Figure 5. Overexpression and purification of I-1-Pase. Lane 1: molecular mass standard, lane 2: cell free extract, lane 3: purified I-1-Pase.

요 약

S. coelicolor A3(2)로부터 항산화 저분자 thiol분자인 MSH를 HPLC 및 monobromobimane 형광 검출 방법으로 분리·정제하여 그 존재를 확인하였다. 표준물질인 MSH-bimane과 동일하게 용출되는 MSH 분획을 확인하였으며 여러 thiol 분획 중 MSH 분획이 가장 많은 것으로 보아 MSH가 *S.*

<i>E. coli</i>	MHPMLNIAVRAARKAGNLI AKNYETPDAVEASQKGSNDVF	40
Human	MADPWQECMDYAVTLARQAGEVCEAIKNEMVMLKSSPVDLVTATD	47
<i>Streptomyces</i>	MIEDNETIDEFLARHTGDVEEAVRKAQAQEIIMPRWRRLAAHEVDQKAGPHDLVTDADRKA	60
motif A		
<i>E. coli</i>	TNVDKAAEAVIDTIRKSY PQHTIITEESGELEGTDQDVQWYI DPVDGT TNFIKRLPHFAV	100
Human	QKVEKMLISSIKEKYP SHSFIGEESVAAGEKSILTDNPTW DPVDGT TNFVHRFPFVAV	107
<i>Streptomyces</i>	ELYLTEVLPRLPGSVVVGEEAVHANPASYGAIRGEAPW DPVDGT RQFVRGEEGFCT	120
<i>E. coli</i>	SI AVRIKGRTEVAVVYDPMRNE LFTATRGQGAQLNGYRLLGSTARLDGTILATGFPFKA	160
Human	SIGFAVNKKIEFGVVYSCVEGKMYTARKGKGAF CNGQKLQVSQQEDITKSLLVTELGSSR	167
<i>Streptomyces</i>	LVALAHRGVVHASWTYAPAGDRLATAARGGGAF LDGERLYAGPPEPGRDLRVATSHPDYT	180
motif B		
<i>E. coli</i>	--KQYATTYINIVGKLFNECADFRRTGSAALDLAYVAAGRV DGF FEI GLRP WDF AAG ELL	220
Human	TPETVRMVLNMEKLF CIPVHGIRSVGTA AVNMCLVATGGADAY YEMGIHC WDVAGA GII	227
<i>Streptomyces</i>	-----TDEQKRDLLALRTPGVAPR PCGSAGLEYLAVARGESDATAFSWEAA WDHAAG LLL	240
<i>E. coli</i>	VREAGGIVSDFTGGHNYMLTGNIVAGNPRVVKAMLANMRDELS DALKR	268
Human	VTEAGGLMDVTGGPF DLMSRRVIAANNRILAEERIAKEIQV IPLQRDDED	257
<i>Streptomyces</i>	VEEAGGTHLTRTGEPPFRITGGNELPFTAARDAATARQV VALLSGEA	287

Figure 6. Comparison of sequence alignments of I-1-Pase from *S. coelicolor* with those from human and *E. coli*.

*coelicolor*의 주된 thiol 화합물로 판단되었다. MSH 생합성에 관여하는 효소 중 I-1-Pase의 유전자의 기능을 알아보기 위하여 이 유전자를 방선균에서 분리한 후 대장균에 클로닝하여 과도발현시켰다. 발현된 I-1-Pase를 Ni-NTA column을 사용하여 정제하였다. 정제된 I-1-Pase는 soluble protein으로 281개 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 32 kDa이었다. 인간 및 대장균의 I-1-Pase와 각각 24와 25%의 sequence homology를 보였으며, 기존의 I-1-Pase가 가지고 있는 공통의 I-1-Pase motif A와 motif B를 *S. coelicolor* A3(2)도 가지고 있는 것으로 확인되었다.

감 사

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 2004년도 지역대학우수과학자지원사업 (과제번호: R05-2004-000-12321-0)의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Newton, G. L., K. Arnold, M. S. Price, C. Sherrill, S. B. Delcardayre, Y. Aharonowitz, G. Chhen, J. Davies, R. C. Fahey, and C. Davis (1996), Distribution of thiols in microorganism: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes, *J. Bacteriol.* **178**, 1990-1995.
2. Meister, A. and M. E. Anderson (1983), Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
3. Fahey, R. C. and A. R. Sundquist (1991), Evolution of glutathione metabolism, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **64**, 1-53.
4. Newton, G. L., C. A. Bewley, T. J. Dwyer, R. Horn, Y. Aharonowitz, G. Cohen, J. Davies, D. J. Faulkner, and R. C. Fahey (1995), The structure of U17 isolated from *Streptomyces clavuligerus* and its properties as an antioxidant thiol, *Eur. J. Biochem.* **230**, 821-825.
5. Misset-Smits, M., P. W. van Ophem, S. Sakuda, and J. A. Duine (1997), Mycothiol, 1-O-(2'-[N-acetyl-L-cysteiny]amido-2'-deoxy-alpha-D-glucopyranosyl)-D-myo-inositol, is the factor of NAD/factor-dependent formaldehyde dehydrogenase, *FEBS. Lett.* **409**, 221-222.
6. Norin, A., P. W. van Ophem, S. R. Piersma, B. Persson, J. A. Duine, and H. Jornvall (1997), Mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase, a prokaryotic medium-chain dehydrogenase/reductase, phylogenetically links different eukaryotic alcohol dehydrogenases-primary structure, conformational modelling and functional correlations, *Eur. J. Biochem.* **248**, 282-289.
7. Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1989), Inositol phosphates and cell signalling, *Nature* **341**, 197-205.
8. Loewus, F. A. (1990), Inositol biosynthesis, In *Inositol metabolism in plants*. D. J. Moore, W. F. Boss, and F. A. Loewus, Eds., p13, Wiley-Liss, Inc., New York.
9. Majerus, P. W. (1992), Inositol phosphate biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 225-250.
10. Rana, R. S. and L. E. Hokin (1990), Role of phosphoinositides in transmembrane signaling, *Physiol. Rev.* **70**, 115-164.
11. Sakuda, S., Z. Y. Zhou, and Y. Yamada (1994), Structure of a novel disulfide of 2-(N-acetylcysteiny)amido-2-deoxy-alpha-L-glucopyranosyl- myo-inositol produced by *Streptomyces* sp., *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1347-1348.
12. Young, D. B. and K. Duncan (1995), Prospects for new interventions in the treatment and prevention of mycobacterial disease, *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 641-673.
13. Bornemann, C., M. A. Jardine, H. S. Spies, and D. J. Steenkamp, (1997), Biosynthesis of mycothiol: elucidation of the sequence of steps in *Mycobacterium smegmatis*, *Biochem. J.* **325**, 623-629.
14. Chen, L. and M. F. Roberts (1998), Cloning and expression of the inositol monophosphatase gene from *Methanococcus jannaschii* and characterization of the enzyme, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2609-2615.
15. Parro, V., D. A. Hopwood, F. Malpartida, and R. P. Mellado (1991), Transcription of genes involved in the earliest steps of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*, *Nucleic Acids Res.* **19**, 2623-2627.
16. Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch (1989), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.