

## Adenylyl Cyclases in Mycobacteria

Han-Seung Jeon<sup>1</sup>, In-Jeong Ko<sup>2</sup> and Jeong-Il Oh<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Microbiology, Pusan National University, 609-735 Busan, Korea<sup>2</sup>Korea Science Academy of KAIST, 614-822 Busan, Korea

Received February 17, 2011 / Accepted March 20, 2011

Adenylyl cyclase (AC) catalyzes the formation of cyclic AMP (cAMP) from ATP. The cAMP produced by AC serves as a secondary messenger in a variety of signal transduction pathways, and controls various cellular functions in many organisms. ACs can be grouped into six classes based on their primary amino acid sequences. Eukaryotes and mycobacteria contain only members of class III AC. The catalytic cyclase domains of class III AC are active as dimers: mammalian ACs, which are composed of a single polypeptide with two catalytic cyclase domains, form the active site as a result of intramolecular dimerization of the catalytic cyclase domains. In contrast, mycobacterial ACs function as homodimers, since their polypeptides contain a single catalytic cyclase domain. Six amino acids are required for the catalytic activity of class III AC - two aspartate residues, a lysine-aspartate pair and an arginine-asparagine pair. 16 ACs belonging to the class III were identified in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and their characteristics are reviewed.

**Key words** : Adenylyl cyclase, cAMP, *Mycobacterium tuberculosis*, secondary messenger, signal transduction pathway

## 서 론

병원균을 포함하여 생물체가 환경 내에서 효율적으로 생존하기 위해서는 외부의 환경을 인지하고 반응하여 변화된 환경에 효율적으로 적응을 해야한다. 이 과정은 신호전달경로(signal transduction pathway)를 통해서 이루어지며, 신호전달경로는 신호인지(signal reception), 신호전달(signal transduction), 그리고 반응(response)의 세가지 과정으로 이루어진다. 신호인지는 빛과 같은 물리적 신호와 화학적 신호분자(ligand)에 특이적으로 결합하는 수용체(receptor)에 의해 이루어지는데 대부분의 수용체는 세포막에 위치하여 외부의 신호를 인지한다. 많은 신호분자(1차신호)들은 세포막을 자유롭게 통과하지 못하기 때문에 신호를 세포 내부의 신호전달 관련 분자(kinase, transcription factor, ion channel 등)에 직접 전달해줄 수가 없다. 신호전달경로에서 외부의 신호를 받아 세포 내부의 신호전달 관련 분자의 활성을 조절하는 기능을 하는 작은 분자를 이차전달자(secondary messenger)라 한다. 이차전달자로 기능을 하는 대표적인 분자는 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP)로 adenylyl cyclase (AC)에 의해서 ATP로부터 합성된다[4,36].

AC는 반응을 촉매하는데 있어서 금속이온 의존적인 방식으로 cAMP를 합성한다. AC는 아미노산 서열을 바탕으로 총 6개의 class (I-VI)로 분류될 수 있다[6,35]. 이 중 mycobacteria

에 존재하는 AC들은 진핵생물에서 발견되는 AC와 단백질 1차구조가 비슷한 class III로 분류된다[35,36].

현재까지 mycobacteria의 AC 유전자는 *Mycobacterium avium*에서 12개, *M. leprae*에서 4개, *M. marinum*에서 31개, *M. smegmatis*에서 10개, *M. tuberculosis*에서 16개가 밝혀졌다[35]. 본 총설은 결핵균을 포함하는 mycobacteria에서 발견되는 AC에 대해 지금까지 보고된 내용과 최근에 제시된 cAMP와 결핵균의 숙주 내의 감염과 생존 기전과의 관계에 대해 다룰 것이다.

## Adenylyl cyclase 분류

AC는 촉매 도메인(catalytic domain)의 1차구조를 바탕으로 최근까지 총 6개 class로 분류가 되었고 서로 다른 class에 속하는 AC 간에는 단백질 1차구조의 유사성이 없다. Class III에 속하는 AC는 고등식물을 제외한 진핵생물과 원핵생물 모두에서 발견되는 일반적인 형태의 AC이고, 나머지 5 class에 속하는 AC는 일부의 세균에서만 발견된다.

## Class I

AC로는 처음으로 발견된 class I AC (enterobacterial AC)는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Erwinia chrysanthemi*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia pestis* 등과 같은 장내세균과 *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*에서 발견되었다[6]. 이들은 분해대사물 억제(catabolite repression)나 병원성(virulence) 발현과 같은

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2593, Fax : +82-51-514-1778

E-mail : joh@pusan.ac.kr

과정에 관여한다[7]. 그 중 *E. coli*의 AC는 아미노말단에 촉매 도메인이, 카복실말단에는 조절 도메인(regulatory domain)으로 구성되어 있는 분자량 97 kDa인 monomer 형태를 하고 있다. *E. coli*의 AC는 *cyaA* 유전자에 인코딩되어 있는데, glucose가 고갈되면 활성화된다. Class I AC의 3차원 구조는 아직까지 밝혀지지 않았다[6,31].

Class II

Class II AC는 *Bacillus anthracis*와 *Bordetella pertussis*와 같은 병원균에서 외부로 분비되는 외독소(exotoxin)로서 기능을 한다[5,21,28]. 이 효소가 숙주세포에 들어가게 되면, 숙주의 calmodulin에 의해 활성화되어, cAMP를 대량생산하게 되고 숙주세포의 신호전달 경로가 교란되어 질병이 유발된다. 이 AC의 calmodulin-결합 도메인은 AC의 활성부위에 기질이 결합하는 것을 방해하는 기능을 한다. Calmodulin이 calmodulin-결합 도메인에 결합하게 되면 단백질의 모양(conformation)이 변하여 활성부위가 기질의 접근에 자유로워져 효소가 활성화된다. *Pseudomonas aeruginosa*에서도 class II에 속하는 AC가 발견되는데[42], 이 AC는 활성자(activator)로서 calmodulin대신 숙주세포의 세포질에 존재하는 다른 인자를 사용한다고 알려져 있다[28].

Class III

Class III AC의 분포

Class III AC는 고등식물을 제외한 원생생물, 균류(fungi), 조류(algae), 동물을 포함하는 진핵생물과 원핵생물에서 발견된다[23,26]. 이 class에 속하는 AC들은 활성부위를 구성하는 cyclase homology domain (CHD)의 아미노산 서열의 유사성을 갖는다. 대부분의 이 class의 AC는 CHD를 포함한 복수의 도메인으로 이루어져 있다[23,26]. 이러한 도메인들은 막에 AC를 위치시키거나, 신호인지, 그리고 하위 신호전달 분자로의 신호전달의 기능을 가지고 있다.

포유류에는 두 종류의 AC가, 즉 막결합 AC (membrane-bound AC)와 세포질 AC (soluble AC), 존재한다(Fig. 1)[8,20,39]. 막결합 AC는 6개의  $\alpha$ -helix로 구성된 막통과 도메인(transmembrane domain) 2개와 2개의 CHD로 구성되어 있다. 발견되는 조직과 활성조절 기작에 따라 9개의 isoform으로 나뉜다[26,29]. 이러한 형태의 막결합 AC는 포유류 뿐만 아니라 선형동물인 *Caenorhabditis elegans*와 곤충인 *Drosophila melanogaster*, 원생생물인 *Dictyostelium discoideum* 등에서도 발견된다. 한 polypeptide 내의 두 개의 CHD가 intramolecular dimerization을 통해 한 개의 활성부위를 형성한다(Fig. 2). 포유류에서 발견되는 세포질 AC는 아미노말단에 두 개의 CHD를 포함하고 있으며 카복실말단 부위는 자가활성억제 도메인(autoinhibitory domain)으로 역할을 한다(Fig. 1)[11]. 막결합 AC와 마찬가지로 intramolecular dimerization를 통해 한 개

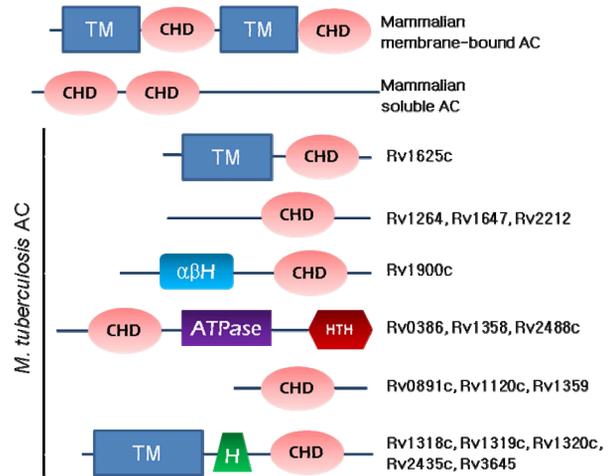


Fig. 1. Domain composition of class III adenylyl cyclases in mammals and mycobacteria. Abbreviations are as follows: CHD, cyclase homology domain;  $\alpha\beta$ H,  $\alpha\beta$ -hydrolyase; ATPase, AAA+ type ATPase; HTH, helix-turn-helix DNA binding domain; H, HAMP-domain; TM, transmembrane domain composed of  $\alpha$ -helices.

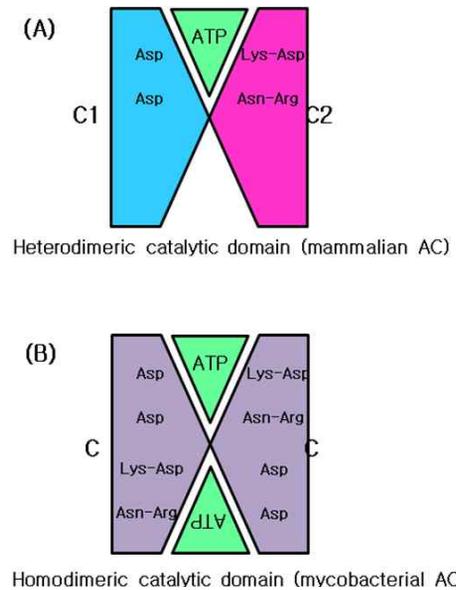


Fig. 2. Schematic structure of the catalytic domain of the class III adenylyl cyclase. (A) The mammalian AC consists of a single polypeptide with two different CHDs (cyclase homology domain: C1 and C2). Heterodimerization of the two CHDs forms the catalytic domain possessing one active site (ATP-binding site). (B) The polypeptide comprising the mycobacterial AC contains a single CHD. Homodimerization of two identical CHDs of each polypeptide in a head to tail orientation leads to the formation of the catalytic domain with two active sites. The amino acid residues, which are well conserved among the class III ACs and important for their catalytic activities, are given in the schematic diagrams.

의 활성부위를 형성한다. 세포질 AC와 비슷한 AC의 유전자가 원생생물인 *Paramecium*과 세균인 *Chloroflexus aurantiacus*의 genome에 존재한다[19].

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발견된 AC는 카복실말단은 한 개의 CHD를 가지고 아미노말단에는 Ras 결합 도메인을 가지고 있어 GTP와 결합한 Ras 단백질에 의해 활성화된다[17,18]. Ras 결합 도메인과 CHD 사이에는 14개의 leucine-rich 도메인과 protein phosphatase 2c의 촉매 도메인과 유사한 도메인이 위치한다. CHD가 polypeptide에 한 개만이 존재하기 때문에 활성부위를 구성하기 위해서는 두 개의 polypeptide의 dimerization이 일어나야 한다[17]. GTP를 cGMP와 pyrophosphate로 전환시키는 guanylyl cyclase의 구조도 class III AC와 유사하고 유사한 CHD를 포함하고 있음이 밝혀졌다[6].

Mycobacteria에서 발견되는 AC는 모두 class III에 속하고 CHD를 polypeptide에 한 개만을 가진다(Fig. 1). 따라서 mycobacteria에서 발견되는 AC는 homodimer의 4차구조를 가지며 두 개의 CHD가 모여 두 개의 동일한 활성부위를 형성하게 된다(Fig. 2)[35,36].

#### Class III AC의 촉매 기작

위에서 언급했듯이 class III AC의 활성부위는 두 개의 CHD가 서로 반대방향으로(head to tail orientation) 모여서 만나는 지점(interface)에 형성된다. 포유류에서 발견되는 AC에서처럼 한 단백질(polypeptide)에 두 개의 CHD가 존재하면 두 개의 CHD의 아미노산 서열이 동일하지 않기 때문에 CHD가 heterodimer로서 활성부위를 형성한다(Fig. 2A). 이 경우 기질인 ATP가 결합하는 활성부위는 한 개가 형성된다[6,23,26]. *S. cerevisiae*와 mycobacteria에서 발견되는 AC는 단백질에 한 개의 CHD만 존재하므로 활성부위를 형성하기 위해서는 두 개의 polypeptide가 dimerization이 일어나야 한다(Fig. 2B). 이 경우는 두 개의 CHD가 만나는 지점에 두 개의 활성부위가 형성된다[35]. Class III에 속하는 AC는 활성부위를 형성하는 CHD가 비슷한 3차원 구조를 가지고 있고, 동일한 촉매 기작을 가지지만 CHD의 아미노산 서열의 차이에 따라 4개의 subgroup으로 나눈다(class IIIa-class IIId)[23].

이 class에 속하는 AC의 활성부위에는 일반적으로 6개의 중요한 아미노산 잔기가 보존되어 있다[23,26]. 촉매에 필요한 금속이온( $Mg^{2+}$  또는  $Mn^{2+}$ )과 결합하는 aspartate-aspartate 잔기쌍(*M. tuberculosis*의 Rv1625c에서 Asp-231과 Asp-274), 기질인 ATP와 결합하여 기질특이성을 부여하는 잔기쌍(*M. tuberculosis*의 Rv1625c에서 Lys-270과 Asp-339), 그리고 반응 중에 ATP의 ribose의 3'-hydroxyl group이  $\alpha$ -phosphate를 SN2 반응으로 공격해서 cAMP를 생성할 때 전이단계(transition state)의 분자를 안정화시키는 asparagine-arginine 잔기쌍(*M. tuberculosis*의 Rv1625c에서 Asn-346과 Arg-350)이 보존되어 있는 6개의 아미노산 잔기에 해당한다. Class III AC의 활성화에 필수적인 금속이온은 ATP의 3개의 인산기와 결합하여 안정

화시키며 ribose의 3'-hydroxyl group을  $\alpha$ -phosphate에 위치시키는 것을 돕는다. 전이단계를 안정화시키는 arginine은 ATP의  $\alpha$ -phosphate group의 음(-)전하를 중성화시키며, asparagine은 ribose의 conformation을 반응이 일어날 수 있도록 안정화시킨다. 활성을 가지는 것으로 증명된 AC의 아미노산 서열을 multiple alignment를 이용하여 비교해 보면 활성부위에 보존되어 있는 6개의 잔기 중에 금속이온과 결합하는 두 개의 aspartate 잔기는 필수적으로 보존되어 있다. 전이단계를 안정화시키는 arginine은 대부분의 AC에서 보존되어 있고, AC의 최적 활성을 갖는데 중요한 역할을 함이 증명되었다. 기질특이성을 부여하는 잔기쌍의 변이는 심한 편이다. 예를 들어 *M. tuberculosis* H37Rv의 Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c, Rv1358, Rv3646에서는 aspartate가 threonine으로 치환되어 있고, Rv0386과 Rv2488c에서는 asparagine으로 보존적으로 치환되어 있다[35]. 또한 기질특이성을 주는 잔기쌍 중 lysine은 양(+전하)를 띠는 asparagine과 glutamine으로 보존적으로 치환되어 있는 경우도 있다[35].

#### Class IV, Class V, Class VI

Class I에 속하는 AC를 가지는 *A. hydrophila*와 *Y. pestis*에는 class I에 속한 AC와는 아미노산 서열의 유사성이 없는 또 다른 AC가 발견되었는데, 이것을 class IV로 따로 분류하였다. 이들은 높은 온도(65°C)와 높은 pH 조건(pH 9.5)에 최적화된 생화학적 성질을 지니고 있다[38]. *Y. pestis*에 존재하는 class IV AC의 3차원 구조가 결정되어 보고되었다[13].

반추동물의 위에서 발견되는 혐기성 세균중 하나인 *Prevotella ruminicola* D31d에서 *E. coli*의 *cyaA* mutant를 complementation하는 유전자가 발견되었다 이 유전자의 산물은 cAMP를 생산하는 능력이 있었으나, 지금까지 알려진 AC의 아미노산 서열과 유사성을 갖고있지 않아서 class V로 따로 분류되었다. 이 AC의 분자량은 67 kDa으로 혐기성 세균 중에서는 처음으로 밝혀진 AC이다[12].

Class V와 마찬가지로 AC 유전자가 결손된 *E. coli*를 이용해 AC활성을 *E. coli*에 부여하는 유전자(*cyaC*)를 질소고정세균인 *Rhizobium etli*에서 발견할 수 있었다[40]. *cyaC* 유전자 역시 이미 알려진 AC유전자와는 유사성을 나타내지 않아 class VI로 새로 분류하였다. 이와 유사한 유전자가 *Mesorhizobium loti*, *Sinorhizobium meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens* 등에서 확인되었지만, 그것에 대한 기능은 아직 밝혀지지 않았다.

#### Mycobacterial adenylyl cyclase

*Mycobacterium*속의 *M. marinum*에서 31개, *M. avium*에서 12개, *M. leprae*에서 4개, *M. smegmatis*에서 10개, *M. tuberculosis* H37Rv에서 16개의 AC 유전자가 확인되었다[35]. 본 총설에서는 인간에게 결핵을 일으키는 *M. tuberculosis* H37Rv에서 발견

되는 16개의 AC에 대하여 연구된 결과를 다룰 것이다.

#### Rv1625c

*rv1625c* 유전자에 의해 인코딩되는 AC는 *M. tuberculosis*에서 가장 먼저 그 특성이 밝혀졌으며, 이 AC의 도메인 구성은 카복실말단에 CHD가, 아미노말단에는 6개의  $\alpha$ -helix로 구성된 막통과 도메인이 존재한다. 이는 6개의  $\alpha$ -helix로 구성된 2개의 막통과 도메인과 2개의 CHD를 가지는 포유류의 막결합 AC의 반쪽구조와 동일하다고 볼 수 있다(Fig. 1). Rv1625c은 포유류 세포 내에서도 AC로서 기능을 할 수 있다는 연구결과가 보고되었다[14,15,30].

#### Rv1264와 Rv1647

Rv1264는 카복실말단에 CHD 하나만을 포함한 단순한 형태로(Fig. 1), 모든 mycobacteria에서는 이와 동일한 orthologue들이 존재한다. Rv1264의 아미노말단은 자가억제 도메인으로서 작용한다[22]. 즉, 아미노말단 도메인이 제거되면 AC의 활성이 300배 증가함이 관찰되었다. 또한 pH에 따라 효소활성이 달라지는데, holoenzyme 상태일 때 산성인 pH 6.0에서 가장 높은 활성이 나타났으며, 정제된 아미노말단이 제거된 AC는 pH 5.5~8.0 범위에서 일정하게 높은 활성이 나타났다. 그리고 Rv1264의 3차원 구조의 규명과 돌연변이 연구로부터 아미노말단의 조절 도메인에 있는 10번째  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ N10 switch)가 pH에 반응하여 conformation이 변화하여 AC의 활성이 조절됨이 제안되었다[41].

Rv1647은 Rv1264와 유사한 도메인 구조를 가졌으며 Rv1264와는 반대로 알칼리 pH 범위 내에서 높은 효소활성이 나타났으며, detergent를 처리 하게 되면 효소활성이 증가됨이 관찰되었다. 반면에 높은 염 농도 범위에서는 효소활성이 억제되었다[32].

#### Rv1900c

Rv1900c의 아미노말단에는 약 300개의 아미노산으로 구성된  $\alpha\beta$ -hydrolase 도메인을 포함하는데(Fig. 1), 이 도메인에서 실질적으로 가수분해 활성은 검출하지 못하였다. Rv1900c의 3차원 구조로부터 이 AC는 homodimer의 4차구조를 가지지만 2개의 활성부위 중 한 개만이 기능을 함이 밝혀졌다. 즉, homodimerization에 의해 2개의 CHD의 interface에 만들어진 2개의 활성부위 중 하나에만 금속이온과 ATP가 결합되어 있음이 관찰되었다[37]. Rv1900c는 AC 활성의 약 20% 정도의 guanylyl cyclase 활성도 가지고 있음이 증명되었다. 진화학적으로 CHD의 homodimerization에 의해 활성부위가 만들어지는 AC와 CHD의 heterodimerization에 의해 활성부위가 만들어지는 AC의 중간단계로 생각된다.

#### Rv0386

Rv0386은 CHD 옆에 AAA+ATPase 도메인과 helix-

turn-helix DNA 결합 도메인이 나란히 나열된 구조로 되어있다(Fig. 1). 이 AC는 AC 활성 이외에 guanylyl cyclase 활성을 가지고 있다. 그 이유는 Rv0386의 활성부위에는 기질특이성을 부여하는 lysine-aspartate 잔기쌍 대신 glutamine-asparagine 잔기쌍이 존재하는데, 이 아미노산들이 GTP를 기질로서 인식하기 때문이다. Glutamine-asparagine 잔기쌍을 원래의 lysine-aspartate 잔기쌍으로 치환하면 guanylyl cyclase 활성이 사라짐이 관찰되었다[10,25]. Rv0386은 helix-turn-helix DNA 결합 도메인이 있음에도 불구하고 세포벽에 붙어있는 것으로 밝혀졌고 결핵균이 대식세포(macrophage)에 감염 시에 대식세포 내의 cAMP의 농도를 크게 증가시키는 AC로 규명되었다. Rv0386 결손은 쥐 모델에서 결핵균의 병형성의 감소를 일으킨다[2].

#### Rv1120c

Rv1120c는 164개의 아미노산만으로 이루어진 class III AC 중 CHD만을 갖는 가장 작으면서 단순한 형태이다(Fig. 1). 이 유전자는 frameshift 현상에 의해 pseudogene형태로 존재한다. 따라서 *M. avium* TN104에서 Rv1120c와 orthologue인 Ma1120 유전자산물을 바탕으로 Rv1120c의 생화학적 및 효소학적 특성을 유추할 수 있었다. Ma1120 유전자 산물은  $Mn^{2+}$  ATP 존재하에 최고의 활성이 보인다. 포유류의 AC 활성억제자로 잘 알려진 P-site 화합물(2'-deoxy-3'-AMP와 2',5-di-deoxy-3'-ATP)에 의해서는 효소활성이 억제되는 현상이 관찰되었다[34].

#### Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c, Rv2435c, Rv3645

Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c, Rv2435c 그리고 Rv3645 유전자 산물은 공통적으로 HAMP (histidine kinase, adenylyl cyclases, methyl-accepting chemotaxis protein and phosphatase) 도메인을 가지고 있다는 특징이 있다(Fig. 1)[35]. 약 50개의 아미노산으로 구성된 HAMP 도메인은 일반적으로 막통과 도메인과 효과 도메인(effector domain)사이의 linker의 역할을 하며 막통과 도메인에서 인지한 외부 신호를 효과 도메인에 전달하는 역할을 한다. 이들 5개의 유전자의 아미노산 서열은 아미노말단의 HAMP 도메인과 막통과 도메인에 비해 CHD에서 가장 높은 유사성을 보이는데, 이는 각각의 AC의 신호인지 기작이 상이함을 나타낸다. 실제로 HAMP 도메인은 Rv3645의 효소활성을 증가시키는 반면 Rv1319c의 활성은 억제시켰다. 하지만 HAMP가 조절 도메인으로서 어떻게 AC의 활성을 조절하는지에 대한 구체적인 기작은 아직 밝혀지지 않았다[24]. Rv1318c, Rv1319c, Rv1320c 그리고 Rv3645의 경우는 기질특이성을 부여하는 lysine-aspartate 잔기쌍이 lysine-threonine으로 치환되어 있으며[35], Rv1319c의 경우 포유류의 세포질에 존재하는 AC와 마찬가지로 bicarbonate 이온( $HCO_3^-$ )에 의해 활성이 증가함이 보고되었다[9].

## Rv2212

Rv1264와 43%의 유사성을 보이는 Rv2212는 이미 보고된 AC 중 촉매속도가 가장 빠르나 ATP에 대한 친화력은 낮다. 불포화지방산은 이 유전자의 기질에 대한 친화력을 증가시켜 AC활성을 증가시킨다[1]. 또한 *Thermobifida*와 *Nocardia*에서도 이와 유사한 AC를 인코딩하는 유전자가 발견이 되었다.

## Rv0891c

Rv0891c는 한 개의 CHD로 구성된 단순한 형태로(Fig. 1), helix-turn-helix DNA 결합 도메인을 가지는 Rv0386, Rv2488c 그리고 Rv1358과 CHD 부분에서 60~70% 정도 유사성을 가진다. 이 사실로부터 Rv0891c는 이들 AC와 유사한 생화학적 특성을 가질 것으로 예상할 수 있다[35].

## cAMP의 mycobacteria에서의 역할

Mycobacteria에서의 cAMP의 영향은 우선 결핵을 일으키는 원인균으로서, 결핵균(*M. tuberculosis*)이 숙주내로 침입하게 되면, 숙주 대식세포의 phagocytosis 작용에 의해 포식 되고 phagosome내에 머물게 된다. 숙주는 phagosome 내의 병원균을 죽이기 위해 다양한 방어기작을 펼치게 되는데, 그 중 하나가 lysosome-phagosome fusion을 들 수 있다. 이것은 lysosome이 phagosome과 결합하게 되면 lysosome 내의 가수분해 효소와 H<sup>+</sup>ATPase에 의해 phagosome 내의 세균이 소화되는 작용을 말한다. 이 과정을 위해 phagosome 막에서 lysosome과 fusion시키는 역할을 하는 phagosomal actin의 조립 과정이 요구되는데, cAMP는 phagosomal actin 조립과정을 억제한다고 알려져 있다[16]. 따라서 phagosome 내의 cAMP 농도가 높아지면 phagosome-lysosome fusion을 억제하여 대식세포 내의 결핵균의 생존력을 높여준다[16]. 비병원성균인 *M. smegmatis*의 경우 일단 대식세포에 의해 포식 되면 48시간 이내에 죽어버리는 특징이 있다[3]. 이 밖에도 *M. microti* 역시 대식세포에 감염되면 대식세포 내의 cAMP의 농도가 크게 증가하며, cAMP가 lysosome-phagosome fusion 과정을 억제한다고 알려졌으며, *M. bovis*나 *M. leprae*의 경우에도 일단 숙주 대식세포 내로 들어가면 일시적으로 대식세포 내의 cAMP량이 증가된다고 알려졌다[27].

이처럼 cAMP는 신호전달 과정에서 중요한 요소로서 역할을 하기 때문에 cAMP가 세포내에 적절한 농도로 유지되는 것 역시 중요하다. Phosphodiesterase (PDE)는 cAMP를 AMP로 가수분해를 시키면서 세포 내의 cAMP농도의 항상성을 조절한다. mycobacteria에서 PDE를 인코딩하는 유전자로는 *M. tuberculosis* H37Rv의 Rv0805 유전자, *M. avium*의 Mb0828 유전자 그리고 *M. leprae*의 ML2210 유전자가 알려져 있으며, *M. smegmatis*를 포함한 다른 mycobacteria에서는 아직 PDE 유전자가 확인되지 않았다. 이는 PDE 외의 cAMP의 세포 외로의 분비등의 다른 기작에 의해 mycobacteria 세포 내의 cAMP

항상성이 조절 될 수도 있다는 사실을 암시한다[33].

최근 *M. tuberculosis*의 대식세포로의 감염 시에 대식세포 내의 cAMP의 농도 증가는 Rv0386 AC에 의한 것으로 증명되었으며, 대식세포 내의 cAMP 농도의 증가는 protein kinase A (PKA)-cAMP response element binding protein (CREB) 신호전달 경로를 통해 proinflammatory cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 합성을 증가시킴이 증명되었다[2]. 대식세포에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비는 폐 조직에 caseous necrosis를 유발하며 딱딱한 조직인 면역세포와 격리된 육아종 (granuloma)의 형성을 유도하여 결핵균의 숙주 내에서 생존률을 증가시킨다. 따라서 결핵균에 의한 면역세포 내에서의 cAMP의 증가는 결핵균의 숙주 내에서의 생존률을 증가시키게 된다.

## 감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의해 연구되었음.

## References

1. Abdel, M. A., I. Tews, J. E. Schultz, and J. U. Linder. 2006. Fatty acid regulation of adenylyl cyclase Rv2212 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J.* **273**, 4219-4228.
2. Agarwal, N., G. Lamichhane, R. Gupta, S. Nolan, and W. R. Bishai. 2009. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a *Mycobacterium tuberculosis* adenylyl cyclase. *Nature* **460**, 98-102.
3. Anes, E., P. Peyron, L. Staali, L. Jordao, M. G. Gutierrez, H. Kress, M. Hagedorn, I. Maridonneau-Parini, M. A. Skinner, A. G. Wildeman, S. A. Kalamidas, M. Kuehnel, and G. Griffiths. 2006. Dynamic life and death interactions between *Mycobacterium smegmatis* and J774 macrophages. *Cell Microbiol.* **8**, 939-960.
4. Antoni, F. A. 2000. Molecular diversity of cyclic AMP signalling. *Front Neuroendocrinol.* **21**, 103-132.
5. Baillie, L. and T. D. Read. 2001. *Bacillus anthracis*, a bug with attitude! *Curr. Opin. Microbiol.* **4**, 78-81.
6. Baker, D. A. and J. M. Kelly. 2004. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases. *Mol. Microbiol.* **52**, 1229-1242.
7. Botsford, J. L. and J. G. Harman. 1992. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**, 100-122.
8. Buck, J., M. L. Sinclair, L. Schapal, M. J. Cann, and L. R. Levin. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines unique signaling molecule in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 79-84.
9. Cann, M. J., A. Hammer, J. Zhou, and T. Kanacher. 2003. A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. *J. Biol. Chem.* **278**, 35033-35038.
10. Castro, L. I., C. Hermsen, J. E. Schultz, and J. U. Linder.

2005. Adenylyl cyclase Rv0386 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv uses a novel mode for substrate selection. *FEBS J.* **272**, 3085–3092.
11. Chaloupka, J. A., S. A. Bullock, V. Iourgento, L. R. Levin, and J. Buck. 2006. Autoinhibitory regulation of soluble adenylyl cyclase. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 361–368.
  12. Cotta, M. A., T. R. Whitehead, and M. B. Wheeler. 1998. Identification of a novel adenylate cyclase in the ruminal anaerobe, *Prevotella ruminicola* D31d. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 257–260.
  13. Gallagher, D. T., N. N. Smith, S. K. Kim, A. Heroux, H. Robinson, and P. T. Reddy. 2006. Structure of the class IV adenylyl cyclase reveals a novel fold. *J. Mol. Biol.* **362**, 114–122.
  14. Guo, Y. L., U. Kurz, A. Schultz, J. U. Linder, D. Dittrich, C. Keller, S. Ehlers, P. Sander, and J. E. Schultz. 2005. Interaction of Rv1625c, a mycobacterial class IIIa adenylyl cyclase, with a mammalian congener. *Mol. Microbiol.* **57**, 667–677.
  15. Guo, Y. L., T. Seebacher, U. Kurz, J. U. Linder, and J. E. Schultz. 2001. Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *EMBO J.* **20**, 3667–3675.
  16. Kalamidas, S. A., M. P. Kuehnle, P. Peyron, V. Rybin, S. Rauch, O. B. Kotoulas, M. Houslay, B. A. Hemmings, M. G. Gutierrez, E. Anes, and G. Griffiths. 2006. cAMP synthesis and degradation by phagosomes regulate actin assembly and fusion events: consequences for mycobacteria. *J. Cell Sci.* **119**, 3686–3694.
  17. Kataoka, T., D. Broek, and M. Wigler. 1985. DNA sequence and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* **43**, 493–505.
  18. Kido, M., F. Shima, T. Satoh, T. Asato, K. Kariya, and T. Kataoka. 2002. Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3117–3123.
  19. Kobayashi, M., J. Buck, and L. R. Levin. 2004. Conservation of functional domain structure in bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclases in bacteria and eukaryotes. *Dev. Genes Evol.* **214**, 503–509.
  20. Krupinski, J., F. Coussen, H. A. Bakalyar, W. J. Tang, P. G. Feinstein, K. Orth, C. Slaughter, R. R. Reed, and A. G. Gilman. 1989. Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**, 1558–1564.
  21. Ladant, D. and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**, 172–176.
  22. Linder, J. U., A. Schultz, and J. E. Schultz. 2002. Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an auto-inhibitory N-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 15271–15276.
  23. Linder, J. U. and J. E. Schultz. 2003. The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal.* **15**, 1081–1089.
  24. Linder, J. U., A. Hammer, and J. E. Schultz. 2004. The effect of HAMP domains on class IIIb adenylyl cyclases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2446–2451.
  25. Linder, J. U. 2005. Substrate selection by class III adenylyl cyclases and guanylyl cyclases. *IUBMB Life* **57**, 797–803.
  26. Linder, J. U. 2006. Class III adenylyl cyclases: molecular mechanisms of catalysis and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* **63**, 1736–1751.
  27. Lowrie, D. B., V. R. Aber, and P. S. Jactett. 1979. Phagosome-lysosome fusion and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in macrophages infected with *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis* BCG or *Mycobacterium lepraemurium*. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 431–441.
  28. Mock, M., E. Labruyère, P. Glaser, A. Danchin, and A. Ullmann. 1988. Cloning and expression of the calm-odulin-sensitive *Bacillus anthracis* adenylate cyclase in *Escherichia coli*. *Gene* **64**, 277–284.
  29. Patel, T. B., Z. Du, S. Pierre, L. Cartin, and K. Scholich. 2001. Molecular biological approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* **269**, 13–25.
  30. Reddy, S. K., M. Kamireddi, K. Dhanireddy, L. Young, A. Davis, and P. T. Reddy. 2001. Eukaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **276**, 35141–35149.
  31. Roy, A., A. Danchin, E. Joseph, and A. Ullmann. 1983. Two functional domains in adenylate cyclase of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **165**, 197–202.
  32. Shenoy, A. R., N. P. Sreenath, M. Mahalingam, and S. S. Visweswariah. 2005. Characterization of phylogenetically distant members of the adenylate cyclase family from mycobacteria: Rv1647 from *Mycobacterium tuberculosis* and its orthologue ML1399 from *M. leprae*. *Biochem. J.* **387**, 541–551.
  33. Shenoy, A. R., N. Sreenath, M. Podobnik, M. Kovacevic, and S. S. Visweswariah. 2005. The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. *Biochemistry* **44**, 15695–15704.
  34. Shenoy, A. R., A. Srinivas, M. Mahalingam, and S. S. Visweswariah. 2005. An adenylyl cyclase pseudogene in *Mycobacterium tuberculosis* has a functional ortholog in *Mycobacterium avium*. *Biochimie* **87**, 557–563.
  35. Shenoy, A. R. and S. S. Visweswariah. 2006. Mycobacterial adenylyl cyclases: biochemical diversity and structural plasticity. *FEBS Lett.* **580**, 3344–3352.
  36. Shenoy, A. R. and S. S. Visweswariah. 2006. New messages from old messengers: cAMP and mycobacteria. *Trends Microbiol.* **14**, 543–550.
  37. Sinha, S. C., M. Wetterer, S. R. Sprang, J. E. Schultz, and J. U. Linder. 2005. Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *EMBO J.* **24**, 663–673.
  38. Sismeiro, O., P. Trotot, F. Biville, C. Vivares, and A. Danchin. 1998. *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **180**, 3339–3344.

39. Sunahara, R. K. and R. Taussig. 2002. Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.* **2**, 168-184.
40. Téllez-Sosa, J., N. Soberón, A. Vega-Segura, M. E. Torres-Márquez, and M. A. Cevallos. 2002. The *Rhizobium etli* *cyaC* product: characterization of a novel adenylate cyclase class. *J. Bacteriol.* **184**, 3560-3568.
41. Tews, I., F. Findeisen, I. Sinning, A. Schultz, J. E. Schultz, and J. U. Linder. 2005. The structure of a pH-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science* **308**, 1020-1023.
42. Yahr, T. L., A. J. Vallis, M. K. Hancock, J. T. Barbieri, D. W. Frank, and Y. Exo. 1998. An adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13899-13904.

### 초록 : 마이코박테리아의 adenylyl cyclase

전한승<sup>1</sup> · 고인정<sup>2</sup> · 오정일<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 미생물학과, <sup>2</sup>KAIST 부설 한국과학영재학교)

Adenylyl cyclase (AC)는 ATP로부터 cAMP를 형성하는 반응을 촉매한다. AC에 의해 생산된 cAMP는 다양한 신호전달 경로에서 이차전달자로 사용되고 많은 종에서 다양한 세포기능을 조절한다. AC는 1차구조에 따라 6개의 그룹으로 나눌 수 있다. 진핵생물과 *Mycobacterium* 속에 속하는 세균에서는 class III에 속하는 AC만이 발견된다. Class III에 속하는 AC의 경우 catalytic cyclase 도메인이 dimer를 형성해야만 활성부위가 형성되고 활성을 가지게 된다. 포유류의 AC는 하나의 polypeptide에 2개의 catalytic cyclase 도메인을 가지고 있고, 이 두 개의 도메인이 intramolecular dimerization을 통해서 활성부위를 형성한다. 반면에 mycobacteria의 AC는 polypeptide에 한 개의 catalytic cyclase 도메인을 가지고 있고, homodimer의 4차구조를 형성하여 활성을 가지게 된다. Class III AC의 활성을 위해서 필요한 6개의 아미노산 잔기가 활성부위에 잘 보존되어 있다. 이 6개의 아미노산 잔기는 Mg<sup>2+</sup>과 결합을 하는 2개의 aspartate 잔기쌍, 기질특이성을 부여하는 lysine-aspartate 잔기쌍, 그리고 반응 전이상태를 안정화시키는 arginine-asparagine 잔기쌍들로 이루어져 있다. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv에서는 16개의 AC 유전자가 발견되었으며, 이 AC의 연구된 특성에 대해 본 총설에서 다룰 것이다.