

## 대장균 Ornithine Transcarbamylase Threonine-56 돌연변이 클론 확립

김지미, 오영선, 이선주  
제주대학교 자연과학대학 화학과

### Introduction of Mutation at Threonine-56 of *Escherichia coli* Ornithine Transcarbamylase

Kim Ji-Mee, Oh YoungSun and Lee Sunjoo  
Department of Chemistry, College of Natural Sciences,  
Cheju National Univ., Cheju 690-756

#### Abstract

*Escherichia coli* ornithine transcarbamylase catalyzes the condensation reaction of ornithine and carbamyl phosphate to produce citrulline. To study the structure and function relationship of the enzyme, Threonine-56 was selected to be mutated. This residue has been suggested to be located at the binding pocket of carbamyl phosphate. Threonine-56 is one of amino acids in the consensus stretch of phosphate binding proteins. It has been substituted to serine, valine and glycine to observe the size and the charge effect. Site-directed mutagenesis by the polymerase chain reaction(PCR) was applied. Each mutant *arg I* gene was obtained, and was ligated to the prokaryotic expression vector pKK223-3. TB 2 *E. coli* strain which does not have ornithine transcarbamylase activity has been used to express mutant *arg I* genes. The result of DNA gel electrophoresis after Hind III/EcoRI digestion of cloned mutant genes indicated that mutant clones were successfully constructed. For further work, DNA sequencing and purification of mutant enzymes will be performed.

[Supported by grants from Ministry of Education]

#### 1. 서론

##### Ornithine Transcarbamylase의 기능 및 특성

Ornithine으로부터 urea를 생성하는 urea cycle은 생체 안에

존재하는 과량의 nitrogen을 생체 밖으로 제거시키는 중요 신진대사의 단계에 위치하고 있다. Ureotelic animals에 의해서는 배출되는 ammonia의 약 90%가 urea의 형태로 존재한다. 생체 안에서 존재하는 amino acids의 deamination은 주로 transamination reaction에 의하여 일어나지만, amides와 amino nitrogen은 ammonia를 발생시키는 근원이 된다. 이 urea cycle은 4 enzymes이 cyclic manner로 작용한다. 이 cycle에 의하여 생성되는 urea의 한 nitrogen atom은 ammonia로부터 유래하고 두 번째 것은 aspartate로부터 유래한다. 또한 urea의 carbonyl group은 carbon dioxide로부터 유래하며, ornithine은 nitrogen과 carbonyl group의 carrier로 작용하고 매 cycle마다 재생된다. 본 실험에서 연구한 ornithine transcarbamylase (OTCase; EC 2.1.3.3)는 urea cycle의 첫 단계에서 ornithine과 carbamyl phosphate의 축합반응으로부터 citrulline을 합성하는 반응을 촉진하는 효소이다.

고등동물에 존재하는 ornithine transcarbamylase는 3개의 똑같은 subunits로 구성되어 있고 분자량은 약 110 kD이며, ornithine으로부터 citrulline을 생성하는 정반응만을 촉매하는 anabolic enzyme이다. 그러나, eukaryote 중에서는 yeast, 그리고 일부의 prokaryote에서는 역반응을 촉매하는 catabolic enzyme도 존재한다. 대부분의 ornithine transcarbamylase들은 trimer의 구조를 가지지만 *Pseudomonas*처럼 hexamer 또는 dodecamer로 존재하기도 한다. 한편, human liver와 *E. coli*로부터 추출된 ornithine transcarbamylase의 등전점(Isoelectric point, pI)은 각각 7.95와 4.9이다(Pierson *et al.*, 1977).

다양한 세포들로부터 얻은 anabolic ornithine transcarbamylase는 매우 비슷한 반응속도 성질들을 갖는다. *E. coli*로부터 얻은 ornithine transcarbamylase는 Michaelis-Menten Kinetics을 따르고, pH 8이상에서 기질의 결합과 생성물의 이탈이 모두 순차적이다. 첫반응에서, 효소는 첫 번째 기질인 carbamyl phosphate과 결합하고, 두 번째 생성물인 inorganic phosphate을 방출한다(Marshall and Cohen, 1972; Legrain and Stalon, 1976; Kuo *et al.*, 1985a).

Ornithine transcarbamylase는 기질들에 대한 선택의 고유성이 매우 강하여 ornithine과 carbamyl phosphate의 유사 기질의 경우에 본래의 기질들에 비해서 5% 미만의 고유성을 가지고 있을 뿐이다. 이와같은 ligands들이 효소에 결합하고 또한 transcarbamylation의 촉매작용에 관여하는, 효소의 활성화 자리에 있는 amino acid residues는 결합하는 ligands에 따라 크게 2가지로 분류할 수 있다. 즉, chemical modification 실험결과에 의하면 carbamyl phosphate의 결합에는 적어도 한 개씩의 lysine (Marshall & Cohen, 1980)과 arginine group(Marshall & Cohen,

1980; Kantrowitz et al., 1980)이 작용하며 또 다른 기질인 ornithine 결합에는 cysteinyl group(Marshall & Cohen, 1980)이 작용한다. 이 결과로 제시된 amino acid residue들의 효소 단백질에서의 구조적 역할 및 촉매 기능에 대한 역할이 molecular level에서 좀 더 세밀하게 관찰되었다. *E. coli*의 *arg I* 유전자에 의하여 expression되는 Ornithine transcarbamylase의 arginine 57의 residue를 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 glycine으로 치환시킨 돌연변이 효소의 경우에 이 residue가 carbamyl phosphate의 결합에 역할을 하며 induced fit 형태의 단백질 구조의 변화를 유발하여 효소와 carbamyl phosphate의 착물(E-CP binary complex)에 대한 ornithine 결합의 고유성을 높여준다. 이 arginine residue에 의하여 전파되는 효소의 isomerization은 촉매작용에 중요한 역할을 하여 이것이 없는 돌연변이 효소는 그 활성이 20,000배나 감소하였다(Kuo et al., 1988). 한편, 같은 방법에 의하여 Cysteine 273를 alanine으로 치환시킨 돌연변이 효소로 실험한 반응속도론적 결과에 의하면 이 cysteine residue는 active pocket에서 ornithine과 금속 아연이온이 결합하는 residue로서 작용한다(S. Lee et al., 1990; Kuo et al., 1990). Ornithine transcarbamylase는 고등동물에서는 mitochondrial matrix에 존재하고 효소의 precursor는 핵(nucleus)에서 expression되며 mitochondrial targeting sequences가 N-terminus 위에 붙어있다. 이 leader peptide의 크기는 약 4kD이며 효소 단백질이 mitochondria의 세포막에 있는 receptor에 의하여 translocation된 후에, Zn(II)에 의존하는 matrix protease에 의하여 제거된다(Horwich et al., 1984). 이 precursor에 대한 nucleotides의 sequences와 이로부터 산출된 amino acids sequences가 고등동물의 경우에는 human(Horwich et al., 1984; Hara et al., 1988), mouse(Scherer et al., 1988), 그리고 rat(Krause et al., 1985)에 대해서 알려져 있다. Ornithine transcarbamylases는 진화하는 동안 잘 보존되어서 일 예로 Human과 rat의 ornithine transcarbamylase는 놀라울 정도의 동질성을 가지고 있다. 이 두 효소들은 같은 수의 amino acids를 가지고 있으며, amino acids 단계에서 93%, 그리고 DNA의 open reading frame(ORF)에서 89%의 동일성을 가지고 있다. Prokaryotes의 경우에는 *E. coli*의 *arg I* (Bencini et al., 1983; Kuo et al., 1988)와 *argF*(Bencini et al., 1983), 그리고 다른 prokaryotes의 유전자의 nucleotides의 sequences가 알려져 있다.

#### Ornithine transcarbamylase와 Aspartate transcarbamylase의 비교

*E. coli*로부터 얻은 Ornithine transcarbamylase와 Aspartate transcarbamylase은 카바밀 인산에 의한 transcarbamylation 반응을 촉진시킨다. aspartate transcarbamylase의 holoenzyme은 3개의 dimeric regulatory subunits와 2개의 trimeric catalytic

subunits으로 구성되어 있다. ornithine transcarbamylase와 같이, aspartate transcarbamylase의 catalytic subunit은 분자량(Mr)이 102,000으로 3개의 동일한 subunit으로 구성되어 있다(Konigsberg & Henderson, 1983). 모든 *E. coli*의 ornithine transcarbamylase와 aspartate transcarbamylase에 관하여 아미노산 염기서열의 전반부의 반은 카바밀 인산의 binding domain에 해당한다.

carbamyl phosphate에 대한 두 효소의 binding domain은 동일하다. *E. coli arg I*와 *pyrB* 사이의 전 homology는 대략 35~40%이다(Vliet et al., 1984). aspartate transcarbamylase의 카바밀 인산 domain을 ornithine transcarbamylase의 카바밀 인산 domain으로 치환시킨 chimeric aspartate transcarbamylase은 거의 완전한 활성을 나타냈다(Houghton et al., 1989). 즉, chimeric 효소의 반응속도론적 성질이 wild type aspartate transcarbamylase의 반응속도 인자들과 아주 유사하게 나타났다.

carbamyl phosphate의 phospho oxygens에 결합하는 Aspartate transcarbamylase(ATCase)의 amino acid residue에는 Table 1에서 보여진 것처럼 약 7개가 있다. 그 중 2개의 Threonines이 작용을 하고 있다. 이와 같은 Threonine residues는 phosphate binding proteins에 자주 나타나는 amino acid residues로서, 일반적으로 protein kinases에 의하여 phosphorylation이 되는 target residues들이다. Ornithine transcarbamylase(OTCase)도 ATCase와 carbamyl phosphate binding domain이 매우 흡사하므로 같은 amino acid residues들이 ligand로서 작용하리라 추정된다.

Table 1. Comparison of residues implicated in binding and catalysis of ornithine and aspartate transcarbamylase from *E. coli* K-12

	Amino Acid Residues in aspartate transcarbamylase <sup>a</sup>	Amino Acid Residues in Ornithine transcarbamylase <sup>b</sup>
	Serine 52	Serine 55
	Threonine 53	Threonine 56
	Arginine 54	Arginine 57
Carbamyl phosphate domain	Threonine 55	Threonine 58
	Serine 80	Serine 81
	Lysine 84	Lysine 86
	Arginine 105	Arginine 106
	Histidine 134	Histidine 133
	Arginine 167	Arginine 165
Amino-acid domain	Arginine 229	
	Glutamine 231	
	Leucine 267	Leucine 274

<sup>a</sup> Data taken from Honzatco & Lipscomb(1982).

<sup>b</sup> Data taken from Bencini et al.(1983), and Kuo et al.(1988).

carbamyl phosphate가 결합하는 효소상의 리간드는 어떠한 amino acid residues가 있는가? 이에 대한 정확한 연구 결과는 아주 미미한 정도이다. 특히, 이 효소의 3-dimensional structure가 밝혀지지 않은 상태에서 carbamyl phosphate가 결합하는 효소상의 아미노산 리간드를 정확히 추정하여 알아낸다는 것은 쉽지 않다. 그래서, 지금까지 보고된 연구결과에서 얻은 간접적 증거(circumstantial evidences)로부터 carbamyl phosphate의 binding에 관여하는 효소상의 아미노산의 발견과 그것들을 확인하는 필요성이 대두되었다.

본 연구의 궁극적인 목표는 carbamyl phosphate가 OTCase에 binding할 때 enzyme isomerization을 유발하는데, Threonine 56 residue가 구조변환에 어느 정도 기여를 하는지 정량적으로 밝혀내려고 한다. ornithine transcarbamylase의 Threonine 56이 구조와 촉매기능에 관여하는 자세한 mechanism을 molecular level에서 연구하는데 예비적으로 꼭 필요한 단계로서 돌연변이 효소를 얻는 것이 필요하고, 이는 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 얻었다. 연구범위는 Threonine 56의 역할을 알아내기 위한 한 방법으로 돌연변이체를 확립하는 것이다. 즉, 본 연구실에서 보유하고 있는 *E. coli* OTCase의 *arg I*를 이용하여 Threonine 56이 serine, valine, Gly로 치환된 돌연변이 OTCase 발현 시스템을 확립한다.

## 2. 재료 및 방법

### 시약

PCR(DNA Polymerase Chain Reaction)에 이용되는 Oligodeoxynucleotides는 Bionia(Korea)에서 합성하였다. *Taq* DNA polymerase 대신 사용한, proofreading 기능을 지닌 Vent DNA polymerase는 New England Biolab(USA)에서 구입하였고, 제한효소(HindIII, EcoRI)와 디옥시뉴클레오티드는 BM Korea에서 구입했다. Prokaryotic expression vector인 pKK223-3는 Pharmacia(Sweden)에서, Affinity chromatography에 사용되는 Matrex Blue Gel A와 DNA fragments의 여과시키는데 이용되는 Microcon은 Amicon(USA)에서 구입하였다. Ampicillin, Trizma base, Agarose, Urea, Phenol, Ethanol, Sodium acetate, KCl, NaCl, Ammonium sulfate, 그외  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Ornithine, Carbamyl phosphate, antipyrine, 2, 3-butadionmonoxime, (SIGMA, St Louis, Mo, USA)등 효소아세이와 molecular biology에 필요한 시약들은 모두 SIGMA에서 구입하여 사용하였다. RNase, T-Vector, Ligase, DNA Purification Kit, 제한효소인 HindIII, EcoRI (Pro-

mega, New England Biolab, USA), Yeast extract, Tryptone(DI-FCO, USA), Sequencing kit(Pharmacia, Sweden), 등이 본 연구에서 사용되었다.

### 방법

#### *E. coli* Genomic DNA 추출

*E. coli* Genomic DNA은DH5 $\alpha$  strain[*hsdR recA1*  $\Delta$ (*argF-lacZYA*) U169 $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15]로부터 추출되었다. 먼저, DH5 $\alpha$ 을 LB plate에 도말하여 DH5 $\alpha$  single colony을 취해 LB 배지에서 12시간 동안 배양한 후, Bacterial cell을 500rpm에서 5분간 원심분리기로 침전시켰다. 이 침전물을 TE 567 $\mu$ l, 10% SDS 3 $\mu$ l, 20mg/ml Proteinase K을 포함하는 완충용액으로 resuspension하고 난 후, 37 $^{\circ}$ C 에서 1 hr동안 반응시켰다. 5M NaCl을 100 $\mu$ l 가하고 잘 혼합시켰다. 순서적으로, Cetyl Tetra Ammonium Bromide/NaCl 용액을 80 $\mu$ l 가하고 용혈된 혼합물을 65 $^{\circ}$ C에서 10분동안 보관하였다. 세포 lysate을 우선 chloroform/isoamyl alcohol(24 : 1)로 처리한 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)로 처리하여 추출하였다. Genomic DNA에 isopropyl alcohol 0.6배 가하여 침전시키고, DNA 침전물을 70% Ethanol로 세척한다. genomic DNA을 TE 100 $\mu$ l에 resuspension시켰다.

#### *arg I* 유전자 증폭과 Cloning

*arg I* 유전자를 증폭하기 위해 2개의 Oligodeoxynucleotides를 디자인하여 합성하였다. Table 2에서 보듯이 N-말단 Primer의 염기서열은 5'-CA GGT GAA TTC ATG TCC GGG TTT TAT CAT AAG CAT-3'이고, C-말단의 Primer 염기서열은 5'-CA TGT AAG CTT TTA TTT ACT GAG CGT CGC GAC CAT-3'이었다. Prokaryotic expression vector, pKK223-3에 직접 클로닝을 하기 위해 EcoRI 과 HindIII에 해당하는 Restriction enzyme sites을 각각의 N-말단과 C-말단 염기서열 끝에 첨가시켰다. Restriction enzyme sites은 N-말단과 C-말단 염기서열에 밑줄을 그어 놓았다. PCR은 Genecycler (BioRad, USA)을 이용하여 수행되었으며, *arg I* 유전자는 2 $\mu$ l 정도의 genomic DNA, 2mM dNTP 10 $\mu$ l, 각각의 N-말단과 C-말단 primers 100pmol, 10x reaction buffer 10 $\mu$ l, 2.5unit의 Vent DNA polymerase 를 함유하여 최종 용액 부피가 100 $\mu$ l에서 증폭시켰다. Denaturation 온도는 94 $^{\circ}$ C 30초, Annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C 1분, Extension 온도는 72 $^{\circ}$ C 2분으로 하였다. Amplification에 대한 더 자세한 사항은 Molecular Cloning의 방법

을 참고하였다. 증폭된 *arg I* 유전자는 1% agarose gel electrophoresis에 의해 확인되었다.

#### Site-Directed Mutagenesis

돌연변이된 *E. coli arg I* 유전자를 합성하는데 PCR 방법을 응용하였다. PCR방법으로 point mutation시키는 방법의 간략한 scheme은 Figure 1과 같다. Table 2와 같이 디자인된 2개의 돌연변이 PCR primers은 각 돌연변이의 DNA 중간체를 합성

하는데 이용하였다. 전체길이의 돌연변이된 *arg I* 유전자는 5'-N terminal과 3'-C terminal primers을 사용하여 위에서 언급한대로 만들어진 2개의 DNA 중간체로부터 증폭되었다 (Denaturation, 94°C, 30 sec; Annealing, 65°C, 1 min; Polymerization, 72°C, 2 min). 증폭된 돌연변이 *arg I* 유전자들은 agarose gel electrophoresis을 하여서 합성된 DNA가 1.0kb의 크기를 갖음을 확인하였다.

Table 2. Amino acid & Mutagenic primers

	Amino acid	Codon	Oligodeoxynucleotides(5'-3')
Wild type	N-terminus		CA GGT GAA TTC ATG TCC GGG TTT TAT CAT AAG CAT
	C-terminus		CA TGT AAG CTT TTA TTT ACT GAG CGT CGC GAC CAT
Mutant	Thr 56	ACT	
	Ser 56	AGC	GAA AAA GAC TCG <u>AGC</u> CGT ACC CGA TGC TCT TTC TCG GGT ACG <u>GCT</u> CGA GTC TTT TTC GAA GAT GAG
	Gly 56	GGT	GAA AAA GAC TCG <u>GGT</u> CGT ACC CGA TGC TCT TTC TCG GGT ACG <u>ACC</u> CGA GTC TTT TTC GAA GAT GAG
	Val 56	GTT	GAA AAA GAC TCG <u>GTT</u> CGT ACC CGA TGC TCT TTC TCG GGT ACG <u>AAC</u> CGA GTC TTT TTC GAA GAT GAG

Amino acid 및 DNA sequences는 Kuo et al.(1988)에 발표된 *arg I* gene의 DNA sequences를 참고로 함.

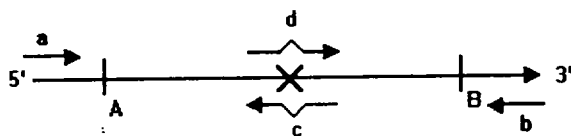


Figure 1. Strategy for PCR Site-directed Mutagenesis

- A, B : restriction enzyme site
- c, d : mutant primers
- a : 5'-terminus primer
- b : 3'-terminus primer

#### 돌연변이 *arg I* 유전자의 클로닝

증폭된 돌연변이 *arg I* 유전자를 HindIII EcoR I으로 double digestion시키고, 같은 제한효소로 자른 pKK223-3 *E. coli* 발현벡터에 ligation시켰다. 부분적으로 deletion mutation된 *arg I* 유전자를 가지고 있으며, *argF* 유전자가 완전히 deletion 되어 있어 오니틴 트랜스카바미라제의 기능이 없는 *E. coli* TB 2 cell [*E. coli* K-12 :  $\Delta(arg I - pyrB I) argF^-$ ]에 형질전환시켰다. 형질전환 시키는 방법은 shot-gun 방법을 이용하였으며 screening은 발현벡터가 ampicillin 분해 유전자를 가지고 있기 때문에 LB 배지에 이를 50 $\mu$ g/ml의 농도로 포함시켜 배양하

였다. 배지에서 밤동안 배양시킨 후에 형성된 colony를 선택하여 액체 LB배지에서 ampicillin 50 $\mu$ g/ml을 가하고 밤동안 배양하였다. 각 용액들로부터 세포를 침전시켜서 알카리 방법에 의한 plasmid 추출분리를 하였다. 분리된 각각의 플라스마드는 HindIII EcoR I으로 double digestion시키고 아가로스 전기영동에 의하여 클로닝된 여부를 확인하였다.

#### Ornithine Transcarbamylase의 추출 및 정제

재조합 플라스미드(pKK/arg I)를 포함하는 TB 2 cell의 colony을 M9/Uracil/Ampicillin/agar plate에서 선별하여 뽑았다. 50 $\mu$ l/ml Ampicillin를 함유하는 LB 배지 1L에 재조합 플라스미드(pKK/arg I)를 가지고 있는 TB 2 cell을 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. 세포 배양액을 5000rpm에서 20분동안 원심분리하여 침전시켰다.

침전물을 2배(무게비율)의 breakage buffer(100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40mM L-ornithine, pH 7.5)에 서스펜션시켰다. 세포들을 ultrasonicator로 40초 동안 lysis시키고, ice에서 1분간 냉각시킨 후, 다시 세포 배양액을 ultrasonicator로 3~4회 반복하여 lysis시키고, ice에서 냉각시켰다. 이 세포 배양액을 12000rpm에서 20분간 원심분리시켰다. 상층액만을 65 $^{\circ}$ C water bath에서 10분동안 가온시킨후, ice bath에 넣어 냉각시키고 원심분리하여 침점물을 걸러낸다. 상층액만을 취해서 40% ammonium sulfate saturation을 한 후, 원심분리하여 상층액만을 취했다. 다시, 상층액을 90% ammonium sulfate saturation을 하고, 원심분리하여 상층액은 버리고, 침전물을 취했다. 60% ammonium sulfate/ 50mM potassium phosphate pH7.5 용액에 침전물을 30분동안 stirring시키면서 녹인 후, 원심분리시켰다. 침전물을 20mM Tris acetate buffer(pH7.5)에 녹이고, 같은 완충용액에 대하여 dialysis를 3~4회 시켰다. 투석시킨 효소를 Amicon (USA)의 protein concentrator로 농축시키고, 실온에서 Matrex Blue Gel A(Amicon) affinity column으로 0~0.5M KCl gradient을 이용하여 분리시켰다. 효소가 존재하는 분획은 효소 아세이를 하여 활성이 나타나는 분획을 취하였다. 효소의 존재가 확인된 분획을 10mM Tris acetate(pH7.5)에서 투석시키고, Amicon의 단백질 농축기로 농축시켰다. Laemmli(1970) method에 따라, Coomassie Blue로 염색한 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 결과로 효소의 homogeneity를 확인하였다.

#### Enzyme assays

효소 아세이는 다음과 같이 수행되었다. 오르니틴과 카바밀 인산에 대한 효소반응은 보통 반응혼합물에 카바밀 인산의 첨가되면서 시작되었다. 초기속도는 Pastra-Landis method을 이용하여 반응생성물인 L-citrullin의 생성속도로서 결정하였다. 효소반응은 아세이 성분들이 다 함께 있는 용액에 카바밀인산을 가하기 시작하면서 일정시간의 반응을 시작하고, 5% 아세트산에 녹인 0.8% 2, 3-butadionmonoxime용액(0.89g/100 ml)과 50% 황산에 미리 용해되어 있는 antipyrine(5g/l)용액을 1:2 부피비율로 섞어 만든 colour reagent를 각 분석하고자 하는 시험관에 가함으로서 반응이 중단되었다. 실온의 어두운 장소에서 밤동안 묵인 후에 45 $^{\circ}$ C의 water bath에서 일정시간 illumination 시켰다. 각 아세이 용액의 농도를 UV/VIS spectrophotometer의 460nm에서 흡광도의 크기로써 측정하였다. 표준곡선도 함께 얻어서 OD를 시트룰린의 농도로 변환시킬 수 있도록 하였다.

#### DNA Sequencing

클로닝된 돌연변이 arg I 유전자의 point mutation이 정확히 의도한대로 도입이 되었는지를 확인하기 위한 실험적 방법으로 DNA Sequencing을 사용하였다. 각 돌연변이 clone들을 선별하여 배양하고, DNA Purification Kit(Wizard mini colum, Promega Co)으로 plasmid DNA를 순수하게 분리 및 정제한 후, Sanger방법(1977)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 순수 정제한 plasmid DNA 5~10 $\mu$ l를 template DNA로 사용하고, 여기에 2N NaOH/2mM EDTA 8 $\mu$ l를 가하여 실온에서 10분간 방치했다. 방치해 둔 eppendorf tube에 3M NaOAc(pH4.8) 7 $\mu$ l를 첨가한 후, cold-EtOH 120 $\mu$ l를 잘 혼합하여 dry ice에서 15분간 보관하였다. 그런 다음, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액은 버리고, 70% cold EtOH 200 $\mu$ l를 가하여 세척하고 12,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 다시 상층액을 버리고, DNA pellets을 얻은 후, 진공상태에서 건조시켰다.

template DNA(5~10 $\mu$ l)를 증류수 12 $\mu$ l에 녹이고, Annealing buffer(Cy5 AutoRead sequencing kit) 2 $\mu$ l, primers(4~400 pmol)를 첨가하고, 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가온한 후, 실온까지 천천히 식혀서 annealing시켰다. annealed template 와 primer된 tube에 Cy5-dATP labelling Mix 1 $\mu$ l를 가한 후 잘 혼합하였다. 희석시킨 T7 DNA polymerase(6~8units/2 $\mu$ l) 2 $\mu$ l를 가하고 실온에서 5분간 labelling 반응을 시켰다. labelling 반응을 5~10분간 시킨 후 Extension buffer(Cy5 AutoRead Sequencing kit)

1 $\mu$ l, DMSO(Cy5 AutoRead Sequencing kit) 3.5 $\mu$ l를 가하고 잘 혼합한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 pre-warm시킨 4개의 termination mixture가 들어있는 eppendorf tube(ddA, ddC, ddG, ddT)에 labeling 반응을 한 용액 5.4 $\mu$ l씩을 각각 4개의 eppendorf tube에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 termination 반응을 실시하였다. stop solution(Cy5 AutoRead Sequencing kit) 6 $\mu$ l씩을 각각 4개의 termination mixture가 들어있는 eppendorf tube에 가하여 termination 반응을 멈추게 했다. Sequencing gel 전기영동을 하기 위해 samples를 80~85 $^{\circ}$ C에서 2~3분간 가운한 후, 얼음물에 냉각시켰다.

Sequencing gel 전기영동은 8% polyacrylamide/6M urea gel을 이용하여 1600V에서 700분 동안 running하였다. sequencing data 분석은 computer상의 ALF win program을 이용하여 염기서열을 확인하였다.

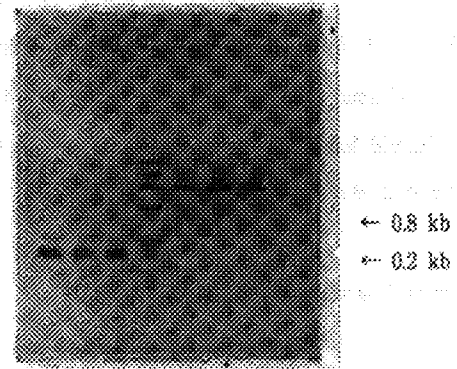
### 3. 결과 및 고찰

#### Site-directed mutagenesis

전체길이의 돌연변이된 *arg I* 유전자를 *E. coli* TB3 세포에 클로닝하기 위하여, DNA Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Site-directed mutagenesis 방법을 도입하여 Threonine 56을 Glycine, Valine, Serine로 돌연변이시켰다. Table 2와 Figure 1에 mutagenic primers 합성을 위한 염기서열과, PCR를 이용한 site-directed mutagenesis 방법을 기술하였다. *E. coli* genomic DNA를 *arg I* 유전자의 wild type을 주형으로 사용하였다. 2개의 돌연변이된 primers와 5'-말단 primer, 3'-말단 primer를 이용하여 각각의 2개의 돌연변이된 중간체를 증폭하였다. 5'-와 3'-돌연변이된 중간체에 대한 겔 전기영동 결과가 Figure 2에 나타나 있다. 5'-돌연변이된 중간체 크기가 대략 0.2kb이고, 3'-돌연변이된 중간체의 크기가 0.8kb이다.

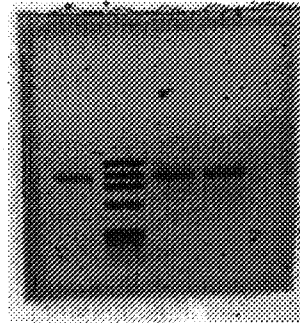
전체길이의 돌연변이된 *arg I* 유전자를 얻기 위해 PCR template로 2개의 5'-와 3'-돌연변이된 중간체를 사용하고, 5'-말단 primer, 3'-말단 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 결과가 Figure 3이다. 즉, Figure 3은 전체길이의 돌연변이된 *arg I* 유전자를 PCR로 합성한 결과를 gel electrophoresis한 것이다. 이들의 각 DNA 크기가 약 1.9kb로서 돌연변이 *arg I* 유전자(TOS, TOV, TOG)가 합성되었음을 알 수 있다.

Figure 2. 5'- and 3'-DNA Intermediates Made By PCR



1. 5'-Intermediate of Thr to Ser
2. 5'-Intermediate of Thr to Val
3. 5'-Intermediate of Thr to Gly
4. Marker(1.35, 1.08, 0.6, 0.31, 0.28, 0.23kbs)
5. 5'-Intermediate of Thr to Ser
6. 3'-Intermediate of Thr to Val
7. 3'-Intermediate of Thr to Gly

Figure 3. Mutant *arg I* Genes Amplified By PCR



1. Mutant *arg I* of Thr to Ser
2. Marker(1.35, 1.08, 0.6, 0.31, 0.28, 0.23kbs)
- ←1.9kb 3. Mutant *arg I* of Thr to Val
4. Mutant *arg I* of Thr to Gly

1 2 3 4

#### 돌연변이된 *arg I* 의 클로닝

PCR로 얻은 전체크기의 돌연변이된 *arg I* 유전자를 순수하게 분리하기 위하여 low melting-temperature agarose gel electrophoresis를 이용하여 순수하게 DNA를 분리 및 정제하였다. 순수 분리한 mutant *arg I* 와 *E. coli* 발현벡터인 pKK223-3를 HindIII와 EcoRI로 자르고, Centricon(Amicon, USA)으로 여과시킨 후, Ligation시켜 재조합된 mutant *arg I* pKK223-3를 competent XL1-blue cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 clone으로 부터 alkali-DNA 플라스미드 mini preparation방법을 이용하여 mutant *arg I* pKK223-3 plasmid를 추출하여 EcoRI와 HindIII로 자른 후, 전기영동한 결과가 Figure 4이다. Figure 4에서 보여지듯이 4.5 kb 크기가 pKK223-3이고, 1.0kb 크기가 *arg I* 유전자이다. 이로써 2개의 돌연변이 유전자들이

각각 풀로남 되었음을 알 수 있다. 즉, Threonine 56이 serine과 valine으로 치환된 돌연변이 플론은 얻어졌으나, glycine으로 치환된 플론은 아직 확보하지 못하여서 계속해서 실험이 진행중에 있다. 한편, 돌연변이의 정확한 도입은 DNA sequencing analysis를 하여 확인중에 있다. 그러나 돌연변이의 도입은 mutagenic primers에 이미 도입되어 있으므로 본 실험실에서의 축적된 data로 미루어 볼 때, 정상적으로 도입이 되었으리라 확신한다.

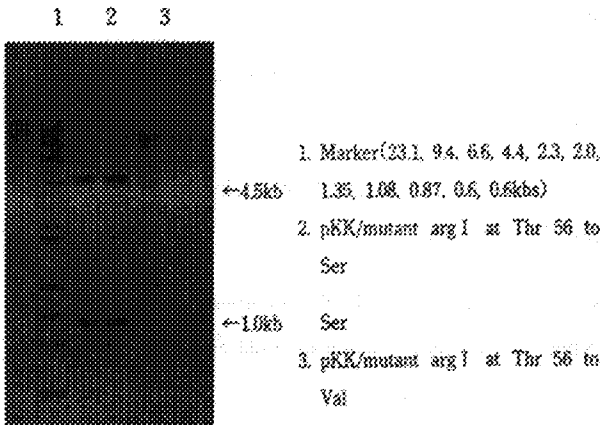


Figure 4. HindIII/EcoR I Digestion of pKK(mutant arg I)

Mutant TOS의 발현

Threonine-56을 serine으로 치환시킨 돌연변이 효소는 PCR에 의하여 증폭된 mutant arg I가 결합된 pKK223-3 plasmid를 competent TB 2 cell에 형질전환시킨 클론을 이용하여 발현시켰다. LB/ampicillin 고체 배지에서 선택한 단일 colony를 LB/ampicillin 액체 배지에서 밤사이 배양한 후에 2리터 배지에서 또 하루를 배양하였다. 배양된 박테리아들로부터 열분할을 하고 affinity chromatography를 한 결과가 Figure 5이다. 효소의 활성에 대한 아세이를 한 결과, KCl gradient의 존재 하에서 elution된 fraction중의 하나에서 효소의 활성이 나타났다.

Figure 5에서 얻은 각 분액들을 아세이 한 결과 KCl gradient하에서 얻은 분액중의 하나에서 효소의 활성을 나타내었다는 것은 Threonine-56을 serine으로 치환된 오르니틴 카바밀라제가 성공적으로 만들어졌음을 나타내고, 돌연변이 효소도 활성의 변화가 어느정도인지 확인은 되지 않았지만 아직도 효소로서의 기능을 하고 있음을 제시한다. Threonine과 serine은 크기가 약간 달라지지만 크기가 전하의 효과가 크게 다르지 않을 것으로 기대되어 돌연변이에 의한 효소활성의 변화는 크지 않으리라 판단된다.

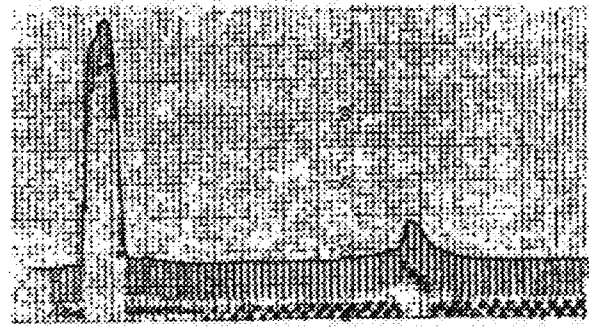


Figure 5. Affinity Chromatogram for Mutant TOS Ornithine Transcarbamylase

한편, 효소의 분자크기와 순수 분리 및 정제 정도를 결정하기 위한 SDS 단백질 전기영동한 결과 돌연변이된 오르니트렌스 카바밀라제가 38 kDa의 크기에서 major band로 얻어짐을 Figure 6에서 볼 수 있다.

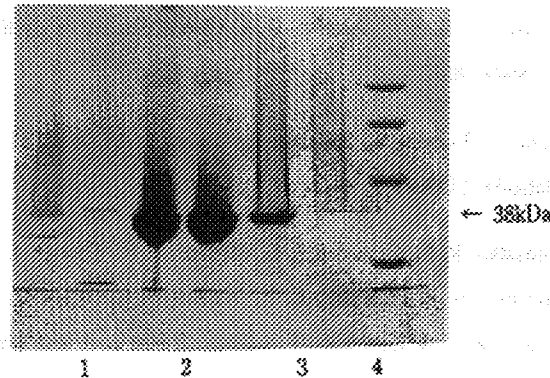


Figure 6. The results of the SDS polyacrylamide gel electrophoresis for the expressed arg I gene product. Lanes 1, 2 and 3: Three protein fractions of which had activity of ornithine transcarbamylase obtained from chromatography shown as arrow peak in Figure 5 were applied on the 7.5% SDS polyacrylamide gel. They were collected by the use of the Matrex Blue Gel A column. Lane 4 was the protein molecular size marker. The sizes of the molecular marker were 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 36 kDa, 20.1 kDa from the top protein band. The calculated molecular size of the fractionated protein was 38 kDa.

4. 결론

오르니트 트랜스카바밀라제의 첫 번째 기질인 카바밀린산의 결합자리 구조와 기능간의 상관관계를 알아보기 위하여서 결합자리에 관련되리라 추정되는 Threonine-56을 선택하여 이 잔기의 역할을 결정하는 것이 본 연구의 한 목적이다. 본 연구기간동안에 Threonine-56을 charge와 size를 고려하여

serine, valine과 glycine으로 돌연변이 시킨 클론을 확보하였다. DNA agarose gel electrophoresis에 의한 크기 확인, 효소아세이에 의한 효소활성 측정 결과, 돌연변이 오니틴트랜스카바밀라제가 클로닝되었음을 알 수 있었고, 효소활성이 wild type보다는 적었지만 미약하나마 존재함을 알 수 있었다.

확보된 돌연변이 클론들로부터 효소들을 추출분리하여 기질의 결합 상수와 같은 반응속도론적 상수와, pH study, 기질의 결합 메카니즘, 카바밀인산에 의한 induced-fit 형태의 구조 변환 유무 및 정도, chemical modification에 의한 활성의 변화 정도 등을 측정하여 wild type과 상호비교 함으로써 Threonine 56의 기능 및 구조상의 역할을 밝힐 수 있다. 이와같은 부분은 최종결과를 얻을 때까지 계속하여 행해질 것이다.

## 5. 참고문헌

- Bencini, D. A., Houghton, J. E., Hoover, T. A., Foltermann, K. F., Wild, J. R. & O'Donovan, G. A. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 8509-8518.
- Hara, A., Tsuzuki, T., Shimada, K., Takiguchi, M., Mori, M. & Matsuda, I.(1988) *J. Biochem.* 103, 302-308.
- Honzatko, R. B., Crawford, J. L., Monaco, H. L., Lander, J. E., Edwards, B. F. P., Evans, C. R., Warren, S. G., Wiley, C. C., Lander, R. C. & Lipscomb, W. N.(1982) *J. Mol. Biol.* 160, 219-263.
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Williams, K. R., Kalousek, F., Krause, J. P., Doolittle, R. F., Konisberg, W. & Rosenberg, L. E.(1984) *Science* 224, 1068-1074.
- Houghton, J. E., O'Donovan, G. A. & Wild, J. R.(1989) *Nature* 338, 172-174.
- D.(1988) *J. Bacteriology* 170, 2725-2734.
- Kantrowitz, E. R., Pastra-Landis, S. C. & Lipscomb, W. N. (1980) *Trends Biochem. Sci.* 5, 124-128.
- Kantrowitz, E. R. & Lipscomb, W. N.(1988) *Science* 241, 669-674.
- Konigsberg, W. H. & Henderson L.(1983) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 80, 2467-2471.
- Krause, K. L., Volz, K. W. & Lipscomb, W. N.(1987) *J. Mol. Biol.* 193, 527-553.
- Kuo, L. C., Miller, A. W., Lee, S. & Kozuma, C.(1988) *Biochemistry* 27, 8823-8832.
- Lee, S., Shen, W.-H., Miller, A. W. & Kuo, L. C.(1990) *J. Mol. Biol.* 211, 255-269.
- Maniatus, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J.(1989) *Molecular cloning-A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Marc, R. H. & Miller, R. D.(1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 103-111.
- Marshall, M. & Choen, P. P.(1980) *J. Biol. Chem.* 255, 7287-7290.
- Pierson, D.L., Cox, S. L. & Gilbert, B. E.(1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6464-6469.
- Scherer, S. E., Veres, G. & Caskey, C. T.(1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 1593-1601.
- Vliet, F. V. Cunnin, R., Jacobs, A., Piette, J., Gigot, D., Lauwereys, M., Pierard, A. & Glansdorff, M.(1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 6277-6289.