

## *Mycobacterium bovis* BCG Rv2435c 유전자의 기능에 대한 연구

이승실 · 배영민\*

창원대학교 미생물학과 경남 창원시 사림동 9번지

Received April 11, 2005 / Accepted May 23, 2005

**Studies on the Function of the Rv2435c Gene of the *Mycobacterium bovis* BCG.** Seung-Sil Lee and Young-Min Bae\*. Department of Microbiology, Changwon University, Changwon, Kyungnam 641-773, Korea – A library of the mutants was prepared by transposon mutagenesis of the *Mycobacterium bovis* BCG. We screened this library for the resistance to an anti-tuberculosis antibiotic, PA-824. Most of the mutants resistant to the PA-824 were not able to synthesize the coenzyme F<sub>420</sub> which is normally produced by the wild type *M. bovis* BCG strains. HPLC analysis of the cellular extract showed that one of those mutants which lost the ability to synthesize F<sub>420</sub> still produced F<sub>0</sub>. The insertion site of the transposon in this mutant was determined by an inverse PCR and the transposon was found to be inserted in the Rv2435c open reading frame (ORF). Rv2435c ORF is predicted to encode an 80.3 kDa protein. Rv2435c protein appears to be bound to the cytoplasmic membrane, its N-terminal present in the periplasm and C-terminal in the cytoplasm. The C-terminal portion of this protein is highly homologous with the adenylyl cyclases of both prokaryotes and eukaryotes. There are 15 ORFs which have homology with the class III AC proteins in the genome of the *M. tuberculosis* and *M. bovis*. Two of those, Rv1625c and Rv2435c, are highly homologous with the mammalian ACs. We cloned the cytoplasmic domain of the Rv2435c ORF and expressed it with six histidine residues attached on its C-terminal in *Escherichia coli* to find out if this protein is a genuine AC. Production of that protein in *E. coli* was proved by purifying the histidine-tagged protein by using the Ni-NTA resin. This protein, however, failed to complement the *cya* mutation in *E. coli*, indicating that this protein lacks the AC activity. All of the further attempts to convert this protein to a functional AC by a mutagenesis with UV or hydroxylamine, or construction of several different fusion proteins with Rv1625c failed. It is, therefore, possible that Rv2435c protein might affect the conversion of F<sub>0</sub> to F<sub>420</sub> not by synthesizing cAMP but by some other way.

**Key words** – *Mycobacterium*, Adenylyl cyclase, cAMP

인류의 역사상 많은 생명을 앗아간 질병 중의 하나인 결핵은 *Mycobacterium tuberculosis* complex에 속하는 세균들에 의해 야기되는데, 서로 유사한 *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, 및 *M. microti* 등이 *M. tuberculosis* complex에 포함된다[6]. 최근에 결핵균에 대한 연구가 활발하게 진행되어 1998년에 *M. tuberculosis* H37Rv genome의 완전한 염기서열이 발표되었고, 2003년에는 *M. bovis* AF2122/97 genome의 완전한 염기서열이 발표되었다[6,10]. 또한 이 두 세균들의 genome sequence는 99.95% 이상이 동일한 것으로 밝혀졌다[10]. 결핵은 지속적인 항생제들의 개발에 따라 감소추세를 보이다가 1980년대 후반부터 다시 증가추세로 돌아서서 현재는 매년 8백만 명이 새로 감염되고, 2~3백만 명이 죽어가고 있다[9,21]. 세계보건기구(WHO)는 이 질병이 완전하게 퇴치되지 않는다면 20년 이내에 10억 이상의 인구가 결핵에 새롭게 감염되고, 3천 6백만 명이 죽게 될 것이라고 예상하고 있다[21].

결핵을 일으키는 tubercle bacilli는 숙주세포내에 침입하

여 장기간에 걸쳐 생존할 수 있다. 침입한 세균이 숙주 내에서 어떻게 숙주의 방어기작을 피하는지는 알려져 있지 않으며, 숙주와 세균의 communication에 관련된 화학적 특성이나 환경변화에 대한 반응과 조절에 관련된 bacteria의 신호전달 과정 또한 거의 알려져 있지 않다. 거의 모든 생명체들에서 가장 보편적인 communication system 중의 하나인 cyclic nucleotide에 의한 second messenger cascade 또한 마찬가지이다[11]. 다만 mycobacteria를 섭취한 macrophage 내부에서 cAMP의 농도가 상승했고, 또한 phagosome-lysosome의 융합이 저해되었다는 보고가 있을 뿐이다[14,17].

현재 cAMP-binding protein들은 7개의 서로 다른 class로 분류되고 있는데 *M. tuberculosis* 및 *M. bovis*의 genome에는 Class III adenylyl cyclase (AC)로 추정되는 15개의 open reading frame (ORF)이 존재한다는 것이 보고되었다[6,10,13,15,19]. 한 세균 세포내에 이와 같이 많은 수의 AC ORF가 존재한다는 것은 대단히 이례적인 일이고, 또한 이들 15개의 AC ORFs 중에서 Rv1625c와 Rv2435c는 특이하게도 mammalian AC와 유사성이 대단히 높은 단백질들을 암호화하는 것으로 추정되고 있다[11,19]. 그 중 Rv1625c는 N-말단의 6개의 transmembrane span과 C-말단의 catalytic domain으로 구성된

### \*Corresponding author

Tel : +82-55-279-7463, Fax : +82-55-279-7460

E-mail : yominbae@sarim.changwon.ac.kr

47 kDa의 protein을 암호화하며, catalytic domain이 AC 활성을 가지는 것으로 발표되었다[11].

Rv2435c ORF의 DNA는 80.3 kDa의 protein을 암호화하는 것으로 추정되며, 이 protein의 N-terminal portion은 세포막의 외부에 존재하고, C-terminal portion은 세포막의 내부에 존재하는 것으로 추정되고 있다. 이 Rv2435c protein의 extracellular domain은 *Desulfovibrio vulgaris*의 chemotaxis receptor (DcrH)로 추정되는 protein의 N-terminal domain과 유일하게 유사성을 가지고, cytoplasmic domain은 다른 생물체들의 AC들과 유사성을 가지는 것으로 추정된다[8,11]. DcrH의 extracellular domain은 환경변화(용존산소)에 대한 sensor의 기능을 가지는 것으로 추정되고 있고, intracellular domain은 methylase로서 signal transduction에 관여하는 것으로 추정되고 있다[8]. 따라서 Rv2435c protein의 extracellular domain도 어떤 환경적인 변화를 감지하여 AC로 추정되는 cytoplasmic domain을 활성화시킬 것으로 예상할 수 있다. 현재 *M. tuberculosis* 및 *M. bovis*의 AC가 pathogenesis에 필요한지는 알려져 있지 않다[14,17].

본 연구에서는 *M. bovis*에 transposon을 이용한 mutagenesis를 수행하였고, 이렇게 하여 얻어진 mutant들 중에서 coenzyme F<sub>420</sub>을 생합성하지 못하는 mutant를 분리하였다. 이 mutant에서 transposon의 삽입부위를 확인한 결과, Rv2435c ORF에 삽입되어있음을 알 수 있었다. 이 Rv2435c 단백질이 다른 생물체들의 adenylyl cyclase들과 높은 유사성을 보임에 따라 이 단백질이 AC 활성을 가지는지를 알아보기 위해 *E. coli*에서 Rv2435c protein의 catalytic domain을 발현시켰으며, 여러 가지 방법을 통해 Rv2435c protein의 AC 활성을 확인하고자하였다.

## 재료 및 방법

### Bacterial strains 및 배양 배지.

Rv2435c ORF의 mutagenesis를 위해서는 *M. bovis* BCG Montreal 균주가 사용되었고, cloning을 위해서는 *Escherichia coli* JM109[20]이 사용되었으며, 단백질 발현 및 발현된 단백질을 adenylyl cyclase 활성을 가지는지를 complementation을 통해서 확인하기 위해서는 *E. coli* DHT1[7]을 사용하였다. *M. bovis*의 배양을 위해서는 Middlebrook 7H9 medium이 사용되었고, *E. coli* 배양을 위한 배지로는 LB medium[20]이 사용되었으며, adenylyl cyclase 활성의 유무를 확인하기 위한 *E. coli* DHT1의 배양을 위해서는 1%의 maltose를 포함하는 MacConkey agar[7]를 사용하였다. Plasmid selection을 위해서는 최종 농도가 각각 25 µg/ml, 25 µg/ml, 100 µg/ml가 되도록 배지에 kanamycin (Sigma), tetracyclin (Sigma), ampicillin (Sigma) stock solution을 첨가하여 사용하였다.

### Transposon mutagenesis 및 inverse PCR.

Mycobacterial transposon인 Tn1096을 사용하여 *M. bovis* BCG의 mutant를 얻고 inverse PCR을 통해 그 insertion site를 확인하는 실험은 이미 다른 곳에 발표된 대로 수행하였다[2,5,18]. Inverse PCR을 위한 *M. bovis* BCG Rv2435c mutant의 genomic DNA는 Husson et al.의 방법에 따라 분리되었다[12]. 이 genomic DNA를 *EagI*으로 절단한 후에 self-ligation을 시키고, 그 DNA를 template로 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 대략 760 bp의 PCR 산물이 얻어졌는데, 이것의 염기서열을 분석하여 transposon의 삽입부위를 확인하였다. 이때에 사용된 primers는 이미 발표되었다[5].

### HPLC를 이용한 Rv2435c mutant의 분석.

HPLC를 이용하여 Rv2435c mutant가 F<sub>420</sub>을 생성하는지의 여부를 확인하기 위하여, 이미 발표된 방법에 따라 crude extract를 분석하였다[2,5]. 즉, 이 균주를 Middlebrook 7H9 medium 200 ml에서 3주간 배양한 후, 원심분리 하였다. 침전된 세포들을 1.5 ml의 70% ethanol에 녹인 후, 100°C에서 15분간 가열하였다. 이것을 다시 원심분리하고 상등액 1 ml을 새로운 microfuge tube로 옮긴 후, 진공건조하여 용매를 완전히 제거하였다. 이것을 200 µl의 초순수에 녹인 후, 15 µl를 Beckman System Gold Nouveau 126 HPLC에 주입하였다. 이 때에 α-Bondpack C-18 (Spelco) column (3.0 mm×300 mm)이 사용되었다. 사용된 buffer로는, buffer A는 2%의 acetonitrile을 포함하는 27.5 mM의 sodium acetate (pH 4.7)였고, buffer B는 100% acetonitrile이었다. Elution buffer에서 buffer B의 비율은 다음과 같이 변화시켰다. 처음부터 2분까지는 0%, 2분부터 6분까지는 0에서 2%까지 linear gradient로 증가시켰고, 6분부터 15분까지는 2%에서 10%로, 15분부터 22분까지는 10%에서 28%로 증가시켰고, 그리고 22분부터 27분까지는 28%에서 0%로 감소시켰다. 이렇게 하여 분리된 물질들은 Shimadzu RF-10Axl fluorescence detector

Table 1. Primers used in this study

Primer	DNA sequence
2435c-3-fwd	5'-TTTTCCATGGATCTGCAAACCAAAGAGGA-3'
2435c-3-rev	5'-TTTAGATCTCTCCGACAATCGGTAGAT-3'
1625c-fwd	5'-TTTTCCATGGATACTGCGCGCGCGGAGGC-3'
1625c-rev	5'-TTTAGATCTGACCCCTGCCGTGCGGGT-3'
SOE-1	5'-TCGACTTCGCGCTCGACATGACCAAT-3'
SOE-2	5'-TCGAGCGCGAAGTCGACGGTTCGGGG-3'
SOE-3	5'-CGGACTTTGCCCTAGAGATCGCGCCG-3'
SOE-4	5'-TCTAGGGCAAAGTCCGCCAGTGTCTG-3'
SOE-5	5'-GTCCTGTTTGCCGACATCGTTCGGGTT-3'
SOE-6	5'-GATGTCGGCAAACAGGAC-3'
SOE-7	5'-TACGACCTGTGGGGCGCGGCAGTGA-3'
SOE-8	5'-CGCCCCACACGTCTGTA-3'

(excitation at 400 nm, emission at 470 nm)를 사용하여 분석하였다.

#### PCR 및 DNA cloning.

Gene SOEing의 2차 PCR을 제외한 PCR 반응액은 template DNA 1  $\mu$ l, primer-1 (10 pmol/ $\mu$ l) 2.5  $\mu$ l, primer-2 (10 pmol/ $\mu$ l) 2.5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP (NEB) 8  $\mu$ l, 10 $\times$  *Pfu* DNA polymerase buffer (Promega) 10  $\mu$ l, *Pfu* DNA polymerase (3 U/ $\mu$ l; Promega) 1  $\mu$ l로 구성되며, 총 부피를 100  $\mu$ l로 하였다. 또한, PCR에 사용한 primer는 모두 Table 1에 나타내었다. 그리고 PCR product와 expression vector는 적당한 제한효소 (*Nco*I, NEB; *Bgl*II, Takara; *Bam*HI, Promega; *Hind*III, Takara; *Xho*I, Boehringer)를 이용하여 절단하고, agarose gel을 사용하여 전기영동한 후, 원하는 DNA의 band를 오려내고, Wizard gel and PCR purification system (Promega)을 이용하여 DNA를 순수 분리하였다.

Rv2435c ORF 중에서 catalytic domain을 pQE60에 cloning 하여 pRv2435c-3를 제조하기 위한 primer로는 2435c-3-fwd와 2435c-3-rev가 사용되었다 (Table 1). 또한 adenyl cyclase 활성을 갖는 positive control로 사용할 pRv1625c plasmid는 Rv1625c의 catalytic region을 pQE60 plasmid에 in-frame으로 cloning한 것으로, PCR은 *M. bovis* BCG chromosome (100 ng/ $\mu$ l)을 template로 하고, 1625c-fwd와 1625c-rev primer를 사용하였으며, PCR program은 96 $^{\circ}$ C, 1분; 60 $^{\circ}$ C, 1분; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 한 주기로 하여 총 30주기를 실행하였다. 증폭된 PCR product는 *Nco*I과 *Bgl*II로 절단된 pQE60 DNA와 섞어서 ligation하였다.

Rv2435c와 Rv1625c ORF들의 hybrid를 만들기 위하여 gene SOEing을 수행하였다. 우선 *M. bovis* BCG chromosome 으로부터 SOE-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8을 증폭하기 위해 1차 PCR을 수행하였으며, 각각 SOE-1과 1625c-rev, 2435c-3-fwd와 SOE-2, SOE-3와 2435c-3-rev, 1625c-fwd와 SOE-4, SOE-5와 1625c-rev, 2435c-3-fwd와 SOE-6, SOE-7과 2435c-3-rev, 1625c-fwd와 SOE-8 primers를 사용하여 증폭하였다. PCR program은 96 $^{\circ}$ C, 1분; 55 $^{\circ}$ C, 1분; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 한 주기로 하여 총 30주기를 실행하였다.

2차 PCR은 1차 PCR products를 template로 하여 SOE-1+2, -3+4, -5+6, -7+8을 증폭 분리하기 위해, 1차 PCR products를 10배 희석하여 각 1  $\mu$ l를 template로 사용하였으며, 나머지 PCR 반응액 조성은 1차 PCR과 동일하게 사용하였다. SOE-1+2와 SOE-5+6는 각각 SOE-1과 SOE-2, SOE-5와 SOE-6를 template로 하고, 2435c-3-fwd와 1625c-rev primers를 사용하였으며, SOE-3+4와 SOE-7+8는 각각 SOE-3와 SOE-4, SOE-7과 SOE-8을 template로 하고, 1625c-fwd와 2435c-3-rev primers를 사용하여 증폭하였다. 2차 PCR은 96 $^{\circ}$ C, 1분; 55 $^{\circ}$ C, 1분; 72 $^{\circ}$ C, 1분 10초를 한 주기로 하여 총 30주기를 실행하였다. 증폭된

PCR product는 *Nco*I과 *Bgl*II를 사용하여 절단한 후, *Nco*I과 *Bgl*II로 절단된 pQE60 DNA와 섞어서 ligation하였다.

#### Cell lysis and preparation of crude extract.

Rv2435c 단백질의 catalytic domain을 *E. coli*에서 발현시키기 위해 100  $\mu$ g/ml의 ampicillin을 포함한 LB medium 200 ml에 pRv2435c-3를 포함하는 *E. coli* DHT1 균주를 배양하였다. 이 때에 배양액의 600 nm에서의 흡광도가 0.6이 될 때에 최종농도가 5 mM이 되도록 isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG)를 첨가하여 5시간 동안 induction을 수행하였다. 그 후에 Sorvall centrifuge를 이용하여 SLA-1500 rotor로, 4 $^{\circ}$ C, 6,000 rpm에서 20분 동안 centrifuge한 후, 세균 1 g당 4 ml의 lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH8.0)에 현탁 시켰다. 여기에 lysozyme (1 mg/ml)을 첨가하고, bead-beater (5,000 rpm, 60 sec, 3번)를 이용하여 cell을 lysis시킨 후, 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 20분 동안 centrifuge하여 cleared lysate를 얻었다.

#### Purification of His-tagged protein and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

Cleared lysate에 1/4 volume (1 ml)의 50% Ni-NTA (nickel-nitrilotriacetic acid) agarose (Qiagen)를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 rotary shaker로 200 RPM의 속도로 1 시간 동안 섞어 주었다. 이것을 column에 loading한 후, 4 ml의 wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH8.0)로 2번 세척하고, 0.5 ml의 elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH8.0)로 4번 elution하였다. 이렇게 하여 얻어진 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였다. SDS-PAGE는 다른 문헌들에 수록된 방법에 따라서 수행하였다[4,22].

#### Hydroxylamine mutagenesis.

pRv2435c-3 plasmid DNA 6  $\mu$ g을 hydroxylamine을 이용하여 random mutagenesis를 수행하였다[1]. Ethanol로 precipitation된 DNA를 사용하여 *E. coli* DHT1에 transformation한 후, maltose-MacConkey agar에 도말하여 형성된 colony들의 색을 관찰하였다.

#### UV mutagenesis.

pRv2435c-3, pQE60-1+2, 3+4, 5+6, 7+8 plasmids를 *E. coli* DHT1에 transformation한 후, 각각 25  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml의 kanamycin (Sigma)과 ampicillin (Sigma)을 포함한 maltose-MacConkey agar 배지에 배양하였으며, 같은 항생제를 포함한 LB 액체배지에서 4시간 동안 배양한 후, 위와 동일한 항생제를 포함한 maltose-MacConkey agar 배지에 배양액 150  $\mu$ l를 도말하고, ultraviolet crosslinker (UVP)를 이용하여 0.002 J/cm<sup>2</sup>의 UV를 조사한 뒤, 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다[3,16].

결 과

Transposon을 이용한 mutagenesis 및 그 삽입 부위의 확인.

Mycobacterial transposon인 Tn1096을 포함하는 pPR29 plasmid를 이용하여 *M. bovis* BCG 균주에 mutagenesis를 수행하였다[2,5,18]. Genome에 Tn1096이 삽입된 mutant들 중에서 coenzyme F<sub>420</sub>을 합성하지 못하는 균주들만 증식할 수 있도록 항결핵균제인 PA-824를 포함하는 배지에서 selection 하였다[23]. F<sub>420</sub>을 생성하는 wild type 균주들은 PA-824에 5 µg/µl의 농도에서 증식이 억제되고, F<sub>420</sub>을 생성하지 못하는 mutant 균주들은 이 농도에서 증식이 억제되지 않는다는 것은 이미 전에 보고된 적이 있다[23]. 이렇게 하여 얻어진 여러 개의 mutant들에서 transposon이 삽입된 부위는 inverse PCR을 이용하여 확인하였다. 그 결과, 한 개의 mutant에서 Rv2435c ORF의 N-말단으로부터 524번째의 아미노산인 lysine을 암호화하는 AAG codon의 A와 G사이에 transposon이 삽입되어있음을 확인할 수 있었고, 이 mutant를 YMBCG43으로 이름을 붙였다(Fig. 1).

YMBCG43 균주에 있어서의 coenzyme F<sub>420</sub> 및 F<sub>0</sub>의 생합성 여부 확인.

YMBCG43 균주가 실제로 F<sub>420</sub>을 생합성하지 않는지를 확인하기 위하여 세포추출액을 HPLC로 분석하였다. 분석결과 얻어진 profile은 Fig. 2에 나타내었다. 얻어진 profile을 분석해 보면 YMBCG43 균주는 F<sub>420</sub>의 전구물질인 F<sub>0</sub>는 합성을 하지만 F<sub>420</sub>은 합성하지 않음을 알 수 있다. 따라서 F<sub>0</sub>로부터 F<sub>420</sub>이 생합성되는 반응에 Rv2435c 단백질이 직접 또는 간접적으로 연관되어 있음을 알 수 있다. BLAST search에 의해서 이 단백질이 다른 AC들과 높은 homology를 보임에 따라

이 단백질이 AC활성을 가질 가능성이 높다고 판단하여, 이 단백질을 *E. coli*에서 발현시켜서 그 활성을 확인해 보기로 하였다.

*E. coli*에서 Rv2435c 단백질의 발현.

우선 Rv2435c 단백질의 catalytic domain을 *E. coli*에서 발

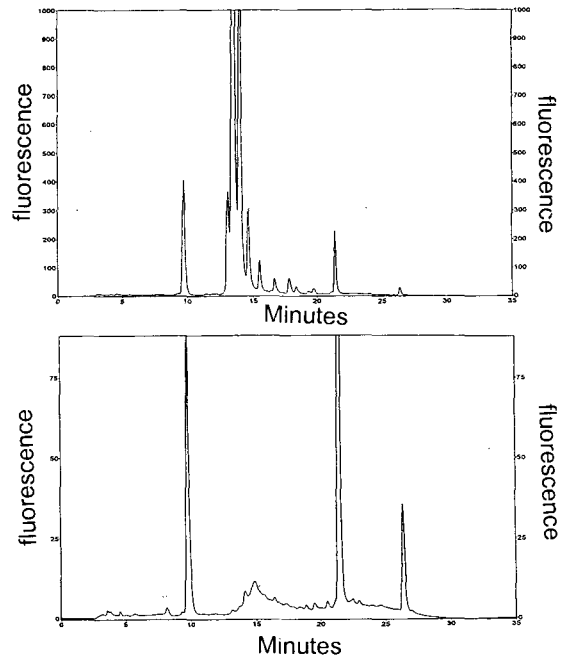


Fig. 2. HPLC elution profiles of extracts prepared from a wild type strain (top) and a Rv2435c mutant (bottom). Note that the fluorescence scale for each profile is different from one another. The two highest peaks for the wild type correspond to F<sub>420</sub> with 6 (13.6 min) and 5 (14.0 min) glutamates, respectively. F<sub>0</sub> is eluted at 21.4 min.

```

MTSGEALDSV AESESTPAKK RHKNVLRPRP RFRASIQSKL MVLLLLTSIV SVAALAAIVY QSGRTSLRAA    70
AYERLTQLRE SQKRAVELTF SOLTNSLVIIY ERGLTVVDAV VRFTAGFDQL ADATISPAQQ QAI VNYNNNE    140
FITPVERTTG DKLDITALLP TSPAQRYLQA YYTAPFTSDQ DAMRLDDAGD GSAWSAANAQ FNSYFREIVT    210
RFOYDDAVLL DTRGNIVYTL SKDPDLGTNI LTGPYRESNL RDAYLKALGA NAVOFTWITD FKPYQPQLGV    280
PTAWLVAPVE AGGKTQGVLA LPLPIDKINK IMTADRQWQA AGMGSGTETY LAGPDSL MRS DSRLFLQDPE    350
EYRKQVVAAG TSLDVVNRAI QFGGTTLLQP VATEGLRAAQ RGQTGTVTST DYTGSRELEA YAPLNVPDSD    420
LHWSILATRN DSEAFAAVAS FSRALVLTIV GIIVVICVAS MLIAHAMVRP IRRLEVTGQK ISAGDYEVNI    490
PVKSRDEIGD LTAAFNEMSR NLQTKHEELN EQRKENDRLL LSMMPPEVVE RYRLGEQTIA QEHQDVTVLF    560
ADILGVDEIS SGLSGNELVK IVDELVRQFD SAAEHLGVER IRTLHNGYLA GCGVTTPRLD NIPRTVDFAL    630
EMRRIVDRFN CQTGNDLHLR VGINTGDVIS GLVGRSSVVY DMWGAAVSLA YQMHSQSPQP GIYVTSQVYE    700
AMRDVWQFTA AGTISVGGLE EPIYRLSERS 730
    
```

Fig. 1. The amino acid sequence of the Rv2435c protein. The two transmembrane regions are inverted. The first transmembrane region from the N-terminus is oriented from the cytoplasm to the periplasm. The second transmembrane region is headed from the periplasm to the cytoplasm. The 524th amino acid from the N-terminus is lysine and encoded by an AAG codon. The Tn1096 transposon is inserted between the 'A' and 'G' of the AAG codon in the Rv2435c mutant.

현시하기 위해 pQE60 vector에 Rv2435c ORF의 catalytic domain을 in-frame으로 insertion하여 pRv2435c-3 plasmid를 제조하였다. Rv2435c gene에서 cloning될 부분은 이미 adenylyl cyclase의 활성을 가지는 것으로 밝혀진 Rv1625c의 catalytic domain (25.5 kDa) 과의 상동성을 고려해서 결정하였다(Fig. 3). pRv2435c-3 plasmid를 함유하는 *E. coli* 세포로부터는 C-말단에 6개의 histidine을 가진 25.5 kDa의 Rv2435c catalytic domain이 발현될 것으로 예측되었다. 이렇게 제조된 cleared lysate를 SDS-PAGE로 분석하였으나, 발현된 단백질의 구분이 어려웠다. 따라서 cleared lysate를 Ni-NTA resin을 이용하여 정제한 후에 SDS-PAGE로 분석해 보기로 하였다. 그 결과 pRv2435c-3를 함유하는 *E. coli* DHT1 으로부터 대략 29 kDa의 단백질이 생성되는 것이 확인되었다(Fig. 4). 이 단백질의 크기가 예상보다 약간 크지만 histidine tag를 가지고 있기 때문에 Rv2435c의 catalytic domain이 발현된 것으로 판단하였다. 따라서 Rv2435c의 catalytic domain을 발현시키는 *E. coli* DHT1에서 complementation을 통해서 AC 활성을 확인하고자 하였다.

**Complementation을 통한 adenylyl cyclase 활성의 확인.**

*E. coli* DHT1에 pRv2435c-3를 도입시킨 후, 1%의 maltose를 포함하는 MacConkey agar에 도말하였다. 또한 positive control로 사용하기 위해 pRv1625c를 포함하는 *E. coli* DHT1도 같은 조건으로 배양하였다. 이 때 사용된 pRv1625c는 Rv1625c의 catalytic domain을 pQE60에 in-frame으로 cloning하여서 제조하였다. 그 결과, pRv1625c를 함유하는 *E. coli* DHT1 세포는 colony 주변으로 확산되는 선명한 붉은 색을 띄는 것이

쉽게 관찰 되었다. 그러나 pRv2435c-3를 함유하는 세포는 같은 조건에서 전혀 붉은 색을 띠지 않았기 때문에, 이 단백질의 catalytic domain은 adenylyl cyclase의 활성을 가지지 않는다고 판단하였다. 이 경우, 이 ORF가 숙주인 포유류로부터 이 세균에게로 전달되었으나, 그 후에 발생한 mutation에 의해 현재 활성을 갖고 있는 단백질을 암호화하고 있지 않을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 따라서 이 단백질이 mutagenesis를 통하여 AC 활성을 획득할 수 있는지를 확인하고자 하였다.

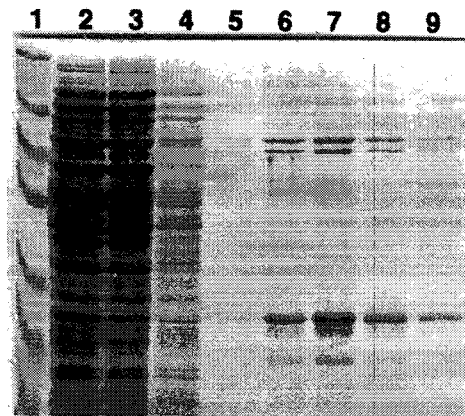


Fig. 4. Purification of the catalytic domain of the Rv2435c protein expressed in *E. coli* DHT1. 1, Prestained marker. The molecular weights of each proteins are 175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25 and 16.5 kDa from the top; 2, cleared lysate 3, flow-through; 4, first wash; 5, second wash; 6, first eluate 7, second eluate 8, third eluate 9, fourth eluate. The extract of the *E. coli* DHT1 containing pQE60 does not show a protein band of 29-kDa under the same condition (data not shown).

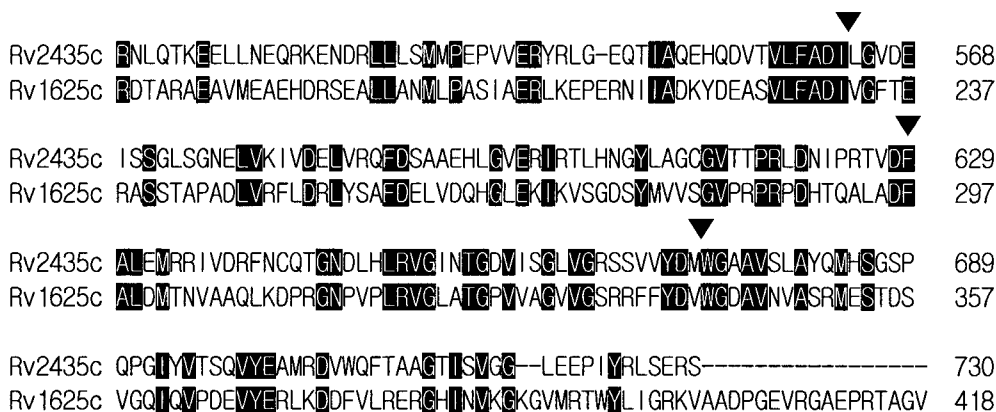


Fig. 3. Comparison of the amino acid sequences of the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2435c and Rv1625c catalytic domains. Identical residues are shown in reversed characters. The filled triangle indicates the positions where two proteins are fused. The hybrid 1+2 carries Rv2435c (119 amino acids) at its N-terminal and Rv1625c (121 amino acids) at its C-terminus, and the two proteins are fused at the second triangle. The hybrid 3+4 carries Rv1625c (120 amino acids) at its N-terminus and Rv2435c (102 amino acid) at its C-terminus, and these are fused at the second triangle. The hybrid 5+6 carries Rv2435c (54 amino acids) at its N-terminus and Rv1625c (186 amino acids) at its C-terminus, and these are fused at the first triangle. The hybrid 7+8 carries Rv1625c (164 amino acids) at its N-terminus and Rv2435c (58 amino acids) at its C-terminus, and these are fused at the third triangle.

### Random mutagenesis를 통한 adenylyl cyclase 활성의 확인.

Hydroxylamine을 이용하여 pRv2435c-3 plasmid로 *in vitro* mutagenesis를 수행한 후, *E. coli* DHT1에 transformation 하고, maltose-MacConkey agar에 도말하였다. 그러나 수천 개의 colony 중에서 붉은 색을 띠는 것은 전혀 없었다. 또한 pRv2435c-3를 함유하는 *E. coli* DHT1에 UV를 조사하여 *in vivo* mutagenesis를 시도하였으나 역시 붉은 색 colony는 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 Rv2435c와 Rv1625c 단백질들을 fusion 시켜서 AC 활성이 나타나는지를 시험해 봄으로써 Rv2435c의 어느 부분 때문에 AC 활성이 나타나지 않는가를 확인하고자 하였다. 이 때에 PCR을 이용한 gene SOEing이라는 방법을 사용하였다[24].

### Rv2435c와 Rv1625c ORFs의 gene SOEing를 통한 adenylyl cyclase 활성의 확인.

Rv2435c와 Rv1625c ORFs의 gene SOEing을 통해 Rv2435c의 adenylyl cyclase 활성을 알아보하고자 하였다. Gene SOEing은 hybrid gene이나 mutant 분자를 형성할 때 주로 이용하는 실험 방법이며, 그 과정은 1차와 2차 PCR로 나뉘는데, 1차 PCR은 상보적인 region을 포함한 primer를 사용하며, 2차 PCR은 1차 PCR의 product를 template로 하여 결합된 gene을 형성한다[24].

Rv2435c와 Rv1625c gene을 SOEing하기 위해 먼저, Rv1625c protein의 AC 활성에 중요한 region과 Rv2435 protein의 아미노산 sequence를 비교하였다(Fig. 3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 두 protein의 상동성이 높은 부위 3곳에서 fusion이 되도록 SOEing하여 pQE60-1+2, pQE60-3+4, pQE60-5+6, pQE60-7+8 plasmid를 제조하였다. 이렇게 형성된 plasmid들을 *E. coli* DHT1에 transformation하고, maltose-MacConkey agar에 도말하여 나타나는 colony들을 관찰하였으나 hybrid plasmid로부터는 붉은 색 colony가 형성되는 경우는 전혀 없었다.

또한, pRv2435c-3또는 pQE60-1+2, -3+4, -5+6, -7+8가 포함되어있는 *E. coli* DHT1을 액체배지에 배양한 후, UV를 조사하여 maltose-MacConkey agar에 도말하고 나타나는 colony들을 관찰하였으나 역시 붉은 색 colony는 전혀 나타나지 않았다. 따라서 본 연구에서는 Rv2435c ORF을 일부라도 포함하는 경우에는 adenylyl cyclase 활성이 전혀 관찰되지 않았다.

## 고 찰

그 역할이 아직 정확히 알려지지 않고 있으나, coenzyme F<sub>420</sub>은 대부분의 *Mycobacterium*속의 세균들에 의해서 생성되고 있다[5]. 본 연구에서는 transposon mutagenesis를 통해서 F<sub>420</sub> 합성능력을 상실한 *M. bovis* mutant를 얻었다. 이 균주의 경우, F<sub>420</sub>은 합성하지 않으나 그 전구물질인 F0는 합성하

고 있음이 HPLC 분석결과 밝혀졌다(Fig. 4). 또한 inverse PCR을 이용해서 transposon의 삽입부위를 확인해 본 결과, 이 mutant에서는 transposon이 Rv2435c ORF에 삽입되어 있음을 알아낼 수 있었다. 따라서 F0가 F<sub>420</sub>으로 변환되는 과정에 Rv2435c 단백질이 관여하고 있음을 알 수 있었다. BLAST로 검색한 결과, 이 Rv2435c 단백질이 다른 adenylyl cyclase들과 높은 유사성을 보임에 따라 이 단백질이 adenylyl cyclase 활성을 가지는지를 확인해 보고자 하였다.

Adenylyl cyclase는 ATP를 cAMP로 전환시키는 효소로서, 이렇게 생성된 cAMP는 많은 생물체들에서 signal transduction의 매개체 또는 조절인자로서 중요한 역할을 하고 있다. 한편, 결핵을 일으키는 tubercle bacillus는 mammalian cell내에 침입하여, macrophage, monophage 또는 mononuclear phagocyte에 의해 제거되지 않고 세포내에 생존할 수 있으며, 영구적이고 만성적인 감염을 일으킨다. 침입한 pathogen은 mammalian host와의 다양한 cross-talk 양상에 의해 증식하는 동안 위장하고, host의 방어기작을 피한다. 그러나 host와 pathogen의 communication에 관련된 화학적 특성이나 환경변화에 대한 반응과 조절에 관련된 bacteria의 신호전달 과정은 거의 알려져 있지 않으며, 다만 mycobacteria를 섭취한 macrophage 내부에서 cAMP의 농도가 상승했고, 또한 phagosome-lysosome의 융합이 저해되었다는 보고가 있을 뿐이다[14,17]. 따라서 이 병원균들이 숙주세포내에서 생존하기위해 세균의 AC들이 중요한 역할을 하고 있을 가능성이 있다. 또한 *E. coli*와 같은 세균의 경우에는 cAMP를 만들기 위하여 단 하나의 *cya* 유전자를 가지고 있는데 반해서, *M. tuberculosis*의 genome에는 Class III AC로 추정되는 ORF들이 15개나 존재하고 있다. 왜 이 세균이 이렇게 많은 AC ORF를 가지고 있는지, 그리고 이 중에서 과연 몇 개의 ORF가 활성을 가지는 AC를 암호화하고 있는지는 알려져 있지 않다. 그 중에서도 Rv1625c와 Rv2435c는 다른 prokaryotic cyclase와 달리 포유류의 AC와 유사성이 높고, 따라서 아마도 이 병원균이 숙주인 포유류로부터 획득한 것이 아닌가 하는 의견도 제시되고 있다. 그러므로 Rv2435c gene의 구조와 기능에 대한 이해가 중요한 의미를 지닐 수 있다.

Rv2435c DNA sequence를 BLAST search한 결과, full-length protein은 80.3 kDa이며, extracellular domain은 환경변화에 대한 sensor 기능을 가지는 *D. vulgaris*의 chemotaxis receptor (DcrH)로 추정되는 protein과 유사하므로 환경변화를 인식하는 기능을 가지는 것으로 추정되고[8], cytoplasmic domain은 adenylyl cyclase들과 유사하므로 AC 활성을 가지는 것으로 추정된다[11]. 따라서 본 연구에서는 Rv2435c 단백질의 catalytic domain을 *cya*인 *E. coli* DHT1에서 발현시켜 AC 활성의 유무를 complementation을 통해서 확인해 보고자 하였다. *E. coli* DHT1 균주는 adenylyl cyclase를 암호화하는 *cya* 유전자가 deletion에 의해 inactivation되어있기

때문에 cAMP를 생합성할 수가 없다. 따라서 cAMP-receptor protein (CRP)에 의해 activation되는 promoter들은 기능을 발휘하지 못하게 된다. 그러므로 이 균주는 lactose나 maltose와 같은 당들을 이용할 수가 없게 된다. 그러나 기능을 가진 AC가 plasmid로부터 생성된다면 이러한 당들을 다시 이용할 수 있게 된다. pRv2435c-3 plasmid를 *E. coli* DHT1에 도입시킨 후 확인한 결과, C-말단에 histidine-tag를 가진 단백질이 *E. coli* 세포 내에서 정상적으로 생성되는 것이 확인되었으나, complementation은 일어나지 않았다. 또한 *E. coli*에서 Rv2435c protein을 발현시킬 때, IPTG를 이용하여 induction을 수행하여도 결과는 마찬가지였다.

Mutation을 통해서 AC 활성을 획득하도록 유도해 보기 위하여 hydroxylamine을 이용한 *in vitro* mutagenesis, 그리고 UV 조사를 통한 *in vivo* mutagenesis를 시도해 보았으나 어느 경우에도 complementation은 일어나지 않았다.

최종적으로, 이미 AC 활성을 가지는 것이 밝혀진 Rv1625c의 catalytic domain과 Rv2435c protein의 catalytic domain으로 추정되는 부분의 hybrid들을 제조하여 complementation이 일어나는지를 조사하였으나, 어떤 경우에도 complementation은 일어나지 않았다. 물론 positive control로 사용한 Rv1625c에서는 AC 활성이 명확하게 관찰되었다[11]. 따라서 Rv2435c 단백질이 AC 활성을 가지고 있을 가능성은 매우 낮다고 판단된다.

위에서 얻어진 결과들을 종합하면, Rv2435c ORF에 transposon이 삽입된 mutant에서는 F<sub>420</sub>의 생합성 능력이 상실되었으므로 Rv2435c 단백질이 cAMP를 합성하는 이외의 다른 방법으로 F<sub>420</sub>의 생합성에 영향을 미칠 가능성을 생각해 볼 수 있다. 또한 Rv2435c, Rv2434c, Rv2433c 및 Rv2432c ORF들이 서로 부분적으로 overlap되어 있으므로 polarity의 가능성을 생각해 볼 수 있다. 이 경우, 실제로 F<sub>420</sub>의 생합성에 관여하는 단백질은 Rv2435c가 아니라 그 아래쪽에 있는 다른 단백질일 가능성이 크다고 볼 수 있다. 이러한 여러 가지 가능성에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다고 본다.

## 요 약

*Mycobacterium bovis* BCG 균주에 transposon을 사용하여 mutagenesis를 수행함으로써 mutant library를 제조하였다. 이 mutant library를 screening하여 항결핵제인 PA-824에 내성을 갖는 mutant들을 얻었고, *M. bovis* wild type에서는 정상적으로 생성되는 coenzyme F<sub>420</sub>이 대부분의 이들 mutant들에서는 생성되지 않는다는 것을 알게 되었다. 세포 추출액을 HPLC로 분석해본 결과, 그 중에서 한 mutant는 F<sub>420</sub>을 생성하지 않으나 그 전구물질인 F<sub>0</sub>는 생성하고 있음이 밝혀졌다. 따라서 이 mutant에서는 F<sub>420</sub> 생합성 회로의 마지막 단계가 차단되어 있음을 알 수 있다. 이 mutant를 inverse PCR을 통해 분석해본 결과, transposon이 Rv2435c 유전자에 삽입되

어있는 것을 확인할 수 있었다. Rv2435c 유전자는 세포막에 결합되어있는 80.3 kDa의 단백질을 암호화하는 것으로 추정되고, 이 단백질의 N-말단은 periplasm에 존재하고 C-말단은 원형질에 존재하는 것으로 추정되고 있다. 원형질에 존재하는 C-말단은 원핵생물과 진핵생물들의 adenylyl cyclase들과 높은 유사성을 나타낸다. Adenylyl cyclase는 ATP로부터 cAMP를 생합성하는 효소이다. *M. tuberculosis* 나 *M. bovis*의 genome에는 class III adenylyl cyclase를 암호화하는 것으로 추정되는 유전자가 모두 15개나 존재한다. 특히 이들 중에서 Rv1625c와 Rv2435c는 포유류의 adenylyl cyclase들과 높은 유사성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이 Rv2435c 단백질이 진정된 adenylyl cyclase인지를 확인하기 위하여 우리는 이 단백질 중에서 원형질에 존재하는 부분을 C-말단에 6개의 histidine을 첨부한 채로 대장균에서 발현시켰다. 대장균에서 이 단백질이 생성되는 것은 histidine이 첨부된 단백질을 Ni-NTA resin을 사용하여 대장균으로부터 분리함으로써 확인하였다. 그러나 이 단백질이 대장균에서 *cya* mutation을 complementation하지 못하였고, 따라서 이 단백질이 adenylyl cyclase 활성을 갖지 않음을 알 수 있었다. 자외선이나 hydroxylamine을 사용한 mutagenesis 또는 Rv2435c와 Rv1625c 간의 fusion단백질을 만들어서, 이 단백질이 adenylyl cyclase로서의 활성을 획득하도록 하는 모든 시도는 실패하였다. 따라서 Rv2435c 단백질이, F<sub>0</sub>가 F<sub>420</sub>으로 변환되는 데에 영향을 미치는 방법이 cAMP를 생합성함으로써가 아니라 다른 방법으로 영향을 미치고 있다는 것을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 지원에 의해서 수행되었으며 (R05-2002-000-00074-0), 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. Aronshtam, A. and M. G. Marinus. 1996. Dominant negative mutator mutations in the *mutL* gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2498-2504.
2. Bae, Y. M. and L. Daniels. 2005. Mutations in the PPE genes that confer resistance to a nitroimidazopyran drug on *Mycobacterium bovis* strains. *J. Life Sci.* **15**, 182-185.
3. Barak, Y., O. Cohen-Fix and Z. Livneh. 1995. Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. *J. Biol. Chem.* **270**, 24174-24179.
4. Bollag, D. M. and S. J. Edelman. 1991. *Protein methods*. 2nd ed., Wiley-Liss Inc., New York.
5. Choi, K. P., T. B. Bair, Y. M. Bae and L. Daniels. 2001. Use of transposon Tn5367 mutagenesis and a nitroimidazopyran-based selection system to demonstrate a requirement for *fbtA* and *fbtB* in coenzyme F<sub>420</sub> biosynthesis by *Mycobacterium*

- bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **183**, 7058-7066.
6. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.
  7. Dautin, N., G. Karimova, A. Ullmann and D. Ladant 2000. Sensitive genetic screen for protease activity based on a cyclic AMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**, 7060-7066.
  8. Deckers, H. and G. Voordouw. 1996. The *dcr* gene family of *Desulfovibrio*: implications from the sequence of *dcrH* and phylogenetic comparison with other *mcp* genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 21-29.
  9. Dye, C., M. A. Espinal, C. J. Watt, C. Mbianga and B. G. Williams. 2002. World-wide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **185**, 1197-1202.
  10. Garnier, T., K. Eiglmeier, J. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon and R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7877-7882.
  11. 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.
  12. Husson, R. N., B. E. James and R. A. Young. 1990. Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 519-524.
  13. Linder, J. U. and J. E. Schultz. 2003. The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell. Signal.* **15**, 1081-1089.
  14. Lowrie, D. B., V. R. Aber and P. S. Jackett. 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.
  15. McCue, L. A., K. A. McDonough and C. E. Lawrence. 2000. Functional classification of cNMP-binding proteins and nucleotide cyclases with implications for novel regulatory pathways in *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res.* **10**, 204-219.
  16. Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
  17. Padh, H. and T. A. Venkitasubramanian. 1980. Lack of adenosine-3',5'-monophosphate receptor protein and apparent lack of expression of adenosine-3', 5'-monophosphate functions in *Mycobacterium smegmatis* CDC46. *Microbios.* **27**, 69-78.
  18. Pelicic, V., M. Jackson, J. M. Reyrat, W. R. Jacobs, Jr., B. Gicquel and C. Guilhot. 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10955-10960.
  19. Reddy, S. K., M. Kamireddi, K. Dhanireddy, L. Young, A. Davis and P. T. Reddy. 2001. Eudaryotic-like adenylyl cyclases in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Biol. Chem.* **276**, 35141-35149.
  20. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd eds.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
  21. Segovia-Juarez, J. L., S. Ganguli and D. Kirschner. 2004. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model. *J. Theor. Biol.* **231**, 357-376.
  22. Silhavy, T. J., M. L. Berman and L. W. Enquist. 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
  23. Stover, C. K., P. Warrener, D. R. VanDevanter, D. R. Sherman, T. M. Arain, M. H. Langhorne, S. W. Anderson, J. A. Towell, T. Yuan, D. N. McMurray, B. N. Kreiswirth, C. E. Barry and W. R. Baker. 2000. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **405**, 962-966.
  24. Vallejo, A. N., R. J. Pogulis and L. R. Pease. 2003. *Mutagenesis and synthesis of novel recombinant genes using PCR*, pp. 467-474, In Dieffenbach, C. W. and G. S. Dveksler (eds.), PCR Primer, 2nd ed., Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.