

碩士學位論文

*Escherichia coli* Ornithine  
Transcarbamylase의 Serine 55에 관한  
돌연변이 시스템 확립

濟州大學校 大學院

化學科



吳 英 鮮

1997年 2月

---

Site-Directed Mutagenesis of  
Serine 55 in *Escherichia coli* Ornithine  
Transcarbamylase

**Young-Sun Oh**

(Supervised by Sunjoo Lee, Ph. D., Assistant Professor of  
Department of Chemistry )



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
**MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1997. 2

*Escherichia coli* Ornithine  
Transcarbamylase의 Serine 55에 관한  
돌연변이 시스템 확립

지도교수 李 璿 柱

吳 英 鮮

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

1997年 2月

오영선의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 :

정 특 상

委

員 :

김 원 경

委

員 :

이 석 주

濟州大學校 大學院

1997年 2月

# 목 차

	page
List of Tables .....	iii
List of Figures .....	iv
Abstract .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	13
III. 결 과 .....	20
IV. 고 찰 .....	28
요 약 문 .....	32
참고문헌 .....	33



---

## List of Tables

	page
<b>Table 1.</b> Comparison of residues implicated in binding and catalysis of ornithine and aspartate transcarbamylase from <i>E. coli</i> K-12. .....	9
<b>Table 2.</b> Comparison of amino acid sequences in the phosphate binding sites of several phosphate binding proteins. .....	11
<b>Table 3.</b> Amino acid to be mutated and mutagenic primers. .....	15
<b>Table 4.</b> The viabilities of TB 2 strains under various growth conditions. .....	21
<b>Table 5.</b> The comparison of kinetic parameters of <i>E. coli</i> ornithine transcarbamylase. .....	23

---

## List of Figures

	page
<b>Figure 1.</b> Urea cycle and ornithine transcarbamylase catalyzed reaction. .....	3
<b>Figure 2.</b> Substrate binding mechanism of ornithine transcarbamylase. .....	4
<b>Figure 3.</b> Binding of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate to the catalytic unit of the holoenzyme, aspartate transcarbamylase. .....	10
<b>Figure 4.</b> Strategy for site-directed mutagenesis by Polymerase Chain Reaction. .....	18
<b>Figure 5.</b> The results of the agarose gel electrophoresis for Polymerase Chain Reaction product of <i>argI</i> gene. .....	20
<b>Figure 6.</b> The results of the agarose gel electrophoresis for <i>pKK/argI</i> plasmid. .....	22
<b>Figure 7.</b> The results of the SDS polyacrylamide gel electrophoresis for the expressed <i>argI</i> gene product. .....	23

**Figure 8.** 5'- and 3'- DNA Intermediates made by Polymerase Chain Reaction.  
..... 24

**Figure 9.** Mutant *argI* genes made by Polymerase Chain Reaction.  
..... 25

**Figure 10.** The results of gel electrophoresis after HindIII/EcoR I digestion of mutant *argI*/pKK223-3.  
..... 26

**Figure 11.** The results of DNA sequencing of mutant and wild type *E. coli* ornithine transcarbamylase.  
..... 26

**Figure 12.** Purification profile of Cysteine-55 mutant *E. coli* ornithine transcarbamylase.  
..... 27



## ABSTRACT

*E. coli* ornithine carbamyltransferase is the enzyme which catalyzes the first step of biosynthetic pathway of arginine. It is the condensation reaction of L-ornithine and carbamyl phosphate to produce L-citrulline. Ornithine transcarbamylase also includes a conservative amino acid stretch, -Ser-Thr-Arg-Thr-, of various phosphate binding proteins. The stretch has been implicated as the binding site of carbamyl phosphate. The enzyme undergoes the conformational change upon the binding of carbamyl phosphate which is the first substrate to bind to the enzyme. To understand the structural and functional roles of Serine 55 which is implicated in the carbamyl phosphate binding, mutant enzymes have been constructed at this position by applying the site-directed mutagenesis. The serine residue was mutated to cysteine, alanine and glycine to observe the charge and size effects. *E. coli argI*, gene for one of ornithine transcarbamylase isozymes, was cloned by the polymerase chain reaction (PCR). The *argI* was amplified from genomic DNA of *E. coli* DH5 $\alpha$  strain, and ligated to the prokaryotic expression vector, pKK223-3. The recombinant DNA was transformed to *E. coli* TB 2 cell which lacked the isozymes of ornithine transcarbamylase. The results of medium selection and enzyme assay indicated that ornithine transcarbamylase was cloned. The enzyme was purified and confirmed by the SDS PAGE and kinetic results. Site-directed mutagenesis was applied to mutate serine to cysteine, alanine or glycine. The template was cloned wild type *argI*. PCR amplification resulted in mutant *argI* genes at Serine 55. They were ligated to pKK223-3 and transformed to TB 2 cell. The results of DNA sequencing clearly showed correct mutations were introduced.

In conclusion, The mutant enzyme systems of ornithine transcarbamylase at Serine 55 have been successfully constructed. These systems can be used for studying the roles of Serine 55 during the enzymatic catalysis.

# I. 서론

## 1. Ornithine Transcarbamylase 의 기능

오니틴으로부터 urea를 생성하는 Urea cycle은 생체 안에 존재하는 과량의 질소를 생체 밖으로 제거시키는 중요 신진대사의 단계에 위치하고 있다. Ureotelic animals에 의해서는 배출되는 암모니아의 약 90%가 urea의 형태로 존재한다. 생체 안에서 존재하는 아미노산의 deamination은 주로 transamination reaction에 의하여 일어나지만, amides 와 amino nitrogen은 암모니아를 발생시키는 근원이 된다. 이 urea cycle은 4개의 효소가 cyclic manner로 작용한다(Figure 1). 이 cycle에 의하여 생성되는 urea의 한 질소원자는 암모니아로부터 유래하고 두 번째 것은 aspartate로부터 유래한다. 또한 urea의 carbonyl group은 이산화탄소로부터 유래하며, 오니틴은 질소와 carbonyl group의 carrier로 작용하고 매 cycle마다 재생된다. 본 논문 실험에서 연구하려는 ornithine transcarbamylase (OTCase; EC 2.1.3.3)는 urea cycle의 첫 단계에서 오니틴과 카바밀인산의 축합반응으로부터 시트룰린을 합성하는 반응을 촉진하는 효소이다(Figure 1).



human plasma에 용해되어 있는 평균 암모니아의 양은 약  $50\mu\text{g}/100\text{ml}$  이다. 이 양의 2배 이상이 되면 hyperammonemia와 같은 증상이 확연히 드러나는데 urea cycle은 이처럼 강한 독성의 암모니아를 다른 화학적 형태로 변환시키기 때문에 생체 안에서 암모니아의 독성을 막는데 매우 중요한 기능을 하고 있다. Urea cycle의 한 구성원인 Ornithine transcarbamylase(OTCase)의 유전자는 성염색체 중 X chromosome에 관련되어 있으며 (Short *et al.*, 1973) 그 결핍증은 매우 심각한 결과를 초래한다. Ornithine transcarbamylase 결핍증의 남자 태아는 출생 후 곧 사망하며 (Marc *et al.*, 1979), 생존시에는 ammonia intoxication (hyperammonemia), mental retardation, neurologic impairment등을 겪는다 (Levin *et al.*, 1969).

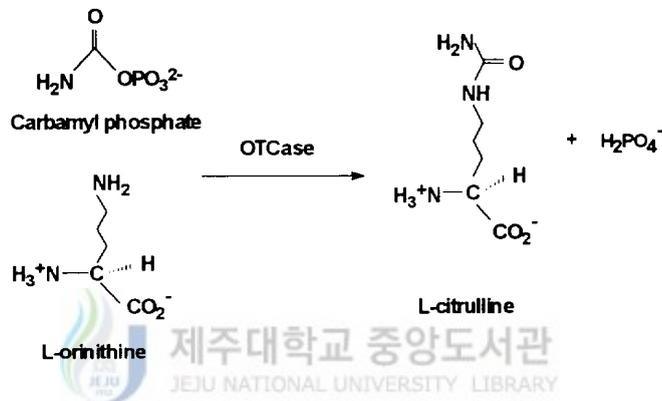
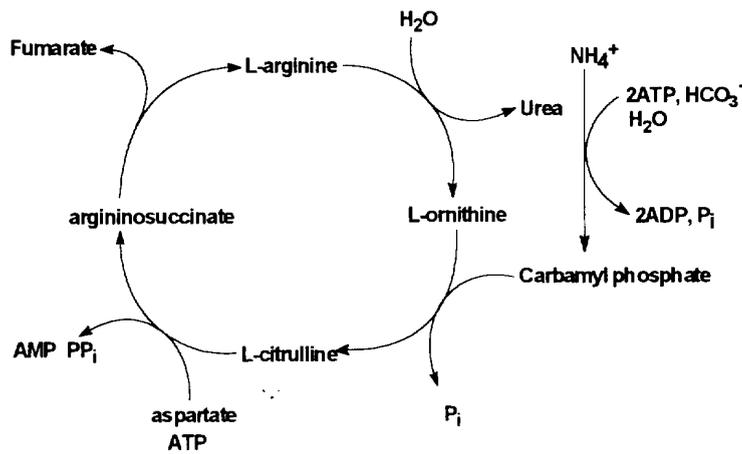


Figure 1. Urea cycle and ornithine transcarbamylase-catalyzed reaction

## 2. Ornithine transcarbamylase의 특성 및 구조

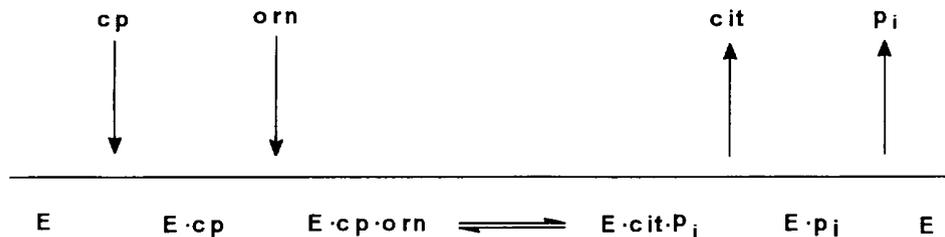
고등동물에 존재하는 ornithine transcarbamylase는 3개의 똑같은 subunits로 구성되어 있고 분자량은 약 110 kD 이며, 오니틴으로부터 시트룰린을 생성하는 정반응만을 촉매하는 anabolic enzyme이다. 그러나, eukaryote 중에서는 yeast, 그리고 일부의 prokaryote에서는 역반응을 촉매하는 catabolic enzyme도 존재한다. 대부분의

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).

### 1) Steady-state kinetics(정류상태 반응속도론)

다양한 세포들로부터 얻은 anabolic ornithine transcarbamylase는 매우 비슷한 반응속도 성질들을 갖는다. *E. coli*로부터 얻은 ornithine transcarbamylase은 Michaelis-Menten Kinetics을 따르고, Figure 2A에서 보듯이 pH 8 이상에서 기질의 결합과 생성물의 이탈이 모두 순차적이다. 첫반응에서, 효소는 첫 번째 기질인 카바밀인산과 결합하고, 두 번째 생성물인 inorganic phosphate을 방출한다(Marshall and Cohen, 1972; Legrain and Stalon, 1976; Kuo *et al.*, 1985a). pH 7 이하에서, 효소는 enzyme-carbamyl phosphate 복합체를 거쳐 우선적인 경로로 random binding mechanism을 따른다(Figure 2B, Wargnies *et al.*, 1978). 반응물들의 ternary complex(효소-카바밀인산-L-Ornithine; E-Cp-Orn)와 생성물의 ternary complex(효소, L-Citrulline와 인산; E-citrulline-P<sub>i</sub>)의 존재는 Legrain와 Stalon에 의해 밝혀졌다 (Legrain, C. & Stalon, 1976).

#### (A) BI-BI ORDERED MECHANISM



(B) RAPID-EQUILIBRIUM RANDOM MECHANISM

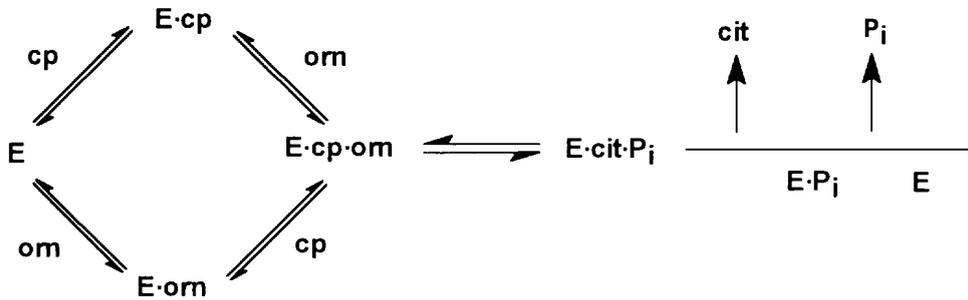


Figure 2. Mechanism of ornithine transcarbamylase

2) 기질의 고유성

Ornithine transcarbamylase는 기질들에 대한 선택의 고유성 (substrate specificity)이 매우 강하여 오니틴과 카바밀인산의 유사 기질(substrate analog)의 경우에 본래의 기질들에 비해서 5% 미만의 고유성을 가지고 있을 뿐이다. 이와 같은 리간드들이 효소에 결합하고 또한 transcarbamylation의 촉매작용에 관여하는, 효소의 활성화 자리에 있는 아미노산 잔기는 결합하는 리간드들에 따라 크게 2 가지로 분류할 수 있다. 즉, chemical modification 실험결과에 의하면 카바밀인산의 결합에는 적어도 한 개씩의 lysine (Marshall & Cohen, 1980) 과 arginine group (Marshall & Cohen, 1980; Kantrowitz *et al.*, 1980)이 작용하며 또 다른 기질인 오니틴 결합에는 cysteinyl group (Marshall & Cohen, 1980)이 작용한다. 이 결과로 제시된 아미노산 잔기들의 효소 단백질에서의 구조적 역할 및 촉매 기능에 대한 역할이 분자단계에서 좀더 세밀하게 관찰되었다. *E. coli*의 *argI* 유전자에 의하여 expression되는 Ornithine transcarbamylase의 arginine 57의 잔기를 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 glycine으로 치환시킨 돌연변이 효소의 경우에 이 잔기가 카바밀인산의 결합에 역할을 하며 induced fit 형태의 단백질 구조의 변화를 유발하여 효소와 카바밀인산의 착

물 (E-CP binary complex)에 대한 오니틴 결합의 고유성을 높여준다. 이 arginine 잔기에 의하여 전과되는 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 잔기는 active pocket에서 오니틴과 금속 아연 이온이 결합하는 잔기로서 작용한다 (Lee *et al.*, 1990; Kuo *et al.*, 1990).

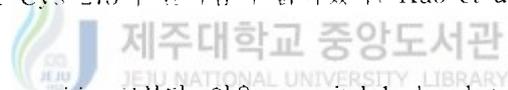
### 3) OTCase의 유전자들

Ornithine transcarbamylase는 고등동물에서는 미토콘드리아 matrix에 존재하고 효소의 선 구체는 핵 (nucleus)에서 expression되며 mitochondrial targeting sequences가 N-terminus 위에 붙어있다. 이 leader peptide의 크기는 약 4 kD이며 효소 단백질이 미토콘드리아의 세포막에 있는 receptor에 의하여 translocation된 후에, Zn(II)에 의존하는 matrix protease에 의하여 제거된다 (Horwich *et al.*, 1984). 이 선 구체에 대한 핵산의 염기서열과 이로부터 산출된 아미노산서열이 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 Human 과 rat의 ornithine transcarbamylase는 놀라운 정도의 동질성을 가지고 있다. 이 두 효소들은 같은 수의 amino acids를 가지고 있으며, 아미노산 단계에서 93%, 그리고 DNA의 open reading frame (ORF)에서 89%의 동일성을 가지고 있다. Prokaryotes의 경우에는 *E. coli*의 *argI* (Bencini *et al.*, 1983; Kuo *et al.*, 1988) 와 *argF* (Bencini *et al.*, 1983), 그리고 다른 prokaryotes의 유전자의 핵산의 염기서열이 알려져 있다.

### 3. Ornithine transcarbamylase 활성의 조절

#### 1) 효소 활성의 조절

금속 효소 (metalloenzyme)에 있어서 금속이온들은 주로 효소의 구조적 분절 (conformational integrity)을 유지하거나 촉매작용에 직접적으로 참여한다. OTCase 경우에는 금속이온이 이 두 가지의 목적으로 쓰여지지 않는다. ornithine transcarbamylase는 금속이온이 없어도 구조적으로 매우 안정하며 in vitro에서 오니틴으로부터 시트룰린을 생성하는 촉매 작용도 매우 높은 고유활성 (specific activity)을 나타낸다. 그러나, *E. coli*의 *argI* 유전자에 의하여 발현된 ornithine transcarbamylase에 있어서 아연 금속이온이 효소의 substrate cooperativity를 유발시키고, 이 금속이온은 in vitro에서 효소활성의 제어통제에 요구되는 allosteric cofactor로서 작용한다는 것이 발견되었다 (Kuo *et al.*, 1983). 즉,  $Zn^{2+}$  이온은 두가지 작용을 한다: 하나는 카바밀인산이 결합하지 않은 효소에 tight binding inhibitor로서 작용한다. 두 번째는 카바밀인산과 결합한 효소에 allosteric interaction을 유발시켜 오니틴의 결합이 cooperative하게 한다(Lee *et al.*, 1990). 아연이온이 효소에 결합하는 결합리간드중의 하나로는 Cys-273이 관여함이 밝혀졌다( Kuo *et al.*, 1990).



최근에 *A. parasiticus*로부터 얻은 mannitol-1-phosphate dehydrogenase도 역시  $Zn(II)$ 이온에 의하여 substrate cooperativity가 유발된다는 것이 보고되었다 (Foreman & Niehaus, 1985). 아연 금속이온이 효소에 대하여 allosteric cofactor로 작용하는 것은 이 두 효소 외에는 아직 알려지지 않았다. 한편 ornithine transcarbamylase는 allosteric 효소인 aspartate transcarbamylase (ATCase)와 같이 카바밀인산을 공통으로 소유한다. 그러기 때문에 OTCase에 결합이 있을 때는 pyrimidine 생합성 경로 (biosynthetic pathway)에서 과량의 카바밀인산이 남기 때문에 eukaryotes에서 pyrimidine 중간체가 누적되는 현상이 일어난다 (Ratner, 1973). 그러므로, 생체 안에서 carbamyl phosphate pool의 delicate한 분포는 urea cycle과 pyrimidine 생합성경로 사이에서 서로 엮들려 일어나는 신진대사의 제어통제를 하는 두 transcarbamylase에 의하여 일어난다고 유추된다.

## 2) Ornithine transcarbamylase와 Aspartate transcarbamylase 의 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 kD으로 3개의 동일한 subunit으로 구성되어 있다(Konigsberg & Henderson, 1983). 모든 *E. coli*의 ornithine transcarbamylase와 aspartate transcarbamylase에 관하여 아미노산 염기서열의 전반부의 반은 카바밀인산의 binding domain에 해당한다. 카바밀인산에 대한 두 효소의 binding domain은 동일하다. *E. coli argI*와 *pyrB* 사이의 전 homology는 대략 35~40%이다(Vliet *et al.*, 1984). Aspartate transcarbamylase의 카바밀 인산 domain을 ornithine transcarbamylase의 카바밀인산 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.



## 4. 연구 필요성

카바밀인산이 결합하는 효소상의 리간드는 어떠한 아미노산 잔기들이 있는가? 이에 대한 정확한 연구 결과는 아주 미미한 정도이다. 특히, 이 효소의 3-dimensional structure가 밝혀지지 않은 상태에서 카바밀인산이 결합하는 효소상의 아미노산 리간드를 정확히 추정하여 알아낸다는 것은 쉽지 않다. 그래서, 지금까지 보고된 연구결과에서 얻은 간접적 증거로부터 카바밀인산의 결합에 관여하는 효소상의 아미노산의 발견과 그것들을 확인하는 필요성이 대두되었다. 카바밀인산의 phospho oxygens에 결합하는 aspartate transcarbamylase(ATCase)의 아미노산 잔기에는 Table 1과 Figure 3에서 보여진 것처럼 약 7개가 있다. 그 중 2개의 serines이 작용을 하고 있다. 이와 같은 serine 잔기는 Table 2에서 보듯이 phosphate binding

proteins에 자주 나타나는 아미노산 잔기들로서, 일반적으로 protein kinases에 의하여 phosphorylation이 되는 target 잔기들이다. Ornithine transcarbamylase(OTCase)도 ATCase와 carbamyl phosphate binding domain이 매우 흡사하다는 보고가 있고, 따라서 같은 아미노산 잔기들이 리간드로서 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>	
carbamyl phosphate domain	Serine	52	Serine	55
	Threonine	53	Threonine	56
	Arginine	54	Arginine	57
	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).

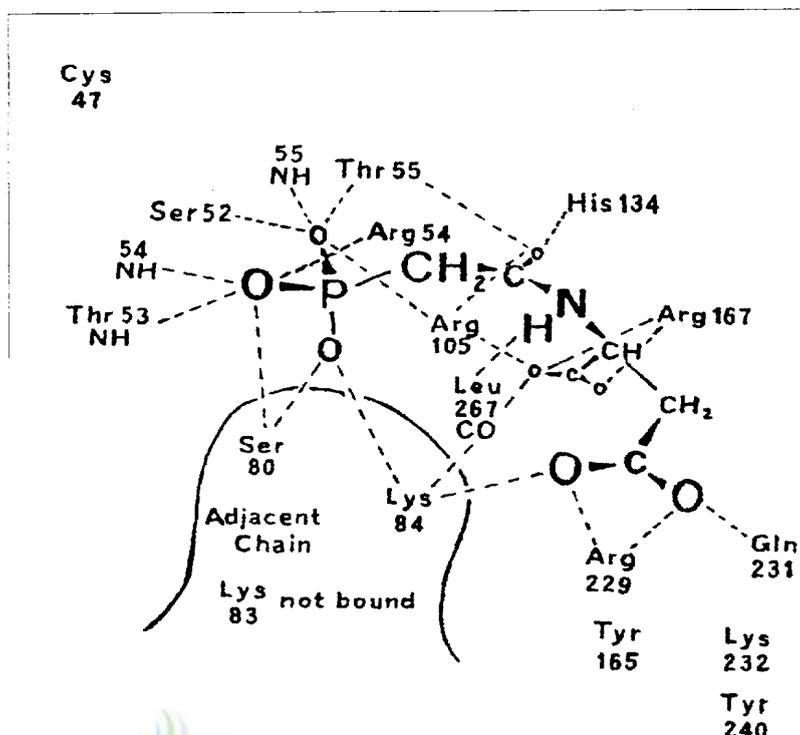


Figure 3. Binding of N-(phosphonacetyl)-L-aspartate to the catalytic unit of the holoenzyme, aspartate transcarbamylase (Volz *et al.*, 1986)

Table 2. Comparison of amino-acid sequences in the phosphate binding sites of several phosphate binding proteins<sup>a</sup>

protein	Sequence
Myelin protein	gly-ser(OH)-gly-lys(-)-asp
Histone H2A	ser(OH)-gly-arg(+)-gly
Histone H4	ser(OH)-gly-arg(+)-gly
Histone H1	gly-ser(OH)-phe-lys(+)-leu
Glycogen synthetase	ile-ser(OH)-val-arg(-)-
Troponin	ile-thr(OH)-ala-arg(+)-gly
Flavodoxin	gly-ser(OH)-gly-lys(+)-gly
Adenylate kinase	gly-ser(OH)-gly-lys(-)-gly
Aspartate transcarbamylase	ala-ser(OH)-thr-arg(+)-thr
Ornithine transcarbamylase	ala-ser(OH)-thr-arg(-)-thr
Consensus sequence <sup>b</sup>	X-ser(OH)-X-arg(+)-X or lys(+)

<sup>a</sup> This table is adapted from that in Bencini *et al.*,(1986).

<sup>b</sup> X represents an undefined amino acid, (-) represents a positively charged amino acid(OH) denotes an amino acid with a hydroxyl group.

카바밀인산과 결합하는 아미노산 잔기들 중에서 Arginine 57이 protein isomerization에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다. Site-directed mutagenic method를 이용하여 Arginine 57을 Glycine으로 치환시킨 돌연변이 효소의 경우 isomerization이 일어나지 않았다. 이것은 charge와 size효과가 동시에 일어났기 때문에 정확히 어느 요인이 isomerization에 어느 정도 작용을 하는지 확실치가 않다. 즉, arginine의 uredo group이 다른 음전하의 아미노산 잔기와 salt linkage를 이루고 있는지, 아니면 size가 큰 R group이 glycine의 H group으로 됨에 의하여 spectroscopy로는 검출되지 않는 국지적 영향이 일어나 오히려 트랜스카바밀라제의 카바밀인산에 의한 isomerization을 방해하는지 확실치가 않다. 전통적 방법인 chemical modification에 의한 아미노산 잔기들의 중요성을 알아내는 경우도 있지만, 현재 사용되고 있는 유전공학 방법으로 보완되어야 할 부분들이 있다. 즉, 단백질의 화학적으로 안정한 소수성의 아미노산 group들의 기능을 연구한다든지, 또는 단백질의 일정구간의 중요성을 연구할 때는, 전통적 방법은 제한점이 있다. point mutation의 경우에는 아미노산 잔기의 R group을 화학적으로 일정 경향성을 띤 그룹으로 돌연변이 시킴으로써 그 잔기의 기질의 결합과 촉매작용에서의 화학적 역할과 그 잔기의 행동양식을 조직적으로 밝혀낼 수 있다.

본 논문 연구의 궁극적인 목표는 카바밀인산이 오히려 트랜스카바밀라제에 결합할 때 enzyme isomerization을 유발하는데, Serine 55 잔기가 구조변환에 어느 정도 기여를 하는지 정량적으로 밝혀내려고 한다. ornithine transcarbamylase의 Serine 55이 구조와 촉매기능에 관여하는 자세한 메커니즘을 분자단계에서 연구하는데 예비적으로 꼭 필요한 단계로서 돌연변이 효소를 얻는 것이 필요하고, 이는 site-directed mutagenesis방법을 이용하여 얻었다. 논문 실험의 범위는 Serine 55의 역할을 알아내기 위한 한 준비단계로서 돌연변이체를 확립하는 것이다. *E. coli* 오히려 트랜스카바밀라제의 *argI*가 본 연구실에서는 보유하고 있는 것이 없기 때문에 이를 클로닝하고 Serine 55가 Cysteine, Alanine, Glycine 로 치환된 돌연변이 오히려 트랜스카바밀라제 발현 시스템을 확립하는 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시 약

PCR (DNA Polymerase Chain Reaction)에 이용되는 Taq DNA polymerase 와 Oligodeoxynucleotides는 Korea Biotech에서 구입하였고, 제한효소(HindIII, EcoR I)와 디옥시뉴클레오티드는 BM Korea에서 구입하였다. Prokaryotic expression vector인 pKK223-3는 Pharmacia (Sweden)에서, Affinity chromatography에 사용되는 Matrex Blue Gel A와 DNA fragments를 여과시키는데 이용되는 Microcon은 Amicon(USA)에서 구입하였다. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP(spec. act. 3,000 Ci/mmol)은 Amersham(USA)에서 구입하였으며, Ampicillin, Trizma base, Agarose, Urea, Phenol, Ethanol, Sodium acetate, KCl, NaCl, Ammonium sulfate, 그리고 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Ornithine, Carbamyl phosphate, antipyrine, 2, 3-butadionmonoxime, (SIGMA, St Louis, Mo, USA)등 효소아제이와 molecular biology에 필요한 시약들은 모두 SIGMA에서 구입하여 사용하였다. RNase, T-Vector, Ligase, DNA Purification Kit, 제한효소인 HindIII, EcoR I (Promega, Northern California, USA), Yeast extract, Tryptone(DIFCO, USA), Sequencing kit(USB, USA), Thermocyclar(Pharmacia Co, Sweden), UV/Vis Spectrophotometer(KONTRON UVIKON 860, USA)등이 본 연구에서 사용되었다.

### 2. 방 법

#### 1) *E. coli* Genomic DNA 추출

*E. coli* Genomic DNA은 DH5 $\alpha$  strain[hsdR recA1  $\Delta$ (*argF-lacZYA*)U169  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15]로 부터 추출되었다. 먼저, DH5 $\alpha$ 을 LB plate에 도말하여 DH5 $\alpha$

single colony을 취해 LB 배지에서 12시간 동안 배양한 후, Bacterial cell을 5000rpm에서 5분간 원심분리기로 침전시킨다. 이 침전물을 TE 567 $\mu$ l, 10% SDS 3 $\mu$ l, 20mg/ml Proteinase K을 포함하는 완충용액으로 resuspension하고 난 후, 37 $^{\circ}$ C에서 1hr동안 반응시킨다. 5M NaCl을 100 $\mu$ l 가하고 잘 혼합시킨다. 순서적으로, CetylTetraAmmoniumBromide/NaCl 용액을 80 $\mu$ l 가하고 용해된 혼합물을 65 $^{\circ}$ C에서 10분동안 보관한다. 세포 lysate을 우선 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)로 처리한 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1)로 처리하여 추출한다. Genomic DNA에 isopropyl alcohol 0.6배 가하여 침전시키고, DNA 침전물을 70% Ethanol로 세척한다. genomic DNA을 TE 100 $\mu$ l에 resuspension시킨다.

## 2) *argI* 유전자 증폭과 Cloning

*argI* 유전자를 증폭하기 위해 Table 3에서 나타낸대로 2개의 Oligodeoxynucleotides를 디자인하여 합성하였다. 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'이다. 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 Thermocycler(Pharmacia Co. Sweden)에서 수행되었으며, *argI* 유전자는 2 $\mu$ g 정도의 genomic DNA, 2mM dNTP 10 $\mu$ l, 각각의 N-말단과 C-말단 primers 100pmol, 10 x reaction buffer 10 $\mu$ l, 2.5unit의 Taq DNA polymerase 를 함유하여 최종 용액 부피가 100 $\mu$ l에서 증폭시켰다. Denaturation 온도는 94 $^{\circ}$ C, Annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C, Extension 온도는 72 $^{\circ}$ C로 하였다. Amplification에 대한 더 자세한 사항은 Molecular Cloning의 방법을 참고하였다 (Molecular cloning 2, Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989). 증폭된 *argI* 유전자는 1% agarose gel electrophoresis에 의해 확인되었다. PCR하여 얻은 DNA들을 Low-melting-temperature Agarose gel electrophoresis를 하여 원하는 DNA band를

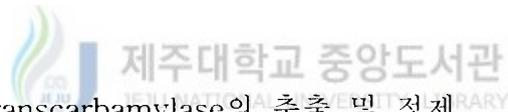
Table 3. Amino acid and mutagenic primers

Amino acid	Condon	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	Ser 55	TCG	
	Cys 55	TGC	TTC GAA AAA GAC TGC ACT CGT ACC CGA TGC TCT
			TCG GGT ACG AGT GCA GTC TTT TCT GAA GAT GAG
	Gly 55	GGG	TTC GAA AAA GAC GGG ACT CGT ACC CGA TGC TCT
			TCG GGT ACG AGT CCC GTC TTT TCT GAA GAT GAG
	Ala 55	GCC	TTC GAA AAA GAC GCG ACT CGT ACC CGA TGC TCT
TCG GGT ACG AGT CGC GTC TTT TCT GAA GAT GAG			

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

자른 후, 자른 agarose slice에 2배의 TE(20mM Tris · Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)를 가하고, Agarose gel를 melting시키기 위해, 65°C water bath에서 5분간 놓아두었다.

실온에서 용액을 식힌 후, 동량의 Phenol(pH 8.0)를 가하여 잘 혼합하고 5000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 수용액층만 micro tubes에 옮긴 후, 수용액과 동량의 chloroform/isoamyl alcohol(24:1)를 가하여 잘 혼합하고, 5000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 다시, 수용액층만 polystyrene centrifuge tubes에 옮기고 동량의 ether를 가하여 혼합한 후, 5000rpm에서 10분간 원심분리하였다. ether를 제거한 후, 남은 용액의 0.2배의 3M sodium acetate(pH 4.8)를 가하고 전체 용액의 2배의 ethanol를 가하여 잘 혼합하고 -70℃ 저온냉장고에 2시간 두었다. polystyrene centrifuge tubes를 10000rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하고 vacuum dry oven에서 건조시킨 후, TE(20mM Tris · Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 DNA들을 순수하게 분리 및 정제하였다. 정제한 *argI* 유전자 DNA와 발현 벡터인 pKK223-3을 EcoR I 과 HindIII으로 자른 후, 두 제한효소로 잘린 DNA fragments를 Amicon의 Microcon-30으로 여과시키고, T4 DNA ligase로 ligation시켰다. Shot-gun method에 의해 *argI* 유전자가 재조합된 plasmid을 TB 2[*E. coli* K-12:△(*argI-pyrBI*)*argF*] 세포에 형질전환시켰다. 형질전환 시킨 TB 2 cell을 M9 minimal plate(1mM Uracil, 50µg/ml Ampicillin)에 도말하였다. M9 ampicillin plate에서 얻은 colony을 50µg/ml Ampicillin로 처리된 LB 배지에서 배양하여 재조합 플라스미드로 형질전환이 된 세포를 얻었다.



### 3) Ornithine Transcarbamylase의 추출 및 정제

재조합 플라스미드(pKK/*argI*)를 포함하는 TB 2 cell의 colony을 M9/Uracil/Ampicillin/agar plate에서 선별하여 뽑는다. 50µg/ml Ampicillin를 함유하는 LB 배지 1L에 재조합 플라스미드(pKK/*argI*)를 가지고 있는 TB 2 cell을 37℃에서 밤새 배양한다. 세포 배양액을 5000rpm에서 20분동안 원심분리하여 침전시킨다. 침전물을 2배의 breakage buffer (100mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/40mM L-ornithine, pH 7.5)에 녹인다. 세포들을 Ultrasonicator로 40초 동안 lysis시키고, ice에서 1분간 냉각시킨 후, 다시 세포 배양액을 Ultrasonicator로 3~4회 반복하여 lysis시키고, ice에서 냉각시킨다. 이 세포 배양액을 12000rpm에서 20분간 원심분리시킨다. 상층액만을 65℃ water bath에서 10분동안 가운시킨후, ice bath에 놓아둔다. 상층액만을 취해서 40%

ammonium sulfate saturation을 한 후, 원심분리하여 상층액만을 취한다. 다시, 상층액을 90% ammonium sulfate saturation을 하고, 원심분리하여 상층액은 버리고, 침전물을 취한다. 60% ammonium sulfate/ 50mM potassium phosphate pH7.5 용액에 침전물을 30분동안 stirring시키면서 녹인 후, 원심분리시킨다. 침전물이 다 녹으면, 20mM Tris acetate buffer(pH7.5)에서 dialysis시킨다. 투석시킨 효소를 실온에서 Matrex Blue Gel A(Amicon)column으로 0~0.5M KCl gradient을 이용하여 분리시킨다. 효소 분액을 10mM Tris acetate(pH7.5)에서 투석시키고, Amicon의 단백질 농축기로 농축시킨다. Laemmli<sup>11)</sup> method에 따라, 전기영동하고, Coomassie Blue로 염색한 sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel 결과로 효소의 homogeneity를 확인하였다.

#### 4) Enzyme assays

효소에 의한 Steady-state 초기 속도는 한 종류의 기질을 포화상태의 농도로 고정시키고 분석되는 기질의 농도를 변화시켜 가면서 아세이를 수행하여 얻은 결과로부터 분석되었다. 오니틴과 카바밀인산에 대한 효소반응은 보통 반응혼합물에 카바밀 인산의 첨가되면서 시작된다. 초기속도를 Pastra-Landis method을 이용하여 반응 생성물인 L-citrullin의 생성속도로서 결정하였다. 효소반응은 5% 아세트산에 녹인 0.8% 2, 3-butadionmonoxime용액(0.8g/100ml)과 50% 황산에 미리 용해되어 있는 antipyrine(5g/1 l)용액부피 1:2비율로 섞어 만든 color reagent를 각 분석하고자 하는 시험관에 2ml씩 가함으로서 반응이 중단된다. 초기속도 결과는 nonlinear regression methods을 이용한 Michaelis-Menten equation (equation 1)에 적합함을 보여준다.

$$v = V_{\max}[S]/(K_M + [S]) \quad (\text{equation 1})$$

이 식에서,

V: Rate of catalysis,  $K_M$ : Michaelis constant,  $V_{\max}$ : Maximal rate, [S]: Substrate concentration이다.

## 5) Site-Directed Mutagenesis

PCR 방법은 돌연변이된 *E. coli argI* 유전자를 합성하는데 응용되었다. 간략한 schem은 Figure 4와 같다. Table 3와 같이 디자인된 2개의 돌연변이된 PCR primers은 각 돌연변이의 DNA중간체를 합성하는데 이용된다. 전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자는 5'- 와 3'- 말단 primers을 사용하여 2개의 중간체DNAs로부터 증폭된다(Denaturation, 94°C, 30sec ; Anealing, 65°C, 1min ; Polymerization, 72°C, 2min). Agarose gel electrophoresis을 한 결과, 새로이 합성된 DNA를 확인했다. 증폭된 돌연변이 *argI* 유전자를 pKK223-3 *E. coli* 발현벡터에 ligation시키고, 부분적으로 deletion mutation된 *argI* 유전자를 가지고 있는 *E. coli* TB 2 cell에 형질전환시켰다.

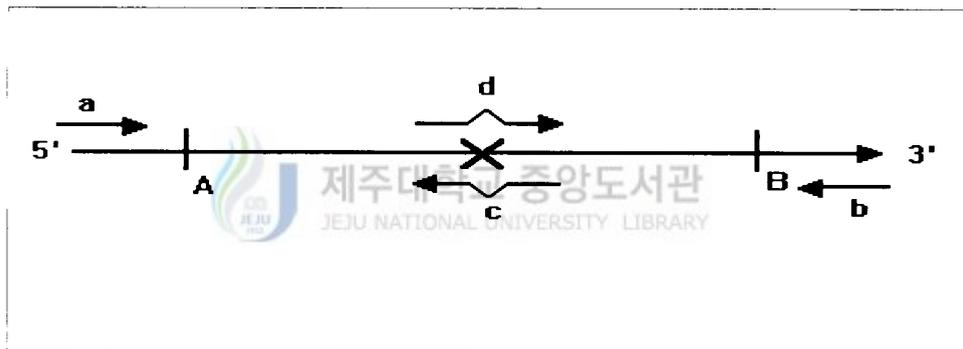


Figure 4. Strategy for PCR site-directed mutagenesis

A, B : restriction enzyme site

c, d : mutant primers

a : 5'-terminus primer

b : 3'-terminus primer

## 6) DNA Sequencing

증폭된 돌연변이 *argI* 유전자를 확인하기 위한 실험적 방법으로 DNA Sequencing을 사용하였다. clone을 선별하여 DNA Purification Kit(Wizard mini column, Promega Co)으로 DNA를 순수하게 분리 및 정제한 후, Sanger의 Dideoxy-mediated Chain-termination method(1977)를 이용하여 분석하였다. 순수 정제한 plasmid DNA 1~2 $\mu$ g를 template DNA로 사용하고, 여기에 2N NaOH/2mM EDTA 2 $\mu$ l를 가하여 실온에서 5분간 방치했다. 방치해 둔 Eppendorf tube에 2.5mM Sodium acetate(pH5.2) 3 $\mu$ l를 첨가한 후, cold-ethanol 75 $\mu$ l를 잘 혼합하여 -70 $^{\circ}$ C에서 15분간 보관하였다. 그런 다음, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 70% cold ethanol 200 $\mu$ l를 가하고 12,000rpm에서 15분간 원심분리했다. 다시 상층액을 버리고, DNA pellets을 얻은 후, 진공상태에서 건조시켰다.

Template DNA(1~2 $\mu$ g)에 5x sequencing buffer 2 $\mu$ l, primers 1 $\mu$ g을 첨가하고, 65 $^{\circ}$ C에서 2분간 가운한 후, 실온까지 천천히 식혀서 Annealing시켰다. 0.1M DTT 1 $\mu$ l, Labeling Mix (dGTP) 5x concentrate (7.5 $\mu$ M dGTP, 7.5 $\mu$ M dCTP, 7.5 $\mu$ M dTTP) 2 $\mu$ l, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP 0.5 $\mu$ l, sequenase 2 units를 혼합하여 실온에서 5분간 labeling 반응을 하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 Pre-warm시킨 4개의 termination mixture가 들어있는 Eppendorf tube(ddA, ddC, ddG, ddT)에 labeling 반응을 한 용액 3.5 $\mu$ l씩을 각각 4개의 Eppendorf tube에 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 Termination 반응을 실시하였다. Stop Solution(95% Formamide, 20mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue, 0.05% Xylene Cyanol FF) 4 $\mu$ l씩을 각각 4개의 termination mixture가 들어있는 Eppendorf tube에 가하여 Termination 반응을 멈추게 했다. Sequencing gel 전기영동을 하기 위해 samples을 75 $^{\circ}$ C에서 2분간 가운한 후, 얼음물에 냉각시켰다.

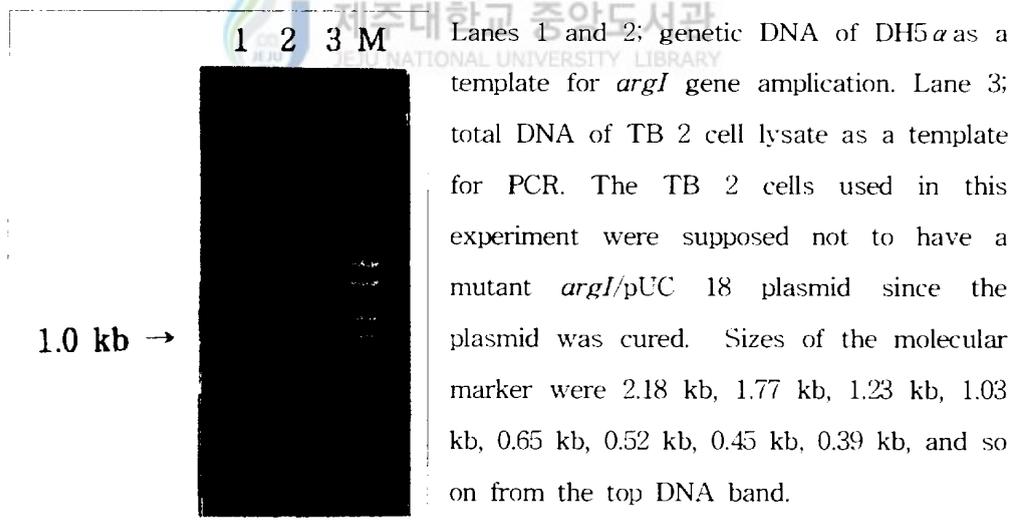
Sequencing gel 전기영동은 8% polyacrylamide/6M urea gel을 이용하여 1600V에서 5시간 동안 running하였다. 전기영동이 끝나면 10% MeOH/CH<sub>3</sub>COOH (1:1)에서 40분간 fixing시킨 후, Sequencing gel를 gel dryer로 2시간 정도 말린다. Sequencing gel이 마르면, X-ray film을 밀착시켜 -70 $^{\circ}$ C에서 12시간 정도 노출시킨 후, film을 현상하여 결과를 얻었다.

### III. 결 과

#### 1. Wild type *argI*의 cloning 및 확인

Ornithine transcarbamylase의 *argI* 유전자를 클로닝하기 위하여, Wild type *E. coli* genomic DNA로 부터 *argI* 유전자를 PCR로 증폭시켰다. 증폭하기 위한 Oligonucleotide primers은 발현벡터인 pKK223-3에 cloning을 실시하기 위해 HindIII와 EcoR I 효소의 restriction site을 첨가시켰다. Oligonucleotide primers은 Table 3을 참조하였다. 즉, 각각의 primer은 효소에 대해 좋은 기질로 작용하는 restriction enzyme site의 5' side에 5개의 extra bases를 첨가하였다. PCR을 하여 전기영동을 한 결과가 Figure 5이다.

Figure 5. The results of the agarose gel electrophoresis for PCR product of *argI* gene.



PCR하여 얻은 DNA를 Low-melting-temperature Agarose gel electrophoresis를 이용하여 순수하게 DNA를 분리 및 정제하였다. Wild type *argI* 유전자가 발현하는 양상을 보기 위하여 *E. coli* TB 2 cell를 host cell로 사용한다. *E. coli* TB 2 cell은 *pyrBI*와 *argI* 유전자가 모두 제거되어서 uracil과 arginine가 없는 medium에서는 자랄 수가 없다. *pyrBI*는 *E. coli* aspartate transcarbamylase의 유전자이다. 순수 분리 및 정제한 *argI*와 pKK223-3를 HindIII와 EcoR I 로 자르고, 여과시킨 후, Ligation시켜 재조합된 pKK223-3/*argI*를 competent TB 2 cell에 형질전환시킨다. 형질전환된 clone으로부터 plasmid를 추출하여 EcoR I 과 HindIII로 자른 후에 agarose 전기영동한 결과가 Figure 6 이다. cloned *argI* 유전자가 기능적으로 발현이 되었는지 조사하기 위하여 숙주 TB 2 세포와 pKK223-3/*argI* plasmid 로 형질전환된 TB 2 colony를 선별하기 위해 다양한 growth condition을 갖는 plates를 만들어 screening한 결과가 Table 4이다.

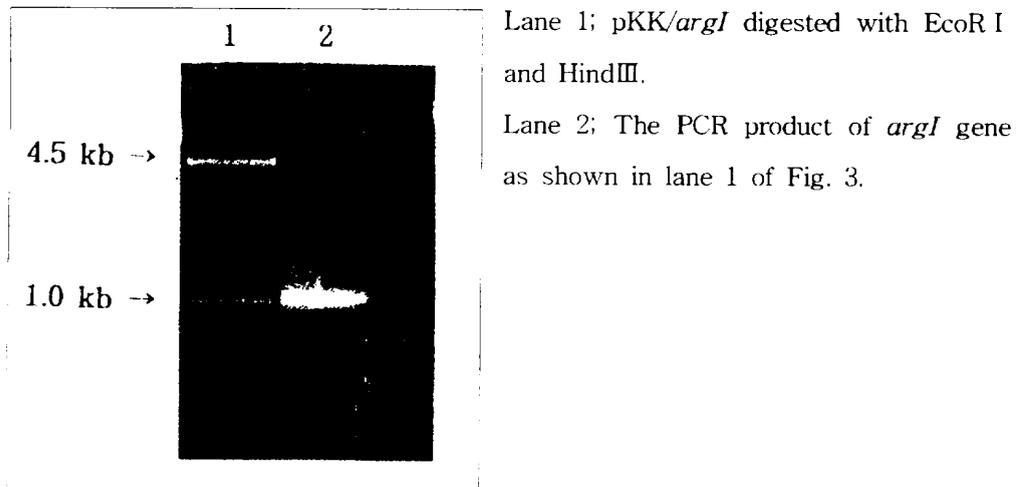
Table 4. The viabilities of TB 2 strains under various growth conditions

Strains	Growth conditions			
	LB/amp	M9/Uracil/arg	M9/Uracil	M9/Uracil/amp
TB2	x	o	x	x
TB2 (pkk/argI)	o	o	o	o

amp: ampicillin, *argI*: arginine.

O indicates that the bacterial cells could grow on the media, and X means that the cells were not able to grow on the media.

Figure 6. The results of the agarose gel electrophoresis for pKK/*argI* plasmid.



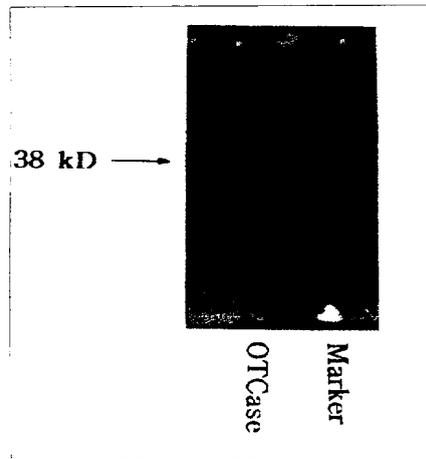
Lane 1; pKK/*argI* digested with EcoRI and HindIII.

Lane 2; The PCR product of *argI* gene as shown in lane 1 of Fig. 3.

## 2. Wild type *argI*의 발현 및 확인

형질전환된 TB 2 세포에서 생산하는 ornithine transcarbamylase은 암모늄염에 의한 분할(ammonium sulfate fractionation), 열변성(heat denaturation), Amicon's Matrex Blue Gel A 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)을 사용하여 순수하게 분리하였다. 효소의 분자크기와 순수 분리 및 정제 정도를 결정하기 위한 SDS 단백질 전기영동한 결과가 Figure 7이다. 클로닝된 *argI*로 부터 발현된 Ornithine transcarbamylase의  $K_m$ 와  $k_{cat}$  같은 반응속도 매개변수들은 Wild type의 Ornithine transcarbamylase의 반응속도 매개변수와 비교하여 나타낸 결과가 Table 5이다.

Figure 7. The results of the SDS polyacrylamide gel electrophoresis for the expressed *argI* gene product. Lanes 2 and 3; Two



protein fractions of which had activity of ornithine transcarbamylase were applied on the 7.5% SDS polyacrylamide gel. They were collected by the use of the Matrex Blue Gel A column. Lane 1 was the protein molecular size marker. The sizes of the molecular marker were 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20.1 kDa, and 14.4 kDa from the top protein band. The calculated molecular size of the fractionated protein was 38 kDa.

Table 5. The comparison of kinetic parameters of *E. coli* ornithine transcarbamylase.

Sources	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m^{orn}$ (mM) <sup>a</sup>	$K_m^{cp}$ (mM) <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> K-12	$1.4 \times 10^3$	0.32	0.05
TB2 (pkk/argI)	$1.0 \times 10^3$	0.35	0.06

$K_m^{orn}$ ; Michaelis constant for L-ornithine,  $K_m^{cp}$ ; Michaelis constant for carbamyl phosphate,  $k_{cat}$ ; turnover number of the enzyme.

<sup>a</sup> The enzymic reaction was performed at 2mM carbamyl phosphate in Tris acetate buffer, pH 8.5 for 5 min at 25°C. The range of L-ornithine concentration was 0~6mM.

<sup>b</sup> The enzymic reaction was performed at 4mM L-ornithine in 50mM Tris acetate buffer, pH 8.5 for 5 min at 25°C. The range of carbamyl phosphate concentration was 0~2mM.

### 3. Site-directed mutagenesis

전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자를 *E. coli* 세포에 클로닝하기 위하여 DNA Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Site-directed mutagenesis 방법을 도입하여 Serine 55을 Glycine, Alanine, Cysteine으로 돌연변이시켰다. Table 3과 Figure 4에 mutagenic primers와 PCR를 이용한 site-directed mutagenesis방법을 기술하였다. pKK223-3 발현벡터에 클로닝 되었던 *argI* 유전자의 wild type을 주형으로 사용하였다. 2개의 돌연변이된 primers와 5'-말단 primer, 3'-말단 primer을 이용하여 각각의 2개의 돌연변이된 중간체를 증폭하였다. 5'-와 3'-돌연변이된 중간체에 대한 겔 전기영동 결과가 Figure 8에 나타나 있다. 전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자를 얻기 위해 PCR template로 2개의 5'-과 3'-돌연변이된 중간체를 사용하고, 5'-말단 primer, 3'-말단 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 결과가 Figure 9이다. 즉, Figure 9는 전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자를 PCR로 합성한 결과를 gel electrophoresis한 것이다.

Figure 8. 5'- and 3'- DNA Intermediates made by PCR

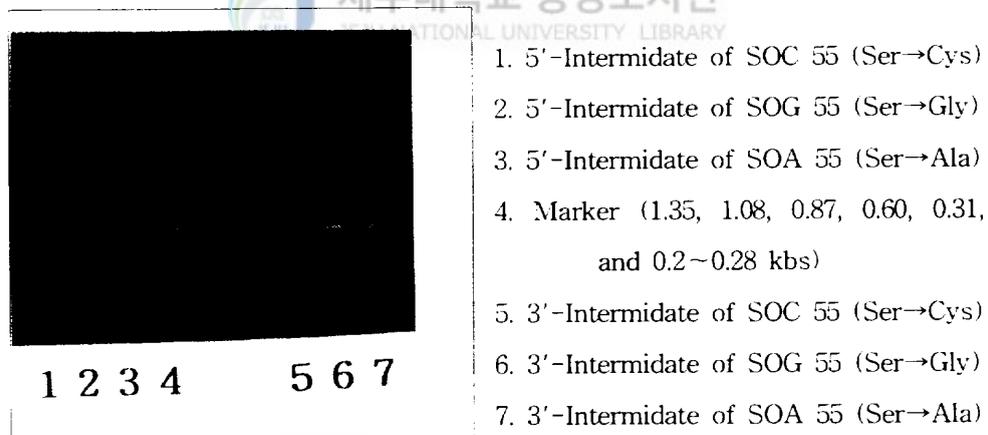
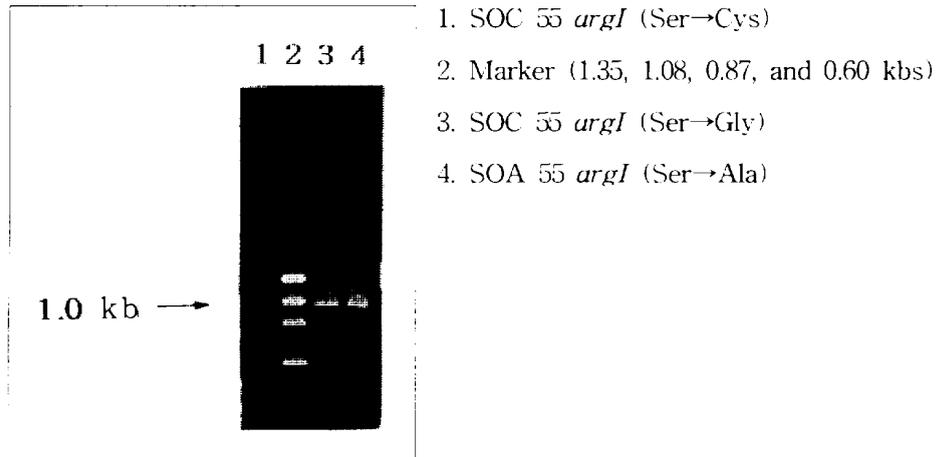


Figure 9. Mutant *argI* genes made by PCR



#### 4. Mutant *argI*의 cloning 및 확인

PCR로 얻은 전체크기의 돌연변이된 *argI* 유전자를 순수하게 분리하기 위하여 Low-melting-temperature Agarose gel electrophoresis를 이용하여 순수하게 DNA를 분리 및 정제한다. 순수 분리한 Mutant *argI*와 *E. coli* 발현벡터인 pKK223-3를 HindIII와 EcoR I로 자르고, 여과시킨 후, Ligation시켜 재조합된 mutant *argI*/pKK223-3를 competent XL1-blue cell에 형질전환시킨다. 형질전환된 clone으로부터 alkali-DNA mini preparation방법을 이용하여 plasmid를 추출하여 EcoR I과 Hind III로 자른 후, 전기영동한 결과가 Figure 10이다. 클로닝된 각 돌연변이 유전자들의 돌연변이 여부를 Sanger의 Dideoxy-mediated Chain-termination method(1977)에 의하여 핵산 염기서열 결정을 한 결과가 Figure 11이다.

Figure 10. The results of gel electrophoresis after HindIII/EcoR digestion of Mutant *argI*/pKK223-3

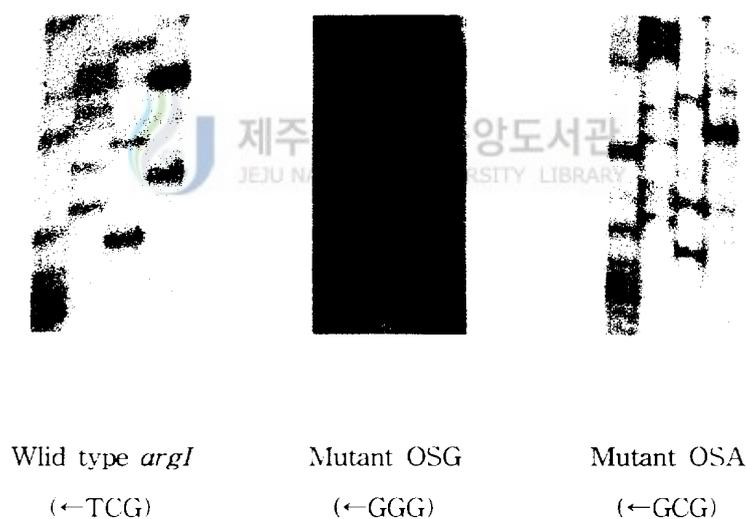
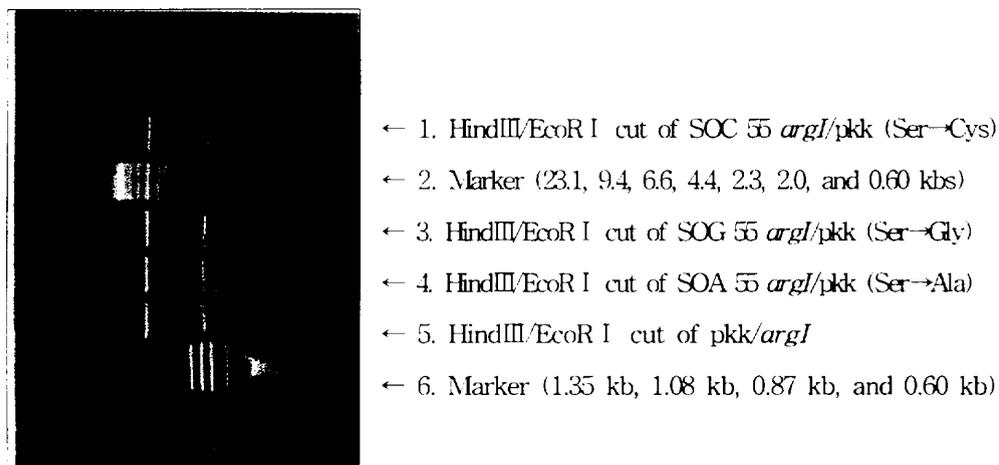


Figure 11. The results of DNA sequencing of Mutant & Wild type *E. coli* ornithine transcarbamylase.

## 5. Mutant SOC의 발현

Serine 55를 cysteine으로 치환 시킨 돌연변이 효소는 PCR에 의하여 증폭된 mutant *argI*가 접합된 pKK223-3 plasmid를 competent TB 2 cell에 형질전환 시켰다. LB/ampicillin 고체 배지에서 선택한 단일 colony를 LB/ampicillin 액체 배지에서 밤사이 배양한 후에 2리터 배지에서 또 하룻밤을 배양하였다. 배양된 박테리아들로부터 염분활을 하고 affinity chromatography를 한 결과가 Figure 12이다. 효소의 활성에 대한 아세이를 한 결과, KCl gradient의 존재 하에서 elution된 fraction중의 하나에서 효소의 활성이 나타났다.

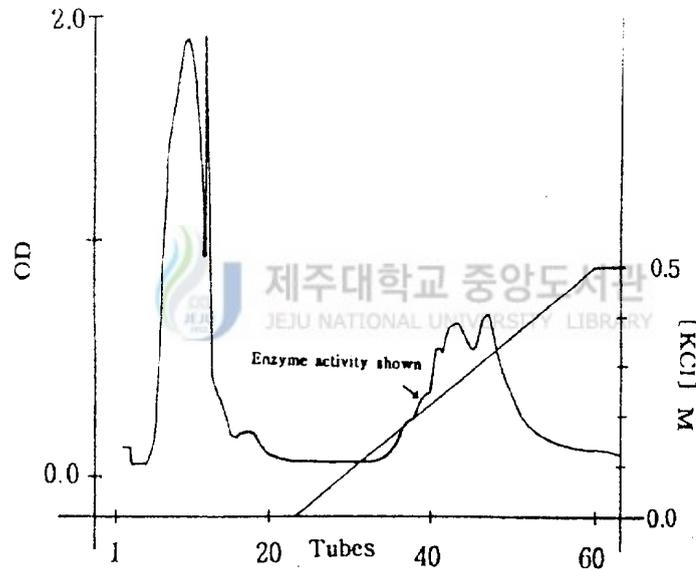


Figure 12. Purification Profile of Cysteine-55 Mutant *E. coli* ornithine transcarbamylase

## IV. 고찰

### 1. Wild type *argI*의 cloning 및 확인

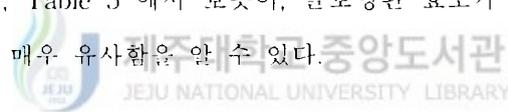
Ornithine transcarbamylase의 *argI* 유전자를 클로닝하기 위하여, HindIII와 EcoR I 효소의 restriction site을 가지고 있는 Primers를 이용하여 Wild type *E. coli* genomic DNA로부터 *argI* 유전자를 PCR로 증폭시켰다. PCR 생성물을 겔 전기영동한 결과, Figure 5에서 보듯이 lane 1과 2는 *E. coli* DH5a의 genomic DNA를 주형으로 하여 얻은 결과이고, lane 3은 일부분의 *argI* 유전자가 제거된 TB 2 cell의 total DNA를 주형으로 PCR 한 것으로 negative control로 사용하였다. 그 결과, lane 1과 2는 DNA의 크기가 1.0 kb의 단일띠를 얻을 수 있었고, lane 3에서는 band를 볼 수 없었다. Low-melting-temperature agarose gel electrophoresis를 이용하여 PCR로 얻은 DNA를 순수하게 분리 및 정제하였다. 분리 및 정제한 *argI*와 pKK223-3를 HindIII와 EcoR I로 자르고, 여과시킨 후, Ligation시켜 재조합된 pKK223-3/*argI*를 competent TB 2 cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 clone으로부터 plasmid를 추출하여 EcoR I과 HindIII로 자른 결과, Figure 6에서 알 수 있듯이, lane 1은 2개의 band를 얻을 수 있었다. 여기서, 4.5 kb크기가 pKK223-3이고, 1.0 kb크기가 *argI* 유전자이다. Wild type *argI* 유전자가 발현시키기 적합한 host cell로 *E. coli* TB 2 cell을 사용했다. *E. coli* TB 2 cell은 *pyrB1*와 *argI* 유전자가 모두 제거되어서 Uracil과 arginine가 없는 medium에서는 자랄 수가 없다. cloned *argI* 유전자가 기능적으로 발현을 하는지 알아보기 위하여 pKK223-3/*argI* plasmid로 형질전환된 TB 2 colony와 숙주 TB 2 세포를 다양한 growth condition을 갖는 plates에서 screening하였더니, Table 4와 같이, TB 2 세포는 arginine이 없는 M9 minimal medium에서는 자라지 않는 것으로 보아 Ornithine transcarbamylase의 기능에 관여하는 유전자가 결핍되어 있음을 알 수 있다. 반면에, pKK223-3/*argI* plasmid를 함유하고 있는 형질전환된 TB 2 세포인 경우에는 arginine이 없는 M9 minimal medium에서도 매우 잘 자라는 것으로 보아 pKK223-3/*argI* plasmid가 클로닝 되었음을 알 수 있다. 또한, Ampicillin으로 처리된 M9 minimal medium과 LB plates에서도 TB 2 세포인 경우

세포가 자라지 않지만, pKK223-3/*argI* plasmid가 클로닝 되어있는 TB 2 세포인 경우는 Ampicillin으로 처리되어 있음에도 불구하고 잘 자라는 것으로 보아 Ampicillin에 저항성이 있는 유전자를 가지고 있는 pKK223-3/*argI* plasmid가 클로닝되었음을 알 수 있다.

## 2. Wild type *argI*의 발현 및 확인

형질전환된 TB 2 세포에서 생산하는 Ornithine transcarbamylase은 암모늄염에 의한 분할(ammonium sulfate fractionation), 열변성(heat denaturation), Amicon's Matrex Blue Gel A 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)을 사용하여 순수하게 분리하였다. 효소의 분자크기와 순수 분리 및 정제 정도를 결정하기 위한 SDS 단백질 전기영동한 결과 38 kDa으로 아주 순수한 단일 band가 얻어짐을 Figure 7에서 볼 수 있다.

클로닝된 *argI*로 부터 발현된 Ornithine transcarbamylase의  $K_m$ ,  $k_{cat}$  와 같은 반응속도 매개변수들은 Wild type의 Ornithine transcarbamylase의 반응속도 매개변수와 비교하여 보면, Table 5 에서 보듯이, 클로닝된 효소가 Wild type의 Ornithine transcarbamylase와 매우 유사함을 알 수 있다.



## 3. Site-directed mutagenesis

전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자를 *E. coli* 세포에 클로닝하기 위하여, DNA Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 Site-directed mutagenesis 방법을 도입하여 Serine 55을 Glycine, Alanine, Cysteine으로 돌연변이시켰다. *E. coli* pKK223-3 발현벡터에 클로닝 하였던 *argI* 유전자의 Wild type을 주형으로 사용하였고, 각각의 2개의 돌연변이된 primers와 5'-말단 primer, 3'-말단 primer을 이용하여 각각의 2개의 돌연변이된 중간체를 증폭하였다. 5'-와 3'-돌연변이된 중간체에 대한 겔 전기영동 결과가 Figure 8에 나타나 있는데, 5'-돌연변이된 중간체 크기가 대략

0.2 kb이고, 3'-돌연변이된 중간체의 크기가 0.8 kb이다. 전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자를 얻기 위해 PCR template을 2개의 5'-과 3'-돌연변이된 중간체를 사용하였고, 5'-말단 primer, 3'-말단 primer를 이용하여 PCR로 증폭한 결과 전체길이의 돌연변이된 *argI* 유전자가 합성되었다. Figure 9에서 보듯이 1.0 kb의 전체길이의 mutagenic *argI* 유전자(SOC, SOA, SOG)가 합성됨을 보여주고 있다.

#### 4. Mutant *argI*의 cloning 및 확인

Low-melting-temperature Agarose gel electrophoresis를 이용하여 순수하게 DNA를 분리 및 정제하였다. 순수 분리한 Mutant *argI*와 *E. coli* 발현벡터인 pKK223-3를 HindIII와 EcoR I 로 자르고, 여과시킨 후, Ligation시켜 재조합된 mutant *argI*/ pKK223-3를 competent XL1-blue cell에 형질전환시켰다. 형질전환된 clone으로 부터 DNA mini preparation방법을 이용하여 DNA plasmid를 추출하고, 형질전환된 clone으로 부터 얻은 mutant *argI*/ pKK223-3를 EcoR I 과 HindIII로 자른 결과 Figure 10, 11에서 보여지듯이 4.5 kb크기가 pKK223-3이고, 1.0 kb크기가 *argI* 유전자이다. 돌연변이된 각 돌연변이 유전자들의 돌연변이 여부를 DNA sequencing 함으로써 확인하였다. Figure 11에서 보듯이 각 코돈에 해당하는 염기서열은 세린이 알라닌과 글라이신으로 전환되었음을 보여준다.

#### 5. Mutant SOC의 발현

Figure 12에서 얻은 각 분액들을 아세이 한 결과 KCl gradient하에서 얻은 분액중의 하나에서 효소의 활성을 나타내었다는 것은 DNA sequencing한 결과와 더불어 Serine 55가 cysteine으로 치환된 오니틴 트랜스카바밀라제가 성공적으로 만들어졌음을 나타내고, 돌연변이 효소도 활성의 변화가 어느 정도인지 확인은 되지 않았지만 아직도 효소로서의 기능을 하고 있음을 제시한다. 세린과 시스틴의 차이는 세린의 산소 대신에 시스틴의 황 원자가 치환되어서 그 크기가 약간 달라지지만 크기나

전하의 효과가 크게 다르지 않을 것으로 기대되어 돌연변이에 의한 효소활성의 변화는 크지 않으리라고 판단된다.

위의 데이터들을 종합하여 보면, *E. coli* 오니틴 트랜스카바밀라제의 isozyme의 유전자 중의 하나인 *argI*를 클로닝하였고 이로부터 Serine 55의 역할을 밝히기 위한 Cys 55, Ala 55, Gly 55의 돌연변이 오니틴 트랜스카바밀라제의 발현 시스템을 확립하였다. 앞으로 더 수행되어야 할 일들은 돌연변이 효소들을 순수하게 추출하여 반응속도분석 결과와 Spectroscopic 결과를 얻어 wild type orithine transcarbamylase에 관한 결과를 비교분석함으로써 Serine 55의 구조 및 기능적 역할을 밝히고자 한다.



## 요 약 문

*Escherichia coli*의 오니틴 트랜스카바밀라제는 아르지닌 생합성 경로에서 오니틴과 카바밀인산으로부터 시트룰린의 합성을 촉진시키는 효소이다. 이 효소는 여러 가지 Phosphate 결합 단백질이 가지고 있는 유사한 아미노산 서열의 한 가닥인 -Ser-Thr-Arg-Thr-을 가지고 있다. 기질이 결합한 효소가 구조변화를 일으켜 효소의 활성을 유발하는 유발적합형인 이 효소의 한 domain은 효소에 카바밀인산의 결합을 하는데 기여한다. 본 연구의 목적은 *E. coli* 오니틴 트랜스카바밀라제의 Ser-55의 촉매작용의 역할을 연구하기 위한 돌연변이 효소를 만드는 것이다. Serine 잔기는 서로 다른 크기와 전하를 가지고 있는 Cysteine, Alanine, 그리고, Glycine으로 돌연변이시켰다. 돌연변이를 시키기 위한 주형인 Wild type *argI* 유전자와 차이는 효과를 분석하므로써 오니틴 트랜스카바밀라제에 Serine 55잔기의 역할을 분명히 알 수 있다. DNA polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 *argI* 유전자의 Serine 55 위치를 Site-directed mutagenesis방법에 의해 돌연변이시켰다. 겔 전기영동의 결과는 Ser 55이 Cysteine, Alanine, 그리고, Glycine으로 치환된 mutant *argI* 유전자를 발현벡터인 pKK223-3에 클로닝 되었음을 보여준다. 돌연변이를 시키기 위한 주형 DNA는 wild type *argI* 유전자를 사용하였다. 이 유전자는 *E. coli* strain DH5 $\alpha$ 의 genomic DNA를 추출하여 PCR에 의한 방법으로 얻었다. 증폭된 *argI*는 pKK223-3에 접합시켜서 TB 2 cell에 형질전환 시켰으며, 발현된 단백질의 확인은 선택배지에 의한 것과 효소의 활성으로 확인되었다. SDS 단백질 전기영동 결과도 약 38 kDa 크기의 Wild type 효소가 순수하게 얻어졌다.

결론적으로 본 연구의 결과로서 *E. coli* 오니틴 트랜스카바밀라제의 유전자인 *argI*가 클로닝되었으며, Serine 55의 구조와 기능에 대한 기여를 연구할 수 있는 돌연변이된 분자들이 확보되었다.

## 참 고 문 헌

- 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.
- Foreman, J. E. & Niehaus, W. G. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10019-10022.
- 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.
- Itoh, Y., Soldati, L., Stalon, V., Flmagne, P., Terawaki, Y., Leisinger, T., & Haas, 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.
- Krause, K. L., Volz, K. W. & Lipscomb, W. N. (1987) *J. Mol. Biol.* **193**, 527-553.
- Kuo, L. C. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 5243-5247.
- Kuo, L. C., Miller, A. W., Lee, S. & Kozuma, C. (1988) *Biochemistry* **27**, 8823-8832.
- Kuo, L. C., Caron, C., Lee, S. & Herzberg, W. (1990) *J. Mol. Biol.* **211**, 271-280.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S., Shen, W.-H., Miller, A. W. & Kuo, L. C. (1990) *J. Mol. Biol.* **211**, 255-269.
- Legrain, C. & Stalon, V. (1976) *Eur. J. Biochem.* **63**, 289-301.

- Levin, B., Dobbs, R. H., Burgess, E. A. & Palmer, T. (1969) *Arch. Dis. Childhood* **44**, 162-169.
- 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.
- Ratner, S. (1973) *Adv. Enzymol. & Related Areas of Mol. Biol.* **39**, 1-90.
- Scherer, S. E., Veres, G. & Caskey, C. T. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 1593-1601.
- Short, E. M., Conn, H. O., Snodgraa, P. J., Campbell, A. G. M. & Rosenberg, L. E. (1973) *New Engl. J. Med.* **288**, 7-12.
- Smith, J. A., Struhl, K., Seidman, J. G., Moore, D. D., Kingston, R. E., Brent, R. & Ausubel, F. M. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Willy interscience.
- Volz, K. W., Krause, K. & Lipscomb, W. N. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**, 822-826.

