

저온성균 *Sporosarcina psychrophilia*로부터 Aspartate Transcarbamylase 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석

성혜리 · 안원근¹ · 김사열*
경북대학교 미생물학과, ¹생물학과

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *pyrB* Gene Encoding Aspartate Transcarbamylase from Psychrophilic *Sporosarcina psychrophilia*. Sung, Hye-ri, Won G. An¹, and Sa-Youl Ghim*. Department of Microbiology and ¹Department of Biology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea. – The *Sporosarcina psychrophilia pyrB* gene, which encodes aspartate transcarbamylase (ATCase), was cloned on *Sau3AI* restriction endonuclease fragment inserted into pUC19 plasmid vector. *S. psychrophilia pyrB* gene was expressed in *Escherichia coli pyrB* mutant for the complementation test. The sequence of 2,606 nucleotides including putative *pyrB* gene was determined. The region contained one full open reading frame (ORF) and two partial ORFs. The deduced amino acid sequence of the second ORF showed 59% identity with that of *Bacillus caldolyticus* ATCase. The first and third partial ORFs were closely related to the uracil permease (*pyrP*) and dihydroorotase (*pyrC*), respectively. Besides, potential terminator, antiterminator, and anti-antiterminator structures were found in the intergenic region between *pyrP* and *pyrB*. These results suggested that *S. psychrophilia* pyrimidine nucleotide biosynthesis genes are clustered as well as other *Bacillus* sp. Over-expressed product of *pyrB* encoding ATCase was purified and analyzed by the SDS-PAGE. The purified PyrB protein turned out to be molecular mass of 27 kDa and showed ATCase activity.

Key words: *Sporosarcina psychrophilia*, *pyrB*, aspartate transcarbamylase, nucleotide sequence, expression

Aspartate transcarbamylase(ATCase; EC 2.1.3.2)는 *pyrB* 유전자 산물이며 pyrimidine nucleotide 생합성에 관여하는 효소로서 carbamyl phosphate와 L-aspartate로부터 N-carbamyl aspartate와 inorganic phosphate의 생성을 촉매하는 효소이다. 대장균에서 allosteric enzyme의 전형으로서 ATCase의 구조와 기능에 대한 연구가 처음으로 이루어졌고 [4], 그 후 1986년에 대장균 *pyrB* mutant를 이용하여 *Bacillus subtilis*에서 *pyrB* 유전자를 클로닝하여 그 구조를 밝혔다[17].

지금까지 연구되어진 여러 종류의 세균 ATCase는 그 구조적 특성을 바탕으로 classA, classB, classC로 나누었다[3]. ClassA ATCase를 가지고 있는 대표적인 세균은 *Pseudomonas* sp.인데, 이것은 regulatory site와 catalytic site를 모두 포함한 2개의 trimer subunit와 구조적인 역할만 하는 3개의 dimer subunit를 가진 가장 큰 효소로 알려져 있다[23]. ClassB ATCase는 Enterobacteria가 주로 가지고 있으며, 가장 잘 연구된 대장균의 경우 2개의 catalytic trimer subunit와 3개의 regulatory dimer subunit를 가지고 있다[14].

ClassC ATCase는 *Bacillus* sp.가 주로 가지고 있으며, 하나의 catalytic trimer subunit를 가지고 있다[17].

PyrB 단백질의 구조 연구와 동시에 그 기능에 대해서도 다양한 연구가 있었는데, 대표적인 것으로 인체에 pathogen으로 알려진 *Helicobacter pylori*에서는 *pyrB* 유전자가 생육에 필수적인 역할을 하는 사실이 밝혀져 이것을 therapeutic target으로도 연구하고 있다[7]. 또한, 최근 nucleotide, nucleoside와 nucleobase 등 모유에 미량으로 들어있는 non-protein-nitrogen fraction이 체내에서 중요한 역할을 하고 있다고 알려지면서, 이들 물질에 대한 관심이 집중되고 있다. 이들은 체내에서 일정하게 합성되지만 합성되는 양에는 한계가 있으므로, 적절한 양을 섭취했을 때에는 장의 철 흡수를 도와주고, 긴 사슬 불포화지방산 합성에 영향을 미치고, 면역 기능의 조정자로서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 특히, 유아의 성장을 촉진시키거나, 면역력을 증가시키는데 큰 영향을 줄 수 있다는 보고가 있었다[13, 22]. 하지만 이 물질들은 모유에 비하여 우유에서 그 함유량이 매우 낮다. 그래서 유아의 이유식이나 식품에 이 물질들을 첨가하는 연구가 활발히 이루어지고 있고, 유럽은 이미 그 첨가를 허락하고 있다[24]. 모유 수유 기간에 따라 nucleoside 조성의 변화를 보여주는 조사에서는 uridine의 경우 수유 기간이 오래 될수록 그 함유량이 상당히 감소하는 경향을 보였다[16]. 이

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5374, Fax. 82-52-955-5522
E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

경우 uridine이 첨가된 이유식을 섭취 시킬 수 있는데, 이 때 균의 pyrimidine 생합성 경로를 조절하여 산업적 생산에 이용할 수 있는 대안이 가능하다. 이런 측면에서 볼 때 pyrimidine 생합성 경로의 첫 효소인 ATCase를 연구하는 것은 매우 중요하다.

*Sporosarcina psychrophilia*는 2001년 이전에는 *Bacillus* 속에 속하는 *B. psychrophilus*라고 명명되어 왔지만, 이것은 2001년에 형태적, 유전적 연구에 의해 *Sporosarcina* 속으로 재분류 되었다[15,27]. 이 균은 저온성균으로 4-25°C의 온도 조건에서 잘 자라며, 0°C에서도 아주 천천히 자랄 수 있지만, 30°C 이상에서는 자라지 못한다고 연구되어 있다[1]. 그러나, 이 저온성균이 생산하는 효소는 낮은 온도에서 뿐만 아니라 비교적 높은 온도에서도 활성을 유지한다는 연구가 있었는데, 그것은 이 균의 pyruvate kinase가 다른 중온성균의 pyruvate kinase 비하여 온도에 안정적이고 비교적 높은 효소활성을 보인다는 것이었다[26].

그러므로 본 연구에서는 저온성균인 *S. psychrophilia*에서 *pyrB* 유전자를 클로닝 하여 염기서열을 결정하고, 그 유전자 발현 산물인 ATCase의 효소활성을 확인 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

사용균주 및 plasmid는 Table 1에 표시하였다. *S. psychrophilia*[15,19,27]는 caso media(peptone from casein 15 g/L, peptone from soymeal 5 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.3)를 써서 23°C에서 배양하였다. 대장균은 LB 배지[2]와 AB 배지[8]에 0.2% glucose, 0.2% vitamin-free casamino acid, thiamine (1 µg/ml), tryptophan(40 µg/ml), hypoxanthin(20 µg/ml)을 부과하여 사용하거나 필요할 시에는 ampicillin(100 µg/ml)이나 uracil(20 µg/ml)을 첨가하여 37°C에서 배양하였다.

pyrB 유전자 클로닝 및 염기서열 분석

*S. psychrophilia*로부터 염색체 DNA를 분리하여 제한효소 *Sau3AI*으로 절단하였다. 전기영동 후 다양한 크기로 잘려진 DNA 단편 중 1.6-4 kb 크기의 DNA 단편들을 DNA Prep mate™(Bioneer, Korea)를 사용하여 회수하고, 이 DNA 단편 3 µg과 *Bam*HI과 calf intestinal alkaline phosphatase를 처리한 1 µg의 pUC19를 ligation시켰다. *Escherichia coli* sφ990에 ligation mixture를 calcium chloride 방법[9]으로써 형질전환 시키고, ampicillin을 첨가한 AB 배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 살아남은 colony를 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종한 후, 16시간을 배양시켜 Plasmid extraction kit(Bioneer, Korea)를 써서 insert DNA가 ligation 되어있는 plasmid를 분리하여서 염기서열을 결정하였다.

ATCase 활성 측정

Aspartate transcarbamylase의 효소활성 측정은 반응 산물인 carbamyl aspartate를 spectrophotometric system으로 466 nm에서 측정하는 Bond *et al.*의 방법[5]으로 수행하였다.

과쇄한 cell extract에 0.5 M L-aspartate 100 µl, 1.0 M Tris acetate(pH 8.2) 200 µl와 2차중류수를 넣어 부피를 900 µl로 맞추고 carbamyl phosphate(0.153 g/10 ml) 100 µl를 넣어 30°C에서 30분간 반응시킨 후 5% perchloric acid 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응물 100 µl를 2차중류수 900 µl와 섞어 5% acetic acid에 녹인 0.5% 2,3-butadione monoxime 500 µl와 40% sulfuric acid에 녹인 antipyrin(4 g/L) 1ml을 넣고, yellow lamp를 이용하여 60°C에서 2시간 동안 발색반응을 시킨 후 466 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량은 Coomassie Protein Assay Reagent Kit(Pierce, USA)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준 단백질로 사용하였다[6].

Table 1. Used bacterial strains and plasmids.

Strain/plasmid	Relevant genotype	Source
Strain		
<i>Sporosarcina psychrophilia</i> DSM2274	<i>pyrB</i> ⁺ (wild type)	DSM ¹
<i>E. coli</i> Sφ990	<i>pyrB59, argH1, thi-1, hisG1, purF1, mtl-2, xyl-7, malA1, ara-13, lacY1</i> or <i>lacZ24, strA8 A9</i> or <i>A14</i>	CGSC4517 ²
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ , <i>ompT, hadS_B (rB- mB-), gal (λc1857, ind1, Sam7, lacUV5-T7gene1), dcm</i> (DE3)	Takara
Plasmid		
pUC19	Ap ^R	
pSM1	2.1 kb insert with <i>pyrB</i> in pUC19 <i>Bam</i> H1 site	This work
pSM2	2.6 kb insert with <i>pyrB</i> in pUC19 <i>Bam</i> H1 site	This work
pET14b	Ap ^R	Novagen
pSM3	879 bp insert with in pET14b <i>Nde</i> 1 site	This work

¹DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zell Kulturen, Branschweig, Germany.

²CGSC, *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, Conn. USA.

pET14b vector 클로닝

클로닝한 *pyrB* 유전자의 발현을 알아보기 위하여 *pyrB*의 추정 start codon과 stop codon에 *NdeI* 제한효소 site(CATATG)를 붙여서 forward(5'-CATATGATGCAACATCTTGT-3')와 reverse primer(5'-CATATGTCAATTCCTCCC-3')를 합성하고, *S. psychrophilia*의 *pyrB* 유전자를 포함하고 있는 pUC19을 template로 하여 denaturation(94°C, 3분) 시킨 후, denaturation(94°C, 30초), annealing(52°C, 30초), elongation(72°C, 30초) 단계를 35회 반복하여 incubation(72°C, 15분) 하는 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 전기영동한 다음 gel에서 회수하여 pGEM-T Easy Vector systems(Promega, USA)에 클로닝하고 *E. coli* XLI-Blue에 형질 전환 했다. 다시 분리한 plasmid를 *NdeI*으로 처리하여 전기영동 후 *pyrB* 유전자 단편만 회수하고, 6개의 His-tag을 포함하고 있어서 nickel affinity를 이용하여 클로닝한 부분의 단백질을 정제할 수 있는 대장균 expression vector인 pET14b를 *NdeI* 제한효소와 calf intestinal alkaline phosphatase를 처리한 후 전기 영동하여 gel에서 회수하여 *pyrB* 유전자 단편과 ligation시켜서 *E. coli* BL21에 형질전환하고 ampicillin을 포함한 LB 배지에 도말하였다.

ATCase의 과다발현 및 정제

pET14b에 *S. psychrophilia*의 *pyrB* coding 유전자만 ligation하여 *E. coli* BL21에 형질전환한 균주를 ampicillin을 첨가한 LB 배지에 접종하여 37°C에서 16시간 전 배양한 후 동일한 배지에 전배양액 5%를 접종하여 37°C에서 배양하였다. Cell수가 약 2×10^9 이 될때까지 배양한 후 0.1 mM IPTG를 넣고 25°C에서 4시간 더 배양하여 6개의 His-tag을 포함한 PyrB 단백질의 과다 발현을 유도하였다.

균체를 회수하여 단백질의 active site를 변하지 않게 native 상태로 단백질을 정제하기 위해서 lysis buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)를 넣어 현탁하여 균체를 파쇄한 후, 이것을 10,000 g에서 15분간 원심분리하여, 그 상등액을 시료로 하고, Ni-NTA agarose(Qiagen, Germany)를 이용하였다. Ni-NTA agarose 100 µl에 상등액 700 µl를 넣고 2시간 binding 시킨 후 Glass Econo-Column(Bio-rad, USA)을 사용하여, wash buffer B(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, pH 8.0)로 2번 씻어내고, wash buffer C(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM imidazole, pH 8.0)로 1번 더 씻어낸 다음 elution buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) 300 µl를 넣고 단백질을 회수하였다. 과다발현한 PyrB 단백질의 확인을 위하여 SDS-PAGE를 수행하였다. Separating gel 10%, stacking gel은 5%로 만들고, 전기영동은 120 V의 조건으로 90분간 실시하였다. Gel은 0.1% Coomassie brilliant blue R250(BIO BASIC INC, Canada)으로 염색한 다음 methanol:acetic

acid:water(1:1:8) 용액으로 탈색하여 단백질 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

***S. psychrophilia pyrB* 유전자의 클로닝**

S. psychrophilia pyrB 유전자를 확보하기 위하여 *S. psychrophilia*의 *Sau3A1* library를 *pyrB* mutant 균주 *E. coli* Sφ990에 형질전환해서 uracil을 넣지 않고, ampicillin을 첨가한 AB 배지에서 살아남은 colony를 선택하였다. 각 colony로부터 plasmid를 분리한 후 *EcoRI*으로 처리하였을 때 2종류의 서로 다른 크기의 insert DNA(2.1 kb, 2.6 kb)가 클로닝 되었음을 확인하고, 각각을 pSM1 과 pSM2라고 명명 하였다(Fig. 1). 분리한 pSM1과 pSM2가 ATCase를 발현하는지 확인하기 위하여 ATCase assay를 수행하였다. *E. coli* sφ990 균주가 pSM1과 pSM2 plasmid 각각을 포함하고 있을 때 ATCase 활성을 나타내었다(Table 2).

Cloned DNA 단편의 염기서열 분석

E. coli sφ990 균주에서 ATCase 활성이 확인된 pSM1과 pSM2 두 plasmid의 삽입 DNA 단편을 양 방향으로 염기서열을 결정 한 결과 pSM2가 pSM1 보다 5'-end에 481 nucleotide를 더 포함하고 있었고 나머지 부분은 동일하였다(Fig. 2). 이 염기 서열을 GenBank에서 Blast search를 수행했을 때 여러개의 ORF가 확인되었는데, 완전한 하나의 ORF는 aspartate transcarbamylase를 encoding하는 879 bp 크기의 *pyrB* 유전자였다. 그리고 *pyrB* 유전자 5'-upstream에 위

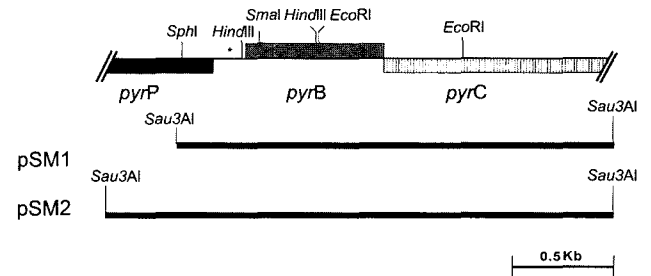


Fig. 1. Restriction map of cloned *pyrB* gene region from *S. psychrophilia*. Dark Boxes and stripe box represent putative ORF for each gene. Asterisk region includes putative terminator, antiterminator, and anti-antiterminator structures.

Table 2. Expression of ATCase activity in *E. coli* strains.

Strain/Plasmid	Specific activity (µmole/mg·min)
Sφ990/pUC19	0
Sφ990/pSM1	2.91
Sφ990/pSM2	2.69
BL21/pSM3 (purified)	43.25

치하는 682 nucleotide 부위는 uracil permease를 encoding 하는 *pyrP* 유전자의 일부를, 그 3'-downstream에 위치하는 356 nucleotide 부위는 dihydroorotase를 encoding 하는 *pyrC*

유전자의 일부를 가지고 있는 것으로 확인할 수 있었다. 그리고 *pyrP* 유전자와 *pyrB* 유전자 사이에 존재하는 188 bp 크기 부위의 intergenic region을 분석하였을 때 잠재적인

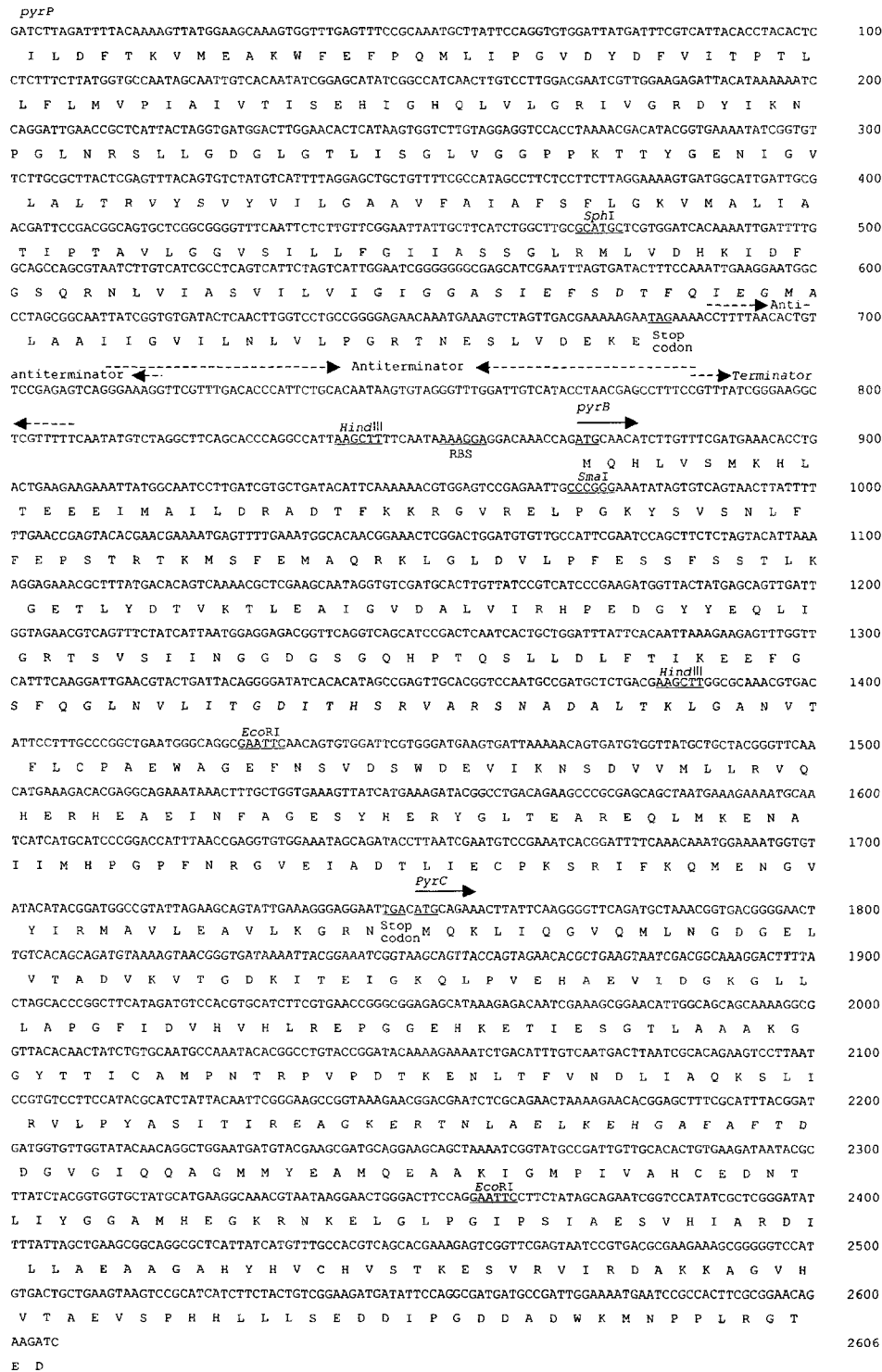


Fig. 2. Nucleotide sequence of the *S. psychrophilia pyrB* gene region. Below the nucleotide sequence the deduced amino acid sequence is given in the one-letter code. Start and stop codons of the coding regions as well as putative ribosomal binding site are underlined. Broken arrows above the non-coding sequences between *pyrP* and *pyrB* indicate regions of dyad symmetries which might form terminator, antiterminator, and anti-antiterminator structures.

terminator, antiterminator, anti-antiterminator 구조를 가지고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과로 보아 *S. psychrophilia*의 pyrimidine 생합성 경로에 관여하는 유전자는 다른 *Bacillus* sp.와 같이 cluster를 형성하고 있다고 볼 수 있었으며, attenuation mechanism에 의하여 *pyr* cluster의 발현이 조절되는 것으로 추측할 수 있었다[10-12,21].

PyrB 단백질을 아미노산 수준에서 비교 분석 했을 때 *S. psychrophilia* *PyrB* 단백질은 *Bacillus* 속의 *PyrB* 단백질들과 높은 identity를 보여주고 있었다(Fig. 3).

*B. caldolyticus*와 59% identity와 69% similarity를 보였고, *B. subtilis*와 56% identity와 73% similarity를 보였고,

*B. halodurans*와 56% identity와 71% similarity를 보여 주었다. 그래서 *S. psychrophilia* *PyrB* 단백질은 *Bacillus* 속의 *PyrB* 단백질과 같은 *claasB*에 속하는 것으로 추정되었다.

발현된 *pyrB* 유전자의 효소활성

pSM1과 pSM2 각각의 plasmid를 포함하는 *E. coli* Sφ990 균주에서 ATCase 활성 측정은 uracil을 넣어주지 않고 ampicillin을 첨가한 AB 액체배지에 pSM1과 pSM2가 클로닝된 *E. coli* Sφ990를 배양하고 436 nm에서 OD값이 약 0.8이 되었을 때 균체를 모아, 0.9% NaCl로 씻은 후, 100 mM Tris-Cl(pH 7.8)·2 mM EDTA로 현탁한 후 파쇄하여

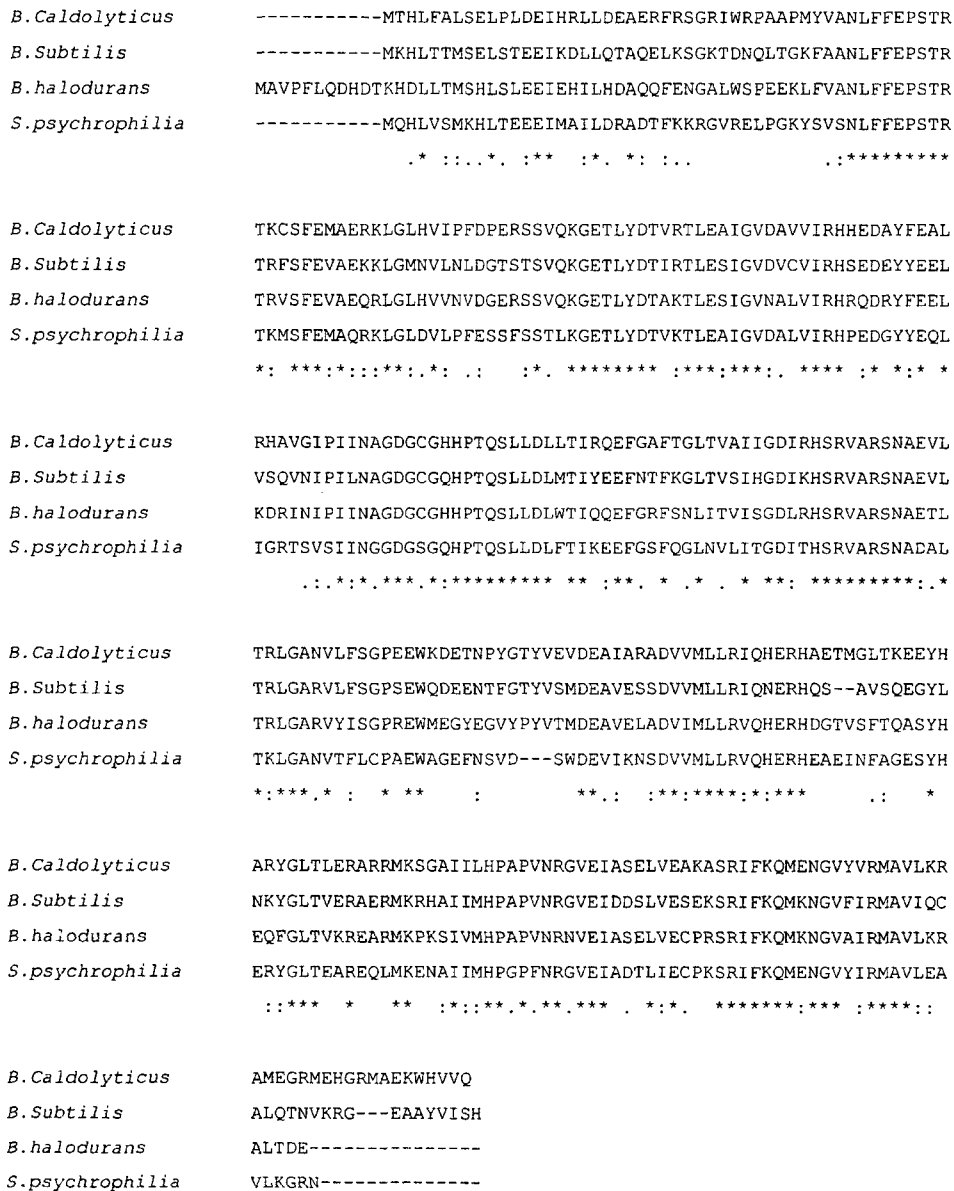


Fig. 3. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of *S. psychrophilia* ATCase with sequences of ATCase from *B. caldolyticus*[12], *B. subtilis* [17], and *B. halodurans* [25]. Asterisks indicate identical amino acids and dots indicate similar amino acids. Two dots has high similarity more than one dots.

ATCase assay를 수행하였다. 대조군으로 위와 동일한 조건에 ampicillin 없이, uracil을 넣어준 배지에 *E. coli* Sφ990를 동일한 방법으로 배양하여 파쇄하고, ampicillin과 uracil을 넣어준 배지에 *E. coli* Sφ990에 pUC19만을 형질전환 한 것을 같은 방법으로 배양하고 파쇄하여 실험을 수행하였다. 후자의 대조군에서는 ATCase의 활성이 나타나지 않았지만, pSM1과 pSM2를 포함하는 *E. coli* Sφ990는 ATCase 활성을 나타냈다(Table 2). Sφ990 균주에 2.1 kb와 2.6 kb 크기의 DNA 단편이 각각 클로닝된 pSM1과 pSM2 사이에서 ATCase 효소활성 차이는 거의 나타나지 않았다.

*S. psychrophilia*의 ATCase 효소활성은 동일한 실험을 한 호염성 중온성균인 *B. clausii*의 ATCase보다 4배 정도 높은 활성을 나타내었다(data not shown).

***S. psychrophilia* ATCase의 특징**

온도에 따른 *S. psychrophilia* ATCase 효소 활성을 알아보기 위하여 *E. coli* BL21/pET14b system을 이용하여 과다발현한 PyrB 단백질을 native 상태로 정제한 후, 정제한 단백질 10 µ에 동일한 양의 L-aspartate와 carbamylphosphate를 넣고 10, 20, 30, 40, 50, 60°C 각각의 온도에서 30분 동안 반응시키는 조건으로 ATCase 활성을 측정하였다. *S. psychrophilia*의 최적 생육온도 부근인 20°C에서도 활성을 나타냈지만, 온도가 증가함에 따라 활성이 점차 증가하다가 40°C에서 최대활성을 나타내었고, 그 후 효소활성이 점차 감소하였으나, 60°C에서도 최대활성의 절반 이상을 나타내었다(Fig. 4).

이러한 결과로 보아 저온성 세균인 *S. psychrophilia* ATCase는 온도에 안정적이라고 할 수 있다. 비슷한 온도 조건에서 생육하는 *B. psychrosaccharolyticus*의 alanine racemase의 경우 pyridoxal 5'-phosphate(PLP)가 있을 때 고온에서도 상당히 안정한 효소활성을 나타낸다는 보고가 있었다[20].

ATCase의 과다발현 및 정제

E. coli BL21과 pET14b expression vector를 이용하여 *NdeI* 제한효소 site를 가진 *S. psychrophilia* pyrB 유전자의

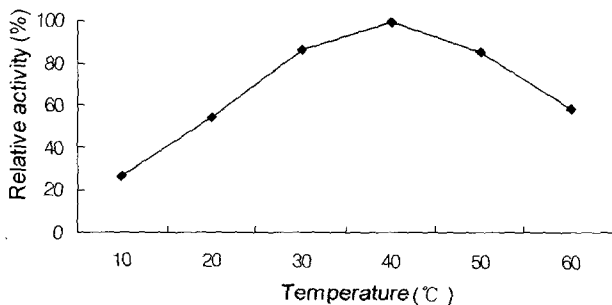


Fig. 4. Effect of temperature on ATCase activity of purified *S. psychrophilia* ATCase. The ATCase activity was determined with standard ATCase assay at various temperatures.

coding region만 클로닝하여 pSM3이라고 명명 하였다. 그 insert DNA의 염기서열을 결정한 결과 *S. psychrophilia*의 pyrB임을 확인 하였다.

그리고 그 발현 산물인 PyrB 단백질을 확인하기 위하여 pSM3를 가진 *E. coli* BL21을 0.1 mM IPTG로 pyrB 유전자를 과다발현 시킨 후 파쇄하여 SDS-PAGE로 그 과다발현 정도를 확인하고, active site가 변하지 않게 정제하는 native 조건과 과다발현하면서 생성된 inclusion body를 urea로 녹이며 단백질을 inactive하게 정제하는 denatured 조건 모두에서 PyrB 단백질을 정제해 보았다.

대조군으로 *E. coli* BL21과 *E. coli* BL21에 pET14b만 형질전환 시킨 것도 동일 조건의 IPTG로 과다발현을 유도하고 파쇄하여 SDS-PAGE에서 함께 전기영동을 수행하여 PyrB 단백질의 발현 여부와 크기를 비교해 보았다(Fig. 5). Native 조건과 denatured 조건으로 정제한 것 모두에서 비슷한 크기의 과다발현한 PyrB 단백질 band를 관찰할 수 있었다. 대조군으로 배한 *E. coli* BL21과 *E. coli* BL21에 pET14b만 형질전환한 것도 모두 같은 조건의 IPTG로 과다발현을 유도 하였지만, 과다발현된 단백질 band는 나타나지 않았다.

*S. psychrophilia*의 추정 PyrB 단백질은 약 27 kDa 정도 크기에서 band가 나타났다. 이것은 이론적으로 예상했던 29 kDa 크기와 유사하였다. 그리고 이것은 알려진 다른 *Bacillus* sp의 PyrB 단백질과도 유사한 크기였다[18]. 정제된 PyrB 단백질이 ATCase 활성을 가지고 있는지 확인하기 위해서 native 조건으로 정제한 단백질로 ATCase assay를 수행하였다. 그 결과는 Table 2에 표시한 바와 같이 비교적 높은 ATCase 활성을 보여 주었다.

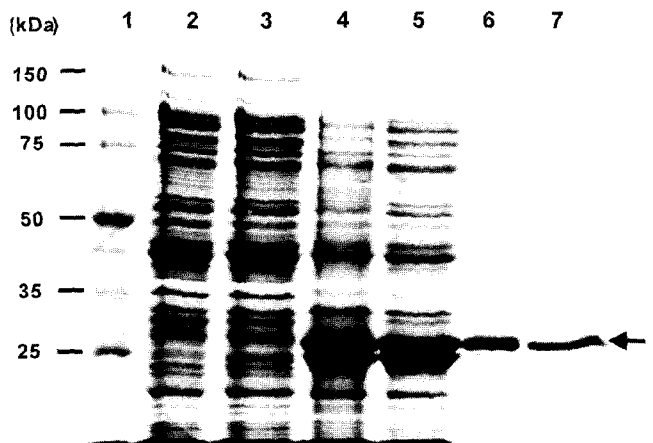


Fig. 5. Purification of the aspartate transcarbamylase expressed in *S. psychrophilia*. Lane 1, protein molecular weight standard; lane 2, supernatant of sonicated *E. coli* BL21; lane 3, supernatant of sonicated *E. coli* BL21/pET14b; lane 4, denatured supernatant of sonicated *E. coli* BL21/pSM3; lane 5, native supernatant of sonicated *E. coli* BL21/pSM3; lane 6, purified ATCase as denatured method; lane 7, purified ATCase as native method (all samples were treated in heat before SDS-PAGE).

요 약

저온성 균인 *Sporosarcina psychrophilia*의 염색체 DNA를 추출하여 *Sau3AI*으로 부분 절단하고 pUC19 vector에 ligation 시킨 후, *Escherichia coli pyrB* mutant 균주에 형질전환하여 uracil이 없는 AB 배지에서 생존하는 균주를 선택한 후, 그 plasmid를 분리하여 pSM1과 pSM2라고 명명하였다. 두 plasmid의 염기배열을 결정된 결과 pSM2 insert DNA는 pSM1 insert DNA 부분을 포함하는 2,606 nucleotide 단편이었다. 염기서열을 분석하였을 때 이것은 1개의 완전한 open reading frame(ORF)과 2개의 부분 ORFs를 포함하고 있었다. 두 번째 위치한 완전한 ORF는 *Bacillus caldolyticus* aspartate transcarbamylase(*pyrB*)와 아미노산 서열 수준에서 59% 상동성을 보였고, 첫 번째와 세 번째 위치한 부분적 ORFs는 각각 *Bacillus*속의 uracil permease(*pyrP*)와 dihydroorotase(*pyrC*)와 높은 상동성을 보였다. 그리고 *pyrB*와 *pyrP* 사이에 intergenic 부분에는 잠재적인 terminator, antiterminator, anti-antiterminator 구조를 포함하고 있었다. 이러한 결과는 *S. psychrophilia* pyrimidine 생합성에 관련된 유전자들은 다른 *Bacillus* 속에서 알려진 바와 같이 유전자군을 형성하고 있을 것으로 추정했다. *S. psychrophilia pyrB* 유전자의 생성물을 과다발현 시키고 정제해서 그 단백질을 SDS-PAGE로 확인한 결과 27 kDa 부근에서 band를 확인할 수 있었으며, 정제한 단백질을 ATCase 효소활성을 지니고 있었다.

REFERENCES

- Alsobrookm, D., J. M. Larkin, and M. W. Sega. 1972. Effect of temperature on the cellular integrity of *Bacillus psychrophilus*. *Can. J. Microbiol.* **18**: 1671-1678.
- Bertani, G. 1951. Studies of lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
- Bethell, M. R. and M. E. Jones. 1969. Molecular size and feedback-regulation characteristics of bacterial aspartate transcarbamylases. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**: 352-365.
- Blackburn, M. N. and H. K. Schachman. 1977. Allosteric regulation of aspartate transcarbamoylase. Effect of active site ligands on the reactivity of sulfhydryl groups of the regulatory subunits. *Biochemistry* **15**: 5084-5091.
- Bond, R. W., A. S. Field, and R. W. Switzer. 1983. Nutritional regulation of degradation of aspartate transcarbamylase and of bulk protein in exponentially growing *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **153**: 253-258.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Burns, B. P., S. L. Hazell, G. L. Mendz, T. Kolesnikow, D. Tillet, and B. A. Neilan. 2000. The *Helicobacter pylori pyrB* gene encoding aspartate carbamoyltransferase is essential for bacterial survival. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**: 78-84.
- Clark, D. J. and O. Maaloe. 1967. DNA replication and the division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **23**: 99-112.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114.
- Ghim, S.-Y. and R. L. Switzer. 1996. Characterization of cis-acting mutations in the first attenuator region of *Bacillus subtilis pyr* operon that are defective in pyrimidine-mediated regulation of expression. *J. Bacteriol.* **178**: 2351-2355.
- Ghim, S.-Y. and J. Neuhard. 1994. The pyrimidine biosynthesis operon of the thermophile *Bacillus caldolyticus* includes genes for uracil phosphoribosyltransferase and uracil permease. *J. Bacteriol.* **176**: 3698-3707.
- Ghim, S.-Y., P. Nielsen, and J. Neuhard. 1994. Molecular characterization of pyrimidine biosynthesis genes from the *Bacillus caldolyticus*. *Microbiology* **140**: 479-491.
- Gil, A. 2002. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**: S1-4.
- Kim, K. H., Z. X. Pan, R. B. Honzatko, H. M. Ke, and W. Lipscomb. 1987. Structural asymmetry in the CTP-liganded form of aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **196**: 853-875.
- Larkin, J. M. and J. L. Stokes. 1966. Isolation of psychrophilic species of *Bacillus*. *J. Bacteriol.* **91**: 1667-1671.
- Leach, J. L., J. H. Baxter, B. E. Molitor, M. B. Ramstack, and M. L. Masor. 1995. Total potentially available nucleosides of human milk by stage of lactation. *Am. J. Clin Nutr.* **61**: 1224-1230.
- Lerner, C. G. and R. L. Switzer. 1986. Cloning and structure of the *Bacillus subtilis* aspartate transcarbamylase gene (*pyrB*). *J. Biol. Chem.* **261**: 11156-11165.
- Mejias-Torres, I. A. and B. H. Zimmermann. 2002. Molecular cloning, recombinant expression and partial characterization of the aspartate transcarbamoylase from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**: 191-201.
- Nakamura, L. K. 1984. *Bacillus psychrophilus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 121-123.
- Okubo, Y., K. Yokoigawa, N. Esaki, K. Soda, and H. Kawai. 1999. Characterization of psychrophilic alanine racemase from *Bacillus psychrosaccharolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**: 333-340.
- Quinn, C. L., B. T. Stephenson, and R. L. Switzer. 1991. Functional organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic operon. *J. Biol. Chem.* **266**: 9113-9127.
- Schlimme, E., D. Martin, and H. Meisel. 2000. Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* **84**: S59-68.
- Schurr, M.J., J. F. Vickrey, A. P. Kumar, A. L. Campbell, R. Cunin, R. C. Benjamin, M. S. Shanley, and G. A. O'Donovan. 1995. Aspartate transcarbamoylase genes of *Pseudomonas putida*: requirement for an inactive dihydroorotase for

- assembly into the dodecameric holoenzyme. *J. Bacteriol.* **177**: 1751-1759.
24. Sugawara, M., N. Sato, T. Nakano, T. Idota, and I. Nakajima. 1995. Profile of nucleotides and nucleosides of human milk. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **41**: 409-418.
25. Takami, H, K. Nakasone, Y. Takaki, G. Maeno, R. Sasaki, N. Masui, F. Fuji, C. Hirama, Y. Nakamura, N. Ogasawara, S. Kuhara, and K. Horikoshi. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **28**: 4317-4331.
26. Tanaka, K., H. Sakai, T. Ohta, and H. Matsuzawa. 1995. Molecular cloning of the genes for pyruvate kinase of two bacilli, *Bacillus psychrophilus* and *Bacillus licheniformis*, and comparison of the properties of the enzymes produced in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 1536-1542.
27. Yoon, J.-H., K.-C. Lee, N. Weiss, Y.-H. Kho, K.-H. Kang, and Y.-H. Park. 2001. *Sporosarcina aquimarina* sp. nov., a bacterium isolated from seawater in Korea, and transfer of *Bacillus globisporus* (Larkin and Stokes 1967), *Bacillus psychrophilus* (Nakamura 1984) and *Bacillus pasteurii* (Chester 1898) to the genus *Sporosarcina* as *Sporosarcina globispora* comb. nov., *Sporosarcina psychrophila* comb. nov. and *Sporosarcina pasteurii* comb. nov., and emended description of th. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1079-1086.

(Received Sep. 14, 2002/Accepted Nov. 8, 2002)