

## 요각류 *Paracyclopsina nana* Acetate Kinase의 클로닝 및 대장균에서의 발현

정상운 · 서정수 · 이영미 · 박태진 · 김일찬<sup>1</sup> · 박흥기<sup>2</sup> · 이재성\*

한양대학교 대학원 분자생명환경과학과, <sup>1</sup>한국해양연구원 극지연구소,

<sup>2</sup>강릉대학교 생명과학대학 해양생명공학전공

요각류 *Paracyclopsina nana* acetate kinase를 클로닝하였다. 전체 open reading frame은 1,200 bp이었으며, poly(A) signal sequence가 ORF에 내재되어 있었다. 분자계통학적 분석결과 *P. nana* acetate kinase 유전자는 진핵생물계 곰팡이류인 *Aspegillus*와 같은 branch를 형성하였고, *P. nana* acetate kinase가 다른 원핵미생물들의 acetate kinase와는 구별되며 fungi와 같은 branch에 존재하는 것을 확인하였다. 또한, *E. coli*를 이용하여 원핵세포 발현벡터를 이용한 단백질 발현 유도를 통하여 *P. nana* acetate kinase 단백질 분자량이 약 50 kDa에 이르는 것을 확인하였다. 이 자료는 본 요각류와 다른 생물의 acetate kinase 단백질의 생화학적 특성비교에 유용하게 쓰이리라 사료된다.

**Key words** □ acetate kinase, Copepoda, *Paracyclopsina nana*, phylogenetic analysis, recombinant protein

Acetate kinase(AK)는 phosphotransferase (EC 2.7.2)에 속하는 효소로서 ATP로부터 acetyl phosphate를 생성하거나(EC 2.7.2.1) acetyl phosphate로부터 ATP를 생성하는 과정(EC 2.7.2.12)에 관여하는 중요 효소이다 (1, 2, 3, 4). AK는 주로 혐기성 미생물의 물질대사과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있는데, methane producing bacteria의 acetate로부터 methane의 생성 경로 중의 중요 중간대사체인 acetyl-Co A의 생성에 직접적으로 관여하고 있다. 즉, ATP로부터 phosphate group을 acetate에 전달하여 acetyl phosphate를 생성하고, 생성된 acetyl phosphate는 phosphate acyltransferase의 작용으로 Co A group과 phosphate가 치환됨으로서 acetyl-Co A를 생성하여 methane의 생성경로로 유입되게 된다.

현재까지 대부분의 acetate kinase 유전자는 주로 Bacteria에서 보고된 것들이 대부분이며, Archaea의 *Methanosarcina* sp.와 Eukaryota의 Fungi등에서 일부가 보고되어 있으나(5), 그 이상의 고등생물에서는 보고되어진 바가 없다. 따라서 본 논문에서는 요각류(copepoda)의 일종인 *Paracyclopsina nana*에서 발견된 acetate kinase 유전자의 cloning을 통하여 DNA 및 protein sequence를 최초로 보고할 뿐 아니라 기존에 등록된 bacteria 유래의 유전자 정보와 비교분석하였고, *E. coli* protein expression system을 이용하여 발현시켜 그 특성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

요각류 *Paracyclopsina nana*는 강릉대학교 해양생명공학부 먹이생물실험실에서 Lake Songji strain을 분양받아 실험에 사용하였다.

#### cDNA library의 제작

분양받은 개체 약 5 g (wet weight)을 액체질소를 사용하여 냉동시킨 후 막자사발에 넣어 분쇄하였다. 분쇄된 조직에 약 3배 정도의 Trizol을 넣고 tissue grinder를 사용하여 완전히 파쇄한 후에 total RNA를 분리하였고, 분리된 total RNA로부터 mRNA의 정제는 mRNA purification kit (Invitrogen, USA)를 이용하여 수행하였다. 정제된 mRNA는 -80°C에 보관하였고 cDNA library의 제작은 λZAP II cDNA library kit (Stratagene, USA)를 사용하여 수행하였다. 우선, mRNA로부터 oligo(dT)-*Xho*I linker primer를 이용하여 cDNA를 제작한 다음, 양쪽 말단에 *Eco*RI linker를 ligation하고 *Xho*I로 처리하여 3'쪽은 *Eco*RI, 5'쪽은 *Xho*I의 단일방향성 cDNA (unidirectional cDNA)를 제작하였다. 제작된 cDNA는 Sepharose CL-2B column을 이용하여 크기별로 분획하였고, 약 1,000 bp이상 크기의 cDNA만을 모아서 *Eco*RI/*Xho*I로 처리된 Uni-ZAP XR vector에 ligation하였다. Ligation products는 XL1-Blue MRF' cell에 packaging extract와 함께 packaging 하여 cDNA library를 구성하였다.

#### cDNA insert의 확인

구성된 library의 cDNA insert를 확인하기 위하여 Uni-ZAP

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 02-2220-0769, Fax: 02-2299-9450  
E-mail: jslee2@hanyang.ac.kr

XR vector를 *in vivo* excision reaction에 의해 pBK-CMV phagemid vector로 전환하였고 이를 *E. coli* XL0LR strain에 transformation하여 X-gal과 IPTG가 포함된 LB-Kanamycin plate에 접종하여 insert가 포함된 colony를 선별하였다. 선별된 colony는 다시 LB-kanamycin broth에서 37°C로 16-18 시간동안 배양한 다음 plasmid purification kit (Promega)를 사용하여 plasmid를 정제하였다. 정제된 plasmid는 *SacI* 과 *KpnI*으로 처리하여 insert를 확인하고 T3 primer를 이용하여 sequencing을 수행하였다. Sequence 정보는 NCBI의 GenBank를 검색하여 200 이상의 alignment score를 가지는 유전자를 대상으로 하여 확인하였다.

### 분자계통학적 분석

NCBI GenBank에 등록되어 있는 Bacteria, Archaea, Fungi 유래의 acetate kinase 유전자의 DNA 및 amino acid sequence를 이용하여 *P. nana*의 DNA 및 amino acid sequence와 Clustal X program을 이용하여 alignment 시킨 후, aligned data matrix를

PAUP 4.0b program을 이용하여 분석하였다. 다른 생물 종들과의 상관관계는 계통도를 구성하여 나타내었다.

### Acetate kinase 유전자의 cloning 및 *E. coli* 에서 발현

cDNA library로부터 전체 sequence가 확인된 acetate kinase 유전자의 단백질을 발현시키기 위하여 5'-end의 start codon을 포함하는 forward primer와 3'-end의 stop codon까지의 reverse primer를 제작하였고(PN-Acetate kinase-F, 5'-ATG GCG CTC CAA AGG AAC ATT TTG G-3', PN-Acetate kinase-R, 5'-TTA TCT CAT GAT AGC ATT TAT TGT TTC-3'), *P. nana*의 total RNA를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 증폭된 acetate kinase 유전자는 pCR<sup>®</sup> T7/NT TOPO TA vector (Invitrogen, USA)에 ligation하고 *E. coli* TOP10F' strain에 transformation 하였다. Transformants를 대상으로 하여 정확한 방향성을 가지는 transformant를 *HindIII* restriction enzyme으로 확인하고, 확인된 clone을 다시 *E. coli* BL21(DE3)pLysS strain에 transformation하

F primer	
1	ATGGCGCTCCAAAGGAACATTTTGGTAAATCAACTGTGGAAGCTCTTCGGTGAATTTCAA 60
	M A L Q R N I L V I N C G S S S V K F Q
61	GTTGTCGATCCATTTACTAAAGTTCGAAGCTTAGCTGGAATCATAGACCGACTGAATACA 120
	V V D P F T K V R S L A G I I D R L N T
121	CCAAAAGCAGTTTTAAAGCTCCAACAAGGCAATGGCCATCAACATATGAGCTTAGGAAAT 180
	P K A V L K L Q Q G N G H Q H M S L G N
181	GTTGGCCATCTGTCAAGTATTGACAGGATTTCTGACTTGGTCAACATCTAATATTTAGTGTG 240
	V G H L S A I D R I S D L V T S N I E L
241	GCTGGTATAGGTACAGAGTGGTGCATGGAGGGGATGTTTTCAAAGAAGCAGTCAAAATT 300
	A G I G H R V V H G G D V F K E A V K I
301	ACTCGTGACACCAAGAAGTCATAAAAAGCTTGAGCCATCTTGCTCCAAATGCACAATCCC 360
	T R D T K E V I K S L S H L A P M H N P
361	AACAACCTAATGGGAATTGAGCTTTAGAGAAGAAGTTCAGTCATCTGCCTCAGGTTGCA 420
	N N L M G I E L L E K K F S H L P Q V A
421	GTTTTGATACACATTTTCATGTCAAATCTATGCCAGAAAAAGCTTTTCGATACGCTGTG 480
	V F D T T F H V K S M P E K A F R Y A V
481	CCAGAACAATGGCTTGAGTCCCATAAAGTAAGGAGATACGGATTTACGGAATGAGCCAT 540
	P E Q W L E S H K V R R Y G F H G M S H
541	AAGTATGTGGCCGGTGAAGTTCGAAATCTGATGAAGAAACCAGTTAACGAAGTGTGGTTC 600
	K Y V A G E F A N L M K K P V N E V S V
601	ATCAGTGTCCACCTCGGAAATGGTGTCTCGATGTGTGCGATAAAGGACGAAAAAGTGTG 660
	I S A H L G N G C S M C A I K D G K S V
661	GATACCTCTATGGGTTTTACTCCGCTAGAAGGACTTATATGGGTACAAGATCAGGGGAT 720
	D T S M G F T P L E G L I M G T R S G D
721	CTTGACCGCTCAGTCATCAGCTACATGGCTCAAAGGCTGTCGTGCAGTGTGACGAGGTC 780
	L D A S V I S Y M A Q R L S C S A D E V
781	CTTAACTTATGTGTACATAAAAAGTGGACTGGAGGCAATTCAGGATATCATGACTCGAGA 840
	L N L L L H K S G L E A I S G Y H D S R
841	GATATGTAGATGAAGTTTATGGAAGGTGACAAAAGAGCAGCTCTCGCAATAGAAATGTTT 900
	D I E M K F M E G D K R A A L A I E M F
901	TGCTACAGAAATCGCCAAATACTTGCGGGCTACGTCGTTCCCTGAGACAAATCCCAGAT 960
	C Y R I A K Y L A A Y V V P L R Q I P D
961	GGGATATTTTCACAGGTGGCATAGGAGAACGATCTCCGCTGAAGCGTAAACTGATTATT 1020
	G I I F T G G I G E R S P L K R K L I I
1021	GATCTCTCCAGCCTATGGCTTTAAGATGACGATGTGGAAATATGAAAACTCCATT 1080
	D L L Q P I G F K I D D V E N M K N S I
1081	ATGATAGTTCTAATGATTCTACCGGAGCAATTCAGTAATACCAACTAACGAAGAGCTT 1140
	M I S S N D S T G A I A V I P T N E E L
1141	GTAATGCTCAGSAACCAATAAATGCTATCATGAGATAAGTAAAAA 1200
	V I A Q E T I N A I M R *

R primer

**Fig. 1.** Complete sequence of *Paracyclopina nana* acetate kinase gene. The forward or reverse primers were used to amplify the PCR product of complete *P. nana* acetate kinase cDNA for subcloning into the expression vector, pCR T7/NT-TOPO.

여 acetate kinase 단백질의 발현에 사용하였다.

Acetate kinase 단백질의 발현은 IPTG로 유도하였으며, 12-18 시간 배양한 균주를 새로운 LB-Ampicillin/Chloramphenicol 배지에 1/100으로 희석하여 접종하고, 37°C에서 O.D. (600 nm) 0.5가 될 때까지 배양한 후, IPTG를 0.5 mM이 되도록 첨가하여 30°C에서 다시 3시간동안 배양하였다. Acetate kinase 단백질의 발현은 10% SDS-PAGE gel을 통하여 확인하였다.

Western 분석을 위해서는 PAGE gel을 nitrocellulose membrane에 transfer하고, transfer된 membrane은 TBST로 2회 washing한 다음, 5% non-fat dried milk가 첨가된 blocking solution을 이용하여 실온에서 30분간 blocking 하였다. TBST로 다시 5분간 3회 washing한 후 anti-His G-HRP antibody (Invitrogen)를 1/1000으로 희석하여 첨가한 blocking solution으로 실온에서 1시간 동안 반응 시켰다. 그리고 다시 TBST로서 실온에서 5분씩 3회 washing 한 후, ECL kit (Amersham Biotech.)를 이용하여 발광 시킨 후 X-ray film에 노출시켜 Histidine이 tagging 된 단백질 band를 검출하였다.

### 결과 및 고찰

#### *P. nana* cDNA library 및 acetate kinase 유전자 정보 확인

*P. nana*는 요각류(copepoda)에 속하는 동물성 plankton의 한 종류로서 해양 생태계의 대표적인 먹이생물이다. 본 연구에서는 이러한 해양성 plankton으로부터 유용 유전자원을 발굴하고자 1,000 bp 이상 크기의 cDNA library를 구성하였고, cDNA insert를 확인하는 과정에서 현재 미생물 및 곰팡이에서만 보고된 acetate kinase 유전자의 정보를 확인할 수 있었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, *P. nana*의 acetate kinase 유전자는 전체 길이가 1,200 bp 이며 392 개의 amino acid로 구성되어 있었다. 종결 codon은 poly(A)sequence의 앞쪽에 존재하였으며, 특징적인 poly A signal sequence (AATAAA)는 open reading frame (ORF)내부 끝부분에서 발견되었다. 이는 특이적인 현상으로 요각류에 특이적으로 나타나는 현상으로 보인다. *P. nana* acetate kinase의 392 개의 amino acid 중에서 7번 amino acid로부터 384 amino acid까지가 전형적인 acetate kinase conserved domain (Pfam 00871)인 것으로 확인되었으며 Pfam 00871 domain과 99.7%의 alignment 비율 및 376의 alignment score를 나타내었다.

#### *P. nana* acetate kinase 유전자의 분자계통학적 분석

Pfam분류에 따르면 acetate kinase는 butyrate kinase, 2-methylpropanoate kinase와 함께 acetokinase family에 속하며 현재 Pfam database에는 Archaea의 3종과 Bacteria 174종의 생물종의 sequence가 등록되어있다. 그리고 NCBI GenBank에는 Fungi의 acetate kinase 유전자도 등록되어져 있다. 그러나 아직 fungi 이상의 고등생물의 acetate kinase 유전자에 대한 정보는 보고되어져 있지 않기 때문에 본 연구에서는 미생물에서 33종, fungi에서 2종 등 총 35개 생물종의 acetate kinase 유전자의 amino acid sequence를 분자계통학적 방법으로 비교, 분석하였다. Fig.

2에서 보는 바와 같이 현재까지 알려진 대부분의 acetate kinase 유전자는 Bacteria에서 유래된 것으로 드물게 Archaea의 *Methanosarcina* spp.와 Fungi의 *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp.등이 보고되어져 있다. 이들중에서 대표적인 10여종의 미생물들과 (*Streptomyces*, *Mycobacterium*, *Shewanella*, *Escherichia*, *Deinococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Symbiobacterium*, *Mathanosarcina*) 1종의 곰팡이(*Aspergillus*)와의 amino acid의 sequence alignment를 통하여 서로간의 상관관계를 비교분석하였다. Archaea의 *Methanosarcina* species의 경우는 408 개의 amino acid로 구성되어 있으며, *P. nana*와는 56%의 sequence homology (36% identity)를 나타내었다. 다른 10종의 미생물들은 385-405 amino acid로 구성되어 있으며, *P. nana*와는 50-61%의 sequence homology를 나타내었다(38-40%의 sequence identity). *Aspergillus* species의 경우는 469 amino acid로 구성되어 있어 가장 길었으며, *P. nana*와는 39%의 sequence homology (23% sequence identity)를 나타내었다. Alignment gap의 경우, *P. nana*와 다른 미생물들 사이에는 4-8%의 alignment gap이 발생하는 것으로 확인되었고, 특히 *Aspergillus* species와는 20%의 상대적으로 큰

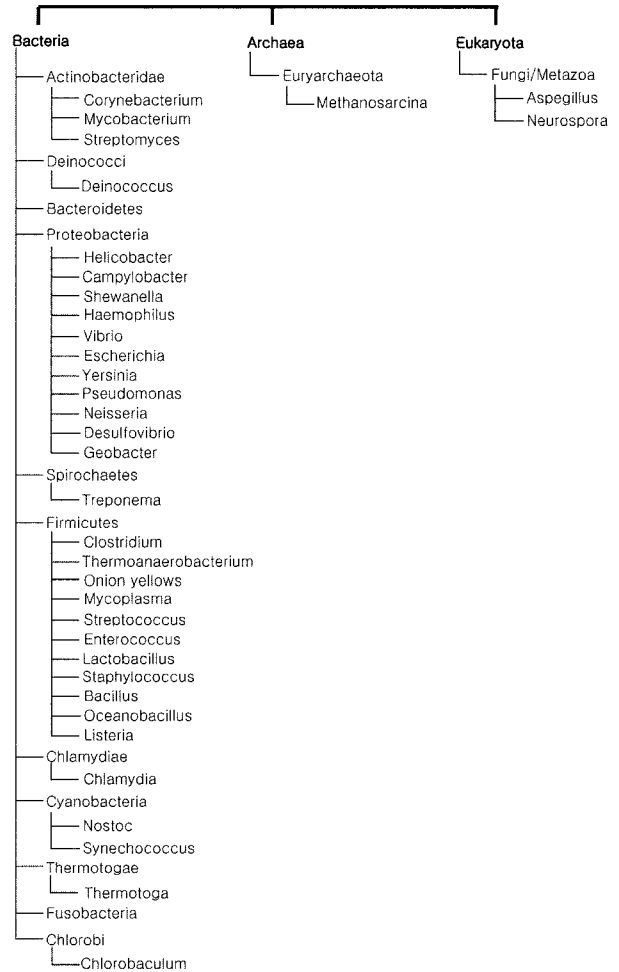


Fig. 2. List of organisms that acetate kinase gene sequences have been reported.

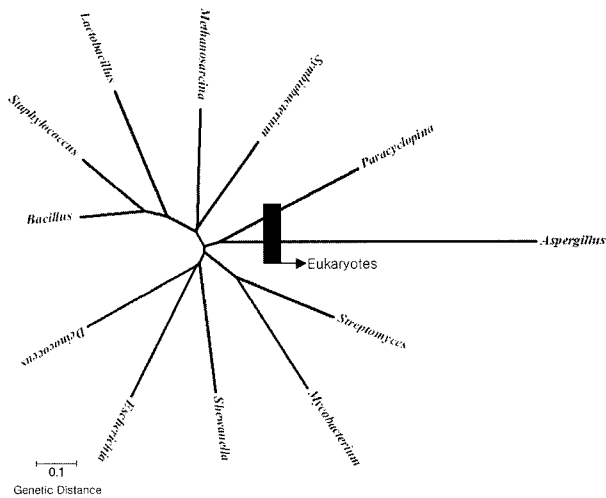
alignment gap이 발생하였다(Fig. 3).

분자계통학적 분석을 위하여 위의 alignment 된 sequence matrix로부터 alignment gap을 제외한 alignment data matrix를 구성하였고(355 sites), 이를 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software를 사용하여 분석하였다(6). 분석방법 으로서는 Poisson correction의 분석모델을 적용한 Minimum Evolution (ME) 방법을 사용하였다(7). 분석결과에 따른 계통도의 구성은 Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm이 사용되

어, 가장 작은 branch length의 합(Sum of branch length (SBL)) 을 갖는 unrooted tree를 구성하였다(7). 계통도의 검증은 100회 의 bootstrap 법에 의해 보정하였으며, 이때 random seed number 는 64238이었다. 결과적으로 도출된 계통도의 SBL 값은 4.40674740 이었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 P. nano의 acetate kinase 유전자의 sequence는 다른 미생물들과는 다른 독립된 branch를 가지는 것으로 확인되었다. 특히, 분류학상으로 같은 진핵생물에 속하는 곰팡이류의 Aspergillus 종과 같은

Table with 3 columns: Organism Name, Amino Acid Sequence, and Alignment Position. Rows include Streptomyces, Mycobacterium, Bacillus, Staphylococcus, Lactobacillus, Methanosarcina, Symbiobacterium, Shewanella, Escherichia, Deinococcus, Paracycloplina, and Aspergillus. Each organism has a unique sequence of amino acids represented by letters (A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y) and dashes/dots for gaps/identical positions. The sequences are aligned in columns, with positions indicated by numbers at the top of each column.

Fig. 3. Alignment matrix of acetate kinase amino acid sequence from 10 cellular organisms. 7 bacterial species, 1 archaeal species, and 1 fungi species. The sequence information was retrieved from the NCBI GenBank. Sequence alignment was performed using clustal X program (Ver. 1.81). Dash (-) and dot (.) indicate the blank and identical sequence between those organisms, respectively.



**Fig. 4.** The unrooted phylogenetic tree of *P. nana* acetate kinase gene with other cellular organisms. The phylogenetic tree was constructed using MEGA program (Ver. 3.0). The relationships of *P. nana* acetate kinase gene with those of other cellular organisms were calculated by Poisson correction model and the phylogenetic tree was constructed by CNI algorithm. All procedure was corrected by 100 bootstrap. The scale bar represents genetic distance.

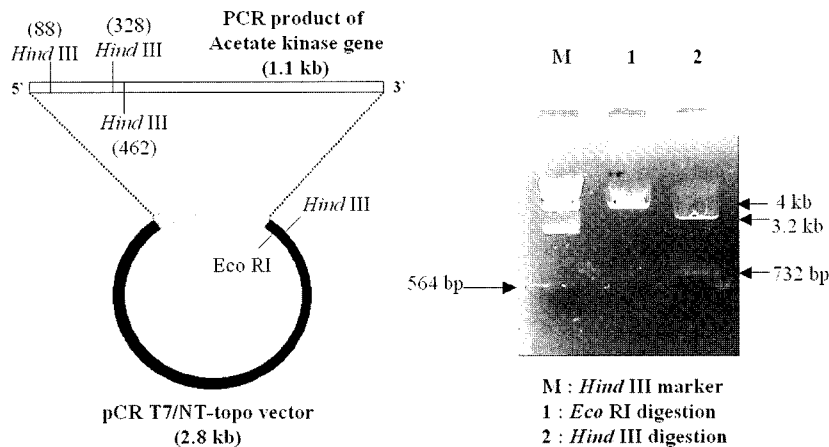
branch를 가지고, 공생미생물인 *Symbiobacterium*이 속한 branch와 구별되는 것으로 보아 본 연구에서 확인된 *P. nana*의 acetate kinase 유전자는 공생미생물이나 다른 미생물의 오염에 기원한 것이 아니라 *P. nana* 유래의 유전자임을 확인할 수 있었다.

***P. nana* acetate kinase의 단백질 발현 vector 구성 및 발현 특성**

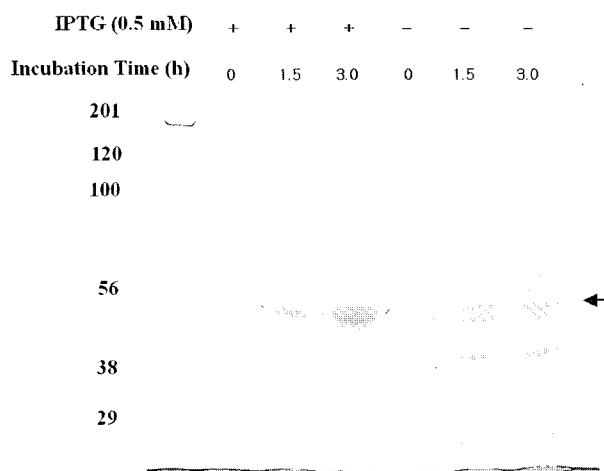
*E. coli* 내 발현 system을 구축하기 위하여 acetate kinase 유전자의 5'- 및 3'-의 양말단으로부터 primer를 작성하고(Fig. 1), *P. nana*의 cDNA로부터 PCR을 수행하여 pCR T7/NT-topo vector에

cloning 하였다(Fig. 5). 즉 이를 N terminal에 6개의 histidine이 tagging 되는 pCR T7 TOPO vector에 ligation하여 transformation하였고, 올바른 방향으로 cloning 된 clone을 확인하기 위하여 분리된 plasmid를 *Hind*III로 처리하여 agarose gel에 전기영동하여 732 bp의 DNA fragment가 나오는 clone을 선별하였다(Fig. 5). 그리고 이 clone을 다시 BL21(DE3)pLysS에 transformation하였고, 형성된 colony를 이용하여 단백질 발현을 IPTG로 유도하여 10% SDS-PAGE에서 확인하였다.

*P. nana*의 acetate kinase 유전자는 약 392개의 amino acid로 구성되어 있으므로 이론적인 분자량은 약 43 kDa이지만 본 연구에서는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 약 50 kDa 부근에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 *P. nana*의 acetate kinase 단백질의 3차원적인 구조 또는 총체적인 이온 등 물리, 화학적인 특성에 기인하는 것으로 보인다. 예컨대 *Methanosarcina thermophila*의 경우 *M. thermophila*의 acetate kinase 유전자는 408개의 amino acid로 구성되어 있어 이론적인 분자량은 약 44.2 kDa이지만, 실제 SDS-PAGE 상에서는 약 53 kDa으로 본 *P. nana*와 유사한 크기를 갖는 것으로 확인되었다(8). 따라서, 본 연구에서 확인된 것처럼 *P. nana* acetate kinase 단백질의 분자량은 약 50 kDa일 것으로 추정되며, Fig. 6의 lane 2와 3에서처럼 IPTG 첨가에 따라 *E. coli* cell 내에서 발현이 유도되는 것을 확인하였다. 그러나, 발현된 *P. nana* acetate kinase 단백질은 대부분이 불용성의 inclusion body를 형성하는 것으로 확인되었다(Fig. 7). Fig. 7에서 보는 바와 같이 lane 2, 3의 전세포추출액(whole-cell crude extract)에서는 acetate kinase 단백질의 발현이 확인되었지만, 이를 lysis solution에서 파쇄한 후 원심분리하여 얻은 상층액(Fig. 7, Lane 4)에서는 SDS-PAGE의 gel 염색뿐만 아니라 anti-His antibody에 의한 Western 분석에서도 검출되지 않았다. 대신 원심분리에 의해 침전된 불용성의 분획에서 발현된 단백질이 강하게 검출되는 것으로 보아(Lane 5, Fig. 7), 발현된 acetate kinase 단백질의 대부분은 불용성의 inclusion



**Fig. 5.** Schematic plot for constructing expression vector of acetate kinase. Left side shows the cloning strategy of PCR-amplified acetate kinase gene into pCR T7/NT-TOPO vector. The location of *Hind*III and *Eco*RI sites were indicated. The photomicrograph of agarose gel on right side shows the restriction enzyme pattern of recombinant construct to confirm the direction.



**Fig. 6.** Induction and expression profile of *P. nana* acetate kinase protein on 10% SDS-PAGE. The transformed cells were pre-incubated, and IPTG was added to induce *P. nana* acetate kinase protein. The sampling was done at 0, 1.5 hour, and 3 hour. After incubation, the whole cell extracts were prepared from induced and non-induced cells and these were analyzed on 10% SDS PAGE. The arrow indicates the induced acetate kinase protein.

body를 형성하는 것으로 추정할 수 있었다. *P. nana* acetate kinase 단백질의 amino acid 구성을 살펴보면 비록 소수성의 amino acid가 52%를 차지하기는 하지만 친수성 amino acid (28%)와 중성 amino acid (20%)가 48%를 차지함으로써 전체 단백질의 특성을 소수성으로 단정 짓기는 어려우며, 특히 *M. thermophila*의 cell extract에서 acetate kinase는 수용성분획에서 주된 활성이 발견됨에 따라(8) cell membrane등에 존재하는 내재성 막단백질(integral membrane protein)은 아닌 것으로 추정된다.

이상과 같은 결과에 따라, 본 논문에서는 진핵생물계 곰팡이류

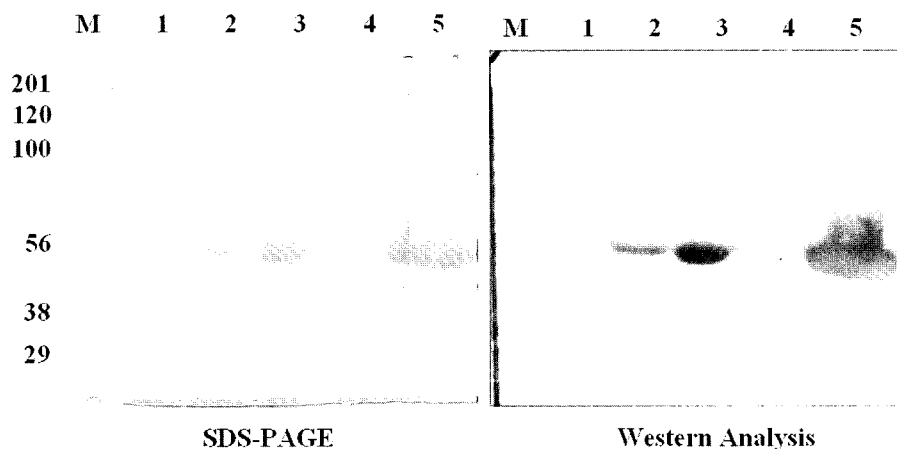
이상의 고등생물에서 acetate kinase 유전자를 최초로 요각류의 일종인 *P. nana*에서 cloning 하여 유전자의 DNA 서열정보를 확인하였으며, 그 서열정보의 분자진화학적 분석을 통하여 *P. nana*의 acetate kinase가 미생물들의 acetate kinase와는 구별되며 fungi와 같은 branch에 존재하는 것을 확인하였다. *E. coli*의 발현체계를 이용한 단백질 발현 유도를 통하여 His-tagged acetate kinase 단백질의 분자량이 다른 종의 acetate kinase 단백질과 마찬가지로 약 50 kDa에 이르는 것을 확인하였다. 따라서 이와 같은 결과를 토대로 하여 진핵고등생물에서 발견된 acetate kinase 단백질의 활성을 측정하여 다른 생물종의 acetate kinase 활성과 비교함으로써 고등생물계에서 acetate kinase 단백질의 생물학적 역할에 대해 추후 고찰하여야 할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 말

본 연구는 한국학술진흥재단 중점연구소 연구비 지원(2004-C00013)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Reeves, R.E. and J.D. Guthrie. 1975. Acetate kinase (pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1389-1395.
2. Romain, Y., S. Demassieux, and S. Carriere. 1982. Partial purification and characterization of two isoenzymes involved in the sulfurylation of catecholamines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 999-1005.
3. Romano, A.H. and W.J. Nickerson. 1954. Cystine reductase of pea seeds and yeasts. *J. Biol. Chem.* 208, 409-416.
4. Stern, J.R. and S. Ochoa. 1951. Enzymatic synthesis of citric acid.



**Fig. 7.** SDS-PAGE and Western analysis of whole cell crude extracts. The transformed cells were lysed in lysis buffer at 4°C and the chromosome was destroyed by passing through of the lysates into a 13-gauge needle for 5-10 times. After separation of pellet and supernatant by centrifugation at 15,000 rpm, 4°C for 30 min, these two fractions were analysed on 10% SDS-PAGE. For Western analysis, the PAGE-gel was electroblotted on nitrocellulose membrane, and His-tagged protein was detected with anti-His antibody using ECL method. Lane 1 : induction time 0, Lane 2 : induction time 1.5 hour, Lane 3 : induction time 3 hour, Lane 4 : supernatant, Lane 5 : pellet.

- I. Synthesis with soluble enzymes. *J. Biol. Chem.* 191, 161-172.
5. NCBI GenBank Search and Taxonomy Results.
6. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150-163.
7. Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
8. Aceti, D.J. and J.G. Ferry. 1988. Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermo-philus*. *J. Biol. Chem.* 263, 15444-15448.

(Received July 26, 2005/Accepted August 30, 2005)

---

**ABSTRACT : Cloning of Acetate Kinase Gene from the Copepod *Paracyclops nana* and its Expression in *Escherichia coli***

**Sang-Oun Jung, Jung Soo Seo, Young-Mi Lee, Tae-Jin Park, Il-Chan Kim<sup>1</sup>, Heum Gi Park<sup>2</sup>, and Jae-Seong Lee** (Department of Molecular and Environmental Bioscience, Graduate School, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, <sup>1</sup>Polar BioCenter, Korea Polar Research Institute, Korean Ocean Research & Development Institute, Ansan 426-744, Korea, <sup>2</sup>Division of Marine Resource Development, College of Life Sciences, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea)

The acetate kinase gene from the copepod *Paracyclops nana* was cloned. The open reading frame (ORF) was 1,200 bp, and poly(A) signal sequence was located in the end of the ORF. After the molecular phylogenetic analysis of *P. nana* acetate kinase gene, it was revealed that it formed the same branch with that of *Aspergillus*. Also *P. nana* acetate kinase showed the difference with those of other prokaryotic microorganisms but showed the same clade with those of fungi. We also confirmed that the recombinant protein of *P. nana* acetate kinase made approximately 50 kDa after expression of recombinant gene construct in *E. coli*. This may be useful to compare this protein to those of other organisms in biochemical characteristics.