2006年 2月

碩士學位論文

Streptomyces sp. SCC-2136의 deoxysugar 생합성에 관련된 Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase 유전자 (*sch*S6)의 과발현 단백질 분리정제 및 생화학적 특성연구

朝鮮大學校 大學院

藥學科

金秀 珉

# Streptomyces sp. SCC-2136의 deoxysugar 생합성에 관련된 Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase 유전자 (*sch*S6)의 과발현 단백질 분리정제 및 생화학적 특성연구

Over expression of Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase Gene(*sch*S6) Involved in Deoxysugar Biosynthesis from *Streptomyces* sp. SCC-2136 and Biochemical Properties of the Expressed Protein

2006年 2月

朝鮮大學校 大學院

藥學科

金秀 珉

# Streptomyces sp. SCC-2136의 deoxysugar 생합성에 관련된 Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase 유전자 (*sch*S6)의 과발현 단백질 분리정제 및 생화학적 특성연구

# 指導教授 柳 鎭 鐵

이 論文을 理學碩士 學位申請論文으로 提出함

## 2005年 10月

# 朝鮮大學校 大學院

## 藥學科

# 金秀珉

# 金秀珉의 碩士學位論文을 認准함

委員	長	朝鮮大學校	教授	禹	銀	闌	印
委	員	光州科技阮	教授	金	載	_	印
委	員	朝鮮大學校	教授	柳	鎭	鐵	印

# 2005年 11月 29日

# 朝鮮大學校 大學院

# Contents

## List of Fiugures

## List of Table

## ABSTRACT

Ι.	Introduction1
Π.	Materials and Methods5
1.	Generals
2.	Bacterial strains, plasmids and culture conditions
3.	Design of PCR primers for the probe of
	dTDP-glucose 4,6-dehydratase6
4.	Construction of the genomic library and screening
5.	Nucleotide sequencing and analysis7
6.	Accession number 7
7.	Construction of expression plasmid7
8.	Protein concentration8
9.	Enzyme assays
10.	HPLC Analysis8
11.	Over expression and purification of glucose-1-phosphate
	thymidylyltransferase9
12.	Molecular weight determinationD
13.	Substrate and inhibitor specificityD
ш.	Results and Discussion11

Cloning of deoxysugar biosynthetic gene cluster of				
Streptomyces sp. SCC-213611				
2. Sequence analysis11	2.			
3. Over expression of <i>schS6</i> in <i>E.coli</i> 2	3.			
4. Purification and physical characterization of	4.			
glucose-1-phosphate thymidylyltransferase2				
Substrate and inhibitor specific of				
glucose-1-phosphate thymidylyltransferaseB				
V. Conclusion23	IV.			
/. Keferences ····································	ν.			

# List of Figures

Figure. 1	Structure of Sch 47554 and Sch 47555
Figure. 2	Amplification and cloning strategy of <i>schS6</i> into pET32a+ for the expression plasmid pSCHS615
Figure. 3	Complimentary neocleotide sequence of s <i>chS6</i> and its deduced amino acid sequence
Figure. 4	Multiple sequence alignments of the SchS6 with known glucose-1-phosphate thymidyltransferases from databank (NCBI)
Figure. 5	Ni-affinity column chromatogram of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase
Figure. 6	Purification fractions and molecular weight determination of the expressed schS6 by SDS-PAGE

# List of Tables

Table. 1	Purification scheme for glucose-1-phosphate		
	thymidylyltransferase from <i>Streptomyces</i> sp.		
	SCC-2136		
Table. 2	Activity of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase with various nucleotides		
Table. 3	Substrate specificity of glucose-1-phosphate		
	thymidylyltranferase		

### ABSTRACT

Over Expression of Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase Gene(*schS6*) Involved in Deoxysugar Biosynthesis from *Streptomyces* sp. SCC-2136 and Biochemical Properties of the Expressed Protein

> Kim Su Min Advisor: Prof. Yoo Jin-Cheol, Ph.D. Department of Pharmacy, Graduate School of Chosun University

The deoxysugar biosynthetic gene cluster of Sch 47554/ Sch 47555 was cloned from Streptomyces sp. SCC-2136. The three orfs namely schS6, schS5, and schS2 were amplified, cloned and heterologously expressed in E. coli. One of the orfs, schS6, appeared to encode glucose-1-phosphate thymidylyltransferase, which converts dTTP and Glucose-1-Phosphate to TDP-D-glucose and pyrophosphate. The dTDP-D-glucose is a key metabolite in prokaryotics as a precursor for a large number of modified deoxysugars. These deoxysugars are major part of various antibiotics from glycosides to macrolides. SchS6 was expressed in E.coli in the vector pSCHS6 and the expression protein was purified to apparent homogeneity by ammonium sulfate precipitation and Ni-NTA affinity column using imidazole buffer as eluents. The specific activity of the enzyme increased 4.7-fold with a recovery of 17.5%. It migrated as single band on SDS-PAGE with a molecular mass of 56kDa. The purified protein showed thymidylyltransferase glucose-1-phosphate activity, catalyzing а reversible bimolecular group transfer reaction. In the forward reaction the highest activity was obtained with combination of dTTP and  $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate, and only 12% of that activity was obtained with the substrates UTP/ $\alpha$ -D-glucose 1-phosphate. And the purified protein was highly specific for dTDP-D-glucose and pyrophosphate in the reverse reaction.

#### I. Introduction

토양미생물 상호간의 길항적 관계가 1940년 Waksman에 의해 보고된 이후 많은 생리활성물질이 분리되었다. 특히 방선균에서 분리된 생리활성물질이 지금까지 발 견된 물질 중 약 45%를 차지하고 있으며 이중 대부분은 *Streptomyces* 속에서 분리 되었고 fungi, bacilli, pseudomonas가 나머지의 대부분을 차지하고 있다.<sup>32,33,44</sup> 방선균에 관한 연구는 1875년에 Ferdinand Cohn이 *Streptothrix foesteri*이라는 방선균을 처음으로 발견함으로써 시작되어 1940년 Dr. Waksman 그룹에 의해 항생 제 탐색 연구가 시작되어 1941년 Actinomycin이 처음 발견되었고, 임상적으로 유 용한 항생제로서는 Streptomycin이 처음으로 탐색 개발되었다. 1940년대부터 많은 항생제들이 streptomyces에서 발견되면서 이러한 이차대사 물질에 대한 연구는 주 로 치료활성에 관한 문제나 미생물 발효에 의한 생산문제에 치우쳐왔으나, 개발된 많은 항생제들의 남용으로 1957년 이후부터 항생제에 내성을 보이는 병원균들이 검출되기 시작하였고 이러한 문제를 해결하기 위해 더욱 강력하고 효율적이며 부 작용이 적은 치료제의 필요성으로 새로운 구조를 가진 항생제들이 요구됨에 따라 최근에는 항생제를 비롯한 많은 이차대사물질들의 생합성 효소나 그 유전자들에

많은 항생제들은 적어도 한 개 이상의 sugar가 붙어있다. 이들 sugar는 deoxyhexose, dideoxyhexose, aminosugar, inositol 등으로 매우 다양한 구조를 가지고 있으며, 직접 또는 간접적으로 biological activity를 보여주는 메카니즘 에 참여하거나 높은 생물학적 활성을 갖도록 affinity에 관여하고 있다. 새로운 항생제를 찾기 위해서 새로운 deoxysugar 구조를 구성하고 이를 다양하게 변형된 aglycon에 결합시켜 새로운 항생물질을 합성하고자 하는 시도가 최근에 연구되고 있다.

- 1 -

Nucleotide-sugar dTDP-D-glucose는 원핵생물에서 주요한 대사체이며, L-rhamnose (6-deoxyhexose), 6-deoxy-L-talose, 2,6 dideoxyhexoses와 다른 deoxyhexoses와 같은 많은 변형된 sugars의 전구체로 대표된다. <sup>13,14,15</sup> 게다가 bacterial antigens의 구성분이 되며, 이들 unusual deoxyhexoses는 macrolide 항 생제를 포함한 glycosides에서 발견할 수 있다 (Aguirrezabalage *et al*., 2000; Floss and Beale, 1989; Vara and Hutchinson, 1988; Yoo *et al.*, 2000).<sup>16.17.18.19</sup> Macrolides, anthracyclines, 그리고 polyethers를 포함한 많은 항생제들은 부분 적인 deoxygenated hexose sugar (deoxyhexose) 구성분을 가지고 있고, 이것들은 일반적으로 특수한 항생제의 필수적인 생물학적 활성이 된다. 많은 연구를 통해 항생제에서 발견된 모든 deoxyhexoses를 생합성하기 위한 early enzymatic step이 dTTP와 α-D-glucose-1-phosphate로부터 glucose-1-phospate thymidylyltransferase (dTDP-glucose synthase, EC 2.7.7.24)에 의해 dTDP-glucose를 형성하는 이 *et al.*, 1997).<sup>20.21</sup> Lombo 증명되었다 (Bechthold *et al.*, 1995; Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase는 reversible bimolecular group transfer 반응에 따라 촉매시킨다.

#### dTTP + $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate $\leftrightarrow$ dTDP-D-glucose + pyrophosphate (ppi)

Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase를 암호화하는 많은 유전자들은 6-deoxyhexose moieties를 포함한 natural products의 생합성 유전자를 가지고 있 는 gene clusters에서 발견되었다 (Jiand. *et al*., 1991; Pissowotzki. *et al*., 1991; Merson-Davies and Cundliffe, 1994; Marolda and Valvano, 1995; Shong et 1998).<sup>22.23.24.25.26</sup> al., Salmonella enterica 또한, LT2, Streptomyces ant ibiot icus. Pseudomonas aeruginosa, E.coli로부터 클론된 glucose-1-phosphate thmidylyltransferase 유전자들의 발현과 생화학적 특성, catalytic mechanism이 보고된 바 있다 (Lindquist *et al.*, 1993; Yoo *et al.*,

1999; Simone et al., 2001).<sup>15.27.28</sup>

Sch 47554와 Sch 47555는 Streptomyces sp. SCC-2136 균주로부터 생산되는 새 로운 angucycline계 항진균제로서 *Candida albicans, C. tropicalis*와 *C.* stellatoidea에 대한 항진균 활성을 가진다.<sup>2</sup> 그들은 L-aculose와 D-amicetose와 같은 2,3,6-trideoxysugar를 가지고 있다. Trideoxysugar에 대한 몇몇의 경우가 보고되었고 잘 알려진 예로서 landomycin과 urdamycin의 dTDP-L-rhodinose, dTDP-L-epivancosamine, daunorubicin의 dTDP-daunosamine과 vancomycin의 rubradirin의 rubranitrose가 있다.<sup>3</sup> Aculose와 amicetose는 glycoside 항생제의 2,3,6-trideoxysugars를 가지고 있는 특수한 경우를 대표한다.<sup>4.5.6.7</sup> 원핵생물의 주 요 metabolite인 dTDP-D-glucose는 수많은 modified deoxysugars의 전구체가 된 다. 이들 deoxysugars은 glycosides부터 macrolides에 이르는 다양한 항생제들의 주요한 부분으로서, 그들의 명백한 역할에 대한 연구가 진행되고 있으며 그들 스 스로는 생물학적으로 불활성인 것으로 알려졌다. 이러한 deoxysugars이 복잡한 구 조의 한 부분이 되었을 때 그들은 많은 화합물들의 생물학적 활성을 촉진하는 결 정적인 역할을 한다.1 미래에 이것은 urdamycin과 유사한 주요 PKS core로서 항 항생제로 사용되어질 가능성이 있다. tumor Deoxysugars의 원천인 glucose-1-phosphate는 dTDP-D-glucose synthase에 의해 dTDP-D-glucose로 활성화 되고 dTDP-D-glucose 4,6 dehydratase에 의한 성공적인 dehydration 결과 dTDP-4-keto-6-deoxyglucose로 전환된다. 이후의 과정으로 epimerization, reduction, dehydration, methylation, amination이 있다.

SchS6gene은glucose-1-phosphatethymidylyltransferasegene과강한상동성을보여준다.Orfs중의하나인schS6은glucose-1-phosphatethymidylyltrasferase를암호화함으로써dTTP와Glucose-1-phosphate를TDP-D-glucose와pyrophosphate로전환시킨다.본연구에서는E.coli에서

- 3 -

의 발현과 발현된 Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase의 분리, 그 생화학 적 특성분석을 수행하였다.

#### II. Materials and Methods

#### 1. Generals

Inorganic pyrophosphatase, dTMP, dTDP, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dADP-D-glucose, dCDP-D-glucose, dGDP-D-glucose, dTDP-D-glucose, dTDP-4-keto-6-deoxyglucose와 모든 dUDP-D-glucose, sugar-1-phosphate, IPTG(Isopropyl β-D-thiogalactoside), DTT, TEMED, Ammonium persulfate, SDS, Acrylamide, Carbenicillin, β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β-NAD), Glycine, Glycerol, 2-Mercaptoethanol, Polyacrylamide는 Sigma Chemical Co.에 서 구입하였고, Standard protein (Phosphorylase b, Albumin, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase, Trypsin Inhibitor,  $\alpha$ -Lactalbumin), Trizma base, Ammonium sulfate, Potassium chloride와 Potassium phosphate는 USB (USA)에서 얻었다. Ni-affinity gel은 Novagen (USA) 제품을 구입하여 사용하였고, Shim-Pack CL-DOS (M) 8C Column, ODS Hypersil column과 CL-Dos guard column은 SHIMADZU Co. (Japan)로부터 구입하였다.

*Escherichia coli* XL1- Blue MRF는 Stratagene (La Jolla, CA)로부터 얻었고, *Escherichia coli* BL21(DE3)와 pET32a+ 발현벡터는 Invitrogen Corporation (San Diego, USA)로부터 받아 사용하였다. Synthetic oligonucleotides는 GeneChem (Daejeon, Korea)에 의해 합성되어졌고, Polymerase chain reaction (PCR)은 GeneAmp kit과 함께 perkin-Elmer Cetus로부터 구입하였다. 다른 모든 Chemicals 는 Sigma 또는 United States Biochemical (Cleveland, USA)의 제품을 사용하였으 며 Restriction enzymes와 다른 enzymes는 Promega Biotech (Madison, USA)와 TaKARa Shuzo Co.에서 구입하였다.

- 5 -

#### 2. Bacterial strains, plasmids and culture conditions

Streptomyces sp. SCC-2136 (ATCC 55186)은 ISP2 배지 (1% malt extract, 0.4% yeast extract, 0.4% glucose) agar plate에 3-5일동안 28℃에서 배양한다. E.coli XL1 Blue MRP를 재조합 플라스미드의 준비와 cosmid library를 구축을 위 해 사용하였다. E.coli BL21 (DE3)를 발현숙주, pET32a+를 발현벡터로 사용하였으 며, 위의 균주들을 선택적으로 배양하기 위해 ampicillin (100 µg/ml)과 apramycin (100 µg/ml)를 사용하였다.

#### 3. Design of PCR primers for the probe of dTDP-glucose 4,6-dehydratase

#### 4. Construction of the genomic library and screening

상보적인 *E. coli* 세포들의 클로닝, 형질전환과 DNA 조작은 Standard protocol 에 따라 수행하였다.<sup>9</sup> *Streptomyces* sp. SCC-2136의 genomic DNA는 ISP2 액체배지 에서 28℃, 3일동안 배양한 후에 준비하였고, Hopwood 등의 방법에 따라 phenol-chloroform 혼합액에 의해 추출되었다.<sup>10</sup> 그런 후에 *Sau*3AI로 부분 절단하 여 30-40kb의 단편을 *Hpa*I와 *Ban*HI으로 절단된 cosmid 벡터 pOJ446에 붙였다. In vitro packing은 Gigapack Ⅲ XL packing extract (Stratagene, USA)을 제조자의 intoduction에 따라 수행하였다. Probe는 random primer labeling kit (Stratagene, USA)를 사용하여 <sup>32</sup>P로 표지되었고 gel filtration에 의하여 분리되 었다. Hybridization은 10ml의 2X SSC (50℃, 6h)에서 수행하였다.<sup>9</sup>

#### 5. Nucleotide sequencing and analysis

Nucleotide sequences는 automatic sequencer를 사용한 dideoxy chain termination method에 의해 결정되었다. Computer-aided sequence 분석은 DNASIS software package (version 2.1, 1995; Hitachi Software Engineering)로 행하였 고, database searches는 BLAST로 수행하였다.

#### 6. Accession number

*Sch*S6의 Nucleotide sequence는 EMBL nucleotide database의 accession number\*\*\*\*에 따랐다.

#### 7. Construction of expression plasmid

*SchS*6은 forward primer BS-SynI: 5'-<u>GGATCC</u>CATATGAAGGCGCTTGTGCTG-3'와 reverse primer BS-SynII: 5'-<u>GAATTC</u>CCTCATGACGTGACCTCCAC-3'를 사용한 cosmid로 부터 증폭되었다 (restriction sites are underlined). PCR은 Pre-Mix<sup>™</sup> -Top kit (Bioneer, Korea)를 이용한 Tachne thermocycler (Eppendorff, USA)로 수행하였 다. PCR산물은 *Ban*HI과 *Eco*RI으로 절단, 정제되었고 동일한 제한 효소에 의해 절 단된 벡터 pET32a+를 클로닝하였다 (Figure 2). 플라스미드 pSCHS6은 *E.coli* BL21 (DE3)에서 발현되었다.

#### 8. Protein concentration

단백질 농도는 standard로서 bovine serum albumin를 사용한 Bradford (1976)<sup>30</sup> 등의 방법에 의해 측정하였다. 흡광도 A<sub>280</sub>에서 측정하는 단백질의 농 도는 column fraction들을 분석하는데 고정적으로 사용되어진다.

#### 9. Enzyme assays

Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase의 활성은 HPLC에 의해 dTTP와 dTDP-D-glucose의 농도변화에 따라 측정된다. α-D-glucose-1-phosphate와 dTTP로 부터 dTDP-D-glucose를 형성하는 것을 확인하기 위해 standard protocol로 측정하 였다. Reaction mixtures는 15µmol Tris/HCl pH 8.0, 3.6µmol MgCl<sub>2</sub>, 7.2µmol D-glucose-1-phosphate, 1.8µmol dTT, 1.8 U inorganic pyrophosphatase와 적당 히 등분된 glucose-1-phosphate thymidylyltransferase (usually 30µl)를 최종 volume 300µl로 맞추고 37℃ 항온조에서 반응시킨다. 20분 간격으로 sample (30 µl)을 취하고 즉시 1.0ml 50mM potassium phosphate pH 3.0을 첨가하여 반응을 종결시킨다. 회석된 sample들을 HPLC에 의해 분석되어질때까지 4℃에 보관하고 integrated HPLC peak area로부터 형성되어진 dTDP-D-glucose의 양을 계산한다. enzyme activity의 1 unit는 standard assay condition에서 20분동안 1 nmol dTDP-D-glucose의 형성과 같고, specific activity는 1 milligram protein 당 1 units이다.

#### 10. HPLC Analysis

Guard column (CL-DOS guard column; SHIMADZU Co.)과 함께 설치된 Shim-Pack

CL-DOS (M) 8C column (4.6 x 150mm)을 HPLC로 사용한다. Sample 또는 standard solution을 column에 주입하고 200mM potassium phosphate pH 4.0와 함께 진행시 켰다. Flow rate는 1ml/min, 온도는 25℃, 유출물의 흡광도는 254nm이다.

# Over expression and purification of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase

pSCHS6으로 형질전환된 *E.coli* BL21 (DE3)을 Ampicillin (100μg/ml)을 첨가 한 LB broth (1L) 접종하여 37℃에서 OD600 값 0.4~0.6이 되도록 배양한 뒤, 0.1mM IPTG를 넣어준다. 25℃에서 10시간 동안 induction하고 10,000 x g 10분 동안 원 심분리하여 상층액은 버리고 차가운 20mM Tris/HCl (pH 8.0) + 1mM MgCl2 buffer 로 침전물을 두 번 washing하고 얼음 위에서 ultrasonicater를 이용하여 disruption 하였다. Cellular debris를 15,000 x g 30분 동안 원심분리하여 제거 하고, 상등액은 crude extract라고 하였다. Crude extract에 Ammonium sulfate powder를 35% saturation이 되도록 첨가하고 12,000 g x 1시간동안 원심분리하였 다. 상등액에 ammonium sulfate powder를 70% saturation이 되도록 넣어준 후, 원 심분리하여 침전물을 얻었다. 침전된 단백질을 적은 양의 50mM Potassium phosphate buffer (pH 8.0)에 녹이고, 동일한 buffer(200ml)로 ultramembrane filtration에 의해 두 차례 염을 제거해주고 6ml로 농축시켰다. 농축시킨 분획을 200mM KCl을 포함한 50mM Potassium phosphate (pH 8.0) buffer (Lysis buffer)로 전평형시킨 Ni-NTA slurry 3ml과 함께 200rpm rotary shaker를 사용하여 혼합하였 다 (4℃, 60분). 혼합액을 column (1 x 4 cm)에 적하하고 flow through 분획을 회 수하였다. Lysis buffer 8ml로 Washing 후, lysis buffer 80ml에 10mM~200mM imidazole의 농도구배를 주어 elution하고 각각의 분획을 회수하였다. 각 분획들 효소활성을 확인하고, 효소활성을 가진 150mM~200mM imidazole 분획들을 의 centricon (Amicon. Inc.)을 사용하여 농축하고, -80℃에 보관하였다.

#### 12. Molecular weight determination

Subunit 분자량과 효소 sample들의 순도는 β-galactosidase (116,000), bovine serum albumin (66,200), ovalbumin (45,000), lactate dehydrogenase (35,000), restriction endonuclease *Bsp*981 (25,000), β-lactoglobulin (18,400), lysozyme (14,400)을 standard로 하는 Laemmli (1970)에 의해 연구된 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 측정한다. Separating과 stacking gel은 각각 12%, 5% polyacrylamide로 한다.

#### 13. Substrate and inhibitor specificity

정제된 효소의 다양한 nucleoside triphosphates (2.0mM)와 sugar-1-phosphates (6.0mM)의 정반응, nucleoside sugars (2.0mM)와 pyrophosphate (6.0mM) 역반응의 효기질 특이성은 inorganic pyrophosphatase가 생략된 standard assay system을 사용하여 조사하였다. Inhibition 반응은 2mM, 5mM 억제 농도 (ATP, CTP, GTP, UTP, TTP, TDP, TMP)로 수행하였다.

#### III. Results and Discussion

# Cloning of deoxysugar biosynthetic gene cluster of *Streptomyces* sp. SCC-2136

Streptomyces sp. SCC-2136의 genomic library는 probe인 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase에 의해 deoxysugars의 생합성 유전자 집단을 스크리닝 하였다.<sup>(11)</sup> 스크린된 cosmid library의 2000개 이상의 클론들 중에서 pSCC1을 가지고 있는 10 개의 클론들을 hybridization 하였다. Cosmid pSCC1은 deoxysugar를 합성하는 9개 의 ORFs와 polyketide synthase를 합성하는 몇 개의 ORFs의 존재를 확인하기 위해 서열화 되었다. dTDP-D-glucose synthase를 암호화하는 *schS6*은 database로부터 추론된 아미노산 서열의 비교를 통해 cluster에 위치함을 알게 되었다.

#### 2. Sequence analysis

유전자 *schS6*은 1.06kb이고, *Streptomyces*의 특정인 70% G+C를 포함한 ATG와 TGA 종결 코돈을 가지고 있으며 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase (*schS5*)와 C-glycosyl transferase (*schS7*)의 옆에 위치한다. 종결 코돈은 *schS5*의 개시 코 돈과 중복된다. 비교를 통해 *Streptomyces fradiea* (D-olivose/L-rhodinose 생합 성)의 UrdG, *Streptomyces cyanogenus* (D-olivose/L-rhodinose 생합성)의 LanG, *Streptomyces* sp. AM-7161 (medermycin 생합성)의 Med-ORF1-18과 *Streptomyces violaceoruber* Tü22 (D-olivose/L-rhodinose 생합성)의 Gra-orf16 서열들이 각각 74%, 69%, 64%,와 58%의 동일성을 보임을 알 수 있다. Multiple alignments는 TTP 결합 도메인 <sup>8</sup>GGSGTR<sup>13</sup>과 glucose 결합 부위인 <sup>157</sup>EKP<sup>160</sup>의 보호된 N-terminal triphosphate를 보여준다 (Figure. 4).

#### 3. Over expression of schS6 in E.coli.

schS6-inserted pET32a+를 사용한 과발현 플라스미드 pSCHS6을 구축하였고 발 현 숙주로는 *E.coli* BL21 (DE3)를 사용하였다. 형질전환된 *E.coli* BL21 (DE3)/pSCHS6의 cultivation과 induction 결과로 56.100 Dalton 단백질이 생산되 었다 (Figure. 6). 이 단백질 band는 induction 시간을 10시간 연장함으로써 intensify 되었다. 그 분자량은 SchS6 단백질의 예보된 분자량 (56,100 Da)과 일 치하였다. *E.coli* system에서 *Streptomyces*로부터 클론된 많은 유전자의 High-level 발현은 종종 불용성 단백질이 매우 조밀하게 모여진 inclusion bodies 를 형성하게 한다 (Schein and Noteborn, 1988; Kil and Chang, 1998). 보통 배양 온도 (37℃)에서 E.coli의 schS6 과발현은 inclusion body를 형성하게 한다. 발현 된 단백질의 가용성은 cultivation 온도를 25℃로 낮춰줌으로써 증가된다.

# 4. Purification and Physical characterization of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase

Cell Free extract의 과발현된 단백질은 ammonium sulfate fractionation과 Ni-affinity column chromatography를 통해 4.7배 정제되었고 17.5%의 yield를 보 였다 (Table. 1). Ni-affinity column chromatography step에서 coincidental elution 단계 단백질의 효소활성은 Figure. 5에 나타내었다. 정제된 효소의 specific activity는 80.1 units/mg 이다. 단백질은 분자량 약 56kDa의 single protein band로 SDS-PAGE 상에서 볼 수 있다.

# 5. Substrate and inhibitor specificity of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase

정반응으로 다양한 nocleotide triphosphates와 sugar-1-phosphates, 역반응 으로 nucleosid diphosphate sugars로 정제된 효소의 substrate specificity를 조 사하였다. 정반응은 dTTP와 α-D-glucose-1-phosphate의 반응에서 가장 높은 활성 을 얻었다 (Table. 3). Subsrates UTP/α-D-glucose-1-phosphate의 반응에서 12% 의 relative activity를 얻었다. 역반응에서 정제된 효소는 dTDP-D-glucose 와 pyrophosphate에서 가장 높은 활성을 보였고, GTP-D-glucose 와 pyrophosphate에 서 2%의 relative activity를 얻었다.



Figure. 1 Structure of Sch 47554 and Sch 47555



Figure. 2 Amplification and cloning strategy of *schS6* into pET32a+ for the expression plasmid pSCHS6

(B: BamHI; E: EcoRI)

1	-	GTGGTGGCGGCACTGGAACAGCTCCGCTGAACCGCCAAGGCCCCGACGCCCGAGGCACGA - 6	50
61	-	ACGCCCGGAGCACGACGAGAAAAGGCATGCACACGTGAATCGAGAGGACTCCTCATGAAG - 1	L20
		МК	
121	_	CCCCTTCTCCTCCCACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC	180
101			200
1 9 1	_		240
TOT			210
0.4.1			
241	-	GACCTGGGCGTCACCGACATCGGCGTCATCGTCGGCCACCGGGGCCCGGAGATCGACGCC - 3	300
		D L G V T D I G V I V G H R G P E I D A	
301	-	GCCCTCGGTGACGGCTCCCGTTTCGGCGTGAAACTCACCTACATCTCCCAGGACGCCCCG - 3	360
		A L G D G S R F G V K L T Y I S Q D A P	
361	-	CGCGGCCTCGCCCACACGGTGGCCATCGCCCGGGACTTCCTCGGCGACGACGACTTCGTG - 4	120
		R G L A H T V A I A R D F L G D D F V	
421	_	ATGTACCTGGGCGACAACGTGCTGCCCGAGGGCGTCGCCGCCGACGAGGAGTTCACG - 4	180
		M Y L G D N V L P E G V A A T A E E F T	
481	_	GCCCGGCGTCCGGCCGCGCGGGAGATCGTGGTCCACAGGGTGACCGACC	540
101			
541	_		500
JII			100
C 0 1			~ ~ ~
601	-	CGCAGCGACATGGCGATGGTCGGCGTGTACTTCTTCACCTCGGCCATCCACCGGGCGGTG - 6	560
		R S D M A M V G V Y F F T S A I H R A V	
661	-	GACTCGATCGAGCCCAGCGCCCGTGGCGAGCTGGAGATCACGGACGCCATCCAGTGGCTG - 7	/20
		D S I E P S A R G E L E I T D A I Q W L	
721	-	CTGGCCTCCGGCGCCGAGGTCCGCGCCACCCAGTACGGCGGCTACTGGAAGGACGCCGGG - 7	780
		L A S G A E V R A T Q Y G G Y W K D A G	
781	-	AACGTCGAGGACGTCCTGGACTGCAACCGCTACCTCCTGGACCGGCTGGCGCCGTCCGT	340
		N V E D V L D C N R Y L L D R L A P S V	
841	_	GAGGGTGACGTCGACGACCTCAGCGAGCTGCTGGGCGCGGTCGTCGTCGAGGCGGGGGGGG	€00
		EGDVDDLSELLGAVVVEAGA	
901	_	CGCGTGACACGGTCGCGCATCGAGGGGCCCGGTGATCATCGGGGCGGGGGGGG	960
201			
961	_		1020
901			1020
1001			1 0 0 0
1021	-	GTGGAGAACTCCATCGCCCTCGACGAGGCCTCGGTCAGCGGCGTCAAGGGCCTGCGCAGT - 1	1080
		V E N S I A L D E A S V S G V K G L R S	
1081	-	TCGCTGATCGGGCGGTCCGCCTCGGTCGGCACCAGTGAGCAGGGCGTCGACCGGTACCGG – 1	1140
		S L I G R S A S V G T S E Q G V D R Y R	
1141	-	CTGGTCGTCGGAGACCACACCCGAGTGGAGGTCACGGCA <b>TGA</b> GGATCCTCGTCACCGGAG - 1	L200
		L V V G D H T R V E V T A *	
1201	_	CGGCCGGCTTCATCGGCTCCCACTTCGTGCGCAACGTGCTGGAGGGCTCGTACAGCGGGT - 1	L260
1261	_	GGGAGGACGCGCAGG - 1275	
		G R T R R	

Figure. 3 Complimentary neocleotide sequence of s*chS6* and its deduced amino acid sequence. The start and stop codons are shown in bold letters. Numbers at right and left indicate nucleotide numbers in

the 5'-3' direction.



Figure. 4 Multiple sequence alignments of the SchS6 with known glucose-1-phosphate thymidyltransferases from databank (NCBI).

UrdG from S. fradiae (AF164960), LanG from S. cyanogenus

(AF080235), Med-ORF1-30 from S. sp. AM-7161 (AB103463),

Gra-orf16 from S. violaceoruber Tu22 (AJ011500) and MtmD from S.

argillaceus (Y10907). The TTP binding Ndomain GGXGXR and central

glucose-1-phospahe binding site EKP are enclosed into boxes.

Table 1. Purification scheme for glucose-1-phosphate thymidylyltransferase from *Streptomyces* sp. SCC-2136

Purification	Total protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	3532.5	59390	17	100	1
Ammonium sulfate	1150.4	29333	25	49	1.5
Ni-affinity	129.8	10397	80.1	17.5	4.7



Figure. 5 Ni-affinity column chromatogram of glucose-1-phosphate thymidylyltransferase : Pooled enzyme from ammonium sulfate fractionation step was fractionated on a column of Ni-Affinity (1 x 4 cm)



Figure. 6 Purification fractions and molecular weight determination of the expressed schS6 by SDS-PAGE : Lane 1/6, SDS-PAGE standard; Lane 2/3, E. coli BL21 (DE3) pSCHS6 strain (control/induction); Lane 4, Supernatant of whole cell lysate (=cell

free extract); Lane 5, Ni-affinity column chromatography.

# Table 2. Activity of glucose-1-phosphate thymidylyltransferasewith various nucleotides

Nucleotidee	Relative activity (%)			
	2mM	5mM		
dTTP	100	100		
ATP	79	60		
CTP	79	59		
GTP	88	56		
UTP	26	6		
dTMP	102	80		
dTDP	102	86		

\*Nuceotides were added to the standard forward reaction mixture

Table 3.	Substrate specificity of glucose-1-phosphate
	thymidylyltransferase

	Substrate A (2mM)	Substrate B (6mM)	Relative activity
Forward reaction	ATP	$\alpha$ -D-glucose-1-phosphate	0.01
	CTP	$\alpha$ -D-glucose-1-phosphate	0.012
	GTP	$\alpha$ -D-glucose-1-phosphate	⊲0.001
	dTTP	$\alpha$ -D-glucose-1-phosphate	1
	dTTP	$\alpha$ -D-galactose-1-phosphate	0.1
	dLLb	$\alpha$ -D-mannose-1-phosphate	0.11
	dTTP	$\alpha$ -D-glucosamine-1-phosphate	0.23
	UTP	$\alpha$ -D-glucose-1-phosphate	0.12
	UTP	$\alpha$ -D-galactose-1-phosphate	⊲0.001
	UTP	$\alpha$ -D-mannose-1-phosphate	⊲0.001
	UTP	$\alpha$ -D-glucosamine-1-phosphate	0.08
Reverse reaction	ADP-D-glucose	Pyrophosphate	⊲0.001
	CDP-D-glucose	Pyrophosphate	⊲0.001
	GDP-D-glucose	Pyrophosphate	0.02
	dTDP-D-glucose	Pyrophosphate	1
	UDP-D-glucose	Pyrophosphate	⊲0.001

### IV. Conclusion

발현벡터 pSCHS6은 *schS6* 유전자와 pET32a+를 포함한 pPSCC1의 PCR product (약 1.06kb)와 함께 구축하였다. Cosmid pSCC1은 deoxysugar를 합성하는 9개의 ORFs와 polyketide synthase를 합성하는 몇 개의 ORFs의 존재를 확인하기 위해 서 열화 되었고, dTDP-D-glucose synthase를 암호화하는 *schS6*은 database로부터 추 론된 아미노산 서열의 비교를 통해 cluster에 위치함을 알게 되었다.

형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3)/pSCHS6의 cultivation과 induction 결과로 56.100 Dalton 단백질이 생산되었다 (Figure. 6). 이 단백질 band는 induction 시 간을 10시간 연장함으로써 intensify 되었다. 그 분자량은 SchS6 단백질의 예보된 분자량 (56,100 Da)과 일치하였다.

발현된 단백질은 부분적으로 (약 15%) cell lysate에서 가용화 되어있고, 발 현된 단백질의 대부분은 insoluble form으로 존재한다. Cell free extract에서 발 현된 단백질은 ammonium sulfate fractionation 과 Ni-affinity column chromatography를 통해 4.7배 정제되었고 17.5%의 yield를 보였다. 단백질은 SDS-PAGE 상에서 분자량 약 56kDa의 single protein band로 나타난다.

Glucose-1-phosphate thymidylyltransferase 의 Substrate 와 inhibitor specificity는 정반응에서 dTTP 와 α-D-glucose-1-phosphate의 반응이 가장 높 은 활성을 나타내었고, substrates UTP/α-D-glucose-1-phosphate로 부터 약 12% 활성을 보였다. 정제된 단백질은 역반응에서 dTDP-D-glucose 와 pyrophosphate가 매우 specific 하였다.

## V. References

- 1. Alexander, C., Weymouth-wilson. (1997) The role of carbohydrates in biologically active natural products. *Nat. Pro. Rep.* 14, 99-110.
- Chu, M., Yarborough, R., Schwartz, J., Patel, M. G., Horan A. C., Gullo V. P., Das P. R., and Puar M. S. (1992). Sch 47554 and Sch 47555, two Novel Antifungal Antibiotics Produced from A *Streptomyces* sp., *The Journal of antibiotics*. 46. 861-865.
- Maharjan, J.,K.,H., C.,C., G.,J., J.,J., C., andSohng, J. K. (2003). Functional identification of *rub52* gene involved in the biosynthesis of rubradirin, *Biotech. Lett.* 25, 909-915.
- Liru, W., Robert, L. W., and Leo, C. V. Biosynthesis of the dideoxysugar component of jadomycin B: genes in the *jad* cluster of *Streptomyces venezuelae* ISP5230 for L-digitoxose assembly and transfer to the angucycline aglycone. (2002). *Microbiology*. 148. 1091-1103.
- 5. Hoffmeister, D., Ichinose, K., Domann, S., Faust, B., Trefzer, A., Drager, G., Kirschning, A., Fischer, C., Kunzel, E., Bearden, D. W., Rohr, J., and Bechthold, A. The NDP-sugar co-substrate and concentration the enzyme expression level influence the substrate specificity of glycosyltransferases: cloning and characterization of deoxysugar biosynthetic genes of the urdamycin biosynthetic gene cluster. (2000). Chemistry & Biology. 7. 821-83.
- Chena, S., Jeffrey, Robertsa, B., Xueb, Y., Sherman D. H., Reynoldsa K., A., The *Streptomyces venezuelae* pikAV gene contains a transcription unit essential for expression of enzymes involved in glycosylation of narbonolide and 10- deoxymethynolide. (2001). *Gene.* 263. 255-264.
- Westrich, L., Domann, S., Faust, B., Bedford, D., Hopwood, D. A., and Bechthold, A. Cloning and characterization of a gene cluster from *Streptomyces cyanogenus* S136 probably involved in landomycin biosynthesis (1999). *FEMS Microbiology Letters*. 170. 381-387
- 8. Sohng, J. K., Oh, T. J. and Kim, C. H. (1998). Method for cloning biosynthetic genes of secondary metabolites including deoxysugar

from actinomycetes. J. Biochem. Mol. Biol. 31. 484-491

- Sambrook, J. and Russell, D.W, (2001). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kieser, T., Mervyn, J. B., Mark, B. J., Keith, C. F., and Hopwood,
  D. A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation Norwich, U. K.
- Decker, H., Gaisser, S., Pelzer, S., Schneider, P., Westrich, L., Wohlleben, W. and Bechthold, A. (1996). A general approach for cloning and characterizing dNDP-glucose dehydratase genes from actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 141. 195-201.
- Cho, S. S., Choi, J. H., Kim, S. J., Lee, O. H., Sohng, D. H., Sthapit, B., and Yoo, J. C. (2002). Molecular Cloning and Identification of Deoxysugar Biosynthetic Genes of Aculose and Amicetose Moieties of Sch 47555 & 47554 from Streptomyces sp. SCC-2136. *Microbiological Society* of Korea.
- Kessler, A. C., Haase, A., and Reeves, P. R. (1993) Molecular analysis of the 3,6-dideoxyhexose pathway genes of Yersinia pseudotuberculosis serogroup IIA. J. Bacteri. 175, 1412-1422.
- 14. Krugel, H., Schumann, S., Hanel, F., and Fiedler, G. (1993) Nucleotide sequence analysis of five putative *Streptomyces* griceus genes, one of which compliments and early function in daunorubicin biosynthesis that is linked to a putative gene cluster involved in TDP-daunosamine formation. *Mol. Gen. Genet.* 24, 193-202.
- 15. Simone, Z., Davide, Z., Camillo, R., Laura, S., Michela, T., and Martino, B. (2001) Kinetic and crystallographic analyses support a sequential-ordered Bi Bi catalytic mechanism for *Escherichia coli* glucose-1-phosphate thymidylyltransferase. J. Mol. Biol. 313, 831-843.
- 16. Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Allende, N., Rodriguez, L., Brana, A. F., Mendez, C., and Salas, J. A. (2000) Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces* antibioticus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1266-1275.
- 17. Floss, H. G. and Beale, J. M. (1989) Biosynthesis of the macrolide

antibiotics. Angewandte Chemie 28, 146-177.

- Vara, J. A. and Hutchinson, C. R. (1988) Purification of hymidinediphospho-D-glucose 4,6-dehydratase from an erythromycin producing strain of Saccharoployspora erythrea by high resolution liquid chromatography. *J. Biol. Chem.* 263, 14992-14995.
- Yoo, J. C., Choi, J. Y., Yun, S. C., Kim, C. G., Lee, J. J., Kim, S. B., and Sohng, J. K. (2000) Sequence analysis and expression of *rubN2* as dTDP-glucose 4,6-dehydratase gene cloned from *Streptomyces achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061, rubradirin producer. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 4, 313-321.
- Bechhold, A., Sohng, J. K., Smith, T. M., Chu, X., and Floss, H. G. (1995) Identification of *Streptomyces violeceoruber* Tu22 genes involved in the biosynthesis of granaticin. *Mol. Gen. Genet*. 248, 610-620.
- 21. Lombo, F., Siems, K., Brana, A. F., Mandez, C., Bindseil, K., and Salas, J. A. (1997) Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* 179, 3354-3357.
- 22. Jiand, X. -M., Neal, B., Santiago, F., Lee, S. J., Romana, I. K., and Reeves, P. R (1991) Structure and sequence of the rfe (O-antigen) gene cluster of *Salmonella serovar* typhymurium (stain LT2). *Mol. Microbial.* 5, 695-713.
- Pissowotzki, K., Mansouri, K., and Piepersberg, W. (1991) Genetics of streptomycin production in *Streptomyces griseus*: molecular structure and putative function of genes str ELMB2N. *Mol. Gen. Genet.* 231, 113-123.
- Merson-Davies, L. A. and Cundliffe, E. (1994) Analysis of five tylosin biosynthesis genes from the *tylI*BA region of the *streptomyces fradiae* genome. *Mol. Microbiol.* 13, 349-355.
- 25. Marolda, C.L. and Valvono, M. A. (1995) Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis of the *E. coli* Vw187 (07: K1) *rfb* gene cluster: identification of functional homologs of *rfb*B and *rfb*A in the *rff* cluster and correct location of the *rff*E gene. *J. Bacteriol.* 177, 5539-5546.

- Sohng, J. K., Oh, T. J., and Kim, C.H. (1998) Method for cloning biosynthetic genes of secondary metabolites including deoxysugar from actinomycetes. J. Biochem. Mol. Biol. 31, 484-491.
- 27. Lindquist, L., Kaiser, R., Reeves, P. R., and Lindberg, A. A. (1993) Purification, characterization and HPLC assay of *Salmonella* glucose-1-phosphate thymidylyltransferase from the cloned *rfb*A gene. *Eur. J. Biochem.* 211, 763-770.
- 28. Yoo, J. C., Lee, E. H., Han, J. M., Bang, H. J., and Sohng, J. K. (1999) Expression of orf (ch1D) as glucose-1-phosphate thymidylyltransferase gene involved in olivose biosynthesis from *Streptomyces antibioticus* Tu99 and biochemical properties of the expressed protein. J. Biochem. Mol. Biol. 32, 363-369.
- Yoo, J. C., Lee, H. C., Sohng, J. K., Kim, H. J., Nam, D. H., Han, J. M., Cho, S. S., Choi, J. H. (2003) Cloning and Expression of the Glucose-1-Phosphate Thymidylyltransferase Gene (*gerD*) from *Streptomyces* sp. GERI-155. *Mol. Cells.* 2. 274-280.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle pf protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 31. D. A. Hopwood (1997) Chem. Rev. 97:2456
- 32. Waksman. S. A (1940) Antagonistic interrelationships among microorganisms. *Chronica Botanica on Microorganisms* 6: 145-148
- Cross, T. (1982) Actinomycetes: A continuing soure of new metabolites. Developments in Idustrial Microbiology 23: 1-18
- 34. Lancini, G, and F. Parenti: Antibiotics, An integrated view, Springer-Verlag (1982)