

결핵균 Adenylate Kinase 돌연변이 유전자와 Human Muscle-type Adenylate Kinase 합성 유전자를 형질전환한 BCG의 성장속도 변화 유무 조사

대한결핵협회 결핵연구원¹, 한양대학교 과학기술대학 생화학과²

이승헌¹, 김효준², 박영길¹, 배길한¹

Investigation of the Growth Rate Change in Recombinant BCG which was cloned *Mycobacterium tuberculosis* Adenylate Kinase Mutation Gene or Human Muscle-type Adenylate Kinase Synthetic Gene.

Seung-Heon Lee¹, Hyo-Joon Kim², Young-Kil Park¹, Gill-Han Bai¹

¹Department of Molecular Biology, Korean Institute of Tuberculosis, Seoul, Korea ²Department of Biochemistry, Hanyang University College of Biotechnology, Ansan, Korea

Background : Normal cell proliferation and viability is strongly depends on the availability of metabolic energy and the maintenance of the appropriate adenylate-nucleotide pools. Hypothetically, changes in adenylate kinase (AK) expression could therefore be associated with adaptation to altered growth characteristics or inversely altered growth characteristics of proliferating cells could drive the changes in the metabolic profile. This study investigated whether the expression of either AK1 or a *Mycobacterium tuberculosis* adenylate kinase mutant which has the same catalytic activity of AK1 could affect the growth rate of slow-growing BCG.

Method : Recombinant BCGs, which were cloned the human muscle-type adenylate kinase synthetic gene (AK1) and adenylate kinase mutation gene (AKmtDM) of *Mycobacterium tuberculosis* into the *Mycobacterium/E.coli* expression vectors, were constructed. Recombinant BCGs and wild-type BCG were cultured in 7H9 media and the optical density at 600nm was measured at intervals of 2-3 days.

Result : There wasn't the growth rate change induced by AK1 or AKmtDM expression in recombinant BCGs.

Conclusion : The expression of AK1 or *Mycobacterium tuberculosis* adenylate kinase mutant in BCG does not affect the growth rate of BCG.

(*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 187-193)

Key words : Adenylate kinase, Mutation, Growth rate, BCG

서 론

Adenylate kinase (ATP:AMP phosphotransferase, myokinase, AK)는 에너지 대사와 nucleotide 합성에 관여하는 효소로서, 대부분의 생물체에 존재한다. 인산기 전이 반응 $AMP + ATP \leftrightarrow 2ADP$ 를 촉매하여 세포내 adenine nucleotide pool의 구성을 조절하며, 세포의 에너지 전하를 결정한다^{1,2}.

AK는 염기서열 비교에 의해 약 190 잔기로 이루어진 short variant와 LID domain을 보유하며 약 214-238 잔기로 이루어진 long variant로 분류된다. 일반적으로 진핵세포의 세포질내 효소는 short variant이며, bacteria, yeast, 미토콘드리아 AK는 long variant이다. 인체내 조직에는 5가지의 isoform이 존재하는데³, AK1과 AK5는 short variant로 세포질에 존재하며⁴, 미토콘드리아에 존재하는 AK2와 AK3⁵, 그리고 AK4는 long variant이다. AK4의 세포내 위치는 아직 보고되고 있지 않다⁶.

X-ray crystallography에 의해 AK의 구조가 분석되었는데⁷⁻¹⁰, α/β global fold로 이루어진 3차 구조를 나타내며 몇 개의 α -helices로 둘러싸인 5개의 parallel β -sheet와 2개의 peripheral domain인 AMPbd와 LID로 구성되어 있다. 이들 AMPbd와 LID는 catalytic

Corresponding author : Gill-Han Bai

Address:

Korean Institute of Tuberculosis

14 Woomyundong, Socho-gu, Seoul, 137-140, Korea

Phone : +82-2-577-5766 Fax : +82-2-573-1914

E-mail : gbai@hotmail.com

Received : Nov. 2. 2005

Accepted : Jan. 27. 2006

cycle동안 mononucleotide와 trinucleotide를 분리하는데 중요한 기능을 한다¹¹. AMPbd는 2개의 helices(α 2와 β 3)로 구성되어 있고, LID domain은 short variant에서는 다양한 loop로 이루어져 있으며 long variant에서는 four-stranded anti-parallel sheet로 이루어져 있다. LID domain의 길이와 구조는 두 variant에서의 주요 차이점이다.

진핵 생물의 세포질내 효소인 AK1은 AK 종류 중 가장 두드러진 효소로서 뇌, 심장과 골격근육 같은 고 에너지 소모가 요구되는 조직에서 발현된다^{12,13}. 마우스 모델을 이용하여 AK1 유전자를 knock-out 시킴으로써 AK1에 의해 촉매된 인산기 전이 반응이 이들 조직에 있어서 세포내 에너지 유지에 필수적인 것을 증명하였고, 더구나 골격 근육과 심장에 있어서는 AK1 기능 저하는 대사성 스트레스(metabolic stress)에 대한 tolerance 감소를 유발한다고 보고되었다^{13,14}.

Mycobacterium tuberculosis adenylate kinase-(AKmt)는 다른 미생물의 long variant AK와는 달리 진핵생물의 AK1과 유사한 short variant로서 181개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으나 *E.coli*의 AK(AKe)에 비해 촉매 활성도가 1/3 정도, 진핵세포의 AK1에 비해 촉매 활성도가 1/10 정도로 보고되었다. 52 종류의 서로 다른 AK의 염기서열을 비교한 결과에서는 *M. tuberculosis*의 AK가 기존의 bacteria에 존재하는 long variant AK와는 다른 short variant로서 분류하였다^{15,16}.

정상적인 세포의 증식과 생존력은 물질대사 에너지의 유용성과 적절한 adenylate-nucleotide pools의 유지에 매우 밀접하게 의존한다. AK 발현의 변화는 변화된 성장 특성에 대한 적응과 연관될 수 있거나 반대로 증식하는 세포의 변화된 성장 특성으로 인하여 물질대사 특성 내에서 어떤 변화를 이끌어 낼 수 있다고 추측되었다. 현재 결핵 백신으로서 이용되고 있는 BCG는 성장주기가 24 시간인 매우 느린 균으로 대량 배양을 위해서는 보통 2 개월이라는 긴 기간이 소요된다. 또한 계대를 거듭할수록 성장상태가 악화되는 단점을 나타낸다. 본 실험에서는 BCG의 성장주기를 개선할 목적으로 결핵균의 에너지 대사에 관여하는 유전자중 mammalian cell과 기능적으로 다른 차이를

나타내는 AK를 선정하였고, 성장 속도가 매우 느린 BCG에 human AK1의 촉매 활성도와 유사하도록 *M. tuberculosis* AK (AKmt)유전자의 ATPbd와 LID domain을 돌연변이하여 제조한 유전자와 human muscle-type AK 합성 유전자를 각각 *Mycobacterium/E.coli* 발현벡터에 재조합하여 형질전환함으로써 성장 속도에 변화가 있는지를 검토하여 성장 촉진을 유도하는 BCG 개량형을 제조하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사용한 균주 및 플라스미드

클로닝에 사용된 숙주세포로는 *E.coli* EZ cell (QIAGEN, German)을 이용하였고, PCR 산물 클로닝을 위한 플라스미드로는 pDrive T-vector (QIAGEN, German)을 사용하였다.

BCG내에서의 발현 벡터로는 shuttle 플라스미드인 pEM과 pMV261을 사용하였고, 균주로는 *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P₂를 사용하였다.

결핵균 adenylate kinase 돌연변이 유전자(pAKmtDM)와 human muscle-type adenylate kinase 합성 유전자(pAK)는 한양대학교 생화학과 면역학 실험실에서 분양받았다.

2. 사용한 배지와 배양조건

E.coli 배양을 위해서는 LB (Luria-Bertani : 1% Bacto-trypton, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl) 혹은 LB 고체배지(LB + 2% Bacto-agar)를 사용하였다.

BCG 배양을 위해서는 10% OADC enrichment (Difco, MD, USA), 0.05% Tween80을 포함하는 7H9 액체배지(Difco, MD, USA)와 10% OADC enrichment, 0.2% glycerol을 포함하는 7H11 고체배지(Difco, MD, USA)를 사용하였다.

사용한 배지들은 37°C에서 배양하였고, 항생제로는 ampicillin (100 μ g/ml)과 kanamycin (25 μ g/ml 혹은 50 μ g/ml)을 사용하였다.

Table 1. Primers for cloning

Protein	Sequence
Adenylate kinase mutant (AKmtDM)	5' CACGGATTGGCCAGCGTGAGAGTT 3' Bal I
	5' GCTTGGCTGCAGCTACTTTCCAG 3' Pst I
Human muscle-type adenylate kinase (AK1)	5' AGGGTAGGATCCATGGAAGAGAAG 3' BamHI
	5' GGCATCCATATGCTATTATTTCCAG 3' Nde I

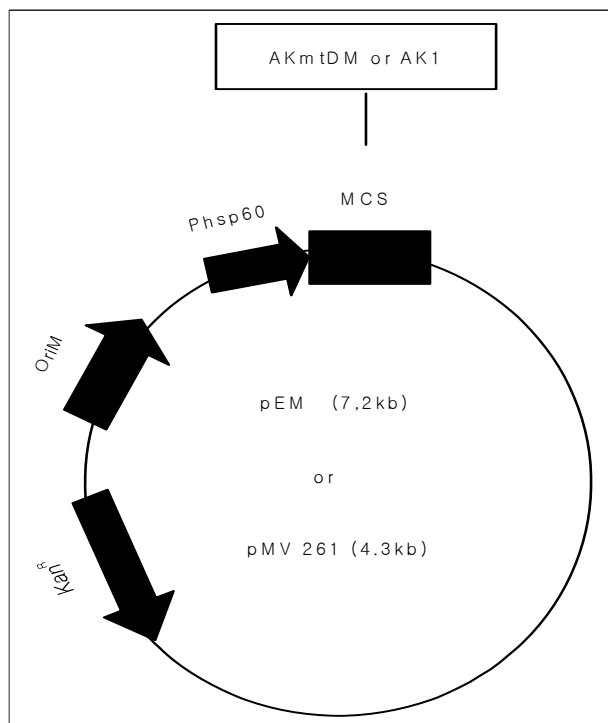


Figure 1. Construction of recombinant plasmids.
 Kan^R : Tn903 derived *aph* gene conferring kanamycin resistance as a selectable marker.
 OriM : The origin of mycobacterial replication derived from pAL5000.
 Phsp60 : Mycobacterial promoter derived from regulatory sequences of a BCG heat shock protein, *hsp60*.
 MCS : Multiple cloning sites.

3. 결핵균 adenylate kinase 돌연변이 유전자(pAKmtDM)와 human muscle-type adenylate kinase 합성 유전자(pAK)의 클로닝

pAKmtDM와 pAK를 주형으로 클로닝에 이용할 제한효소 염기서열이 삽입된 primer(Table 1)들을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물들을 1.5% 아가로스 겔에 전기영동한 후 GeneClean kit를 사용하여

gel elution을 하였다. 얻어진 4 μ l DNA, 1 μ l pDrive T-vector와 5 μ l 2 x ligation mixture를 혼합하고 16°C에서 16 시간동안 ligation하여 *E.coli* EZ cell에 42°C에서 heat-shock 방법으로 형질전환하였다. X-gal (40 μ g/ml)과 IPTG (40 μ g/ml)가 포함된 LB 고체배지(100 μ g/ml ampicillin)에서 배양된 균 집락 중 흰색 균 집락만을 선별하고 재조합 플라스미드들을 분리한 후 염기서열분석법을 이용하여 염기서열을 확인하였다. 확인된 형질전환체들에서 재조합 플라스미드를 분리한 후 각각의 제한효소를 이용하여 삽입된 DNA를 gel elution 방법으로 분리하고, 동일한 제한효소로 절단된 *Mycobacterium/E.coli* 발현벡터 pEM과 pMV261에 ligation하여 *E.coli* EZ cell에 형질전환하였다. LB 고체배지(50 μ g/ml kanamycin)에서 배양된 균 집락에서 재조합 플라스미드를 분리한 후 클로닝에 사용된 제한효소로 절단하여 형질전환체를 선별하였다(pMVAKmtDM, pEMAK1)(Fig. 1).

4. 재조합 BCG 제조

멸균된 증류수와 10% glycerol로 세척하여 만든 BCG competent cell에 재조합 플라스미드를 1 μ g 첨가하고 Gene Pulser electroporator (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 electroporation (25 μ F, 6250 V/cm³)한 후 1 ml 7H9 액체배지를 첨가하여 37°C에서 16 시간 배양하였다. 배양한 균액을 7H11 고체배지(kanamycin 25 μ g/ml)에 분주하고 37°C에서 3-4 주간 배양하여 재조합 균체들을 선별하였다. 이들 재조합 균체들을 7H9 액체배지(kanamycin 25 μ g/ml)에 접종하고, 37°C에서 3 주간 배양하여 플라스미드를 분리하였다. 배양된 균액을 10,000 rpm에 원심분리하여

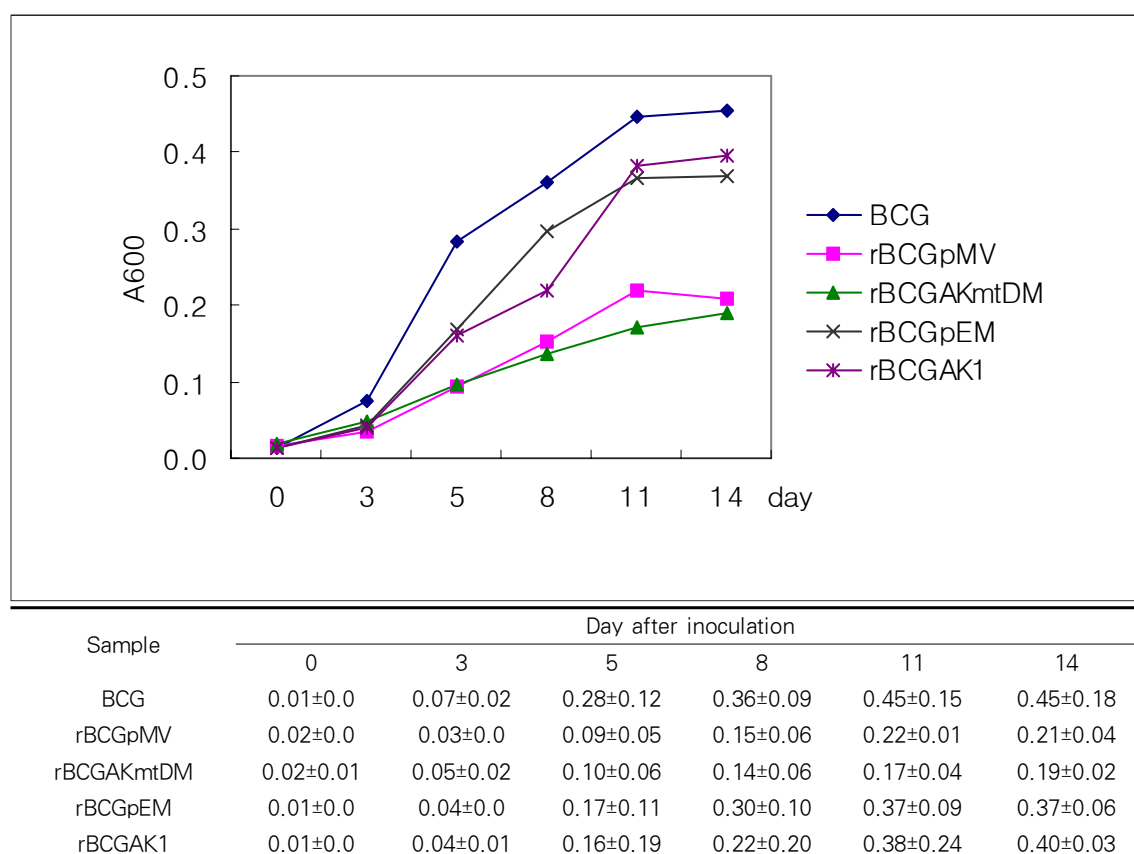


Figure 2. Growth curve of recombinant BCGs and values of optical density at 600nm. Data represent the mean of triplicate values \pm standard error of the mean.

얻은 균체에 400 μ l GTE (Glucose-Tris-EDTA, 20 mg lysozyme)으로 재부유하고, 37°C에서 3 시간 처리한 후, 300 μ l lysis sol (2.5% SDS, 0.3 N NaOH)을 첨가하여 5 분간 처리하고 250 μ l solIII (3 M Potassium acetate, pH 5.2)를 첨가하여 혼합한 뒤, 12,000 rpm으로 30 분간 원심분리한 후 상등액을 수거하고 isopropanol을 동량으로 넣고 섞어준 뒤 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하여 침전시켰다. 침전물을 건조하여 멸균된 증류수에 녹이고 4°C에 보관하여 사용하였다. 분리한 플라스미드를 다시 *E.coli* EZ cell에 형질전환하여 자란 균체에서 플라스미드를 분리하고 제한효소와 염기서열분석법을 이용하여 형질전환체(rBCGAKmtDM, rBCGAK1)를 확인하였다.

5. 재조합 BCG의 성장 특성 조사

7H11 고체배지에서 배양한 하나의 콜로니를 7H9

액체배지에 접종하여 37°C에서 3-4 주간 배양한 후, 다시 7H9 액체배지 50 ml에 일정량($A_{600}=0.01-0.02$)을 접종한 후 37°C에서 현탁 배양하면서 2-3 일 간격으로 600nm (A_{600} , absorbance) 값을 측정하였다. 재조합 BCG인 경우 kanamycin 25 μ g/ml 되게 첨가하였다.

결 과

Human AK1의 촉매 활성도와 유사하도록 결핵균 AK (AKmt)유전자의 ATPbd와 LID domain을 돌연변이하여 제조한 유전자를 클로닝(pMVAKmtDM)한 재조합 BCG (rBCGAKmtDM)와 human muscle-type adenylate kinase 합성 유전자를 클로닝(pEMAK1)한 재조합 BCG (rBCGAK1)에서 플라스미드를 분리하고 염기서열분석을 하여 open reading frame에 제대로 삽입되었음을 확인하였다.

이들 재조합 BCG와 BCG Pasteur 1173P₂ (wild-

type)를 7H9 액체배지에 접종하고 3-4 주간 배양한 후 모든 균 액들이 일정한 A_{600} 값이 되도록 희석하여 확인하고 일정량을 다시 7H9 액체배지에 접종하고 배양하면서 2-3 일 간격으로 A_{600} 값을 측정하여 재조합 BCG의 성장특성의 변화 유무를 확인하였다.

성장 곡선 그래프를 이용하여 성장특성의 변화를 확인한 결과에서는 모든 재조합 BCG의 성장이 BCG에 비해 억제되는 양상을 나타내었다(Fig. 2).

고 찰

생체내 에너지 대사와 nucleotide 합성에 관여하는 효소로서 adenylate kinase (AK)는 세포내 adenine nucleotide pool의 구성을 조절하며, 세포의 에너지 전하를 결정한다. 또한 이러한 기능들은 세포의 증식과 생존력에 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되어 왔다.

결핵균 AK (AKmt)는 다른 bacteria의 AK에 비하여 매우 짧은 LID domain으로 이루어져 있으며 열안정성이 높고 진핵세포의 AK1에 비해 촉매 활성도가 10 배 낮고, 대장균의 AK에 비해 3 배 낮은 것으로 보고되었다^{15,16}. 이전 연구에서는 활성이 낮은 AKmt와 AK1 family의 활성에 관련된 ATPbd와 lid domain의 아미노산 서열을 비교하여 높은 상동성을 나타내는 영역에서 극성이 다른 아미노산(Ala¹¹, Glu¹²²)이 포함되어 있는 것을 확인하였고, AKmt의 ATPbd에 속하는 Ala¹¹과 lid domain에 속하는 Glu¹²²를 AK1과 동일하게 serine과 lysine으로 변형시킨 유전자에 대한 재조합 단백질이 AK1과 유사한 효소 촉매능을 회복함을 보고하였으며, 또한 각 domain에 대한 단일 돌연변이체에 대한 촉매능은 AKmt와 유사한 것으로 보고하였다¹⁷.

본 실험은 결핵균의 성장 속도가 늦은 이유가 mammalian cell이나 대장균에 비해 결핵균 AK의 매우 낮은 활성도에 의한 것이라는 추측으로부터 AK1과 유사한 촉매능을 나타내는 AKmt 돌연변이 유전자와 human muscle-type AK 합성 유전자(AK1)를 각각 *Mycobacterium/E.coli* 발현벡터에 재조합하여 성장 속도가 매우 느린 BCG에 형질전환함으로써 성장 속도에 변화가 있는지를 확인하여 성장 촉진을 유도하

는 BCG 개량형을 제조하고자 하였다.

균의 성장 측정은 탁도 측정의 변형으로 600nm에서의 흡광도 값을 측정하였다. 일정량의 균 액을 액체배지에 접종하여 2-3 일 간격으로 A_{600} 값을 측정함으로써 성장 속도의 변화를 관찰한 결과에서는 AK 유전자를 재조합한 어떠한 재조합 BCG도 BCG에 비해 성장 속도가 증가되지 않았고 오히려 감소되는 양상을 나타내었다. BCG와 rBCGAK1의 경우 유사한 성장 곡선 유형을 나타내고 있으나, 벡터만 형질전환된 rBCGpEM과도 유사한 경향을 나타내어 AK1 단백질이 실제로 성장 속도의 변화에는 관여하지 않는 것으로 판단되었으며, 약간의 감소 경향은 항생제에 의해 야기되는 현상일 것으로 판단되었다. 그러나, BCG와 rBCGAKmtDM을 비교해보며, rBCGAKmtDM의 성장은 BCG에 비해 현저히 감소된 것으로 나타났다. 이전 실험에서 AKmtDM의 활성이 AK1과 유사함을 증명하여서¹⁷ 이러한 결과는 AKmtDM에 의한 것이 아닐 것으로 판단하였고, 오히려 발현벡터의 차이에서 나타난 현상이 아닐까하는 추측을 하였다.

Bruin 등은 서로 다른 성장 속도를 나타내는 두 개의 세포(mouse neuroblastoma N2a cell - 2 hr, human colon carcinoma SW480 cell - 20 hr)에 AK1을 과발현하여 세포 성장에서의 AK1 관여 여부를 확인하고자 하였으나, 여러 실험들(glucose deprivation, galactose feeding, metabolic inhibitor test)을 통하여 AK1이 세포들의 성장 변화에 관여하지 않는다고 보고하였다¹⁸. 본 실험에서도 성장 속도가 제일 느린 mycobacteria를 모델로 결핵균 AK를 변이시켜 활성을 높인 유전자와 AK1 유전자를 재조합하여 발현을 하였으나 성장 속도에는 변화가 없는 것으로 나타나 단지 성장곡선으로 판단한 실험일지라도 Bruin 등의 보고와 유사한 결과를 추론할 수 있었고, AK 활성증가로 nucleotide pool의 활용 효율이 증대되고 대사 에너지인 ATP 공급이 신속히 이루어질 수 있더라도 세포 증식에는 큰 영향은 미치지 않음을 확인하였다.

결핵균의 생체 내에서의 생존에 대한 AK의 역할은 정확하게 규명된 것이 없다. 단지 구조적 측면에서의 매우 낮은 활성도로 인한 영양소 결핍 환경에서의 생존 가능성 제시와 *Pseudomonas aeruginosa*의 경우

ATP가 존재한 상태에서 AK가 대식세포(macrophage)의 사멸을 유도하는 독성인자의 역할을 한다는 보고가 있을 뿐이다⁹. 좀 더 세밀한 결핵균 AK의 역할을 확인하기 위해서는 결핵균 계놈내의 AK 유전자와 본 실험에 사용한 유전자를 대체하거나 knock-out을 이용한 추가적인 연구를 통하여 규명할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

배 경 :

결핵균의 성장 속도가 늦은 이유가 mammalian cell이나 대장균에 비해 결핵균 AK의 매우 낮은 활성도에 의한 것이라는 추측으로부터 AK1과 유사한 촉매능을 나타내는 AKmt 돌연변이 유전자와 human muscle-type AK 합성 유전자(AK1)를 각각 *Mycobacterium/E.coli* 발현벡터에 재조합(pMVAKmtDM, pEMAK1)하여 성장 속도가 매우 느린 BCG에 형질 전환함으로써 이들 단백질들의 촉매능에 의한 성장 속도 변화가 일어나는지를 확인하고자 하였다.

방 법 :

Human AK1의 촉매 활성도와 유사하도록 결핵균 AK (AKmt)유전자의 ATPbd와 LID domain을 돌연변이하여 제조한 유전자(AKmtDM)와 human muscle-type adenylate kinase 합성 유전자(AK1)를 *Mycobacterium/E.coli* 발현벡터에 클로닝하여 재조합 BCG를 제조하였고, 이들 재조합 BCG와 BCG Pasteur 1173P₂ (wild-type)를 7H9 액체배지에 접종하여 2-3 일 간격으로 A₆₀₀ 값을 측정하였다.

결 과 :

재조합 BCG의 성장 속도는 Wild-type BCG의 성장 속도에 비해 변화가 없었다.

결 론 :

결핵균 adenylate kinase의 정확한 기능은 알 수 없으나, adenylate kinase의 촉매 활성도의 증가는 BCG의 성장 속도에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. Dzeja PP, Zeleznikar RJ, Goldberg ND. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol Cell Biochem* 1998;184:169-82.
2. Zeleznikar RJ, Dzeja PP, Goldberg ND. Adenylate kinase-catalyzed phosphoryl transfer couples ATP utilization with its generation by glycolysis in intact muscle. *J Biol Chem* 1995;270:7311-9.
3. van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogues by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol Ther* 2000;87:189-98.
4. van Rompay AR, Johansson M, Karlsson A. Identification of a novel human adenylate kinase: cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein. *Eur J Biochem* 1999;261:509-17.
5. Fukami-Kobayashi K, Nosaka M, Nakazawa A, Gō M. Ancient divergence of long and short isoforms of adenylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family. *FEBS Lett* 1996;385:214-20.
6. Yoneda T, Sato M, Maeda M, Takagi H. Identification of a novel adenylate kinase system in brain: cloning of the fourth adenylate kinase. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;62:187-95.
7. Müller CW, Schlauderer GJ, Reinstein J, Schultz GE. Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure* 1996;4:147-56.
8. Müller CW, Schultz GE. Structure of the complex of adenylate kinase from *Escherichia coli* with the inhibitor P1, P5-di(adenosine-5')-pentaphosphate. *J Mol Biol* 1988;202:909-12.
9. Abele U, Schulz GE. High-resolution structures of adenylate kinase from yeast ligated with inhibitor Ap5A, showing the pathway of phosphoryl transfer. *Protein Sci* 1995;4:1262-71.
10. Wild K, Grafmüller R, Wagner E, Schulz GE. Structure, catalysis and supramolecular assembly of adenylate kinase from maize. *Eur J Biochem* 1997;250:326-31.
11. Yan H, Tsai MD. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1999;73:103-34.

12. Inouye S, Yamada Y, Miura K, Suzuki H, Kawata K, Shinoda K, et al. Distribution and developmental changes of adenylate kinase isozymes in the rat brain: localization of adenylate kinase 1 in the olfactory bulb. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:618-22.
 13. Janssen E, Dzeja PP, Oerlemans F, Simonetti AW, Heerschap A, de Haan A, et al. Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement. *EMBO J* 2000;19:6371-81.
 14. Pucar D, Janssen E, Dzeja PP, Juranic N, Macura S, Wieringa B, et al. Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress. *J Biol Chem* 2000;275:41424-9.
 15. Miron S, Munier-Lehmann H, Craescu CT. Structure and dynamic studies on ligand-free adenylate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* revealed a closed conformation that can be related to the reduced catalytic activity. *Biochemistry* 2004;43:67-77.
 16. Munier-Lehmann H, Burlacu-Miron S, Craescu CT, Mantsch HH, Schultz CP. A new subfamily of short bacterial adenylate kinases with the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme as a model: a predictive and experimental study. *Proteins* 1999;36:238-48.
 17. 이수현. 단백질 공학에 의해 활성이 강화된 mycobacterial adenylate kinase 변이체의 작성. 한양대학교 석사학위논문 2005.
 18. de Bruin W, Oerlemans F, Wieringa B. Adenylate kinase I does not affect cellular growth characteristics under normal and metabolic stress conditions. *Exp Cell Res* 2004;297:97-107.
 19. Markaryan A, Zaborina O, Punj V, Chakrabarty AM. Adenylate kinase as a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001;183:3345-52.
-