creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이학석사 학위논문

*Sephs1*과 *Sephs2*의 functional determinant 동정과 활성에 미치는 영향

2020 년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

최 종 은

*Sephs1*과 *Sephs2*의 functional determinant 동정과 활성에 미치는 영향

지도교수 이 병 재

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2019 년 12 월

서울대학교 대학원
생명과학부
최 종 은

한민국의 석사 학위논문을 인준함
2019 년 12 월

위 원 장 천 종 식 (인)

부위원장 이 병 재 (인)

위 원 김 진 홍 (인)

국 문 초 록

Selenophosphate Synthetase(SEPHS)는 selenide와 ATP를 매개체로 selenophosphate를 합성한다. SEPHS는 두 가지의 paralogue, Selenophosphate synthetase 1(SEPHS1)과 Selenophosphate synthetase2(SEPHS2)는 높은 서열유사성과 구조유사성을 띄지만 Sephs2만 selenophosphate를 biosynthesis(생합성)하고 Sephs1는 그렇지 못하다. 이 둘의 차이에는 catalytic domain에 존재하는 active site의 아미노산 차이에 따라 selenophosphate 합성 능력이 결정된다. SEPHS1과 SEPHS2가 공통으로 갖는 functional domain 안에서 특히 catalytic domain의 active site에서 차이를 나타내고, 이것이 곧 selenophosphate synthesis activity에 영향을 미친다. SEPHS1은 Thr 또는 Arg을 가지며, SEPHS2는 Sec이나 Cys를 가진다. 본 연구에서는 SEPHS1 Thr29 자리에 mutagenesis를 일으키고, 같은 위치의 SEPHS2의 Cys60자리에 mutagenesis를 일으켜 간접적으로 ATP hydrolysis를 통해 selenophosphate synthesis activity를 회복하는지 알아보려고 하였다. 그 결과, SEPHS1의 Thr29Cys는 ATP에서 AMP+Pi로 가수분해 되었고 더 나아가 selenide가 없는 배경에서도 AMP로 가수분해 하였다. SEPHS2 Cys60은 ATP에서 selenide를 넣어주었을때만 AMP로 가수분해 할 수 있었으며, SEPHS2의 Thr 돌연변이는 selenide와 상관없이 AMP로 가수

분해 하지 못하였다.

주요어 : Selenophosphate synthetase 1 (SEPHS1), Selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2), 셀레늄, Active site, ATP hydrolysis

학 번 : 2017-24567

목 차

I. 서론 ····· 1

II. 재료 및 방법 ····· 4

1. Vector construct ····· 4
2. Human SEPHS1과 SEPHS2의 과발현 ····· 6
3. Ni-affinity column chromatography ····· 7
4. SDS-PAGE ····· 9
5. Thin Layer Chromatography ····· 10

III. 결과 ····· 11

1. 재조합 단백질의 발현과 분리 ····· 11
2. Human SEPHS1과 SEPHS2의 효소 활성 ····· 19

IV. 고찰 ····· 21

V. Appendices ····· 23

Appendix 그림 1 ····· 23
Appendix 그림 2 ····· 24
Appendix 그림 3 ····· 25
Appendix 그림 4 ····· 26
Appendix 그림 5 ····· 27
Appendix 그림 6 ····· 28
Appendix 그림 7 ····· 29
Appendix 그림 8 ····· 30

VI. 참고문헌 ····· 32

Abstract 36

그 림 목 차

[그림 1] ····· 12
[그림 2] ····· 13
[그림 3] ····· 16
[그림 4] ····· 17
[그림 5] ····· 20

표 목 차

[표 1] ····· 5

I. 서 론

셀레늄은 필수 미량 원소로 유기체의 생명활동에 필수적이다. 셀레늄은 세포 안에서 셀레노시스틴 (selenocysteine; Sec)의 형태로 존재하며 단백질의 아미노산 서열에 추가 되는데, 이러한 단백질들을 selenoproteins 이라 부른다(Lee et al., 1996). Selenophosphate synthetase (SEPHS)는 무기 Selenium인 Selenide와 ATP를 기질로 이용하여 selenophosphate 합성하는 효소이다. 기존에 알려진 Selenocysteine 의 생합성 경로에 대한 연구에서, UGA가 종결코돈 대신에 Selenocysteine을 삽입시키고, 특별한 tRNA[Ser]Sec을 이용하여 진핵생물에서 Selenocysteine을 생합성한다고 알려졌다(Lee et al., 1989). 그 과정 중에 selenocysteine synthetase (SEPSECS)는 selenophosphate synthetase로부터 생성된 active selenium donor인 monoselenophosphate 전달받는 데 쓰인다(Xu et al., 2006).

SEPHS는 bacteria에서 처음 발견되었으며, 많은 eukaryote과 archaea에서도 관찰되었다 (Na et al., 2018). 원핵생물에서 SEPHS는 오직 하나의 type (SelD)으로만 존재하지만, 고등 진핵생물에서는 두 가지 isoform인 selenophosphate synthetase 1 (SEPHS1)과 selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2)가 발견되었다(Na et al., 2018). 두 가지의 isoform중, 오직 SEPHS2만 selenophosphate 생합성 과정에서 catalytic activity를 나타내

며 monoselenophosphate(SeP)를 생합성 할 수 있는 반면에, SEPHS1는 selenocysteine(Sec)생합성 능력은 보이지 않지만 세포의 생존에 필수적인 역할을 하는 단백질이라는 것이 제시되었다(Xu et al.,2007). 원핵생물의 박테리아에서 셀레노시스틴이 합성되기 위해서는 SelD (selenophosphate synthetase) 가 필요하는 것이 셀레늄단백질 합성 기능이 결여된 돌연변이와 ATP를 이용한 연구에서 밝혀졌다 (Leinfelder et al., 1990). 따라서, 박테리아의 SelD는 셀레늄단백질 합성에 필수적이다. SEPHS1과 SEPHS2은 높은 서열, 구조 유사성을 나타낸다. 특히, 여러 기능적 domain이 conserved(보존)되어있음이 나타났다(Na et al., 2018). *E.* coli SelD의 homolog인 진핵생물의 SEPHS2 catalytic domain에 Sec을 가지고 있으며 여러 종의 prokaryote에서 SelD homologue들은 SEPHS2의 active site에 존재하는 Sec 자리에 cysteine (Cys17)을 가지는 반면에 human SEPHS1과 Drosophila SEPHS1은 각각 같은 자리에 threonine(Thr)과 arginine(Arg)을 가진다 (Low et al., 1995). Phylogenetic analysis를 통해 봤을 때 원핵생물의 Cys17은 catalytic process에 중요한 역할을 나타내는 active site임이 밝혀졌다(Kim et al.,1992).

본 연구에서는 in vitro환경에서의 Sephs1과 Sephs2 생화학적 기능, 특히 선행 연구들에서 밝히지 못한 active site의 중요 아미노산에 따른 SeP 합성 능력, 즉 catalytic activity에 미치는 영향에 초점을 맞춰

Sephs1의 기능을 밝히고자 한다. 따라서, SEPHS1과 SEPHS2의 catalytic domain 활성 부위의 아미노산 mutagenesis를 통해 SeP 합성에 어떤 영향을 미쳤는지를 특히 E.coli SEPHS2의 Cys17에 해당되는 mouse SEPHS1의 Thr29를 Cysteine으로 치환한 mutant와 SEPHS2의 Cys를 Thr로 치환한 mutant들에 대하여 ATP의 2단계 가수분해 능력 즉 AMP 생성 능력을 통해 간접적으로 selenophosphate 합성 여부를 판단하려고 한다.

II. 재료 및 방법

1. Vector construct 제작

pET28a-Human(hSEPHS1)은 pET28a plasmid의 6X Histidine과 thrombin site를 제거하기 위해 carboxyl terminus의 NcoI site와 amino terminus의 XhoI site를 이용하여 절단조각을 제작하였다. hSEPHS1의 cDNA를 포함하는 plasmid로부터 PCR로 증폭된 NcoI-XhoI 절단 조각과 함께 carboxyl terminus에 6X Histidine tag을 함께 pET28a(+) plasmid에 삽입하였다. pET28a-Human(hSEPHS1) T29 는 Sephs1_NcoI_Fwd과 Sephs1_XhoI_Rev의 두 primer를 사용하였다. 또한, carboxyl terminus의 5'-ATGG-3'의 Guanine 염기 제거를 위해 Sephs1_NOATG_Fwd를 사용하여 in-frame reading을 유도하였다. pET28a-Human(hSEPHS1) Thr29Cys mutant의 catalytic domain Threonine29 코돈(ACA)을 Cys29코돈(TGC)으로 전환하기 위해서는 위의 primer 와 함께 Sephs1_Thr29Cys_Fwd와 Sephs1_Thr29Cys_Rev 을 사용하였다.

hSEPHS2는 NcoI-XhoI site에 human SEPHS2의 cDNA를 포함하는 plasmid로부터 PCR로 증폭된 NcoI-XhoI 절단 조각을 삽입함으로써 제작하였다. SEPHS2의 Cys60 은 Sephs2_NcoI_Fwd과 Sephs2_XhoI_Rev 을 사용하였다. pET28a-human SEPHS2 Cys60Thr의 catalytic domain

Cys60 코돈(TGC)을 Thr60 코돈(ACA)으로 치환하는 mutant를 제작하기 위해서는 위의 primer와 함께 Sephs2_C60T_Fwd와 Sephs2_C60T_Rev을 사용하였다. Full-length의 construct는 DH5a 균주에 transformation 하였다. 제작된 plasmid는 제한효소 분석을 통하여 확인하였고 DNA sequencing을 통해 서열을 확인하였다.

제작시 사용한 모든 primer는 표1과 같다.

표 1.

Primer	Sequence (5' -> 3')	Tm(°C)
Sephs1_NcoI_Fwd	AAACCATGGATGTCTACGCGGGAGTC	63
Sephs1_XhoI_Rev	TGGTGCTCGAGAGAGGTGGCCC	60
Sephs1_NOATG_Fwd	AAGGAGATATACCATGTCTACGCGGGAGTC	63
Sephs1_T29C_Fwd	CTGAACTGAAGGGCTGCGGCTGCAAAGTGCCCC	62
Sephs1_T29C_Rev	TGGGGCACTTTGCAGCCGCAGCCCTTCAGTTCAGT	65
Sephs2_NcoI_Fwd	AAACATGGCGGAACGCCTGCGGCG	62
Sephs2_XhoI_Rev	AAAGTGCTCGAGCGAGCTAGGCTCA	63
Sephs2_C60T_Fwd	GGCATGAAGGGCACAGGCTGCAAGGTC	57
Sephs2_C60T_Rev	GACCTTGCAGCCGTGTGCCCTTCATGCCG	62

2. Human SEPHS1과 SEPHS2의 과발현

pET28a-hSEPHS1 Thr29, Thr29Cys 그리고 hSEPHS2 Cys60과 Cys60Thr를 포함하는 대장균(BL21(DE3))를 37도의 Luria Broth(1% Tryptone, 0.5% NaCl, 1% Yeast Extract) 배지에서 37도, 250rpm 으로 키웠다. 흡광도 600이 0.6에 도달했을 때 0.1mM가 되도록 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 첨가해주었다. IPTG(Invitrogen) 첨가 후 대장균을 37도에서 4시간을 더 배양하였다. 4시간 후 원심분리에 의해 대장균을 회수하였다.

3. Ni-affinity column을 이용한 Chromatography

pET28a-hSEPHS1은 1mL(SEPHS1)의 Probond resin(Invitrogen)에 resin 부피의 2배의 binding buffer (20mM Tris-HCl(pH8.0), 500mM NaCl)를 넣고 천천히 흔들어 주었다. 약 5분정도 흔들어 준 후 500xg 이하의 속도로 원심분리를 하고 상층액을 따라서 버리고 resin에 다시 binding buffer를 넣는다. 위와 같은 과정을 3회 더 반복하였다. 활성화된 resin에 SEPHS1과 SEPHS2가 들어있는 용약을 각각 부은 후 4도에서 2시간동안 흔들어주었다. 결합이 끝난 후 이 혼합액을 10mL용량의 column에 천천히 부어주었다. 이때 혼합액을 부어주는 속도는 한시간에 resin 부피의 3-4배의 용액이 resin을 통과할 수 있도록 조절해주었다. 혼합액을 다 부어준 후 resin 부피의 10배(10mL/30mL)가 되도록 washing buffer 1 (200mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM NaCl, 20mM Immidazole)를 부어주었다. 그리고 다시 washing buffer 2 (200mM Tris-Cl (Cl, 20mM Tris-HCl(pH8.0)를 넣어주어 resin에 붙은 hSEPHS1과 SpH8.0), 500mM NaCl, 40mM Imidazole)를 부어주었다. 세척이 끝난 후 500ul의 Elution buffer(600mM Immidazole, 500mM NaEPHS2를 떼어낸다.

pET28a-hSEPHS2의 경우에는, 2mL(SEPHS2)의 Probond resin(Invitrogen)와 binding 하여 hSEPSH1과 동일한 방법으로 하고, wash buffer 2의 경우 (200mM Tris-Cl (pH8.0), 500mM NaCl, 60mM

Imidazole)로 세척한 후, 500ul Elution buffer로 resin에 붙은 hSEPHS2를 떼어내었다.

4. Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Stock solution을 만든 후 다음과 같은 조성에 의해 10%의 젤을 만들어서 Hoefer SE 250 mighty gel set 에 부어주었다. 이 때 bis-Acrylamide와 Ammonium persulfate는 넣은 뒤 빠르게 굳으므로, 넣어준 후 바로 gel set에 3/5만큼 부어준다. separating gel을 완전히 굳힌 뒤, stacking gel을 위에 넣어준다.

<u>Separating gel</u>

Water	2063ul
4X Lower buffer	1250ul
30% bis-Acrylamide (30:0:8)	1667ul
10% Ammonium persulfate	50ul
TEMED	5ul

<u>Stacking gel</u>

Water	1160ul
4X Lower buffer	500ul
30% bis-Acrylamide (30:0:8)	300ul
10% Ammonium persulfate	34ul
TEMED	2ul

Sample은 1X sample buffer와 섞어서 5분간 끓인 후 gel에 loading 하였다. 150V, 50mA(constant current)로 약 1시간 동안 전기영동 하였다.

5. Thin Layer Chromatography(TLC)

총 10ul의 혼합액에 40mM HEPES(pH 7.4), 20mM KCl, 10mM $MgCl_2$,5μCiof[α-^{32}P]ATP,그리고 10mM DTT와 0.3mg/ml의 효소 hSEPHS1 Thr29, Thr29Cys 과 hSEPHS2 Sec60Cys, Sec60Thr를 각각 넣어준 후 1시간 동안 37도에서 반응시켰다. 1시간 후, PEI-Cellulose TLC plate(Sigma)에 1ul씩 점을 찍듯이 loading 하였다. 0.8M LiCl로 TLC chamber 안에서 약 1시간 정도 running 시켜주었다. Running이 끝난 후 plate를 꺼내어 Biomolecular imager (FLA7000IP)에서 phosphorimaging 하였다.

III. 결 과

1. 재조합 단백질의 발현과 분리

1-1. 단백질 과발현

재조합 plasmid의 construction: pET28a-hSEPHS1과 pET28a-hSEPHS2는 pET28a의 NcoI 과 XhoI site에 PCR로 증폭된 human SEPHS1과 SEPHS2의 NcoI-XhoI 절단 조각을 삽입함으로써 제조하였다(Appendix 그림 5-8). 제작된 plasmid는 DNA를 추출하여 sequencing하여 의도했던 sequence가 맞는지 기존의 SEPHS1, SEPHS2 sequence와 alignment 하여 확인하였다 (Appendix 그림1-4). 그림. 1에서는 pET28a-hSEPHS1과 pET28a-hSEPH2를 발현시키기 위한 전략을 나타내었다. 그림. 2에서는 hSEPHS1과 hSEPHS2 각각 IPTG를 넣어주었을 때와 넣지 않았을 때의 발현 양상을 비교하였다. 각각을 대장균에 형질전환 시켜 발현시켰을 때 pET28a-hSEPHS1을 집어넣은 대장균에서는 약 39kDa의 단백질이 대량 발현되는 것을 관찰 할 수 있었고 (그림. 2A), hSEPHS2를 집어넣은 대장균에서는 약 49kDa의 단백질이 대량 발현 되는 것을 관찰하였다 (그림. 2B). 많은 경우 대장균에서 soluble fraction를 형성하였다. 이를 확인하기 위해 초음파분쇄기를 이용하여 세포를 분쇄하고 원심분리를 해서 상층액과 pellet을 SDS 폴리아클리아마이드 젤 전기영동으로 분석하여 보았다. 이 때 대부분의 발현단백질이 soluble fraction에 존재한다

는 것을 SDS를 통해 관찰하였다.

그림. 1

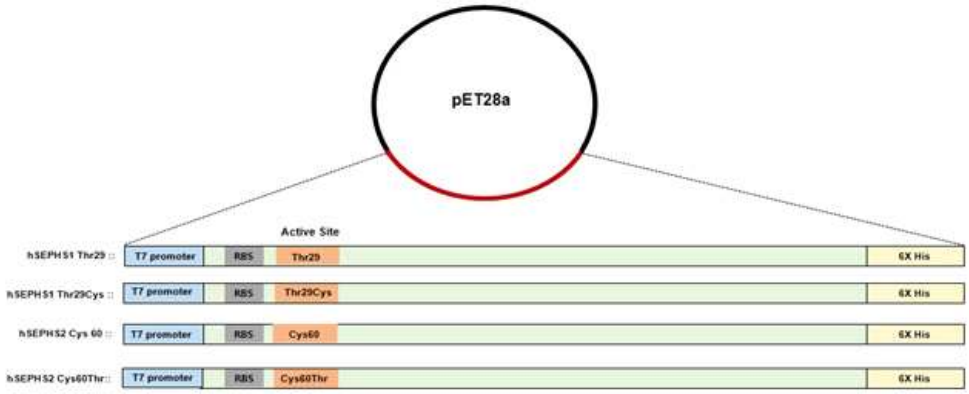
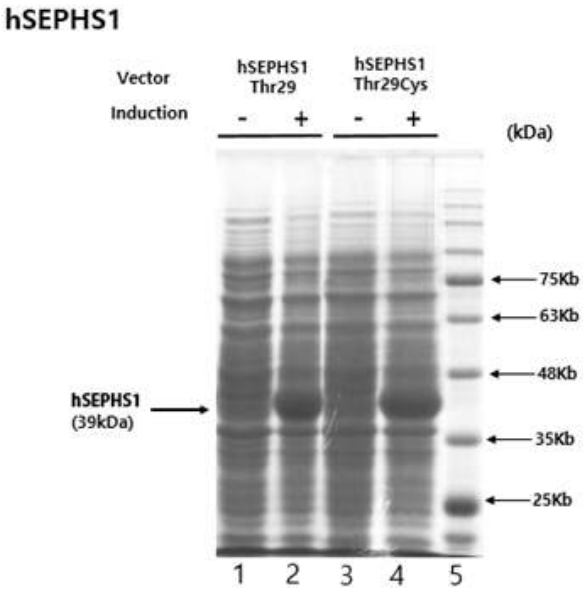


그림2. Strategy of pET28a-hSEPHS1 Thr29, pET28a-hSEPHS1 Thr29Cys, pET28a-hSEPHS2 Cys60, pET28a-hSEPHS2 Cys60Thr plasmids.

그림. 2

A


hSEPHS1
Vector
Induction
hSEPHS1 Thr29
hSEPHS1 Thr29Cys
- +
- +
(kDa)
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS1 (39kDa)
1 2 3 4 5

B

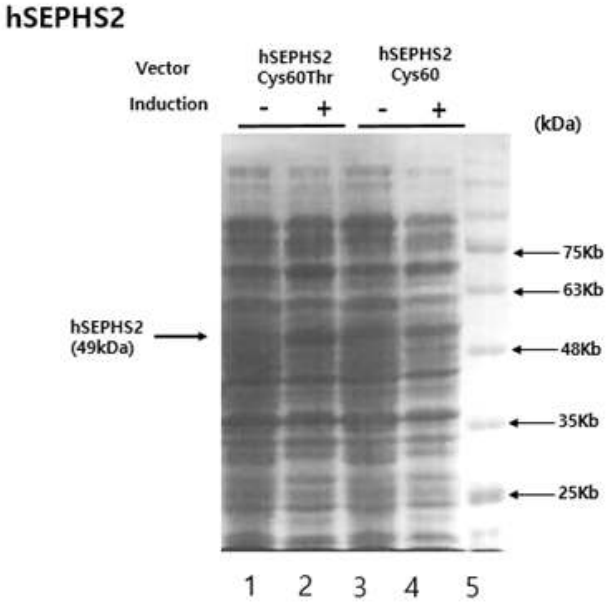

hSEPHS2
Vector
Induction
hSEPHS2 Cys60Thr
hSEPHS2 Cys60
- +
- +
(kDa)
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS2 (49kDa)
1 2 3 4 5

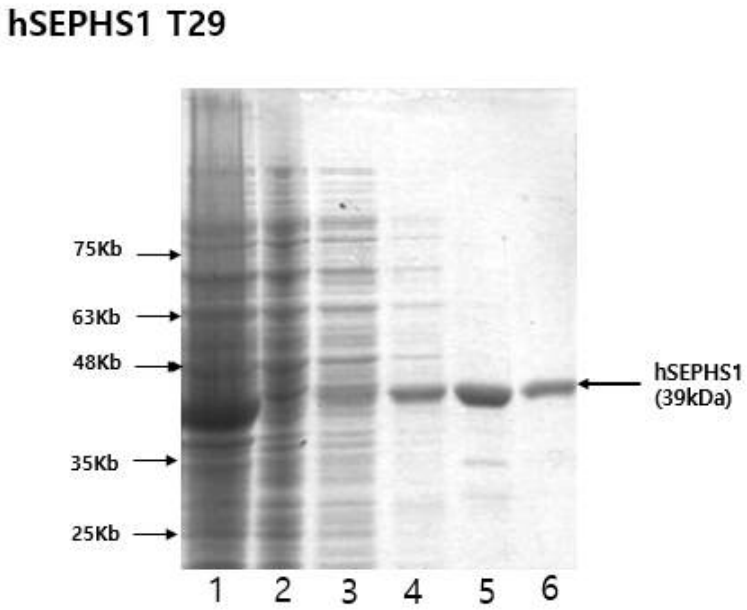
그림2. Overexpression of pET28a-hSEPHS1 and hSEPHS2. Total E. Coli extracts from 1ml culture were analyzed by 10& SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. Total proteins from the cells bearing pET28a-hSEPHS1 (lane 1, 2, 3, and 4) or pET28a-hSEPHS2 (lane1, 2, 3, and 4) were extracted just before (designated -; lanes 1 and 3) or four hours after (designated +; lanes 2 and 4) IPTG induction.

1-2. Nickel Agarose를 이용한 단백질 정제

Nickel Agarose(Probond)를 이용하여 SEPHS1(39kDa)과 SEPHS2 (49kDa)의 과발현 된 단백질을 정제하였다. Wash Buffer(20mM Immidazole)과 Elution Buffer(1M Immidazole)을 차례로 흘려주면서 마지막에 agarose bead에 붙어있는 단백질을 흘려주어 원하는 단백질을 얻어내었다(그림3-4).

그림. 3

A


hSEPHS1 T29
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS1
(39kDa)
1 2 3 4 5 6

B

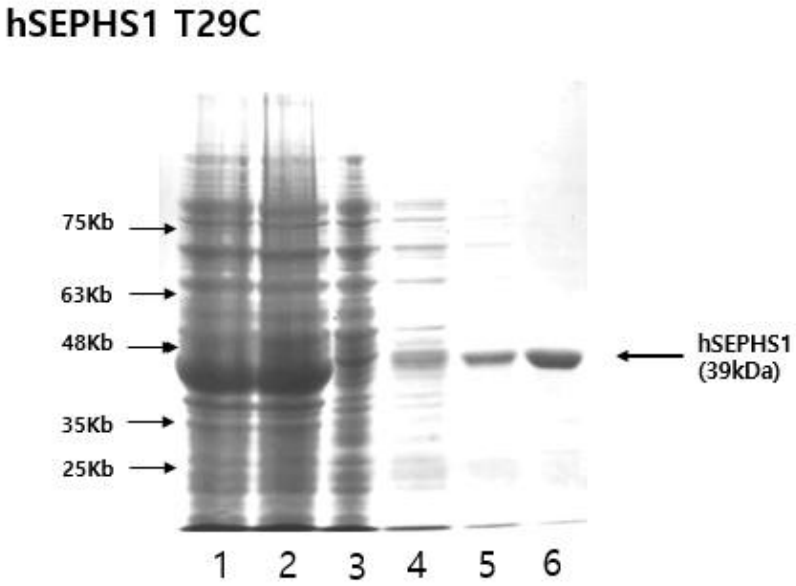
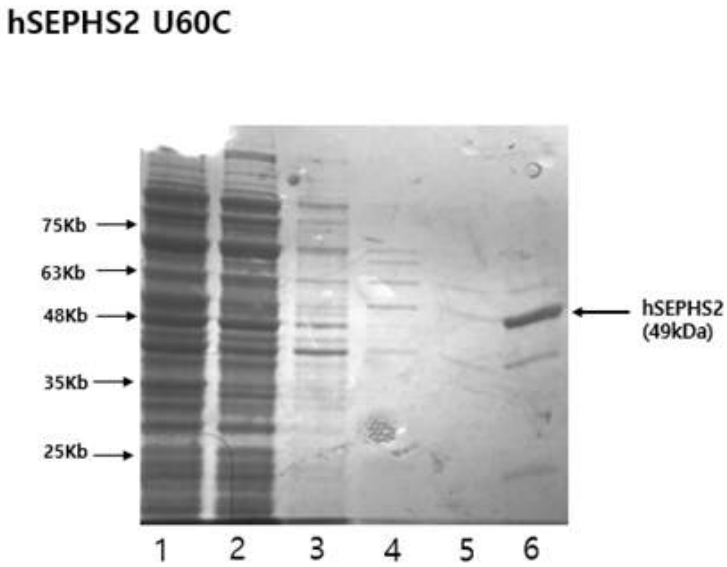

hSEPHS1 T29C
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS1
(39kDa)
1 2 3 4 5 6

그림. 4

A


hSEPHS2 U60C
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS2
(49kDa)
1
2
3
4
5
6

B

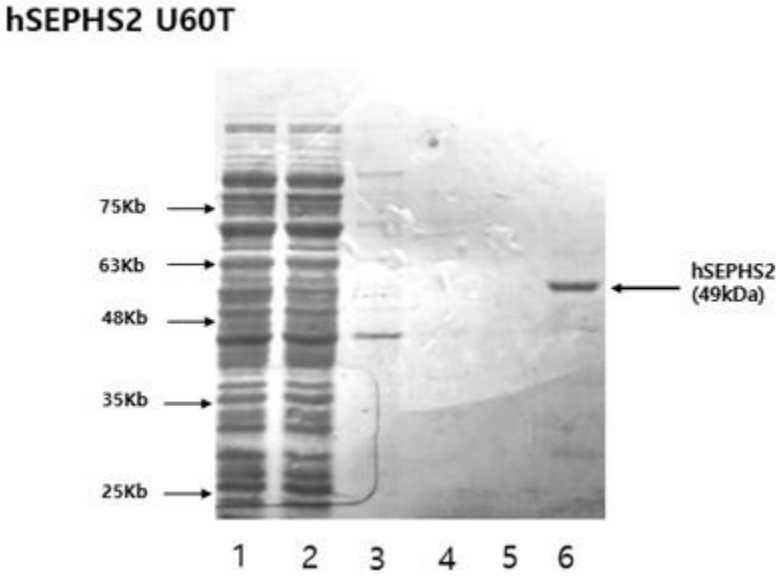

hSEPHS2 U60T
75Kb
63Kb
48Kb
35Kb
25Kb
hSEPHS2
(49kDa)
1
2
3
4
5
6

그림 4. Purification of expressed recombinant pET28a hSEPHS1 and hSEPSH2; Recovered from soluble fraction and loaded on nickel-affinity resin. After the flow-through fraction (FT, lane 2) was passed, the resin was washed several times with Wash Buffer (20mM Imidazole) (W1 and W2; lanes 3 and 4) and the bound hSEPHS1 and hSEPHS2 was eluted with 600mM Imidazole (E1 and E2; lanes 6 & 7) and analyzed by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis.

2. Human SEPHS1과 SEPHS2의 효소 활성

대장균에서 발현, 분리된 재조합 hSEPHS1과 hSEPHS2의 생물학적 활성을 비교하기 위해 Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용하여 조사하였다. SEPHS1은 wild type인 Thr29에서는 AMP로 가수분해 하지 못하며, Threonine을 Cysteine으로 치환한 mutant에서는 AMP 합성 능력이 생긴 것을 알 수 있었다. 더 나아가, Selenide가 결핍되어있는 조건에서도 AMP가 합성되는 것을 알 수 있었다. Cysteine을 가진 hSEPHS2는 Selenide가 있을 땐 Selenophosphate + AMP + Pi를 합성하며, selenophosphate를 생합성한다는 것이 밝혀진 바 있다. 하지만, 그림에서처럼 Selenide가 결핍된 상황에서는 AMP를 합성하지 못하였다. 또한, 본 실험에서 나온 결과가 효소에 대한 결과임을 입증하기 위해 control로 쓰인 빈 벡터(Mock Vector)에서는 ATP가 분해되지 않음을 알 수 있다.(그림. 5).

그림 5.

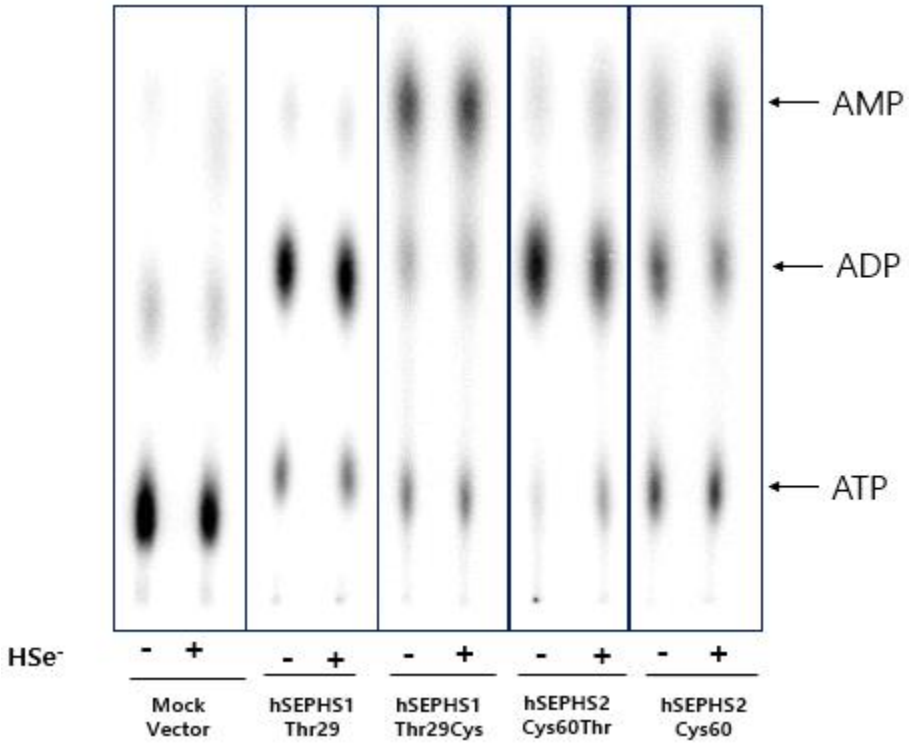


그림 5. ATP hydrolysis Assay; 10ul reaction with 40mM HEPES (pH7.4), 20mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 2.5uCi of [α-32P]ATP, and 10mM DTT, and either with or without 0.25mM selenide. After adding each selenophosphate synthetase protein, reactions were incubated at 37°C for 1 h under anaerobic conditions. Then 1ul of each reaction was loaded on to PEI TLC plates, the plates were run in 0.8M LiCl, and the developed TLC plates were exposed to a PhosphorImager screen.

IV. 고 찰

Selenophosphate synthetase (SEPHS)는 진핵생물에서 두 종류의 isoform으로 존재하며, Xu의 연구보고에 따르면, 오직 SEPH2만이 selenoprotein 생합성 능력을 나타내고 세포의 성장과 증식에 필수적이라는 연구결과가 있었다. 하지만, SEPHS1은 그러한 능력이 없고, redox homeostasis에 관여한다는 연구결과 있었다. SEPHS1이 결핍되면, 스트레스 관련 selenoprotein과 redox homesotasis 관련 유전자의 발현이 현저히 감소되며 hydrogen peroxide의 축적을 가져온다는 것이 밝혀졌었다.

Na의 연구보고에 의하면, SEPHS1과 SEPHS2 서열 분석 결과 conserved 된 domain이 발견되었고 특히 active site에서 *Sephs1*는 Arg, Thr을 가지며 *Sephs2*는 Sec자리에 Cys를 가지는 것이 밝혀졌다. 따라서 catalytic domain에 위치하고 있는 아미노산에 따라 효소 활성에 중요한 역할을 할 것으로 보여진다.

그림 7를 통해 ATP hydrolysis를 통해 간접적으로 효소의 SeP합성 능력을 조사해본 결과, *Sephs1*과 *Sephs2* 모두 1차 ATP 가수분해 (hydrolyze) 능력을 나타내어 ADP+Pi를 생성하지만, *Sephs2*과 같이 catalytic domain 에 Cys 또는 Sec이 존재하는 경우는 ADP가 더 분해되어 AMP+Pi으로 된다. 하지만, Thr으로 치환된 *Sephs2*는 AMP로 가

수분해 하지 못하였다. 따라서, human *Sephs2*가 Selenophosphate syntehtase로써 selenoprotein을 생합성하기 위해선, active site에 Cys가 필수적임을 알 수 있다.

더 나아가, *Sephs1*의 경우, wild type인 29번째 자리가 Threonine인 경우, AMP로 가수분해 하지 못하였으나, Cysteine으로 치환된 경우 AMP로 가수분해 할 수 있으며 놀랍게도 Selenide를 넣어주지 않은 환경에서도 AMP를 AMP로 가수분해 하는 능력이 있음을 확인했다.

본 연구를 통해 SEPHS1과 SEPHS2의 catalytic domain에 존재하는 아미노산의 중요성을 제시하였다. *Sephs1*의 Cysteine이 *Sephs2*에 미치는 영향이나 mutant들의 상호작용에 대해서 좀 더 조사가 필요하다. 예를 들어, *Sephs1*의 Thr29Cys mutant와 Sephs2 Cys60과 Cys60Thr의 상호작용을 TLC를 통해 조사하였을 때의 AMP 가수분해 능력을 볼 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 in vivo 조건에서 위의 mutant들을 처리하였을 때 나타나는 세포의 양상을 조사하고 어떠한 조절 기작을 통해 생합성에 관여하는지에 대한 조사가 필요하다. 더 나아가 SEPHS1의 다른 역할을 밝히기 위한 후속 연구가 필요할 것이다.

V. Appendices

Appendix 그림 1. SEPHS1 Thr29 Sequence

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2953 bits(1599)	0.0	1601/1602(99%)	0/1602(0%)	Plus/Plus

```
Query  4808  CGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCC  4867
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     CGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCC  60

Query  4868  GATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGG  4927
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGG  120

Query  4928  TGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAAT  4987
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   TGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAAT  180

Query  4988  ACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTT  5047
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   ACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTT  240

Query  5048  TAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGTCTACGCGGGAGTCCTTTAACCCGGAAAGTTACG  5107
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   TAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGTCTACGCGGGAGTCCTTTAACCCGGAAAGTTACG  300

Query  5108  AATTGGACAAAAGCTTCCGGCTAACCAGATTCACTGAACTGAAGGGCACAGGCTGCAAAG  5167
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   AATTGGACAAAAGCTTCCGGCTAACCAGATTCACTGAACTGAAGGGCACAGGCTGCAAAG  360

Query  5168  TGCCCCAAGATGTCCTGCAAAAATTGCTGGAATCTTTACAGGAGAACCACTTCCAAGAAG  5227
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   TGCCCCAAGATGTCCTGCAAAAATTGCTGGAATCTTTACAGGAGAACCACTTCCAAGAAG  420

Query  5228  ATGAGCAGTTTCTGGGAGCCGTTATGCCAAGGCTTGGCATTGGAATGGATACTTGTGTCA  5287
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   ATGAGCAGTTTCTGGGAGCCGTTATGCCAAGGCTTGGCATTGGAATGGATACTTGTGTCA  480

Query  5288  TTCCTTTGAGGCACGGTGGGCTTTCCTTGGTTCAAACCACAGATTACATTTACCCGATCG  5347
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   TTCCTTTGAGGCACGGTGGGCTTTCCTTGGTTCAAACCACAGATTACATTTACCCGATCG  540

Query  5348  TAGACGACCCTTACATGATGGGCAGGATAGCGTGTGCCAATGTCCTCAGTGACCTCTATG  5407
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   TAGACGACCCTTACATGATGGGCAGGATAGCGTGTGCCAATGTCCTCAGTGACCTCTATG  600

Query  5408  CAATGGGGGTCACGGAATGTGACAATATGCTGATGCTCCTTGGAGTCAGTAATAAAATGA  5467
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   CAATGGGGGTCACGGAATGTGACAATATGCTGATGCTCCTTGGAGTCAGTAATAAAATGA  660

Query  5468  CCGACAGGGAAAGGGATAAAGTGATGCCTCTGATTATCCAAGGTTTTAAAGACGCAGCTG  5527
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   CCGACAGGGAAAGGGATAAAGTGATGCCTCTGATTATCCAAGGTTTTAAAGACGCAGCTG  720

Query  5528  AGGAAGCAGGAACATCTGTAACAGGCGGCCAAACAGTACTAAACCCCTGGATTGTCCTGG  5587
             ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   AGGAAGCAGGAACGTCTGTAACAGGCGGCCAAACAGTACTAAACCCCTGGATTGTCCTGG  780

Query  5588  GAGGAGTGGCTACCACTGTCTGCCAACCCAATGAATTTATCATGCCAGACAATGCAGTGC  5647
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   GAGGAGTGGCTACCACTGTCTGCCAACCCAATGAATTTATCATGCCAGACAATGCAGTGC  840

Query  5648  CAGGGGACGTGCTGGTGCTGACAAAACCCCTGGGGACACAGGTGGCAGTGGCTGTGCACC  5707
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   CAGGGGACGTGCTGGTGCTGACAAAACCCCTGGGGACACAGGTGGCAGTGGCTGTGCACC  900

Query  5708  AGTGGCTGGATATCCCTGAGAAATGGAATAAGATTAAACTAGTGGTCACCCAAGAAGATG  5767
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   AGTGGCTGGATATCCCTGAGAAATGGAATAAGATTAAACTAGTGGTCACCCAAGAAGATG  960

Query  5768  TAGAGCTGGCCTACCAGGAGGCGATGATGAACATGGCGAGGCTCAACAGGACAGCTGCAG  5827
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   TAGAGCTGGCCTACCAGGAGGCGATGATGAACATGGCGAGGCTCAACAGGACAGCTGCAG  1020

Query  5828  GACTCATGCACACGTTCAATGCCCACGCCGCCACTGACATCACGGGCTTCGGGATTTTGG  5887
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GACTCATGCACACGTTCAATGCCCACGCCGCCACTGACATCACGGGCTTCGGGATTTTGG  1080

Query  5888  GCCATGCGCAGAACCTGGCCAAGCAGCAGAGGAACGAGGTGTCGTTTGTAATTCACAACC  5947
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  GCCATGCGCAGAACCTGGCCAAGCAGCAGAGGAACGAGGTGTCGTTTGTAATTCACAACC  1140
```

Appendix 그림 2. SEPHS1 Thr29Cys Sequence

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2916 bits(1579)	0.0	1587/1591(99%)	0/1591(0%)	Plus/Plus

```
Query  4819  ACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCA  4878
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCA  60

Query  4879  TCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCC  4938
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    TCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCC  120

Query  4939  ACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTA  4998
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   ACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTA  180

Query  4999  TAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA  5058
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   TAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA  240

Query  5059  AGGAGATATACCATGTCTACGCGGGAGTCCTTTAACCCGGAAAGTTACGAATTGGACAAA  5118
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   AGGAGATATACCATGTCTACGCGGGAGTCCTTTAACCCGGAAAGTTACGAATTGGACAAA  300

Query  5119  AGCTTCCGGCTAACCAGATTCACTGAACTGAAGGGCACAGGCTGCAAAGTGCCCCAAGAT  5178
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||
Sbjct  301   AGCTTCCGGCTAACCAGATTCACTGAACTGAAGGGCTGCGGCTGCAAAGTGCCCCAAGAT  360

Query  5179  GTCCTGCAAAAATTGCTGGAATCTTTACAGGAGAACCACTTCCAAGAAGATGAGCAGTTT  5238
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   GTCCTGCAAAAATTGCTGGAATCTTTACAGGAGAACCACTTCCAAGAAGATGAGCAGTTT  420

Query  5239  CTGGGAGCCGTTATGCCAAGGCTTGGCATTGGAATGGATACTTGTGTCATTCCTTTGAGG  5298
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   CTGGGAGCCGTTATGCCAAGGCTTGGCATTGGAATGGATACTTGTGTCATTCCTTTGAGG  480

Query  5299  CACGGTGGGCTTTCCTTGGTTCAAACCACAGATTACATTTACCCGATCGTAGACGACCCT  5358
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   CACGGTGGGCTTTCCTTGGTTCAAACCACAGATTACATTTACCCGATCGTAGACGACCCT  540

Query  5359  TACATGATGGGCAGGATAGCGTGTGCCAATGTCCTCAGTGACCTCTATGCAATGGGGGTC  5418
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   TACATGATGGGCAGGATAGCGTGTGCCAATGTCCTCAGTGACCTCTATGCAATGGGGGTC  600

Query  5419  ACGGAATGTGACAATATGCTGATGCTCCTTGGAGTCAGTAATAAAATGACCGACAGGGAA  5478
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   ACGGAATGTGACAATATGCTGATGCTCCTTGGAGTCAGTAATAAAATGACCGACAGGGAA  660

Query  5479  AGGGATAAAGTGATGCCTCTGATTATCCAAGGTTTTAAAGACGCAGCTGAGGAAGCAGGA  5538
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   AGGGATAAAGTGATGCCTCTGATTATCCAAGGTTTTAAAGACGCAGCTGAGGAAGCAGGA  720

Query  5539  ACATCTGTAACAGGCGGCCAAACAGTACTAAACCCCTGGATTGTCCTGGGAGGAGTGGCT  5598
             || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   ACGTCTGTAACAGGCGGCCAAACAGTACTAAACCCCTGGATTGTCCTGGGAGGAGTGGCT  780

Query  5599  ACCACTGTCTGCCAACCCAATGAATTTATCATGCCAGACAATGCAGTGCCAGGGGACGTG  5658
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   ACCACTGTCTGCCAACCCAATGAATTTATCATGCCAGACAATGCAGTGCCAGGGGACGTG  840

Query  5659  CTGGTGCTGACAAAACCCCTGGGGACACAGGTGGCAGTGGCTGTGCACCAGTGGCTGGAT  5718
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   CTGGTGCTGACAAAACCCCTGGGGACACAGGTGGCAGTGGCTGTGCACCAGTGGCTGGAT  900

Query  5719  ATCCCTGAGAAATGGAATAAGATTAAACTAGTGGTCACCCAAGAAGATGTAGAGCTGGCC  5778
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   ATCCCTGAGAAATGGAATAAGATTAAACTAGTGGTCACCCAAGAAGATGTAGAGCTGGCC  960

Query  5779  TACCAGGAGGCGATGATGAACATGGCGAGGCTCAACAGGACAGCTGCAGGACTCATGCAC  5838
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   TACCAGGAGGCGATGATGAACATGGCGAGGCTCAACAGGACAGCTGCAGGACTCATGCAC  1020

Query  5839  ACGTTCAATGCCCACGCCGCCACTGACATCACGGGCTTCGGGATTTTGGGCCATGCGCAG  5898
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  ACGTTCAATGCCCACGCCGCCACTGACATCACGGGCTTCGGGATTTTGGGCCATGCGCAG  1080

Query  5899  AACCTGGCCAAGCAGCAGAGGAACGAGGTGTCGTTTGTAATTCACAACCTCCCGGTGCTG  5958
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  AACCTGGCCAAGCAGCAGAGGAACGAGGTGTCGTTTGTAATTCACAACCTCCCGGTGCTG  1140
```

Appendix 그림 3. SEPHS2 Cys60 Sequence

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3267 bits(1769)	0.0	1771/1772(99%)	0/1772(0%)	Plus/Plus

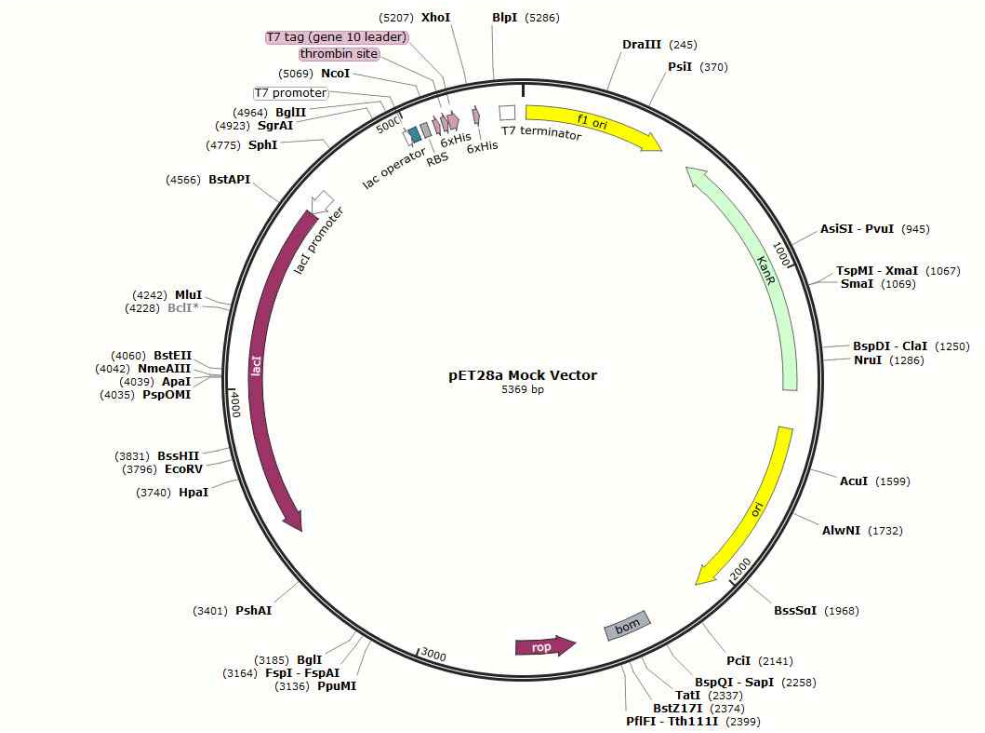
```
Query  4806  CACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGC  4865
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     CACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGC  60

Query  4866  CCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCC  4925
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    CCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCC  120

Query  4926  GGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTA  4985
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   GGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTA  180

Query  4986  ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG  5045
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   ATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG  240

Query  5046  TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCGGAAGCCTCGGCGACGGGCGCCTGCGGAGA  5105
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGCGGAAGCCTCGGCGACGGGCGCCTGCGGAGA  300

Query  5106  GGCGATGGCAGCGGGCGGAAGGCTCCTCGGGCCCGGCGGGCTTGACTCTGGGCCGGAGCTT  5165
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   GGCGATGGCAGCGGGCGGAAGGCTCCTCGGGCCCGGCGGGCTTGACTCTGGGCCGGAGCTT  360

Query  5166  CTCGAACTACCGGCCCTTCGAGCCCCAGGCGTTGGGCCTCAGCCCGAGCTGGCGGCTGAC  5225
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   CTCGAACTACCGGCCCTTCGAGCCCCAGGCGTTGGGCCTCAGCCCGAGCTGGCGGCTGAC  420

Query  5226  GGGCTTCTCCGGCATGAAGGGCTGAGGCTGCAAGGTCCCGCAGGAGGCGCTGCTCAAACT  5285
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   GGGCTTCTCCGGCATGAAGGGCTGCGGCTGCAAGGTCCCGCAGGAGGCGCTGCTCAAACT  480

Query  5286  CCTGGCGGGACTGACGCGGCCGGACGTGCGGCCCCCGCTGGGCCGGGGCCTGGTGGGTGG  5345
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   CCTGGCGGGACTGACGCGGCCGGACGTGCGGCCCCCGCTGGGCCGGGGCCTGGTGGGTGG  540

Query  5346  CCAGGAAGAGGCGTCCCAGGAAGCCGGCCTGCCGGCAGGAGCGGGCCCCAGCCCCACCTT  5405
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   CCAGGAAGAGGCGTCCCAGGAAGCCGGCCTGCCGGCAGGAGCGGGCCCCAGCCCCACCTT  600

Query  5406  TCCAGCCCTGGGCATCGGGATGGACTCCTGCGTCATCCCCCTGAGGCACGGGGGCCTGTC  5465
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   TCCAGCCCTGGGCATCGGGATGGACTCCTGCGTCATCCCCCTGAGGCACGGGGGCCTGTC  660

Query  5466  ACTGGTGCAGACCACGGACTTCTTTTACCCCTTGGTAGAAGATCCCTACATGATGGGGCG  5525
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   ACTGGTGCAGACCACGGACTTCTTTTACCCCTTGGTAGAAGATCCCTACATGATGGGGCG  720

Query  5526  CATAGCTTGTGCCAACGTGCTGAGTGACCTCTACGCCATGGGGATTACTGAATGTGACAA  5585
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   CATAGCTTGTGCCAACGTGCTGAGTGACCTCTACGCCATGGGGATTACTGAATGTGACAA  780

Query  5586  CATGTTGATGTTACTCAGCGTCAGCCAGAGTATGAGTGAGGAGGAACGCGAAAAGGTAAC  5645
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   CATGTTGATGTTACTCAGCGTCAGCCAGAGTATGAGTGAGGAGGAACGCGAAAAGGTAAC  840

Query  5646  GCCACTCATGGTCAAAGGCTTTCGGGATGCGGCTGAGGAAGGAGGGACGGCAGTGACCGG  5705
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   GCCACTCATGGTCAAAGGCTTTCGGGATGCGGCTGAGGAAGGAGGGACGGCAGTGACCGG  900

Query  5706  TGGGCAAACGGTGGTCAACCCTTGGATTATAATCGGTGGAGTTGCCACTGTAGTATGCCA  5765
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   TGGGCAAACGGTGGTCAACCCTTGGATTATAATCGGTGGAGTTGCCACTGTAGTATGCCA  960

Query  5766  ACCAAATGAGTTCATAATGCCGGACAGCGCCGTCGTTGGGGACGTGCTGGTGTTAACCAA  5825
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   ACCAAATGAGTTCATAATGCCGGACAGCGCCGTCGTTGGGGACGTGCTGGTGTTAACCAA  1020
```

Appendix 그림 4. SEPHS2 Cys60Thr Sequence

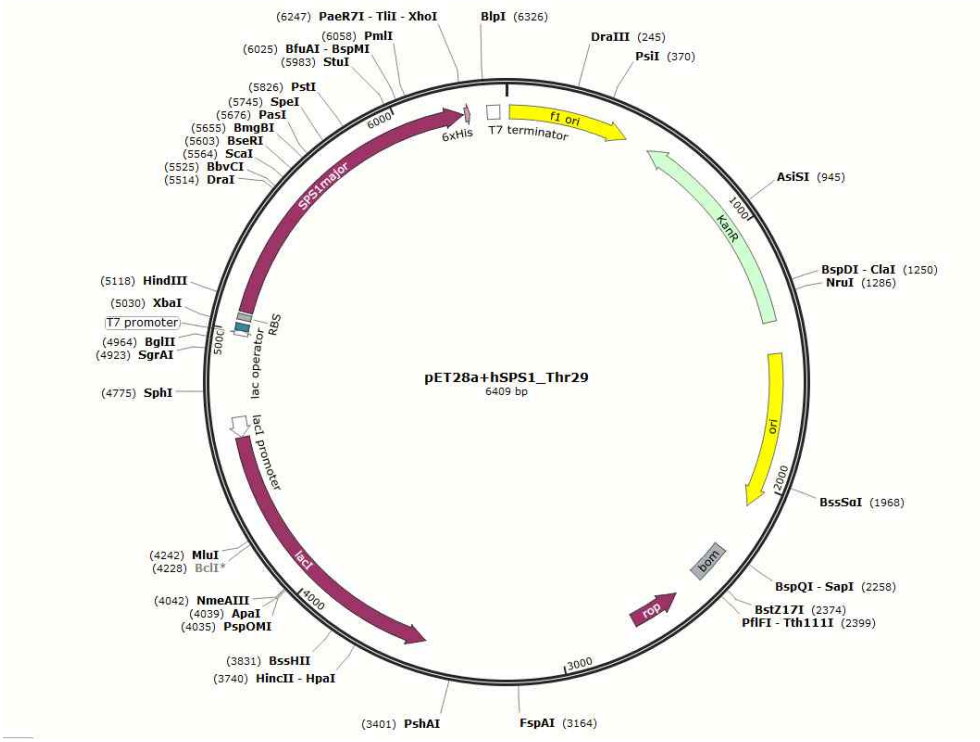
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3081 bits(1668)	0.0	1674/1677(99%)	0/1677(0%)	Plus/Plus

```
Query  4823  TACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGG  4882
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     TACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGG  60

Query  4883  TGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGA  4942
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    TGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGA  120

Query  4943  TGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG  5002
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   TGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG  180

Query  5003  GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA  5062
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA  240

Query  5063  GATATACCATGGCGGAAGCCTCGGCGACGGGCGCCTGCGGAGAGGCGATGGCAGCGGCGG  5122
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   GATATACCATGGCGGAAGCCTCGGCGACGGGCGCCTGCGGAGAGGCGATGGCAGCGGCGG  300

Query  5123  AAGGCTCCTCGGGCCCGGCGGGCTTGACTCTGGGCCGGAGCTTCTCGAACTACCGGCCCT  5182
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   AAGGCTCCTCGGGCCCGGCGGGCTTGACTCTGGGCCGGAGCTTCTCGAACTACCGGCCCT  360

Query  5183  TCGAGCCCCAGGCGTTGGGCCTCAGCCCGAGCTGGCGGCTGACGGGCTTCTCCGGCATGA  5242
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   TCGAGCCCCAGGCGTTGGGCCTCAGCCCGAGCTGGCGGCTGACGGGCTTCTCCGGCATGA  420

Query  5243  AGGGCTGAGGCTGCAAGGTCCCGCAGGAGGCGCTGCTCAAACTCCTGGCGGGACTGACGC  5302
             |||||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   AGGGCACAGGCTGCAAGGTCCCGCAGGAGGCGCTGCTCAAACTCCTGGCGGGACTGACGC  480

Query  5303  GGCCGGACGTGCGGCCCCCGCTGGGCCGGGGCCTGGTGGGTGGCCAGGAAGAGGCGTCCC  5362
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   GGCCGGACGTGCGGCCCCCGCTGGGCCGGGGCCTGGTGGGTGGCCAGGAAGAGGCGTCCC  540

Query  5363  AGGAAGCCGGCCTGCCGGCAGGAGCGGGCCCCAGCCCCACCTTTCCAGCCCTGGGCATCG  5422
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   AGGAAGCCGGCCTGCCGGCAGGAGCGGGCCCCAGCCCCACCTTTCCAGCCCTGGGCATCG  600

Query  5423  GGATGGACTCCTGCGTCATCCCCCTGAGGCACGGGGGCCTGTCACTGGTGCAGACCACGG  5482
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   GGATGGACTCCTGCGTCATCCCCCTGAGGCACGGGGGCCTGTCACTGGTGCAGACCACGG  660

Query  5483  ACTTCTTTTACCCCTTGGTAGAAGATCCCTACATGATGGGGCGCATAGCTTGTGCCAACG  5542
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   ACTTCTTTTACCCCTTGGTAGAAGATCCCTACATGATGGGGCGCATAGCTTGTGCCAACG  720

Query  5543  TGCTGAGTGACCTCTACGCCATGGGGATTACTGAATGTGACAACATGTTGATGTTACTCA  5602
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   TGCTGAGTGACCTCTACGCCATGGGGATTACTGAGTGTGACAACATGTTGATGTTACTCA  780

Query  5603  GCGTCAGCCAGAGTATGAGTGAGGAGGAACGCGAAAAGGTAACGCCACTCATGGTCAAAG  5662
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   GCGTCAGCCAGAGTATGAGTGAGGAGGAACGCGAAAAGGTAACGCCACTCATGGTCAAAG  840

Query  5663  GCTTTCGGGATGCGGCTGAGGAAGGAGGGACGGCAGTGACCGGTGGGCAAACGGTGGTCA  5722
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  841   GCTTTCGGGATGCGGCTGAGGAAGGAGGGACGGCAGTGACCGGTGGGCAAACGGTGGTCA  900

Query  5723  ACCCTTGGATTATAATCGGTGGAGTTGCCACTGTAGTATGCCAACCAAATGAGTTCATAA  5782
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   ACCCTTGGATTATAATCGGTGGAGTTGCCACTGTAGTATGCCAACCAAATGAGTTCATAA  960

Query  5783  TGCCGGACAGCGCCGTCGTTGGGGACGTGCTGGTGTTAACCAAACCGTTAGGAACCCAGG  5842
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   TGCCGGACAGCGCCGTCGTTGGGGACGTGCTGGTGTTAACCAAACCGTTAGGAACCCAGG  1020
```

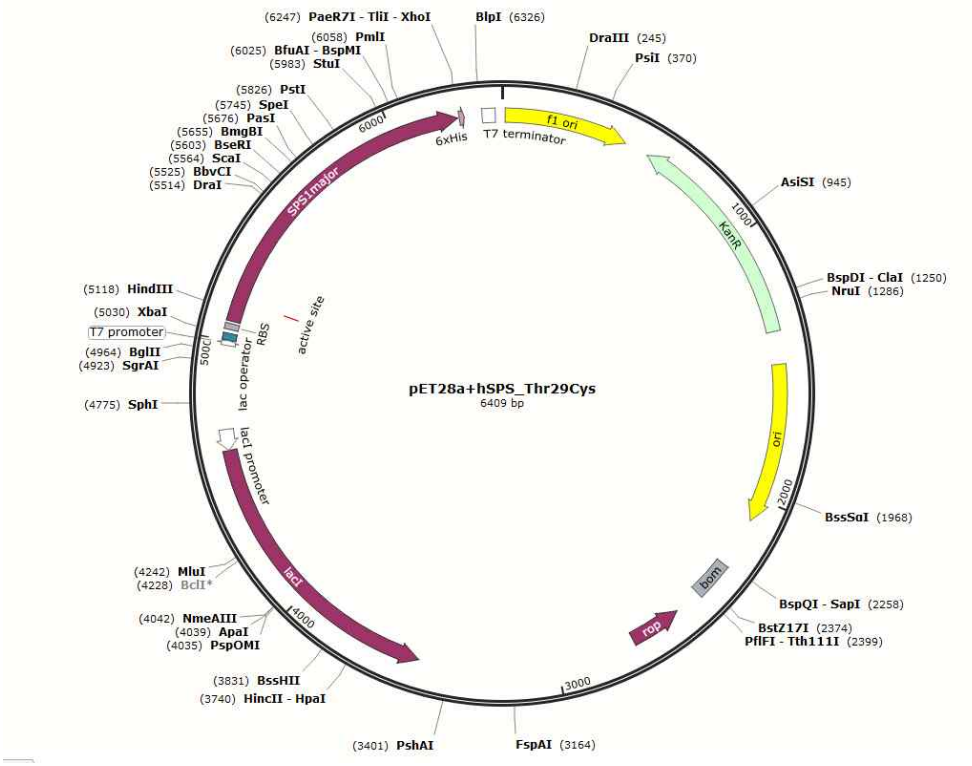
Appendix 그림 5. pET28a Mock Vector



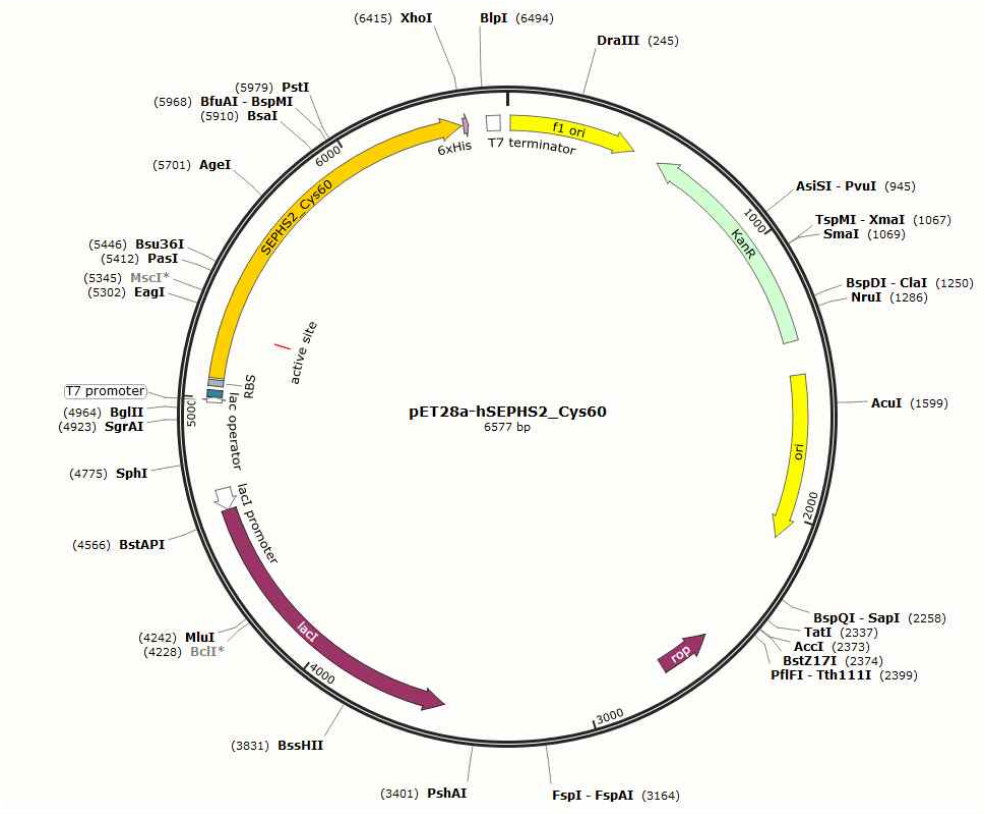
Appendix 그림 6. SEPHS1 Thr29



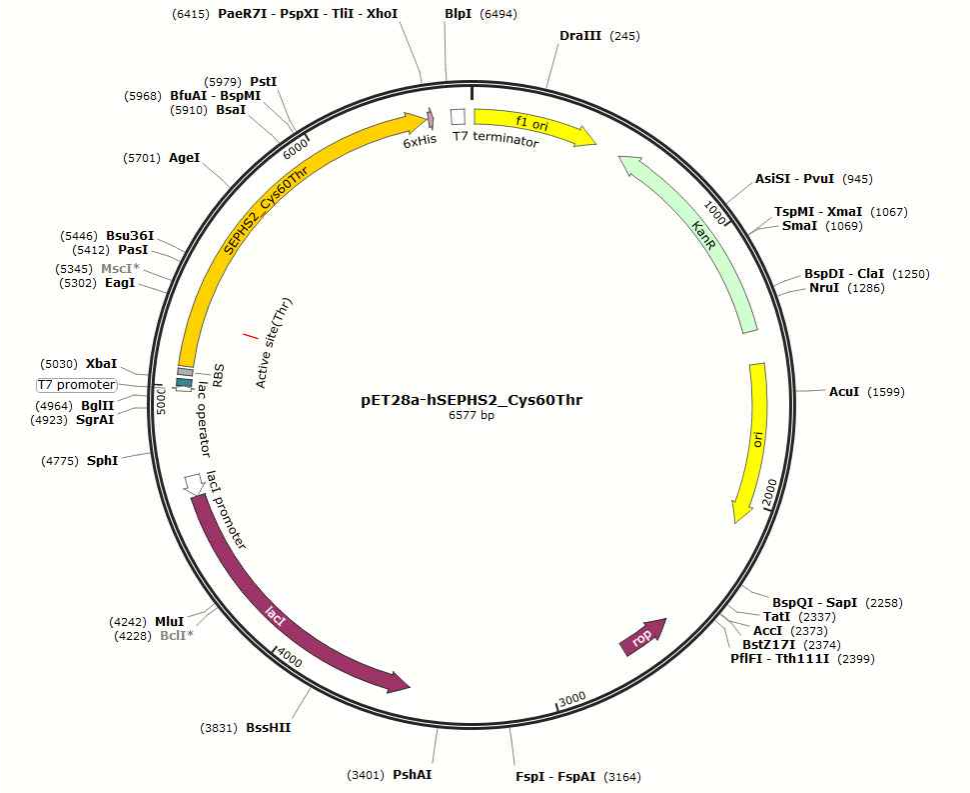
Appendix 그림 7. SEPHS1 Thr29Cys vector map



Appendix 그림 8. SEPHS2 Cys60 vector map



Appendix 그림 9. SEPHS2 Cys60Thr vector map



VI. 참고문헌

Alsina B, Serras F, Baguñá J, Corominas M. (1998) patufet, the gene encoding the Drosophila melanogaster homologue of selenophosphate s ynthetase, is involved in imaginal disc morphogenesis. Mol Gen Gene t. 257(2):113-23.

Bang J, Huh JH, Na JW, Lu Q, Carlson BA, Tobe R, Tsuji PA, Glad yshev VN, Hatfield DL, Lee BJ. (2015) Cell Proliferation and Motility Are Inhibited by G1 Phase Arrest in 15-kDa Selenoprotein-Deficient Chang Liver Cells. *Mol Cells*. 38(5):457-65.

Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G.,Veprek, B., and Zinoni, F. (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid.Mol. Microbi ol. 5, 515−520.

Flore O, Bastien C, Arnold D, Puemi, Jurgen S, and Christian B.. Analysi s of Novel Interactions between Components of the Selenocysteine Biosyn thesis Pathway, SEPHS1, SEPHS2, SEPSECS, and SECp43. Biochemistry 2017 56 (17), 2261-2270.

Itoh Y1, Sekine S, Matsumoto E, Akasaka R, Takemoto C, Shirouzu M, Yokoyama S (2009) Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs, J. Mol. Biol. 385(5);1456 - 1469.

Kai-Tuo Wang, Juan Wang, Lan-Fen Li, Xiao-Dong S (2009) Crystal str uctures of catalytic intermediates of human selenophosphate synthetase 1, J. Mol. Biol. 390(4):747 - 759.

Kim I.Y, Veres Z., Stadtman T.C. (1992) Escherichia coli mutant SELD enzymes. The cysteine 17 residue is essential for selenophosphate formati on from ATP and selenide, J Biol Chem. 25;267(27):19650-4.

Kim JY, Lee KH, Shim MS, Shin H, Xu XM, Carlson BA, Hatfield D L, Lee BJ. (2010) Human selenophosphate synthetase 1 has five splice variants with unique interactions, subcellular localizations and expressi on patterns. Biochem Biophys Res Commun. 397(1):53-8.

Lee, B. J., Worland, P. J., Davis, J. N., Stadtman, T. C., and Hatfield, D. L. (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. J. Biol. Chem. 264, 9724—9727.

Leinfelder W, Forchhammer K, Veprek B, Zehelein E, and Böck A (19 90) In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRN A(UCA): involvement and characterization of the SelD gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(2):543-7.

Leung L, Kwong M, Hou S, Lee C, Chan JY. (2003) Deficiency of th e Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethal ity and severe oxidative stress. J Biol Chem. 278(48):48021-9.

Low SC, Harney JW, Berry MJ (1995) Cloning and functional charact erization of human selenophosphate synthetase, an essential componen

t of selenoprotein synthesis. J Biol Chem. 270(37):21659-64.

Na, J. Jung J, Bang J, Lu Q, Bradley C, Guo X, Vadim G, Kim J, Dolph L. H, Lee B (2018) Selenophosphate synthetase 1 and its role in redox h omeostasis, defense and Proliferation. Free Radical Biology and Medicine 127:190-197.

Serras F, Morey M, Alsina B, Baguñà J, Corominas M. (2001) The D rosophila selenophosphate synthetase (selD) gene is required for devel opment and cell proliferation. Biofactors. 14(1-4):143-9.

Shim MS, Kim JY, Jung HK, Lee KH, Xu XM, Carlson BA, Kim K W, Kim IY, Hatfield DL, Lee BJ. (2009) Elevation of glutamine level by selenophosphate synthetase 1 knockdown induces megamitochondri al formation in Drosophila cells. *J Biol Chem*. 20;284(47):32881-94.

Tamura, T., Yamamoto, S., Takahata, M., Sakaguchi, H., Tanaka, H., Sta dtman, T. C., and Inagaki, K. (2004) Selenophosphate synthetase genes fr om lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling
L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 16162−16167.

Tobe R, Carlson BA, Huh JH, Castro NP, Xu XM, Tsuji PA, Lee SG, Bang J, Na JW, Kong YY, Beaglehole D, Southon E, Seifried H, Tess arollo L, Salomon DS, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL, Lee BJ. (2016) Selenophosphate synthetase 1 is an essential protein with r oles in regulation of redox homoeostasis in mammals. Biochem J. 15;4 73(14):2141-54.

Walker, H., J.A. Ferretti, T.C. Stadtman (1998) Isotope exchange studi es on the Escherichia coli selenophosphate synthetase mechanism. Pro c.Natl.Acad.Sci.USA 95:2180-2185.

Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL,(2006) Biosynthesis of selenocysteine on its t RNA in eukaryotes, PLoS Biol.5(1)e4.

Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VL, Hatfield DL (2007) Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein bios ynthesis, Biochem. J. 404: 115 - 120.

Abstract

Selenophsophate synthetase(SEPHS) synthesizes selenophosphate from using ATP from selenide. SEPHS has two paralogues, Selenophosphate syntheatse1(SEPHS1) and Selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2). These two isoforms are highly similarity in sequence and structure. However, only SEPHS2 has the ability to biosynthesize selenophosphate, and SEPHS1 does not. Among the functional domains that these two have in common, the difference between the two is the amino acid that exists in the active site in catalytic domain which determines their selenophosphate synthesis activity. SEPHS1 has Thr or Arg, and SEPHS2 has Cys or Sec at the active site.

In this study, mutagenesis was induced in Sephs1 Thr29 site, and corresponding Sephs2 Cys60 site and assayed ATP hydrolysis activity on the mutant enzyme to see the ability to synthesize selenophosphate. As a result, Sephs1 Thr29Cys was hydrolyzed in to AMP+Pi from ATP and surprisingly AMP was produced under no selenide condition. Sephs2 Cys60 was able to produce AMP from

ATP only with Selenide background, and SEPHS2 Cys60Thr could not hydolyze AMP from ATP either with or wihtou the Selenide.

keywords: selenium, selenophosphate, ATP hydrolysis, AMP, SEPHS1, SEPHS2

Student Number : 2017-24567