

Analysis of the functional domains of CFTase gene cloned from
Xanthomonas oryzae #5 using recombinant deletion mutant

김병우, 유동주, 류혜경, 박주희

동의대학교 미생물학과

전화 (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

Abstract

Various recombinant deletion mutants were constructed from cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase(CFTase) gene of *Xanthomonas oryzae* #5. The mutants were expressed in *Escherichia coli* DH5 α . We were able to obtain three recombinant proteins were purified, and examine their CFTase and hydrolyzing activity. N-terminal deletion mutant had both CFTase activity and hydrolyzing activity. however, in C-terminal and N,C-terminal deletion mutant disappeared CFTase activity, but hydrolyzing activity remained. From there results, it seems that the C-terminal region(amino acid 1173~1333) is important for cyclization.

서론

Cycloinulo-oligosaccharide(cyclofructans [CF])는 6~8의 D-fructofranose가 β -(2 \rightarrow 1) 결합으로 연결된 cyclic oligosaccharide이다(CF6, CF7, and CF8). 이 CF의 구조는 cyclodextrin과 유사하여 의학 및 식품 분야에서 유용하게 이용될 수 있다. CF는 cycloinulo-oligosaccharide fructano transferase(CFTase)의 intramolecular transfructosylation 작용에 의해 inulin으로 합성되어 진다. CFTase는 *B. circulans* OKUMZ 31B, *B. circulans* MCI-2554, 및 *Bacillus macerans* CFC1 등의 균주로부터 보고 된 바 있다.

CFTase는 inulin으로부터 cycloinulohexaose, cycloinuloheptaose, cycloinulooctaose를 생성하는 cyclization 반응, cycloinulohexaose와 GF3,GF4로부터 DP2-10의 fructooligosaccharides을 생성하는 coupling 반응, GF3와 GF4로부터 DP5-10의 fructooligosaccharides을 생성하는 disproportionation 반응, CF6과 F6로부터 F2-4을 생성하는 hydrolyzing 반응을 촉매하는 multi fuctional enzyme이다.

본 연구는 *Xanthomonas oryzae* #5으로부터 CFTase 유전자를 클로닝하여 염기서열을 밝힌 바 있다. 이 CFTase 유전자로부터 recombinant deletion mutant를 구성 발현시켜, CFTase의 fuctional domain의 특성을 밝혔기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 균주 배양: *Xanthomonas oryzae* #5는 2% Inulin, 2% Yeast extract, 0.5% (NH₄)₂HPO₄, 0.2% NH₄H₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MnCl₂·4H₂O, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.05% FeSO₄·7H₂O, pH 7.0, 37°C에서 배양하였고, 숙주균주는 *E. coli* DH5 α [*supE44*, Δ *lacU169*(Φ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] 사용하였고, vector는 pUC18/19를 사용하였다. 형질전환체는 30 μ g/ml의 ampicillin을 첨가한 LB배지에서 배양하였다.

Recombinant DNA techniques : Plasmid는 QIAGEN Plasmid Midi Kit을 사용하여 추출하였다. Gel electrophoresis는 TAE buffer(40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Maniatis등의 방법에 따랐으며, agarose gel상의 DNA 절편은 Gene Clean Kit를 사용하여 추출 회수하였다. polymerase chain reation(PCR)은 vent DNA polymerase(NEB) 및 KOD DNA polymerase(Toyobo)를 사용하였다.

Recombinant deletion mutant clone의 선별: PCR product를 pUC18/19와 ligation 시켜으며, 형질전환주는 ampicillin (20 μ g/ml), isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (100mM), X-Gal (20mg/ml) 함유한 LB agar에서 무색 colony를 선별하여 LB에서 2일 배양 후 배양상층액을 inulin과 반응 시켜 paper chromatography(n-Butanol : Pyridin : Water = 6 : 4 : 3)으로 CFTase 또는 inulin 분해능이 있는 형질전환주를 선별하였다.

DNA Sequencing 및 Computer Analysis: Plasmid pUC18/19에 subcloning 시킨 CFTase gene의 염기배열 및 recombinant deletion mutant의 염기배열 확인은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)에 의해 dideoxy chain termination method로 하였다. Nucleotide 와 amino acid sequence 분석은 GENETYX-WIN 3.1 software program을 사용하였다.

Overexpression and partial purification of recombinant protein : subclonig 된 recombinant deletion mutant의 gene을 pET28a vector subclonig 시키고, *E. coli* BL21(DE3)pLysS 및 HMS(DE3)pLysS 균주에 형질전환하였다. recombinant protein은 NZCYM broth에서 1mM/ml IPTG로 유도 발현시키고, HistrapTM kit를 이용하여 분리 정제 하였다.

결과 및 고찰

다른 균주 CFTase 및 endo-,exo inulinase와 homology 비교: Fig. 1 에 나타낸 바와 같이 CFTase는 *B. circulans* MCI-2554의 CFTase 또는 *Bacillus*

macerans CFC1와 아미노산 배열에 있어서 각각 약 72% 또는 96%의 높은 비율의 homology를 나타내었다. 그리고 *Pseudomonas* endo-,exo inulinase 와는 conservation region에 있어 약 50% 정도의 homology를 나타내었다. 이러한 homology 결과로부터 fig 3과 같은 recombinant deletion mutant를 구성하였다.

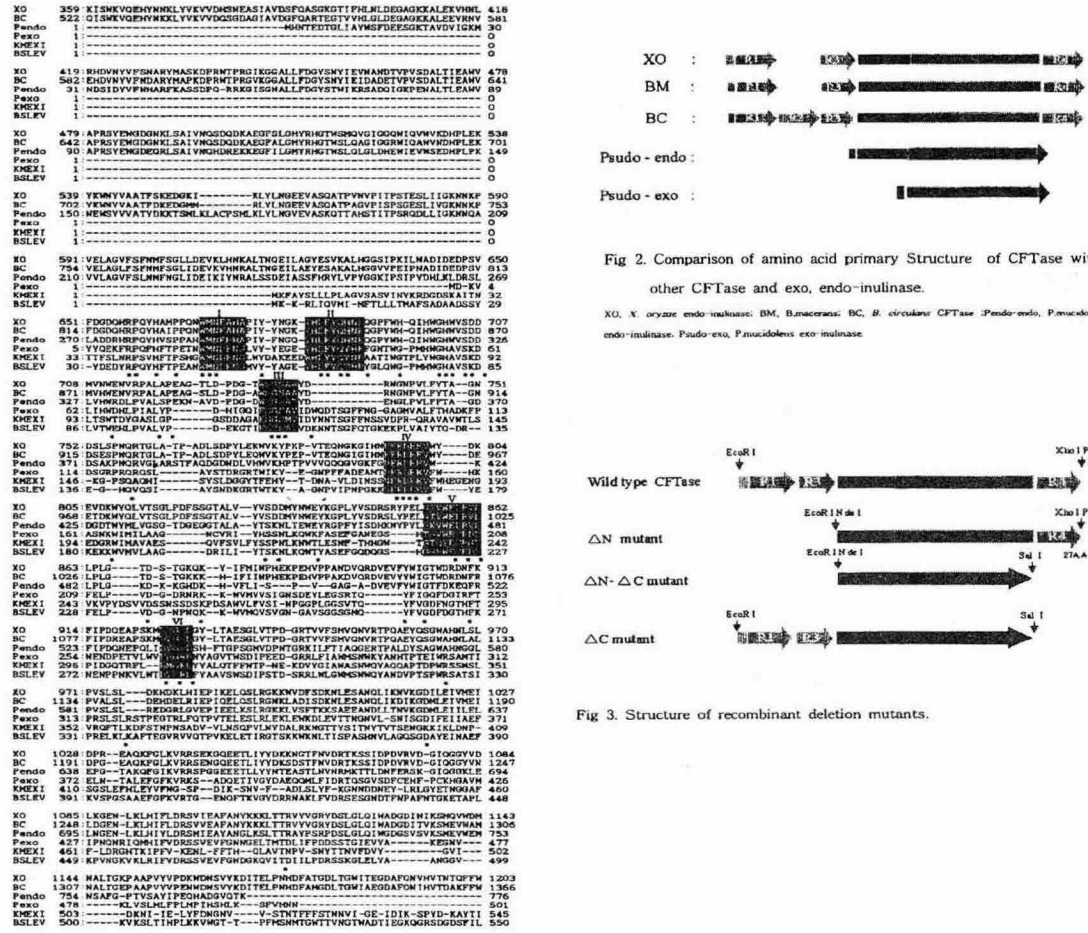


Fig 2. Comparison of amino acid primary Structure of CFTase with other CFTase and exo, endo-inulinase.

XO, X. oryzae endo-inulinase; BM, B. macerans; BC, B. caryocarya CFTase; Pseudo-endo, P. maculicola endo-inulinase; Pseudo-exo, P. maculicola exo-inulinase.

Fig 3. Structure of recombinant deletion mutants.

Purification of recombinant proteins : wild type protein 및 recombinant protein은 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 및 HMS(DE3)pLysS 균주 발현 시켜 HisTrap kit 및 G-100 gel filtration, Hitrap Q, Sp ionexchange를 이용하여 분리 정제 하였다. 분리 정제된 단백질 분자량은 각각 148KDa, 106KDa, 88KDa, 103KDa 였다. 분리 정제된 recombinant deletion mutant의 CFTase와 hydrolyzing activity를 확인 하였으며, N-terminal deletion mutant는 CFTase와 hydrolyzing activity를 나타

내었지만 , C-terminal deletion mutant와 N,C-terminal mutant는 hydrolyzing activity만 나타 내었다.

요약

Xanthomonas oryzae #5로부터 클로닝 된 CFTase 의 functional domain의 분석을 위해 CFTase의 recombinant deletion mutant를 구성하고, recombinant protein을 분리, 정제하였다. 분리, 정제한 recombinant protein의 활성을 측정 한 결과 C-terminal이 deletion 된 mutant는 cyclization 반응이 소실 되었다. 이와 같은 결과로부터 CFTase의 C-terminal 은 cyclization 반응의 중요한 functional domain 이다.

참고문헌

1. Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto. "Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase(CFTase) from *Bacillus circulans* MCI-2554"(1995), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59(1), 31-34.
2. Eom, S.-J., Y.-M. Kwon, and Y.-j. Choi. "Molecular cloning of *Pseudomonas* sp. inulinase gene and its expression in *E. coli*"(1995), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23(5), 550-555.
3. Kwon, Y.-M., H.-Y. Kim, and Y.-J. Choi, "Cloning and Characterization of *Pseudomonas mucidolens* Exoinulinase"(2000), *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(2), 238-243.
4. Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. van Beeumen, and J. Vandenhaute. "Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* inulinase var. marxianus ATCC 12424"(1991), *FEBS Lett.* 289(1), 64-68.
5. Martin, I., M. Debarbouille, E. Ferrari, A. Klier, and G. Rapoport. "Characterization of the levanase gene of *Bacillus subtilis* which shows homology to yeast invertase"(1987), *Mol. Gen. Genet.*, 208, 177-184.