

## *Kluyveromyces fragilis*의 Alkaline Phosphatase 유전자의 구조 분석

박수영 · 황선갑 · 하상철<sup>1</sup> · 김종국 · 박 완 · 홍순덕\*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과  
<sup>1</sup>KIST 유전공학연구소 생물공학연구실

### Structural Analysis of Alkaline Phosphatase Gene from *Kluyveromyces fragilis*

Park, Soo-Young, Seon-Kap Hwang, Sang-Chul Ha<sup>1</sup>  
Jong-Guk Kim, Wan Park and Soon-Duck Hong\*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,  
Taegu 702-701, Korea

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology, Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 17,  
Taeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

**Abstract** — From the pSKH201 plasmid which had been previously cloned in our laboratory, a 3.0kbp insert DNA encoding the alkaline phosphatase of *Kluyveromyces fragilis* was cleaved with several restriction endonucleases and ligated into the appropriate sites of M13mp18/19 vectors and sequenced by Sanger's dideoxy chain termination method. The sequence contained a 1,638 bp open reading frame(ORF) whose similarities in nucleotide, when compared with those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by GENETYX program, were found to be 61% and 46%, respectively. The deduced amino acid sequence consists of 546 amino acids and contains several homologous regions in the alkaline phosphatases of *E. coli*, *S.cerevisiae* and human placenta.

Phosphatases는 인산 ester결합의 가수분해를 촉매하는 효소로서 이들은 작용 최적 pH에 따라 acid phosphatase와 alkaline phosphatase로 분류되며, alkaline phosphatase는 여러가지 생물의 다양한 조직에 존재한다는 사실이 알려져 있다. 효모에서 acid phosphatase(EC 3.1.3.2)는 세포내 periplasm에 존재하는 glycosylated 형태의 효소이고(1), 이에 반해 alkaline phosphatase(EC 3.1.3.1)는 주로 vacuole과 cytoplasm에서 발견되며(2), Asn-GlcNac형태의 glycoprotein으로 알려져 있다(3). *S. cerevisiae*의 세포추출물에서는 두 종류의 alkaline phosphatase가 발견되었는데, 하나는 PHO13에 의해 코드되는 p-nitrophenyl phosphatase이고, 다른 한가지는 무기인산염에 의해 억제되는 non-specific phosphatase이다(4,5). 이러한 non-specific alkaline phosphatase는 분자량 약 90,000 dalton 정도의 glycoprotein이며, 4번 염색체

상의 PHO8 유전자에 의해 코드되어 진다. Oshima 그룹에 의해 *S. cerevisiae*의 alkaline phosphatase 전사조절 유전자가 연구되어졌고(5) 그 염기배열이 밝혀진 바 있다(6). 한편, *Escherichia coli*의 alkaline phosphatase는 단일의 phoA 구조유전자에 의해 코드되며 mature 형태로 periplasmic space에 존재한다(7).

*E. coli* alkaline phosphatase는 배지내 무기인산염 결핍시에만 유도되고, phoB와 phoR 유전자에 의해 조절을 받으며, phosphate regulon의 negative regulation에는 pstA, pstB 및 pstU 유전자가 존재한다(8). 1981년 Breg에 의해 *E. coli*의 alkaline phosphatase 유전자가 클로닝 된 이후, 그 염기 배열이 결정되었고, 또한 *Bacillus licheniformis*는 전사에 필요한 각각의 RNA polymerase를 가지는 alkaline phosphatase 구조 유전자들이 반복배열을 가짐이 밝혀졌다(9). 이상과 같이 *E. coli* 및 *S. cerevisiae*에서는 alkaline phosphatase에 관하여 많은 연구가 수행되어 왔으며, 최근에 들어서는 *E. coli* alkaline phosphatase 유전자

**Key words:** Alkaline phosphatase gene, *Kluyveromyces fragilis*

\*Corresponding author

(*phoA*)가 expression vector의 융합유전자로 사용되고 있다. 또한, 그 유전자는 분비성 단백질과 융합되어 단백질의 sorting 및 분비기작 연구에도 이용되고 있다(10).

본 연구에서는 효모이면서도 단백질의 세포외 분비능이 우수하며 이종단백질의 공업적인 생산에도 이용될 가능성이 있는 *Kluyveromyces fragilis*의 인산 대사에서의 alkaline phosphatase의 기능 및 조절기구를 밝히기 위한 기초자료를 얻기 위하여 *K. fragilis*의 alkaline phosphatase 유전자의 염기배열을 결정하고 그 구조적인 특징을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmids

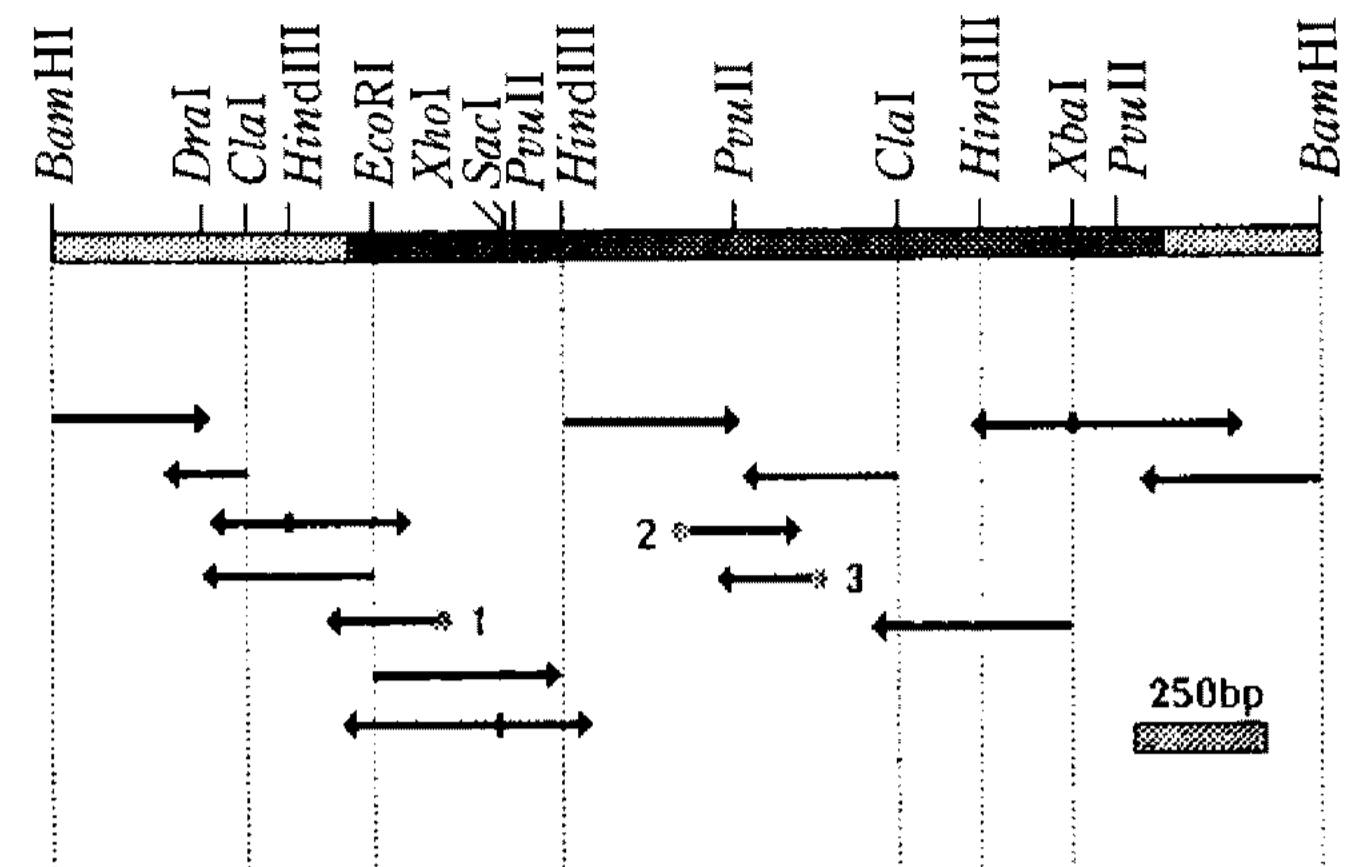
효모 *K. fragilis* Y610 균주의 genomic library로부터 *E. coli* YK537 [*supE44 hsdR hsdM recA1 phoA8 leuB6 thi lacY rpsL20 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1*]과 *S. cerevisiae* NA79-10C [*pho8-2 leu2 trp1 his3*] 두 균주의 alkaline phosphatase 변이를 상보할 수 있는 DNA 단편이 본 연구의 재료로 사용되었다. *E. coli* JM109 [*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' [traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]*]가 염기배열의 결정을 위해 recombinant M13mp18과 M13mp19 vector의 수용균으로 사용되었고, alkaline phosphatase 유전자를 가진 재조합 plasmid로서 plasmid pSKH201 [alkaline phosphatase gene/pUC19 vector]가 사용되었다(11).

### 효소 및 시약

대부분의 제한효소 및 T<sub>4</sub> DNA ligase, RNase, Alkaline phosphatase, Proteinase K 등은 KOSCO biotech 또는 Boehringer-Mannheim사로부터 구입하였으며, X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside), MOPS(4-morpholine propane sulfonic acid) 및 Tricine 등은 Sigma 또는 Merck사로부터 구입하였다.

염기배열결정에는 Taq DNA Sequencing Kit(Boehringer-Mannheim사)와 T<sub>7</sub> Sequencing™ Kit(Pharmacia사)를 사용하였으며, 방사선 동위원소(α-[<sup>35</sup>S]-dATP, α-[<sup>35</sup>S]-dCTP)와 autoradiography film(Hyperfilm-<sup>3</sup>H)은 Amersham사로부터 구입하여 사용하였다. 기타의 시약 및 효소류는 일반 시약상으로부터 구입한 일급시약을 이용하였다.

### DNA 조작



■ : Coding Region (ORF) → : Directions of Sequencing  
▨ : Non-coding Regions \* : Synthetic 17-mer primers

Fig. 1. Restriction map and sequencing strategies for the DNA fragment carrying alkaline phosphatase gene of *K. fragilis*.

The arrows denote the extent of sequence determination. The tail of the arrows represent the site of subcloning into the M13 vector. The numbered bars indicate the synthetic 17-nucleotide primers. Abbreviations of restriction enzymes: B, *Bam*HI; C, *Cla*I; D, *Dra*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Pv, *Pvu*II; S, *Sac*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I.

*E. coli*로부터의 plasmid DNA와 M13 phage DNA의 분리는 alkaline-SDS lysis법(12)에 따라 행하였다. *E. coli*의 transformation과 transfection은 Maniatis 등(13)의 CaCl<sub>2</sub> 방법으로 행하였다.

### 염기배열 결정 및 computer 검색

제한효소로 분해한 plasmid pSKH201의 DNA 단편을 M13mp18 및 M13mp19 vector에 subcloning한 recombinant phage로부터 단일가닥 DNA를 분리하여 Sanger의 dideoxy chain termination법으로 염기배열을 결정하였다(14). 또한, subcloning으로 염기배열결정이 불가능한 부분은 Fig. 1에 도해한 것과 같이 세가지의 oligonucleotide primer [1번 : 5'-GATGAGTTCTTAGCGTG-3', 2번 : 5'-GTCGTGATTTGATTAAA-3', 3번 : 5'-ACAAGAATGGTGTACCT-3']를 합성하여 동일한 방법으로 결정하였다. 결정된 염기배열은 GENETYX program(version 6.38)으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

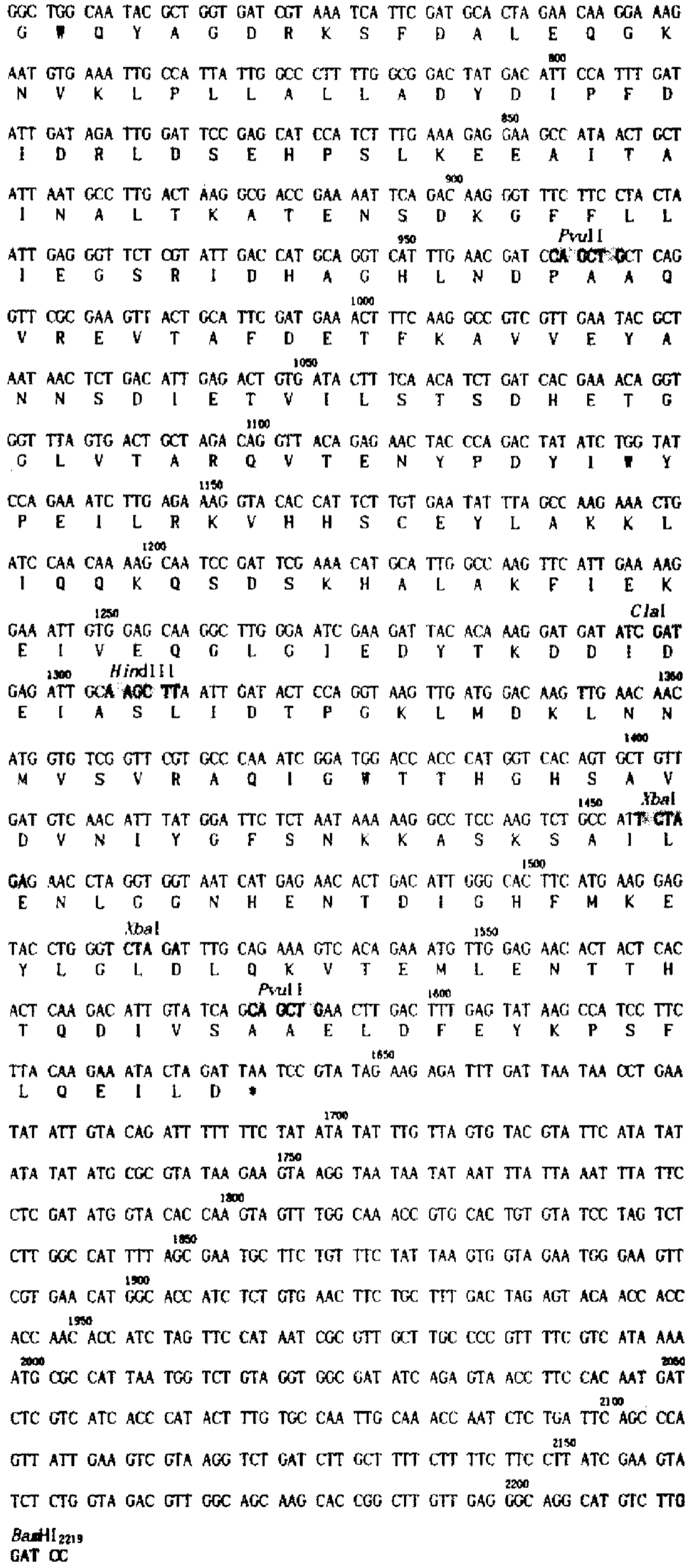
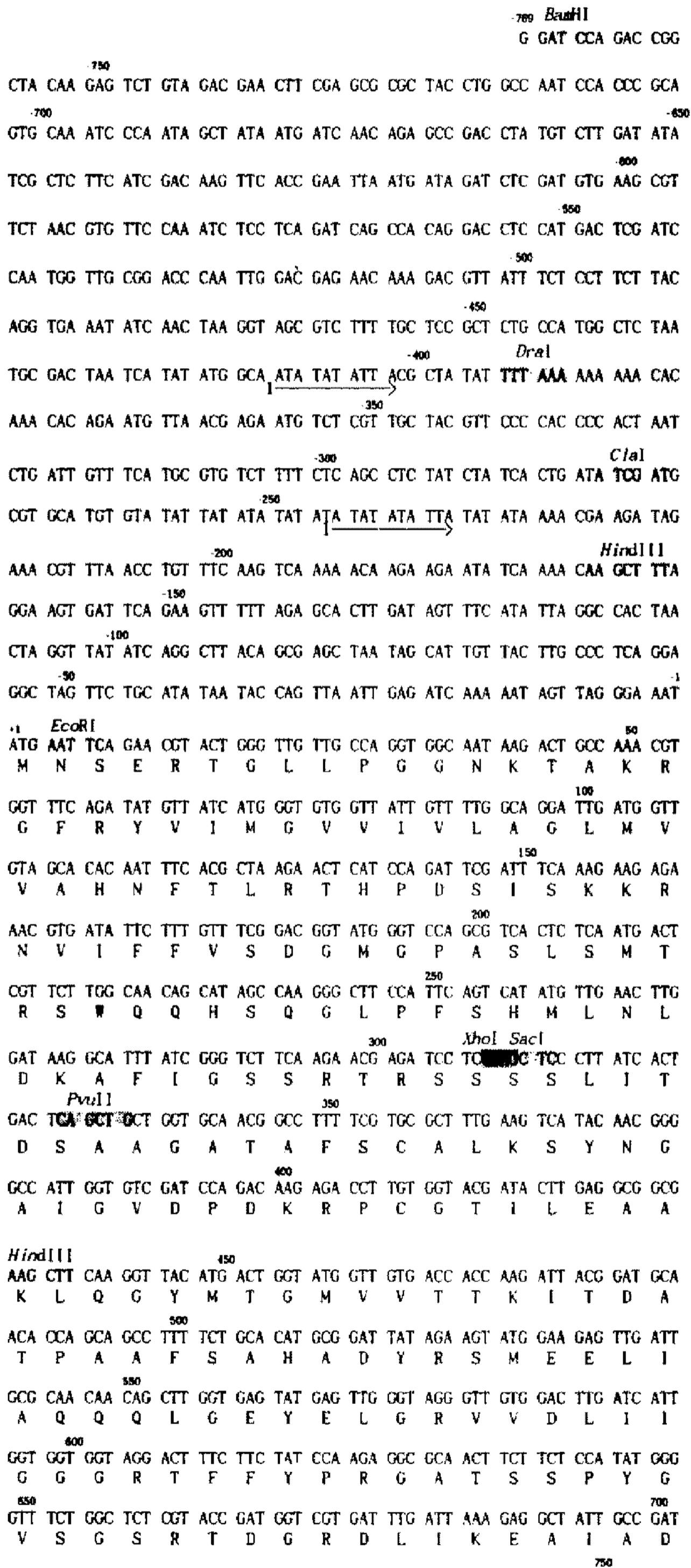
### Alkaline phosphatase 유전자의 subcloning

클로닝된 alkaline phosphatase 유전자의 제한지도(11)에 따라 제한효소 단편들을 M13mp18 혹은 M13

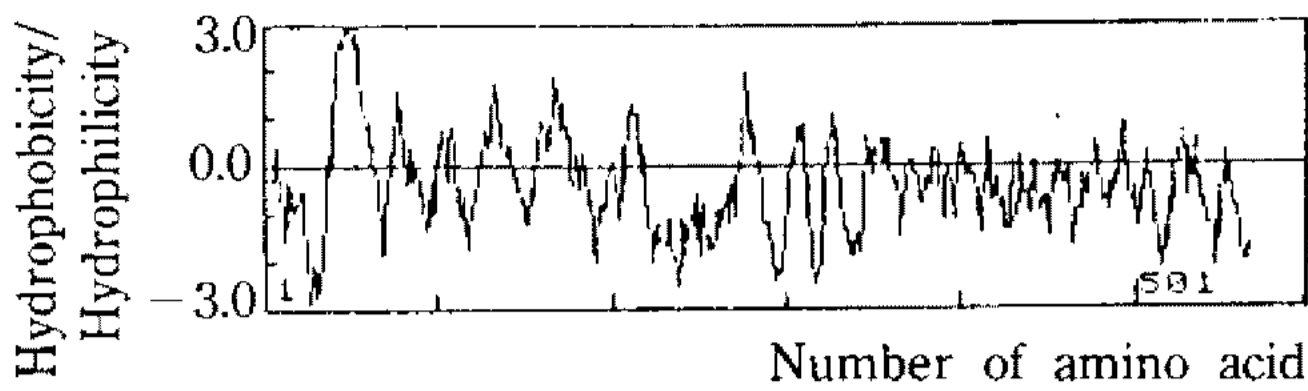
mp19 vector DNA내로 subcloning하였다. Recombinant plasmid들은 *E. coli* JM109로 transfection하여 X-gal plate상에서 clear plaque로 선별하였다. Fig. 1은 염기배열결정의 전략을 도해한 것으로서 *Bam*HI 부위 이하를 염기배열결정에 사용하였다.

**염기배열의 결정 및 분석**

*E. coli*의 *phoA* 변이를 상보할 수 있는 2,988 bp의 염기배열이 결정되었으며 염기배열과 예상되는 아미노산 배열은 Fig. 2와 같다. 5'-noncoding region에 존재하는 direct repeat 배열을 검색한 결과, -411번과 -244번 위치에서 10 bp의 5'-ATATATATTA-3'



**Fig. 2. Nucleotide sequence of the alkaline phosphatase gene of *K. fragilis*.** The sequence of DNA fragment bearing the alkaline phosphatase gene and the deduced amino acid sequence are shown. The arrows marked '1' indicate the 10 bp direct repeats.



**Fig. 3. Hydropathy profile of the protein deduced from nucleotide sequence.**

The deduced amino acid sequence of the ORF was subjected to hydropathy analysis by the method of Doolittle(1982). Hydrophobic values lie above the horizontal axis and hydrophilic values lie below it.

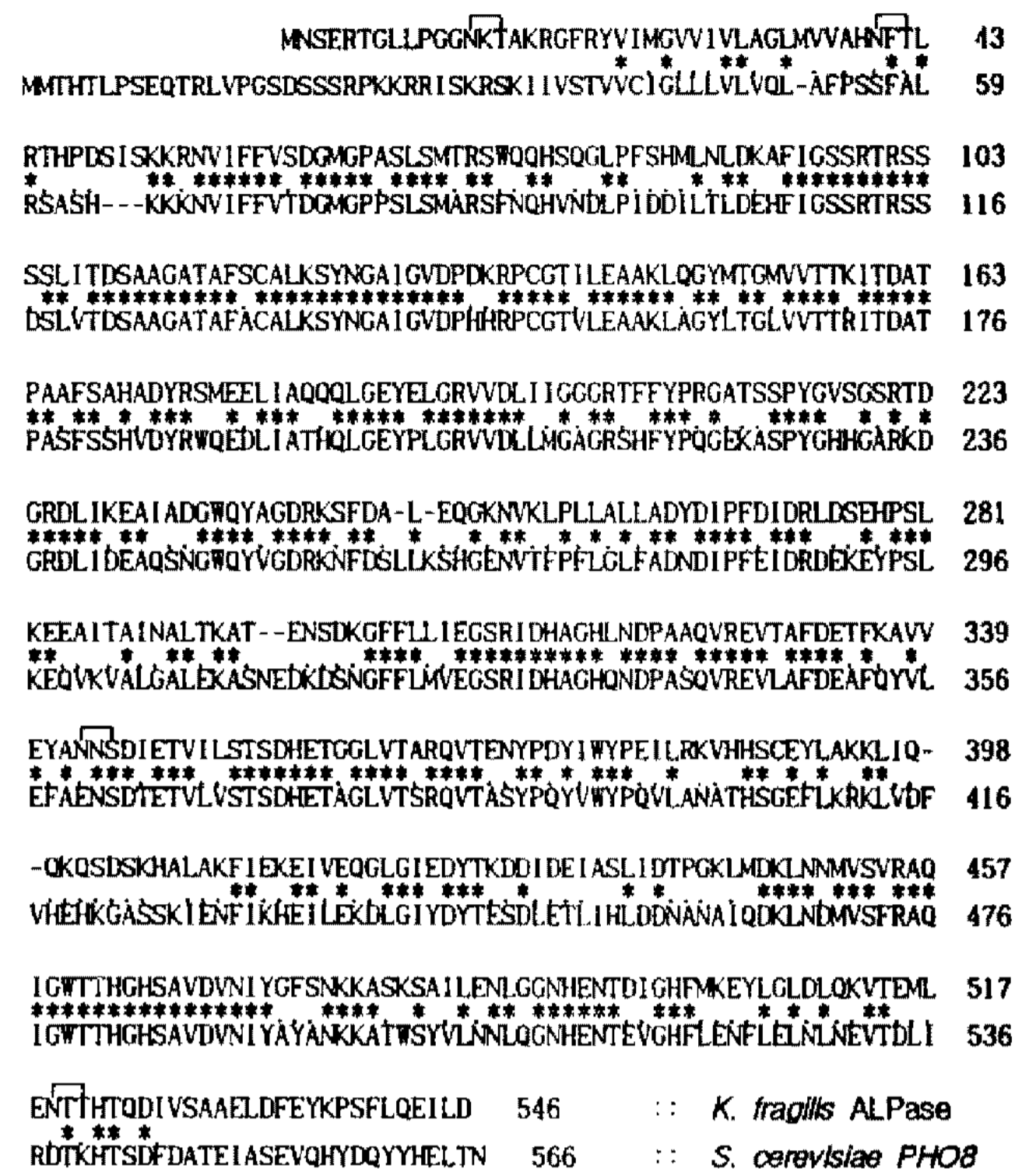
Parameters used in this analysis are as follows: Ile(I) = 4.50, Val(V) = 4.20, Leu(L) = 3.80, Phe(F) = 2.80, Cys(C) = 2.50, Met(M) = 1.90, Ala(A) = 1.80, Gly(G) = -0.40, Thr(T) = -0.70, Ser(S) = -0.80, Trp(W) = -0.90, Tyr(Y) = -1.30, Pro(P) = -1.60, His(H) = -3.20, Glu(E) = -3.50, Gln(Q) = -3.50, Asp(D) = -3.50, Asn(N) = -3.50, Lys(K) = -3.90, Arg(R) = -4.50, Asx(B) = -3.50, Glx(Z) = -3.50.

배열이 direct repeat로 존재하고 있음이 관찰되었다. 2,988 bp 염기배열내에는 구조유전자의 상류부에 promoter활성을 나타내는 부위가 존재함이 밝혀진 바 있으며(11), 염기배열분석으로부터 최초의 ATG 개시 codon 상류로 약 770 bp 내부에 5'-TATAAT-3'의 TATA 유사 배열이 -685번, -652번, -420번, -410번, -260에서 -228까지, -41번 위치에 존재하지만 +1번 위치에 가장 가까운 -41번 위치가 promoter 유사배열로 여겨진다.

한편, 전체 배열내에는 1,638 bp의 open reading frame이 존재하였으며, 결정된 alkaline phosphatase의 염기배열을 효모 *S. cerevisiae*의 PHO8(6) 및 *E. coli*의 phoA(15) 유전자의 염기배열과 비교해 보았을 때 각각 61%, 46%의 상동성을 나타내었다.

**아미노산 배열 분석**

Open reading frame로부터 유추되는 alkaline phosphatase 단백질은 ATG 개시 codon으로부터 TAA 종결 codon까지 546개 amino acid 잔기들로 구성되어 있으며, 예상되는 분자량은 60,046 dalton이었다. 이 단백질의 N-말단에는 염기성 아미노산들이 짧게 나타나고 뒤이어 소수성 아미노산들이 연결되어 있으며 (Fig. 3), 이들의 특징은 *S. cerevisiae*의 alkaline phosphatase와 유사하였다. *K. fragilis*의 alkaline phosphatase 유전자의 codon 이용성은 특별한 편향성을 보이지 않았다. *S. cerevisiae*의 repressible alkaline phosphatase는 당사가 8% 부착되어 있는 N-glycosylated 단백질인데(3), N-linked glycosylation은 3개의 아미노산으로 구성된 Asn-X-Thr과 Asn-X-Ser 배열



**Fig. 4. Similarity of amino acid sequence of alkaline phosphatase between *K. fragilis* and *S. cerevisiae*.**

Amino acid sequence is given in single letter code and aligned to provide maximum homology. Astrisks mark identical residues. The putative N-glycosylated asparagine residues are indicated with tetragons.

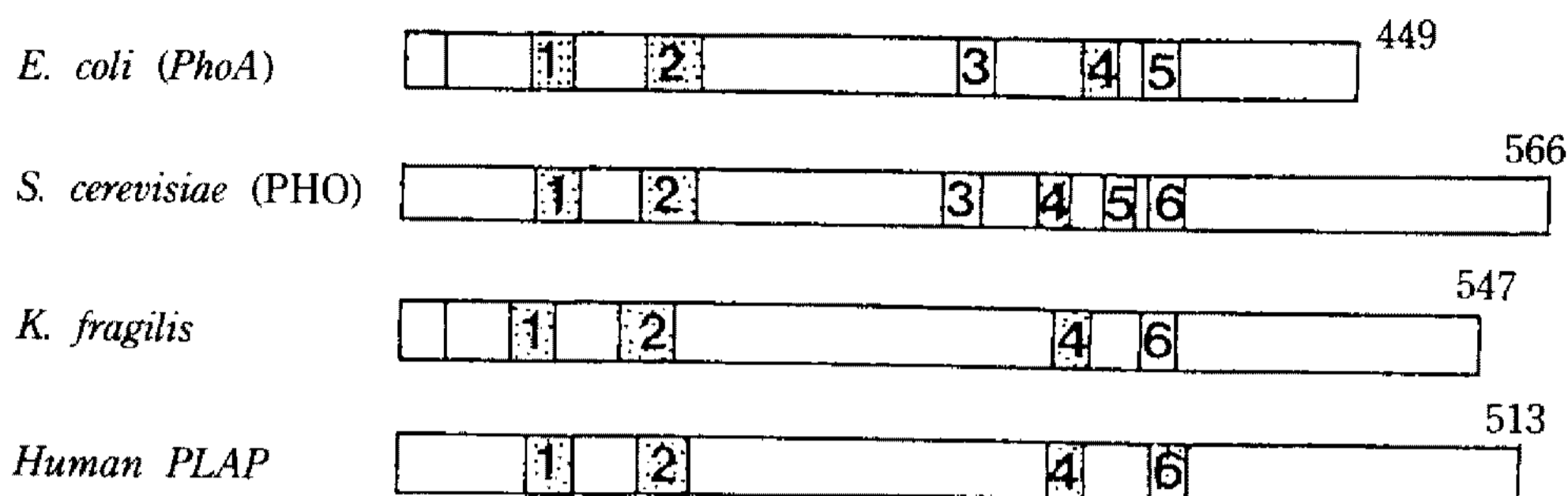
에서 일어나는 것으로 알려져 있다. 이와같은 배열은 *K. fragilis*의 alkaline phosphatase에서 아미노산 13번, 40번, 343번과 519번 위치에서 관찰되었다(Fig. 4에서 사각형으로 표시). Open reading frame으로부터 유추된 아미노산 배열과 *S. cerevisiae*의 alkaline phosphatase와 비교했을 때 60.2%의 상동성을 보였다 (Fig. 4). 그리고 이러한 아미노산 배열을 *E. coli*, *S. cerevisiae* 그리고 human placental alkaline phosphatase의 아미노산 배열과 비교했을 때(16, 17), 몇개의 상동성이 있는 지역이 발견되었는데 그 중 네가지의 alkaline phosphatases에서 공통부분이 3개소에서 발견되었다(Fig. 5의 Region I, II, IV). 특히 region II의 serine이 *S. cerevisiae*의 alkaline phosphatase의 active site로 알려져 있는데, *K. fragilis*의 alkaline phosphatase에서도 이 잔기가 발견되는 것으로 보아 아미노산 배열 110번째 serine 잔기는 아마도 이 효소의 활성부위일 것으로 여겨진다.

**요 약**

본 연구실에서 이미 클로닝되어 있는 *Kluyveromy-*



A



B

	Region I	Region II	Region IV	region VI
phoA 43	KNIILLIGDGMGDSEITAAR	99 VTDSAASATAWSTGVKTYNGALGVDIH	316 GFFLQVEGASIDK	PHO8 371 TSDHETGGLVT
	** * **** **	***** ** * **** ** *	**** ** **	*****
PHO8 67	KNVIFVTDGMPASLSMAR	120 VTDSAAGATAFACALKSYNGAIGVDPH	319 GFFLMVEGSRIDH	KALP 354 TSDHETGGLVT
	***** ***** *	***** *****	**** *****	** * **
KALP 54	RNVIFVSDGMPASLSMTR	107 ITDSAAGATAFACALKSYNGAIGVDPD	302 GFFLLIEGSRIDH	PLAP 345 TSEEDTSLVLT
	* * * ****	* * ** * * **	**** ** ****	
PLAP 34	KNLIIFLGDGMGVSTVTAAR	89 VPDSGATATAYLCCGVKGNFQTIGLSAA	305 GFFLFVEGGRIDH	

Fig. 5. Comparison of the predicted amino acid sequence with that of *E. coli*, *S. cerevisiae* and human placental alkaline phosphatases.

A: The primary structure of the four phosphatases. Homologous regions between two or three of the four enzymes are shown as numbered areas, and regions common to all three enzymes are shaded.

B: The alignments of amino acid sequences in the homologous regions are shown. The astrisks indicate identity with the several alkaline phosphatases.

*ces fragilis* Y610의 alkaline phosphatase 유전자를 함유한 3.0 kbp의 DNA 단편을 재료로 하여 몇 종류의 제한효소로 절단하여 M13mp18/19 vectors에 subcloning하거나, 세 종류의 합성 oligonucleotide를 primer로 이용하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법으로 염기배열결정을 행하였다. 결정된 염기배열 (2,988 bp)을 분석한 결과, 1,638 bp의 open reading frame(ORF)이 확인되었으며, ORF의 염기배열상의 상동성은 *S. cerevisiae*와 61%, *E. coli*와 46%로 나타났다. ORF로부터 추정된 아미노산배열은 546개의 아미노산잔기로 이루어져 있으며, 예상되는 분자량은 60,046 dalton이었다. *S. cerevisiae*의 PHO8 유전자로부터 유추된 아미노산배열과의 상동성은 60.2%로 나타났다. *E. coli*, *S. cerevisiae* 및 human placenta의 alkaline phosphatase와 상동성이 높은 지역을 검색한 결과 Region I, II, IV의 세 부분이 공통부위로 관찰되었다. 또한, glycosylation 부위 및 active site로서 가능한 잔기의 위치를 예측할 수 있었다.

### 감사의 말

이 논문은 1990년도 교육부 지원 학술 연구 조성비에 의해 연구된 것이며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Arnold, W.L. 1972. Location of alkaline phosphatase and  $\beta$ -fructofuranosidase within yeast cell envelope. *J. Bacteriol.* **112**: 1346-1352.
2. Wiemken, A., M. Schellenberg, and K. Ureck. 1979. Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*S. cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* **123**: 23-35.
3. Onishi, H.R., J.S. Tkacz, and J.O. Lampen. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase: formation of active enzyme in the presence of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* **254**: 11943-11952.
4. Attias, J. and J.L. Bonnet. 1972. A specific alkaline p-nitrophenyl phosphatase activity from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **268**: 422-430.
5. Toh-E, A., H. Nakamura, and Y. Oshima. 1976. A gene controlling the synthesis of non-specific alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **428**: 182-192.
6. Yoshinobu, K., H. Nayashi, T. Akio, B. Isao, and Y. Oshima. 1987. Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *S. cerevisiae*. *Gene* **58**: 137-148.
7. Malamy, M. and B. Horecker. 1961. The localization of alkaline phosphatase in *E. coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**: 104-108.

8. Shinagawa, H., K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. Structure and function of regulatory genes for the phosphate regulon in *E. coli*. pp. 20-25. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.
9. Hullet, F.M., P.Z. Wang, M. Sussman, and J.W. Lee. 1985. Two alkaline phosphatase genes positioned in tandem in *Bacillus licheniformis* MC14 require different RNA polymerase holoenzymes for transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 1035-1039.
10. Wongi, S. and A.J. Shatkin. 1993. Membrane topology model of *E. coli*  $\alpha$ -ketoglutarate permease by *phoA* fusion analysis. *J. Bacteriol.* **175**: 565-567.
11. Hwang, S.K., T.K. Kwon, J.G. Kim, J.H. Nam, S.D. Hong, and J.H. Seu. 1992. Cloning of the alkaline phosphatase gene from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 237-242.
12. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
13. Maniatis, M., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
14. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **74**: 5463-5467.
15. Kikuchi, Y., K. Yoda, M. Yamasaki, and G. Tamura. 1981. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene(*phoA*) of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **9**: 5671-5678.
16. Bradshaw, R.A., F. Cancedda, L.H. Ericsson, P.A. Neumann, S.P. Piccoli, M.J. Schlesinger, K. Shrier, and K.A. Walsk. 1981. Amino acid sequence of *E. coli* alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**: 3473-3477.
17. Millan, J.L. 1986. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **261**: 3112-3111.

(Received December 27, 1993)