

*Streptomyces coelicolor*의 3-Phytase 상동성 유전자 ID1103135의 기능분석

김미순 · 강대경¹ · 이홍섭² · 연승우² · 김태영² · 홍순광*

명지대학교 생명정보학부, ¹주이시바이오시스템 중앙연구소, ²일동제약주식회사 중앙연구소

*Streptomyces coelicolor*의 전 유전체 정보를 분석한 결과(7), 유전자 ID1103135가 코드 하는 open reading frame SCO7697이 phytase[myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase 상동성 (3-6,8,23)]에 유의하게 유사한 것으로 판단되었다. *S. coelicolor* A3(2)M의 염색체 DNA를 주형으로 PCR 방법으로 SCO7697 전체를 포함하는 DNA 단편을 클로닝하였다. 두 가지의 서로 다른 길이를 갖는 클로닝 된 ID1103135 DNA 단편을 *E. coli* 발현용 벡터 pET28a(+)에 삽입하여, 두 종의 재조합 벡터 pET28-SP와 pET28-LP를 얻었다. pET28-SP와 pET28-LP를 각각 *E. coli* BL21에 도입하여, IPTG로 발현 유도된 단백질을 SDS-polyacrylamide 전기영동으로 확인한 결과, 발현은 성공적으로 이루어 졌으나 대부분 불용체를 형성하고 분자량은 예상보다 약간 큰 것으로 나타났다. 불용체 형성은 단백질의 불활성화를 수반 함으로서, 배양 온도를 37°C에서 30°C로 변화시켜 배양하는 방법으로 발현된 단백질을 가용화시켰다. 발현된 단백질을 추출하여 조추출물 또는 정제한 상태로 phytase 활성을 측정하였으나 효소활성은 관찰할 수 없었다. 대장균 시스템에서의 발현이 효소 활성의 소실을 초래했을 가능성이 있으므로, ID1103135 유전자를 자신의 promoter를 함유하도록 PCR 클로닝하여, *E. coli* - *Streptomyces*의 shuttle vector인 pWHM3에 삽입하고, 이를 방선균 호스트인 *S. lividans*에 도입하였다. 형질 전환체의 세포 조추출액 및 세포배양액의 phytase 활성을 측정하였으나, 역시 활성을 확인할 수 없었다. 이와 같은 결과는 SCO7697이 아주 높은 확률(E value; 6e⁻⁸⁹)로 phytase일 것으로 annotation 되었으나, 실제로 이와는 다른 기능을 함유하고 있음을 시사하고 있다.

Key words □ phytase, phytic acid, *S. coelicolor*, SCO7697

Phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase[3-6, 8, 23])는 phosphatase의 한 종류로서 phytic acid를 분해하여 phosphate와 phosphate inositol 및 inositol을 만드는 효소이다(16, 17).

식물성 식품 중에 약 1~2% 존재하는 phytic acid는 담황색의 점액성 용액으로서 물 및 알코올과 잘 혼합되는 강산성 물질이며 Ca, Mg, Fe, Cu 및 Zn 등의 2가 혹은 3가 금속이온 등 여러 가지 금속 이온과 복합체를 만들어 불용성 화합물이 되기 때문에 무기질의 체내 흡수를 저해하는 중요한 antinutritional factor로 작용한다. 더욱이 단백질과 결합하여 protein-phytate 복합체를 형성하기 때문에 용해도를 감소시켜 단백질 분해 효소의 작용을 저해하고 단백질의 체내 흡수를 감소시킨다고 보고된 바 있다(16).

이런 phytic acid는 가축의 사료로 사용하는 주요 곡물 내 인 함량의 50~70%를 차지하는 매우 중요한 유기물질이다(19). 그러나 닭과 돼지 등의 단위 가축은 소화관내에 phytic acid를 분해하는 phytase를 생산하지 못하며, 그로 인해 사료내 인의 이용률이 극히 낮은 것으로 밝혀졌다. 또한 phytic acid는 단위 동물에

중요한 미량의 광물질, 아미노산, 비타민 등과 결합함으로써 이들 영양분의 동물 체내로의 흡수를 막고 분뇨로 배출되게 한다. 이와 같이 소화 흡수 되지 못한 phytic acid는 상수원 등에 유입되어 소호수의 녹조, 바다의 적조 현상을 유발하는 중요한 환경 오염원으로 작용한다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 phytase를 사료 내에 첨가하여 사용함으로써 단위 동물이 사료내의 불용성 인을 이용할 수 있게 되고, 동시에 중요한 미량 생체활성 물질의 이용성을 증진 시키며, 동물 분으로 배출되는 인의 함량을 감소 시킴으로써 환경오염을 방지하게 된다.

본 연구에서는 유전정보 해독이 완료된 토양 방선균인 *S. coelicolor*의 전 유전체 정보로부터 phytase 상동성을 보이는 유전자 부분을 탐색하였고, 이 유전자 부분이 *Bacillus subtilis*, *Gloeobacter violaceus*에 존재하는 기존의 phytase와 26-47%의 homology를 보인다는 것을 알아냈다. 따라서 이 유전자를 클로닝하여 대량 발현 시켜 효소 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

DNA 추출 및 조작

S. coelicolor A3(2)M의 염색체 DNA는 Hopwood (9) 등의 방

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-6198, Fax: 031-335-8249
E-mail: skhong@mju.ac.kr

법에 따라 추출하였으며, 대장균에서의 형질전환 및 plasmid DNA는 Maniatis(15)등의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한효소 및 T4 DNA ligase (Takara, Korea)등을 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 회사의 방법을 따랐다.

유전자의 분리 및 동정

S. coelicolor A3(2)M 에 존재하는 phytase 상동성 gene을 분리하기 위해서, 방선균의 genomic DNA를 얻었다(16). 그리고 조사한 sequence를 바탕으로 primer를 제작해서, PCR법으로 DNA를 증폭시켜 클로닝 하였다. PCR 반응은 *S. coelicolor* A3(2)M의 염색체 DNA를 template로 사용하였고, primer는 각각 100 pmol을 사용하였으며, TaKaRa사의 Taq polymerase (TaKaRa Co., Japan)를 사용하였다. 98°C에서 2분간 DNA를 변성시킨 후, 96°C에서 1분간 1회 후, 98°C에서 30초, 68°C에서 90초간의 단계로 30회 반복하여 증폭한 후, 72°C에서 10분간 최종증폭 하였다.

유전자의 클로닝

PCR 산물을 pGEM-T Easy vector에 도입한 후, *E. coli* 발현용 벡터인 pET28a(+) 및 *E. coli-streptomyces* shuttle vector인 pWHM3 vector에 적당한 효소를 이용해서 클로닝 했다.

대장균에서 유전자의 대량 발현

IPTG를 이용한 SCO7697의 대량 발현은 Smith 등의 방법을 변형하여 실시하였다(11). *E. coli* BL21을 LB 액체 배지에 ampicillin (50 µg/ml)과 함께 접종하여 12시간 배양한 후 3,000 × g에서 10분간 원심분리하여 균체만을 모은 후 동량의 M9 액체배지를 이용하여 부유시켰다. 3,000 × g에서 10분간 다시 원심분리한 후 M9 배지에 재부유하여 ampicillin (50 mg/ml) 100 µl와 함께 1 ml을 100 ml의 M9 액체 배지에 접종하여 2시간 배양한 후, IPTG를 1 mM을 첨가하여 3시간동안 발현시킨 다음 3,000 × g에서 20분간 원심분리후 균체만을 모아 -20°C에 보관하였다. *E. coli* BL21을 이용한 SCO7697의 발현유도실험은, 배양 온도를 37°C와 30°C로 변화시켜 사용하였다.

단백질의 정량

각각의 배양 조건에서 성장한 균체의 단백질의 양을 측정하기 위해서 Bradford 분석법을 이용하였다(2). 배양한 균체에 각각 300 µl의 완충액을 넣어 현탁시키고, 초음파분쇄기로 분쇄한 후 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻어진 침전물과 상등액을 이용하여 각각의 단백질의 양을 측정하였는데, 이때 BSA (bovine serum albumin)를 표준품으로 이용하여 standard curve를 작성한 후 측정하였다.

방선균의 형질 전환

S. lividans 균주를 방선균 배지인 R2YE 배지에서 36시간 동안 27~30°C에서 배양했고, 진탕 배양은 50~300g에서 진행시켰다. 균체를 원심분리하여 lysozyme (1 mg/ml)을 포함한 P완충액 20

ml을 넣고 30°C에서 15~60분 정도 처리하면서 반응중간에 원형질체(1) 생성 정도를 현미경으로 확인하였다. 원형질체가 형성되지 않은 균체는 멸균된 목면필터로 여과하여 제거하고, 여과된 것은 P완충액으로 세척하고 다시 P완충액에 녹인 후 분주해서 -70°C에 보관하였다. 형질전환 시에는 보관된 원형질체를 37°C에서 신속히 녹여주고 T 완충액(25% PEG1000 포함)을 1 ml를 첨가한 후 즉시 20 µl DNA (1 µg)를 섞어준 다음, 1분 후에 5 ml의 P완충액으로 녹였다. 이를 분주해서 각 샘플에 0.8% 한천을 첨가한 R2YE 배지 2.5 ml을 잘 섞은 후 R2YE 재생 배지에 접종하여 배양하였다. *S. lividans*는 30°C에서 18~24시간 배양 후에 thioestreptone (25 µg/ml)을 포함한 0.6% 소프트 R2YE 한천배지 3 ml을 overlay 하였다. 이를 28°C에서 3~5일 배양하여 자라나는 형질 전환체를 선택하여 분석하였다.

방선균 형질전환체의 발현 분석

R2YE 평판 배지에서 자라나는 형질 전환체를 R2YE 배지에 접종하여 30°C에서 8일간 배양했다. 채취한 샘플은 -70°C에서 보관하였다가 4,000 × g에서 15분간 원심 분리하여 균체를, TE 완충액(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA(pH8.0))에 세포당 5 ml/mg 농도로 현탁시켰다. 각 샘플에 lysozyme 용액(100 mg/ml)을 1 µg/100 µl 씩 넣고 초음파분쇄기로 세포를 깨뜨린 후 4,000 × g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 세포 조추출물을 효소활성 측정 및 단백질 전기영동에 사용하였다. 단백질 샘플은 끓는 물에 10분간 처리해서 단백질을 변성시켜서 10% SDS PAGE으로 단백질의 발현을 확인했다. 또한, 세포를 침전시킨후 얻은 배양액을 100% trichloroacetic acid (TCA)로 침전하여 중화시킨 후 효소활성 측정 및 전기영동 분석을 실시하였다.

효소의 활성 측정

Phytase 활성 측정은 Suthluk 방법을 변형해서 사용했다(10, 12-14, 18, 20, 22). TE 완충액을 첨가한 각 샘플 100 µl 에 기질 완충액 (1% sodium phytate in 0.1M Tris-HCl [pH 7.0]) 400 µl를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 500 µl의 15% TCA를 넣고, 500 µl를 assay mixture (1M H₂SO₄:2.5% ammonium molybdate:10% ascorbic acid = 3:1:1) 500 µl와 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 820 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 각 sample 100 µl 에 15% TCA 500 µl를 첨가해서 효소 활성을 멈춘 다음, 기질 완충액을 넣고 반응시켜서 측정하였다.

결과 및 고찰

유전자 ID1103135의 클로닝

방선균 유래의 phytase에 관하여 연구하기 위해, 최근 보고된 *S. coelicolor* A3(2)M의 전 유전정보로부터 phytase 후보유전자를 탐색하였다. 그 결과, probable secreted hydrolase로 등록된 ORF SCO7697가 Pfam에 등록된 PFO2333 phytase와 387개의 아미노산 중 31%의 identity를 보이는 아주 가능성이 높은 후보 유전자

로 판단되었다. SCO7697 단백질을 유사성 분석한 결과, 이미 알려진 *Bacillus subtilis*의 phytase (10-11, 24)와는 26%의 아미노산 sequence homology를 확인할 수 있었으며, genome sequencing이 완료된 *Gloeobacter violaceus*의 putative phytase gene과는 47%, *Nostoc sp. PCC7120*의 putative phytase gene과는 37%의 homology를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 본 결과로부터 SCO7697이 phytase를 코드하고 있을 가능성이 아주 높을 것으로 판단되어 본 유전자의 클로닝 및 대량발현 연구를 실시하였다.

S. coelicolor A3(2)M의 염색체 DNA에 존재하는 SCO7697 단편을 분리하기 위해서, 방선균의 genomic DNA를 분리하였다. 그리고 보고된 sequence를 바탕으로 대장균용 발현 발현 벡터인 pET28a(+)와 방선균용 발현 벡터인 pWHM3에 도입하기 위하여 Table 1과 같은 프라이머를 제작하였다. 대장균 발현 벡터에 유전자를 도입하기 위하여, 예상되는 전사개시부위로부터 전사가 시작되도록 하기 위하여 EF2 및 ER1 primer를 사용하였으며, 이보다 상부에서 전사가 시작되도록 EF1과 ER1 primer를 사용하여 PCR을 수행하였다(Fig. 2A). PCR 반응은 *S. coelicolor* A3(2)M chromosomal DNA를 template로 사용하였고, primer는 각각 100 pmol을 사용하였으며, TaKaRa사의 Taq polymerase (TaKaRa Co., Japan)를 사용하였다. 98°C에서 2분간 DNA를 변성시킨 후, 96°C에서 1분간 1회 후, 98°C에서 30초, 68°C에서 90초간의 단계로 30회 반복하여 증폭한 후, 72°C에서 10분간 최종증폭 하였다. 얻어진 약 1.4 및 1.3 kbp의 PCR 산물을 각각 pGEM-T Easy vector에 클로닝하여 염기서열을 확인한 후, pET 28a(+)-의 *EcoRI-HindIII* 및 *NdeI-HindIII* site에 cloning 하여 두 가지 재조합 벡터 pET28-LP와 pET28-SP를 얻었다(Fig. 2B). Primer EF1과 RF1으로 증폭하여 얻은 pET28-LP는 N-terminal에 벡터유래의 his-tag을 포함한 526개의 아미노산으로 구성된 분자량 58.37 kDa의 단백질이 발현될 것으로 예상되었고, primer EF2와 RF1으로 증폭하여 얻은 pET28-SP는 463개의 아미노산으로 구성된 분자량 48.77 kDa의 단백질을 코드 할 것으로 예상 되었다(Fig. 2B).

Table 1. List of primers used in this study*

Name	Primer sequence
EF1	5'-CTC GGC CAC <u>GAA TTC</u> GTC GC-3' <i>EcoRI</i>
EF2	5'-GAC GAA GGA GAC AGC <u>ATA TGC</u> ACG CGT TC-3' <i>NdeI</i>
ER1	5'-CGG CCC <u>GGG CCC</u> GGG TCG-3' <i>SmaI</i>
SF1	5'-C TGC AGA GCA TGA TCC GTT CCC T-3'
SR1	5'-AG GCG CTC GAC GAC TGA GAG CCA-3'

대장균에서 ID1103135 유전자의 발현

클로닝 된 SCO7697의 대량발현 및 phytase 활성을 조사하기 위하여, pET28-LP와 pET28-SP 재조합 벡터를 *E. coli* BL21 균주에 도입하였다. *E. coli* 형질전환체를 선발하여, 다음과 같은 방법으로 발현 여부를 확인하였다. 우선 형질 전환체를 37°C에서 전 배양하고, 이를 새로운 배지에 접종하여 A₅₅₀이 0.6-0.8이 될 때까지 배양하고, IPTG induction을 실시하였다. IPTG 첨가후에는 배양온도를 30°C로 옮겨 4시간 후 배양을 중지하였다. 4,000 g에서 15분 원심분리를 해서 균체를 액체 배지와 분리한 후, 초음파분쇄기로 세포를 깨뜨린 후 4,000 × g에서 20분을 원심분리해서 pellet과 lysate로 분리하고, 10% SDS PAGE 단백질의 발현을 확인했다.

단백질의 예상되는 크기는 N-terminal에 부가된 아미노산을 포함하여 각각 58.4 및 48.8 kDa 이었으나, IPTG induction 후에 나타나는 단백질은 이보다 10 kDa 정도 큰 69 및 59 kDa 정도로 예측되었다(Fig. 3A)(21). SDS-PAGE 상에서의 단백질의 운동성은 단백질의 속성에 따라 약간씩 다르게 나타나므로, 본 연구 결과 클론된 유전자는 대장균계에서 잘 발현되고 있으며, 배양온도의 변화로 봉입체 형성을 줄이고 가용화가 가능한 것으로 판단되었다.

Sodium phytate를 이용한 phytase 효소 활성 측정 결과, 벡터

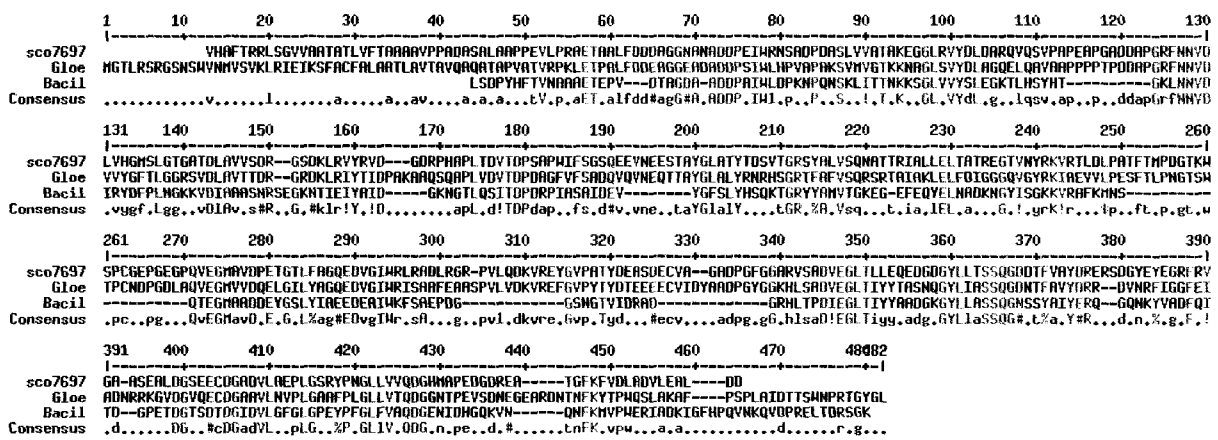


Fig. 1. Amino acid comparison of the SCO7697 and two phytases. G1oe, probable phytase from *Sgloeobacter violaceus* PCC 7421 (BAC90040); Bac11, phytase (PhyC) from *Bacillus subtilis* (AJ584664.1).

A 1 C TGC AGA GCA TGA TCC GTT CCC TGC GCG ACG ACG AGG GCG TAT AGC 46
 SF
 47 CCC GGT CAA CTC CCC GAG GGG CAG GGC CGA TCC GTT CAC CCC TCG GGC 94
 EF1
 95 ACG CAT CCG TCG CCG GCG GGC TGC CCG GGC GAC GCG CGT CCT CCG CCT 142
 143 CCG TTG CCG ATC ATG TGA CCG CCG CCC AGT GGT GGG TGC GGC CCG GCT 190
 191 CCG TAC GTC GCG GGC GCG TGG CCG TCA CCC GTT CCC CGA CGA AGG AGA 238
 239 CAG CTC GTC CAC GCG TTC ACA AGA CCG CTT TCC GGT GTC GTC GCG GCG 286
 EF2
 1 V H A F T R R L S G V V A A 14

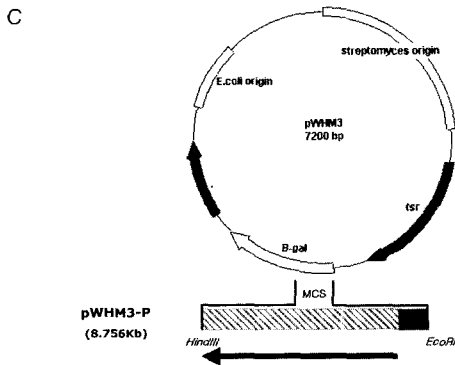
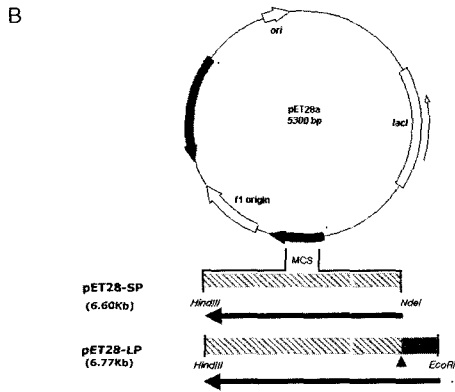


Fig. 2. Nucleotide sequence of the promoter region of SCO7697 (A) and restriction maps of expression vector in *E. coli* (B) and *Streptomyces* (C). (A) The initiation codon is italicized and part of the amino acid sequence deduced from the ORF is shown beneath the nucleotide sequences in one-letter code. The ribosome binding site (RBS) is indicated by bold letters and the nucleotide sequences that were used for primers are underlined. (B) The restriction enzyme sites used for cloning are placed at both ends of the inserts. The DNA fragments obtained from PCR were inserted into pET28a(+) to generate pET28-SP and pET28-LP. The extra 52 amino acids that will be added in N-terminal region of Sco7697 were marked with Nadd and the original translational initiation codon was indicated by arrow. The coding regions are depicted by the thick arrows under the inserted fragments. (C) The *Streptomyces-E. coli* shuttle vector, pWHM3, was ligated with the PCR product. The promoter region of the PCR product was also marked with P. Abbreviations: tsr, thiostreptone resistance; β -gal, β -galactosidase.

만을 도입한 대조군과 비교하여 형질 전환체에서의 phytase 활성의 유의한 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 3B). 또한, metal-chelating affinity chromatography를 이용하여 his-tagged protein

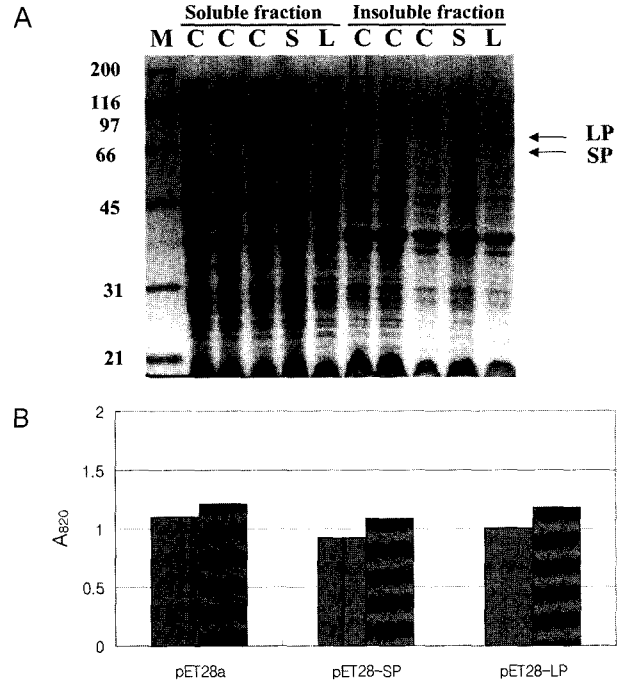


Fig. 3. Detection of expressed protein (A) and measurement of phytase activity in *E. coli* transformed with pET28-SP and pET28-LP (B). (A) The cellular protein of *E. coli* was separated into soluble and insoluble fractions by the simple centrifugation and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. lane M, molecular weight standards; lane C, sample from *E. coli* carrying pET28a(+); lane S, sample from *E. coli* carrying pET28-SP; lane L, sample from *E. coli* carrying pET28-LP. The overexpressed proteins with molecular weights of 59 and 69 kDa are indicated by large arrows in the transformants with pET28-SP and pET28-LP, respectively. (B) The phytase activity of the samples were measured as described in the text. The phytase activity measured in pH 7.0 were depicted with filled squares and those in pH 5.0 were represented by the dashed squares.

만을 정제하여 활성을 측정하였으나, phytase 활성은 보이지 않았다(자료 미제시).

방선균에서 ID1103135 유전자의 발현

상기의 결과로부터, 방선균의 유전자가 대장균에서 active form으로 발현되지 않았거나, N-terminal processing이 대장균에서 일어나지 않아 활성이 없을 가능성이 제기되었고, 따라서 방선균계를 이용하여 본 유전자를 발현하기로 하였다. 이를 위하여 본 유전자 자신의 promoter를 포함하도록 고안된 primer SF1 및 SR1을 이용하여 PCR을 수행하였고, 1.5 kbp의 PCR 산물을 pGEM-T Easy vector에 도입하여 염기서열을 확인한 후, 대장균과 방선균의 shuttle vector인 pWHM3 vector의 HindIII-EcoRI site에 도입하였다. 이를 *S. lividans*의 protoplast에 PEG 처리법으로 형질 전환 시켰으며, 이 중 세 개의 형질전환체를 선발하여 phytase 활성을 측정하였다.

R2YE 배지에서 배양한 균체 및 배양액을 이용하여 phytase 활성을 측정하였지만 효소활성은 발견되지 않았다(Fig. 4B). 단백

질 발현을 SDS-PAGE 확인한 결과, 세포 조 추출액에서는 다수의 방선균 단백질이 있어 전기 영동상에서 관찰이 어려웠으나, 배양액을 TCA침전한 경우에는 예상크기의 단백질이 관찰되어, ID1103135 유전자가 코드하는 SCO7697 단백질은 세포외로 분비되는 단백질 일 것임을 시사하였다(Fig. 4A). 실제로, 이용 가능한 data base로부터 SCO7697 단백질은 33개로 구성된 분비 signal peptide를 갖는 것으로 예상되었다.

이상과 같이 *S. coelicolor* genomic DNA로부터 phytase homologue gene을 코드 할 것으로 예상되는 SCO7697 유전자를 cloning하여 *E. coli* 및 *S. lividans*에 발현시킨 후에 효소활성을 조사하였다. *E. coli*에서는 soluble form으로 발현되었으나 효소 활성을 확인할 수 없었다. 또한, 자체 promoter를 포함한 전체

유전자를 *S. lividans*에 도입한 경우에도 phytase 활성을 확인할 수 없었다. 이와 같은 결과는 우리가 클로닝한 SCO7697 단편이 비록 phytase를 코드할 것으로 annotation 되어 있는 있지만, 사실은 phytase 효소가 아닌 다른 종류의 hydrolase 효소를 코드하고 있을 것으로 추정 되었다. 이와 같은 부정적 결과를 보고하는 이유는 homology search 결과에 의존하여 진행될 post-genomic 시대의 연구에 에서는 보다 면밀한 확률적 조사가 필요하다는 사실을 보고하고, 특히 phytase와 같이 산업적으로 유용한 효소를 연구하려는 연구자에게는 본 SCO7697 단편이 phytase를 코드하고 있지 않다는 사실이 유용한 지식이 될 것으로 판단하기 때문이다. 비록, *S. lividans*나 *S. coelicolor* 자체가 약간의 phytase 활성을 보이고는 있으나 이는 균주가 분비하는 phytase 에 의한 것이 라기 보다는 다른 종류의 hydrolase의 활성에 기인한 것으로 판단된다(Fig. 3, 4).

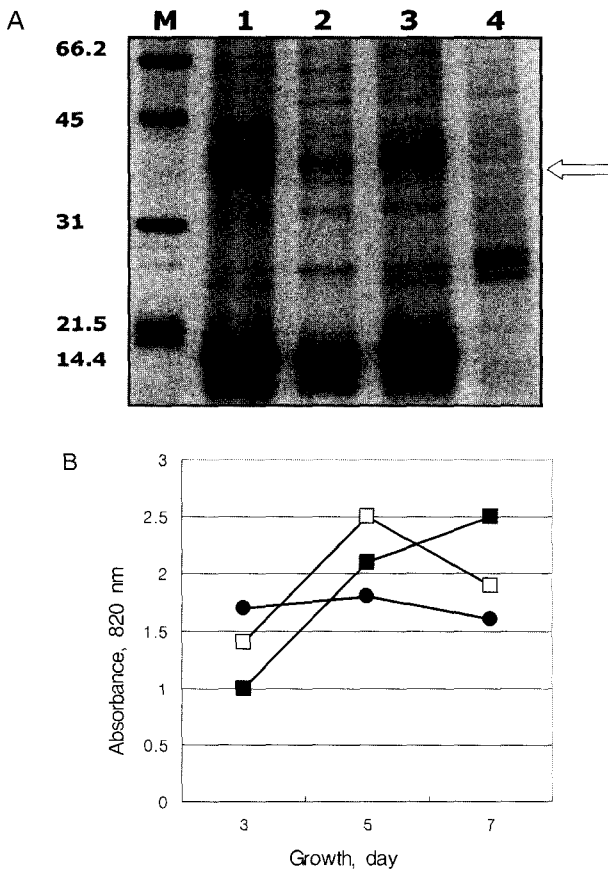


Fig. 4. Detection of expressed protein and measurement of phytase activity in *S. lividans* TK24 transformed with pWHM3-P. (A) The extracellular protein of *S. lividans* in the R2YE culture broth was precipitated by 100% TCA after 5 days cultivation, and then analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Lane M, molecular weight standards; lane 1, sample from *S. lividans* carrying pWHM3 as the control; lane 2 and 3, samples from *S. lividans* carrying pWHM3-P; lane 4, sample from *S. coelicolor*. The protein that was expected to have a molecular weight of 41.225 kDa after cleavage of signal peptide is indicated by large arrows. (B) The phytase activities of *S. lividans* carrying pWHM3 (□), *S. lividans* carrying pWHM3-P (■), and *S. coelicolor* (●) were measured as described in the text.

감사의 말

본 연구는 산업 자원부 공동핵심개발사업 (과제번호 1000-5636) 연구지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Ashok P., S. George, R.S. Carlos, A.R. Jose, and T.S. Vanete. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource technol.* 77, 203-214.
2. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
3. Cosgrove, D.J. 1970. Inositol phosphate phosphatase of microbiological origin. Inositol pentaphosphate intermediates in the dephosphorylation of the hexaphosphates of *myo*-inositol, *scyllo*-inositol, and *D-chiro*-inositol, by a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *J. Biol. Sci.* 23, 1207-1220.
4. Greiner, R. and M. Larsson Alminger. 2001. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by phytases of cereals. *J. Food Biochem.* 25, 229-248.
5. Greiner, R., M. Larsson Alminger, and N.G. Carlsson. 2001. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytase of bakers yeast. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2228-2233.
6. Greiner, R., N.G. Carlsson, and M. Larsson Alminger. 2000. Stereospecificity of *myo*-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by a phytase of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 84, 53-62.
7. Harper, D., A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C.W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, and T. Hornsby. 2002. Complete genome sequence of the *S. coelicolor* A3(2). *Nature* . 417, 141-147.
8. Hayakawa, T., K. Suzuki, H. Miura, T. Ohno, and I. Igaue. 1990. Myoinositol polyphosphate intermediates in the dephosphorylation of phytic acid by acid phosphatase with phytase activity from rice bran. *Agric. Biol. Chem.* 54, 279-286.
9. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, and H. Schrempf. 1985. In Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes Foundation. Norwich.

10. Kerovuo J. and S. Tynkkynen. 2000. Expression of *Bacillus subtilis* phytase in *Lactobacillus plantarum* 755. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 325-9.
11. Kerovuo J., M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkkinen, and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2079-85.
12. Kim, W.C., B.C. Oh, H.K. Kim, S.C. Kang and T.K. Oh. Characterization and cloning of a phytase from *Escherichia coli* WC7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 1, 1-7.
13. Kim, Y.O. and H.K. Kim. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* Sp. DS11. *Enzym. Microb. Technol.* 22, 2-7.
14. Lim, P.E. and M.E. Tate. The phytases: II. 1970. Properties of phytase fraction F1 and F2 from wheat bran and the *myo*-inositol phosphates produced by fraction F2. *Biochim. Biophys. Acta.* 302, 326-328.
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U. S. A.
16. Mikico Shimizu. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1364-1365.
17. Miksch, G., S. Kleist, K. Friehs, and E. Flaschel. 2002. Overexpression of the phytase from *Escherichia coli* and its extracellular production in bioreactors. *Appl. Microbiol. biotechnol.* 59, 685-694.
18. Rackis, J.J. and R.L. Anderson. 1977. Mineral availability in soy protein products. *Food Prod.* 11, 38
19. Reddy N.R., S.K. Sathe, and D.K. Salunkhe. 1982. Phytates in legumes and cereals. *Adv. Food Res.* 28, 1-92.
20. Suthiluk P., K. Chananart, and D. Saovane. 2002. Thermo-acid-tolerant phytase production from a soil bacterium in a medium containing rice bran and soybean meal extract. *Bioresource Technol.* 87, 295-298.
21. Tadashi N., T. Tatsuya, and A. Hideharu. 1999. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Appl Environ. microb.* 65, 4682-4684.
22. Tanveer A., R. Shahid, S. Muhammad, H. Ahsan-ul, and H. Zia-ul. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. *Anim. feed Sci Tech.* 83, 103-114.
23. Tye, A.J., F.K.Y.Siu, T.Y.C.Leung, and B.L. Lim. 2002. Molecular cloning and the biochemical characterization of two novel phytases from *B. subtilis* 168 and *B. licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 190-197.
24. Wang Y., B. Yao, H. Zeng, X. Shi, S. Cao, T. Yuan, and Y. Fang. 2001. Purification and properties of neutral phytase from *Bacillus subtilis*. Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences 41, 198-203.

(Received May 24, 2004/Accepted June 3, 2004)

ABSTRACT : Functional Analysis of Gene ID1103135 Encoding a 3-Phytase Precursor Homologue of *Streptomyces coelicolor*

Mi-Soon Kim, Dae-Kyung Kang¹, Hong Sub Lee², Seung Woo Yeon², Tae Yong Kim², and Soon-Kwang Hong* (Department of Biological Science, College of Natural Science, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ¹Bio-Resources Institute, Easy Bio System Inc., Chonan 330-820, Korea, ²ILDONG Research Laboratory, ILDONG Pharmaceutical Co. Ltd., 265-5, Yongin 449-910, Korea)

Among the annotated ORFs of *Streptomyces coelicolor*, SCO7697 was supposed to encode for phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase). The DNA fragment containing SCO7697 was cloned by the PCR from the chromosomal DNA of *S.coelicolor* A3(2)M. The cloned fragment was introduced into *E. coli* expression vector, pET28a(+), to yield two recombinant plasmids, pET28-SP and pET28-LP, which were designed to encode different length of proteins. When the pET28-SP and pET28-LP were introduced into *E. coli* BL21, the transformants successfully overexpressed recombinant proteins, but the molecular weights of the expressed proteins were appeared bigger than those of expected in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The shift of cultural temperature from 37 to 30°C made most of expressed protein be solubilized. The expressed protein, however, did not show any phytase activity. When the DNA fragment with its own promoter placed on the *E. coli-Streptomyces* vector, pWHM3, and introduced into *S. lividans*, the phytase activity was not detected either. These results suggest that even though the SCO7697 was annotated as a probable phytase with high probability (E value is 6e⁻⁸⁹), the real product does not have phytase activity.