

*Bifidobacterium longum*의 Sucrose 대사 관련 *scr* 유전자군의 특성 규명

권태연 · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Characterization of the *scr* Gene Cluster Involved in Sucrose Utilization in *Bifidobacterium longum*.
Kwon, Taeyeon and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea – The nucleotide sequence of 8.6-kb *EcoRI* fragment containing sucrose phosphorylase gene isolated from *Bifidobacterium longum* SJ32 was determined. It was found that the fragment contained five open reading frames including the gene cluster for sucrose utilization such as a sucrose phosphorylase (ScrP), a sucrose transporter (ScrT), and a GalR-LacI-type transcriptional regulator (ScrR) identified by amino acid homology. Each gene showed over 94% amino acid homology among various *B. longum* strains. Genomic organization of the gene cluster is the same as those of other strains of *B. longum* but different from that of *B. lactis*. In spite of high homology of each gene among *B. longum* strains, the difference of flanking sequences of the gene cluster between strains SJ32 and NCC2705 insinuates the horizontal transfer of *scrPTR* between *B. longum* strains. The increase of sucrose phosphorylase activity in heterologous *E. coli* system by the co-expression of *scrT* with *scrP* against the single expression of *scrP* was measured. It seems to be the result of sucrose uptake increment by *scrT* in the host and is an indirect evidence that *scrT* is the gene for sucrose transport. The existence of multiple sucrose uptake systems in *B. longum* is supposed from the findings of several genes besides *scrPTR* involved in sucrose uptake in the genome of *B. longum* NCC2705.

Key words: *Bifidobacterium longum*, sucrose phosphorylase, *scrP*, *scrT*, *scrR*, sucrose uptake

Bifidobacteria는 대표적인 장내 유익균으로 항암활성, 면역기능 강화, 혈청콜레스테롤 저하, 유당불내증의 개선 및 vitamin B-complex 합성 등의 건강기능성을 가지고 있는 것으로 보고되었다[4, 7, 13, 16]. 뿐만 아니라 α -galactosidase, β -galactosidase, β -xylosidase, α -glucosidase, β -glucosidase와 같은 비소화성 올리고당을 분해할 수 있는 가수분해효소를 생산하여, 결장 내에서의 탄수화물 발효에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다[2,10,17,19]. 이미 인체에 대한 안전성이 증명되었기 때문에 식품관련 산업에서의 bifidobacteria 유래 올리고당 가수분해효소의 생산 및 적용은 매우 유망한 것으로 전망된다. 특히 inulin, oligofructose, raffinose 등의 올리고당이 bifidobacteria의 성장을 도와주는 prebiotics라고 보고되면서 bifidobacteria의 탄수화물 대사와 관련된 유전학적 연구에 대한 관심이 증가하고 있다[17].

본 연구자들은 α -결합으로 연결된 올리고당을 분해할 수 있는 효소를 대량생산하여 식품산업에 도입하는 것을 목표로 한국인의 분변에서 분리한 *Bifidobacterium longum* SJ32 균주로부터 $\alpha(1,2)$ 와 $\alpha(1,6)$ glycosidic linkage를 보유한 raffinose를 분해할 수 있는 효소 유전자의 cloning을 시도하

여 $\alpha(1,2)$ 결합을 절단할 수 있는 효소를 암호화하는 8.6 kb의 *EcoRI* 단편을 cloning하였고(Fig. 1), 이 단편이 포함된 pUC19 plasmid, pMJ1의 subcloning을 수행하여 약 2.7 kb *EcoRI-SmaI* 단편의 염기서열을 결정하였다[5]. 또한 염기서열로부터 번역되는 아미노산서열의 상동성 검사 및 재조합 효소의 기질에 대한 반응성에 근거하여 cloning한 유전자를 sucrose phosphorylase 유전자(splP)로 보고하였다[5].

Sucrose phosphorylase는 sucrose와 inorganic phosphate를 D-fructose와 α -D-glucose-1-phosphate (G-1-P)로 전환시키는 반응과 그 역반응을 촉매하는 효소로 phosphorolysis와 더불어 transglycosylation 활성도 보유하고 있다[6]. 즉, sucrose와 inorganic phosphate의 존재 하에 sucrose의 glucose에 inorganic phosphate를 전이시켜 G-1-P와 D-fructose를 형성하며, 그 역반응에서는 G-1-P의 glucose 부분을 D-fructose에 전이시켜 sucrose와 inorganic phosphate를 형성한다[8].

본 연구에서는 *B. longum* SJ32 균주로부터 cloning한 sucrose phosphorylase 유전자 주변의 염기서열을 결정하고, 그 결과 발견된 sucrose 대사 관련 유전자들의 구성 및 특성을 규명하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-249-9656, Fax: 82-31-253-1165

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

재료 및 방법

염기서열 결정 및 분석

염기서열은 수탁업체 (TaKaRa, Korea)에 의뢰하여 결정하였고, 염기서열 및 아미노산서열 분석에는 CLUSTAL W multi-alignment program (European molecular biology laboratory, Germany)과 DNASIS software (Hitachi software engineering company, Japan)를 이용하였다. 염기서열과 아미노산서열의 상동성 검사에는 GenBank database에 수록된 정보를 대상으로 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 BLAST program을 사용하였다.

PCR 증폭 및 cloning

유전자의 증폭을 위한 PCR에서는 template DNA는 0.1 µg 이하로, primer는 20 pmol 농도로 첨가하였고, 0.25 mM의 dNTP와 2 unit의 *Taq* polymerase (TaKaRa)를 첨가하여 UNO II thermal cycler (Biometra, Germany)를 증폭에 사용하였다. *scrP* 증폭에는 염기서열에 상보적으로 제작한 forward primer ScrP-F (5'-ATg AAA AAC AAA gTg CAA CTC ATC-3')와 reverse primer ScrP-R (5'-ggT TAG TCg ATA TCg gCA ATC g-3')을 사용하였고, *scrPT*의 증폭에는 ScrP-F와 reverse primer ScrT-R (5'-TTA TTC ggC AgA TTT ggT ggT gA-3')을 사용하였다. 온도조건은 95°C에서 5분 예열한 다음, 94°C 1분, 68°C 1분, 72 °C 1분 과정을 30회 반복 수행하도록 설정하였다. *scrPT* 증폭 시에는 annealing 온도만을 66.5°C로 바꾸어 수행하였다.

증폭된 단편은 전기영동한 다음, 0.8% agarose gel에서 회수하여 pGEM-T Easy vector (Promega, USA)에 cloning한 후, pUC18에 다시 cloning하여 유전자 조작용 숙주로 사용한 *Escherichia coil* JM109을 형질전환하였다.

Sucrose phosphorylase 활성 측정

균체 배양액 1.5 ml를 12,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 회수한 균체를 100 mM HEPES buffer (pH 7.5)로 2번 씻은 후, 같은 buffer에 현탁하고 적당량의 glass bead를 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포 추출액을 12,000

rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소로 사용하였다.

HEPES buffer에 녹인 10 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (*p*NP-Glc) 기질용액 200 µl를 40°C에서 예온시킨 후, 효소액 8 µl를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시켰다. 냉각된 200 mM Na₂CO₃ 용액 500 µl를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음, 반응액의 흡광도를 400 nm에서 측정하여 활성으로 환산하였다. 효소의 활성은 *p*-nitrophenol (*p*NP) 표준 곡선으로부터 산출하였고, 효소 활성 단위는 상기 조건에서 1분 동안 1 µmol의 *p*NP를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다[1].

단백질 정량은 bovine gamma globulin을 표준물질로 하여 Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Sucrose 대사 관련 유전자군의 염기서열 분석

SJ32 균주 유래 *splP* 유전자의 염기서열로부터 번역되는 추정 아미노산서열은 2003년에 완성된 *B. longum* NCC2705의 유전체 염기서열(NC_004307) 중, sucrose phosphorylase (ScrP)의 아미노산서열과 98% 상동성을 가지고 있었고, *B. lactis*의 ScrP와는 84% 상동성을 나타내었다(Table 1) [5, 17]. 뿐만 아니라, NCC2705 균주의 *scrP* 하류에서는 sucrose transporter로 추정되는 *scrT* 유전자의 존재가 발견되어, 본 연구자들은 pMJ1의 전체 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정 결과, pMJ1의 8.6 kb 단편에는 모두 5개의 open reading frame (ORF)이 존재하는 것으로 나타났고, 기존에 보고된 *B. longum* 유래의 sucrose transporter (ScrT) 및 sucrose 대사에 관여하는 GalR-LacI-type transcriptional regulator (ScrR)와 90% 이상의 아미노산서열 상동성을 보유한 ORF가 *splP*의 하류에 위치하고 있었다(Fig. 1). 따라서 이들 ORF는 sucrose 대사에 관여하는 유전자임이 확실시 되어, 이들 ORF를 각각 *scrT*, *scrR*로 명명하였고 *splP*는 *scrP*로 수정하였다. Bifidobacteria 유래 sucrose 대사 관련 ScrP, ScrT, ScrR의 상동성을 Table 1에 나타내었다.

scrP 유전자: 1,527 bp 크기의 SJ32 균주 유래 *scrP*는 508개의 아미노산을 암호화하고, 다른 bifidobacteria 유래

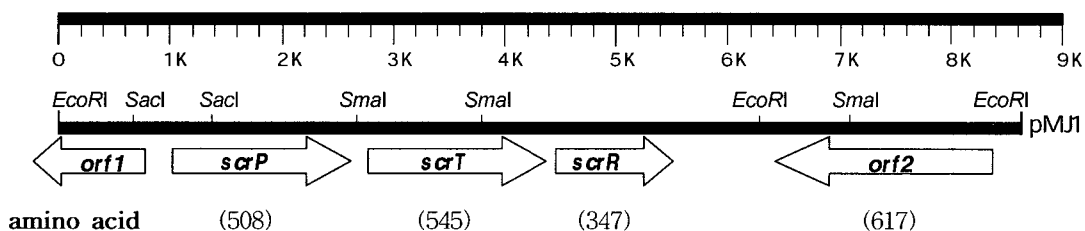


Fig. 1. Schematic representation of the open reading frames in the insert of pMJ1. The extent and direction of each gene is illustrated with open arrows. The number of amino acid of the protein specified by each gene is given below the gene. The determined nucleotide sequence was deposited in the GenBank database under accession number AY236071.

Table 1. The % amino acid identities of ScrP, ScrT, and ScrR .

ORF	Strain	BS	BN	BA	BL	Accession No.
ScrP	BS	100				AY236071
	BN	98	100			NP_695726
	BA	92	92	100		AAO33821
	BL	84	83	85	100	AAN01605
ORF	Strain	BS	BD	BN	BL	Accession No.
ScrT	BS	100				AY236071
	BD	99	100			ZP_00121693
	BN	94	94	100		NP_695725
	BL	28	28	27	100	AAN01604
ORF	Strain	BS	BD	BN	BL	Accession No.
ScrR	BS	100				AY236071
	BD	99	100			ZP_00121694
	BN	100	99	100		NP_695724
	BL	57	57	57	100	AAN01606

Pair alignments between homologous proteins were made with the CLUSTAL W program. BS, *B. longum* SJ32; BD, *B. longum* DJO10A; BN, *B. longum* NCC2705; BA, *B. adolescentis* DSM 20083; BL, *B. lactis*.

sucrose phosphorylase와는 아미노산 수준에서 80% 이상의 상동성을, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium vitis*, *Pseudomonas saccharophila*, *Streptococcus mutans*와는 35% 이상의 상동성을 가지고 있다[5].

International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUB-MB)는 효소의 촉매반응 종류와 기질 특이성에 근거하여 효소를 분류하고 명명하였다. 그러나 기질과의 반응에 기초한 이 분류법은 여러 종류의 기질에 반응하는 효소의 분류에는 적합하지 않을 뿐만 아니라 효소의 구조적 특성을 반영하지 않았기 때문에 효소의 진화적 측면 해석에 문제점을 가지고 있다. 따라서 1991년 Henrissat [3]는 IUB-MB의 효소 분류 및 명명을 보완하여 새로운 분류법을 제안하였다. 현재, 아미노산서열과 효소의 3차 구조 간에는 직접적인 관계가 있음이 계속적으로 밝혀지고 있어, 아미노산서열의 유사성에 근거를 둔 이 분류체계는 하나 이상의 기질에 대한 특이성을 보유한 효소들 사이의 진화적 관계와 역학적 정보를 유도하는데 있어서 유용한 방법으로 간주되고 있다.

새로운 분류법에 따르면 glycoside hydrolase는 carbohydrate와 non-carbohydrate 사이, 혹은 두개 이상의 carbohydrate 사이의 glycosidic bond를 가수분해하는 광범위한 효소그룹을 지칭하며, archaeobacteria, eubacteria, eukaryotes 등 거의 모든 생물에서 발견되는 탄수화물 대사의 핵심효소이다[3]. 현재 glycoside hydrolase는 91개의 family로 분류되어 있고 sucrose phosphorylase는 family 13에 속한다. 이 family 13의 효소들은 hydrolysis, cyclization, disproportionation 등

의 반응 뿐 아니라 transglycosylation 활성도 함께 지니는 것으로 보고되었다(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>).

scrT 유전자: *scrT*에 의한 단백질 합성은 *scrP*의 stop codon 약 200 bp 하류에서 시작하며 이 유전자의 크기는 1,638 bp로서 545개의 아미노산을 암호화한다. ScrT는 원핵 생물 및 진핵생물의 sugar transporter family에 속하는 transporter들의 아미노산서열과 높은 상동성을 보이며, 특히 *B. longum* DJO10A와 99%, *B. longum* NCC2705와 94%의 상동성을 가지고 있어 sucrose transport에 관여하는 것으로 추정된다.

scrR 유전자: *scrR* 유전자는 1,044 bp의 염기로 이루어져 있으며 347개의 아미노산을 암호화한다. SJ32 균주 유래 ScrR을 Pfam Protein Families Database (<http://pfam.wustl.edu/>)의 protein search program을 이용하여 분석한 결과, N-terminal 부분에서 LacI-GalR family (LGF)에 속한 다른 미생물 유래 sucrose regulator들의 아미노산서열과 높은 상동성이 나타났고(Fig. 2), 이 보존 영역은 DNA binding에 관여하는 helix-turn-helix (H-T-H) motif로 알려져 있다 [9, 17]. N-Terminal 영역 외에도 sucrose regulator들이 공통적으로 가지고 있는 sugar binding에 관여하는 것으로 알려진 보존 영역이 존재하고[17], 특히 *B. longum* 기준 156번 아미노산에 해당하는 aspartic acid (D)의 경우 효소의 3차 구조를 안정화시키는 역할을 하며, 196번의 arginine (R)의 경우 effector 결합에 관여 하는 것으로 보고되었다[9].

Rho-independent terminator로 추정되는 stem-loop 구조가 *scrR* 유전자의 stop codon 50 bp downstream에서 발견되지만 T-stretch는 결여되어 있다.

orf1: pMJ1에서는 sucrose 대사 관련 유전자 외에도 2개의 ORF가 발견되었고, *scrP*와 반대 방향으로 전사되는 *orf1*은 stop codon이 발견되지 않아 불완전한 ORF가 cloning된 것으로 나타났다. LGF에 속한 regulator의 유전자와 상동성을 가지고 있어, 본 연구자들이 발표한 전보[5]에서는 이 유전자를 sucrose 대사의 regulator 유전자로 추정하였으나, pMJ1의 전체 염기서열을 결정된 결과 *scrT* 하류에서 발견되는 *scrR*의 아미노산서열이 기존에 보고된 sucrose regulator와 높은 상동성을 보유하고 있어 *orf1*은 다른 당대사 관련 regulator 유전자로 추정된다.

orf2: 1,854 bp의 염기로 구성된 *orf2*는 617개의 아미노산을 암호화하며 아미노산서열 상동성 비교 결과 acyl-transferase로 추정된다.

Sucrose 대사 관련 유전자군의 배열

*B. lactis*의 sucrose 대사 관련 유전자군 *scrPTR*은 *B. longum*과는 달리 조절 유전자인 *scrR*의 전사가 *scrP* 및 *scrT*와 반대로 진행된다(Fig. 3) [17]. 또한 *B. lactis*의 ScrP의 경우, *B. longum* 및 *B. adolescentis*와 83% 이상의 상동성을 가지고 있음에도 불구하고, ScrT는 *B. longum*과 28%

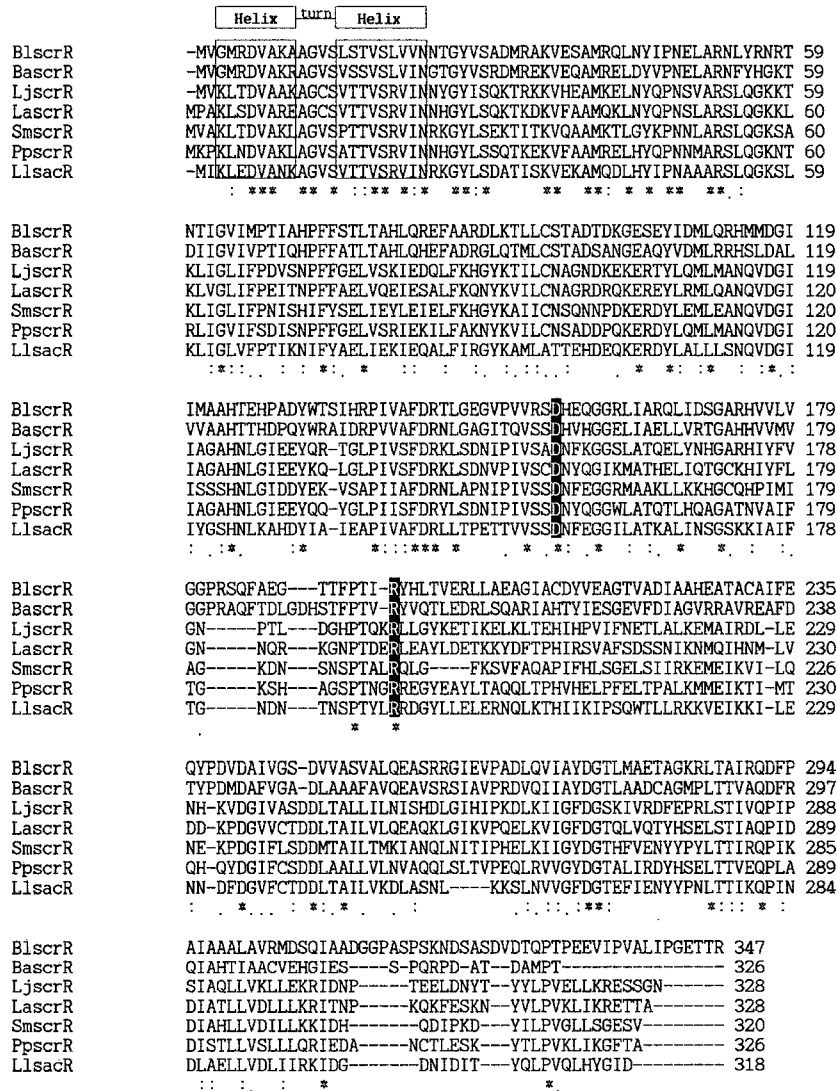


Fig. 2. Multiple-sequence alignment of ScrR of *B. longum* (BlscrR) and other sucrose regulators, including those of *B. lactis* (BascrR, accession No. AAN01606), *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (LjscrR, NP_965738), *Lactobacillus acidophilus* (LascrR, AA038868), *S. mutans* (SmscrR, AAC31628), *Pediococcus pentosaceus* (PpscrR, P43472), and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LlsacrR, Q04939). Identical amino acids are indicated by asterisks, and similar amino acids are indicated by dots. The helix-turn-helix motif (enclosed in boxes) is conserved in all these proteins, which belong to the GalR-LacI family of regulators.

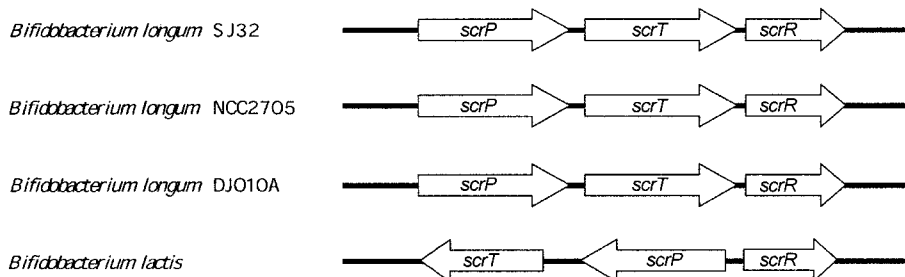


Fig. 3. Genomic organization of *scrP*, *scrT*, and *scrR* in several bifidobacteria.

이하, ScrR은 57% 이하의 상동성을 나타내었다(Table 1). 이 결과는 *B. lactis*의 sucrose 대사 관련 유전자군이 각기 다른

기원에서 유래하였음을 시사한다. 한편 *B. longum* SJ32 균주와 NCC2705 균주가 보유한 *scrPTR*의 주변 유전자는

SJ32 균주의 경우, *scrP*의 상류에는 LGF에 속하는 regulator가 *scrR*의 하류에는 추정 acyltransferase가 존재하는 반면, NCC2705 균주의 경우에는 *scrP*의 상류에 IS256 family에 속하는 repeat region이 있으며 *scrR*의 하류에는 sugar transporter ShiA가 존재한다. 따라서 *B. longum*에서의 *scrPTR* 유전자군의 획득은 horizontal transfer에 의해 이루어진 것으로 추정된다.

*scrT*의 발현이 sucrose phosphorylase 활성에 미치는 영향

Trindade 등[17]은 *B. lactis*로부터 cloning한 *scrP*, *scrT*, *scrR* 유전자의 일부를 삭제한 plasmid를 구축한 다음, 대장균에서 주변 유전자가 *scrP*의 발현에 미치는 영향을 ScrP 활성 측정을 통하여 알아보았다. *scrT*가 일부 혹은 전부가 삭제된 경우에도 높은 sucrase 활성을 나타내었으나 세 유전자가 모두 있는 경우에 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과로부터 *E. coli* heterologous system에서도 ScrT가 ScrP의 활성에 기여할 것으로 추정된다. 따라서 PCR로 증폭한 SJ32 균주 유래 *scrP*와 *scrPT*를 pUC18 vector의 *lac* promoter 하류에 삽입한 pSP와 pSPT를 구축하여 *E. coli* JM109 균주에서의 pNP-Glc 분해활성을 측정하였다. IPTG에 의한 유도 효과는 나타나지 않았고, *scrT*의 추가적 발현이 ScrP의 활성에 크게 영향을 주지는 못했지만 pSPT를 보유한 형질전환주로부터 pSP를 보유한 형질전환주보다 높은 활성이 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 *scrT*의 발현에 의한 대장균 세포 내로의 sucrose 유입의 증가가 ScrP 활성의 증가에 기여한 것으로 사료되고 *scrT*가 sucrose transporter의 유전자임을 뒷받침한다.

*B. longum*에서의 sucrose 유입

모든 미생물은 환경으로부터 영양분을 획득하여 살아가며, 미생물 주변의 영양분은 세포막을 통해 세포 내로 운송된 후 분해경로를 통해 대사된다[20]. Bacteria는 여러 가지 mechanism을 통해 탄수화물을 세포 내로 운반하며, 유산균 역시 sugar transport를 phosphoenolpyruvate (PEP)-sugar phosphotransferase system (PTS) 및 non-PTS system에 의

Table 2. Sucrose phosphorylase activity of *E. coli* cells transformed with pSP or pSPT plasmid containing *B. longum scrP* or *scrPT* gene.

Transformant	Specific activity (unit/mg protein)	
	IPTG induction	Without induction
JM109 (pUC18)	0.70	0.68
JM109 (pSP)	1.21	1.27
JM109 (pSPT)	1.96	1.94

One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme that liberates 1 μ mol of *p*-nitrophenol from the substrate per minute.

존한다[11, 15].

*B. longum*의 sucrose 유입 경로를 알아보기 위해 *B. longum* NCC2705 균주의 유전체를 대상으로 PEP-PTS system에서의 유입되는 당의 종류를 결정하는 sugar-specific protein, enzyme II (EII)의 존재를 검색한 결과, glucose-specific IIABC component의 유전자가 존재하는 것을 확인하였다. Glucose class로 분류되는 glucose-specific IIABC component는 glucose 뿐만 아니라 trehalose, maltose, N-acetylglucosamine, β -glucosides 및 sucrose의 유입에도 관여하는 것으로 보고되었다[12]. 따라서 *B. longum*의 경우, PTS system에 의한 sucrose의 세포 내 유입 가능성을 배제할 수 없다.

Non-PTS system에 의한 sucrose 유입 경로를 알아보기 위해 NCC2705 균주의 유전체를 대상으로 sucrose 대사 관련 유전자를 검색해본 결과, β -fructofuranosidase (sucrase/invertase, NP_665334)의 유전자 *cscA*의 존재를 확인하였고, 이 유전자의 하류에 sucrose transport protein (sucrose permease, NP_695335)의 유전자 *cscB*의 존재를 확인하였다. 이러한 결과는 CscB를 통해 세포 내로 유입된 sucrose가 CscA에 의해 glucose와 fructose로 가수분해되어 이용될 가능성을 시사한다.

*B. longum*이 보유한 ScrPTR은 다른 non-PTS mechanism 중 하나로 sucrose transporter를 이용한 sucrose의 세포 내 유입과, sucrose phosphorylase에 의한 sucrose 분해를 추정하게 한다. 이미 sucrose phosphorylase는 gram-positive 및 gram-negative의 다양한 bacteria가 보유하고 있는 것으로 보고되었고[17], sucrose phosphorylase에 의한 sucrose의 D-fructose와 G-1-P로의 전환은 ATP를 요구하는 해당과정의 준비 단계인 hexokinase 반응을 거치지 않고 인산화된 glucose를 합성하기 때문에 에너지 절약적인 이점을 가지고 있다고 알려져 있다[18].

Russell 등[14]은 *S. mutans*가 raffinose를 multiple sugar metabolism (Msm) system을 이용하여 세포 내로 유입하고, 유입된 raffinose를 α -galactosidase에 의해 sucrose와 galactose로, sucrose는 sucrose phosphorylase에 의해 분해 대사하는 것으로 보고하였다. NCC2705 균주의 유전체에서 Msm system의 존재여부를 조사해 본 결과, Msm system의 *msmK*와 *msmR*은 발견되지 않았지만, periplasmic-like sugar-binding protein 유전자 *msmE*와 periplasmic transport system을 구성하는 integral membrane protein의 유전자인 *msmFGG*가 발견되었다(Fig. 4). 또한 *S. mutans*의 *msmEFG*의 주변에 존재하는 α -galactosidase 유전자 *aga*가 *B. longum*의 경우에도 Msm system 유전자군의 상류에 존재하고, sucrose phosphorylase 유전자 *gtfA*에 상응하는 *scrP*가 존재한다는 점은 *B. longum*에서도 raffinose가 Msm system에 의해 유입될 가능성이 높다.

Fig. 5에는 본 연구의 결과로 추정되는 *B. longum*의 sucrose 대사와 관련된 당의 유입과 분해를 도식화하였다. *B.*

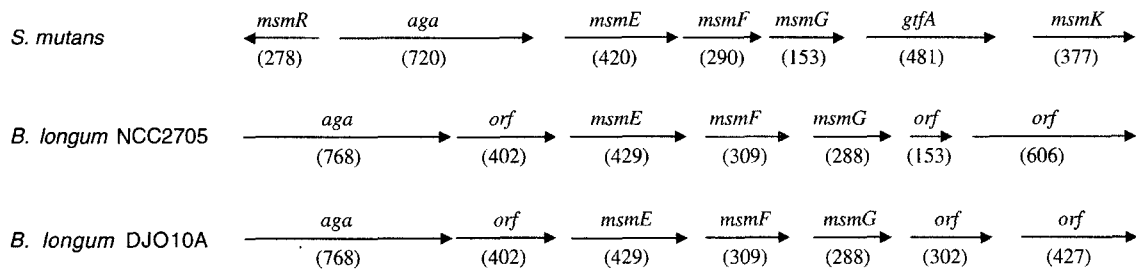


Fig. 4. Arrangement of *msm* genes. The extent and direction of each gene is illustrated with arrows (*aga*, α -galactosidase gene; *msmE*, a gene for periplasmic-like sugar-binding protein; *msmFG*, genes for two membrane proteins; *gtfA*, sucrose phosphorylase gene; *msmK*, a gene for ATP-binding protein; *orf*, unknown ORFs). The number of amino acids of the protein specified by each gene is given below the gene.

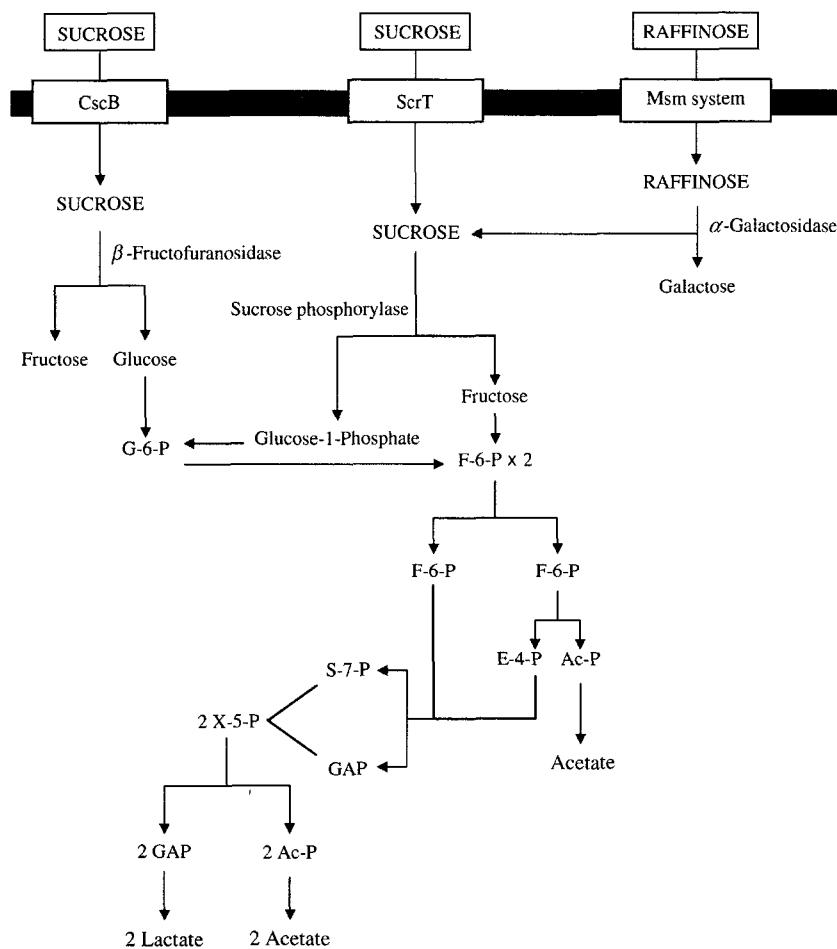


Fig. 5. The proposed sucrose transport and catabolism of *B. longum*. Abbreviations: G-6-P, Glucose-6-phosphate; F-6-P, Fructose-6-phosphate; E-4-P, Erythrose-4-phosphate; S-7-P, Sedoheptulose-7-phosphate; GAP, Glyceraldehyde-3-phosphate; X-5-P, xylulose-5-phosphate; Ac-P, Acetylphosphate.

*longum*이 보유한 다양한 sucrose multiple transport system은 변동적인 sucrose 공급 상황에 빠르게 적응하기 위한 진화적 과정에서 비롯된 것으로 추정된다[15, 20].

요 약

Bifidobacterium longum SJ32 균주로부터 cloning한

sucrose phosphorylase 유전자를 포함하는 8.6 kb의 *EcoRI* 단편의 염기서열을 결정하였다. 5개의 open reading frame이 존재하였고, 상동성 검색의 결과, sucrose 대사에 관여하는 sucrose phosphorylase (*ScrP*), sucrose transporter (*ScrT*), GalR-LacI-type transcriptional regulator (*ScrR*) 유전자의 존재를 확인하였다. SJ32 균주의 *scrPTR* 유전자군은 다른 *B. longum* 균주의 *scrPTR*과 배열이 동일하고, 각 유전자 산

물이 아미노산 수준에서 94% 이상의 상동성을 가지고 있지만, 주변 유전자는 다르게 나타나 *B. longum* 균주 간의 *scrPTR* 유전자군의 horizontal transfer를 추정하게 한다. 대장균에서의 *scrP*와 *scrT*의 동시 발현은 세포 내로의 sucrose 유입을 증가시켜 sucrose phosphorylase의 활성 증가에 영향을 주는 것으로 나타나, *scrT*가 sucrose transporter 유전자임을 뒷받침한다. 기존에 보고된 *B. longum* NCC2705 균주의 유전체로부터 *scrPTR* 외에도 sucrose 대사에 관여하는 다양한 sucrose multiple transport system에 관여하는 유전자의 존재가 확인되어, *B. longum*이 다양한 sucrose 유입체계를 보유하고 있음이 추정된다.

감사의 글

본 연구는 2003학년도 경기대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Den Herder, I. F., A. M. Rosell, C. M. van Zuilten, P. J. Punt, and C. A. van den Hondel. 1992. Cloning and expression of a member of the *Aspergillus niger* gene family encoding alpha-galactosidase. *Mol. Gen. Genet.* **233**: 404-410.
- Desjardins, M. L., D. Roy, and J. Goulet. 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* **73**: 299-307.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**: 309-316.
- Ibrahim, S. A. and A. Bezkorovainy. 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. *J. Food Prot.* **56**: 713-715.
- Kim, M., T. Kwon, H. J. Lee, K. H. Kim, D. K. Chung, G. E. Ji, E.-S. Byeon, and J.-H. Lee. 2003. Cloning and expression of sucrose phosphorylase gene from *Bifidobacterium longum* in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1211-1217.
- Kitao, S. and H. Sekine. 1992. Transglucosylation catalyzed by sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides* and production of glucosyl-xylitol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 2011-2014.
- Lee, J., A. Ametani, A. Enomoto, Y. Sato, H. Motoshima, F. Ike, and S. Kaminogawa. 1993. Screening for the immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 2127-2132.
- Mieyal, J. J. and R. H. Abeles. 1972. Disaccharide phosphorylase, pp. 515-523. In P. D. Boyer, (ed.), *The enzymes*, vol. 7, Academic Press, New York.
- Nguyen, C. C. and M. H. Saier, Jr. 1995. Phylogenetic, structural and functional analyses of the LacI-GalR family of bacterial transcription factors. *FEBS Lett.* **377**: 98-102.
- Nunoura N., K. Ohdan, K. Tanaka, H. Tamaki, T. Yano, M. Inui, H. Yukawa, K. Yamamoto, and H. Kumagai. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the β -D-glucosidase gene from *Bifidobacterium breve* clb, and expression of β -D-glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 2011-2018.
- Poolman, B. 2002. Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 147-164.
- Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.
- Reddy, B. S. and A. Rivenson. 1993. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* **53**: 3914-3918.
- Russell, R. R., J. Aduse-Opoku, I. C. Sutcliffe, L. Tao, J. J. Ferretti. 1992. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J. Biol. Chem.* **267**: 4631-4637.
- Sato, Y., F. Poy, G. R. Jacobson, and H. K. Kuramitsu. 1989. Characterization and sequence analysis of the *scrA* gene encoding enzyme IIScr of the *Streptococcus mutans* phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **171**: 263-271.
- Tannock, G. W. 1999. Probiotics: a critical review. Horizon Scientific Press, Norfolk, United Kingdom.
- Trindade, M. I., V. R. Abratt, and S. J. Reid. 2003. Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 24-32.
- Van den Broek, L. A., E. L. Van Boxtel, R. P. Kievit, R. Verhoef, G. Beldman, and A. G. Voragen. 2004. Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- Van Laere, K. M., R. Hartemink, M. Bosveld, H. A. Schols, and A. G. Voragen. 2000. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 1644-1652.
- Wang, J., E. D. Gilles, J. W. Lengeler, and K. Jahreis. 2001. Modeling of inducer exclusion and catabolite repression based on a PTS-dependent sucrose and non-PTS-dependent glycerol transport systems in *Escherichia coli* K-12 and its experimental verification. *J. Biotechnol.* **92**: 133-158.

(Received May 10, 2004/Accepted Sep. 6, 2004)