

Sphingomonas chungbukensis DJ77 균주에서 Phosphomannomutase를 암호화하는 *pmmC* 유전자의 클로닝과 발현

김미혜¹ · 최정도¹ · 신말식² · 김영창^{1,3*}

¹충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ²전남대학교 생활과학대학 식품영양학과, ³충북대학교 바이오연구소

Expression and Cloning of the *pmmC* Gene Encoding Phosphomannomutase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. Kim, Mi-Hye¹, Jung-Do Choi¹, Malshick Shin², and Young-Chang Kim^{1,3*}. ¹School of Life Sciences, Chungbuk National University, ²Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ³Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea – Phosphomannomutase (PMM) is a key enzyme in prokaryotes and eukaryotes, which catalyzes the conversion of α -D-mannose 6-phosphate to α -D-mannose 1-phosphate. The latter is the substrate for the synthesis of GDP-mannose, which serves as the mannosyl donor for many metabolic pathways in the cells. We report here on the isolation of a gene from a genomic library of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77, the *pmmC* gene encoding phosphomannomutase. The gene was cloned into *E. coli* expression vector, and the sequence was analyzed. The ribosomal binding site GGAAG lays 5 bp upstream of the ORF of 750 bp, which is initiated by ATG codon and terminated by TAG. The predicted sequence of the enzyme consists of 249 amino acids with a molecular mass of 27.4 kDa and showed 86.9% similarity to that of eukaryotic phosphomannomutase after bioinformatical analyses with the conserved domain search of NCBI. The purified gene product revealed the activity of phosphomannomutase. In conclusion, we confirmed that *pmmC* gene encodes phosphomannomutase actually.

Key words: *Sphingomonas chungbukensis*, *pmmC*, phosphomannomutase

Phosphomannomutase(PMM, EC 5.4.2.8)은 원핵 생물인 대부분의 그람 음성 세균에서 미생물 생장에 필수적인 대사물질이며, 다양한 생물학적 역할[10, 12]을 하는 exopolysaccharide (EPS) 구성당인 GDP-D-mannose를 합성하는 경로에 위치한 효소로서 mannose 6-phosphate(M6P)와 mannose 1-phosphate (M1P)간의 가역적 반응을 촉매하는 역할을 한다. 이 반응에서 생성되어진 M1P는 GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP)에 의해 당 전구체인 GDP-D-mannose를 생성하고, GDP-D-mannose는 GDP-rhamnose synthetase(GRS)에 의해 또 다른 구성당 GDP-D-rhamnose로 결합하여 EPS 혹은 lipopolysaccharide(LPS)의 구성물질로 이용된다. 또한 해당 과정과 세포벽 합성의 대사 경로에서 mannosyl기를 전달해주는 중요한 역할을 하는 효소이다[5, 6, 11-13, 19, 21]. 반면 진핵 생물인 효모에서의 PMM은 다양한 세포의 단백질 합성과 분비, folding에 필요한 glycosylation 대사 과정의 초기 단계를 촉매하는 효소로서 작용하며[17], 식물에서는 아스코르브산 생합성 과정에 관여하여 비타민 C의 합성에도 영향을 준다[4, 20]. 또한 임상학적으로 잘 알려진 Jaeken

syndrome, 즉 glycosylation type Ia(CDG-Ia)의 장애를 갖고 있는 환자에게서는 PMM의 활성이 없는 것으로 밝혀졌다 [10].

이러한 *pmm* 유전자를 조작하여 유용한 변이주를 만들고 산업적으로나 의학적으로 이용이 가능하게 할 수 있다[2]. 본 연구에서는 *Sphingomonas chungbukensis* DJ77에서 PMM을 암호화할 것으로 예상되는 유전자를 동정하고 *pmmC*로 명명하였다. 이 유전자는 원핵 생물에서는 아직 실험적으로 연구가 되지 않았으나, 진핵 생물에서의 PMM 유전자와 유사한 것으로 예측되는 *pmmC* 유전자가 PMM의 활성을 나타내는지 확인하는 실험을 수행하였으며, 이를 바탕으로 어느 단계의 대사에 관여하는지를 밝히고, 산업적인 이용가치가 큰 변이주로 응용하고자 한다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 대전 공단지역 하·폐수로부터 분리 보고된 *S. chungbukensis* DJ77이다. 이 균주의 유전체 사업의 일환으로 제작한 fosmid library의 클론을 주형으로 PCR하여 하위 클론을 제작하였다. 이 클론의 형질전환을 위한 숙주 세포로는 *Escherichia coli* BL21(DE3)(Novagen,

*Corresponding author

Tel: 82-43-261-2302, Fax: 82-43-268-2538

E-mail: youngkim@chungbuk.ac.kr

Germany)을 사용하였으며, 발현 벡터로는 pET21c(Novagen, Germany)를 이용하였다. 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다. 영양 배지로는 LB(Luria-Bertani)배지를 사용하였다.

유전자의 추출 및 조작

S. chungbukensis DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy 등[15]의 방법에 따라 추출하였으며, plasmid DNA는 Sambrook 등[12]의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한 효소 및 T4 DNA ligase(Roche, Germany) 등을 구입하여 사용하였으며, 반응 조건은 회사의 방법을 따랐다.

염기서열 결정과 분석

클로닝된 유전자는 Gene ALL Plasmid Miniprep Kit (Generalbiosystem, Korea)를 사용하여 추출하였고, Macrogen (Korea)에 의뢰하여 서열을 결정하였다. 염기 서열과 아미노산 서열은 BLASTN, BLASTP, TBLASTN program[1]을 이용하여 분석하였고, 다중 서열 검색과 계통분류학적 분석은 각각 CLUSTALX[18]와 PHYLIP[13]를 이용하여 분석하였다.

대장균에서 *pmmC* 유전자의 발현 및 정량

발현 벡터 pET-21c에 클로닝된 *pmmC* 유전자를 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현시키기 위해 LB 배지에서 OD600값이 0.6-0.7이 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양된 세포는 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG)로 유도하여 37°C에서 3시간 동안 배양한 다음 20,000×g에서 15분 동안 원심 분리하였으며, 유도하지 않은 세포 또한 같은 조건으로 원심 분리하였다. 각각의 세포 pellet은 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride(PMSF)이 첨가된 1×native binding buffer(25 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 8)로 현탁하였다. 세포 현탁액을 4°C에서 초음파분쇄기 분쇄 및 sodium dodecyl sulfate(SDS)로 용해하였고, 20,000×g에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액만을 조심스럽게 취하였다.

각각의 단백질은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였고, 시약(Bio-Rad, USA)을 이용하였다[3]. 0.1%의 SDS가 포함된 12.5% acrylamide gel에서 SDS-PAGE를 하여 결과를 확인하였다[8].

효소의 활성 측정

효소의 활성 측정은 Martins과 Sa'-Correia[11]와 Sa'-Correia 등[16]의 방법을 변형시킨 Leitao 등[10]의 방법을

```

GCCTCGCATTGGCCAGCGGTGCGGTTTCATGAGGGATCGACGCTGTTCTGTCGTCATCAA 60
TGGCTCAGCTTGCCTCGCCTACCCGATCCGGCAGGGAAGCAGGCATGAAGTGGCTGATC 120
                                     M K W L I
GCCTTCGACCTCGACGGCACGCTTGCCGAGAGCAAGCGGCCGTTATCGGAGGATATGGCC 180
A F D L D G T L A E S K R P L S E D M A
GCAATCCTCGCCGATTGCTGCCATCACGGATGTGGCGGTGATCTCGGGCGGGACTGG 240
A I L A R L L A I T D V A V I S G G D W
CCGCAGTTCGAAAAGCAGATCGCCTCGGCCCTTCTGCGCGCTCGCGCTCGACCGTCTC 300
P Q F E K Q I A S R L P A G V A L D R L
TGTTGATGCCGACCACAGGCAGAACTCTATCGTTTCAATGCGCTTGGCGCGCG 360
W L M P T T G T K L Y R F I N G A W R A
GTCTATGCCGAACCTGTCGACGACGCGGAGAAGGCGAAGATCCGCACGGCCCTCGATCAG 420
V Y A E L F D D A E K A K I R T A F D Q
GCGCTGACCGATGCCGCTCGCCGACGAACTGATCTGGGCGAAGCGATCGAGGACCGG 480
A L T D A G L A D E R I W G E R I E D R
GGCAGCCAGATCACCTTTTCGGGCTGGGGCAGGACGCGCGCTGAAGGAAAAGGAAAGCG 540
G S Q I T F S G L G Q A A P L K E K E A
TGGGATCCTGACCGAAAAGAGAGACCGCGTTCGAGGCCACGTTGCGCGCGAAGCTGCCG 600
W D P D R K K R T A L Q A T L R A K L P
GAGCTCTCGATCAATCTCGGTGGCAGACATCGATCGACGTGACGAGCAGGAGGATCGAC 660
E L S I N L G G T T S I D V T R A G I D
AAGGGCTATGGCCTGAAGCGCCTGAGTGCCGAGACCGGTTGCCGCTCGACGGGATGCTG 720
K G Y G L K R L S A E S G V P L D G M L
TTCATTGGGGATGCGATATCCCGGTGGGAATGACTATCCCGCTGCTGAAATCGGCCCTC 780
F I G D A I F P G G N D Y P A A E I G L
GACACAGTGGGGTGGCGACGTGCGGAAACCACCGCCTGCTGACCGCCATCATCGCG 840
D T V R V R D V A E T T A V V T A I I A
TGCTGCACCGATAGGATCAAGATACATGGTGGCTCCATCGCGGAATGCCGATTGTCA 900
C L H R *
AAGCTCTGGCTTGTGCGCTTAAGGGCAGCGCTTCATAAAACGAGAAGAAGACCTGCAGC 960
AGACAGCTGATGGGCTGC 978
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the *pmmC* gene encoding phosphomannomutase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77 (AY907675). A putative ribosome binding site is underlined. The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence are shown in 1-letter code, and an asterisk indicates the stop codon.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacterial strains	Relevant characteristics	References
Bacterial strains		
<i>Sphingomonas chungbukensis</i> DJ77	<i>str^r</i>	7
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <i>ompT hsdS_B (r_B m_B) gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Germany.
<i>E. coli</i> EPI300 TM -T1 ^R	[F ⁺ <i>mcrAΔf(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d lacZΔf15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG trfA tonA</i>]	Epicentre, USA
Plasmids		
pET21c	Ap ⁺ , T7 <i>lac</i> promoter, C-terminal His-tag	Novagen, Germany Stratagene Co.
pCC1FOS TM	Cm ⁺ , linearized at the unique <i>Eco72 I</i> site and dephosphorylated	Epicentre, USA

의해 수행하였다. PMM 활성 측정을 위해 기질인 M1P의 농도를 0 mM~2 mM까지 변화를 주었다. 기질을 포함한 반응 용액에는 15 mM Tris-Cl buffer(pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM glucose 1,6 bisphosphate, 1 U glucose 6-phosphate dehydrogenase(Sigma, USA), 그리고 1 mM NADP⁺, 1 U phosphoglucose isomerase(Sigma, USA)와 phosphomannose isomerase(Sigma, USA)를 넣은 후 cell crude extract를 각각 15 µg/µl가 되도록 넣었다. 여기에 증류수를 1000 µl이 되도록 첨가한 후 30°C에서 한 시간 동안 반응하여 흡광도(340 nm)를 분광광도계(Beckman DU-650, USA)로 측정하였다. 효소 활성은 일정 조건하에서 1분

동안 1 µmol의 NADP를 환원시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

결과 및 고찰

pmmC 유전자의 구조 및 기능

S. chungbukensis DJ77의 유전체 사업 수행 과정 중 획득한 shotgun library 서열과 fosmid library 서열의 분석을 통해 PMM을 암호화하는 유전자(pmmC)[AY907675]를 동정하였다. pmmC는 ATG를 개시 코돈으로 사용하며, TAG를 종결 코돈으로 사용하는 750 bp의 open reading frame

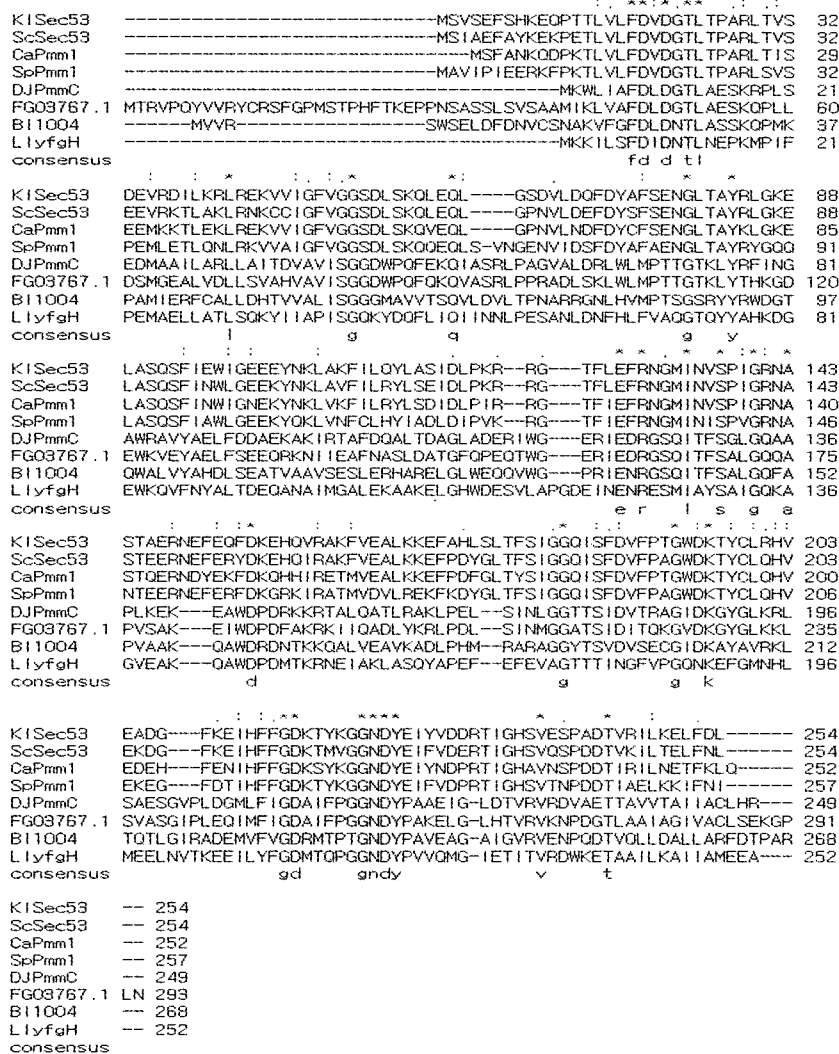


Fig. 2. Comparison of the deduced amino acid sequence of the PmmC of *S. chungbukensis* DJ77 with other homologues. Identical amino acids for all eight proteins are shown on a black background and the conserved amino acids for all eight organisms are given as 'consensus' beneath the polypeptide sequences. Sequences shown are *Kluyveromyces. lacitii* Sec53p (*KlSec53*, CAD21466), *Saccharomyces. cerevisiae* Sec53p (*ScSec53*, NP_116609), *Candida. albicans* Pmm1p (*CaPmm1*, EAL02637), *Schizosaccharomyces. pombe* Pmm1p (*SpPmm1*, NP_594325), *S. chungbukensis* DJ77 PmmC (*DJPmmC*, AY907675), *Gibberella zeae* PH-1 (FG03767.1, hypothetical protein, EAA71459), *Bifidobacterium longum* NCC2705 (B11004, hypothetical protein, NP_696176), *Lactococcus lactis subsp. lactis* I11403 (LlyfgH, hypothetical protein, NP_266726). *K. lacitii*, *Sc. cerevisiae*, *C. albicans*, *Sz. pombe* are eukaryotic organism and *S. chungbukensis* DJ77 (PmmC, AY907675), *G. zeae* PH-1, *B. longum* NCC2705, *L. lactis* I11403 are eubacteria.

임을 확인하였다. 이 ORF로부터 발현되는 아미노산은 249 개이며, 27.4 kDa의 단백질을 암호화할 것으로 예상하였다 (Fig. 1). 리보솜 결합부위로 예상되는 염기서열(5'-GGAAG-3')은 ORF의 개시코돈으로부터 5 bp 앞에 존재한다. NCBI의 conserved domain search로 아미노산 서열을 분석한 결과 pfam03332에 속하는 eukaryotic phosphomannomutase (EC:5.4.2.8)의 보존된 서열과 86.9%의 상동성을 보였다. 또한 *Gibberella zeae* PH-1의 hypothetical protein FG03767.1과 62%의 상동성을 보였으며, 그 외에 상동성은 낮았으나 진핵 생물의 PMM과도 유사도를 보였다. 상동성을 보인 종의 아미노산 서열과 다중 서열 검색을 수행하여 일부 보존된 부위가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 특히 진핵 생물과 원핵 생물의 아미노산 서열에서 N-terminal과 C-terminal 부근에 동일하게 보존된 부위[(FDXDXTL), (GDX(5)GNDY)]가 존재하는 것은 주목할 만하다(Fig. 2). 이러한 결과로 *pmmC*가 진핵 생물의 PMM 유전자와 유사함을 확인하였다. Multiple alignment와 PHYLIP의 결과로부터 제작한 계통수는 KIMURA FORMULA로 boot strap 1000번 통해 신뢰도를 측정하였다. 이 결과에서는 진핵 생물의 PMM 그룹과 원핵 생물의 PMM 그룹으로 나뉘는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 진핵 생물의 PMM과 원핵 생물의 PMM의 차이를 확실하게 보여주는 것이라 할 수 있다 (Fig. 3). 결론적으로 생물정보학도구를 사용하여 *pmmC*가

진핵 생물의 PMM과 유사한 기능을 갖는 유전자로 예측하였다.

대장균에서의 *pmmC* 유전자의 발현

단백질 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과, 세포를 계면활성제인 SDS로 용해한 경우에는 예상했던 27.4 kDa에서의 과발현된 단백질을 확인할 수 있었으나, 초음파분쇄기로 분쇄한 경우에는 과발현된 단백질을 확인할 수가 없었다. 재조합 유전자를 과발현시킬 때 불용성 단백질을 형성하여 초음파분쇄기로 분쇄한 세포에서 과발현된 단백질이 상등액에 존재하지 않는 것으로 추측하였다. 불용성 단백질인 경우에는 pellet에 단백질이 존재할 것으로 생각되어, 과발현된 세포의 pellet을 SDS로 용해한 후 SDS-PAGE로 결과를 확인하였다. 추측한 대로 pellet에서 27.4 kDa의 과발현된 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이로 인해 대량 발현된 단백질을 정제할 수 없었기에 대량 발현 하지 않은 상태의 세포에서 효소 활성을 측정하였다.

효소 활성

본 실험 균주인 DJ77과 목표 유전자를 삽입하지 않은 *E. coli* BL21(DE3)을 활성 측정의 대조군으로 사용하였다. 각 균주를 초음파기로 분쇄한 후 얻은 cell crud extract의 총 단백질을 정량한 결과는 Table 2와 같다. 이를 바탕으로 각 세포의 15 µg/µl의 단백질에 대한 PMM 활성을 측정한 결과 *pmmC* 유전자가 클로닝된 *E. coli* BL21(DE3)과 *S. chungbukensis* DJ77에서 기질 농도의 증가에 따라 활성의 증가를 보였다(Fig. 5). *S. chungbukensis* DJ77이 기질

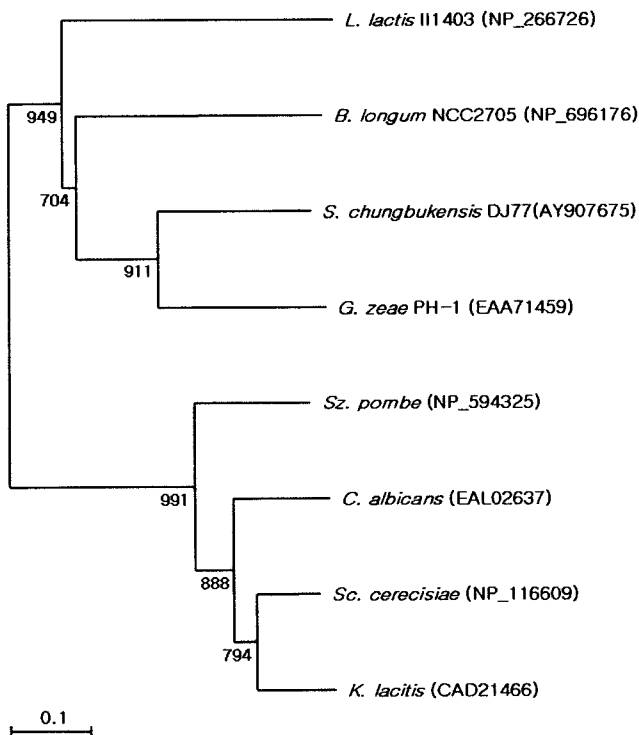


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the multiple-sequence analysis of the fully sequenced PMM proteins. The CLUSTALX program [19] was used for the sequence alignment and the phylogenetic tree construction.

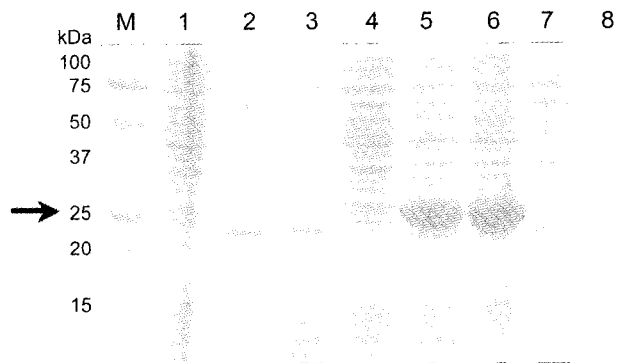


Fig. 4. Expression of recombinant *pmmC* in *E. coli*. Samples of different fractions of *E. coli* were run in a Coomassie blue-stained 12.5% SDS-PAGE gel. Lane M, protein molecular weigh markers; lane 1, total cell lysate of *E. coli* BL21(DE3); lanes 2 and 3 total lysates of cells harboring pET21c before and after IPTG induction; lanes 4 and 5, total lysates of cells harboring pET21c-*pmmC* before and after IPTG induction; lanes 6 and 7, pellet and supernatant of the lysate of cells harboring pET21c-*pmmC* after IPTG induction; lane 8, total cell lysate of *S. chungbukensis* DJ77. The protein that was expected to have a molecular weights of 27.4 kDa is indicated by arrow.

Table 2. Quantity of protein in cell crude extract.

strain	<i>S. chungbukensis</i> DJ77	<i>pmmC</i> -pET21c in BL21(DE3)	pET21c in BL21(DE3)
Total protein in cell crude extract (μg/ml)	150.7	184.0	158.9

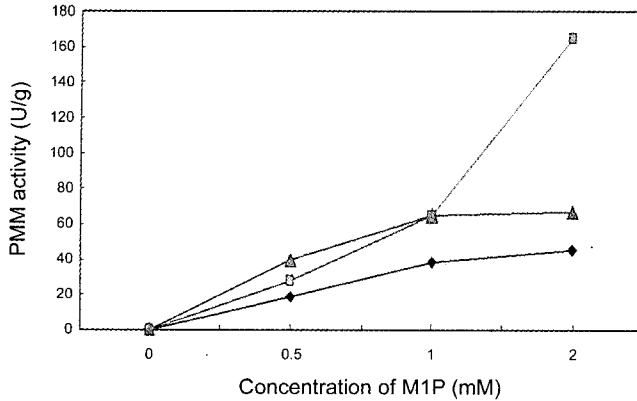


Fig. 5. Activity of phosphomannomutase. Activity of PMM of *S. chungbukensis* DJ77(▲-), pET21c in BL21(DE3)(◆-) and *pmmC*-pET21c in BL21(DE3)(□-) crude cell extract for M1P.

(M1P)에 대한 활성을 보이는 것은 DJ77에 PMM을 암호화하는 유전자가 존재함을 의미하고, *pmmC* 유전자가 클로닝된 균주에서 PMM의 활성이 더 높게 나타난 것은 *pmmC*가 발현되어 활성을 갖는다는 것을 추측할 수 있었다. 이로써 *pmmC* 유전자가 PMM을 암호화하는 것을 확인하였다. 하지만 이는 목표 단백질을 수용성으로 과발현시키지 못한 것으로 활성은 그만큼 낮을 것이라고 예상되며, 과발현시 형성되는 불용성 단백질을 가용화하여 단백질의 활성을 측정하면 더 높은 활성을 나타낼 것으로 기대된다. 이 연구를 바탕으로 앞으로 *pmmC* 유전자가 관여하는 구체적인 대사 경로를 밝히고 산업적으로 유용한 변이주를 만들고자 한다.

요 약

Phosphomannomutase는 진핵 생물과 원핵 생물에 있어서 중요한 효소로, α -D-mannose 6-phosphate를 α -D-mannose 1-phosphate로 전환시켜 GDP-mannose를 생산한다. 이 기질은 여러 대사 경로에서 중요하게 작용하는 mannosyl기를 제공하도록 돕는다. 본 논문에서는 *Sphingomonas chungbukensis* DJ77에서 phosphomannomutase를 암호화하는 유전자를 유전체 library로부터 동정하고 이를 *pmmC*로 명명하였으며, 이를 발현 vector에 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 유전자 *pmmC*는 ATG를 개시 코돈으로 사용하고, TAG를 종결 코돈으로 사용하는 750 bp의 open reading frame임을 확인하였고, 이 ORF의 5 bp 앞쪽으로 리보솜 결합 부위가 존재한다. 이 ORF로부터 유추되는 아미노산은 249개이며, 단백질 분자량은 약 27.4 kDa이다. 이 유전자를 구성하는 아미노산 서열은 NCBI의 conserved domain search를 통한

분석으로 eukaryotic phosphomannomutase와 약 86.9% 유사성이 있음을 나타냈고, 기질에 대한 활성을 측정한 결과 *pmmC* 유전자가 암호화하는 단백질이 phosphomannomutase임을 확인할 수 있었다.

감사의 말

이 연구는 KISTEP(M10311310001-03B4531-00110) 바이오디스커버리 사업에서 지원된 연구비에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Baird, J. K., P. A. Sandford, and I. W. Cottrell. 1983. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. *Bio/Technology* **1**: 778-783.
- 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.
- Conklin, P. L., S. R. Norris, G. L. Wheeler, E. H. Williams, N. Smirnoff, and R. L. Last. 1999. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (Vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4198-4203.
- Isabel, S. C., A. M. Fialho, P. Videira, L. M. Moreira, A. R. Marques, and H. Albano. 2002. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **29**: 170-176.
- Isabel, S. C., D. Aldis, S. K. Wang, B. Alan, and A. M. Chakrabarty. 1987. Alginate biosynthetic enzymes in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*: Overproduction of phosphomannose isomerase, phosphomannomutase, and GDP-mannose pyrophosphorylase by overexpression of the phosphomannose isomerase (*pmi*) gene. *J. Bacteriol.* **169**: 3224-3231.
- Kim, C. K., J. W. Kim, Y. C. Kim, and T. L. Mheen. 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* **24**: 67-72.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Matthijs, G., E. Schollen, E. Pardon, M. Veiga-Da-Cunha, and J. Jaeken, J. J. Cassiman, and E. Van Schaftingen. 1997.

- Mutations in *PMM2*, a phosphomannomutase gene on chromosome 16p13, in carbohydrate-deficient glycoprotein type I syndrome (Jaken syndrome). *Nat. Genet.* **16**: 88-92.
10. Pace, G. W. 1987. Microbial gums, pp. 449-456. In J. Bullock and B. Kristiansen (eds.), *Basic Biotechnology*. Academic Press, London.
 11. Padgett, P. J. and P. V. Phibbs, Jr. 1986. Phosphomannomutase activity in wild-type and alginate-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* **14**: 187-206.
 12. Qian, N., G. A. Stanley, A. Bunte, and P. Radstom. 1997. Product formation and phosphoglucomutase activities in *Lactococcus lactis*: cloning and characterization of a novel phosphoglucomutase gene. *Microbiology* **143**: 855-865.
 13. Retief, J. D. 2000. Phylogenetic analysis using PHYLIP. *Methods. Mol. Biol.* **132**: 243-258
 14. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 15. Silhavy, T. J., M. L. Berman, and L. W. Enquist. 1984. *Experiments with gene fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 16. Sjoberg, A. and B. Hahn-Hagerdal. 1989. β -Glucose-1-phosphate a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1549-1554.
 17. Staneva, D., D. Uccelletti, F. Farina, P. Venkov, and C. Pall-eschi. 2004. *KISEC53* is an essential *Kluyveromyces lactis* gene and is homologous with the *SEC53* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 41-51
 18. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic. Acids Res.* **24**: 4876-4882.
 19. Videira, P. A., L. L. Cortes, A. M. Fialho, and S. C. Isabel. 2000. Identification of the *pgmG* gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities, in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2252-2258.
 20. Wheeler, G. L., M. A. Jones, and N. Smirnov. 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365-369.
 21. Zielinski, N., A. M. Chakrabarty, and A. Berry. 1991. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encoding phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* **266**: 9754-9763.

(Received Feb. 1, 2005/Accepted May 25, 2005)