

Paenibacillus polymyxa Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase의 효소 활성에 미치는 각 Domain의 역할

유동주¹ · 박정하² · 유경옥² · 남수완^{3,4} · 김광현² · 김병우² · 권현주^{2,4*}

¹오사카대학 물질생명공학전공, ²동의대학교 생명응용학과,
³동의대학교 생명공학과, ⁴동의대학교 대학원 바이오물질제어학과

Domain Function and Relevant Enzyme Activity of Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase from *Paenibacillus polymyxa*. You Dong-Ju¹, Jung-Ha Park², Kyung-Ok You², Soo-Wan Nam^{3,4}, Kwang-Hyeon Kim², Byung-Woo Kim², and Hyun-Ju Kwon^{2,4*}. ¹Department of Material and Life science, Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka 567-0871, Japan, ²Department of Life Science and Biotechnology, Dongeui University, Busan 614-714, Korea, ³Department of Biotechnology and Bioengineering, Dongeui University, Busan 614-714, Korea, ⁴Department of Biomaterial Control, Dongeui University Graduate School, Busan 614-714, Korea – Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) converts inulin into cycloinulooligosaccharides (cyclofructan, CF) of β -(2→1)-linked D-fructofuranose as well as hydrolysis of cyclofructan. Sequences analysis indicated that CFTase was divided into five distinct regions containing three repeated sequences (R1, R3, and R4) at the N-terminus and C-terminus. Each domain function was investigated by comparison of wild type CFTase enzyme (CFT148) and deletion mutant proteins (CFT108: R1 and R3 deletion; CFT130: R4 deletion; and CFT88: R1, R3, and R4 deletion) of CFTase. The CFT108 mutant had both CFTase and CF hydrolyzing activity as CFT148 did. CFTase activities and CF hydrolysing activities were disappeared in CFT130 and CFT88 mutants. These results indicated that the C-terminal R4 region of *P. polymyxa* CFTase is necessary for cyclization and hydrolyzing activity.

Key words: *Paenibacillus polymyxa*, deletion mutant, cyclofructan, repeat region, cycloinulooligosaccharide fructanotransferase

서 론

Cycloinulooligosaccharide(cyclofructan [CF])는 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase)의 작용에 의해 inulin으로부터 생산되는 환상 올리고당이다. CF를 생산하는 CFTase는 분자내 당전이 반응에 의해 주로 fructose 분자 6~8개가 β -(2→1)결합으로 연결된 비환원성의 cycloinulohexaose(CF6), cycloinuloheptose(CF7), 그리고 cycloinuluoctaose(CF8)를 생산하며, 생산 비율은 각각 80%, 20%, 1% 정도이다[6, 7].

CF는 bowl-shape 구조로 되어있고, 외부는 hydroxyl group에 의해 친수성을 나타내며, 내부는 ether 결합으로 인하여 소수성을 띄고 있다. CF의 이와 같은 구조는 환상 올리고당으로 잘 알려진 cyclodextrin(CD)과 물리적, 화학적으로 유사한 성질을 가지며 주로 내부 공극에 휘발성 화합물이나 유기화합물을 포집하여 포집화합물의 물성 개선 효과

를 가진다[22]. 그 중 CF6은 결정 구조 분석에서 18-crown-6-skeleton 구조를 하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 또한 metal ion과 복합체를 형성할 수 있는 성질을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다[18, 20, 22]. 또한, CF는 물질의 동결, 해동에 안정적 효과를 나타내며 특정 화합물의 운반 기능을 가지고 있기 때문에, 이러한 물리적, 화학적 특성은 식품, 의약, 농업, 화학공업 등의 여러 분야에서 응용되어 이용될 수 있을 뿐만 아니라 앞으로 산업적으로 이용이 크게 증가될 수 있을 것으로 기대된다[4, 19]. 그 예로 식품 분야에서는 차 또는 커피의 쓴 맛 성분, caffeine, 수산 가공품의 악취, 그리고 콜레스테롤 등의 유해성분 제거 등에 사용될 수 있으며, 의약 분야에서는 약물 운반체, 용해제, 유도체 등의 보조제로 사용가능하다. 난용성 성분의 용해도 증가, 휘발성 성분의 휘발성 방지, 산소, 열 등의 분해 요인으로부터 보호 등의 물성개선효과가 있기 때문에 농약의 살충제 및 살균제에도 사용 가능하다. 한편, CF는 올리고당의 기능성까지도 포함하고 있어 장내세균개선 효과, 치아 우식증 예방, 혈당 강화작용 등의 기능을 나타낸다.

이러한 기능성 올리고당인 CF를 생산하는 CFTase는 현재까지 *Bacillus circulans* OKUMZ31B[6, 7], *B. circulans*

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-1519, Fax: 82-51-890-1532
E-mail: hjkwon@deu.ac.kr

MCI-2554[12, 13], 그리고 *B. macerans* CFC1[9] 등 주로 *Bacillus* 속의 세균이 생산하는 것으로 보고되어 있다. *B. circulans* MCI-2554에서 cloning된 CFTase 유전자 분석에 의하면 1,503개의 아미노산으로 구성되어 있으며 167kDa의 분자량을 나타내는 것으로 추정되나 배양 상등액에서 분리 정제된 CFTase는 110kDa의 분자량을 나타낸다는 보고가 있다[12]. 또한 *B. macerans*의 CFTase는 150kDa과 107kDa의 분자량을 나타내는 두 가지 형태의 효소가 분비된다는 보고도 있다[9]. 본 실험에서 사용한 균주인 *Paenibacillus polymyxa*가 생산하는 CFTase는 1,333개의 아미노산으로 구성되어 있으며 분자량은 148kDa이다[3]. 하지만 본 균주가 배양 상등액에 분비 하는 CFTase는 3가지의 다른 분자량을 나타내고 있다는 것을 확인하였다.

CFTase의 아미노산 서열을 비교해 보면 β -fructofuranosidase family와 상동성이 매우 높으며 이들 family의 일원임을 알 수 있다[12]. 이들 family에는 분자내 당전이 반응, cyclization 반응뿐만 아니라 β -(2 \rightarrow 1) fructosidic 결합을 분해하는 효소인 β -fructofuranosidase (invertase, sucrase) (EC 3.2.1.26)와 levanase, inulinase등이 속해 있다.

CFTase의 가장 큰 특징은 다기능 효소라는 점이다. 즉, inulin과 같은 fructan 기질에 작용하여 환상의 CF를 합성하는 cyclization 반응, 당전이 반응인 coupling 반응과 disproportionation 반응, 분해 반응인 hydrolyzing 반응을 매개한다[5]. 현재까지 밝혀진 다기능 효소의 구조적인 특징을 살펴보면 몇 개의 domain으로 구성되어 있으며 각각의 domain이 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 현재까지 다기능 효소로 가장 연구가 많이 이루어진 CGTase가 그 예로써 CF와 유사한 물성을 가지는 cyclodextrin(CD)를 생산하는 미생물 유래 효소이다. *Bacillus stearothermophilus* CGTase의 X-ray 결정 구조 분석을 통하여 밝혀진 바에 의하면 CGTase는 A, B, C, D, E의 5가지 domain으로 구성되어 있으며 이중 A, B, C domain은 α -amylase와 유사한 활성을 나타내며 D, E domain은 cyclization반응에 관여 할 것이라는 보고가 있다[10, 11, 16].

P. polymyxa CFTase의 1차 구조를 분석해 보면 몇 가지 특징적인 점이 있다. 본 CFTase는 *B. macerans* CFC1과 96%, *B. circulans* MCI-2554와 73%의 상동성을 나타내고 있으며 몇 개의 domain으로 나누어짐을 알 수 있는데 inulinase와 CFTase에서 공통적으로 나타나는 CR영역(core region), endo-inulinase와 높은 상동성을 가지는 ERH영역

(endo-inulinase region of homology)과 R영역(repeat region)을 포함하고 있다[3]. CFTase에서 발견되는 R영역은 CFTase를 생산하는 균주에 따라서 3개 또는 4개의 반복된 형태로 나타나는 특징적인 영역으로 N-말단 혹은 C-말단에 존재하며 아직 그 역할에 대해서는 밝혀져 있지 않다.

본 연구는 각 domain의 역할을 규명하기 위하여 N-말단 결손 변이체, C-말단 결손 변이체를 제작하고 그 활성과 특성을 야생형과 비교 검토하여 각 domain의 역할을 규명하였기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 실험에 사용한 야생형 CFTase 공여체는 *P. polymyxa* 와 이 균주의 CFTase 유전자를 함유한 재조합 plasmid pD11을 사용하였으며[3], CFTase 유전자 증폭 및 결손변이체를 제작하기 위한 숙주세포는 *E. coli* DH5 α [F-, ϕ 80lacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rK- mK+), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gvrA96*, *relA1*]를 사용하였고, 야생형 CFTase와 결손 변이 CFTase를 대량 발현시키기 위한 숙주세포는 *E. coli* HMS174(DE3)pLysS(F-, *recA1*, *hsdR*(rK12- mK12+), RifR(DE3)pLysS)를 사용하였다.

단백질의 대량 발현 및 정제를 위한 발현 vector는 plasmid pET28a(+) (Novagen, Madison, USA)를 사용하였다.

CFTase의 결손변이체 제작

본 실험에서 ORF의 증폭 및 결손변이체의 구축을 위해 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다. *P. polymyxa*의 야생형 CFTase(CFT148)를 효율적으로 발현시키기 위해서 CFTase 유전자의 ORF 부위(4.0Kb)만을 PCR로 증폭하였다. 주형 DNA는 *P. polymyxa*의 CFTase 유전자를 함유한 pD11을 사용하였다[3]. CFTase의 ORF 증폭을 위한 primer는 primer f1과 primer r1을 사용하였으며, 증폭된 DNA 단편은 pET28a(+) plasmid에 subcloning하였다(pET-*cft148*). 야생형 CFTase의 N-말단 R1과 R3 영역을 제거한 결손변이 CFTase(CFT108)를 제작하기 위해서는 primer f2와 primer r1을 사용하여 2.8Kb 크기의 CFT108 유전자를 증폭시켰다. 증폭된 2.8kb의 단편은 pET28a(+)에 subcloning(pET-

Table 1. Primers used for amplification of CFTase gene.

primer	sequence	remark
primer f1	5'-CGGAATTCATGAGGAAAGCCAAAGG-3'	<i>EcoRI</i>
primer f2	5'-TTCCATATGGGACTATTTCCACTTAAACC-3'	<i>NdeI</i>
primer r1	5'-AGCTCGAGTCAGTTGTTGGTTTTCTTCTT-3'	Stop codon, <i>XhoI</i>
primer r2	5'-GCTGTCGACTCAAGGCAGCTCTGTAATATCC-3'	Stop codon, <i>SalI</i>

cft108)하였으며 DNA 염기서열 분석을 통하여 N-말단의 R1과 R3 영역이 결손된 것을 확인하였다(Sequencing facility, Solgent Co., Daejeon, Korea). C-말단의 R4 영역을 제거한 결손변이체 CFT130의 제작을 위해서는 primer f1과 primer r2를 사용하여 PCR한 3.5Kb 크기의 증폭된 단편을 pET28a(+)에 subcloning(pET-*cft130*)하였으며, DNA 염기서열 분석을 통하여 C-말단의 R4 영역이 결손된 것을 확인하였다. R영역을 모두 제거한 CFT88의 제작을 위해서는 primer f2와 primer r2를 사용하여 PCR하였으며 그 결과로 얻어진 2.4Kb의 DNA는 pET28(+)에 subcloning(pET-*cft88*)하였다. 유전자 증폭은 PCR machine(GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer, Norwalk, U.S.A.)을 사용하여 변성은 94°C에서 1분, annealing은 53°C에서 1분, extension은 74°C 2min, 30 cycle 조건에서 행하였다.

재조합 효소의 발현 및 정제

재조합 단백질 정제는 각각의 재조합 DNA로 형질 전환된 *E. coli* HMS174(DE3)pLysS/pET-*cft148*, *E. coli* HMS174/pET-*cft108*, *E. coli* HMS174/pET-*cft130*과 *E. coli* HMS174/pET-*cft88*을 NZCYM 배지에 배양한 후 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 각각의 재조합 단백질 CFT148, CFT108, CFT130과 CFT88의 발현을 유도하였다. IPTG에 의해 유도 발현된 단백질들은 N-말단에 His-Tag가 융합된 형태로 발현되어 정제가 용이하다. 발현된 재조합 단백질은 모두 불용성의 봉입체를 형성하였으며 본 효소를 획득하기 위하여 sonication buffer(50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)를 사용하여 균체를 파쇄 시킨 후 원심분리 하여 균체 파쇄물로부터 봉입체를 회수하였다. 회수한 봉입체는 wash buffer(2M Urea, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2% Triton X-100)를 사용하여 숙주세포 유래 단백질을 제거하고, 8M Urea가 첨가된 20 mM phosphate buffer(pH 7.8) 존재 하에서 Ni²⁺ column(Histrap kit, Novagen Co., Madison, U.S.A.)을 사용하여 정제하였다. 정제된 재조합 단백질은 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 투석을 통해 refolding 시킨 후 이 후 실험의 효소 액으로 각각 사용하였다.

CFTase의 활성 측정 및 CF의 정량 분석

CFTase의 정성적 활성측정은 thin-layer chromatography (TLC)로 분석하였다. 효소반응은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1 mL에 최종 농도 1%가 되도록 녹인 inulin과 효소를 혼합하여 40°C에서 시간별로 반응시켰다. 효소 반응액을 비등수에서 5분간 열처리 하여 효소 반응을 정지시키고 반응액 5 µl씩 TLC plate(MERCK, Darmstadt, Germany)에 점적한 후 butanol : isopropanol : water (3 : 12 : 4, v/v)를 전개용매로 하여 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray로 도포한 후 120°C에서 10분간 가열하여 발색시켜 확인하였다.

CFTase의 정량은 RI detector(RID 410, Waters, Massachusetts, U.S.A.)가 장착된 HPLC로 분석하였다. Column은 TSK gel Amide-80(Tosoh Co., TOKYO, Japan)을 사용하였고, 용출용매는 탈기한 acetonitrile : H₂O (65 : 35, v/v)를 유속 1.0 ml/min이 되도록 사용하였으며 column oven 온도는 65°C로 하였다.

N-말단 아미노산 분석

SDS-polyacrylamide gel은 10% acrylamide gel을 사용하였으며 단백질 염색은 Coomassie brilliant blue R-250으로 하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 PVDF membrane (BIO-RAD, California, U.S.A.)에 흡착 시킨 후 단백질 band를 membrane으로부터 절단 분리하여 N-말단 아미노산 분석을 행하였다. 이때 N-말단 아미노산 분석은 Protein Sequencer(model 241, Agilent Co., Palo Alto, U.S.A.)를 이용하였다.

결 과

*P. polymyxa*가 분비 생산하는 CFTase의 특징

본 연구진은 이미 *P. polymyxa*의 CFTase 유전자를 cloning 하여 보고 한 바 있다. *P. polymyxa*의 CFTase 유전자는 3,999개의 nucleotide로 구성되어 있으며 1,333개의 아미노산으로 이루어진 분자량 148kDa의 CFTase를 생산한다[3]. 현재까지 CFTase gene(*cft*) 염기서열이 보고되어 있는 것은 *B. circulans* MCI-2554[12, 13]와 *B. macerans* CFC1[9] 등이며 이들 효소와 각각 84%, 98%의 상동성을 나타내고 있다. 보고되어진 이들 CFTase 유전자와 β-fructofuranosidase family의 아미노산 서열을 분석해 보면 몇 개의 특징적인 domain으로 나뉘어 지는 것을 알 수 있다(Fig. 1). 이 domain영역을 살펴보면 N 또는 C-말단에 존재하는 repeat region(R), endoinulinase 유사영역인 ERH와 invertase 또는 exo-inulinase 유사영역인 core region(CR)이다. 본 *P. polymyxa*의 CFTase는 *B. macerans* CFC1 균주의 CFTase와 동일한 구조로 3개의 repeat region을 가지며 이 R 영역은 N-말단에 2개, C-말단에 1개 존재하고 있고, ERH와 core region으로 구성되어 있다. 또 다른 *B. circulans* MCI-2554

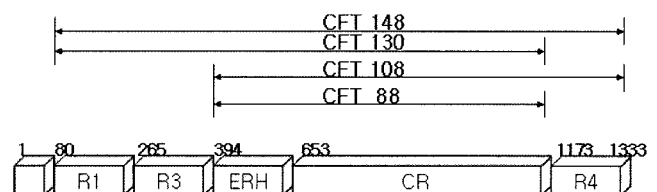


Fig. 1. Schematic drawing of the alignment of *Paenibacillus polymyxa* CFTase with its deletion mutants. R1, R3, R4, regions of repeat sequences; ERH, endo-inulinase region of homology; CR, core region.

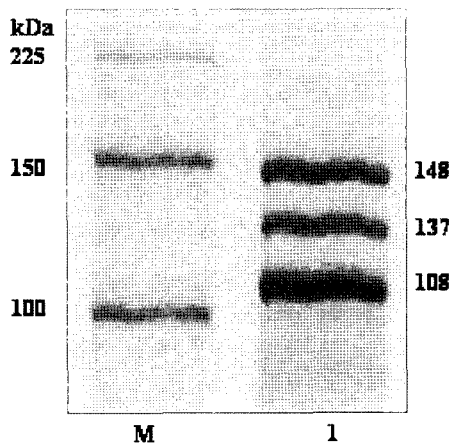


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the partially purified CFTase from *P. polymyxa*. M : Molecular weight marker, 1 : Partially purified CFTase.

균주의 CFTase와 비교해 보면 N-말단의 2번째 R 영역(R2)이 결손되어 있음을 알 수 있었다. 본 균주가 생산하는 CFTase는 148 kDa 크기의 유전자를 함유하고 있으나, 분비 생산되는 CFTase를 정제하면 독특한 형태의 단백질이 관찰되었다. 배양 상등액에서 CFTase 활성을 나타내는 단백질을 정제하면 3가지 크기 148 kDa, 137 kDa, 108 kDa의 단백질 band가 확인되었다(Fig. 2). 이 3가지 크기의 단백질은 어느 단백질 정제과정에서도 관찰되었으며 분리되지 않았다. 그래서 이 3가지 크기의 단백질이 각각 CFTase 활성을 가진 단백질인지 확인하기 위해서 Zymogram으로 활성염색을 시도해 보았으나 모든 단백질이 활성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 3가지 크기 단백질의 N-말단의 아미노산 서열을 분석해 보았다. N-말단 아미노산 분석 결과 3가지 크기의 단백질은 모두 *P. polymyxa*의 CFTase로 밝혀졌다. 148kDa band는 *P. polymyxa*의 CFTase의 70번째 위치의 Ser, 137 kDa band는 252번째 위치의 Thr, 108 kDa band는 394번째 아미노산인 Gly으로부터 시작되는 단백질임을 확인할 수 있었다(Table 2). 이들 3가지 크기의 단백질은 CFTase의 특징적인 domain과 깊은 관련이 있었다. 크기별로 분석해 보면 148 kDa 단백질은 야생형의 CFTase이고, 137 kDa 단백질은 N-말단의 R1이 제거된 형태이고, 108 kDa는 N-말단의 R1과 R3가 같이 제거된 형태의 단백질이었다.

Table 2. N-terminal sequence of partially purified CFTase from *P. polymyxa*.

Predicted Molecular size (kD)	N-terminal amino acid sequence	Amino acid position of the matching ORF
148	SVTDSVYQ	70 - 77
137	TDIKPDFK	252 - 259
108	GKGTFIHLNL	394 - 403

따라서 이러한 결과에 따라 *P. polymyxa*의 CFTase는 N-말단으로부터 69번 아미노산까지는 signal peptide가 존재하며 성숙 단백질로 분비 생산 될 때에는 processing의 방법에 따라 148 kDa, 137 kDa, 108 kDa의 세가지 크기의 CFTase를 생산하는 것으로 사료된다.

하지만 이 세가지 크기의 CFTase에서 활성형은 어느 단백질인지, 또한 repeat region(R)의 역할은 무엇인지, CF 형성에 어떤 역할을 담당하는지 검토할 필요성이 있다. 따라서 이들 domain의 역할을 확인하기 위하여 N-말단의 Repeat 영역 R1, R3과 C-말단의 R4를 각각 또는 동시에 제거한 결손변이체를 제작하여 그 활성을 비교해 보았다. 야생형 CFTase를 CFT148로, N-말단의 R1과 R3를 제거한 결손변이 CFTase를 CFT108로, C-말단의 R4를 제거한 결손변이 CFTase를 CFT130, 모든 R 영역을 제거한 결손변이 CFTase를 CFT88로 명명하였다.

재조합 단백질의 활성과 각 domain의 역할

구축한 재조합 단백질은 N-말단에 His-tag가 융합된 형태로 발현된다. IPTG 유도를 통해 대량 발현되었을 때 재조합 단백질들은 모두 inclusion body로써 불용성 분획에 존재하였다. 불용성 분획을 washing buffer로 2~3회 세척하여 숙주 대장균 유래의 단백질을 제거하였다. 목적 단백질 분리를 위하여 8M Urea buffer(pH 7.8)를 첨가하여 불용성 분획을 용해시킨 후 Histrap Kit를 이용하여 분리 정제하였다. 정제된 단백질은 FPLC를 통해 순수 정제하였으며 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 이용한 투석과정을 통해 refolding하였다. 정제된 CFT148, CFT108, CFT130과 CFT88의 분자량은 각각 148 kDa, 108 kDa, 130 kDa과 88 kDa으로 SDS-PAGE 전기영동으로 확인하였으며 단일 band로 정제되었다(data not shown).

CFTase는 다기능효소로 inulin으로부터 CF를 생성하는 cyclization 반응, inulin이나 생성된 CF를 분해하여 다양한 fructooligosaccharide를 생산하는 hydrolyzing 반응, 및 생성된 올리고당 간에 당을 전이하는 coupling 반응 또는 disproportionation 반응을 촉매한다.

CFTase의 각 domain이 효소의 활성에 미치는 역할을 조사하기 위해서 먼저 inulin으로부터 CF를 생성하는 cyclization 반응을 확인 하였다. 최종 농도 1%가 되도록 녹인 기질 (inulin)에 동일한 효소량(1 µg 단백질량)을 첨가하여 최적 반응 온도인 40°C에서 각 시간별로 반응시켜 thin layer chromatography(TLC)로 CF와 그 외 반응 산물의 생성 패턴을 확인하였다(Fig. 3).

야생형 CFT148과 결손변이체 CFT108의 주요 반응산물은 CF로 반응초기(CFT148 - 3 hr, CFT108 - 30 min)에는 inulin으로부터 주로 CF를 생성하다가, 반응시간이 지남에 따라 F₂, F₃, F₄ 등의 fructooligosaccharide를 생성하였다. 반면, 결손변이체 CFT130과 CFT88의 경우에는 CF의 생성

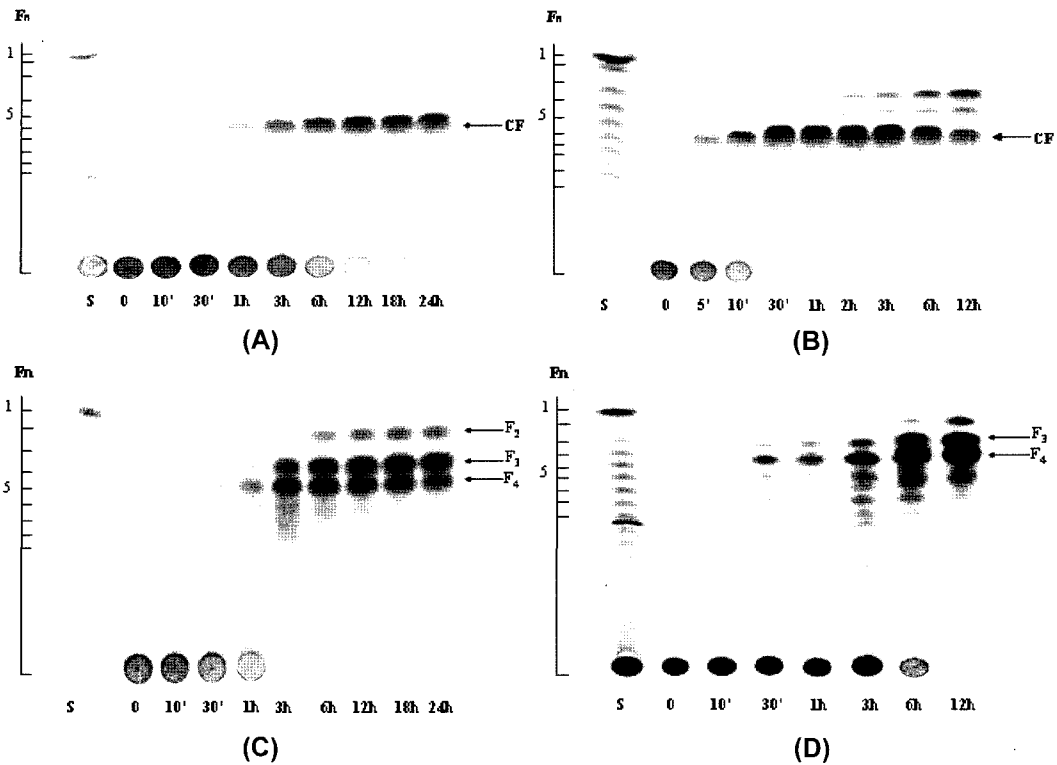


Fig. 3. Thin-layer chromatographs of the enzymatic products from inulin by CFTase and deletion mutant proteins. (A) CFT148 (B) CFT108 (C) CFT130 (D) CFT88.

은 관찰되지 않았으며 반응초기부터 inulin을 가수분해하여 F₂, F₃, F₄ 등의 fructooligosaccharide를 생성하였다. 이상의 결과에서 N-말단의 repeat 영역인 R1과 R3를 제거한 CFT108의 경우 야생형 CFT148과 마찬가지로 CF를 생산하는 것으로 보아 N-말단의 R1과 R3 domain은 cyclization 반응에는 아무런 역할을 하지 않는 것으로 나타났다. 한편 C-말단의 repeat 영역인 R4를 제거한 CFT130과 CFT88은 CF를 생산하지 않아 이 domain이 cyclization 반응에 필수적인 것으로 확인되었다. 또한 N-말단과 C-말단의 repeat 영역을 모두 제거한 CFT88이 inulin의 가수분해능이 있는 것으로 나타나 CFTase의 CR영역은 inulin hydrolization 반응에 관여하는 것으로 생각된다.

CFTase는 inulin을 이용하여 일차적으로 CF를 다량으로 생산하나, 일정량의 CF가 생산되면 CF를 분해하여 fructooligosaccharide를 생산하는 CF hydrolization 반응을 가지고 있다. 이와 같은 CF hydrolization 활성을 조사하기 위하여 1% CF(최종농도)와 각각의 효소 1 µg을 첨가하여 40°C에서 반응시켰다. 반응 기질로 사용한 CF는 본 연구실에서 자체 생산하여 사용하였다[17].

Hydrolization 반응을 확인한 결과(Fig. 4), CF를 기질로 하였을 때 CFT148과 CFT108은 반응시간이 경과함에 따라 CF를 분해하여 F₂, F₃, F₄를 생성하나, CFT130과 CFT88의 경우에는 CF를 전혀 분해하지 않았다. 이상의 결과로

CFTase의 CF hydrolization 반응에 관여하는 domain은 C-말단의 R4영역으로 확인되었으며, CF hydrolization 반응은 inulin hydrolization 반응과는 달리 cyclization 반응의 부산물로 end product인 CF가 과량 생산되면 이를 분해하여 fructooligosaccharide를 생성하는 것으로 생각된다.

CFTase는 올리고당 사이에 당을 전이하여 중합도가 다른 새로운 올리고당을 합성하는 coupling 반응을 촉매하기도 한다. 이러한 disproportionation 반응의 활성을 조사하기 위하여 올리고당 GF₄를 반응기질로 하여 재조합 단백질들의 활성을 검토하였다. 최종농도 0.5%의 GF₄(Meiji Pharmaceutical co. Tokyo, Japan)와 각각의 효소 1 µg을 첨가하여 40°C에서 반응시켜 확인한 결과(Fig. 5), 네 종류의 단백질 모두 2분자의 GF₄로부터 GF₇과 GF를 생산하였다. 반응 시간이 경과할수록 CFT148과 CFT108은 생성된 GF₇을 기질로 하여 CF와 GF를 생산하였으며 CF는 다시 F₃로 분해되었다. CFT130과 CFT88의 경우에는 GF₇이 GF와 F₃로 분해되었다. 이상의 결과로 야생형이나 결손변이체 모두 disproportionation 반응의 활성을 가지고 있어서 CR 영역이 이 반응에 관여하는 domain인 것으로 생각된다.

최적 pH 및 최적 온도 비교

재조합 단백질 중 CFTase 활성을 나타내고 있는 CFT148과 CFT108은 inulin을 기질로 CF의 생성하고 CF를 기질로

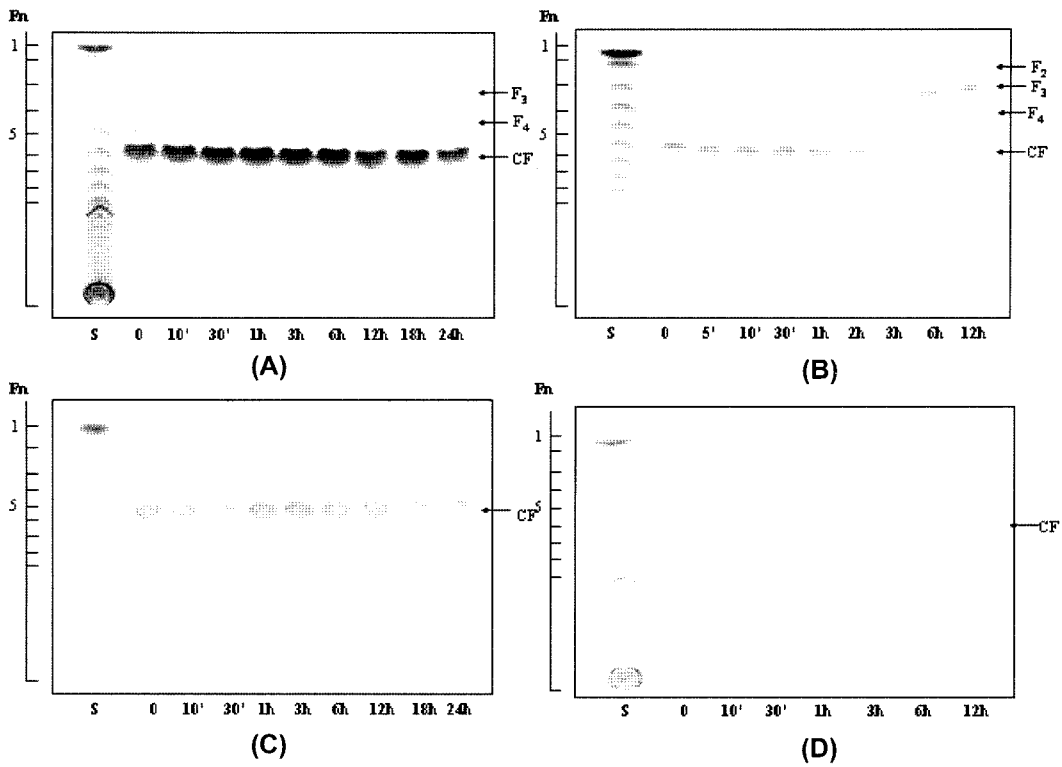


Fig. 4. Thin-layer chromatographs of the enzymatic products from cyclofructan(CF) by CFTase and deletion mutant proteins. (A) CFT148 (B) CFT108 (C) CFT130 (D) CFT88.

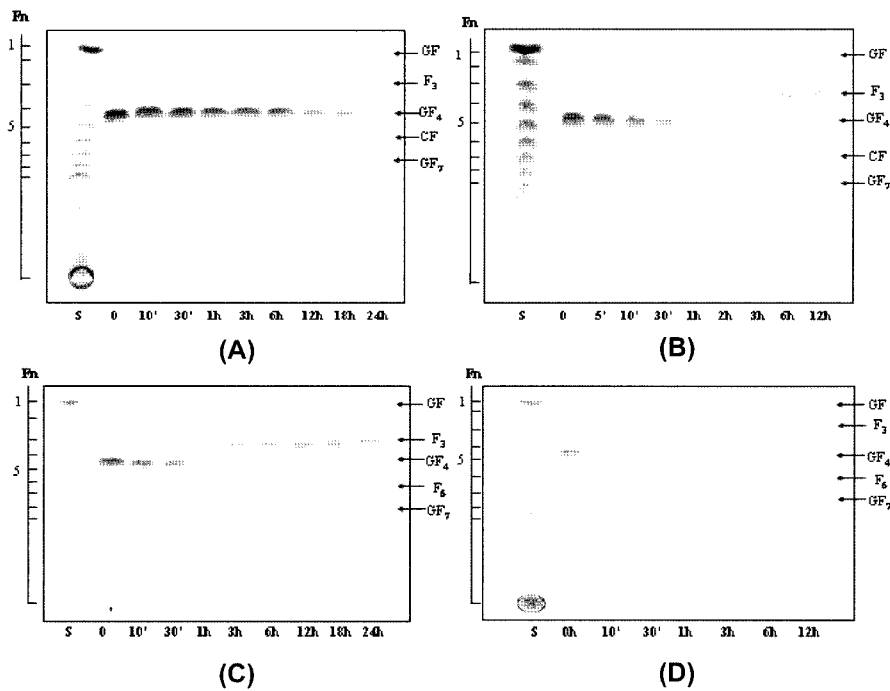


Fig. 5. Thin-layer chromatographs of the enzymatic products from GF4 by CFTase and deletion mutant proteins. (A) CFT148 (B) CFT108 (C) CFT130 (D) CFT88.

는 CF의 분해 반응을 가지고 등 동일한 기능을 가지고 있어서, 두 효소의 활성의 차이를 비교하기 위해서 최적 pH와

온도의 변화를 비교하여 보았다.

먼저, pH 4.0~10.0의 범위에서 1% inulin을 기질로 40°C,

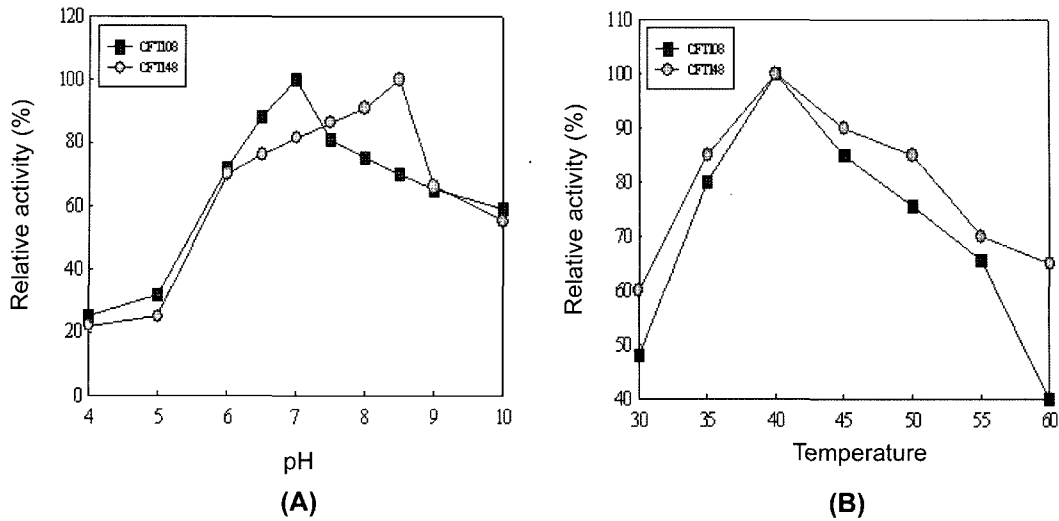


Fig. 6. Effects of temperature and pH on the activity of CFT148 and CFT108. (A) Optimum pH (B) Optimum temperature.

1시간 반응시켜 CF 생성 활성을 측정하였다. Fig. 6(A)에서 보는 바와 같이 CFT148은 pH 8.5, CFT108은 pH 7.0에서 최적 활성을 나타내어 결손 변이체가 야생형 보다 산성 쪽으로 최적 pH의 이동이 일어났음을 확인할 수 있었다. N-말단의 R영역의 제거로 인하여 결손 변이체의 conformation의 변화가 조금 일어난 것으로 판단되며 이점에 대해서는 현재 검토 중에 있다. 최적 반응 온도는 30~60°C의 범위에서 효소 활성을 측정한 결과 Fig. 6(B)에서 보는 바와 같이 CFT148과 CFT108 모두 40°C에서 최적 활성을 나타내었다.

금속 이온에 대한 영향

CFT148 과 CFT108의 효소반응에 대한 금속 이온의 영향을 알아보기 위해 Ag, Cu, Zn, Ni, Fe, Ba, Mg, Mn, Ca

을 각각 10 mM, 20 mM로 첨가하여 CFT148과 CFT108 효소액을 1% inulin과 40°C, 1시간 반응시켜 CFTase활성을 측정하였다.

반응결과 두 효소 모두 Ag에 의해서 완전히 저해 되었으며, Cu, Zn에 의해서도 약간 저해되는 것이 확인되었다. 그러나 그 외의 금속이온에 의해서는 활성에 큰 차이를 보이지는 않았다. CFT148과 CFT108의 금속이온에 대한 영향은 같게 나타났다. 따라서 CFTase의 N-말단의 R영역에는 이온 결합 부위 등이 존재하지 않는 것으로 사료된다.

CFT148과 CFT108의 CF생산량 비교

결손 변이체 CFT108의 효소 활성을 검토해 보면 CF생성과 CF의 분해 활성을 모두 가지고 있으며 야생형 CFT148의 활성과 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 CF생산

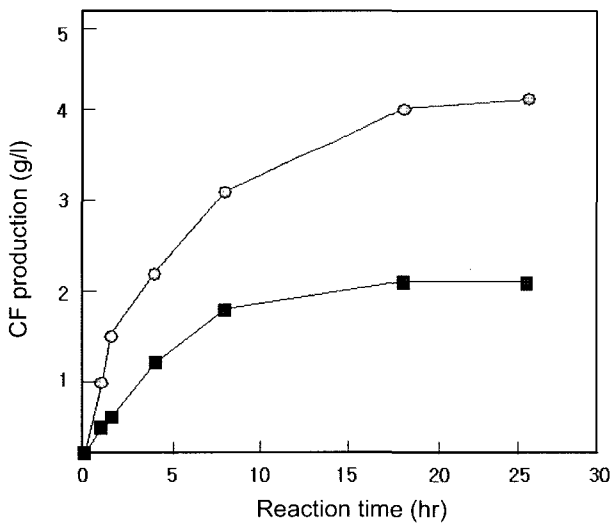
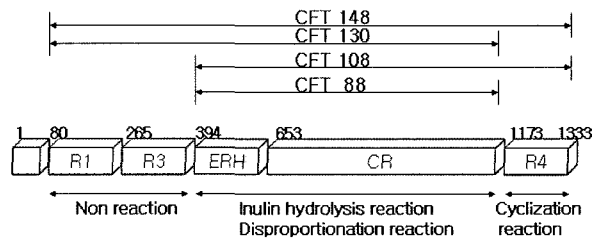


Fig. 7. Time profile of CF production from inulin by CFT148 and CFT108. ○, CFT108; □, CFT148.



protein	CFT148	CFT130	CFT108	CFT88
Cyclization	○	×	○	×
Endo-inulinase	×	○	×	○
Disproportionation	○	○	○	○
CF hydrolyzation	○	×	○	×

Fig. 8. Schematic representation of the domain structure of *P. polymyxa* CFTase and relevant enzyme activity.

효율을 검토해 보기로 하였다. 효소반응은 최종 농도 1% inulin과 1 µg protein/mL의 효소액을 40°C에서 시간별로 반응시키고 5분간 열처리하여 반응을 정지시킨 후 각각의 반응액을 0.45 µm filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 반응 1시간째부터 CFT148과 결손변이체 CFT108의 CF생산량은 차이가 났으며 반응 4시간째에 CFT148은 1.2 g/L, CFT108은 2.2 g/L의 CF를 생산하여 CFT108의 CF 생산 효율이 CFT148보다 약 2배 정도 좋은 것으로 나타났다. 반응 26시간의 최대반응 생산량도 CFT148은 1.9 g/L, CFT108은 4.1 g/L로 2배 이상의 차이를 보였다.

고 찰

CFTase는 여러 가지 활성을 함께 가지고 있는 다기능 효소로 cyclodextrin과 같은 물성 개선효과를 가지고 있는 CF를 inulin으로부터 생산하는 산업적 가치가 매우 높은 효소 중의 하나이다. CFTase는 유전자 구조에서도 매우 흥미 있는 효소 중의 하나이다. 이와 유사한 다기능 효소로써 cyclomatodextrin glucanotransferase(CGTase)가 있다[21]. CGTase는 α -(1→4) transglycosylation반응을 매개하여 α -(1→4)glucan으로부터 cyclodextrin (CD)을 합성하는 cyclization반응을 촉매하는 효소이다. 또한 CGTase는 포도당이나 설탕과 같은 적당한 수용체가 존재하면 CD나 α -1,4 glucan과 같은 물질로부터 다른 수용체에 당을 전이시키는 coupling반응과 중합도가 다른 올리고당으로 전환시키는 disproportion반응을 촉매하기도 한다. CFTase와 비교하면 CGTase는 기질만 다를 뿐 동일한 반응 기구를 가지고 있는 효소라 할 수 있으며 분비, 생산 균주의 동정과 효소의 구조 결정 등 많은 연구 보고 되어 있다. 최근 X-ray 결정 구조 분석된 CGTase의 특징을 보면 이 효소는 A, B, C, D, E 5 가지 domain으로 구성되고 이중 A, B 그리고 C domain은 α -amylase와 같은 방식의 α -(1→4)glycosidic 결합 분해에 중요한 역할을 담당하며 cyclization 반응에는 E, D domain과 효소의 입체구조가 중요하다는 연구결과가 보고되었다 [10, 11, 16]. 따라서 본 *P. polymyxa*의 CFTase 역시 효소의 활성에 따른 domain의 역할이 나뉘어져 있을 것이라 사료된다. 현재까지 보고되어진 CFTase와 inulin을 기질로 하는 exo-inulinase[2, 14], endo-inulinase[15]의 유전자 영역을 비교해 보면 특징적으로 나뉘어 지는 domain영역을 관찰할 수 있다. Inulinase와 CFTase에서 공통적으로 나타나는 CR 영역(core region), endo-inulinase와 높은 상동성을 가지는 ERH영역(endo-inulinase region of homology)과 R영역(repeat region)을 포함하고 있다. 먼저 inulin을 기질로 하는 효소에서 공통적으로 관찰되는 CR영역은 기질 결합 영역을 포함하며, ERH영역은 분해 활성에 중요한 역할을 담당하고 있는 것이라 사료된다. 따라서 CFTase의 특징적인 cyclization활성은 CFTase만 독특하게 보유하고 있는 R영역

에서 이루어지리라 추측할 수 있다. Kim[9] 등의 보고에 의하면 *B. macerans*에서 분비되는 CFTase는 150 kDa과 N-말단이 결실된 107 kDa 두 가지 형태가 존재한다고 보고하였다. 크기가 다른 두 단백질은 최적 pH, 온도 등이 동일하며 CF 생산 효율 또한 동일하다고 보고하였다. 그러나 이 두 단백질의 큰 차이점은 열 안정성으로 107 kDa의 단백질이 150 kDa의 단백질보다 높은 안정성을 가지고 있으나 기질 친화성은 낮은 것으로 보고하였다.

본 효소인 *P. polymyxa*의 CFTase의 각 영역별 결손 변이체를 구축하여 효소의 활성 검토를 해 본 결과 여러 가지 재미있는 결과를 얻게 되었다. 먼저 CFTase의 N-말단에 공통적으로 나타나는 R 영역을 제거한 CFT108을 구축하여 검토한 결과 본 효소의 야생형인 CFT148과 동일한 양상의 효소 활성을 나타내었으며 inulin을 기질로 한 CF 생산에서는 2배 이상 높은 생산 효율을 나타내었다. 또한 C-말단에 존재하는 R4 영역을 제거한 CFT130은 CFT148, CFT108과는 전혀 다른 양상의 활성을 나타내었다. Inulin을 기질로 하였을 때에는 fructooligosaccharide를 생성하였으며 CF를 기질로 하였을 때에는 CF를 분해하지 못하였으므로 전형적인 endo-inulinase와 동일한 양상을 나타내었다. 즉, CFTase에서 특징적으로 나타나는 repeat region중 C-말단에 존재하는 R4만이 cyclization 반응을 담당하고 있다는 사실을 알 수 있다(Fig. 8).

Protease, growth factor 그리고 hormones 단백질 중에서 pre-pro-protein의 형태로 pro-sequence를 가지고 있는 경우가 많은데 이들 sequence는 단백질의 folding[1], 단백질의 균체 외로의 분비[23], 불안정한 환경 내에서의 단백질의 불활성화 유지[8] 등의 역할을 담당하고 있는 것으로 보고되어 있다.

P. polymyxa CFTase의 경우에도 단백질의 균체외로의 분비에 대해 3가지 크기의 단백질의 형태로 관찰되었으며, 96%의 상동성을 나타내고 있는 *B. macerans* CFTase에서도 2가지 형태의 단백질이 관찰되었다. N-말단의 보다 자세한 검토가 필요하겠지만 *P. polymyxa* CFTase는 pre-pro-protein의 형태로 pro-sequence인 signal peptide와 pro-sequence인 repeat region을 가지고 있어 단백질의 균체외로의 분비를 원활하게 하기 위한 역할을 담당하고 있을 것으로 사료된다. CFTase는 다기능 효소로 여러 domain으로 구성되어 있으며 그중 N 말단의 R domain의 결손에도 단백질의 활성을 유지하고 결손 변이체 제조에 의해 높은 효율의 CF생산, fructooligosaccharide 생산 등이 가능한 효소로 산업적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

토양으로부터 분리한 *P. polymyxa* 균주가 생산하는 CFTase의 각 repeat region의 결손 변이체를 제작하였으며 그에 따른 야생형 효소와 변이 효소의 활성변화 및 효소 특

성을 비교 검토하였다. 야생형 CFTase를 CFT148로, N-말단의 R1과 R3를 제거한 결손변이체 CFTase를 CFT108로, C-말단의 R4를 제거한 결손변이체는 CFT130, 모든 R 영역을 제거한 것은 CFT88로 명명하였다. 각각 정제된 재조합 단백질은 148 kDa, 108 kDa, 130 kDa, 그리고 88 kDa의 크기를 나타내었다. Inulin을 기질로 각 재조합 단백질의 활성을 검토한 결과 CFT108은 CF생성, CF분해 반응을 모두 가지고 있었으며 CFT130, CFT88의 경우에는 CF생성 활성을 나타내지 않았으며 endo-inulinae와 동일한 inulin 분해활성을 나타내었다. 따라서 N-말단의 repeat region인 R1과, R3의 역할은 균체 외로의 분비를 담당하며 C-말단의 R4영역은 CFTase의 중요 활성인 cyclization반응을 담당하고 있는 것으로 확인되었다. Repeat region을 모두 제거한 결손 변이체는 기질 inulin을 F2-F4 사이의 중합도를 가진 fructooligosaccharide를 생산하는 endo-inulinase의 활성을 가지고 있었다. CFTase는 다기능 효소로 여러 domain으로 구성되어 있으며 각 domain의 결손에도 단백질의 활성을 유지하였으며, 특히 결손 변이체 CFT108은 고효율의 CF 생산이 가능하여 산업적으로 유용하게 사용될 수 있는 효소이다.

감사의 말씀

본 연구는 2004학년도 동의대학교 교내연구비(2004AA097)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Eder, J., and A. R. Fersht. 1995. Pro-sequence-assisted protein folding. *Mol. Microbiol.* **16**: 609-614.
- Eom, S. J., Y. M. Kwon, and Y. J. Choi. 1995. Molecular cloning of *Pseudomonas* sp. inulinase gene and its expression in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 550-555.
- Jeon, S. J., D. J. You, H. J. Kwon, K. Shigenori, K. Namio, K. H. Kim, Y. H. Kim, and B. W. Kim. 2002. Cloning and characterization of Cyclodextrinoligosaccharide Fructanotransferase (CFTase) from *Bacillus polymyxa* MGL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 921-928.
- Kanai, T., N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda, and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4956-4960.
- Kawamura, M. and T. Uchiyama. 1993. Reaction catalyzed by cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 343.
- Kawamura, M. and T. Uchiyama. 1994. Purification and some properties of cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **260**: 297-304.
- Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura, and K. Mizutani. 1989. Formation of a cyclodextrin-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **192**: 83-90.
- Kim, D. W., S. J. Lin, S. Morita, I. Terada, and H. Matsuzawa. 1997. A carboxy-terminal prosequence of aqualysin I presents proper folding of the protease domain on its secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**: 535-539.
- Kim, H. Y. and Y. J. Chio. 2001. Molecular characterization of cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase(CFTase) from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 995-1000.
- Klein, C. and G. E. Schulz. 1991. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217**: 737-750.
- Kubota, M., Y. Matsuura, S. Sakai, and Y. Katsube. 1991. Molecular structure of *B. stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase and analysis of substrate binding site. *Denpun Kagaku.* **38**: 141-146.
- Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto. 1995. Purification and characterization of cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase (CFTase) from *Bacillus circulans* MCI-2554. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 31-34.
- Kushibe, S., R. Sashida, and Y. Morimoto. 1994. Production of cyclofructan from inulin by *Bacillus circulans* MCI-2554. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 1136-1138.
- Kwon, H. J., S. J. Jeon, D. J. You, K. H. Kim, Y. G. Jeong, Y. H. Kim, Y. M. Kim, and B. W. Kim. 2002. Cloning and characterization of exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 155-159.
- Kwon, Y. M., H. Y. Kim, and Y. J. Choi. 2000. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 238-243.
- Lawson, C. L., R. Vanmontfort, B. Strokopytov, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, G. E. Devries, D. Penninga, L. Dijkhuizen, and B. W. Dijkstra. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J. Mol. Biol.* **236**: 590-600.
- Park, J. H., H. J. Kwon, and B. W. Kim. 2006. High yield production of cyclofructan by deletion mutant enzyme of cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase. *J. Life Sci.* **16**: 1-5.
- Sawada, M., T. Tanaka, Y. Takai, T. Hanafusa, T. Taniguchi, M. Kawamura, and T. Uchiyama. 1991. The crystal structure of cyclodextrinohexaose produced from inulin by cyclodextrinoligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **217**: 7-17.
- Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **7**: 244-248.
- Takai, Y., Y. Okumura, S. Takahashi, M. Sawada, M.

- Kawamuta, and T. Uchiyama. 1993. A permethylated cyclic fructo-oligosaccharide host that can bind cations in solution. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1**: 53-54.
21. Takata, H., Kuriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, N., Imanaka, T. 1992. Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at alpha-(1-4)- and alpha-(1-6)-glucosidic linkages. *J. Biol. Chem.* **267**: 18447-18452.
22. Uchiyama, T., M. Kawamura, T. Uragami, and H. Okuno. 1993. Complexing of cyclodextrin-oligosaccharides with metal ions. *Carbohydr. Res.* **241**: 245-248.
23. Wetmore, D. R., S. L. Wong, and R. S. Roche. 1992. The role of the pro-sequence in the processing and secretion of the thermolysin-like neutral protease from *Bacillus cereus*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1593-604.

(Received Aug. 10, 2006/Accepted Sep. 1, 2006)