

공학박사 학위논문

해양 미생물 *Pseudomonas* sp. W7 유래
C-terminus truncated agarase의
overexpression과 활성 비교

지도교수 공 인 수

이 논문은 공인수 박사 학위논문으로 제출함



2003년 8월






부경대학교 대학원

생물공학과

윤수철

윤수철의 공학박사 학위논문을 인준함

2003년 6월 일

주 심	이학/농학박사	홍 용 기	
부 심	공 학 박 사	김 중 균	
위 원	공 학 박 사	김 성 구	
위 원	공 학 박 사	김 영 옥	
위 원	공 학 박 사	공 인 수	

목 차

List of Figures	iii
List of Tables	v
Abstract	1
서 론	4
2) 재료 및 방법	9
1. Bacterial strains, Plasmids and growth conditions	9
2. Preparation of Plasmid DNA	9
3. Construction of Plasmid pEAG3	11
4. Preparation of Component cell	11
5. Transformation in <i>E. coli</i>	13
6. DNA Sequence and Analysis	13
7. Overexpression of pEAG3 and its Derivates	14
8. Agarose Gel Electrophoresis	14
9. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis	15
10. Protein Quantification and Enzyme Assay	15
11. Deletions with Exonuclease III	16
12. Deletion of C-terminal Region	17
13. Kinetics Determination	17

14. Thermal Stability	20
3) 결과	21
1. Nucleotide and deduced amino acid sequence.	21
2. Comparision of the PjaA with α - amylase from <i>A. haloplanctis</i>	21
3. Chloride binding site of PjaA	23
4. Conserved chloride binding site of β -agarase and α - amylase	23
5. Effect of chloride binding site of β -agarase	27
6. Overexpression of the pjaA gene	27
7. Truncated plasmid of pEAG3	28
8. Effect of induces and host cells for overexpression	33
9. Effect of lactose concentration and incubation time on overexpression	35
10. Purification of PjaA and truncated agarases	37
11. Thermostability of agarases	46
12. Kinetics	46
4) 고찰	50
5) 참고문헌	63
6) 요약	74
7) 감사의 글	77

List of Figures

- Fig. 1. Structure and Hydrolysis of Agarose.
- Fig. 2. Construction of overexpression plasmid-
- Fig. 3. Schematic diagram of the Exonuclease III method
- Fig. 4. Deletion of C-terminal region of agarase gene (*pjaA*) by ExonucleaseIII treatment.
- Fig. 5. Nucleotide sequence of the agarase gene (*pjaA*) and the deduced amino acid sequence
- Fig. 6. Amino acid comparison of the PjaA from *Pseudomonas* sp. W7 and the Amy from *A. haloplanctis*.
- Fig. 7. Amino acid comparison of the PjaA from *Pseudomonas* sp. W7 and the amylase gene from other microorganisms
- Fig. 8. Alignment of the chloride binding site from several chloride dependent α -amylases.
- Fig. 9. Electrophoresis of PCR product and pEAG3 fragment.
- Fig.10. Time Course yield of *E. coli* BL21(DE3)/pEAG3
- Fig.11. Deletion of pEAG3 with exonuclease III and the molecular weight calculated from DNA sequence

- Fig.12. SDS-PAGE with pEAG3 deletion mutants
- Fig.13. Agarolytic activity of *E. coli* BL21(DE3) with pEAG3 deletion mutants.
- Fig.14. SDS-PAGE of overexpressed agarases from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3 and derivatives.
- Fig.15. Effect of lactose concentration on expression from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3-1.
- Fig.16. Time course yield of PjaAI produced in *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3-1.
- Fig.17. SDS-PAGE analysis of the purified agarases from pEAG3 derivatives
- Fig.18. Agarolytic activity of purified agarases from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3 derivatives.
- Fig.19. Agarolytic activity of colonies from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3 derivatives, which were cultivated on LB/agar plate containing lactose for 12h
- Fig.20. Stability of agarolytic activity as a function of temperature.
- Fig.21. Control elements of the pET system
- Fig.22. Overall structure of *Aletermonas haloplanctis* α -amylase
- Fig.23. Putative structure of PjaA and truncated PjaA proteins and the relative activities.
- Fig.24. Putative structure of domain A in PjaA.

Fig.25. Putative structure of domain C in PjaA.

Fig.26. Putative domain of structure of PjaA.

List of Tables

Table 1. Plasmids and bacterial strains used.

Table 2. Effect of host cells and inducing agents on overexpression.

Table 3. Comparison of agarase activities through purification step with various *E. coli* strains and recombinant plasmids.

Table 4. Kinetics of PjaA and PjaAI by Lineweaver-Bulk plot

Overexpression and comparative studies on the C-terminus
truncated agarase of *Pseudomonas* sp. W7

Yoon, Soo-Cheol

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate school,
Pukyong National University

Abstract

The *pjaA* gene encoding β -agarase of *Pseudomonas* sp. W7 isolated from marine environment consist of an open reading frame (ORF) of 1,926 nucleotides and encodes a protein of 642 amino acids with a molecular weight of 69,540Da. The deduced amino acid sequence of PjaA from 32 to 482 residues showed 45% sequence homology with α -amylase of *Alteromonas haloplanctis* A23 isolated from the antarctic water. A putative protein ligands for chloride binding was identified as Arg-212, Asn-302 and Lys-339,

respectively. The *pjaA* gene was expressed at high levels in *Escherichia coli*. The C-terminal truncated plasmids digested by exonuclease III were overexpressed and the agarolytic activities were examined. The expressed protein of plasmid pEAG3-3 which was eliminated 259 amino acid residues from C-terminus led to complete loss of the agarolytic activity.

To investigate the differences in expression levels and agarase enzyme activities, inducers and host strains for overexpression were changed. Specific activity was increased about 2.5 folds by replacement of host cell from *Escherichia coli* BL21(DE3) to *E. coli* AD494(DE3)pLysS. When lactose, instead of IPTG, was used as an inducer, a specific activity was increased 3 folds in *E. coli* AD494(DE3)pLysS. Three plasmids derived from the β -agarase gene (*pjaA*) of *Pseudomonas* sp. W7 were expressed in *E. coli* AD494(DE3)pLysS. These products are corresponded to the complete

(PjaA) and two C-terminal truncated (PjaAI and PjaAII) forms of β -agarase. The PjaAI and PjaAII were constructed from PjaA by deletion of 127 amino acid residues and 182 amino acid residues at carboxyl terminal region, respectively. In order to characterize some properties of these proteins, the proteins were purified through the affinity chromatography. The molecular weights of purified proteins were 71 kDa, 58 kDa and 52 kDa, respectively, on SDS-PAGE. PjaAII protein had a lower specific activity than those of PjaA and PjaAI. In comparison with the mature PjaA protein, PjaAI showed different properties in K_m value and thermostability. The K_m value of PjaAI was lower than that of PjaA, and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of PjaAI was increased to 5 times. The enzyme activity of PjaAI remained more than 90% at 50°C. In contrast to PjaAI, 20% of remaining activity in PjaA showed at the same temperature.

서 론

Agar는 *Geildium*, *Acanthepeltis*, *Pterocilaria*, *Gracilaria*, *Ahbafeltia*, *Canpylaephora*, *Ceramium* sp. 와 같은 해조류의 구성성분으로, 단일당으로 된 다당류가 아닌 agarose 와 agaropectin의 혼합물로 구성되어 있고, agarose와 agaropectin의 함량은 해조류의 종류에 따라 차이가 있다. 분자량은 16,000 ~ 135,000 이며, 중성다당류로서 겔화능이 강하고, 응고성을 가지게 하는 주된 성분이다. Agarose는 agaropectin에 비해 uronic acid, 황산기 등이 적으며, pyruvic acid는 함유되어 있지 않고, 겔화농도가 0.35%로 낮은 농도에서도 겔화 된다.¹⁻⁴⁾

Agar는 0.2-0.3% (W/V)에서 겔 형성능력을 가지게 되며, 1-2% (W/V)의 농도에서는 매우 단단한 gel이 형성된다. 일단 형성된 gel은 고온에서 잘 견디는 성질을 지니고 있으며, 일정온도를 유지해 주면 시간이 경과함에 따라 점도가 증가하게 된다.¹⁾

겔사슬과 황산기가 많이 함유되어 있다고 알려진 agaropectin은 아직 까지 화학적인 조성, 구조자체가 분명하게 밝혀져 있지 않다.⁵⁻⁶⁾

특히, agarose는 가수분해에 의해 2가지 다른 종류의 oligosaccharide로 나누어지는 데, agarobiose를 구성단위로 하는 agarooligosaccharides와 neoagarobiose를 구성단위로 하는 neoagarooligosaccharides 이다. Agarose는 Fig. 1 에서와 같이 Agarase의 일종인 α -agarase로 가수분해하면 D-

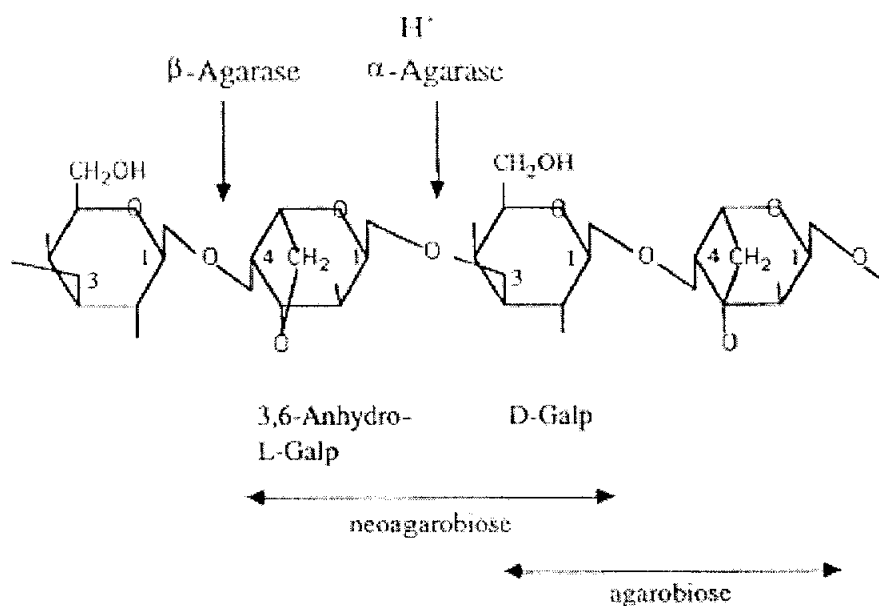


Fig. 1. Structure and Hydrolysis of Agarose

galactose 와 3,6-anhydro-L-galactose가 β -1,4 결합으로 된 agarobiose를 반복단위로 하는 agarooligosaccharide가 생성된다. β -agarase로 가수분해하면, D-galactose 와 3,6-anhydro-L-galactose가 α -1,3 결합으로 된 neoagarobiose를 구성성분으로 하는 neoagarooligosaccharides 가 생성된다. 이러한 hetero 형태인 한천의 α 결합을 끊는 것이 α -agarase 이고, β 결합을 끊는 것이 β -agarase 이다 ⁷⁻⁸⁾

Agar를 분해하는 미생물을 배지상에 한천을 탄소원으로 첨가하였을 때, 한천을 분해, 흡수하기 위하여 여러 가지 형태의 agarase를 생산하며, 이들 균주중 한천이 없을 경우 거의 생육을 못하는 종들도 보고 되어 있다. 대부분의 agarase는 30~45°C, pH 는 중성영역에서 최적활성을 가지며, 분자량은 최저 18kDa에서 360kDa까지 다양한 크기로 나타났다. 분자구조상 현재까지 밝혀진 α -agarase가 모두 dimer로 구성되어 있는 것은 특이한 사항이라 할 수 있다. ⁹⁻¹²⁾

대표적인 agarase 생산 균주는 *Alteromonas* sp., ^{9,13)} *Streptomyces*, ¹⁴⁾ *Cytophaga*, ¹⁵⁻¹⁷⁾, *Pseudomonas*, ¹⁸⁻²²⁾ *Vibrio* sp., ²³⁻²⁶⁾ 등이며, 대부분의 균주들은 적어도 한가지 이상의 agarase를 생산하는 것으로 나타났다. 그 중 *Cytophaga* sp. ²⁷⁾, *Pseudomonas* sp. ^{20,22,28)}, *Pseudoalteromonas* sp. ²⁹⁾, *Alteromonas* sp. ¹³⁾, *Vibrio* sp. ^{25,30)} 와 같은 다양한 미생물에서 β -agarase 가 분리되었다.

분자 유전학적 연구를 통하여 여러 미생물로부터 agarase가 보고 되고 있다. *P. atlantica*로 부터는 504aa(Mw 57kDa)를 coding하는 extracellular β -agarase 유전자가 분리되었으며, 또한 *Streptomyces coelicolor*에서 309aa(Mw 35kDa)를

coding하는 *dag A* gene이, *Vibrio* sp. Strain JT0107에서 *aga A*와 *aga B*인 β -agarase(Mw 105kDa), 그외 다른 여러 종류의 β -agarase 의 유전자가 분리되어, 염기서열 등이 결정되고 분석되었다.

본 연구실에서는 이전 연구에서, agar degrading bacteria인 *Pseudomonas* sp. 를 양식중인 *Porphyra tenera*로부터 분리하였다. *Pseudomonas* sp. W7의 β -agarase gene (*pjaA*)은 *Escherichia coli*를 host로 하여 cloning하고 recombinant PjaA protein의 생화학적 특성을 조사하였다.³¹⁾ 이 연구에서 PjaA protein은 0.9M NaCl에서 maximal agarolytic activity를 지녔다. 반대로 대부분의 marine bacteria에서 유래한 β -agarase는 0.1M NaCl에서 optimal activity를 보이거나 NaCl 농도와는 무관했다. 이 연구에 근거하여 본 실험에서는 NaCl에서 유래한 ion이 enzyme activity와 연관이 있을 것이라고 가정했다. 최근 marine environment에서 분리한 *A. haloplanctis*의 α -amylase specific site에 결합하는 chloride ion이 enzyme activation에 중요한 역할을 한다는 연구가 보고되었다.³⁸⁾

본 논문에서는 putative chloride binding site를 포함하는 *pjaA* gene의 nucleotide sequence와 PjaA의 C-terminal region이 agarolytic activity에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 먼저 agarase gene의 overexpression을 위해 pET-22b(+) expression vector를 사용하여 시도하였다. pET-22b(+) plasmid는 T7 *lac* promoter system을 지니고 있으며 일반적으로 *E. coli*에서 IPTG에 의해서 induction된다. 그러나 *E. coli* 내의 많은 enzyme들의

overexpression은 온도, inducer, host strain과 같은 다양한 환경에 크게 영향을 받는다는 사실이 보고되어 왔다. 그러므로 target enzyme의 생산을 위해서 host strain과 inducer의 변화에 따른 expression level을 조사해 볼 필요가 있다. 특히 최근 연구에서 *lac* based promoter를 이용한 overexpression에서 값싸고 nontoxic inducer로써 lactose의 가능성을 보여주고 있다.^{32,33)} Lactose는 IPTG와 비교했을 때 숙주에서 slow induction kinetic과 different carbon catabolite repression을 보여준다.³³⁻³⁵⁾ 본 연구에서도 lactose를 이용한 overexpression이 agarase 유전자에서도 가능한지에 대해서도 조사하였다. 또한 overexpression을 하기위해서 inducer를 추가할 때 생기는 또 다른 중요한 문제점은 overexpression 동안에 나타나는 단백질의 misfolding으로 인한 enzyme activity의 손실이다. Disulfide bond는 정확한 folding을 위한 중요한 인자들 중 하나이며, *E. coli*에서 thioredoxin reductase의 결실은 잠재적인 disulfide 결합의 형성을 가능하게 한다. 본 실험에서는 thioredoxin reductase가 결손된 *E. coli* AD494(DE3)을 숙주로 사용하여 overexpression level과 agarase activity에 미치는 영향에 대해서 조사하였다.³⁴⁾ 또한 이 실험에서는 C-terminal truncated agarase을 정제하여 C-terminal region과 activity의 관계를 밝히기 위해 효소 kinetic과 thermostability의 차이를 비교했으며 밝혀진 agarase 유전자 염기 결정구조를 바탕으로 하여 agarase의 결정 구조 및 functional domain 들의 예측 결과를 보고한다.

재료 및 방법

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

이 실험에 사용된 plasmid와 bacterial strain을 Table 1에 나타내었다.

Preparation of plasmid DNA

각각 *Pseudomonas* sp. W7 유래 agarase gene이 cloning 된 plasmid pJA1을 가지고 있는 *E. coli*를 Luria-Bertani media 2ml 에 50 μ g/ml의 ampicillin 을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 진탕배양한다. 원심 분리하여 cell을 down시켰다. 얻어진 pellet을 solution I(50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH8.0, 10mM EDTA pH8.0) 100 μ l에 resuspend시켰다. 여기에 solution II(D.W, 10N NaOH, 20% SDS) 200 μ l를 첨가하여 반응시키고 마지막으로 3M sodium acetate(pH4.8, HCl) 150 μ l를 가하여 반응시킨 후 원심 분리하여 상층액만 취하여 145 μ l polyethyleneglycol에 첨가하였다. Mixture를 원심 분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 100 μ l H₂O에 녹인 후 5.5M LiCl 100 μ l를 가하여 얼음에 10분간 방치하였다. Mixture를 원심 분리하여 상층액만 eppendorf tube에 옮겨서 0.6 volume의 isopropanol을 가했다. 원심 분리한 후 70% ethanol로 washing한 후 SpeedVac (Eyela Co.)를 이용하여 vaccum dry

Table 1. Plasmids and bacterial strains used.

Plasmids / strains	Genotype or relevant characteristics	Reference or source
Plasmid		
pJA1	Ap ^r , contains a 3053-base <i>Hind</i> III fragment	31
pEAG 3	Ap ^r , contains a 1926-base <i>Nde</i> I/ <i>Eco</i> RI fragment containing <i>pjaA</i>	This study
pEAG 3-1	Ap ^r , derivative of pEAG3 truncated 381 bp from C-terminus with Exonuclease III	This study
pEAG 3-2	Ap ^r , derivative of pEAG3 truncated 546 bp from C-terminus with Exonuclease III	This study
pEAG 3-3	Ap ^r , derivative of pEAG3 truncated 777 bp from C-terminus with Exonuclease III	This study
<i>E. coli</i> strains		
AD494(DE3)	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII$ $phoR \Delta malF3 F' [lac^+ (lacI^f) pro]$ $trxB::kan(DE3)$	Novagen co.
AD494(DE3) pLysS	$\Delta ara-leu7697 \Delta lacX74 \Delta phoAPvuII$ $phoR \Delta malF3 F' [lac^+ (lacI^f) pro]$ $trxB::kan(DE3) pLysS (Cm^R)$	Novagen co.
BL21(DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$	Novagen co.
BL21(DE3) pLysS	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3)$ $pLysS (Cm^R)$	Novagen co.

시켜서 plasmid pJA1을 얻었다.

Construction of plasmid pEAG3

Agarase gene의 open reading frame은 PCR 을 이용하여 증폭하였다. Forward primer 로는 5'-GGAACATATGAAAGCTATTGCCCTG-3'(NdeI site) 를, reverse primer로는 5'-GGCCGAATTCATTGGTGTGATGTCATC-3'(EcoRI site) 를 이용하였으며, template DNA로는 pJA1를 10ng 사용하였다³¹⁾. PCR condition은 denaturation 94℃에서 30초, annealing 55℃에서 30초, extension 72℃에서 2분으로 25cycle 반응시켰다. 이렇게 얻은 PCR product를 endonuclease NdeI 과 EcoRI으로 double digestion 한 후 overexpression vector인 pET-22b(+) (Novagen Co.)에 ligation 시켰다 (Fig. 2).

Preparation of competent cell

Competent cell 제조는 Mandel과 Higa의 CaCl₂ method에 따랐다. 하룻밤 배양한 *E. coli* DH5 α 를 LB liquid medium에 접종하여 O.D = 0.5에 도달할 때까지 incubation시켰다. Pre-cooled rotor에서 원심 분리하여 얻어진 cell에 20ml의 차가운 50mM CaCl₂를 첨가하여 resuspend시킨 후 30분간 얼음에 방치하였다. 15,000rpm에서 원심 분리하여 얻어진 pellet을 동일한 solution

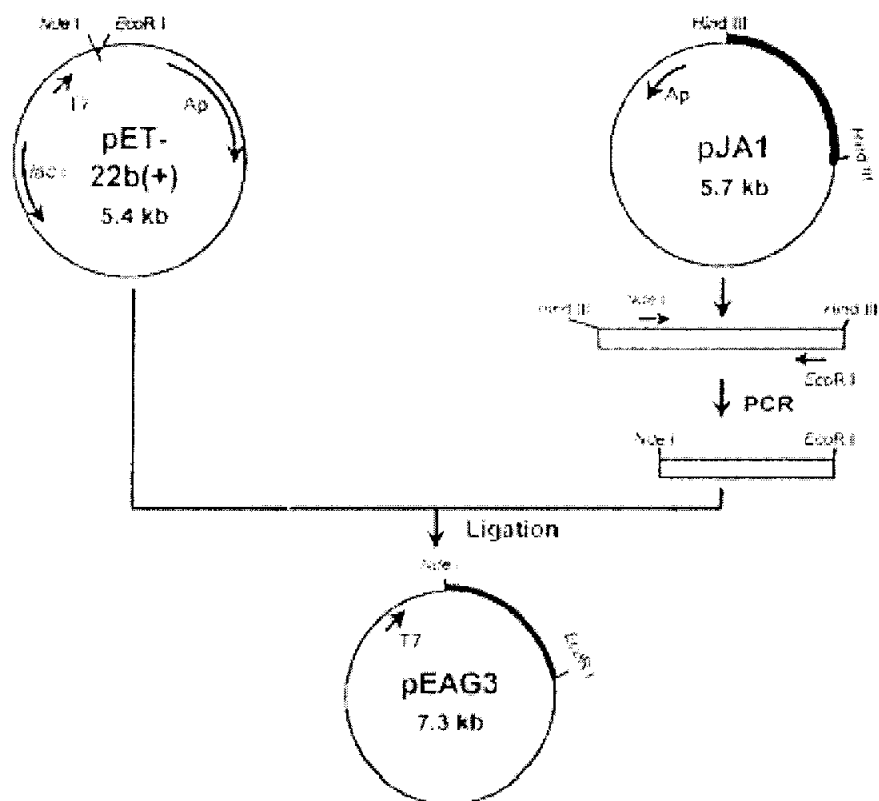


Fig. 2. Construction of overexpression plasmid

0.4ml에 resuspend시켜서 *E. coli* DH5 α competent cell을 얻었다.

Transformation in E. coli

300 μ l의 competent *E. coli* DH5 α 에 4 μ l의 ligation mixture를 가한다. Mixture를 ice에서 40분간 incubating시킨 후 42 $^{\circ}$ C에서 3분간 heating시켰다. 여기에 LB 1ml을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 incubation시켰다. 이것을 ampicillin을 포함한 LB agar에 각 0.2ml씩 도말하여 plate를 37 $^{\circ}$ C에서 12~16시간동안 incubation시켜서 colony를 얻을 수 있었다.

DNA Sequence and analysis.

염기서열의 결정은 ABI prism 377 (Perkin-Elmer) DNA sequencer를 이용하여 결정하였다. pUC계열의 plasmid는 m13RP또는 UP의 primer를 사용하였고 pET22b(+)의 경우 T7 terminal region의 부위를 primer로 사용하였다. 염기서열로부터 얻어진 deduced amino acid sequence의 homology의 분석과 multi-alignment의 분석은 NCBI의 BLAST search program 및 Clustal W multi-alignment tool을 이용하여 분석 하였다. 분석된 염기서열과 아미노산 서열의 배열은 GeneDoc (ver 2.6) program을 이용하였다

Overexpression of pEAG3 and its derivatives

*E.coli*는 37°C LB broth에서 gentle shaking하면서 배양하였다. 하룻밤 배양한 cell의 1% (v/v)를 1L LB broth에 접종하고 OD₆₀₀= 0.6에 이르면 IPTG 혹은 lactose를 최종 농도가 1mM되도록 첨가하였다. Induction을 시작한지 3시간 후에 배양액을 원심분리하여 얻은 cell을 20mM Tris-HCl (pH8.0)에 현탁시킨 후 ice에서 sonication하여 cell을 파쇄시켰다. 이를 30분간 10,000×g에서 원심분리하여 얻은 soluble fraction을 Ni-IDA affinity chromatography를 행하여 정제한다. 단백질을 0.5M imidazole이 포함된 20mM Tris-HCl(pH8.0) buffer에 의해서 용출시키고 4°C에서 20mM Tris-HCl(pH8.0) buffer로 하룻밤 동안 투석하였다. 정제된 agarase의 분자량과 발현된 단백질의 양을 추정하기 위해 SDS-PAGE를 이용하였다

Agarose gel electrophoresis.

DNA 전기영동은 agarose slab gel을 사용하여 1×TBE buffer(10×Tris 30.10g, Boric acid 10g, (Na₂) EDTA 1.794g in 250ml) 에서 수행되었다. Ethidium bromide 는 0.5μg/ml의 농도를 첨가되었다. 0.8% agarose gel 에서 100V로 전기영동시킨 후에 DNA band는 UV transilluminater를 사용하여 확인하였고, Polaroid 카메라로 사진 촬영하였다. Size marker는 *Hind*III로 digest 된 λ

DNA의 fragment를 사용하였다.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SDS-Polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli에 방법에 따라 수행하였다. 정제된 agarase가 포함된 용액을 5분 동안 boiling water bath에서 열을 가한 후 2% SDS Buffer(1.25% Tris-HCl, 20% glycerol, 2% β -mercaptoethanol, 0.001% bromophenol, pH 6.8)를 첨가하였다. 이 sample들은 즉시 12% slab gel 을 사용하여 전기영동하였다. Gel들은 Comassi blue로 염색하였고, Fairbanks et al 의 방법으로 탈색하였다. 분자량을 알아보기 위해 표준 marker로 bovine serum albumin (MW 66,000), ovalbumin (MW 45,000), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (MW 36,000), carbonic anhydrase (MW 29,000) 와 Cytochrome (MW 12,400) 을 사용하였다.

Protein quantification and enzyme assay.

세포 추출물에서 전체 단백질의 농도와 정제된 효소의 농도는 Bradford method를 이용해서 구했다. Standard curve는 bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.)을 이용하여 얻었다. 20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.9 M NaCl에 1% (w/v)agar를 포함한 agar plate는 plate assay시에 agarase activity를 알아 볼 때

이용했다. 정제된 효소를 agar plate에 접종하여 37℃에서 12시간 반응시켰다. 효소의 활성은 plate에 Lugol (0.12M KI에 0.05M I₂)용액을 첨가함으로써 나타나는 transparent halo에 의해서 측정하였다. 또한 liquid assay를 위해서 agarase 활성은 Somogyi-Nelson method 를 통해 결정하였다. 기질용액을 만들기 위해서는 0.3% (w/v) agar를 20mM Tris-HCl(pH8.0), 0.9 M NaCl에 완전히 용해 시켜야 한다. Agarase 활성은 standard로 D(+) galactose를 이용하여 OD₅₁₀에서 흡광도를 통하여 측정하였다. 효소 1 unit는 분당 1μmol의 당을 환원시키는데 유리되는 효소의 양으로 하였다.

Deletions with Exonuclease III

Exonuclease III 을 이용하여 agarase 유전자의 절단 편들을 만드는 절차는 Henikoff ³⁵⁾ 의해 진행되었다. S1 nuclease 와 Exonuclease III는 Promega로부터 얻어졌다. 총 volume 100μl 중에 10μl의 pEAG3 plasmid DNA는 제한효소인 Sac I와 EcoR I에 의해 절단되었다. 절단이 완전히 이루어 졌을 때 200 U의 Exonuclease III를 절단된 DNA에 바로 첨가 하였다. 100μl 시료를 1분 간격으로 sampling하여 1U 의 S1 nuclease를 포함한 S1 nuclease mixture 2.5 μl를 혼합하였다. 이 시료들은 30분 동안 30℃에서 배양하였다. S1 nuclease step 다음에 반응물은 ethanol을 첨가하여 DNA를 침전시켰다. 건조된 pellet은 Klenow 효소 반응 혼합물

10 μ l에 녹였다. Mixture를 37℃에서 3분간 배양하고, ligation시킨 후, *E. coli* DH5 α 로 형질전환시켰다. (Fig. 3)

C-terminal region의 deletion

C-terminal region을 다양한 크기로 제거하기 위해 10 μ l의 plasmid pEAG3을 *Bam*H I과 *Sac* I으로 처리하여 3'쪽을 blocking한 후 1U의 Exonuclease III를 처리 하고 37℃에서 1분 간격으로 반응을 종료 시켰다. 반응이 종료된 시료를 다시 상온에서 S1 nuclease처리 하여 말단을 blunt화시킨 후 ligation시키고 *E. coli* XL1-Blue에 transformation을 실시 하였다. Transformant로부터 plasmid를 분리하고 plasmid에서 3'이 잘려나간 크기의 순서를 기준으로 다시 재분류한 후 염기서열결정을 통하여 잘려나간 3'의 부위를 결정하였다 (Fig. 4). 또한 발현 host인 *E. coli* BL21(DE3) 에 transformation한 후 IPTG를 이용하여 발현을 시킨 후 SDS-PAGE를 실시하여 발현 된 단백질의 크기를 측정 하였다.

Kinetics determination

Kinetic parameter를 구하기 위하여 agarase가 포함된 용액을 다양한 농도의 agar-용액과 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법을 이용하여 활성을 측정

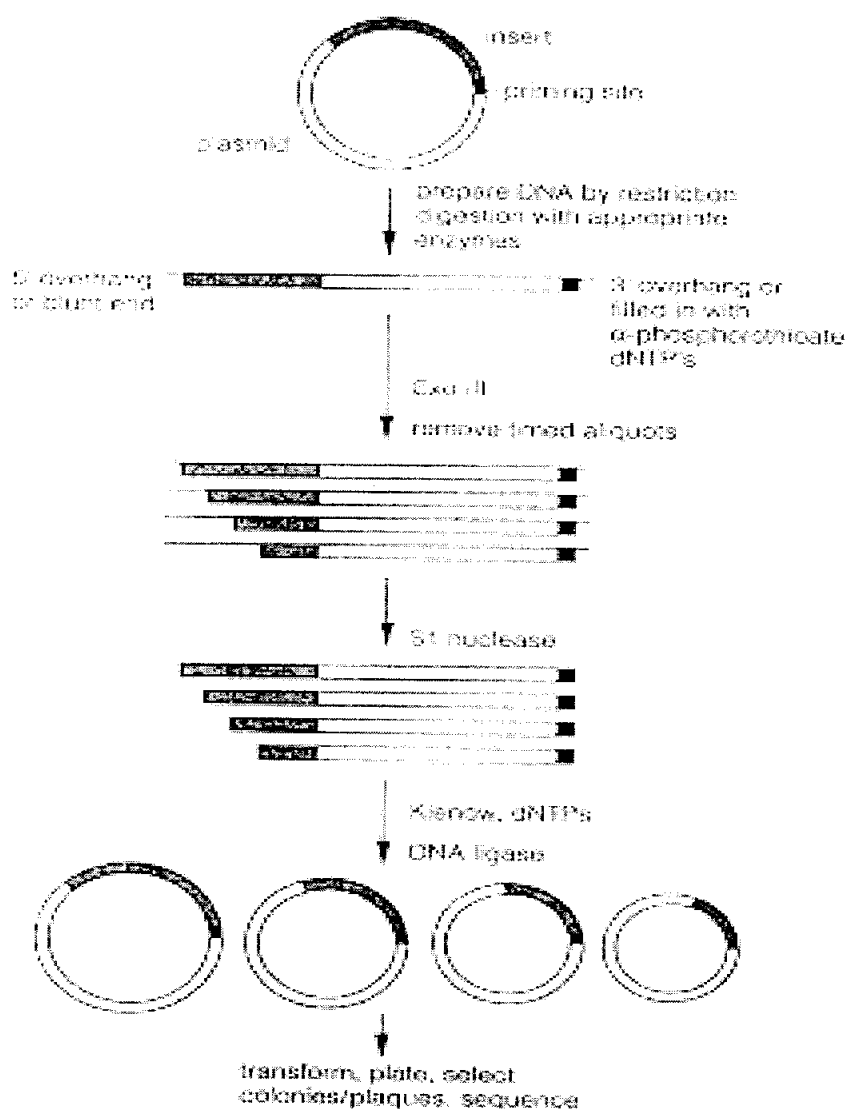


Fig. 3. Schematic diagram of the Exonuclease III method

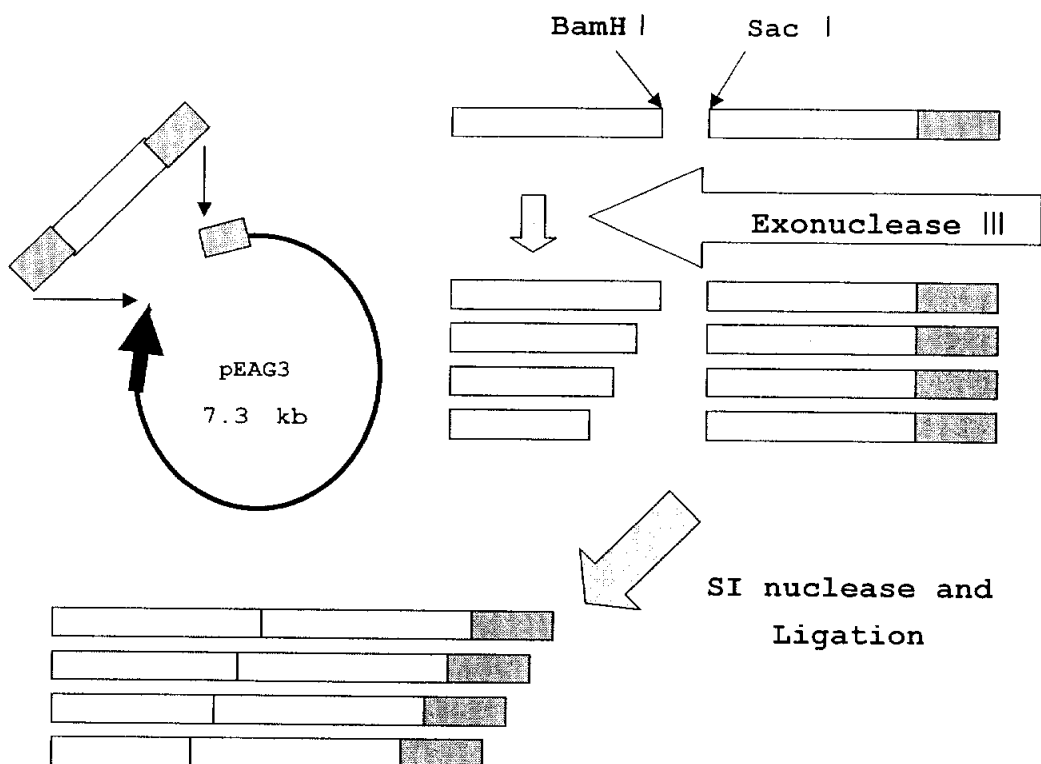


Fig. 4. Deletion of C-terminal region of agarase gene(*pja4*) by Exonuclease III treatment.

하였다. 측정된 효소 활성치를 이용하여 Michaelis-Menten 식을 이용하여 K_m , K_{max} 값 등을 결정하였다.

Thermal Stability

Thermal stability 는 효소를 20mM Tris-HCl(pH8.0), 0.9 M NaCl buffer 에서 30 분 동안 40℃에서 80℃까지 10℃간격으로 효소를 preincubation 후에 agarase 잔류활성을 측정함으로써 결정하였다.

결 과

Nucleotide and deduced amino acid sequence

pJA plasmid의 3.0kb *Hind*III fragment 의 DNA sequence를 Fig. 5에 나타내었다. Fragment내에는 한 개의 ORF만 존재했으며 ORF는 642개의 amino acid residues를 coding 하는 1,926 nucleotides로 구성되어있다. Sequence로부터 계산한 polypeptide의 molecular mass 는 69,540 Da 이며 *pjaA* gene의 G+C content는 54% 이다. Start codon으로부터 6 bp upstream에 위치하는 GGGAG sequence는 consensus Shine-Dalgarno sequence 와 homologous한 ribosomal binding sequence로 추정된다.³⁶⁾ 또한 18bp의 gap을 두고 -35, -10 promoter consensus sequence 인 TTGACA, TATAAT 와 homology를 보이는 CTGCGA와 CATAAT sequence 역시 coding region의 upstream에서 찾아볼 수 있었다.³⁷⁾

*Comparison of the PjaA with α -amylase from *A. haloplanctis**

PjaA 단백질의 amino acid sequence를 다른 β -agarase의 amino acid sequence와 비교했을 때 similarity가 20% 이하로 매우 낮았다. 그러나 BLAST search program을 이용하여 PjaA 단백질 내의 32 - 482번 amino acid

*Hind*III

-699 AAGCTTGCCAGCCAGCCAGGTACCAATATCCAGCACCGCCTTGCAGTGCCTACCCGCTGCGCCATAGCCCGCCGGCCGCTGAATCTG
 CCCCAGCATGAGACATCAAAACCCGCTGATATAGCCTCGGGATATCTGCCTAGAATAGTTGCGGTTAGGAGAGATTATGAAACTCTGCA
 GCGCATATTTAGGGATGTGCGCAAAACAATGGGTCACTGCTATCCACTTGCACCTTTTGCAGTTTACCCAAACAGCGCGCAAACTTAA
 GCAGCCCCGCAACACTCTCTAAACAAAGACGCTCAGCCACGCTCTCGGGCAGCTCAGGTTAAACCCAAATCGGGCAGCTTCGGGTCTGTCA
 TAACGGGGGGTGGGTTGTCGAGCGTATATCGCTGGTATAGGGCCATTTCACCTAACGTTTATGGCGCAGAGGATAAAGCTTGGGCTATA
 AAAAAAGCCAGCCGCTCGCGCCATTTCGCACTCTTCAACATTATTAATTTGCATACGATTCAACCTCACTGCATACGTATACATCTTGGC
 CTTGCCCTTAGGCGCAGCTTATGTTGTCTGGCAGTGCAGTAAACCAATAAAGATCATCGCCATCGCTTAAGGCGATTAGCGTTGCG
 CATTAGCAGGCCCACTTCGCACTTCTTTGATGCACCCACATAATCAATAACCAACTGGAGTCACACATGAAGCTATTGCGCTGCC 20

1 -35 -10 S.D. M K A I A L P
 CGCAACACCTAAACGGCTTAAGCAAAAAACCTTTACGCGCTACCTTTTAAACAGTTTGTGGGCGCCGCGCTTACGCTGGCGGCACA 110

8 A T P K R L K Q K T F T R L P F K Q F V G A A A L T L A A Q
 GTCATCTTACGCTGCGCACCGGCTTTGTGCACTTATTGAGTGGAGCTGGAAACGACATAGCCGATAGGAGGAAAACCTTCTCGTCCCAA 200

38 S S Y A G T A F V H L F E W S W N D I A D E C E N F L G P K
 GGGCTTTBATGGGTACAAATATCACGCGCCACCGAACAGCTCAAAGGCCAGCAGTGGTGACGCGTTATCAGCGTTATCACTTACCTACCAAAA 290

68 G P D A V Q I S P P T E H V K G Q Q W H T R Y Q P I T Y Q W
 TTTAAGCAGCCGAGCGGCACTGAAGCCGAACTCCAAAGCAATGATCAACCGCTGCCACAGTGGCGGTGTAATAAATTTAGCGCGATATAGT 380

98 L T S R S R E A E L S M I N R C H S A G V K I Y A D I V
 CGTCAACAGATGGCCAACTATTAGTCAAGGCAATTACGGTGTGACGCGCACTTGGTGGGACCGCGGATTACCCGCAATTTAGCAC 470

128 V N Q A N H N H L V E G N Y G V D G T W A P R D Y P E F S T
 GCAAGCTTTACCCGCTGCGCACCGGCTTACGAGCGCAACTCTGTATGGAGCTGTGACTTAAGCGTATGCGCGATCTGATGATCA 560

158 Q D F H P G C A T D Y S D A N S V N S C D L S G M P D L D H
 CAGCCAACTTATGCGCGATACCGTGCCTTACGCGCTTACCAATAAGCGGTGATGGCTTCCGCTGCGCGCGGAA 650

188 S Q P Y V R D T V A N Y L T R L T N H G V D G F E I D A A K
 CATATGCGCCCTCCGACATTATGGCTTATTACAGCGCGGTAACCCCTGGGTATTTTAGAGGTGATGGCTTGGCGGTGAAGC 740

218 H M P P S D I N G P L Q A A G M P N V P L F V I G A G E A
 TCCAGAGATCCAACTGCGCACTACCTTACTAGCGCTGTACTGATGATTTAGCTACGCGCGCGCTGCGCGCGGCACTTTAATGGTCA 830

248 P E I O P A N Y T Y L G A V T E F S Y G P A L A G N F N Q
 AATTAACTATTATAGAGCTTGGCCAACTGGGCTTACTGCCCTCAGCGGATGCGCTTAGTATTGTGATGAACAGCGCGCGGAGCG 920

278 I K H L L E L G P N W G L L P S A D A L V F V D E N H D R E R
 CGGCGCGGTGGCGCGGTAACTTTTATACAAAGATGGCGCAAGTACAAGTGGCCAACTGTTTATGTTGGCTTGGCTTGGCGGTGAAGC 1010

308 G H G G G G N L F Y K D G A X Y N L A N V P M L L A Y P Y G Y
 TCCAAAGATCATGTGCGGTACGAGTTTGAATGAACCACTCAAGCGCGGCAAGCAGATAGGCGCGCTGCGCGCGGCGGTGAGCGCAA 1100

338 P K I H S G Y E P D E T T Q A G T D I G P P A P G G C D A N
 GGGTGGGTATGTCAGCACCGCTGGGCAACATCGCCAAATAGTGGGTTTGAATAATACCAAGCTGGAGCGCTTGGAGCTTGAATCA 1190

368 G W V C Q H R W G N I A N H V G P R N Y T V D A W S L D N Q
 AGTGGTGAATTAACGATAACGCTTGGCTTGGGCGCGGCAAGGCTTTGTGGTGAATCAACAGCGTCAAGGCGCGTAAACCAAACT 1280

398 V V I N D N A I A F G R G D K G F V V I N N Q T
 CCTCTACCGCGCATGCGCGCGGTGACTATTGCGATATCTTGGTGTGATGATGAATGAGCGGTAGCAACATCAGTGTGACACAA 1370

428 L Y T G M P A G D Y C D I L R A D D E C S G T H I S V D W N
 CGGCTTGGCGCTTATGCGTGGCGCTGAATCAGCGTCAAGCTTTCATGGCGCGCGCGCGCGCGGCTGAGCAATCAACTCCGCTGCGC 1460

458 G P A S F S V G P E S A S A I H G G A R P S V S N Q L P V A
 GATTATCGAGGCGCGCGCGAGACGCTAGAAACAGGTAGCCAACTAACCTTCAAGTGGCGTTAACTGATAGTATGAGTACGCGCATTTGT 1550

488 I I E G A P E T L T G S Q V T L S G V N S Y D S D G S I V
 CAGCTACTTTAGGAGCACCGGTGCCACATCAACACTTACCGCACGCTGGCAATCCCGGACCGCTACCTTTAGCTTAACGCTAAC 1640

518 S Y L H W S T G A T T S N I T A T L D N P G T A T V T
 CGACACCGGCGCGCTGACAGCGGAGAGGTAAATTTACGCTGGGTGGCGATGAGCTAATCAGTAACTTTGATGCGCTCTACTTTGCG 1730

548 D A N Q G A T D S R E V S I Q V G G D E L I S N P D A L Y F R
 CGGTACGCGCAACGCGCTGGCGCGCGGTGCCATGACGTTGGTTCGACGATCAGCTTGGCAATTAGAGCTTCAAGTTTGAATGCGCGCAAGCCAA 1820

578 T P N G N A A S P M T L V D D N T W Q L D V Q P D G Q A N
 CCAGCGCTTTAAGTTTGAATTTAGCGCGCGATTTGGAGCCAAACTATGGCGCAACCAACCTGACGCGGTGCTGGAGCAGTAACCGCGAT 1910

608 Q R F K P D L A G D N S Q N Y G D N N I L T A C N T V T A M
 GACATCAACACCAATGTGATTTGGTCAGTACCGGTGCAAGTAAACGACGCGGAGCTAAGTTACAGCATCAACTCATTTGGCCGCGAGGCTTT 2000

638 T S T P M =
 AACAGCAATTGGTACGGTGTTCAGTGGTGGCACTTTAACTTGGAGCTGACGCGCAATGAATTTAACCGCGATTAATCTGGAGT 2354

GTCAATGTTCAGCTCGACGCGCGCGCGCTTACGCTTATAAGTTTGAACGCTACTGTGATTTGGTCCCAACTACGCGGATTAACATAGC
 GATGGCATCTGATAGCAGCGGCAATGAGCTTGTGATGGCGCAACCGGTAACTGCTACCTTGAAGTAAAGCAACAACTTGTCTTAC
 CGCGCGCTTGAAGCCTTAGACCTAGAGACAAAAACCGTGGCGACCCCGCGGCTTTTATGATGCGAGCTTTACGCTGAAGCTT

*Hind*III

Fig. 5. Nucleotide sequence of the agarase gene (*pja4*) and the deduced amino acid sequence. The open reading frame is composed of 1926 nucleotides and 642 amino acids. The putative -35,-10 regions and S.D. sequence are underlined. The putative protein ligands of chloride binding site compared with α -amylase are black boxed. The sequence reported here is available in the GenBank Data Library under the accession number, AF153911.

residue가 남극으로부터 분리한 *A. haloplanctis*의 α -amylase(GenBank accession No. X58627)와 45%의 identity를 보였다. (Fig. 6)

Chloride binding site of PjaA

대부분의 미생물 유래 α -amylase 가 chloride 비의존성 효소인데 반해 *A. haloplanctis* 의 α -amylase는 chloride를 필요로 하는 enzyme으로 밝혀졌다. 이 chloride binding ligands 는 *A. haloplanctis*, *Drosophila melanogaster*, 척추동물의 췌장과 침선 등을 포함한 많은 다른 sources로부터 얻은 α -amylase에서도 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다. Chloride ion 은 amylolytic activity의 allosteric effector로 알려져 있으며 흥미로운 것은 chloride 의존성 α -amylase에 필수적인 conserved chloride binding ligand가 PjaA enzyme에도 존재한다는 것이다.(Fig. 7, 8)

Conserved chloride binding site of β -agarase and α -amylase

1996년 Feller et al.에 의해 site directed mutagenesis에 의해 *A. haloplanctis*의 α -amylase 의 chloride binding에 대한 구조적, 기능적 측면에서의 연구가 이루어졌다. ³⁸⁾ 이 결과에 따르면 Arg-196, Asn-286, Lys-324 이 세 amino acid residue가 chloride ion binding을 위한 protein

pjaA: 32 ITIAAQSSYAGIAFEVHLEFWSNDIADECENFLGPKGFDVQISPPTEHVKGQOWNTRYQ 91
amy : 16 ILLPSIATATPIITEVHLEFNNQDVAQECEQYLGPKGYAAVOVSPPNEHITGSQOWNTRYQ 75

pjaA: 92 EITYQNLTISRSGTEAELOSINRCISAGVQIVADIVVNQVANHLEVGNYGVDSITWWAPRD 151
amy : 76 PVSYE-LQSRGENRAQFTDYNRCSAAGVDIVVDILINHVA—AGSGTGTAGNSFGNKS 131

pjaA: 152 YPEFSTODEHPGCATDYSNANS—VWSCDSMPDLDHSQPVVRDIVANVLTRELINMG 207
amy : 132 FEITYSPODEHESCITINNSDYGNDRYRVQNCQVSLADELTASNYVQNTIAHINDLQAIS 191

pjaA: 208 VDSERIDAAKHMPPSDINGEL-QAAGNPVFELEVI GAGGEA PEIQPANYTYLCAVTEESY 266
amy : 192 VKGERFDASKHVAASDIQSLMAKVNGSPVFEQEVLDGGEA—VGASEYLTGLVTEPKY 249

pjaA: 267 GPALAGNE-NGQIKHLELGPNGLLPSADALVEVDNHDRERGHGGSNLF-YKDGAKIN 324
amy : 250 STELENTERRNGSLAWLSNFGGAGFMSSAVVEVDNHDNORGHGGAGNVITFEDGRLID 309

pjaA: 325 LANVEMLAYPVGYPKIVSGYQDETTCAGIDIGPPAPGG—CDANGVCOHRENTIANM 381
amy : 310 LANVEMLAYPVGYPKVSSYQHGDDAGGPNVPEVINNGNLECFASNAKCEHRSYTAGG 369

pjaA: 382 VGERNYIVDAASLDNQVVINDNATAFGRGDKGFVVINNGOSSVNOILYTGMPAGDYCDIL 441
amy : 370 VGERNNIADNNAVTVWDNTNNQISFGRGSSGHMAINKEDSILTAIVQIDVASCQVGVNL 429

pjaA: 442 RAD—DECSGINTISVONNEFASFSVSPESASATHGGARPSVSN 482
amy : 430 KGELSADAKSESSEVITVNSDETINLNIGAWDAATHKNKALNTSS 475

Fig. 6. Amino acid comparison of the PjaA from *Pseudomonas* sp. W7 and the Amy from *A. haloplantis*. Black boxes show 45% identity between the PjaA and the Amy. The sequences were aligned by using BLAST search system in NCBI (National Center for Biotechnology Information).

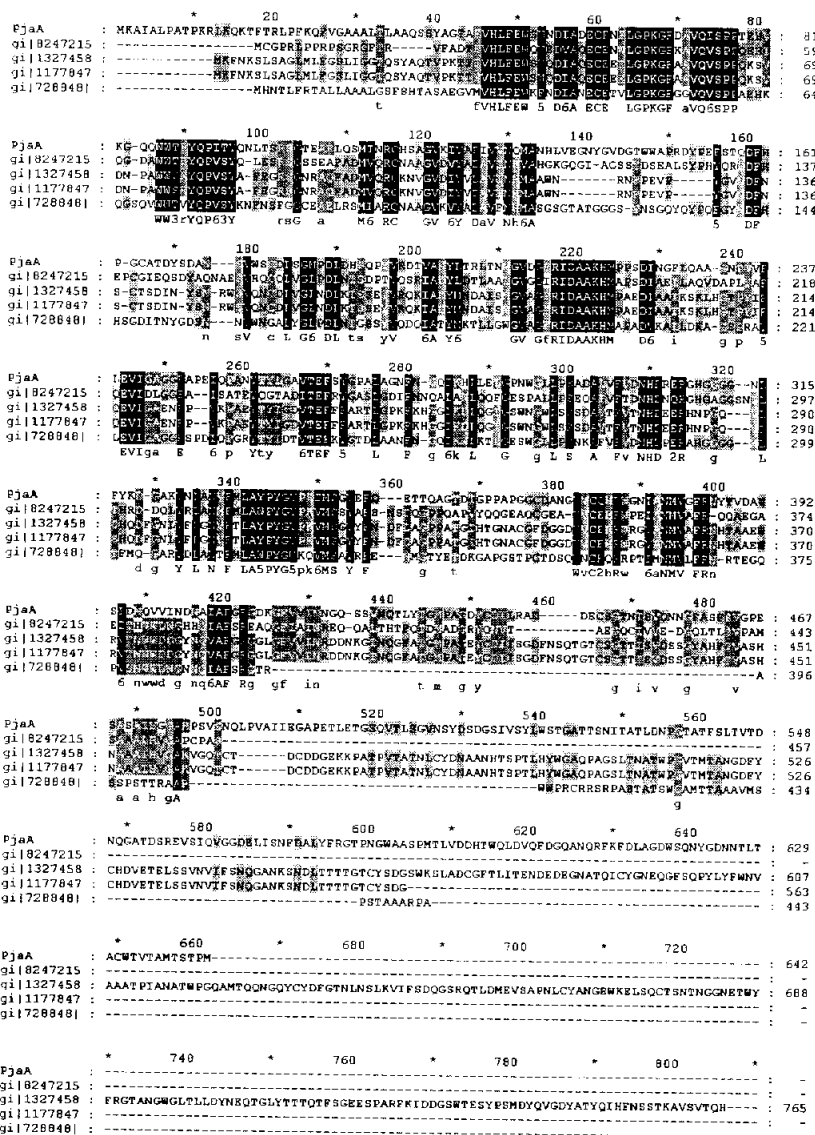


Fig. 7. Amino acid comparison of the PjaA from *Pseudomonas* sp. W7 and the amyase gene from other microorganisms. PjaA : *Pseudomonas* W7 agarase, gi|728848 : *Aeromonas hydrophila* amyase, gi|1327458 : *Pseudomonas* sp. KFCC10818 alpha-amylase, gi|8247215 : *Halomonas meridiana* alpha-amylase, gi|1177847 : *Pseudomonas* sp. KFCC10818 alpha-amylase

				*	↓								
<i>Pseudomonas</i> sp.W7 β -agarase	207	G	V	D	G	E	R	I	D	A	A	K	217
<i>Alteromonas haloplanctis</i> α -amylase	191	G	V	K	G	E	R	F	D	A	S	K	201
<i>Drosophila melanogaster</i> α -amylase	197	G	V	A	G	E	R	V	D	A	A	K	207
Vertebrate pancreas α -amylase	202	G	V	A	G	E	R	L	D	A	A	K	212

				*	↓								
<i>Pseudomonas</i> sp.W7 β -agarase	297	L	M	E	V	D	N	H	D	R	E	R	307
<i>Alteromonas haloplanctis</i> α -amylase	281	V	M	E	V	D	N	H	D	N	Q	R	291
<i>Drosophila melanogaster</i> α -amylase	299	L	M	E	V	D	N	H	D	N	Q	R	309
Vertebrate pancreas α -amylase	305	L	M	E	V	D	N	H	D	N	Q	R	315

			*										
<i>Pseudomonas</i> sp.W7 β -agarase	334	P	Y	G	Y	P	K	I	M	S	G	Y	344
<i>Alteromonas haloplanctis</i> α -amylase	319	P	Y	G	Y	P	K	V	M	S	S	Y	329
<i>Drosophila melanogaster</i> α -amylase	338	P	F	G	T	P	R	V	M	S	S	F	348
Vertebrate pancreas α -amylase	344	P	Y	G	F	T	R	V	M	S	S	Y	354

Fig. 8. Alignment of the chloride binding site from several chloride dependent α -amylases. Black boxes (asterisk) are protein lignads for the chloride binding. Shaded boxes are identical residues. GenBank accession numbers of *A. haloplanctis*, *D. melanogaster* and vertebrate pancreas are X58627, X04596, and P00688, respectively.

ligand로서 *A. haloplanctis* 의 enzyme activation에 중요한 역할을 하며 (Fig. 8), basic residue인 Lys은 chloride 의존성 α -amylase 내에서 종종 Arg로 치환되는 반면 Arg 와 Asn residues 는 항상 변화가 없다. *Pseudomonas* sp. W7의 PjaA 에서 chloride binding 의 세 개의 residue는 Arg-212, Asn-302, Lys-339로 나타났다. PjaA 단백질은 *A. haloplanctis* α -amylase와 밝혀진 다른 agarase의 sequence와 비교해 볼 때 PjaA는 conserved chloride binding ligands 만을 공통으로 가지고 있었다.

Effect of chloride binding site of β -agarase

PjaA 단백질의 enzyme activity에 NaCl이 미치는 영향은 이미 본 연구실에서 Ha et al.에 의해 PjaA 단백질의 agarolytic activity가 NaCl 농도를 0.9M 까지 높였을 때 최적이었다고 보고된 바 있다.³¹⁾ Deduced amino acid sequence에 의하면, PjaA 단백질 내의 이 conserved binding ligands 가 enzymatic activity를 조절하는 데 기여한다고 볼 수 있다. 그러나 구조와 기능을 밝히는 데는 더 많은 연구가 필요하다.

Overexpression of the pjaA gene

E. coli 내에서 recombinant agarase 의 expression 을 위해서 lac promoter

의 조절을 받을 수 있는 완전한 agarase gene을 포함하는 pJAI plasmid를 제조하였다³¹⁾. 그러나 pJAI plasmid가 transformation 된 *E. coli* JM83은 적은 양의 enzyme 을 생산하였다. 발현량을 증가시키기 위해 pEAG3 plasmid를 PCR에 의해 construction 하였다.(Fig. 9) Fig. 10에 보듯이 pEAG3 plasmid를 포함하는 transformant는 PjaA 단백질에 해당하는 71kDa protein 을 대량 발현하였다. Sonication으로 세포를 파쇄시킨 후 insoluble fraction보다 soluble fraction에서 더 많은 PjaA protein이 관찰되었으며, 이는 PjaA 단백질의 아미노산 서열을 분석해볼 때 hydrophilic한 성질을 나타내고 있다는 사실과 깊은 관계가 있을 것으로 추정된다.

Truncated plasmid of pEAG3

C-terminal region의 기능을 이해하기 위해 pEAG3 plasmid로부터 3'-end가 deletion 된 plasmid들을 제조하였다. pEAG3 plasmid의 C-terminal이 truncated된 fragment를 포함하는 3개의 plasmid들을 얻을 수 있었으며 이를 각각 pEAG3-1, pEAG3-2, pEAG3-3 plasmid라고 명명하였다. (Fig. 11) pEAG3-1, pEAG3-2, pEAG3-3 plasmid를 포함하는 *E. coli* transformant들은 각각 58kDa, 52kDa, 44kDa 의 protein을 성공적으로 대량 발현하였다. (Fig. 12) PjaA 단백질의 C-terminal로부터 182 amino acid residue가 deletion 된 pEAG3-2 plasmid는 pEAG3나 pEAG3-1보다 plasmid들이 생산하는 PjaA

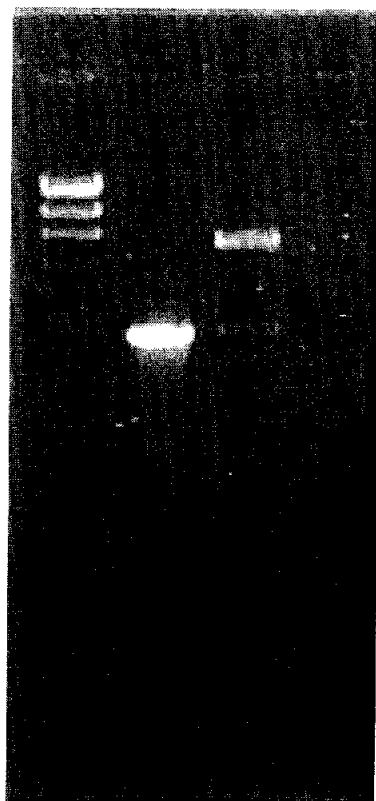


Fig. 9. Electrophoresis of PCR product and pEAG3 fragment.

Lane 1 : Molecular weight marker(λ -DNA/*Hind*III)

Lane 2 : PCR product

Lane 3 : pEAG3/*Nde* I. *Eco*RI

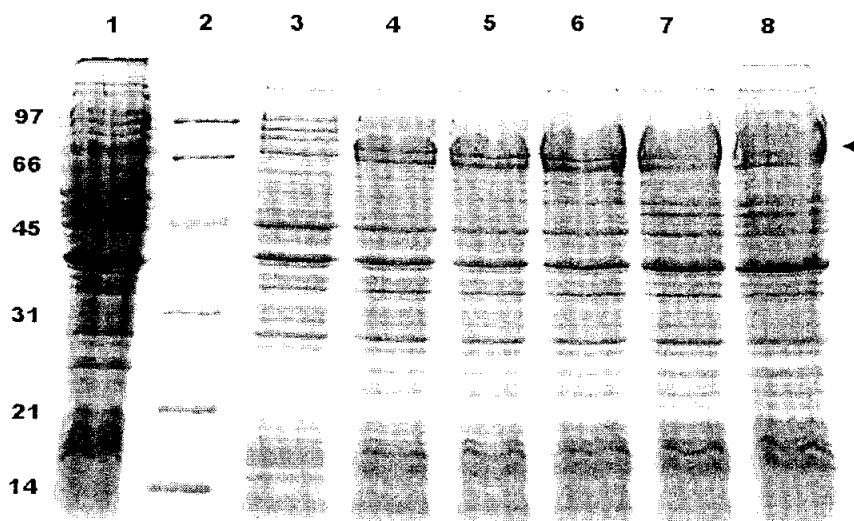


Fig. 10. Time Course yield of *E. coli* BL21(DE3)/pEAG3

Lane 1 : *E. coli* BL21(DE3)/pET-22b(+)

Lane 2 : Molecular weight size marker

Lane 3 –8 : Cell extracts from *E. coli* BL21(DE3)/pEAG3 cultured
for 0,1,2,3,4,5h after induction, respectively

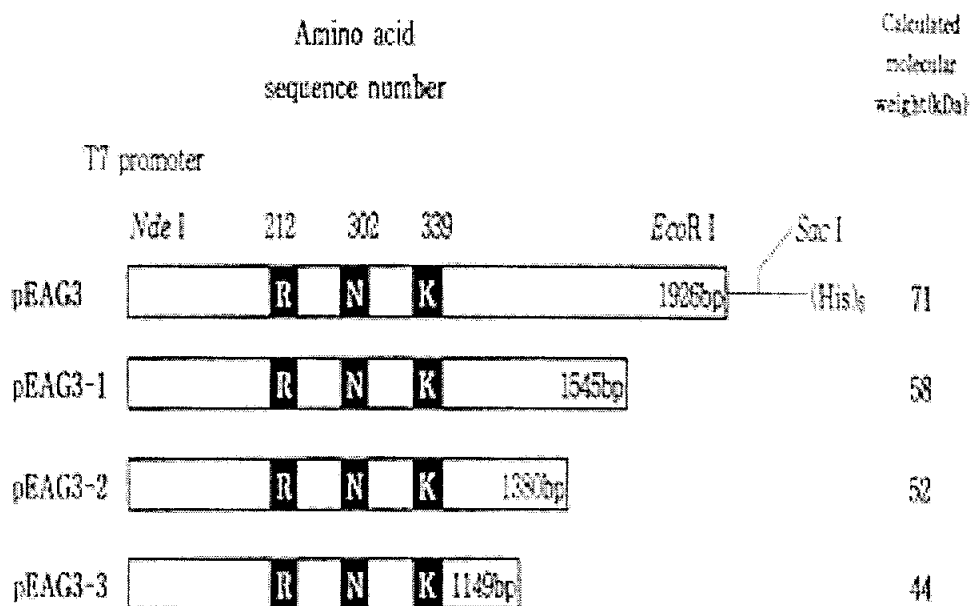


Fig. 11. Deletion of pEAG3 with exonuclease III and the molecular weight calculated from DNA sequence

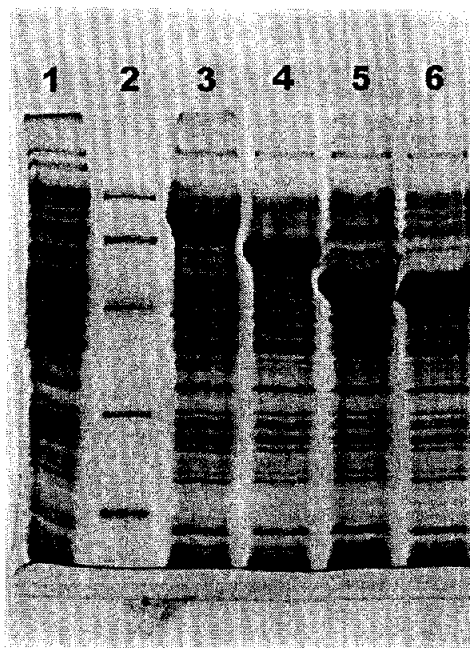


Fig. 12. SDS-PAGE with pEAG3 deletion mutants

Lane 1, pET-22b(+)

Lane 2, molecular weight standard

Lane 3, pEAG3 ;

Lane 4, pEAG3-1

Lane 5, pEAG3-2

Lane 6, pEAG3-3

단백질의 유도체들보다 agarolytic activity가 감소하였으며 1,149bp가 결실된 pEAG3-3 plasmid는 agarolytic activity를 완전히 상실하였다 (Fig. 13). 이 결과에서 PjaA 단백질의 C-terminal로부터 truncated 된 amino acid residue 수가 증가함에 따라 agarolytic activity가 감소하고 있다는 것을 알 수 있다. 이는 C-terminal의 amino acid residue 가 agarolytic activity를 가지는데 매우 중요하다는 것을 말한다. SWISSPROT sequence data bases를 이용한 homology search에서 truncated C-terminal region의 amino acid sequence는 *Clostridium thermocellum*³⁹⁾ 의 cellulase를 coding하는 *celJ* gene과 38%의 identity를 가지며, *C. histolyticum*⁴⁰⁾ 의 collagenase를 coding하는 *colG* gene 과는 36%의 identity를 가졌다. 그러나 이 region의 특별한 기능에 대해서는 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

Endoglucanase, xylanase, chitinase 등의 많은 polysaccharide hydrolytic enzyme 들이 동물, 식물, 미생물에서 얻어졌다. 이 enzyme 들의 conserved domain 들은 매우 다양한 형태를 가지고 있다. 그러나 agarolytic system에 관여하는 정확한 domain은 아직 밝혀지지 않은 상태로 남아있어 앞으로 더 많은 연구가 요구되고 있다.

Effect of inducers and host cells for overexpression

PjaA 단백질과 그 유도체들을 2 종류의 다른 inducer와 3종류의 다른

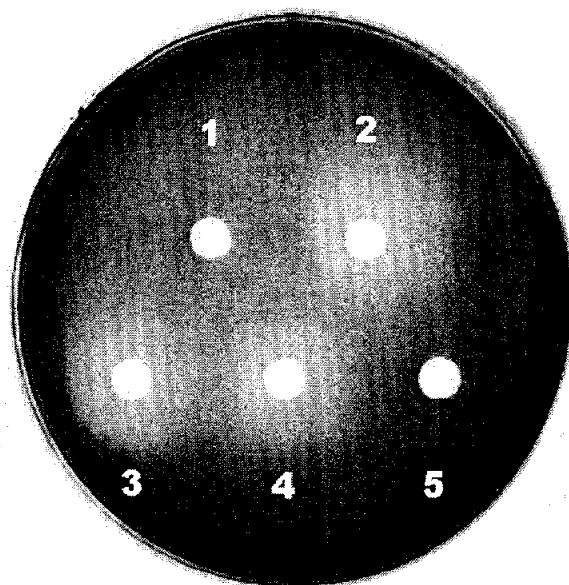


Fig. 13 Agarolytic activity of *E. coli* BL21(DE3) with pEAG3 deletion mutants. Agar plate was stained with I_2/KI solution (0.05M I_2 in 0.12M KI)

1, pET-22b(+); 2, pEAG3; 3, pEAG3-1; 4, pEAG3-2; 5, pEAG3-3

host strain을 이용하여 induction 시켰다. *Pseudomonas* sp. W7 유래의 β -agarase 유전자를 갖는 plasmid pEAG3을 *E. coli* strain BL21(DE3), AD494(DE3), AD494(DE3)pLysS에 transfer시켜 얻은 transformants를 각각 IPTG와 lactose를 inducer로 이용하여 agarase 발현량을 조사하였다. 각각 1L culture의 cell 상층액으로부터 50mg의 soluble fraction을 회수하여 agarase activity를 측정하였다.

Table 2에서 보듯이, pEAG3 plasmid가 transfer되어있는 *E. coli* BL21(DE3)에서 lactose를 이용한 induction에서의 agarase activity는 IPTG induction보다 4.5배 높았으며 다른 host인 AD494(DE3)와 AD494(DE3)pLysS 에서도 같은 결과를 나타냈다.

서로 다른 host 간의 agarase activity 역시 비교하였다. *E. coli* AD494(DE3)로부터 얻어진 agarase가 BL21(DE3)에서 얻은 agarase보다 높은 activity를 나타냈으며, 특히 AD494(DE3)pLysS가 agarase 발현에서 가장 효율적인 host로 조사되었다.

Effect of lactose concentration and incubation time on overexpression

앞에서 Exonuclease III를 이용하여 agarase 유전자를 deletion하고 그 유전자들의 대량발현된 protein (PjaAI and PjaAII)의 존재를 관찰하였다.

Table 2. Effect of host cells and inducing agents on overexpression.

Strain	Plasmid	Inducing agent	Specific activities (U/mg)
BL21(DE3)	pEAG3	IPTG	0.224
BL21(DE3)	pEAG3	Lactose	0.918
AD494 (DE3)	pEAG3	IPTG	0.352
AD494 (DE3)	pEAG3	Lactose	0.917
AD494 pLysS	pEAG3	IPTG	0.498
AD494 pLysS	pEAG3	Lactose	1.499

이들 truncated agarase gene 들을 *E. coli* AD494(DE3)pLysS에 transfer시켜 agarase protein들이 대량발현되는지 조사하였다. 그 결과 대량발현된 agarase 인 PjaA, PjaAI, PjaAII 단백질을 cell lysate로부터 SDS-PAGE로 확인할 수 있었다 (Fig. 14).

Lactose에 의한 대량발현은 *E. coli* 내에서 lactose의 분해 산물로 생성되는 glucose에 의해 발현이 저해될 수 있는 가능성이 있다고 생각되어 왔다 ⁴¹⁾. 이를 확인하기 위해 lactose 농도와 배양 시간이 agarase 발현에 미치는 영향을 조사해 보았다. pEAG3-1 plasmid가 transfer된 *E. coli* AD494(DE3)pLysS는 lactose 농도를 10mM까지 점차 증가시켜 주면서 배양되었다. 그 결과 배지에 첨가된 lactose 의 양이 0.5mM 에서 10mM에 이르기까지 agarase 단백질의 발현량은 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 15). Fig. 16에서 PjaAI 단백질이 lactose induction 후 배양 시간에 따라 받는 영향을 조사한 것으로 agarase 단백질이 induction 후 2시간 후부터 cytoplasm 내에 축적됨을 보여주고 있으며 lactose에 의한 repression은 전혀 관찰되지 않았다.

Purification of PjaA protein and truncated agarases

C-terminal deletion에 의한 agarase activity의 영향을 조사하기 위해 truncated agarase인 PjaAI과 PjaAII 단백질들, 그리고 intact form인 recombinant agarase

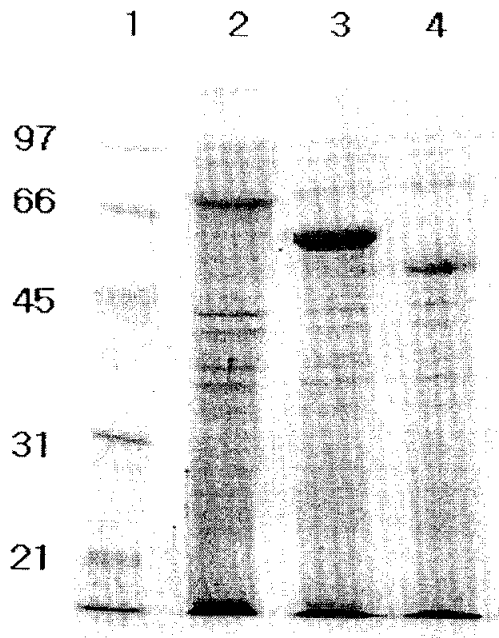


Fig. 14. SDS-PAGE of overexpressed agarases from *E. coli* AD494 (DE3)pLysS harboring pEAG3 and derivatives.

Lane 1, molecular marker (low range molecular marker

lane 2, PjaA (pEAG3)

lane 3, PjaAI (pEAG3-1)

lane 4, PjaAII (pEAG3-2).

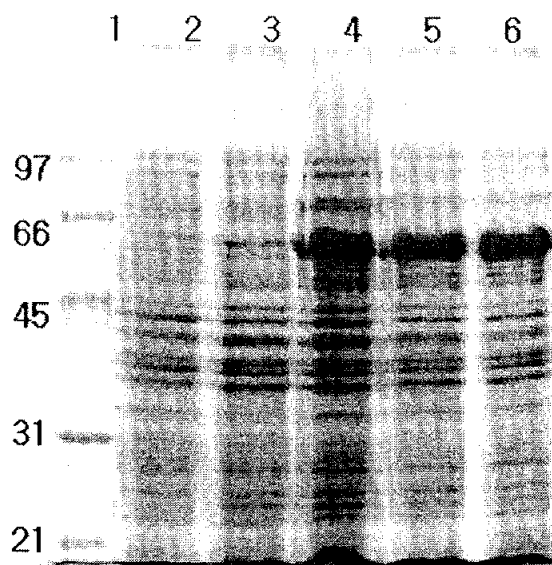


Fig. 15. Effect of lactose concentration on expression from *E. coli* AD494 (DE3)pLysS harboring pEAG3-1.

Lane 1, molecular marker

Lane 2, no lactose

Lane 3, 0.1 mM lactose

Lane 4, 0.5 mM lactose

Lane 5, 1 mM lactose

Lane 6, 10 mM lactose

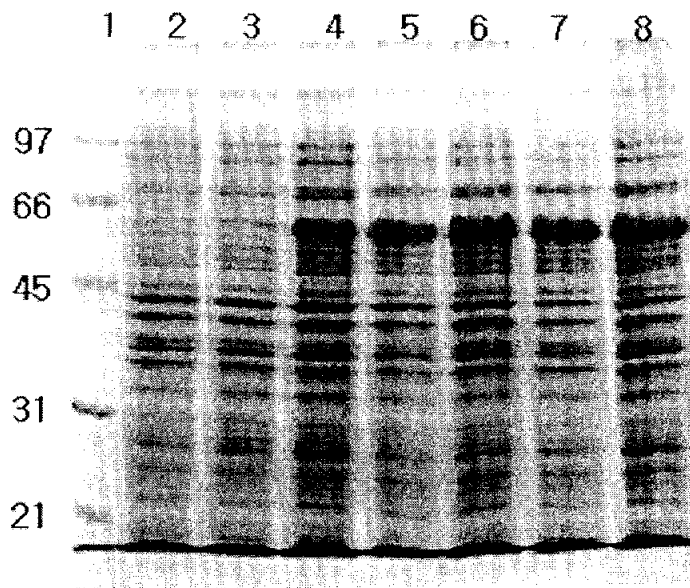


Fig. 16. Time course yield of PjaAI produced in *E. coli* AD494 (DE3)pLysS harboring pEAG3-1.

Lane 1, molecular marker

Lane 2, not induced

Lane 3, 1h

Lane 4, 2h

Lane 5, 3h

Lane 6, 4h

Lane 7, 5h

Lane 8, 6h

PjaA 단백질을 정제하였다. 각 plasmid 의 C-terminal에는 6개의 histidine tail이 있으므로 이 단백질들을 정제하기 위해서 metal chelating affinity chromatography를 이용하였다. Cell lysate의 soluble fraction을 Ni-IDA column (Novagen Co.)에 loading 시키고 0.5M imidazole로 elution 시켰다. Elution된 agarase를 20mM Tris-HCl (pH8.0)으로 투석한 후 SDS-PAGE 상에서 분석하였다 (Fig. 17). 정제된 recombinant protein은 분자량이 각각 71kDa, 58kDa, 52kDa로 나타나 DNA sequence로부터 계산한 값과 일치했다. Table 3은 Ni-IDA affinity chromatography로 truncated agarase를 정제하는 과정을 나타낸 것이다. Purification yield 와 specific activity는 C-terminal 의 길이에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 정제된 agarase PjaA, PjaAI, PjaAII 단백질들의 specific activity는 각각 5.0 U/mg, 31.0 U/mg, 1.2 U/mg으로 나타났다. PjaAII 단백질의 specific activity는 정제된 enzyme의 양에 비해 매우 낮게 나왔다. Agarase PjaA 단백질 역시 각각 다른 host에서 IPTG와 lactose를 이용하여 induction한 결과, specific activity는 서로 달랐으나 purification yield는 거의 비슷했다.

정제한 agarase 들의 agar degrading activity는 각각 agar plate와 liquid assay를 통해 조사하였다. Table 3과 Fig. 18에서 보듯이 agar polymer는 liquid 상태나 solid 상태에서 모두 agarase activity에 영향을 주지 않았다. Fig. 19는 PjaA 단백질과 truncated agarase들의 extracellular agarase activity를 agar plate 상에서 test한 것이다. 이는 cytoplasm으로부터 정제한 agarase

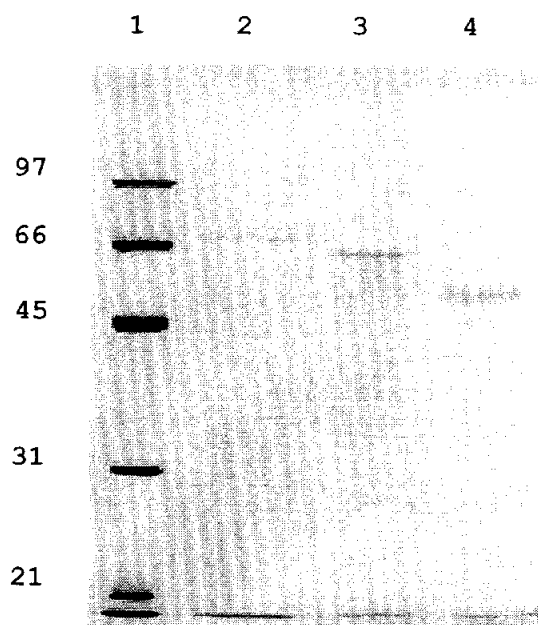


Fig. 17. SDS-PAGE analysis of the purified agarases from pEAG3 derivatives. Lane 1, molecular marker; lane 2, PjaA; lane 3, PjaAI; lane 4, PjaAII

Table 3. Comparisons of agarase activities through purification step against various *E. coli* strains and recombinant plasmids.

Strains/ Plasmids		Inducin g agent	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
BL21(DE3) /pEAG3	Cell lysate	IPTG	50.7	12.1	0.2	100	1
	Purified enzyme		0.6	0.4	0.7	3.9	3.2
AD494pLysS /pEAG3	Cell lysate	Lactose	51.7	77.9	1.5	100	1
	Purified enzyme		0.7	3.5	4.8	4.5	3.2
AD494pLysS /pEAG3-1	Cell lysate	Lactose	50.8	101.6	2.0	100	1
	Purified enzyme		1.1	34.1	30.5	33.6	15.2
AD494pLysS /pEAG3-2	Cell lysate	Lactose	52.7	5.5	0.1	100	1
	Purified enzyme		0.6	0.7	1.1	13.7	11.1

Each strain was incubated at 37°C in LB broth containing appropriate antibiotics. When the absorbance was 0.6 at OD₆₀₀, IPTG or lactose was added into the culture to a final concentration of 1 mM, and each culture was further incubated for 3 h.

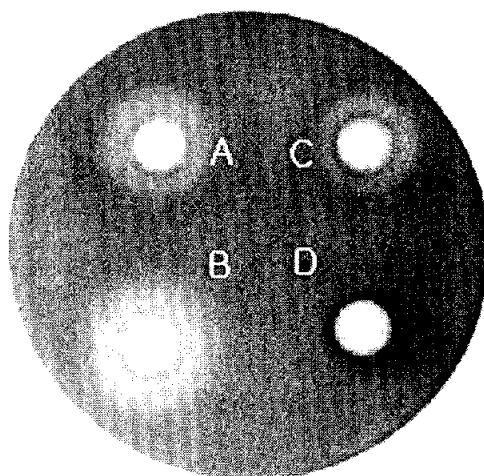


Fig. 18. Agarolytic activity of purified agarases from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3 derivatives. Agar plate was stained with I_2/KI solution (0.05 M I_2 in 0.12 M KI) A, PjaA; B, PjaAI; C, PjaAII; D, Tris-HCl (pH 8.0). The purified agarase (12 μ g) was laid on the 1.2% (w/v) agar plate in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0).

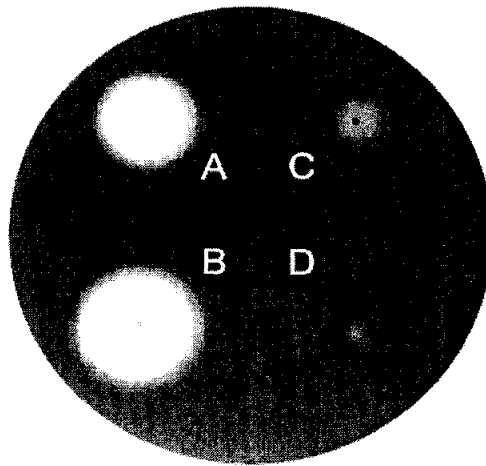


Fig. 19. Agarolytic activity of colonies from *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3 derivatives, which were cultivated on LB/agar plate containing lactose for 12 h. A, *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3; B, *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3-1; C, *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3-2; D, *E. coli* AD494(DE3)pLysS harboring pEAG3-3.

에서의 결과와 일치하며 (Fig. 18), C-terminal region이 agarase의 extracellular space로의 secretion에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

Thermostability of agarases

β -agarase PjaA, PjaAI 단백질들의 thermostability 는 irreversible thermal inactivation curve를 통해서 조사하였다 (Fig 20). Intact form 인 PjaA 단백질의 agarase activity는 온도가 높아짐에 따라 크게 감소하였다. PjaAI 단백질이 60℃에서도 60%의 activity를 유지하는 반면 PjaA 단백질은 50℃일 때 20%의 activity를 가지고 있었다. 해양에서 분리한 *Pseudoalteromonas* 의 agarase 역시 PjaA 단백질과 비슷한 thermostability를 보여주고 있다 ²⁹⁾. 그러나 thermophile을 제외한 대부분의 marine microorganism으로부터의 agarase 는 thermostability 가 50℃를 넘지 않는 것으로 보고되었다 ⁴²⁾.

Kinetics

PjaA와 PjaAI 단백질들의 K_m value 와 K_{cat} value를 구하기 위해 hyper program (ver.1.1s)에서 lineweaver-burk plot을 이용하였다. K_m value 와 K_{cat} value는 non linear regression analysis로 계산하였다. PjaA와 PjaAI 단백질의 K_m value는 각각 10mg/ml 과 1.7 mg/ml로 나타났다. Catalytic efficiency (K_{cat}

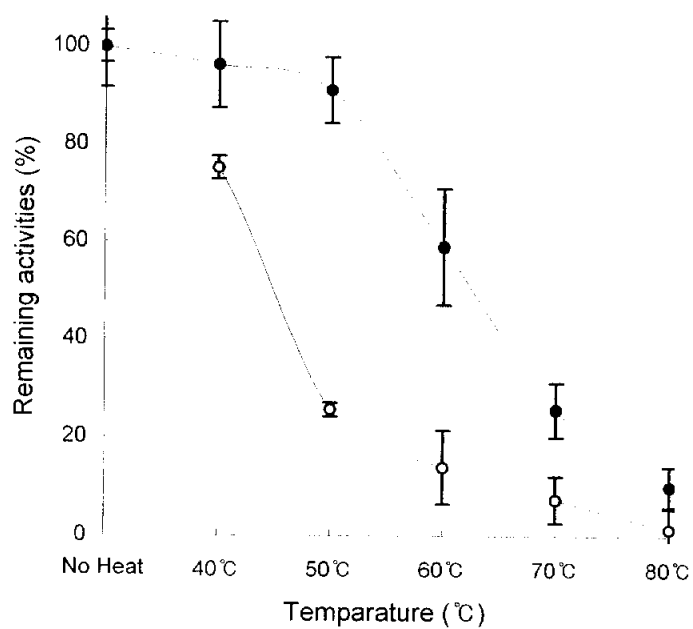


Fig. 20. Stability of agarolytic activity as a function of temperature.

Each enzyme was preincubated at different temperature for 30 min. The open circle means the agarase activity of PjaA, and the solid circle means PjaAI activity.

$/K_m$)는 각각 $3.12 \text{ min}^{-1} \cdot (\text{mg/ml})^{-1}$ 와 $15.4 \text{ min}^{-1} \cdot (\text{mg/ml})^{-1}$ 였다. K_{cat} / K_m value의 차이에서 PjaAI 단백질이 PjaA 단백질보다 substrate binding과 sequential reaction 이 효율적이라는 것을 알 수 있었다. (Table 4)

Table 4. Kinetics of PjaA and PjaAI by Lineweaver-Bulk plot

Type	K_m (mg/ml)	V_{max} (min ⁻¹ *mg/ml)	K_{cat} (min ⁻¹)	K_{cat}/K_m min ⁻¹ (mg/ml) ⁻¹
PjaA	10	0.37	31.2	3.12
PjaA	1.7	0.31	26.2	15.4

고 찰

이전까지 agarase 들에 관한 연구는 다양한 미생물들에서 substrate degrading을 포함한 생화학적 성질과 DNA sequence를 밝히기 위한 cloning에 초점을 맞춰왔으며, 이러한 연구결과로 여러 미생물로부터 α -agarase, β -agarase 유전자의 cloning 또는 효소의 정제가 되어졌고, 여러 생화학적인 특성이 밝혀져 왔다.⁹⁻³⁰⁾

이전의 연구에서 *E. coli* 내의 많은 enzyme들의 overexpression은 온도, inducer, host strain과 같은 다양한 환경에 크게 영향을 받는다는 사실이 보고되어 왔다.⁴¹⁾ 그러므로 target enzyme의 활성 효율성과 대량생산을 위해서 host strain과 inducer의 변화에 따른 expression level을 조사해 볼 필요가 있었다. 우선 agarase 단백질을 대량으로 얻기 위하여 agarase 유전자를 PCR을 이용하여 증폭하였고, 이를 대량발현 vector인 pET22b(+)에 cloning하였으며, 효소활성 증대를 위하여 pET 계열의 vector를 효과적으로 사용할 수 있는 host strain(*E. coli* BL21, AD494, Novagen Co.) 을 사용하였는데, Fig. 21과 같이 발현조절 되도록 설계된 것이다. 또한 AD494(DE3) strain은 thioredoxin reductase deficient mutant strain으로 *E. coli*에서 thioredoxin reductase는 cytoplasmic protein 내의 cystein을 환원시키는 것으로 알려져 있으므로⁵¹⁾ thioredoxin reductase의 deficiency는 cytoplasm 내에 disulfide bond의 형성을 가능하게 한다.

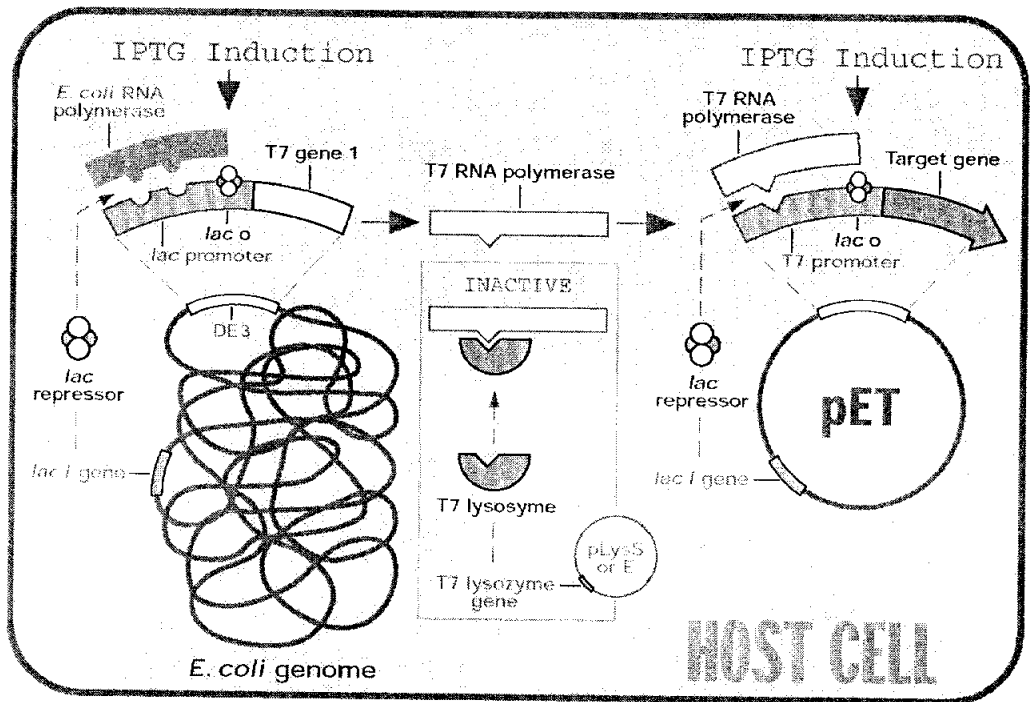


Fig. 21. Control elements of the pET system.

PjaA 단백질에는 cystein residue가 9개 존재하며 그 중 8개가 C60-C447 amino acid residue에 위치한다. Sequence가 유사한 amylase에서는 4개의 intra disulfide bond가 존재한다고 알려져 있으며,^{44,49)} PjaA molecule에도 적어도 4개의 disulfide bond가 존재할 수 있을 것으로 보인다. 왜냐하면 9개의 cystein(C-60, C-115, C-164, C-177, C-364, C-372, C-438, C-447, C-631)들은 amylase sequence의 cystein homology 비교에 있어 100% identity를 나타내고 있기 때문이다. (Fig. 7) 또한, Table 2는 AD494(DE3) strain에서 agarase activity의 증가는 cystein bond와 관련이 있음을 시사한다. 게다가 본 연구실에서는 C-terminal의 259 amino acid 가 deletion 된 PjaAIII 단백질이 agar polymer를 degrade 시키지 않음을 보고 한 바 있다.⁴³⁾ PjaAIII 단백질이 보여주는 agarase activity의 상실은 C-438에서 C-447 residue 사이의 존재 가능한 disulfide bond가 제거 되었기 때문이라고 추정된다.

Lactose에 의한 대량발현은 *E. coli* 내에서 lactose의 분해 산물로 생성되는 glucose에 의해 발현이 저해될 수 있는 가능성이 있다고 생각되어 왔다.⁴¹⁾ 또한 lactose는 IPTG와 비교했을 때 숙주에서 slow induction kinetic과 different carbon catabolite repression을 보여준다.³³⁻³⁵⁾ 그러나 최근 연구를 보면, *lac* based promoter를 이용한 overexpression에서 값싸고 nontoxic inducer로서 lactose의 가능성을 보여주고 있다.^{32,33)} 이러한 연구 보고를 토대로 기존에 사용되는

inducer인 IPTG 이외에 lactose를 inducer로 사용하여 induction효율을 비교하였는데, lactose를 inducer로 사용하는 것이 발현에 효율적이었다. 결과적으로 이번 연구에서의 중요한 결과 중, lactose를 inducer로 host strain을 *E.coli* AD494(DE3) pLysS로 한 것이 agarase 의 발현에 효율적이라는 것을 밝힌 것은 의미가 있다고 생각한다.

또한 Ni-IDA resin에 대한 binding capacity는 C-terminus의 길이에 따라 영향을 받는 것으로 본 실험에서 조사 되었으며, PjaA 단백질보다 truncated agarase의 6-histidine tail이 Ni-IDA에 더 효율적으로 결합한다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 추정하여 볼 때 C-terminal sequence의 deletion이 agarase structure에 변화를 일으키며, 그 결과 Ni-IDA resin에 대한 binding capacity의 차이를 유발한다는 것을 시사한다. Purification fold 는 PjaAI 단백질에서 15.2배, PjaAII 단백질에서는 11.1배가 증가하여 truncated agarase들이 intact form에 비해 높은 binding capacity를 가지고 있음을 보여주고 있다.

Purified PjaA 단백질과 PjaAI 단백질은 K_m value와 K_{cat} value, 그리고 thermostability에 큰 차이를 보인다. 127개의 amino acid가 deletion 된 PjaAI 단백질은 PjaA 단백질보다 K_m value 가 5.9배 낮으며, catalytic efficiency (K_{cat}/K_m)는 5배 증가하였다. 반면 PjaAI 단백질보다 55개가 amino acid 가 더 deletion 된 PjaAII 단백질은 agarase activity가 크게 감소하였다.

Fig 6.에서 PjaA 단백질의 amino acid sequence (32-482 residue)가 A.

haloplanctis 유래의 α -amylase 의 mature form과 45% 의 homology 가 있음을 보였고, α -amylase family는 분자 구조 내에 catalytic (β/α)₈ barrel (domain A), protruding domain B, 그리고 domain C의 세가지 domain구조를 가지고 있는 것으로 보고 되고 있다. ^{44, 49)} (Fig. 22) 이러한 domain의 구조적인 역할은, catalytic center의 역할을 하고 있는 domain A와 β -strand로 구성되어 있으며 domain A의 hydrophobic residue를 용매로부터 보호함으로써 catalytic domain 을 안정화 시키고 있는 것으로 보고 되고 있다⁴⁴⁾. 또한 domain C는 substrate binding에 도움을 주는 것으로 생각되어지고 있다. ^{45,46)} 그러나 모든 경우에 있어 안정성과 활성에 필요한 것으로 보지는 않고 있다. 본 연구자는 NCBI의 domain search program인 CD (Conserved Domain Database and Search Service, Ver. 1.53)를 이용한 한 database (with All-3551-PSSMs database) 검색을 통해 PjaA 단백질에서는 α -amylase family에서 찾을 수 있는 2개의 conserved domain 이 발견되었다. (β/α)₈ barrel로 알려진 catalytic domain A 는 amino acid sequence F⁴⁵-R³⁸⁵의 부분에 해당하고, amino acid sequence N⁴⁰²-R⁴⁷⁷은 domain C의 부분과 높은 유사성을 나타내고 있는 것으로 조사되었으며(Fig.23), 이러한 유사성으로 미루어 보아 이러한 domain구조는 agarase PjaA에서도 유사한 기능을 수행하고 있으리라 추정된다.

본 실험에서 구축된 C-terminal region이 결여된 agarase mutant를 이용한

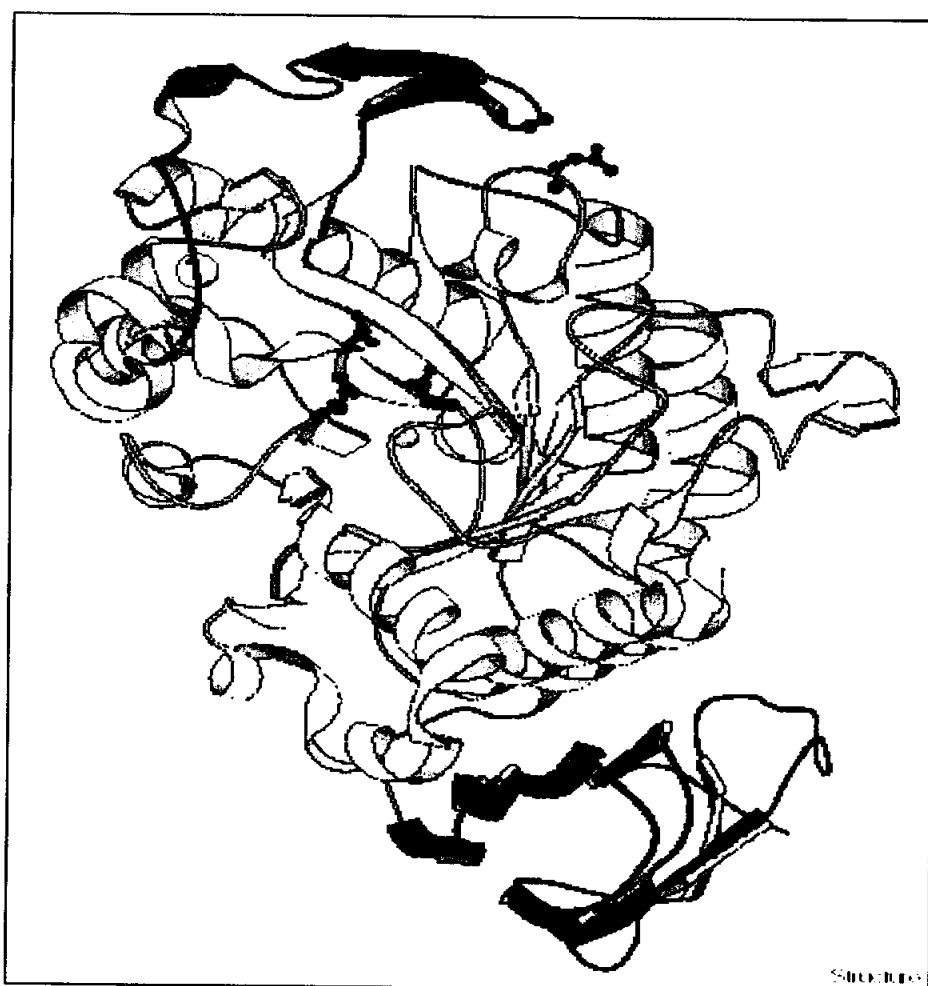


Fig. 22. Overall structure of *Alteromonas haloplanctis* α -amylase

Domain A is colored in cyan, domain B in pink and domain C in Blue. The active site with the three catalytic amino acids is shown, as are the calcium ion(yellow sphere) and chloride ion(green sphere)

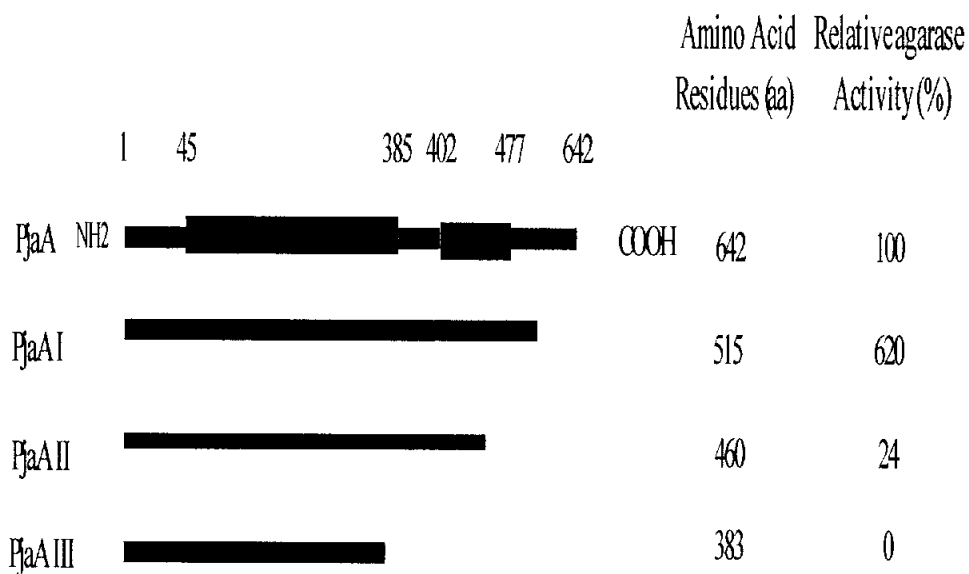


Fig. 23. Putative structure of PjaA and truncated PjaA proteins and the relative activities. The black boxes indicate the conserved domain A and C, respectively

실험의 결과에서 C-terminal region의 125개의 amino acid가 결여된 mutant인 PjaAI의 경우 활성이 오히려 증가 하였고, 반면에 182개의 amino acid가 결여된 mutant인 PjaAII의 경우에는 활성이 상당히 감소 하였으며, 159개의 amino acid가 결여된 mutant에서는 전혀 활성을 찾아 볼 수가 없었다. 이러한 결과는 C-terminal region이 agarase활성에 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 시사하고 있다.

또한 PjaAI과 PjaAII는 C-terminal region의 결여로 인해 서로 상반되는 결과를 보여주고 있다. PjaAI에서 결여된 C-terminal region은 agarase의 활성에는 영향을 미치고 있지 않은 것으로 조사되었다. 이 region의 역할에 대해 secretion에 관여하는지에 대해서도 조사하여 보았으나 agarase의 secretion에는 전혀 영향을 미치지 않았다.(Fig.18,19) 반면에 PjaAI과 PjaAII사이의 55개의 amino acid region은 secretion에 관한 실험에서는 이 region 역시 secretion에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었으나 활성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 조사되었다. 또한 이 region은 domain search program에서 조사된 domain C region에 해당하는 것으로 이러한 결과로 conserved domain C가 agarase에서도 유사한 역할을 하고 있는 것으로 추정된다. 현재의 연구결과로서 이 domain이 agarase의 binding에 관여하고 있는지 아니면 active domain으로서의 역할을 하고 있는지에 관해서는 추후의 연구가 더욱 필요하다고 생각되어 지나 amylase에서의 이러한 domain C에 대해서는 substrate binding에 관여 하는

것으로 알려져 있고 domain A가 active domain으로 보고되고 있어 본 연구에 사용된 agarase에서도 binding에 관여하는 것으로 추정되고 이러한 binding domain의 결여로 PjaAII에서 활성의 감소를 초래한 것으로 추정된다. 완전한 활성의 실활을 보이는 PjaAIII의 경우 active domain으로 추정되는 domain A는 남아 있으나 domain C에 해당되는 부분이 완전히 결여 되어 활성의 상실을 초래한 것으로 추정된다.

특이한 점은 이러한 domain region의 일부분이 결여된 mutant인 PjaAI에서 thermostability가 증가한다는 점이다. 기존의 보고에서 C-terminal region의 deletion이 protein의 구조에 변화를 시켜 stability에 영향을 미친다는 보고가 있다.⁵²⁾ 또한 amylase에서도 C-terminal region의 modification에 thermostability를 증가 시키는 것으로 보고 되고 있다.⁵³⁻⁵⁴⁾ 이러한 stability에 영향을 미치는 요소로 *A. haloplunctis*의 α -amylase에서 chloride ion등의 metal ion이 allosteric activation과 stabilization에 기여하며,³⁸⁾ disulfide bonding이 thermostability를 상승시킨다는 보고도있다.⁵⁰⁾ PjaA 단백질 역시 molecule 내에 calcium ion binding site와 chloride ion binding site와 유사한 amino acid sequence를 가지고 있으며 이러한 유사구조로 미루어 볼 때 C-terminal region의 deletion과 disulfide bonding 으로 인한 PjaAI 단백질의 compact structure가 thermostability를 증가시키는 것으로 본다.

흥미로운 것은 PjaA 단백질과 PjaAI 단백질 사이에 본질적인

차이점은 없으며 PjaAI 단백질은 단지 PjaA 단백질보다 127개의 carboxyl amino acid residue가 짧아졌을 뿐이다. 그러나 이러한 C-terminal region의 결여에 의해 conserved domain C 는 C-terminal region의 끝에 위치하게 되었고 그것이 structural modification을 일으켜 domain A 와 domain C 사이에 영향을 주어 thermostability와 substrate와의 affinity에 증가를 가져온 것으로 추정된다. 또한 이러한 결과는 domain search를 통해 분석된 2개의 domain구조가 PjaA에서도 domain을 형성하고 있으며 각각 active domain과 substrate binding domain의 역할을 하고 있는 것으로 추정된다. 그러나 PjaA protein에서 C-terminal region의 정확한 역할은 여전히 밝혀지지 않고 있으며 앞으로 이의 규명을 위한 연구가 더 요구되고 있다.

Nushin 등이⁴⁹⁾ 밝혀낸 amylase 단백질구조를 참고로 하여, NCBI의 domain search program인 CD(Conserved Domain Database and Search Service, Ver. 1.53)를 이용하여 homology modeling 을 수행하여 PjaA의 Domain A(Fig. 23), Domain C(Fig. 24) 를 2차원적 구조로, Fig. 25는 Domain A와 β Sheet(B domain), domain C를 리본형태의 2차원적인 구조로 추정해 본 것으로, amylase의 구조의 homology가 45%정도인 아미노산 종류 차이와 폴딩의 형태에 따라 다소 구조적으로 다르게 나타난 것으로 보인다.

결론적으로 host strain인 *E. coli* AD494 pLysS 에 pET22(+) expression vector를 선택하고, inducer로서 lactose를 사용한 것은 C-terminus truncated

agarase 가 값싸고 활성이 강한 enzyme으로서의 이용 가능성이 크다고 생각된다. 또한 PjaA 단백질은 *Alteromonas haloplanctis* 유래의 α -amylase family에서 찾을 수 있는 2개의 conserved domain 이 발견되었다. $(\beta/\alpha)_8$ barrel로 알려진 catalytic domain A 는 amino acid sequence F⁴⁵-R³⁸⁵의 부분에 해당하고, amino acid sequence N⁴⁰²-R⁴⁷⁷은 domain C의 부분과 높은 유사성을 나타내고 있는 것으로 조사 되었으며, 이러한 유사성으로 미루어 보아 이러한 domain구조는 agarase PjaA에서도 유사한 기능을 수행하고 있으리라 추정되나, 이러한 도메인의 명확한 구조와 기능은 아직 밝혀지지 않고 있어 이 부분에 대한 연구가 요구된다.

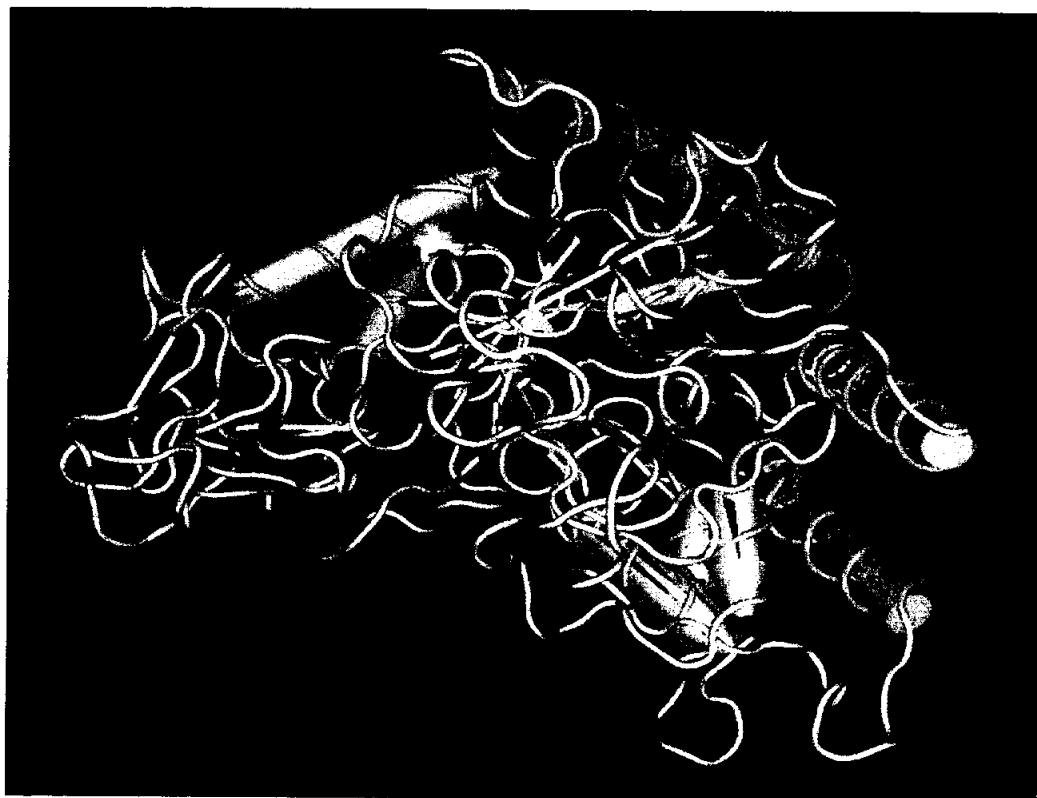


Fig. 24. Putative structure of domain A of PjaA

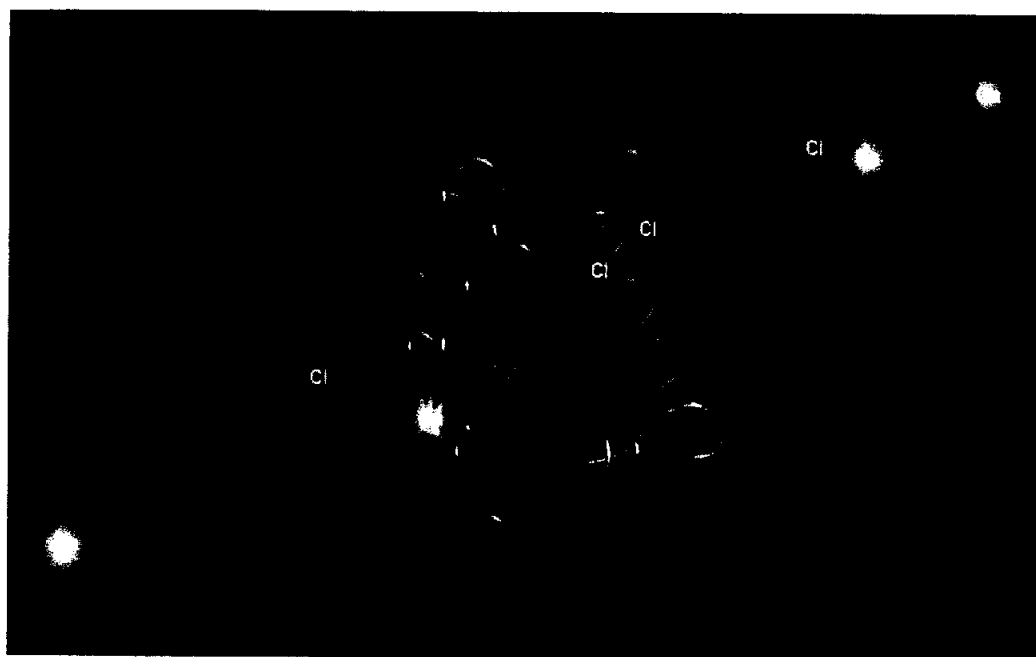


Fig. 25. Putative structure of domain C of PjaA



Fig. 26. Putative domain structure of PjaA

Domain A is colored in blue, domain B in gray and domain C in brown. The active site with the three catalytic amino acids is shown, as are the calcium ion (pink sphere) and chloride ion (red sphere)

참 고 문 헌

1. Aspinall, G. O. (1983) : The Polysaccharides, 2, Academic Press, New York.
2. Rees, D. A. (1972) : Chemistry and Industry, 630-636
3. Kennedy, J. F., J. Griffiths, and D. P. Atkins (1984) : The Application of Hydrocolloids, Recent Developments, Future Trends. In , Gums and Stabilizers for the Food Industry, Phillips, G. O., D. J. Wedlock, and P. A. Williams. 417.
4. Kennedy, J. F., and C. A. White(1983) : Bioactive Carbohydrates. In, Chemistry Biochemistry and Biology, Edis Horwood. Ltd.
5. Duckworth, M., and W. Yaphe(1971) : The structure of agar, Carbohydr. Res., 16, 435-445
6. Lopez-Bautista, J., and D. F. Kapraun(1995) : Agar analysis, nuclear genome quantification and characteriation of four agarophytes(Gracilaria) from the Mexican Gulf Coast, J. of Appl. Phycol., 7, 351-357.

7. Day, D. F. and W. Yaphe(1975) : Enzymatic hydrolysis of agar : Purification and characterization of neoagarobiose hydrolase β -nitrophenyl, α -galactoside hydrolase, Can. J. Microbiol., 21, 1512-1518.
8. Van Hofsten, B. and M. Malmqvist(1975) : Degradation of agar by a gram negative bacterium, J. Gen. Microbiol., 87, 150-158.
9. Young, K. S., S. S. Bhattacharjee, and W. Yaphe(1978) : Enzymatic cleavage of the α -linkage in agarose, to yield agaro-oligosaccharides, Carbohydr. Res., 66, 207-212.
10. Potin, P., C. Richard, c. Roches, and B. Kloareg(1993) : Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agartlyticus*(Cataldi) comb. nov., strain GJIB, Eur. J. Biochem, 214, 599-607.
11. Belas, R. (1989) : Sequence analysis of the agrA gene encoding β -agarase from *Pseudomonas atlantica*, J. Bacteriol., 171, 602-605.
12. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazake, and M. Norma(1994) :

Purification and characterization of a novel enzyme, α -neoagarooligosaccharide hydrolase(α -NAOS Hydrolase), from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107, J. of Bacteriol., 176, 6812-6818.

13. Leon, O., Quintana, L., Peruzzo, G. and Slebe, J. C. (1992) : Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1, Appl. Environ. Microbiol., 58, 4060-4063.

14. Hodgson, D. A. and K. F. Chater(1981) : A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1, J. Gen. Microbiol., 124, 339-348.

15. Lee, W. K., B. J. Kim, S. D. Ha, and J. Y. Kong(1999) : Isolation and identification of marine bacterium *Cytophaga* sp. AYK301 and optimal culture conditions for the production of agarase, Korean J. Biotechnol. Bioeng., 14, 572-577

16. Cho, S. Y., D. D. Joo, Y. S. Choi, O. S. Kim, H. M. Song, and E. H.

- Lee(1996) : Isolatio of agar degrading bacteria, *Cytophaga* sp. ACLJ-18 and optimization of enzyme production, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 11, 593-599.
17. Van der Meulen, H. J. and W. Harder(1976) : Characterization of the neo-agarotetraose and neoagarobiose of *Cytophaga flevensis*, Antonie van Leeuwenhoek, 42, 81-94.
18. Belas, R., D. Bartlett, and M. Silverman(1988) : Cloning and gene replacement mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* agarase gene, Appl. Environ. Microbiol., 4, 30-37.
19. Kong, J. Y., S. K. Bae, S. H. Hwang, S. D. Ha, H. T. Kim, S. K. Kim, and B. J. Kim(1996) : Purification of extracellular agarase from marine bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and molecular cloning of the agarase gene, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 11, 37-45.
20. Morrice, L. M., M. W. McLean, W. F. Long, and F. B. Williamson(1983) : β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica* : Substrate specificities, Eur. J. Biochem., 137, 149-154.
21. Groleau, D. and W. Yaphe(1977) : Enzymatic hydrolysis of agar, purification

- and characterization of β -neogarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*, Can. J. Microbiol., 23, 672-679.
22. Yamaura, I., Matsumoto, T., Funatsu, M., Shigeiri, H., and Shibata, T.(1991) :
Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5,
Agric. Biol. Chem., 55, 2531-2536.
23. Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamikado(1990) : Purification and
characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2, Eur. J. Biochem.,
187, 461-465.
24. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazake, and M. Noma(1994) :
Purification and characterization of a novel enzyme, α -neoagarooligosacch
-aride hydrolase (α -NAOS hydrolase), from a marine bacterium, *Vibrio* sp.
strain JT0107, J. Bacteriol., 176, 6812-6818.
25. Aoki. T., Araki, T. and Kitamikado, M.(1990) : Purification and
characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2, Eur. J. Biochem.,
187, 461-465.

26. Sugano, Y., T. Terada, M. Arita, M. Noma, and t. Matsumoto(1993) :
Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium,
Vibrio sp. Strain JT0107, Appl. Environ. Microbiol., 59, 1549-1554.
27. Van der Meulen, H. and Vedkamp, H.(1974) : Isolation and characterization of
Cytophaga flevensis sp. nov., a new agarolytic flexibacterium. Antonie Leeuwenhoek
40, 329-346.
28. Morrice, L. M., M. W. McLean, W. F. Long, and F. B. Williamson (1983) :
 β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica* : Purification and some
properties, Eur. J. Biochem., 135, 553-558..
29. Vera, J., Alvarez, R., Murano, E., Slebe, J. C. and Leon, O. (1998) : Identification of a
marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular
agarase, Appl. Environ. Microbiol. 64, 4378-4383
30. Sugano, Y., Nagae, H., Inagaki, K., Yamamoto, T., Terada, I. And Yamazaki, Y.
(1995) : Production and characteristics of some new β -agarases from a marine
bacterium, *Vibrio* sp. strain JT 0107, J. Ferment. Bioeng., 79, 549-554.
31. Ha, J. C., Kim, G. T., Kim, S. K., Oh, T. K., Yu, J. H., and Kong, I. S.

- 1997) : β -agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effect of salt on its activity, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 1-6.
32. Hoffman, B. J., Broadwater, J. A., Johnson, P., Harper, J., and Fox, B. G. (1995) : Lactose fed batch overexpression of recombinant metalloprotein in *Escherichia coli* BL21(DE3): Process control yielding high levels of metal incorporated, soluble protein, Protein Expr. Purif., 6, 646-645.
33. Shanklin, J. (2000) : Overexpression and purification of the *Escherichia coli* inner membrane enzyme acyl-acyl carrier protein synthase in an active form, Protein Expression and Purification, 18, 355- 360.
34. Derman, A. I., Prinz, W. A., Berlin, D., and Beckwith, J. (1993) : Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *E.coli*, Science, 5140, 1744-1747.
35. Henikoff, S. (1984) : Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing, Gene, 28, 351-359.

36. Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) : Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes, *Nature*, 254, 34-38
37. Rosenberg, M. and Court, D. (1979) : Regulatory Sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription, *Annu. Rev. Genet.*, 13, 319-353.
38. Feller, G., Bussy, O. L., Houssier, C., and Gerday, C. (1996) : Structural and functional aspects of chloride binding to *Alteromonas haloplanctis* α -amylase, *J. Biol. Chem.*, 271, 23836-23841.
39. Ahsn, M. M., Kimura, T., Karita, S., sakka, K. and Ohmiya, K. (1996) : Cloning, DNA sequencing and expression of the gene encoding *Clostridium thermocellum* cellulase *celJ*, the largest catalytic component of the cellulosome, *J. Bacteriol.*, 178, 5732-5730.
40. Matsushita, O., Jung, C. M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y. and Okabe, A. (1999) : Gene duplication and multiplicity of collagenase in *Clostridium histolyticum*, *J. Bacteriol.*, 181, 923-933.

41. Stülke, J., and Hillen, W. (1999) : Carbon catabolite repression in bacteria.
Curr. Opin. Microbiol., 2, 195-201
42. Kim, B. J., Kim, H. j., Ha, S. D., Hwang, S. H., Byun, D. S., Lee, T. H., and Kong, J. Y. (1999) : Purification and characterization of β -agarase from marine bacterium. *Bacillus cereus* ASK202, Biotechnol. Lett., 21, 1010-1015.
43. Lee, S. B., Park, J. H., Yoon, S. C., Kim, J. M., and Kong, I. S. (2000) :
Sequence analysis of β -agarase sequence gene (*PjaA*) from *Pseudomonas* sp.
isolated from marine environment. J. Biosci. Bioeng., 89, 485-488.
44. MacGregor, E. A., Janeček, S., and Svensson, B. (2001) : Relationship of
sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes,
Biochim. Biophys. Acta., 1546, 1-20.
45. Dauter, E., Dauter, M., Brzozowski, A. M., Christensen, S., Borchert, T. V.,
Beiser, L., Wilson, K. S., and Davies, G. J. (1999) : X-ray structure of
Novamyl, the five-domain 'maltogenic' α -amylase from *Bacillus*
stearothermophilus: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution,
Biochemistry, 38, 8385-8392.

46. Lawson, C. L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., de Vries, G. E., Penninga, D., Dijkhuizen, L., and Dijkstra, B. W. (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.
47. Hamer, G.K., Bhattacharjee, S.S., and Yaphe, W. (1977) : Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ^{13}C -n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, 54, C7-C10.
48. Buttner, M.J., Fearnley, I.M. and Bibb, M. J. (1987) : The agarase gene(dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) : nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet*, 209, 101-109
49. Nushin Aghajari, Georges Feller, Charles Gerday, Richard Haser(1998) : Structure of the psychrophilic *Alteromonas haloplanktis* α -amylase give insights into cold adaptation at a molecular level , *Structure*, 6(12), 1503-1516.

50. Van den Akker, F., Feil, K.K., Roach, C., Platas, A., A., Merritt, E.A. & Hol, W.G.J.(1997) : Crystal structure of heat-labile enterotoxin from *E. coli* with increased thermostability introduced by an engineered disulfide bond in the A subunit. *Protein Sci*, 6, 2644-2649.
51. Prinz, W., A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J.(1997) : *J. Biol. Chem.*, 272-, 15661-15667
52. Guyot, J.P., Sanoja, R.R., Morlon-Guyot, J.(2000) : Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus*: amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding, *Appl. Environ. Microb.*, 66(8), 3350-3356
53. Williams, C. H-Jr. (1995) : Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*., *FASEB Journal*, 9(13), 1267-1276.
54. Goodenough, PW (1995) : A Review of Protein Engineering for the Food Industry, *Molecular Biotechnology*, (4)2, 151-166

요 약

해양 미생물 *Pseudomonas* sp.로부터 agarase 유전자 *pjaA* 를 대량 발현시켰으며 이 유전자의 염기서열을 분석하였다. Agarase 유전자는 총 1,902 bp의 nucleotide 로 구성되어 있으며, 69,540 Da 의 molecular weight를 가진다. 또한 이 유전자는 *A. haloplanctis* α -amylase 유전자와 45%의 유사성을 가졌으며, 3개의 chloride binding ligand를 가지고 있어 Cl^- ion의 중요성을 나타내었다.

Agarase 유전자를 expression vector인 PET-22b(+)에 cloning 하여 plasmid pEAG3이라 명하였으며, 이로부터 단백질을 대량으로 발현할 수 있었다. pEAG3에서 exonuclease III를 처리하여 plasmid pEAG3-1, pEAG3-2, pEAG3-3을 만들었다. Agarase activity를 측정해본 결과 pEAG3-3에서 activity가 완전히 소실됨을 알았다. 이것으로 agarase 유전자의 C-terminal 부분이 agarase activity에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 추정할 수 있었다.

또한 Agarase 의 expression level과 activity의 차이를 비교하기 위하여 inducer와 host strain을 변화시키면서 대량발현 시켰다. 그 결과 *Escherichia coli* AD494(DE3)pLysS를 host strain으로, lactose를 inducer 로 사용했을 때 enzyme activity가 증가하는 것을 확인하였다.

이에 따라 *Pseudomonas* sp. W7의 agarase PjaA 단백질과 C-terminal이 결실된 truncated agarase PjaAI 단백질, PjaAII 단백질을 *E. coli* AD494(DE3)pLysS에서 대량 발현시켜 이 단백질들의 생화학적 특성을 조사하였다. 단백질들은 metal affinity chromatography를 이용해 정제하였으며, 정제된 단백질의 분자량은 SDS-PAGE 상에서 각각 71 kDa, 58 kDa, 52kDa로 나타났다. PjaAII 단백질은 PjaA 단백질이나 PjaAI 단백질보다 낮은 specific activity를 가졌다. PjaAI은 mature PjaA protein보다 낮은 K_m value를 가졌고, catalytic efficiency(K_{cat}/K_m)는 PjaA 보다 5배 증가하였다. 또한 PjaAI의 enzyme activity는 50°C에서 90%의 activity가 유지된 반면 PjaA 단백질은 같은 온도에서 20%의 activity 만이 남아있어 thermostability에서도 큰

차이를 보였다.

감사의 글

학문과 직장생활이라는 두 가지의 길을 열어 주시고 아낌없는 지도와 사랑으로 이끌어 주신 공인수 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 그리고 연구 과정에 많은 관심과 애정을 보내주신 홍용기 교수님, 김중균 교수님, 김성구 교수님, 공재열 교수님, 박남규 교수님, 이형호 교수님, 홍성운 교수님, 손병화 교수님께도 감사 드립니다. 또한 연구실내에서는 직장생활 등으로 항상 바쁜 이 선배에게 아낌없는 온정과 도와준 이종희, 안선희, 김선희, 이은미, 정승하, 이지현, 임준혁 후배들에게 감사드리고, 연구실 밖에서는 바쁜 와중에도 항상 도움을 준 박기재, 하정철, 김구택, 박효진, 이상봉, 최선영, 강정화, 진철호, 신승렬 후배들에게도 감사의 마음을 전합니다. 그리고 바쁜 와중에도 논문심사를 맡아주신 김영옥 박사에게도 진심으로 감사를 드립니다.

누구보다도 암으로 투병하고 있으시면서도 변함없는 사랑으로 저에게 용기를 주시는 어머님, 항상 어머니를 병간하시면서 주름이 한층 더생긴 아버님께 글로나마 큰절을 올립니다. 또한 항상 사위인 저에게 용기를 북돋아 주신 장인, 장모님, 그리고, 중도에 어려웠을 때, 고민을 나눈 은경이 외삼촌 내외, 이모 내외분들에게도 감사를 드립니다.

그리고 박봉에도 불구하고 경제적 어려움에 불구하고 항상 나에게 용기를 심어주고, 애들을 잘 키워주고 있는 사랑하는 아내 이선미, 항상 좋은 아빠가 되어주지 못하는 데도 항상 이쁘고 사랑스럽게 자라주고 있는 딸 은경이, 밝고 씩씩하게 자라주고 있는 지창이에게 감사의 글 보냅니다.