

Analysis for the function of the core region of *Bacillus polymyxa* CFTase

Hyun-Ju Kwon, Kyung-Ok You, Ju-Hee Park, You-Na Oh, Kwang-Hyun Kim, Byung-Woo Kim

Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University.

TEL : (051)890-1519 ,FAX (051)890-1532

Abstract

Sequence analysis indicated that *Bacillus polymyxa* MGL21 CFTase was divided into five distinct regions. CFTase contained three regions of repeat sequences at the N-terminus and C-terminus. The endo-inulinase region of homology (ERH) of CFTase was similar to that of *Pseudomonas mucidolens* endo-inulinase. Furthermore, CFTase possessed a highly conserved core region. In order to understand the role of the core region on the function of CFTase from *B. polymyxa* MGL21 CFTase Δ NC was prepared. The molecular weight of the purified wild type CFTase and CFTase Δ NC were 148kDa, 90kDa, respectively.

서 론

Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase)는 Inulin으로부터 당 전이반응에 의해 cycloinulooligosaccharide(cyclo fructan[CF])를 형성하는 효소이며, CF는 cyclodextrin과 유사하여 의학 및 물성개선제로 유용하게 이용할 수 있다. *Bacillus polymyxa* 유래 BP-CFTase는 1,301 아미노산으로 구성되며 *B. circulans* CFTase 와 73%, *B. macerans* CFC1 CFTase와 96%의 상동성을 가진다. BP-CFTase는 N말단과 C말단 부분의 3개의 repeat region, endo-inulinase 상동성 영역, core region의 5영역으로 나눌 수 있다(3). 현재 까지 알려진 CFTase는 Homology 검색에 의해 Fig1과 같이 1차 구조는 알려져 있지만 각 region의 역할에 대해서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 본 실험은 core region의 역할을 규명하기 위하여 결손 유전자 Δ NC를 구축하였다. N-terminal 의 repeat영역과 C-terminal의 repeat영역 모두를 결손시킨 변이효소 BP-CFTase Δ NC(Fig1(B))를 정제하여 야생형 CFTase와 생화학적 특성을 비교하였다.

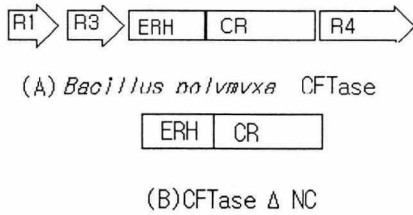


Fig1. Schematic design of CFTase and CFTaseΔNC

재료 및 방법

1. 사용 균주 및 plasmid

BP-CFTase ΔNC 의 대량 생산을 위하여 결손유전자 ΔNC를 pET28a의 *NdeI-SalI* site에 도입하여 발현 vector pDI2ΔNC-His를 구축하였다.

E. coli HMS174(DE3)pLysS[F,recA1,hsd (rk12⁻mk12⁺)Rif R(DE3)pLysS(cm^r)]와 plasmid pET28a는 Novagen사에서 구입하였다. 대장균의 형질전환체는 30μg/ml의 kanamycin을 함유하는 LB배지 중, 37°C에서 배양하였다.

2. 효소의 대량생산과 정제

변이효소를 대량생산하기 위하여 구축한 pDI2ΔNC-His로 *E. coli* HMS174(DE3) pLysS를 형질전환하였다. 이 형질전환체를 30μg/ml의 kanamycin이 첨가된 LB배지에 전배양하여 전배양액 1%로 NZCYM 배지를 이용하여 본배양하였다. 배양액의 흡광도가 OD₆₆₀=0.35에 달하면 IPTG최종농도가 1mM이 되도록 첨가하여 단백질 대량 발현을 유도하였다. 변이효소는 inclusion body로써 불용성 분획에 존재하였다. 불용성 분획을 washing buffer로 2~3회 세척하는 것으로 숙주 대장균 유래의 단백질을 제거하였다. 세정과정 후 불용성 분획에 8M Urea buffer (pH7.8)을 첨가하여 녹인 뒤 his-binding resin에 결합 시킨 후 8M Urea buffer (pH6.0) /50mM imidazole을 첨가하여 용출시켜 순수 분리 정제하였다. 정제된 단백질은 50mM phosphate buffer로 투석하여 refolding 시켰다.

3. 효소 반응 생성물의 확인

효소 반응 생성물은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 효소반응은 50mM phosphate buffer에 녹인 2% inulin과 정제한 BP-CFTase ΔNC를 1:1로 첨가하여 40. C에서 시간별로 반응시켰다. 반응정지는 비등수에서 5분간 열처리하였으며 각각의 반응액을 TLC plate에 점적한 후 butanol : isopropanol : water (3 : 12 : 4, v/v) 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray로 120°C, 10분간 가열하여 발색시켰다. 표

준물질은 2% inulin용액과 100mM의 Cu^{2+} 용액을 1:1로 혼합하여 10분간 100℃ 끓는 물에서 가수분해하여 사용하였다.

결과 및 고찰

BP-CFTase의 core region의 기능을 규명하기 위하여, CFTase유전자의 N-terminal repeat region과 C-terminal repeat region을 제거한 ΔNC 유전자를 구축하였다. 야생형 BR-CFTase와 CFTase ΔNC 의 정제후 SDS-PAGE 분석 결과 이들은 각각 148kDa, 90kDa(Fig.2)로 확인되었다. 정제된 BP-CFTase ΔNC 의 활성은 야생형 CFTase와는 달리 cyclic 및 전이 반응에 의해 생성되는 CF를 형성하기보다는 F_2 , F_3 , F_4 등의 oligosaccharide을 주로 생산하여 CFTase 활성보다는 endo-inulinase 활성이 증가되는 것으로 확인되었다.(Fig.3) 현재, 야생형 CFTase와 CFTase ΔNC 의 안정성 및 효소반응물 등의 효소의 생화학적 특성을 검토중이다.

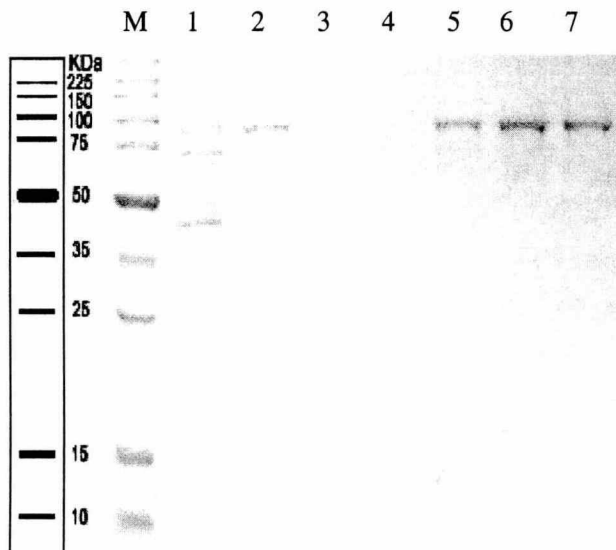


Fig.2. SDS-PAGE of the purified BP-CFTase ΔNC

Lane M; MW Maker

Lane 1; after sonication of cell

Lane 2; after binding His-Tag resin

Lane 3,4; washing with buffer pH6.0, 5.3 respectively

Lane 5~7; elution with three times (1st, 2nd, 3rd) respectively

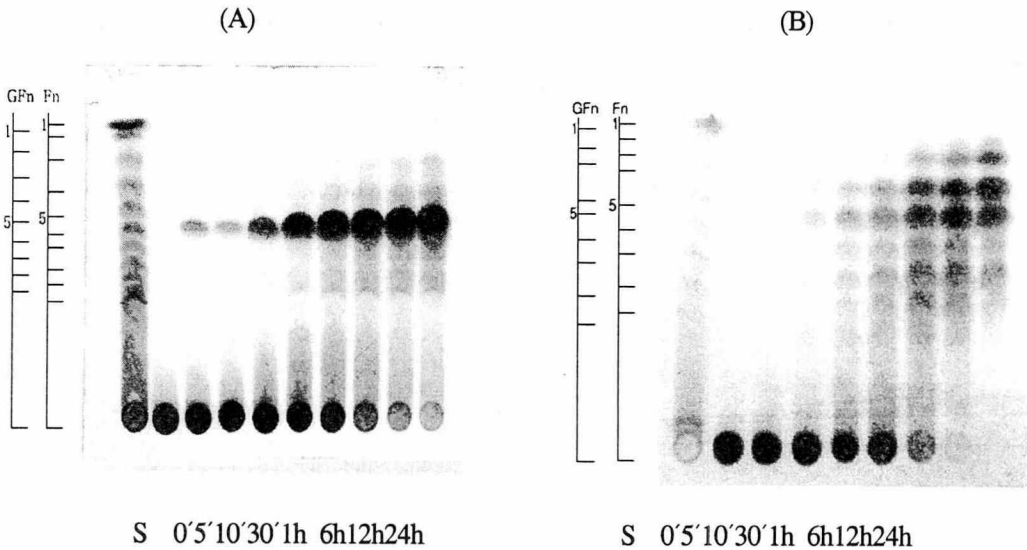


Fig.3. Thin-layer chromatogram of the reaction products from inulin by BP-CFTase(A) and CFTase Δ NC(B).

참고문헌

1. Kanai, T., Ueki, N., Kawaguchi, T., Teranishi, Y., Atomi, H., Tomorbaatar, C. Ueda, M. and Tanaka, A. (1997), Recombinant thermostable cyclinulooligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4956-4960.
2. Kim, H. Y. and Choi, Y. J. (2001), Molecular characterization of cyclinulooligosacchride fructanotransferase from *Bacillus macerans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 995-1000.
3. Jeon, S. J., Kim, B. W., You, D. J., Kwon, H. J., Shigenori, K., Namio, K. Kim, K. H., Kim, Y. H. (2002), Cloning and Characterization of Cyclinulooligosaccharide Fructanotransferase (CFTase) from *Bacillus polymyxa* MGL21, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**(6): 921-928.