

Analysis for the function of the N-terminal repeat region of *Bacillus polymyxa* CFTase

Byoung-Woo Kim, Jung-Ha Park, Eun-Young Kim, Kwang-Hyoun Kim,
Hyoun-Ju Kwon .

Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University.

TEL : (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

Abstract

Previously we reported the cloning and sequence analysis of a CFTase gene from *Bacillus polymyxa* . CFTase was divided into five distinct regions. In order to understand a role of the N-terminal repeat region on the function of CFTase from *Bacillus polymyxa* MGL21, deletion mutant CFTase ΔN was prepared. Recombinant protein was overproduced in *E. coli* as inclusion body, solubilized in bufer containing 8M urea, and refolded in the phosphate buffer. The molecular weight of the purified wild type CFTase and CFTase ΔN were 148kDa , 108kDa, respectively.

서 론

Cycloinulo-oligosaccharide(cyclofructans [CF])는 6~8의 D-fructofranose가 β -(2 \rightarrow 1) 결합으로 연결된 cyclic oligosaccharide이다(CF6, CF7, and CF8). 이 CF의 구조는 cyclodextrin과 유사하여 의학 및 식품 분야에서 물성개선제로 유용하게 이용될 수 있다. CF는 cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase (CFTase)의 intramolecular transfructosylation 작용에 의해 inulin부터 합성되어진다. CFTase는 *B. circulans* OKUMZ 31B, *B. circulans* MCI-2554, 및 *B. macerans* CFC1 등의 균주로부터 보고된 바 있다.

본 연구팀은 *B. polymyxa* 로부터 CFTase 유전자를 cloning 하여 염기서열을 밝힌 바 있다. *B. polymyxa* 유래의 CFTase (BP- CFTase)는 N말단 C말단 부분에 3개의 repeat region, endo-inulinase 상동성 영역과 core region의 5개의 영역으로 나눌 수 있으며, *B. macerans* CFC1 CFTase 와 96%, *B. circulans* CFTase 와 73%의 상동성을 가진다.

본 연구는 BP-CFTase의 N-말단 repeat region의 역할을 규명하기 위하여 repeat

region R1, R3을 제거한 BP-CFTase ΔN 을 구축하였으며 변이효소 ΔN 을 정제하여 야생형의 BP-CFTase 와 생화학적 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 균주 배양 : *B. polymyxa*는 2% inulin , 2% yeast extract, 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.05% KCl, 0.05% $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7.0, 37°C에서 배양하였고, 숙주 균주는 *E. coli* DH5a [*supE44*, $\Delta lacU169(\Phi 80 lacZ \Delta M15)$, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1,relA1*] 를 사용하였고, vector는 pUC18/19를 사용하였다. 형질 전환체는 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 ampicillin 을 첨가한 LB배지에서 배양하였다. 야생형 또는 변이 단백질의 대량발현을 위해서는 숙주 균주는 *E. coli* HMS(DE3)pLysS를 vector는 pET28a를 사용하였다.

Overexpression of recombinant protein : BP-CFTase ΔN 유전자를 pET28a vector의 *Nde* I, *Xho* I site에 도입하여 pDI2 ΔN -His를 구축하였다. 변이효소를 대량 생산하기 위하여 *E. coli* HMS(DE3)pLysS 균주에 형질전환하였다.

재조합 효소는 숙주세포 내에서 발현되어 inclusion body 를 형성함으로써 cell을 파쇄하여 inclusion body로부터 효소의 발현량을 확인하였다.

Purification of recombinant protein : Inclusion body 를 함유한 재조합 효소를 sonication buffer를 이용하여 파쇄 시킨 후, 원심분리에 의해 균체 파쇄 물로부터 inclusion body를 회수한다. 그 후 2%의 Tritone X-100이 함유된 buffer로 washing 해 주어 숙주세균 유래의 단백질을 제거한다. 얻어진 inclusion body를 용해하기 위해 8M urea를 사용하여, Histrap kit를 이용하여 정제 후, pH 7.0 50mM phosphate buffer를 이용하여 refolding 시킨다.

효소 반응 생성물 확인 : 효소반응 생성물은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 효소반응은 50mM phosphate buffer에 녹인 2% inulin에서 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리한 후 각각의 반응 액을 TLC plate에 점적 한 후 butanol:isopropanol:water(3:12:4, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray 로 120. C 분간 가열하여 발색시켰다.

표준물질은 2% inulin 용액과 Cu용액을 1:1로 혼합하여 100°C 끓는 물에서 가수 분해하여 사용하였다.

결과 및 고찰

BP-CFTase 및 변이효소 BP-CFTase Δ N은 대량 발현 시에 inclusion body 형성을 확인했으며, 8M urea 첨가 buffer로 Histrap kit를 이용하여 정제 하였다. 분리 정제 된 BP-CFTase 와 변이효소 BP-CFTase Δ N의 단백질 분자량은 각각 148kDa, 103kDa 이었다. 현재 이 변이 효소의 생화학적 특성을 분석하기 위하여 진행 중 에 있다.

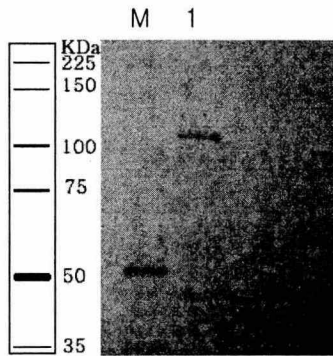


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified BP-CFTase Δ N.

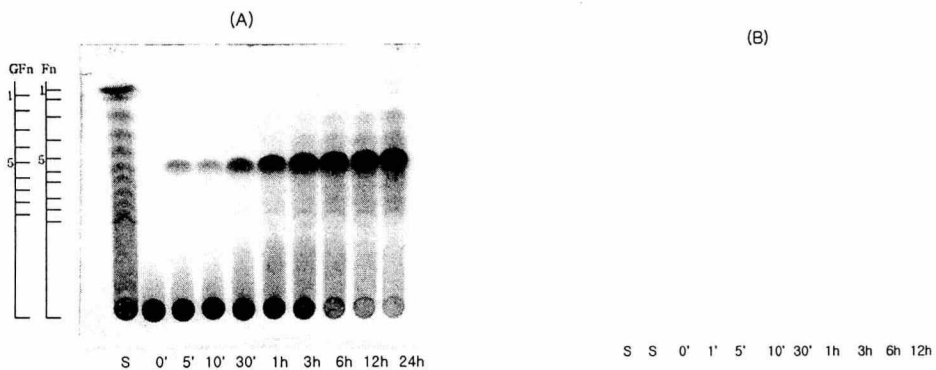


Fig. 2. Thin-layer chromatography of the reaction products from inulin by BP-CFTase (A) and CFTase Δ N (B)

참고문헌

1. Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto (1995), "Purification and characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase) from *Bacillus circulans* MCI-2554", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**(1), 31-34.
2. 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**(5), 550-555.
3. Kwon, Y.-M., H.-Y. Kim, and Y.-J. Choi (2000), "Cloning and Characterization of *Pseudomonas mucidolens* Exoinulinase", *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(2), 238-243.