

Schwanniomyces occidentalis var. *persoonii* CBS 2169 α -Amylase 유전자의 Nucleotide Sequence

박종천¹ · 배 석 · 오상진 · 이진종¹ · 전순배*
전남대학교 미생물학과, ¹생물학과

Nucleotide Sequence of α -Amylase Gene in the Yeast *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169

Park, Jong-Chun¹, Suk Bai, Sang-Jin Oh,
Jin-Jong Lee¹ and Soon-Bai Chun*

Department of Microbiology, ¹Department of Biology,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract — The relationship between *Schwanniomyces occidentalis* CBS 2863 (formerly *castellii*) and CBS 1153 (formerly *alluvius*), and their variety *persoonii* was examined at α -amylase gene level. Using *Sch. occidentalis* α -amylase gene as probe, *Sch. occidentalis* α -amylase gene homologues were obtained from *Sch. occidentalis* CBS 1153 and *Sch. occidentalis* var. *persoonii*. The restriction analysis of these homologues showed that the restriction enzyme sites between *Sch. occidentalis* CBS 2863 and CBS 1153 was identical but different between these strains and *Sch. occidentalis* var. *persoonii*. To investigate the difference between them, nucleotide sequence of approximately 2.0 kb of α -amylase gene homologue from *Sch. occidentalis* var. *persoonii* was determined. The result showed that α -amylase gene homologue from *Sch. occidentalis* var. *persoonii* have 0.24 Kb of deletion at position 141 base from initial codon of *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase gene and also 27 stop codons with deletion, substitution, and addition of base at many sites in the internal region of open reading frame. However, the homolog of amino acid residues predicted from DNA sequence of N- and C-terminal region of α -amylase gene homologues between *Sch. occidentalis* and its variety exhibited 83%. On the other hand, such homologue of *Sch. occidentalis* α -amylase gene was not observed in *Debaryomyces vanriji* which was able to utilize starch and closely related to *Sch. occidentalis*.

전분의 액화와 당화과정에는 전분 분해 효소인 α -amylase(EC 3.2.1.2)와 glucoamylase(EC 3.2.1.3)가 중요한 역할을 한다. 이 중 α -amylase는 전분의 α -1,4 결합을 가수분해하는 효소로서 전분액화에 필수적이며 원핵생물은 물론 진핵생물에 이르기까지 널리 분포하고 있다. 특히, 전분 분해능이 좋은 *Schwanniomyces*속에서 속하는 종들의 전분 분해 효소 유전자 연구가 활발히 진행되고 있다(1-5). 이 속에 속하는 효모들 중 *Sch. occidentalis*, *Sch. castellii*, *Sch. alluvius* 그

리고 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*는 상호간 DNA 교잡(6), 포자의 현미경적 연구(7) 그리고 세포벽 성분 분석(8) 등의 결과에 의하면 동일 종으로 분류되고 있다. 그러나 rRNA 부분 염기서열 분석(9) 결과에서 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*는 타 *Schwanniomyces occidentalis* 균주와 차이가 있었다. 이와 같은 차이를 α -amylase 유전자 수준에서 비교 분석한 자료는 *Schwanniomyces* 종들의 계통분류에 활용할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*의 염기서열이 결정되면 open reading frame(ORF)의 구조 및 전사조절 부위의 특징을 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase(2)의 그것과 비교함으로써 유

Key words: *Schwanniomyces*, α -amylase gene, *Debaryomyces*, nucleotide sequence

*Corresponding author

전자구조의 차이점을 발견할 수 있을 것이다.

본 논문에서는 *Sch. occidentalis* CBS 2863(종전 *castellii*), CBS 1153(종전 *alluvius*), *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 그리고 *Sch. occidentalis*와 같이 전분을 가수분해하고(10) 계통학적으로 근연종인 *Debaryomyces vanriji*(9)간의 유연관계를 α -amylase 유전자 수준에서 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 효모 균주는 *Schwanniomyces occidentalis* CBS 2863(ATCC 26077), *Sch. occidentalis* CBS 1153, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* NRRL Y-7400 그리고 *Debaryomyces vanriji* NCY 577이었고, 형질전환과 형질도입을 위한 숙주세균은 *E. coli* HB101과 JM103 (Δ [lac, pro], thi, strA, SupE, endA, sbcB, hsdR, F' traD36, proAB, lacI^q, Z Δ M15)이었다. 또한 DNA sequencing을 위한 벡터로는 파야지 M13mp18과 M13mp19이었고, 플라스미드는 pBR322와 pUC19를 사용했다.

배지 및 배양조건

효모는 YEPD 배지(2% glucose, 2% Bacto peptone, 2% Yeast extract)에서 30°C 로, *E. coli*는 LB배지(1% Bacto tryptone, 1% NaCl, 0.5% Yeast extract, pH 7.3)에서 37°C 로 배양하였고, JM103을 위한 최소배지는 M9 배지(11)를 사용했다.

효소 및 시약

유전자 cloning, 형질 도입 그리고 염기서열분석에 필요한 시약 및 X-gal(5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside), IPTG(iso-propyl-thio-galactoside) 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, U.S.A.)제품을, 그리고 [α -³²P]dCTP와 [α -³⁵S]dATP는 Du Pont de Nemours and Co.(Wilmington, DE, U.S.A.) 제품을 구입하여 사용했다.

유전자 은행제조

Sch. occidentalis var. *persoonii* CBS 2169와 NRRL Y-7400 및 *Sch. occidentalis* CBS 1153의 게놈 DNA를 *EcoRI*으로 완전 절단한 DNA 절편과 p³²로 표식한 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자(2)와

Southern blot 하였다. 그 결과 나타난 교잡 밴드와 동일 선상에 있는 별개의 agarose 겔로부터 4.5~5.5 kb DNA 절편을 용출 분리하여 이를 pYcDE-2의 *EcoRI* 위치에 삽입 *E. coli* HB101에 형질전환시킨 다음 ampicilin 저항성(Amp^r) *E. coli* 형질전환체를 효모의 유전자 은행으로 하였다.

Southern 및 Colony hybridization

Southern hybridization은 Sambrook 등(11)의 방법을 수정, α -³²P dCTP(3,000 Ci)와 Klenow fragment 그리고 random primer를 사용하여 primer extention 방법으로 제조하였고, hybridization은 Smiley 등(13)과 Purrello 등(12)의 방법에 따라 실시하였다. 그리고 colony hybridization은 Sambrook 등(11)의 방법에 따랐다.

제한효소 지도 작성

Ausubel 등(14)의 방법에 따라 전분 유전자가 포함된 DNA 단편을 pBR322와 pYcDE-2에 삽입 재조합 플라스미드를 제조하여 여러가지 제한효소(1~10 U/ μ g DNA)로 단순 또는 복합 절단하거나, 분리된 4.8 kb DNA 단편을 제한효소 양을 조절(0.1~1.0 U/ μ g)하여 절단하였다. 절단된 DNA 조각들을 0.8~2.0% agarose gel에서 전기영동한 후, 절편의 크기를 비교하여 제한효소 지도를 작성하였다.

염기서열 결정

이미 작성된 제한효소 지도에 따라 sequencing strategy를 세운 다음 각각의 DNA 절편을 M13mp18 또는 M13mp19에 subcloning하여 single stranded DNA를 얻었다(11). 염기서열분석은 USB(United States Biochemical Co.)의 sequencing kit를 사용, Sanger 등(15)의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

Schwanniomyces occidentalis 균주간 전분 유전자의 상동성

*EcoRI*으로 완전 절단한 *Schwanniomyces occidentalis* CBS 1153와 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169의 게놈 DNA 절편과 p³²로 표식한 *Sch. occidentalis* CBS 2863(ATCC 26077) 전분 유전자(5.0 kb)(2)와 hybridization한 결과 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*와 *Sch. occidentalis* CBS 1153으로부터 *Sch. occi-*

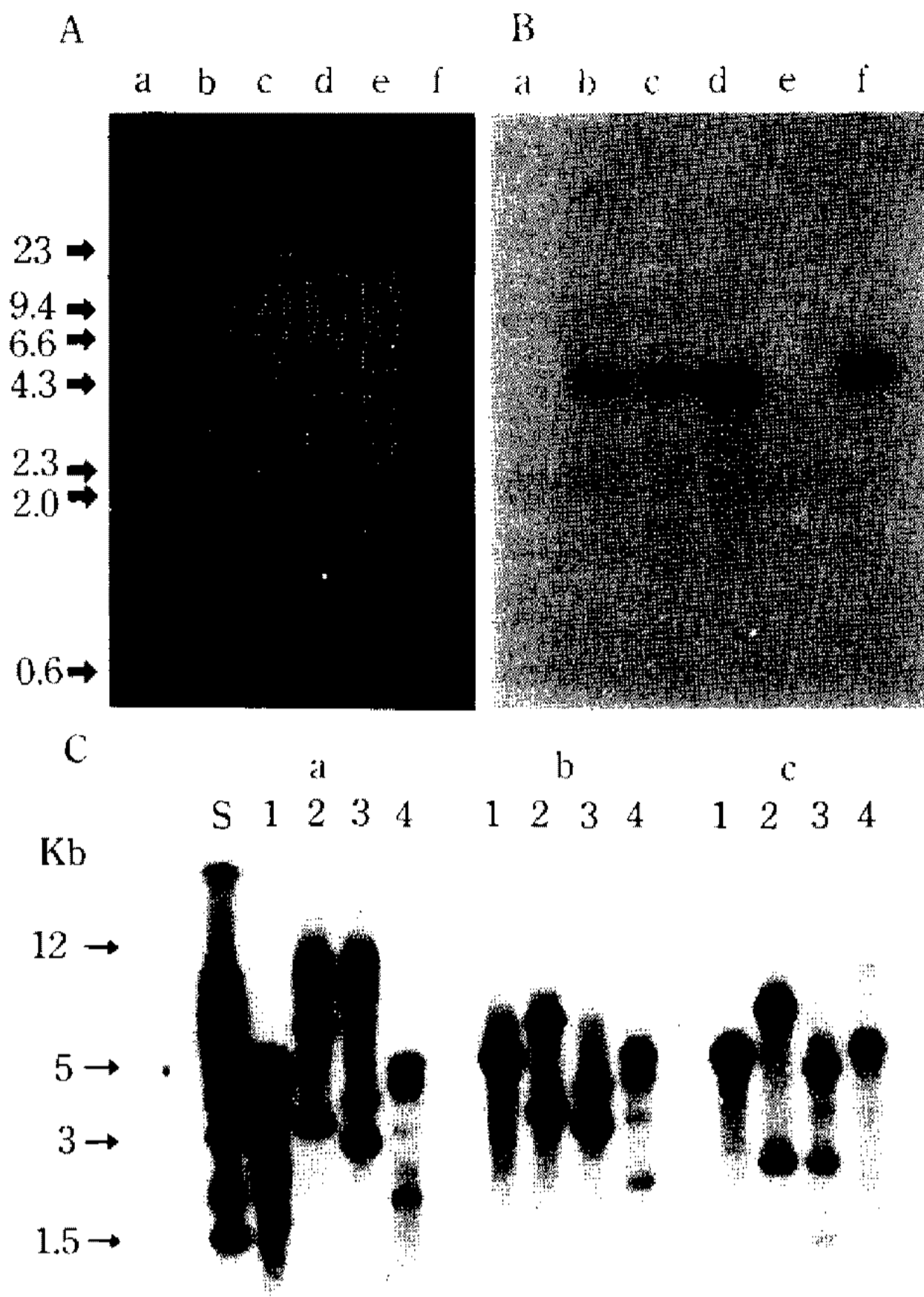


Fig. 1. Southern blot analysis of genomic DNA isolated from *Schwanniomyces* strains.

[Panel A] λ -*Hind*III DNA (lane a) and each genomic DNA from *Sch. occidentalis* CBS 2863 (lane b), *Sch. occidentalis* CBS 1153 (lane c), *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 (lane d) and *S. cerevisiae* SHY3 (lane e) were completely digested with *Eco*RI, and together with CBS 2863 AMY gene (5.0 kb [lane f]) and [Panel B] these were hybridized with α - 32 P-labelled CBS 2863 AMY gene. [Panel C] BRL size makers (lane S), CBS 2863 DNA (lane a), CBS 1153 DNA (lane b) and CBS 2169 DNA (lane c) were digested with *Eco*RI (lane 1), *Hind*III (lane 2), *Hpa*I (lane 3) and *Kpn*I (lane 4), hybridized with α - 32 P-labelled CBS 2863 AMY gene.

dentalis CBS 2863 α -amylase 유전자 상동체의 존재를 확인할 수 있었으며 Southern hybridization으로 상동체들의 대략적인 제한효소 위치를 조사한 결과 제한효소 위치 양상이 *Sch. occidentalis* CBS 2863과 *Sch. occidentalis* CBS 1153에서는 일치하였으나, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169와는 차이가 있었다(Fig. 1). *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자를 프로브로 사용한 colony hybridization 방법으로 *Sch. occidentalis* CBS 1153과 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169의 게놈 DNA 유전자 은행

1,000개와 1,500개로부터 양성 클론을 각각 1개와 2개를 얻었다. 이들 양성 클론들로부터 각각 재조합 플라스미드를 분리하여 *Eco*RI으로 처리해 본 결과 *Sch. occidentalis* CBS 1153 게놈 DNA를 포함하고 있는 재조합 플라스미드는 5.0 kb DNA 조각이 삽입되어 있었고, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 게놈 DNA를 포함하고 있는 2개의 재조합 플라스미드는 모두 4.8 kb DNA 절편이 삽입되어 있었다. 전자는 pSaAMY로 그리고 후자는 pSpAMY로 각각 명명하였다. 5.0 kb와 4.8 kb 삽입 DNA 절편을 pBR322에 각각 연결시켜 제한효소 지도를 작성한 결과, pSaAMY의 제한효소 위치는 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자의 그것과 일치하였으나 pSpAMY에서는 *Hpa*I 위치가 하나 더 있었고 또한 *Hind*III 위치는 하나만 존재하였을 뿐만 아니라 위치도 다른 점이 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자와 차이가 있었다(Fig. 2). 이같은 결과는 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* α -amylase 유전자 상동체가 *Sch. occidentalis* 균주들의 α -amylase 유전자와 차이가 있음을 암시하고 있다. Kurtzman과 Robnett(9)도 18s와 25s rRNA 부분 염기서열 분석 결과에 의하면 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*는 타 *Schwanniomyces occidentalis* 균주들과는 차이가 있었다고 보고한 바 있다. 상술한 재조합 plasmid(pSaAMY와 pSpAMY)를 *S. cerevisiae* SHY3에 형질전환시켜 3% 전분이 함유된 고체 최소배지에서 배양한 결과 pSaAMY가 포함된 형질전환체의 colony 주위에는 침전층이 형성되었으나 pSpAMY가 포함된 형질전환체 colony 주위에는 침전층이 형성되지 않았다. 또한 형질전환체를 1% 전분이 함유된 액체 최소배지에서 5일간 배양한 결과 pSaAMY가 포함된 형질전환체는 성장하였고 이의 배양상등액으로부터 α -amylase 활성이 검출되었으나 pSpAMY가 포함된 형질전환체는 거의 성장하지 않았고 배양상등액으로부터도 α -amylase 활성이 검출되지 않았다. 따라서 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169의 α -amylase 유전자는 돌연변이된 것으로 추정되었다.

***Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 α -amylase 유전자 상동체의 염기서열 결정**

Fig. 3에 표시된 sequencing strategy에 따라 open reading frame(ORF)이 포함되어 있을 것으로 생각되는 약 2.0 Kb의 염기서열을 결정하였다(Fig. 4). 이 염기서열을 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 의

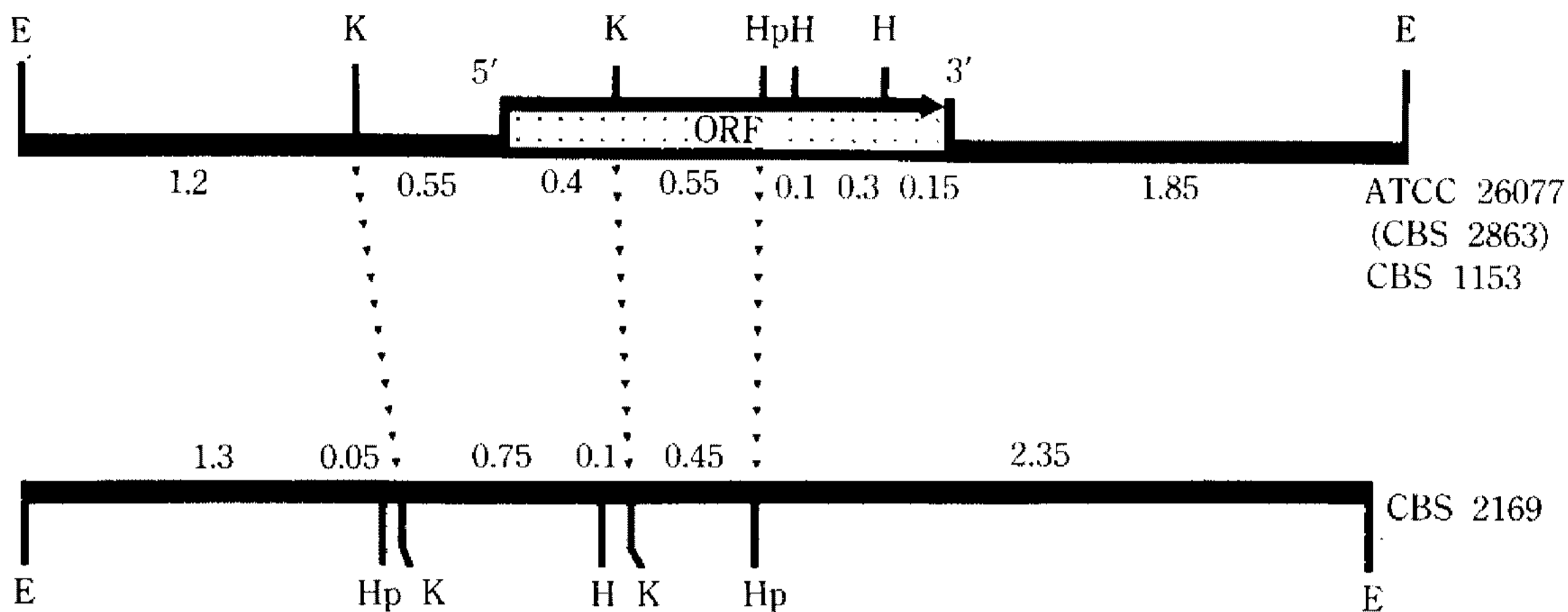


Fig. 2. Comparison of restriction map of inserted DNA in pSaAMY and pSpAMY. Restriction enzymes are: E., *EcoRI*; H., *HindIII*; Hp., *HpaI*; K., *KpnI*.

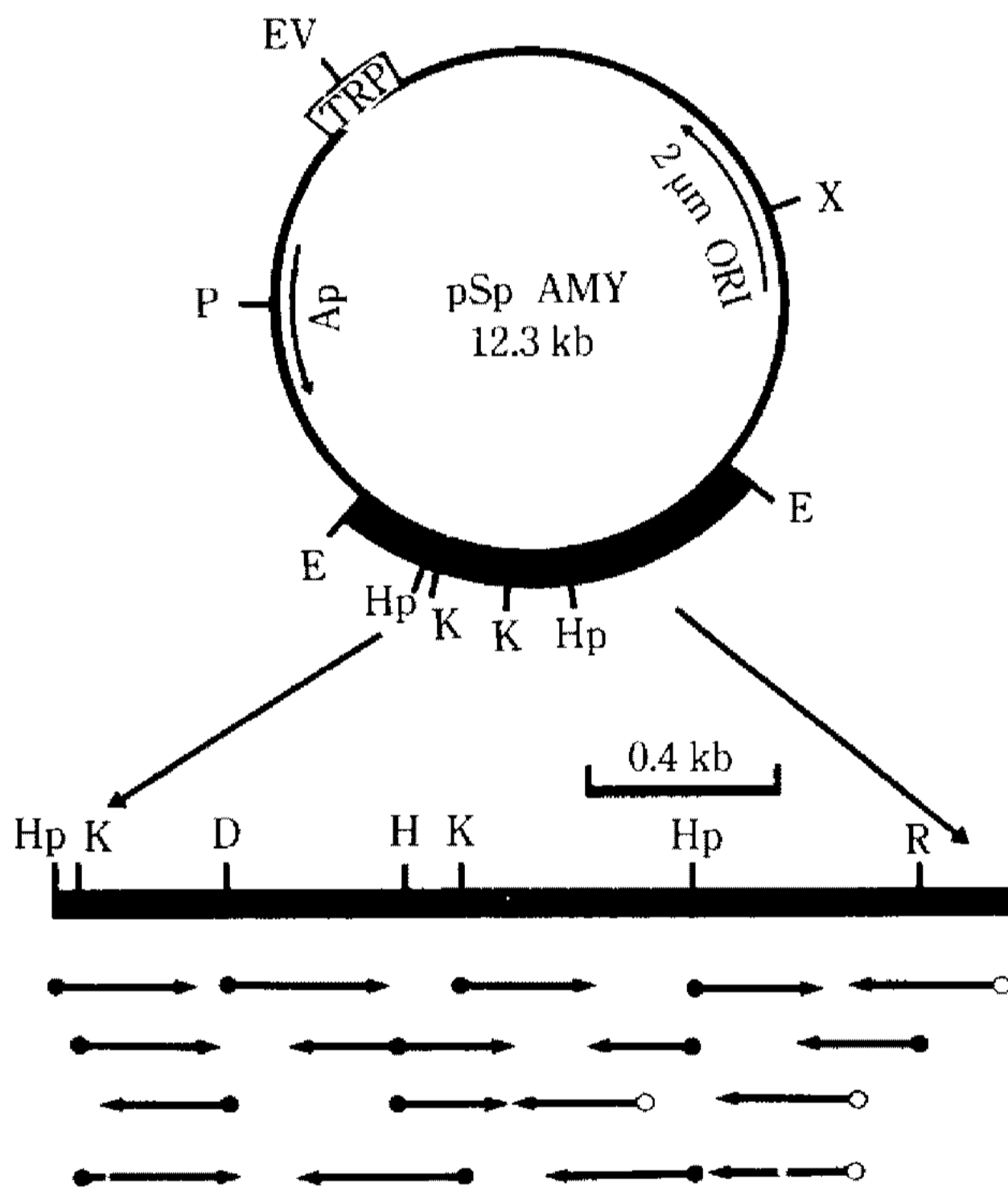


Fig. 3. Restriction map and sequencing strategy for inserted DNA (ca. 2.0 Kb) in pSpAMY.

The arrows indicate individual sequence readings from the labelled sites and open circles are site that be synthesized by oligonucleotide primer. Restriction enzymes are: D., *DraI*; EV., *EcoRV*; H., *HindIII*; Hp., *HpaI*; K., *KpnI*; P., *PstI*; R., *RsaI* and X., *XbaI*.

그것과 비교했을 때 약 90% 정도의 상동성이 있었다. 그리고 ORF 상류(upstream)에 존재한 TATA box는 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α-amylase 유전자(2)의 그것과 동일한 위치에 있었다. 그러나 두 염기서열의 ORF를 비교했을 때, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 α-amylase 유전자 상동체는 ORF 141 번째

염기에서부터 241개의 염기가 결실되어 있었다. 그 외에도 10 군데의 염기가 결실되었고 7 군데의 염기가 삽입되었으며, 여러개의 염기가 치환되어 27개의 정지 코돈이 나타났다. 그리고 3'비번역 부위에 존재한 polyadenylation 신호 부위인 TAG-TATGT-TTT 서열 중 TATGT가 TGTAT로 치환되어 있었다. 그러나 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 α-amylase 유전자 상동체의 염기서열로부터 추정된 N- 및 C-말단 쪽의 아미노산 서열과 *Sch. occidentalis* CBS 2863(ATCC 26077)(2), *Sch. occidentalis* ATCC 26076 (3) 그리고 *Sch. occidentalis* CCRC 21164(5) α-amylase 유전자 염기서열로부터 추정된 그것과 비교하였을 때, 아미노산의 일치도가 83%이었다(Fig. 5). 따라서 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* α-amylase 유전자 상동체는 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α-amylase 유전자(2)의 돌연변이체임을 시사해주고 있다.

Debaryomyces vanriji와 Schwanniomyces 균주들간의 상동성 비교

rRNA 부분 염기서열분석 결과로 작성된 효모의 계통수에 의하면 *Schwanniomyces occidentalis* 균주들은 *Debaryomyces vanriji*로부터 분지되어 있다(9). 또한, 동일 분지내에 있는 *Debaryomyces vanriji*는 *Schwanniomyces* 종들과 마찬가지로 전분을 이용하는 것으로 알려져 있다(10). 따라서 α-amylase 유전자 수준에서 이들 종간에 상동성을 알아보고, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 외에 다른 균주도 α-amylase 유전자가 돌연변이 되었는가를 확인하기 위해 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169 α-amylase 유전자 상동체(4.8 kb)를 프로브로 사용하여

-545 *KpnI* -446
GGTACGTCGAG CTAATTTAG AACCGGCTAT AGATCCGCTT GACTAAGAAG AGATATGGAA GAAAACAAC ATCCGAGCAC TCTTTTTTAA GTTTTTTCT
-445 -346
ATTTTCTTTT GCTCCTACIT CAATAATTTA TCTAAATTGT ATTATACGTT AGATCATAAT GTACTGATAA CAGAGAGTAT TATCATACAC TTGTGGATTT
-345 -246
CGAAAGGTGG AACCAAAAGC ATACATAGTC AAGCCCATGA TAATTTGATG TAATTAAGGT TGTAGTCGTT CTTACCGATC CGCCATTCTA CCCCACACGG
-245 -146
TTTCATGGCA TGTAAGTGT TCAATAGTGA AGTACAATGA ACGTTTTGGT AATGCTGCTA TTGTGGATC AGTAATTATG TTTAACAAT TAAGTCTGG
-145 -46
AAAATTTATT AAAATTTTAC CAACAATTA ACCGAAATCC AATCGAAGGT GCGTCCAGC TGGTGTATAA ATTACTCTTG AAATTCAAAT TGAACATTGA
-45 36
TACTATCTAA AGTAAAGGTG TTATTCTACA ATACTAAATA AAATAAAAGC AAGAC ATG ATT TTT TCA ATT GAA GGA TTT ACA AGT AAA GTT
M I F S I E G F T S K V
37 *HindIII* 117
GTT GCA GCA ATT TTA GCA TTC TCA AGC TTG GTA TCT GCT CAA CCG ATT ATT TTT GAC AAG AGA GAT GTT AGC TCG TCA GCT
V A A I L A F S S L V S A Q P I I F D K R D V S S S A
118 *KpnI* 198
GAA AAA TAA AAA GAC CTA TCG ATT CTA ATT TCG GTA CCG CTG ATG ATT AAA CAA TTA GCT AGC GAA TTG CAT TCC AGA AAC
E K * K D L S I L I W V P L M I K Q L A S E L H S R N
199 279
ATG TTA TTG ATG ATC GAC GTT TTT TAC AAC CAT TAT GCT TGG AGC GGT GAT GGC TCA AGC GTC GAT TAT CTA GTT TCA CTC
M L L M I D V F Y N H Y A W S G D G S S V D Y L V S L
280 360
CAT TCA ATC AAC AAT CTT ACT TCA CGA TTT TTG TTT AAT TAC AAA TTA TGA TGC TCA AAC CAA TAT TGA AGG TTG TTG GGA
H S I N N L T S R F L F N Y K L * C S N Q Y * R L L G
361 441
AGG TGA TAC TGA AGT CTC CCT TCC AGA TTT AAG AAG TGA GGA TAA TGG TGT TAT AGG AGG ATT TCA AAC TTG GGT GTC AGA
R * Y * S L P S R F K K * G * W C Y R R I S N L G V R
442 522
TAT TGT TCA AAA CTA TTC AAT CGA TGG TTT AAG AAT CGA TAG TGC AAA GTA CGT AGA TAC CAC TTC TTT AAC GAA GTT TGA
Y C S K L F N R W F K N G * C K V R R Y H F F N E V *
523 603
GGA CAC TTC TGG TGT TTA TAA CTT AGG TGA AGT TTA CCA AGG ATA TCC AAC TTA TAC TTG TCC ATA TCA GAA TTA TGT GAA
G H F W C L * L R * S L P R I S N L Y L S I S E L C E
604 684
AGG AGT TAC CAA CTA TCC ATT ATA CTA TCC AGT ATA TAG ATT CTT CAG TGA TAC TTC GGC GAC TTC CAG CGA GTT AAC TTC
R S Y Q L S I I L S S I * I L Q * Y F G D F Q R V N F
685 765
AAT GAT CTC CAC ATT ACA GTC ATC TTT TTT CCG ACG CTC TTT GTT GGG AAA CTT TAT TGA AAA CCA TGA TCA AGT TAG ATT
N D L H I T V I F F R T L F V G K L Y * K P * S S * I
766 846
CAC ATC AGT TAC TTC AGA CAC ATC CTT GAT TAT GAA TGC AAT GGC TTG TAT AAT TTT GGG TGA TTG TAT CCC AAT TAT GTT
H I S T F R H I L D Y E C N G L Y N F G * L Y P N Y V
847 927
TTA TGG CCA AGA ACT AGG TCT CAA TGG TGG TTA CCG TCC CTG CCA ATA GAG ATT GCC TTT ATG GTT AAG TGG ATA TGA ATT
L W P R T R S Q W W L P S L P I E I A F M V K W I * I
928 1008
CCG ACT CAG AAT ACT ATG AGC TAA TCG GTA TAT TAA ATC AAA TAA TAA ATC AAG CCA CTA CGA AGG ATT CCG OCT ATT CAA
P T Q N T M S * S V Y * I K * * I K P L R R I P P I Q
1009 1089
CTT ACA AAT OCT CAG TTG TTT CTT CTT CAG ACC ACG ATA TAG CCA CTA GAA AGG GTA GCA ATG CTA TCA ATT GAT TTC CAT
L T N P Q L F L L Q T T I * P L E R V A M L S I D F H
1090 1170
TTT TAA TAA TTT AGG TTC AGA CCG CTC AAG GAC ATT AAT GTC AGA AAC GCC GGC TAT TCT AGT GGT AAT AAA GTT GTC GAA
F * * F R F R R L K D I N V R N A G Y S S G N K V V E
1171 1251
GTT GTT TCT TGC AAT TCC GTT ACA GTT GGT GGC TCC GGA AGC TAA TCT GTC TCA ATT TGT GGT GGA ATG CCC CAA GTT TAC
V V S C N S V T V G G S G S * S V S I C G G M P Q V Y
1252 1296 +43
GCT CCG TCT TCT GTT CTT TCG GGA TCT GGC ATC TGC AAT CAA TAG ATTGATCCAG CGCTAACCCCT TTTTITAGATA CGACAAGTTT ATT
A P S S V L S G S G I C N Q *
+44 +144
TTAGAAAAA GTTCTAAGA ATGGTCCAAA CAAGTCTCTA TTACTCTCTT . ATCCCTGGAT ATCTGTTTTT AATGTYCCCG ACTCCGCATT CCTCATATTT
+145
AGTCTA

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the *Sch. occidentalis* var. *persoonii* AMY-homologous gene. Putative promoter and polyadenylation site are denoted by solid and dotted lines. The stop codon sites are shown by asteristics and the presumptive deletion site (0.24 Kb nucleotide sequences) denoted by vertical arrow.

S. p CBS 2169	<u>MIFSI</u> EGFTSKVVAAILAFSSLVSAQPIIFDKRDVSSSAEK*KDLSI-----
S. c CBS 2863	MRFSTEGFTSKVVAAILAFSRLVSAQPIIFDKADVSSSADLWLDQSIYQIVTDRFAASDGGSTTADCLVSDRKICGGSYLGIIDLLDYIQG
S. o ATCC 26076	MRFSTEGFTSKVVAAILAFSRLVSAQPIIFDMADVSSSADLWLDQSIYQIVTDRFAASDGGSTTADCLVSDRKICGGSYLGIIDLLDYIQG
S. o CCRC 21164	MRFSTEGFTSKVVAAILAFSRLVSAQPIIFDMADVSSSADLWLDQSIYQIVTDRFAASDGGSTTADCLVSDRKICGGSYLGIIDLLDYIQG
	▲
S. p CBS 2169	-----LIWVPLMIKQLASELHSRNMLLMIDVFYNHYAWSGDGSVDYLVSLHSINNL
S. c CBS 2863	MGFTAIWISPVVEQIPDNTAYGYAYHGYWMKNIDELNTNFGTADDELKQLASELHSRSMLLMVDVVYNHYAWNGDGSVDYSSFTPFNQQS
S. o ATCC 26076	MGFTAIWISPVVEQIPDNTAYGYAYHGYWMKNIDELNTNFGTADDELKQLASELHSRSMLLMVDVVYNHYAWNGDGSVDYSSFTPFNQQS
S. o CCRC 21164	MGFTAIWISPVVEQIPDNTAYGYAYHGYWMKNIDELNTNFGTADDELKQLASELHSRSMLLMVDVVYNHYAWNGDGSVDYSSFTPFNQQS
S. p CBS 2169	TSRFLFNKYL*CSNQY*RLGR*Y*SLPSRFK*G*WYRRI*SNLGVRYCSKLFNRWFKNG*CKVRRYHFFNEV*GHFWCL*LR*SLPRI
S. c CBS 2863	YFHDYCLITNYNDQTNVEVCWEGDTEVSLPDLSTEDNEVIGVFQTVWSDVFQNYSDGLRIDSAKHVDTASLTKFEDASGVYDLGEVYQG
S. o ATCC 26076	YFHDYCLITNYNDQTNVEVCWEGDTEVSLPDLSTEDNEVIGVFQTVWSDVFQNYSDGLRIDSAKHVDTASLTKFEDASGVYDLGEVYQG
S. o CCRC 21164	YFHDYCLITNYNDQTNVEVCWEGDTEVSLPDLSTEDNEVIGVFQTVWSDVFQNYSDGLRIDSAKHVDTASLTKFEDASGVYDLGEVYQG
S. p CBS 2169	SNLYLSISELCERSYQLSIISSII*IL*YFGDFQRVNFNDLHITVIFFRTLFVGKLY*KP*SS*IHISTFRHILDYECNGLYNFG*LYP
S. c CBS 2863	DPTYTCPYQNYMKGVTNYPLYPVYRFFSDTSATSSSELTSMISTLNSSCSDVSLGNIENHDQVRFPVTSVSDTSLIKNAMAFIILGDGI
S. o ATCC 26076	DPTYTCPYQNYMKGVTNYPLYPVYRFFSDTSATSSSELTSMISTLNSSCSDVSLGNIENHDQVRFPVTSVSDTSLIKNAMAFIILGDGI
S. o CCRC 21164	DPTYTCPYQSYMKGVTNYPLYPVYRFFSDTSATSSSELTSMISTLNSSCSDVSLGNIENHDQVRFPVTSVSDTSLIKNAMAFIILGDGI
S. p CBS 2169	NYVLWPRTRSQQWLPSPLEIAFMVKWI*IPTQNTMS*SVY*IK**IKPLRRIPPIQLTNPQI.FLLQTTI*PLERVAMLSIDFHF**FRF
S. c CBS 2863	PIIYYGQEQGLNGGSDPANREALWLSGYNTDSEYYELISKLAQIRNQAIKKDSAYSTYKSSVSSSDHIYATRKGSDANQLISIFNNLGS
S. o ATCC 26076	PIIYYGQEQGLNGGSDPANREALWLSGYNTDSEYYELISKLAQIRNQAIKKDSAYSTYKSSVSSSDHIYATRKGSDANQLISIFNNLGS
S. o CCRC 21164	PIIYYGQEQGLNGGSDPANREALWLSGYNTDSEYYELISKLAQIRNQAIKKDSAYSTYKSSVSSSDHIYATRKGSDANQLISIFNNLGS
S. p CBS 2169	<u>RRDKDINVRNAGYSSGNKVVVVSCNSVTVGGSGS*SVSICGGMPQVYAPSSVLSGSGICNQ*</u>
S. c CBS 2863	NGSQDITVSNTGYSSGDKVIDIISCNVSVAGDSGSLSVSISGGMPQVYAPSSVLSGSGICNQ*
S. o ATCC 26076	NGSQDITVSNTGYSSGDKVIDIISCNVSVAGDSGSLSVSISGGMPQVYAPSSVLSGSGICNQ*
S. o CCRC 21164	NGSQDITVSNTGYSSGDKVIDIISCNVSVAGDSGSLSVSISGGMPQVYAPSSVLSGSGICNQ*

Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of α -amylase deduced from *Schwanniomyces* strains.

The amino acid sequences of the α -amylase deduced from *Sch. occidentalis* var. *persoonii* (first line), *Sch. castellii* (second line), and from *Sch. occidentalis* (third and fourth line) have been aligned by deleting gaps (-) to maximize the similarity. Regions with significant similarity are overlined and the presumptive signal peptidase cleavage site is indicated by triangle.

Sch. occidentalis CBS 1153, *Sch. occidentalis* var. *persoonii* NRRL Y-7400 그리고 *Debaryomyces vanriji* NCY 577의 게놈 DNA와 Southern hybridization을 실시하였다. 그 결과 *Sch. occidentalis* CBS 1153에서는 5.0 kb 부근에 hybridization 밴드가 나타난 반면 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* NRRL Y-7400과 CBS 2169에서는 프로브와 동일한 위치에서 나타났다(Fig. 6). 그래서 앞에서와 같이 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* NRRL Y-7400 균주로부터 상동체를 분리하여 제한효소 지도를 작성하여 본 결과 제한효소 위치(자료미제시)가 *Sch. occidentalis* var. *persoonii* CBS 2169의 그것과 일치하였다. 따라서 NRRL Y-7400 균주의 α -amylase 유전자도 돌연변이 되었을 것으로 추정되었다. 그런데 효모의 검색표에는 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*가 다른 *Schwanniomyces occidentalis* 균주와 마찬가지로 전분을 이용한다고 되어 있다

(10). 이상의 결과를 종합해 볼 때 Kreger van Rij(10)가 작성한 검색표에 *Sch. occidentalis* var. *persoonii*도 전분을 이용한다는 항목은 재고되어야 할 것으로 사료된다. 한편 *Sch. occidentalis* 균주와 계통학적으로 근연 종인 *Debaryomyces vanriji*에서는 α -amylase 유전자 상동체가 발견되지 않았다. 이같은 결과는 α -amylase 유전자 수준에서 *Schwanniomyces occidentalis* 균주들간에는 상동성이 있었으나, 이들과 *Debaryomyces vanriji*간에는 상동성이 없음을 보여주고 있다.

요 약

Schwanniomyces occidentalis 균주 CBS 2863(*castellii*)과 CBS 1153(*alluvius*) 그리고 이들의 변종인 *Schwanniomyces occidentalis* var. *persoonii*간의 유연관계를 α -amylase 유전자 수준에서 조사하였다. *Sch.*

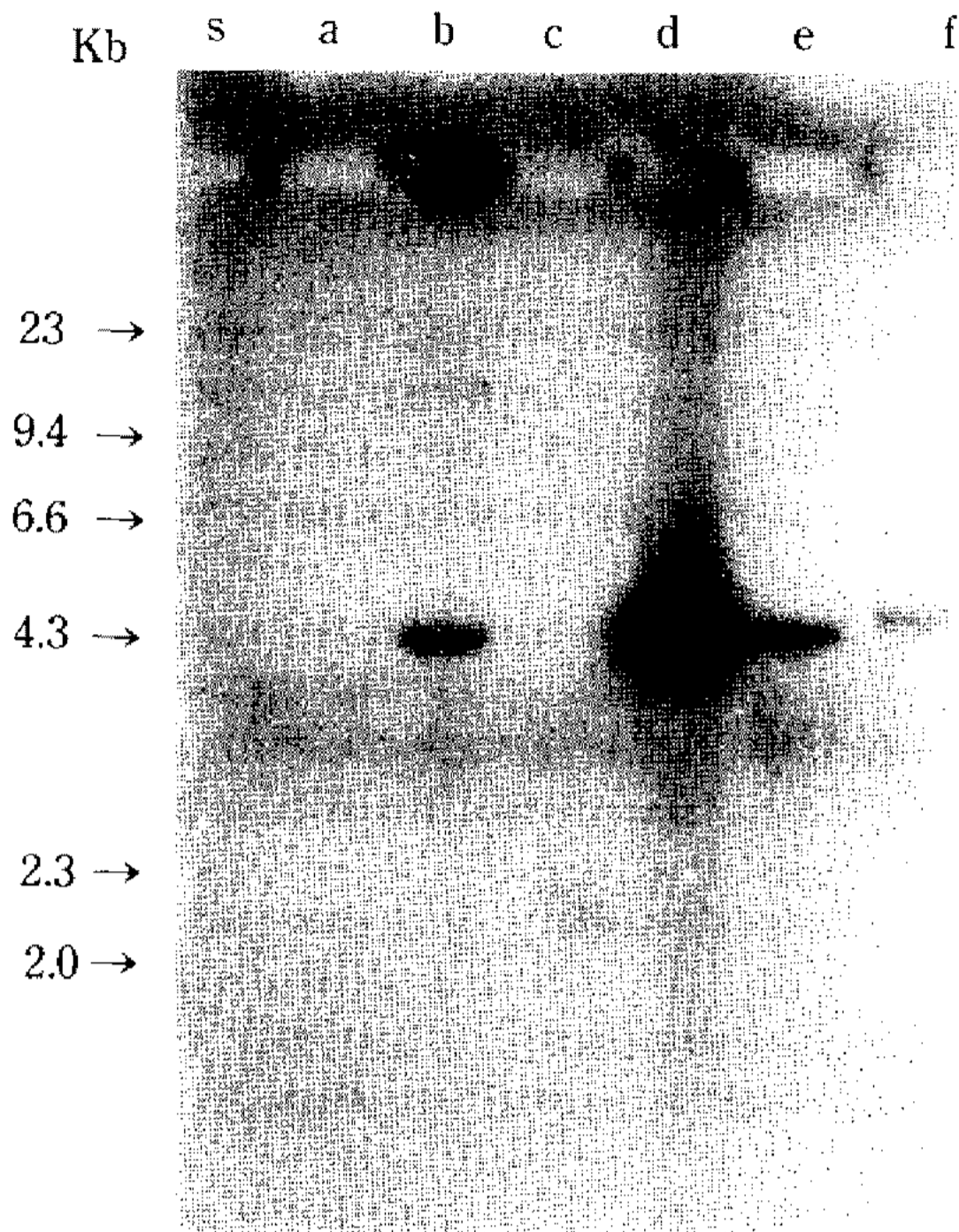


Fig. 6. Comparison of homologues between *Schwanniomyces* strains and *Debaryomyces vanriji* NCY 577 by Southern blot analysis.

λ -HindIII DNA(lane s), genomic DNA from *Debaryomyces vanriji* NCY 577(lane a), *Sch. occidentalis* var. *personii* NRRL Y-7400(lane b), *S. cerevisiae* SHY3(lane c), *Sch. occidentalis* var. *personii* CBS 2169(lane e), and *Sch. occidentalis* CBS 1153(lane f), were completely digested with *Eco*RI, and together with CBS 2169 AMY-homologous gene[4.8 kb(lane d)], hybridized with α -³²P-labelled CBS 2169 AMY-homologous gene.

occidentalis CBS 2863 α -amylase 유전자를 이용, 이들 균주의 게놈으로부터 얻어진 α -amylase 유전자 상동체들의 제한효소 지도를 작성하여 분석한 결과 *Sch. occidentalis* CBS 2863과 CBS 1153의 α -amylase 상동체간에는 제한효소 위치가 일치하였으나 이들과 *Sch. occidentalis* var. *personii*간에는 차이가 있었다. 이같은 차이를 알아보기 위하여 *Sch. occidentalis* var. *personii* α -amylase 상동체 약 2.0 kb에 대한 염기서열을 결정하였다. 그 결과 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자의 open reading frame의 시작 코돈에서 141번째로부터 241개의 염기쌍이 결실되었고 또 중앙 부위에서도 많은 염기쌍이 치환, 결실, 첨가로 27개의 정지코돈이 나타났다. 그러나 N-말단과 C-말단 부위의 아미노산과 *Sch. occidentalis* CBS 2863 α -amylase 유전자의 그것과는 83% 상동성을 보여주었다. 한편 전분을 이용하고 계통학적으로 *Sch. occidentalis*균과 근연종인 *Debaryomyces vanriji*에서는

Sch. occidentalis CBS 2863 α -amylase 유전자 상동체가 존재하지 않았다.

감사의 말

본 연구는 1992-1993년 교육부 학술연구 조성비(유전공학) 지원에 의하여 이루어졌습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Dohmen, R., A.W.M. Strasser, U.M. Dahlems and C.P. Hollenberg. 1990. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (GAMI) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **95**, 111-121.
2. Park, J.C., S. Bai, Y.T. Chi, and S.B. Chun. 1992. Nucleotide sequence of the extracellular α -amylase gene in the yeast *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 26077. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**, 17-24.
3. Strasser, A.W.M., R. Selk, R.J. Dohmen, T. Niermann, M. Bielefeld, P. Seeboth, G. Tu and C.P. Hollenberg. 1989. Analysis of the α -amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and the secretion of its gene product in transformants of different yeast genera. *Eur. Biochem.* **184**, 699-706.
4. Wang, T.T., L.L. Long and H.H. Wen. 1989. Cloning and expression of a *Saccharomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3167-3172.
5. Wu, F.M., T.T. Wang and W.H. Hsu. 1991. The nucleotide sequence of *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene. *FEMS Microbiology Lett.* **82**, 313-318.
6. Price, C.W., C.B. Fuson and H.J. Phaff. 1978. Genome comparison in yeast systematic: *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* **42**, 161-193.
7. Kurtzman, C.P., M.J. Smiley and F.L. Baker. 1972. Scanning electron microscopy of ascospores of *Schwanniomyces*. *J. Bacteriol.* **112**, 1380-1382.
8. Spencer, J.F.T. and P.A.J. Gorin. 1969. Systematics of the genera *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces* and *Brettanomyces*: Proton magnetic resonance spectra of the mannan and mannose containing polysaccharides as an aid in classification. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **35**, 361-378.
9. Kurtzman, C., and Robnett. 1991. Phylogenetic

- relationships among species of *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwanniomyces* determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeast*. **7**, 61-72.
10. Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. *Debaryomyces* Lodder et Kreger-van Rij nom. cons., p 130-150. Kreger-van Rij(ed.), The yeasts a taxonomic study. Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam.
 11. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. USA.
 12. Purrello, M. and I. Balazs. 1983. Direct hybridization of labelled DNA to DNA in Agarose gels. *Anal. Biochem.* **128**, 393-397.
 13. Smiley, G.S.T., C.F. Brunk and R.E. Perlman. 1983. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Anal. Biochem.* **131**, 365-372.
 14. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1987. Restriction mapping. *In Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York, USA.
 15. Sanger, S.N. and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.

(Received September 6, 1993)