

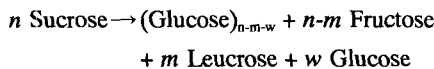
특집: 산업미생물의 분자생물학적 응용(II)

Glucosyltransferases(GTF) 유전자의 분자유전학적 특성연구

김도만 · 류화자

전남대학교 생물화학공학과

Glucosyltransferases(GTF, EC 2.4.1.5)는 sucrose로부터 glucan을 합성하는 효소들을 포괄적으로 일컬으며 *Leuconostoc*과 *Streptococcus* 속의 미생물들로부터 주로 생산된다[21, 25]. 이 두 종의 균들은 그람 양성이며 facultative anaerobic cocci로서 서로 밀접한 관계에 있으나 이들 간에 가장 큰 차이점은 최근에 개발된 돌연변이 균 이외의 *Leuconostoc*속 균들은 효소 생산을 위하여 sucrose를 요구하는 반면 *Streptococcus*속 균들은 sucrose를 필요로 하지 않는 것이다[17]. 즉 *Leuconostoc*속 균들은 glucansucrase를 inducible하게 생산하며 *Streptococcus*속 균들은 constitutive하게 생산한다. Glucosyltransferase의 설탕에 대한 반응기작은 다음과 같다[31].



이 효소반응의 주된 산물은 고분자량의 glucan(약 10^7 - 10^8 Da)과 fructose이며 부산물로는 glucose와 leucrose (5-O- α -D-glucopyranosyl-D-fructopyranose)가 생산된다. 효소반응 중 sucrose 이외의 다른 탄수화물이 존재하면 작은 분자량의 올리고당이 생산된다. 이 효소의 glucan 합성기작에 관하여는 많은 생화학적 연구가 되어왔으며[3, 4, 6, 9, 19] 그 중 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F에 의해 생산되는 glucosyltransferase의 한 종류인 dextransucrase는 two-site insertion mechanism으로 dextran을 합성하는 것으로 설명되고 있다 (Fig. 1)[21, 31]. Glucosyltransferase의 분자유전학적 연구는 주로 *Streptococcus*속으로부터 생산된 GTF에 관하여 연구되

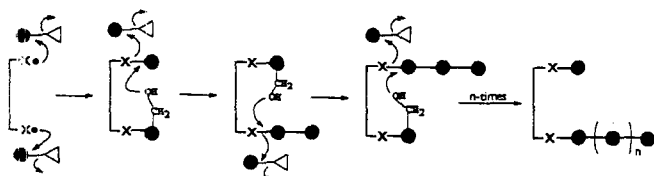


Fig. 1. Two-site insertion mechanism for the synthesis of *L. mesenteroides* B-512F dextran by dextransucrase. ●-△ is sucrose, ● is glucose, △ is fructose, X represents an enzyme nucleophile, ●-●- represents two glucose residues linked α , 1-6. X orients the glucosyl units so that their C-6 hydroxyl groups can make an attack onto C-1 of the apposed glucosyl unit.

어 왔으며, 연구내용은 주로 이 효소의 N-terminal catalytic site와 C-terminal glucan binding site에 관한 연구이다[1, 11, 15, 23, 30, 32, 35, 36, 38]. *Leuconostoc*속의 dextransucrase 유전자에 관한 연구는 최근에 시작하였으며, 효소활성에 관여하는 catalytic site와 dextran binding site에 관한 연구가 진행중에 있다[24, 25, 27, 41]. 본 고에서는 지금까지 연구된 *Streptococcus*속과 *Leuconostoc mesenteroides*의 GTFs에 관련된 분자유전학적 주요한 특성을 살펴보기로 한다.

*Streptococcus*속 glucosyltransferase 유전자의 분자유전학적 특성

GTF 유전자에 관하여 가장 많이 연구가 된 미생물은 *Streptococcus*속으로 이 미생물에서 생산되는 GTF는 치태 형성의 주요인으로서 연구가 많이 되어 왔다[5, 11, 13, 22]. 구강 미생물인 *Streptococcus*속의 한 균인 *S. mutans*는 세가지의 GTF를 생산하는데 이는 GTF-I, GTF-S, GTF-SI이며 처음 두가지는 주로 불용성과 수용성 glucan을 각각 생산하는 효소이고 세 번째 효소는 두가지 물성의 glucan을 모두 생산한다. 세 효소 GTF-I, GTF-SI, GTF-S를 coding하는 유전자가 분리되어 *gtfB*, *gtfC*, 그리고 *gtfD*라고 각각 명명하였다[8, 22]. GTFs는 효소의 크기가 160-180kDa 가량으로 sucrose의 분해 작용을 하는 N-terminal catalytic domain과 glucan-binding 역할을 하는 C-terminal domain이 있는 것으로 알려졌다. Catalytic domain의 아미노산 서열은 GTFs간의 높은 conservation을 가지고 있어 현재까지 알려져있는 모든 GTF의 아미노산 잔기중 42% 가량의 homology를 보여 준다(Table 1)[5]. Glucan-binding domain의 경우는 몇가지 종류의 동일한 아미노산 서열의 반복단위(repeat)로 구성 되어 있고, 이들의 수는 GTFs의 종류에 따라서 다소 다르다[25].

Catalytic site의 분자유전학적 분석

Mooser등이 *Streptococcus*속의 GTF-I와 GTF-S효소의 활성 부위의 peptide를 분리하여 연구한 결과 Asp가 이 peptide에서 sucrose와 공유결합 함을 보여주었고, 이 이후에 다른 여러 가

Table 1. Amino acid composition of GTF deduced from the nucleotide sequence of *gtfI*

Amino acid	No. of residues ^a	
	With signal peptide	Without signal peptide
Alanine	143	136
Arginine	43	41
Asparagine	109	108
Aspartic acid	137	137
Glutamic acid	65	63
Glutamine	93	93
Glycine	135	134
Histidine	19	18
Isoleucine	50	49
Leucine	92	90
Lysine	122	117
Methionine	27	24
Phenylalanine	64	63
Proline	30	30
Serine	106	101
Threonine	124	122
Tryptophan	25	24
Tyrosine	98	98
Valine	115	111
Total	1,597	1,559

^aM, with signal peptide, 177,100; M_r without signal peptide, 172, 983.

지 *Streptococcus*속 GTF효소들의 상응하는 Asp잔기를 site-directed mutagenesis를 이용하여 변화시킴으로서 이 아미노산이 활성에 중요한 영향을 줌을 확인하였다[15, 16, 29]. Kato 등은 *S. mutans* GTF-I의 D451을 E, N, T로 전환하여 얻은 돌연변이 효소들이 모두 sucrose와 GTF활성을 보이지 않음을 확인하여 이 아미노산이 GTF의 활성에 중요한 역할을 함을 확인하였다. 반면에 그 주위의 Asp 잔기들은 효소의 활성을 현저히 감소 시키지는 않았다. 따라서 GTF-I의 D451의 역할은 다른 GTFs의 상응하는 Asp 잔기와 같으리라고 여겨진다 (Table 2)[16]. 또한 GTFs의 활성에 관여하는 것으로 여겨지는 아미노산 잔기들을 site-directed mutagenesis를 통하여 다른 아미노산으로 치환하고, 생산된 치환 효소의 glucan 합성특성을 비교하여 glucan product의 구조에 특정 아미노산이 영향을 끼침을 확인하였다[5, 32]. Shimamura 등의 *S. mutans* GTFs 연

Table 2. Enzymatic activities of mutagenized GTF derivatives

Enzyme	Relative GTF Activity ^a (%)
Parental GTF-I	100
Mutant D451N	0
Mutant D451T	0
Mutant D451E	0
Mutant D457N	47.5
Mutant D567T	75.6

^aGTF activity was determined utilizing the radioactive sucrose assay.

생물산업

구 결과에 따르면 GTF-I의 경우 dextran T10과 같은 수용체가 없으면 D457N, D567T, D571K, K1014T 등의 돌연변이에서 생산된 GTF-I는 각각 37, 24, 18, 14% soluble-glucan(SG)을 합성하였다. 반면에 원래의 GTF-I와 I448V, 그리고 K779Q 돌연변이는 SG를 거의 생산하지 않았다. Dextran T10이 존재하면 원래의 GTF-I 효소는 약 13%의 SG를 합성하는데 I448V, D457N, D571K, K1014T 돌연변이는 25-60%의 SG를 생산하였으며 이는 원래의 GTF-I효소에서 생산되어진 양보다 2-4배 많은 양이다. 그러나 D567T와 K779Q 돌연변이는 GTF-I보다 많은 SG를 생산하지는 않았다. 그러므로 GTF-I의 몇 가지 conserved amino acid residue인 457, 567, 571, 1014에 대한 치환은 효소의 SG생산 능력을 증가시켰다. 더군다나 GTF-I의 6가지 아미노산을 GTF-S에 있는 상응하는 아미노산으로 치환하면 dextran T10이 없어도 SG를 주로 생산할 수 있었으며 수용체가 있을 때는 insoluble-glucan(IG)과 SG를 비슷한 양으로 생산하였다. 이 치환된 GTF-I는 계속적으로 IG를 생산하였지만 그 양은 원래의 GTF-I보다 훨씬 적었다(Table 3)[32]. GTF-S의 경우는 Asn-471을 Asp로 치환하면 원래의 GTF-S보다 약 23% 증가된 IG를 생산하였다. 더군다나 589번 위치의 Thr을 Asp로 치환하여 얻어진 효소는 dextran T10이 없는 경우 85%의 IG를 생산하였다. 따라서 이 부위를 산성 아미노산으로 치환하면 glucan product의 구조적 특성에 크게 영향은 주지만 효소가 항상 GTF-I의 활성만을 갖도록 하기에 충분하지는 않았다(Table 4). 돌연변이에 의해서 sucrose에 대한 GTF-I와 GTF-S의 결합 능력은 그다지 변하지 않았지만 생산된 산물의 α -1,3 glucose 결합 양은 달라짐을 알 수 있었다.

Glucan-binding에 대한 C-terminal direct repeat unit들의 역할

GTFs에서 glucan-binding 부위는 C-terminal 부위에 위치하고 있으며, 일반적으로 약 300-400개의 아미노산으로 구성되어 있고, 유사한 아미노산 서열이 반복되는 부분들이 발견되는데 서열의 유사성에 따라 A, B, C 그리고 D repeat로 구별하고 있다(Fig. 2)[11]. 이 반복되는 아미노산의 서열은 모두 동일한 구조적인 요소를 가지고 있는데, 이를 YG repeat이라고 하며 이는 aromatic amino acid가 모여있고 주위에 극성을 지니며 단백질의 turn을 유도하는 아미노산으로 구성되어 있는 특성이 있어, aromatic center에서 3 또는 4개의 아미노산 잔기가 떨어져서 glycine이 나온다는 특징을 보여 준다. 이 지역의 역할은 GTF 생산 균주에 따라 다소 차이를 보여주고 있어 *S. mutans* GS-5로부터 얻어진 GTF-I의 경우 C-terminal domain의 1/3은 효소 활성과 glucan binding의 두 가지 모두에 필요함을 볼 수 있었다[15]. 즉, 한 repeat 부분 이외의 나머지 부분을 deletion 하면 여전히 충분한 sucrose 활성을 보여 주면서도

Table 3. Soluble and insoluble glucan-synthetic activities of original and mutant GTFs of *S. mutans* GS5

Glucosyltransferase	Glucan-synthetic activity ^a (cpm)						Stimulation ^b by dextran (fold)
	Without dextran T10			With dextran T10			
	SG	IG	TG	SG	IG	TG	
GTF-I pTSU5	0(0)	8,950(100)	8,950	1,380(13)	9120(87)	10,500	1.2
GTF-I I448V	0(0)	9,170(100)	9,170	2,690(25)	8160(75)	10,850	1.2
GTF-I D457N	2,490(37)	4,250(63)	6,740	2,780(26)	7870(74)	10,650	1.6
GTF-I D567T	2,080(24)	6,760(76)	8,840	1,880(18)	8500(82)	10,380	1.2
GTF-I D571K	1,500(18)	6,990(82)	8,490	2,590(25)	7900(75)	10,490	1.2
GTF-I K779Q	160(3)	5,320(97)	5,480	1,510(18)	6930(82)	8,440	1.5
GTF-I K1014T	730(14)	4,350(86)	5,080	6,400(60)	4350(40)	10,750	2.1
GTF-I I448V : D457N	2,560(33)	5,280(67)	7,840	2,930(24)	9030(76)	11,960	1.5
GTF-I D457N : D567T	1,900(30)	4,340(70)	6,240	3,070(29)	7450(71)	10,520	1.7
GTF-I D457N : D571K	2,890(28)	7,430(72)	10,320	4,170(34)	8170(66)	12,340	1.2
GTF-I D567T : D571K	3,250(41)	4,700(59)	7,950	4,810(48)	5240(52)	10,050	1.3
GTF-I D567T : D571K : K1014T	2,290(38)	3,780(62)	6,070	3,870(42)	5450(58)	9,320	1.5
GTF-I D457N : D567T : D571K : K1014T	220(10)	1,890(90)	2,110	1,670(25)	4940(75)	6,610	3.1
GTF-I I448V : D457N : D567T : D571K : K1014T	100(4)	2,140(96)	2,510	1,180(21)	4530(79)	5,710	2.3
GTF-I D457N : D567T : D571K : K779Q : K1014T	570(23)	1,910(77)	2,480	1,960(30)	4510(70)	6,470	2.6
GTF-I I448V : D457N : D567T : D571K : K779Q : K1014T	4,540(73)	1,650(27)	6,190	7,720(51)	7330(49)	15,050	2.4
GTF-S pYND72	840(86)	140(14)	980	7,480(99)	90(1)	10,500	7.7
GTF-S N471D	3,190(62)	1,990(38)	5,180	11,080(99)	60(1)	11,140	2.2
GTF-S T589D	180(15)	1,000(85)	1,180	9,400(99)	100(1)	9,500	8.1
GTF-S T589E	30(2)	1,510(98)	1,540	12,080(99)	70(1)	12,150	7.9
GTF-S N471D : T589D	5,440(69)	2,440(31)	7,880	12,260(99)	160(1)	12,420	1.6
GTF-S N471D : T589E	3,330(53)	2,970(47)	6,300	13,340(99)	70(1)	13,410	2.1

^aThe activities are shown for SG, IG, and TG (total glucan) synthesized from [U-¹⁴C]sucrose. The values in parentheses represent the percentages of SG or IG in the reactions.

^bStimulation is expressed as the ratio of TG in the presence and absence of dextran T10.

Table 4. Linkage analyses of α-D-glucans synthesized by the GTF-S T589E mutant in the absence or presence of dextran T10

Enzyme	Dextran ^a	Glucan	Conc. (mol%) glucose residue with the following α linkage:			
			1, 3	1, 6	1, 3, 6	1
GTF-S T589E	-	Soluble	4.3	65.8	13.7	16.2
		Insoluble	38.1	33.6	10.9	17.4
	+	Soluble	8.2	44.1	23.1	24.6
		Insoluble	31.0	37.8	10.0	21.2
GTF-S ^b	-	Soluble	0	70.3	15.1	14.6
GTF-I ^c	-	Insoluble	76.0	24.0	ND ^a	ND

^aThe enzyme were reacted in the absence (-) or presence (+) of 10mg of dextran T10.

GTF 활성은 볼 수 없었다. 또한 6개의 repeat 부분을 모두 없애면 두 활성 모두 다 없어졌다(Fig. 3, 4)[15]. 이처럼 C-terminal deletion이 sucrose와 GTF 활성에 다른 효과를 보여주는 것은 효소에는 두가지 기능을 갖는 domains이 존재하는 것으로 한 군데는 sucrose의 결합과 분해에 관여하고 다른 것은 glucan의 결합과 chain elongation에 관여하는 것으로 여겨진다. 하지만 *S. mutans* 또는 *S. sobrinus* GTF의 C-terminal 지역은 sucrose의 분해에는 참여하지 않으나 활성에는 영향을 주는 것으로 보고되어 있다[15, 23].

*S. mutans*는 glucan-binding protein(GBP)을 생산하며 이 효소는 536아미노산으로 되어 있고 주로 친수성 아미노산으로

이루어져 있다. 이 단백질도 GTFs처럼 상당히 많은 homologous repeat이 있는데 이 repeat들도 두 가지 group으로 되어 있어 consensus A와 C repeat sequence로 구별하고 있다[1]. A와 C의 각 repeat들은 32-34개 그리고 17-20개 정도의 아미노산으로 구성되어 있다. 각각의 A와 C를 형성하는 repeat들은 48-78%정도의 homology를 보이고 있으며 다른 균들의 GTFs(*S. downei*의 GTFI, *S. mutans*의 GTFB와 GTFC)와 또한 상당한 homology를 가지고 있다. 하지만 *S. mutans*의 fructosyltransferase와는 homology가 거의 없다[33, 34, 37, 40]. *Streptococcus* 속의 GTF-S의 C-terminal repeats의 수와 구성 아미노산들의 종류가 효소의 기능성과 관련되어 있다는 구체

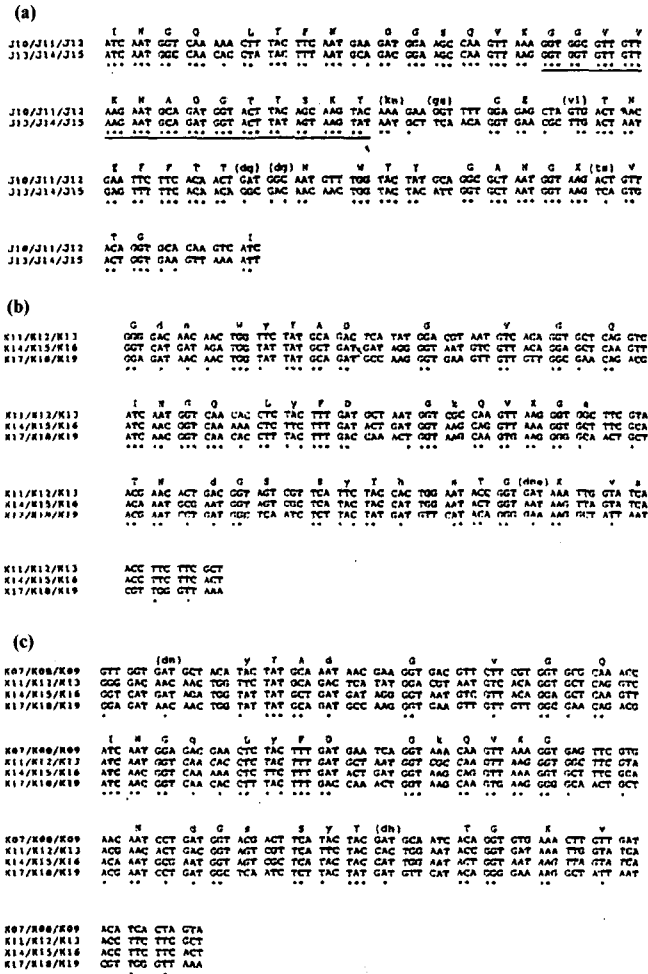


Fig. 2. Homology between the in-frame nucleotide sequence coding for the "YG" repeats J10-J12 and J13-J15(a); K11-K13, K14-K16, and K17-K19(b); and K7-K9, K11-K13, K14-K16 and K17-K19(c). The asterisks show positions of identity in the nucleotide sequence. The capital letters show the amino acids that are indentical, while the lower-case letters show the conserved amino acids in the aligned sequences. The region originally used to define the "D" repeat in the *gtfJ* is underlined. J, *gtfJ*; K, *gtfK*.

적인 연구 결과는 아직 많지 않으나 *S. mutans*의 GTF-S의 4개의 A repeats은 이 효소가 주로 α-1, 6-glycosidic unit으로 되어있는 수용성 glucan을 합성하는데 필요하다는 것이 확인되었다[23]. 반면에 *S. mutans*의 GTF-I 효소의 경우는 두개의 A repeats이 주로 α-1, 3-glycosidic unit으로 되어있는 불용성 glucan의 합성에 필요하다는 것이 밝혀 졌다[5].

Glucosyltransferases의 발현에 영향을 주는 유전자의 특성

불용성 glucan은 치아 표면의 구강 미생물 축적에 주된 역할을 하며, 이러한 미생물의 축적은 치아의 충치를 일으킨다.

생물산업

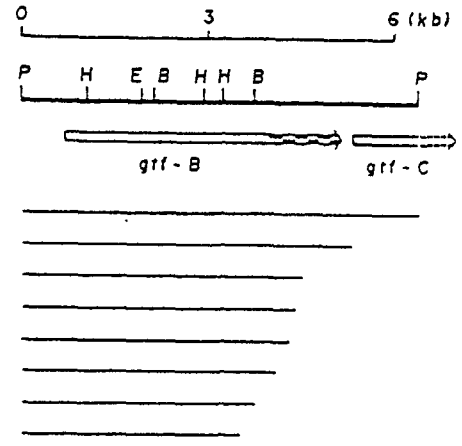


Fig. 3. Structures of the deletion derivatives of the GTF-I enzyme. The restriction map of the 6.4 kb *PstI* fragment is depicted above the structures of the deletion derivatives. The direct repeating units are depicted at the 3' end of the *gtfB* gene. H, *HindIII*; P, *PstI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*.

*Streptococcus*속 균을 다양한 생육환경에서 키울 때 관측되는 GTF의 생산량은 생육조건에 따라 달라 *S. mutans*의 경우에는 생장 배지중의 속도가 증가하면 GTF의 양이 증가 됨을 볼 수 있었다[39]. Tween 80과 같은 neutral detergent와 sodium의 농도는 *S. gordonii*의 체외분비성 GTF 활성을 감소시켰는데 Tween 80의 경우는 membrane의 유동성에 영향을 주기 때문이었다[2]. 또한 sucrose의 첨가는 GTF의 발현을 순간적으로 증가시킬 수 있었으며 돌연변이 균 중에는 GTF의 발현이 크게 증가 된 것도 분리되어 이와같은 결과로부터 GTF의 발현을 조절하는 부위가 있음을 예측할 수 있다[14]. Sulavik 등은 *S. gordonii*에서 약 1 kb의 크기를 가지는 GTF의 발현에 관여하는 부위를 얻었으며 이를 *rgg*로 명하였다[35]. 이 유전자로

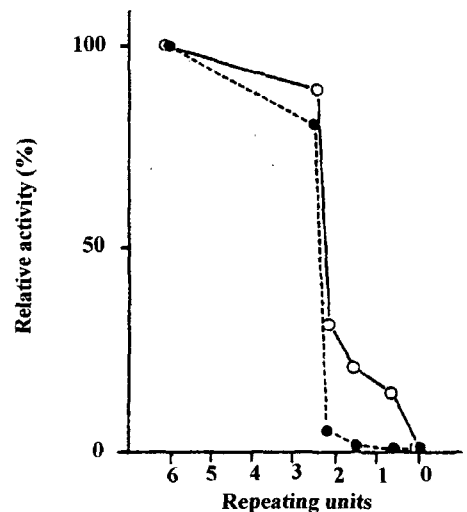


Fig. 4. Correlation between the number of direct repeating units and enzyme activities of the GTF-I deletion derivatives. ○-○, sucrose activity; ●-●, GTF activity.

부터 66bp downstream에는 *gtfG* 유전자가 존재하며, 이 유전자의 염기서열에는 흥미로운 inverted repeat이 존재함을 볼 수 있고 이것이 *gtfG*의 regulation에 직접 관여하여 GTF의 발현에 긍정적으로 영향을 미친다. *S. gordonii*는 sucrose를 포함한 배지 상에서 hard-colony phenotype(Spp⁻)에서 soft-colony phenotype(Spp⁺)로 phase가 전환하는 현상을 보이는데 이 Spp⁻ colony는 다시 Spp⁺로 전환 할 수 있음을 확인하였다. 이 phase 전환 비는 10⁻³에서 10⁻⁴였으며, 이들 phase의 차이는 GTF의 활성 정도에도 영향을 줌을 확인하였다. 즉 Spp⁺의 형태가 효소 생산량이 4-10배 가량 높았다. 이들 Spp phenotype에도 *rgg*가 영향을 주어 Spp⁺ 균에서 *rgg* 부분을 변화시킬 경우 Spp⁻의 phenotype이 되었고, Spp⁻ 균에 *rgg*를 갖고있는 plasmid를 형질전환한 결과 그 활성은 wild-type 보다도 증가됨을 볼 수 있었다(Fig. 5)[35]. 현재까지 *rgg*의 연구결과에 의하면 염기서열 중에는 두 곳의 inverted repeat이 있는데, 첫 번째 것(IR-1)은 *rgg*의 -10 promoter와 ribosome binding site 사이의 26 bp 부분에 위치하고 있다. 이곳에 어떤 단백질이 결합

하면 *rgg*의 transcriptional initiation을 막을 것이며, 이에 대한 가능성은 돌연변이 균의 선발로 확인되었다[12]. 두번째 inverted repeat은 *rgg*와 *gtfG* 사이에 위치하며, *gtfG*의 transcription과 translation을 모두 조절하는 것으로 알려졌다[35]. 하지만 이에 대한 자세한 연구는 *rgg*와 *gtf*의 발현에 영향을 주는 조절인자들과 관련하여 앞으로의 연구과제로 남아있다.

*Leuconostoc mesenteroides*의 dextransucrase 유전자의 분자생물학적 특성

현재까지 연구된 *L. mesenteroides*의 dextransucrase 유전자는 B-512F와 B-1299 균으로부터 분리되었는데 B-1299로부터는 α-1,6 glucan만을 생성하는 체외분비성 dextransucrase B (DSRB)를 coding하는 유전자의 염기서열이 밝혀졌으며 *dsrB* 유전자의 ORF는 4521 bp였고 이에 해당하는 아미노산은

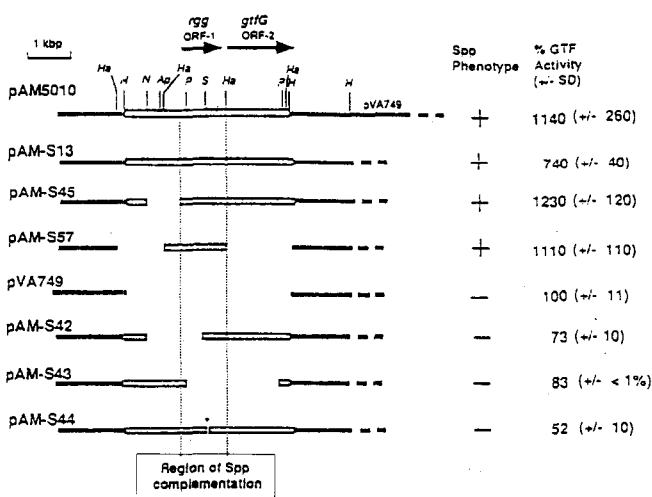


Fig. 5. Schematic of plasmid derivatives, depicting the region which complements the Spp⁻ phase variants and relative levels of extracellular GTF. The restriction map of pAM5010 is shown. Ha, *Hae*III site; H, *Hind*III site; N, *Nru*I site; Ap, *Apa*I site; P, *Pvu*II site; S, *Sal*I site. A + in the Spp phenotype column indicates that a plasmid derivative confer an Spp⁺ phenotype on the Spp⁻ phase variants CH97. This was determined by infection of CH97 transformed with the various derivatives. A - indicates that no change in the Spp⁻ CH97 phenotype occurred. The GTF activity of plasmid derivatives placed in *S. gordonii* CH1 was determined relative to that from CH1 containing the control plasmid pVA749 (100%). GTF from supernatants of cultures of CH1 transformed with plasmid derivatives was assayed and quantitated as described in Materials and Methods. All samples were assayed in triplicate, and a standard deviation (SD) was calculated. The asterisk in the pAM-S44 schematic denotes a 4-bp deletion which resulted in the absence of the *Sal*I restriction site.

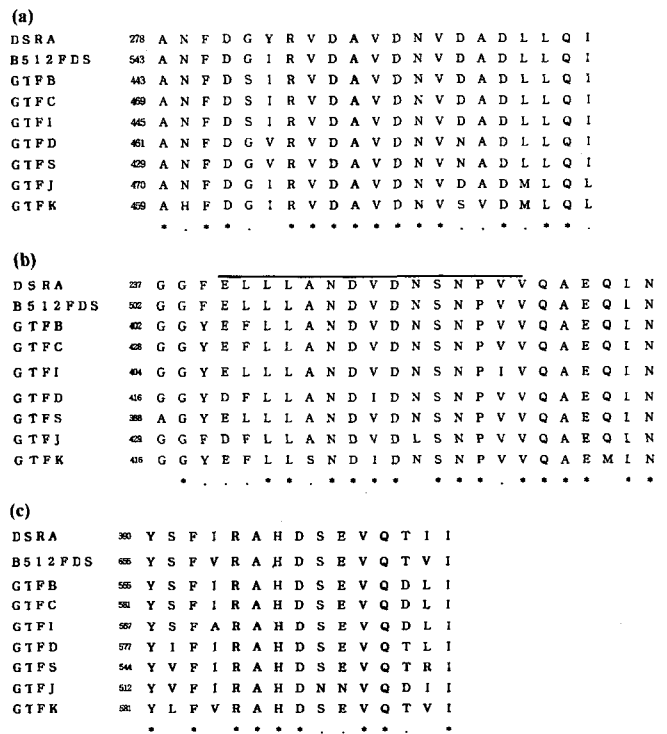


Fig. 6. Alignment of the deduced partial amino-acid sequences of DSRB, *L. mesenteroides* NRRL B-512F dextransucrase gene (Wilke-Douglas *et al.*, 1989), GTFB (Shiroza *et al.*, 1987), GTFC (Ueda *et al.*, 1988), GTFD (Honda *et al.*, 1989), GTFI (Ferretti *et al.*, 1987), GTFP (Gilmore *et al.*, 1990), GTFJ (Giffard *et al.*, 1991), GTFK (Giffard *et al.*, 1993). (a) Sequence homologous to the sucrose binding site identified by Mooser *et al.* (1991). The active aspartic residue is in bold type. (b) Sequence homologous to the active site identified by Funane *et al.* (1993), upperlined by the black bar above. (c) Conserved sequence where is located the threonine residue identified by Shimamura *et al.* (1994) is found as influencing the structure of the synthesized glucan. This non-conserved residue is in bold type.

	«A» repeats	«C» repeats	«N» repeats
Consensus sequence	WYYFN--DGQAATGLQITDGQTV--FDDN-GQ-VK	DGKI--YFFDPDSGEVVKRNFV	
Sequence and location in DSRS	¹¹⁹³ YYFDKT-GHLVTGLQKINNHTYY-FLPN-GIELV ¹³²³ WFYFDGN-GHAVTGFQTINGKQY-FY-NDGHQSK ¹³⁶³ TFYTSATDGRLLVTGVQKINGIT-YAFD-NTGNLIT	¹²³² DGTIV-YFDKK-GHQVFDQYI ¹²⁷⁶ DGHQQYFDQN-GVQVKDKVI ¹⁴²⁴ DGVLK-YFDGQNGEQVKDAII	¹³⁹⁹ YYQLAD-GKYML ¹⁴⁵¹ YFYNATQGVAVK ¹⁴⁶⁴ DYFE-YQGNWYL ¹⁴⁷⁹ YQLIK-GFKAVDD ¹⁵¹⁶ YQFDNNG-NAVSA

Fig. 7. Sequences of A repeats, C repeats, and N repeats. The consensus sequences (*Streptococcus sobrinus* MFe28) used to identify the A and C repeats are shown. Boldface type indicates conserved amino acid residues.

1507개로, 분자량은 168,511 Da이었다[26]. 또다른 유전자는 *dsrA*로 이 유전자에서 얻어지는 단백질은 1290개의 아미노산으로 구성되어 있고 분자량은 145,490 Da로 계산되었다[28]. B-512F에서 얻어진 dextransucrase 유전자(*dsrS*)는 1527개의 아미노산으로 되어있고[24] 이 아미노산의 서열은 DSR-B, DSR-A, 그리고 *Streptococcus*균의 GTFs와 상당히 많은 homology를 가지고 있다(Fig. 6)[28]. 대체적으로 dextransucrase는 다른 GTFs처럼 N-terminal에 catalytic domain이 있고 이는 약 900개의 아미노산으로 구성되어 있으며 C-terminal domain은 300-400개의 아미노산으로 구성되어 있어 GTFs처럼 A-D repeat이 존재하는 것으로 알려져 있고 이 또한 YG repeat이다(Fig. 7)[24]. DSR-B의 아미노산서열 homology는 *Streptococcus*의 GTFs와는 45-56% 정도이고 DSR-A와는 50%가량이며 다른 종의 균이지만 같은 구조의 dextran을 합성하는 DSR-S와는 70%의 homology가 있다[26]. Monchois 등은 DSR-S의 활성에 영향을 미치는 중요한 아미노산을 확인하기 위하여 유전자의 4군데의 염기를 site-directed mutagenesis를 이용하여 변화 시켰으며, 그 4군데는 D511N, D513N, D551N, H661R로 D511N, D551N은 dextran과 oligosaccharide의 합성을 완전히 억제하였고 D513N, H661R의 경우는 활성의 감소만을 보여 주었다. 따라서 D511N, D551N의 두 carboxyl group은 이 효소의 촉매작용에 있어서 필수적인 부분으로 생각되며 각 돌연변이 균의 glucan-binding activity가 그대로 유지되는 것으로 DSR도 다른 GTFs의 경우처럼 두 개의 domain structure로 되어 있음을 알 수 있다. C-terminal domain은 효소의 sucrose에 대한 K_m 값이나 효소활성의 적정 pH, sucrose의 결합, 그리고 dextran과 올리고당의 합성에서의 촉매작용 자체에는 영향을 주지 않지만 이 부분을 deletion하면 합성된 올리고당의 크기에 차이가 나는 점으로 미루어 C-terminal domain은 catalytic site로부터 올리고당의 분리에 관여하는 것으로 여겨진다[25].

Glucansucrase와 dextransucrase의 유전자와 관련된 앞으로의 연구 과제는 유전자의 발현에 관한 regulation, glucan의 다양한 구조 및 물성의 차이와 효소의 활성 부위의 상관 관계, 그리고

효소의 작용 기작에 관한 연구 등이며, 이에 대한 이해는 이 효소에 대한 생화학적, 분자 유전학적 이해와 더불어 산업적 이용 가치가 높은 glucose 화합물의 합성에도 기여할 것이다.

참고문헌

- Banas, J. A., R. R. B. Russell, and J. J. Ferretti. 1990. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.* **58**: 667-673.
- Buchan, R. J. and H. F. Jenkinson. 1990. Glucosyltransferase production by *Streptococcus sanguis* Challis and comparison with other oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**: 63-71.
- Chludzinski, A. M., G. R. Germaine, and C. F. Schachtele. 1976. *Streptococcus mutans* dextransucrase: purification, properties, and requirement for primer dextran. *J. Dent. Res. special Issue C.* **55**: C75-C86.
- Ditson, S. L. and R. M. Mayer. 1984. Dextransucrase: The direction of chain growth during autopolymerization. *Carbohydr. Res.* **126**: 170-175.
- Ferretti, J. J., M. L. Gilpin, and R. R. B. Russell. 1987. Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. *J. Bacteriol.* **169**: 4271-4278.
- Fu, D. and J. F. Robyt. 1988. Essential histidine residues in dextransucrase: chemical modification by diethyl pyrocarbonate and dye photo-oxidation. *Carbohydr. Res.* **183**: 97-109.
- Fu, D. and J. F. Robyt. 1991. Maltodextrin acceptor reactions *Streptococcus mutans* 6715 glucosyltransferases. *Carbohydr. Res.* **217**: 201-211.
- Fujiwara, T., Y. Terao., T. Hoshino., S. kawabata., T. Ooshima., S. Sobue., S. Kimura, and S. Hamada. 1998. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 331-336.
- Germaine, G. R., A. M. Chludzinski, and C. F. Schachtele. 1976. *Streptococcus mutans* dextransucrase: Requirement for Prmer dextran. *J. Bacteriol.* **120C**: 287-294.
- Germaine, G. R., S. K. Harlander., W-L. S. Leung, and C. F. Schachtele. 1977. *Sterptococcus mutans* dextransucrase: Functioning of primer dextran and endogeneous dextransase

- in water-soluble and water-insoluble glucan synthesis, *Infect Immun.* **16**: 637–648.
11. Giffard, P. M. and N. A. Jacques. 1994. Definition of a fundamental repeating unit in Streptococcal glucosyltransferase glucan binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* **73**: 1133–1141.
 12. Haisman, R. J. and H. F. Jenkinson. 1991. Mutants of *Streptococcus gordonii* Challis over-producing glucosyltransferase. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 483–489.
 13. Hamada, S. and H. D. Slade. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**: 331–384.
 14. Hudson, M. C. and R. Curtiss III. 1990. Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. *Infect. Immun.* **58**: 464–470
 15. Kato, C. and H. K. Kuramitsu. 1990. Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **72**: 299–302.
 16. Kato, C., Y. Nakano., M. Lis, and H. K. Kuramitsu. 1992. Molecular genetics analysis of the catalytic site of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 1184–1188.
 17. Kim, D. and J. F. Robyt. 1994. Selection of *Leuconostoc mesenteroides* mutants constitutive for glucansucrases. *Enzyme Microbiol. Technol.* **16**: 1010–1015.
 18. Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Properties of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC constitutive dextranucrase. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**: 689–695.
 19. Kobayashi, M. and K. Matsuda. 1980. Characterization of the multiple forms and main component of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Biochem. Biophys. Acta.* **614**: 46–62.
 20. Kobayashi, M., I. Yokoyama, and K. Matsuda. 1986. Substrate binding sites of *Leuconostoc* dextranucrase evaluated by inhibition kinetics. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2585–2590.
 21. Koepsell, H. J., H. M. Tsuchiya., N. N. Hellman., A. Kasenko., C. A. Hoffman., E. S. Shape, and R. W. Jackson. 1952. Enzymatic synthesis of dextran. Acceptor specificity and chain initiation. *J. Biol. Chem.* **200**: 793–801.
 22. Kuramitsu, H. K. 1993. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**: 159–176.
 23. Lis, M., T. Shiroza, and H. K. Kuramitsu. 1995. Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2040–2042.
 24. Monchois, V., A. Reverte, M. Remaud-Simeon, P. Monsan, and R.-M. Willemot. 1998. Effect of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase carboxy-terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1644–1649.
 25. Monchois, V., M. Remaud-Simeon., R. R. B. Russell., P. Monsan, and R.-M. Willemot. 1997. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 465–472.
 26. Monchois, V., M. Remaud-Simeon., P. Monsan, and R.-M. Willemot. 1998. Cloning and sequencing of a gene coding for an extracellular dextranucrase (DSRB) from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only a $\alpha(1-6)$ glucan. *FEMS Microbiol. Lett.* **159**: 307–315.
 27. Monchois, V., R.-M. Willemot., M. Remaud-Simeon., C. Croux., P. Soucaille, and P. Monsan. Primary structure of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Annals New York Academy of Sciences.* 151–156.
 28. Monchois, V., R.-M. Willemot., M. Remaud-Simeon., C. Croux, and P. Monsan. 1996. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. *Gene.* **182**: 23–32.
 29. Mooser, G., A. Hefta., R. J. Paxton., J. E. Shively, and T. D. Lee. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α -glucosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **266**: 8916–8922.
 30. Nakano, Y. J. and H. K. Kuramitsu. 1992. Mechanism of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases: hybrid-enzyme analysis. *J. Bacteriol.* **174**: 5639–5646.
 31. Robyt, J. F. 1996. Mechanism and action of glucansucrases. pp. 1-22. In Park, K. H., J. F. Robyt, and Y. D. Choi. (ed), Progress in Biotechnology. Vol. 12. Elsevier.
 32. Shimamura, A., Y. J. Nakano., H. Mukasa, and H. K. Kuramitsu. 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferase influencing the structure of the glucan product. *J. Bacteriol.* **176**: 4845–4850.
 33. Shiroza, T. and H. K. Kuramitsu. 1988. Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions. *J. Bacteriol.* **170**: 810–816.
 34. Shiroza, T., S. Ueda. and H. K. Kuramitsu. 1987. Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **169**: 4263–4270.
 35. Sulavik, M. C., G. Tardif, and D. B. Clewell. 1992. Identification of a Gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* *challis*. *J. Bacteriol.* **174**: 3577–3586.
 36. Tsumori, H., T. Minami, and H. K. Kuramitsu. 1997. Identification of essential amino acids in the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J. Bacteriol.* **179**: 3391–3396.
 37. Ueda, S., T. Shiroza, and H. K. Kuramitsu. 1988. Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene.* **69**: 101–109.
 38. Vickerman, M. M., M. C. Sulavik, P. E. Minick, and D. B. Clewell. 1996. Changes in the carboxy-terminal repeat region affect extracellular activity and glucan products of

- Streptococcus gordonii* glucosyltransferase. *Infect. Immun.* **64**: 5117-5128.
39. Wenham, D. G., T. D. Hennessey, and J. A. Cole. 1979. Regulation of glucosyl- and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 117-124
40. Whiley, R. A., R. R. B. Russell., J. M. Hardie, and D. B. Beighton. 1988. *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans* serotype h. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 25-29.
41. Wilke-Douglas, M., J. T. Perchorowicz., C. M. Houck, and B. R. Thomas. 1989. Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit products. PCT patent WO 89/12386.