

Bacillus pumilus TX703 유래 Xylanase 유전자(*xynK*)의 Cloning과 염기서열 분석

박 영 서*

경원대학교 식품생물공학과

Molecular Cloning and Analysis of Nucleotide Sequence of Xylanase Gene (*xynK*) from *Bacillus pumilus* TX703

Young Seo Park*

Department of Food and Bioengineering, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Korea

Abstract

A gene coding for xylanase from thermo-tolerant *Bacillus pumilus* TX703 was cloned into *Escherichia coli* DH5 α using pUC19. Among 7,400 transformants, four transformants showed clear zones on the detection agar plates containing oat-spelts xylan. One of them which showed highest xylanase activity was selected and its recombinant plasmid, named pXES106, was found to carry 2.24 kb insert DNA fragment. When the nucleotide sequence of the cloned xylanase gene (*xynK*) was determined, *xynK* gene was found to consist of 1,227 base-pair open reading frame coding for a polypeptide of 409 amino acids with a deduced molecular weight of 48 kDa. The coding sequence was preceded by a putative ribosome binding site, the transcription initiation signals, and *cis*-acting catabolite responsive element. The deduced amino acids sequence of xylanase is similar to those of the xylanases from *Hordeum vulgare* (barley) and *Clostridium thermocellum*, with 39 and 31% identical residues, respectively. The amino acids sequence of this xylanase was quite different from those of the xylanases from other *Bacillus* species.

Key words – xylanase gene, cloning, nucleotide sequence, *Bacillus pumilus*

서 론

식물세포벽은 cellulose, hemicellulose, lignin 등의 중합체로 구성되어 있는데 이중에서 hemicellulose는 galactan, mannan, xylan 등이 혼합되어 있는 복합 다당류로서 출처에 따라 구조가 매우 다양하지만 xylan이 전체 hemicellulose

의 절반 이상을 차지하고 있다[37,38]. Xylan은 그 자체로서는 이용가치가 별로 없으나 xylose 단위로 분해되면 이용성이 증가되기 때문에 xylan을 분해하는 효소에 관하여 세균이나 곰팡이를 대상으로 오래전부터 많은 연구가 진행되어 왔다[18,35]. Xylan은 5탄당인 D-xylose가 β -1,4 결합을 하는 중합체로서 일반적으로 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등의 측쇄를 가지고 있는 복잡한 구조의 중합체로서[6, 31] hard wood와 soft wood에 각각 20~25%, 7~12%가 함유되어 있다[4,38]. Xylan을 가수분해하여 xylose 또는 xyl-

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 031-750-5378, Fax : 031-750-5273
E-mail : ypark@kyungwon.ac.kr

ooligosaccharide로 전환시키는 효소인 xylanase는 동식물과 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있으며 β -1,3 xylanase [exo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase (EC.3.2.1.72), endo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase (EC.3.2.1.32)]와 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan xylanohydrolase [endo-xylanase (EC.3.2.1.8), exo-xylanase (EC.3.2.1.37)]가 있다[42,45]. β -1,3 Xylanase는 주로 해초나 해조류에 존재하는 β -1,3 xylan을 분해하는데 *Chaetomium globosum*과 *Irpex luteus* 등 극히 한정된 미생물만이 생산하는 것으로 보고되고 있다. 그러나 일반적으로 xylanase는 고등식물에 존재하는 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan의 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan xylopyranosyl linkage를 절단하는 효소로서 그 중 세균 유래의 xylanase는 주로 endo-type으로 작용하고 곰팡이 유래의 xylanase는 exo나 endo-type으로 작용하는 것으로 보고되어 있다. Xylanase는 자연계에 풍부한 목질계 바이오매스로부터 ethanol 등과 같은 바이오에너지의 생산, 목질계로부터 양질의 pulp 생산, 가축의 사료제조, 식품첨가물 등 생물공학산업에 유용하게 사용될 수 있어 최근 그 산업적 중요성이 강조되고 있다 [18,44]. Xylanase는 주로 *Bacillus*속과 *Aspergillus*속 미생물이 주로 생산하며 *Bacillus*속 미생물이 생산하는 xylanase는 D-xylose에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다.

Xylanase 유전자의 cloning은 1983년 Bernier 등 [1]이 *B. subtilis*의 chromosomal DNA로부터 *Escherichia coli*에 cloning한 것을 시초로 하여 현재까지 50여종의 xylanase 유전자가 cloning되었으며 이 중 *B. stearothermophilus*에서 유래된 xylanase 유전자 [10] 등 30여종의 xylanase 유전자의 염기배열 순서가 결정되어 xylanase의 발현기작, 분비기작 및 조절기작 등에 관한 기초적인 정보를 제공하고 있다. 또한 이러한 유전공학 및 단백질공학 등의 기법을 이용하여 xylanase의 구조와 기능과의 관계를 연구함으로써 유전자의 발현, 효소의 가수분해 효율, 기질 특이성, 그리고 효소의 안정성 등을 개선시킬 수 있다. 한편 xylanase의 생산성을 증대시키기 위한 접근방법으로서 xylanase 유전자의 구조 분석을 통하여 효소의 생합성이 관여하는 조절기구들을 분자적 수준에서 조절함으로써 효소의 산업적 생산시 효소생산의 저해요인을 제거하여 효소의 고효율 생산이 가능하다.

따라서 본 연구에서는 토양으로부터 분리한 xylanase 생산 내열성 *Bacillus* 균주의 chromosomal DNA로부터 xylanase 유전자를 cloning하여 그 염기배열순서를 결정한 후 이로부터 전사, 번역 등 유전자 발현에 관련된 구조를 분석하여

xylanase 유전자의 구조와 발현과의 관계를 해석하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

본 연구에 사용된 xylanase 유전자의 공여균주로는 토양으로부터 분리한 내열성 *Bacillus pumilus* TX703 [27]을 사용하였고 형질전환을 위한 숙주균주로는 *E. coli* DH5 α [13]를 사용하였으며 cloning을 위한 vector DNA로는 pUC19 [40]을 사용하였다.

배지

Plasmid DNA의 분리와 *E. coli* 형질전환을 위한 액체배양에는 LB 배지[30]를 사용하였다. *E. coli* 형질전환체의 선별에는 LB/Ap/X-Gal/IPTG 배지[30]를 사용하였고 xylanase 유전자를 함유한 *E. coli* 재조합체의 검색에는 LB 한천 평판 배지에 0.5%의 oat-spelts xylan이 첨가된 xylanase 탐색배지를 사용하였다. 배지에 첨가한 ampicillin은 최종농도가 100 μ g/ml가 되도록 첨가하였다.

사용시약 및 효소

Oat spelt xylan, D-cycloserine은 Sigma사 제품을 사용하였고 bacto-tryptone, bacto-yeast extract는 Difco사 제품, 제한효소, T4-DNA ligase, calf-intestinal alkaline phosphatase는 Boehringer Mannheim사 제품을 사용하였으며 agarose는 Bio-Rad사 제품, 1 kb DNA ladder는 Life Technologies사 제품을 사용하였다. 또한 chromosomal DNA 분리는 Promega사의 Wizard Genomic DNA Purification System을 구입하여 사용하였으며 agarose gel로부터 DNA의 용출에는 Bio101사의 GeneClean II Kit을 사용하였다.

Xylanase 효소활성측정

효소의 활성 측정은 Somogyi-Nelson의 환원당 정량법 [34]에 의하여 수행하였다. 1%의 xylan 용액 (oat-spelts xylan in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 400 μ l에 조효소액 100 μ l를 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후, alkaline copper reagent (28 g disodium hydrogen phosphate, 40 g Rochell salt, 100 ml 1N NaOH, 80 ml 10% cupric sulfate,

180 g sodium sulfate / 1 L)를 400 μ l 가한 뒤 100°C에서 10분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액을 수돗물로 냉각한 후 Nelson's reagent (50 g ammonium molybdate, 42 ml sulfuric acid, 6 g sodium arsenate heptahydrate in 50 ml H₂O / 1 L)를 400 μ l 가하고 2.6 ml의 증류수로 희석하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준곡선은 D-xylose를 0.1 μ mol 사용하였고, 효소 1 U는 주어진 조건에서 분당 1 μ mol의 D-xylose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

Chromosomal DNA의 분리

B. pumilus TX703의 chromosomal DNA는 Promega사의 Wizard Genomic DNA Purification System을 이용하여 분리하였다. LB 배지에서 하룻밤동안 37°C에서 250 rpm으로 진탕배양한 배양액 1 ml를 원심분리하여 균체를 얻고 480 μ l의 50 mM EDTA 용액에 현탁시킨 다음 10 mg/ml (in 10 mM Tris-HCl)의 lysozyme을 120 μ l 첨가하고 37°C에서 60분간 반응시켰다. 원심분리하여 모은 침전물에 600 μ l의 Nuclei Lysis 용액을 가하여 현탁시키고 80°C에서 10분간 반응시켰다. Cell lysate에 3 μ l의 RNase 용액을 가하여 섞어주고 37°C에서 60분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시킨 다음 Protein Precipitation 용액을 200 μ l 가하여 섞어준 뒤 0°C에서 5분간 정치시키고 원심분리하였다. DNA를 함유하고 있는 상등액을 새로운 tube에 옮기고 600 μ l의 isopropanol을 가하여 DNA가 눈에 보이는 덩어리로 형성될 때까지 섞어준 다음 원심분리하여 모은 침전물에 600 μ l의 70% ethanol을 넣고 DNA 침전물이 깨끗해질 때까지 세척하였다. 다시 원심분리하여 상등액을 따라 버리고 15분 동안 건조한 다음 100 μ l의 멸균 증류수를 가하여 65°C에서 1시간 동안 반응시켜 녹인 다음 -20°C에서 보관하여 사용하였다.

Plasmid DNA의 분리

*E. coli*로부터 plasmid DNA를 신속분리하기 위하여 miniscreen법 [28]을 변형하여 사용하였다. 하룻밤 배양한 LB 배양액 1.5 ml를 4°C, 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 균체를 모으고 냉각된 GTE 완충용액 (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) 100 μ l에 현탁시켰다. 여기에 200 μ l의 lytic mixture (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 가하여 조심스럽게 섞어준 후 0°C에서 5분간 방치

한 다음 150 μ l의 5M potassium acetate (pH 4.8)를 가하여 잘 섞어주고 0°C에서 10분간 방치하였다. 반응액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 새로운 tube에 상등액을 옮기고 RNase A 용액 (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl)을 2 μ l 가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 여기에 200 μ l의 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 가하여 섞어준 다음 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 새로운 tube에 상등액을 옮기고 200 μ l의 chloroform:isoamylalcohol (24:1)을 가하여 섞어준 다음 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 새로운 tube에 옮겼다. 0.6배량의 isopropanol을 가한 후 섞어준 다음 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 DNA를 1 ml의 70% ethanol로 세척한 뒤 침전된 DNA를 건조시킨 후 적당량의 증류수에 녹여 사용하였다.

E. coli 형질전환

*E. coli*의 형질전환을 위한 competent cell은 Hanahan의 방법 [13]을 변형하여 조제하였다. LB 한천 평판 배지에 보존된 *E. coli*의 단일 colony를 5 ml의 LB 배지에 접종하여 37°C, 250 rpm에서 하룻밤 진탕배양한 종배양액을 50 ml의 LB 배지에 1%가 되도록 접종한 후 OD₆₀₀ = 0.4가 될 때까지 37°C, 250 rpm에서 진탕배양하였다. 배양액을 0°C에서 10분간 방치한 후 2,600 g에서 10분간 원심분리하여 침전된 균체를 10 ml의 CaCl₂ 용액에 현탁시키고 2,600 g에서 7분간 원심분리하여 침전된 균체를 25 ml의 살균 냉각된 CaCl₂ 용액 (50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 현탁시킨 뒤 0°C에서 30분간 방치하였다. 4°C에서 2,600 g로 7분간 원심분리하여 균체를 모으고 4 ml의 냉각된 CaCl₂/glycerol 용액 (15% (v/v) glycerol, 50 mM CaCl₂)을 넣어 현탁시켰다. 이 현탁액을 100 μ l씩 분주하여 -70°C에 보관하면서 competent cell로 사용하였다. Competent cell 100 μ l에 200 ng의 ligated DNA를 포함하고 있는 ligation mixture를 혼합하여 섞어준 후 0°C에서 40분간 방치하였다. 42°C에서 2분간 heat shock를 가한 후 LB 배지를 1 ml 넣고 37°C에서 90분간 250 rpm으로 배양시켜 유전자를 발현시킨 뒤 LB/Ap/X-Gal/IPTG 배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤동안 배양시켰다. 생성된 white colony를 재조합체로 선정하여 분석하였다.

Agarose gel 전기영동 및 DNA 단편의 회수

전기영동 완충용액으로는 TAE 완충용액 (40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)을 사용하였으며 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethidium bromide를 첨가한 0.8% (w/v)의 agarose 수평 gel을 사용하여 1/5배량의 5 \times gel loading 완충용액 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% (w/v) sucrose)을 가한 DNA 용액을 100 V에서 40분간 전기영동한 후 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였다. Agarose gel로부터 DNA 단편의 회수는 Bio101사의 GeneClean II Kit을 사용하여 수행하였다. DNA 단편을 함유하고 있는 agarose gel로부터 원하는 크기의 DNA 단편을 잘라내고 6 M의 sodium iodide를 DNA 단편의 3배량을 넣고 gel이 녹을 때까지 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 방치하였다. 10 μl 의 glassmilk를 넣고 매 2분마다 vortex하며 얼음물에서 10분간 방치하였다. 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5초간 원심분리하여 모은 침전물을 new wash액 700 μl 로 현탁하여 5초간 원심분리한 후 세척하였다. 이 과정을 3회 반복하여 모은 glassmilk 침전물에 20 μl 의 증류수를 가하여 현탁시켜서 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 방치한 후 3분간 원심분리하여 새로운 tube에 상등액을 옮겨 DNA를 회수하였다.

Xylanase 유전자의 cloning과 재조합 균주의 선별

Xylanase 유전자의 cloning을 위하여 *B. pumilus* TX703에서 분리하여 정제한 chromosomal DNA를 HindIII로 부분 절단하고 역시 같은 제한효소로 절단한 pUC19 plasmid vector에 1:2의 비율로 ligation시켜 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환체들 중에서 외래 DNA가 삽입된 white colony를 0.5% oat-spelts xylan이 함유된 LB 한천배지에 replica한 후 D-cycloserine ($\times 10$, 240 mg/40 ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0) 0.5 ml를 4.5 ml의 top agarose (1% bacto-tryptone, 0.8% NaCl, 0.8% agarose)와 혼합하여 plate에 overlay한 후 6시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에 배양하여 세포를 용균 시킴으로써 세포내 효소를 방출시킨 다음 형질전환체 주위에 투명환을 생성하는 colony를 xylanase 유전자가 삽입된 형질전환체로 선별하였다.

Xylanase 유전자의 염기배열순서결정 및 분석

선별한 재조합 *E. coli* 세포로부터 재조합 DNA를 분리한 다음 여러 가지 제한효소로 절단하여 전기영동을 실시함으로써 xylanase 유전자의 제한효소지도도를 작성하였다. 이 결

과에 근거하여 제한효소로 절단한 여러가지 유전자 단편을 pUC19 plasmid vector에 ligation시켜 재조합 plasmid DNA를 제조한 후 각 subclone에 대한 염기배열순서를 결정하기 위한 실험을 행하였다. Xylanase 유전자의 염기배열순서결정은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 게놈사업단의 의뢰하여 ABI 자동염기분석기로 수행하였으며 Mac Molly DNA 분석 program을 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 유전자의 cloning

B. pumilus TX703의 chromosomal DNA로부터 xylanase 유전자를 cloning하기 위하여 약 7,400 주위의 *E. coli* 형질전환체를 0.5% xylan이 함유된 LB 한천배지에 배양시킨 결과 colony 주위에 투명환을 생성하는 4 균주를 얻었고 각각 No. 1, No. 2, No. 4, No. 9로 명명하였다 (data not shown). 이들 4 균주로부터 plasmid DNA를 분리한 후 HindIII로 절단하여 전기영동에 의하여 삽입된 DNA의 크기를 분석한 결과 No. 1과 No. 2의 삽입 DNA 단편은 각각 6 kb와 12 kb였고 No. 4와 No. 9는 삽입 DNA의 크기가 2.3 kb였으며 제한효소 절단 형태도 동일하여 No. 4와 No. 9는 동일 DNA 단편이 삽입된 것으로 판단되었다. 이들 재조합 균주의 xylanase 효소활성을 측정한 결과 No. 1은 0.058 U/ml, No. 2는 0.029 U/ml, No. 4는 0.083 U/ml, No. 9는 0.053 U/ml로 나타나 이들 4개의 재조합 균주 중에서 삽입 DNA의 크기가 가장 작고 효소활성이 가장 높은 No. 4를 선택하여 본 연구에 사용하였다. 이 균주로부터 plasmid DNA를 분리하여 *E. coli* DH5 α 에 재형질전환시킨 결과 모든 형질전환체가 투명환을 나타내어 vector 내에 xylanase 유전자가 cloning되었음을 확인하였고 이 재조합 plasmid DNA를 pXES106으로 명명하였다.

Xylanase 유전자의 제한효소지도 작성

pXES106 재조합 DNA의 제한효소지도도를 작성하기 위하여 xylanase 유전자가 함유된 형질전환체로부터 재조합 plasmid DNA인 pXES106을 분리한 후 여러 가지 제한효소로 절단한 다음 agarose gel 전기영동에 의해 DNA 단편의 크기를 분석하였다. 그 결과 삽입 DNA에는 BamHI, BglII, KpnI, PstI, PvuI, SalI, SmaI, XbaI, XhoI 절단부

위가 존재하지 않았고 *Hind*III 절단부위가 4개 존재하였으며 *Eco*R I, *Pvu*II 절단부위가 각각 1개씩 존재함을 알 수 있었다. pXES106 DNA의 제한효소지도는 Fig. 1에 나타내었다.

Xylanase 유전자의 염기배열순서 결정

제한효소지도 작성 후 cloning된 xylanase 유전자가 함유된 DNA 단편의 염기배열순서를 결정하기 위하여 여러 가지 제한효소로 절단한 DNA 단편들을 pUC19에 subcloning한 후 제조한 subclone들의 염기배열순서결정을 수행한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 xylanase 유전자를 함유한 삽입 DNA의 크기는 2,187 bp로 확인되었다.

Cloning된 DNA 단편 내에 존재하는 xylanase 유전자의 open reading frame을 검색하기 위하여 DNA 단편상의 염기배열순서를 분석한 결과 이 DNA 단편에는 ATG 개시 codon으로 시작되는 1,227 bp의 open reading frame 한개가 존재함을 알 수 있었다. 일반적으로 xylanase의 분자량은 평균 40 kDa으로 알려져 있고 이를 유전자의 크기로 환산하면 대략 1 kb 정도가 되기 때문에 이 open reading frame이 xylanase를 coding하는 frame으로 결론지었고 1,227 bp의 크기를 갖는 이 xylanase 유전자를 *xynK*라 명명하였다

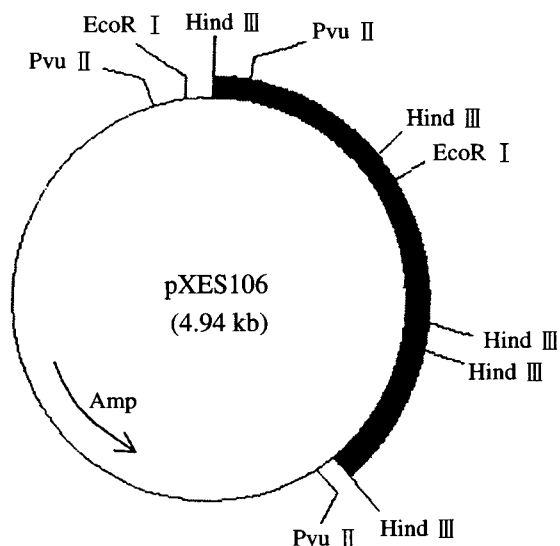


Fig. 1. Restriction endonuclease cleavage map of recombinant plasmid pXES106.

A *Hind*III fragment containing xylanase gene (closed thick line) was inserted into plasmid pUC19.

(GenBank accession number: AF466829). Xylanase 유전자를 포함하고 있는 이 open reading frame은 409개의 아미노산으로 구성되어 있으며 추산 분자량이 48 kDa인 하나의 polypeptide 분자의 유전정보를 지니고 있었다. *Bacillus* 중에는 pI가 낮으면서 분자량이 높은 종류와 pI가 높으면서 분자량이 낮은 종류가 있는데 본 실험 균주의 xylanase 유전자의 pI는 7.5로 계산되어 후자에 속하며 Nanmori 등 [26]이 분리한 *B. stearrowthermophilus*의 pI 4.83이나, 본 균주의 유전자와 마찬가지로 분자량이 낮고 pI가 높은 균주에 속하는 Blanco 등 [2]이 분리한 *Bacillus* sp. BP-23의 pI 9.3과는 많은 차이를 보였다.

Promoter

유전자 전사과정의 첫번째 단계는 RNA 중합효소가 DNA 분자상의 promoter에 결합하는 것으로 promoter의 구조는 전사의 효율을 결정하고 있으며, 강한 promoter의 하류에 있는 유전자는 mRNA가 대량으로 합성되어 그 결과 해당 유전자 산물도 대량으로 생산된다. *B. subtilis*는 포자형성 등의 분화현상이 중요한 특징이며, 전사조절계는 *E. coli*의 경우보다 복잡하다. Promoter의 인식 요소이며 RNA 중합효소와 DNA와의 직접적 접촉을 유도하는 전사인자의 하나인 σ 인자는 *E. coli*에서 2 종류로 알려져 있는데 대부분의 유전자의 전사에는 σ^{70} 이 이용되며 열충격 등의 특정상황에 발현되는 유전자들의 전사에는 σ^{32} 가 이용된다. 반면에 *B. subtilis*에서는 적어도 5종류의 σ 인자 (σ^A , σ^H , σ^C , σ^E , σ^D)가 알려져 있고, 각각이 인식하는 promoter의 염기배열과 유전자의 발현시기는 다르다.

*B. subtilis*의 σ^A 인자가 인식하는 promoter가 제일 많으며, 그 공통염기배열은 *E. coli*의 σ^{70} 인자가 인식하는 공통염기배열과 일치한다. *in vitro*계에서 *E. coli*의 RNA 중합효소는 *E. coli*와 *B. subtilis*의 promoter를 모두 인식하지만, *B. subtilis*의 σ^A 는 *E. coli*의 *tac* promoter를 인식할 수 없다는 보고가 있다 [25]. 이것은 *B. subtilis*의 유전자는 *E. coli*에서 발현되지만, 그 반대는 일어나지 않는다는 결과와 부합하고 있다.

Xylanase는 대부분의 *Bacillus* 세포에서 영양세포 단계에서 생합성되어 분비되므로 영양세포단계의 유전자 발현에 관계하는 σ^A 인자가 관여하는 것으로 알려져 있다 [33]. 본 xylanase 유전자의 염기배열에서 σ^A 인자가 인식하는 pro-

Bacillus pumilus TX703 유래 Xylanase 유전자(*xynK*)의 Cloning과 염기서열 분석

AAGCTTTGATATTCTTTGCTGCAGCCACAAAGCAGGAAACAGGTGATTATACAGCGCTTGGTGCAAGAGCGAAAGATGCA	80
GCTGCGCAGCTCCTAGAGGTTGCATGGAATTACAA <u>ATGATGGCGTCCGGCA</u> TAGTGACAGAGGAAGATAGAGAAGACTATGA	160
CCGTTTCTTTAGAAAAGAAGTGTATTTCCCAAATGGATGGAACCGGACATTTGGTCAAGGAAATCAAATTCCTGGAGCCA	240
GCACCATTCCTTCTGACCCGAGGAGGAGGAATGGGGTCTATACGAGTTTTGCTGATCTTCGTCCGAAGATTAACAA	320
GATCCAGCATGGTCTTCACT <u>CGAAA</u> GTAAATATCAGTCTTCA <u>TTTAATGA</u> AGCTACAGGCAAATGGGAGAATGGCGCACC	400
AGTTTTCACTTATCACCGCTTCTGGTCTCAAGTGGATATGGCCACTGCCTATGCTGAATACCATCGTCTGATCAACTAAG	480
AGGTTAAAAGCAAGCTGCCGGCTTCTGGCCGGCAGTTTGAATAGGTAATGAATCCAATGAAGATAAGGGT <u>GATTT</u> CA	560
M D K E R S F L H H S F N R G E N G Q E N L M W K K E	
ATGGACAAAGAAAGAGCTTTCTTCATCATTCAATCAATAGAGCGAAAATGGGCAGGAAAATCTGATGTGGAAAAAGA	640
A D D R I S E H R Q R D L V I N V T N G E K K P I A G	
GGCGGATGATCGAATCTCAGAGCATAGACAAAGAGATCTGTGATCAACGTGACAAACGGCGAAAAAAGCCAATAGCAG	720
I E V E I K Q I R H E F A F G S A M N D Q V L F N Q	
GAATAGAGTTGAAATAAAGCAAATCAGACATGAATTCGCCTTTGGTTCAGCGATGAATGATCAAGTGTATTTAATCAA	800
Q Y A D F F V K H F N W A V F E N E A K W Y A N E P E	
CAATATGCTGATTTTTTCGTGAAGCATTTAATTGGGCTGTTTTTGAAAATGAAGCAAAATGGTATGCGAATGAGCCAGA	880
R G K I T Y E K A D A M L N F A D R H Q L P V R G H A	
AAGAGGAAAATCACCTACGAAAAAGCAGATGCGATGCTGAATTTTGCAGATCGACATCAGCTTCCAGTGAGGGGCGCAG	960
L F W E V E D A N P S W L R S L P N H E V Y E A M K	
CTTTATTTTGGGAGGTAGAGGATGCGAATCCAAGCTGGCTGAGGTCAGTCCCGAATCACGAAGTATATGAAGCCATGAAA	1040
K R L E H A G N H F K G R F R H W D V N N E M M H G S	
AAACGGCTTGAGCATGCGGGCAATCACTTTAAGGGAAGTTCCGGCATTTGGGATGTAAACAATGAAATGATGCATGGTTTC	1120
F F K D R F G K N I W K W M Y E E T K K I D P Q A L L	
ATTTTTTAAAGATCGCTTTGGGAAAAATATTTGGAAGTGGATGTATGAAGAAACGAAAAAATGACCCCTCAAGCACTAT	1200
F V N D Y N V I S Y G E H H A Y K A H I N E L R Q L	
TGTTTGTGAATGATTATAATGTGATCTCTTATGGTGAACACCATGCCTATAAAGCCATATCAATGAACTGCCTCAGTTA	1280
G A P I E A I G V Q G H F E E R V D P V I V K E R L D	
GGCGCACCTATTGAGGCGATTGGGGTTCAAGGCCATTTTGAAGAACGGGTCGATCCAGTCATTGTCAAAGAGAGGCTCGA	1360
V L A E L G L P I W V T E Y D S V H P D P N R R A D N	
TGTGCTGGCTGAGCTTGGTCTTCCAATATGGGTACAGAGTACGATTTCTGTTCCACCTGACCCCTAATAGAAGAGCGGATA	1440
L E A L Y R V A F S H P A V K G V L M W G F W A G A	
ACCTGGAAGCTTTATATCGCGTCGCAATTTAGTCAATCCAGCCGTAAGAGAGTCTGATGTGGGATTTTGGGCAGGTGCC	1520
H W R G E H A A I V N Y D W S L N E A G R R Y E K L L	
CATTGGAGAGGTGAACATGCAGCCATCGTGAATTTATGATGGTCTTTAAATGAAGCAGGACGACGTTATGAAAAGCTTCT	1600
N E W T T Q R V E K T D A N G H V K C P A F H G T Y E	
AAACGAGTGGACGACGCAAGAGTTGAAAAACAGATGCTAATGGCCATGTGAAATGTCAGCATTTCACGGAACATATG	1680
I R I G K E N K M L K Q Q T I E L D S N E Q T P F Q	
AGATTGCAATCGGTAAGAAAAATAAATGCTCAAACAGCAGACGATTGAACCTGATTCAAATGAACAAACACCGTTTCAA	1760
L D V I L P Q E G	
CTAGACGTAATCCTGCCTCAAGAAGGATAGAGATAGATTGTGAGGAGAATGTAATGAAAAAGTGGGCTCAAAGAGTGTC	1840
TTGCTTCATACTTCTAGCCGCTATATGGTCTGGCTGGTTTTTCGCTTACGATGAAGGCTGCCGCTTATGTGCAGACGTCTG	1920
GTACACAATTTACACTGAACAATCAACCATTTTACTTCGCCGGCACAATAATTACTATTTCCATTACAAATCTAAAAAA	2000
ATGGTAGATGCTGTGTTTCGATGATATGAAAGCAATGAATTTAAAGGTCATACGGATTGGGGCTTTCACGACGGGGCTCC	2080
TCAAGAAAACCTCAGTCTTACAATCTAGTCCAGGCGTCTATGAAGAATCTGGTTTTTCATTTTTCTAGATTATGCGATTAT	2160
AAAGCAGGACAGGAAGGAATAAAGCTT	2187

Fig. 2. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the xylanase gene (*xynK*). The deduced -10 box, -35 box, and ribosome binding site (RBS) were underlined. The proposed catabolite responsive element (CRE) was boxed.

moter 구역을 Mac Molly DNA 분석 프로그램을 이용해 검색해 본 결과 Fig. 2에서와 같이 ATG 개시 codon으로부터 각각 193과 216 base 상류에 -10 box와 -35 box로 추정되는 공통염기배열의 존재를 확인하였으며 또한 -10 box로부터 7 bp 하류에 전사개시점인 A가 위치함을 알 수 있었다. TTTAAT의 염기서열을 가진 -10 box의 경우는 *B. subtilis*의 공통염기배열인 TATAAT와 5개의 염기가 일치하였고, -35 box의 TCGAAA는 공통염기배열인 TTGACA와 6개 중 4개의 염기가 일치하였다. 또한 -10 box와 -35 box 사이의 간격도 17 bp로 매우 효율적인 promoter 구조임을 알 수 있었다.

Ribosome 결합부위

유전자의 번역효율은 번역개시속도, mRNA의 안정성, codon usage, ribonuclease의 존재 여부, 에너지 공급과 산물의 독성 등 여러 요인에 의해 영향을 받는다. *B. subtilis*에서 유전자가 효율적으로 발현되기 위해서는 유전자에 적당한 ribosome 결합부위가 존재해야 한다. Ribosome 결합부위는 세가지 구성부위 즉 Shine-Dalgarno 배열, Shine-Dalgarno 배열과 개시 codon 사이의 간격, 개시 codon으로 이루어져 있다. 유전자의 효율적 발현을 위해서는 16S rRNA의 3' 말단 부위와 Shine-Dalgarno 배열 사이에 상보성이 높아야 한다. *B. subtilis*가 지니는 16S rRNA의 3' 말단 부위는 Shine-Dalgarno 배열과 염기쌍을 형성할 수 있는 3'-AUU-CCUCCA-5' 염기배열을 포함하는데 [24] 본 xylanase 유전자에는 AUG 개시 codon으로부터 4 bp 상류에 5'-AAGAT-AAGGGTGATT-3' 염기배열을 지니고 있어 16S rRNA의 3' 말단 부위와 상보적으로 결합할 수 있음을 알 수 있었다. 개시 codon은 *B. subtilis*의 대부분의 유전자에서 AUG가 가장 많이 사용되며 GUG는 *spoE* 유전자와 *spoVG* 유전자 등에서 일부 사용되고 있으며 [25] UUG는 *S. aureus*의 β -lactamase 유전자와 *Bacillus phage*인 SPO1의 middle gene 등 극히 제한적으로 사용되고 있는데 본 *xynK* 유전자의 번역 개시 codon은 AUG로 가장 일반적인 개시 codon을 사용하고 있었다.

Catabolite responsive element (CRE)

본 *xynK* 유전자의 공여균주인 *B. pumilus* TX703은 배지 중에 0.2%의 저농도 glucose가 존재할 때 xylanase의 생합성이 완전히 저해되어 본 유전자가 생합성하는 효소는 ca-

tabolite repression에 매우 민감하게 받는 것으로 보고한 바 있다[27].

Bacillus 속 균주는 포자형성, 효소전달체계나 세포외 합성 등의 세포성장과정 중에 catabolite repression을 받는 것으로 알려져 있다[15]. Catabolite repression은 glucose 등과 같이 간단히 이용되는 탄소원의 존재시 분해 관련효소 생합성이 억제되는 것을 말하는데[7,8], *E. coli*의 경우 cyclic AMP (cAMP)를 고농도로 첨가했을 때 glucose에 의한 repression이 해제되어 cAMP가 catabolite repression에 중요한 역할을 한다는 기구가 잘 알려져 있다[3,29]. 그러나 *Bacillus* 속 균주에서는 glucose에 의한 catabolite repression 작용기작이 정확하게 알려져 있지 않고 있는데 Laoide 등[19]은 *B. licheniformis amyL* 유전자의 catabolite repression은 전사과정 중에 일어나며 catabolite repression 관여 가능한 조절단백질이 전사초기위치 근처에 존재하는 cis-acting 부위에 결합하여 glucose 존재시 전사를 지연시킨다고 제시하였다. Catabolite responsive element (CRE)라 불리는 cis-acting 염기배열은 몇몇 유전자의 catabolite repression을 조절하는데, CRE에 결합하는 인자는 명백하게 밝혀지지 않았지만 catabolite control protein (CcpA)이 관여하는 것으로 알려져 있다[14,15]. Weickert [43]와 Chambliss [5]에 의해 보고된 CRE는 14 bp의 palindrome 구조로 TG(A/T)NANCGNTN (A/T)CA의 공통염기배열을 지니고 있다.

본 연구에서 분석한 *xynK* 유전자의 염기배열에서는 ATG 개시 codon으로부터 432 bp 상류에 존재하는 TGATGGCG-TCGGCA 배열이 CRE로 추정되었는데 공통염기배열과는 14개의 염기중 11개의 염기가 일치되고 있었다. 본 실험에 사용된 *B. pumilus* TX703의 xylanase 효소에 대한 catabolite repression 기작을 연구하기 위해서는 site-directed mutagenesis 등의 연구방법을 통해 cis-acting 부위를 조사하는 것이 필요하며 본 균주로부터 catabolite repression에 관여하는 trans-acting 조절단백질을 생합성하는 유전자의 분리가 요구된다.

Codon usage와 아미노산 조성

현재 수많은 생물체의 유전자 염기배열순서가 결정되었으며 이들 각각에 대한 codon usage도 결정되었는데 이로부터 생체내에서 하나의 아미노산에 대한 codon의 선택이 무작위적이지 아니라는 사실이 밝혀졌다[17]. 더욱이 이러한

비무작위적 codon의 선택성, 즉 codon usage의 편중성은 종 특이적 또는 계통적 특이성을 갖는 것으로 나타났다[11]. Codon usage의 연구가 가장 많이 되어 있는 *E. coli*와 *S. cerevisiae*에서는 발현수준이 높은 유전자에서 생체내 가장 풍부한 양으로 존재하는 tRNA에 의해 최적으로 번역되는 codon이 사용빈도가 가장 높아 codon usage의 편중성이 나타난다고 하였다. 본 xylanase 유전자의 codon usage를 Table 1에 나타내었는데 proline은 CCA를, histidine은 CAT를, tyrosine은 TAT를, aspartic acid는 GAT를, asparagine

은 AAT를 주로 사용하고 있었다. Xylanase 유전자의 발현에 있어서 amino acid의 함량은 Table 2에서 보는 바와 같이 glutamic acid가 10.02%로 가장 많았고 다음이 alanine으로 7.82%였으며 asparagine과 leucine이 6.85%를 나타내었다.

Signal sequence

세포 외로 분비되는 단백질은 N-말단에 15~30개 정도의 아미노산 잔기로 된 peptide가 달린 전구체형으로서 세포질 내의 ribosome 상에서 합성된다. 이 peptide 부분은 세포막을 통과하는 기구에 관련되어 있으며 막을 통과할 때에 특이적인 protease (signal peptidase)로 절단, 제거되어 성숙형 단백질이 된다. 제거되는 이 단백질을 signal peptide라 한다. Signal peptide는 중앙부에 소수성 아미노산 잔기로 된 넓은 소수영역을 가지며, N-말단 가까이에 염기성 아미노산 잔기가 있다. 이 반응에 관여하는 효소는 signal peptidase 이외에 세포막에 남은 signal peptide를 분해하는 peptidase가 있다.

본 xylanase 유전자의 염기배열을 기초로 작성된 hydrophathy plot을 살펴본 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 본 유전자로부터 생합성되는 단백질은 친수성 부분이 월등히 많은 경향을 나타내고 있으며 N-말단 부분에 소수성 부분이 없는 것으로 확인되었다. 이것은 Lee 등[20]이 실험한 *B. stearothermophilus*의 est I 유전자의 hydrophathy plot과 비슷한 경향을 보였다.

Taberner 등 [36]이 분리한 alkalophilic *Bacillus* strain N137의 xylanase를 coding하는 *xyaA*는 세포내 분비성 단백질에서 생산되는 전형적인 N-말단 signal peptide를 가지고 있지 않는데, 이 경우 *xyaA*의 기질특이성은 세포막을 통과

Table 1. Codon usage of xylanase from *B. pumilus* TX703

Codon	(%)	Codon	(%)
GGG-Gly	10(20%)	CCA-Pro	13(50%)
GGA-Gly	12(24%)	CCC-Pro	0(0%)
GGC-Gly	15(31%)	CCU-Pro	8(31%)
GGU-Gly	12(24%)	GUC-Cys	2(67%)
GCG-Ala	11(17%)	UGU-Cys	1(33%)
GCA-Ala	18(29%)	AUG-Met	17(100%)
GCC-Ala	14(22%)	CAC-His	9(32%)
GCU-Ala	20(32%)	CAU-His	19(68%)
AGC-Ser	5(15%)	UAC-Tyr	7(25%)
AGU-Ser	4(12%)	UAU-Tyr	21(75%)
UCG-Ser	1(3%)	GAC-Asp	8(22%)
UCA-Ser	9(26%)	GAU-Asp	29(78%)
UCC-Ser	0(0%)	GAG-Glu	17(30%)
UCU-Ser	15(44%)	GAA-Glu	39(70%)
ACG-Thr	7(27%)	AAG-Lys	12(27%)
ACA-Thr	15(58%)	AAA-Lys	33(73%)
ACC-Thr	2(8%)	AGG-Arg	7(16%)
ACU-Thr	2(8%)	AGA-Arg	18(42%)
GUG-Val	18(42%)	CGG-Arg	5(12%)
GUA-Val	7(16%)	CGA-Arg	5(12%)
GUC-Val	10(23%)	CGC-Arg	3(7%)
GUU-Val	8(19%)	CGU-Arg	5(12%)
CUG-Leu	12(27%)	AAC-Asn	9(20%)
CUA-Leu	5(11%)	AAU-Asn	35(80%)
CUC-Leu	4(9%)	CAG-Gln	11(34%)
CUU-Leu	12(27%)	CAA-Gln	21(66%)
UUG-Leu	2(5%)	UUC-Phe	12(30%)
UUA-Leu	9(20%)	UUU-Phe	31(70%)
AUA-Ile	10(30%)	UGG-Trp	23(100%)
AUC-Ile	11(33%)	UGA-TER	3(30%)
AUU-Ile	12(36%)	UAG-TER	3(30%)
CCG-Pro	5(19%)	UAA-TER	4(40%)

Table 2. Amino acid composition of xylanase from *B. pumilus* TX703

Codon	No. (%)	Codon	No. (%)	Codon	No. (%)
Gly	25(6.11%)	Ala	32(7.82%)	Ser	12(2.93%)
Thr	10(2.44%)	Val	26(6.36%)	Leu	28(6.85%)
Ile	20(4.89%)	Pro	15(3.67%)	Cys	1(0.24%)
Met	10(2.44%)	His	22(5.38%)	Tyr	13(3.18%)
Asp	22(5.38%)	Glu	41(10.02%)	Lys	27(6.60%)
Arg	25(6.11%)	Asn	28(6.85%)	Gln	16(3.91%)
Phe	22(5.38%)	Trp	14(3.42%)	TER	0(0.00%)

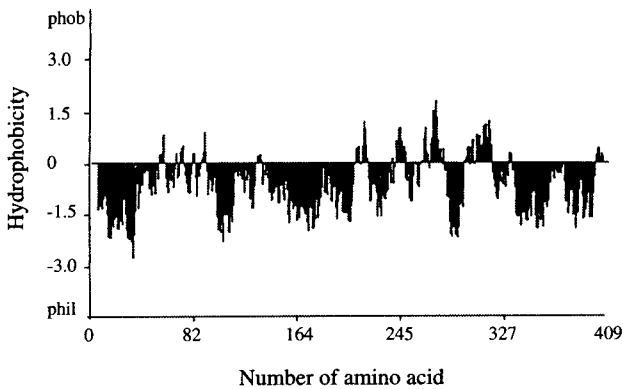


Fig. 3. Hydropathy plot of the xylanase.

하여 세포내로 들어올 수 있는 xylo-oligosaccharide에 국한된다. XyaA는 일반적인 *Bacillus*속 균주 [32]에서 설명되는 것과는 다른 분비기구를 이용한다고 여겨진다. XyaA의 분비기구는 N-말단 signal sequence가 없이 분비되는 alkaline protease [9]와 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 분비되는 lipase [12], *Erwinia chrysanthemi*로부터 분비되는 protease [22], 그리고 *E. coli*로부터 분비되는 α -hemolysin [23]과 같은 단백질의 분비기구와 유사하다. 이러한 단백질은 분비에 필수적인 C-말단 targeting signal인 GGNGNDNNN 염기배열을 지니고 있다. XyaA는 위에 설명한 분비단백질들이 지니고 있는 C-말단 targeting signal을 가지고 있지 않으나 C-말단에 α -helical 구조를 지니고 있다. 본 *xynK* 유전자의 공여균주인 *B. pumilus* TX703은 xylanase를 균체 외로 분비하지만 [27] xylanase의 C-말단에 targeting signal을 지니고 있지 않은 것으로 확인되어 본 효소가 어떤 기작에 의해 분비되는지 연구할 필요성이 있다고 사료된다.

다른 유전자들과의 유사성

현재까지 xylanase 유전자의 염기배열을 결정하여 보고된 예는 30여종이 있다. 본 xylanase 유전자의 발현산물인 단백질의 아미노산 서열이 다른 생물 유래의 xylanase 아미노산 서열과 얼마나 유사성이 있는지 알아보기 위하여 GenBank database를 검색한 후 CLUSTALW program을 이용하여 homology alignment를 작성한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 여러 xylanase 중에서 본 연구에 사용된 *B. pumilus* TX703의 xylanase와 가장 유사성이 높은 xylanase는 *Hordeum vulgare* 유래의 xylanase isozyme X-I으로 39%의 아미노산

이 동일하였다. Wakarchuk 등 [41]은 *B. circulans*가 생산하는 xylanase의 활성부위에는 Glu⁷⁸과 Glu¹⁷²가 관여한다고 보고하였고 *Clostridium thermocellum* [46], *Dictyoglomus thermophilum* [23], *Thermotoga neapolitana* [39] 등에서도 glutamic acid 부위가 xylanase의 활성부위에 존재한다고 보고된 바 있다. Fig. 4에서 비교한 xylanase 모두 *B. pumilus* TX703의 xylanase의 208번째와 322번째 위치에 glutamic acid를 지니고 있어 이 부위가 현재까지 보고된 xylanase의 활성부위와 일치함을 알 수 있었다.

요 약

Xylanase를 생산하는 내열성 *Bacillus pumilus* TX703의 chromosomal DNA로부터 xylanase 유전자를 cloning하여 그 염기배열 순서를 결정한 다음 이로부터 유전자 발현에 관련된 구조를 분석하였다. Xylanase 유전자의 cloning을 위해 제한효소 *Hind*III로 절단한 *B. pumilus* TX703의 chromosomal DNA와 pUC19을 ligation시켜 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시킨 후 형질전환체 중에서 xylanase 활성을 나타내는 재조합 plasmid pXES106을 분리하였다. 재조합 plasmid pXES106은 pUC19의 *Hind*III 부위 내에 2.24 kb의 외래 DNA가 삽입되었고, 이 plasmid DNA를 분리하여 *E. coli* DH5 α 에 재형질전환시킨 결과 vector 내에 xylanase 유전자가 cloning되었음을 확인하였다.

Cloning된 유전자의 염기배열을 분석한 결과 이 유전자의 총 크기는 2,187 bp였고 이는 409개의 아미노산을 coding하는 open reading frame 1,227 bp를 포함하고 있었다. 이 염기배열은 ATG 개시 codon으로부터 각각 193과 216 base 상류에 TTTAAT의 -10 box와 TCGAAA인 -35 box로 추정되는 염기배열이 존재하였고 -10 box로부터 7 bp 하류에 전사개시점인 A가 위치하고 있었다. 또한, 개시 codon으로부터 432 bp 상류에 공통염기배열과 14개의 염기 중 11개의 염기가 일치하는 TGATGGCGTCGGCA의 catabolite responsive element (CRE)가 존재하였다. *B. pumilus* TX703의 xylanase와 아미노산배열의 유사성이 가장 높은 xylanase는 *Hordeum vulgare*의 isozyme X-I이었고 본 xylanase는 208번째와 322번째에 glutamic acid 잔기를 가지고 있어 *Clostridium thermocellum*, *Dictyoglomus thermophilum*, *Thermotoga neapolitana* 등에서 밝혀진 바와 같이 glutamic acid 부위가 xylanase의

Bacillus pumilus TX703 유래 Xylanase 유전자(xynK)의 Cloning과 염기서열 분석

1	MDKER-SFLHHSFNR	GENGQENLMWKKEAD	DRISEHRQDLVINV	TNGEKKPIAG-----	-----IEV	EIKQIRHEFAHGSAM	72	
2	MGAFLRLTEPRSAAV	FVHGAPAGVDVKVMD	LRVYPVDHKARFKQL	KDKTKDKARKRDVILK	LGTPAGAGAGAAASV	RVVQLDNAFFPCTCI	90	
3	MGAFLRLSTEPRSAAV	YVQGAPAGVDVKVMD	LRVVFHADRKARFTQL	KDKTKDKARKRDVVLK	LGAAATGA-----ARV	RVVQLDNSFPFCTCI	85	
4	GISPLTGEALLRADV	NRSGBKVDSTDYSVLK	RYILRIITEFPGQGD	VQTPNPSVTPQTPTI	PTISG-----NAL	RDYAEARGIKIGTCV	533	
5	-----M	GNPAVCDAREPGFAD	VAVYLLSHNNQRRC	RIWPNNSIWE-----	-----VFKDD--	FDIGAAV	53	
6	-----	---MINQRFSLVLL	LILLTFSLGFLKEEA	KGMEI PSLKE-----	-----	-VYKDY--	FTIGAAV	49
7	-----	-----MKGLPALLL	LIGCVSSFGSQ----	-DVPLRVLAE-----	-----	-KLNIIHIGFAAGNMF	44	
8	-----MGSHAL	PRPALRQRI RGGCGR	GRGVLGLGATLSTPP	TAHAAESTLG-----	-----	-AAAAQSGRYFGTAI	60	
1	NDQVLFNQ--YADF	FVKHFNWAVFNEAK	WYANEPERKGIITYEK	ADAMLNFAADRHLQLPV	RGHALHWEVEDANPS	WLRSL-----PNHE	154	
2	NTSVIQKPA--FLDF	FTNHFDWAVFENELK	WYHTEVQQQLNYAD	ADALLAFCDRLGKTV	RGHCVFHWSVDGVDVQQ	WVKNL-----NKDQ	172	
3	NTTVIQNPA--FVDF	FTNHLDWAVFENELK	WYHTEAQQQLNYAD	ADALLDFCDRLGKRA	RGHCVFHWSVDGVDVQQ	WVKNL-----DRDQ	167	
4	NYPFYNNSDPTYNSI	LQREFSMVVCENEMK	FDALQPRQNVDFFSK	GDQLLAFEAERNGMQM	RGHTLIWHNQ--NPS	WLTNG--NWNRDS	617	
5	TSRTVDS----AADL	LRAQYNSITAEENEMN	PINTQPSSEGVFTFEQ	ADKIADFAAKHGKKL	RGHTLVWHNQ--TPD	WFFEAPGGGPAGKET	137	
6	SHLNIYH----YENL	LKKHFNSLTPENQMK	WEVIHPKPYVYDFGP	ADEIVDFAMKNGMKV	RGHTLVWHNQ--TPG	WVYAG-----TKDE	127	
7	WSLPDAEK---YMEV	AKREFNILTPEQNMK	WDTIHPERNRYNFEP	AEKHVEFALKNDMIV	RGHTLVWHNQ--LPG	WLTGQ----EWSKEE	125	
8	AAGRLSDST--YTSI	ASREFNMVTAENEMK	IDATEPQRGQDFDSA	GDRVYNWAVQNGKEV	RGHTLAWHSQ--QPY	WMQSL-----SGSD	140	
1	VYEAMKKRLEHAGHN	FKGRFRHVDVNNEMM	HG---SFFK-----D	RFG--KNIWKWMEET	KKIDPQALLFVNDYN	VIS--Y--GEHHAYK	231	
2	LRSAMQSRLEGLVSR	YAGRFKHYDVNNEMM	HG--RFFR-----D	RLGDEEDVPAYMFKEV	ARLDPEPVLFVNDYN	VECGNDPNATPEKYA	254	
3	LRSAVQSRIQGLVSR	YAGRFPHYDVNNEMM	HG--RFFR-----D	RLGDEEDVPAYMFKEV	ARLDPEAALFVNDYN	VECGNDPNATPEKYA	249	
4	LLAVMKNHITVTMTH	YKCKIWEVDVANEEM	DDSG-NGLRSSIWRN	VIG-QDYLDYAFRYA	READPDALLFVNDYN	IEDLGP--K-SNAVF	702	
5	LLRRMRDHIHAVAGR	YKGRTYCWDVNEAV	ADEGEQWLRSKWHWD	MVG-PEFIVRAFERYA	READPDALLFVNDYN	-EC--NP-AKRDKII	222	
6	ILARLKEHIKEVVGH	YKCKVYAWDVNEAL	SDNPNEPLRRAPWYD	ICG-EEVIEKAFIWA	HEVDPAKLFVNDYN	-LE--DP-IKREKAY	212	
7	LLNILEDHVKTVVSH	FRGRVKIWDVNEAV	SDS--GTYESIWR	TIG-PEYIEKALIWA	KEADPDALILVNDYN	IEE-IN--AKSNFVY	209	
8	LRQAMIDHINGVMNH	YKCKIAQWDVNEAF	EDGN-SGARSDNLQ	RTG-NDWIEVAFRTA	RAADPSAKLCVNDYN	IEN--WTWAKTQAVY	226	
1	AHINELRQLGAPIEA	IGVQGH-F--EERVD	PVIVKERLDVLAELG	LPIWVTEMLSVHDPD	NRRADNLEALYRVAF	SHPA---VKGVLMW	314	
2	EQVAWLQSCGAVVRG	IGLQGH---VQNPV	GEVICAALDRIAKTG	VPIWFTEMLMPEYDV	GLRAKDLEVLVREAY	AHPA---VEGIVFW	336	
3	DQVAWLQSCGAVVRG	IGLQGH---ISNPV	GEVICGALDRIAATG	VPVWFTEMLVCEADV	GLRAQDLEVLVREAY	AHPA---VEGIVFW	331	
4	NMIKSMKERGVPIDG	VGFQGHFINGMSPEY	LASIDQNIKRYAEIG	VIVSFTTEMLIRIP--	-----QSENPTAF	QVQANNY-KELMKIC	783	
5	RLVKWLKECGAPIHG	IGMQGHYN--LASPS	IAEVREAIEKYAELG	LVIHVTEMLMSVYAW	DDRRTDLLEPTAEMV	ERQAELY-EQLFSLY	309	
6	KLVKKLDKGVPIHG	IGIQGHWT--LAWPT	PKMLEDSIKRHAELG	VEVQVTEMLISIIYD	RNENNNFKVPPEDRL	ERQAELY-KEAFEL	299	
7	NMIKNLREKGVPIDG	IGFQGHID--YRGIN	YESFKKNLERHAELG	LQIYITEML-----	--RGFPLGGSVGYLL	KKQAEVY--RRIPEIC	288	
8	NMVRDFKQGVPIIDC	VGFQGHFN--SGSPY	DSNFRTLQSHALG	VDVAITEMLIQGASP	TTYANVVNDCLAVSR	CLGITVWGVDRDTSW	314	
1	GFWAGAHWRG-----	-EHAIVNYDWSLN-	-----	-----	-----EAGRREYKLL	NEWTQRVEKTDANG	362	
2	GFMQGTMWV-----	-QNAWLVADAGTVN-	-----	-----	-----EAGQMFLNLQ	KEWKT DARGNFDGDG	383	
3	GIMQGMWV-----	-KDAWLVADAGTVN-	-----	-----	-----EAGQMLMNLH	KEWKT DARGNVDNA-	377	
4	--LANPNCNT-----	-FVMWGFDTKYTWLP	-----	-----	-----GTFPGYG---	--NPLIYDSNYNPKP	825	
5	REYRDVIRS-----	-VTFWGAADYAWL-	-----	-----	-----SYFPVRG--R	RNWPLLFDAQHRPKE	354	
6	RKYKGIVTG-----	-VTFWGVADYTWL-	-----	-----	-----YFWPVRG--R	EDYPLLFDKNHNPKK	344	
7	--LDNPAVRA-----	-IQFWGFDTKYSWVP	-----	-----	-----GFFKGYG---	--KALIFDENYNPKP	330	
8	RSGDTPLLFNGDGSK	KPAYSAVLDALNGGS	SGEPPEDGSSQIKN	AASGRCLDVSGAGTA	DGTAVQLYDCHGGTN	QQWYTYTDAGEFRVYG	404	
1	HVKCPAFHGTYEIRI	GKENKMLKQQTIELD	SNEQTPFQLDVILPQ	EG-----	-----	409		
2	NFKFRGPFYGRVYVEV	TTAKGQMLKFTTVE	KGDNTPVVVDLADA-	-----	-----	427		
3	-----	-----	-----	-----	-----	377		
4	--AYNAI KEALMGY-	-----	-----	-----	-----	837		
5	--AFRRVVRTAGAEA	-----	-----	-----	-----	367		
6	--AFWEIVKF-----	-----	-----	-----	-----	352		
7	--CYFAIRELMEEKL	KER-----	-----	-----	-----	346		
8	NKCLDAGGTGNGARV	QIYSCWGGDNQKWRV	NSDGTIVGVQSGLCL	DAAGTGNSTPVQLYT	CSYADNQRWTVS	476		

Fig. 4. Alignment of xylanase amino acid sequences from *B. pumilus* TX703 and other sources.

1, *B. pumilus* TX703; 2, *Hordeum vulgare* isozyme X-I; 3, *Hordeum vulgare* isozyme X-II; 4, *Clostridium thermocellum*; 5, *Dictyoglomus thermophilum*; 6, *Thermotoga neapolitana*; 7, *Streptomyces thermoviolaceus*; 8, *Bacillus* sp. D3.

활성부위라 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 경원대학교 학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고 문헌

- Bernier, R. Jr., H. Driguez and M. Desrochers. 1983. Molecular cloning of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in *Escherichia coli*. *Gene* **26**, 59-65.
- Blanco A., T. Vidal, J. F. Colom and F. I. Pastor. 1995. Protein purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4468-4470.
- Botsford, J. L. 1981. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **45**, 620-642.
- Brillouet, J. M. and J. P. Joseleau. 1987. Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp (beeswing bran of wheat kernel). *Carbohydr. Res.* **159**, 109-126.
- Chambliss, G. H. 1993. *Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. pp. 213-219, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Das, N. N., S. C. Das, A. K. Sarkar and A. K. Mukherjee. 1984. Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*). *Carbohydr. Res.* **129**, 197-207.
- Deutscher, J., E. Kster, U. Bergstedt, V. Charrier and W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**, 1049-1053.
- Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 78-85.
- Duong, F., C. Soscia, A. Lazdunski and M. Murgier. 1994. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system. *Mol. Microbiol.* **11**, 1117-1126.
- Gat, O., A. Lapidot, T. I. Alchana, C. Regueros and Y. Shoham. 1994. Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1889-1896.
- Grantham R., C. Gautier, M. Gouy, M. Jacobzone and R. Mercier. 1981. Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. *Nucleic Acids Res.* **9**, r43-74.
- Guzzo, J., J. M. Pages, F. Duong, A. Lazdunski and M. Murgier. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* **173**, 5290-5297.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Henkin, T. M., F. J. Grundy, W. L. Nicholson and G. H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**, 575-584.
- Hoch, J. A., K. Trach, F. Kawamura and H. Saito. 1985. Identification of the transcriptional suppressor *sof-1* as an alteration in the *spo0A* protein. *J. Bacteriol.* **161**, 552-555.
- Hueck, C. J. and H. Wolfgang. 1995. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol. Microbiol.* **15**, 395-401.
- Ikemura, T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.* **2**, 13-34.
- Kulkarni, N., A. Shendye, M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 411-456.
- Laoide B. M. and D. J. J. McConnell. 1989. *Cis* sequences involved in modulating expression of *Bacillus licheniformis amyL* in *Bacillus subtilis*: Effect of sporulation mutations and catabolite repression resistance mutations on expression. *J. Bacteriol.* **171**, 2443-2450.
- Lee, J. S. and Y. J. Choi. 1997. Nucleotide sequence of the *estI* gene coding for *Bacillus stearothermophilus* acetylxylan esterase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 23-29.
- Letoffe, S., P. Delepelaire and C. Wandersman. 1990. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *EMBO J.* **9**, 1375-1382.
- Mackman, N., J. M. Nicaud, L. Gray and I. B. Holland. 1985. Genetical and functional organisation of the *Escherichia coli* haemolysin determinant 2001. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 282-288.

23. McCarthy, A. A., D. D. Morris, P. L. Bergquist and E. N. Baker. 2000. Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **11**, 1367-1375.
24. McLaughlin, J. R., C. L. Murray and J. C. Rabinowitz. 1981. Unique features in the ribosome binding site sequence of the gram-positive *Staphylococcus aureus* beta-lactamase gene. *J. Biol. Chem.* **256**, 11283-11291.
25. Moran C. P. Jr, N. Lang, S. F. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A. L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 339-346.
26. Nanmori T., T. Watanabe, R. Shinke, A. Kohno and Y. Kawamura. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol.* **172**, 6669-6672.
27. Park, Y. S., M. Y. Kang, H. G. Chang, G. G. Park, J. B. Kang, J. K. Lee and T. K. Oh. 1999. Isolation of xylanase-producing thermo-tolerant *Bacillus* sp. and its enzyme production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 370-377.
28. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques-An Introduction*. pp. 91-101, Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts.
29. Saier, M. H. Jr. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *The New Biologist* **3**, 1137-1147.
30. Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular cloning - A laboratory manual*. 3rd eds., CSHL Press. Cold Spring Harbor, New York.
31. Scalbert, A., B. Monities, J. Y. Lallemand, E. Guittet and C. Rolando. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* **24**, 1359-1362.
32. Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli and D. Kluepfel. 1991. Sequences of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene* **107**, 75-82.
33. Shorestein, R. G. and R. Losick. 1973. Comparative size and properties of the sigma subunits of ribonucleic acid polymerase from *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **248**, 6170-6173.
34. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
35. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 39-67.
36. Taberero, C., J. Sanchez-Torres, P. Perez and R. I. Santamaria. 1995. Cloning and DNA sequencing of xyaA, a gene encoding an endo-beta-1,4-xylanase from an alkalophilic *Bacillus* strain (N137). *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2420-2424.
37. Timell, T. E. 1965. Wood hemicelluloses: Part II. *Carbohydr. Chem.* **20**, 409-483.
38. Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70.
39. Velikodvorskaya, T. V., I. Y. Volkov, V. T. Vasilevko, V. V. Zverlov and E. S. Piruzian. 1997. Purification and some properties of *Thermotoga neapolitana* thermostable xylanase B expressed in *E. coli* cells. *Biochemistry* **62**, 66-70.
40. Vieira J. and J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene.* **19**, 259-268.
41. Wakarchuk, W. W., R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi and M. Yaguchi. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**, 467-475.
42. Warren, R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 183-212.
43. Weickert M. J. and G. H. Chambliss. 1990. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6238-6242.
44. Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, In: *Hemicelolose and Hemicellulases* (Coughlen, P. P. and G. P. Hazlewood, eds), pp. 127-143, Portland Press, London.
45. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganism: Functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317.
46. Xie, H., H. J. Gilbert, S. J. Charnock, G. J. Davies, M. P. Williamson, P. J. Simpson, S. Raghobhama, C. M. Fontes, F. M. Dias, L. M. Ferreira and D. N. Bolam. 2001. *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry* **40**, 9167-9176.

(Received February 7, 2002; Accepted April 4, 2002)