

*Escherichia coli*에서의 *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 acetyl xylan esterase 발현 양상

이인숙 · 윤석원 · 정상운¹ · 오충훈¹ · 김재현^{1*}

단국대학교 미생물학전공, ¹단국대학교 의학레이저연구센터

Streptomyces coelicolor A3(2)의 acetyl xylan esterase 유전자를 *Escherichia coli*에 클로닝하여 그 발현양상을 조사하였다. 이를 위하여 유전자 전체 DNA를 PCR증폭을 통하여 제조하였다. PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 1,008개의 nucleotide로 구성된 하나의 open reading frame이 존재함을 확인하였고, 이것은 335개의 아미노산으로 이루어진 약 38 kDa의 단백질을 생성할 것으로 예측할 수 있었다. 이 유전자의 염기서열은 *Streptomyces lividans*의 acetyl xylan esterase와 98%의 상동성을 가졌다. 그런데 *Escherichia coli* (pLacI)에서 IPTG 유도에 의해 두 가지의 acetyl xylan esterase가 발현되었으며 각각의 분자량은 38 kDa과 34 kDa이었다. 이 중에서 38 kDa의 단백질은 N-말단의 signal peptide를 포함한 전체 단백질이고, 34 kDa의 단백질은 41번과 42번의 두 알라닌 잔기사이의 펩티드 결합이 끊어져 생산된 것으로 추정되었다.

Key words □ acetyl xylan esterase, cloning, gene, PCR amplification, signal peptide, *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Xylan은 5탄당인 D-xylose로 구성된 중합체로써 떡갈나무나 일년생 농작물에서 주로 많이 발견된다(6, 11, 30). 구조적으로는 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등의 측쇄를 가지고 있는 복잡한 구조의 중합체로서 hard wood와 soft wood에 각각 20~25%, 7~12%가 함유되어 있다(22). 또한 식물 세포벽의 격자구조를 이루는 hemicellulose의 구성성분 중에서도 xylan 및 xylan 유도체가 존재하며 그 함량 비율이 활엽수에서는 80~90%, 벗짚에서는 35%, 보릿짚에 31%, 옥수수 껍질에 15%인 것으로 알려져 있다. 이들을 농산 및 임산 자원으로써 활용하기 위하여 xylan의 분리기술과 함께 xylan으로부터 xylitol 및 xylose로의 전환과정이 중요하게 연구되어왔다. Xylan의 완벽한 분해를 위해서는 endoxylanase, β -xylosidase (18), acetyl xylan esterase (24) 등의 효소가 필요하다고 보고되어 있다. 이 중에서 acetyl xylan esterase (AxeA, EC 3.1.1.6)는 *Pseudomonas fluorescens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptomyces* spp., *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Caldocellum saccharolyticum*, *Thermomonospora fusca*, *Fibrobacter succinogenes*를 포함한 일부 세균에서 발견되었으며(2, 22), *Schizophyllum commune*와 같은 섬유소 분해 곰팡이에도 존재한다는 것이 밝혀졌다(8).

Streptomycetes에 있어서 acetyl xylan esterase 유전자(axeA)의 구조는 *S. lividans*와 *S. thermoviolaceus*에서 연구되었다(24, 27). 두 경우에 모두 AxeA의 N-말단 쪽에 촉매부위가 존재하며, 탈아세틸 반응에 관련된 다른 단백질들과의 유사성이 알려져 있다. 한편 C-말단 쪽에는 xylan 결합부위가 존재하며, 이 부분은 *S.*

*lividans*의 xylanase B와 매우 높은 유사도를 보이며 넓게는 cellulose 결합 영역(CBD family II)에 속한다고 한다(27). *S. lividans*의 AxeA는 정제되어 그 효소학적 특성이 보고되었으나(8), *S. thermoviolaceus*에서는 현재까지 정제되지 않고 있다.

본 실험실의 연구에서 *S. coelicolor* A3(2)에서의 esterase 발현은 과산화수소 저항성 인자와 관련되어 있음이 확인되었고, 이는 esterase가 기존에 알려진 고유 기능 이외에 산화적 스트레스에 대한 방어적 기능으로서의 새로운 기능을 가지고 있음을 시사한다고 사료된다(28). 따라서 이번 실험에서는, 방선균의 acetyl xylan esterase와 산화적 스트레스에 관한 관련성을 연구하는 첫 단계로 *S. coelicolor* A3(2)의 acetyl xylan esterase 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시켰고 그 발현 양상을 관찰하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

실험에서 사용된 균주는 -20°C 에서 포자상태로 보관되고 있던 *S. coelicolor* A3(2)이었다. 포자용액을 yeast extract-malt extract (YEME) 평판배지에 접종하고 30°C 에서 일주일 배양하여 포자가 충분히 생산되도록 하였다. 신선하게 형성된 포자를 백금으로 끊어 모아 증류수에 풀어서 접종액으로 사용하였다. YEME 평판배지는 yeast extract 3g, malt extract 5g, 환천 1.7%를 D.W. 1L에 녹인 후 고압증기멸균하고 2ml의 2.5 M의 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 20 ml의 50% glucose를 첨가하여 제조하였다.

S. coelicolor A3(2)의 genomic DNA 분리에 사용된 균체를 얻기 위하여 환천이 생략되고 34% sucrose를 첨가한 YEME 배양액에 새로 생산된 포자를 충분히 접종하였다. 30°C 에서 2일간

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 041-550-3452, Fax: 041-551-9229
E-mail: jaehkim1@dankook.ac.kr

Table 1. Composition of PCR solution

Composition of PCR	Volume (μ l)
10 \times reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH8.3, 50 mM KCL)	2
25 mM MgCl ₂	1.2
1.25 mM dNTP mix	3.2
RNase	0.1
DMSO	0.4
Taq. polymerase	0.1
Forward primer(100 mM)	1
Reverse primer(100 mM)	1
Deionized water	9
Template DNA(25 ng/ μ l)	2
Total	20

배양한 후, 원심분리기(13,000 \times g)를 사용하여 균체를 수확하였다. 클로닝과 발현에 사용된 *E. coli*는 NovaBlue™ competent cells과 Tuner™ (DE3)pLacI competent cells (Novagen, USA)을 구입하여 사용하였다. *E. coli*는 항생제(carbenicillin 50 μ g/ml과 tetracycline 15 μ g/ml 혹은 carbenicillin 50 μ g/ml과 chloramphenicol 34 μ g/ml)가 첨가된 LB broth에서 배양하였다.

PCR을 이용한 *axeA* 획득

NCBI GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)로부터, *S. lividans*의 *axeA*와 이와 상응하는 *S. coelicolor* A3(2)의 open reading frame (*S. coelicolor* cosmid C-75A)에 대한 정보를 얻었다. 이를 근거로 *S. coelicolor* A3(2)로부터 *axeA* 전체를 하나의 PCR 산물로 얻고 동시에 발현시키기 위하여 start codon과 stop codon 이 PCR 산물의 양 말단에 위치하도록 PCR primer를 제작하였다.

axeAUP : 5'-ATG CGT ACC AGT ACC GGA CC-3'

axeADOWN : 5'-TCA GCC CGC AGT ACA GGA CAC-3'

Genomic DNA는 Genetic Manipulation of *Streptomyces*의 procedure 4에 따라서 추출되었다(10). 이때 spermidine-HCl 침전 과정은 생략하였다.

PCR 조성은 Table 1과 같게 만들어 사용하였고, 95°C에서 5분 동안 DNA를 변성시킨 후, 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 과정을 35회 반복하고(13), 마지막으로 72°C에서 15분 동안 반응시키고, 반응물은 4°C에 보관하였다.

axeA 클로닝 및 확인

위에서 얻어진 PCR 산물은 pETBlue-1 AccepTor Vector (Novagen, USA)에 ligation 시키고 *E. coli* NovaBlue™에 형질 전환 시켰다. 이때 적용된 방법은 제조 회사가 지시한 방법에 따랐다. 형질전환 균체는 carbenicillin (Sigma, USA) 50 μ g/ml, tetracycline (Sigma, USA) 15 μ g/ml과 X-Gal (Promega, USA) 70 μ g/ml, IPTG (Promega, USA) 80 μ M이 첨가된 LB agar plate에 도말 한 후, 37°C에서 15~18시간 배양하였고 흰색의 콜로니

를 재조합 plasmid를 가지고 있는 균주로 선별하였다.

형질전환된 흰색 콜로니를 항생제(carbenicillin 50 μ g/ml, tetracycline 15 μ g/ml)가 첨가된 LB broth에 넣고, 37°C에서 12~16시간 진탕배양(150 rpm)하였다. 배양액을 13,000 \times g에서 1분간 원심분리하여 균체를 회수하고 alkaline 용해와 sodium acetate 침전을 통하여 재조합 plasmid를 추출하였다(20). 이 재조합 plasmid에 *axeA*가 삽입되었는지를 알아보기 위해 *EcoR* I (Promega, USA)으로 절단하였다. 제한효소의 반응은 제조회사의 지시에 따라 수행하였으며 agarose gel에 전기영동하여 그 결과를 관찰하였다.

Nested PCR를 통하여 *axeA*를 확인하기 위하여, *axeA*의 start codon쪽의 약 300 base pair를 증폭할 수 있는 primer를 제작하였다.

axeAUP' : 5'-GGN GCN TN GCN GGN GGN AC-3'

axeADOWN' : 5'-TATTGCN GG GTN GG GG-3'

PCR 조건 및 thermal cycler는 앞에 서술한 방법으로 시행하였다.

axeA 삽입방향 분석

재조합 plasmid에서 T7 promoter와 *axeA*의 판독 방향이 일치하여 유전자 발현이 가능한지, 또는 반대 방향으로 들어간 것인지 확인하기 위하여 *axeAUP* primer와 *axeADOWN* primer, pETBlueUP primer 그리고 pETBlueDOWN primer (Novagen, USA)를 이용하여 PCR을 수행하였다. *axeAUP*과 *axeADOWN* primer는 위에서 사용한 primer를 사용하였고, pETBlueUP과 pETBlueDOWN primer는 pETBlue-1 AccepTor Vector에 포함된 부분을 새로 제조하여 사용하였고, 그 염기서열은 다음과 같다.

pETBlueUP : 5'-TCA CGA CGT TGT AAA ACG AC-3'

pETBlueDOWN : 5'-GTT AAA TTG CTA ACG CAG TCA-3'

삽입방향을 결정하기 위하여 pETBlueUP와 pETBlueDOWN primer, *axeAUP*와 pETBlueDOWN primer, *axeADOWN*와 pETBlueDOWN primer, *axeAUP*와 pETBlueUP primer, *axeADOWN*와 pETBlueUP primer, 그리고 *axeAUP*와 *axeADOWN* primer를 PCR을 위한 primer set으로 설정하여 PCR을 시행하였다. PCR 조건 및 thermal cycler는 위와 동일한 방법으로 시행하였다.

유전자의 발현

*axeA*가 삽입된 재조합 pETBlue-1 AccepTor plasmid를 Tuner™ (DE3)pLacI *E. coli* (Novagen, USA)에 형질전환하였다. 균주들은 LB broth에서 배양하고 IPTG (0.24~1 mM)로 단백질 합성을 유도하였다. 합성된 단백질은 균체 추출액을 Laemmli의 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 확인하였다(14). 우선 얻어진 균체를 초음파(Sonics, USA)로 파쇄하여 세포 추출액을 준비한 후, 준비된 시료에 2 \times sample buffer (100 mM DTT, 2% SDS, 80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.006% BPB, 15% glycerol)을 혼합하여 95°C에서 5분간 처리하였다. SDS-PAGE는 4% stacking gel과 12% separating gel에서 수행되었다. 90 volt에서 30분, 120 volt에서 60분 동안 전게시켰다. 또한 표준단백질

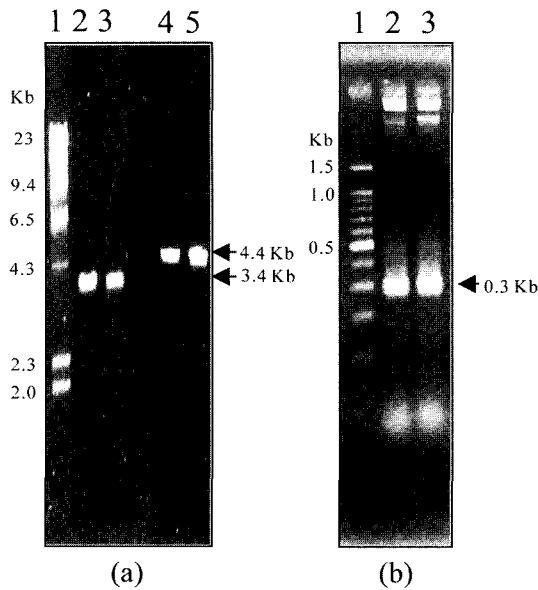


Fig. 1. The purified genomic DNA from *S. coelicolor* A3(2) and the PCR product of *axeA* gene. (a) Genomic DNA from *S. coelicolor* A3(2). Lane 1, λ /Hind III marker; Lane 2, Genomic DNA, (b) PCR product of *axeA* gene from *S. coelicolor* A3(2). Lane 1, 100 bp DNA ladder marker; Lane 2, Eluted PCR product.

marker로는 prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

***S. coelicolor* A3(2)의 *axeA* 클로닝**

34% sucrose가 함유된 YEME배지에서 2일간 배양된 *S. coelicolor* A3(2)에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 0.8% agarose gel에서 확인한 결과 비교적 깨끗한 genomic DNA를 확인할 수 있었다(Fig. 1a). 이렇게 준비된 genomic DNA를 주형으로 하여 *axeA*에 대한 PCR을 수행하였고, 그 결과 약 1 kb의 PCR band를 확인할 수 있었다(Fig. 1b).

PCR로 증폭된 *axeA*는 pETBlue AccepTor Vector와 연결하고 *E. coli*에 형질전환시킨 결과 12개의 흰색 colony를 얻을 수 있었다. 이렇게 얻어진 흰색 colony들이 *axeA*를 가지고 있는지를 확인하였다. 우선 흰색 colony로부터 plasmid를 분리하였고, 제한 효소의 처리를 통하여 plasmid의 크기를 비교하였다. pETBlue-1 AccepTor Vector에는 하나의 *EcoR* I에 대한 절단 부위를 가지고 있어서 *EcoR* I을 이용하여 절단할 경우, PCR 산물이 삽입되어져 있지 않을 경우에는 약 3.4 kb의 크기를 나타내지만 PCR 산물이 삽입되어질 경우에는 약 4.4 kb의 크기를 나타낸다. 본 실험의 결과에서도 plasmid 자체의 크기는 3.4 kb임을 확인하였고 (Fig. 2a, lanes 2, 3), 흰색 colony로부터 분리된 plasmid의 크기는 약 4.4 kb임을 관찰할 수 있었다(Fig. 2a, lanes 4, 5). 또한 *axeA* 내부의 약 300 bp를 증폭할 수 있는 nested PCR을 시행한 결과에서도 흰색 콜로니로부터 분리된 plasmid를 주형으로 사용하

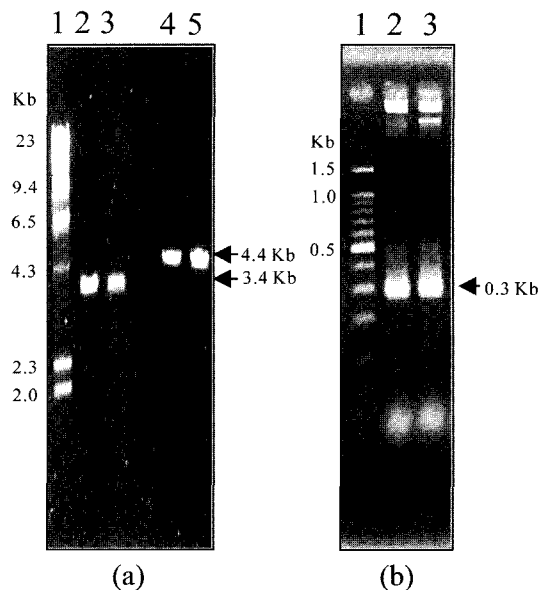


Fig. 2. The insert check by restriction enzyme digestion and nested PCR. (a) *EcoR* I digestion of pETBlue with and without *axeA* insert. Lane 1, λ /Hind III marker; Lanes 2 and 3, pETBlue; Lanes 4 and 5, Recombinant pETBlue containing PCR product of *axeA* gene. (b) Nested PCR reaction of the purified recombinant plasmids using *axeA*UP primer and *axeA*DOWN primer. Lane 1, 100 bp DNA ladder marker; Lanes 2, 3, Recombinant pETBlue containing PCR product of *axeA* gene.

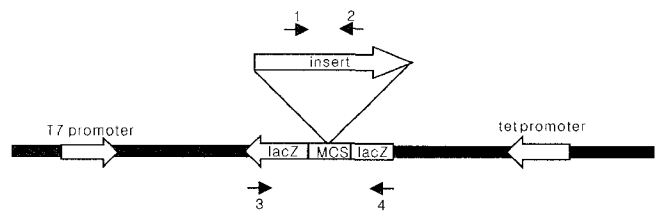


Fig. 3. The PCR primers applied to confirm orientation of insert. 1, *axeA*UP primer; 2, *axeA*DOWN primer; 3, pETBlueUP primer; 4, pETBlueDOWN primer.

여 PCR을 수행한 경우에만 예상대로 약 300 bp의 PCR 산물이 생성됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2b). 이상의 결과들을 종합해 볼 때, 형질전환을 통하여 얻어진 12개의 흰색 colony들은 *axeA*가 삽입된 재조합 plasmid를 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

그러나 PCR 산물의 cloning에 있어서는 그 방향성의 확인이 중요시되므로, 본 실험에서도 흰색 colony로부터 얻어진 재조합 plasmid에 대해서 *axeA*가 삽입된 방향을 조사하였다. T7 promoter와 *axeA*의 판독방향이 서로 동일한지, 혹은 반대 방향인지를 확인하기 위하여 4종류의 primer (pETBlueUP, pETBlueDOWN, *axeA*UP, *axeA*DOWN)를 적절히 조합하여 다양한 primer set를 설정하고 PCR을 시행하였다(Fig. 3). Table 2에서 보는 바와 같이 pETBlueUP primer와 pETBlueDOWN

Table 2. Amplification of *axeA* using different sets of primers

Primers		#4	#8
pERBlueUP	pERBlueDOWN	+	+
<i>axeA</i> UP	pERBlueDOWN	+	-
<i>axeA</i> DOWN	pERBlueDOWN	-	+
<i>axeA</i> UP	pERBlueUP	-	+
<i>axeA</i> DOWN	pERBlueUP	+	-
<i>axeA</i> UP	<i>axeA</i> DOWN	+	-

primer, 그리고 *axeA*UP primer와 *axeA*DOWN primer를 이용한 PCR 결과를 기준으로 상호 비교하여 *axeA*가 정방향으로 삽입된 colony를 구분할 수 있었다. 이 균주와 재조합 plasmid를 각각 재조합균주#4와 pAXEA#4로 명명하였다. 또한 반대 방향으로 삽입된 균주와 재조합 plasmid는 각각 재조합균주 #8과 pAXEA#8로 명명하였다(Table 2). 12개의 형질전환체 중 7개는 *axeA*가 T7 promoter의 조절을 받도록 삽입되었고 반대 방향으로 삽입된 균주는 5개로 판명되었다.

삽입된 DNA의 염기서열을 분석한 결과 *axeA*는 총 1,008 bp의 뉴클레오티드로 구성되어있고 *S. coelicolor* A3(2) cosmid C-75A와 100% 일치하며 *S. lividans*의 *axeA*와 98% 상동성을 갖는 것으로 밝혀졌다(자료 미제시).

클로닝된 유전자의 발현

*axeA*가 *E. coli* 내에서 발현되는지의 여부를 확인하기 위하여 pAXEA#4와 pAXEA#8을 단백질 발현용 균주인 Tuner™(DE3) pLacI *E. coli* 세포로 형질전환하고 IPTG를 첨가하여 발현양상을 관찰하였다. 그 결과 예상대로 pAXEA#4를 보유하는 균주(#4-1)에서는 새로운 단백질을 발현하는 것으로 관찰되었다. 그러나 pAXEA#8을 보유하는 균주(#8-1)에서는 50 μM와 100 μM의 IPTG를 첨가하여도 새로이 발현되는 단백질 띠를 확인할 수 없었다(Fig. 4).

그런데 균주#4-1에서 발현되는 단백질의 크기는 각각 34 kDa 과 38 kDa의 두 가지이며 이들의 생산은 숙주 *E. coli*의 성장단계와 IPTG 첨가 후의 시간 경과에 따라서 서로 다른 것으로 관찰되었다. OD₆₀₀=0.2 정도의 lag 성장기에 IPTG가 첨가되면 38 kDa만이 생산되지만(자료 미제시), OD₆₀₀=0.5 정도의 log 성장기에는 IPTG 첨가에 의하여 우선 34 kDa이 주로 생산되다가 시간이 경과되면서 38 kDa이 같이 생산되었다. 즉 34 kDa의 단백질은 IPTG를 첨가하고 2시간 후에 수확한 균체에서 이미 발현되어져 있는 것으로 확인되었고(Fig. 4, lane 3), 38 kDa의 단백질은 3시간 후에 수확한 균체에는 적은 양 생산되었으나(Fig. 4, lane 4), 4시간 후에 수확한 경우에는(Fig. 4, lane 5) 38 kDa과 34 kDa의 단백질이 모두 과량 생산되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

***E. coli*에서 발현된 AxeA**

본 실험의 pAXEA#4에서 발현될 수 있는 전체 AxeA의 크기

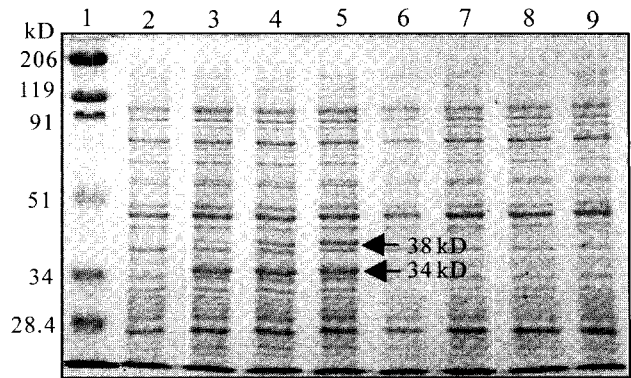


Fig. 4. Production of AxeA at exponential growth phase in the two different transformants. Lane 1, SDS-PAGE standards broad range markers; Lane 2, #4-1, at 0 h; Lane 3, #4-1, at 2 h; Lane 4, #4-1, at 3 h; Lane 5, #4-1, at 4 h; Lane 6, #8-1, at 0 h; Lane 7, #8-1, at 2 h; Lane 8, #8-1, at 3 h; Lane 9, #8-1, at 4 h.

The transformant #4-1 harbors the pAXEA#4 in which *axeA* is inserted in the right direction to be controlled by the T7 promoter, while the transformant #8-1 harbors the pAXEA#8 in which *axeA* is inserted in the opposite direction. AxeA production was examined at different times (0–4 h) after IPTG induction for each transformant during logarithmic growth phase (OD₆₀₀=0.5).

를 아미노산 잔기의 합으로 계산한 값은 38.3 kDa (1,008 bp, 334 아미노산)으로 SDS-PAGE에서 관찰된 단백질의 크기와 거의 일치한다. 따라서 38 kDa의 단백질은 AxeA 단백질인 것으로 추정할 수 있었다(Fig. 4, lane 5). 또한 34 kDa은 *S. lividans*의 배양액에 존재하는 완성된 세포의 acetyl xylan esterase의 분자량과 일치한다(8). 앞에서 서술한 바와 같이 이 실험에서 클로닝된 유전자는 *S. lividans*의 acetyl xylan esterase 유전자와 거의 일치한다. 따라서 관찰된 34 kDa 역시 AxeA 단백질일 것이다. 이러한 결과가 나타날 수 있는 것은 *E. coli*의 signal peptidase가 합성된 전구체 AxeA의 signal peptide를 인식하여 제거하기 때문인 것으로 생각하였다. Signal peptidase가 lag 성장기에는 생산되지 않았기 때문에 이 시기에는 38 kDa의 전구체 AxeA만이 생산되었고, 이후의 log 성장기에는 signal peptidase가 생산되기 때문에 34 kDa의 완성된 AxeA이 생산된 것으로 생각된다. 또한 signal peptidase 활성이 과량 발현된 전구체 AxeA를 완전히 처리하기에는 부족하거나 생성된 유리 signal peptide의 축적에 의하여 feedback 작용이 억제되어 38 kDa이 동시에 존재하는 것으로 추측되고 있다.

세균에서 단백질을 방출하는 방법에는 3가지 기작(Sec-dependent pathway, signal recognition particle-dependent pathway, twin-arginine-dependent pathway)이 알려져 있으며(21), 분비단백질들은 세포막을 통하여 외부로 분비될 단백질임을 표지하는 signal sequence 혹은 signal peptide를 가지게 된다(7, 19). 이 signal peptide는 분비단백질이 세포막을 관통하여 분비될 때 signal peptidase에 의해 제거되며(3, 5), 이것은 세포막으로부터 mature protein이 방출되는데 필요하다고 알려져 있다(4).

이중에서 주된 경로는 Sec-dependent pathway로써 이는 type I

CLUSTAL X (1.62b) multiple sequence alignment

Signal Peptide	Matured AxeA
MRTSTGPRAS SRTLRLTLAGS UAVTALAAG TAAAGAAPAQ	AAACNGYUGL TFDDEPSCST
.....102030405060	
QSLLNALRQN GLRATHFNQG QYAAQNPSLU RAQUDAGHW ANHSYTHPHM TQLGQAQNS	
.....708090100110120	
EISRTQQAIA GAGRDAKLF RPPYGETNAT LRSVEAKYGL TEVIINDUSQ DWNNASTDAI	
.....130140150160170180	
UQAUSRLGNG QVILMHDWPA NTLAAIPRIA QTLAGKGLCS GMISPTGERA UAPDGS6GGG	
.....190200210220230240	
DGGGGGGGAC TATLSAGQRH GDRYLNLSUV SGASDWIVTM NVPSPAKVLS TUNUNASYPS	
.....250260270280290300	
AQTLTANSNG SGGNIGATIQ ANGNWITPSV SCTAG	
.....310320330	

Fig. 5. Deduced amino acid sequence of the AxeA protein of *S. coelicolor* A3(2).

signal peptidase와 밀접한 관련이 있다. Type I signal peptidase는 세포막에 결합된 형태의 endopeptidase인데 Sec system의 translocase와 함께 위치한다. 이러한 type I signal peptidase는 serine protease로써 원핵세포의 P (prokaryotes)-type과 진핵세포의 endoplasmic reticulum (ER)-type으로 나뉘어 진다(25). P-type의 signal peptidase 활성화에는 serine과 lysine 잔기가 필수적인 반면 ER-type의 signal peptidase 활성화에는 serine과 histidine 잔기가 필수적이라고 알려져 있으며(26, 29), 활성부위의 아미노산 서열사이에서도 유사성을 나타내고 있는 것으로 알려져 있다(16). 그러므로 본 실험에서 발현된 AxeA 단백질이 각각 34 kDa과 38 kDa의 두개의 protein으로 확인된 것은 바로 이 보존된 type I signal peptidase의 작용을 받은것 이라고 할 수 있다.

이러한 추정은 전구체 AxeA의 signal peptide 서열에서도 확인할 수가 있었다. 그람음성세균의 signal peptide의 평균적인 길이는 25.1개이고(9) 그람양성세균의 경우는 32.0개로 보고되어 있다(12). 이러한 signal peptide들은 주로 N-말단과 C-말단에 편중되어 있고(15), signal peptidase에 의해 인식되어 잘라지는 부분의 아미노산 서열을 통계학적으로 분석한 결과, (Ala-X-Ala)라고 하는 법칙이 존재함이 확인되었다(16). 이는 signal peptidase에 의해 잘라지는 부분의 -1과 -3 부분에 위치하는 아미노산이 alanine이라는 것을 의미한다. 비록 본 실험에서 *S. coelicolor* A3(2)의 AxeA를 정제하지는 않았지만, 클로닝된 *axeA*의 염기서열로부터 아미노산 서열을 예측해본 결과 N-말단의 아미노산 서열이 *S. lividans*의 AxeA와 모두 동일함을 확인할 수 있었다(23).

따라서 본 실험에서 생산된 *S. coelicolor* A3(2)의 AxeA 전구체 역시 N-말단 부분에 41개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide를 가지고 있으며, -1과 -3 아미노산의 서열이 alanine인 것으로 미루어 *E. coli*에 존재하는 type I signal peptidase가 발현된 AxeA를 절단할 수 있으며 그 부위는 alanine 41과 alanine 42 잔기 사이일 것으로 추정해 볼 수가 있었다(Fig. 5). *S. lividans*의 경우에는 *axeA* 뿐만 아니라 *xylA*의 signal peptide 역시 41개의 아미노산으로 이루어졌음이 밝혀져 있다(17). 41 개의 아미노산 잔기의 분자량을 계산하면 4.4 kDa이 되므로 완성된 AxeA의 크기는 33.9 kDa (38.3-4.4 kDa)으로 계산되어 SDS-PAGE에 나타난 34 kDa과 거의 일치하였다. 이 완성된 AxeA 단백질은 세포추출액과 배양액에서 모두 검출되었다(1). 이상의 결과들은 *S. coelicolor* A3(2)의 acetyl xylan esterase 유전자가 *E. coli*에서 발현되더라도 *E. coli*의 signal peptidase에 의해 인식될 수 있고 생산된 AxeA은 비록 생산량은 적었지만 *S. coelicolor* A3(2)에서와 동일함을 알려주고 있다.

감사의 말

이 연구는 2003학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음

참고문헌

1. 최원일. 2002. *Streptomyces coelicolor* A3(2)의 acetyl xylan esterase를 발현하는 *Escherichia coli*의 H₂O₂ 저항성. 석사학위논문. 단국대학교
2. Chang, S.C., M.H. Su, and Y.H. Lee. 1997. Roles of the signal peptide and mature domains in the secretion and maturation of the neutral metalloprotease from *Streptomyces cacaoi*. *Biochem. J.* 321, 29-37.
3. Dalbey, R. and von Heijne. 1992. Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes: a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* 17, 474-478.
4. Dalbey, R. and W. Wickner. 1985. Leader peptidase catalyses the release of exported proteins from the outer surface of the *E. coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 230, 15925-15931.
5. Dalbey, R., M.O. Lively, S. Bron, and J.M. van Dijk. 1997. The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci.* 6, 1129-1138.
6. Degraffi, G., M. Kojic, G. Ljubijankic, and V. Venturi. 2000. The acetyl xylan esterase of *Bacillus pumilus* belongs to a family of esterases with broad substrate specificity. *Microbiol.* 146, 1585-1591.
7. Driessen, A.J.M. 1994. How proteins cross the bacterial cytoplasmic membrane. *J. Membr. Biol.* 142, 145-159.
8. Dupont, C., N. Daigneault, F. Shareck, R. Morsoli, and D. Kluepfel. 1995. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase produced by *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.* 319, 881-886.
9. Heijne, G. and L. Abrahamsen. 1989. Species-specific variation in signal peptide design, Implications for protein secretion in foreign host. *FEBS Lett.* 244, 439-446
10. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.

- M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, p. 79. The John Innes Foundation, Norwich.
11. Horikoshi, K. and T. Aliba. 1992. A new microbial world, p 117-129. Japan Scientific Societies Press.
 12. Kebir, H., C. Dupont, and R. Morosoli. 2000. Increased xylanase production in *Streptomyces lividans* after replacement of the signal peptide: dependence on box and inverted repeat sequence. *Biochim. Biophys. Acta.* 1491, 177-184.
 13. Kwon, O.S. and J.J. Sninsky. 1995. Genetic variation of BIV isolates characterized by PCR using degenerate primers. *J. Microbiol.* 33, 252-259.
 14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
 15. Lammertyn, E. and J. Anne. 1998. Modifications of *Streptomyces* signal peptides and their effects on protein production and secretion. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 1-10.
 16. Paetzel, M., R.E. Dalbey, and N.C. Strynadka. 2000. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases. A novel antibiotic target. *Pharmacol. Ther.* 87, 27-49.
 17. Page, N., D. Kluepfel, F. Shareck, and R. Morosoli. 1996. Effect of signal peptide alterations and replacement on export of xylanase A in *Streptomyces lividans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 109-114.
 18. Poutanen, K. and M. Sundberg. 1988. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 419-424.
 19. Pugsley, A. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.
 20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 21. Schaerlaekens, K., M. Schierova, E. Lammertyn, N. Geukens, J. Anné, and L. Van. Mellaert. 2001. Twin-arginine translocation pathway in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 183, 6727-6732.
 22. Shao, W. and J. Wiegel. 1995. Purification and characterization of two thermostable acetyl xylan esterase form *Thermoaerobacterium* sp. Strain JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 729-733.
 23. 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.
 24. Shareck, F., P. Biely, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1995. Analysis of DNA flanking the xlnB locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene* 153, 105-109.
 25. Tjalsma, H., A. Bolhuis, M.L. van Roosmalen, T. Wiegert, W. Schumann, C.P. Broekhuizen, W.J. Quax, G. Venema, S. Bron, and J.M. van Dijk. 1998. Functional analysis of the secretory precursor processing machinery of *Bacillus subtilis*: identification of a eubacterial homologous of archaeal and eukaryotic signal peptidases. *Genes Dev.* 12, 2318-2331.
 26. Tschantz, W.R., M. Sung, V.M. Delgado-Partom, and R. Dalbey. 1993. A serine and a lysine residue implicated in the catalytic mechanism of the *E. coli* leader peptidase. *J. Biol. Chem.* 268, 27349-27354.
 27. Tsujibo, H., T. Ohtsuki, T. Iio, I. Yamazaki, K. Miyamoto, M. Sugiyama, and Y. Inamori. 1997. Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanase and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 661-664.
 28. Um, T.H., C.H. Oh, J.S. Lee, Y.D. Park, J.H. Roe, and J.H. Kim. 1995. Pleiotrophic effect of a gene fragment conferring H₂O₂-resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Microbiol.* 33, 339-343.
 29. van Dijk, J.M., A. de Jong, G. Venema, and S. Bron. 1995. Identification of the potential active site of the signal peptidase SipS of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 270, 3611-3618.
 30. Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-311.

(Received February 21, 2003/Accepted May 7, 2003)

ABSTRACT : Expression Pattern of Acetyl Xylan Esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in *Escherichia coli*

In Suk Lee, Seock-won Youn, Sang Oun Jung¹, Chung-Hun Oh¹, and Jae-heon Kim*
(Department of Microbiology and ¹Medical Laser Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea)

We cloned a gene encoding acetyl xylan esterase (*axeA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and studied its expression pattern in *Escherichia coli*. The full sequence of *axeA* was amplified by PCR. Sequence analysis of the PCR product revealed an open reading frame of 1,008 nucleotides encoding a protein consisted of 335 amino acid residues, with a calculated molecular mass of about 38 kDa. The base sequence showed 98% homology to the same gene of *Streptomyces lividans*. Two different kinds of acetyl xylan esterases were produced in *Escherichia coli*(pLacI) by IPTG induction; their molecular weights were 38 kDa and 34 kDa, respectively. Of these, 38 kDa protein seemed to be a total protein holding N-terminal signal peptide region, whereas 34 kDa protein seemed to be a matured protein without signal peptide which was produced by peptide bond cleavage between two amino acid residues of alanine 41 and alanine 42.