

## 키토산분해효소의 분류와 효소적 특성

정우진 · 국주희 · 김길용 · 박지용<sup>1</sup> · 박노동\*

전남대학교 응용생물공학부, 전남대학교 농업과학기술연구소, <sup>1</sup>광주과학기술원 생명과학과

## Enzymatic Characterization and Classifications of Chitosanases

Woo-Jin Jung, Ju-Hee Kuk, Kil-Yong Kim, Zee-Yong Park<sup>1</sup> and Ro-Dong Park\*

Glucosamine Saccharide Materials Laboratory (NRL), Department of Agricultural Chemistry, Institute of Agricultural Science & Technology, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea

<sup>1</sup>Department of Life Science, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, 500-712, Korea

Received December 31, 2004; Accepted March 12, 2005

Many chitosanases, glycosyl hydrolases that catalyze the degradation of chitosan, have been found in microorganism. In this paper, classification of the enzyme has been described, which is based on the amino acid sequence (families) and splitting patterns (subclasses). Glycohydrolytic mechanisms such as inversion and retention of the substrate anomer are also discussed in context of the families. Interrelationship among the primary structure, clan, anomeric conversion and the splitting patterns has been suggested. In addition, advanced definition of chitosanase was introduced through the investigation of enzymatic products from partially *N*-acetylated chitosan as a substrate.

**Key words:** chitosanase, glycosyl hydrolase, mode of action, transglycosylation, classification of microbial chitosanase, chitosanase family

### 서 론

탄수화물은 단당, 이당, 올리고당, 다당 등의 형태로 자연에 분포하면서 고유한 기능을 수행한다. 올리고당을 예로 들면, 단당들 사이에 다양한 결합을 통하여 천문학적으로 많은 수의 결합이 가능한 탓에 같은 크기의 단백질이나 핵산에 비하여 비교할 수 없이 다양한 구조와 기능의 다양성을 가질 수 있다. 올리고당과 다당은 구조, 에너지 저장 및 이용, 바이러스 감염, 세포 신호전달 등의 생명과정들에서 중추적 역할을 수행한다.<sup>1)</sup>

이들 당 관련 효소들(Carbohydrate active enzymes, CAZY)은 그러므로 광범위한 생명과정에 관여되어있다고 할 것이다. 근래, 상당한 수의 당 관련 효소들의 서열과 3차원구조가 밝혀지게 되고, 아미노산 서열 특성, 3차구조, 기질/생성물 특이성, 공격 모드(*exo* or *endo* enzyme), 입체화학적 반응기작 등에 근거하여 이들을 분류하는 시도들이 있어왔다.<sup>2,3)</sup>

특히 아미노산 서열과 입체구조 사이에 직접적 상관성이 있는만큼, 아미노산 서열 상동성에 기초한 당질분해효소의 분류는 효소단백질의 구조적 특성, 진화적 상관, 작용기구 등의 추론에 기여하는 바 크다. 당에 작용하는 다양한 효소들에 관한 아미노산 서열 정보는 web server(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>)

를 통하여 활용할 수 있다. 현재 CAZY는 당류의 구조적, 기능적 다양성을 반영하여, 당 관련 효소들을 5 class로 분류하고, 이들을 다시 아미노산 서열과 구조에 따라 다수의 family로 나누어 취급하고 있는 바, 당질가수분해효소(Glycoside hydrolases)에 97 family, 당전달효소(Glycosyltransferase) 75 family, 다당분해효소(Polysaccharide lyases) 15 family, 탄수화물 에스테라제(Carbohydrate esterases) 14 family, 탄수화물 결합 단백질(Carbohydrate-binding modules) 42 family가 있다.

이중 당질가수분해효소들(Glycoside hydrolases; EC 3.2.1.-)은 당-당 사이 또는 당-비당 사이의 글리코시드결합을 가수분해하는 효소군으로 광범위한 분포를 갖는다. 1991년 Henrissat 등<sup>2)</sup>에 의해 당질가수분해효소들의 아미노산 배열의 상동성과 3차 구조에 기초한 분류가 처음으로 실험되어 처음 35 family로 나뉘었으며, 1993년 45 family로, 1996년 58 family로, 2001년 85 family로, 지금(2004년 10월)은 97 family로 분류되기에 이르렀다.<sup>3)</sup> 당질가수분해효소(Glycoside hydrolases) 가운데 family 1-4, 5(chitosanase), 6-7, 8(chitosanase), 9-17, 18(chitinase), 19(chitinase), 20(chitobiase), 22(chicken type lysozyme), 23(goose type lysozyme), 24(phage-type lysozyme), 25-35, 38-39, 42-43, 45, 46(chitosanase), 47-49, 51, 53-54, 56-58, 61, 65, 67-68, 74, 77, 82-83, 88, 90-91, 94 등 총 61 family에 속하는 효소들에 대해서는 적어도 하나 이상 3차원 입체구조까지도 알려졌다(<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). 최근 family 75와 80으로 분류되는 수종의 chitosanase들이 제시되었지만 이들의 입체

\*Corresponding author

Phone: 82-62-530-2133; Fax: 82-62-530-0876

E-mail: rdpark@chonnam.ac.kr

구조는 보고된 바 없다.

키토산분해효소(Chitosanases, EC 3.2.1.132)는 당질가수분해 효소군의 하나로, 아미노당인 D-glucosamine(GlcN) polymer인 chitosan의  $\beta$ -1,4-glycoside 결합을 가수분해하는 효소이며, 세균, 곰팡이, 식물 등에 널리 분포한다. CAZY에 따르면, 모든 chitosanase는 family 5, 8, 46, 75, 80에 속한다. 현재까지 다양한 생물에서 상당수의 chitosanase가 정제되어 그 효소적 성질과 작용기작 등에 관한 총설이 수편 게재된 바 있다.<sup>4,5,6)</sup>

본 논문은 키토산분해효소에 관한 이전 총설에서<sup>6)</sup> 취급하였던 부분을 일부 보완하고 효소단백질의 아미노산 서열과 구조에 근거한 새로운 발견을 정리하고자 하였다.

### Chitosanase와 Chitinase

Chitosanase는 chitin의 부분 탈아세틸화산물인 chitosan을 가수분해하는 탓에 chitin을 가수분해하는 chitinase와 비교되어왔다. 지금까지 통상 아세틸기가 40% 이상인 chitin과 그 이하인 chitosan 가운데 어느것을 보다 잘 분해하느냐 하는 것으로 chitinase와 chitosanase로 분류하여 왔지만, 이것만으로 판단하는 것이 과연 옳은지 의문을 제기하지 않을 수 없다. 1992년의 Enzyme Nomenclature에 의하면,<sup>7)</sup> chitinase는 chitin 및 chitodextrin중의 GlcNAc-GlcNAc 결합을 endo형으로 가수분해하는 효소라고 정의하였으며, chitosanase는 부분 아세틸화 chitosan 중의 GlcNAc-GlcN 사이의  $\beta$ -1,4 결합을 endo형으로 가수분해하는 효소라고 정의하였다. 그후 이 정의에 맞지 않는 신규 chitosanase도 많이 보고되어, 이것이 chitinase인가 또는 chitosanase인가의 논란이 제기되어 그 정의의 재정립이 요구되었다.<sup>8)</sup>

그후 Mitsutomi 등<sup>9)</sup>은 GlcN-GlcN를 분해하지만 GlcNAc-GlcNAc를 분해하지 못하는 것을 chitosanase로, GlcNAc-GlcNAc를 분해할 수 있으나 GlcN-GlcN를 분해하지 못하는 것을 chitinase로 규정하였다. 어느 효소나 GlcN-GlcNAc 또는 GlcNAc-GlcN 결합을 가수분해할 수 있다. 이 제안은 chitosanase나 chitinase 모두 부분아세틸화된 키토산을 분해한다

는 발견과 그 분해산물의 분석에 기초하고 있다. 이들 유전자와 단백질의 구조에 근거하여보면, 이들의 구조는 이들이 작용하는 기질의 유사성과는 별도로 서로 판이하게 상이하였다. 이에 따라 chitinase는 family 18과 19로, chitosanase는 Table 1에 기술한대로 5 family로 분류되고 있다. Table 1에는 5 family에 속한 효소군, 작용기작, 촉매잔기, clan 및 fold 등이 비교되어 있다. 여기서 clan은 단백질 구조의 기술에 나타나는 PDB identifier-fold-superfamily-family-protein의 위계 가운데 superfamily 쪽에 해당하는 개념이지만 비슷한 구조의 것들만으로 그룹을 지은 것이다. Chitosanase는 현재 4종의 clan으로 구별되고 있다.

### Chitosanase Family

Fig. 1에 지금까지 보고된 chitosanase의 N-말단 아미노산 서열을 family별로 정리하였다. Family 5에는 *Streptomyces griseus* HUT6037과<sup>10)</sup> *Streptomyces* sp. NO3<sup>11)</sup> 2종의 chitosanase 서열만이 보고되어 있으며, 이 둘 사이에는 높은 서열 상동성을 보인다. Family 5에는 chitosanase 이외에  $\beta$ -1,4-glucanolytic activity를 갖는 cellulase, licheninase, mannosidase, endo-glycosylceramidase, xylanase 등 다양한 탄수화물 가수분해효소들이 함께 속해 있으며, 최근 보고된 위의 두 chitosanase들이 다른 효소들과 높은 아미노산 서열 상동성을 나타낸 것은 흥미롭다. Family 5 chitosanase의 3차원구조는 같은 family 내의 다른 단백질들과 마찬가지로 fold ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>이며 clan GH-A에 속한다(Table 1).

Family 8에 속하는 것으로 *Bacillus cereus* P16,<sup>12)</sup> *Bacillus* sp. 928,<sup>13)</sup> *Bacillus* sp. GM44,<sup>14)</sup> *Bacillus* sp. KSM-330,<sup>15)</sup> *Bacillus circulans* WL-12,<sup>16)</sup> *Bacillu* sp. 7-M(Uchida, Y., personal communication) 등이 있다(Fig. 1B). 이들은 carboxymethylcellulose 분해활성(CMCase)을 갖는다. Family 8에는 chitosanase 이외에 cellulase(EC.3.2.1.4), licheninase(EC 3.2.1.73) 및 endo-1,4- $\beta$ -xylanase(EC 3.2.1.8)의 효소들( $\beta$ -1,4-glucanolytic

**Table 1. The sequence-based families of chitosanases**

	Family 5	Family 8	Family 46	Family 75	Family 80
Known Activities	Chitosanase (EC.3.2.1.132); Many other hydrolases (EC.3.2.1.-)	Chitosanase (EC.3.2.1.132); Cellulase (EC.3.2.1.4); Licheninase (EC 3.2.1.73); Endo-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8)	Chitosanase (EC.3.2.1.132)	Chitosanase (EC.3.2.1.132)	Chitosanase (EC.3.2.1.132)
Mechanism	Retaining (e → e)	Inverting (e → a)	Inverting (e → a)	Not known	Inverting (inferred)
Catalytic Nucleophile/Base	Glu (experimental)	Asp (inferred)	Asp (experimental)	-	Asp (inferred)
Catalytic Proton Donor	Glu (experimental)	Glu (experimental)	Glu (experimental)	-	Glu (inferred)
3D Structure	Available	Available	Available	Not available	Not available
Clan	GH-A	GH-M	GH-I	-	GH-I
Fold	Fold ( $\beta/\alpha$ ) <sub>8</sub>	Fold ( $\alpha/\alpha$ ) <sub>6</sub>	Fold $\alpha+\beta$	-	-
Statistics	CAZy (509); GenBank/GenPept (701); Swissprot (317); PDB (49); 3D (20); cryst (2)	CAZy (68); GenBank/GenPept (94); Swissprot (34); PDB (8); 3D (3)	CAZy (19); GenBank/GenPept (28); Swissprot (15); PDB (2); 3D (1)	CAZy (18); GenBank/GenPept (25); Swissprot (9)	CAZy (3); GenBank/GenPept (3); Swissprot (3)
Recent References	(47,48)	(49)	(50)	(26,27)	(22,23)

<b>A. Family 5</b>					
	1	5	10	15	20
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037 <sup>37)</sup>	A	A T P L A	A N G Q L S	V C G R Q L C N	
<i>Streptomyces</i> sp. NO3 <sup>11)</sup>	A	A T P L A	A N G E L R	V C G L E L C N	
<b>B. Family 8</b>					
	1	5	10	15	20
<i>Bacillus</i> sp. P16 <sup>12)</sup>	A	A K E M K P F F	Q Q V N Y A		
<i>Bacillus</i> sp. 928 <sup>13)</sup>	A	A K E M K P F P	Q Q V N Y	A G V I K	
<i>Bacillus</i> sp. GM44 <sup>14)</sup>	A	A A K E M K P F P	Q Q V N Y	A G V I K	
<i>Bacillus</i> sp. KSM-330 <sup>15)</sup>	A	V A K E M K P F P	Q Q V N Y	S G I L K	
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 <sup>16)</sup>	A	F A A P N K P F P	Q H T T Y T S	G S I K	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <sup>52)</sup>	A	A A K E M K P F P	Q Q V N Y	A G V I K	
<i>Paenibacillus fukuinensis</i> <sup>353)</sup>	A	A G E M M F P	Q Q V S Y	S G I I K	
<b>C. Family 46</b>					
	1	5	10	15	20
<i>Bacillus circulans</i> MH-K1 <sup>17)</sup>	N	N T G L D G E O W N N I	M K L I N K P		
<i>Bacillus ehimensis</i> <sup>54)</sup>	D	R T G L D G E Q W N N I	M K L I N K P		
<i>Bukholderia gladioli</i> strain CHB101 <sup>51)</sup>	D	N T G L D G E G W D N I	M K L V N K P		
<i>Streptomyces</i> sp. N174 <sup>18)</sup>	A	G A G L D D P H K K E I	A M E L V S S A		
<i>Nocardioides</i> sp. N106 <sup>19)</sup>	A	A V G L D D P H K K D I	A M Q L V S S A		
<i>Nocardioides</i> sp. K-01 <sup>21)</sup>	A	A G L D D P V K K D I	A M Q I V S S A		
<i>Amycolatopsis</i> sp. CsO-2 <sup>20)</sup>	A	V P L D D P A K K E I	A M E L V S S A		
<i>Chlorella virus</i> CVK2 <sup>55)</sup>	I	N G L G D D K E W Q T A	V W D I Y V K L		
<b>D. Family 75</b>					
	1	5	10	15	20
<i>Fusarium solani</i> f. <i>robiniae</i> SUF704 <sup>26)</sup>	R	D V P A N V K S F K D S I I	K Q G S C		
<i>Fusarium solani phaseoli</i> SUF386 <sup>27)</sup>	R	D V P A N V K T F K D S I I	K Q		
<b>E. Family 80</b>					
	1	5	10	15	20
<i>Matsuebacter chitosanotabidus</i> 3001 <sup>22)</sup>	A	A A A G V I P V G D S R V Y G A V F D			
<i>Sphingobacterium multivorum</i> <sup>23)</sup>	A	A A A G V I P V G D S R V Y G N V			

Fig. 1. Homology comparison among N-terminal amino acid sequence of chitosanase families.

activity)이 속해 있다. Family 8 chitosanase의 3차원구조는 fold ( $\alpha/\alpha$ )<sub>6</sub>이며 clan GH-M에 속한다(Table 1).

*Bacillus circulans* MH-K1,<sup>17)</sup> *Streptomyces* sp. N174,<sup>18)</sup> *Nocardioides* sp. N106,<sup>19)</sup> *Amycolatopsis* sp. CsO-2<sup>20)</sup> 등 사이에서는 활성중심으로 추정되는 N-말단 측에 존재하는 Asp와 Glu를 중심으로 큰 상동성을 보인다. 특히 *Streptomyces* sp. N174,<sup>17)</sup> *Nocardioides* sp. N106,<sup>19)</sup> *Nocardioides* sp. K-01<sup>21)</sup>의 방선균 3종 사이에서는 전체배열에서 70%이상의 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). 이들은 모두 family 46에 속하는 chitosanase들이다. Family 46 chitosanase의 3차원구조는 fold  $\alpha + \beta$ 이며 clan GH-I에 속한다(Table 1).

Family 80에 속하는 chitosanase로는 *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001,<sup>22)</sup> *Sphingobacterium multivorum*<sup>23)</sup>의 아미노산 서열이 밝혀졌으며, 둘 사이에는 높은 상동성을 보였다(Fig. 1). 이들의 3차원구조나 활성부위 등에 관한 자료는 미비하지만 family 46과 함께 clan GH-I에 속할 뿐만 아니라 활성부위가 Asp와 Glu인 것으로 추론되고 있어, Family 46과 80은 같은 family일 가능성이 논의되고 있다.<sup>24,25)</sup>

마지막으로, Family 75에 속하는 것으로는 *Fusarium solani* SUF704,<sup>26)</sup> *Fusarium solani phaseoli* SUF386<sup>27)</sup>의 아미노산 서

열이 확인되었으며, 둘 사이에는 높은 상동성을 나타낸다(Fig. 1). 이들의 3차원구조나 fold 및 활성부위 등에 관한 자료는 턱없이 부족하지만, 곰팡이 유래 chitosanase family는 주로 세균 유래 chitosanase family인 family 46, 80에서 발견되는 활성부위인 Asp와 Glu 잔기가 확인되지 않는 것으로 보아 그 기원이 상이한 것으로 보인다.<sup>23)</sup> Family 46, 75, 80은 chitosan만을 기질로 삼는 가수분해효소군이다.

지금까지 보고된 이들 5 family chitosanase의 N-말단측의 보존영역은, 아미노산 서열과 분자량의 차이에 근거하여 닭난백형(c-type), 거위난백형(g-type), T4 Phage형(p-type), 그리고 bacteria 형(b-type)의 4가지 group으로 분류되는 lysozyme의 type들 가운데, c-type 혹은 g-type lysozyme의 활성중심 부근의 아미노산 서열과 일부 상동성을 보이지만, chitinase의 그것과는 분명히 다른 서열을 갖는다.<sup>28)</sup>

### 기질 분해 패턴과 Family의 상관성

Chitosanase가 기질 결합부위에 lysozyme과 같이 6개의 단당 단위를 인식한다는 가정에 기초한다면, 기질 polymer내의 단당 단위의 배열이 중요하다. 예를 들면, 탈아세틸화도 70%의

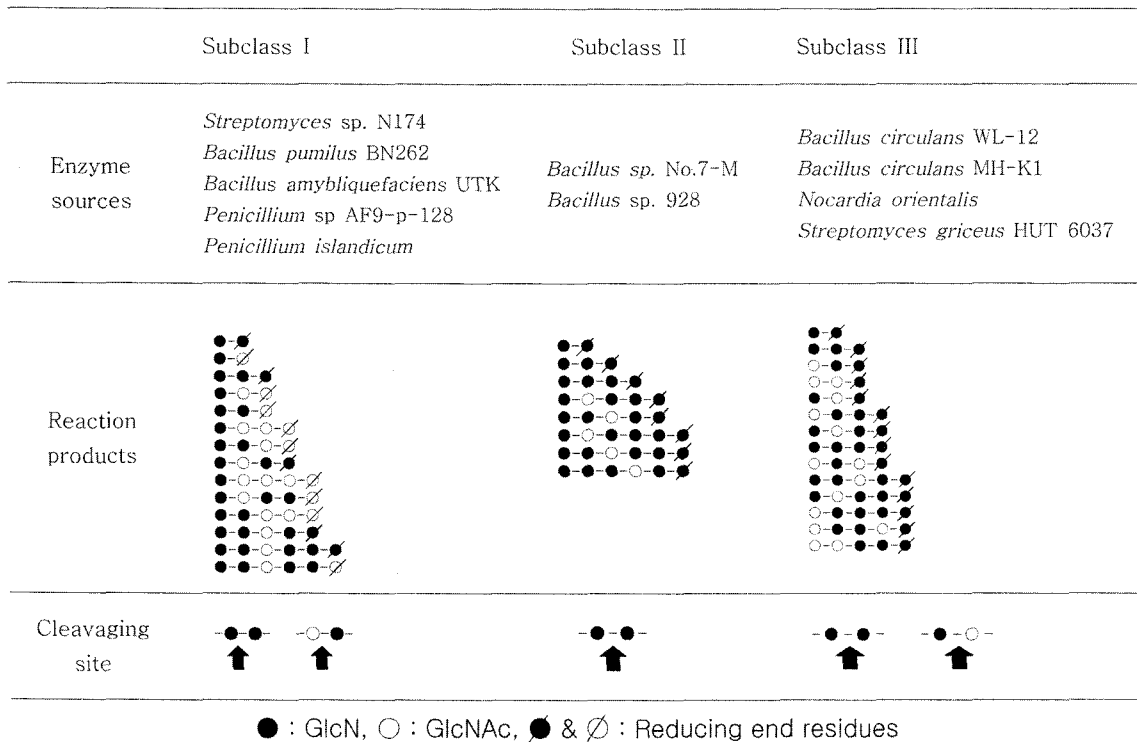


Fig. 2. Subclass classification and action pattern of microbial chitosanases on partially N-acetylated chitosan.

chitosan을 *Bacillus circulans* MH-K1 유래 chitosanase로서 반응시켰을 때의 최종분해생성물은 GlcN의 homooligomer(GlcN-GlcN, GlcN-GlcN-GlcN), 혹은 GlcNAc-GlcN의 heterooligomer (GlcNAc-GlcN-GlcN-GlcN, GlcN-GlcNAc-GlcN-GlcN, GlcN-GlcN-GlcNAc-GlcN-GlcN)였다. 이는 chitosan polymer중에서 GlcNAc가 2개 이상 연속되어 존재하는 영역에서는 효소활성을 나타내지 않는다는 것을 의미한다. 더욱이 생성물의 환원말단이 전부 GlcN이며 비환원말단이 GlcN 혹은 GlcNAc이므로 대부분은 GlcN-GlcN 사이의 결합을 절단하고 GlcN-GlcNAc 사이도 절단했을 것임을 제시한다.<sup>29)</sup>

이는 앞서 서술한 “부분아세틸화 chitosan중의 GlcNAc-GlcN 사이의 β-1,4 결합을 endo형으로 가수분해하는 효소”라는 정의와는 맞지 않는다. 한편, *Streptomyces* sp. N174 유래 chitosanase는 탈아세틸화도 65-75%의 chitosan을 GlcN-GlcN, GlcN-GlcN-GlcN, GlcN-GlcNAc, GlcN-GlcN-GlcNAc, GlcN-GlcNAc-GlcNAc, GlcN-GlcN-GlcNAc-GlcNAc, GlcN-GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc-GlcNAc과 같은 산물로까지 가수분해한다.<sup>30)</sup> 그러므로 이 chitosanase는 GlcNAc-GlcN 사이와 GlcN-GlcN 사이를 절단하는 효소이며, *Bacillus circulans* MH-K1 유래 chitosanase와는 기질의 인식이 확실히 다르다. 이러한 분해양식 이외에도 *Bacillus* sp. No. 7-M 유래 chitosanase와 같이 GlcN-GlcN 사이 밖에는 절단하지 못하는 것도 있다.<sup>31)</sup>

Chitosanase의 부분 아세틸화 키토산에 대한 분해양식에 근거하여 Fukamizo 등<sup>32)</sup>은 chitosanase를 3 subclass로 분류할 것을 제안하였으며, 이를 Fig. 2에 나타냈다. Subclass I에 속하는 것으로는 *Penicillium islandicum*,<sup>3)</sup> *Penicillium* sp. AF9-P-128,<sup>33)</sup>

*Streptomyces* sp. N174,<sup>30)</sup> *Bacillus pumilus* BN262,<sup>32)</sup> *Bacillus amyloliquefaciens* UTK<sup>34)</sup> chitosanase 등이 있으며, 이들은 GlcN-GlcN, GlcNAc-GlcN 결합을 절단하여 그 생성물의 비환원말단 당 잔기는 언제나 GlcN을, 환원말단 당 잔기는 GlcN 또는 GlcNAc를 갖는다. Subclass II에는 *Bacillus* sp. No. 7-M<sup>35)</sup>과 *Bacillus* sp. 928<sup>13)</sup> chitosanase가 있으며 이들은 오직 GlcN-GlcN만을 절단한다. Subclass III에는 *Bacillus circulans* WL-12,<sup>16)</sup> *Nocardia orientalis*,<sup>36)</sup> *Bacillus circulans* MH-K1,<sup>17)</sup> *Streptomyces griceus* HUT 6037<sup>37)</sup> chitosanase 등이 있으며, 이들은 GlcN-GlcN, GlcN-GlcNAc 결합을 가수분해하여 그 생성물의 환원말단 당 잔기는 오직 GlcN를 갖는 효소이다. 적어도 이 3 subclass에 속하는 효소들은 Mitsutomi 등<sup>9)</sup>이 제안한 chitosanase의 정의의 내용과 일치한다. Fig. 2에는 각 subclass에서 대표적인 *Streptomyces* sp. N174,<sup>18)</sup> *Bacillus* sp. No. 7-M,<sup>35)</sup> *Bacillus circulans* MH-K1<sup>17)</sup> chitosanase를 포함한 다수 chitosanase들의 분해산물들의 구조를 나타냈다.

Uchida 등<sup>33)</sup>과 Fukamizo 등<sup>32)</sup>이 제시한 subclass와 family 사이에는 어떤 상관성이 있을까? 이상 논의한 N-말단 아미노산 배열, 반응생성물 분석에 근거한 분해패턴, 분해산물의 아노머 배형, CMC 분해능의 유무 등을 종합한 것이 Fig. 3이다.

Subclass I과 II는 각각 family 46/80과 8로 분류되며, subclass III는 CMCCase 활성의 유무에 따라 두 family로 나뉜다. Family 8은 CMCCase 활성을 보유하지만 family 46/80은 그 활성이 없다. 이는 아미노산 서열/3차원구조와 기질의 분해 패턴/특이성 사이에 일정한 상관성이 있음을 단적으로 보여준다. 그러나, family 5는 family 8, 46, 80과는 다르게 보전형이며 또 당전이활성형인 바, family-subclass 상관성에 관한 한 충분

Family 8		Family 46 & 80	
subclass II	subclass III	subclass I	
CMCase activity (+)		CMCase activity (-)	
Inverting mechanism			
<i>Bacillus</i> sp. No. 7-M	<i>B. circulans</i> WL-12	<i>B. circulans</i> MH-K1	<i>Streptomyces</i> sp. N174
● : GlcN, ○ : GlcNAc			

Fig. 3. Classification of microbial chitosanases in family and subclass.

한 연구 성과를 기다려야 할 것 같다. 마찬가지로, 곰팡이 유래 family 75와 subclass와의 상관에 관한 정보는 절대 부족한 현실이다.

앞으로 여러 종 유래의 chitosanase의 1차구조와 분해양식이 밝혀지면 다양한 family와 subclass로 분류될 가능성이 있고 또 이들 사이의 상관성이 해명될 수 있을 것이며, 나아가 보다 정교한 chitosanase의 정의로 귀결될 것이다.

### Anomer와 Family의 상관성

Chitosan, chitin, cellulose 등의 글리코시드 결합이 가수분해 되면 생성물의 환원말단 탄소는 α-anomer 또는 β-anomer가 된다. 반전형(Inverting mechanism) 가수분해효소는 일회적 친핵치환(single nucleophilic displacement)으로 두개의 카르복시그룹(흔히, Glu/Glu, Asp/Glu)이 관여하여 물 분자가 2-아미노기의 방향에서 친핵적으로 βC-1을 공격하여 가수분해를 촉매하며 이로써 anomer 탄소의 입체배향은 반전되어 α-anomer를 생성한다. 이때 물 분자가 위치할 공간이 필요한 탓에 두 카르복시그룹 사이에 6.5-9.5Å의 공간이 필요하다.<sup>38)</sup> 보전형(Retaining mechanism) 효소는 이중적 친핵치환(double nucleophilic displacement)으로 먼저 당잔기-효소 중간체를 형성하고 다음에 물 분자의 참여로 이 중간체의 가수분해가 일어나며, β-anomer의 배향이 그대로 보전된다. 두 카르복시그룹 사이의 거리는 반전형의 그것보다 짧은 5.5이다. 보전형 효소들은 흔히 당전이활성(transglycosylation)을 갖는 것으로 보인다(Fig. 4). 실제로 반전형과 보전형을 자세히 검토하면, 4가지 유형이 가능하다. 즉, 반전형에는 e → a, a → e의 2 유형이, 보전형에는 e → e, a → a의 2 유형이 그것이다. 그러나, 키틴분해효소나 키토산분해효소의 기질은 β-1,4 글리코시드 결합을 하고 있으므로 2가지 유형만이 가능할 것이다.<sup>39,40)</sup>

Chitinase의 경우, family 19에 속하는 대맥 유래의 분자량 26 kDa chitinase,<sup>41)</sup> 대두 chitinase,<sup>42)</sup> 양 chitinase<sup>43)</sup>와 *Streptomyces griseus* HUT 6037 chitinase<sup>37)</sup> 등은 반전형의 기작에 따라 α-anomer를 생성한다. 한편, family 18에 속하는 오이,<sup>42)</sup> 고무나무,<sup>44)</sup> *Bacillus circulans* WL-12,<sup>45)</sup> *Streptomyces griseus*<sup>43)</sup> chitinase는 보전형 기작에 따라 β-anomer를 생성한다. 그러므로,

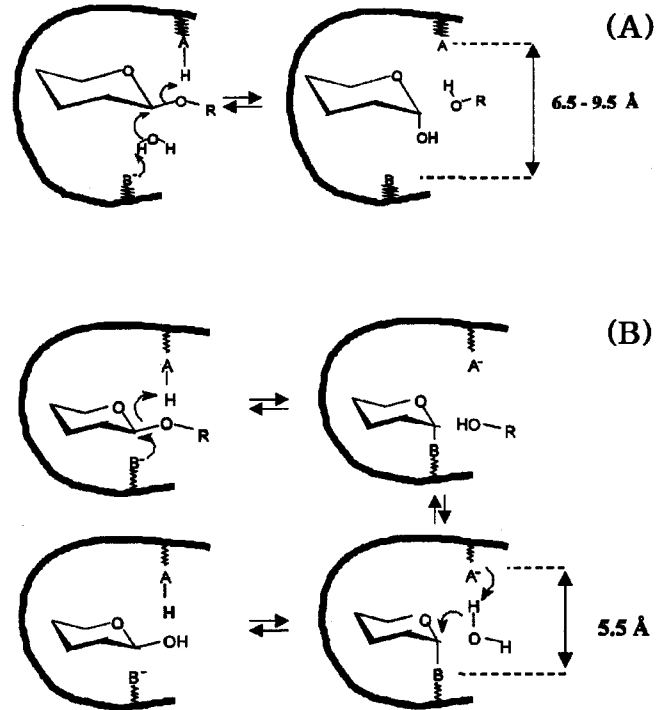


Fig. 4. Reaction mechanism of inverting (A) and retaining (B) glycoside hydrolases.<sup>39,40)</sup>

단백질의 구조와 가수분해 작용기작 사이에 깊은 관련이 있어 보인다.

*Streptomyces* sp. N174 chitosanase의 경우,<sup>46)</sup> 효소-기질 복합체의 모델링을 통하여 이 효소의 활성중심인 Glu22와 Asp40 사이에 반전형에 필수인 한 분자의 물이 들어갈 공간 12Å을 확보하고 있기 때문에, 이 효소는 반전형 작용양식을 따를 것으로 제안되었다.<sup>38)</sup> Table 1에 제시한대로, chitosanase는 clan GH-A(보전형, family 5), GH-I(반전형, family 46, 80), GH-M(반전형, family 8)으로 분류되며, family 75의 입체구조에 관한 자료는 아직 없다. 이중 family 5를 포함하는 clan GH-A의 효소들은 그 작용 기질의 넓은 스펙트럼에도 불구하고 모두 보전형이며 당전이활성형이다. 한편, Family 8, 46, 80의 당질분해효소들은 반전형을 나타낸다.<sup>2)</sup> 이는 단백질의 구조와 작용기작 사이의 깊은 상관과, 단백질의 1차구조와 입체구조에 근거한 분류의 효용성을 제시하는 것이다. 다양한 chitosanase에 대한 구조와 반응양식에 관한 연구가 앞으로 더 필요하며, 이를 통하여 chitosanase의 작용기구, 분류, 저해제 개발 등에 필요한 기초정보의 확보가 가능할 것이다.

### 초 록

키토산분해효소(Chitosanases, EC 3.2.1.132)는 당질가수분해 효소군의 하나로, 아미노당인 D-glucosamine polymer인 chitosan의 β-1,4-glycoside 결합을 가수분해하는 효소이며, 세균, 곰팡이, 식물 등에 널리 분포한다. 본 논문에서는 chitosanase의 N-말단 아미노산의 서열과 입체구조에 근거한 family 및 clan 분류, 작용모형, 절단 유형, subclass 분류, 및 family-subclass

상관성을 검토하였다. 아미노산 서열과 입체구조와 기질의 분해패턴 사이에는 깊은 상관이 있음을 확인 제시하였다. 다양한 종 유래 chitosanase의 1차구조의 해명과 진화적 상관 규명, 나아가 보다 정교한 chitosanase의 정의와 다양한 산업적 응용에의 가능성도 검토하였다.

**Key words:** 키토산분해효소, 당류 가수분해효소, 작용기작, 당전이반응, 미생물 키토산분해효소 분류, 키토산분해효소 계통

사 사

본 연구는 과학기술부 특정연구개발사업비(국가지정연구실사업)의 지원으로 수행된 것으로 이에 감사를 표합니다.

참고문헌

1. Henrissat, B. and Davies, G. (1977) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
2. Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.
3. Henrissat, B. and Bairoch, A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695-696.
4. Fenton, D. M. and Eveleigh, D. E. (1981) Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 151-165.
5. Somashekar, D. and Jaseph, R. (1996) Chitosanases-properties and applications: A review. *Biore. Tech.* **55**, 35-45.
6. Park, R. D. and Jin, Y. L. (2000) Characteristics, mode of action, and classification of microbial chitosanases. *Kor. J. Chitin Chitosan* **5**, 207-216.
7. IUBMB (1992) Enzyme Nomenclature. Academic Press, San Diego.
8. Saito, J. and Ando, A. (1996) The forefront of chitosanase research. *Chitin Chitosan Res.* **2**, 187-196.
9. Mitsutomi, M., Ueda, M., Arai, M., Ando, A. and Watanabe, T. (1996) Action patterns of microbial chitinases and chitosanases on partially N-acetylated chitosan. *Chitin Enzymol.* **2**, 273-284.
10. Tanabe, T., Morinaga, K., Fukamizo, T. and Mitsutomi, M. (2003) Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 354-364.
11. Naito, M., Seki, K., Hirai, N., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. (2004) Purification and characterization of chitosanase from *Streptomyces* sp. NO3. *Chitin Chitosan Res.* **10**, 96-97.
12. Jo, Y. Y., Jo, K. J., Jin, Y. L., Kim, K. Y., Shim, J. H., Kim, Y. W. and Park, R. D. (2003) Characterization and kinetics of 45 kDa chitosanase from *Bacillus* sp. P16. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 1875-1882.
13. Seki, K., Nakamura, T., Shimoda, H., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. (2000) Family 8 chitosanase from *Bacillus* sp. No. 928. in *Proceeding 8th ICCO and 4th APCCS*. (Yamaguchi, Japan), p. 204.

14. Choi, Y. J., Ryu, M. J., Kim, E. J., Kim, Y. S. and Shin, Y. C. (1999) Characterization, commercial production, and applications of a chitosanase from *Bacillus* sp. KCTC0377BP. in *Proceeding International Symposium on Utilization of Chitin and Chitosan* (Mokpo, Korea), pp. 112-134.
15. Ozaki, K., Sumitomo, N. and Ito, S. (1991) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4-beta-glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2299-2305.
16. Mitsutomi, M., Isono, M., Uchiyama, A., Nikaido, N., Ikegami, T. and Watanabe, T. (1998) Chitosanase activity of the enzyme previously reported as  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase form *Bacillus circulans* WL-12. *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 2107-2114.
17. Ando, A., Noguchi, K., Yanagi, M., Shinoyama, H., Kagawa, Y., Hirata, H., Yabuki, M. and Fujii, T. (1992) Primary structure of chitosanase produced by *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**, 135-144.
18. Masson, J. Y., Denis, F. and Brzezinski, R. (1994) Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. *Gene* **140**, 103-107.
19. Masson, J. Y., Boucher, I., Neugebauer, W. A., Ramotar, D. and Brzezinski, R. (1995) A new chitosanase gene from a *Nocardioides* sp. is a third member of glycosyl hydrolase family 46. *Microbiology.* **141**, 2629-2635.
20. Ando, A., Fuchigami, H., Miyatsuchi, D. and Nakayama, S. (2000) Chitosanase gene of *Amycolatopsis* sp. CsO-2. in DataBase.
21. Okajima, S., Kinouchi, T., Mikami, Y. and Ando, A. (1995) Purification and some properties of a chitosanase *Nocardioides* sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **41**, 351-357.
22. Park, J. K., Shimono, K., Ochiai, N., Shigeru, K., Kurita, M., Ohta, Y., Tanaka, K., Matsuda, H. and Kawamukai, M. (1999) Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001. *J. Bacteriol.* **181**, 6642-6649.
23. Matsuda, Y., Iida, Y., Shinogi, T., Kakutani, K., Nonomura, T. and Toyoda, H. (2001) *In vitro* suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitosanase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitosanase gene csnSM1. *J. Gen. Plant Pathol.* **67**, 318-324.
24. Yoon, H. G., Kim, H. Y., Lim, Y. H., Kim, H. K., Shin, D. H., Hong, B. S. and Cho, H. Y. (2000) Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. strain CK4: cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3727-3734.
25. Tremblay, H., Blanchard, J. and Brzezinski, R. (2000) A common molecular signature unifies the chitosanases belonging to families 46 and 80 of glycoside hydrolases. *Can. J. Microbiol.* **46**, 952-955.
26. Shimosaka, M., Kuroiwa, K. and Okazaki, M. (2002) Cloning of a chitosanase gene from the fungus *Fusarium solani*. in DataBase
27. Shimosaka, M., Kumehara, M., Zhang, X. Y., Nogawa, M. and Okazaki, M. (1996) Cloning and characterization of a chitosanase gene from the plant pathogenic fungus. *Fusarium solani*. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 426-431.

28. Ando, A., Kobayashi, T., Morosawa, H., Okajima, S., Shinoyama, H. and Fujii, T. (1993) Molecular structure of chitosanase gene of *Bacillus circulans* MH-K1. *Tech. Bull. Fac. Hort.*, Chiba Univ. Japan **47**, 45-51.
29. Mitsutomi, M., Kidoh, H. and Ando, A. (1995) Action of chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Chitin Chitosan Res.* **1**, 132-133.
30. Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I. and Brzezinski, R. (1995) Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochem. J.* **311**, 377-383.
31. Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M. and Ohtakara, A. (1992) Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 448-453.
32. Fukamizo, T., Ohkawa, T., Ikeda, Y. and Goto, S. (1994) Specificity of chitosanase from *Bacillus pumilus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1205**, 183-188.
33. Uchida, Y., Takeda, H., Ohtuma, A. and Seki, K. (1995) Purification and properties of exo- $\beta$ -D-glucosaminidase from *Penicillium* sp. and its application. *Chitin Chitosan Res.* **1**, 138-139.
34. Seki, K., Kuriyama, H., Okuda, Y. and Uchida, Y. (1997) Molecular cloning of the gene encoding chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* UTK. *Adv. Chitin Chitosan* **2**, 284-289.
35. Uchida, Y. and Ohtakara, A. (1988) Chitosanase from *Bacillus* species. *Method Enzymol.* **161**, 501-505.
36. Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A. and Nanjo, F. (1991) Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta* **1079**, 65-72.
37. Ohno, T., Armand, S., Hata, T., Nikaidou, N., Henrissat, B., Mitsutomi, M. and Watanabe, T. (1996) A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organisms *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* **178**, 5065-5070.
38. Davies, G. and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853-859.
39. Sinnott, M. L. (1991) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**, 1170-1202.
40. McCartér, J. D. and Withers, S. G. (1994) Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 885-892.
41. Hollis, T., Honda, Y., Fukamizo, T. and Marcotte, E. (1997) Kinetic analysis of barley chitinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 335-342.
42. Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J. M. and Henrissat, B. (1996) Plant chitinases use two hydrolytic mechanisms. *FEBS Lett.* **382**, 186-188.
43. Fukamizo T., Koga D. and Goto S. (1995) Comparative biochemistry of chitinases-anomeric form of the reaction products. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 311-313.
44. Terwisscha, van., Scheltinga, A. C., Armand, S., Kalk, K. H., Isogai, A., Henrissat, B. and Dijkstra, B. W. (1995) Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* **34**, 15619-15623.
45. Armand, S., Tomita, H., Heyraud, A., Gey, C., Watanabe, T. and Henrissat, B. (1996) Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinase A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.* **343**, 177-180.
46. Marcotte, E., Hart, P. J., Boucher, J., Brzezinski, R. and Robertus, J. D. (1993) Crystallisation of a chitosanase from *Streptomyces* N-174. *J. Mol. Biol.* **232**, 995-996.
47. Sakon, J., Adney, W. S., Himmel, M. E., Thomas, S. R. and Karplus, P. A. (1996) Crystal structure of thermostable Family 5 endocellulase E1 from *Acidothermus cellulolyticus* in complex with cellotetraose. *Biochemistry* **35**, 10648-10660.
48. Dominguez, R., Souchon, H., Lascombe, M. B. and Alzari, P. M. (1996) The crystal structure of a Family 5 endoglucanase mutant in complexed and uncomplexed forms reveals an induced fit activation mechanism. *J. Mol. Biol.* **257**, 1042-1051.
49. Alzari, P. M., Souchon, H. and Dominguez, R. (1996) The crystal structure of endoglucanase CelA, a Family 8 glycosyl hydrolase from *Clostridium thermocellum*. *Structure* **4**, 265-275.
50. Marcotte, E. M., Monzingo, A. F., Ernst, S. R., Brzezinski, R. and Robertus, J. D. (1996) X-ray structure of an anti-fungal chitosanase from *Streptomyces* N174. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 155-162.
51. Shimozaki, M., Fukumori, Y., Zhang, X. Y., He, N. J., Kodaira, R. and Okazaki, M. (2000) Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 354-360.
52. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, D. S. D., Overbeek, R. and Kyrpides, N. (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**, 87-91.
53. Kimoto, H., Kusaoke, H., Yamamoto, I., Fujii, Y., Onodera, T. and Taketo, A. (2002) Biochemical and genetic properties of *Paenibacillus* glycosyl hydrolase having chitosanase activity and discoidin domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 14695-14702.
54. Akiyama, K., Fujita, T., Kuroshima, K., Sakane, T., Yokota, A. and Takata, R. (1999) Purification and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus ehimensis* EAG1. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 383-385.
55. Yamada, T., Hiramatsu, S., Songsri, P. and Fujie, M. (1997) Alternative expression of a chitosanase gene produces two different proteins in cells infected with *Chlorella virus* CVK2. *Virology* **230**, 361-368.