

Bacillus alcalophilus AX2000 유래 xylanase 유전자 (*XynT*)의 Cloning과 염기서열 분석**박 영 서***

경원대학교 생명공학부

Received June 10, 2005 / Accepted September 20, 2005

Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Xylanase gene (*xynT*) from *Bacillus alcalophilus* AX2000. Young-Seo Park*. *Division of Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea* – A gene coding for xylanase from alkali-tolerant *Bacillus alcalophilus* AX2000 was cloned into *Escherichia coli* DH5a using pUC19. Among 2,000 transformants, one transformant showed clear zone on the detection agar plate containing oat-spelts xylan. Its recombinant plasmid, named pXTY99, was found to carry 7.0 kb insert DNA fragment. When the nucleotide sequence of the cloned xylanase gene (*xynT*) was determined, *xynT* gene was found to consist of 1,020 base-pair open reading frame coding for a polypeptide of 340 amino acids with a deduced molecular weight of 40 kDa. The coding sequence was preceded by a putative ribosome binding site, and the transcription initiation signals. The deduced amino acid sequence of xylanase is similar to those of the xylanases from *Bacillus sp.* N137 and *B. stearothermophilus* 21 with 61% and 59% identical residues, respectively.

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

식물세포벽의 주요 hemicellulose인 xylan은 5탄당인 D-xylose가 β -1,4 결합을 하는 중합체로서 일반적으로 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등의 측쇄를 가지고 있는 복잡한 구조를 지니고 있다[8,9]. Xylan을 가수분해하여 xylose 또는 xylooligosaccharide로 전환시키는 효소인 xylanase는 동식물과 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있으며 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 β -1,4-xylanase [endo-(1,4)- β -D-xylanase (EC.3.2.1.8), exo-xylanase (EC.3.2.1.37)]가 있는데[12,14], 이들 중에서 β -1,4 xylanase가 xylan 가수분해의 주요 효소로 작용하고 있다. Xylanase는 자연계에 풍부한 목질계 바이오매스로부터 ethanol 등과 같은 바이오에너지의 생산, 목질계로부터 양질의 pulp 생산, 가축의 사료제조, 식품첨가물 등 생물공학산업에 유용하게 사용될 수 있어 그 산업적 중요성이 강조되고 있다[1,13].

Xylanase 유전자는 현재까지 50여종이 cloning되었으며 이 중 30여종의 xylanase 유전자의 염기배열 순서가 결정되어 xylanase의 발현기작, 분비기작 및 조절기작 등에 관한 기초적인 정보를 제공하고 있다. 최근 유전공학 및 단백질공학 등의 기법을 이용하여 xylanase의 구조와 기능과의 관계를 연구함으로써 유전자의 발현, 효소의 가수분해 효율, 기질 특이성, 그리고 효소의 안정성 등을 개선시키는 연구가 진행되고 있으며, DNA shuffling 등의 기법을 이용하여 새로운 활성을 지니는 xylanase를 제조하는 연구도 이루어지고 있다. 특히, 중성에서는 불용성인 xylan이 알칼리에서는 잘 용해되

며, pulp 제조공정에서는 강알칼리 조건에서 표백공정이 이루어지기 때문에 호알칼리성 xylanase에 관한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

본 연구에서는 토양으로부터 분리한 알칼리 내성 *Bacillus* 균주의 chromosomal DNA로부터 xylanase 유전자를 cloning 하여 그 염기배열순서를 결정한 후 이로부터 전사, 번역 등 유전자 발현에 관련된 구조를 분석하였다.

본 연구에 사용된 xylanase 유전자의 공여균주로는 pH 10에서 최적 효소활성을 지니는 호알칼리성 xylanase를 생산하는 *Bacillus alcalophilus* AX2000[4]을 사용하였다. Xylanase 효소의 활성 측정은 1%의 xylan 용액(oat-spelts xylan in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 기질로 사용하여 Somogyi-Nelson의 환원당 정량법[7]에 의하여 수행하였으며 효소 1 U는 주어진 조건에서 분당 1 μ mol의 D-xylose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

Xylanase 유전자를 cloning하기 위하여 Wizard Genomic DNA Purification System (Promega, USA)을 이용하여 *B. alcalophilus* AX2000으로부터 분리된 chromosomal DNA를 *Pst*I로 부분 절단한 후 pUC19에 ligation시킨 다음 *E. coli* DH5a에 형질전환시켰다[5]. LB/Ap/X-Gal/IPTG 배지[5]에서 형성된 형질전환체 중에서 white colony를 나타내는 약 2,000주의 재조합체를 0.5%의 oat-spelts xylan이 함유된 LB 한천배지에 배양시킨 결과 colony 주위에 투명환을 생성하는 균주를 얻었다. 이 균주로부터 plasmid DNA를 분리한 후 제한효소 분석을 실시한 결과 pUC19의 *Pst*I 부위에 7.0 kb의 DNA 단편이 삽입되었음을 확인하였으며 이 재조합 균주의 xylanase 활성을 측정한 결과 0.24 U/ml로 나타나 vector 내에 xylanase 유전자가 cloning되었음을 확인하였고,

***Corresponding author**

Tel : +82-31-750-5378, Fax : +82-31-750-5273

E-mail : ypark@kyungwon.ac.kr

이 재조합 plasmid DNA를 pXTY99로 명명하였다. pXTY99의 제한효소 분석과 효소활성 측정에 의해 xylanase 유전자가 존재하는 것으로 확인된 2.27 kb의 *Clal*-*PstI* DNA 단편의 염기서열결정을 기초과학연구원 연구소에 의뢰하여 ABI

자동염기분석기로 수행하였다. 그 결과 xylanase 유전자를 함유한 삽입 DNA의 크기는 2,279 bp로 확인되었으며 Vector NTI DNA 분석프로그램(InforMax, USA)을 사용하여 그 염기서열을 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 DNA 단편

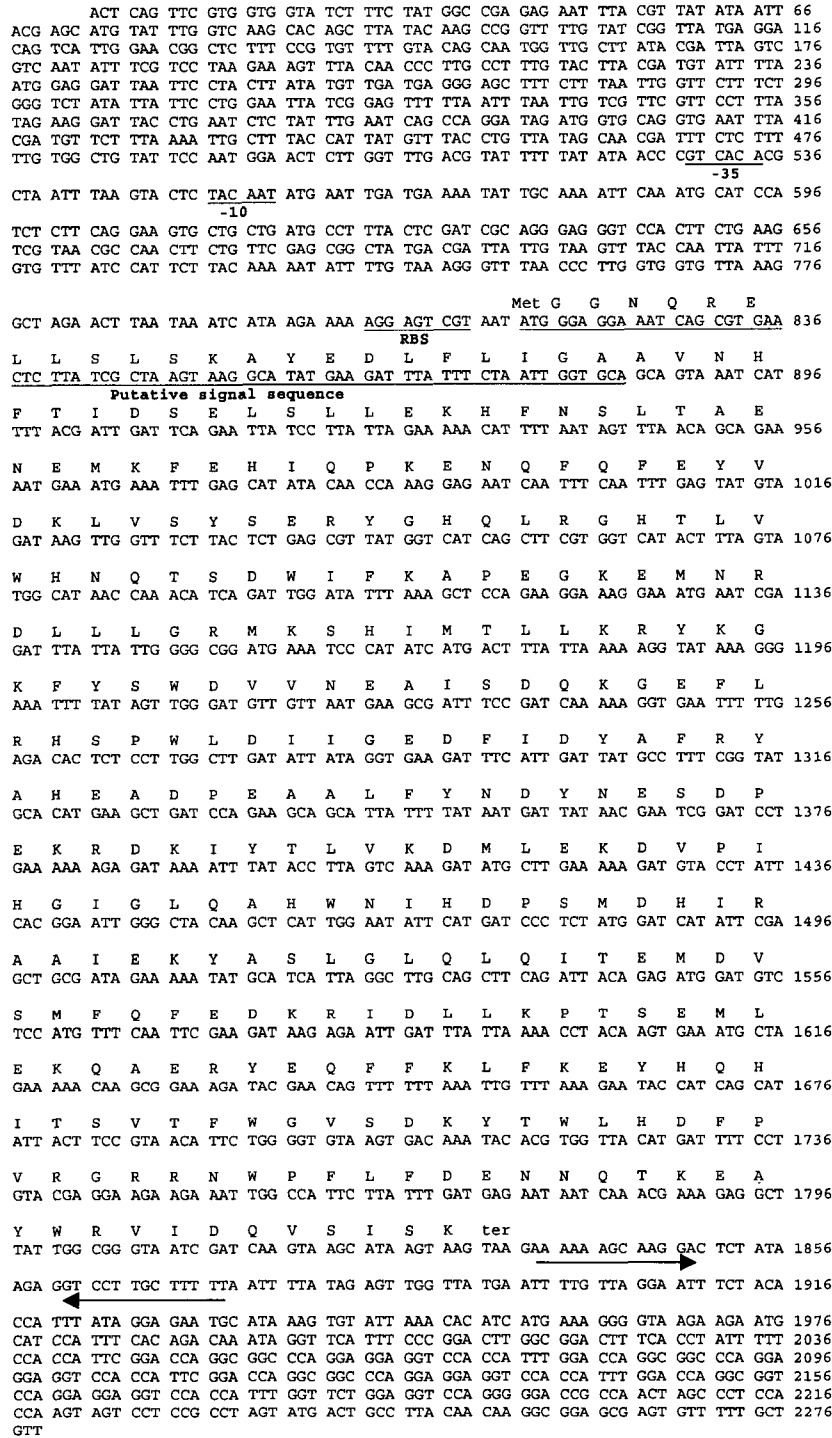


Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the xylanase gene (*xynT*). The deduced -10 box, -35 box, and ribosome binding site (RBS), and the putative signal sequence were underlined. The putative transcription terminator was also underlined with arrowhead.

에는 ATG 개시코돈으로 시작되는 1,020 bp의 open reading frame이 한 개가 존재하는 것으로 확인되었고, 이를 xylanase 유전자인 것으로 확인하여 *xynT*라 명명하였다(GenBank accession number: AY423561). Xylanase를 coding하고 있는 이 open reading frame은 340개의 아미노산으로 구성되어 있으며 추산 분자량이 40 kDa인 하나의 polypeptide 분자의 유전정보를 지니고 있었다. *Bacillus* 중에는 pI가 낮으면서 분자량이 높은 종류와 pI가 높으면서 분자량이 낮은 종류가 있는데 본 xylanase의 pI는 5.6으로 계산되어 pI가 낮으면서 분자량이 높은 종류에 속하는 효소로 확인되었다.

대부분의 xylanase는 *Bacillus*의 영양세포 단계에서 생합성되어 분비되므로 영양세포단계의 유전자 발현에 관계하는 RNA 중합효소의 σ^A 인자가 유전자의 전사과정에 관여하는 것으로 알려져 있다[6]. 본 연구에서 사용된 xylanase 역시 *B. alcalophilus* AX2000의 영양세포에서 생산되므로 *xynT* 유전자의 염기배열에서 *Bacillus*의 σ^A 인자가 인식하는 promoter 구역을 검색해 본 결과 Fig. 1에서와 같이 ATG 개시코돈으로부터 각각 259와 282 base 상류에 -10 box와 -35 box로 추정되는 공통염기배열의 존재를 확인하였다. TACAAT의 염기서열을 가진 -10 box의 경우는 *B. subtilis*의 σ^A 인자가 인식하는 promoter의 공통염기배열인 TATAAT와 5개의 염기가 일치하였고, -35 box의 GTCACA는 공통염기배열인 TTGACA와 6개 중 4개의 염기가 일치하여 비교적 잘 보존되어 있음을 알 수 있었다. 또한 -10 box와 -35box 사이의 간격도 17 bp로 매우 효율적인 promoter 구조임을 알 수 있었다.

또한 본 유전자의 3' 말단의 하류에는 13 base로 이루어진 상보적 역반복 서열이 10개의 염기를 사이에 두고 존재하여 mRNA로 전사될 때 stem-loop 구조가 형성될 수 있음을 확인하였다. 그러나 stem-loop 구조 내에 GC-rich한 부위가 존재하지 않았기 때문에 이 구역은 p-factor 의존성 전사 terminator로 작용할 것으로 추측되었다.

본 xylanase 유전자에는 AUG 개시코돈으로부터 6 bp 상류에 16S rRNA의 3' 말단 부위와 상보적으로 결합할 수 있는 5'-AGGAGU-3' 염기배열을 지니고 있어, 이 부위가 ribosome 결합부위인 것으로 판단하였다. 개시코돈은 *B. subtilis*의 대부분의 유전자에서 AUG가 가장 많이 사용되며 GUG는 *spoE* 유전자와 *spoVG* 유전자 등에서 일부 사용되고

있으며[3] UUG는 *Staphylococcus aureus*의 β -lactamase 유전자와 *Bacillus phage*인 SPO1의 middle gene 등 극히 제한적으로 사용되고 있는데, 본 *xynT* 유전자의 번역 개시코돈은 AUG로 가장 일반적인 개시코돈을 사용하고 있었다.

한편 본 xylanase는 *B. alcalophilus* AX2000에서 세포 밖으로 분비되므로 signal peptide가 존재할 것으로 예상되었다. 본 xylanase의 hydropathy plot을 살펴본 결과 N 말단 부분에 소수성 부위가 존재하는 것으로 나타나 첫 번째 아미노산으로부터 23번째 아미노산인 alanine까지의 부위가 signal peptide인 것으로 추측되어지며 signal peptidase의 전형적인 절단 부위인 23번째와 24번째에 존재하는 alanine과 alanine사이에서 절단이 이루어지는 것으로 사료되었다(data not shown). 정확한 signal peptide의 위치를 알기 위해서는 세포외로 분비된 효소를 정제한 후 N 말단 아미노산서열 결정 실험이 요구된다. 본 xylanase의 amino acid의 함량은 Table에서 보는 바와 같이 leucine이 9.41%로 가장 많았고 다음이 glutamic acid로 8.82%였으며 lysine과 aspartic acid가 7.35%를 나타낸 반면 cysteine 잔기는 존재하지 않았다.

Xylanase는 구조와 아미노산서열에 기초한 glycoside hydrolase의 분류상 GH10과 GH11 family로 분류된다. GH10 family에 속하는 xylanase는 모두 $(\beta/a)_8$ 구조를 지니는 촉매 부위를 지니고 있으며 평균 분자량은 40 kDa이다. GH11 family에 속하는 xylanase는 GH10 xylanase보다 분자량이 더 작으며(약 20 kDa) β -jelly 구조를 보여준다. 본 xylanase의 아미노산 서열을 NCBI Blastp 프로그램을 이용하여 database를 검색한 결과 GH10에 속하는 xylanase로 확인되었으며 다른 생물 유래의 xylanase와의 유사성을 알아보기 위하여 CLUSTALW program을 이용하여 homology alignment를 작성한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 여러 xylanase 중에서 본 연구에 사용된 *B. alcalophilus* AX2000의 xylanase와 가장 유사성이 높은 xylanase는 *Bacillus* sp. N137 유래의 xylanase로 61%의 아미노산이 동일하였으며 그 다음으로 *B. stearothermophilus* 21(59%)과 *B. stearothermophilus* T-6(57%) 유래의 xylanase 순으로 유사성이 높았다. 현재까지 xylanase의 활성부위에 관한 연구가 여러 연구진들에 의해 보고되었는데, Wakarchuk 등[11]은 *B. circulans*가 생산하는 xylanase의 활성부위에는 Glu⁷⁸과 Glu¹⁷²가 관여한다고 보고하였고

Table. Amino acid composition of xylanase from *B. alcalophilus* AX2000

Codon	No. (%)	Codon	No. (%)	Codon	No. (%)
Gly	15 (4.41)	Ala	17 (5.00)	Ser	21 (6.18)
Thr	12 (3.53)	Val	14 (4.12)	Leu	32 (9.41)
Ile	20 (5.88)	Pro	10 (2.94)	Cys	0 (0.00)
Met	10 (2.94)	His	16 (4.71)	Tyr	16 (4.71)
Asp	25 (7.35)	Glu	30 (8.82)	Lys	25 (7.35)
Arg	16 (4.71)	Asn	14 (4.12)	Gln	16 (4.71)
Phe	21 (6.18)	Trp	9 (2.65)	TER	1 (0.29)

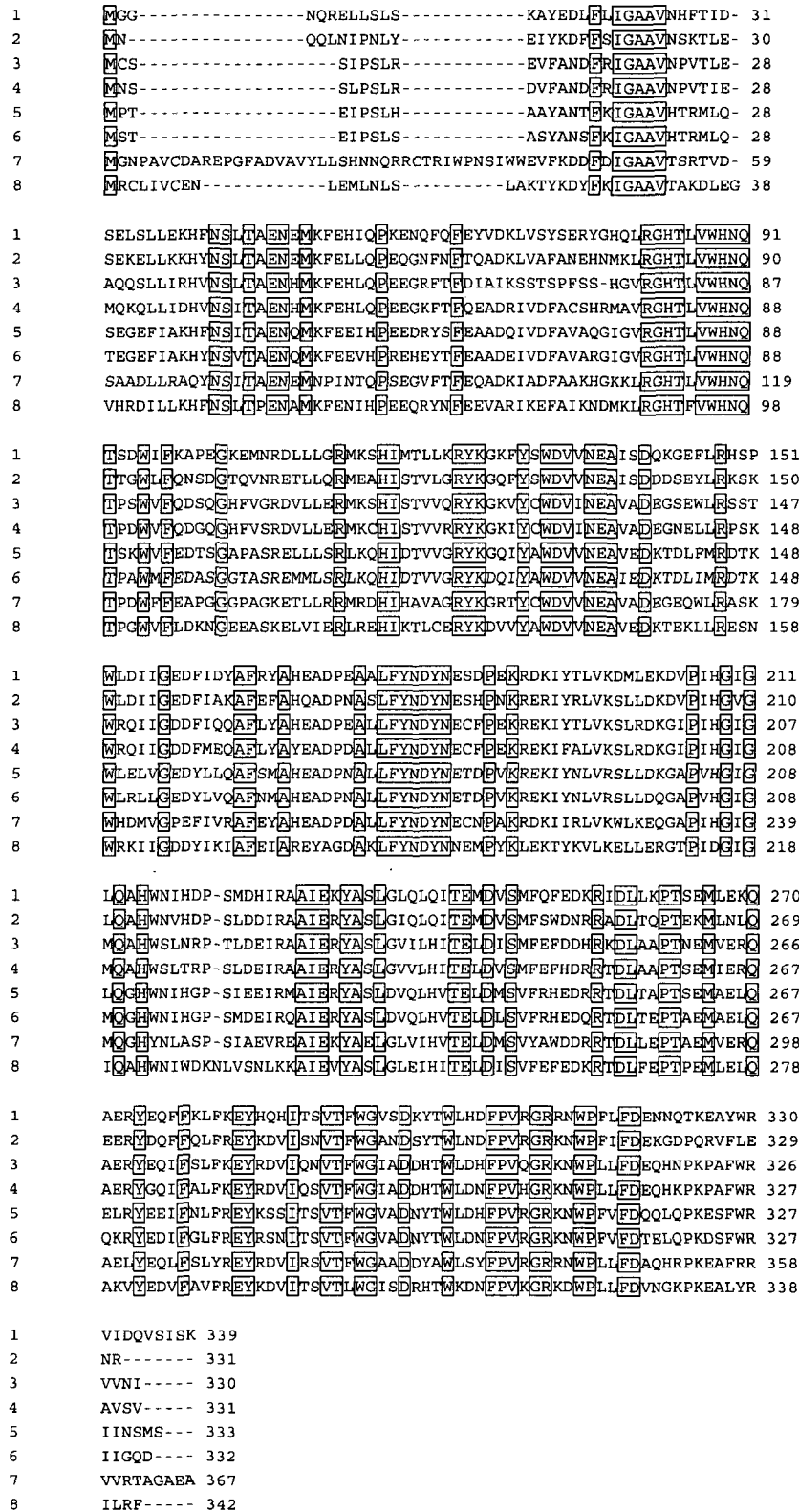


Fig. 2. Alignment of xylanase amino acid sequence from *B. alcalophilus* AX2000 and other sources. Asterisks show the putative amino acid residues which are involved in active sites of xylanases.

- 1, *B. alcalophilus* AX2000; 2, *Bacillus* sp. N137; 3, *B. stearothermophilus* 21; 4, *B. stearothermophilus* T-6; 5, *Aeromonas punctata* ME-1; 6, *Bacillus* sp. BP-23; 7, *Thermobacillus xylanilyticus* D3; 8, *Caldicellulosiruptor saccharolyticum*.

Clostridium thermocellum[15], *Dictyoglomus thermophilum*[2], *Thermotoga neapolitana*[10] 등에서도 glutamic acid 부위가 xylanase의 활성부위에 존재한다고 보고된 바 있다. *B. alcalophilus* AX2000의 xylanase의 48번째와 137번째 glutamic acid는 *B. circulans* xylanase의 Glu⁷⁸과 Glu¹⁷²에 해당하는 아미노산이며 Fig. 2에서 비교한 모든 xylanase가 이 위치에 glutamic acid를 지니고 있어 이 부위의 아미노산이 본 xylanase의 활성부위와 관련되었을 것으로 판단되었다.

요 약

Xylanase를 생산하는 알칼리 내성 *Bacillus alcalophilus* AX2000의 chromosomal DNA로부터 xylanase 유전자를 cloning하여 그 염기배열 순서를 결정한 다음 이로부터 유전자 발현에 관련된 구조를 분석하였다. Xylanase 유전자의 cloning을 위해 제한효소 *Pst*I로 절단한 *B. alcalophilus* AX2000의 chromosomal DNA와 pUC19를 ligation 시켜 *E. coli* DH5a에 형질전환시킨 후 형질전환체 중에서 xylanase 활성을 나타내는 재조합 plasmid pXTY99를 분리하였다. 재조합 plasmid pXTY99은 pUC19의 *Pst*I 부위 내에 7 kb의 외래 DNA가 삽입되었다. Cloning된 xylanase 유전자(*xynT*)의 염기배열을 분석한 결과 유전자의 크기는 1,020 bp이었고 이는 340개의 아미노산으로 구성된 분자량 40 kDa의 polypeptide를 coding하고 있었다. 이 염기배열은 AUG 개시 codon으로부터 각각 259와 282 base 상류에 TACAAT의 -10 box와 GTTCACA인 -35 box로 추정되는 염기배열이 존재하였으며 ribosome 결합부위가 존재하였다. *B. alcalophilus* AX2000의 xylanase와 아미노산배열의 유사성이 가장 높은 xylanase는 *Bacillus* sp. N137과 *B. stearothermophilus* 21 유래의 xylanase로 각각 61%와 59%의 유사성을 나타내었다.

참 고 문 헌

- Kulkarni, N., A. Shendye, M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 411-456.
- 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.
- 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.
- Park, Y. S. and T. Y. Kim. 2003. Isolation of *Bacillus alcalophilus* AX2000 producing alkaline xylanase and its enzyme production, *Korean J. Microbol. Biotechnol.* **31**, 157-164.
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular cloning - A laboratory manual*. 3rd eds., CSHL Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Shorenstein, R. G., 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.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determinations. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
- Timell, T. E. 1965. Wood hemicelluloses: Part II. *Carbohydr. Chem.* **20**, 409-483.
- Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**, 45-70.
- 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.
- Wakarchuk, W. W., R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi, M. Taguchi M. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**, 467-475.
- Warren, R. A. J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 183-212.
- Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, In: *Hemicellulose and hemicellulases* (Coughlen, P. P. and G. P. Hazlewood, eds), pp. 127-143, Portland Press, London.
- Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganism: Functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317.
- Xie, H., H. J. Gilbert, S. J. Charnock, G. J. Davies, M. P. Williamson, P. J. Simpson, S. Raghothama, 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.