

백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*에서 유래한 Manganese Peroxidase Gene(*mnp5*)의 *Pichia* *pastoris*에서의 이종발현*¹

이재원*² · 양인*² · 五十嵐圭日子*³ · 鮫島正浩*³ · 최인규*^{2†}

Expression of a Manganese Peroxidase Gene (*mnp5*) from White rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in the *Pichia pastoris**¹

Jae-Won Lee*² · In Yang*² · Kiyohiko Igarashi*³ · Masahiro Samejima*³ · In-Gyu Choi*^{2†}

요 약

백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 유래한 Manganese peroxidase (*mnp5*)를 methylotrophic yeast인 *Pichia pastoris*에서 이종 발현을 하였다. 이종발현으로부터 얻어진 단백질은 클로닝으로부터 예상되어지는 분자량보다 높은 분자량인 45 kDa으로 나타났다. 이것은 *mnp5*가 가지고 있는 glycosylation site에 의한 것이며, N-linked hyperglycosylation이 효소 활성에 영향을 미치는지를 site direct mutation에 의해 확인하였다. Sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)와 Coomassie Brilliant Blue (CBB)염색에 의해 분자량을 확인한 결과 약 37 kDa으로 나타났으며, 효소활성을 측정한 결과 glycosylation이 효소 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구로부터 *P. pastoris*에서 *mnp5*의 이종 발현이 성공적으로 이루어졌으며 이러한 결과로부터 heme을 포함하고 있는 단백질의 이종발현 생산의 가능성을 보여주었다.

ABSTRACT

The manganese peroxidase (*mnp5*) from white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* has been

*¹ 접수 2005년 5월 16일, 채택 2005년 6월 8일

*² 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부 Department of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*³ 동경대학교 농업생명과학대학원 Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

† 주저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

heterologously expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The majority of the rMnP5 (recombinant MnP5) produced by *P. pastoris* exhibited an approximate molecular mass 45 kDa considerably larger than that of the predicting *mnp5* due to two glycosylation sites of *mnp5*. After site direct mutation treatment, the effect of *N*-linked hyperglycosylation was examined by enzyme activity. Analysis by sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining revealed a major protein band with a molecular mass of 37 kDa. Enzyme activity of M-rMnP5 (mutant recombinant MnP5) was similar to that of rMnP5, indicating that hyperglycosylation did not affect the active site.

In this work, active *mnp5* was successfully expressed in *P. pastoris*, suggesting that *P. pastoris* has potential capability of producing active heme-containing proteins.

Keywords: *Phanerochaete chrysosporium*, manganese peroxidase, methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, glycosylation

1. 서 론

백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*가 생산하는 균체 외 효소 중 lignin peroxidase (LiP)(EC 1.11.1.7), manganese peroxidase (MnP)(EC 1.11.1.7)는 목재구성성분인 리그닌뿐만 아니라, 리그닌과 유사한 구조를 가지는 다양한 환경오염물질을 분해한다(안 등, 1998; 최 등 1998; 최 등 2002; 이 등 2004; 이 등 2005; Lee *et al.*, 2004). 난분해성인 환경오염물질들은 낮은 redox potential을 갖는 peroxidase에 의해서는 산화되지 않는다(Kersten *et al.*, 1990) 반면 LiP와 MnP는 담자균이 생산하는 H₂O₂와 함께 phenolic과 nonphenolic 기질을 산화시키는 능력을 가지고 있다(Forney *et al.*, 1982). 독특하게 MnP는 Mn²⁺를 Mn³⁺로의 산화를 촉매하며 lactate, tartrate와 같은 α -hydroxy acid나 malonate, oxalate와 같은 dicarboxylic acid chelator의 존재에서 Mn³⁺-chelator complex를 형성한다. 이러한 complex는 다양한 phenols, amines와 같은 난분해성 물질을 효과적으로 산화한다(Kirk *et al.*, 1998). 이와 같은 리그닌 분해효소는 난분해성 물질 분해, 펄프 종이 산업에서 kraft pulp의 prebleaching 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 하지만 이들 효소들은 많은 isozyme을 가지고 있어 각각의 isozyme에 대한 연구가 필요한 실정이다. 최근 isozyme의 구조 및 특성을 구명하기 위한 방법으로 계층정보를 이용한 이중 발현 시스템

에 대한 연구가 진행되고 있다.

P. chrysosporium 유래의 MnP는 5개의 isozyme이 있다는 것이 최근 보고되었으며, 이중발현으로 isozyme의 구조 및 특성에 대한 연구는 *mnp1*에 대해서 이루어졌으며 아직까지 4종류의 isozyme에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이중 발현 숙주로 *Escherichia coli*를 이용한 *mnp1* 발현 시스템에 대한 연구는 nonglycosylation 산물을 얻을 수 있고 native 효소와 비슷한 활성을 나타냈지만 inclusion bodies를 생산하고 anaerobic 조건에서 heme와 calcium을 첨가해야 하는 단점을 가지고 있다(Whitwam *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 1996). *Aspergillus niger* (Conesa *et al.*, 2000), *A. oryzae* (Stewart *et al.*, 1996)를 이중 발현 숙주로 사용한 연구도 이루어져 왔으며 *A. oryzae*에서 이중발현을 위해서는 500 mg/L의 hemin이 요구되고 *A. niger*에서는 5 g/L의 hemoglobin이 요구된다.

반면 이중발현 숙주로 methylotrophic yeast인 *Pichia pastoris*를 사용함으로써 이와 같은 단점을 해결할 수 있었다. *P. pastoris*는 진핵생물 발현 시스템에 적합한 생물로서 진핵생물 이중발현 효소 생산을 위해 사용되었다(Cereghino *et al.*, 2000; Gellissen *et al.*, 2000). 최근 *P. chrysosporium*에서 유래한 cellobiose dehydrogenase (CDH)는 alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter의 제어에 의해 이중 발현되었고 wild-type CDH보다 높은 수준의 발현량을 보인 연구

Table 1. Oligonucleotides used as primers for PCR

Site	Oligonucleotide
Forward	5'TTTGAATTTCGCCTGTCTGTCCCGACGGCACA3'
Reverse	5'TTTGCGGCCGCTCAAGCCGGCCGTCGAAGCTG3'

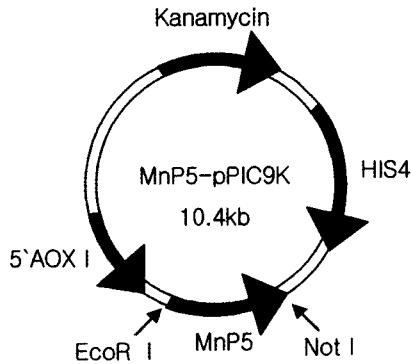


Fig. 1. Construction of MnP5-pPIC9K.

결과도 보고된 바 있다(Yoshida *et al.*, 2001). 또한 *P. pastoris*는 nitric oxide synthase (Gachhui *et al.*, 1996; Leber *et al.*, 1999; Mertens *et al.*, 2000), nitric reductase (Skipper *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2001)와 같은 heme 단백질들을 성공적으로 이종발현을 통하여 생산한 연구도 보고된 바 있다.

본 연구에서는 methanol 첨가로 alcohol oxidase 1의 제어에 의해 유도되는 형질전환 효소를 균체외로 생산하는 methylotrophic yeast인 *P. pastoris*을 이용하여 5개의 MnP isozyme 중에서 펄프 bleaching에 관여하는 *mnp5*의 이종발현 가능성을 확인해 보고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균

Phanerochaete chrysosporium K-3은 일본 동경대학교 농학생명과학 연구과로부터 분양받아 사용하였고, potato dextrose agar (PDA)배지에서 배양한 후 실험에 사용하였다. E.Z.N.A fungal RNA kit를 이용하여 균사로부터 RNA 추출을 하여 cDNA를 합성하

였으며, 이종 발현에 사용되는 숙주는 Invitrogen Corp.의 methylotrophic yeast *Pichia pastoris* KM71을 사용하였다.

2.2. *mnp5* 유전자 클로닝

DOE Joint Genome Institute (JGI) genome 정보로부터 프라이머를 설계하였고 이들의 염기서열은 Table 1과 같다. 프라이머 설계시 제한효소 *Not I*과 *EcoR I* 염기서열을 첨가하였다. *mnp5* 유전자 증폭을 위한 Polymerase Chain Reaction (PCR) 조건은 94°C에서 2분 동안 변성반응을 실시하고, 94°C에서 30초, 68°C에서 1분 30초 동안 결합 반응을 실시한 후, 68°C에서 2분 확장반응을 실시하였다. PCR 산물에 대한 염기 서열을 확인하기 위해 PCR 산물과 클로닝 벡터 pGEM (Invitrogen Corp.)은 ligation kit (takara bio)에 의해 결합된 후 반응능세포(competent cell)로 *E. coli*를 이용하여 열 충격(heat shock) 방법으로 형질전환 하였다. 형질전환된 *E. coli*로부터 plasmid를 추출하여 Sequencer (SQ 5500, HITACHI)를 이용하여 염기서열을 확인하였다.

2.3. 발현 벡터 설계

PCR로부터 얻은 제한효소 *Not I*, *EcoR I*을 포함한 *mnp5*는 제한효소 *Bpu I*로 절단하여 원형의 plasmid를 직선으로 만든 후 이종발현 벡터 pPIC9K (Invitrogen Corp.)에 삽입하였다. pPIC9K벡터는 alcohol oxidase promoter (5' AOX I)와 항생제 kanamycin site를 포함하고 있으며 *mnp5*는 α -factor (secretion-signal sequence)에 인접해 있어 5' AOX I에 의해 발현되었다. 이종발현을 위한 벡터 구조는 Fig. 1과 같다.

Table 2. Oligonucleotides used as primers for RT-PCR

Site	Oligonucleotide
N137Q-F	5'GGTCGCCCCGAAACGACTATT3'
N137D-F	5'GGTCGCCCCGGACACGACTATT3'
N233Q-R	5'ACCGGTGTTTTGGGCCGTTCC3'
N233D-R	5'ACCGGTGTGTGTCGGCCGTTCC3'

2.4. *Pichia pastoris*에서의 발현

*P. pastoris*의 농도가 OD₆₀₀=1.3~1.5가 되면 pPIC9K-MnP5를 electroporation에 의해 형질 전환한 후 1 M sorbitol에 넣고 혼합하여 30°C에서 1시간 배양하였다. 배양 후 항생제 kanamycin을 이용하여 pPIC9K-MnP5를 포함하고 있는 colony를 선택한 후 1 ℓ에 yeast extract 1 g, polypeptone 2 g, glycerol 1 ml를 포함한 배지에 접종하여 30°C에서 3일 동안 배양하였다. 단백질 유도를 위해 위 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거한 후 1 ℓ에 yeast extract 1 g, polypeptone 2 g을 포함한 배지를 첨가하였으며 methanol 1%와 hemin 0.01%를 첨가하여 26.5°C에서 배양하면서 단백질 유도를 관찰하였다.

2.5. *mnp5* glycosylation site의 mutation

Glycosylation site가 효소활성에 관여하는지를 확인하기 위해 site direct mutation으로 glycosylation site를 mutation하였다. Mutation을 위해(asparagine을 glutamine이나 aspartic acid로 mutation) *mnp5* 클로닝 결과로부터 프라이머를 설계하였으며, 그 염기서열은 Table 2와 같다. PCR로 대상 유전자를 증폭하였고, PCR산물에 대한 염기서열은 sequencer로 확인하였다.

2.6. Purification

rMnP5 (Recombinant MnP5)와 M-rMnP5 (Mutant recombinant MnP5)의 배양액을 1% bentonite 처리

한 후 원심분리하였고, 상등액을 PM-10 ultrafiltration membrane (Amicon Inc., USA)을 이용하여 농축하였다. 농축액은 다시 QAE 550C (Toyo pearl) column을 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 분자량을 확인하였다.

2.7. 효소 활성 측정

rMnP5 활성은 흡광도 469 nm에서 기질 0.1 mM 2,6-dimethoxyphenol ($\epsilon_{469}=49.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 산화에 의해 측정하였다. H₂O₂ 농도는 $\epsilon_{240}=43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 적용하여 계산하였고 반응액으로는 0.5 mM MnSO₄, 50 mM sodium malonate (pH 4.5), 0.1 mM 2,6-dimethoxyphenol과, 조효소액으로 조성되었으며 0.1 mM H₂O₂을 계일 나중에 넣어 반응을 개시하여 manganese peroxidase 효소활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *mnp5* gene 클로닝

*P. chrysosporium*으로부터 유래한 MnP5 아미노산 서열은 Fig. 2와 같다. *P. chrysosporium*으로부터 유래한 *mnp5*를 형질전환하여 염기서열을 분석한 결과 381 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, SignalP 3.0 Server에 의해 23 아미노산 잔기의 signal peptide가 존재하는 것을 확인함으로써 균체 외 효소임을 알 수 있었다. 전체 아미노산 잔기로부터 예상되는 분자량은 37 kDa이지만 2곳의 glycosylation site가 존재하여 37 kDa 이상의 분자량이 예상되었다. *P. chrysosporium*으로부터 유래한 *mnp1*과 *lip*의 x-ray 구조와 *Arthromyces ramous*, *Coprinus cinereus*로부터 유래한 peroxidase의 아미노산 배열과의 상동성을 조사한 결과 Mn-binding site는 Glu⁵⁹ Glu⁶³ Asp²⁰³, Calcium binding site로는 Asp⁷¹, Asp⁸⁸, Ser⁹⁰, Heme binding site로는 His⁶², Ile⁶⁵, Arg⁶⁶, Phe⁶⁹, His⁷⁰으로 예측되었다(Sundaramoorthy *et al.*, 1994).

```

001 MAFSTLLAFVALAAVTLAAPT TDTAVCPDGTRVSNAACCA 040
041 FVPLAQDLQETLFMGDCGEDAHEVIRLTFHDAIAISQSQG 080
081 PEAGGGADGSMLLFPTIEPNFEANNGIDDSVNNLIPFMQK 120
121 HNTISAADLVQFAGAVALSNC PGAPRLEFLAGR[NTTI]PA 160
161 VEGLIPEPQDSVTKILQRFEDAGNFSPFEVVSLLASHSIA 200
201 RADKVDETIDAAPFDSTPFTFDTQVFLEVLLKGTGFPGTA 240
241 [NNTG]EVASPLPLGSGTDTGEMRLQSDFALARDSRTACIWQ 280
281 SFVNQQEFMAASFKAAMSKLAILGHSRSNLIDCSDVVPVP 320
321 KPAVNKPFATKGPQDLELTCTSEKFPTLTDPGATET 360
361 LIPHCNNGMSCPAVQFDGPA
    
```

————— : Signal peptide [] : Glycosylation site

Fig. 2. Amino acid sequence of *mnp5* derived from *P. chrysosporium*.

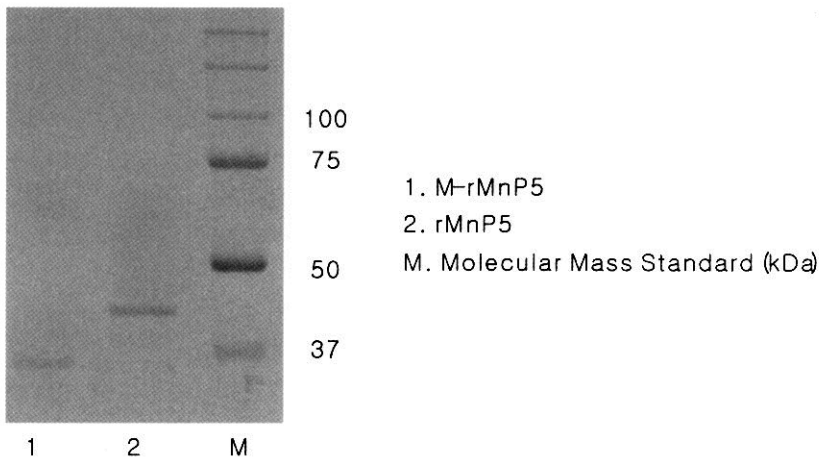


Fig. 3. SDS-PAGE of purified rMnP5 and M-rMnP5.

3.2. *mnp5* glycosylation site의 mutation

이종발현계에서 발생하는 glycosylation은 50~150 개의 당이 연결된 당쇄로서 glycosylation site가 효소의 활성중심에 인접해 있을 경우 효소 활성을 방해하거나 기질과의 접촉을 저해하여 단백질은 생산하지만 활성을 갖지 못하는 경우가 발생한다. 특히 *P. pastoris*는 N-acetylglucosamine 잔기에 mannose oligosaccharides가 연결된 N-glycosylated protein을 생산한다(Cereghino *et al.*, 2000). 따라서 glycosylation site가 효소 활성에 영향을 미치는지의 여부

를 확인하기 위해 site direct mutation을 실시한 결과, N-glycosylation의 전형적인 아미노산 패턴은 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T)으로 carbohydrate-binding site의 특징을 가지고 있으며(Cereghino *et al.*, 2000) *mnp5*에서는 Asn¹⁵⁵, Asn²⁴¹ 2곳에서 glycosylation site가 발견되었다.

Site direct mutation에 의해 glycosylation site인 NTTI에서 고유의 아미노산 잔기인 asparagine (N)이 친수성의 aspartic acid (D)로 NNTG의 asparagine (N)이 친수성의 glutamine (Q)으로 mutation 되어진 것을 *E. coli*에서 형질전환하여 sequence로 염기서열을 확인할 수 있었다.

Table 3. Purification and activity of recombinant MnP5 from *P. chrysosporium*

Purification step	Total volume (ml)	Protein (mg/ml)	Volume activity (U/ml)	Total activity (U)	Specificactivity (U/mg)
Crude culture	1600	0.021	0.024	39	1.14
Ultrafiltration	20	0.224	15	30	6.69
QAE 550C	26	0.050	0.9	23	16.0

Table 4. Purification and activity of mutant-recombinant MnP5 from *P. chrysosporium*

Purification step	Total volumn (ml)	Protein (mg/ml)	Volume activity (U/ml)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)
Crude culture	1600	0.022	0.022	35	1.00
Ultrafiltration	20	0.219	1.39	28	6.35
QAE 550C	26	0.048	0.8	21	16.6

3.3. Purification

2곳의 glycosylation site를 가지고 있는 rMnP5는 purification step에 의해 정제되어 분자량이 SDS-PAGE로부터 37 kDa 이상인 것으로 확인되어 N-linked hyperglycosylation 되었음을 알 수 있었다. *P. chrysosporium*으로부터 유래한 wild type의 경우 46 kDa이고, rMnP1은 55~100 kDa이며 deglycosylation된 것은 약 55 kDa으로 보고되고 있다 (Stewart *et al.*, 1996). *Phanerochaete sordida*로부터 유래한 MnP1, MnP2, MnP3는 약 45 kDa으로 나타났다(Carmen *et al.*, 1994). 따라서 *P. chrysosporium*으로부터 유래한 MnP5는 이와 비슷한 분자량을 갖는 것으로 확인되었다.

Glycosylation site가 효소 활성에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 deglycosylation한 M-rMnP5를 purification step에 의해서 정제한 결과 예상 분자량인 37 kDa을 확인할 수 있었다. SDS-PAGE 결과는 Fig. 3과 같다.

3.4. 효소 활성 측정

Purification step에 의해 정제되어진 M-rMnP5의 효소활성은 16.6 U/mg으로, rMnP5의 효소활성 16 U/mg과 차이를 보이지 않은 것으로 보아 glyco-

sylation는 효소 활성에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다. rMnP5의 정제 후 효소활성은 Table 3과 같고, M-rMnP5에 대한 효소 활성은 Table 4와 같다. M-rMnP5와 rMnP5의 효소 활성은 적정 pH, 산소 조절 등을 고려한다면 보다 높은 효소 활성을 가질 것으로 사료된다.

4. 결 론

진핵생물 고유의 단백질 발현 시스템인 *P. pastoris* 이중발현계를 이용하여 *P. chrysosporium*으로부터 MnP5의 대량생산을 시도하였다. 우선 이중발현을 위해 *mnp5*를 클로닝한 결과 *mnp5*는 381 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 균체 외 효소만이 가지고 있는 소수성잔기로 구성된 signal peptide가 methionine 다음에 23 잔기로 구성되어 있음을 확인함으로써 MnP5가 균체 외 효소임을 확인하였다. 진핵생물 고유의 glycosylation site를 가지고 있어 예상분자량보다 높은 분자량을 나타냈으며, M-rMnP와 rMnP5의 효소 활성이 차이를 보이지 않은 것으로 보아 glycosylation는 효소 활성에는 크게 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구로 methylotrophic yeast인 *P. pastoris*의 이중발현계를 이용한 *P. chrysosporium*에서 유래한 heme 단백질인 MnP5의 대량생산 가능성을 보여주

었다.

사 사

이 연구는 한국과학재단에서 지원한 해외공동연구 과제 수행결과입니다.

참 고 문 헌

1. 안세희, 최인규. 1998. 목질분해균에 의한 4,5,6-tri-guaiacol의 미생물 분해. 목재공학 26(3): 63~72.
2. 이수민, 구본옥, 이재원, 최돈하, 정의배, 최인규. 2004. 옥틸페놀(4-t-octylphenol)의 *Basidioradulum molare*와 *Schizopora paradoxa*에 의한 분해 및 에스트로겐 성 지감 효과. 목재공학 32: 27~35.
3. 이수민, 박기령, 이성숙, 김명길, 최인규. 2005. 백색부후균 *Polyporus brumalis*에 의한 프탈산의 분해. 목재공학 33(1): 48~57.
4. 최인규, 안세희. 1998. 목질 분해균에 의한 pentachlorophenol의 미생물 분해, 목재공학 26(3): 53~62.
5. 최인규, 이재원, 최돈하. 2002. Monochlorophenol의 목질 분해균에 의한 분해 특성. 한국환경농학회지 21(4): 261~268.
6. Campbell, W. H. 2001. Structure and function of eukaryotic NAD(P)H: Nitrate reductase. Cell. Mol. Life Sci. 58: 194~204.
7. Carmen, R. J., D. Cullen, and R. T. Lamar. 1994. Manganese Peroxidase of the White Rot Fungus *Phanerochaete sordida*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 599~605.
8. Cereghino, J. L. and J. M. Cregg. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24: 45~66.
9. Conesa, A., C. A. M. J. van den Hondel, and P. J. Punt. 2000. Studies on the production of fungal peroxidases in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3018~3023.
10. Doyle, W. A. and A. T. Smith. 1996. Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: Folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and Heam. Biochem. J. 315: 15~19.
11. Forney, L. J., C. A. Reddy, and H. S. Pankratz. 1982. Ultrastructural localization of hydrogen peroxide production in ligninolytic *Phanerochaete chrysosporium* cells. Appl. Environ. Microbiol. 44: 732~736.
12. Gachhui, R., A. Presta, D. F. Bentley, H. M. Abu-Soud, R. McArthur, G. Brudvig, D. K. Ghosh, and D. J. Stuehr. 1996. Characterization of the reductase domain of rat neuronal nitric oxide synthase generated in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J. Biol. Chem. 271: 20594~20602.
13. Gellissen, G. 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 741~750.
14. Kersten, P. J., B. Kalyanaraman, K. E. Hammel, B. Reinhammar, and T. K. Kirk. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxymenzenes. Biochem. J. 268: 475~480.
15. Kirk, T. K. and D. Cullen. 1998. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. pp 273~307.
16. Leber, A., B. Hemmens, B. Klosch, W. Goessler, G. Raber, B. Mayer, and K. Schmidt. 1999. Characterization of recombinant human endothelial nitric-oxide synthase purified from the yeast *Pichia pastoris*. J. Biol. Chem. 274: 37658~37664.
17. Lee, S. M. W. Koo, M. K. Kim, D. H. Choi, E. J. Hong, E. B. Jeung, and I. G. Choi. 2004. Biodegradation of dibutylphthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. Enzym. Microbial Technol. 35: 417~423.
18. Mertens, J. A., N. Shiraishi, and W. H. Campbell. 2000. Recombinant expression of molybdenum reductase fragment of plant nitrate reductase at high levels in *Pichia pastoris*. Plant Physiol. 123: 743~756.
19. Skipper, L., W. H. Campbell, J. A. Mertens, and D. J. Lowe. 2001. Pre-steady-state kinetic analysis of recombinant Arabidopsis NADH: Nitrate reductase. J. Bio. Chem. 276: 26995~27002.
20. Stewart P., R. E. Whitwam, P. J. Kersten, D. Cullen, and M. Tien. 1996. Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese per-

- oxidase gene in *Aspergillus oryzae*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 860~864.
21. Sundaramoorthy, M., K. Kishi, M. H. Gold, and T. L. Poulos. 1994. The Crystal Structure of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å Resolution. J. Bio. Chem. 269: 32759~32767.
22. Whitwam, R. E., I. G. Gazarian, and M. Tien. 1995. Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active. Biochem. Biophys. Res. J. 216: 1013~1017.
23. Yoshida M., T. Ohira, K. Igarashi, H. Nagasawa, K. Aida, B. M. Hallberg, C. Divne, T. Nishino, and M. Samejima. 2001. Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* cellobiose dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 2050~2057.