

Sphingomonas chungbukensis DJ77의 Glucosyl-Isoprenyl Phosphate-Transferase를 암호화할 것으로 추정되는 *spsB* 유전자

이수연¹ · 최정도¹ · 신말식² · 김영창^{1,3,*}

¹충북대학교 자연과학대학 생명과학부, ²전남대학교 생활과학대학 식품영양학과,
³충북대 바이오 연구소

S. chungbukensis DJ77의 genome project 수행 결과 다당류 생합성에 관련된 유전자들의 염기서열을 찾아내었다. 본 논문에서는 이러한 유전자들 중 sphingan형 다당류 생합성에 관여하는 glucosyl-isoprenyl phosphate-transferase를 암호화하는 유전자의 완전한 서열을 결정하였고, *spsB*로 명명하였다. 이 유전자는 ATG를 개시코돈으로 사용하며, TGA를 종결코돈으로 사용하고 있다. 또한 총 1392 bp의 open reading frame을 포함하며, 463개의 아미노산으로 구성되어 있다. *SpsB*를 구성하는 아미노산 서열은 동일한 속의 sphingan 형성 균주인 *Sphingomonas* spp S88의 *SpsB*와 50%, *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461의 *GelB*와 48%의 유사성을 나타내었다.

Key words □ glucosyl-isoprenyl phosphate-transferase, *Sphingomonas chungbukensis* DJ77, *spsB*,

미생물에 의해 생산되는 체외 다당류(exopolysaccharide, EPS)는 미생물 성장에 필수적인 대사물질로 구성당의 종류, 결합 순서, 결합 양식과 위치 등에 따라 다양한 구조적 특성을 나타낸다. 이러한 성질은 겔 형성능, 윤활능, 필름 형성능, 표면장력 조절능 등 다양한 물성을 나타내게 하며 이는 식품첨가물, 화장품, 의·약학, 화학공학 등 산업 전반에 광범위하게 이용된다. 특히 미생물로부터 생성되는 다당류는 세포 외로 방출되므로 분리·정제가 용이하며 대사공학을 통해 대량생산이 가능하여 최근 주목받고 있다. 미생물성 다당류 중 “sphingan”은 다양한 구조를 나타내는 캡슐형 다당류로서, S-88, S-60 (gellan), S-130 (welan), S-194 (rhamsan) 등을 포함하며 *Sphingomonas* 속에 의해 분비된다(21, 11, 12).

Sphingomonas chungbukensis DJ77은 1986년 대전 산업단지 내 폐수 침전물에서 분리되어 2000년 Kim *et al.*에 의해 신종으로 보고 되었다(7). 현재까지, whole genome shotgun sequencing을 통한 genome project의 수행 결과 여러 종류의 유전자가 다당류 생합성에 관련되었을 것으로 추측된다. 이러한 유전자들 중 glucosyl-isoprenyl phosphate transferase (glucosyl-IP-transferase)를 지령할 것으로 추측되는 유전자가 발견되었다. 이 유전자는 gellan이나 sphingan의 repeat unit assembly 과정에서 첫 단계에 작용하고, repeat unit은 nucleotide sugar precursor인 D-glucose, L-rhamnose, D-glucuronic acid가 2:1:1의 비율로 구성되어 있다. Glucosyl-IP-transferase는 UDP-glucose로부터 glucose-1-phosphate

를 C₅₅-isoprenyl phosphate lipid carrier로 이동시키는 역할을 담당한다고 알려져 있다(11, 14, 13, 4, 12). 이 효소 유전자는 *Sphingomonas* spp S88에서 발견되어 *spsB*로 명명되었다. 본 연구에서는 *S. chungbukensis* DJ77에서 glucosyl-IP-transferase를 암호화하는 유전자를 동정하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주, plasmids 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Sphingomonas chungbukensis* DJ77(6)을 사용하였다. 형질전환을 위한 숙주세포로는 *E. coli* XL1-Blue (Stratagene Co., USA)를 사용하였고, 클로닝을 위한 vector는 pBluescriptII SK(-) (Stratagene Co., USA)와 pUC19 (Takara Co., Korea)를 이용하였다. 배지로는 LB (Luria-Bertani) 배지를 사용하였다.

DNA 추출 및 조작

S. chungbukensis DJ77의 chromosomal DNA는 Silhavy (16) 등의 방법에 따라 추출하였으며, plasmid DNA는 Sambrook (15) 등의 방법에 따라 추출하였다. 각종 제한 효소 및 T4 DNA ligase 등은 Roche사(Mannheim, Germany) 등으로부터 구입하여 사용하였으며, 반응조건은 회사의 방법을 따랐다.

염기서열 결정과 분석

Applied Biosystems automated DNA sequencer (Model 370, version 1.2.1)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Plasmid DNA는 AtmanBio사의 Plasmid Miniprep Kit (Takara Co., Korea)를

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 043-261-2302, Fax: 043-268-2538
E-mail: youngkim@chungbuk.ac.kr

사용하여 추출하였다. 염기서열과 아미노산서열은 BLASTN, TBLASTN program (1)을 이용하여 분석하였고, multiple alignment와 계통분류학적 분석은 ClustalX (19)와 ClustalW (18)를 이용하였다.

결과 및 고찰

Glucosyl-isoprenyl phosphate-transferase를 암호화하는 *spsB* 유전자의 구조

S. chungbukensis DJ77의 genome project 수행 결과 EPS 생합성에 관련된 유전자들의 염기서열을 찾아내었다. 이러한 유전자들 중 *Sphingomonas* spp S88의 *spsB*와 *S. paucimobilis* ATCC 31461의 *gelB* 유전자와 상동성이 높은 유전자로써 glucosyl-IP-transferase를 암호화하는 유전자일 것으로 추정되는 유전자를 본 균주에서 발굴하여 *spsB*로 명명하였다.

Fig. 1에서 보는 것처럼 유전자 *spsB*는 개시코돈 ATG와 종결 코돈 TGA를 가진 1392bp로 이루어진 open reading frame (ORF)이다. Shine-Dalgarno 서열로 생각되는 염기서열(5'-AAGG-3')은 이 ORF의 개시코돈으로부터 8bp 앞에 존재한다. 또한, 이 ORF의 G+C 함량은 62.7%로 *Sphingomonas* spp S88의 *spsB*

```

TGACATAAAAAGGGTTCAGATGCGAAAATTGATCTGGCGATCGAAGGTGTTCCAGTC 60
      MS K I D L A I E G V P S R Q
GCCAGCCGCAACAGCCGCGGACAGCGAACGCCAGGCTTGGCTTTGCTGTTGCTGC 120
P A T A A A G Q R N A R L W L C L L L L L V
TGGTCGCCGATATGGCGCGCTGGCGACGGGCTTCGCCTTCGGCTGCGCGCGCAGGCT 180
A D M A A A L A T G F A F G L R A A G L P
TGCCCTGGCTCGCGGACGACAATGGCAGCGCTGGCGGGCGGAATGATCCTATGGCG 240
W L A D G Q W Q P L A G G M I V Y G V L
TGCTGGCTTCACAAACAGGCTTACAATCCCAATTCGCTTACCCGCATGACCCAGTCT 300
A F H N Q A Y N P H C L T R M T Q S C R
GCCGACGCGGACCATGGCTTTGGCGGGACGCTGCTGATCTTCTGCTGGTGGTCTTCT 360
S A T M A F A G T L L L I F L L L V V F S L
CGTGAAGGCAACGGGCGAGCTTTCGCCGGCTGGGTGATCGCGGGCATAATGTCAGCG 420
K A T G S L S R L G V S A G I M C S G T
GGACGCTGATCGTGCACCGTTGCTCATCGTGCAGACGCTCGCGGCACTTCGCGG 480
L I V L Q R L L I V Q T V R R N F A D G
ACGGGCTGTTCCGCAACTGTTGATCATCGATGACGGGCTGATTCGGAAGATGTCAGCG 540
L F A Q E L I I D D D G V I P E D V S G M
GTATGGTATGTCGATCGCATAGGCGTGAAGGCGGATTCGACGATCCCTATA 600
V I D A I A I G L K A D L D D P M L
TGCTGCACCGTCTGGGGACCATGCTGCGGATATGATCGGGTCTGATCTCCTGCCCG 660
H R L D P W A P L A V L R V I S C P A E
CGGAACGCAAGGCGGATGGGCGCAGATGCTGAAGGCGGCAACATATTGGCGAGATCA 720
R K A D W A Q M L K G G N I L G E I I V
TCGTGCCGAACGACCGCATGGCCGCTGGCGGTCAGGCTTACGGGAACCGCGA 780
P E L D P W A P L A V L R V I S C P A E
CGCTGGTGGTGTACGCGGGCGGTAACCTTGCCAACCGGGCAAAAGCGGTTGCTGG 840
V V S R G P L N L M R D I A I L L G T
ATATCGTGTGACGGTCCCGTCTGATCGCGCTCGCGCGCTGATGGCGGTGATCGCGA 900
V L T V P V L I A L A P L M A V I A I L
TCCTGATCAAGCTGCACTGCCAGGTCCGGTCTTCTCCGCGAGGAACGGATCGGGCGG 960
I K L D S P G P V F F R Q E R I G R G N
GCAACATGTTGTTCCATATCCTGAAATCCGCGAGATCGGGTTCGAGCAATGCGATCCG 1020
M L F H I L K F R S M R V E Q C D A A G
CCGGCGGACATCCACCCAGCGCACGATAACCGGATCACCCGCTCGGGCGCTTATCC 1080
A T S T Q R H D N R I T R V G A F I R K
GCAAGACCGATCGACGAACCTGCCAATCATATGCTGCTGGGCGAGATGAGCC 1140
T S I D E L P Q L I N V L L G E M S L V
TGGTGGGCGCGTCCCATGCGCTCGCTCGACCGCGGAGGAACAGCTTTCTGGCAGG 1200
G P R P H A L L G S T A E E Q L F W Q V D
TCGACCCCAATATTGGCACCGTCTGAAACCCGCAITACAGGCTGGCGCAGA 1260
R Q Y W H R H A L K P G I T G L A Q I R
TCAGGGGTTTCGCGGCGCACCGAAACCCGCGCGACATATTGAACCGGTAGAGGGCG 1320
G F R G A T E T R L D I L N R V E A D
ACCTGGAATATCTGCATGGCTGGAGCTTATGCGGGACATTCGATCTACTGGGACGG 1380
L E Y L H G W S L M R D I A I L L G T
TCAATGCTCGTCCACAGAACGCATATTGAACACGACTCGAACGGGGATGCGAAGACG 1440
V N V L V H K N A V *
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the *spsB* gene encoding glucosyl-IP-transferase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77(GeneBank accession number AY876944). The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence is shown in one-letter code, and asterisk indicates stop codon. A putative Shine-Dalgarno sequence is underlined.

유전자가 66.17%, *S. paucimobilis* ATCC 31461의 *gelB* 유전자가 64.5% 인 것과 유사하다. ORF에서 유추한 아미노산은 463개이며 이들이 암호화하고 있는 단백질의 분자량은 50.93 kDa으로 계산되었다.

SpsB 단백질 서열의 상동성 비교와 효소의 작용 부위

*spsB*의 염기서열에서 추정된 아미노산 서열을 BLASTP를 통하여 분석한 결과 다른 여러 균주에서 밝혀진 첫 번째 glycosyl transferase와 상동성이 있는 것으로 분석되었다. 이 중에서 가장 상동성이 있는 것은 *Sphingomonas* spp S88의 SpsB (21, 11, 13)로 아미노산 서열 비교 시 50%의 상동성을 나타내었다. 또한 *S. paucimobilis* ATCC 31461의 GelB (14, 4)와는 48%의 상동성을 나타내었다. 그밖에 여러 첫번째 glycosyl transferase의 아미노산 서열의 상동성은 50%를 기준으로 하여 3개 종류로 분류된다. 첫 번째와 두 번째 그룹은 당 전구체를 undecaprenyl phosphate lipid 운반체와 결합시키며, 세 번째 그룹은 isoprenyl phosphate lipid 운반체와 결합시키는 역할을 하는 효소들이다. 본 균주의 SpsB가 속해있는 세 번째 그룹은 first glycosyl transferase 중 glucosyl-IP-transferase에 속하며, 그 중에서 *Sphingomonas* spp S88과 같이 분류됨을 알 수 있었다(Fig. 2).

Fig. 2의 세 번째 그룹에 해당하는 단백질들의 유전자 서열을 분석하였다. Glucosyl-IP-transferase 효소들의 단백질 서열을

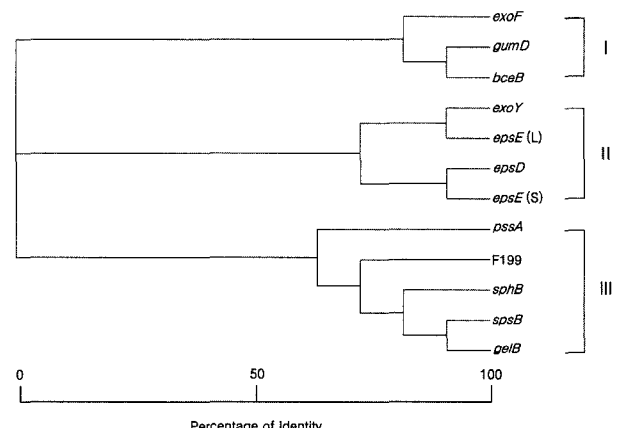


Fig. 2. Dendrogram showing the levels of homology between the amino acid sequences of different first glycosyl transferases. The dendrogram was constructed with the ClustalX program. The enzymes are indicated on the right: *exoF*, *Rhizobium meliloti* (21, 3); *gumD*, *Xanthomonas campestris* (21, 11, 13, 2, 10); *bceB*, *Burkholderia cepacia* R1808 (10); *exoY*, *Rhizobium meliloti* (21, 3); *epsE(L)*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (9); *epsD*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (8); *epsE(S)*, *Streptococcus thermophilus* (8, 17); *pssA*, *Rhizobium leguminosarum* (11, 5); F199, *Sphingomonas aromaticivorans* F199 (unpublished [genbank accession number ZP00304791]); *spsB* (DJ77), this study; *spsB* (S88), *Sphingomonas* spp S88 (21, 11, 13); *gelB*, *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 (14, 4). The enzymes of the group I and II belong to the undecaprenyl phosphate transferase and those of the group III to the isoprenyl phosphate transferase.

<i>spsB</i> (S88)	MNAFEAQRAF	EEQLRAHARS	AFSAAPMLRR	STIRMILYTE	LLLLDSTAIL	LGFYAACSR	60
<i>ge1B</i>	MNAFEAQRAF	EEQLRAYAAP	AFSAAPMLRR	STVRMILYTE	LLLLDSTAIL	ASFYFAACMR	60
<i>spsB</i> (DJ77)	---MS	KIDLAIIEGVP	SRQPATAAGQ	RNARLWLCLL	LLVADMAALA	TGFAGLRAA	52
F199	---MTRHMP1	SETQDAPPRR	RITLPLAPPL	EQRRLLQYLA	LLLLDGAAIL	NGFCIASWLY	57
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	DGNWLSLAGV	NVGIFLLPIT	LGTALASGTY	SLSCLRYPVS	GVKSIFSAFF	FSVPIVLLGS	120
<i>ge1B</i>	DSNWLSLAGV	NVGIFLLPIT	LGTALASGTY	SLESLRHPIS	GVRNILSAFL	FSILIVLLGS	120
<i>spsB</i> (DJ77)	GLPWLADGQW	QPLAGGMIVY	GVLAFHNQAY	NPHCLTRMTQ	SCRATMAFA	GTLILFLVY	112
F199	LGRFLDETSI	LHSQVMLPIY	WSIALSLQVY	TLTALRRPNF	ARARAGLSLI	GAETVLLFVY	117
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	YLLTAEPLPS	RLQLEGVLL	ALSLVTICRL	GFRWHVRALT	RGTLDELVI	VDG-VALEVA	179
<i>ge1B</i>	YLLTTELPLS	RIQLGAGALM	TVVLLMACRL	VFRRHVRAMT	GDKLLDELVI	IDG-VSLDLA	179
<i>spsB</i> (DJ77)	FSLKATGSL	RLGVSAGIMC	SGTILVLRQL	LIVQTVRRNF	ADGLFAQLLI	IDDGVIPEDV	172
F199	FATKSTDNFS	RVSSLLGLGL	SEVLLMWVRA	LVRPLIKARC	GDAVINTLLI	DQG-GIPLRT	176
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	SGAVALDARI	INLTPNPRDP	QMLHRLGTTV	VGFDREVVAC	TEEHRVAVWAL	LLKGMN1KGE	239
<i>ge1B</i>	SDAVALDARI	INLSPNPRDP	QMLHRLGTTV	IGFDREVVAC	TEEHRVAVWAL	LLKGMN1KGE	239
<i>spsB</i> (DJ77)	SGMIVVDALIA	IGLKADLDDP	YMLHRLGTM	RDYDRVVISC	PAERKADWAQ	MLKGGN1LGE	232
F199	PHAYHTDARE	HHLAPDLSDP	HMMDRGLYM	MNMDRVMVSC	PHDRRAAWAL	VFKSANVSC	236
<i>pssA</i>				MTG	LITDRLLPPR	PLEDNVRVSL	SITELNNS-
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	ILVPQFNALG	AIGVDSYEGK	DTLVVSGGPL	NMPNRAKKRA	LDLLITVPAL	VALAPLMIVV	299
<i>ge1B</i>	ILVPQFNALG	AIGVDAYDCK	DTLVVSGGPL	SMPNRAKKRA	LDLLITVPAY	LALAPLMIVV	299
<i>spsB</i> (DJ77)	IIVPELDPMA	PLAVQAYRGT	PTLVVSRGPL	NLANRAKKRL	LDIVLTPVL	IALAPLMIVV	292
F199	IIVDPEVNLG	VLGARRERGY	GALIVASGPL	GLRARAVKRL	LDLALAGGAV	LALGPVLLIV	296
<i>pssA</i>	ISTESFRPSR	RQPSLKIQT	PVIHSDAPQA	PLVDLVKRA	FDIVSSLSAL	LVLAPFLFV	91
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	ATLKLESPPG	PVFFAQDRVG	RGNRLKILK	FRSMRVALCD	ANGNVSASRD	DDRITRVGRI	359
<i>ge1B</i>	ATATKLESPPG	PVLFAQDRVG	RGNRLKILK	FRSMRQALCD	ANGNVSASRD	DDRITRVGRF	359
<i>spsB</i> (DJ77)	ATLKLDSPG	PVFFRQERIG	RGNMLHILK	FRSMRVEQCD	AAGATSTQRH	DNRITRVGRF	352
F199	AVLKLEDDGG	PVLFIQKRTG	RGNRFPIFK	FRSMRVERLD	STGSRASAKD	DDRITRIGRF	356
<i>pssA</i>	ALLKLDSPG	PVLEKQTRWG	KNCKAIVYK	FRSMRTD1CD	VSGVAQTVML	DPVTRVGAJ	151
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	IRKTSIDELP	QLLNVLRGDM	SVVGPPIHAL	GSRAANHLFW	EIDERYWHRH	TLKPGMTGLA	419
<i>ge1B</i>	IRKTSIDELP	QLLNVLRGDM	SVVGPPIHAL	GSRAADHYFW	EIDERYWHRH	TLKPGMTGLA	419
<i>spsB</i> (DJ77)	IRKTSIDELP	QLINVLGEM	SLVGPPIHAL	GSTAEELQFW	QVDRQVWHRH	ALKPGITGLA	412
F199	IRKTSIDELP	QLPNVLRGEM	SIVGPPIHAL	GSLAGEKLFW	EVDHRYWLRH	SLKPGITGLA	416
<i>pssA</i>	LRRTNVDELQ	QLLNVLGEM	SVVGPPIHAL	GMRAGGVLYE	ELVPEYVHRH	AMRPGMTGLA	211
					*: * * * * *		
<i>spsB</i> (S88)	QIRGFRGATD	RRVDLTNRLQ	ADMEYIDGWD	IWRDVTILFK	TLRVIHVSNA	F-	470
<i>ge1B</i>	QVRGFRGATD	RRIDLNRLQ	ANMEYIDGWD	IWRDITILFK	TLRVIHVSNA	F-	470
<i>spsB</i> (DJ77)	QIRGFRGATE	TRRDILNRVE	ADLEYLHGWS	LMRDIAILLG	TWNVLVHKNA	Y-	463
F199	QVRGLRGATD	TETDLANRLQ	ADLEYLDGWT	IWRDLKIIVN	TARVLVHDRA	F-	467
<i>pssA</i>	QMRGLRGPTD	RPAKARARIA	SDLYYVGNFS	ILMDMR1IFG	TVVSELTRGK	GF	263
					*: * * * * *		

Fig. 3. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of the glucosyl transferases from different organisms. Amino acids identical in all sequences are indicated by asterisks and the gaps by dashes. Colons indicate that one of following strong groups is fully conserved. The first amino acid of PssA, which is 263 aa long, matches with the 200th amino acids of the SpS in *S. chungbukensis* DJ77. Shaded boxes mark the conserved bacterial sugar transferase motif. A and B are highly conserved among all of the proteins, proposed as the domain for the interaction with isoprenyl phosphate, and C is responsible for sugar specificity in the transferase (22, 10, 20). A prediction of transmembrane regions is underlined(21).

ClustalW를 통하여 다중 서열 정렬한 결과는 Fig. 3과 같다. 아미노산 번호 270에서 463까지의 영역은 bacterial sugar transferase에 해당하는 모티프 서열이다. 도메인 A와 B는 isoprenyl phosphate와 작용하기 위한 도메인으로 예상되며 모든 단백질들 사이에서 가장 높은 비율로 보인된 서열이다. 또한 도메인 C의 경우는 transferase 내에서 당 특이적으로 반응하는 부위이다(10, 20, 22).

SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/frame0.html>)를 이용하여 각각의 아미노산서열에서 막 관통 부위를 예측하였다. 본 균주의 SpS는 *Sphingomonas* spp S88, *S. paucimobilis* ATCC 31461 그리고 *S. aromaticivorans* F199와 같이 6개의 transmembrane region이 예측되었으며(Fig. 3), 아미노산 서열들의 수소성을 분석한 결과와 일치하였다(Fig. 4). 이는 SpS 효소의 세포 내 작용 부위가 세포막 부분이며 그 위치는 세포막을 관통하고 있음을 예상하게 해 주는 결과이다(20, 21).

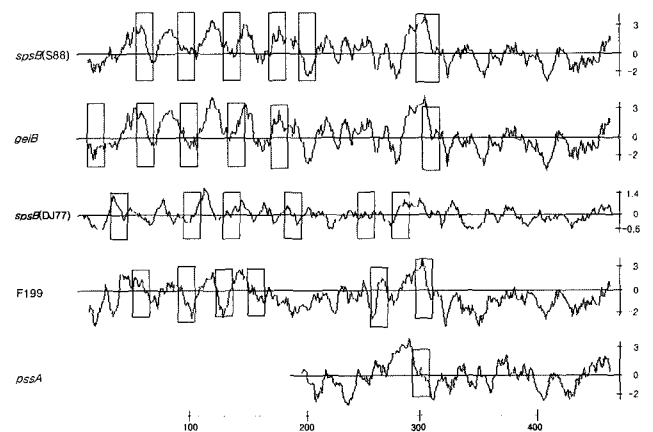


Fig. 4. Comparison of the predicted hydrophobic profiles of SpS in *S. chungbukensis* DJ77 and related proteins. The hydrophobicity was plotted by using the program ProtScale. Hydrophobic and hydrophilic regions were presented in the upper and lower halves of the curve, respectively. The predicted transmembrane segments are indicated by a box (20).

감사의 말

이 연구는 KISTEP (M10311310001-03B4531-00110) 바이오 디스커버리 사업에서 지원된 연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Chou, F.L., H.C. Chou, Y.S. Lin, B.Y. Yang, N.T. Lin, S.F. Weng, and Y.H. Tseng. 1997. The *Xantomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. *Biochem. Biophys. Res.* 233, 265-269
- Glucksmann, M. A., T. L. Reuber, and G. C. Walker. 1993. Family of glycosyl transferases needed for the synthesis of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 175, 7033-7044
- Harding, N.E., Y.N. Patel, and R.J. Coleman. 2004. Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in *Sphingomonas eoldea* ATCC 31461. *J. Ind. Microbiol. Biotch.* 31, 70-82.
- Janczarek, M., and A. Skorupska. 2004. Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *D. Microbiol.* 85, 217-227.
- Kim, C.K., J.W. Kim, Y.C. Kim, and T.I. Mheen. 1986. Isolation of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and genetic characterization of their plasmid genes. *Kor. J. Microbiol.* 24, 67-72
- Kim, S.J., J.S. Chun, K.S. Bae, and Y.C. Kim. 2000. Polyphasic assignment of an aromatic degrading *Pseudomonas* sp., strain DJ77, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas chungbukensis* sp. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1641-1647.
- Kranenburg, R., I.I. Swam, J.D. Marugg, M. Kleerebezem, and W.M. Vos. 1999. Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: Functional analysis of the glycosyltransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. *J. Bacteriol.* 181, 338-340.
- Lamothe, G.T., L. Jolly, B. Mollet, and F. Stingle. 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Arch. Microbiol.* 178, 218-228.
- Moreira, L.M., P.A. Videira, S.A. Sousa, J.H. Leitao, M.V. Cunha, and Isabel Sá-Correia. 2003. Identification and physical organization of the gene cluster involved in the biosynthesis of *Burkholderia cepacia* complex exopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res.* 312, 323-333.
- Pollock, T.J., W.A. van Workum, L. Thorne, M.J. Mikolajczak, M. Yamazaki, J.W. Kijne, and R.W. Armentrout. 1998. Assignment of biochemical functions to glycosyl transferase genes which are essential for biosynthesis of exopolysaccharides in *Sphingomonas* strain S88 and *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 180, 568-593.
- Pollock, T.J. 1993. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1939-1945.
- Pollock, T.J., L. Throne, M. Yamazaki, M.J. Mikolajczak, and R.W. Armentrout. 1994. Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 176, 6229-6237.
- Sá-Corria, I., A.M. Fialho, P. Videira, A.R. Marques, and H. Albano. 2002. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobils* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 170-176.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1990. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Shilhavy, T.J., M.L. Berman, and L.W. Enquist. 1984. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Stingle, F., J.W. Newell, and J.R. Neeser. 1999. Unraveling the Function of glycosyltransferases in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *J. Bacteriol.* 181, 6354-6360.
- Thompson, T.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Thompson, T.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24, 4876-4882.
- Wang, L., D. Liu, and P.R. Reeves. 1996. C-terminal half of *Salmonella enterica* WbaP (RfbP) is the galactosyl-1-phosphate transferase domain catalyzing the first Step of O-Antigen Synthesis. *J. Bacteriol.* 178, 2598-2604.
- Yamazaki, M., L. Thorne, M. Micorajczak, R.W. Armentrout, and T.J. Pollock. 1996. Linkage of genes essential for synthesis of a polysaccharide capsule in *Sphingomonas* strain S88. *J. Bacteriol.* 178, 2676-2687.
- Yoshida, Y., Y. Nakano, Y. Yamashita, and T. Koga. 1998. Identification of a genetic locus essential for serotype b-specific antigen synthesis in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* 66, 107-114.

(Received January 12, 2005/Accepted February 25, 2005)

ABSTRACT : A *spsB* Gene Putatively Encoding Glucosyl-Isoprenyl Phosphate-Transferase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77

Soo-Youn Lee¹, Jung-Do Choi¹, Malshick Shin², and Young-Chang Kim^{1,3*}(¹School of Life Science, Chungbuk National University, ²Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea, ³Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University, Cheongju, 316-763, Korea)

Some genes, which are involved in the biosynthesis of polysaccharides, could be found by the genome project of *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. In this study, we identified the complete nucleotide sequence of a gene, encoding the glucosyl-isoprenyl phosphate-transferase, which catalyzes the first step in the biochemical pathway for the synthesis of the sphingan type polysaccharide. This gene, named *spsB*, is initiated by the ATG codon and terminated by the TGA, and its open reading frame consists of 1392 bp, encoding 463 amino acids. The predicted amino acid sequence of this enzyme indicates 50% similarity to SpsB of *Sphingomonas* spp S88, also produces sphingan, and 48% to GelB of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461.