

히스티딘 에시드 포스파테이즈 (Histidine Acid Phosphatase) 계열 인간 파이테이즈 (Phytase)의 일반적 특성규명

조 세 순

건국대학교 동물생명과학대학 동물생산환경학전공

General Enzymatic Properties of Human Histidine Acid Phosphatase-Phytase

Jaie Soon Cho

Department of Animal Sciences and Environment, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University

ABSTRACT

The glycosylated human MINPP (multiple inositol polyphosphate phosphatase), which was recombinantly over-expressed by using industrial host, *Pichia pastoris*, showed the phytase activity against phytate (InsP₆) and the enzyme activity of the unglycosylated counterpart was decreased to 30%. The optimal phytase activity occurred at pH 7.4. The human MINPP showed high substrate specificity for InsP₆ with little activity on other organic phosphate conjugates such as *para*-nitrophenylphosphate (pNPP), ATP, and ribose-1-phosphate (R-1-P). The phosphatase activity against 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG) by human MINPP was increased to 1.2-fold in the presence of stimulator, 1 mM 2-phosphoglycolate (2-PG) but the phytase activity against InsP₆ was not affected by addition of 1 mM 2-PG. The phosphatase activity against 2,3-BPG by human MINPP was not increased in the presence of 2 mM Mg²⁺ or 100 mM Cl⁻.

(Key words : MINPP, *Pichia pastoris*, Phytase, Phosphatase)

I. 서 론

피틴태인 [Phytate (Inositol hexakisphosphate); InsP₆]은 일반적으로 식품과 사료의 원료로 이용되는 곡류 (cereals), 두과류 (legumes), 유채류 (oil seeds)와 같은 고등식물체내에 존재하는 주된 인의 저장형태이다 (Cosgrove, 1966). 피틴태인은 화학구조적 특성상 6개의 무기인산 (inorganic phosphate) 잔기가 그 중심인 이노시톨 (inositol) 고리에 인 에스테르 (phosphodiester) 결합으로 연결된 전기적으로 매우 음으로 하전된 화합물로서 인간과 동물의 영양학적으로 중요한 금속이온 (Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺) 및 양으로 하전된 단백질, 아미노산에 결합하여 그들의 이용성을 저해하는 항영양성 인자 (anti-nutritional factor)로 작용한다. 더우기 인간과 닭, 돼지와 같은 단위동물 (monogastric animals)들이 이러한 피틴태인을 가수분해하여 무기인을 유리시켜 이용할 수 없기 때문에 분뇨에 포함된 미분해된 피틴태인이 호수나 하천에 스며들어 부영양화 (eutrophication)를 일으켜 환경적으로 주된 인오염원 (phosphorus pollutant)으로도 작용한다 (Haefner 등, 2005).

파이테이즈 (phytase; EC 3.1.3.8 or 3.1.3.26)는 피틴태인

으로부터 무기인을 유리시키는 가수분해효소를 총칭하는 개념으로 현재 histidine acid phosphatase 계열에 속하는 두 가지 효소 즉, 곰팡이 균주 *Aspergillus* sp.와 세균 균주 *E. coli*에서 유래된 미생물 phytase들이 널리 산업화되어 동물 영양학분야에서는 단위동물의 친환경 사료 첨가제로 이용하여 인오염원인 피틴태인 제어를 통한 인의 이용률 증진, 미네랄 및 미량원소의 이용률 개선 및 단백질 소화율 향상을 도모하여 궁극적으로 동물의 생산성 극대화에 기여하였으며 또한 최근에는 인간영양학 및 식품가공분야에서도 인간에게 결핍되기 쉬운 미네랄인 철의 흡수이용률 개선, 제빵공정에서 잠재적 발효촉진조절제로서 이용 등의 사용범위가 확장되고 있다 (Haefner 등, 2005; Lei와 Porres, 2003).

그런데, 인간 (human), 쥐 (rat), 생쥐 (mouse), 닭 (chicken) 과 같은 동물에서도 histidine acid phosphatase 계열의 MINPP (multiple inositol polyphosphate phosphatase) 효소의 유전자가 보고된 이래로 (Chi 등, 1999), 주로 전사수준 (transcription-level)에서 이들 유전자의 발현이 연골세포 (chondrocytes)의 분화 (differentiation) 과정에 관여한다는 단편적인 생리적 기능연구에 국한되었지만 (Hidaka 등,

Corresponding author : Jaiesoon-Cho, Department of Animal Sciences & Environment, College of Animal Bioscience & Technology, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea
Tel: +82-2-450-3375, Fax: +82-2-455-1044, E-mail: chojs70@konkuk.ac.kr

2003), 최근 닭의 MINPP 효소의 특성규명 결과 미생물 유래의 phytase처럼 효율적으로 피틴태인을 가수분해할 수 있는 새로운 계열의 phytase 영역으로 주목하고 있다 (Cho 등, 2006). 본 연구에서는 산업용 균주인 *Pichia pastoris*에서 유전자재조합으로 발현된 피틴태인 분해활성을 지닌 인간 유래 phytase인 MINPP 효소의 일반적 특성규명에 관한 보고이다.

II. 재료 및 방법

1. 재조합 인간 MINPP 효소의 발현 및 정제

인간 MINPP 효소의 그 아미노산 잔기 31번부터 -483번째 부위를 코딩하는 유전자를 포함한 cDNA (Caffrey 등, 1999)를 PCR (polymerase chain reaction)로 증폭한 후, pGEM T-vector (Promega)에 클로닝하고 *E. coli* TOP 10F'에 형질전환하여 positive colony들을 선별하였다. 선별된 그 인간 MINPP 효소 유전자 cDNA를 *Pichia pastoris* 발현 벡터인 pPICZα (Invitrogen)의 MCS (multiple cloning site)인 *EcoR* I, *Kpn* I site에 삽입하여 최종적으로 *Pichia pastoris*에서의 재조합 인간 MINPP 효소 발현 벡터를 구축하였다 (Cho 등 2006). 또한 외래 단백질을 효율적으로 발현시키는 산업용 효모균주인 *Pichia pastoris* X33 시스템 (Invitrogen)을 이용하여 그 단백질의 C-말단 (terminal)에 6개의 histidine 잔기가 fusion된 재조합 인간 유래 MINPP 효소의 발현 및 Ni²⁺-sepharose resin (Amersham Bioscience)을 이용한 친화성크로마토그래피 (affinity chromatography)에 의한 그 효소의 순수 정제 획득은 이전에 기술된 연구방법 (Cho 등, 2006)에 의해서 수행되었다.

2. 정제된 재조합 인간 MINPP 효소의 전기영동 및 면역 블롯(western blot) 분석

정제된 재조합 인간 MINPP 효소를 NuPAGE 4~12% Bis-Tris gel (Invitrogen)을 이용하여 단백질 전기영동을 실시한 후, PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Invitrogen)에 전기를 통하여 블롯 (blot)을 만들었다. 그 blot을 3% BSA (bovine serum albumin)가 함유된 TTBS [Tween 20 Tris-Buffered Saline; 0.05% Tween 20, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl] 용액으로 1시간 동안 blocking하고 난 후, C-terminal His-tag antibody (Invitrogen, dilution 1:1000)로 탐침 (probe)하고 4°C에서 1시간 동안 horse-radish peroxidase가 coupled된 anti-mouse IgG (Cell Signaling, dilution 1:7000)로 배양한 후, blot상에 정제된 재조합 인간 MINPP 효소의 존재여부를 ECL (enhanced chemiluminescence) 시스템 (Amersham Biosciences)을 이용하여 그 instruction에 기술된 방법에 준하여 최종 확인하였다.

3. 정제된 재조합 인간 MINPP 효소의 탈당화처리 (Deglycosylation)

정제된 재조합 인간 MINPP 효소에 부가된 당잔기 (sugar moiety)의 제거는 당잔기 가수분해효소인 endoglycosidase H_f (New England Biolabs)를 이용하여 이전에 기술된 연구방법 (Cho 등, 2008)에 의해서 수행되었다.

4. 효소학적 특성 조사

본 연구의 효소활성 측정의 기질 (substrates)로 사용한 유기인산화합물 (organic phosphate conjugates)인 Phytate dodecasodium salt (Na-InsP₆), 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG), *para*-nitrophenylphosphate (pNPP), ATP, ribose-1-phosphate (R-1-P) 및 화학적 자극제 (chemical stimulator)인 2-phosphoglycolate (2-PG)는 모두 Sigma로부터 구입되었다. 또한 phytate pentamagnesium salt (Mg-InsP₆)는 Torres 등(2005)의 기술한 방법에 의하여 제조되었다. 정제된 MINPP 효소에 의한 기질로 1 mM의 InsP₆를 이용한 phytase 효소활성과 다른 유기인산화합물 (organic phosphate conjugates)들인 1 mM의 2,3-BPG, pNPP, ATP, R-1-P들을 기질로 하여 가수 분해된 무기인산 (P_i)의 양에 근거한 정량적 효소활성측정은 이 논문에서 다른 특별한 측정조건을 언급하지 않는 한, 37°C에서 50 mM Tris-Cl (pH 7.4) 완충용액에서 측정하였다 (Cho 등, 2008). 이때 효소활성단위 1U은 기질에 대하여 효소반응조건에서 분당 1 μmol의 무기인산을 유리시키는 데 필요한 효소의 양으로 정의한다. 또한 phytase 효소활성에 대한 최적 pH 범위는 각각의 다른 pH 완충용액 [50 mM glycine-HCl (pH 3), 50 mM sodium acetate (pH 4-5), 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 6-7), 50 mM Tris-HCl (pH 7.4-8.5)]에서 측정하였고, 또한 특정이온 (2 mM Mg²⁺, 100 mM Cl⁻) 및 chemical stimulator인 2-phosphoglycolate (2-PG)의 첨가에 따른 기질 1 mM의 InsP₆와 2,3-BPG에 대한 MINPP 효소활성의 변화를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

인간 유래 MINPP 효소가 methylotrophic yeast인 *Pichia pastoris*에서 성공적으로 재조합 발현되었다. 발현된 재조합 MINPP 효소는 그것의 C-말단 (terminal)에 6개의 히스티딘 (histidine) 잔기가 융합 (fusion)된 단백질로 Ni²⁺-sepharose column을 이용하여 친화성크로마토그래피 (affinity chromatography)로 정제 한후, SDS-PAGE상에서 그 정제된 효소가 그것의 이론적인 분자량인 54 kDa에 비하여 다소 분자량이 큰 70 kDa의 당화 (glycosylation)로 인한 smear한 diffusion 형태의 단백질로 발현되었고 (Cho 등, 2008), 그 결과는 C-terminal His-tag antibody를 사용한 western blot에 의해서도 확인되었는 데 (Fig. 1), 이는 일반적으로 외래단 단백질을 유전자재조합 기법으로 효모균주인 *Pichia pastoris*

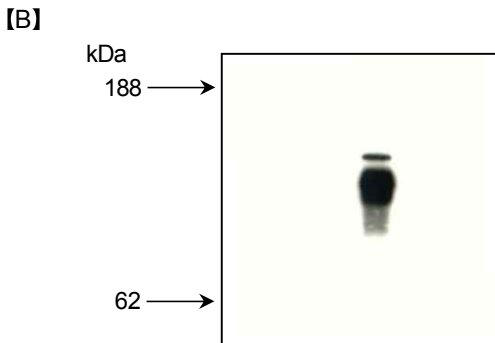
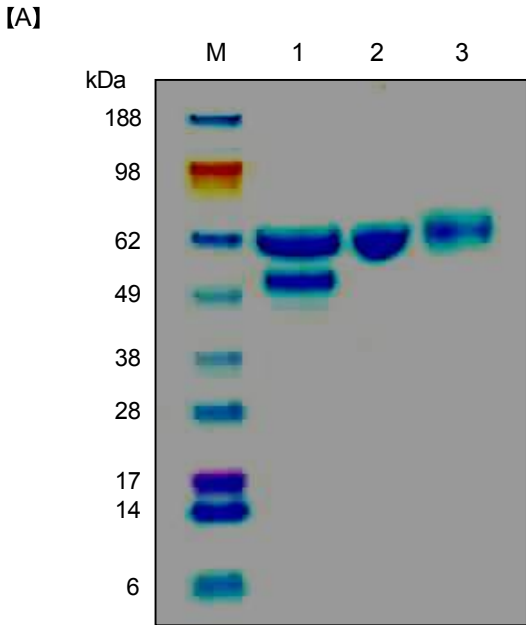


Fig. 1. SDS-PAGE (A) and western blot analysis (B) of the purified recombinant human MINPP (predicted mass, 70 kDa) expressed in *Pichia pastoris* using anti-His (c-term) antibody (Invitrogen). In (A), Lane M: pre-stained standard (Invitrogen); lane 1: deglycosylated MINPP; lane 2: Endo H_r (Mr = 70 kDa); lane 3: intact glycosylated MINPP. In (B), The positions of molecular-mass markers (marked in kDa) are also indicated.

에서 발현시에 나타나는 특징적인 현상이다 (Cregg 등, 2000).

정제된 인간 MINPP 효소의 기질 Mg-InsP₆에 대한 phytase 효소활성을 조사한 결과 당화 (glycosylated)된 intact한 MINPP 효소의 경우 4.9 mU/mg이었고, 당잔기가수 분해효소 (endoglycosidase)를 이용하여 intact한 효소의 당 잔기 (sugar moiety)를 제거한 탈당화 (deglycosylated)된 MINPP 효소의 경우 3.45 mU/mg으로 탈당화시 30%의 효소활성 감소를 나타내었다 (Fig. 2). 이는 이전연구에서 *Pichia pastoris* 균주에서 유전자 재조합 발현된 대부분의 미생물 유래의 당화 (glycosylated)된 phytase 들이 그 탈당

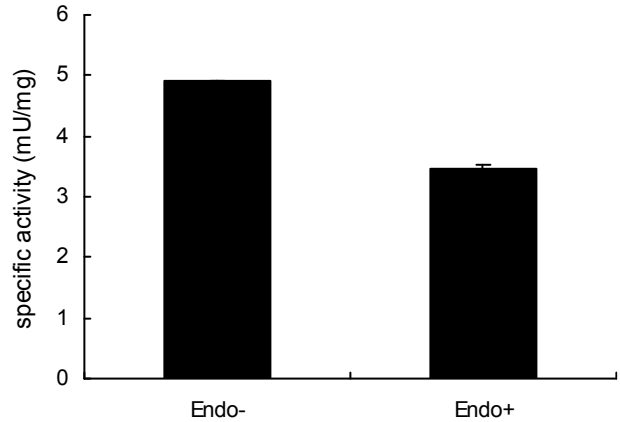


Fig. 2. Phytase activity of human MINPP before and after endoglycosidase treatment. Data was expressed as the mean \pm SE from three experiments.

“Endo⁻” means intact human MINPP before endoglycosidase treatment and “Endo⁺” means human MINPP after endoglycosidase treatment.

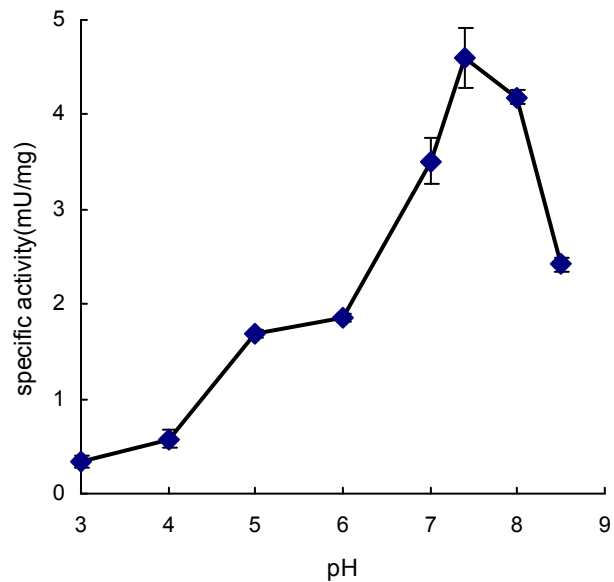


Fig. 3. pH profile of phytase activity by human MINPP using the following buffers: 50 mM glycine-HCl (pH 3), 50 mM sodium acetate (pH 4-5), 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 6-7), and 50 mM Tris-HCl (pH 7.4-8.5). Data was shown as the mean \pm SE from three experiments.

화 (deglycosylated)된 것보다 효소활성의 열안정성 (thermostability) 개선 및 효소반응속도안정성 (kinetic stability)의 측진을 가져온 결과와 유사하다 (Han과 Lei, 1999; Kim 등, 2006; Rasmus 등, 2006).

Fig. 3에서 인간 MINPP 효소의 기질 Mg-InsP₆에 대한

최적 pH 효소활성이 조사되었는데, MINPP 효소는 중성 범위의 pH 7.4에서 효소활성이 가장 높았다. 이는 이전 연구결과에서 단백질의 아미노산 서열 중 MINPP 효소와 같이 그 특징적인 소위, 보존된 효소활성반응부위 (conserved active site motif), “RHGXRXR”를 지니고 있는 histidine acid phosphatase 계열의 대부분 미생물 유래의 phytase가 pH 4.5-6.0의 약산성범위에서 최적 효소활성을 보였던 것과는 대조적이다 (Lei와 Porres 2003). 한편 지금까지 대부분 가축의 phytate 분해 이용을 검증을 위한 성공적인 사양시험 결과는 산성범위에서 최적의 효소활성을 보이는 *E. coli*나 *Aspergillus* sp. 균주와 같은 미생물 유래 phytase의 사료 내 첨가에 의해 이루어졌지만, 최근 중성 및 약알칼리 범위에서 작용하여 최적의 효소활성을 보이는 phytase가 실제로 phytate의 생체 내 분해이용에 더 유리하다는 주장이 제시되기도 하였는데 (Haefner 등, 2005), histidine acid phosphatase 계열과는 다른 *Bacillus* sp.에서 유래된 β -propeller 계열의 phytase 들은 중성 및 약알칼리성 범위에서 최적 pH 효소활성을 나타낸다 (Choi 등, 2001; Kim 등, 1998).

정제된 인간 MINPP 효소의 InsP_6 를 포함한 다양한 유기인산화합물 (organic phosphate conjugates)에 대한 기질특이성 (substrate specificities)을 조사한 결과는 지금까지 많은 선행연구결과에서 나타난 같은 histidine acid phosphatase 계열의 미생물에서 유래한 phytase 효소와 비교해 볼때 상당히 다른 결과를 보였다 (Fig. 4). 우선 MINPP 효소는 다른 미생물 phytase와 마찬가지로 phytate 기질을 효과적으로 가수분해 하였는데, Na-InsP_6 에 대한 효소활성이 Mg-InsP_6 에 비해 1.6배 더 높았다. 하지만 Mg-InsP_6 에 대한 가수분해 결과는 지금까지 선행된 많은 미생물에서 유래된 phytase의 생화학적 연구에서 정량적인 효소활성 측정시 phytate의 기질로 주로 사용한 Na-InsP_6 가 단지 화학적 합성법에 의한 *in vitro* 상에 존재하는 가상적 기질인데 반하여, Mg-InsP_6 는 phytate의 *in vivo* 생체 내 생리환경에 가장 적합하게 존재하는 진정기질로 인식되는 점에서 (Torres 등, 2005) 그 중요성이 평가되어야 한다. 또한 MINPP 효소는 histidine acid phosphatase 계열의 많은 미생물 phytase 효소가 acid phosphatase의 대표적인 기질인, pNPP와 기질 ATP에 대하여 효율적으로 무기인을 유리시키는 광범위한 기질특이성을 보이는 것과는 (Casey와 Walsh, 2003; Wyss 등, 1999) 대조적으로 이들 기질 및 R-1-P로부터 무기인을 유리시키는 수준이 매우 낮았다. 한편, 기질특이성 측면에서 MINPP 효소가 기존의 histidine acid phosphatase 계열의 미생물 phytase와 다른 두드러진 특징은 바로 기질 2,3-BPG에 대한 가수분해능력이다. 지금까지 어떤 미생물 유래의 phytase도 기질 2,3-BPG로부터 무기인을 유리시키는 사실이 보고된 바 없다. 인간 MINPP 효소의 기질 2,3-BPG에 대한 효소활성은 9.04 mU/mg으로 측정되었는데 (Fig. 4), 이전 연구에서 보고된 그 효소활성 값 (9.05 mU/mg)과 거의 일치하였다 (Cho 등, 2008). 이는 Fig. 4에

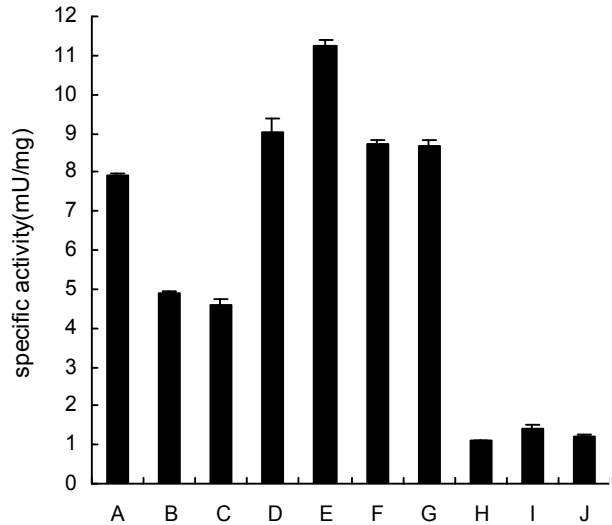


Fig. 4. Substrate specificities of human MINPP in the absence or presence of reagents. Data was expressed as the mean \pm SE from three experiments.

A: Na-InsP₆, B: Mg-InsP₆, C: Mg-InsP₆ in the presence of 1 mM 2-PG, D: 2,3-BPG, E: 2,3-BPG in the presence of 1 mM 2-PG, F: 2,3-BPG in the presence of 2 mM Mg²⁺, G: 2,3-BPG in the presence of 100 mM Cl⁻, H: ATP, I: pNPP, J: R-1-P

서 제시된 phytate 기질인 Mg-InsP_6 및 Na-InsP_6 의 효소활성 (각 4.9 mU/mg와 7.9 mU/mg) 보다 1.1-1.8배 높았다. 생리학적으로 2,3-BPG는 유기인산화합물의 일종으로 적혈구에서 생체내 조직으로의 산소의 운반과 항상성에 관여하는 중요단백질인 헤모글로빈 (hemoglobin)의 기능을 조절하는 중요한 알로스테릭 활성인자 (allosteric effector)인데 바로 단일효소인 인간 BPGM (2,3-BPG synthase/2-phosphatase) 효소의 가수분해에 의해서 그 pool이 조절되며, 특히 *E. coli*에서 재조합 발현된 인간 BPGM 효소의 *in vitro* 상에서 기질 2,3-BPG의 phosphatase 효소활성을 측정할 결과 chemical stimulator인 1 mM 2-phosphoglycolate (2-PG)의 첨가에 의해서 현저하게 그 효소활성이 증가되는 것으로 보고되었다 (Garel 등, 1994). 따라서 본 연구에서 인간 MINPP 효소에 대한 2-PG 첨가시에 기질 2,3-BPG와 Mg-InsP_6 에 대한 phosphatase 효소활성의 변화를 관찰한 결과 2,3-BPG의 경우 그 효소활성이 1.2배 증가되는 효과를 보였지만, Mg-InsP_6 의 경우 2-PG 첨가에 따른 효과를 보이지 않았다 (Fig. 4). 한편 닭 (chicken)의 MINPP에서는 생리학적 농도범위를 벗어난 엄청난 양의 25 mM Mg²⁺ 이온의 첨가시에 기질 InsP_6 에 대한 phytase 효소활성이 2배로 증가하였지만 (Maenz와 Classen, 1998), 인간 MINPP 효소와 그 아미노산 서열 및 생화학적 특성이 가장 유사한 쥐 (rat)의 MINPP 효소는 생리적 농도범위인 1-3 mM의 Mg²⁺ 이

온침가가 기질 InsP_6 에 대한 phytase 효소활성에 아무런 영향을 끼치지 않았다(Craxton 등, 1997). 이를 토대로 인간 MINPP 효소의 기질 2,3-BPG에 대한 생리적 농도범위인 2 mM Mg^{2+} 이온 첨가시 phosphatase 효소활성의 변화를 조사해 본 결과 Mg^{2+} 이온의 첨가효과는 보이지 않았다(Fig. 4). 또한 rat MINPP 효소의 기질 InsP_6 에 대한 효소활성 측정시 그 효소반응의 안정화 효과에 기여하는(Ali 등, 1993) 요소인 100 mM Cl^- 이온의 첨가가 기질 2,3-BPG에 대한 인간 MINPP 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Cl^- 이온의 첨가효과는 보이지 않았다(Fig. 4).

결론적으로 인간 유래 MINPP 효소는 중성범위에서 최적의 피틴테인 분해 활성을 지니고 같은 histidine acid phosphatase 계열의 기존 미생물 유래 phytase와는 상이한 기질특이성을 갖는 차별화된 효소특성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 인간 유래 MINPP 효소를 산업적으로 대량생산하여 인간영양학에서 결핍되기 쉬운 미네랄인 철의 흡수 및 이용률 개선을 위한 첨가제로서의 이용 측면이 고려될 수 있다. 또한 가까운 미래에 인간유래 MINPP 유전자에 관한 정보를 토대로 최근 기능유전체학(functional genomics)과 생물정보학(bioinformatics)의 발달에 따른 단위동물인 돼지에서 발현되는 유전자전사체(transcriptome) 및 발현서열표지(EST; Expressed Sequence Tag)의 분석이 가능해지면서(Tuggle 등, 2007) 아직까지 규명되지 않은 돼지 유래의 MINPP 효소의 유전자 클로닝 시도 및 유전자재조합으로 그 효소를 발현시켜 그 효소학적 연구를 통해 만약 돼지유래 MINPP 효소가 피틴테인 분해활성을 가진 것으로 밝혀진다면, 그 효소를 하나의 돼지의 내생 phytase로서 인오염제어를 위한 친환경사료첨가제로서 이용하는 방안 또는 동물유전공학을 통한 돼지 유래 MINPP 효소가 과발현된 형질전환돼지를 생산하여 인오염이 개선된 저공해친환경동물로 새롭게 육종하여 산업적으로 이용하는 방안이 고려될 수 있다.

IV. 요약

산업용 균주인 *Pichia pastoris*에서 재조합 발현된 당화 된 인간유래 MINPP(multiple inositol polyphosphate phosphatase) 효소는 기질 피틴테인(InsP_6)에 대한 파이테이즈 효소활성을 나타내었고 탈당화시 그 효소활성이 30% 감소되었다. 그 효소의 기질 InsP_6 에 대한 최적 pH 활성은 중성범위인 pH 7.4였다. 기질특이성 측면에서 인간 MINPP 효소는 *para*-nitrophenylphosphate (pNPP), ATP, ribose-1-phosphate (R-1-P)와 같은 유기인산화합물(organic phosphate conjugates)의 분해활성은 매우 낮은 대신, 기질 InsP_6 를 효과적으로 분해하였고 특히 화학적 자극제인(chemical stimulator)인 1 mM 2-phosphoglycolate (2-PG)의 첨가에 따른 기질 2,3-bisphosphoglycerate (2,3-BPG)에 대한 효소활성이 2-PG를 첨가하지 않을때 보다 1.2배 증가되었지만 기질 InsP_6 에 대한 효소활성에는 영향을 주지 않았다. 또한

2 mM Mg^{2+} 이온과 100 mM Cl^- 이온의 첨가는 MINPP 효소의 기질 2,3-BPG에 대한 효소활성에 역시 영향을 주지 않았다.

V. 인용 문헌

1. Ali, N., Craxton, A. and Shears, S. B. 1993. Hepatic Ins (1,3,4,5) P_4 3-phosphatase is compartmentalized inside endoplasmic reticulum. J Biol. Chem. 268:6161-6167.
2. Caffrey, J. J., Hidaka, K., Matsuda, M., Hirata, M. and Shears, S. B. 1999. The human and rat forms of multiple inositol polyphosphate phosphatase: functional homology with a histidine acid phosphatase up-regulated during endochondral ossification. FEBS Lett. 442:99-104.
3. Casey, A. and Walsh, G. 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. Bioresour. Technol. 86:183-188.
4. Chi, H., Tiller, G. E., Dasouki, M. J., Romano, P. R., Wang, J., O'Keefe, R. J., Puzas, J. E., Rosier, R. N. and Reynolds, P. R. 1999. Multiple inositol polyphosphate phosphatase: Evolution as a distinct group within the histidine phosphatase family and chromosomal localization of the human and mouse genes to chromosomes 10q23 and 19. Genomics 56: 324-336.
5. Cho, J., Choi, K., Darden, T., Reynolds, P. R., Petite, J. N. and Shears, S. B. 2006. Avian multiple inositol polyphosphate phosphatase is an active phytase that can be engineered to help ameliorate the planet's "phosphate crisis". J. Biotechnol. 126:248-259.
6. Cho, J., King, J. S., Qian, X., Harwood, A. J. and Shears, S. B. 2008. Dephosphorylation of 2,3-bisphosphoglycerate by MIPP expands the regulatory capacity of the Rapoport-Luebering glycolytic shunt. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 5998-6003.
7. Choi, Y. M., Suh, H. J. and Kim J. M. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. J. Prot. Chem. 20:287-292.
8. Cosgrove, D. J. 1966. The chemistry and biochemistry of inositol polyphosphates. Rev. Pure Appl. Chem 16:209-215.
9. Craxton, A., Caffrey, J. J., Burkhardt, W., Safrany, S. T. and Shears, S. B. 1997. Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. Biochem. J. 328:75-81.
10. Cregg, J. M., Cereghino, J. W., Shi, J. and Higgins, J. R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. Mol. Biotechnol. 16:23-52.

11. Garel, M. C., Arous, N., Calvin, M. C. and Craescu, C. T. 1994. A recombinant bisphosphoglycerate mutase variant with acid phosphatase homology degrades 2,3-diphosphoglycerate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3593-3597.
 12. Haefner, S., Knietzsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M. and Zelder, O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:588-597.
 13. Han, Y. and Lei, X. G. 1999. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364:83-90.
 14. Hidaka, K., Kanematsu, T., Caffrey, J. J., Takeuchi, H., Shears, S. B. and Hirata, M. 2003. The importance to chondrocyte differentiation of changes in expression of the multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Exp. Cell. Res.* 290:254-264.
 15. Kim, Y., Kim, H. K., Bae, K. S., Yu, J. H. and Oh, T. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.* 22:2-7.
 16. Kim, Y. O., Kim, H. W., Lee, J. H., Kim, K. K. and Lee, S. J. 2006. Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 28:33-38.
 17. Lei, X. G. and Porres, J. M. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 25:1787-1794.
 18. Maenz, D. D. and Classen, H. L. 1998. Phytase activity in the small intestine brush border membrane of the chicken. *Poultry Sci.* 77:557-563.
 19. Rasmus, H. N., Fuglsang, C. C., Arleth, L. and Westh, P. 2006. Interrelationships of glycosylation and aggregation kinetics for *Peniophora lycii* phytase. *Biochem.* 45:5057-5066.
 20. Torres, J., Domínguez, S., Cerdá, F. M., Obal, G., Mederos, A., Irvine, R. F., Diaz, A. and Kremer, C. 2005. Solution behavior of myoinositol hexakisphosphate in the presence of multivalent cations. Prediction of a neutral pentamagnesium species under cytosolic / nuclear conditions. *J Inorg. Biochem.* 99:828-840.
 21. Tuggle, C. K., Wang, O. and Couture, O. 2007. Advances in swine transcriptome. *Int. J. Biol. Sci.* 3:132-152.
 22. Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Remy, R., Fimbel, R., Oesterheld, G., Lehmann, M. and van Loon, A.P.G.M. 1999. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:367-373.
- (접수일자 : 2009. 3. 11. / 수정일자 : 2009. 4. 17. / 채택일자 : 2009. 4. 20.)