



붉은줄지렁이 (*Eisenia andrei*) 중장에서 발현되는 chitinase 유전자, EaChi의 동정 및 분자생물학적 특성에 관한 연구

탁은식, 김대환, 이명식, 안치현, 박순철[†]

중앙대학교 생명과학과

(2010년 6월 25일 접수, 2010년 9월 15일 수정, 2010년 9월 17일 채택)

Identification and molecular characterization of the chitinase gene, EaChi, from the midgut of the earthworm, *Eisenia andrei*

Eun Sik Tak, Dae hwan Kim, Myung Sik Lee, Chi Hyun Ahn, Soon Cheol Park[†]

Department of Life Science, Chung-Ang University

ABSTRACT

Chitinases (EC 3.2.1.14) hydrolyze the β -1,4-linkages in chitin, the second most abundant polymer of N-acetyl- β -D-glucosamine which is a structural component of protective biological matrices such as fungal cell walls and insect exoskeletons. The glycosyl hydrolases 18 family including chitinases is an ancient gene family widely expressed in archaea, prokaryotes and eukaryotes. Since earthworms live in the soil with a lot of microbial activities and fungi are supposed to be a major component of the diet of earthworm, it has been reported that there would be appropriate immune system to protect themselves from microorganisms attacks.

In this study, the novel chitinase, EaChi, from the midgut of earthworm, *Eisenia andrei*, were identified and characterized. To obtain full-length cDNA sequence of chitinase, RT-PCR and RACE-PCR analyses were carried out by using the previously identified EST sequence amongst cDNA library established from the midgut of *E. andrei*. EaChi, a partial chitinase gene, was composed of 927 nucleotides encoding 309 amino acids. By the multiple sequence alignments of amino acids with other different species, it was revealed that EaCHI is a member of glycosyl hydrolases 18 family, which has two highly conserved domains, substrate binding and catalytic domain.

Keywords : Chitinase, Novel glycosyl hydrolase, Earthworm, *Eisenia andrei*, Midgut

[†]Corresponding author : scpark@cau.ac.kr

초 록

Chitinase (EC 3.2.1.14)는 곰팡이와 곤충 등에서 세포벽이나 외골격을 형성하는 생물학적 방어기질의 구성 요소인 chitin의 β -1,4-linkages를 가수분해하는 효소이다. 이러한 chitinase를 포함하는 Glycosyl hydrolases 18 family는 Archaea, Prokaryotes 그리고 Eukaryotes에 널리 퍼져 있는 Ancient gene으로 알려져 있다. 그 중, 지렁이는 곰팡이와 세균이 많은 환경에서 자라기 때문에 이러한 미생물들의 공격으로부터 스스로를 보호할 수 있는 면역 체계를 가지고 있는 것으로 알려져 왔다.

본 연구에서는, 붉은줄지렁이 (*Eisenia andrei*)의 중장에서 발현되는 Chitinases의 cDNA 서열을 얻기 위해 기존에 알려져 있던 EST 서열을 가지고 RT-PCR 및 RACE-PCR을 수행하였고 이를 통해 *E. andrei*의 중장에서 발현되는 Chitinase의 특성을 동정 및 규명하였다.

그 결과 309개의 아미노산을 암호화하는 927개의 염기 서열을 얻을 수 있었으며 다른 종들의 Chitinases와 아미노산 서열을 비교 분석한 결과 지렁이의 Chitinase는 Glycosyl hydrolases 18 family에 속하고, 기질 결합과 촉매 작용에 관여하는 2개의 영역이 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다.

핵심용어: 키틴 분해 효소, 당 가수분해 효소, 지렁이, *Eisenia andrei*, 중장

1. 서론

Chitin은 지구상에 Cellulose 다음으로 널리 퍼져 있는 β -1,4-N-acetylglucosamine의 불용성 선형 중합체로써 규조류 (diatom), 효모 (yeast), 균류 (fungi)의 세포벽, 원생동물 (protozoan), 곤충류 (arachnids) 및 갑각류 (crustaceans)의 외골격, 연체동물의 치설 (radula) 및 두족류 (cephalopods)의 Beaks 등에 존재한다¹⁾⁻⁶⁾.

Chitinase는 glycosyl hydrolase (EC 3.2.1.-)에 속하는데 glycosyl hydrolase는 둘 이상의 탄수화물, 탄수화물과 비탄수화물 부분의 글리코시드 결합 (glycosidic bond)을 가수분해하는 효소로서 고세균 (archaea), 진정세균 (eubacteria), 진핵생물들 (eukaryotes)에서 발견되었다. 이 chitinase는 그들의 활성에 따라서 exochitinase, endochitinase, 그리고 N-acetylglucosaminidase로 나눌 수 있다⁷⁾.

Chitinase는 현재까지 서열 분석 결과 glycosyl hydrolase 18 및 19 family로 나눌 수 있으며, glycosyl hydrolase 18 family는 세균, 곰팡이, 바이러스, 동물 및 몇몇 식물들의 chitinase를 포함하

며 19 family는 식물 및 일부 세균의 chitinase를 포함한다^{8,9)}.

Chitinase는 박테리아, 균류, 식물 및 무척추동물 등에서 활성이 보고된 바 있으며, 곤충의 탈피과정과 키틴질 음식의 소화에 중요한 역할을 한다^{10,11)}. 또한 식물의 균류 병원체에 대한 저항성¹²⁾, 유기합성 농약을 사용하지 않은 생물학적 방제시스템, 수산업에서 키틴질이 함유된 유기성 폐기물 처리 등에도 중요하게 이용되고 있다.

지렁이는 토양표면에 존재하는 식물 낙엽층의 일차적인 분해와 영양소의 방출 및 순환에 중요한 역할을 수행하기 때문에 토양생태계의 유지 및 토양 비옥도의 증대에 지대한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹³⁻¹⁸⁾. 이러한 환경에 대한 지렁이의 역할들은 식물의 낙엽 및 유기물 쓰레기를 소화시키는 과정에서 장의 체강으로 분비되는 단백질에 의해 먹이원을 소화시킴으로써 시작되는데¹⁹⁻²¹⁾, amylase, cellulase, chitinase 등의 활성에 의해 이루어진다. 특히, chitinase는 식물에서 곰팡이 균에 저항하는데 중요한 역할을 담당하는 효소로 알려져 있다. 따라서 섭취하는 주요 성분 중 하나가 곰팡이인 지렁이로서는 chitinase가 일중

의 면역시스템으로도 작용할 수 있음이 제시 되었다²⁰⁾. 본 연구에서는 남시지렁이과(lumbricidae)에 속하고 우리나라 분포종인 *Eisenia andrei*의 증장에 분포하는 chitinase의 일부를 동정하여 분자생물학적인 특성을 분석하고 다른 종에서 유래한 유전자와의 비교 분석을 통해 그 유용성을 살펴보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 배양

남시 미끼용 지렁이 (*E. andrei*)를 구입하여 환대가 잘 발달된 성숙한 개체만을 선택하여 증류수로 세척하였다. 토양은 배양토와 자연비료를 1:1로 혼합하여 사용하였으며, 지렁이 성장에 해로운 선충류의 성장을 최소화하기 위하여 65°C 건조용 전기 오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 15×20×7 cm 크기의 플라스틱 용기에 약 60마리씩과 토양을 넣어 23±1°C를 유지하며 습지에서 배양하였다. 배양 시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상을 유지하도록 하였으며, 먹이원으로 우분을 매일 토양 위에 공급하였다. 증장 내용물의 배출을 위하여 지렁이 생리식염수 (25mM NaCl, 2.5 mM K₂SO₄, 67.5 mM Na₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄, 13.25 mM CaCl₂, 5 mM Tris, 2.7 mM glucose)로 적신 filter paper에서 최소 48시간 이상 배양한 후 실험에 사용하였다.

2.2 5' and 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends Polymerase Chain Reaction)-PCR

성숙한 지렁이 증장으로부터 Tri-reagent (Sigma)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 첫 번째 cDNA 가닥은 cDNA synthesis Kit (Promega)를 이용하여 제작하였으며, 유전자 특이적인 primer 5' - GACTTCAACGGTGCCTGGGACACT - 3'과 5' - GCACCGTCCATAGGTGGCAGTACC - 3'을 사용하여 PCR을 수행하였다. 최종 PCR 반응물을 T/A cloning vector (Invitrogen)에 접합시킨 후,

One shot TOP 10 E.coli (Invitrogen)에 형질전환 시켰다. 형질전환 된 박테리아는 1.4 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolylβ-D-galactopyranoside (X-gal), 50 μg/ml ampicillin이 포함된 LB 배지 (5 g of Bacto Yeast Extract, 10 g of Bacto Tryptone, 14 g of Bacto Agar, 10 g of NaCl / 1 ℓ)에 접종하였다.

2.3 플라스미드 분리 및 염기서열 결정

접종 후 형성된 콜로니 중 약 10개의 흰색 콜로니들을 무작위로 뽑아 5 ml의 LB 배지 (ampicillin 100 μg/ml)에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 교반 배양하였다. 배양된 박테리아로부터 플라스미드 DNA의 분리는 QIAprep spin miniprep kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 분리된 플라스미드는 제한효소인 EcoR I (10 U/μl, Roche) 1 μl, buffer H (Roche) 1 μl, plasmid 8 μl를 혼합하여 37°C 항온조에서 1시간 30분 배양 후 1% agarose gel로 cDNA의 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 결정을 위한 반응은 AmpliTaq DNA polymerase가 포함된 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 이용하여 MJ research Gradient Cycler에서 수행하였으며, 형광 표지된 (fluorescent-labelled)절편은 에탄올 침전에 의해 정제하였다. 정제된 표본은 증류수로 용해한 후 ABI 3700 sequencer를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열의 분석은 National Centre of Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)에서 BLASTX 프로그램을 이용하여 단백질 자료 (nonredundant)와 비교를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 지렁이 chitinase 유전자의 일반적인 특징

기준에 밝혀진 일부 염기서열에 특이적인 primer를 제작하여 RACE-PCR을 수행한 결과 309개의 아

```

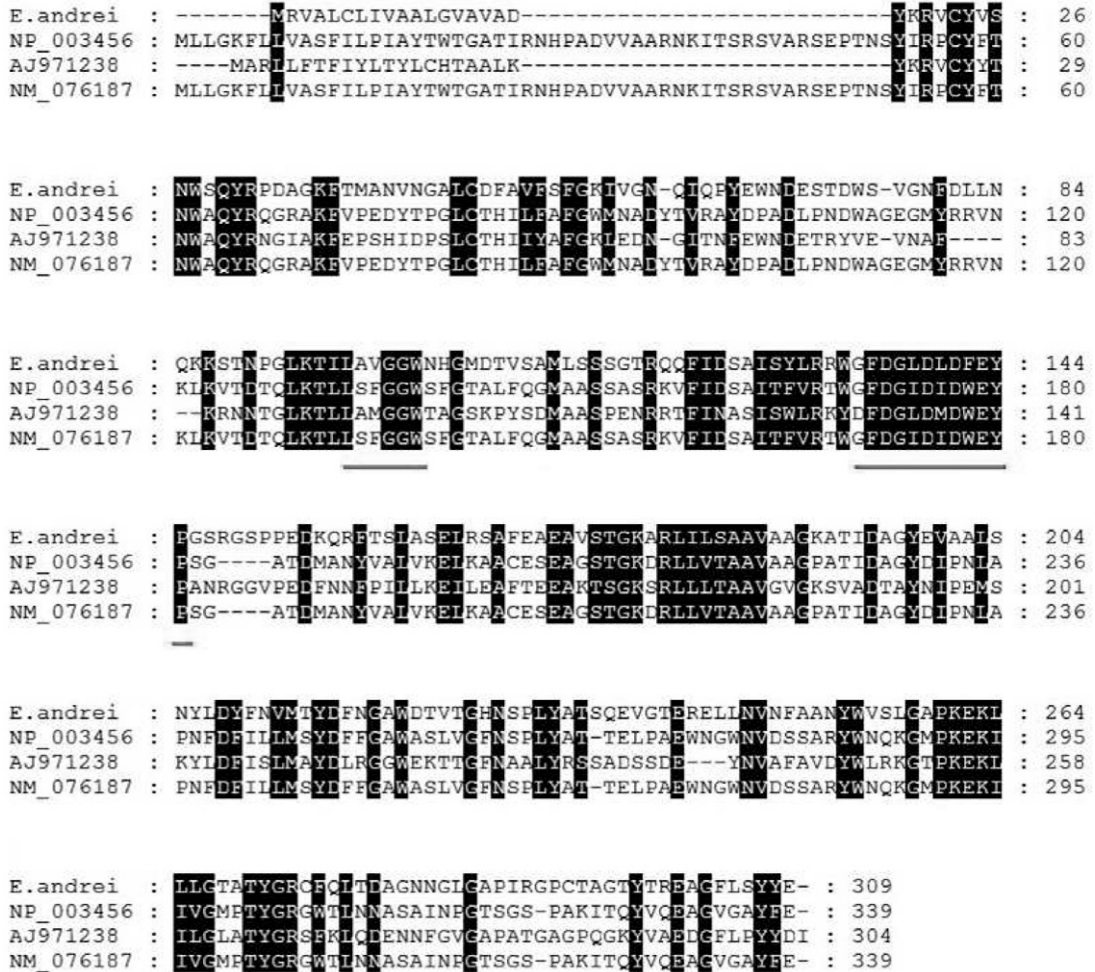
1: ATG AGG GTC GCC CTC TGC TTA ATC GTG GCT GCG CTT GGA GTC GCA GTT GCA GAC TAC AAG
1: M R V A L C L I V A A L G V A V A D Y K
61: CGC GTG TGC TAC GTT TCC AAT TGG TCG CAG TAT CGT CCG GAT GGC GGC AAA TTC ACG ATG
21: R V C Y V S N W S Q Y R P D A G K F T M
121: GCT AAC GTC AAT GGA GCG CTC TGC GAC TTT GGC GTC TTC TCC TTT GGA AAG ATC GTC GGC
41: A N V N G A L C D F A V F S F G K I V G
181: AAT CAA ATT CAG CCG TAC GAG TGG AAC GAC GAA AGC ACT GAT TGG TCG GTC GGA AAC TTC
61: N Q I Q P Y E W N D E S T D W S V G N F
241: GAT CTG CTG AAC CAG AAG AAA TCA ACG AAT CCG GGT CTG AAG ACA ATC CTT GCG GTC GGT
81: D L L N Q K K S T N P G L K T I L A V G
301: GGA TGG AAC CAC GGA ATG GAC ACA GTG TCC GGC ATG TTA TCG TCA AGC GGA ACC CGC CAG
101: G W N H G M D T V S A M L S S S G T R Q
361: CAG TTC ATC GAC AGC GCC ATA TCC TAC CTG CGA AGA TGG GGA TTC GAT GGA TTG GAC CTG
121: Q F I D S A I S Y L R R W G F D G L D L
421: GAT TTC GAA TAT CCA GGA TCC AGA GGA AGT CCA CCG GAG GAC AAA CAG CGA TTC ACC TCA
141: D F E Y P G S R G S P P E D K Q R F T S
481: CTC GCA TCG GAA CTG AGA TCG GCC TTC GAG GCA GAG GCG GTC AGC ACC GGC AAA GCG CGT
161: L A S E L R S A F E A E A V S T G K A R
541: CTT ATT CTC TCG GCT GCC GTG GCC GCC GGA AAA GGC ACC ATC GAT GGC GGT TAC GAG GTC
181: L I L S A A V A A G K A T I D A G Y E V
601: GCC GCT CTC TCC AAT TAC CTG GAC TAC TTC AAC GTG ATG ACC TAT GAC TTC AAC GGT GCC
201: A A L S N Y L D Y F N V M T Y D F N G A
661: TGG GAC ACT GTG ACT GGC CAC AAT TCT CCA CTC TAC GCT ACT TCG CAA GAA GTT GGC ACG
221: W D T V T G H N S P L Y A T S Q E V G T
721: GAA AGA GAA CTG CTC AAT GTG AAC TTT GCA GCG AAT TAC TGG GTC AGC CTC GGA GGC CCG
241: E R E L L N Y N F A A N Y W V S L G A P
781: AAA GAA AAG CTG TTG CTG GGT ACT GGC ACC TAT GGA CCG TGC TTC CAG CTG ACC GAT GGC
261: K E K L L L G T A T Y G R C F Q L T D A
841: GGG AAC AAC GGC CTT GGA GCT CCG ATA AGA GGA CCA TGC ACC GCG GGG ACC TAC ACG AGA
281: G N N G L G A P I R G P C T A G T Y T R
901: GAA GCA GGT TTC CTG TCC TAC TAC GAG
301: E A G F L S Y Y E

```

[Fig. 1] The partial coding sequence of earthworm chitinase gene and its encoding amino acids. The putative signal peptide is underlined. Numbers on the left side indicate nucleotide sequence length and amino sequence length, respectively.

미노산을 암호화하는 927개의 일부 chitinase 서열을 얻을 수 있었고 [Fig. 1], 생물정보학적 방법을 통하여 조사한 결과 N-말단부위의 19개 아미노산 잔기는

signal peptide인 것으로 나타났다. 또한 PeptideMass 프로그램에 의해 예상되어진 이론적인 pI 값은 5.1, 이론적인 분자량은 33.6 kDa 이었다.



[Fig. 2] Alignments of amino acid sequences for partial chitinase gene of *Eisenia andrei*. The alignment was carried out with ClustalW2.0 programme and the shaded columns represent complete coincidence of amino acid residues in the column. Substrate binding domain and catalytic domain is underlined. The organism for the deduced amino acid sequences obtained from the NCBI are as follows: Homo sapiens (NP_003456), *Crassostrea gigas* (AJ971238), *Caenorhabditis elegans* (NM_076187).

3.2 아미노산 서열의 비교 분석

단백질 서열 분석 결과 본 연구에서 밝혀진 *E. andrei*의 chitinase 단백질은 glycosyl hydrolase 18 family에 속하는 것으로 나타났으며 다른 종들과의 서열 분석을 통하여 glycosyl hydrolase의 활성에 필요한 두 개의 영역인 substrate binding domain과 catalytic domain이 잘 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다[Fig. 2]. 또한 *E. andrei*의 chitinase 단백질은 Homo sapiens와는 43%,

*Crassostrea gigas*와는 46%, 그리고 *Caenorhabditis elegans*와는 43%의 상동성을 가지는 것으로 나타났다.

4. 결론

본 논문에서는 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 중장에서 chitinase의 일부 염기 서열을 클로닝 하여 동정하였다. 확인된 염기 서열은 927개의 뉴클레오티드로

써 309개의 아미노산을 암호화 하는 것으로 확인되었다. BLAST X를 통하여 분석한 결과 glycosyl hydrolase 18 family에 속하며, NCBI에 등록된 다른 종들의 18 family 단백질과 43-46% 정도의 상동성을 나타내는 것으로 확인되었다. Chitinase의 활성화에 중요한 역할을 하는 substrate binding domain 과 catalytic domain 이 잘 보존되어 있기 때문에 전체 염기서열이 밝혀진다면 더 많은 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이를 이용한 효소 활성학적인 연구와 재조합유전자에 관한 연구가 이어진다면 대량생산을 통해 산업 전반에 걸쳐 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 중앙대학교 박사후 연수과정 (Post-Doc) 지원사업에 의한 것임.

참고문헌

1. Bartnicki-Garcia S. "Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi", Annu. Rev. Microbiol. 22, pp. 87~108 (1968).
2. Brimacombe J.S., Webber J.M., "Mucopolysaccharides : Chemical Structure, Distribution and Isolation", (B.B.A. Library Vol. 6, 6, pp. 18~42 (1964).
3. Falk M., Smith D.G., McLachlan J., and McInnes A.G., "Studies on Chitan (*B*-(1→4)-Linked 2-Acetamido-2-Deoxy-D-Glucan) Fibers of the Diatom *Thalassiosira Fluviatilis* Hustedt", Canad. J. Chem. 44, pp. 2269~2281 (1966).
4. Hackett C.J., Chen K.C., "Quantitative isolation of native chitin from resistance structures of *Sordaria* and *Ascaris* species", Anal. Biochem., 89, pp. 487~500 (1978).
5. Hackman R.H., Goldberg M., "A method for determinations of microgram amounts of chitin in arthropod cuticles", Anal. Biochem., 110, pp. 277~280 (1981).
6. Jeuniaux C., "La chitine dans le règne animal", Bull. Soc. Zool. France., 107, pp. 363~386 (1982).
7. Tanaka T, Fukui T, Imanaka T, "Different cleavage specificities of the dual catalytic domains in chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", J. Biol. Chem., 276, pp. 35629~35635 (2001).
8. Henrissat B, "A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities", Biochem. J. 280, pp. 309~316 (1991).
9. Ohno T, Armand S, Hata T, Mikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T. "A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037", J. Bacteriol. 178, pp. 5065~5070 (1996).
10. Roberts W.K., Selitrennikoff C.P., "Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity", J. Gen. Microbiol. 134, pp. 169~176 (1988).
11. Schlumbaum A, Mauch F, Vogeli U, Boller T, "Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth", Nature. 324, pp. 365~367 (1986).
12. Guthrie J.L., Khalif S, Castle A.J., "An improved method for detection and quantification of chitinase activities", Can. J. Microbiol. 51, pp. 491~495 (2005).
13. Millott, N., "The visceral nerves of the earthworm. 3. Nerves controlling secretion of protease in the anterior intestine",

- Proc. R. Soc., 132, pp. 200~212 (1944).
14. Edwards, C.A., and Fletcher, K.E., "Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown", *Agric. Ecosyst. Environ.*, 24, pp. 235~247 (1988).
 15. Tillinghast, E.K., O'Donnell, R., Eves, D., Calvert, E., and Taylor, J., "Water-soluble luminal contents of the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and their physiological significance", *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 129(2-3), pp. 345~353 (2001).
 16. Oades, J.M., "The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure", *Geoderma*, 56, pp. 377~400 (1993).
 17. Edwards, C.A., and Lofty, J.R., "Effects of earthworm inoculation upon the root growth of direct drilled cereals", *J. Appl. Ecol.*, 17, pp. 533~543 (1980).
 18. Stockdill, S.M.J., "Effect of introduced earthworms on the productivity of New Zealand pastures", *Pedobiologia*, 24, pp. 29~33 (1982).
 19. Lavelle, P., and Martin, A., "Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soil of the humid tropics", *Soil Biol. Biochem.*, 24, pp. 1491~1498 (1992).
 20. Kaushal, B.R., Bisht, S.B., and Kalia, S., "Effect of diet on cast production by the megascolecid earthworm *Amyntas alexandri* in laboratory culture", *Biol. Fertil. Soils*, 17(1), pp. 14~17 (1994).
 21. Chan, K.Y., and Heenan, D.P., "Surface hydraulic properties of a red earth under continuous cropping with different management practices", *Aust. J. Soil Res.*, 31(1), pp. 13~24 (1993).
 22. Tracey M.V., "Cellulase and Chitinase of Earthworm", *Nature*. 167, pp. 776~777 (1951). 