

Listeria innocua 유래 cyclomaltodextrinase의 유전자 클러스터 구조 및 효소 특성

장명운^{1†}, 정창구^{2†}, 강혜정^{1†}, 김민정¹, 이민재¹, 손병삼¹, 김태집^{1*}

¹충북대학교 대학원 축산·원예·식품공학부

²(주)에이피테크놀로지

Received: August 19, 2016 / Revised: August 26, 2016 / Accepted: August 26, 2016

Gene Cluster Analysis and Functional Characterization of Cyclomaltodextrinase from *Listeria innocua*

Myoung-Uoon Jang^{1†}, Chang-Ku Jeong^{2†}, Hye-Jeong Kang^{1†}, Min-Jeong Kim¹, Min-Jae Lee¹, Byung Sam Son¹, and Tae-Jip Kim^{1*}

¹Division of Animal, Horticultural, and Food Sciences, Graduate School of Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

²Advanced Protein Technologies Co., Suwon 16229, Republic of Korea

A putative cyclomaltodextrinase gene (*licd*) was found from the genome of *Listeria innocua* ATCC 33090. The *licd* gene is located in the gene cluster involved in maltose/maltodextrin utilization, which consists of various genes encoding maltose phosphorylase and sugar ABC transporters. The structural gene encodes 591 amino acids with a predicted molecular mass of 68.6 kDa, which shares less than 58% of amino acid sequence identity with other known CDase family enzymes. The *licd* gene was cloned, and the dimeric enzyme with C-terminal six-histidines was successfully produced and purified from recombinant *Escherichia coli*. The enzyme showed the highest activity at pH 7.0 and 37°C. *licd* could hydrolyze β -cyclodextrin, starch, and maltotriose to mainly maltose, and it cleaved pullulan to panose. It could also catalyze the hydrolysis of acarbose to glucose and acarviosine-glucose. In particular, it showed significantly higher activity towards β -cyclodextrin and maltotriose than towards starch and acarbose. *licd* also showed transglycosylation activity, producing α -(1,6)- and/or α -(1,3)-linked transfer products from the acarbose donor and α -methyl glucopyranoside acceptor.

Keywords: *Listeria innocua*, cyclomaltodextrinase (CDase), gene cluster, enzymatic characterization

서론

Cyclodextrinase 계열의 효소군에는 Glycoside Hydrolase (GH) family 13에 속하는 cyclomaltodextrinases (CDases, EC 3.2.1.54), maltogenic amylases (MAases; EC 3.2.1.133), neopullulanases (NPases; EC 3.2.1.135), *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase II (TVAIL) 등 서로 다른 명칭의 다양한 효소가 포함된다[1, 14, 18, 19]. 지금까지 CDase 계열의 효소들은 *Bacillus* [2, 10], *Paenibacillus* [11], *Clostridium*

[21], *Thermus* [12], *Lactobacillus* [17], *Lactococcus* [8] 속을 포함한 다양한 미생물에서 보고되었다. 특히 이러한 효소 유전자는 대부분의 *Bacillus* 속 미생물 유전체 내에 폭넓게 분포하고 있다[1, 18, 19]. 이들 CDase 계열 효소는 공통적으로 glucose로 구성된 탄수화물 중합체의 α -(1,4)-결합 부위를 가수분해하고, 다양한 수용체 분자에 대한 당전이 활성을 통해 α -(1,4)-, α -(1,3)-, α -(1,6)-결합으로 이루어진 각종 당전이 산물의 생성이 가능하기 때문에 이들 효소를 이용한 신규 탄수화물 소재 생산 등의 응용 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다[18].

그러나, 자연계에 존재하는 미생물 유전체 내에 일반 α -amylase 계열 전분 분해효소에 비해 널리 분포하는 이들 CDase 계열 효소의 역할에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 않았다. *Klebsiella oxytoca* 세포 내에서 cyclodextrin을

*Corresponding author

Tel: +82-43-261-3354, Fax: +82-43-271-4412

E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

경유하는 전분 이용경로가 제안되었고[3, 4], *Bacillus subtilis*의 glycogen 대사에서 maltogenic amylase와 pullulanase의 역할이 보고되었다[23]. 최근 *Listeria monocytogenes*의 maltose/maltodextrin 이용에 관련된 유전자 클러스터와 미생물학적 특성의 상관관계에 대한 보고가 이루어지면서[5], 병원성 균주에 속하는 *Listeria* 속 미생물 내 독성 유전자의 발현과 탄소원 이용 시스템, 탄수화물 대사경로에 대한 유전체 수준의 연구가 필요한 시점이다[15, 22].

본 연구에서는 미생물 유전체 데이터베이스 분석을 통해 *Listeria innocua* ATCC 33090 균주로부터 cyclodextrinase (LICD)로 예상되는 유전자를 발견하고, 클로닝, 발현하여 효소 특성을 확인하였다. 또한 이 유전자가 포함된 유전자 클러스터의 구조를 분석함으로써, 전분 및 maltose 이용 경로에서 LICD의 역할을 제시하였다.

재료 및 방법

미생물 및 유전자

Listeria innocua ATCC 33090 (DSM 20649) 균주의 염색체 DNA는 한국생명공학연구원으로부터 제공받았다. PCR 증폭 유전자의 클로닝을 위한 T-클로닝 벡터는 pMD18-T (Takara Biomedical Inc., Japan)를 사용하였다. 대장균 내 항시 발현은 pHCEII/*Nde*I (BioLeaders Co., Korea)를 변형시킨 pHCXHD [10] 벡터를 사용하였다. 유전자 클로닝 및 발현을 위한 숙주세포는 *Escherichia coli* MC1061 균주를 사용하였다.

시약 및 재료

일반 시약, 기질 및 미생물용 배지는 Sigma-Aldrich (USA)와 Duchefa Biochemie (The Netherlands)에서 구입하였다. 유전자 실험용 제한효소 및 DNA ligase 등은 Roche Applied Science (Germany)에서 구입하였으며, PCR 및 sequencing 프라이머는 Bioneer (Korea)에서 합성하여 사용하였다.

유전자 증폭과 클로닝

Listeria innocua 염색체 DNA를 주형으로 하고, LICD-N (5'-TTTTGGATCCATGGAAAAAGCAGGGATTTATC-3') 및 LICD-C (5'-TTTTCTCGAGGCTGTTTTCTTTAATAACAAGAA-3')를 PCR 프라이머로 사용하여 LICD 유전자를 증폭하였다. PCR 반응은 *Taq* DNA polymerase (Roche)와 C1000 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초로 30회 반복하고, 최종적으로 72°C에서 5분간 추가로 증폭하였다. 증폭된 유전자는 pMD18-T 벡터에 클로닝하여

pMDLICD를 제조하고, SolGent (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. 유전자 발현을 위해 pMDLICD를 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I로 절단하고, 항시발현 벡터인 pHCXHD에 삽입하여 pHXCLICD를 얻었다.

재조합 효소 유전자의 발현 및 정제

pHCLICD가 형질전환된 재조합 *E. coli* MC1061를 LBA (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 mg/ml ampicillin) 액체배지에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 원심분리로 회수한 균체를 ultrasonicator (VCX750, Sonics & Materials, Inc., USA)로 파쇄한 후, HisTrap-FF column (GE Healthcare, Sweden)과 AKTA Prime™ system (GE Healthcare)을 이용하여 정제하였다. 최종적으로 elution buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 500 mM NaCl, 500 mM imidazole] 1 ml/min의 유속으로 효소를 회수하였으며, 정제된 효소는 농축 후 최적 buffer로 투석하여 실험에 사용하였다.

단백질 정량 및 분자량 측정

재조합 단백질의 정제도는 Mini-protean II (Bio-Rad, USA)를 이용한 12% SDS-PAGE로 확인하였다. 전기영동 후, Coomassie blue로 염색하였고, 단백질 표준시료(Sigma-Aldrich)와 비교하여 단백질의 크기를 결정하였다. 단백질의 분자량과 4차 구조는 gel permeation chromatography (GPC; Superdex-200 column, 10 × 300 mm, GE Healthcare) 및 0.5 ml/min 유속의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 분석하였다. 효소 단백질의 농도 측정에는 BCA™ protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc., USA)를 이용하였다.

효소 활성 측정

LICD의 활성을 측정하기 위해 1%의 β -CD, pullulan, soluble starch를 각각 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 후, 적당량의 효소를 첨가하여 최종 100 μ l로 반응하였다. 37°C에서 10분 동안 효소반응을 통해 생성된 maltose의 양을 dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 측정하였다[16]. Maltotriose와 acarbose 기질의 경우, 효소반응으로 생성된 glucose의 양을 AceChem Glucose kit (YD Diagnostics Co., Korea)로 측정하였다. LICD의 활성 1 unit는 1분 당 1 μ mol의 maltose 또는 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

반응 산물 분석

최적 반응조건에서 1% 기질을 1시간 동안 효소반응하여 생성된 가수분해산물을 thin layer chromatography (TLC)

로 분석하였다. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck, Germany)에 1 µl의 시료를 spotting 하고, isopropanol, ethylacetate, 물을 3:1:1의 부피비로 혼합한 전개용액을 사용하였다. TLC plate를 발색시약 (3 g N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine, 50 ml H₂SO₄, 950 ml methanol)에 담긴 후, 건조하고 110°C에서 10분간 발색하여 분석하였다.

당전이 산물 분석

5% acarbose (donor; Carbosynth, England)와 10% α-methyl glucopyranoside (acceptor; Sigma-Aldrich)를 이용하여 최적 반응 조건에서 24시간 반응하였다. 생성된 당전이 산물은 CarboPac PA1 column (0.4 × 25 cm, Thermo Fisher Scientific Co., USA)과 electrochemical detector (ED40, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 high performance anion exchange chromatography (HPAEC; Bio-LC ICS-3000, Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 시료의 분석 조건은 이동상 A (150 mM NaOH, Thermo Fisher Scientific)를 기본으로 이동상 B (600 mM sodium acetate, Sigma-Aldrich)를 분당 1%씩 증가시키는 방법으로 진행하였다. 이동상의 속도는 1.0 ml/min으로 일정하게 유지하였다.

결과 및 고찰

Listeria maltose/maltodextrin 이용 유전자 클러스터

CDase 계열 효소 유전자는 다양한 미생물 유전체에 폭넓게 분포하는 것으로 알려져 있다[20]. 세포 내에서 발견되는 CDase 효소는 cyclodextrin (CD)의 환형구조를 절단하여 α-glucosidase의 최적 기질인 maltose 단위로 가수분해한다[18, 19]. 이미 *Bacillus subtilis* 168 세포 내의 탄수화물 대사에서 maltogenic amylase (MAase)와 debranching enzyme (pullulanase)의 생리적 기능 분석을 위한 다양한 돌연변이 연구가 보고된 바 있다[23]. 따라서, 본 연구에서는 *B. subtilis* MAase 유전자를 이용한 BLAST 검색을 통해 *Listeria innocua* ATCC 33090 유전체로부터 CDase로 예상되는 유전자(*lin2231*; GenBank accession No. NP471564)를 발굴하였고, 이를 LICD 유전자로 명명하였다. LICD 유

전자를 중심으로 *L. innocua* 유전체 서열을 광범위하게 분석하여, 이 유전자가 maltose/maltodextrin 이용 유전자 클러스터 내에 위치하는 것을 확인하였다(Fig. 1). LICD 유전자는 데이터베이스 상에서 초기에 α-glycosidase로 분류되어 있었으며, 이 외에도 다양한 sugar ABC transporter 유전자 군과 maltose phosphorylase 유전자가 클러스터를 구성함을 확인하였다. LICD의 아미노산 서열을 SignalP 서버[20]로 분석한 결과, 특이적인 signal peptide 서열이 발견되지 않았으며, 이는 이 효소가 세포 내의 cytoplasm 영역에서 발견됨을 의미한다. 따라서, LICD와 maltose phosphorylase는 세포 내로 운반된 cyclodextrin 또는 maltooligosaccharide를 서로 다른 방식으로 저분자화 하여 대사경로에 진입시키는 역할을 담당하는 것으로 예측된다. 이러한 유전자 클러스터 구조는 지금까지 알려진 *B. subtilis* 168 및 *Listeria monocytogenes* EGD-e의 유전체 분석 결과와 유사하였다[5, 23, 24].

LICD 유전자의 클로닝 및 발현

LICD 구조 유전자(*lin2231*)는 1,773개의 염기 서열로 이루어지며, 총 591개의 아미노산 잔기를 암호화하고 있다. 목적 유전자를 LICD-N 및 LICD-C 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 약 1.8 kb의 증폭된 LICD 유전자 단편을 T-클로닝벡터에 삽입하여 pMDLICD를 얻었다. 이를 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I으로 처리한 후, pHCXHD 발현벡터에 삽입하여 재조합 플라스미드인 pHCXLICD를 제조하였다. pHCXLICD를 *E. coli* MC1061에 형질전환 하여 재조합 대장균을 얻었으며, 이를 배양하여 C-말단에 6개의 histidine 잔기가 결합된 형태의 재조합 LICD를 얻었다. Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제한 LICD 효소를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 염기서열로부터 예상한 바와 같이 약 70 kDa 크기의 단백질이 발견되고 성공적으로 정제되었음을 확인하였다(Fig. 2).

LICD의 1차 및 4차 구조 분석

CAZy (Carbohydrate Active EnZymes) 데이터베이스에서는 아미노산의 서열 상동성을 토대로 하여, 전분 등 탄수화물 중합체를 기질로 하는 가수분해효소를 GH 13 family

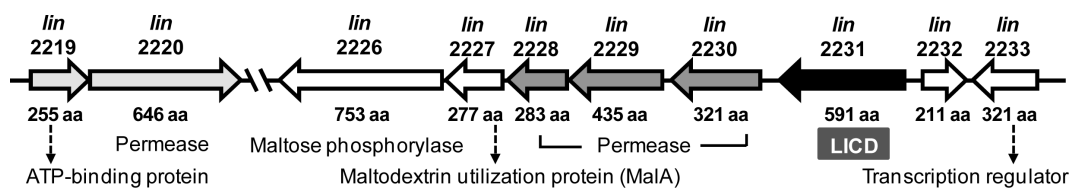


Fig. 1. Gene cluster for maltose/maltodextrin utilization in *Listeria innocua*. Each gene ID is shown above the arrow, and experimentally proven or presumptive protein functions below. The GenBank accession no. for the genome sequence is NC003212.

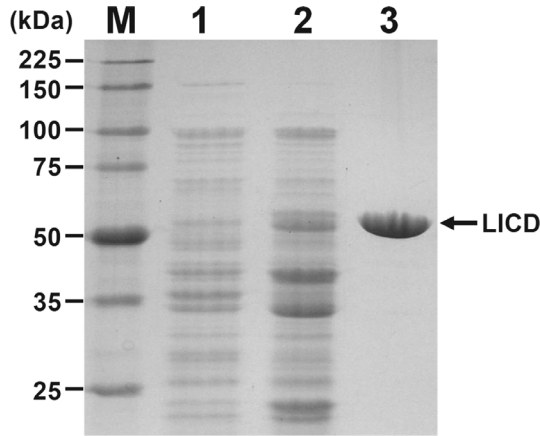


Fig. 2. Gene expression and purification of LICD. SDS-PAGE analysis showed the expression level and the purity of LICD from recombinant *E. coli*. Lane M, protein molecular weight marker; lane 1, cell extract from *E. coli* harboring pHCXHD; lane 2, cell extract from *E. coli* harboring pHCLICD; lane 3, LICD purified by Ni-NTA chromatography.

로 분류하고 있으며[1, 6], 넓은 의미에서 CDase 계열의 효소 역시 GH 13 계열에 속한다[14]. 아미노산 서열에 따른 상관관계를 분석한 결과, LICD는 다른 미생물 유래 CDase 계열 효소들과 39–57% 수준의 서열 상동성을 나타내었다. 특히, *Bacillus* 속 미생물 유래의 효소들과 높은 상관관계를 보였으며, *B. stearothermophilus* MAase [2]와 57.2%, 호열성 균주인 *Thermus* MAase [12]와 51.8%, *B. subtilis* MAase [23]와 52.0%, *B. halodurans* CDase [10]와 50.7%, 또한 *Thermoactinomyces vulgaris* amylase II [9]와 38.5%의 상동성을 나타내었다.

또한 LICD는 CDase 계열 효소의 구조적 특징을 공유하였다. 예를 들면, 일반적인 α -amylase에 존재하지 않는 N-말단 부위를 가지며, 상동 부위 I (DAVFNH), II (GWRLDVANE), III (EIWH), IV (LLGSHD) 서열 또한 매우 높은 유사도를 나타내었다. 상동 부위 II, III, IV 내에 위치하는 주요 활성 부위 아미노산 잔기인 Asp339, Glu368, Asp435 또한 공유하였다. 따라서, LICD는 CD 기질에 높은 활성을 보이는 CDase 계열 효소들과 60% 미만의 서열 상동성을 보이지만, 전체적인 1차 구조 및 활성 잔기의 위치, 상동부위 서열 등을 비교할 때 유사한 효소 특성을 가질 것으로 예상하였다.

GPC 분석 결과, 수용액 상에서 재조합 LICD의 분자량은 약 166 kDa이었으며, 이는 LICD가 homo-dimer의 형태로 존재함을 의미한다(Fig. 3). 지금까지 보고된 CDase 계열 효소들은 대부분 homo-dimer의 형태를 가지는 것으로 알려져 있으며[2, 7, 9, 10, 12, 21], 일부 효소에서 homo-dodecamer의 형태가 보고되기도 하였다[23]. 이들 효소에 공통으로 존재하는 N-말단 domain이 4차 구조의 형성에 중요한 역할을

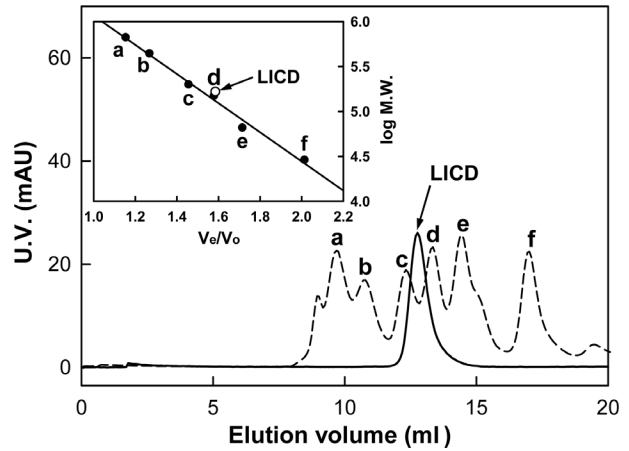


Fig. 3. Determination of quaternary structure of LICD. Molecular mass of LICD was estimated by gel permeation chromatography (Superdex-200). The purified LICD was drawn as a solid line and the molecular weight markers (a dashed line) were used as the mixture of six proteins: (a) thyroglobulin (669 kDa), (b) apoferritin (443 kDa), (c) α -amylase (200 kDa), (d) alcohol dehydrogenase (150 kDa), (e) bovine serum albumin (66 kDa), (f) carbonic anhydrase (29 kDa).

하며, 이 과정에서 형성된 좁고 깊은 형태의 기질 결합 부위 구조가 효소의 기질 특이성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[13]. LICD도 특유의 N-말단 부위를 가지므로, 이를 통해 homo-dimer 구조를 형성할 것으로 예상하였다.

LICD의 효소 특성

재조합 LICD는 β -CD를 기질로 할 때, 37°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 25°C에서도 50% 이상의 활성을 보였지만, 45°C에서는 매우 낮은 활성을 보였다(Fig. 4A). 한편, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에서 가장 높은 β -CD 가수분해 활성을 보였으나, pH 6.0 이하 또는 pH 8.0 이상의 조건에서는 최적 pH 대비 60% 이하의 낮은 활성을 나타내었다(Fig. 4B). 대부분의 중온성 미생물 유래 CDase 계열 효소들이 40–60°C, pH 5.5–8.0 범위에서 최적의 효소 활성을 나타내는 것을 감안할 때, *L. innocua* CDase는 온도 및 pH 변화에 민감한 경향을 나타내었으며, 이는 병원성 미생물 특성 상 숙주의 생육 적정 온도와 밀접한 관련이 있을 것으로 예상하였다[5, 22].

LICD의 기질 특이성 및 가수분해 특성

CDase 계열의 효소는 β -CD, pullulan, starch 뿐 아니라 maltooligosaccharide와 acarbose 등 다양한 기질에 대해 가수분해 및 당전이 활성을 가지는 것으로 알려졌다. 따라서 다양한 기질에 대한 LICD의 효소 활성을 측정하고, 이를 기존에 연구된 CDase 계열 효소들과 직접 비교하였다(Table

1). LICD를 포함한 모든 CDase 계열 효소는 β-CD에 대해 가장 높은 활성을 나타내었으나, 다른 기질에 대한 활성은 효소에 따라 다소 차이를 보였다. 예를 들어 LICD의 β-CD 및 pullulan 가수분해 활성은 BHCD와 ThMA의 중간 수준이었으며, starch와 acarbose에 대한 활성은 다른 두 효소보다 낮았다. 그러나, glucose 3개 분자로 구성된 maltotriose에 대한 가수분해 활성은 BHCD, ThMA에 비해 각각 1.5배,

4.4배 높은 활성을 보였다. 특히, starch 분해 활성에 비해 maltotriose에 대한 활성이 26배 이상으로 매우 높았으며, 이는 LICD가 고분자 중합체 보다 저분자 소당류에 대해 높은 활성을 가지는 효소임을 의미한다. 따라서 중합체 기질에 대해 높은 선호도를 나타낸 BHCD와 비교할 때, LICD의 기질 특이성이 매우 상이함을 알 수 있었다. 또한, α-glucosidase 저해제로 당뇨병 치료에 널리 사용되는 acarbose의 경우, ThMA와 BHCD 등의 CDase 계열 효소에 의해 glucose와 acarviosine-glucose로 분해된다[10, 12]. LICD의 경우에도 acarbose를 분해하지만, 그 활성은 ThMA와 BHCD에 비해 약 0.6% 및 53% 수준으로 크게 낮았다. 비교적 유사한 형태의 저분자 기질인 maltotriose와 acarbose 중, 특히 maltotriose에 대해 매우 높은 활성을 가지는 반면 acarbose에 대해 낮은 활성을 나타내는 것은 각각의 기질에 대한 LICD의 구조적 친화도가 다른 효소와 크게 다르기 때문으로 추측하였다.

각 기질로부터 생성된 반응산물을 TLC로 분석하여 LICD

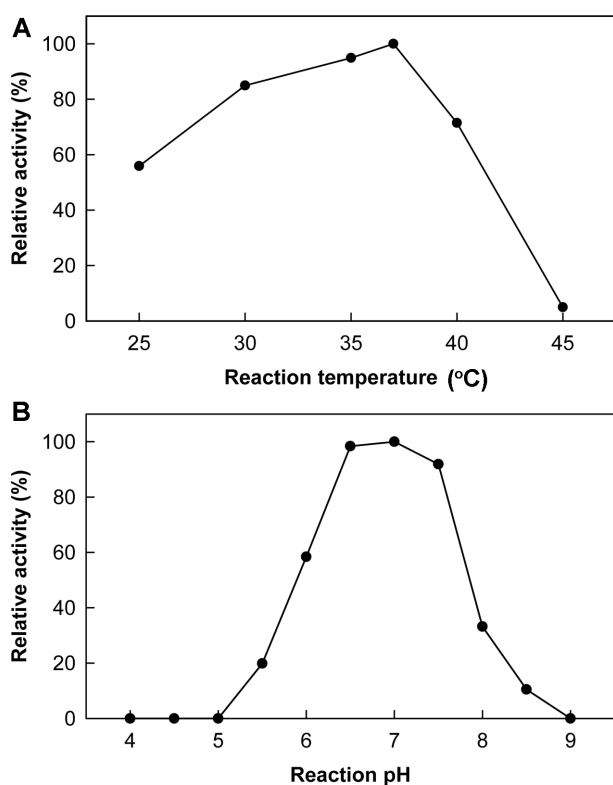


Fig. 4. Effects of reaction temperature (A) and pH (B) on LICD activity. Optimal reaction temperature and pH of LICD were determined on the basis of its hydrolyzing activity towards β-CD. Sodium acetate (pH 4.0–6.0); sodium phosphate (pH 6.0–7.5); Tris-HCl (pH 7.5–8.0); borate-NaOH (pH 8.0–9.0).

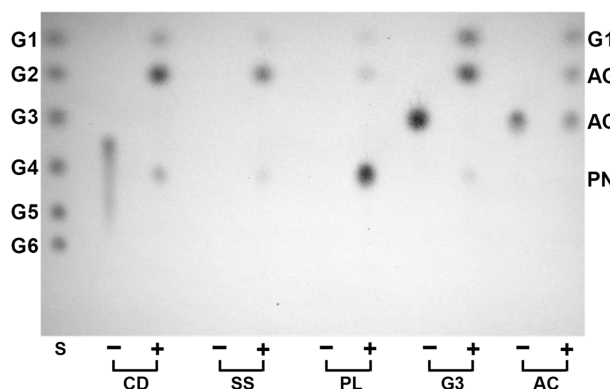


Fig. 5. TLC analysis of hydrolysis patterns of LICD on various substrates. LICD was reacted with 1% of each substrate: CD, β-CD; PL, pullulan; SS, soluble starch; G3, maltotriose; AG, acarviosine-glucose; AC, acarbose; PN, panose; S, maltooligosaccharide standards, and the reaction products with (+) or without (-) enzyme.

Table 1. Comparison of the multi-substrate specificity between LICD and other known CDase-family enzymes.

Enzyme ^a	Specific activity (U/mg) ^b					Activity ratio ^c			
	β-CD	Pullulan	Starch	Maltotriose	Acarbose	C/S	P/S	M/S	M/A
LICD	56.3 ± 0.7	13.0 ± 0.2	3.0 ± 0.0	77.9 ± 0.5	1.6 ± 0.0	18.8	4.3	26.0	48.7
BHCD	52.9 ± 0.3	22.8 ± 0.5	11.2 ± 0.1	17.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.7	2.0	1.6	6.0
ThMA	65.2 ± 0.9	5.0 ± 0.1	4.4 ± 0.1	48.9 ± 0.3	27.3 ± 0.3	14.8	1.1	11.1	1.8

^aLICD, *L. innocua* CDase; BHCD, *B. halodurans* CDase; ThMA, *Thermus* sp. MAase

^bEach hydrolyzing activity on β-CD, pullulan, or starch was determined by DNS reducing sugar assay, whereas the activity on maltotriose or acarbose was measured by glucose oxidase-peroxidase method.

^cThe abbreviations for the activity ratios between substrates were used as follows: C, β-CD; P, pullulan; S, soluble starch; M, maltotriose; A, acarbose.

의 기질 가수분해 패턴을 확인하였다(Fig. 5). LICD는 β -CD의 환형 구조를 *endo*-형으로 절단하여 7개의 glucose로 구성된 직쇄형의 maltoheptaose로 전환하며, 이어지는 가수분해 작용을 통해 maltose를 최종 산물로, glucose를 부산물로 생성하였다. Pullulan 및 starch에 대한 활성은 상대적으로 낮았지만, 장시간 반응을 통해 얻어진 산물은 예상과 같이 각각 maltose와 panose임을 확인하였다. Maltotriose의 분해 산물은 최종적으로 glucose와 maltose였으며, maltose는 더 이상 분해되지 않고 축적되었다. 이상의 결과를 통해 LICD가 α -(1,4)-결합을 분해하여 주로 maltose를 생성하는 전형적인 CDase 계열의 효소임을 알 수 있었다. 한편 acarbose의 경우에는 극히 낮은 효소활성으로 인해 기질이 불완전하게 분해되었으나, 소량의 glucose와 acarviosine-glucose가 생성된 것으로 판단할 때, 역시 다른 CDase 효소들과 유사한 가수분해 특성을 가지는 것으로 판단하였다.

결과적으로 LICD는 전형적인 CDase 계열의 효소이나, pullulan 및 starch와 같은 큰 분자량의 중합체 기질 보다 β -CD, maltotriose와 같은 저분자 소당류의 기질에 더 잘 작용하며, acarbose에 대한 분해 활성이 상대적으로 매우 낮은 특징을 보였다.

LICD의 당전이 특성

CDase 계열 효소의 일종인 ThMA 및 BHCD에 대한 연구

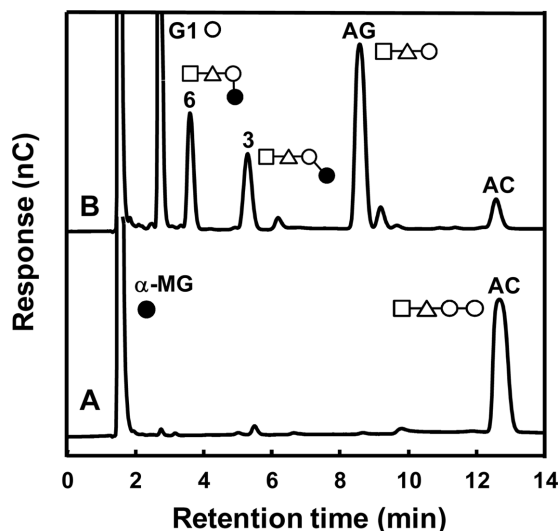


Fig. 6. HPAEC analysis of acarbose transglycosylation products. LICD was reacted with 5% acarbose (donor) and 10% α -methyl glucopyranoside (acceptor) at 37°C for 2 h. At each time interval of (A) 0 min, (B) 120 min, the reaction mixture was taken and analyzed by HPAEC. Abbreviations used here: α -MG, α -methyl glucopyranoside; G1, glucose; AG, acarviosine-glucose; AC, acarbose; 3, α -(1,3)-transglycosylation product; 6, α -(1,6)-transglycosylation product.

에서, 당전이 반응으로 얻어진 α -(1,6)- 및 α -(1,3)-결합의 전이 생성물은 다시 분해되지 않아 축적되며, 반대로 초기에 생성된 α -(1,4)-전이 생성물은 생성과 동시에 빠르게 재분해되는 것으로 보고되었다[10, 12]. 선행 연구를 토대로 LICD의 당전이 활성을 확인하고자, 공여체로 acarbose, 수용체로 α -methyl glucopyranoside (α -MG)를 이용한 당전이 반응을 실시하고, 반응산물을 HPAEC로 분석하였다. 당전이 반응을 통해 BHCD와 유사하게 α -(1,6)- 및 α -(1,3)-전이 생성물이 생성되었다(Fig. 6).

LICD와 기존 CDase 계열 효소 간 상동 부위 잔기들의 차별성에 주목하여 효소 구조 및 기능의 상관관계에 대한 지속적인 연구가 이루어진다면, 고유의 기질 특이성 및 당전이 활성에 관여하는 핵심 아미노산 잔기를 발굴할 수 있을 것이다. 이를 상호 치환하여 효소의 기질 특이성을 변화시키는 단백질 공학적 연구에 중요한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 또한 향후 보다 다양한 미생물에서 유래한 CDase 계열 효소를 비교·연구함으로써, 이들 유전자의 자연계 내 다양성 및 탄수화물 대사경로에서의 역할에 대한 과학적 이해를 향상시킬 것으로 기대한다.

요 약

Listeria innocua ATCC 33090 유전체로부터 maltose/maltodextrin 이용과 관련한 유전자 클러스터를 발견하였으며, 그로부터 cyclomaltodextrinase (LICD)로 예상되는 유전자를 클로닝하고, 대장균 내에서 발현하였다. LICD는 총 591개의 아미노산으로 이루어진 68.6 kDa 크기의 효소이며, 일반적인 CDase 계열 효소들과 39–58%의 아미노산 서열 상동성을 나타내었다. 재조합 LICD는 37°C, pH 7.0의 조건에서 최대 활성을 나타내었으며, cyclodextrin, starch, maltotriose에 작용하여 주로 maltose를 생성하였다. 또한 pullulan을 분해하여 panose를, 그리고 acarbose를 분해하여 glucose와 acarviosine-glucose를 생성하는 전형적인 CDase 계열 효소임을 확인하였다. 그러나, starch 및 pullulan과 같은 고분자 기질 대비 cyclodextrin 및 maltotriose의 저분자 소당류에 대해 상대적으로 높은 활성을 나타내며, acarbose 분해 활성이 매우 낮아 다른 효소들과 차별성을 가진다. 또한 LICD는 acarbose 공여체를 가수분해하여 수용체에 전이하는 당전이 활성을 보였다.

Acknowledgments

This work was supported by the research grant of Chungbuk National University in 2013.

References

1. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* **37**: D233-238.
2. Cha HJ, Yoon HG, Kim YW, Lee HS, Kim JW, Kweon KS, et al. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur. J. Biochem.* **253**: 251-262.
3. Feederle R, Pajatsch M, Kremmer E, Bock A. 1996. Metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella oxytoca* M5a1: purification and characterisation of a cytoplasmically located cyclodextrinase. *Arch. Microbiol.* **165**: 206-212.
4. Fiedler G, Pajatsch M, Bock A. 1996. Genetics of a novel starch utilisation pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *J. Mol. Biol.* **256**: 279-291.
5. Gopal S, Berg D, Hagen N, Schriefer EM, Stoll R, Goebel W, et al. 2010. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoS One* **5**: e10349.
6. Henrissat B, Bairoch A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.
7. Hondoh H, Kuriki T, Matsuura Y. 2003. Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Mol. Biol.* **326**: 177-188.
8. Jang MU, Kang HJ, Jeong CK, Park JM, Yi AR, Kang JH, et al. 2013. Enzymatic characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cyclomaltodextrinase expressed in *E. coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 391-397.
9. Kamitori S, Abe A, Ohtaki A, Kaji A, Tonozuka T, Sakano Y. 2002. Crystal structures and structural comparison of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylase 1 (TVAI) at 1.6 Å resolution and alpha-amylase 2 (TVAII) at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **318**: 443-453.
10. Kang HJ, Jeong CK, Jang MU, Choi SH, Kim TJ, Kim MH, et al. 2009. Expression of cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus halodurans* C-125 and characterization of its multisubstrate specificity. *Food Sci. Biotechnol.* **18**: 776-781.
11. Kaulpiboon J, Pongsawasdi P. 2004. Expression of cyclodextrinase gene from *Paenibacillus* sp. A11 in *Escherichia coli* and characterization of the purified cyclodextrinase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**: 408-415.
12. Kim TJ, Kim MJ, Kim BC, Kim JC, Cheong TK, Kim JW, et al. 1999. Modes of action of acarbose hydrolysis and transglycosylation catalyzed by a thermostable maltogenic amylase, the gene for which was cloned from a *Thermus* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1644-1651.
13. Kim TJ, Nguyen VD, Lee HS, Kim MJ, Cho HY, Kim YW, et al. 2001. Modulation of the multisubstrate specificity of *Thermus* maltogenic amylase by truncation of the N-terminal domain and by a salt-induced shift of the monomer/dimer equilibrium. *Biochemistry* **40**: 14182-14190.
14. Lee HS, Kim MS, Cho HS, Kim JI, Kim TJ, Choi JH, et al. 2002. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* **277**: 21891-21897.
15. Milenbachs AA, Brown DP, Moors M, Youngman P. 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **23**: 1075-1085.
16. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
17. Oh KW, Kim MJ, Kim HY, Kim BY, Baik MY, Auh JH et al. 2005. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**: 175-181.
18. Park KH. 2006. Function and tertiary- and quaternary-structure of cyclodextrin-hydrolyzing enzymes (CDase), a group of multisubstrate specific enzymes belonging to the α-amylase family. *J. Appl. Glycosci.* **53**: 35-44.
19. Park KH, Kim TJ, Cheong TK, Kim JW, Oh BH, Svensson B. 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**: 165-185.
20. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**: 785-786.
21. Podkovyrov SM, Zeikus JG. 1992. Structure of the gene encoding cyclomaltodextrinase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E and characterization of the enzyme purified from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 5400-5405.
22. Poncet S, Milohanic E, Maze A, Nait Abdallah J, Ake F, Larribe M, et al. 2009. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria. *Contrib. Microbiol.* **16**: 88-102.
23. Shim JH, Park JT, Hong JS, Kim KW, Kim MJ, Auh JH, et al. 2009. Role of maltogenic amylase and pullulanase in maltodextrin and glycogen metabolism of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **191**: 4835-4844.
24. Takami H, Nakasone K, Takaki Y, Maeno G, Sasaki R, Masui N, et al. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* **28**: 4317-4331.