

Glucoamylase 유전자의 Promoter와 분비신호서열을 이용한 *Bacillus subtilis* Endo-1,4- β -D-Glucanase의 효모에서 분비

안종석* · 강대욱 · 황인규 · 박승환 · 박무영¹ · 민태익

한국과학기술연구원 유전공학연구소

¹한국과학기술원 생물공학과

STA1 유전자의 promoter와 분비신호서열을 이용하여 *B. subtilis*의 CMCase를 분비하는 재조합 효모균주를 육성하였다. *STA1* 유전자의 promoter, 분비신호서열, TS region 및 mature glucoamylase N-말단부위의 아미노산 98개와 *B. subtilis*의 CMCase 구조유전자가 차례로 연결된 재조합플라스미드 pYESC24를 제작한 후 효모에 형질전환하였으나 CMCase가 세포외로 분비되지 않았다. 반면에 *STA1*의 TS region 및 mature glucoamylase N-말단 아미노산 98개를 제거하여 CMCase 구조유전자가 *STA1*의 분비신호서열에 바로 연결된 재조합 플라스미드 pYESC11에 의한 효모형질전환 균주는 CMCase 분비능이 아주 우수하였다. 이 형질전환 균주를 YPD 배지에서 4일간 배양한 후 세포부위 별 CMCase 역가를 측정한 결과 배양액 1 ml당 총 역가 44.7 unit 존재하였으며 이 중 93% 이상이 배양상등액에서 관찰되었다.

KEY WORDS □ *STA1*, Signal sequence, CMCase

자연계에서 가장 풍부한 biomass인 섬유소를 발효기질로 이용하기 위해서는 섬유소의 당화가 필수적이다. 섬유소 당화에 필요한 효소에는 endoglucanase(CMCase), exoglucanase 및 β -glucosidase(cellobiase) 등의 세 가지가 있다(15). 섬유소분해시 가장 먼저 작용하는 효소인 endoglucanase는 세균인 *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clostridium* 및 *Microbispora*와 곰팡이 *Trichoderma* 및 *Schizophyllum* 등에서 생산되나 에탄올 발효효모인 *Saccharomyces*속에서는 생산되지 않는다(12). 효모에 의한 연료용 에탄올이나 유용에탄올을 생산하기 위한 발효기질로서 섬유소를 이용하기 위하여 섬유소당화효소의 생성능을 효모 *Saccharomyces*에 부여하기 위한 많은 시도가 이루어졌다. *Bacillus subtilis*(3)와 *Cellulomonas fimi*(14) 등의 endoglucanase 자체 분비신호서열을 이용하여 효모에서 분비를 시도한 결과 세포외로 분비되지 않았으나, Honda 등(4)은 내열성 혐기성균의 endoglucanase를 자체 promoter와 분비신호서열을 이용하여 효모에서 분비시키는데 성공하였다. 한편, Skipper 등(14)은 효모의 *ADC I* 유전자의 promoter와 K1 독소의 분비신호서열을, Wong 등(19)은 *MEL1* 유전자의 promoter와 분비신호서열을 각각 사용하여 *Cellulomonas fimi*의 endoglucanase를 효모에서 분비하는데 성공하였다. 그리고 Jackson 등(6)은 효모 *ADC I* 유전자의 promoter와 mouse α -amylase의 분비신호서열을 이용하여 보리의 endoglucanase를 효모에서 분비시킬 수 있었다. 또한 방사형곰팡이인 *Trichoderma reesei*의 endoglucanase isozyme인

EGI(15, 18)과 EG III(11)가 자체 분비신호서열에 의해 효모에서 분비됨이 보고되었다.

한편, *Saccharomyces diastaticus*는 *S. cerevisiae*와 유전적, 생리적으로 매우 유사하며 glucoamylase를 세포외로 분비하여 전분을 분해할 수 있는 효모이다(20). 그리고 이 glucoamylase 유전자(*STA*)에는 단백질의 세포외 분비에 관여하는 분비신호서열(signal sequence)이 존재함이 밝혀졌다(22). 그러나 *STA* 유전자를 이용한 효모에서 외래 유전자의 발현과 단백질의 분비에 관한 보고는 Yamashita 등(22)이 대장균의 β -lactamase 분비와 Nakamura 등(9)이 사람의 5-lipoxygenase 유전자의 발현에 부분적으로 성공한 경우 이외에는 없다.

따라서 본 연구에서는 섬유소 분해능을 효모 *Saccharomyces*에 부여하고자 하는 목적과 외래 유전자 산물의 분비를 위한 glucoamylase 분비신호서열의 이용성을 개발하기 위해 *Bacillus subtilis*의 endoglucanase(CMCase) 구조유전자를 *STA* 유전자의 promoter와 분비신호서열에 재조합하여 *S. diastaticus*에서 CMCase를 세포외로 분비시키는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 효모는 *S. diastaticus* YIY 345(*ura3 leu2-3, 112 his4 sta^o inh^o*)로서 일본 히로시마 대학의 Yamashita 박사로부터 제공받았으며(20) *B.*

subtilis CMCase 유전자의 발현 및 분비용 숙주로 이용하였다. 또한 새로이 제작한 재조합 플라스미드의 증폭을 위해 *E. coli* MC 1061 [*hsdR2 hsdM+ hsdS+ araD139(ara-leu)₇₆₉₇ (lac)₇₄ galE galK16 rpsL (Str^r) mcrA mcrB1*]을 사용하였다. *B. subtilis* CMCase 유전자를 함유한 2.0 kb DNA 단편이 pBR 322에 cloning된 재조합 플라스미드 pBS13(10)으로부터 CMCase 구조유전자를 pUC9에 subcloning하여 이를 이용하였다. 본 연구실에서 이미 cloning된 *S. diastaticus*의 glucoamylase 유전자(STA1)를 함유한 재조합 plasmid pYES 18(1)로부터 STA1 유전자의 promoter와 분비신호서열을 함유한 DNA 단편을 얻은 후 대장균과 효모의 shuttle vector인 YEp 24에 도입하여 *B. subtilis*의 CMCase 분비에 사용하였다.

배지

대장균의 배양을 위해 LB 배지(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl)를 사용하였으며 효모의 배양을 위한 복합배지로 YPD 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였다. 효모형질전환체의 1차 선별을 위한 최소 배지로 histidine(20 µg/ml)과 leucine(30 µg/ml)이 첨가된 YNBD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acid, 2% glucose, 2% agar)를 사용하였다.

효소 및 시약

유전자 조작에 사용된 제한효소와 DNA 변형효소들을 KOSCO, NEB 및 IBI 등에서 구입하였고 DNA 분리와 정제 및 완충용액의 제조에 사용된 시약은 Sigma Chemical Co.의 Mol. Biol. grade를 사용하였다. 배지용 시약은 Difco에서 구입하였다. 재조합 플라스미드를 제작하기 위해 제한효소와 DNA 변형 효소를 이용한 DNA 조작은 제조회사에서 명시한 기준에 준하여 Maniatis 등(8)의 방법으로 수행하였다.

효모의 형질전환

효모에서 CMCase의 발현, 분비를 위한 재조합 플라스미드를 숙주인 효모에 도입하기 위해 Ito 등(5)의 방법으로 효모의 형질전환을 수행하였다.

CMCase를 분비하는 효모형질전환체의 선별

YNBD 한천배지에서 1차적으로 선별된 형질전환체들 중 CMCase를 세포외로 분비하는 균주를 선별하기 위해 모든 형질전환체들을 YNBDSC 한천배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base w/o amino acids, 2% glucose, 1% CMC, 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.5, 20 µg/ml histidine, 30 µg/ml leucine, 2% agar)에 tooth-picking한 후 30°C에서 2일간 배양하였다. 0.2% Congo red 용액으로 30분간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 세척하였다(16). 콜로니 주위에 clear zone이 생성된 형질전환체를 선별하였다.

CMCase의 역가 측정

효모형질전환체가 생산하는 CMCase 역가를 정량

적으로 분석하고 세포부위별 분포를 알아보기 위해 다음과 같은 방법을 사용하였다. 형질전환체를 5 ml의 YPD배지에서 4일간 배양한 후 배양액 1 ml를 취하였다. 원심분리로 배양상등액을 분리, 보관하고 세포 침전물을 찬 증류수로 세척한 후 1 ml의 원형질체 완충액(50 mM Tris·Cl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 M sorbitol, 1 mM DTT)에 현탁한 후 zymolyase 60000 (10 µg)을 첨가하여 30°C에서 1시간 서서히 진탕하였다. 원심분리로 원형질체와 periplasmic 효소액을 분리한 후 1 ml의 lysis 완충액(50 mM Tris·Cl, pH 7.5, 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM potassium acetate, 1 mM PNSF)를 첨가하여 원형질체를 완전히 파괴하여 세포질의 효소액을 준비하였다(7). 이렇게 분획한 각 효소액 50 µl에 멸균수 0.45 ml와 0.5 ml의 50 mM sodium citrate buffer(pH 5.0, 1% CMC)를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하고 5분간 끓인 후 발색된 정도를 550 nm의 파장에서 흡광분석하여 효소역가를 표준곡선으로부터 포도당의 양으로 환산하였다(10). 효소역가 1 unit는 1분당 100 nmole의 포도당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

CMCase 구조유전자의 subcloning

STA1 유전자의 promoter와 분비신호서열을 이용하기 위해서는 CMCase 유전자 중 promoter와 분비신호서열이 제거된 구조유전자만을 확보할 필요성이 있었다. *B. subtilis*의 CMCase는 약 1.5 kb의 open reading frame에 의해 만들어지며 분비신호서열은 N-말단 29개의 아미노산으로 구성되어 있다. Signal peptidase에 의한 분비신호의 절단부위(Ala²⁹-Ala³⁰)로부터 아미노산 11번째 뒤에 제한효소 *BalI* 그리고 translation stop codon의 바로 다음에 *HindIII* 인식부위가 존재한다. Promoter와 분비신호서열 이외에 mature CMCase N-말단 아미노산 11개가 추가로 제거되어도 CMCase의 기능에 별다른 영향이 없음이 확인되었다(10). 따라서 CMCase 전체유전자를 포함하고 있는 재조합 플라스미드 pBS13을 제한효소 *BalI*과 *HindIII*로 절단하고 Klenow enzyme을 처리한 후 생성된 1,380 bp의 CMCase 구조유전자를 pUC9의 *SmaI* 인식부위에 삽입하여 새로운 재조합 플라스미드 pUEC19를 작성하였다(Fig. 1). 이렇게 제작한 재조합 플라스미드 pUEC19에는 본래 CMCase 유전자의 promoter와 분비신호서열 뿐 아니라 mature CMCase의 N-말단 아미노산 10개가 추가로 제거된 CMCase 구조유전자가 존재하게 된다. 또한 삽입된 CMCase 구조유전자 5'말단의 upstream 부위에는 pUC9의 multiple cloning site에서 유래된 제한효소 *BamHI*, *SalI*, *PstI* 및 *HindIII* 그리고 3'말단의 downstream 부위에는 *EcoRI* 인식부위가 각각 존재한다.

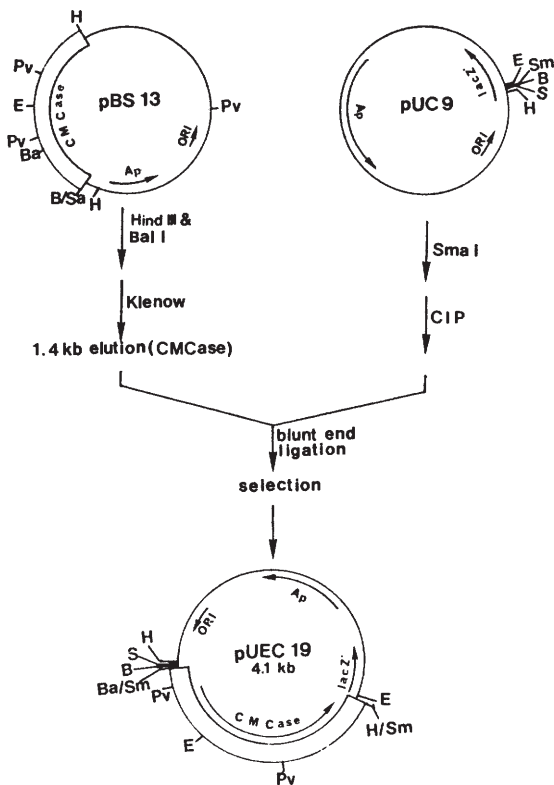


Fig. 1. Procedure for subcloning of CMCase structural gene into pUC9

Abbreviations: B, *Bam*HI; Ba, *Bal*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Pv, *Pvu*II; S, *Sal*I; Sa, *Sau*3AI; Sm, *Sma*I

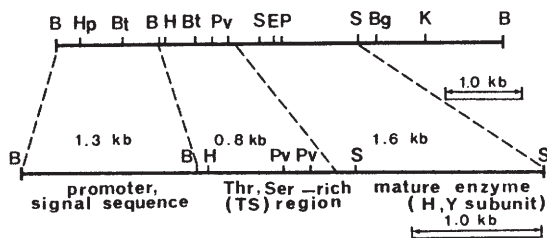


Fig. 2. Restriction map and composition of STA1 gene

STA1 유전자의 promoter와 분비신호서열의 도입

본 연구에 사용한 STA1 유전자의 제한효소지도와 구조를 Fig. 2에 나타내었다. 1.3 kb의 *Bam*HI 단편에는 유전자 발현의 조절부위를 포함한 promoter(23), 32개의 아미노산으로 구성된 분비신호서열(22)과, 아미노산 9개가 더 존재하게 된다. 또한 *Bam*HI 인식 부위에서 *Pvu*II 인식부위 근처까지 약 0.9 kb의 단편에는 아미노산 threonine과 serine이 많이 존재하는

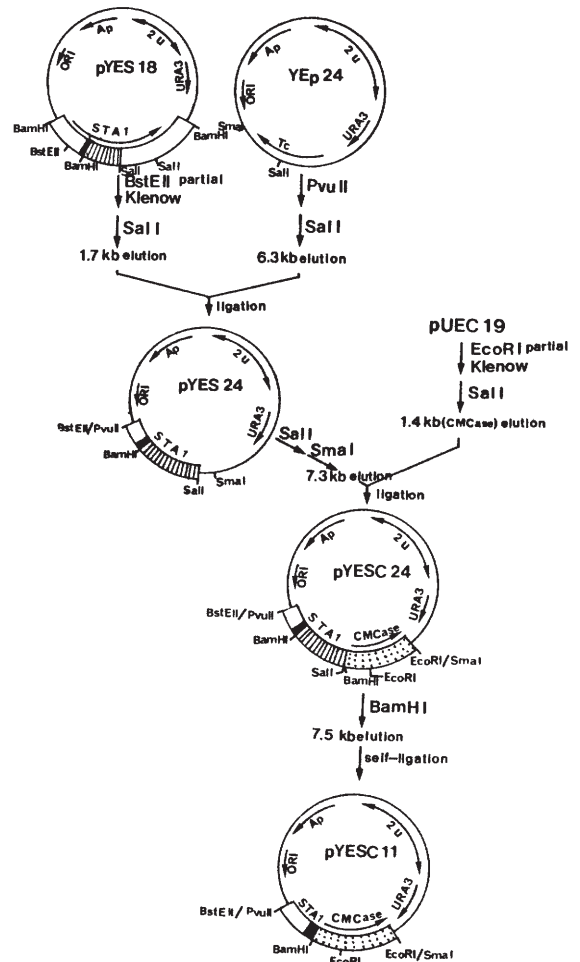


Fig. 3. Construction of recombinant plasmids for CMCase secretion, pYESC 24 and pYESC 11

The open and closed box represent a promoter region and signal sequence of STA1 gene, respectively. The hatched box indicates TS region and N-terminal region of mature glucoamylase. The dotted box denotes the structural gene of CMCase without its promoter and signal sequence region.

Thr. Ser-rich region(TS region)이 존재한다. 다른 전분질 분해효소나 섬유소 분해효소에 존재하는 TS region은 raw-substrate binding domain으로 작용하는 것으로 알려져 있다(2). 그러나 STA1 유전자에 존재하는 TS region의 명확한 기능은 보고된 예가 없지만, Yamashita(23)는 단백질의 세포내 수송 (intracellular transport)의 신호로 작용한다고 보고하였다. 한편 Fig. 2에 나타난 1.3 kb의 *Bam*HI 단편중 *Bst*EII-*Bam*HI의 0.45 kb 단편만으로도 promoter 활성이 있음이 확인되었다(21). 따라서 STA1 유전자들

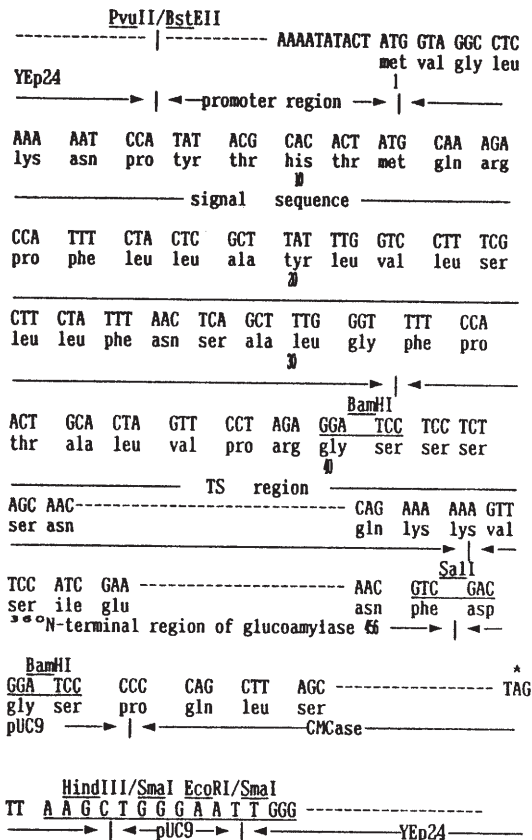


Fig. 4. Nucleotide and amino acid sequences around junction sites between *STAI1* and *CMCase* gene in *pYESC 24*

The numbers below the sequence denote the amino acid position starting with 1 at the first Met. The dotted lines indicate omitted nucleotide sequences. Glucoamylase signal sequence consists of 32 amino acids and probable signal peptidase cleavage site is denoted by an arrow. Authentic N-terminal amino acid of mature glucoamylase is boxed.

함유한 재조합 플라스미드 *pYES18*을 제한효소 *BstEII*로 부분절단 하고 Klenow enzyme을 처리하여 blunt end로 만든 후 *SalI*으로 다시 절단하여 promoter, 분비신호서열 TS region 및 mature glucoamylase의 N-말단 아미노산 98개를 함유한 1.7 kb DNA 단편을 확보하였다. 이것을 YEp24 vector의 *PvuII*와 *SalI* 부위에 삽입하여 재조합 플라스미드 *pYES24*를 제작하였다(Fig. 3). 재조합 플라스미드 *pYES24*에 *CMCase* 구조유전자의 도입

STAI 유전자의 promoter, 분비신호서열 및 TS

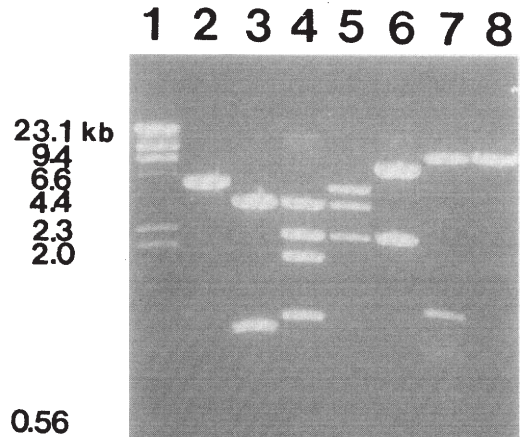


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis pattern of recombinant plasmids digested with several restriction endonucleases

Lane: 1, λ -HindIII digest; 2, pUEC19-BamHI; 3, pUEC19-EcoRI; 4, pYES24-HindIII; 5, pYESC24-HindIII; 6, pYESC11-HindIII; 7, pYESC24-BamHI; 8, pYESC11-BamHI.

region을 함유하고 있는 재조합 플라스미드 *pYES24*에서 *SalI*-*SmaI* 사이의 0.7 kb를 제거한 7.3 kb DNA 단편에 재조합 플라스미드 *pUEC19*을 *EcoRI*으로 부분절단하고 Klenow enzyme을 처리한 후, *SalI*으로 절단하여 얻은 *CMCase* 구조유전자 1.4 kb DNA 단편을 서로 연결하여 최종적으로 재조합 플라스미드 *pYESC24*를 제작하였다(Fig. 3). 재조합 plasmid *pYESC24*에서 *STAI* 유전자와 *CMCase* 구조유전자 간 연결부위의 부분적인 염기서열과 제한효소 인식 부위를 Fig. 4에 나타내었다. *CMCase* 구조유전자의 5'말단과 *STAI* 유전자의 TS region 사이에는 *pUC9*에서 유래된 *BamHI*과 *SalI* 인식부위가 새로이 생성되었다. 재조합 플라스미드 *pYESC24*에는 *STAI* 유전자의 promoter 부위, 분비신호서열, 완전한 TS region 및 mature glucoamylase의 N-말단 아미노산 98개가 존재하며, *STAI* 유전자와 도입한 *CMCase* 구조유전자의 5'말단 사이에는 *pUC9*에서 유래된 *BamHI*과 *SalI* 인식부위가 새로이 생성되었다.

재조합 플라스미드의 제한효소 절단 및 전기영동분석

본 연구에서 제작한 여러 재조합 플라스미드가 원하는 대로 구성되었는지 확인하기 위해 몇 종류의 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose에서 전기영동한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Lane 2와 3은 *pUEC19*을 *BamHI*과 *EcoRI*으로 각각 절단한 것으로 lane 2에서 4.1 kb의 단일 band가 또한 lane 3에서 1.0

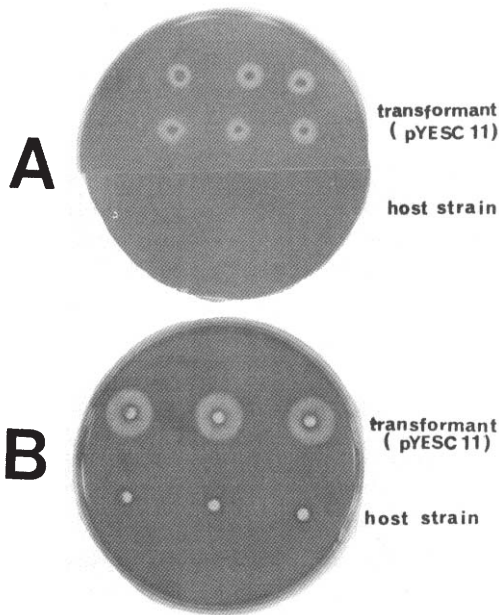


Fig. 6. CMCase secretion by yeast transformant harboring pYESC11

A: *S. diastaticus* YIY 345 and its transformant harboring pYESC11 were grown on selective YNBDSC agar media at 30°C for 2 days. The agar plate was stained with 0.2% Congo red solution followed by washing with 1 M NaCl solution. The clear zones around colonies indicate CMC hydrolysis resulting from CMCase secretion.

B: *S. diastaticus* YIY 345 and its transformant harboring pYESC11 were cultured in 5 ml of YPD broth at 30°C for 3 days. Each culture supernatant (50 μ l) were loaded in holes of agar plate (1% CMC) and incubated at 37°C overnight. CMCase secretion was confirmed by above-mentioned method.

kb와 3.1kb의 두 band가 나타난 것으로 보아 CMCase 구조유전자가 pUC9에 원하는 방향으로 도입되었음을 알았다. Lane 4, 5 및 6은 pYES24, pYESC24 그리고 pYESC 11를 *Hind*III로 각각절단한 결과이다. 재조합 플라스미드 pYES24에는 YEp vector에서 유래된 *Hind*III 인식부위가 세곳에 존재하고 또한 *STA1* 유전자의 TS region에 한 부위가 존재한다. Lane 4(pYES24)에서는 원하는 대로 1.17, 1.82, 2.17 및 2.91 kb 네개의 DNA 단편이 나타났으며, lane 5(pYESC24)에서는 CMCase 구조유전자를 도입할 때 YEp24의 *Hind*III 인식부위가 하나 제거되었기 때문에 2.17, 2.91 및 3.7 kb 세개의 DNA 단편이 생성됨을 확인하였다. 한편 lane 6(pYESC11)에서는 2.17과 5.28 kb 두개의 DNA 단편만 생성된 것으로 보아 pYESC24에서 *STA1* 유전자의 분비신

Table 1. CMCase activity of subcellular fractions by yeast transformant

Subcellular fraction	CMCase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Total	44.75	100
Extracellular	41.74	93.3
Periplasmic	1.18	2.6
Cytoplasmic	1.83	4.1

^aYeast transformant harboring pYESC11 was cultured in YPD broth at 30°C for 4 days. The preparation of subcellular fractions such as extracellular, periplasmic and cytoplasmic fraction and the assay of their CMCase activity were performed as described in material and method.

^bOne unit of CMCase activity was described in material and method.

^cCMCase activity of each subcellular fraction $\times 100$ / total CMCase activity

호서열의 3'말단과 CMCase 구조유전자의 5'말단 사이에 존재하던 TS region이 *Bam*HI 절단에 의해 완전히 제거된 것을 알 수 있었다. 이것을 확인하기 위해 pYESC24(lane 7)와 pYESC11(lane 8)을 *Bam*HI로 각각 절단한 결과 7.5 kb DNA 단편이 공통적으로 존재하였다. 또한 lane 7(pYESC24)에서 나타난 다른 1.2 kb DNA 단편에는 TS region과 mature glucoamylase N-말단 아미노산 98개가 함유되어 있는데 lane 8(pYESC11)에는 나타나지 않은 것으로 보아 pYESC11에서는 TS region과 여분의 N-말단 아미노산이 완전히 제거되었음을 확인할 수 있었다. 이상으로부터 본 연구에 사용한 재조합 플라스미드가 의도한 대로 정확하게 제작되었음을 확인하였다.

CMCase를 분비하는 효모형질전환체의 선별

재조합 플라스미드 pYESC24로 형질전환된 *S. diastaticus* YIY345가 CMCase를 세포외로 분비하는 지 Congo red염색법으로 확인한 결과 CMC가 분해되어 생기는 clear zone을 관찰할 수 없었다. 즉 pYESC24의 효모형질전환체는 CMCase를 분비하지 못하였다. 이것은 Yamashita(23)의 보고와는 달리 *STA1* 유전자의 TS region이 CMCase의 세포외 분비에 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되어서 pYESC24를 제한효소 *Bam*HI로 절단하고 self-ligation하여 *STA1* 유전자의 분비신호서열과 CMCase 구조유전자의 5' 말단사이에 존재하는 TS region과 mature glucoamylase N-말단 부위의 아미노산들이 완전히 제거된 7.5 kb의 재조합 플라스미드 pYESC11을 제작하였다(Fig. 3). 이 재조합 플라스미드를 모 균주인 *S. diastaticus* YIY345에 도입하여 얻은 형질전환체들을 YNBDSC 한천배지에서 배양한 후 Congo red염색을 실시한 결과 세포외로 분비된 CMCase의 작용으로 CMC가 분해되어 생성된 clear

zone을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 또한 모 균주와 pYESC11의 형질전환체를 YPD 액체배지에서 3일간 배양한 배양상등액 50 μ l를 1% CMC가 함유된 2% agar plate에 점적하여 상온에서 하룻밤동안 방치하고 Congo red 염색을 실시하였다. 그 결과 pYESC11의 형질전환체에서는 clear zone이 나타났으나 모 균주의 경우에는 전혀 나타나지 않았다(Fig. 5B). 따라서 pYESC11의 효모형질전환체는 액체배양시에도 CMCase가 세포외로 분비됨을 확인하였다.

형질전환체의 세포부위별 CMCase 활성분포

모 균주에서는 CMCase 활성이 전혀 관찰되지 않았으며 재조합플라스미드 pYESC24에 의해 형질전환된 균주에서는 CMCase 활성이 무시할 정도로 아주 낮게 나타났다. 반면에 재조합 플라스미드 pYESC11의 형질전환체에서는 CMCase가 세포외로 분비됨을 확인하였으므로 이 균주에서 세포 부위별 CMCase 활성의 분포와 분비능을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. pYESC11로 형질전환된 균주에서는 각 세포부위 별 CMCase 역가를 합한 총 역가가 44.7 unit/ml로 pBS13에 의한 대장균 형질전환균주의 23.0 unit/ml(10)보다 높게 나타났다. 아울러 총 역가의 약 93%인 41.7 unit/ml가 배양상등액 중에 존재하여 이 균주에 의한 CMCase 분비능이 매우 높음을 확인할 수 있었다.

아직 효모의 분비효율에 영향을 미치는 요인들에 대해 정확하게 규명되지 않았지만 일반적으로 효모의 분비효율은 분비신호서열의 특성, 분자량, net charge 등의 분비하고자 하는 단백질 자체의 특성, 당쇄(glycosylation)의 정도 및 숙주의 종류 등과 같은 복합적인 요인에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(24). 그리고, 기존 연구결과들에서도 효모세포에서의 이중 단백질의 분비효율은 매우 다양하다. 한편 이러한 결과들 중 분비효율이 높은 경우가 80~90%인 점을 감안하면 *STA1* 유전자의 promoter와 분비신호서열을 이용한 효모에서 *Bacillus*의 CMCase 분비는 매우 효율적임을 알 수 있다(17, 18). 따라서, *STA1* 유전자를 이용한 효모의 분비 vector 개발 및 이를 이용한 유용한 외래 유전자의 발현과 발현된 단백질을 효모에서 생산하고자 하는데 매우 유익하게 이용될 수 있으리라 기대된다.

한편 *Bacillus* CMCase에는 효모에서 발현되어 분비될 경우 N-glycosylation 부위로 작용할 수 있는 아미노산서열(Asn-X-Ser or Thr)이 5곳에 존재하고 있다. 따라서 pYESC11에 의한 효모형질전환 균주에서 분비된 CMCase에서 당쇄가 어느정도 일어났는지 확인할 필요가 있으므로 계속해서 이의 분석을 시도하고 있다. 또한 이 효모균주에서 분비된 CMCase를 정제하여 최적 pH와 온도 및 열안정성 등의 효소학적 특성을 *Bacillus*에서 분리한 CMCase와 비교 분석을 시도하고 있으며, 아울러 N-말단의 아미노산 서열을 조사함으로써 효모세포에 의한 CMCase의 processing pattern을 분석하고

glucoamylase의 분비신호서열이 절단되는 정확한 위치를 밝히고자 노력하고 있다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부의 대체에너지기술 개발사업비의 지원(연구과제 관리번호 C201-101FG)을 받아 수행되었으며 동력자원부 및 에너지관리공단 대체에너지기술개발센터의 관계자 여러분에게 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Ahn, J.S., I.K. Hwang, M.S. Jung and T.I. Mheen, 1989. Effect of plasmid stability on the glucoamylase productivity of *S. diastaticus* harboring recombinant plasmid containing glucoamylase gene. *STA1. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 606-610.
2. Hayashita, S., K. Kurota, K. Ohta, S. Kuhara and K. Fukuda, 1989. Molecular cloning of the glucoamylase I gene of *Aspergillus awamori* var. *Kawachi* for localization of the raw-starch-affinity site. *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 923-929.
3. Hinchliffe, E. and W.G. Box, 1984. Expression of cloned endo-1,3-1,4- β -glucanase gene of *Bacillus subtilis* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **81**, 471-476.
4. Honda, H., S. Iijima and T. Kobayashi, 1988. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an endo- β -glucanase gene from thermophilic cellulolytic anaerobe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 57-58.
5. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura, 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
6. Jackson, E.A., G.M. Ballance and K.K. Thomsen, 1986. Construction of a yeast vector directing the synthesis and release of barley (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4)- β -glucanase. *Carlsberg Res. Commun.*, **51**, 445-450.
7. Lundblad, V., 1989. *Saccharomyces cerevisiae* in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. eds.) unit 13. 13, John Wiley & Sons, Inc., New York.
8. Maniatis, T., E.F. Fitch and J. Sambrook, 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
9. Nakamura, M., T. Matsumoto, M. Noguchi, I. Yamashita and M. Noma., 1990. Expression of a cDNA encoding human 5-lipoxygenase under control of the *STA1* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **89**, 231-237.
10. Prak, S.H., H.K. Kim and M.Y. Pack, 1991. Characterization and structure of the cellulase gene of *Bacillus subtilis* BSE 616. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 441-448.

11. Penttilä, M., M.-L. Suihko, U. Lehtinen, M. Nikkola and J.K.C. Knowles, 1987. Construction of brewer's yeasts secreting fungal endo- β -glucanase. *Curr. Genet.*, **12**, 413-421.
12. Penttilä, M., P. Lehtovaara and J. Knowles, 1989. Cellulolytic yeast strains and their application In *Yeast Genetic Engineering* (Barr, P.J., A.J. Brake and P. Valenzuela, eds.) pp.247-267, Butterworths, Stoneham.
13. Shima, H., M. Inui, R. Akada and I. Yamashita, 1989. Upstream regions of the yeast glucoamylase gene which are required for efficient transcription. *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 749-755.
14. Skipper, N., M. Sutherland, R.W. Davies, R.C., Jr. Miller, A. Warren and R. Wong, 1985. Secretion of bacterial cellulase by yeast. *Science*, **230**, 958-960.
15. Suihko, M.L., U. Lehtinen, B. Zurbriggen, A. Vilpola, J. Knowles and M. Penttilä, 1991. Construction and analysis of recombinant glucanolytic brewer's yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 781-787.
16. Teather, R.M. and P.J. Wood, 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactants in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 777-780.
17. Thomsen, K.K., 1983. Mouse α -amylase synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* is released into the culture medium. *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 545-555.
18. Van Arsdell, J.N., S. Kwok, V.L. Schweickart, M. B. Ladner, D.H. Gelfand and M.A. Innis, 1987. Cloning, characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology*, **5**, 60-64.
19. Wong, W.K.R., C. Curry, R.S. Parekh, M. Wayman, R.W. Davis, D.G. Kilburn and N. Skipper, 1988. Wood hydrolysis by *Cellulomonas fimi* endoglucanase and exoglucanase coexpression as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology*, **6**, 713-719.
20. Yamashita, I. and S. Fukui, 1984. Genetic background of glucoamylase production in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 137-141.
21. Yamashita, I., T. Maemura, T. Hatano and S. Fukui, 1985. Polymorphic extracellular glucoamylase genes and their evolutionary origin in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.*, **161**, 574-582.
22. Yamashita, I., K. Suzuki and S. Fukui, 1986. Proteolytic processing of glucoamylase in yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 475-482.
23. Yamashita, I., 1989. The threonine-and serine-rich tract of the secretory glucoamylase can direct β -galactosidase to the cell envelope. *Agri. Biol. Chem.*, **53**, 483-489.
24. Zsebo, K.M., H.-S. Lu, J.C. Fieschko, L. Goldstein, J. Davis, K. Duker, S.V. Suggs, P.-H. Lai and G.A. Bitter, 1986. Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro- α -factor leader region. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5858-5865.

(Received September 18, 1992)

(Accepted October 2, 1992)

ABSTRACT: Secretion of *Bacillus subtilis* Endo-1,4- β -D-Glucanase in Yeast Using Promoter and Signal Sequence of Glucoamylase Gene

Ahn, Jong Seog*, Dae-Ook Kang, In-Kyu Hwang, Seung-Hwan Park, Moo-Yeong Pack¹, Tae-Ick Mheen(Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daejeon 305-606, and ¹Department of Biotechnology KAIST, Daejeon 305-701, Korea)

For the development of a glucanolytic yeast strain, the secretion of endo-1,4- β -D-glucanase (CMCase) of *Bacillus subtilis* was performed in yeast using glucoamylase gene (*STA1*) of *Saccharomyces diastaticus*. A 1.7 kb-DNA fragment of *STA1* gene containing authentic promoter, signal sequence, threonine serine-rich (TS) region and N-terminal region (98 amino acids) of mature glucoamylase was ligated to YE_p 24, *E. coli*-yeast shuttle vector. And then, CMCase structural gene of *B. subtilis* was fused in frame with the 1.7 kb-DNA fragment of *STA1* gene, resulting in recombinant plasmid pYESC24. Yeast transformant harboring pYESC24 had no CMCase activity. So, we deleted TS region and N-terminal region of mature glucoamylase existing between signal sequence and CMCase structural gene in pYESC24, consequently constructed recombinant plasmid pYESC11. The yeast transformed with the newly constructed recombinant plasmid pYESC11 efficiently secreted CMCase to extracellular medium. After 4 days culture, total CMCase activity of this transformant was 44.7 units/ml and over 93% of total CMCase activity was detected in culture supernatant.