

Article

Streptococcus pyogenes 유래 cyclomaltodextrinase 유전자의 발현 및 효소 특성

장명운^{1†} · 강혜정^{2†} · 정창구³ · 오규원¹ · 이은희¹ · 손병삼¹ · 김태집^{1*}

¹충북대학교 대학원 축산·원에·식품공학부 식품공학전공, ²충청북도 농업기술원 친환경연구과, ³(주)에이피테크놀로지

Functional expression and enzymatic characterization of cyclomaltodextrinase from *Streptococcus pyogenes*

Myoung-Uoon Jang^{1†}, Hye-Jeong Kang^{2†}, Chang-Ku Jeong³, Gyo Won Oh¹, Eun-Hee 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

²Chungcheongbuk-do Agricultural Research and Extension Services, Cheongju 28130, Republic of Korea

³Advanced Protein Technologies Co., Suwon 16229, Republic of Korea

(Received August 23, 2017; Revised September 19, 2017; Accepted September 20, 2017)

A cyclomaltodextrinase (SPCD) gene was cloned from *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294. Its open reading frame consists of 567 amino acids (66.8 kDa), which shows less than 37% of amino acid sequence identity with the other CDase-family enzymes. The homo-dimeric SPCD with C-terminal six-histidines was expressed and purified from *Escherichia coli*. It showed the highest activity at pH 7.5 and 45°C, respectively. SPCD has the broad substrate specificities against β -cyclodextrin, starch, and maltotriose to produce mainly maltose, whereas it hydrolyzes pullulan to panose. It can also catalyze the hydrolysis of acarbose to glucose and acarviosine-glucose. Interestingly, it showed much higher activity on β -cyclodextrin and acarbose than that on starch, pullulan, or maltotriose, which makes SPCD distinguished from common CDase-family enzymes. Although SPCD has significantly high acarbose-hydrolyzing activity, it showed negligible transglycosylation activity.

Keywords: *Streptococcus pyogenes*, cyclomaltodextrinase (CDase), enzymatic characterization, gene expression

[†]These authors contributed equally to this work.

*For correspondence. E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr;
Tel.: +82-43-261-3354; Fax: +82-43-271-4412

Glycoside Hydrolase (GH) family 13에 속하는 cyclomaltodextrinase (CDase, EC 3.2.1.54), maltogenic amylase (MAase; EC 3.2.1.133), neopullulanase (NPase; EC 3.2.1.135)는 서로 다른 명칭을 가지지만, 일반적으로 cyclodextrinase 계열의 효소로 분류된다(Park *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Park, 2006). CDase 계열 효소는 *Clostridium* (Podkovyrov and Zeikus, 1992), *Bacillus* (Cha *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2009), *Thermus* (Kim *et al.*, 1999), *Paenibacillus* (Kaulpiboon and Pongsawasdi, 2004), *Lactobacillus* (Oh *et al.*, 2005), *Lactococcus* (Jang *et al.*, 2013), *Listeria* (Jang *et al.*, 2016) 속 등의 다양한 미생물로부터 연구되었다. 이들 효소는 glucose로 구성된 탄수화물 중합체의 α -(1,4)-결합 부위를 가수분해하여 주로 maltose를 생성하며, 특이적인 당전이활성을 나타내어 α -(1,6)- 또는 α -(1,3)-결합의 다양한 당전이산물을 생성하는 것으로 알려졌다. 따라서 자연계에 존재하는 각종 수용체를 이용한 새로운 탄수화물 소재의 생산에 이들 효소를 활용하는 다양한 연구가 진행되었다(Park, 2006).

이들 CDase 계열 효소는 일반적인 α -amylase 계열 효소에 비해 다양한 미생물 유전체로부터 발견되었으나, 아직 이들 효소

의 세포 내 역할에 대해서 명확히 밝혀지지 않았다. *Klebsiella oxytoca*의 경우, cyclodextrin glucanotransferase에 의해 생성된 cyclodextrin이 세포 내로 운반된 후, 다시 CDase 계열 효소에 의해 저분자화되는 탄수화물 대사경로가 보고되었다(Feederle *et al.*, 1996; Fiedler *et al.*, 1996). 또한 *Bacillus subtilis* 세포 내에서 MAase와 pullulanase의 작용에 의한 glycogen 대사과정이 밝혀졌다(Shim *et al.*, 2009). 최근에 *Listeria* 속 미생물로부터 maltose 또는 maltodextrin 이용 관련 유전자 클러스터와 미생물 생리학적 특성이 연구되었다(Gopal *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2016). 지금까지 진행된 CDase 계열 효소에 대한 연구는 주로 *Bacillus* 속 미생물 유래 효소 및 유전자에 집중되었으나, 최근 각종 미생물의 유전체 정보가 급속히 축적되면서 보다 다양한 미생물로부터 서로 다른 CDase 계열 효소 유전자를 발굴하고 이들의 효소특성을 비교하여 신규 효소를 개발하려는 노력이 진행되고 있다.

본 연구에서는 미생물 유전체 데이터베이스 분석을 통해 *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294 균주로부터 cyclomaltodextrinase (SPCD)로 예상되는 유전자를 클로닝 및 발현하였으며, 기질특이성, 가수분해와 당전이활성 등 다양한 효소특성을 확인하였다. 또한 다른 CDase 계열 효소와의 유전적·효소적 특성을 비교함으로써 산업적으로 유용한 신규 효소 개발을 위한 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

미생물 및 유전자

Streptococcus pyogenes M1 GAS (ATCC 700294)의 염색체 DNA는 한국생명공학연구원에서 제공받았으며, 대장균 내 유전자의 항시발현은 pHCEII/NdeI (BioLeaders Co.)를 변형시킨 pHCXHD (Kang *et al.*, 2009) 벡터를 사용하였다. 유전자 클로닝 및 발현은 *Escherichia coli* MC1061 균주를 사용하였다.

시약 및 재료

일반 시약, 효소 기질 및 미생물 배지는 Sigma-Aldrich와 Duchefa Biochemie에서 구입하여 사용하였다. 각종 제한효소, DNA polymerase, DNA ligase 등 유전자 조작용 효소류는 Roche Applied Science에서 구입하였으며, PCR 및 sequencing 프라이머는 Bioneer에서 합성하여 사용하였다.

SPCD 유전자의 클로닝

*Streptococcus pyogenes*의 염색체 DNA를 주형으로 사용하였으며, SPCD-N (5'-TTTTCATATGAATGTTGCCGGACTC-3') 및 SPCD-C (5'-TTTTCTCGAGGTTACTAAACACAA TATATCC-3') PCR 프라이머로 SPCD 유전자를 증폭하였다. Taq DNA polymerase (Roche)와 C1000 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Inc.)를 사용하여 94°C에서 1분, 54°C에서 30초, 72°C에서 1분 30초로 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 추가로 증폭하였다. 증폭된 유전자는 제한효소 *Nde*I과 *Xho*I으로 절단하고, 항시발현 벡터인 pHCXHD에 삽입하여 pHCXSPCD를 제조하였다.

SPCD 유전자의 발현 및 정제

pHCXSPCD가 형질전환된 재조합 *E. coli*를 LBA (1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 mg/ml ampicillin) 액체배지에 접종하고 37°C에서 12시간 배양하였다. 원심분리로 균체를 회수한 후, VCX750 ultrasonicator (Sonics & Materials Inc.)로 파쇄하고, AKTA Prime™ (GE Healthcare)과 HisTrap-FF column (GE Healthcare)을 이용하여 정제하였다.

효소 단백질 정량 및 분자량 측정

재조합 단백질의 정제도는 Mini-protein II (Bio-Rad)를 이용한 12% SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다. 전기영동으로 분리한 단백질을 Coomassie blue로 염색한 후, 단백질 표준시료(Sigma-Aldrich)와 비교하여 monomer의 분자량을 결정하였다. 단백질의 분자량과 4차구조 분석을 위해 gel permeation chromatography (GPC; Superdex-200 column, 10 x 300 mm, GE Healthcare)를 이용하였으며, 0.5 ml/min 유속의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 용매로 사용하였다. 효소 단백질의 농도 측정은 BCA™ protein assay kit (Pierce Biotechnology Inc.)를 이용하였다.

SPCD의 효소활성 측정

SPCD의 활성을 측정하기 위해 1%의 β -CD, soluble starch, pullulan 기질을 각각 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹인 후, 적당량의 효소를 첨가하여 최종 100 μ l로 반응하였다. 37°C에서 10분간 반응하여 생성된 maltose의 양을 dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 측정하였다(Miller, 1959). Maltotriose와 acarbose 분해활성의 경우, 생성된 glucose의 양을 AceChem Glucose kit (YD Diagnostics Co.)로 측정하였다.

SPCD의 효소활성 1 unit는 1분 당 1 μmol 의 maltose 또는 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

SPCD의 가수분해산물 분석

최적 조건에서 1% 기질과 효소를 12시간 동안 반응한 후, 가수분해산물을 thin layer chromatography (TLC)로 분석하였다. Silica gel 60F₂₅₄ TLC plate (Merck)에 1 μl 의 시료를 spotting하고, isopropanol:ethylacetate:물(3:1:1)의 전개용매를 사용하였다. TLC plate를 발색시약(3 g N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine, 50 ml H₂SO₄, 950 ml methanol)에 담근 후, 건조하고 110°C에서 10분간 발색하였다.

SPCD의 당전이산물 분석

5% acarbose (Carbosynth) 공여체와 10% α -methyl glucopyranoside (Sigma-Aldrich) 수용체를 이용하여 최적 조건에서 24시간 반응하였다. 생성된 당전이산물은 CarboPac PA1 컬럼(0.4 x 25 cm, Thermo Fisher Scientific)과 electrochemical detector (ED40, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 high performance anion exchange chromatography (HPAEC; ICS-3000, Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다. 이동상 A (150 mM NaOH)에 1.0 ml/min의 유속으로 이동상 B (600 mM sodium acetate)를 분당 1%씩 증가시키면서 분석하였다.

결과 및 고찰

SPCD 유전자의 탐색

세포 내에서 발견되는 CDase 계열의 효소는 직쇄형 maltooligosaccharides 또는 환형 구조의 cyclomaltodextrin (CD)을 maltose 단위로 가수분해하며, 이를 통해 α -glucosidase에 의한 당화과정의 효율을 높이는 것으로 알려졌다(Park *et al.*, 2000; Park, 2006). 최근 유전체 데이터베이스 분석 연구를 통해 이들 CDase 계열 효소 유전자가 자연계의 다양한 미생물 유전체 내에 널리 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 다양한 돌연변이 연구를 통해 *Bacillus subtilis* 세포 내의 탄수화물 대사 과정에서 maltogenic amylase와 debranching enzyme의 생리적 기능 및 역할이 보고되었다(Shim *et al.*, 2009). 본 연구에서는 *B. subtilis* MAase 등 기존에 알려진 CDase 계열 효소 유전자의 서열을 기초로 BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) 검색을 통해 *Streptococcus pyogenes* ATCC 700294 유전체(GenBank accession No. NC_002737.2, Ferretti *et al.*, 2001)로부터 CDase

로 예상되는 유전자(NP_269429.1)를 발굴하였다. 이 유전자는 기존 데이터베이스 상에서 α -glycosidase로 예상되었으며, 추가 분석을 통해 이 유전자가 maltose 또는 maltodextrin 이용 유전자의 클러스터 내에 위치하는 것을 확인하였다. 이러한 유전자 클러스터 구조는 지금까지 *B. subtilis* 168 (Shim *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* EGD-e (Gopal *et al.*, 2010) 및 *Listeria innocua* ATCC 33090 (Jang *et al.*, 2016)의 유전체에서 보고된 결과와 유사하였다. 또한 SPCD의 아미노산 서열을 SignalP 프로그램(Petersen *et al.*, 2011)으로 분석한 결과, 특이적인 signal peptide 서열이 발견되지 않아 세포 내의 cytoplasm 영역에서 발견되어 maltodextrin 대사경로에 관여할 것으로 예상하였다.

SPCD의 1차구조 비교

전분 등 탄수화물 중합체를 주요 기질로 하는 (β/α)₈-barrel 구조의 가수분해효소는 아미노산 서열 상동성을 기준으로 대부분 GH 13 계열로 분류되며, 넓은 의미에서 CDase 또한 이러한 계열의 효소에 속한다(Henrissat and Bairoch, 1996; Lee *et al.*, 2002). 아미노산 서열의 상관관계를 분석한 결과, SPCD는 *Thermus* MAase (Kim *et al.*, 1999)와 36.8%의 가장 높은 상동성을 보였으나, *Bacillus halodurans* (BHCD; Kang *et al.*, 2009), *Listeria innocua* (LICD; Jang *et al.*, 2016), 그리고 유산균인 *Lactococcus lactis* (LLCD; Jang *et al.*, 2013) 유래 CDase와 대부분 35% 내외의 상동성을 나타냈다(Table 1). 일반적인 세균 유래 CDase 계열 효소 간의 상동성이 50% 이상으로 높은 수준임을 감안할 때, SPCD와 기존 효소들의 상동성은 비교적 낮았다. 그러나, SPCD는 일반적인 α -amylase와 달리 CDase 계열 효소에서만 특이적으로 발견되는 특수한 N-말단 구조와 상동 부위 I-IV를 가지며, 특히 상동부위 II, III, IV 내에 위치하는 주요 활성 아미노산 잔기인 Asp326, Glu355, Asp422를 공유

Table 1. Amino acid sequence identities among various CDase-family enzymes

Enzyme ^a	Amino acid sequence identity (%)			
	ThMA	BHCD	LICD	LLCD
SPCD	36.8	36.4	34.5	34.5
ThMA		56.0	50.3	46.5
BHCD			50.9	46.6
LICD				47.6

^aSPCD, *Streptococcus pyogenes* CDase in this study; ThMA, *Thermus* MAase (Kim *et al.*, 2001); BHCD, *Bacillus halodurans* CDase (Kang *et al.*, 2009); LLCD, *Listeria innocua* CDase (Jang *et al.*, 2016); LICD, *Lactobacillus lactis* CDase (Jang *et al.*, 2013)

하는 것을 확인하였다(Park *et al.*, 2000). 한편 상동부위 II와 III의 일부 아미노산 잔기가 기존의 CDase 계열 효소와 상이하므로 이로 인한 효소특성의 차이가 발생할 수 있을 것으로 예상하였다(Fig. 1). 결론적으로 SPCD는 기존의 CDase 계열 효소들과 35% 미만의 낮은 서열 상동성을 보이지만, 전체적인 1차 구조 및 상동부위 서열의 유사성 등을 고려할 때, 신규성이 있는 CDase 계열 효소의 일종일 것으로 판단하고 유전자 클로닝, 발현 및 효소 특성 연구를 진행하였다.

SPCD 유전자의 클로닝 및 발현

SPCD의 구조 유전자(NP_269429.1)는 1,701개의 염기 서열로 이루어지며, 총 567개의 아미노산 잔기를 암호화하고 있

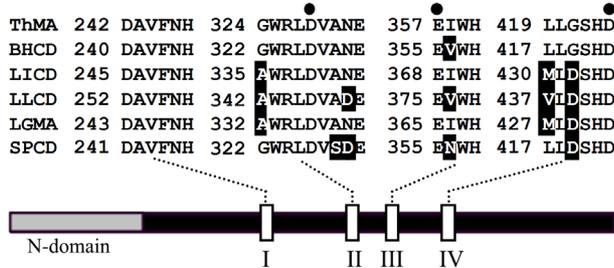


Fig. 1. Comparison of conserved amino acid sequences among CDase-family enzymes. ThMA, *Thermus* MAase; BHCD, *Bacillus halodurans* CDase; LICD, *Listeria innocua* CDase; LLC, *Lactococcus lactis* CDase; LGMA, *Lactobacillus gasserii* MAase; SPCD, *Streptococcus pyogenes* CDase. Catalytic amino acid residues are indicated with closed circles, and non-consensus residues are shown in black boxes.

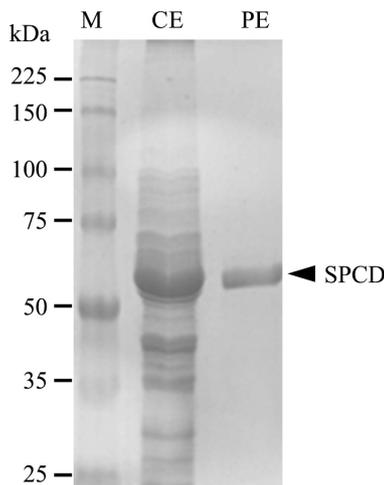


Fig. 2. Gene expression and purification of SPCD from *E. coli*. SDS-PAGE analysis showed the expression level and the purity of SPCD from recombinant *E. coli*. Lane M, protein molecular weight marker; lane CE, cell extract from *E. coli* harboring pHCXSPCD; lane PE, SPCD purified by Ni-NTA chromatography.

다. 목적 유전자를 SPCD-N 및 SPCD-C 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하여 약 1.7 kb의 SPCD 유전자 단편을 얻었으며, 이를 제한효소 *Nde* I과 *Xho* I으로 처리한 후, pHCXHD 발현벡터에 삽입하여 pHCXSPCD를 제조하였다. pHCXSPCD가 형질전환된 *E. coli*를 배양하여 카복시 말단에 6개의 histidine 잔기가 결합된 형태의 재조합 SPCD를 얻었다. Ni-NTA 크로마토그래피를 통해 정제된 SPCD 효소의 크기를 SDS-PAGE로 분석한 결과, 염기서열로부터 예상한 바와 같이 약 67 kDa의 단백질이 성공적으로 발현 및 정제되었음을 확인하였다(Fig. 2).

SPCD의 복합체 구조

아미노산 서열로부터 계산된 SPCD monomer의 분자량은 66,820 Da이었으며, GPC 분석을 통해 결정된 재조합 SPCD의 분자량은 147,120 Da이었다. 따라서 SPCD는 수용액 내에서 homo-dimer 형태로 존재할 것으로 예상하였다(Fig. 3). 일부 호알칼리성 세균인 *Bacillus* sp. I-5 (Lee *et al.*, 2002)와 *B. clarkii* 7364 (Nakagawa *et al.*, 2008) 유래 CDase의 경우, 6개의 dimer가 모여 dodecamer 구조를 형성한다고 알려졌으나, 일반적인 CDase 계열 효소들은 주로 homo-dimer 형태로 존재하는 것으로 보고되었다(Park *et al.*, 2000). 이들 효소의 아미노 말단에는 약 100-130개의 아미노산으로 구성된 고유의 N-domain이 공통으로 존재하여 복합체 구조의 형성에 중요한 역할을 하며, 이 과정에서 형성된 좁고 깊은 형태의 기질 결합부위 구조가 효소의 기질 특이성 및 안정성에 영향을 미치

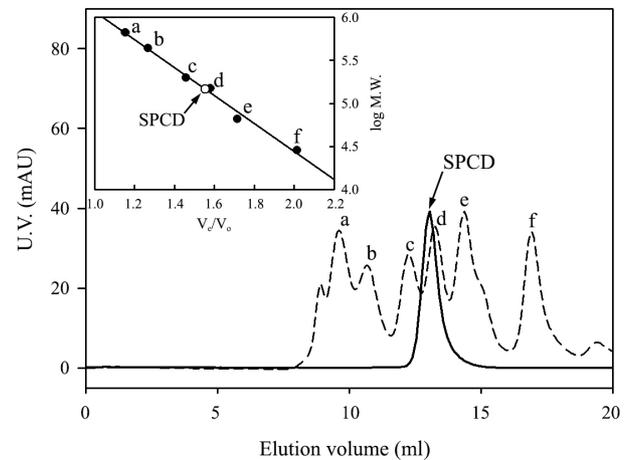


Fig. 3. Determination of quaternary structure of SPCD. Molecular mass of SPCD was estimated by Superdex-200 gel permeation chromatography. The purified SPCD was drawn as a solid line and the molecular weight markers (a dashed line) were used as the mixture of six proteins: a, thyroglobulin (669 kDa); 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).

는 것으로 알려졌다(Kim *et al.*, 2001; Hondoh *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002). SPCD도 CDase 계열 효소 특유의 N-domain을 가지며, 이를 통해 안정적인 homo-dimer 구조를 형성하는 것으로 예상하였다.

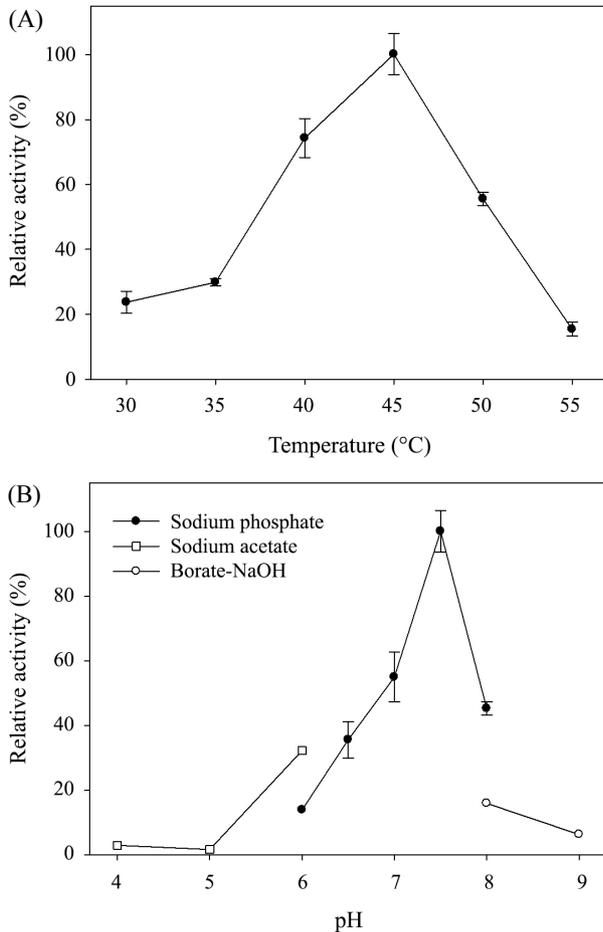


Fig. 4. Effects of reaction temperature (A) and pH (B) on β -CD-hydrolyzing activity of SPCD. Optimal temperature was determined by measuring enzymatic activities at various temperatures in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). For pH optimum, enzymatic activities were measured at various pH and 45°C.

SPCD의 효소 특성

재조합 SPCD는 β -CD를 기질로 할 때, 45°C에서 최대 활성을 나타내었으나, 35°C와 55°C에서 각각 최적 온도 대비 29.9%와 15.4%의 낮은 활성을 보였으며(Fig. 4A), 이는 SPCD의 낮은 열안정성에 기인하는 것으로 예상된다. 한편 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)에서 가장 높은 β -CD 가수분해 활성을 보였으나, pH 7.0 및 pH 8.0에서 최적 pH 대비 55.0% 및 45.2%의 낮은 상대활성을 나타내었다(Fig. 4B). 반응 pH에 대한 효소활성은 pH 7.0-9.0까지의 중성 및 염기성 영역에서 인정하였으나, pH 6.0에서 71.2%로 감소하였고 pH 5.0에서는 47.9%까지 감소하였다(자료 미제시). 대부분의 중온성 미생물 유래 CDase 계열 효소가 40-60°C, pH 5.5-8.0의 최적 반응조건을 가지며(Park *et al.*, 2000), SPCD 또한 유사한 최적 조건을 나타내었으나, 상대적으로 온도 및 pH에 따라 효소활성이 크게 감소하는 점에서 차이를 보였다.

SPCD의 기질 특이성 및 가수분해 특성

CDase 계열의 효소는 β -CD, pullulan, starch, maltooligosaccharides 뿐만 아니라 acarbose 등 다양한 탄수화물 기질을 가수분해할 수 있다. 다양한 기질에 대한 SPCD의 효소활성을 측정하고, 기존에 연구된 CDase 계열 효소들과 상호 비교하였다(Table 2). 효소 유전자 분석에서 예상한 바와 같이, SPCD는 β -CD에 대해 가장 높은 활성을 나타내는 CDase 계열 효소의 일반적인 특징을 보였으나, 그 활성이 starch 가수분해 활성 대비 660.1배로 매우 높아 4.7-82.5배 수준인 다른 CDase 효소들에 비해 큰 차이를 보였다. 반면 pullulan에 대한 가수분해 활성이 매우 낮아서 장시간 반응 후에 활성 측정 또는 분해산물 분석이 가능한 수준이었다.

각 기질로부터 생성된 반응산물을 TLC로 분석하여 SPCD의 기질 분해특성을 확인하였다(Fig. 5). SPCD는 β -CD의 환형 구조를 *endo*-형으로 절단하여 7개의 glucose로 구성된 직쇄

Table 2. Multi-substrate specificity among various CDase-family enzymes

Enzyme	Specific activity (U/mg) ^a					Activity ratio			
	β -CD (C)	Pullulan (P)	Starch (S)	Maltotriose (M)	Acarbose (A)	C/S	P/S	M/S	M/A
SPCD	336.4 ± 2.9	0.03 ± 0.01	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	6.5 ± 0.2	660.1	0.1	1.2	0.1
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
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
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
LLCD	16.5 ± 0.9	0.8 ± 0.0	0.2 ± 0.0	8.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0	82.5	4.0	42.5	85.0

^aEach 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 GOD-POD method.

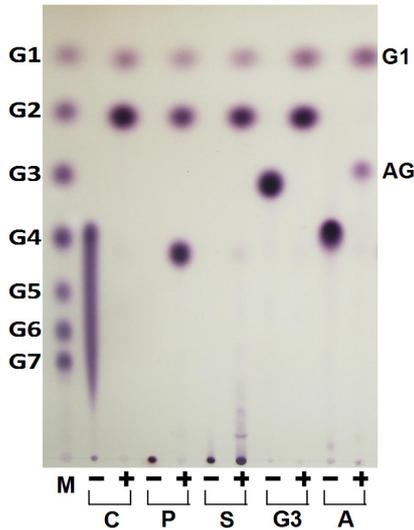


Fig. 5. TLC analysis of hydrolysis patterns of SPCD on various substrates. SPCD was reacted with 1% of each substrate: C, β -CD; P, pullulan; S, soluble starch; G3, maltotriose; A, acarbose; AG, acarviosine-glucose; M, maltooligosaccharide standards, and the reaction products with (+) or without (-) SPCD.

형의 maltoheptaose로 전환하며, 후속 분해과정을 통해 최종 산물로 maltose, 부산물로 glucose를 생성하였다. Pullulan 및 starch에 대한 활성은 상대적으로 매우 낮지만, 12시간 반응을 통해 얻어진 주요 산물은 예상과 같이 각각 maltose와 panose였으며, 일부 glucose를 부산물로 생성하였다. Maltotriose의 분해산물은 최종적으로 glucose와 maltose였으며, maltose는 더 이상 분해되지 않고 축적되지만, maltotetraose 이상의 소당류 기질에 비해 상대적으로 느린 분해속도를 나타냈다. 결론적으로 SPCD는 α -(1,4)-결합을 분해하여 주로 maltose를 생성하는 전형적인 CDase 계열의 효소임을 알 수 있었으며, pullulan 및 starch와 같은 고분자 중합체 기질 보다 β -CD 또는 maltotetraose 이상의 oligosaccharides 기질에 대해 선호도가 높은 효소 특성을 가진다. 특히 maltotriose와 비교할 때 acarbose에 대한 분해활성이 매우 높은 효소이며, 3개의 glucose로 구성된 maltotriose에 대한 가수분해 활성이 β -CD와 acarbose에 비해 상대적으로 낮았다. 일반적인 *endo*-형의 α -amylase는 짧은 길이의 oligosaccharides 기질에 대해 상대적으로 낮은 활성을 보이는 점을 감안할 때(Park *et al.*, 2000), SPCD 또한 maltotriose 이하의 저분자 기질에 잘 작용하지 못하는 *endo*-형의 CDase로 판단하였다.

SPCD의 당전이 특성

CDase 계열 효소의 일종인 ThMA, BHCD, LICD 등의 당전

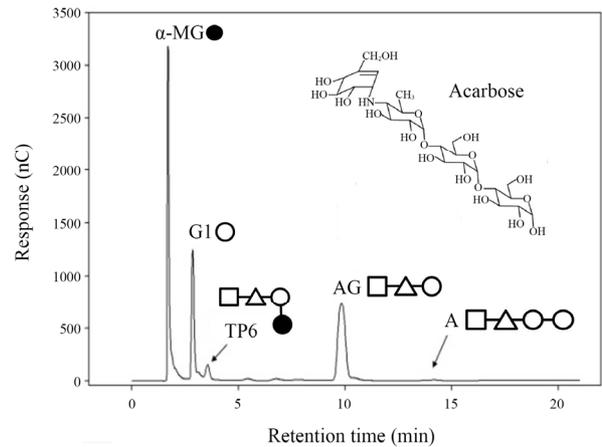


Fig. 6. HPAEC analysis of acarbose transfer products. SPCD was reacted with 5% acarbose (donor) and 10% α -methyl glucopyranoside (acceptor) at 30°C for 24 h. α -MG, α -methyl glucopyranoside; G1, glucose; AG, acarviosine-glucose; A, acarbose; TP6, α -(1,6)-transfer product.

이반응에서 반응 초기에 빠르게 생성된 α -(1,4)-결합의 전이생성물은 생성과 동시에 급속히 재분해되지만, 천천히 생성된 α -(1,6)- 또는 α -(1,3)-결합의 전이생성물은 다시 분해되지 않아 최종 생성물로 축적된다(Kim *et al.*, 1999). SPCD의 당전이 활성을 확인하고자, 공여체로 acarbose, 수용체로 α -methyl glucopyranoside (α -MG)를 이용한 당전이 반응을 수행하고, 반응산물을 HPAEC로 분석하였다. 당전이 반응으로부터 일부 α -(1,6)-결합 전이생성물이 얻어졌으나, 생성량이 무시할 정도로 매우 적었으며, α -(1,3)-결합 전이생성물은 관찰되지 않았다(Fig. 6). 따라서 SPCD는 상대적으로 높은 acarbose 가수분해 활성에 비해 당전이활성은 매우 낮은 특성의 효소로 생각된다.

SPCD의 경우, 다른 CDase 계열 효소와 아미노산 상동성이 35% 내외로 낮은 편이며, 특히 상동부위 II (GWRLDVANE)의 alanine-asparagine 아미노산 잔기가 serine-aspartate로 치환되어 있고, 또한 활성부위 아미노산 잔기인 상동부위 III (EIWH)의 glutamate와 인접한 isoleucine 잔기가 asparagine으로 치환되어 있는 등 1차구조 상에서 충분히 차별화될 수 있다(Fig. 1). 특히, 상동부위 II는 ThMA의 가수분해 및 당전이 활성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Kim *et al.*, 1999), 또한 acarbose의 가수분해 특성에도 영향을 주는 것으로 보고되었다(Oh *et al.*, 2008). 따라서 SPCD 특유의 가수분해 특성이나 낮은 당전이 활성의 이유를 설명하기 위해 이러한 아미노산 잔기에 대한 단백질 공학적 연구를 추가로 진행 중이며, CDase 계열 효소의 기질 특이성 및 당전이 활성에 관여하는 핵심 아미노산 잔기 연구의 모델 효소로 활용 가능할 것이다.

적 요

Streptococcus pyogenes ATCC 700294 유전체로부터 cyclomaltodextrinase (SPCD)로 예상되는 유전자를 발견하였다. SPCD는 총 567개의 아미노산으로 이루어진 66.8 kDa의 효소이며, 기존에 알려진 CDase 계열 효소들과 37% 미만의 아미노산 서열 상동성을 가진다. 본 연구에서는 SPCD 유전자를 클로닝하였으며, 대장균 내에서 카복시 말단에 6개의 histidine 잔기가 결합된 dimer 형태로 발현 및 정제되었다. SPCD는 pH 7.5, 45°C의 반응조건에서 최대의 활성을 나타내었으며, β -cyclodextrin, starch, maltotriose를 기질로 반응하여 maltose를 주산물로 생성하였다. 또한 pullulan을 panose 단위로 분해하며, acarbose를 glucose와 acarviosine-glucose로 가수분해하는 CDase 계열의 효소로 확인되었다. 그러나, SPCD는 다른 효소에 비해 저분자 소당류인 β -cyclodextrin에 대한 활성이 매우 높고, starch 및 pullulan과 같은 고분자 기질에 대해 매우 낮은 활성을 보였다. 또한 maltotriose 분해 활성이 매우 낮은 반면 acarbose에 대해 상대적으로 높은 가수분해 활성을 가지나, 당전이 활성은 매우 낮아 다른 CDase 계열 효소들과 구별된다.

감사의 말

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Cha, H.J., Yoon, H.G., Kim, Y.W., Lee, H.S., Kim, J.W., Kweon, K.S., Oh, B.H., and Park, K.H. 1998. Molecular and enzymatic characterization of a maltogenic amylase that hydrolyzes and transglycosylates acarbose. *Eur. J. Biochem.* **253**, 251–262.
- Feederle, R., Pajatsch, M., Kremmer, E., and Bock, A. 1996. Metabolism of cyclodextrins by *Klebsiella oxytoca* m5a1: purification and characterisation of a cytoplasmically located cyclodextrinase. *Arch. Microbiol.* **165**, 206–212.
- Ferretti, J.J., McShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate, S., Suvorov, A.N., Kenton, S., *et al.* 2001. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4658–4663.
- Fiedler, G., Pajatsch, M., and Bock, A. 1996. Genetics of a novel starch utilisation pathway present in *Klebsiella oxytoca*. *J. Mol. Biol.* **256**, 279–291.
- Gopal, S., Berg, D., Hagen, N., Schriefer, E.M., Stoll, R., Goebel, W., and Kreft, J. 2010. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoS One* **5**, e10349.
- Henrissat, B. and Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**, 695–696.
- Hondoh, H., Kuriki, T., and Matsuura, Y. 2003. Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J. Mol. Biol.* **326**, 177–188.
- Jang, M.U., Jeong, C.K., Kang, H.J., Kim, M.J., Lee, M.J., Son, B.S., and Kim, T.J. 2016. Gene cluster analysis and functional characterization of cyclomaltodextrinase from *Listeria innocua*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**, 363–369.
- Jang, M.U., Kang, H.J., Jeong, C.K., Park, J.M., Yi, A.R., Kang, J.H., Lee, S.W., and Kim, T.J. 2013. Enzymatic characterization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cyclomaltodextrinase expressed in *E. coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 391–397.
- Kaulpiboon, J. and Pongsawadsi, 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.
- Kang, H.J., Jeong, C.K., Jang, M.U., Choi, S.H., Kim, M.H., Ahn, J.B., Lee, S.H., Jo, S.J., and Kim, T.J. 2009. Expression of cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus halodurans* C-125 and characterization of its multisubstrate specificity. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 776–781.
- Kim, T.J., Kim, M.J., Kim, B.C., Kim, J.C., Cheong, T.K., Kim, J.W., and Park, K.H. 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.
- Kim, T.J., Nguyen, V.D., Lee, H.S., Kim, M.J., Cho, H.Y., Kim, Y.W., Moon, T.W., Park, C.S., Kim, J.W., Oh, B.H., *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.
- Lee, H.S., Kim, M.S., Cho, H.S., Kim, J.I., Kim, T.J., Choi, J.H., Park, C., Lee, H.S., Oh, B.H., and Park, K.H. 2002. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J. Biol. Chem.* **277**, 21891–21897.
- Miller, C.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- Nakagawa, Y., Saburi, W., Takada, M., Hatada, Y., and Horikoshi, K. 2008. Gene cloning and enzymatic characteristics of a novel gamma-cyclodextrin-specific cyclodextrinase from alkalophilic *Bacillus clarkii* 7364. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 2004–2011.
- Oh, K.W., Kim, M.J., Kim, H.Y., Kim, B.Y., Baik, M.Y., Auh, J.H., and Park, C.S. 2005. Enzymatic characterization of a maltogenic amylase from *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 expressed in

- Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 175–181.
- Oh, S.W., Jang, M.U., Jeong, C.K., Kang, H.J., Park, J.M., and Kim, T.J.** 2008. Modulation of hydrolysis and transglycosylation activity of *Thermus* maltogenic amylase by combinatorial saturation mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1401–1407.
- Park, K.H.** 2006. Function and tertiary- and quaternary-structure of cyclodextrin-hydrolyzing enzymes (CDase), a group of multi-substrate specific enzymes belonging to the alpha-amylase family. *J. Appl. Glycosci.* **53**, 35–44.
- Park, K.H., Kim, T.J., Cheong, T.K., Kim, J.W., Oh, B.H., and Svensson, B.** 2000. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 165–185.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786.
- Podkovyrov, S.M. and Zeikus, J.G.** 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.
- Shim, J.H., Park, J.T., Hong, J.S., Kim, K.W., Kim, M.J., Auh, J.H., Kim, Y.W., Park, C.S., Boos, W., Kim, J.W., et al.** 2009. Role of maltogenic amylase and pullulanase in maltodextrin and glycogen metabolism of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **191**, 4835–4844.