



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년06월19일
<i>C12N 9/24</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0729938
<i>C12N 9/00</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2007년06월13일

(21) 출원번호	10-2006-0078126	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2006년08월18일	(43) 공개일자
심사청구일자	2006년08월18일	

(73) 특허권자 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 윤한대
경남 진주시 칠암동 284-2

조계만
경남 함양군 안의면 이천리 144

홍수영
경남 진주시 평거동 18-2 유일맨션 301호

(74) 대리인 이덕록

(56) 선행기술조사문헌
US6815192 B2
염기서열 2006

심사관 : 김기연

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 셀룰로즈, 자이란, 린첸안 및 만난을 동시에 분해하는페니바실러스 폴리믹사 G S 0 1 균주의 다기능성 단일효소 c e l 4 4 C 유전자

(57) 요약

본 발명은 단일효소로서 셀룰로즈, 자이란, 린첸안 및 만난을 동시에 분해하는 *cel44C* 유전자에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 본 발명은 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) GS01 균주로부터 분리한 셀룰로즈, 자이란, 린첸안 및 만난을 동시에 분해하는 다기능 단일효소 유전자 및 그 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기를 제공하는 매우 뛰어난 효과가 있다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 DNA 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드로써 셀룰로즈(cellulose), 자이란(xylane), 린첸안(lichen) 및 만난(mannane)을 동시에 분해하는 다기능 단일효소 *ce44c* 유전자(미국 국립생물정보센터 : NCBI 등록번호 DQ367923).

청구항 2.

상기 제1항 유전자 서열로부터 코딩된 서열번호 2의 아미노산 서열.

청구항 3.

상기 제1항 유전자의 구조 분석을 위한 서열번호 3 내지 8의 DNA 서열로 구성된 폴리뉴클레오티드.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) GS01 균주가 생성하는 단일효소로서 셀룰로즈(cellulose), 자이란(xylan), 린첸안(lichenan) 및 만난(mannan)을 동시에 분해하는 유전자에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 5년근 인삼뿌리 내부로부터 내생균을 분리하고 식물 세포벽 분해력이 우수한 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) GS01 균주를 선별하여 상기 균주로부터 생성되는 *ce44c* 다기능성 단일효소 유전자 및 부위 직접 돌연변이법(site direct mutagenesis)을 이용하여 셀룰로즈(cellulose), 자이란(xylan), 린첸안(lichenan), 및 만난(mannan)을 동시에 분해하는 본 발명 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기에 관한 것이다.

식물의 세포벽은 많은 다른 다당류, 단백질, 방향족 화합물로 구성되어 있다. 셀룰로즈(cellulose)는 일차 식물 세포벽 건조중량의 약 15-30%와 이차 식물 세포벽 대부분을 차지하고 있으며, 글루코우스(glucose)가 베타 1→4 결합을 하고 있는 다당류이다. 자이란(xylan)은 헤미셀룰로즈의 일종으로 식물 세포벽의 주요 성분이며, 자일로즈(xylose)가 베타 1→4 결합을 하고 있는 다당류이다.

만난(mannan) 역시 헤미셀룰로즈이며, 만노오스(mannose)가 베타 1→4 결합을 하고 있는 다당류이다. 린첸안(lichenan)은 식물의 내배유 조직과 곡류에 존재하는 식물 다당류로 글루코스(glucose)가 베타 1→3과 1→4 결합을 하고 있는 다당류이다.

많은 세균, 곰팡이, 및 동물에서 식물 세포벽을 분해하는 효소들을 암호화하는 유전자들이 보고 되어 있다. 셀룰로즈(cellulose)를 분해하는 셀룰라아제(cellulase)는 글루코실 하이도라제 패밀리(glycosyl hydrolase family) 5, 8, 9, 44, 45, 48, 및 61 등이 해당되며, 자이란(xylan)을 분해하는 자이란아제(xylanase)는 글루코실 하이도라제 패밀리 10, 11, 및 43 등이 해당되며, 만난의 분해효소인 만난아제는 글루코실 하이도라제 패밀리(glycosyl hydrolase family) 5 및 26 등이 있었으며, 린첸안(lichenan)의 분해효소인 린첸안아제(lichenanase)는 글루코실 하이도라제 패밀리(glycosyl hydrolase family) 16이 대표적이다.

식물 세포벽을 분해하는 효소를 암호화하는 유전자에는 탄수화물 분해를 촉매하는 도메인(catalytic domain, CD), 탄수화물에 결합하는 도메인(carboxylhydrolate binding domain, CBD), 섬유소 기질에 결합하는 도메인(fibronectin, Fn) 등으로 구성되어 있다.

이들 중에서 글루코실 하이도라제 패밀리 44는 지금까지 많이 보고가 되지 않은 식물 세포벽 분해효소이다.

본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로, 본 발명의 목적은 식물 뿌리 내부에 존재하는 균주를 분리, 그 균주의 게놈 라이브러리 제작을 통하여 셀룰로즈, 자이란, 린첸안, 및 만난을 동시에 분해하는 단일 유전자를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 셀룰로즈, 자이란, 린첸안, 및 만난을 동시에 분해하는 단일 유전자의 필수 아미노산 잔기를 제공하는데 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

인삼 뿌리 내부로부터 식물 세포벽 분해력이 뛰어난 균주를 선발한 후 단일효소로서 여러 가지 식물 세포벽을 분해하는 신규한 유전자를 분리하고 상기 유전자를 대장균에 이중 발현시킨 후 유전자의 염기 서열과 아미노산 서열을 결정하고 유전자 산물의 확인 및 효소적 특징 분석과 셀룰로즈, 자이란, 린첸안 및 만난을 동시에 분해하는 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기를 확인함으로써 본 발명을 달성하였다.

발명의 구성

본 발명은 인삼뿌리 내부를 완충액을 넣고 분쇄한 후 한천배지에 도말하여 배양한 후 내생균을 분리하는 단계; 식물 세포벽 분해효소 활성을 조사하는 단계; 상기 분리된 균주를 형질도입하여 다기능 단일 유전자 스크리닝 단계; 중합효소연쇄반응을 이용하여 다기능 단일 유전자의 구조 분석 단계; 효소의 클로닝 및 형질전환하여 얻은 클론을 배양하여 그 상등액을 조효소로 사용하여 다기능 단일 유전자 산물을 확인하는 단계; 디니트로살리시릭산(dinitrosalicylic acid)을 이용한 환원당 정량법으로 다기능 단일효소의 생화학적 특징 검사 단계 및 부위 직접 돌연변이법으로 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기를 확인하는 단계로 구성된다.

본 발명에서 분리된 균주를 대장균(*E. coli*) EP1300TM에 형질도입하였고 유전자 스크리닝은 대장균(*E. coli*) DH5a에 형질전환하여 단일 유전자를 스크리닝하였다.

본 발명에서 단일 유전자의 DNA 염기서열 분석은 PRISM Ready reaction dye terminator/primer cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 이용한 사슬종결법으로 DNA 염기서열 분석하였다.

본 발명에서 단일 유전자의 DNA 염기서열의 연결 및 아미노산의 개방 해독 판독틀(open reading frame, ORF) 분석을 DNAMAN 분석 시스템(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)를 이용하여 분석하였다.

본 발명에서 단일 유전자의 DNA와 아미노산의 상동성 조사는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트(BLAST) 네트워크 서비스와 DNAMAN 분석 시스템(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)를 이용하여 조사하였으며 다기능 단일효소를 생성하는 신규한 유전자(*ce44C*)는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에 등록 번호 DQ367923으로 등록되었다.

본 발명에서 단일 유전자의 필수 활성 아미노산 잔기는 부위 직접 돌연변이법으로 Site directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하였고 중합효소연쇄반응을 실시한 후 대장균(*E. coli*) DH5a에 형질전환하여 DNA 염기서열을 분석한 후 효소들 간의 활성을 조사하였다.

이하 본 발명의 구성을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

실시예1: 균주 분리 및 분해효소 활성 조사

5년근 인삼뿌리를 세척한 후 물기를 제거하고 1% 염소로 10분 동안 침지하여 인삼뿌리 표면을 소독한다. 그 후에 인삼뿌리의 표면으로부터 약 0.5cm를 제거하고 남은 인삼뿌리 내부를 살균된 막자사발에 넣은 후 살균 10mM 포스페이트 완충액(pH 7.2)을 넣고 완전히 마쇄한 후 트리피틱 소이 한천배지(TSA, Difco, USA)에 도말하여 28℃에서 48시간 동안 배양한 후 내생 균주를 분리하였다. 상기 분리된 내생균주를 한천 확산법으로 셀룰라아제, 자이란아제, 펙틴아제 및 프로테아제의 식물 세포벽 분해효소 활성을 조사한 결과 상기 내생균주 중 GS01 균주가 식물세포벽 분해효소 활성이 가장 우수하

였다(표 1; -: 활성 없음, +: 약간 활성, ++: 중간 활성, +++: 강한 활성). GS01 균주는 16S rRNA 염기서열을 통해서 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)로 동정되었고 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) GS01로 명명하였다.

<표 1> 인삼뿌리 내부로부터 분리한 내생균들의 식물세포벽 분해 활성

균 주	셀룰라아제	자이란아제	펙틴아제	프로테아제
GS01	+++	+++	+++	+++
GS02	-	-	-	-
GS03	+	-	-	-
GS04	-	-	-	-
GS05	-	-	-	-
GS06	++	++	++	++
GS07	-	-	-	+
GS08	-	-	-	+
GS09	-	-	-	-
GS10	-	-	-	+
GS11	+	-	-	+
GS12	-	-	-	-

실시예2. 균주 GS01 계놈 라이브러리 구축

균주 GS01의 토탈 계놈 DNA를 분리한 후 DNA 농도 측정하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 희석을 한다. 상기 희석된 DNA를 1ml씩 1.5ml 마이크로 튜브에 담은 후 1ml의 주사기를 이용하여 DNA를 부분적으로 마쇄한 후 전기 영동하여 23 내지 49kb의 사이를 확인한 후 이차 사이즈 선별을 위하여 5 내지 40%의 슈크로오즈 밀도 구배 초원심분리법을 이용하여 원심분리한 후 정액펌프를 이용하여 500 μl 씩 1.5 ml 마이크로 튜브에 분취하고 전기 영동하여 23 내지 49kb의 사이즈를 확인하였다. 사이즈 확인된 라인을 모아서 DNA를 정제하고 DNA 끝을 수선(End-repair)한 후 코스미드 pCC1FOSTM 운반체에 연결하고 람다 DNA 패키징 키트에 포장하여 대장균(*E. coli*) EP1300TM 에 형질 도입하여(Epicentre, WI, USA), 약 4,000,000 클론의 코스미드 라이브러리 풀(pool)을 확보하였다. 이 코스미드 라이브러리를 384 격자에 넣어 배양한 후 한천 확산법으로 식물세포벽 분해 활성 클론을 스크린하였다(도 1 내지 3).

실시예3. 다기능 단일 유전자의 DNA 서열 및 아미노산 서열

DNA와 아미노산의 상동성 조사는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트(BLAST) 네트워크 서비스와 DNAMAN 분석 시스템(Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)를 이용하여 조사하였다. 셀룰라아제 분해활성이 있는 코스미드 클론(ce44F)을 퀴아젠 중간 플라스미드(Qiagen midi plasmid kit, USA)를 이용하여 코스미드 플라스미드를 분리한 후 쏫트간(shunt gun) 방법으로 서브클로닝하여 카복실메틸셀룰로스가 들어있는 배지에서 접종하여 활성이 있는 클론 선별하고 플라스미드를 분리하여 여러 제한효소를 처리하여 DNA 지도를 작성하는 동시에 다기능 단일효소를 코딩하는 유전자 서열 및 아미노산 서열이 서열번호 1 내지 2와 같았다.

개방 해독 관독틀(open reading frame, ORF)을 코딩하는 유전자는 4,056 bp이며 아미노산은 1,352로 구성되어져 있었다. ATG가 시작 코돈이고 오처(ochre) 코돈인 TAA가 종결 코돈이며, 프로모터 영역에 -35 지역, -10 지역, 및 라이보솜 결합 서열(ribosome binding sequence, RBS)인 GGAGG로 구성되어 되어 있었다(도 4 내지 5).

실시예4. 다기능 단일유전자의 유전자 구조 분석

본 발명 유전자의 구조 분석은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 기초로 하였다. 중합효소연쇄반응을 실시하기 위해 제작한 정방향 프라이머에는 *Bam*HI의 제한효소를 만들고 역방향 프라이머에는 새로운 종결코돈과 *Sal*I의 제한 효소를 만들어 중합효소연쇄반응을 한 후 증폭산물과 운반체인 pBluescript II SK+ 를 *Bam*HI과 *Sal*I의 제한효소로 처리한 후 정제하여 연결하고 대장균(*E. coli*) DH5a에 형질전환하여 그 특성을 분석하였다. 본 발명 다기능 단일효소인 ce44C 유전자는 pBluescript II SK+ 운반체에 안에 약 5.1 kb 정도 클로닝 되었으며, 유전자의 구조 분석을 위하여 여러 프라이머를 제작하여 pBluescript II SK+ 운반체에 다시 서브클로닝 하였다.

다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자 시그널 펩타이드(signal peptide, SP), 글루코실 하이드라제 패밀리 44(glycosyl hydrolase family 44, GH44) 도메인, 피브로넥틴 타입 3(fibronectin type 3, Fn3) 도메인, 글루코실 하이드라제 패밀리 26(glycosyl hydrolase family 44, GH26) 도메인 및 셀룰로즈 결합 타입3 모듈레스(cellulose-binding modules type 3, CBM3)로 구성되어 있다. 글루코실 하이드라제 패밀리 26(glycosyl hydrolase family 44, GH26) 도메인은 오로지 만난 아제 활성만이 관여하는 도메인인 것으로 나타났으며, 글루코실 하이드라제 패밀리 44(glycosyl hydrolase family 44, GH44) 도메인은 셀룰라아제, 자이란아제, 및 린첸안아제를 동시에 분해하는 다기능 도메인인 것으로 나타났다.

피브로넥틴 타입 3(fibronectin type 3, Fn3) 도메인과 셀룰로즈 결합 모듈레스 타입3 (cellulose-binding modules type 3, CBM3)는 효소활성에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다(표 2 및 도 6 내지 7).

표 2. 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자 구조 분석을 위한 프라이머

명칭	시퀀스(5'→3')	종결 코돈	클론
서열번호3	1471F AAAGGATCCTTGGATCCTTTGACACAGCCGAAGTG <i>Ban</i> HI		
서열번호4	1311F AAAGGATCCACGGCAGGCTTGTACAATC <i>Ban</i> HI		
서열번호5	1352R AAAGTCGACTCACACATACGTCTCCTTCGAC <i>Sal</i> I	Ochre	P1352 P658-1352
서열번호6	1198R AAAGTCGACGTCGACTTATCGTCGGCTGCTGA GTATC <i>Sal</i> I	Ochre	P1198 P658-1198
서열번호7	657R AAAGTCGACGTCGACCTACTTCGGAACCGCTTT C <i>Sal</i> I	Amber	P657
서열번호8	558R AAAGTCGACGTCGACCTATGGAGACGTGTAATTGCC <i>Sal</i> I	Amber	P558

실시예5. 다기능 단일효소의 도메인별 상동성 비교

본 발명 다기능 단일효소인 *ce44* 유전자의 4가지 도메인과 기존에 밝혀진 도메인과 상동성을 비교한 결과 글루코실 하이드라제 패밀리 44(glycosyl hydrolase family 44, GH44) 도메인과 가장 높은 상동성은 페니바실러스 란투스 (*Paenibacillus latus*)의 *celA*와 63.3%, 피브로넥틴 타입 3(fibronectin type 3, Fn3) 도메인은 페니바실러스 종 (*Paenibacillus* sp.) BP-23의 *ce48C*와 47.8%, 글루코실 하이드라제 패밀리 26(glycosyl hydrolase family 44, GH26) 도메인은 디토크로무스 썬모필룸(*Dictyoglomus thermophilum*) Rt46B.1의 *manA*와 59.1% 있었으며, 셀룰로즈 결합 타입3 모듈레스(cellulose-binding modules type 3, CBM3)는 칼디바실러스 셀룰로보란스(*Caldibacillus cellulovorans*)의 *xyA*와 60.7%로 가장 상동성이 높았다. 모든 도메인 기존에 알려진 것과 상동성이 높지 않은 것으로 보아 본 발명 다기능 단일효소인 *ce44C*는 신규한 효소이며 이를 코딩하는 유전자 역시 신규한 유전자인 것으로 확인이 되었다(표 3).

표 3. 본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*와 기존에 알려진 도메인별 상동성 비교

단백질	상동성 (%)			
	<i>ce44C</i> -GH44	<i>ce44C</i> -Fn3	<i>ce44C</i> -man26	<i>ce44C</i> -CBM3
GH44				
PL- <i>celA</i>	63.3			
CT- <i>celI</i>	59.1			
CC- <i>ceIE</i>	54.4			
CC- <i>manA</i>	54.2			
Fn3				
Pb- <i>ce48C</i>		47.8		
TT-APU		45.7		
TS-APU		44.3		
TE-APU		42.9		
GH26				
DT- <i>manA</i>			59.1	
CS- <i>man26B</i>			51.0	
CT- <i>man26B</i>			48.2	
RM- <i>manA</i>			46.6	
CBM3				
CC- <i>xyIA</i>				60.7
CS- <i>ceIZ</i>				41.0
CC- <i>ceIE</i>				39
AC-CIPV				37.3

[주] *ce44C*-GH44, *ce44C*-Fn3, *ce44C*-GH26, 및 *ce44C*-CBM3: *Paenibacillus polymyxa* GS01, Pl-*celA*: *Paenibacillus latus*, CT-*celI*: *Clostridium thermocellum* F1, CC-*ceIE*: *Caldicellulosiruptor* sp. Tok7B.1, Cs-*manA*: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, Pb-*ce48C*: *Paenibacillus* sp. BP-23, TT-APU: *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, TS-APU: *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, TE-APU: *Thermoanaerobacter ethanolicus*, DT-*manA*: *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, CS-*manA*: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* Rt8B.4, CT-*man26B*: *Clostridium thermocellum*, RM-*manA*: *Rhodothermus marinus* ATCC 43812, CC-*xyIA*: *Caldibacillus cellulovorans*, CS-*ceIZ*: *Clostridium stercorarium*, Ac-CipV: *Acetivibrio cellulolyticus*.

실시예6: 다기능 단일효소의 유전자산물 확인 및 특징

본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*의 유전자 산물은 단백질을 전기영동 후 활성 염색을 통하여 확인하였다. 셀룰로즈, 자일리란, 리첸, 및 만난 기질에 대하여 각각 확인한 결과 모두 약 145,000Da로 확인되었다. 또한 생물정보학 컴퓨터 등전점과 분자량을 측정한 결과 145,294Da로 동일한 결과를 보였다 (http://kr.expasy.org/tools/pi_tool.html).

본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*의 pH에 대한 영향을 살펴본 결과 셀룰로즈와 리첸을 분해하는 셀룰라아제와 리첸아제는 pH 7.0에서 최적 활성을 나타냈었으며, 자일리란과 만난을 분해하는 자일리란아제와 만난아제는 pH 5.0에서 최적 활성을 나타냈다. 다기능 단일효소 *ce44C*의 온도에 대한 영향을 살펴본 결과 셀룰로즈, 자일리란, 리첸, 및 만난의 모든 기질에 대해서 50℃에서 최적 활성을 나타내었다(도 8 내지 9).

실시예7: 다기능 단일효소의 필수 아미노산 잔기 확인

본 발명 다기능 단일효소 *ce44C* 유전자의 활성 부위 조사는 부위 직접 돌연변이법으로 수행하였다(Site directed mutagenesis kit, Stratagene, La Jolla, CA, USA). 본 발명 *ce44C* 유전자가 코딩하는 아미노산 서열과 기존에 알려진 8개의 아미노산 서열을 정렬하여 글루탐산(glutamic acid, Glu, E)과 아스파틱산(aspartic acid, Asp, D)이 일치하는 14개의 지역을 선정한 후 글루탐산과 아스파틱산 모두를 알라닌(Alanine, Ala, A)으로 대체한 프라이머를 제작한 후 pET-29(+)/P558 플라스미드를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 실시한 후 *DpnI*의 제한효소로 처리한 후 대장균(*E. coli*) DH5α에 형질전환하여 얻은 클론에서 플라스미드를 정제하여 DNA 염기서열 분석하여 변화된 것을 확인한 후 본 발명 다기능 단일효소 *ce44C* 유전자의 기존 효소와 무탄트(mutant)된 효소들 간의 활성을 조사하였다(표 4).

표 4. 본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*의 부위 직접 돌연변이법을 위한 프라이머

명칭	시퀀스 (5'→3')	DNA 서열	아미노산 서열
E91AF	ACC GGA TAC AAC TGG GCA AAC AAT ATG TCC AAT	GAA→GCA	Glu→Ala
E91AR	ATT GGT CAT ATT GTT TGC CCA GTT GTA TCC GGT		
D100AF	CCA ATG CAG GAA GTG CCT GGC AGC AAT CTA G	GAC→GCC	Asp→Ala
D100AR	CTA GAT TGC TGC CAG GCA CTT CCT GCA TTG G		
D106AF	TGG CAG CAA TCT AGC GCT AAC TAT TTA TGC AGT	GAT→GCT	Asp→Ala
D106AR	ACT GCA TAA ATA GTT AGC GCT AGA TTG CTG CCA		
D195AF	TTC CAA CTA CAG CCT GCT CTG AAT GAC AAT CGG	GAT→GCT	Asp→Ala
D195AR	CCG ATT GTC ATT CAG AGC AGG CTG TAG TTG GAA		
E196AF	CGG GTC TAT GTT GAT GCG TTC GTC CAT TTT TTA	GAG→GCG	Glu→Ala
E196AR	TAA AAA ATG GTC GAA CGC ATC AAC AGA GAC CCG		
D220AF	GGA TAT GCC CTC GGC AAT GAA CCC GCT	GAC→GCC	Glu→Ala
D220AR	AGT GGG TTC ATT GGC GAG GGC ATA TGG		
E222AF	CCC TCG ACA ATG CAC CCG CTC TCT G	GAA→GCA	Glu→Ala
E222AR	CAG AGA GCG GGT GCA TTG TCG AGG G		
E242AF	GTC GGA GCG AAA GCG TTG GTA GAC CGG	GAG→GCG	Glu→Ala
E242AR	CCG GTC TAC CAA GCG TTT CGC TCC GAC		
D258AF	GTG AAA GCG ATT GGC GCA GGT GCA GAA	GAC→GCC	Asp→ala
D258AR	TTC TGC ACC TGC GGC AAT CGC TTT CAC		
E262AF	ACG CAG GTG CAG CAA TTT TTG GGC C	GAA→GCA	Glu→Ala
E262AR	GGC CCA AAA ATT GCT GCA CCT GCG T		
D314AF	GCA AGA GATTGC TGG CTG TGT TCG ACG TAC TAC A	GAT→GCT	Asp→Ala
D314AR	TGT ACG TCG AAT ACA GCC AGC AAT CTC TTG C		
D317AF	TGC TGG ATG TAT TCG CCG TAC ACT GGT ATC T	GAC→GCC	Asp→Ala
D317AR	GGA TAC CAG TGT ACG GCG AAT ACA TCC AGC A		
E323AF	ACT GGT ATC CCG CAG CGA TGG GCG G	GAA→GCA	Glu→Ala
E323AR	CCG CCC ATC GCT GCG GGA TAC CAG T		

본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*의 구십 한 번째 글루타믹산(E91A)과 이백 이십 두 번째 글루타믹산(E222A)을 알라닌(Alanine)으로 변화시킨 결과 셀루로즈, 자이란, 및 린첸안을 분해할 수 있는 효소 활성이 소실한 것으로 보아 셀루로즈, 자이란, 및 린첸안을 분해하는데 이 두 아미노산이 필수 아미노산 잔기인 것으로 확인되었다. 그 외 다른 무탄트 단백질들은 활성이 기존 단백질과 비슷하거나 2 내지 4배 정도로 활성이 작아졌다(표 5 및 도 10).

표 5. 본 발명 다기능 단일효소 *ce44C*와 이들 무탄트 단백질의 셀루로즈, 자이란, 및 린첸안 분해를 위한 효소의 특징적 활성과 상대적 활성

단백질	특이적 활성(U/mg)/상대적 활성(%)		
	셀룰라아제	자이란아제	린첸안아제
P558	765/100	378/100	754/100
E91A	ND	ND	ND
D100A	312/41	132/35	273/36
D106A	282/37	112/30	258/34
D195A	312/41	134/35	274/36
E196A	336/44	161/43	296/39
D220A	253/33	107/28	240/32
E222A	ND	ND	ND
E242A	279/37	106/28	245/32
D258A	310/41	125/33	266/35
E262A	312/41	128/34	271/36
D314A	758/99	371/98	748/99
D317A	244/32	99/26	234/31
D323A	281/37	116/31	241/32

[주] ND: 활성 없음

발명의 효과

상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이 페니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) GS01 균주로부터 분리한 본 발명 *ce44* 유전자는 단일효소로서 셀룰로즈, 자이란, 린첸안, 및 만난를 동시에 분해하는 매우 뛰어난 효과가 있으므로 제지공업 및 유기농 생산을 위한 환경산업 및 농업산업에 있어 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1A는 23 내지 49kb DNA 사이즈 확인을 위하여 1ml의 주사기를 이용하여 DNA를 부분적으로 마쇄한 후 전기 영동한 결과이며 도 1B는 5 내지 40%의 슈크로오즈 밀도 구배 초원심분리법을 이용하여 원심분리한 후 정액펌프를 이용하여 500 μ l씩 1.5ml 마이크로 튜브에 분취하고 전기 영동한 결과이다.

도 2는 균주 GS01 계놈 라이브러리로부터 클론을 무작위로 선택하고 플라스미드 정제 후 제한효소 BamHI으로 자른 후 전기 영동한 결과이다.

도 3A는 균주 GS01 계놈 라이브러리로부터 셀룰라아제(cellulase) 활성 클론을 스크리닝한 결과이며 도 3B는 자이란아제(xylanase) 활성 클론을 스크리닝한 결과이다.

도 4A는 셀룰로즈 배지에 서브클로닝한 클론을 배양하여 셀룰라아제 활성 클론을 스크리닝한 결과이며 도 4B는 활성 클론의 플라스미드를 분리한 후 여러 제한효소로 처리하여 전기 영동한 결과이다.

도 5는 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자의 DNA 염기서열, 프로모터 지역, 개방 해독 판독틀(open reading frame, ORF)의 아미노산 서열을 나타낸 결과이다.

도 6은 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자의 구조와 셀룰라아제, 자이란아제, 린첸안아제 및 만난아제 활성을 나타낸 결과이다.

도 7은 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자의 구조 분석을 통하여 서브클로닝한 클론의 한천확산법을 통하여 효소 활성을 나타낸 것으로 A는 셀룰라아제(cellulase), B는 자이란아제(xylanase), C는 리첸아제(lichenase) D는 만난아제(mannanase) 효소 활성 결과이다.

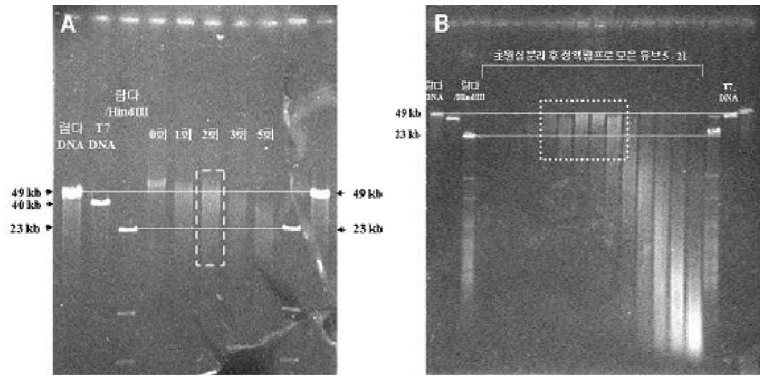
도 8은 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자산물을 단백질 전기영동 후 활성염색법으로 단백질 분자량을 측정한 것으로 A는 셀룰라아제(cellulase), B는 자이란아제(xylanase), C는 리첸아제(lichenase) 및 D는 만난아제(mannanase) 유전자산물을 확인한 결과이다.

도 9A는 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자산물의 pH 변화에 따른 결과이며 도 9B는 다기능 단일효소인 *ce44C* 유전자산물의 온도의 변화에 따른 결과이다.

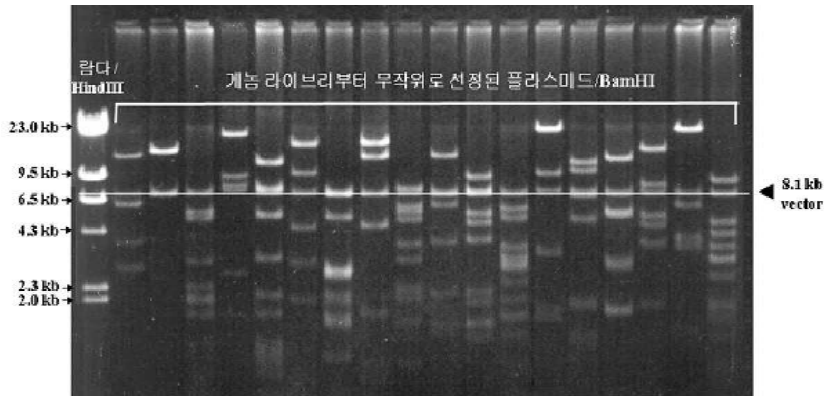
도 10은 부위 직접돌연변이법(site direct mutagenesis)를 위해 다기능 단일효소인 *ce44C*의 아미노산 서열과 기존에 알려진 8 가지의 글루코실 하이드로라제 패밀리 44(glycosyl hydrolase family 44, GH44)의 효소의 아미노산 서열의 결과이다.

도면

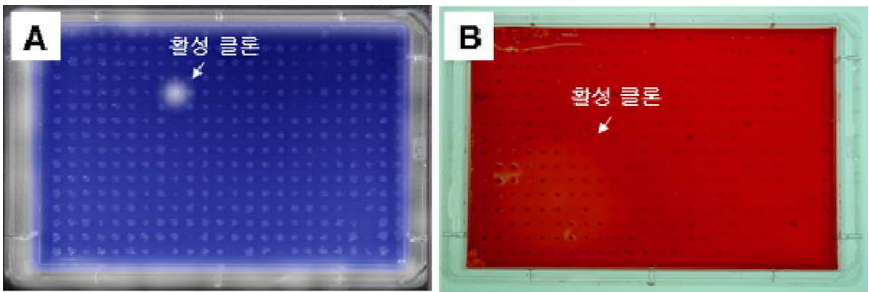
도면1



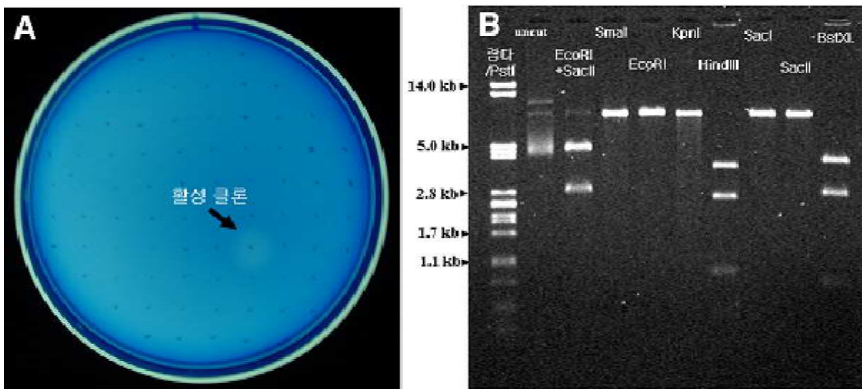
도면2



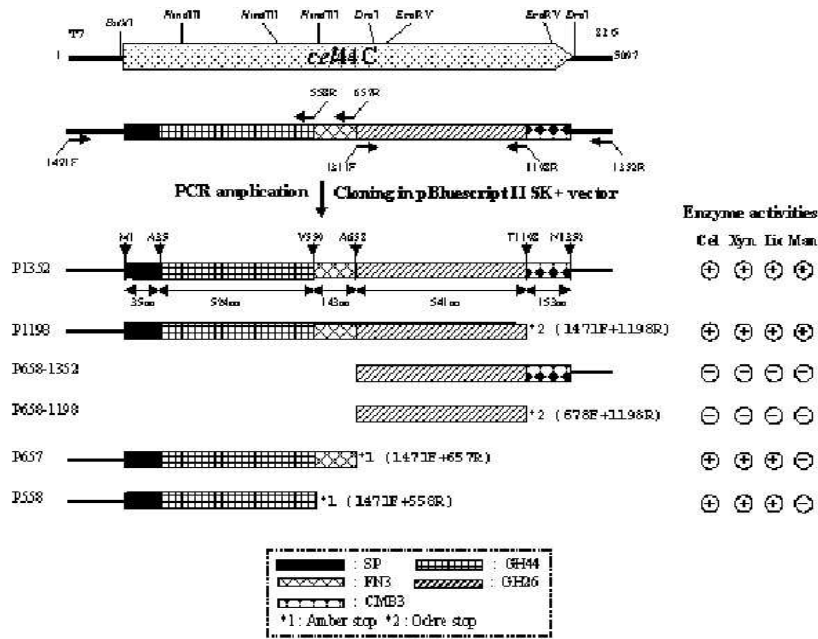
도면3



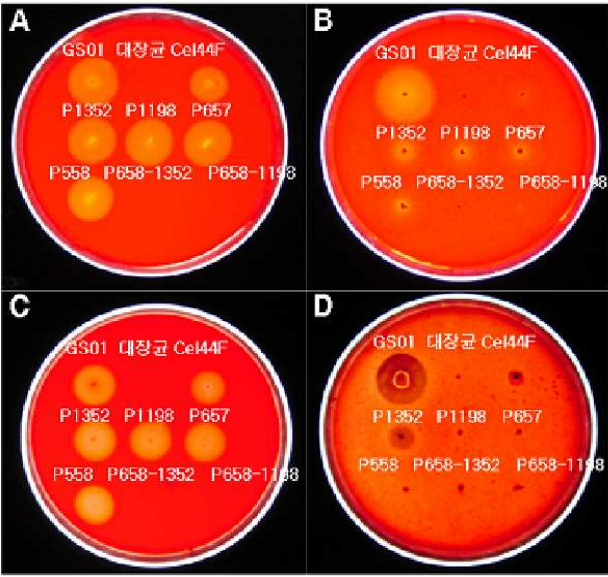
도면4



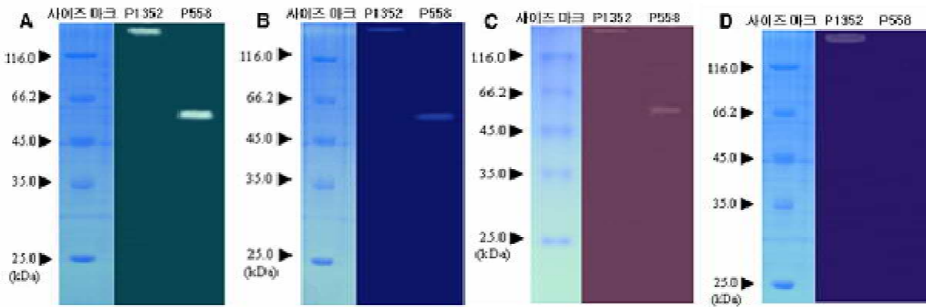
도면6



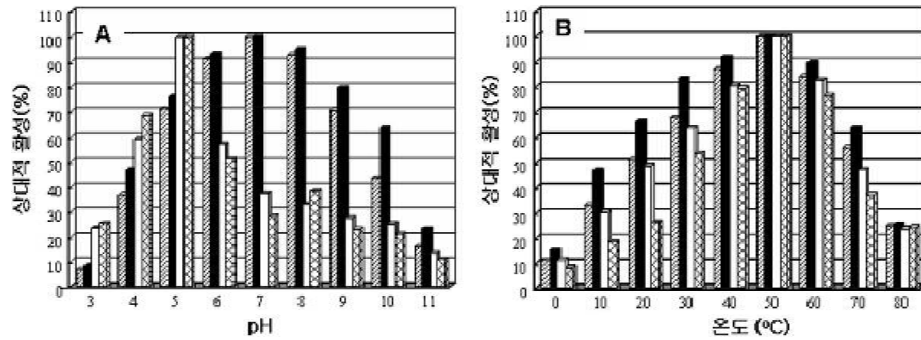
도면7



도면8



도면9



도면10

```

Fp-Cel144C  RRPISPYIYGTNQDL--AGDENMAARLGGNEMTCYNWENNHSNACSDWDNYLCSNQSS
F1-Cel1A     RAAISPNYIYGTNQDL--SGTENWSSRLGGNRLTCYNWENNASSACRDWDDFLCGNHLHS
Ft-Cel1J     RKDISPYIYCSNQ----ELDATVTAKDFCCNRTTCYNWENNFSNACSDWDTYLLDLHYS
Co-PKD       RKDISPYIYCSNQ----ELDATVTAKDFCCNRTTCYNWENNFSNACSDWDTYLLDLHYS
Ca-EndB      KQATISPYIYGTNQD---FSNAKVTARRIGGNRSTCYNWENNDSNAGTDWDMYWLTLKNS
Cc-CelE      RTKISPYIYCANQD---IQGVVHPARLGGNRLTCYNWENNHSNACSDWDYVHCYIYHSS
Cs-ManA      RTQISPYIYCANQD---IEGVVHSARLGGNRLTCYNWENNFSNACNDWDDYLCWSYHSS
Rf-CelB      RREISPLYICVNQYTTDLKSVKTTAVRQGGNEMTAYNWNENASNACSDWDMNLS--KHSS
Rf-EndB      KKATISPLYICVNQYTTDLRDVKTTAVRQGGNEMTAYNWEENASNACSDWDMNLS--KHSS
          ***  ***  **          *  ****  *  ****  *  *  *  ***  *

Fp-Cel144C  GGLTQAECEKPGAVTTTFHDKSLKLGIT-YSLVTLPMAGYVAKDGNCSVQESKAP SARWN
F1-Cel1A     GGVPTDTCDRPGCAVVTAFHDKSLENGA-YSIVTLQHAGYVS RDRNGPVD ESETAPSPRWD
Ft-Cel1J     GGVPKGEWSTPASVVTTFHDKLSKNVPTTLITLQAAGYVSADGNCPVVSQETAPSSRWK
Co-PKD       GGVKCEWSTPASVVTTFHDKLSKNVPTTLITLQAAGYVSADGNCPVVSQETAPSSRWK
Ca-EndB      YDVVKEKYNPEPASVVTAFHDKSLANCVPTSLVTLQACCYVAADQSCPLANTDUAPSSKWK
Cc-CelE      MGITGNDKNVPAAVVSKFHGSIKONA-YSAITLQMGYVAKDGNCTVS ESETAPSPRWA
Cs-ManA      MGISGEDAKVPAAVVSKFHGSIKONA-YSAITLQMGYVSKDNYCTVS ESETAPSNRWA
Rf-CelB      -----DENPPAEVWQRLSKEAARYCVDYKMTTLQMGYVSADKDGTVKEDVAPSKRON
Rf-EndB      -----DSDPPADCVQVLSKQAARYNVNYKLTTLQLAGYVSADKNGPVS EAKAPSD RWN
          *          *  **  ***  *  *  *  ***  *

          195196          220 222
Fp-Cel144C  QVYNAKNTFFQLQPDLDNDNFVYVDE FVHFLVNKYGTASTKAGVKGYALDNEPALWSTHHP
F1-Cel1A     KVEFAKNAPFSLQPHLNDGQVYVDE EVNFLVNRYGNASTSTGIRKAYS LDNEPALWSETHP
Ft-Cel1J     EVKFERKAPFSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Co-PKD       EVKFERKAPFSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Ca-EndB      KVEFNRKCDLSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Cc-CelE      EVKFERKCDLSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Cs-ManA      EVKFERKCDLSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Rf-CelB      EVKFERKCDLSLTPDTEDDYVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
Rf-EndB      KVVLTKNAPFADTPDLTDGVVYVDE FVNYLVNRYGNASTPTGIRKAYS LDNEPALWSTHHP
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

          242          258 262
Fp-Cel144C  RINGEKUGAKELVDREVSLSKAVKADAGARIIFGPVLYGFGAYKDLQIAP---DWD SVKG
F1-Cel1A     RIHP EQLQAALVAKSIDLSKAVKAVD PHARIIFGPALYGFAYLSLQDAP---GWP SLQG
Ft-Cel1J     RIHPDNUAKELIEKSVLSKAVKAVD PYARIIFGPALYGFAYLQDAP---DWC TECE
Co-PKD       RIHPDNUAKELIEKSVLSKAVKAVD PYARIIFGPALYGFAYLQDAP---DWC TECE
Ca-EndB      LIHPDKTKCEVLDKDTQLAQVVKRIDPAARTFCPALFCFSAFNDPNS SD---DWS SVKG
Cc-CelE      RIHPORUTCELEINKSVLAKVIKTLDPDARIIFGPASYGFGVGLTLQDAP---DWNQVKG
Cs-ManA      RIHPNKTCKELIEKSVLAKVIKTLDPSEVVFCTASYGFGVGLTLQDAP---DWNQVKG
Rf-CelB      RVHPPEPUTIEELGNKSVLAKAVKRLDPKARIIFGPALYGYTAFDHLDDDEQHTESGDVKS
Rf-EndB      RMHPDPVTIEELGSKSVEMAKAVKRLDPKAREVFGPALYGYTAFDHLDDDAHTEWEEIKK
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

          314 317 323
Fp-Cel144C  --NYSWFVDYTLQDMRLSSQABGKRLLDVFVHVWYPEAMGGGI-RIIN--EUGND ETKKA
F1-Cel1A     --NYSWFIDYTLQDMKNAHTQNGKRLLDVLVHVWYPEAQGGGQ-RIVFG-GAGNIDTQKA
Ft-Cel1J     --CYRWFDYTLQDMKASDEEGKRLLDVLVHVWYPEARGGGERICFGA-DPRNIE TNKA
Co-PKD       --CYRWFDYTLQDMKASDEEGKRLLDVLVHVWYPEARGGGERICFGA-DPRNIE TNKA
Ca-EndB      --NYQWFIDYTLQDMKRENSDAACKRLLDALDLHVWYPEARCCCG-DWTTT-DTSNVD CNKA
Cc-CelE      --MHRWFLSWYLFQMKKASDSECKRLLDVLVHVWYPEARQVCCVRCFCGENDTSDVAIA
Cs-ManA      --EHRWFISWYLFQMKKASDSECKRLLDVLVHVWYPEARCGMIRVCFDGENDTSKVWIA
Rf-CelB      KNNYHWYLDCTYLDQMKKASDEEGTRLLDVLVHVWYPEARCGMIRVCFDGENDTSKVWIA
Rf-EndB      ANNYHWYLDCTYLDQMKKASDEEGTRLLDVLVHVWYPEARCGMIRVCFDGENDTSKVWIA
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

서열목록

서열목록 전자파일 첨부

