한국농화학회지 제 41 권 제 2 호(1998)
Agricultural Chemistry and Biotechnology
Vol. 41, No. 2, pp. 125~129(1998)

토양에서 분리된 *Xanthomonas* sp.의 Chitinase 유전자 cloning과 *E.coli*에서의 발현

황철원[1]* · 김호상 · 성기영[2] · 은무영[3]

[1]한동대학교 환경미생물학교실, [2]전남대학교 응용식물학부, [3]농업과학기술원 세포유전과

초 록 : 한국 토양에서 분리된 *Xanthomonas* sp.는 *Candida albicans*에 대한 용균성을 나타내며 분비효소로서 chitinase를 분비하는 것으로 사료되었다. 특히 chitinase 활성은 chitin배지에서 배양했을 때 3일 배양에서 최대치를 나타내었다. 이러한 특성이 있는 *Xanthomonas*의 chitinase 유전자를 cloning하기 위하여 cosmid vector를 이용한 genomic library를 작성하였으며, 다른 박테리아 chitinase 유전자와 homology를 가진 지역의 DNA sequence를 oligonucleotide로 합성하여 probe로 사용한 결과 4개의 독립된 positive clone을 cloning 하였다. 이중 pXCH1(1.2 kb insert) 이라고 명명한 clone에 대해 해석한 결과 이 크론의 전사산물은 chitin 배지에서만 유도됨을 확인하였으며 대장균 발현 vector를 이용한 이 유전자의 대장균에서의 발현에 대한 실험의 결과 약 35 kDa의 단백질을 생산하는 것으로 확인하였다. 또한 이 산물의 chitinase 활성을 측정한 결과 유전자가 포함되지 않은 산물에 비해 약 10배의 활성을 나타내어 이 유전자를 *Xanthomonas* sp.의 chitinase 유전자임을 증명하였다.(1997년 12월 30일 접수, 1998년 2월 9일 수리)

서 론

Xanthomonas sp.는 gram(-) 박테리아로써 균체외로 많은 가수분해 효소를 분비하여 난용성 유기 화합물을 탄소원으로 사용하며 생육하는 토양 미생물이다. chitin(poly-β-1, 4-N-acetyglucosamine)은 곰팡이, 무척추동물 등의 세포벽을 구성하고 있는 주요 물질로서 자연계에 널리 분포되어 있다.[1] 이러한 chitin을 가수분해 하는 효소(chitinase, EC 3, 2, 1, 14)는 고등 식물과 박테리아를 포함한 많은 생물에서 발견되고 있다.[2-4] Chitinase는 chitin을 분해하는 주요 효소로서, 식물에 있어서는 식물 병원균 침입에 대한 방어 수단으로서도 중요한 역할을 한다.[3,4] 박테리아의 chitinase는 *Serratia*,[5-6] *Vibrio*,[7] *Streptomyces*,[8-11] 그리고 *Bacillus*[12] 등에서 그 유전자가 cloning 되었으며 이러한 유전자의 발현은 chitin에 의해 유도됨이 알려졌다. 또한 이러한 박테리아의 chitinase 유전자는 서로 그다지 상동성을 나타내지 않으며 multi-gene family[12]를 형성하고 있는 것으로 알려져 있다. 본 실험은 이러한 chitinase의 성질을 이용하여 식물의 진균병에 대한 방어 기작에의 응용과 *Xanthomonas* sp.에 있어서 chitinase 유전자 발현의 기구를 밝히기 위해 토양으로부터 분리된 *Xanthomonas* sp.의 chitinase 유전자의 cloning을 시도하였다.

재료 및 방법

균주, plasmid 및 배지

균주 : *Xanthomonas* sp.(Km^R, Sm^R), *E. coli* HB101, *E. coli* TG1. *Candida albicans*.

Plasmid : Cosmid pKS13, (Kindly supplied by prof. Takagi, M., The Univ. of Tokoy) pUC119, pAQI[17].

배지 : L-broth, M9 media+0.2% Colloidal Chitin, YM media.

시약및 효소

본 실험에서 사용된 시약과 효소는 New England Biolabs 사와 Boehringer Mannheim Bio-Chemica사의 제품을 구입하였으며 colloidal chitin은 Lingappa[13]의 방법에 따라 제조하였다.

항 Candida 활성의 측정

*C. albicans*가 포함된 top agar(4% carrot juice, 0.5% agar)를 plate에 부은 후 *Xanthomonas* sp.를 plate위에 spotting하여 주위의 저지대를 관찰함으로써 항 Candida활성을 측정하였다.

효소 및 단백질 측정

Chitinase 효소의 측정은 colloidal chitin과 효소 용액을 혼합, 37℃에서 2시간 보온한 후 가용성이 된 당은 DMAB 시약을 이용하여 정량적으로 측정하였다.[14] 단백질의 정량은 BSA를 standard로서, Biocinchoninc acid protein assay 시약(Pierce Chemical Co.)을 사용하였다.[14]

단백질 전기영동

단백질의 SDS-PAGE는 Laemmli[15] 방법에 의해 하였으며

찾는말 : *Xanthomonas* sp., Chitinase.
*연락저자

영동후 Coomassie Brilliant Blue R250으로 염색하였다.

Plate 에서의 효소 측정

Colloidal chitin을 포함한 NBY 배지에(1% Peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.2% colloidal chitin, 1.5% Agar) *Xanthomonas* sp.와 기타 대조균주들을 streaking하여 30°C에서 24시간 배양 후 colloidal chitin이 분해된 clear zone을 측정함으로서 확인하였다.

***Xanthomonas* sp.의 genomic library 작성**

Xanthomonas sp.의 total DNA는 Little[16]의 방법에 의해 분리하였다. 분리된 total DNA를 *Sau*3A1 제한 효소로 부분 절단한 후 15~30 kb 크기의 단편을 sucrose density gradient 원심분리에 의해 분리한 후 cosmid vector pKS13의 *Bam*H1 절단 부위에 삽입시켜 *in vitro*에서 λ phage에 package한 후 *E. coli* HB101에 감염시켜 library를 작성하였다.

합성 oligonucleotide probe의 작성과 hybridization의 조건

Oligonucleotide probes(Fig. 2)를 DNA 합성기(Applied biosystem 381 DNA synthesizer)에서 합성하였다. 합성된 oligonucleotide를 [r-^{32}P]로 표식한 후 probe로 사용하였다.

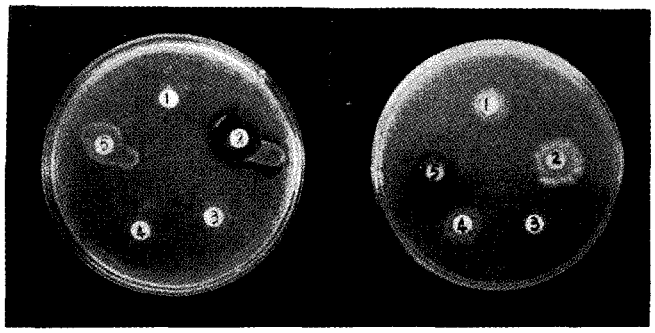
Hybridization 조건은 6×SSC, 5×Denhardt, 0.1% SDS 그리고 0.1 mg/ml의 변성 ssDNA를 사용하여 45°C에서 overnight로 incubation 시켜 같은조건의 온도로 30분간 washing 하였다.

결 과

토양에서 *Xanthomonas* sp.의 특성

분리된 *Xanthomonas* sp.의 약제내성 시험 결과 kanamycin과 streptomycin 내성을 나타내었으며 Fig. 1 B의 No. 2에서 보듯이 *Xanthomonas* sp.는 chitinase를 분비함이 확인되었다. *Xanthomonas* sp.는 chitinase활성을 나타낼 뿐만 아니라 *C. albicans*에 대한 lytic활성 또한 보유함을 나타내었다(Fig. 1 A의 No. 3).

반면 대조균주인 *S. marcescens*는 B의 No. 5에서 보듯이 chitinase 분비능은 인정되나 *C. albicans*에 대한 lytic활성은 나타나지 않음을 알 수 있다(Fig. 1 A의 No. 5). 이 결과는 진균류의 세포벽 lytic활성이 chitinase뿐만 아니라 또 다른 lytic system이 관여함을 시사하며(예, glucanase system 등) 본 실험에서 사용된 균주의 진균 방제 유용성을 시사한다.



(A) (B)

Fig. 1. Lytic and chitin-hydrolyzing activity of *Xanthomonas* sp. Lytic activity against *Candida albicans* (A) and Chitin-hydrolyzing activity (B) of *Xanthomonas* sp. was examined on a 1.5% agar plate contaning *Candida* (A) and 0.2% Chitin (B). The plate was incubated at 37°C for 24 h. 1: *Pseudomonas putida*, 2: *Xanthomonas* sp., 3: *Ehrlichia coil*, 4: *Pseudomonas putida*, 5: *Serratia marcescens*.

Oligonucleotide probe를 이용한 chitinase 유전자의 cloning

Colloidal chitin 배지에서 직접 chitinase 유전자를 cloning하기 위해 *Xanthomonas* sp.의 genomic library를 포함한 *E. coli*를 0.2% colloidal chitin M9 배지에 replica를 하였으나 배지에서 colloidal chitin을 분해하는 chitinase활성을 가진 유전자의 직접 screening 에는 실패하였다. 이는 *Xanthomonas*의 유전자가 *E. coli*에서 발현이 되지 않던지 혹은 되더라도 세포 밖으로 분비되지 못함에 기인하는 것으로 생각된다.

이러한 결과에 의해 chitinase 유전자를 배지에서 직접적으로 cloning하는 것은 불가능한 것으로 생각되어 본 유전자 cloning에는 다른 방법이 필요하게 되었다.

따라서 기존의 박테리아에서 밝혀진 chitinase 유전자의 상동성이 있는 촉매부위(Fig. 2)를 참조하여 oligonucleotide DNA를 합성한 후 [r-^{32}P]로 표식한 probe를 이 용하여 *E. coli* genomic library와 colony hybridization을 한 결과, 약 200개의 positive colony 를 선발 하였다. Positive colony로부터 plasmid를 회수하여 Southern hybridization 한 결과를 Fig. 3. A에서 타내었다. Fig. 3. A의 결과 각각 다른 clone을 선발하여 pUC119에 subclone하였다(Fig. 3. B). 그 중 약 1.2 kb의 단편이 삽입된 pXCH1 clone을 선택하여 아래의 실험을 진행시켰다.

pXCH1 clone의 Northern 분석

박테리아 chitinase 유전자의 전사산물은 유도 물질인

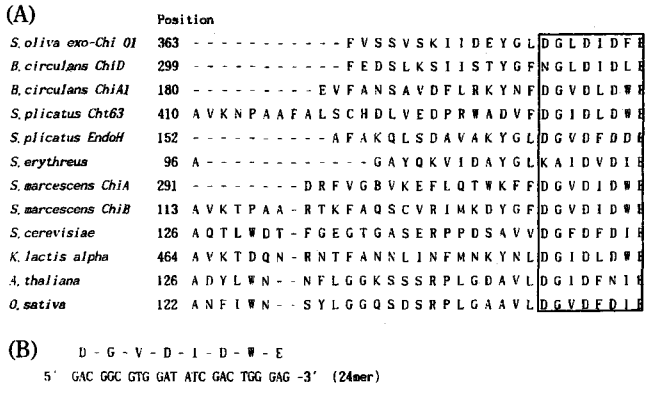


Fig. 2. (A): Alignment of catalytic regions from various chitinases and (B): Oligonucleotide probe used in this study. Oligonucleotide probe was synthesized to match the sequence of ***S. marcescens chitinases.*** The box indicated catalytic regions for synthesizing probe in this study.

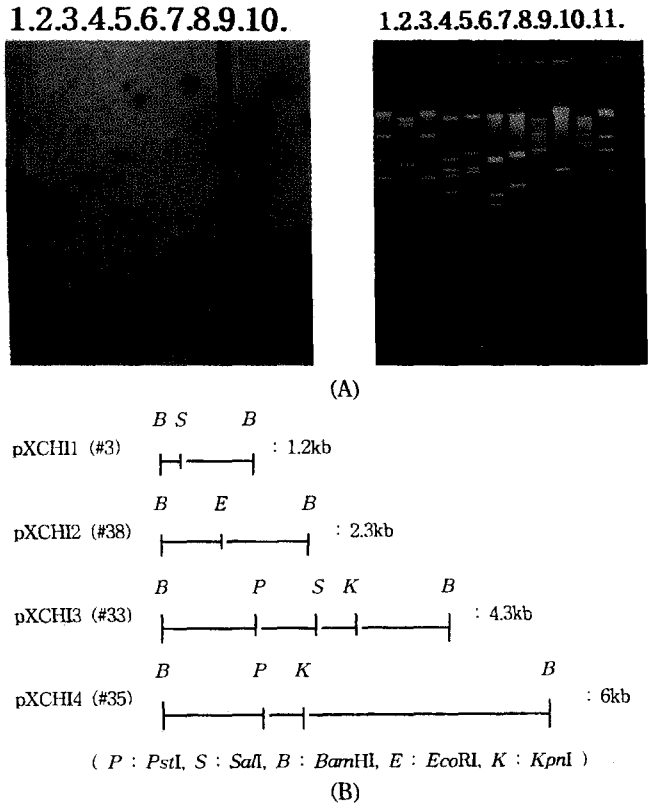


Fig. 3. Southern hybridization of isolated clones from genomic library and its restriction enzyme maps.
A: Isolated clones were digested with *Bam*HI and electrophoresed on a 0.5% agarose gel. Lane 1-10: Isolated clones, 11: λ DNA-*Hind*III as a size marker (right). Autoradiogram of Southern hybridization of the same gel with labelled oligonucleotide as a probe (left). B. Restriction enzyme maps of isolated clones

chitin에 의해 유도됨이 알려져 있다.[12] Cloning한 1.2 kb 단편의 전사산물이 chitin에 의해 유도되는지를 확인하기 위해 1.2 kb 단편을 probe로 Northern 분석을 한 결과, Fig. 4에서 보듯이 이 단편의 전사산물은 chitin에서만 유도됨을 알 수 있고, 그 크기는 약 1 kb와 0.8 kb의 크기였으며 이중 1 kb의 전사산물이 cloning한 1.2 kb의 단편의 크기와 대장균에서 발현된 단백질산물의 크기로보아 chitinase 유전자의 전사산물로 추정되어진다.

대장균 expression vector를 이용한 chitinase 유전자의 발현과 발현산물의 chitinase 활성 측정

본 실험에서 chitinase 유전자를 cloning하기 위해 *E. coli* genomic library로 부터 직접적인 cloning은 실패하였다. 이는 앞에서도 언급하였듯이 *Xanthomonas* sp.의 유전자들이 *E. coli*내에서 기능을 하지 않은 것인지 아니면 단백질은 합성되나 세포 밖으로 분비능이 없든지의 가능성이 있다. 따라서 cloning된 1.2 kb의 단편이 chitinase 활성을 갖고 있는지를 확인하기 위해 *E. coli* 발현 vector(pAQI)의 pUC119 유래의 multi-cloning site의 *Eco*RI-*Hind*III부분에 cloning된 1.2 kb의 단편을 삽입하여 *E. coli*에서의 발현을 시도했다.

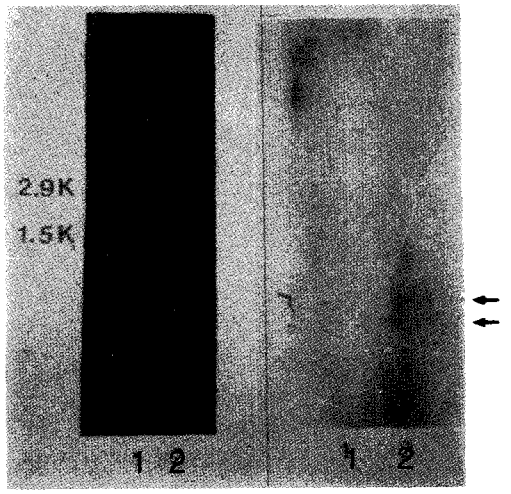


Fig. 4. Total RNA of *Xanthomonas* sp. cells which were grown on various carbon sources was analyzed by Northernblot using the 1.2 kb fragment of pXCH1 as a probe.
Total RNA (5 μg) was electrophoresed. Lane 1: Total RNA from glucose-grown cells, lane 2: Total RNA from chitin-grown cells. The arrows indicate the size of transcripts which bind to the 1.2 kb probe fragment (about 1000 nt and 800 nt).

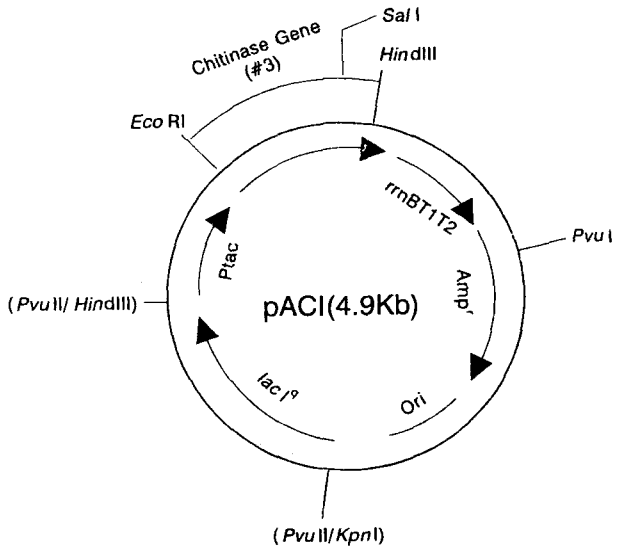


Fig. 5. Expression vector (pAC1) for 1.2 kb fragment of pXCH1.
Expression vector (pAC1) was constructed from plasmid pAQ1(26). The Aqualysinl gene (protease) in pAQ1 was eliminated by cutting with *Eco*R1 and *Hind*III and replaced with the 1.2 kb fragment of pXCH1. The expression of the cloned gene in the vector can be induced by IPTG.

이 vector에 clone된 단편을 삽입한 plasmid를 Fig. 5에 나타내었다.

이 발현 vector는 pUC119 plasmid를 기본으로 tac promoter와 ribosomal DNA terminator를 갖고 있는 것으로 IPTG에 의해 유전자 발현의 유도를 야기시키는 구조를 가지고 있다.[17] 이렇게 구축된 plasmid를 *E. coli*에 보유시켜 IPTG에 의해 유도시킨 결과를 Fig. 6에 나타냈다. chitinase는 *E. coli* 세포 밖으로 분비되지는 않으나 IPTG에 의해 유도시킨

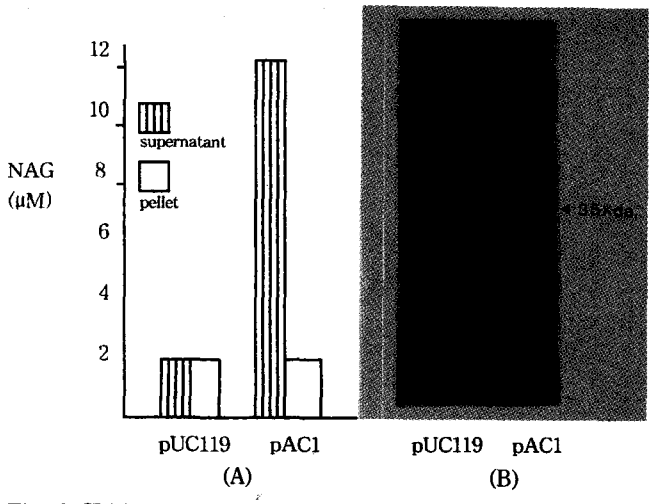


Fig. 6. Chitinase activity (A) and SDS-PAGE analysis (B) of *E. coli* cell harboring pAC1 (containing 1.2 kb chitinase gene). *E. coli* harboring plasmids was induced by 2 mM IPTG, then, disrupted and chitinase activity was measured using DMAB reagent (A), (See Materials and Methods). The supernatant of disrupted cell harboring plasmid was analyzed by SDS-PAGE (B). The arrow indicates induced protein of the cloned gene.

E. coli cell을 파쇄하여 원심분리 후 상층액에 대한 chitinase 활성 측정의 결과 대조균의 약 10배의 활성이 나타났으며 SDS-PAGE에 의한 chitinase 유전자 산물의 크기는 약 35 kDa으로 추정되며 이 크기는 유전자의 전사산물과 일치하는 것으로 판단된다.

고 찰

많은 박테리아 chitinase 유전자들은 multigene-family[12]를 형성하고 있으며 몇 종의 박테리아 chitinase의 생산은 생육단계 별로 차이가 있음을 알 수 있다. 본 논문에서는 몇 개의 *Xanthomonas* sp.의 chitinase 유전자로 추정되는 clone들을 대장균에 cloning 하였으며, 이들은 제한효소의 절단 결과 각각 별개의 clone들로 밝혀졌다.

Northern 분석 결과 두개의 전사산물이 (0.8 kb와 1 kb) 확인되었으나 1.2 kb 단편의크기에 비추어 본 clone의 chitinase의 유전자 전사산물은 1 kb로 추정된다. 따라서 0.8 kb의 전사산물은 1 kb의 분해산물이나 혹은 1.2 kb 단편과 상동성을 가진 것으로 생 각된다. 이러한 결론은 이 유전자의 염기배열 결정과 더불어 밝혀질 것이다. 처음 우리 들은 chitin을 포함한 plate 위에서 대장균 genomic library로 부터 chitinase positive clone을 분리하려고 하였으나 불행하게도 실패하였다. 이는 아마도 chitinase 효소가 균체 밖으로 분비되는 산물이기에 대장균과 *Xanthomonas* sp.와의 분비 system의 차 에 기인하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 농업과학기술원의 지원에 의해 수행된결과입니다.

참고문헌

1. Boller, T. (1985) Induction of hydrolases as possible defense reaction against pathogens, p. 247-262. *In* J. L. key and T. Kosuge (ed.), Cellular and Molecular Biology of plant stress, Alan R. Liss. Inc., New York.
2. Monreal, J. and E. T. Reese, (1969) The chitinase of Serratia marcescens. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689-696.
3. Abeles, F. B., R. P. Bosshart, L. E. Funce and W. H. Habig, (1970) Preparation and purification of glucanase and chitinase from bean leaves. *Pl. physiol.*, **47**, 129-134.
4. Boller, T., A. Gehri, F. Mauch and U. Vo"geli, (1983) Chitinase in bean leaves: Induction by ethylen, purification, properties and possible function. *Planta,* **157**, 22-31.
5. Fuchs, R. L., S. A. McPherson and D. J. Drahos, (1986) Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **51**, 504-509.
6. Jones, D. G., K. L. Grady, T. V. Suslow and J. R. Bedbrook, (1986) Isolating and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens. EMBO,* **5**, 467-473.
7. Wortman, A. T., C. C. Somerville and R. R. Colwell, (1986) Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and application of a chitinase probe. *Appl. and Environ. Microbiol.* **52**, 142-145.
8. Beyer, M. and H. Diekmann, (1985) The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC 11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 140-146.
9. Hara, S., Y. Yamamura, Y. Fujii, T. Mega and T. Ikenaka, (1989) Purification and characterization of chitinase produced by Streptomyces erythraevs. *J. Biochem,* **105**, 484-489.
10. Kamei, K., Y. Yamamura, S. Hara and T. Ikenaka, (1989) Amino acid sequence of chitinase from *Streptomyces erythraevs. J. Biochem,* **105**, 979-985.
11. Robbins, P. W., C. Albright and B. Benfield, (1988), Cloning and expression of a Streptomyces plicatus chitinase (chitinase-63) in Escherichia coli. *J. Biol. Chem,* **263**, 443-447.
12. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki and H. Tanaka, (1990) Chitinase system of *Bacillus circulans* W2-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**, 4017-4022.
13. Lingappa, Y. and J. L. Lockwood, (1962) Chitim media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathol.* **52**, 317-323.
14. Yanai, K., N. Takaya, N. Kojima, H. Horiuai, A. Ohta and M. Takagi, (1992) Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes, *J. Bacteriol.* **174**, 7398-7406.
15. Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**, 681-685.
16. Little, P. F. R., (1987) DNA Cloning: A practical approach. IRL, press **3**, 19-42.
17. Terada, I., S. T. Kwon, Y. Miyata, H. Matsuzawa and T.

Ohta, (1990) Unique precursor of an extracellular protease, Aqualysin I, with NH_2- and COOH- terminal prosequences and its processing in *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* **265**, 576-6581.

Cloning of a Chitinase Gene of *Xanthomonas* sp. Isolated from Soil and its Expression in *E. coli.*

Hwang Cher Won[1]*, Kim Ho Sang, Seong Ki Young[2], Eun Moo Young[3]([1]*Dept. of Environmental Microbiology, Handong University, Pohang, Kyeoung buk Korea,* [2]*College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju and* [3]*Cytogenetic Division, National Agricultural Science and Technology Institute, RDA, Suwon*)

Abstract : *Xanthomonas* sp. isolated from soil exhibited cell wall lytic activity of *Candida albicans* and secreted chitinase in chitin media. Especially, the chitinase activity was induced by chitin and reached a maximum level at 3 days culture in chitin media. We constructed genomic library of *Xanthomonas* sp. using cosmid vector in *E. coli.* Oligonucleotide probe was synthesized from the consensus sequence corresponding to chitinase active site, which was derived from the comparison of amino acid sequences of bacterial chitinase genes. Using this oligonucleotide probe, we screened the genomic library. By restriction enzyme mapping of the positive clones, we identified 4 independent clones which may contain the chitinase gene. One of the clones, named pXCH1 (1.2 kb insert), was further analyzed. Northern blot analysis indicated that its transcripts, 1 kb and 0.8 kb, were induced by chitin. When the cloned gene was induced by IPTG in *E.coli* cell, chitinase activity which was secreted onto culture media was not observed. However, when the cell was disrupted by using sonicator and then centrifuged, the supernatant exhibited chitinase activity. SDS-PAGE of the supernatant indicated that about 35 kDa protein was induced by IPTG. From these results, it was concluded that the cloned DNA was one of the chitinase genes of *Xanthomonas* sp.

Key words : *Xanthomonas* sp. Chitinase

*Corresponding author