

멧누에(*Bombyx mandarina*)로부터 Chitinase를 코딩하는 cDNA의 분리 및 염기서열 결정

구태원[†] · 황재삼 · 성규병 · 윤은영 · 방혜선 · 권오유*

농촌진흥청 농업과학기술원

*충남대학교 의과대학

Molecular Cloning and Characterization of the Gene Encoding Chitinase from *Bombyx mandarina*

Tae-Won Goo[†], Jae-Sam Hwang, Gyoo-Byung Sung, Eun-Young Yun,
Hea-Sun Bang and O-Yu Kwon*

National Institute of Agriculture Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea.

*Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-131, Korea

Abstract

Insects use chitinolytic enzyme to digest chitin in the exoskeleton during the molting process. We have isolated and sequenced a chitinase-encoding cDNA from the silkworm, *Bombyx mandarina*, compared its sequenced with genes encoding chitinolytic enzymes from other sources. The insert DNA in the clone is 2,625 nucleotides long with an open reading frame of 1,695 nucleotides that encodes a protein of 565 amino acids with a molecular weight of 63.4 kDa. The 3' -untranslated region of 889 nucleotides is AT-rich and contains two putative polyadenylation signals. The N-terminal sequence of the encoded protein contains numerous hydrophobic residues characteristic of a leader peptide. The amino acid alignment revealed that the endo- β -N-acetylglucosaminidase had 83% and 97% homology with *M. sexta* and *B. mori*, respectively. The deduced amino acid had two highly conserved region at the amino acid residues 97-111 and 139-148 that were related to the existing chitinase.

Key words – Chitinase, Endo- β -N-acetylglucosaminidases, *Bombyx mandarina*, cDNA, Gene

서 론

Chitin은 (1-4)glycosidic 결합에 의해 연결된 N-acetylglucosamine의 중합체로써 주로 미세섬유로 존재하며[14], 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 풍부하게 존재하고 있다.

특히 chitin은 곰팡이와 효모[11] 그리고 절지동물 각피의 주요한 구성성분으로써 존재하며, 최근엔 척추동물에서도 chitin의 존재가 확인되었다[18].

곤충에서 chitin의 존재는 각피, 위식막(peritrophic membrane), 전장(foregut)과 후장(hindgut)의 linings, 기관

[†] Corresponding author

(tracheal tubes)등에서 발견되고 있다. 특히 곤충의 각피는 곤충이 성장하는데 물리적 제한을 줌으로써 곤충은 탈피과정(molting process)이라는 단계를 거쳐 기존의 각피를 벗고 다음 세대의 체적을 수용할 수 있는 새로운 각피를 만들어 내는 것이 필요하다. 이 탈피과정에서 표피세포로부터 탈피용액이 생성되는데 이 용액에 chitinolytic 효소가 존재하며, 이것에 의해서 chitin이 분해된다. chitin이 분해되는데는 두 가지 종류의 chitinolytic 효소가 관여하는데, 하나가 endo-type의 chitinolytic 효소이고 다른 하나가 exo-type의 chitinolytic 효소이다. 먼저 endo-type의 chitinolytic 효소, chitinase(endo- β -N-acetylglucosaminidase : EC 3.2.1.14)가 chitin 중합체를 endo-splitting 방식으로 무작위하게 분해시켜 N-acetylchitooligosaccharide라는 중간 산물을 만들고 다시 이 중간산물인 N-acetylchitooligosaccharide는 exo-type의 chitinolytic 효소, β -N-acetylglucosaminidase(EC : 3.2.1.30)에 의해서 2-acetamido-2-deoxyglucopyranoside로 분해된다[9,8]. 그리고 이 마지막 생성물인 2-acetamido-2-deoxyglucopyranoside은 β -N-acetylglucosaminidase에 의해 표피세포나 중장(midgut)조직에 흡수되어 chitin synthetase에 의한 합성경로의 전구체로 사용되게 된다[1,6].

본 연구에서는 뱀눈에(*Bombyx mandarina*)에서 처음으로 chitinase를 코딩하는 cDNA를 분리하여 그 염기서열을 밝혔고, 아미노산 서열을 연역하여 기존에 밝혀진 chitinolytic 효소의 아미노산과 비교분석하여 뱀눈에 chitinase 유전자의 구조를 결정하였다.

재료 및 방법

Total RNA 및 messenger RNA 분리

본 연구에 사용된 공시곤충은 농업과학기술원 잠사곤충부 팽발에서 야생하고 있는 뱀눈에(*Bombyx mandarina*)를 채집하여 사용하였다. 채집한 뱀눈에를 해부하여 표피와 장조직을 꺼내어 이로부터 RNAGents Total RNA Isolation System(Promega)을 이용하여 Poly(A)⁺ RNA 분리 및 RT-PCR에 이용할 total RNA를 추출하였다. Poly(A)⁺ RNA의 정제는 Poly(A) Quik mRNA Purification Kit(Stratagene)를 이용하여 정제하였다. 그리고 이 정제한 Poly(A)⁺ RNA는 cDNA 유전자은행을 제작하는데 사용하

였다.

RT-PCR 및 클로닝

뱀눈으로부터 추출·정제한 total RNA와 Poly(A)⁺ RNA를 주형으로 하여 Pharmacia사(U.S.A)의 Access RT-PCR Kit을 이용하여 First-strand cDNA를 합성하였다. Chitinase를 코딩하는 유전자의 탐침 제작을 위한 primer는 기존에 보고된 곤충 chitinase 유전자의 염기서열 중에서 공통염기서열을 참조하여 제작하였다[10].

즉, sense primer로는 5'-AGACAAGAAAGAGTGTA-GCCAAGTAT-3'(25mer)와 antisense primer로는 5'-TATAGCTGGTATTACTTCGGTTAT-3'(25mer)를 각각 제작하였다. Chitinase 유전자 단편을 증폭하기 위하여 1st-strand cDNA 100ng과 제작한 primer, Taq DNA polymerase(Bioneer)를 이용하여 94℃에서 2분간 변성시킨 다음, 94℃ 30초, 55℃ 1분, 68℃ 2분으로 40 cycle 합성시킨 후, 68℃에서 7분간 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 아가로스겔에 전기영동하여 증폭된 단편의 크기를 확인한 후, pGEM-T 벡터(Promega)에 클로닝하여 chitinase 유전자의 탐침으로 사용하였다.

cDNA 유전자은행 제작 및 Screening

뱀눈에의 total RNA에서 순수분리된 Poly(A)⁺ RNA로부터의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene사(CA, U.S.A)의 ZAP-cDNA Synthesis Kit를 이용하여 제작하였다. 즉, Poly(A)⁺ RNA로부터 *Xho* I linker primer와 역전사효소를 이용하여 cDNA 말단을 평활말단으로 만들었다. 그리고 *Eco*R I adapter를 부착시킨 후, 제한효소인 *Xho* I으로 절단하고 size fractionation을 거쳐 적당한 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni ZAP XR 벡터에 결합시켜 삽입한 후 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 패키징을 하여 cDNA 유전자 은행을 제작하고 기주세포(XL1-Blue MRF' strain)내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 시험에 사용하였다.

PCR로 증폭시킨 chitinase 유전자 단편은 Prime-It II Random Primer Labelling Kit(Stratagene)를 이용하여 [α -³²P]dATP로 표지한 후 cDNA 유전자은행 탐색의 탐침으로 사용하였다. cDNA 유전자은행의 탐색은 Sambbook 등

[16]의 방법에 따라 3차에 걸쳐 수행하였다. 선발한 파아지는 파이 지미드로 *in vivo* excision 시키고 *Xho* I 과 *Eco*R I 으로 절단한 후 전기영동하여 삽입된 DNA의 크기를 확인하였다.

DNA 염기서열 결정

DNA 염기서열은 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 제작회사의 방법에 따라 수행하였다. 각 염기의 표지는 Dye Deoxy Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems Inc., U.S.A)를 이용하여 반응액을 조제하고 PCR을 수행한 후, 반응산물을 정제하여 4.5% 아크릴아마이드겔에 전개하였다. 아크릴아마이드겔의 예비통전은 30와트로 30초~1분간 하였으며, 시료 주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 μ l와 50mM EDTA 1 μ l를 넣어 100 $^{\circ}$ C에 2분간 처리하고 급냉한 후 각 well에 6 μ l씩 주입하였으며, 염기서열은 DNA Sequencing Analysis Software(Perkin Elmer Co.)에 의해서 분석하였다.

결과 및 고찰

RT-PCR에 의한 유전자 단편 클로닝

멧누에의 chitinase 유전자의 탐침을 제작하기 위하여 멧누에의 장과 표피로부터 추출·정제한 total RNA와 Poly(A)⁺ RNA를 주형으로 하여 Pharmacia사(U.S.A)의 Access RT-PCR Kit을 이용하여 First-strand cDNA를 합성하였다. 그리고 primer는 기존에 보고된 곤충 chitinase 유전자의 염기서열 중에서 공통염기서열을 참조하여, sense primer(5' -AGACAAGAAAGAGTGTAGCCAAGTAT-3')와 antisense primer(5' -TATAGCTGGT ATTTACTTCG-GTTAT-3')를 제작하여, PCR를 수행하여 약 700 bp의 증폭된 단편을 확인한 후 pGEM-T 벡터(Promega)에 클로닝하였다(Fig. 1). 그리고 염기서열을 분석하여 NCBI blast program을 통해 상동성을 확인한 결과, *M. sexta*[10]와 *B. mori*의 chitinase 유전자[5]와 90% 이상의 상동성이 확인되어 이를 탐침(probe)으로 사용하였다.

cDNA 유전자은행 Screening 및 cDNA 클로닝

멧누에의 total RNA에서 순수분리된 Poly(A)⁺ RNA로부터의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene사(CA.

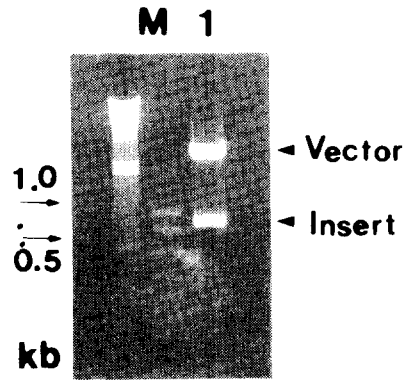


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product (chitinase cDNA) insert in the recombinant plasmid(pGEM-T Vector).

M : Lambda DNA/HindIII and PCR markers. Lane 1 : Recombinant pGEM-T plasmid digested with *Aph* I / *Sac* I.

U.S.A)의 ZAP-cDNA Synthesis Kit를 이용하여 제작하였다. cDNA 유전자은행은 1.2×10^6 pfu/ μ l을 형성하였으며, λ bacteriophage의 X-gal과 IPTG의 이용능력을 기초로 blue/white 검정결과, 90% 이상이 insert DNA를 갖는 bacteriophage 임을 확인하였다(data는 제시하지 않음).

제조된 pGEM-T 플라스미드를 제한효소 *Apa* I 과 *Sac* I 으로 처리한 후 분리된 chitinase 단편을 [α -³²P] dATP로 표지하여 이를 탐침(probe)로 사용하였다. cDNA 유전자은행으로부터 약 50만개의 plaque를 screening한 결과, 1개의 positive bacteriophage plaque를 얻을 수 있었다. 이 positive plaque를 ExAssist/SOLR system을 이용한 *in vivo* excision을 통해 플라스미드 상태의 클론으로 클로닝하였으며, ampicillin(50 μ g/ml)을 함유한 액체 LB배지에서 12시간 동안 진탕배양한 후, 이들 배양체로부터 플라스미드만을 순수분리하였다. 제한효소인 *Eco*R I 과 *Xho* I 으로 절단한 후 1.0% 아가로스겔 상에서 insert DNA를 확인한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 약 2,600 bp 크기의 cDNA를 확인하였다.

Chitinase를 코딩하는 cDNA 염기서열 분석

3차 screening에서 선발한 positive plaque의 파아지를 pBluescript SK(-) 플라스미드 벡터로 유전자 전환한 다음

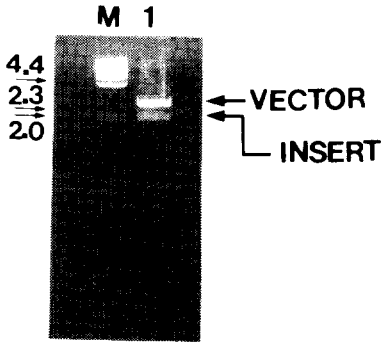


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of cloned chitinase cDNA insert in the recombinant plasmid (pBluscript SK- Vector).
M : Lambda DNA/*Hind*III markers. Lane 1 : Recombinant pBluscript SK(-) plasmid digested with *Eco*R I / *Xho* I.

염기서열을 결정 한 결과 *Eco*R I linker 부위를 포함하여, 2,625 bp의 크기를 가지고 있었다. 선발된 cDNA는 42번째 염기에서 개시되어 1,737번째 염기 위치에서 종결되는 open reading frame을 가지고 있으며, 1,876번째 염기와 2,261번째 염기 위치에 잠정전사 종결신호인 'AATAA A' 가 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이 cDNA의 염기서열에 의해 565개의 아미노산을 연역 하였으며, 추정되는 단백질의 분자량은 63.4 kDa이었다. 또한, 연역되는 아미노산은 hydrophathy 분석결과(data는 제시하지 않음), N-말단의 약 20개의 아미노산으로 구성된 signal peptide가 강하게 소수성을 나타냄을 알 수 있었으며, 21번째부터 27번째까지의 DSRARIV가 앞서 보고된 *M. sexta* 및 *B. mori* chitinase의 성숙(mature) 단백질의 N-말단의 아미노산과 동일하므로[2] 20번째와 21번째 아미노산 사이에 잠정 signal peptide cleavage site[13]가 있음을 추정할 수 있었다. 이 단백질에는 3개의 잠정 N-glycosylation 부위가 86-88(NET), 304-306(NAT), 398-400(NYT)번째의 아미노산 위치에 존재하므로 *M. sexta*의 chitinase에서 보고된 바와 같이[7] 멧누에 chitinase도 당단백질(glycoprotein)임을 추정할 수 있었으며, 곤충 chitinase에서 N-glycosylation은 단백질 분비(secretion)에 요구된다고 보고된 바 있다[2]. 또한, *B. mandarina*의 chitinase는 효모의 chitinase[11]와 비슷하게 C-말단부위에 threonine/serine

아미노산이 많이 존재함을 알 수 있었다.

CLUSTAL W program을 통해서 단백질 서열을 비교한 결과, 곤충인 *B. mori* [5]와 *M. sexta* [10]와의 상동성은 각각 97%, 83%로 상당히 높았다. 한편 식물[12]·효모[11]·세균[19,15,4]과의 chitinase의 상동성은 20% 이하로 매우 낮았지만(Table 1) 두 개의 좁은 특정부위에서는 그 상동성이 매우 높고 잘 보존되어 있었으며, 이 두 개의 부위를 region I 및 region II라고 명명하였다(Table 2). *B. mandarina*의 chitinase에서 region I의 위치는 97번째부터 111번째 위치에 존재하고, region II는 139번째부터 148번째 위치에 존재한다. 그 두 개의 부위에서는 특히 몇몇의 아미노산이 다른 잔기에 비하여 상당히 높게 보존되어 있는데, region I에서는 1개의 lysine과 2개의 glycine, region II에서는 1개의 glycine, 1개의 glutamic acid 및 2개의 aspartic acid가 그러하다(*로 표시). 특히, chitinase family에 속하는 모든 유전자는 chitinase 활성화에 관여하는 특정보존 서열인 [LIVMFY] - [DN] - G - [LIVMF] - [DN] - X - E가 존재하고 보고된 바와 같이[17], chitinase family 활성화에 관여하는 보존서열인, 'FDGLDLWE'가 region II에 존재하고 있었으며, 그리고 이 서열은 비교한 곤충·식물·효모·세균에서도 동일하게 존재하고 있었다(Table 2).

이상의 결과로서 이 유전자는 멧누에로부터 분리한 탈피에 관련된 chitinase family에 속하는 새로운 유전자임을 알 수 있었다.

Table 1. Analysis of the similarities in amino acid sequences between *B. mandarina* chitinase and enzyme from other species

Scientific Name	Aligned Score
<i>Bombyx mori</i>	97
<i>Manduca sexta</i>	83
<i>Cucumis sativus</i>	16
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
<i>Bacillus circulans</i>	7
<i>Streptomyces plicatus</i>	10
<i>Serratia marcescens</i>	17

Sequences were analyzed by CLUSTAL W program

요 약

멧누에(*Bombyx mandarina*)로부터 탈피에 관련된 chitinase

멧누에(*Bombyx mandarina*)로부터 Chitinase를 코딩하는 cDNA의 분리 및 염기서열 결정

```

1 GAATTCGGGGCCGTCGTAGCGACACCGCAACTGTTCAA■CGAGOGATATTGCGACGTTGGCTGTCTGGCGAGT
      M R A I F A T L A V L A S
81 TGCGCCGCAATTAGTTTCAGTTCGGACAGCAGAGCGCGCATCGTTTGTACTTCAGTAATTGGGCGGTGTACCGACCCGGCGT
  C A A L V Q S ↓ D S R A R I V C Y F S N W A V Y R P G V
161 CGGACGTTATGGCATCGAAGACATCCCCGGTGGATTTGTGTACCCACTTGATTTATTCCTTTATTGGCGTCACCGAGAAAT
  G R Y G I E D I P V D L C T H L I Y S F I G V T E K S
241 CAAGCGAAGTTCATTATCGATCCCTGAGCTGGACGTTGGATAAGAGTGGTTCCGTAACCTTCACTCCCTCCGCTCCAAA
  S E V L I I D P E L D V D F L K K Y D F D G L D L D W E
321 CACCCAGATGTCAAGTTCATGGTTCGGGTTGGCGGCTGGGCTGAAGCGGCTCCAAGTACTCACACATGGTGGCACAGAA
  H P D V K F M V A V G G W A E G G S K Y S H M V A Q K
401 GAGCACTAGGATGTCCTTCATCAGAAGCGTTGTGCACTTCTTGAAGAAATATGACTTCGACGGTTCGATCTGGACTGGG
  S T R M S F I R S V V D F L K K Y D F D G L D L D W E
481 AGTATCCCGGTGCCCTGAACGGGGTGGCTCCTTCTCCGATAAAGACAAATCTTGTATTTCTGCAAGAGTTAAAGAGG
  Y P G A A E R G G S F S D K D K F L Y F V Q E L K R
561 GCGTTCATCAGACCGGTAGAGGATGGGAGTGTACTGCTGCCGTACCGCTTGTAACTTCAGGCTGATGGAGGATATCA
  A F I R A G R G W E L T A A V P L A N F R L M E G Y H
641 TGTTCCAGAGCTGTGTGAGAACTGGACGCTATCCAGTGATGTCGTATGATCTGCCGGTAATTGGGCGGTTTCGCGG
  V P E L C Q E L D A I H V M S Y D L R G N W A G F A D
721 ATGTGCATTGCGCTTATACAAACGCCCTCAGCAGCAATGGGCTACGAGAACTTAACTGATGGCTTAAATTTA
  V H S P L Y K R P H E Q W A Y E K L N V N D G L N L
801 TGGGAAGAGAAGGGTTGCCCTACCAATAAAGTGGTTCGATTCGCTTCTATGGAAGTTCATTCACTTTATCAGCTGG
  W E E K G C P T N K L V V G I P F Y G R S F T L S A G
881 AAACAACAACATGGCTTGAACCTTACATCAACAAGAGGCTGGTGGTGGAGACCTGCTCCCTATACAAACGCAACTG
  N N N Y G L G T Y I N K E A G G G D P A P Y T N A T I G
961 GATTCGGGCTTACTATGAAATTTGTACAGAAGTAGATGCAGATGGATGAGTAAAGAAATGGGACGAGTTCCGG
  F W A Y E I C T E V D A D G S G W T K K W D F G
1041 AAATGCCCTACACATACAAGGAACTCAATGGTGGGCTACGAAGATCCTCGTAGTGTGGAGATTAAAGTGAAGTGGAT
  K C P Y T Y K G T Q W V G Y E D P R S V E I K M N W I
1121 CAAGGAGAAGGGCTACCTCGGGCTATGACATGGGCTATAGATATGGACGATTTAAAGGACTATGCGGCGAGGAAATC
  K E K G A L G A M T W A I D M D D F K G L C G E E N P
1201 CCTTGATCAAGCTTCTGCAAAAGCATATGAGCAATTACACAGTACCGCCTGCGGCGACTGGACAACAACCTCTACTCCG
  L I K L L Q K H M S N Y I V P P A R T G Q T T P T
1281 GAATGGGCGGCCACCTTCAACTCCATCAGACCCATCTGAGGGTGTATCGATTTCTACCAACCCACCAACCGTGA
  E W A R P P S T P S D P S E G D P I P T T T T T V K
1361 ACCGACGACAACAAGAACCCCGGAGGCCAAGTACTACCACTACGAAAGTACCCATGGCACCAGGAAGACTTTG
  P T T R T T A R P T T T T T K V P H T T E E D F D
1441 ACATTAACGTGAGCACTCAAGTCGACGAACTACCCACGGAACGAAAGTCGACAATGCGGATGTGTAACTCTGAGGAC
  I N V R P Q V D E L P T E N E V D N A D V C N S E D
1521 GACTACGTACCGACAGAAGAGTGTAGAAAGTATTGGCGATGTGTGAAGGGCGAGGGAGTTCAATTCCTCGTCAACC
  D Y V P D K K E C R K Y W R C V K G E G V F S C Q P
1601 GGGGACGATCTTGAACCTTGAACCTTAACTTTGCGATTGGCCTGAAATACAGACAGACCGGAATTATTGGCGATGTGTG
  G T I L N W K L N V C D W P E N T D R P E L L A M C E
1681 AACGGCGAGGAGTGCAGTACTCGTGTCAACCGGGACAATCTTCAACGTGAACT■CGTTTGGATTGGAATGAAAA
  R R G S A V L V S T G D N L Q R E T
1761 TACAGACAGACCGGAATGTTCCGCAAGTCTAAGAGTGTACTATTAACTAACTATTCTAGGTATAATTCCGAACTCAGA
1841 TTGGTCAAAAAATGTCGTGATCTTCTTAATTTGGCAATAAAGTTCGTAATTTAAGCAACGCATAATTAAATACCTACCGA
1921 ATGAATCCCTTCAACAAGTTTCGATCTGGATTGTAGATACAGITTCAGITTAGTATGATTTAAAAAGCCCTTTCTTACT
2001 TCACATATCGAATTGGTGAGAAAATGTAATTTCAATTTAAACACCAACGCCAATTAAGTATCATTAAATCACCTTTATTA
2081 TTTTAGTTTCCCTATTCTGACTTTTCCAATGATTTTCCAATTTTCAACCGGATTCGCCGTCATAGATAACTAGCGAACT
2161 GATTGGATTCTAAAAGTACTTTTAAATGACCGGAAACCGGATAACCGAAGTAAATACAGCTATCCTTTATTAAGAGCA
2241 AGCTGATCATAGTTTCTCAAAATAAATAAATAAGCATATAAAGTAATAGCCTTAAACGAAATTAAGTAAATAATAT
2321 CCTCGTATTTGTGTCTCACAAAACACAATACGCCAACATTTACAGTGAGTCTGTTATATAAAGGACTATTTTATATG
2401 AGATATATTTTCTTATTTACGCCCTTTTGTGGACCGGATGATCTTTAAGCAACGAAATTTTATCTGTGTTATTA
2481 AAAAAAATAGCTTTGCAAACTTCGCAACAACGTCAGCTAATTTATTTATCCTTTGTAATGGCTTTCTAATCATTGTT
2561 TTTCAAGATTGTATTAGATTAGTTTATTATCACTAACAGGGTGTGTCGAAGATTTCAAAAAA
  
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *B. mandarina* chitinase cDNA.

The black letters in the shadow box indicate initial codon and termination codon, and the white letters in the shadow box indicate three potential glycosylation sites(position 86, 304, 398). Putative signal peptide of the deduced amino acid sequence is double-underlined, and polyadenylation signals are underlined. Arrow indicates the position of NH₂-terminus of chitinase.

Table 2. Comparison of conserved region in amino acid sequence of chitinases

Source	Scientific Name	Region I	Region II (active site)
Insect	<i>Bombyx mandarina</i>	(97) KFMVAVGGWAECCGSK	(136) YDFDGLDLDWEYP
	<i>Bombyx mori</i>	(97) KFMVAVGGWAECCGSK	(136) YDFDGLDLDWEYP
	<i>Manduca sexta</i>	(97) KFMVAVGGWAECCGSK	(136) YDFDGLDLDWEYP
Plant	<i>Cucumis sativus</i>	(98) KVLISIGGGAGSYSL	(142) AVLDGVDFDIEG
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(102) KVLISLGGASGYLFL	(147) AVVDGVDFDIENN
Bacteria	<i>Bacillus circulans</i>	(258) KVLISMGGANGRIEL	(293) YGFNGLDIDLEGS
	<i>Streptomyces plicatus</i>	(127) KVLISVLGNHQGAGF	(164) YGLDGVDFDDEYA
	<i>Serratia marcescens</i>	(267) KILPSIGGWTLSDPF	(305) KFFDGVDFDWEFP
		* **	* * * * *

Numbers in parentheses list position in the amino acid sequence

단백질을 코딩하는 cDNA를 분리하고 그 염기서열의 구조를 해석한 결과, 번역시작부위는 42번 염기위치에 존재하고 이로부터 1,737번 염기의 전사 종결부위(TAA)까지 1,695 염기가 open reading frame를 형성하고 있었다. 그리고 이 open reading frame으로부터 예상되는 단백질은 566개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 추정 크기는 63.4 kDa이었다. 또한, 연역되는 아미노산은 hydropathy 분석 결과, N-말단의 약 20개의 아미노산으로 구성된 signal peptide가 강하게 소수성을 나타냄을 알 수 있었다. 이 단백질에는 3개의 예상되어지는 N-glycosylation부위가 86-88(NET), 304-306(NAT), 398-400(NYT)번체의 아미노산 위치에 존재하고 있었다. 그리고 CLUSTAL W program을 통해서 단백질 서열을 비교한 결과, 곤충인 *B. mori*와 *M. sexta*와의 상동성은 각각 98%, 83%로 상당히 높았지만, 식물·효모·세균과의 chitinase의 상동성은 20% 이하로 매우 낮았지만, 두 개의 좁은 특정부위(region I, region II)에서는 그 상동성이 매우 높게 잘 보존되어 있었다. 특히, region II에서는 chitinase 활성화에 관련된 'FDGLDLDWE'의 존재하고 있었으며, 그리고 이 서열은 비교한 곤충·식물·효모·세균에서도 동일하게 존재하고 있었다. 따라서 이 cDNA를 멧누어로부터 처음으로 분리한 chitinase family에 속하는 새로운 유전자임을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Fukamizo, T. and Kramer, K. J. 1987. Effect of 20-hydroxyecdysone on chitinase and β -N-acetylglucosaminidase during the larval-pupal transformation of *Manduca sexta*(L.). *Insect Biochem.* **17**, 547-550.
2. Gopalakrishnan, B., Muthukrishnan, S. and Kramer, K. J. 1995. Baculovirus-mediated expression of a *Manduca sexta* chitinase gene ; properties of the recombinant protein. *Insect Biochem.* **25**, 255-265.
3. Henrissat, B. 1990. Weak sequence homologies among chitinases detected by clustering analysis. *Prof. seq. data. Anal.* **3**, 523-526.
4. Jones, F. S. G., Grady, K. L., Suslow, T. VC. and Bedlbrook, J. R. 1986. Isolation and characterization of the genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* **5**, 467-473.
5. Kim, M. G., Shin, S. W., Bae, K. S. and Park, H. Y. 1998. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, *Bombyx mori* and the fall webworm, *Hyp-phantria cunea*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**(3), 163-71.
6. Koga, D., Fujimoto, H., Funakoshi, T., Utsumi, T. and Ide, A. 1989. Appearance of chitinolytic enzymes in integument of *Bombyx mori* during the larval-pupal transformation. Evidence for zymogenic forms. *Insect Biochem.* **19**, 123-305.
7. Koga, D., Jilka, J. and Kramer, K. J. 1983. Insect endochitinase : glycoproteins from molting fluid, integument and pupal hemolymph of *Manduca sexta* L. *Insect Biochem.* **13**, 295-305.
8. Kramer, K. J. and Koga, D. 1986. Insect chitin. Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.* **16**, 851-877.
9. Kramer, K. J., Dzsidik-Turner, C. and Koga, D. 1985. Chitin metabolism in insects In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*(Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L. I), Vol. 3, pp. 75-115. Pergamon Press, New York.
10. Kramer, K. J., Corpuz, L. and Choi, H. K. 1993.

- Sequence of a cDNA and Expression of gene encoding epidermal and gut chitinase of *Manduca sexta* Insect. *Biochem. Mol. Biol.* **23**(6), 691-701.
11. Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. 1991. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 19758-19767.
 12. Metraux, J. P., Burkhardt, W., Moyer, M., Dincheer, S., Middlesteadt, W., Willam, S., Payne, G., Carnes, M. and Ryals, J. 1989. Isolation of complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozyme/chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 896-900.
 13. Nielsen, H. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage site. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
 14. Ratnakaran, A. and Hackman, R. H. 1985. Synthesis and deposition of chitin in larvae of Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **2**, 251-263.
 15. Robbins, P. W., Trimble, R. B., Wirth, D. F., Herring, C., Maley, F., Maley, G. F., Das, R., Gibson, B. W., Royal, N. and Biemann, K. 1984. Primary structure of the Streptomyces enzyme Endo- β -N-acetylglucosaminidase H. *J. Bio. Chem.* **259**, 7577-7583.
 16. Sambrook, J. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual(2nd ed.). New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 17. Van Scheltinga, A. C. T., Kalk, K. H., Beintema, I. J. and Dijkstra, B. W. 1994. Crystal structures of hevamine, a plant defence protein with chitinase and lysozyme activity, and its complex with an inhibitor. *Structure* **2**, 1181-1189.
 18. Wagner, G. P. 1994. Evolution and multifunctionality of the chitin system. In Molecular Ecology and Evolution : Approaches and Applications(edited by Schierwater B., Streit B., Wagner G.P. and DeSalle R.), pp. 559-577. Birkhauser Verlag, Basel)
 19. Wanatbe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K., Ohnishi, K. and Tanaka, H. 1992. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circuland* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. *J. Bacteriol.* **174**, 408-41.