

멧누에(*Bombyx mandarina*)로부터 β -N-Acetylglucosaminidase를 코딩하는 cDNA의 분리 및 염기서열 결정

구태원 · 황재삼 · 성규병 · 윤은영 · 방혜선 · 권오유*
농촌진흥청 농업과학기술원, *충남대학교 의과대학

Molecular Cloning and Characterization of the Gene encoding β -N-acetylglucosaminidases Homologue from *Bombyx mandarina*

Tae Won Goo, Jae Sam Hwang, Gyoo Byung Jung, 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,
Taejeon 301-131, Korea

ABSTRACT

Chitinolytic enzymes such as β -N-acetylglucosaminidase are major hydrolases involved in insect molting. We have isolated, sequenced a cDNA encoding β -N-acetylglucosaminidase from the silkworm, *Bombyx mandarina*, and compared its sequence with genes encoding chitinolytic enzymes from other sources. The insert DNA in the clone is 3,284 nucleotides long with an open reading frame of 1,788 nucleotides that encodes a protein of 596 amino acids with a molecular weight of 68.2 kDa. There is a 3'-untranslated region composed with 1,479 nucleotides and are several potential polyadenylation signals. The predicted amino acid sequence apparently contains a leader peptide of 23 amino acids. A search of the amino acids sequence databases for sequences similarities to other β -N-acetylglucosaminidases or β -N-acetylhexosaminidases. The highest similarity matched with the enzyme from *B. mori*, which has a sequence identity of 95%. On the other hand, the identity between the *B. mandarina* enzyme and those from *M. sexta* and human are 70% and 24%, respectively.

Key words : β -N-acetylglucosaminidases, *Bombyx mandarina*, cDNA, Gene, Cloning, Chitin

서 론

Chitin은 (1-4)glycosidic 결합에 의해 연결된 N-acetylglucosamine의 중합체로써 주로 미세섬유로 존재하며(Ratnakaran & Hackman, 1985) 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 풍부하게 존재하고 있다. 특히 chitin은 곰팡이와 효모(Kuranda & Robbins, 1991) 그리고 절지동물 각피의 주요한 구성성분으로써 존재하며, 최근엔 척추동물에서도 chitin의 존재가 확인되었다(Wagner, 1994).

곤충에서 chitin의 존재는 표피, 위식막(peritrophic membrane), 전장(foregut)과 후장(hindgut)의 linings, 기관(tracheal tubes)등에서 발견되고 있다. 특히 곤충의 표피는 곤충이 성장하는데 물리적 제한을 줌으로써 곤충은 탈피과정(molting process)이라는 단계를

거쳐 기존의 표피를 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 분해 된다. chitin이 분해되는데는 두 가지 종류의 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 N-acetylchitooligosaccharide는 exo-type의 chitinolytic 효소, β -N-acetylglucosaminidase(EC : 3.2.1.30)에 의해서 2-acetamido-2-deoxyglucopyranoside로 분해된다(Kramer *et al.*,

1985; Kramer & Koga, 1986). 그리고 이 마지막 생성물인 2-acetamido-2-deoxyglucopyranoside는 β -N-acetylglucosaminidase에 의해 표피세포나 중장(midgut) 조직에 흡수되어 chitin synthetase에 의한 합성경로의 전구체로 사용되게 된다(Fukamizo & Kramer, 1987; Koga *et al.*, 1989). 이들 chitinolytic 효소는 곰팡이의 세포벽과 곤충의 표피 및 소화관을 분해할 수 있다. 그러므로 이들 chitinolytic 효소는 병원성 곰팡이나 해충의 조절에 중요한 재료가 될 수 있다(Kramer *et al.*, 1988; Cohen, 1993). 식물 chitinase는 병원균에 대한 방어 단백질로 연구가 많이 되어 있으며, bean chitinase를 삽입한 형질전환된 담배식물 및 Canola 식물은 곰팡이인 *Rhizoctonia solani*에 저항성을 보였다고 한다(Brogie *et al.*, 1991). 한편, 곤충(멧누에) chitinase를 분석한 결과(Goo *et al.*, 1999), 곤충(멧누에) chitinase는 식물유래의 chitinase (Metraux *et al.*, 1989)와 미생물 유래의 chitinase (Watanabe *et al.*, 1992)와는 상당히 낮은 상동성을 가지고 있었으나, 멧누에의 경우에도 chitinase 활성에 관련된 특정부위를 확인할 수 있었으므로, 작용기작이 유사한 것으로 추정할 수 있었다.

또한, Fukamizo와 Kramer(1985a,b)은 *Manduca sexta*에 chitinase와 β -N-acetylglucosaminidase를 단독 주사해서 각각의 chitin 분해활성을 합한 효과보다 chitinase와 β -N-acetylglucosaminidase를 동시에 주사했을 때 6배 이상의 chitin 분해활성을 나타내었다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 곤충고유의 chitinolytic 효소를 코딩하는 유전자를 적절한 미생물 또는 다른 계에 발현시킴으로써 생물살충제 및 살균제를 개발하기 위한 기초자료 및 유전자 확보를 위하여 멧누에(*Bombyx mandarina*)에서 처음으로 β -N-acetylglucosaminidase를 코딩하는 cDNA를 분리하여 그 염기서열을 밝혔고, 아미노산 서열을 연역하여 기존에 밝혀진 chitinolytic 효소의 아미노산과 비교분석하여 멧누에 β -N-acetylglucosaminidase 유전자 구조를 결정하였다.

재료 및 방법

1. Total RNA 및 messenger RNA 분리

본 연구에 사용된 공시곤충은 농업과학기술원 잠사곤충부 팽발에서 야생하고 있는 멧누에(*Bombyx mandarina*)를 채집하여 사용하였다. 채집한 멧누에를 해부하여 표피와 소화관을 꺼내어 이로부터 RNA

gents Total RNA Isolation System(Promega Co.)을 이용하여 Poly(A)⁺ RNA 분리 및 RT-PCR에 이용할 total RNA를 추출하였다. Poly(A)⁺ RNA의 정제는 Poly(A) Quik mRNA Purification Kit (Stratagene Co.)를 이용하여 정제하였다. 그리고 이 정제한 Poly(A)⁺ RNA는 cDNA 유전자은행을 제작하는데 사용하였다.

2. RT-PCR 및 유전자 클로닝

멧누에로부터 추출·정제한 total RNA와 poly(A)⁺ RNA를 주형으로 하여 Access RT-PCR Kit(Pharmacia Co.)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. β -N-acetylglucosaminidase를 코딩하는 유전자의 탐침 제작을 위한 primer는 기존에 보고된 곤충 β -N-acetylglucosaminidase 유전자의 염기서열 중에서 공통염기서열을 참조하여 제작하였다(Nagamatsu *et al.*, 1995; Zen *et al.*, 1996). 즉, sense primer로는 5'-GCCGAA GAGCACTCATTGTG-3'(20 mer)와 anti-sense primer로는 5'-CGGATATAAGGATTTTCATT-3'(20 mer)를 각각 제작하였다. β -N-acetylglucosaminidase 유전자 단편을 증폭하기 위하여 1st-strand cDNA 100 ng과 제작한 primer, Taq DNA polymerase (Bioneer Co.)를 이용하여 94°C에서 2분간 변성시킨 다음, 94°C 30초, 55°C 1분, 68°C 2분으로 40 cycle 합성시킨 후, 68°C에서 7분간 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 아가로스 겔에 전기영동하여 증폭된 단편의 크기를 확인한 후, pGEM-T 벡터(Promega Co.)에 클로닝하여 β -N-acetylglucosaminidase 유전자의 탐침으로 사용하였다.

3. cDNA 유전자은행 제작 및 Screening

멧누에의 total RNA에서 순수분리된 poly(A)⁺ RNA로부터의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene 사(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 결정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 시험에 사용하였다.

PCR로 증폭시킨 β -N-acetylglucosaminidase 유전자 단편은 Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene Co.)를 이용하여 [α - 32 P] dATP로 표지한 후 cDNA 유전자은행 탐색의 탐침으로 사용하였다. cDNA 유전자은행의 탐색은 Sambook 등(1989)의 방법에 따라 3차에 걸쳐 수행하였다. 선발한 파아지는 파아지미드로 *in vivo* excision 시키고 *Xho* I과 *EcoR* I으로 절단한 후 전기영동하여 삽입된 DNA의 크기를 확인하였다.

4. 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, 시료주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 μ l와 50 mM EDTA 1 μ l를 넣어 100°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

1. RT-PCR에 의한 유전자 단편 클로닝

멧누에의 β -N-acetylglucosaminidase 유전자의 탐침을 제작하기 위하여 멧누에의 장과 표피로부터 추출·정제한 total RNA와 poly(A)⁺ RNA를 주형으로 하여 Access RT-PCR Kit(Pharmacia Co.)을 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 그리고 primer는 기존에 보고된 곤충 β -N-acetylglucosaminidase 유전자의 염기서열 중에서 공통염기서열을 참조하여, sense primer(5'-GCCGAAGAGCACTCATTGTG-3')와 anti-sense primer(5'-CGGATATAAGGATTTTCATT-3')를 제작하여, PCR을 수행하여 약 700 bp의 증폭된 단편을 확인한 후 pGEM-T 벡터(Promega Co.)에 클로닝하였다(그림 1). 그리고 염기서열을 분석하여 NCBI blast program을 통해 상동성을 확인한 결과, *M. sexta* (Nagamatsu *et al.*, 1995)와 *B. mori*(Zen *et al.*, 1996)의 β -N-acetylglucosaminidase 유전자와 90% 이상의 상동성이 확인되어 이를 탐침(probe)으

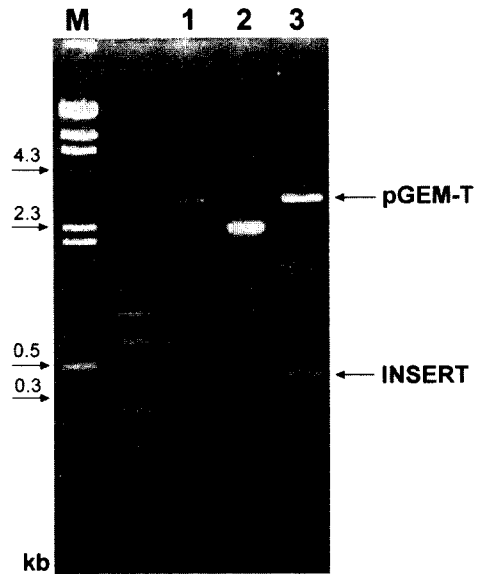


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product(β -N-acetylglucosaminidase cDNA) insert in the recombinant plasmid(pGEM-T Vector). M: Lambda DNA/Hind III and PCR markers. Lane 1; pGEM-T Vector, Lane 2; Uncutted recombinant plasmid Lane 3; Recombinant pGEM-T plasmid digested with Aph I/Sac I.

로 사용하였다.

2. cDNA 유전자은행 Screening 및 cDNA 클로닝

멧누에의 total RNA에서 순수분리된 Poly(A)⁺ RNA로부터의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene사 (CA, 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 blue/white 검정결과, 90% 이상이 insert DNA를 갖는 bacteriophage 임을 확인하였다(data는 제시하지 않음).

재조합된 pGEM-T 플라스미드를 제한효소 *Apa* I과 *Sac* I으로 처리한 후 분리된 β -N-acetylglucosaminidase 단편을 [α - 32 P] dATP로 표지하여 이를 탐침(probe)으로 사용하였다. cDNA 유전자은행으로부터 약 50만개의 plaque를 screening한 결과, 4개의 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 배양

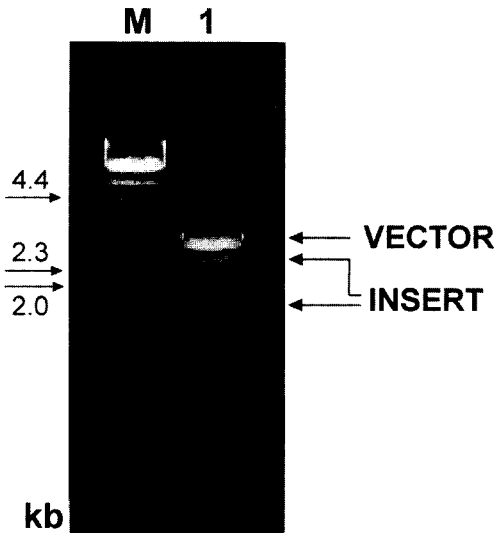


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of β -N-acetylglucosaminidase cDNA insert in the recombinant plasmid(pBluscript SK- vector). M : Lambda DNA/HindIII. Lane 1 : Recombinant pBluscript SK(-) plasmid digested with Aph I/Sac I.

체로부터 플라스미드만을 순수분리하였다. 제한효소인 *EcoR* 과 *Xho* I 으로 절단한 후 1.0% 아가로스 겔 상에서 insert DNA를 확인한 결과 그림 2에서 보는 바와 같이 약 2,700 bp와 500 bp 크기의 삽입된 cDNA를 확인하였다.

3. β -N-acetylglucosaminidase를 코딩하는 cDNA 염기서열 분석

3차 screening에서 선발한 positive plaque의 파아지를 pBluscript SK(-) 플라스미드 벡터로 유전자 전환한 다음 염기서열을 결정 한 결과 3,284 bp의 크기를 가지고 있었으며, 선발된 cDNA는 17번째 염기에서 개시되어 1,805번째 염기 위치에서 종결되는 open reading frame을 가지고 있었다. 그리고 3' 끝부분의 염기서열에는 poly A 염기부위를 포함하여, AT-rich 부위와 다수의 잠정전자 종결신호 'AATAAA'가 존재함을 확인할 수 있었다(그림 3).

이 cDNA의 open reading frame으로부터 596개의 아미노산을 연역하였으며, 추정되는 단백질의 분자량은 68.2 kDa이었다. 또한, 연역된 아미노산은 hydrophaty 분석결과(data는 제시하지 않음), N-말단의 약 23개의 아미노산으로 구성된 signal peptide가 강하게 소수성을 나타냄을 알 수 있었다. 그리고 24번째부터

36번째까지의 EEHSLWRWTCENN가 앞서 보고된 *B. mori*(Nagamatsue *et al.*, 1995)와 동일하였으며, von Heijne(1984)이 보고한 β -N-acetylglucosaminidase의 성숙(mature) 단백질의 N-말단의 아미노산과 동일하므로 23번과 24번 아미노산 사이에 잠정 signal peptide cleavage site가 있음을 추정할 수 있었다. 이 단백질에는 1개의 잠정 N-glycosylation 부위가 337-339(NPT)번재의 아미노산 위치에 존재하므로 *M. sexta*의 β -N-acetylglucosaminidase에서 보고된 바와 같이(Zen *et al.*, 1996) 멧누에 β -N-acetylglucosaminidase도 당단백질(glycoprotein)임을 추정할 수 있었으며, 곤충 β -N-acetylglucosaminidase에서 N-gly-cosylation은 단백질 분비(secretion)에 요구된다고 보고된 바 있다(Gopalakrishnan *et al.*, 1995).

CLUSTAL W program을 통해서 단백질 서열을 비교한 결과, 곤충인 *B. mori*(Nagamatsue *et al.*, 1995)와 *M. sexta*(Zen *et al.*, 1996)와의 상동성은 각각 95%, 70%로 상당히 높았다. 한편 human (Myerowitz *et al.*, 1985)·murine(Kuranda & Robbins, 1991)·효모(Cannon *et al.*, 1994)·세균(Soto-Gil & Zyskind, 1989; Somerville & Colwell, 1993)과의 β -N-acetylglucosaminidase의 상동성은 30% 이하로 매우 낮았지만(표 1) 두 개의 좁은 특정부위에서는 그 상동성이 매우 높고 잘 보존되어 있었다. 이것은 β -N-acetylglucosaminidase family에 속하는 모든 유전자는 β -N-acetylglucosaminidase 활성화에 관련 두 개의 특정 보존부위를 가지고 있다는 보고와 일치하여, 이 두 개의 부위를 region I 및 region II라고 명명하였다(그림 4). *B. mandarina*의 β -N-acetylglucosaminidase에서 region I의 위치는 205번째부터 254번째 위치에 존재하고, region II는 360번째부터 376번째 위치에 존재한다. region I에서는 1개의 isoleucine, proline, glycine, lysine, asparagine과 2개의 histidine, arginine 및 4개의 aspartic acid가, 그리고 region II에서는 1개의 hisidine, glycine, aspartic acid, glutamic acid 등이 다른 아미노산 잔기보다 상당히 높게 보존되어 있었다(*로 표시). 이상의 결과로서 이 유전자는 멧누에로부터 분리한 탈피에 관련된 β -N-acetylglucosaminidase family에 속하는 새로운 유전자임을 알 수 있었다.

적 요

멧누에(*Bombyx mandarina*)로부터 탈피에 관련된 β -N-acetylglucosaminidase 단백질을 코딩하는 cDNA

```

1  AAGGCTCCTGTA AAAAGATGGGCTTCAAGCAATTTGATTTACACCGTCTTCATAATATAGGATCGGGGATCCGACGG
      M W I O A I C I Y T V F I I G C G I P T A
81  CAGCCGAGAGCACTCATTTGTGGAGATGGACGTGCGAAAACAATAGATGCCAAGAGATCAGGAACGCGCCGGAGAAATAG
      A L E E H S L W R W T C E N N R C T K I R N E P E N K
161  GAGCCTGTCTCAGACTGGAAAGCTGCAAGATGTTCTGTGCCGATTTGGTCTCCTCTGGCGAAACCAACGATCGAGAC
      E P V L R L E A C K M F C D D C G L L W P K P T I E T
241  AAATCTGGGTAACCTCTCCAAAGATTAATGAACCATCGACATTCAGATCACCAGCAGGGAAAGAGGAGCGAC
      N L G N F L S K I N M N T I D I Q I T K Q G K S D D L
321  TCCTCAAGCGGCTGCCGACAGGTTAAGACACTGGTTCCAGTTCGGTCCCTAAAGGCTTCTCGCGAAGGCAGCAGGA
      L K A A A D R F K T L V S S S V P K G F S A K A A G
401  AAATCAGTCACAGTTTATTTAGTCAATGAAAATCCTTATATCCGAGAATTCCTCCGACATGGATGAGAGCTACGAGCT
      K S V T V Y V L V N E N P Y I R E F S L D M D E S Y E L
481  TCACATTCATCAACCTCGAGGACAAAGTAAAGTACCATACCTGGAACTCTTTCTTGGGCTCCGTAACGGTCTGG
      Y I S S T S S D K V K A T I R G N S F F G V R N G L E
561  AGACGCTCTTTAGCTAATCGTGTACGACGACATAAGGAATAATCTGTGATTTGCGGTGACGTCAACAATTAAGGACAGG
      T L F Q L I V Y D D I R N N L L I V R D V T I K D R
641  CCTGTCTATCTACGAGGATTTTGTCTGGACCGCGAGGAATCTACTCCATAGATTCATCAAAAGAACTATAGA
      P V Y P Y R G I L L D T A R N F Y S I D S I K R T I D
721  CGAATGGCGCAGTAAATGAACACATTCACCTGGCACATTCGGACAGCCAGATTTCCGTTGGTCTTACAGAAAA
      A M A A V K L N T F H W H I T D S Q S F L V L Q K S
801  GTCGAACTCAGTAAGCTCGGACATACAGTCCACCAAGGTGATACAAGCAAGATTCGTGAAGTTGTCGAATAT
      P N F S K L G A Y S P T K V Y T K Q D I R E V E Y
881  GGCCTTGAGAGGGATTCGTGTTTACCGGAAATTTGATGCGCCCGCTCATGTGGGAGAGGGATGCCAGGACCGGGACT
      G L E R G V R V L P E F D A P A H V G E G W Q D T G L
961  CACCGTGTCTTTAAGCGCGAGCCGTGGACGAAATTCGCGTGGAGCCGCTTGGGTCGACCTGACCTGAAAGAGG
      T V C F K A E P W T K F C V E P P C G Q L N P T K E E
1041 AACATTACGACTACTGGTAGATATTTATGTTAAATGGCTGAGGCGTTTGGAGGACGACATGTTCCACATGGGAGGA
      H Y D Y L V D I Y V E M A E A F E S T D M F H M G G
1121 GACGAGTTCAGCAAGCTGTTGAACTCCTCAGAGGAGATCCAAAATTTATGATTCAGAACCCGCTGGAATTTGGACAA
      D E V S E R C W N S S E E I Q N F M I W N L D K
1201 GAGCAGTTTCTGAGCTTTGGAACACTCTCCAGAAAGCCTCAAGACAGAGCGTATAAGGCGCTCGGTAAACGACTAC
      S S F L K L N Y F Q K N A Q D R A Y K A F G K R L P
1281 CTCTGATTTCTATGGACGAGATGACCGACTACACTCAGTACAGAAATCTTGGACAAAGCAATACATCATACAG
      L I L W T S R C L T D Y T H V E K F L D E Y I I Q
1361 GTCTGGACCACTGGAGCGCCACAAATTCAGGTTTGTCCAGAAAGGATCCGCTGATATGTCAAATACGACCC
      V W T T T G A D P Q I Q G L L Q K G Y R L I M S N Y D A
1441 TCTAATCTTGTGATTTGGGATTCGGGATCGGCTGGGTTGGTCTGGTAAATAATTTGGTTCACCGTACCGCGGCGAGAAAG
      L Y F D C G F G A W V G S G N N W C S P Y I G G Q K V
1521 TGTACGGTAACAGTCCAGGGTATGGCGCTCCTACCGGAAACAGATCTTAGTGGTGAAGTAGCGCTGTGGTCCGAG
      Y G N S P A V M A L S Y R D Q I L G G E V A L W S E
1601 CAGTCGGACCTGCCAGCTGGACCGCGGATGTGGCCAGAGCGGCTGCCTTCGCGAGCGCATGTGGCCGAACTTC
      Q S D P A T L D G R L W P R A A A A F E R M W A E P S
1681 CACCGGTGGCAGGACCGGATCAGCGGATGCTCCATGTTAGAGAACGTTTGGTAAAGATGGGAATTCAGACTGAATCCG
      T A W Q D A E H R M L H V R E R L V R M G I Q A E S L
1761 TTGAGCCGACTGGTCTATCAGAATCAAGGACTTTGCTATGGTTAGAGTTCATAGACAACGGGAAGAGGATGTCTGCC
      E P D W C Y Q N Q G L C Y G *
1841 AGCCTTATGAATAATAAATAACAAAGACAGACAATACTATCCTAAAACCTCATCGCCATTTTTTCGAATAACCAAATAA
1921 AGAGGAATTCCTTTGCTTTATTTTGTATTGTAATAATGTTGTTATTAACAACAAGATTTTTGGCGGAAATACAAT
2001 TTGAAATAAAAAGTAAAGCAAACTTTGCCAGCTTAAAAAATAAAGCGAAATAAAGGTTAGAAAAAGAAAAACAAA
2081 TGTATAATGTTTAAATAGGATTTTTTATTCAGTTAAACAAATATATCATAAATTTAGTTTATTTGTTGATTTAATAA
2161 TTAAAAAATAACCATTTCCCGAGATGTTCTATTTCCGCGAGCATTAAAAATACACAGTACTCGCATATTTGACTA
2241 ATGGTAAGAATTTTGGATTTACATGACATTAATAATAAATTAAGTTATAAAAATATTTTTATTAAGATTTAAAAA
2321 CACTGTAATTAATCGTATCAAAAGTGTATTCGGTGTATAATTTGTGACTTTATAGCATATATAGTAAAAATTAAGC
2401 CAGGCTTTTTAAATCTTTCAAGTGGACAGCATTCCTACAGTAAAAATAAATCATCTACAGTGTGACATATTAATAAG
2481 TCATGTCAGCGGATCCGCAAAATTTCAAATTCCTGTCATTTGGTGTAGTTATATGACAAAGGGTTTGAGAACCTAGCC
2561 TTTATTTGTACAAATTAATTAAGTACTGTTATTTCTACATTTGAAAACGATGTTGACATTTAAATAAAGATGAATACAATTTG
2641 TTCCATCAATTAATGAAAGCAAAATAAAAATAAAGCAAGCAGAGATTAACACAGTAAAAATGTTTTAAGTATAAATGTT
2721 AAAATTTTTCAATAAAAAATACATACGTCAAAACAGAGCTCCGATCGGATTTTTGTGCAAAATTTAAGTTGATAA
2801 CAATTCAGTCTCGAGATATTTCAATTTCAAAAATTTACCATGCTCCAGAGTACCTCTATATTTGACAAGATCTCGA
2881 CAATGTATATATTTGCAAAAAGTATTTGATTCGATTCGTTGCTCTTACACTTATAGTTTTAAACAATTTATTTGGTAA
2961 AAACCTGACATAAGCAATAAGTGGGTTATAAGTGTGAAACATTTTTGGAATATCTCACGAGAAGATATAAATAAAGT
3041 TAATACTCATATAAATTTTTAAATCGTTTTACTACGTATATATTTAACGTAATTTCTATCGTACATATTAATTA
3121 AAATTTGTAATCTTATACAGCATTTACTATTTACACATTAATTAAGATATTAATCTATATACTTACAGGACAGTGT
3201 GTGTTTTGATTTCTGTGACTTATTAATGTACACTATTTGATTTTTAATAAAATTCGCATAATAAAAAATAA
3281 AAA
    
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *B. mandarina* β -N-acetylglucosaminidase 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. Putative signal peptides of the deduced amino acid sequence is double-underlined, and polyadenylation signals are underlined. Arrow indicates the position of NH_2 -terminus of β -N-acetylglucosaminidase.

를 분리하고 그 염기서열의 구조를 해석한 결과, 번역시작부위는 17번 염기위치에 존재하고 이로부터 1,805번 염기의 전사 종결부위(TAA)까지 1,695 염기

가 open reading frame를 형성하고 있었다. 그리고 이 open reading frame으로부터 예상되는 단백질은 596개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 추정 크기는

인용문헌

- Brogie K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C. J. and Broglie R.(1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. **254** : 1194-1197.
- Cannon R. D., Niimi K, Jenkinson H. F. and Shepherd M. G.(1994) Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. *J Bacteriol*. **176**(9) : 2640-7.
- Cohen E.(1993) Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Arch. Insect Biochem. Physiol*. **22** : 245-261.
- Fukamizo T. and Kramer K. J.(1985a) Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system molting fluid. *Insect Biochem*. **15** : 1-7.
- Fukamizo T. and Kramer K. J.(1985b) Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system molting fluid. *Insect Biochem*. **15** : 141-145.
- 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.
- Goo T. W., Hwang J. S., Sung G. B., Yun E. Y., Bang H. S and Kwon O. Y.(1999) Molecular cloning and characterization of the gene encoding chitinase homologue from *B. mandarina*. *Korean Society of Life Science*. **9**(4) : 341-347.
- 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.
- 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.
- Kramer K. J. and Koga D.(1986) Insect chitin. Physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem*. **16** : 851-877.
- Kramer K. J., Hopkins T. L. and Schaefer J.(1988) Insect cuticle chemistry and metabolism. In *Biotechnology for Crop Protection*(edited by Hedin P. A., Menn J. J. and Hollingworth R. M.), pp. 160-185. American Chemical Society, Washington, DC.
- 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.
- 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.
- Metraux J. P., Burkhart 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.
- Myerowitz R, Piekarz R, Neufeld E. F., Shows T. B. and Suzuki K.(1985) Human beta-hexosaminidase alpha chain: coding sequence and homology with the beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**(23), : 7830-4.
- Nagamatsu Y., Yanagisawa I., Kimoto M., Okamoto E. and Koga D.(1995) Purification of a chitooligosacchari-dolytic β -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori* larvae during metamorphosis and the nucleotide sequence of its cDNA. *Insect Biotech. Biochem*. **59**(2) : 219-225.
- 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.
- Sambook J.(1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*(2nd ed.). New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Somerville C. C. and Colwell R. R.(1993) Sequence analysis of the beta-N-acetylhexosaminidase gene of *Vibrio vulnificus*: evidence for a common evolutionary origin of hexosaminidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**(14) : 6751-5.
- Soto-Gil R. W. and Zyskind J. W.(1989) N,N'-diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi*. Primary structure, processing, and evolutionary relationships. *J. Biol. Chem*. **264**(25) : 14778-83.
- von Heijne G.(1984) How signal sequences maintain cleavage specificity. *J. Mol. Biol*. **173**(2), : 243-51.
- 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.
- 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)
- Zen K. C., Choi H. K., Krishnamachary N., Muthukrishnan S. and Kramer K. J.(1996) Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect β -N-acetylglucosaminidase gene. *Insect Biochem. Molec. Bio*. **26**(5) : 435-444.