

지렁이 중장에서 발현되는 Endo- β -1,4-glucanase의 동정 및 특성에 관한 연구이명식 · 조성진 · 탁은식 · 허소영 · 이종애 · 박범준 · 조현주 · 신주옥¹ · 박순철*
(중앙대학교 생명과학과, ¹연세대학교 생명과학과)Isolation and Characterization of Endo- β -1,4-glucanase from the Midgut of the Earthworm, *Eisenia andrei*Lee, Myung Sik, Sung Jin Cho, Eun Sik Tak, So Young Hur, Jong Ae Lee, Bum Joon Park, Hyun Ju Cho, Chuog Shin¹ and Soon Cheol Park*(Department of Life Science, Chung-Ang University, ¹Department of Life Science, Yonsei University at Wonju Campus)

ABSTRACT

Endogeneous endoglucanase (EC 3.2.1.4) cDNA was cloned from a representative species (*Eisenia andrei*) of the earthworm family Lumbricidae. Endoglucanase from the midgut of the earthworm is composed of 456 amino acids and belongs to glycosyl hydrolase family 9 (GHF9), sharing high homologies (50-51%) with those of selected termite and crayfish. This endoglucanase consists of three consensus catalytic domains found in most microbial cellulases. A phylogenetic tree was constructed using the amino acid sequence data matched through the BLASTX program and showed that GHF9 families could be divided into four groups of arthropoda, bacteria, plant and annelida.

Key words : Endoglucanase, earthworm, *Eisenia andrei*, midgut, glycosyl hydrolase family 9

서 론

지구상에서 가장 풍부한 탄수화물 다중결합체 중의 하나인 셀룰로오스는 주로 육상식물 및 해양조류에 의해 생산되며, 많은 유기체들의 먹이원으로 이용된다. 식물에서의 셀룰로오스는 세포벽을 구성하는 주요소로서 1,4-glycosidic bond에 의해 결합된 β -D-glucopyranosyl unit로 구성된 다당류이다. 장래에 농업 분야에서 셀룰로오스의 효율적인 이용은 생산력 증대 뿐만 아니라 식량 대체효과에 중요한 관심의 대상이 될 것이다. 일반적으로 셀룰로오스를 포도당으로 분해하는 데에는 세 가지의 효소가 요구된다: β -1,4-glycosidic bond의 내부를 절단하는 endoglucanase (EC 3.2.1.4), 셀룰로오스 사슬의 말단으로부터 이당류인 cellobiose를 절단하는 cellobiosidase (EC 3.2.1.91) 및 cellobiose를 포도당으로 가수분해하는 cellobiase (EC 3.2.1.21). 이러

한 효소들은 여러 가지 형태로 존재하며, 소수성 분석에 의하여 58개의 그룹으로 분류되어 있다 (Henrissat와 Bairoch 1996). 이러한 그룹 중의 하나로 glycosyl hydrolase family 9 (GHF9)이 있으며 (Henrissat *et al.* 1989), 이 그룹에 속하는 효소들은 특성화된 염기서열이 상동성을 보인다 (Watanabe 등 1998).

고등동물과 무척추동물에서의 셀룰로오스 분해에 대한 관점은 셀룰로오스 분해 능력을 가지고 있는 장내 미생물과 식물에 초점을 두었으며, 최근까지도 셀룰로오스의 분해 능력은 장내 미생물(박테리아, 균류 및 원생동물)과 식물만이 가지고 있는 것으로 알려져 있었다. 이러한 관점에서 동물 내생의 endoglucanase 유전자들을 동정하기 위한 도전이 시작되었다. 식물-기생의 씨스트 선충류 (plant-parasitic cyst nematodes)에서 동물기원의 endoglucanase 유전자를 처음으로 분리하였으며 (Smant *et al.* 1998), 이후 흰개미 (Watanabe 1998, Tokuda 1999), 가재 (Byrne *et al.* 1999) 등에서 유전자들이 분리되었다.

토양생태계의 유지에 대한 지렁이의 역할 (Chan과 Heenan

* Corresponding author
Phone) +82-2-820-5212, Fax) +82-2-820-5212
E-mail) scpark@cau.ac.kr

1993, Oades 1993), 토양 비옥도의 증대 (Edwards와 Lofty 1980, Stockdill 1982) 및 유기물 쓰레기의 처리 (Edwards 1985, Butt 1993)에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다. 지렁이는 토양표면에 분포하는 식물 낙엽층의 일차적인 분해 및 낙엽층에 포함된 영양소의 방출과 순환에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 유용한 동물이며 (Lavelle와 Martin 1992, Kaushal 등 1994), 분변토라 불리는 배설물은 주변 토양에서 보다 더 많은 미생물들이 분포하고 즉시 이용되어질 수 있는 영양소들을 많이 포함하고 있기 때문에 주변의 토양보다 지렁이 서식지에서의 비옥도가 증대됨이 관찰되었다 (Murray *et al.* 1985, Daniel과 Anderson 1992, Tiwari와 Mishra 1993). 또한 지렁이를 이용하여 가정, 농업 및 산업에서 발생하는 많은 유기물 쓰레기를 처리하기 위한 방법들에 대한 관심이 증가하고 있다 (Edwards 1988, Neuhauser *et al.* 1988).

환경에 대한 지렁이의 이러한 역할들은 먹이원을 소화시킴으로써 시작되며, 식물의 낙엽 및 유기물 쓰레기를 소화시키는 과정에서 장의 체강으로 분비되는 단백질에 의해 수행된다 (Millott 1944, Edwards와 Fletcher 1988, Whiston과 Seal 1988). 지렁이의 중장 (midgut)은 소화관으로서 앞부분은 분비 및 소화를 담당하며, 뒷부분은 흡수를 담당한다. 중장의 앞부분에서 amylase 및 protease와 같은 효소들의 활성이 높게 나타나며 (Tillinghast *et al.* 2001), 중장에서의 cellulase 및 chitinase의 활성이 보고된 바 있으나 (Tracy, 1951, Mishra와 Dash 1980), 유전자에 관한 연구는 아직까지 수행된 바 없다.

우리는 SSH (suppression subtractive hybridization) 방법을 통하여 지렁이 중장에서 발현되는 endoglucanase 유전자의 342 bp의 절편을 확보하였다. 본 연구에서는 최초로 환형동물인 지렁이 *Eisenia andrei*의 중장에서 endoglucanase를 코딩하는 유전자의 구조 및 계통수와 관련된 전체 염기서열 구조에 대한 특성을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 배양

낱시 미끼용 지렁이 (*Eisenia andrei*)를 구입하여 환대가 잘 발달된 성숙한 개체만을 선택하여 사육하였다. 선택된 지렁이는 증류수로 수 차례 세척하였다. 토양은 배양토와 자연비료를 1:1로 혼합하여 사용하였으며 15×20×7 cm 크기의 플라스틱 용기에 약 60마리씩 넣어 23±1°C를 유지하며 암소에서 배양하였다. 배양 전에 토양은 지렁이 성장에 해로운 선충류의 성장을 최소화하기 위하여 65°C 건조용 전기 오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 사용하였다. 배양시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상을 유

지하도록 하고, 먹이원으로 우분을 매일 토양 위에 공급하였다. 중장 내용물의 배출을 위하여 지렁이 생리식염수 (25 mM NaCl, 2.5 mM K₂SO₄, 67.5 mM Na₂SO₄, 0.5 mM MgSO₄, 13.25 mM CaCl₂, 5 mM Tris, 2.7 mM glucose)로 적신 filter paper에서 최소 48시간 이상 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. Total RNA 및 mRNA의 분리

성숙한 지렁이 중장으로부터 total RNA는 Tri-reagent (Sigma)를 이용하였으며, mRNA는 dynabeads (DYNAL)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 추출하였다.

3. 5'-Rapid amplification cDNA ends (RACE)-PCR

Endoglucanase 유전자의 full-length open reading frame (ORF)을 확보하기 위하여 SMART RACE cDNA amplification Kit (Clontech)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실험을 수행하였다. 최종 PCR 반응물을 T/A cloning vector (Invitrogen)에 접합시킨 후, One shot TOP 10 *E. coli* (Invitrogen)에 형질전환 시켰다. 형질전환된 박테리아는 1.4 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal), 50 μg/ml ampicillin이 포함된 LB 배지 (5 g of Bacto Yeast Extract, 10 g of Bacto Tryptone, 14 g of Bacto Agar, 10 g of NaCl/l)에 접종하였다.

4. 플라스미드 분리 및 염기서열 결정

접종 후 형성된 콜로니 중 약 10개의 흰색 콜로니들을 무작위로 뽑아 5 ml의 LB 배지 (ampicillin 100 μg/ml)에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 교반 배양하였다. 배양된 박테리아로부터 플라스미드 DNA의 분리는 QIAprep spin mini-prep kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. 분리된 플라스미드는 제한효소인 *EcoR* I (10 U/μl, Roche) 1 μl, buffer H (Roche) 1 μl, plasmid 8 μl를 혼합하여 37°C 항온조에서 1시간 30분 배양 후 1.2% agarose gel로 cDNA의 삽입 여부를 확인하였다. 염기서열 결정을 위한 반응은 AmpliTaq DNA polymerase가 포함된 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit를 이용하여 MJ research Gradient Cycler에서 수행하였으며, fluorescent-labeled 절편은 에탄올 침전에 의해 정제하였다. 정제된 표본은 증류수로 용해한 후 ABI 3700 sequencer를 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열의 분석은 Poly (A) tail, 벡터의 염기서열, 접합자 (adaptor)의 염기서열 및 모호한 염기서열 (N)를 포함하고 있는 부분을 제거한 뒤 National Center of Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)에서 BLASTX 프로그램을 이용하여 단백질 자료 (nonredundant)와 비교하였다.

지렁이 endoglucanase 의 동정 및 특성

1	<u>M A T R I L M M L L G M I A L C M S G V A G O Y N Y D E</u>	40
1	GGATTCTGTTGTTTTGTTTCGAGAAAGAGCACAAATAACCATGGCGACACGATTGATGATGCTGCTGGGCATGATTGCCCTGTGCATGTCGGGAGTTGCAGGTCAATATAATTATGATGAA	120
41	V L E K S I L F Y E A E R S G D L P S N N R I P Y R G D S A L G D Q G N Q G Q D	80
121	GTTCTGGAAAAATCAATCTCTTCTACGAGGCTGAGAGATCTGGGACCTTCCCTCAAACAACCGTATTCCTATCGAGGAGACTCAGCCCTCGGAGACCAGGGTAACCAAGGACAGGAC	240
81	L T G G W Y D A G D H V K F G F P M A F A T T T L A W G I L E F R D G Y E A A G	120
241	CTGACAGGAGGATGGTATGACGCTGGAGACCATGTGAAGTTGGTTTTCCGATGGCATTTTCTACGACAGCTGGCCTGGGGTATTCTGGAGTTCAGGGACGGTTACGAGGCAGCGGGT	360
121	Q Y W L A L D S I R W T L N Y F L K A H V S D N E F Y G Q V G D A N T D H A W W	160
361	CAGTACAACCTGGCCCTCGACAGCATTGATGGACCTCAACTATTTCTCAAAGCCACGTCAGCGATAACGAGTTCTATGGTCAGGTGGGTGATGCTAACACTGACCACGCTGGTGG	480
161	G R P E D M T M E R P A W S I S P S A P G S D L A A E T A A A L A A G Y L V F R	200
481	GGTCGTCAGAGGATGACAATGGAAAGACCAGCCTGGAGCATCTCACCTCTGCCCTGGGTGAGTCTAGCTGCTGAGACTGCTGCTGCCCTGCCCGCGGTTACCTCGTCTTCAGA	600
201	D L D A A F A N N L L A H S R T L Y D F A L N N R G I Y S Q S I S N A A G F Y A	240
601	GACTTGGATCGCGGCTTTCGCAACAACCTACTCGCTCACTCGAGGACCTGTACGACTTCGCTCTTAAACAATCGTGAATCTACAGTCAGTCTATTTCCAACGCCCTGGATTTTATGGC	720
241	S S A Y E D E L A W G A A W L Y R A T E E Q E Y L D R A Y E F G T T T N T A W A	280
721	TCATCCGCATACGAGGACGAGTTAGCCTGGGGTGCAGCGTGGTGTACAGGGCGACGGAAGAGCAGGAGTATCTCGACCGACCTACGAGTTCGGTACCACCACCAACACAGCCTGGGCC	840
281	Y D W N E K I V G Y Q L L L T T S A G Q T D F L P R V E N F L R N W F P G G S V	320
841	TATGACTGGAACGAGAAGATCGTCGGTTATCAGTTGTTGCTCACCACCTCTGCTGGGCGAGCGGACTCTCTGCCCTCGTGTGGAGAATTCCTTCGGAATGGTTCCAGGAGGTTTCAGTA	960
321	Q Y T P L G L A W L A Q W G P N R Y A A N A A F I A L V S A K Y N I L A S E S E	360
961	CAATATACCCGTTAGGTCTCGCTGGCTGGCTCAGTGGGACCCCAACCGATACGCGAGCAATGCCGCTTCATAGCATTGGTGTCCGAAAGTACAACATCCTGGCTTCGGAATCTGAA	1080
361	Q F A R S Q I H Y M L G D A G R S Y V V G F G N N P P Q Q P H H R S S S C P D Q	400
1081	CAATTCCGCCGTAGCCAGATCCACTATATGCTCGGAGACGCCGGAAGAAGCTACGTCGTTGGTTTTGGCAACAATCCTCCTCAGCAGCCACATCACCGATCATCGTCTTCCGCCGACCCAG	1200
401	P A E C D W D E F N Q P G P N Y Q I L Y G A L V G G P D Q N D Q F E D L R S D Y	440
1201	CCAGCTGAGTGTGACTGGGATGAGTTCAACCAACCTGGTCCCAACTATCAGATCCTCTACGGGGCCCTGGTGGGCGGACCGGATCAGAACGACCAATTTCGAGGACCTGAGAAGCGACTAC	1320
441	I R N E V A N D Y N A G F Q G A V A A L R A I Q L R D G K *	
1321	ATCAGGAACGAAGTGGTAATGACTACAACGCCGATTCCAAGGAGCTGTGCTGCTCTCGAGCCATTGAGTGGAGACGGCAAGTGAATCATCTCCAGAAACCGAGCTCATCGCCA	1440
1441	<i>TAAACATGAAITGGCGCACAGTAAATTA AAAACGTTTTTGAAGAAGCTCCTCTCATGGACGATATAGCTATATAATATAATAATCTTCTCACTGCAGGTCACATAAATAACGGTTTT</i>	1560
1561	<i>GTCACAGTTCGGTAAATAAACCA</i>	1583

Fig. 1. Full-length of cDNA sequence and deduced EiEG amino acid sequence. The putative signal peptide is underlined. The asterisk is stop codon and dotted-line is sequence previously determined by SSH method. A part of 3' untranslated region is written in italics.

5. 계통수 (Phylogenetic tree) 분석

BLATX 프로그램을 이용하여 Genebank 자료와 유사성을 비교하여 전체염기서열이 밝혀진 유전자들을 분류군별로 선택하여 CLUSTAL X 프로그램을 이용하여 정렬하였다. 계통수 분석에는 Mega II 프로그램을 사용하였으며, NJ (neighbor-joining) 알고리즘에 의해 거리 분석(distance analysis)을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 지렁이 endoglucanase cDNA 전체염기서열의 분석

SSH 방법을 사용하여 확보한 절편에 특이적인 primer를 제작하여 5' RACE를 실시하여 확인된 endoglucanase의 전

체 염기서열은 1,371 bp의 ORF로 구성되어 있다(Fig. 1). ATG 시작 코돈은 5' 말단으로부터 40 bp에서 시작되며, 3' 말단은 polyadenylation signal (AATAAA)을 포함하여 173 bp이다. Endoglucanase의 ORF는 GHF9의 endoglucanase와 유사성을 보이는 456개의 아미노산으로 번역되며, signal peptide (Nelson 등 1997)는 21개이다. PSORT II Prediction 프로그램 (Horton과 Nakai 1997)에 의해 분석된 최종 목적지는 extracellular이며, PeptideMass 프로그램 (Wilkins 등 1997)에 의해 예상된 이론적인 pI값은 4.5, 이론적인 분자량은 51 kDa이다.

2. 아미노산 염기서열의 비교

지렁이의 endoglucanase는 흰개미 (*Nasutitermes takasago*-

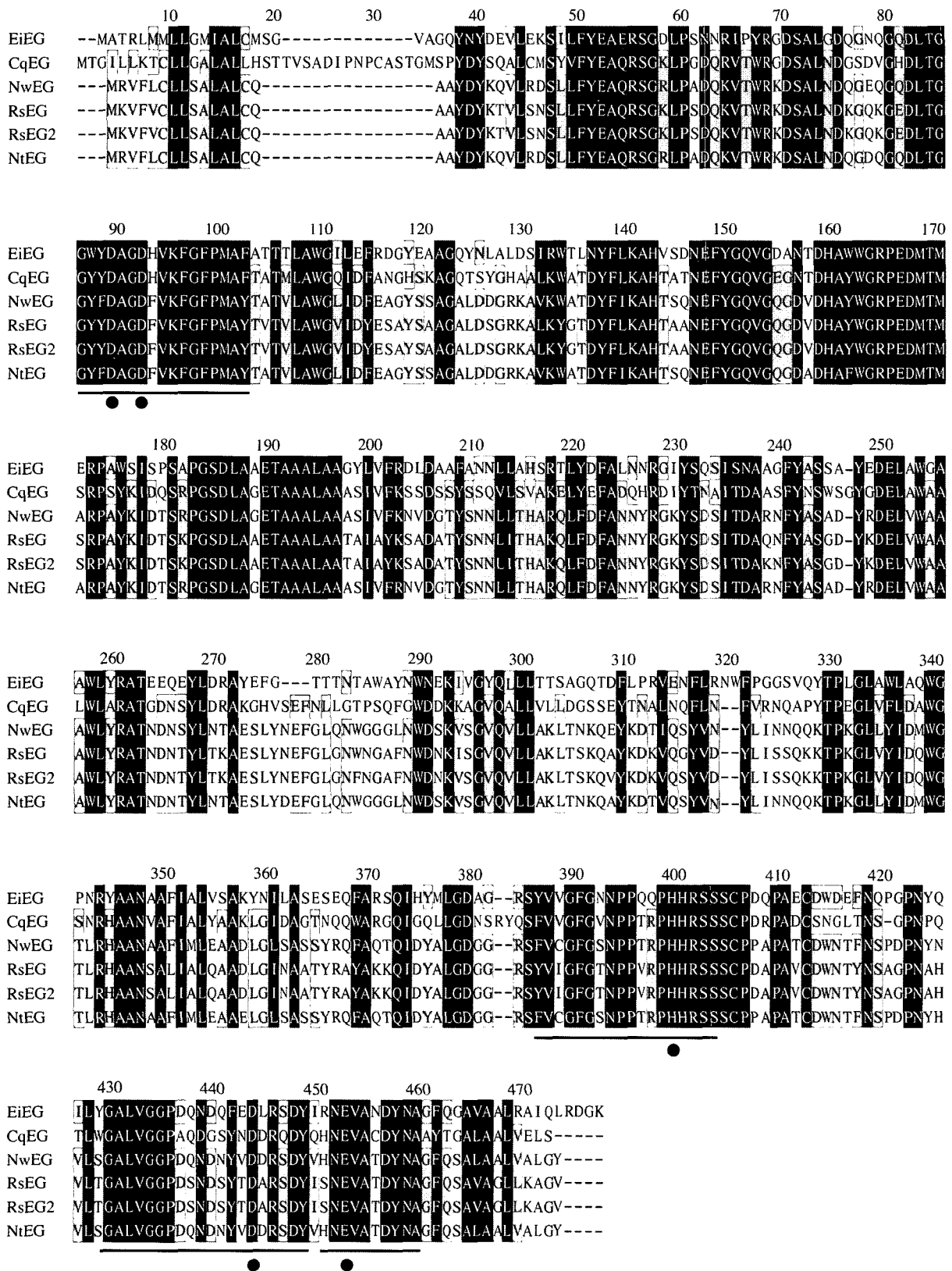


Fig. 2. Deduced EiEG (*Eisenia andrei* endoglucanase) amino acid sequences aligned with endoglucanases from *Reticulitermes speratus* (RsEG, RsEG2), *Nasutitermes walkeri* (NwEG), *Nasutitermes takasagoensis* (NtEG) and *Cherax quadricarinatus* (CqEG). The alignment was carried out with GeneDoc program and the identical amino acids are shaded. The conserved catalytic residues are marked with a black circle and GHF9 consensus motifs are underlined.

지렁이 endoglucanase 의 동정 및 특성

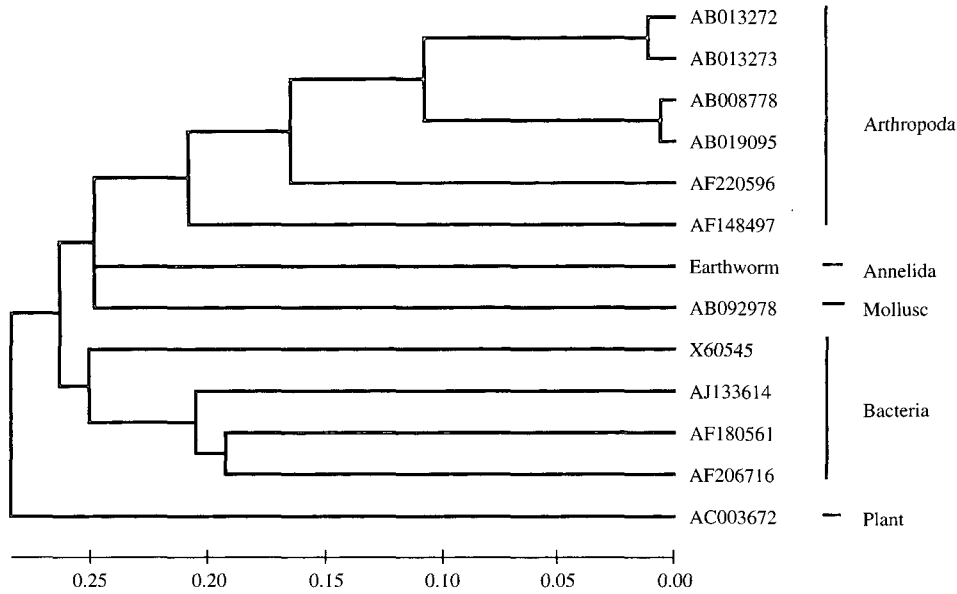


Fig. 3. Phylogenetic tree of GHF9 members based on amino acid using Mega II program. Genebank accession numbers used for the analysis are: *Nasutitermes takasagoensis* AB01327; *Nasutitermes walkeri* AB013273; *Reticulitermes speratus* AB008778 and AB019095; *Panesthia cribrata* AB220596; *Cherax quadricarinatus* AF148497; *Haliotis discus* AB092978; *Clostridium thermocellum* X60545; *Bacillus* sp. BP-23 AJ133614; *Myxobacter* sp. AL-1 AF180561; *Bacillus pumilus* AF206716; *Arabidopsis thaliana* AC003672.

ensis)의 endo- β -1,4-glucanase와 51%, 흰개미 (*Nasutitermes walkeri*)의 NwEG와 51%, 흰개미 (*Reticulitermes speratus*)의 salivary cellulase, endoglucanase 2와 50% 및 가재 (*Cherax quadricarinatus*)의 cellulase GHF9과 50%의 상동성을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 2). GHF9 그룹은 세 지역이 잘 보존되어 있으며, 이 지역이 가수분해 활성에 매우 중요하다. 첫 번째는 활성 부위 (active site) histidine (His-399)를 포함하는 지역으로서, 【(STV)-X-(LIVMFY)-(STV)-X(2)-G-X-(NRK)-X(4)-(PLIVM)-H-X-R】이 보존된 염기서열을 나타낸다 (Tomme *et al.* 1991). 두 번째는 가수분해에 중요한 잔기인 asparatate (Asp-423) 및 glutamate (Glu-452)를 포함하는 지역으로서, 【(FYW)-X-D-X(4)-(FYW)-X(3)-E-X-(STA)-X(3)-N-(STA)】이 보존된 염기서열을 나타낸다 (Tomme *et al.* 1992). 세 번째는 두 개의 가수분해 잔기 asparatate (Asp-89, Asp-92)를 포함하는 지역으로서, 【G-(WY)-(YFH)-D-A-G-D-(HNY)-(VLG)-(KRM)-(FY)】이 보존된 염기서열을 나타낸다 (Sakon *et al.* 1997).

3. 계통수 분석

Fig. 3은 전체염기서열이 확인된 GHF9 그룹에 속하는 여러 종들의 cellulase 아미노산 유사성에 근거하여 계통수를 분석한 결과이다. GHF9 그룹의 cellulase의 계통수는 4가지의 뚜렷한 가지로 나뉘어 진다: 1. 흰개미, 바퀴벌레, 가재를 포함하는 절지동물; 2. 박테리아; 3. 식물; 4. 환형동물 및 연

체동물. 이러한 경향은 본 연구에서 밝혀진 지렁이와 전복을 제외한 GHF9 그룹의 catalytic domain에 근거한 계통수 분석의 결과와 유사하다 (Tokuda *et al.* 1999). 또한 바퀴벌레와 흰개미, 가재가 하나의 가지로 묶여지는 것은 둥지 및 먹이 서식지의 유사성에 근거하여 나무를 먹고 살아가는 바퀴벌레가 흰개미로 진화하였을 것이라는 분자생물학적인 증거를 뒷받침해 주고 있다 (Lo *et al.* 2000).

적 요

지렁이 (*Eisenia andrei*)의 중장에서 내생의 endoglucanase 유전자의 전체 염기 서열을 동정하였다. ORF의 길이는 1,371 bp이며, 456개의 아미노산으로 번역된다. NCBI에 등록된 가재와 흰개미의 cellulase 및 endo- β -1, 4-glucanase와 50-51%의 유사성을 보이며, 활성 부위가 잘 보존되어 있었다. 계통수 분석에서는 다른 동물 분류군에서 밝혀진 GHF9 그룹의 cellulase와 근연관계가 없음이 확인되었다.

감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Butt, K.R. 1993. Utilization of solid paper mill sludge and spent brewery yeast as a feed for soil-dwelling earthworms. *Bioresource Technol.* **44** : 105-107.
- Byrne, K.A., S.A. Lehnert, S.E. Johnson and S.S. Moore. 1999. Isolation of a cDNA encoding a putative cellulase in the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gene*. **239** : 317-324.
- Chan, K.Y. and D.P. Heenan. 1993. Surface hydraulic properties of a red earth under continuous cropping with different management practices. *Aust. J. Soil Res.* **31** : 13-24.
- Daniel, O. and J.M. Anderson 1992. Microbial biomass and activity in contrasting soil material after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* Hoffmeister. *Soil Biol. Biochem.* **24** : 465-470.
- Edwards, C.A. 1985. Production of feed protein from animal wastes by earthworm. *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **310** : 299-307.
- Edwards, C.A. 1988. Breakdown of animal, vegetable, and industrial organic wastes by earthworms. *Agric. Ecosyst. Environ.* **24** : 21-31.
- Edwards, C.A. and K.E. Fletcher. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agric. Ecosyst. Environ.* **24** : 235-247
- Edwards, C.A. and J.R. Lofty. 1980. Effects of earthworm inoculation upon the root growth of direct drilled cereals. *J. Appl. Ecol.* **17** : 533-543.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316** : 695-696.
- Henrissat, B., M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle and J.P. Mornon. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene*. **81** : 83-95.
- Horton, P. and K. Nakai. 1997. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **5** : 147-52.
- Lavelle, P. and A. Martin. 1992. Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil organic matter dynamics in soil of the humid tropics. *Soil Biol. Biochem.* **24** : 1491-1498.
- Kaushal, B.R., S.B. Bisht and S. Kalia. 1994. Effect of diet on cast production by the megascolecoid earthworm *Amyntas alexandri* in laboratory culture. *Biol. Fertil. Soils* **17** : 14-17.
- Lo, N., G. Tokuda, H. Watanabe, H. Rose, M. Slaytor, K. Maekawa, C. Bandi and H. Noda. 2000. Evidence from multiple gene sequences indicates that termites evolved from wood-feeding cockroaches. *Curr. Biol.* **29** : 801-804.
- Millott, N. 1944. The visceral nerves of the earthworm. 3. Nerves controlling secretion of protease in the anterior intestine. *Proc. R. Soc.* **132** : 200-212.
- Mishra, P.C. and M.C. Dash. 1980. Digestive enzymes of some earthworms. *Experientia*. **36** : 1156-1157.
- Murray, P.M., A. Feest and M.F. Madelin. 1985. The numbers of viable myxomycete cells in the alimentary tracts of earthworms and in earthworm casts. *Bot. J. Linn. Soc.* **91** : 359-366.
- Neuhauser, E.F., R.C. Loehr and M.R. Malecki. 1988. The potential of earthworms for managing sewage sludge, in *Earthworms and Wastes Management*, SPB Acad. Publ., The Netherland, pp. 9-20.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10** : 1-6.
- Oades, J.M. 1993. The role of biology in the formation, stabilization and degradation of soil structure. *Geoderma* **56** : 377-400.
- Sakon, J., D. Irwin, D.B. Wilson and P.A. Karplus. 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat. Struct. Biol.* **4** : 810-818.
- Smant, G., J.P. Stokkermans, Y. Yan, J.M. de Boer, T.J. Baum, X. Wang, R.S. Hussey, F.J. Gommers, B. Henrissat, E.L. Davis, J. Helder, A. Schots and J. Bakker. 1998. Endogenous cellulases in animals: isolation of beta-1, 4-endoglucanase genes from two species of plant-parasitic cyst nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** : 4906-4911.
- Stockdill, S.M.J. 1982. Effect of introduced earthworms on the productivity of New Zealand pastures. *Pedobiologia* **24** : 29-33
- Tillinghast, E.K., R. O'Donnell, D. Eves, E. Calvert and J. Taylor. 2001. Water-soluble luminal contents of the gut of the earthworm *Lumbricus terrestris* L. and their physiological significance. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **129** : 345-353.
- Tiwari, S.C. and R.R. Mishra. 1993. Fungal abundance and diversity in earthworm casts and in ungested soil. *Biol. Fertile Soils* **16** : 131-134.
- Tomme, P., S. Chauvaux, P. Beguin, J. Millet, J.P. Aubert and M. Claeyssens. 1991. Identification of a histidyl residue in the active center of endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *J. Biol. Chem.* **266** : 10313-10318.
- Tomme, P., J. van Beeumen and M. Claeyssens. 1992. Modification of catalytically important carboxy residues in endoglucanase D from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. J.* **285** : 319-324.
- Tokuda, G., N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, T. Matsumoto and H. Noda. 1999. Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1447** : 146-159.
- Tracey, M.V. 1951. Cellulase and chitinase of earthworms. *Nature* **167** : 776-777.
- Watanabe, H., H. Noda, G. Tokuda and N. Lo. 1998. A cellulase gene of termite origin. *Nature*. **394** : 330-331.
- Whiston, R.A. and K.J. Seal. 1988. The occurrence of cellulases in the earthworm *Eisenia foetida*. *Biol. Wastes* **25** : 239-242.
- Wilkins, M.R., I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J.-C. Sanchez, D.F. Hochstrasser and R.D. Appel. 1997. Detailed peptide characterisation using PEPTIDEMASS-a World-Wide Web accessible tool. *Electrophoresis*. **18** : 403-408.