

열안정성을 높이기 위한 변이형피타제의 유전자합성과 재조합효모발현운반체제작

김주성, 김철호, 홍완근

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《다른 나라의 선진기술과 과학연구성과들을 우리의 실정에 맞게 받아들이기 위한 사업도 잘하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제25권 140페이지)

공업적으로 응용되는 피타제의 생산성과 효과성을 높이기 위한 방도의 하나는 열안정성을 비롯한 효소학적특성이 개선된 유전자를 설계합성하여 분비형발현숙주에서 효율적으로 발현시키는것이다.[6] 그러자면 기능개변을 위한 변이점들이 도입되고 해당 발현숙주의 코돈선호성과 같은 특성이 반영된 피타제유전자배열을 설계합성하고 발현운반체에 재조합시켜야 한다.

우리는 열안정성개선에 기여하는 8개의 변이점[5]을 도입한 피타제유전자를 합성하고 그것을 pPIC9K에 재조합하여 재조합효모발현운반체를 제작하였다.

재료와 방법

변이를 도입할 원천유전자로는 전문연구소에 보존된 *Escherichia coli* 38로부터 클론화한 피타제유전자[1](GenBank 등록번호 KT731135)를 리용하였으며 유전자합성과 염기배열결정은 전문기관에 의뢰하여 진행하였다.

운반체로는 pGEM[®]-T vector(《Promega》)와 pPIC9K(《Invitrogen》)를, 클론화용숙주로는 *E. coli* DH5 α 를 리용하였다. PCR에는 LA Taq폴리메라제(《TaKaRa》)를, 재조합에는 T4 DNA 리가제(《Promega》)를 리용하였다. 제한효소로는 *Eco*RI와 *Not*I(《TaKaRa》)을 리용하였다. 아가로스겔DNA분리키트(《OMEGA bio-tek》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 리용하여 유전자단편과 플라스미드를 각각 분리하였다.

유전자배열에 대한 해석에는 전용프로그램(DNAMAN 6.0.3.99)을 리용하였다.

결과 및 논의

대장균기원의 피타제는 높은 촉매활성과 프로테아제저항성, 낮은 pH에서의 최적활성 등으로 하여 여러가지 미생물기원의 피타제중에서 가장 우월한 효소로 인정되고있지만 열안정성이 낮은것으로 하여 생산과 응용에서 일정한 제약을 받는다.[6] 이로부터 아미노산배열에 변이를 도입하여 피타제의 열안정성을 높이기 위한 연구[3-5, 8]가 광범히 진행되었으며 열안정성에 기여하는 변이점들도 적지 않게 밝혀졌다. 열안정성을 높이기 위한 변이 도입에서 중요한것은 변이효과의 가산성이 성립하는 동시에 효소의 촉매활성이 떨어지지 않는 변이점들을 선택하는것이다. 이로부터 성숙펩티드배열에 8개의 변이(W46E, Q62W, A73P, K75C, S146E, R159Y, N204C, Y255D)를 도입하여 합성한 변이형피타제유전자(*appA38M8*)와 그것의 추정아미노산배열을 그림 1에 보여주었다.

```

1      CAAAGTGAACCAAGAACTTAAACTTGAAAGTGTGCTCATCGTCTCTAGGCACGGTGTTAGAGCCCCAACCAAGGCT*
1      Q S E P E L K L E S V V I V S R H G V R A P T K A

76     ACCCAGCTTATGCAAGATGTTACCCAGACGCTTGGCCAACTTGGCCAGTCAAGTTGGGAGAGTTGACTCCAAGG*
26     T Q L M Q D V T P D A W P T W P V K L G [E] L T P R

151    GGTGGAGAGTTGATCGCCTACTTGGGTCACTACTGGAGGCAGAGGCTTGTGCTGACGGTTTGCTTCCAAAGTGC*
51     G G E L I A Y L G H Y [W] R Q R L V A D G L L [P] K [C]

226    GGATGTCCACAGAGTGGTCAAGTTGCCATCATTGCCGACGTTGATGAAAGGACTAGAAAAACCGGAGAAGCTTTT*
76     G C P Q S G Q V A I I A D V D E R T R K T G E A F

301    GCCGCTGGATTGGCTCCAGACTGCGCTATCACCGTCCATACTCAAGCTGACACCGTTCTCCAGACCTTTGTTC*
101    A A G L A P D C A I T V H T Q A D T S S P D P L F

376    AACCCATTGAAGACCGGTGTGTGTAGTTGGATAATGCCAACGTACCGACGCTATCTTGGAAAGGGCCGGTGG*
126    N P L K T G V C Q L D N A N V T D A I L [E] R A G G

451    TCTATCGCTGACTTCACCGGACACTACCAAACCGCTTTTAGAGAGCTTGAGAGGGTCTTAACCTCCCTCAAAGT*
151    S I A D F T G H [Y] Q T A F R E L E R V L N F P Q S

526    AATCTTTGCTTGAAGGGGAGAAGCAAGATGAGAGTTGCAGTTTGACCAAGCTTGCCTAGTGAATTGAAGGTC*
176    N L C L K R E K Q D E S C S L T Q A L P S E L K V

601    AGTGGCGACTGCGTCTCTTTGACTGGTGCCGTTAGTCTTGCCAGTATGCTTACCAGAGATCTTCTTTTGCAGCAA*
201    S A D [C] V S L T G A V S L A S M L T E I F L L Q Q

676    GCTCAAGGAATGCCAGAACCCTGGGATAGGATCACCAGTACCAAGTGGAAACACCTTGCTTAGTTTGCAC*
226    A Q G M P E P G W G R I T D S H Q W N T L L S L H

751    AACGCCCAATTGACCTTTTGCAAAGGACTCCAGAGGTCGCTAGGTCTAGGGCCACTCCTTTGTTGGACTTGATC*
251    N A Q F [D] L L Q R T P E V A R S R A T P L L D L I

826    AAGACCGCCCTTACCCACATCCACCACAAAGCAAGCTTATGGAGTCACCCTTCCAACCTCTGTCTTTTCATC*
276    K T A L T P H P P Q K Q A Y G V T L P T S V L F I

901    GCTGGACACGATACCAACCTTGCCAACTTGGGAGGTGCTTTGGAGCTTAAGTGGACCTTGCCCGGACAACAGAC*
301    A G H D T N L A N L G G A L E L N W T L P G Q P D

976    AATACCCACCCGGAGGAGAGCTTGTCTTCGAGAGGTGGAGGAGGTGAGTGACAACAGTCAGTGGATCCAAGTT*
326    N T P P G G E L V F E R W R R L S D N S Q W I Q V

1051   TCTTTGGTCTTCCAGACCTTGCAACAGATGAGAGATAAAACCCCTTTGTCTTTGAACACCCACCCGGAGAGGTT*
351    S L V F Q T L Q Q M R D K T P L S L N T P P G E V

1126   AAGTTGACCTTGGCTGGATGCGAGGAGAGAAACGCCCAAGGAATGTGCTCTCTTGTGCTGTTTCACTCAGATCGTC*
376    K L T L A G C E E R N A Q G M C S L A G F T Q I V

1201   AATGAGGCTAGAATCCCAGCTTGT*
401    N E A R I P A C

```

그림 1. 변이형피라제의 유전자배열과 그것의 추정아미노산배열
원천배열과 차이는 염기는 *로, 변이시킨 아미노산은 네모칸으로 표시함.

새롭게 합성한 *appA38M8*의 길이는 1 224bp이며 408개의 아미노산으로 구성된 변이형피라제의 성숙펩티드를 암호화한다. 원천유전자의 성숙펩티드암호화배열과의 염기배열상동성은 71.00%이며 동의코돈치환에 의하여 달라진 염기의 80.23%는 코돈의 세번째 위치에 있다.

*appA38M8*의 코돈리용률을 분석한 결과 *P. pastoris*에서 발현수준이 높은 유전자들의 평균리용률[2, 9]과 잘 일치하였다. 원천배열과 비교하면 *Pichia pastoris*에서 리용률이 낮은 코돈들이 동의코돈으로 치환되어 제거되었다는것을 알수 있다.(표)

표. 원천배열과 *appA38M8*의 코돈리용률

아미 노산	코돈	코돈리용률		아미 노산	코돈	코돈리용률		아미 노산	코돈	코돈리용률							
		%				%				%							
		wt	38M8			wt	38M8			wt	38M8						
Phe	TTT	82	27	Ser	TCT	4	38	Tyr	TAT	75	25	Cys	TGT	50	30		
	TTC	18	73		TCC	4	0		TAC	25	75		TGC	50	70		
	TTA	15	0		TCA	32	0		ter	TAA	—		—	ter	TGA	—	—
	TTG	17	62		TCG	12	0		ter	TAG	—		—	Trp	TGG	/	/
Leu	CTT	6	38	Pro	CCT	7	17	His	CAT	75	25	Arg	CGT	36	0		
	CTC	13	0		CCC	17	13		CAC	25	75		CGC	36	0		
	CTA	10	0		CCA	24	70		Gln	CAA	38		64	CGA	5	0	
	CTG	38	0		CCG	52	0		CAG	62	36		CGG	14	0		
Ile	ATT	43	7	Thr	ACT	16	24	Asn	AAT	50	27	Ser	AGT	20	62		
	ATC	36	93		ACC	38	76		AAC	50	73		AGC	28	0		
	ATA	21	0		ACA	9	0		Lys	AAA	69		31	Arg	AGA	0	29
	Met	ATG	/		/	ACG	38		0	AAG	31		69	AGG	9	71	
Val	GTT	13	33	Ala	GCT	8	58	Asp	GAT	58	35	Gly	GGT	38	38		
	GTC	25	67		GCC	26	42		GAC	42	65		GGC	21	0		
	GTA	21	0		GCA	37	0		GAA	48	35		GGA	28	62		
	GTG	42	0		GCG	29	0		Glu	GAG	52		65	GGG	14	0	

wt: 원천유전자, 38M8: 새로 합성한 변이형유전자 *appA38M8*, ter: 종결코돈, /: Met과 Trp에 대해서는 코돈리용률분석을 진행하지 않았음.

염기배열의 GC함량은 원천배열에서 54.79%인것이 *appA38M8*에서 50.96%로 변화되어 최적범위에 더 가깝게 낮아졌다.[7] 또한 부위별GC함량의 불균일성을 나타내는 표준편차는 원천배열에서 14.15%인것이 *appA38M8*에서 10.39%로 감소하였다. *appA38M8*에는 다음단계의 재조합과 선형화에 리용되는 제한효소(*EcoRI*, *NotI*, *SalI*, *SacI*)의 인식배열이 포함되어있지 않다.

합성한 *appA38M8*을 발현운반체 pPIC9K에 재조합하기 위하여 프라이머를 아래와 같이 설계합성하였다.(제한효소인식배열을 밑줄로, 종결코돈을 강조체로 표식하였음.)

appA38M8_EcoRI_up: 5'-GCGGAATTCCAAAGTGAACCAGAACTTAAACTTG-3'

appA38M8_NotI_down: 5'-TATAGCGGCCGCTTAACAAGCTGGGATTCTAGC-3'

화학합성한 유전자배열을 포함하는 플라스미드 pUC57-*appA38M8*을 주형으로 하고 우의 프라이머쌍을 리용하는 PCR를 진행하였다.(그림 2의 ㉠) PCR는 94℃ 초기변성 5min→94℃ 변성 30s, 62℃ 아닐링 30s, 72℃ 연장 80s, 30회 순환→72℃ 최종연장 7min의 조건에서 진행하였다. 증폭산물을 pGEM®-T vector에 클론화하고 재조합클론화운반체에 대한 PCR검정과 2중제한분해검정을 진행하였다.(그림 2의 ㉡)

그림 2에서 보는바와 같이 해당한 크기(약 1.2kb)의 목적단편이 증폭되었으며 재조합클론화운반체는 2중제한분해에 의하여 운반체에 해당한 크기(약 3.0kb)의 단편과 목적단편에 해당한 크기의 단편으로 갈라진다.

EcoRI/NotI 2중제한분해산물에서 목적단편을 분리하여 같은 방법으로 2중제한분해한 pPIC9K와 재조합시키고 얻어진 재조합발현운반체에 대한 PCR검정과 제한분해검정을 진행하여 유전자조작의 정확성을 확인하였다.(그림 3)

또한 얻어진 재조합발현운반체에 대한 염기배열결정을 진행하여 합성된 *appA38M8*이

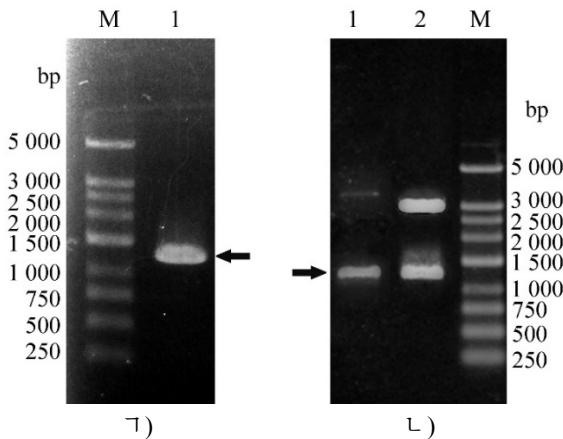


그림 2. 목적단편증폭을 위한 PCR과 2중제한분해에 의한 재조합클론화운반체에서의 목적단편확인용 위한 아가로스겔전기영동상

ㄱ) 목적단편증폭을 위한 PCR, ㄴ) 재조합클론화운반체에 대한 유전자검정; 아가로스겔농도 0.7%, M은 250bp DNA분자크기표식자, 1-검정PCR, 2-*EcoRI/NotI* 2중제한분해

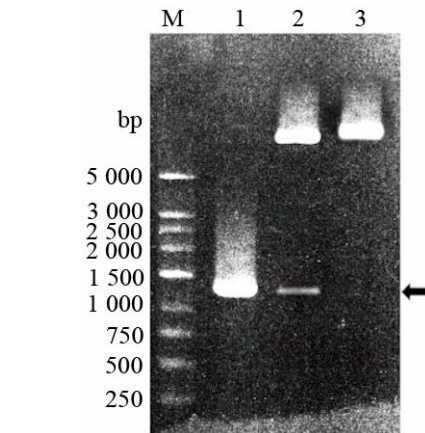


그림 3. PCR과 2중제한분해에 의한 재조합 발현운반체에서의 목적단편확인용 위한 아가로스겔전기영동상

아가로스겔농도 0.7%, M은 250bp DNA분자크기표식자, 1-검정PCR, 2-*EcoRI/NotI* 2중제한분해, 3-*EcoRI* 단일제한분해

해당 운반체의 목적하는 위치에 정확히 방향성삽입되었다는것을 확인하였다.

변이점도입과 코돈최적화를 통하여 새롭게 합성한 *appA38M8*의 재조합효모발현운반체 pPIC9K-*appA38M8*의 실제적인 발현특성과 발현산물의 효소학적특성변화에 대하여서는 메타놀동화효모발현체를 구축하여 더욱 연구를 심화시켜야 한다.

맺는 말

1) 피타제의 효소학적특성을 개선하기 위한 변이점들이 도입되고 *P. pastoris*에서의 발현에 합리적으로 코돈최적화된 피타제유전자 *appA38M8*을 합성하였다.

2) 합성된 *appA38M8*을 pPIC9K운반체에 *EcoRI*와 *NotI*를 리용하여 방향성삽입하여 재조합효모발현운반체 pPIC9K-*appA38M8*을 제작하였다.

참고 문헌

- [1] 최연아 등; 조선민주주의인민공화국 과학원통보, 2, 58, 주제104(2015).
- [2] Ashish A. Prabhu et al.; Process Biochemistry, 51, 709, 2016.
- [3] B. Fei et al.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 40, 5, 457, 2013.
- [4] B. Fei et al.; Curr. Microbiol., 66, 374, 2013.
- [5] James B. Garrett et al.; Appl. Environ. Microbiol., 70, 5, 3041, 2004.
- [6] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [7] F. F. Sun et al.; Enzyme and Microbial Technology, 92, 107, 2016.
- [8] W. Tzu-Hui; J. Biotechnol., 175, 1, 2014.
- [9] X. Zhao et al.; Shengwu Gongcheng Xuebao, 16, 308, 2000.

Gene Synthesis of an *appA* Variant for Improved Thermostability and Construction of Recombinant Yeast Expression Vector

Kim Ju Song, Kim Chol Ho and Hong Wan Gun

We have synthesized *appA38M8*, an *appA* variant, which has mutations to improve its enzymatic characteristics, and is codon optimized for expression by *Pichia pastoris*. The synthesized *appA38M8* was directionally inserted into vector, pPIC9K using *EcoRI* and *NotI*, to construct recombinant yeast expression vector pPIC9K-*appA38M8*.

Keywords: codon optimization, *Pichia pastoris*, *appA*, thermostability