

대장균재조합피타제(*appA*)의 분비형발현을 위한 발현체계의 구축

김송이, 김주성, 김철호

경애하는 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《먹이첨가제문제도 해결하여야 합니다.》

축산업발전과 환경보호에서 큰 의의를 가지는 대장균피타제를 실천에 도입하는데서 분비형발현체계를 구축하는것은 중요한 몫을 차지하며 이를 위한 연구[6]가 일부 진행되였다.

우리는 *Escherichia coli* 38의 피타제유전자의 분비형발현을 위하여 OmpA, PelB 및 자체신호배렬을 AppA성숙펩티드의 N-말단에 도입하여 클론화[2]한데 기초하여 그것의 발현체계를 구축하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

발현운반체들로는 《Novagen》의 pET-22b(+)와 pET-30a(+)를 리용하였다.

제한분해에는 *Nde* I과 *Hind* III, *Nco* I(《TaKaRa》)을, 재조합반응에는 T4 DNA리가제(《Promega》)를 리용하였다. 아가로즈겔DNA분리키트(《OMEGA bio-tek》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 리용하여 2중제한분해산물과 플라스미드를 각각 분리하였다. 기타 유전자조작들은 표준조작[3]에 준하여 진행하였다.

클론화용숙주로는 *E. coli* DH5 α 를, 발현숙주로는 *E. coli* BL21(DE3)을 리용하였다.

재조합피타제의 발현은 하루밤동안 배양한 재조합균주를 1% 되게 LB배지(Amp 100 μ g/mL, 혹은 Km 50 μ g/mL)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C, 200r/min에서 약 4h동안 초기배양을 진행한 다음 8mmol/L 젖당으로 25 $^{\circ}$ C, 200r/min에서 약 10h동안 유도배양하는 방법으로 진행하였다.

배양액에 분비된 재조합피타제는 배양물을 원심분리(4 $^{\circ}$ C, 10 000r/min, 1min)하고 상청액에 대한 SDS-PAGE와 피타제활성측정을 통하여 분석하였다.

SDS-PAGE는 선행방법[5]에 준하여 12% 겔에서 진행하였으며 피타제활성측정은 변경된 물리브덴청법[1]으로 진행하였다. 피타제효소활성 1U는 해당 반응조건에서 1min동안에 1 μ mol의 무기린을 생성하는 효소의 량으로 정의하였다.

결과 및 논의

OmpA와 PelB, AppA자체신호배렬을 AppA의 성숙펩티드의 N-말단에 도입하기 위한 재조합발현운반체를 그림 1과 같이 설계하였다.

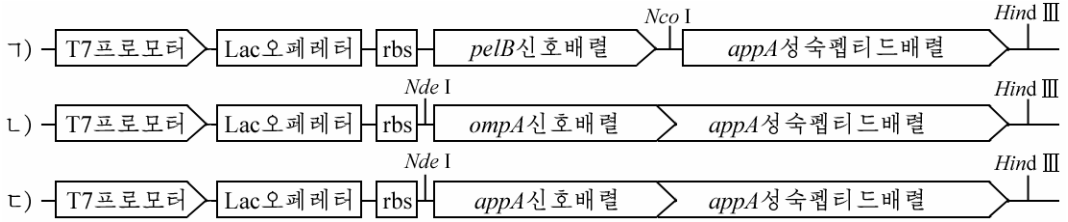


그림 1. 각종 신호배열도입을 위한 재조합발현운반체모식도

1) *pelB*신호배열, 2) *ompA*신호배열, 3) *appA*신호배열

*ompA*와 자체신호배열에 대해서는 pET-30a(+), *pelB*신호배열에 대해서는 pET-22b(+)를 발현운반체로 리용하였다.

설계에 따르는 재조합을 진행하기 위하여 목적토막이 클론화된 재조합플라즈미드[2]를 해당한 제한효소로 분해하고 전기영동을 진행하여 분리하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 T운반체(《TaKaRa》)에 클론화하였던 1.3kb정도의 토막과 3.0kb정도의 운반체가 완전분해되어 정확히 갈라졌으며 영동상에서 목적하는 토막들을 분리하여 재조합반응에 리용하였다.

*PelB*신호배열도입을 위하여 분리한 *appA*성숙펩티드암호화토막을 같은 2중제한분해로 선형화한 운반체 pET-22b(+)와 재조합하였다. 또한 *OmpA*신호배열과 *AppA*신호배열도입을 위하여 분리한 토막들도 해당한 2중제한분해로 선형화한 운반체 pET-30a(+)와 재조합하였다. 재조합산물들을 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시키고 해당한 항생소(Amp 100 μ g/mL 혹은 Km 50 μ g/mL)를 포함한 LB평판배지에 형성된 균무지들을 하루밤 배양하여 플라즈미드를 분리하였다. 얻어진 재조합플라즈미드들에 대한 PCR검정은 해당 토막들을 T운반체와 재조합시키는데 리용되었던 프라이머[2]를 리용하여 진행하였다.(그림 3)

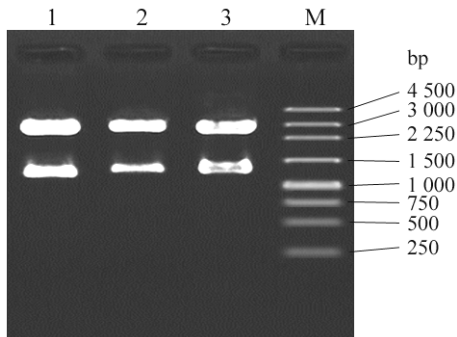


그림 2. 2중제한분해에 의한

목적유전자토막의 분리

1-*PelB*신호배열도입(*Nco* I+*Hind* III), 2-*OmpA*신호배열도입(*Nde* I+*Hind* III), 3-*AppA*신호배열도입(*Nde* I+*Hind* III), M-250bp DNA Ladder Marker

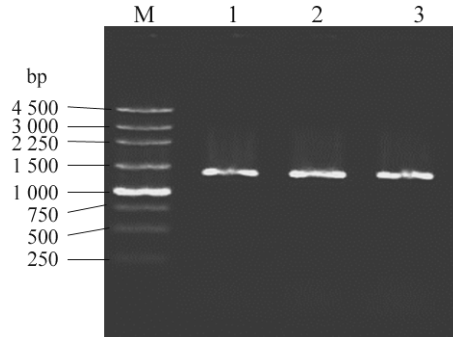


그림 3. 재조합발현플라즈미드들의 PCR검정

M-250bp DNA Ladder Marker, 1-*AppA*신호배열도입, 2-*OmpA*신호배열도입, 3-*PelB*신호배열도입

재조합플라즈미드들에 대하여 해당한 제한효소분해검정을 한 결과는 그림 4와 같다.

그림 3, 4에서 보는것처럼 PCR검정에서 목적하는 크기의 토막이 정확히 증폭되었으며 2중제한분해에 의하여 재조합발현플라즈미드들을 구성하는 운반체(약 5.4kb)와 삽입토막(약 1.3kb)의 크기를 확인하였다. 또한 재조합플라즈미드들에 대한 염기배열을 분석하여 삽입

된 토막들의 배열이 T운반체에 클론화되었던 토막들의 것[2]과 일치하다는 것을 확인하였다.(결과에는 보여주지 않음) 이로부터 *appA*의 분비형발현을 위한 발현플라즈미드들이 정확히 재조합되었다는 것을 알 수 있다.

얻어진 재조합발현플라즈미드들을 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시키고 유도배양한 다음 배양상청액에 대한 SDS-PAGE 분석을 진행하였다.(그림 5)

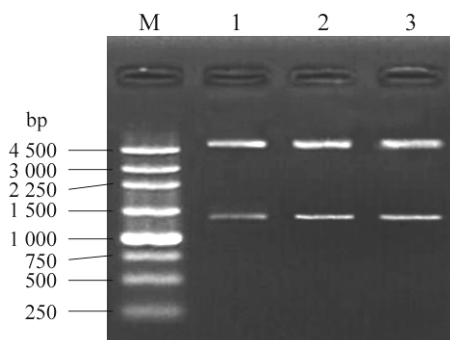


그림 4. 재조합발현플라즈미드들의 2중제한분해검정

M-250bp DNA Ladder Marker, 1-*appA* 신호배열도입, 2-*pelB*신호배열도입, 3-*ompA*신호배열도입

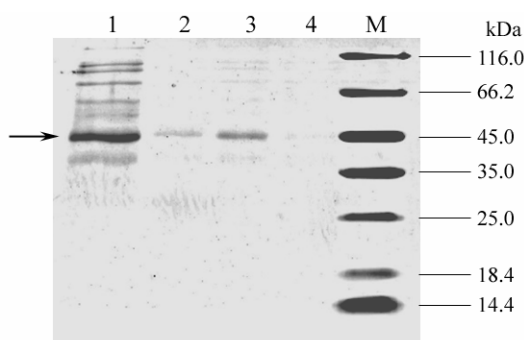


그림 5. 각이한 신호배열을 도입한 재조합피타제의 발현숙주의 유도배양상청액에 대한 SDS-PAGE

1-AppA, 2-OmpA, 3-PelB, 4-음성대조, M-단백질분자량표식자

그림 5에서 보는바와 같이 신호배열의 종류에 따라서 배양액속에 분비된 목적하는 크기(약 45kDa)의 단백질량에서는 큰 차이가 있었다. 자체신호배열을 리용하였을 때 그 량이 가장 많았으며 PelB, OmpA신호배열을 도입한 발현체계에서는 점차 분비량이 적어졌다. 세 가지 재조합발현운반체에서 신호배열을 제외한 영역들(프로모터, 오페레이터, rbs 등)과 그것들의 배치가 일치하며 같은 발현숙주와 유도방법을 리용하였으므로 분비량의 차이는 신호배열의 기능상의 차이라고 볼 수 있다. 음성대조로 리용한 피타제체내발현용 *E. coli* BL21(pET-28a-*appA*)[2]의 경우에는 영동상에서 해당 크기의 띠를 검출할 수 없었다. 이것은 *E. coli* BL21(pET-28a-*appA*)의 재조합발현계에서 AppA의 신호배열이 개시코돈 ATG의 바로 다음에 놓이지 못하고 그사이에 His꼬리와 T7꼬리를 비롯한 여분의 배열이 삽입되어 발현되므로 자체신호배열이 기능을 나타내지 못하였기 때문이라고 본다.

배양상청액과 균체의 초음파마쇄상청액의 피타제활성을 측정하였다.(표 1)

활성 측정결과 AppA 자체신호배열을 리용한 발현체계에서 배양액의 재조합피타제활성이 가장 높다는 것이 확인되었으며 이것은 SDS-PAGE결과와 일치한다. 이것은 분비된 폴리펩티드가 배양액환경에서도 온전한 공간구조를 유지하면서 피타제활성을 나타낸다는 것을 보여준다.

표 1. 각이한 신호배열을 도입한 발현체계에서 배양상청액과 균체내의 피타제활성

신호배열	피타제활성 /(U·mL ⁻¹)		
	배양상청액	균체초음파 마쇄상청	총활성
음성대조	—	95.6	95.6
AppA	27.5	52.8	80.3
OmpA	6.2	21.4	27.6
PelB	12.8	59.2	72.0

선행한 연구들에서 널리 리용된 OmpA와 PelB신호배열[4]에 비하여 더 우수한 분비능력을 나타낸 대장균피타제유전자의 자체신호배열은 표 2와 같다.

표 2. 분비형발현체계구축에 리용된 신호배열들

구분	염기 및 아미노산배열
AppA신호	ATGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTATCTCTTCTGATTCCGTTAACCCCGCAATCTGCATTGCGT M K A I L I P F L S L L I P L T P Q S A F A
OmpA신호	ATGAAAAAGACAGCTATCGGATGTCAGTGGCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCC M K K T A I A I A V A L A G F A T V A Q A
PelB신호	ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCC M K Y L L P T A A G L L L L A A Q P A M A

강조체로 표시한것은 양전하를 띤 말단이고 밑줄로 표시한것은 극성절단구역임

표 2에서 보는바와 같이 자체신호배열은 다른 신호배열들과 마찬가지로 양전하를 띤 말단과 중심의 소수성핵, 극성절단구역으로 구성되어있다.

대장균에서 재조합단백질의 분비형발현은 아직 해결해야 할 문제가 많고 응용잠재력이 매우 큰 대상이라고 할수 있다. 단백질의 분비형발현에서 가장 중요한 요소의 하나가 신호배열인데 모든 단백질에 보편적인 신호배열은 아직 발견되지 않았다.

우리의 연구에서는 재조합단백질의 분비형발현에 가장 널리 리용되는 PelB나 OmpA신호배열보다도 피타제자체의 신호배열이 더 효과적인것으로 판정되었다. 대장균피타제가 원래 페리플라즘호소이고 자체신호배열과 성숙펩티드사이의 적합성이 그 어떤 다른 배열보다도 좋기때문이라고 본다. 자체신호배열에 의한 분비효율을 더 높일수 있는 배양방법을 찾아내고 실천에 응용하기 위한 연구가 더 심화되어야 한다.

맺 는 말

AppA성숙펩티드의 N-말단에 OmpA, PelB 및 AppA신호배열을 도입하기 위한 발현플라스미드들의 재조합과 유전자검정을 진행한 결과 얻어진 재조합플라스미드들은 목적하는 신호배열들을 도입한 유전자토막(약 1.3kb)을 포함하고있다. 재조합발현균주들의 유도발현 실험결과 도입한 신호배열들에 의한 배양액에서의 재조합피타제의 분비와 효소활성이 확인되었으며 그 수준은 37°C, 200r/min에서 약 4h동안 초기배양을 진행한 다음 8mmol/L 젓당으로 25°C, 200r/min에서 약 10h동안 유도배양을 진행할 때 AppA자체의 신호배열을 리용한 재조합발현체계에서 27.5U/mL로서 가장 높다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [2] 김송이 등; 생물학, 3, 35, 주체105(2016).
- [3] J. Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1~300, 2001.
- [4] Shau-Ping Lei et al.; Journal of Bacteriology, 169, 4379, 1987.
- [5] U. K. Laemmli et al.; Nature, 227, 680, 1970.
- [6] Lei Wang et al.; Int. J. Mol. Sci., 15, 12842, 2014.

주체105(2016)년 4월 5일 원고접수

Construction of Recombinant Expression System for Secretory Production of *Escherichia coli* Phytase(*appA*)

Kim Song I, Kim Ju Song and Kim Chol Ho

We have constructed the recombinant expression system by introducing OmpA, PelB and native signal peptide into N-terminus of AppA of *Escherichia coli*, and carried out gene test to ensure the size of inserted gene segment (about 1.3kb). According to the lactose induction of recombinant strains, recombinant phytase was secreted into the medium by introduced signal peptides, and the native signal peptide showed the highest level of secretion as 27.5U/mL, when the strain was initially cultivated for 4h at 37°C, 200r/min, and then induced by 8mmol/L of lactose for 10h at 25°C, 200r/min.

Key words: *appA*, *Escherichia coli*, secretory production, recombinant phytase