

## 대장균피타제성숙펩티드의 재조합발현계 구축과 발현특성

김복신, 김주성

넓은 응용범위를 가진 피타제에 대한 연구에서 생산성을 높이기 위한 배양조건의 최적화와 함께 재조합발현계의 구성요소들의 작용방식을 해명하는것은 중요한 의의를 가진다.[4-6]

우리는 이미 체내발현형 및 분비형발현계가 구축된 대장균피타제(AppA)[1, 2]의 성숙펩티드에 대한 재조합발현계를 구축하고 발현특성을 밝혀 이 효소단백질의 접히기에서 신호배렬의 새로운 기능을 해명하였다.

### 재료 및 방법

클론화운반체로는 pGEM<sup>®</sup>-T vector(《Promega》)를, 발현운반체로는 pET 28a(《Novagen》)를 리용하였다. 제한효소로는 *Nco*I과 *Hind*III(《TaKaRa》)을, 재조합효소로는 T4 DNA리가제(《Promega》)를 리용하였다. 아가로스겔DNA분리키트(《OMEGA bio-tek》)와 플라스미드분리키트(《TIANGEN》)를 리용하여 유전자단편과 플라스미드를 각각 분리하였다.

피타제의 성숙펩티드암호화배렬을 증폭하기 위한 프라이머를 재조합에 리용할 제한효소를 고려하여 다음과 같이 설계하였다.

정방향프라이머: 5'-ATACCATGGCATTTCGCTCAGAGTGAGCCG-3'

역방향프라이머: 5'-TTTAAGCTTTTACAAACTGCACGCCGGTATG-3'

프라이머에 포함시킨 제한효소(*Nco*I, *Hind*III)의 인식배렬을 밑줄로 표시하였다.

유전자단편을 pGEM<sup>®</sup>-T vector에 클론화하기 위한 PCR에는 LA Taq폴리메라제(《TaKaRa》)를 리용하였으며 PCR반응은 94℃ 5min→94℃ 변성 30s, 60℃ 아닐링 30s, 72℃ 연장 90s, 35회 순환→72℃ 연장 7min의 조건에서 진행하였다. 클론화용숙주로는 *E. coli* DH5α를, 발현숙주로는 *E. coli* BL21(DE3)을 리용하였다.

SDS-PAGE는 선행방법[7]에 준하여 12% 겔에서 진행하였으며 색밀도분석에는 전용프로그래(《Quantity One 4.2.2.9》)를 리용하였다.

피타제활성측정은 변경된 몰리브덴청법[2]으로 진행하였다.

### 결과 및 논의

재조합플라스미드 pET-28a-appA[2]를 주형으로 성숙펩티드암호화배렬증폭을 위한 PCR를 진행하였다.(그림 1) 성숙펩티드암호화배렬의 크기에 해당하는 영동띠가 해당 주로에 정확히 나타났다. 증폭산물로부터 선행방법[3]에 준하여 클론화운반체와 발현운반체를 제작하고 얻

어진 재조합플라스미드들에 대한 PCR검정과 2중제한분해검정(그림 2)을 진행하였다.

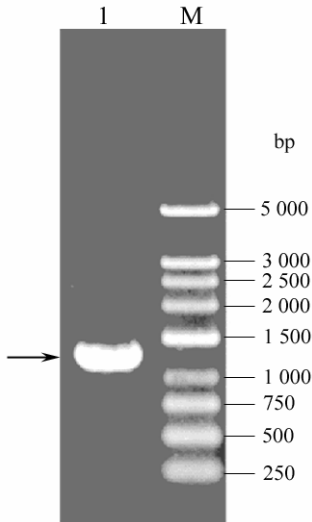


그림 1. 목적단편증폭을 위한 PCR산물의 전기영동상

1-AppA의 성숙펩티드 암호화배열, M은 분자 크기표식자

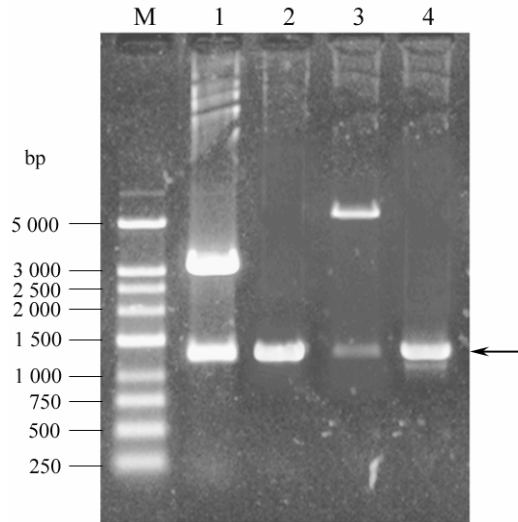


그림 2. 재조합운반체들에 대한 유전자 검정산물의 전기영동상

M은 분자크기표식자, 1, 2-AppA의 성숙펩티드암호화배열을 재조합시킨 클론화운반체의 *NcoI/HindIII* 2중제한분해 및 PCR검정, 3, 4- 성숙펩티드배열만을 발현시키기 위한 발현운반체의 *NcoI/HindIII* 2중제한분해 및 PCR검정

그림 2에서 보는바와 같이 *NcoI/HindIII* 2중제한분해를 통하여 재조합운반체들은 예상되는 크기의 해당한 단편들로 절단되었으며 PCR검정에서는 삽입단편의 크기에 해당하는 산물이 증폭되었다. 또한 운반체에 대한 배열분석을 통하여 AppA성숙펩티드암호화배열이 정확히 삽입되었다는것을 확인하였다.(결과는 보여주지 않음.)

재조합발현운반체를 발현숙주 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 재조합발현계를 구축하고 *E. coli* BL21(pET-28a-appA)[3]을 대조로 그것의 최적발현조건에서 두가지 발현계에 대한 유도배양을 진행한 다음 균체의 초음파마쇄상청의 피타제활성을 측정하였다. 유도발현 결과 N-말단에 일부 꼬리표(tag)배열과 자체신호배열을 함께 발현시키는 대조구에서 초음파마쇄상청의 피타제활성은 103.8U/mL로서 선행연구결과[2]와 일치하였지만 성숙펩티드만을 발현하는 균주에서는 배양상청과 초음파마쇄상청에서 검출가능한 피타제활성이 나타나지 않았다. 이 균주에 대하여 각이한 젖당농도(2~10mmol/L)와 온도(16~28°C)에서 유도배양을 진행하였으나 피타제활성은 검출되지 않았다.

최적발현조건에서 유도배양한 균체의 초음파마쇄상청과 침전물에 대한 SDS-PAGE분석을 진행하였다.(그림 3)

그림 3에서 보는바와 같이 두 발현계에서 유사한 크기를 가진 목적단백질이 고발현되었지만 그것의 풀림성에서는 큰 차이가 있었다. 색밀도분석법으로 측정한 결과 대조구에서는 발현된 재조합단백질중 97%이상인 풀림성상청속에 포함되었으나 새롭게 구축한 성숙펩티드의 발현계에서는 대부분이 불용성봉입체형태로 발현되었다. 두가지 발현운반체에서 N-말단암호화영역을 제외한 나머지 핵산배열이 공통이라는것을 고려하면 이러한 차이는 풀

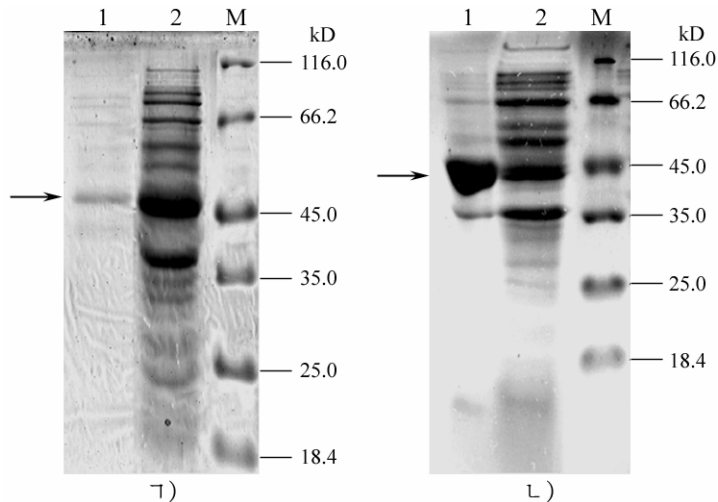


그림 3. 재조합발현계의 유도배양산물에 대한 SDS-PAGE상

1) 대조, 2) 성숙펩티드의 발현계; 1-침전물(5배 농축),  
2-상청, M-단백질분자량표식자(《Fermentas SM0431》)

리펩티드사슬의 N-말단에 일부 여분배열과 함께 부가된 자체신호배열에 의한 것이라고 볼 수 있다. 또한 성숙펩티드만으로는 온전한 접히기를 진행할수 없다는것을 확인할수 있다.

고초균피타제에 대한 선행연구[3]에 의하면 여분배열을 가진 신호배열은 국제화나 접히기와 같은 작용을 나타내지 못하고 오히려 체내발현효소활성을 낮추는 작용을 하였으며 그것은 신호배열에 있는 소수성영역[6]이 봉입체의 형성을 촉진하기때문이라고 보았다.

또한 지금까지는 N-말단에 신호배열을 가지고있는 AppA프레단백질이 세포사이질공간으로 수송되고 그곳에서 DsbA와 DsbC에 의하여 접히기와 디설피드결합형성을 진행하는 것으로 알려져있었다.[5, 6] 우리는 이번에 처음으로 여분배열을 가진 신호배열도 재조합피타제의 접히기와 활성발현에 충분한 효과를 나타내며 필수적이라는것을 확인하였다.

이 연구결과와 자체신호배열을 리용한 분비형발현계에 대한 선행연구[1]의 음성대조와 실험구들사이 발현량과 국제화수준에서의 차이에 대한 자료로부터 대장균발현계에 여분배열을 가진 신호배열을 인식하는 물질새가 존재하며 그것이 일정한 발현조건[2]에서 대부분의 재조합단백질을 활성형으로 접히지게 한다고 볼수 있다. 고초균피타제와 대장균피타제의 신호배열들사이의 이러한 차이는 기본적으로 단백질분자들의 구조적차이, 구체적으로는 디설피드결합의 개수와 린접상태에서의 차이[5]에 의한것으로 추측할수 있으며 AppA의 신호배열은 여분배열을 가진 상태에서도 비린접디설피드결합을 가진 다른 재조합단백질의 접히기에도 효과적으로 적용될수 있을것이다.

## 맺 는 말

1) 대장균피타제의 성숙펩티드를 발현하는 재조합발현계를 구축하고 그것의 발현특성을 밝혔다.

2) AppA의 자체신호는 N-말단으로부터 일정하게 떨어져있어도 충분한 접히기효과를 나타낸다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 62, 11, 119, 주체105(2016).
- [2] 김일성 종합대학학보(자연과학), 61, 4, 98, 주체104(2015).
- [3] 김철호 등; 생물학, 3, 7, 주체105(2016).
- [4] Grzegorz Kłosowski et al.; Molecules, 23, 848, 1, 2018.
- [5] Mehmet Berkmen et al.; Biol. Chem., 280, 11387, 2005.
- [6] F. J. M. Mergulhao et al.; Biotechnol. Advances, 23, 177, 2005.
- [7] U. K. Laemmili et al.; Nature, 227, 680, 1970.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

### **Construction of Recombinant Expression System of Mature Peptide of *Escherichia coli* AppA and Its Characterization**

*Kim Pok Sin, Kim Ju Song*

We constructed the recombinant expression system of *E. coli* AppA's mature peptide and characterized its expression and folding process to investigate the role of AppA's leader peptide.

The native leader peptide exhibits an efficient folding capacity though it is apart from the N-terminus.

Key words: AppA, mature peptide, leader peptide, folding