

재조합고초균피타제의 재구조화에 관한 연구

김철호, 김주성, 최연아

재조합단백질을 발현시키는데서 많은 경우 불용성단백질 침전물인 봉입체로부터 가용성의 활성형단백질로 회복(재구조화, refolding)시키는 문제가 제기된다.[3, 5, 7]

여러가지 시약을 리용한 봉입체단백질의 재구조화방법이 많이 연구되었지만 재구조화조건은 단백질의 종류에 따라 차이이며 보편적인 방법은 아직 없는것으로 되어있다. 특히 피타제의 재구조화에 대해서는 *Bacillus*속유래의 피타제에 대해서만 연구[6]되었을뿐이다.

우리는 *Bacillus subtilis* A1731로부터 클론화한 피타제유전자를 대장균에서 발현시킨데 이어 발현단백질중 적지 않은 몫을 차지하는 봉입체단백질의 재구조화를 실현하여 활성을 회복시키기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

균주로는 고초균피타제발현재조합대장균 *E. coli* Rosetta Gami(pET-phyNH)[2]를 리용하였다. 배지로는 LB배지를 리용하였다.

봉입체의 수집 피타제발현재조합대장균을 LB배지에 접종률이 1% 되게 접종하고 37°C, 200r/min에서 OD₆₀₀ = 0.5~0.6 되게 배양한다. 다음 0.4mmol/L 되게 IPTG를 첨가하고 25°C, 200r/min에서 11h동안 유도배양하였다. 유도배양액 10mL를 취하여 4 800r/min에서 10min동안 원심분리하여 균체를 모은다. 여기에 용균완충액(20mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 0.5mmol/L NaCl)을 10mL 넣고 균체를 현탁시킨다. 다음 초음파마쇄기를 리용하여 세포를 마쇄한 다음 이 현탁액을 4 800r/min에서 10min동안 원심분리하여 상청액을 제거하고 침전물을 얻는데 이것이 봉입체단백질이다.

봉입체의 가용화 얻어진 봉입체시료에 봉입체가용화완충액(50mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 8mol/L 뇨소)을 1mL 넣고 1h동안 진탕하여 봉입체단백질을 가용화한다.

봉입체의 재구조화 봉입체재구조화완충액 10mL에 가용화한 봉입체단백질용액 0.2mL를 방울방울 떨어뜨리면서 자석교반기로 교반한 다음 4°C조건에 방치한다. 시간별로 시료용액을 취하여 활성을 측정하고 재구조화정도를 평가한다.

피타제활성측정 피타제활성은 선행방법[2]에 준하여 측정하였다. 해당 조건에서 1min동안에 1μmol의 무기린산을 생성하는 효소량을 피타제활성 1U로 정하였다.

결과 및 논의

1) 재조합고초균피타제의 활성에 미치는 Ca²⁺의 영향

*Bacillus subtilis*피타제를 비롯하여 β-프로펠라포스파타제(BPP)속에 속하는 피타제는

안정성유지와 활성발현에 Ca^{2+} 을 필수적으로 요구한다.[4] 이로부터 Ca^{2+} 을 각이한 농도로 첨가해주면서 가용성상청액의 효소활성변화를 검토하였다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 Ca^{2+} 은 *Bacillus subtilis* 피타제의 활성발현에 필수적이며 2mmol/L의 농도에서 효소활성이 가장 높았다. 고초균유래의 피타제활성측정에 리용하는 완충액의 Ca^{2+} 농도는 일반적으로 1~5mmol/L이다.[5, 6] 이로부터 봉입체의 재구조화 완충액에서 Ca^{2+} 의 농도를 2mmol/L로 정하였다.

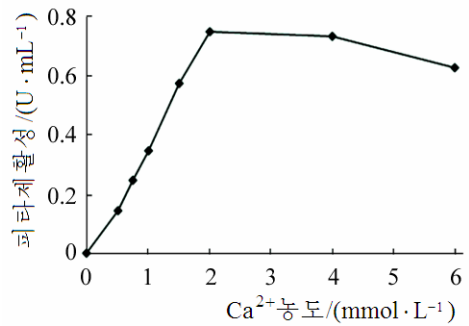


그림 1. Ca^{2+} 농도에 따르는 가용성 상청액의 피타제활성

2) 각이한 재구조화완충액에서 봉입체단백질의 재구조화

여러가지 저분자물질들을 재구조화완충액에 첨가하여 재구조화를 촉진시킨 연구결과들이 많이 발표되었다. 일반적으로는 높은 농도(8mmol/L)의 효소용액에서 봉입체단백질을 가용화하고 효소농도를 점차적으로 낮추는 방법으로 목적단백질을 재구조화시킨다. 그러나 효소만으로는 불충분하며 종종 여러가지 저분자용질들을 첨가하여 재구조화를 촉진시킨다.[7]

우리는 여러가지 보조제를 첨가한 완충액에서 봉입체로 발현된 피타제단백질의 재구조화에 대하여 검토하였다. 즉 기본완충액(50mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 50mmol/L NaCl, 2mmol/L CaCl_2)에 선행연구에서 효과가 비교적 높은것으로 인정된 보조제들(200mmol/L L-아르기닌, 10mmol/L β -메르캅토에타놀, 500mmol/L 프롤린, 50mmol/L 글리신)을 각각 첨가한 재구조화완충액을 교반하면서 여기에 가용화완충액(50mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 8mmol/L 효소)으로 가용화한 봉입체단백질용액을 방울방울 떨어뜨려 50배 희석하고 4°C조건에

방치하는 방법으로 실험을 진행하였다. 24h 지난 다음 시료의 피타제활성을 측정 한 결과 글리신이 가장 효과적이였다.(표) 글리신이 피타제의 효소활성에 영향을 미치지 않는다는것을 고려해볼 때 이것은 글리신이 재구조화과정의 보조제로 작용한 결과라고 볼수 있다.

표. 재구조화시약의 종류에 따르는 피타제활성

재구조화시약	피타제활성 (U·mL ⁻¹)
—	0.024
200mmol/L L-아르기닌	0.018
10mmol/L β -메르캅토에타놀	0.132
500mmol/L 프롤린	0.392
50mmol/L 글리신	0.906

3) 보조제의 처리농도와 처리시간이 재구조화에 미치는 영향

재구조화완충액의 글리신농도를 각이하게 변화시키면서 재생되는 피타제활성을 검토한 결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 50mmol/L까지 완충액의 글리신농도가 증가함에 따라 재구조화되는 피타제활성이 증가하고 그 이상에서는 유의성있는 차이가 없었다. 이로부터 재구조화시약으로서는

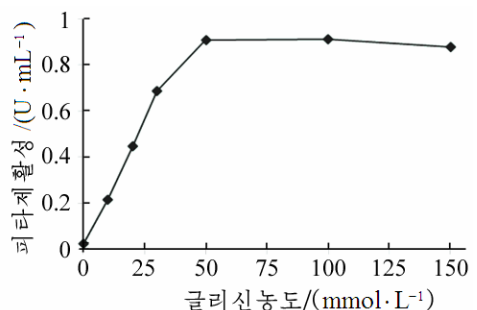


그림 2. 재구조화완충액에서 글리신 농도에 따르는 피타제활성변화

50mmol/L 글리신이 효과적이라는것을 알수 있다.

한편 봉입체로부터 효소활성이 회복되는데 걸리는 소요시간을 알아보기 위하여 0~150min동안 재구조화시킨 시료의 활성을 측정하였는데 결과 재구조화조작을 시작한지 60min 이내에 활성이 포화점에 이른다는것을 알수 있었다.(그림 3)

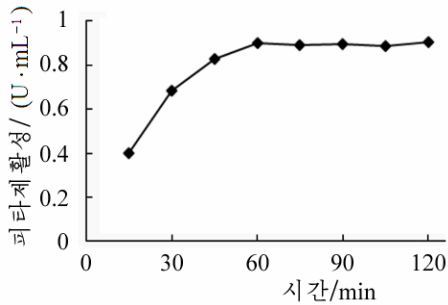


그림 3. 재구조화에 미치는 시간의 영향

단백질응집은 접혀지지 않은 폴리펩티드사슬의 비 특이적인 소수성호상작용 또는 부분적구조를 이룬 접히기중간체들의 틀린 호상작용에 의하여 일어날수 있다. *Bacillus subtilis* A1731피타제의 아미노산배열 (GenBank 등록번호 KT731134)[1]을 보면 Cys잔기가 존재하지 않으며 결국 디설피드결합이 이루어질수 없으므로 단백질응집의 기본원인을 소수성호상작용으로 볼수 있다.

선행연구에서는 *Bacillus* sp.유래의 피타제재구조화에 대하여 프롤린의 효과성이 가장 높다[6]고 하였다. 이번에 진행한 연구결과에 따르면 *Bacillus subtilis* A1731피타제에 대해서는 글리신의 재구조화효과성이 아르기닌이나 프롤린에 비하여 더 높다. 프롤린은 재구조화과정에는 간섭하지 않으면서 접히기중간체들의 호상작용을 감소시키는 응집억제제로 작용한다.[6]

한편 L-아르기닌은 재구조화완충액에서 가장 많이 리용되는 아미노산인데 구아니딘기를 가진것으로 하여 주로 강한 변성효과제로 재구조화에 긍정적인영향을 미친다. 글리신, 프롤린, 사탕 등과 같은 물질들은 주로 내부의 소수성호상작용이 부분적으로 혼란된 상태에 있는 단백질중간체들에 작용하여 용매에 로출된 비극성표면을 감소시키고 단백질내부의 소수성핵을 복귀시켜 정확한 재접히기가 이루어지도록 한다.[7]

또한 용액의 점성을 높여 단백질재접히기의 동력학적과정을 조절함으로써 부분적으로 접혀진 중간체들이 응집에 의해 파괴되지 않고 재접히기를 성공적으로 완성하도록 한다고 볼수 있다. 재구조화완충액에서 글리신의 농도가 증가함에 따라 효소활성이 증가한다는 사실(그림 2)이 이것을 증명해준다.

우리가 발현시킨 *Bacillus subtilis* A7131피타제의 아미노산배열과 선행연구에서 제기된 *Bacillus* sp.피타제(GenBank 등록번호 EF536824)[6]의 아미노산배열을 비교해보면 두 배열사이의 상동성은 72.11%에 달하며 소수성아미노산이나 산성 및 염기성아미노산의 조성에서는 차이가 거의나 없다.

맺는 말

50mmol/L 트리스-HCl, pH 8.0, 50mmol/L NaCl, 15mmol/L CaCl₂, 50mmol/L 글리신으로 구성된 봉입체재구조화완충액에서 *Bacillus subtilis* A1731유래의 재조합피타제를 1h이상 재구조화시켰을 때 봉입체의 재구조화가 효과적으로 진행된다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 61, 5, 112, 주체104(2015).
- [2] 김철호 등; 생물학, 3, 12, 주체104(2015).
- [3] A. Jungauer et al.; J. Biotechnol., 128, 587, 2007.
- [4] X. G. Lei et al.; Annu. Rev. Anim. Biosci., 1, 283, 2013.
- [5] D. E. C. S. Rao et al.; Journal of Applied Microbiology, 105, 1128, 2008.
- [6] T. T. Thi et al.; J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37, 279, 2010.
- [7] K. Tsumoto et al.; Protein Expression and Purification, 28, 1, 2003.

주체105(2016)년 12월 5일 원고접수

Refolding of Recombinant *Bacillus subtilis* Phytase

Kim Chol Ho, Kim Ju Song and Choe Yon A

To determine the appropriate refolding reagent, the denatured recombinant phytase was diluted in refolding buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 50mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 15 mmol/L CaCl₂) containing one of the different refolding co-solutes, viz 200 mmol/L L-arginine, 500 mmol/L proline, 50 mmol/L glycine and 10 mmol/L β -mercaptoethanol.

The maximum efficiency of protein refolding was achieved with 50 mmol/L glycine.

Key words: *Bacillus subtilis*, phytase, refolding, recombinant protein