

Ketoprofen ethyl ester에 대해 높은 광학 선택성을 갖는 (R)- 과 (S)-stereospecific esterase들의 클로닝과 서열분석 및 발현

김지연, 최기섭, 김근중, 유연우

아주대학교 분자과학기술학과

(031) 219-2455, FAX (031) 216-8777

Abstract

To isolate novel strains that hydrolyzed the rac-ketoprofen ethyl ester to ketoprofen in the stereospecific manner, we screened broad ecological niches and soil samples in which the activity was expected to be found. From thousands of strains, we isolated a *Pseudomonas* sp. S34 producing a (S)-stereospecific esterase, and a thermostable esterase with (R)-form selectivity was also obtained from *Bacillus stearothermophilus* JY144. To further analyse the gene structure and to induce a high level expression, two genes from each strain were cloned and sequenced. BLAST search results with the esterase gene from S34 revealed that both of gene (80-84 %) and amino acid sequences (89- 95 %) were highly conserved in the related esterases from *Pseudomonas strains (fluorescens and aeruginosa)*. The thermostable esterase from JY144, however, revealed a relative low homology (45-52 %) to other esterase and/or lipase from related strains. Obviously, a complete conversion with pure enantiomer (R- or S) were readily achieved by recombinant clones expressing either (R)- or (S)-stereospecific esterase.

서론

Ketoprofen (2-[3-Benzoylphenyl]propionic acid)은 비 스테로이드계 소염진통제 (Non-steroid anti-inflammatory Drugs, NSAIDs)로서 2-aryl-substituted propionic acid를 공통적으로 가지고 있는 profen류 NSAIDs의 한 종류이다. 이들은 체내 prostaglandin 생합성 과정의 촉매로서 작용하는 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다. 이러한 약리작용은 대부분 하나의 입체 이성질체의 효과에 의한 것이고 다른 이성질체의 경우는 약리 활성이 없거나 오히려 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 현재 시판되는 많은 광학 이성질체 화합물(racemate 형태)의 경우에, 활성이 없는 enantiomer가 인체 내에서 원하지 않는 대사경로를 유발할 위험성이 있으므로 순수한 형태의 enantiomer로 제조하여 사용하는 것이 바람직하다⁽¹⁾. Profen drug들은 모두 stereogenic center 양쪽에 커다란 두 그룹을 가지고 있고 입체 장애(steric hindrance)에 의해 이들이 입체적으로 서로 반대쪽에 위치하게 되는데, 순수한 입체

화합물을 얻기 위한 방법으로 profen drug의 ester 형태를 광학 선택적으로 kinetic resolution하는 방법이 가장 좋다고 알려져 있으며 이들에 대한 enzymatic resolution 방법이 다양하게 연구되어 왔다⁽²⁾. 본 연구에서는 광학적으로 순수한 (S)- or (R)-ketoprofen의 효소적 분할을 위한 신규 미생물의 탐색으로 얻어진 두 효소의 유전자 (R- and S-stereospecific)를 cloning한 후 염기서열을 분석하고 대량생산을 시도하였다.

재료 및 방법

Strain screening - 선별을 위한 시료로 전국 각지의 토양 및 퇴비 등을 이용하였고, tributyrin만을 탄소원으로 하는 선별배지를 이용하였다. 각각 30°C와 50°C 항온조에서 배양한 후, clear zone을 형성하는 균주를 1차 선별하였고, 이들을 선별한 온도에서 exponential phase까지 배양하여 균체를 회수한 후 효소원으로 이용하였다. 효소반응은 25 mM ketoprofen ethyl ester를 기질로 사용하고, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8) 조건하에서 24시간 반응시키며 시간별로 분석하였다.

Gene cloning - 각각의 균체에서 분리한 chromosomal DNA를 *Sau3AI*으로 partial digestion한 후 cloning vector로서 pBluescript II SK를 이용하여 유전자 library를 제작하였다. Library 제작에 이용된 vector로는 pBluescript II SK의 *EcoRI*과 *PstI* 위치에 GFP유전자를 삽입하여 발현되는 형광정도에 의해 positive와 negative clone을 구분할 수 있는 vector를 제작하여 사용하였다. Host cell은 *E. coli* XL1-Blue를 이용하였다. α -Naphthyl acetate와 Fast Blue RR을 이용한 esterase activity staining⁽³⁾을 통하여 clone을 1차 선별하였고, LB배지에서 배양한 후 whole cell을 이용한 효소반응을 통해 최종 선별하였다.

Sequence analysis - Chain termination method로 DNA sequencing을 수행하였고, pBluescript II SK의 T3, T7 universal primer를 이용하였다. 얻어진 결과는 gene and protein data bank를 통한 BLAST search를 수행한 후 관련된 유전자들과 Clustal X를 통해 비교하였다. ORF의 예측 및 분석은 DNAClub program을 이용하였다.

Analysis - Ketoprofen ethyl ester 및 효소반응으로 생성된 (S)- 또는 (R)-Ketoprofen은 HPLC를 이용하여 정량하였다. Chiral column (Chirex)을 사용하여 254nm에서 UV detector로 분석하였다.

결과 및 토의

선택배지(tributyrin)를 통해 일차 선별된 균체들 중, 효소활성 및 입체특이성이 우수한 효소원을 확보하기 위하여 광학분할을 시도한 후 (S)-stereospecific esterase

를 생산하는 S34 와 고온에서 안정하고 (R)-form에 선택성을 갖는 esterase를 생산하는 JY144를 분리하였다. 일반적인 균주 동정 과정을 통해 이들을 각각 *Pseudomonas* sp.와 *B. stearothermophilus*로 명명하였으며 16S rRNA 분석을 통해 확인하였다. On-off system의 원리를 활용한 cloning vector를 자체 제작한 후 genomic DNA library를 구축하여 esterase 활성을 갖는 positive clone을 activity staining을 통해 얻을 수 있었다. *Pseudomonas* sp. S34의 library로부터 esterase를 활성을 포함하는 DNA fragment (3.5 kb)를 얻었고, 동일한 과정을 통해 1.5 kb DNA fragment를 *B. stearothermophilus* JY144에서 얻을 수 있었다(Fig. 1). Subcloning 결과, *Pseudomonas* esterase gene은 *Hind* III-*Pst* I 사이에 있는 것으로 확인하였고 JY144 유전자의 경우 직접 sequencing에 이용하였다. Sequencing을 통해 얻어진 염기서열의 분석을 통해 S34 유전자의 경우, *P. fluorescens*와 *P. aeruginosa*에서 유래된 각각의 esterase와 80% 이상의 유사성을 보였으며 유사한 아미노산 서열로 구성되어 잘 보존되어진 protein family임을 확인 할 수 있었다. *Bacillus stearothermophilus* JY144 유래의 esterase의 경우, 648 base와 216 개의 amino acids로 구성되어진 새로운 형태의 esterase로 확인되어 졌으며, BLAST search를 통한 검색결과 *S. coelicolor* 유래의 esterase/lipase와 52 %, *B. stearothermophilus* 유래의 esterase와 47 %, *Bacillus thermoreovorans* 유래의 esterase와 45 %의 유사성을 나타내었다. 또한 60번째 아미노산에 일반적으로 알려진 esterase의 active site 의 consensus sequence인 Gly-X-Ser-X-Gly⁽⁴⁾이 존재함을 알 수 있었다.

Cloning을 통해 얻어진 유전정보(염기서열 및 아미노산서열)를 이용하여 각각의 효소의 최적 발현시스템을 구축하였다. 대량발현을 유도한 재조합 균체를 활용하여 실제 효소반응을 수행한 결과, 반응조건에 따라 enantiomeric excess (ee) value가 변하는 wild type과는 달리 이론 값(50%)에 근접한 수율로 99 %이상의 ee 값을 갖는 순수한 (S)- 그리고 (R)-form의 광학 이성질체를 생산할 수 있었다.

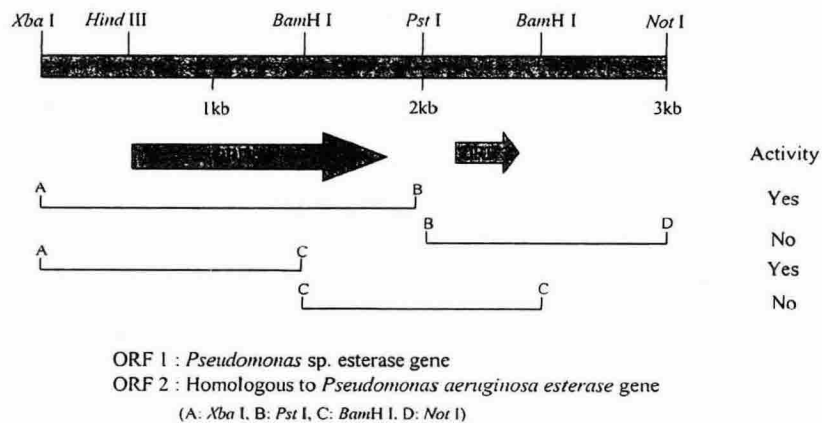
요약

토양으로부터 특이적인 광학 이성질체에 활성을 갖는 두 효소원을 선별한 후, 동정하여 *Pseudomonas* sp. S34와 *B. stearothermophilus* JY144로 명명하였고, gene cloning과 sequencing을 통해 유전자의 특성 및 관련효소들과의 유연관계를 규명하였다. 규명된 정보의 분석과 비교를 통해 ketoprofen ethyl ester에 활성을 갖는 효소들의 구조적 특성을 추론할 수 있었고, 이를 바탕으로 발현시스템을 구축하였다. 대량생산된 효소를 활용한 반응의 결과 높은 수율과 순도를 갖는 각각의 광학이성질체를 경제적으로 생산할 수 있었다.

참고문헌

1. Mauleon, D., R. Artigas, M. L. Garcia, and G. Caganico, (1996), *Drugs*, 52, 24-46
2. Magolin, A. L. (1993), *Enzyme and Microbiology Technology*, 15, 266-280
3. V. Khalameyzer, I. Fischer, U. T. Bornscheuer, and J. Altenbucher, (1999), *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 477-482
4. H. J. Park, W. J. Choi, E. C. Huh, E. Y. Lee C. Y. Choi, (1999), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 545-547
5. M. B. Nthangeni, H. G. Patterson, A. Tonder, W. P. Vergeer, D. Litthauer, (2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 705-712

A. *Pseudomonas* sp. esterase gene



B. *Bacillus stearothermophilus* esterase gene

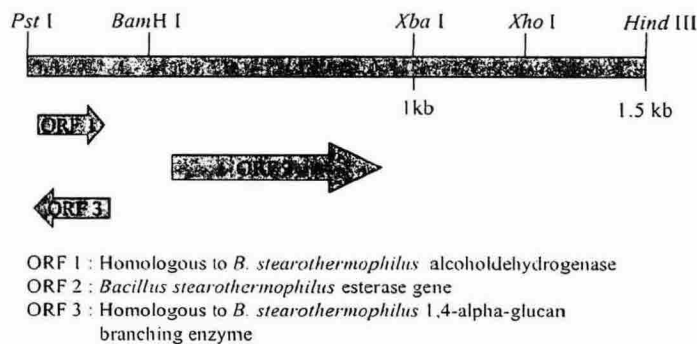


Fig. 1. Restriction map of *Pseudomonas* sp. S34 esterase and *Bacillus stearothermophilus* JY144 esterase