

**One-step purification and biochemical characterization of
a (S)-stereospecific esterase from *Pseudomonas fluorescens* KCTC
1767**

최기섭, 김지희, 김지연, 김근중, 유연우*
아주대학교 분자과학기술학과 발효대사공학실험실
전화 (031) 219-2455 FAX (031) 216-8777

Abstract

The *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767, a selected and identified as potential candidate for stereo-specific resolution of rac-ketoprofen ethyl ester, was systematically investigated in order to induce the high level expression and detailed characterization of the expressing enzyme esterase. We cloned the esterase gene from chromosomal DNA of *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 by PCR with two synthetic primers that designed for simple purification. The recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 exhibited a high conversion rate and enantioselectivity to the (S)-ketoprofen ethyl ester as expected. The enzyme was easily purified to homogeneity by using a metal chelating affinity chromatography as a protein with poly histidine tag, and thus obtained 0.6 mg of protein from a 100 mL culture broth in a single step. The purified enzyme was steadily stable at the pH range from 7.0 to 10. The activity was also retained to be about 70% after the preincubation at 40 °C but over 50 °C lost the activity completely. The molecular mass of the esterase was estimated to be about 43 kDa on SDS-PAGE, and an identical result was also shown in gel filtration chromatography. The specific activity was calculated 27 mM/mg-protein/min by using the rac-ketoprofen ethyl ester as a substrate.

서론

류마티스성 관절염 및 통증의 치료제로 쓰이는 Ketoprofen(rac-2-[3-benzoyl phenyl] propionic acid)은 비스테로이드계 소염진통제로서 2-aryl-substituted propionic acid를 공통적으로 가지고 있는 profen의 한 종류이다. 이들은 체내의 prostaglandin 생합성 촉매제인 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서 결국 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다. 2-arylpropionic acid의 (S)-isomer가 (R)-isomer의 약리적 활성보다 매우 강하여 비대칭적 합성이나

Kinectic resolution에 관한 연구에 관심이 집중되고 있다.

본 연구에서는 기존에 (S)-ketoprofen에 광학활성을 갖는 균주에서 분리된 효소들의 생화학적 특성과 유전정보를 활용하여 관련된 효소들을 탐색한 후, 분석된 결과를 바탕으로 PCR-cloning을 시도하였다. 결과적으로, 단백질 혹은 유전자 수준에서 연관성이 추정되어지는 하나의 esterase family를 *Pseudomonas* 속의 균주들로부터 확인 할 수 있었다. 따라서 *Pseudomonas* 속과 연관된 degenerate primer를 제작하여 공시균주에서 PCR을 수행한 후 pTrc99A vector에 cloning하였고, 그 중 *Pseudomonas fluorescence* KCTC 1767의 clone에서 활성을 갖는 재조합 esterase를 얻을 수 있었다. 단일 단계로 순수하게 정제하기 위해서 pQE30 system에서 발현시켜 histidine tagged protein을 얻었고 metal binding resin을 이용하여 순수하게 정제된 esterase를 얻을 수 있었으며, 이 효소를 이용하여 일반적인 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

Esterase를 cloning하기 위해 *E. coli* XL1-Blue 와 pTrc99A vector를 사용하였고 공시균주에서 PCR을 수행하기 위하여 degenerate primer를 제작하였으며 반응액은 normal PCR조건을 사용하였다. 반응은 denaturation을 94°C에서 1분, annealing은 52°C에서 1분, extending은 72°C에서 50초간 실시하였다.

Gene bank에 등록된 *Pseudomonas* 균주에서 유래한 esterase의 nucleotide sequence를 토대로 하여 5' 말단에는 *EcoR* I 인식부위를 만들고, 3' 말단에는 *Pst* I 인식부위를 만든 25-mer primer를 제작하였다. pTrc99A에 cloning한 후 esterase gene에 대하여 sequencing을 하였으며, 이 결과를 토대로 새로운 primer를 제작하여 subcloning에 사용하였다. 또한 pQE30으로의 subcloning시에는 제한효소 인식부위 중 5' 말단부위를 *Bam*H I 으로 바꾼 primer를 사용하였다.

단일 과정을 통하여 단백질을 순수분리하기 위하여 PCR product를 pQE30 vector에 cloning한 후 transformation된 *E. coli* XL1-Blue를 ampicillin(100ug/mL)이 첨가된 Luria Bertani 액체배지에서 초기 대수증식기(OD₆₀₀ 0.5)까지 배양한 후 IPTG(최종농도 0.3mM)를 넣어서 2시간 30분동안 유전자 발현을 유도하였다. Histidine tagged protein의 정제를 위해서는 Ni-NTA resin(Qiagen Co.)을 사용함으로써 얻었다. Native PAGE 실시 후 α -Naphthyl acetate를 이용하여 activity staining하였고 효소활성이 있는 band를 확인하였다.

DNA sequencing으로 효소의 크기를 알아보았고 최적 pH와 최적 온도, 그리고 pH와 온도의 stability를 알아보았다.

결과 및 고찰

Degenerate primer를 이용한 PCR 실험에서 *Pseudomonas* 속의 genomic DNA를 template로 사용하여 생성물을 형성하였고 transformation한 후에 agar plate상에서 activity staining을 하였을 때 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767이 활성을 나타내었다. PCR product를 제한효소 *EcoR*I 과 *Pst*I으로 절단한 후 pTrc99A vector에 cloning하였으며 정제를 쉽게하기 위하여 Histidine tagged protein을 생성하는 pQE30 vector에 5' 말단부위의 제한효소를 바꿔 절단한 DNA fragment를 삽입하였다.(Figure 1) pTrc99A를 주형으로 한 PCR생성물을 sequencing 한 결과 GeneBank에서 기존에 발표된 esterase들과 아주 높은 상동성을 보였다. Esterase 효소들에서 보이는 active site의 보존적인 서열(G-X-S-X-G)을 볼 수 있으며 carboxylesterase와 아미노산 서열상에서 90% 이상의 상동성을 보였고 nucleotide 서열비교에서도 80%이상의 상동성을 확인할 수 있다.

pQE30 vector system 에서 poly histidine tag를 가진 protein을 생성하여 chelating affinity chromatography로 순수 분리된 esterase를 쉽게 얻을 수 있었고 0.6 mg/100 mL을 얻었다. 이 효소는 ee값이 100%로 (S)-ketoprofen에 대해서만 특이적으로 반응하며 높은 전환률을 보였다. 순수 분리된 효소는 pH8.0에서 가장 안정하였으며 pH10에서 최적으로 알카리 조건에서 매우 안정한 특성을 보였다. 최적 온도는 30 ℃이며 50 ℃이상에서 매우 불안정하였다.(Figure 2) SDS-PAGE상에서 esterase size는 43 kDa으로 추정되었고 gel filtration chromatography 에서도 이와 같이 추정되었다. Ketoprofen ethyl ester에 대한 specific activity는 27 mM/mg-protein/min이다.

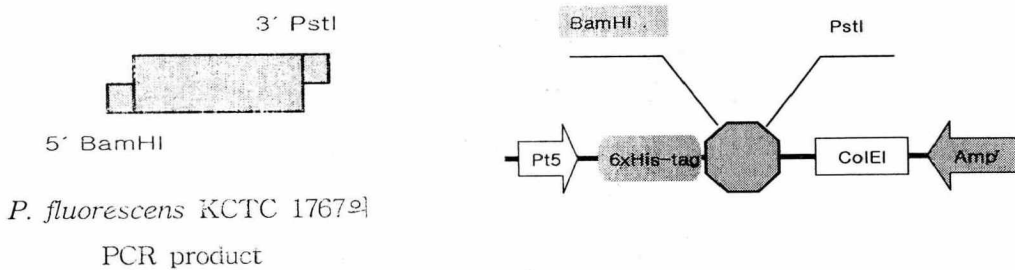


Figure 1. Schematic diagram of the esterase gene was subcloned to pQE30 expression vector

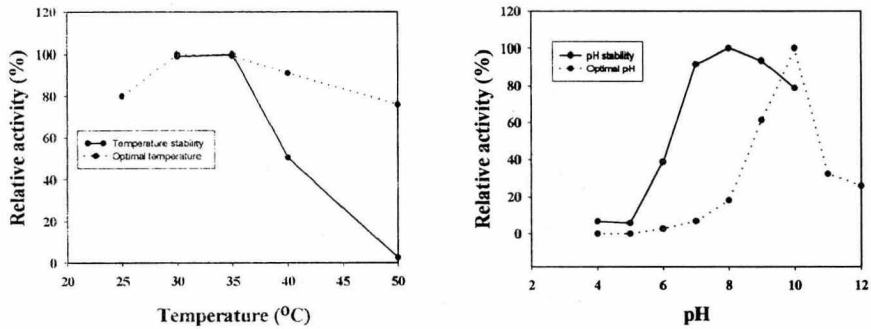


Figure 2. The pH and temperature properties of (S)-ketoprofen ethyl ester hydrolase from *p. fluorescens* KCTC 1767

참고문헌

1. V.Khalameyzer, I.Fischer, U. T. Bornscheuer, and J. Altenbuchner" Screening, Nucleotide Sequence, and Biochemical Characterization of an Esterase from *Pseudomonas fluorescens* with High Activity towards Lactones"(1999), App. Env. Microb, 65(2), 477-482
2. Teresa Sanchez, Juan J. Moreno, "Ketoprofen S(+) enantiomer inhibits prostaglandin production and cell growth in 3T6 fibroblast cultures"(1999), Eur. J. Pharm, 370, 63-67
3. J.W. Kim, Y. S. Shim and S. S. Yoon," Isolation and Purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. YJ103 isolated from Raw Milk"(1997), Korean J. Dairy Sci, 19(1), 17-24
4. N. Krebsfinger, F.Zocher, J. Altenbuchner, and U.T. Bornscheuer," Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*"(1998), 22, 641- 646