

## Directed evolution을 이용한 (S)-Ketoprofen ethylester의 광학분할용 Esterase의 특성 개량

김승범, 김지희, 유연우\*  
아주대학교 분자과학기술학과  
전화 (031) 219-2449, FAX (031) 216-8777

### Abstract

As for the purpose, we first introduce an random mutation into wild-type gene to expand a mutation space, and then further recombine the mutant genes by staggered extension process PCR. As a result, we obtained the best clones 6-52 that showed a high activity and stability, from a round of error prone and staggered extension process PCR. The purified enzyme showed a similar pH stability to the wild-type enzyme and reveal a slightly high optimum pH at 12. In the optimum temperature, an identical dependency was also showed and a quite high stability in the thermal stability was obtained. Along with this, the enzyme was also stable at a reaction that supplement with a 15 % of ethanol as an additive. The addition of other solvents and surfactants did not improve the reaction and thus resulted in a similar profile to those of wild-type enzyme. The specific activity on the target compound rac-ketoprofen ethyl ester was calculated to be about 85, 000 unit, and the kinetic constants  $K_m$  and  $V_{max}$  were determined to be 0.2 mM and 90 mM/mg-protein/min, respectively. The deduced amino acid alignment with the wild type enzyme revealed five mutations at L120P, I208V, T249A, D287H and T357A. Based on these observations, the site directed mutagenesis to delineate the mutagenic effect is under progress.

### 서 론

Chiral drugs 중에서 류마티스성 관절염 및 통증의 치료제로 쓰이는 ketoprofen (*rac*-2-[3-Benzoylphenyl]propionic acid)은 비스테로이드성 소염진통제 (Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs, NSAIDs) 로서 2-aryl-substituted propionic acid를 공통적으로 가지고 있는 profen의 한 종류로써 체내의 prostaglandin 생합성 촉매제인 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서 결국 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다.<sup>1)2)</sup>

Esterase란 가수분해효소 중에 에스테르결합을 가수분해하는 효소의 총칭으로서, 이

러한 esterase는 주로 이화과정에서 ester 결합을 가수분해하게 되는데, pH 5~8 및 30°C~37°C의 온도 조건에서 가장 우수한 활성을 갖는다.

Directed evolution technique에는 일반적으로 DNA shuffling, Error prone PCR(ep PCR), Staggered extension process(StEP)를 이용되고 있으며, H. Zaho<sup>3,4)</sup>는 directed evolution을 이용하여 *Bacillus subtilis* subtilisin E를 *Thermiactinomyces vulgaris*의 thermophilic enzyme인 thermitase의 특성을 갖도록 개량하는 연구를 수행하였다. Subtilisin E를 ep PCR에 의하여 random mutagenesis를 수행하고, 이를 StEP에 의하여 *in vitro* recombination한 후에 *B. subtilis*에 transformation하여 96well plates 방법을 통해 screening 하였다. 이 결과 83°C에서 enzyme의 half life가 200배 이상 증가되었고 optimum temperature가 76 °C까지 증가됨을 보였다. 이 실험을 통하여 directed evolution은 enzyme의 thermostability 증진에 효율적인 방법임을 실증하였다. Stemmer<sup>5)</sup>는 Wild type의 GFP를 3번의 DNA shuffling과정을 통해 fluorescence가 45배 증가한 mutant를 최종적으로 screening 한 연구 결과를 보고 하였고, 세 번에 걸친 shuffling으로 hydrophilicity가 증가하는 방향으로 mutation이 일어남으로써 soluble form이 증가하고 aggregation을 막을 수 있었기 때문이라고 발표하였다. Bornscheuer UT<sup>6)</sup>는 esterase gene을 가지고 ep PCR을 수행하여 enantioselectivity를 향상 시킨 연구 결과를 보고하였다.

Random mutagenesis에 의해서 무작위로 error를 유발하여 변이 단백질을 제조한 후 아미노산 residue의 변화에 따른 특성을 연구하고자 하였고 변이효소의 특성 분석을 바탕으로 일련의 과정을 통해 목적에 맞는 특성을 지닌 효소를 얻을 수 있을 거라 생각되며 이를 통해 실제 산업적 응용이 가능한 효소원을 선별하고자 하였다.

## 재료 및 방법

1. (S)-ketoprofen ethyl ester에 대한 높은 광학활성이 있는 균주인 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 (Korea Collection for type Culture)의 esterase coding 유전자를 pQE30에 cloning하고 이 esterase gene을 template로 사용하여 ep PCR을 실시하고 그 결과 gene당 2~3개의 base가 변환된 유전자를 template으로 하여 StEP을 실시하였다. Esterase 유전자를 형질전환하기 위한 host strain은 *E. coli* XL1-blue를 사용하였다

2. primary screening은 50°C에서 2시간반응 후  $\alpha$ -naphthyl acetate를 이용한 Urakami와 Komagata의 방법<sup>7)</sup>을 이용한 activity staining 으로 향상된 균주를 screening하였으며, 이 균주들 중 우수한 특성이 보여 지는 균주들의 esterase를 정제한 후, activity와 50°C에서의 thermostability를 HPLC 통해 비교 분석 하여 Wild type보다 activity와 stability가

향상된 균주를 2차 screening하였다.

3. Ni-NTA resin을 사용하여 affinity chromatography를 수행하여 6개의 histidine이 N-terminal 부위에 결합된 esterase를 정제 하였고 protein 효소를 3 $\mu$ g 취한 후, 광학활성과 50 $^{\circ}$ C에서의 안정성을 알아보았다.

4. 효소에 의한 ketoprofen ethyl ester의 resolution은 Chirex phase 3005(phenomenex Co. USA)을 사용하여 UV detector로 254 nm에서 분석하였다. 이동상의 용액은 methanol (99% 이상)에 최종농도가 0.03 M이 되도록 ammonium acetate를 첨가하여 사용하였다.

### 결과 및 고찰

1. Error prone PCR과 StEP를 실시 한 후 1차와 2차 screening을 통해서 mutant6-52, 8-37, 9-26, 10-11를 선별하였다.

Table 1. (R)- or (S)-ketoprofen formation from Ketoprofen ethyl ester by mutant strain selected.

Strain	Conversion yield (%)	EEp(%)*	50 $^{\circ}$ C, 2h conversion yield (%)	EEp(%)*
Wild type	28.9	100	0.2	100
6-52	43.4	94.1	12.8	100
8-37	42.2	95.7	4.27	100
9-26	43.6	95.3	3.8	75.0
10-11	36.2	100	2.8	

\* (S)-ee value of predominant product

Number	1	2	3	4	5
Strain number	wild type	6-52	8-37	9-26	10-11

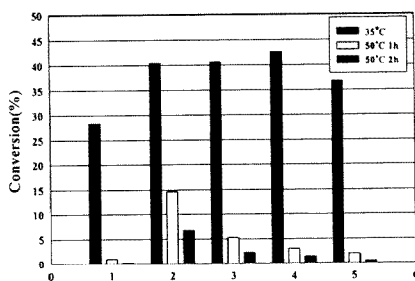


Figure 1. Enantioselective hydrolysis of the mutants in various temperature range and reaction time. the mutants in 15% Ethanol.

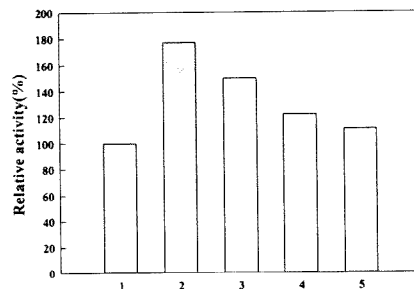


Figure 2. Enantioselective hydrolysis of the mutants in 15% Ethanol.

2. 최종 선별된 균주의 esterase는 고온에서도 안정함을 보였고 15% ethanol에서 같은 pattern을 보였다. 이 중에서 고온에서 가장 안정한 mutant6-52를 최종 선별하여 일반적인 특성을 알아보았다. 아미노산 분석결과 5개의 아미노산이 L120P, I208V, T249A, D287H, T357A로 변환 되었다. 극성이고 비전하인 249번째인 Threonine이 비극성이고 소수성 아미노산으로 변환 하였고 나머지는 대부분은 같은 성질로 변환 되었다.

3. 정제된 효소의 pH에 대한 안정성은 pH 8.0 이상에서 안정하였으며, pH 6.0 이하에서는 활성이 급격히 감소하여 산성조건에서는 불안정함을 확인할 수 있었다. Wild type 보다 최적 pH가 높아졌고 안정성은 비슷한 결과를 보였다(Figure 3). 정제된 효소의 최적 반응온도는 35℃이었고, 열 안정성은 30, 35℃에서는 대조군에 비하여 90% 이상의 residual activity를 나타내었지만, 50℃에서는 50% 수준으로 급격히 감소하였으며, 55℃이상에서는 효소의 활성을 모두 잃었다. Wild type과 최적온도는 동일하였으나 열에 대한 안정성에서는 wild type이 45℃에서 활성을 급속히 잃은 것에 비하여 향상된 열 안정성을 보였다(Figure 4).

4. 불용성인 기질의 용해도를 증가시키기 위해 nonionic surfactant인 Triton X-15, Triton X-45, Triton X-100, Triton X-165, Triton X-305와 Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80을 1% (w/v)첨가하여 효소활성을 관찰한 결과, 모든 계면활성제에서 효소반응이 증가하였으며 Triton 류 모두가 Tween 류와 비교하여 효소반응 증가의 결과를 나타냈다.

Triton류에서는 분자량이 증가 할수록 효소반응이 증가하여 Triton X-100 이상에서는 약 10배 이상의 효소반응이 증가 하였다(Table 2).

**Table 2.** Effect of various surfactants on the activity of a mutated esterase

	Relative activity (%)
Control	100
Tween 20	600
Tween 40	800
Tween 60	624
Tween 80	1000
Triton X-15	612
Triton X-45	1012
Triton X-100	1200
Triton X-165	950
Triton X-305	1120

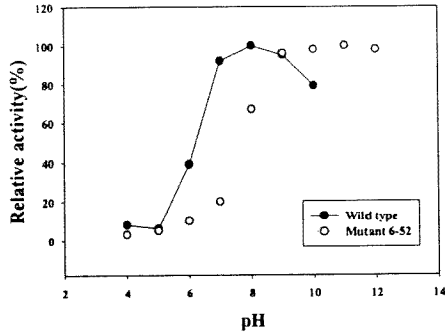


Figure 3. The pH stability of a directed evolved (S)-ketoprofen ethyl ester hydrolase.

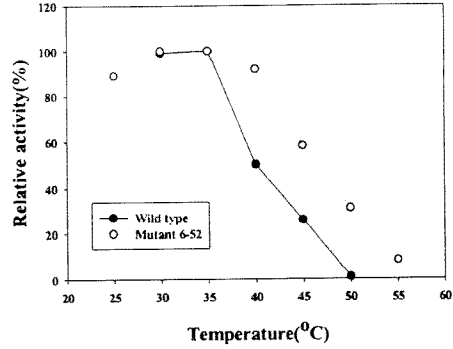


Figure 4. The temperature stability of a directed evolved (S)-ketoprofen ethyl ester hydrolase.

### 참고문헌

1. Margolin, A. L., "Enzymes in the synthesis of chiral drugs", *Enzyme Microb. Technol.*, 15, pp.266-280, 1993.
2. Patel, R. N., "Stereo selective Biocatalysis", Marcel Dekker. Inc., 2000
3. H.Zhao, F. H. Arnold, "Directed evolution converts sutilisin E into a functional equivalent of thermitase", *Protein Engineering* Vol.12 No.1, pp.47-53, 1999
4. H.Zhao, F. H. Arnold, "Molecular evolution by staggered extension process in vitro recombination", *Nature Biotechnology* Vol 16, pp.258-261, 1998
5. Stemmer W.P.C, "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, *Nature Biotechnol.*, pp.315-319, 1996
6. U.T. Bornscheuer, "Directed Evolution of an Esterase for the stereoselective Resolution of a Key Intermediate in the Synthesis of Epothilones", *Bioengineering and Bioengineering*, Vol 58, No.5, 1997
7. T. Urakami, K. Komagata, "Electrophoretic comparison of enzymes in the gram negative methanol-utilizing bacteria", *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 27, pp.381-403, 1981.