

Study on recombinant expression of Phospholipase C gene (plc) in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its properties

Seo Kook-Hwa^{1,3} and Jong Il Rhee^{2,3}

Chonnam National University, Department of Materials and Biochemical Engineering¹,

Faculty of Applied Chemical Engineering², Bioprocess Technology Lab.³

Tel : +82-62-530-0847, FAX : +82-62-530-1849

Abstract

The phospholipase C (PLC) hydrolyzes the polar head groups such as phosphocholine or phosphoethanolamine residues esterified at the sn-3 position of phospholipids. *Pichia pastoris* can utilize methanol as a carbon source and produce recombinant proteins under the control of the strong, tightly-regulated alcohol oxidase (AOX) promoter. In this study, we developed recombinant *P. pastoris* system for PLC expression and analyzed PLC activity.

서 론

Phospholipase C (PLC)는 세척제, 식품첨가제, 화장품, 의약품 등에 많이 이용되는 phospholipid의 가수분해를 촉진하여 diacylglycerol (DAG)과 phosphate monoester를 산출하는 효소로 mammalian PLC와 유사한 역할을 하기 때문에 이에 대한 유용한 모델로 관심이 모아지고 있다. 최근 미생물로부터 얻어지는 PLC는 단분자, 아연특이성 효소로써 유기 인산의 제조, 광학 이성질적으로 순수한 (enantiomerically pure) DAG의 생산 등과 같은 생촉매 합성 반응에 사용되고 있어서 산업적으로 그 중요성이 점점 증가하고 있다. 이러한 PLC를 대량으로 생산하는 공정을 개발하고 PLC의 생산성을 모니터링하기 위해서는 PLC의 활성도를 정확히 분석하는 것이 매우 중요하다.

본 연구에서는 *Bacillus cereus* ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자를 pPICZa C에 삽입하여 메탄올 자화 효소인 *Pichia pastoris* GS115, X-33, KM71H에 도입하여 extracellular PLC를 발현시켰다. 또한, *B. cereus*와 *P. pastoris*에서 생산된 extracellular PLC의 활성을 여러 조건 (온도, pH, 각종 성분의 첨가에 따른 영향)에서 측정하여 각각의 PLC 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에서 사용된 숙주는 *B. cereus* 11, 318, 559와 *P. pastoris* GS115 (His⁻, Mut⁺), X-33 (Mut⁺), KM71H (Mut^s, Arg⁺)이고, 재조합 단백질 발현을 위한 vector로는 pPICZa C (Invitrogen, Zeocin^R)를 사용하였다. 종자배양에서는 LB (1 % tryptone, 1 % NaCl, 0.5 % yeast extract, 25 µg/mL zeocin)배지와 YPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose, 100 µg/mL zeocin) 배지를 사용하였고, 재조합 단백질 발현을 위한 배지로는 BMGY & BMMY (1 % yeast extract, 2 % peptone, 100 mM potassium phosphate (pH 6.0), 1.34 % YNB, 4 x 10⁻⁵% biotin, 1 % glycerol or 0.5 % methanol, 100 µg/mL zeocin)배지를 사용하였다.

2. 사용한 Plasmid

B. cereus ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자 (from Prof. Mary F. Roberts, Boston college)를 methanol을 이용하여 extracellular recombinant protein의 발현을 유도하는 AOX 1 promoter를 지닌 pPICZa C에 삽입하여 pPICZa C/PLC를 제조하였다.

3. 배양방법

종균배양에서는 우선 냉동 보관된 종균을 *B. cereus*는 LB 배지에서 *P. pastoris*는 YPD 배지에서 12시간 이상 배양하여 활성화시킨 후, 각 배지에 1 %의 종균배양액을 접종하였다. 본 배양에서 *B. cereus*는 LB 배지를 사용하여 진탕배양기 (250 mL 진탕용기, 37 °C, 180 rpm, working volume 100 mL)에서 배양하였고, *Pichia pastoris* GS115, X-33, KM71H는 BMGY 배지를 사용하여 24 시간 정도 (OD₆₀₀ = 2~6) 배양한 후 배양액을 원심분리 (실온, 3000 x g, 5 min)하여 모은 cell을 BMMY 배지에 OD₆₀₀ = 1이 되도록 접종하고 진탕배양기 (500 mL 진탕용기, 30 °C, 200 rpm, working volume 100 mL)에서 배양하였다.

4. 분석방법

생산된 extracellular PLC를 정량하기 위해서 S. Kurioka의 *p*-Nitrophenylphosphoryl-choline (*p*-NPPC)을 이용한 spectrophotometric assay를 변형하여 사용하였다. *p*-NPPC는 PLC에 의해 *p*-nitrophenol과 phosphorylcholin으로 분해되는데 이 때 생성된 *p*-nitrophenol이 유색반응을 나타낸다. 이러한 반응을 이용하여

PLC solution 90 μl 와 100 mM *p*-NPPC 10 μl (100 mM Borax buffer, pH 7.5)를 혼합한 후 microplate reader (Wallac 1420 VICTOR²)로 405 nm에서 PLC activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 재조합 *P. pastoris*로부터 extracellular PLC의 생산

진탕배양기를 이용하여 재조합 단백질을 생산하는 *P. pastoris*를 배양하면서 methanol 유도발현 후 12시간 간격으로 채취한 시료를 분광광도계로 600 nm에서 측정하여 균주의 성장속도를 살펴보고 효소의 활성화에 큰 영향을 미치는 pH도 측정하였다. 또한, 원심분리 (13000 rpm, 5 min, 4 °C)하여 얻어진 상등액 속에 존재하는 extracellular PLC를 정량하여 균주의 성장속도와와의 관계도 살펴보았다.

2. pH 변화에 따른 PLC 활성 변화

반응 pH에 따른 효소의 activity와 stability 정도를 살펴보기 위해서 각 pH에 따른 buffer를 제조하여 pH 4에서 10까지 1간격으로 변화시켜 PLC 활성 정도를 살펴보았다.

3. 온도 변화에 따른 PLC 활성 변화

반응 온도에 따른 효소의 activity와 stability 정도를 살펴보기 위해서 *B. cereus*와 *P. pastoris*에서 생성된 extracellular PLC를 30 °C에서 80 °C까지 5 °C 간격으로 각각의 온도에서 효소의 활성 정도를 살펴보았다.

4. 금속이온 첨가에 따른 PLC 활성 변화

*B. cereus*와 *P. pastoris*에 의해 생성된 extracellular PLC 용액에 여러 종류의 금속이온을 1, 3, 5 mM이 되도록 첨가하여 40 °C에서 3시간 동안 반응시킨 후 효소의 활성 정도를 살펴보았다.

5. 유기용매와 계면활성제의 첨가에 따른 PLC 활성 변화

Wild type PLC와 recombinant PLC에 30 % (v/v)의 유기용매와 1 % (w/v)의 계면활성제를 각각 첨가하여 40 °C에서 1시간 동안 반응시킨 후 효소의 활성 정도를 살펴보았다.

요 약

본 연구에서는 산업적으로 중요성이 날로 증가하고 있는 PLC의 대량 생산을 위해서 *B. cereus* ATCC10987에서 분리된 PLC 유전자를 pPICZα C에 삽입한 *P. pastoris* system을 개발하여 extracellular PLC를 생산하였다. 또한, 공업적 이용을 위해 여러 조건에서 *B. cereus*와 *P. pastoris*에서 생산된 extracellular PLC의 활성도를 측정하여 특성을 살펴보았다.

참고문헌

1. Minning, S., A. Serrano, P. Ferrer, C. Sola, R. D. Schmid and F. Valero (2001), "Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*", *Journal of Biotechnology* **86**, 59-70.
2. Kurioka, S. and M. Matsuda (1976), "Phospholipase C Assay Using p-Nitrophenylphosphorylcholine Together with Sorbitol and Its Application to Studying the Metal and Detergent Requirement of the Enzyme", *Analytical Biochemistry* **75**, 281-289.
3. Cristina, A., T. Michael, J. Hehir and M. F. Roberts (1997), "Cloning, Over expression, Refolding and Purification of the Nonspecific Phospholipase C from *Bacillus cereus*", *Protein Expression and Purification* **10**, 365-372.