

The development of papain which is extremely stable to anionic environment by directed molecular evolution

Whankoo Kang^{1,3}, Hyoung-Sik Kim¹, Sun-Duk Hwang¹, Bum-Chang Kim¹, Jeong-Il Son¹,
Byung-Ryul Lee¹, Chul-Woo Lee¹, Bheong-Uk Lee^{2,3}

Department of Chemical Engineering, Hannam University¹

Department of Biological Science, Kosin University²

Gene to Protein, Inc.³

TEL: +82-42-629-8009, FAX: +82-42-623-9489

Abstract

In this study, development of papain which is extremely stable to negative ionic environment was made by directed molecular evolution. The screening method to confirm papain activity was designed using anionic material and skim milk agar plate for obtaining stable modified papain. Most stable modified papain P38-10 was obtained, which shows activity 10-15 times higher compared to wild type papain in anionic environment.

서론

Cysteine protease중의 하나인 파파인은, 표피에 적용될 경우 박리된 표피의 각질을 이루는 케라틴 등의 단백질을 분해하여, 표피의 신진대사를 원활하게 하여 피부 기능의 정상화를 유지할 수 있는 매우 중요한 화장품 첨가제 효소이다. 화장품내에는 음이온성 고분자물질이 다량 함유하고 있어, 파파인의 활성을 저해하는 문제점을 안고 있으며 이러한 문제점을 해결은 화장품 업계에서 매우 중요하게 여겨지고 있다. 따라서 효소의 기능을 개선시키는 분자진화방법에 의해 음이온성 고분자 물질에 안정한 파파인의 개발은 화장품 첨가제 효소로서 경쟁력은 매우 클 것으로 사료되고 있다. 효소 개량은 생명공학 분야에서 막대한 연구가 이루어지는 중요한 주제로서, 현재 미국 W. Stemmer에 의해 소개된 분자진화 기술이 가장 강력한 방법 중의 하나로 인정받고 있다. 기술의 중요성은 화장품 첨가제로서의 단일 효소의 개량뿐만 아니라, 동일 기술이 화장품으로 상용화가 가능한 다양한 효소들에 적용될 수 있는 기반 기술로 응용되어질 수 있다.

재료 및 방법

벡터 및 균주조립

파파야 열매에서 RNA를 뽑아내어 cDNA를 합성하였고 이를 이용하여 PCR에 의해서 파파인 유전자를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 이용하여 파파인을 발현하는 YEGa-Papain IV(GAL promoter)와 pYIGP-Papain IV(GAP promoter) vector를 개발하였다. 또한 이들 vector를 *S.cerevisiae* Y2805에 transformation 하였고, 파파인 발현을 확인하였으며, 이들을 error prone PCR을 통한 파파인 library의 발현에 사용하였다.

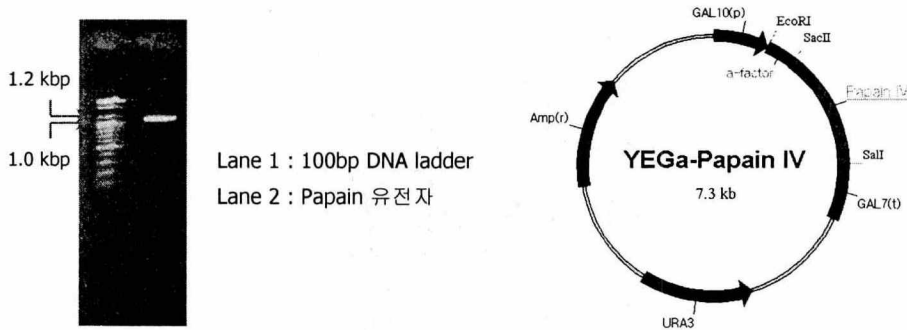


그림1) PCR을 통해 증폭한 파파인 유전자와 *S. cerevisiae* papain 발현 벡터.

분자진화

Error prone PCR 방법

정제된 papain PCR product, 10X mutagenic buffer, 10X dNTP mix 및 5mM MnCl₂ 용액을 준비하였다. PCR tube에 10X mutagenic buffer 10 μ l, 10X dNTP mix 10 μ l, 각 primer 30pmol, template DNA 1 μ l, Taq polymerase 5unit, error rate를 조절하기 위해서 MnCl₂을 0.3~1.0mM이 되도록 넣고 최종 부피가 100 μ l가 되도록 D.W.로 채웠다. PCR program은 94 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min을 15번 반복하여 PCR한다.

DNA shuffling을 통한 mutagenesis^{2),3)}

Error prone PCR을 통해서 선별된 mutant에서 구한 유전자들을 대상으로 shuffling을 수행하였다. shuffling은 DNaseI 처리단계, 조각을 reassembly하는 단계, reassembled product를 사용하여 증폭하는 단계로 나누어 수행하였다.

배양

최소배지(Minimal media, glucose 20g/L, yeast nitrogen base w/o amino acid 6.7g/L, histidine 20mg/L)를 통하여 얻어진 균주들의 발현량 확인을 위한 기초적인 회분식 실험을 위한 flask 배양은 500ml의 baffled flask를 이용하였는데 100ml의 배지에 균주를 접종한후실험 하였다. GAL promoter 의 경우 YE 2%, glucose 2%, Galactose 3%, 200rpm, 온도 30℃의 진탕 배양기에서 실험하였다.

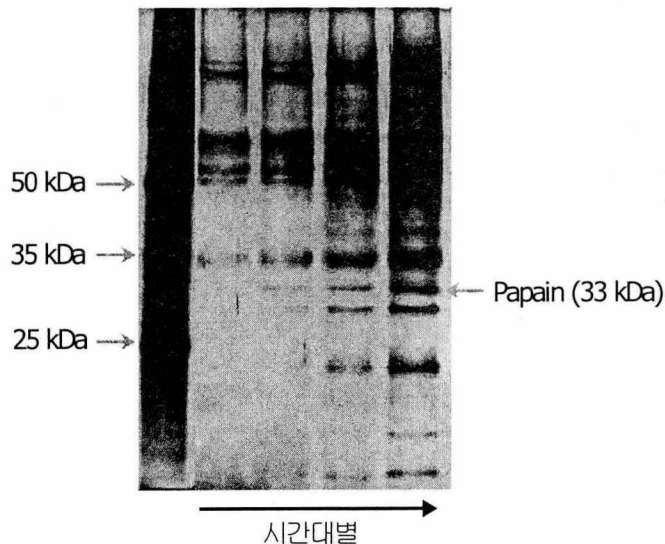


그림2) Flask level에서 배양하여 SDS-PAGE gel로 단백질 발현확인.

분석방법

음이온성 고분자물질과 계면활성제 중 대표적으로 사용되는 3가지 시약 polyacrylamide, polyacrylic acid, polysobrbate을 대상으로 실험하였다. Skim milk agar plate에서 filter paper 이용하는 방법으로 음이온성 고분자물질이 1%되도록 첨가한 skim milk agar plate(skim milk 0.5%)에 일정간격으로 filter paper disc을 올

려놓고, 배양액 20 μ l을 떨어뜨린 후 37 incubator에 넣어 약 10시간 반응시킨 후 선명한 환이 크고 넓게 형성된 변형된 파파인을 screening하여 선별하였다. Screen된 변형 papain의 활성 검정방법으로 Casein을 이용한 파파인의 정량분석방법^{4),5)}을 사용, 파파인(14unit/mg), casein N,N-dimethylated (5g)과 picrylsulfonic acid (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, 10ml)을 각각 sigma에서 구입하여 사용하였으며, 파파인이 casein을 분해하여 분해된 amine류와 picrylsulfonic acid와 결합하여 발색하는데 이것을 microplate reader로 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 이와 같은 정량분석 방법을 이용하여 파파인 변이체의 배양액에 음이온의 최종농도가 1%가 되도록 조제하여 매 5시간마다 정량분석법에 의해 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

분자진화방법에 의하여 음이온성 고분자 첨가시 안정성을 지니는 개량형 파파인을 얻고자 screening한 결과 skim milk agar plate에서 크고 선명한 clear zone을 형성하는 두 가지 개량형 파파인 균주를 얻어 실제 음이온성 고분자물질과 계면활성제 중 대표적으로 사용되는 3가지 시약 polyacrylamide, polyacrylic acid, polysorbate를 대상으로 활성 측정을 수행하였다. 정량분석방법에 의한 음이온성 고분자를 첨가시 파파인의 안정성은 음이온 물질에 의하여 파파인의 활성이 매우 저해됨을 알 수 있었고, 특히 35시간 정도 음이온에 노출되었을 때 wild type의 파파인은 그 활성이 거의 대부분 잃어버리는 것으로 확인되었다(2~4% 활성만 잔류). 이 결과 polyacrylamide을 첨가한 P38-10의 개량형 파파인은 wild type에 비해 약 15배정도 활성을 유지하였고, polyacrylic acid는 10.2배와 polysorbate에 대해 10배의 활성유지를 나타내고 있다. 따라서 본 분자진화방법에 의하여 구한 개량형 파파인 변이체의 경우는 이러한 음이온 첨가 후 35시간이 경과 후 wild type에 비해 활성이 10-15배 정도로 높게 유지됨을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서 음이온에 안정한 파파인을 얻기 위한 방법으로 방향성분자진화를 이용하였다. 변이체를 선별하기 위한 방법으로는 skim milk agar plate에 음이온성 고분자 물질을 1%농도로 첨가하여 선명한 환이 형성되는 균주를 선별하였다. 이와 같은 방법으로 선별되어진 균주 P38-10을 SDS-PAGE gel로 발현을 확인하였고, 파파인의 정량 분석방법을 통하여 활성을 측정하였다. 개량형 파파인의 발현액에 음이온성 고분자 물질을 일정하게 첨가하여 매 5시간마다 활성을 측정하였다. 이

결과 개량형 파파인의 경우 wild type에 비해 10-15배의 활성과 안정성을 유지하는 것으로 확인하였다.

References

1. Humin Zhao, Lori giver (1998), "Molecular evolution by staggered extension process(StEP) in vitro recombination", *Nature biotechnology* **16**, 258-261.
2. Humin Zhao, Frances H. Arnold (1997), "Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination", *Nucleic acids research* **25**(6), 1307-1308.
3. Ji-hu Zhang, Glenn Dawes (1996), "Directed Evolution of fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening", *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* **94**(9), 4504-4509.
4. Ming Xian, Xinchao Chen (2000), "Inhibition of papain by s-nitrosothiols", *Biological chemistry* **275**(27), 20467-20473.
5. Bubins, W.A and Ofner (1992), The determination of e-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous material by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid, *Anal. biochem.* **207**, 129-133.