

대장균에서 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase의 대량 발현 및 Periplasmic Space로의 Transport

김남일 · 임재윤 · 조태주*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate(EPSP) synthase는 방향족 아미노산을 생합성하는 shikimate pathway의 6번째 효소로 광범위 제초제인 glyphosate의 target enzyme이다. 본 연구에서는, glyphosate에 저해를 받지 않는 EPSP synthase를 개발하고자 하는 연구의 한 단계로서, 우선, EPSP synthase를 대량 발현시킬 수 있는 expression vector인 pET-25b를 사용하여 발현시킨 다음, 발현된 효소가 periplasmic space로 transport되는지 또 발현된 단백질이 효소 활성을 가지고 있는지 확인하고자 하였다. 그 결과, pelB leader를 앞에 붙여 발현시킨 EPSP synthase는 periplasmic space로 제대로 transport되며, 단백질 생산 및 periplasmic space로의 수송은 induction 온도에 의해 크게 좌우된다는 것을 관찰하였다. Periplasmic space로 수송되는 EPSP synthase의 양은 34°C에서 induction시켰을 때 가장 많은 것으로 나타났다. 한편, pET-25b를 이용하여 발현시킨 EPSP synthase는 C-terminal 부위에 HSV-tag, His-tag 등 26개의 아미노산이 더 있는 상태로 만들어지는데, His-tag은 Ni²⁺-affinity chromatography를 통한 정제에, HSV-tag은 Western blotting을 통한 detection에 각각 이용할 수 있었다. 또한, 이와 같이 발현된 recombinant EPSP synthase는 phosphocellulose resin에 결합하였다가 기질인 shikimate 3-phosphate와 phosphoenolpyruvate에 의해 elution되며, glyphosate에 의해 저해되는 등 wildtype 효소와 같은 효소 특성을 보였다.

KEY WORDS □ EPSP synthase, 대량 발현

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate(EPSP) synthase(E.C. 2.5.1.19)는 방향족 아미노산 생합성경로(17)에서 가장 잘 연구된 효소 중 하나로 기질인 phosphoenolpyruvate(PEP)를 또 다른 기질인 shikimate 3-phosphate(S3P)에 transfer하여 EPSP와 Pi를 만들어 낸다. EPSP synthase는 식물과 미생물에서만 발견되는 효소인데, 식물과 박테리아의 EPSP synthase는 monomeric protein이나(7, 17), fungi의 EPSP synthase는 식물과 박테리아의 효소와는 달리 다섯 가지의 기능을 갖는 aroM 복합체의 한 부분으로 만들어진다(4). EPSP synthase의 특성 중 하나는, PEP를 기질로 사용하는 다른 효소들과는 달리, PEP를 두 번째 기질로 사용한다는 점이다(3). EPSP synthase의 또 다른 특징은 그 반응과정으로, PEP-dependent 효소들 중 EPSP synthase를 제외한 모든 효소가 PEP의 O-P bond를 공격하는 반면, EPSP synthase는 C-O bond를 공격하여 S3P에 PEP를 전달한다(2). 이와 같은 두 특징은, EPSP synthase의 강력한 inhibitor로 개발된 N-phosphonomethyl glycine(glyphosate)이 PEP를 사용하는 다른 효소의 활성에는 영향을 주지 않고 EPSP synthase의 활성만을 선별적으로 억제하는 원인이 된다. PEP의 transition state analogue인 glyphosate는 미국 Monsanto사에서 개발된 제초제로, EPSP synthase의 기질 중 PEP에 대해서는 competitive inhibitor로 작용하며(3, 13, 20), S3P에 대해서는 uncompetitive inhibitor로 작용한다(3, 20). Glyphosate는 동물체 내에는 존재하지 않는 EPSP synthase를 target으로 하는 만

큼 사람을 포함한 동물에 거의 피해가 없는 것으로 보고되었다(15, 18, 23). 그러나, glyphosate는 작물과 잡초에 모두 작용하는 광범위 제초제이기 때문에, 작물을 파종하기 전에만 집중적으로 사용하는 등 그 사용에 제한이 있다는 단점이 있다.

본 실험실에서는, EPSP synthase의 glyphosate 결합부위를 변화시켜 다량의 mutant를 얻은 다음, 다수의 mutant를 쉽게 screening할 수 있는 방법인 phage display 방법을 통해 glyphosate에 내성이 있는 EPSP synthase를 선별하고, 최종적으로 glyphosate에 내성이 있는 작물을 개발할 계획으로 있다. Phage display 방법(5, 11)은 특정 단백질을 M13 phage 등 filamentous phage의 coat protein과의 fusion protein 상태로 발현시켜 그 단백질이 phage 표면에 돌출되도록 하는 방법으로 수 천만가지 또는 그 이상의 mutant clone을 동시에 screening할 수 있기 때문에, 특정 항체 clone의 선별(12) 및 더 나은 특성을 갖도록 변형된 단백질 clone의 선별(1) 등에 널리 이용되고 있다. 그러나, phage display 방법이 성공하기 위해서는 우선, 발현된 단백질이 periplasmic space로 수송되어야 하며, 또 제 활성을 가져야 한다. 본 연구에서는, EPSP synthase를 발현시켰을 때 periplasmic space로 수송되게끔 하는 발현 system 및 발현조건을 확립하고자 하였으며, 변형된 EPSP synthase를 얻었을 경우 그 효소 특성을 보다 쉽게 분석할 수 있도록 하는 대량 발현 및 정제 system을 확립하고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed

재료 및 방법

사용 균주, plasmid 및 시약

EPSP synthase 발현에 사용한 균주 BL21(DE3) 및 vector 인 pET-25b는 Novagen에서 구입하였으며, 정제에 사용한 Ni^{2+} -affinity resin과 phosphocellulose는 각각 Qiagen과 Sigma에서 구입하였다. Taq DNA polymerase, *SfiI*, *NotI*, *NcoI*, *EcoRI*, *BamHI* 효소는 Promega, Boehringer Mannheim, Takara에서 구입하였다. Malachite green, phosphoenolpyruvate, tertgitol 등 시약은 대부분 Sigma에서 구입하였으며, 특급 품질의 것이었다. Shikimate 3-phosphate는 Dr. Amrhein(Swiss Federal Institute of Technology Zurich)으로부터 제공받아 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR) 및 pET-25b로의 클로닝

EPSP synthase 유전자를 증폭하기 위한 PCR은 100 μ l의 반응액에, 20 ng의 *E. coli* genomic DNA, 각각 100 p mol의 Ecoarof1 및 Ecoaror1 primer, 0.25 mM dNTP mix(0.25 mM dATP, 0.25 mM dGTP, 0.25 mM dCTP, 0.25 mM dTTP), 1X PCR buffer(Takara), 5 unit의 Taq DNA polymerase(Takara)를 사용하여 수행하였다. PCR에 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같았다: Ecoarof1, 5' CTT ATA GAT CTA GAG GCC CAG CCG GCC ATG GAA TCC CTG ACG TTA CAA C 3'과 Ecoaror1, 5' AAT CTA GAA TGC GGC CGC GGC TGC CTG GCT AAT CCG 3'. PCR에 사용한 기기는 Equibio ThermoJet 또는 Perkin Elmer 9600이었으며, PCR 조건은 다음과 같았다: 95°C에서의 3분간 초기 denaturation 과정을 수행한 후, denaturation(95°C에서 1분), annealing(55°C에서 2분), polymerization(72°C에서 3분) 과정을 30 cycle 수행하였으며, 72°C에서 최종 10분간 반응시켰다. 증폭된 DNA는 phenol/chloroform extraction 후에 ethanol로 침전시켜 정제하였으며, *NcoI*과 *NotI* 효소로 처리하였다. 이 DNA는, *NcoI*과 *NotI*으로 절단한 pET-25b와 ligation시킨 다음, BL21(DE3) 균주를 형질전환시키는데 사용하였으며, 이 과정을 통해 얻은 clone을 pET-aro라 명명하였다.

Induction 및 단백질 추출

Ampicillin(100 μ g/ml)이 들어있는 2 ml LB broth에서 밤새 배양한 pET-aro clone을 ampicillin(100 μ g/ml)이 들어있는 100 ml LB broth에 1:100으로 희석하여 넣고, 25°C, 30°C, 34°C 또는 37°C에서 $O.D_{600}=0.7$ 이 될 때까지 배양하였다. 그 다음, IPTG(최종 농도 1 mM)를 첨가한 후 3시간 동안 같은 온도에서 배양하여 EPSP synthase를 발현시켰다. Periplasmic extract는 박테리아 pellet을 osmotic shock 처리하여 얻었으며, 그 방법은 다음과 같았다. 박테리아 배양액을 10°C에서 7000 \times g로 20분간 원심 분리하여 얻은 pellet을 8 ml의 sucrose 용액(20% sucrose, 30 mM Tris-Cl, pH 8.0)에 현탁한 후, 32 μ l의 0.25 M EDTA(pH 8.0)를 첨가하여 30°C에서 10분간 천천히 진탕하였다. 이 sample을 7000 \times g로

다시 10분 동안 원심 분리하여 얻은 pellet을 3.6 ml의 ice-cold sterile distilled water(SDW)에 현탁하고 얼음에서 10분간 처리하였다. 그 다음, 10분 동안 원심 분리하여 얻은 상층액이 periplasmic extract이었으며, 이때 얻은 pellet은 세포내 soluble fraction 및 insoluble fraction을 얻는데 사용하였다. Soluble fraction은, 박테리아 pellet을 4 ml SDW에 현탁한 후 Soniprep150(MSE)을 사용하여 14 micron으로 5초 동안 4회 sonication한 다음, 10000 \times g에서 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취한 것이었으며, pellet은 insoluble fraction을 얻는데 사용하였다. Insoluble fraction은, pellet을 4 ml의 6 M urea로 녹이고 상온에서 2시간 동안 shaking한 다음 10000 \times g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상층액이었다. 위 과정에서 얻은 periplasmic extract에는 10X PAD buffer(100 mM potassium citrate, 10 mM DTT, 4 mM ammonium molybdate)를 1.9 volume만큼 첨가하였다. SDS-PAGE를 통해 soluble, periplasmic, insoluble fraction을 분석할 때에는 각 fraction에서 10 μ l를 사용하여 수행하였다.

EPSP synthase 정제

Ni^{2+} -affinity chromatography를 통한 정제 과정은 Qiagen의 Ni-NTA assay protocol을 따랐다. 100 μ l의 periplasmic extract에 100 μ l의 Ni^{2+} -affinity resin, 300 μ l의 SPN buffer(50 mM sodium phosphate, pH 8.0, 300 mM NaCl)를 첨가하고 30분 동안 흔들어 주었으며, Microfuge에서 30초 동안 원심 분리한 다음, resin을 500 μ l SPN buffer로 세 번, 500 μ l 0.1 M imidazole로 두 번 반복하여 washing하였다. Elution은 200 μ l 0.3 M imidazole를 사용하여 수행하였으며, elution 과정은 세 번 반복하였다. Phosphocellulose를 이용한 정제 과정에서는, 100 μ l periplasmic extract에 100 μ l phosphocellulose resin, 300 μ l 1X PAD buffer를 첨가하고 2분간 가볍게 inversion하여 섞어주었으며, Microfuge에서 30초 동안 원심 분리한 후 resin을 200 μ l 1X PAD buffer로 세 번 washing하였다. Phosphocellulose resin에 붙은 EPSP synthase는 0.5 mM S3P와 0.5 mM PEP가 들어 있는 1X PAD buffer 200 μ l로 elution하였다. Elution 과정은 세 번 반복하였다.

Enzyme assay

EPSP synthase의 활성 측정은, Nafziger 등의 방법(14)을 따랐으며, 반응산물인 Pi를 정량하는 방법은 malachite green dye assay method(8)를 사용하였다. Assay buffer의 조성은 50 mM HEPES, pH 7.0, 0.5 mM S3P, 0.5 mM PEP, 0.1 mM ammonium molybdate이었다. Assay buffer 90 μ l에 단백질 sample 10 μ l를 넣어 30°C에서 1-2시간 동안 반응시킨 후 malachite 발색시약(4.2% ammonium molybdate와 0.045% malachite green을 1:3으로 섞은 용액 5 ml에 2% tertgitol을 100 μ l 첨가한 용액) 0.8 ml을 넣고 1분간 방치한 다음, 42% sodium citrate 용액 100 μ l을 첨가하였으며, 약 30분이 경과한 후 $O.D_{600}$ 을 측정하였다.

Western blot analysis

Western blot은 periplasmic protein 및 Ni²⁺-affinity chromatography를 통해 얻은 sample을 12.5% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동한 후에 수행하였다. 전기영동은 40 mA, 100 V에서 1시간 30분 동안 수행하였으며 그 후, nitrocellulose membrane으로 단백질을 10°C에서 2시간 동안 transfer시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane은, 2% BSA가 첨가된 1× TBST buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)로 4°C에서 밤새 blocking시킨 다음, 1× TBST buffer에 anti-HSV-tag antibody를 1:7500으로 희석하여 넣은 용액 30 ml을 넣고 2시간 동안 상온에서 흔들어주면서 반응시켰다. Anti-HSV-tag antibody의 detection 방법은 Amersham의 ECL protocol을 따랐다. Primary Antibody를 처리한 membrane을 30 ml 1×TBST로 5분간 3회 washing한 후 1:7500으로 희석한 anti-mouse/horseradish peroxidase conjugate를 사용하여 2시간 동안 상온에서 교반 배양하였으며, membrane의 물기를 제거한 후 2 ml의 ECL detection solution을 넣어 반응시키고 암실에서 노출시킨 다음 현상하였다.

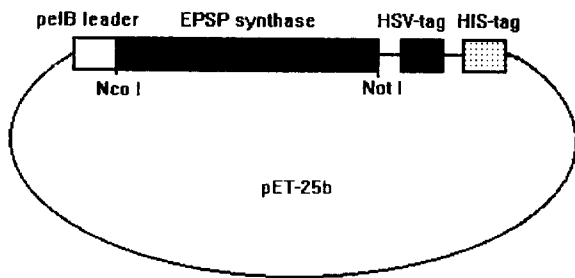
결과 및 고찰

EPSP synthase 유전자의 cloning 및 단백질 발현

방향족 아미노산 생합성경로인 shikimate pathway(17) 중 6번째 효소인 EPSP synthase는 광범위 제초제인 glyphosate의 target 효소인데, glyphosate에 피해를 받지 않는 EPSP synthase의 개발을 위해 우선 EPSP synthase를 대량 생산해 낼 수 있는 발현 system을 확립하고자 하였다. 이를 위해 EPSP synthase의 유전자(aroA)를 클로닝하고자 Genebank에서 *E. coli*의 aroA 유전자를 검색하여 염기서열을 알아낸 다음, 이를 근거로 primer를 제작하였다. 이 primer를 사용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 결과 1.3 kb의 aroA 유전자를

얻었다. 이 PCR 산물을 pET-25b에 클로닝하였으며, pET-aro라 명명하였다(Fig. 1). pET vector의 경우, 삽입된 유전자의 발현이 T7 promoter 및 lac operator에 의해서 조절되며, IPTG의 첨가에 의해 발현이 유도된다. 또한 pET-25b는, 삽입되는 유전자의 앞쪽에 pelB leader sequence가 있어, 단백질이 발현될 경우 periplasmic space로 수송될 수 있게 고안된 vector이다. pelB leader에는 전형적인 signal peptide(24)에서와 같이 N-terminal 부위에 염기성 아미노산 및 중앙 부위에 소수성 아미노산이 있다. 또한, EPSP synthase와의 경계 부위에 Signal peptidase I의 인식 부위인 Ala-X-Ala(19)가 있어, pelB leader가 절단될 경우 wildtype EPSP synthase와 똑같은 N-말단을 가질 것으로 예상된다(Fig. 1 참조).

EPSP synthase를 대량 생산해 내기 위하여 우선, pET-aro clone을 37°C에서 induction시킨 후 periplasmic space에 있는 soluble protein을 추출한 다음 SDS-PAGE를 통해 조사하였다. 그러나, 만들어지는 단백질은 예상보다 적은 것으로 나타났는데, 발현된 EPSP synthase가 insoluble form으로 만들어지는 것은 아닌지 조사하기 위하여, 37°C에서 induction시킨 박테리아 세포에서 각각 soluble, periplasmic, insoluble fraction을 얻은 후 SDS-PAGE를 수행하여 분석한 결과, 대부분의 단백질이 insoluble form으로 된다는 것을 발견하였다(Fig. 2). Schein(16)은 *E. coli*에서 단백질을 대량 발현시킬 때 배양 온도에 따라 만들어지는 단백질의 solubility가 크게 영향을 받으며, 일반적으로 낮은 온도에서 배양하면 inclusion body 형성을 줄일 수 있다고 보고한 바 있어, 본 연구의 대상인 EPSP synthase의 경우에도 온도의 영향을 받는지 조사하기로 하였다. 25°C, 30°C, 34°C 그리고 37°C에서 각각 단백질을 induction시킨 다음 조사한 결과, 25°C의 경우에는 단백질이 전체적으로 적게 만들어졌으며, periplasmic space로 수송되는 단백질도 상당히 적었다. 30°C와 34°C에서는 insoluble form보다는 soluble form(세포질의 soluble form 및 periplasmic space에 있는 soluble form)으로 더 많이 만들어지며 periplasmic space로 제대로 수송되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히, 34°C에서 induction시킬 경우 periplasmic space로 수송되는 양이 가장 많은 것으로



signal peptide/mature EPSP synthase junction:
H₂N-MKTLTAAAGLLLLAAQPAMA-MESLTLOPIA-
signal peptide ——— EPSP synthase
C-terminal region:
EPSP synthase ——— pET sequence
-FPDYFEOLARISQAAAALEIKRASQPELAPEDPEDVEHHHHHH-COOH
NotI HSV-tag His-tag

Fig. 1. pET-aro clone. *E. coli* EPSP synthase gene was inserted into NcoI/NotI restriction sites of pET-25b. In this construct, the EPSP synthase is expressed as a fusion protein having a signal peptide(PelB leader) at N-terminus and HSV-tag and His-tag at C-terminus.

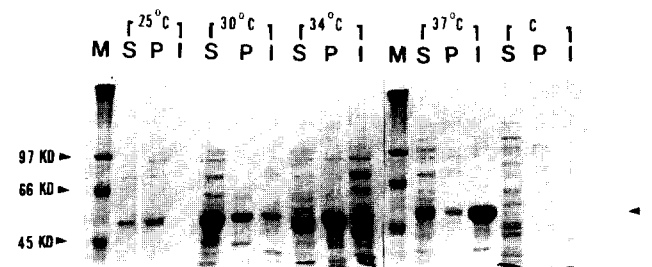


Fig. 2. Expression of EPSP synthase at various induction temperatures. Proteins from intracellular soluble fraction(S), insoluble fraction(I) and periplasmic extract(P) of the pET-aro clone induced at various temperatures(25°C, 30°C, 34°C and 37°C) were analyzed by 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Coomassie-staining. Samples from the bacterial cells harboring a pET-25b vector without aroA insert(C) were used as control.

나타났다.

이와 같이 온도에 따라 periplasmic space로 수송되는 양과 solubility가 달라지는 것은, Stader와 Silhavy(19)가 지적한 바와 같이, 만들어지는 단백질이 온도에 따라 그 미세한 구조가 달라지며 이로 인해 secretion의 효율 및 solubility가 달라지기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 온도에 의한 영향은 각 단백질의 특성에 따라 달라질 수 있는데, Schein(16)은 높은 배양 온도에서도 inclusion body가 잘 형성되지 않는 단백질의 특성을 분석한 결과, 낮은 proline 함량, "-" 전하를 띠는 아미노산이 연속적으로 존재하는 부위의 존재 및 metal ion와의 결합 등의 구조적인 특징이 있다고 보고한 바 있다. pET-aro에서 만들어지는 recombinant EPSP synthase의 경우, proline 함량이 낮은 편이 아니며(signal peptide를 제외한 부분에서 4.7%), "-" 전하를 띠는 아미노산이 연속적으로 존재하는 부위도 없는 것으로 나타났다. 한편, M13 phage의 sex pili가 제대로 형성되기 위해서는 박테리아 배양 온도가 34°C 이상은 되어야 하는데, 34°C에서 EPSP synthase가 많이 생산되며, 또 periplasmic space로 제대로 수송되기 때문에, phage display 방법을 적용하는데 큰 무리는 없을 것으로 생각된다. 그러나, EPSP synthase에 M13 phage의 coat protein을 fusion시킬 경우 그 결과가 달라질 수도 있기 때문에, 본 실험의 발현 system을 실제 phage display에 적용할 때는 induction 온도의 영향을 다시 조사할 필요가 있을 것이다.

pET-aro clone을 induction시켜 얻은 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분석한 결과, major band로 나타난 단백질의 크기는 약 50 KDa인 것으로 나타났는데, 이러한 단백질 band는 vector만 있는 경우에는 나타나지 않았다(Fig. 2). EPSP synthase를 pET-25b vector를 사용하여 발현시킬 경우, C-terminal에 His-tag 및 HSV-tag이 fusion된 단백질로 만들어 지는데(Fig. 1 참조), SDS-PAGE에서는 wildtype 효소의 크기가 49 KDa인 것으로 나타난다고 보고되어(9), 본 실험에서 얻은 major band의 크기는 예상되는 크기라 할 수 있다.

Ni²⁺-affinity chromatography를 통한 EPSP synthase의 정제 및 detection

앞서 기술한 바와 같이, pET-25b vector를 사용하여 단백질을 발현시킬 경우, 발현되는 단백질의 C-terminal에 His-tag과 HSV-tag이 있기 때문에 이를 단백질 정제 및 detection에 이용할 수 있다. His-tag을 이용한 정제방법을 Ni²⁺-affinity chromatography이었는데, 이것은 연속된 6개의 His residue가 Ni²⁺에 결합하는 것을 이용한 분리 방법이다. EPSP synthase의 elution은 0.3 M imidazole 200 μl로 실시하였는데, 첫 번째 elution에서 거의 모든 EPSP synthase가 elution되는 것을 확인할 수 있었다. Ni²⁺-affinity chromatography로 EPSP synthase를 정제한 다음 SDS-PAGE를 한 결과는 Fig. 3A에 보인 바와 같은데, Ni²⁺-affinity chromatography를 통해 EPSP synthase를 제외한 대부분의 단백질이 제거되는 것으로 나타났다. 한편, pET-aro clone에서 발현된 단백질을 SDS-PAGE를 통해 분리한 후, anti-HSV-tag antibody를 이용하여 Western blotting을 하여 본 결과, gel 상

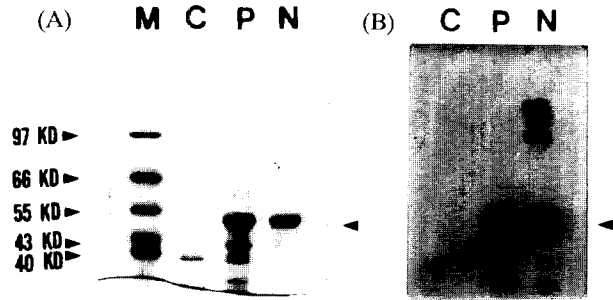


Fig. 3. Purification of EPSP synthase by Ni²⁺-affinity chromatography. Proteins purified by Ni²⁺-affinity chromatography were analyzed by 12.5% SDS-PAGE(Panel A) and Western blot (Panel B). C and P represent periplasmic extracts of the clone containing a pET-25b vector without aroA insert and the pET-aro clone, respectively. N represents eluate samples from Ni²⁺-affinity resin.

에 major band로 나타난 단백질이 HSV-tag을 가진 단백질, 즉 pET-aro clone에서 만들어진 recombinant EPSP synthase임을 확인할 수 있었다. aroA 유전자 없이 vector만 있는 박테리아의 경우에는 이러한 band를 관찰할 수 없었다(Fig. 3B). 이상의 결과를 통해, pET-25b를 이용하여 발현된 EPSP synthase는, 예상되는 대로, His-tag 및 HSV-tag이 fusion된 단백질 상태로 만들어지며, 이들 His-tag 및 HSV-tag을 정제 및 detection에 이용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

Phosphocellulose chromatography 및 recombinant EPSP synthase의 효소 활성

한편, EPSP synthase는 phosphocellulose resin에 결합하는 특성이 있기 때문에(10), 이를 이용하여 정제할 수도 있다. Phosphocellulose resin을 사용하여 정제한 결과, wildtype EPSP synthase와 마찬가지로 phosphocellulose resin에 붙었다가 기질인 S3P, PEP를 사용하여 elution시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. Periplasmic fraction에 있는 EPSP synthase의 활성을 측정된 결과, pET-aro clone뿐 아니라 vector DNA만 가지고 있는 clone에서도 활성이 있는 것으로 나타났다. 이것은, 본 실험에서 사용한 효소활성 측정방법이 효소반응의 산물인 Pi를 정량하는 방법인데, periplasmic space에 있는 phosphatase의 작용에 의해서도 PEP 또는 S3P로부터 Pi가 생성될 수 있기 때문인 것으로 생각된다. phoA 유전자의 산물인 alkaline phosphatase는 periplasmic space에 있는 phosphatase의 대표적인 예이다(6). 그러나, phosphocellulose resin을 이용하여 EPSP synthase를 정제한 후에 활성을 측정된 결과, vector DNA만 가지고 있는 박테리아를 induction시켜 배양한 경우에는 정제 전에 나타나던 활성이 거의 없어지나, pET-aro clone의 경우에는 정제 후에도 효소 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이 같은 결과는, periplasmic space에 있던 phosphatase가 phosphocellulose chromatography 과정에서 제거된 때문으로 보인다. 한편, phosphocellulose chromatography를 통해 정제할 경우 Ni²⁺-affinity chromatography를 통해 정제한 것보다 yield가 낮았는데(data not shown), 이것은 periplasmic space에 많이 있는

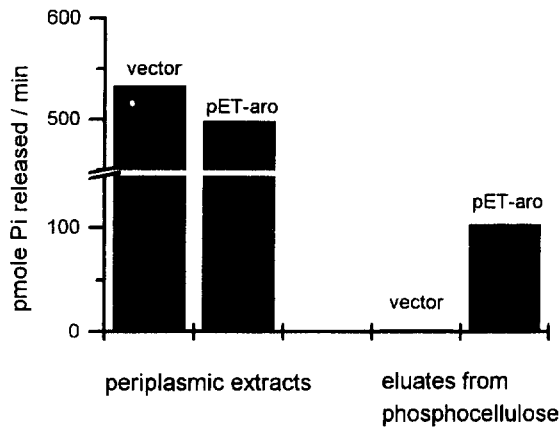


Fig. 4. Phosphate-releasing activities before and after phosphocellulose chromatography. The phosphate releasing activities of periplasmic extracts and eluates from phosphocellulose chromatography were analyzed using the same assay buffer as used in EPSP synthase assay.

phosphatase 때문에 phosphocellulose의 phosphate group이 떨어져나가 EPSP synthase가 resin에 잘 결합하지 못한 때문인 것으로 생각된다. 즉, phosphatase가 존재하는 경우, 그 phosphatase가 phosphocellulose chromatography 과정에서 제거되긴 하나, phosphocellulose resin의 정제능을 저하시킬 것으로 생각한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는, phosphocellulose resin을 사용하기 전에 ammonium sulfate fractionation, gel filtration, DEAE cellulose chromatography 등의 과정(10)을 거쳐 phosphatase를 먼저 제거하는 것이 좋을 것이다. Steinrucken 등(22)은 식물체 EPSP synthase를 정제할 경우, 10 M sodium tungstate를 사용하면 phosphatase 활성을 거의 완전히 억제할 수 있기 때문에 crude extract를 직접 phosphocellulose chromatography에 사용할 수 있다고 보고한 바 있으나, 본 실험실에서 사용한 결과 효과가 없는 것으로 나타났다. Phosphocellulose chromatography를 통해 얻은 단백질이 실제 EPSP synthase인지 확인하기 위하여, standard assay buffer와 기질 중 PEP를 제외한 buffer, S3P를 제외한 buffer 그리고 glyphosate를 첨가한 buffer를 사용하여 효소 활성을 측정할 결과, standard assay buffer를 사용한 경우에는 효소 활성을 뚜렷이 관찰할 수 있었으나, PEP 또는 S3P를 제외한 sample에서는 효소 활성이 나타나지 않으며, 5 mM glyphosate가 첨가된 sample에서도 효소 활성이 나타나지 않는 등 전형적인 EPSP synthase의 효소 특성을 보이는 것으로 나타났다(data not shown).

본 연구에서 얻은 정보는 추후 glyphosate에 내성이 있는 EPSP synthase를 phage display 방법으로 선별하고자 하는 연구에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 한편, pET-25b는 phagemid vector로 M13 origin이 있기 때문에 M13 phage의 coat protein 유전자인 gp3나 gp8 유전자를 pET-aro clone의 *aroA* 유전자 뒷 쪽에 삽입하면 phage display에 사용할 수 있을 것이다. 또한, induction시킬 때 IPTG의 농도를 조절하면 발현되는 EPSP synthase의 양도 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 교육부의 학술연구조성비(1994년 유전공학)로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bass, S., R. Greene and J.A. Wells. 1990. Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins* **8**, 30-314.
2. Bondinell, W.E., J. Vnek, P.R. Knowles, M. Specher and D.B. Sprinson. 1971. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **246**, 6191-6196.
3. Boocock, M. R. and J.R. Coggins. 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS LETT.* **154**, 127-133.
4. Duncan, K., M.R. Edwards and J.R. Coggins. 1987. The pentafunctional arom enzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is a mosaic of monofunctional domains. *Biochem. J.* **246**, 375-386.
5. Hoess, R.H. 1993. Phage display of peptides and protein domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 572-579.
6. Hoffman, C.S. and A. Wright. 1985. Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: an approach for studding protein secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 5107-5111.
7. Kishore, G.M. and D.M. Shah. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 627-663.
8. Lanzetta, P.A., L.J. Alvarez, P.S. Reinach and O.A. Candia. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**, 95-97.
9. Lewendon, A. and J.R. Coggins. 1983. Purification of 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **213**, 187-191.
10. Lewendon, A. and J.R. Coggins. 1987. 3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyl transferase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **142**, 342-348.
11. Makowski, L. 1994. Phage display: structure, assembly and engineering of filamentous bacteriophage M13. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 225-230.
12. McCafferty, J., A.D. Griffiths, G. Winter and D.J. Chiswell. 1990. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554.
13. Mousdale, D.M. and J.R. Coggins. 1984. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from seedlings of *Pisum sativum* L. *Planta* **160**, 78-83.
14. Nafziger, E.D., J.M. Widholm, H.C. Steinruecken and J. L. Killmer. 1984. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. *Plant Physiol.* **76**, 571-574.
15. Rank, J., A.-G. Jesen, B. Skov, L.H. Pedersen and K. Jensen. 1993. Genotoxicity testing of the herbicide Round-up and its active ingredient glyphosate isopropylamine using mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutation Research* **300**, 29-36.
16. Schein, C.H. 1989. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Biotechnology* **7**, 1141-1148.

17. Singh, B.K., D.L. Siehl and J.A. Connelly. 1991. Shikimate pathway: Why does it mean so much to so many? *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol.* **7**, 143-185.
18. Smith, E.A. and F.W. Oehme. 1992. The biological activity of glyphosate to plants and animals. *Vet. Hum. Toxicol.* **34**, 531-43.
19. Stader, J.A. and T.J. Silhavy. 1990. Engineering *Escherichia coli* to secrete heterologous gene products. *Methods Enzymol.* **185**, 166-187.
20. Steinrucken, H.C. and N. Armhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 1207-1212.
21. Steinrucken, H.C. and N. Armhein. 1984. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*: 2. Inhibition by glyphosate [N-phosphonomethylglycine]. *Eur. J. Biochem.* **143**, 351-357.
22. Steinrucken, H.C., A. Schultz, N. Amrhein, C.A. Porter and R.T. Fraley. 1986. Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia hybrida* cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 169-178.
23. Temple, W.A. and N.A. Smith. 1992. Glyphosate herbicide poisoning experience in New Zealand. *New Zeal. Med. J.* **105**, 173-4.
24. Wickner, W., A.J.M. Driessen and F.-U. Hartl. 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 101-124.

(Received January 10, 1997/Accepted March 8, 1997)

ABSTRACT: Overexpression and Periplasmic Transport of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase in *E. coli*

Nam Il Kim, Jai-Yun Lim and Tae-Ju Cho*(Division of Life Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

5-Enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) synthase is the sixth enzyme of the shikimate pathway that synthesizes aromatic amino acids. The enzyme is a primary target for the glyphosate which is a broad-spectrum and environmentally safe herbicide. As a first step toward development of glyphosate-resistant EPSP synthase, the EPSP synthase gene (*aroA*) was amplified by polymerase chain reaction and cloned into pET-25b vector. In this construct, designated pET-*aro*, the *aroA* gene is expressed under control of strong T7 promoter, and the EPSP synthase is produced as a fusion protein with pelB leader at N-terminus and HSV-tag and His-tag at C-terminus. When the pET-*aro* clone was induced to produce the enzyme, it was found that the EPSP synthase was successfully exported to periplasmic space. The periplasmic transport was greatly dependent on the induction temperatures. Among the induction temperatures examined (25°C, 30°C, 34°C and 37°C), induction at 34°C gave rise to maximal periplasmic transport. The recombinant EPSP synthase could have been purified by Ni²⁺-affinity chromatography using the His-tag, and detected by anti-HSV-tag antibody. The recombinant EPSP synthase also bound to phosphocellulose resin and was eluted by shikimate 3-phosphate and phosphoenolpyruvate, as expected. The recombinant EPSP synthase purified from phosphocellulose resin showed typical EPSP synthase activity.