

## *Streptomyces peuceitius* subsp. *caesius* ATCC 27952 유래 Aklavinone 11-Hydroxylase 유전자의 대장균에서의 대량발현과 최적화

민우근 · 홍영수<sup>1</sup> · 최용경<sup>1</sup> · 이정준<sup>1</sup> · 홍순광\*  
명지대학교 이과대학 생명과학과, <sup>1</sup>KIST 생명공학연구소

**Condition Optimization for Overexpression of the Aklavinone 11-Hydroxylase Gene from *Streptomyces peuceitius* subsp. *caesius* ATCC 27952 in *Escherichia coli*.** Min, Woo-Keun, Young-Soo Hong<sup>1</sup>, Yong-Kyung Choe<sup>1</sup>, Jung-Joon Lee<sup>1</sup>, and Soon-Kwang Hong\*. Department of Biological Science, College of Natural Science, Myongji University, Yong-in 449-728, Korea and <sup>1</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea - The *dnrF* gene, responsible for conversion of aklavinone to  $\epsilon$ -rhodomycinone via C-11 hydroxylation, was mapped in the daunorubicin gene cluster of *Streptomyces peuceitius* subsp. *caesius* ATCC 27952, close to *drrAB*, one of the anthracycline resistance genes. To characterize the enzymatic properties of the aklavinone 11-hydroxylase, the *dnrF* gene was overexpressed in *Escherichia coli*. The pET-22(+) plasmid which has the T7 promoter under the control of *lacUV5* gene was used for the overexpression of the *dnrF* gene, and the recombinant plasmid pET213 that contains the *dnrF* gene linked to the T7 promoter of pET-22b(+) was introduced into the *E. coli* BL21. When the expression of the *dnrF* gene was induced by IPTG at the final concentration of 1 mM, the induced protein could be detected in SDS-PAGE only in insoluble precipitate. The insoluble protein was electroeluted from the gel and used for the preparation of antiserum in mice. Various culture conditions were tested to maximize the expression of the aklavinone 11-hydroxylase in soluble form. The enzymatic activity was checked by the bioconversion experiment, and the protein was confirmed by the SDS-PAGE and the Western blot analysis. From the analysis of the data, it was concluded that the culture induced with IPTG at the final concentration of 0.02 mM at 37°C yielded the best productivity of active form of enzyme.

**Key words:** overexpression, aklavinone 11-hydroxylase, *dnrF* *Streptomyces peuceitius*

*Streptomyces*에서 생산하는 daunorubicin, doxorubicin, aclacinomycin 등과 같은 항생제는 유방암, 방광암, leukemia, Hodskins'병 등에 현재까지 가장 널리 쓰여져 온 항암제였으나, 심장독성 등의 부작용이 있어 투여량 및 사용 기간에 있어서 많은 제약을 받고 있다[1, 10, 11, 12, 16]. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 새로운 anthracycline계 항암제를 찾아내고자 노력해 왔으며 또한 기존의 doxorubicin 및 daunorubicin을 변형시켜 급성 및 만성 심장 독성을 줄이고, 경구 투여가 가능한 유도체 합성연구가 계속되어, 현재 epirubicin과 idarubicin이 개발되어 사용되고 있다.

지금까지의 연구결과, doxorubicin을 생산하는 *Streptomyces peuceitius* ATCC 27952로부터 doxorubicin 내성 유전자(*drrAB*)가 cloning되었고, *drrAB*를 포함한 5.5 kb의 염기서열분석결과 *drrAB* 외에 두 개의 ORF가 존재함이 확인되었다. 그 중 *drrAB*의 upstream 부위의 ORF를 포함하는 단편을 *S. lividans* 1326에 도입하였을

때, 배양액에 첨가한 aklavinone을  $\epsilon$ -rhodomycinone으로 전환시키는 활성이 확인되어, 이 2.3 kb 단편에 aklavinone 11-hydroxylase 유전자(*dnrF*)가 함유되어 있는 것으로 판단되었다. 이 효소는 염기배열로부터 추정되는 아미노산 배열을 분석한 결과 flavin type hydroxylase와 높은 유사성을 보임이 밝혀졌다[3]. 몇몇 FAD 또는 NAD(P)의존성 효소의 N말단과 C말단에 존재하는 잘 보존된 ADP 부위의 결합 자리와 FAD의 ribityl 부위의 결합 자리의 두가지 아미노산 배열이 DnrF에서도 발견되었는데 이 hydroxylase들은 진화학적으로 동일한 기원을 가진 것으로 aklavinone 11-hydroxylase도 FAD 또는 NAD(P) 의존성으로 추정되었고 실제로 bioconversion 실험에서 NADP 의존성으로 밝혀졌다. 또한 aclacinomycin을 생산하는 *Streptomyces galilaus* ATCC 31133에 *dnrF* 유전자를 도입시킨 결과 11-hydroxyaklacinomycin이라는 hybrid antibiotics를 만들어내는데 성공하였다[7]. Aklavinone 11-hydroxylase는 *Streptomyces peuceitius* ATCC 29050에서도 그 활성이 보고된 바 있다[2].

이러한 효소활성을 이용하여 다양한 구조의 화합물을

\*Corresponding author  
Tel. 82-335-30-6198, Fax. 82-335-35-8249  
E-mail: skhong@bioserver.myongji.ac.kr

대상으로 유도체합성을 조사하기 위하여 우선 aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 대량발현을 시도하였다. 방선균의 유전자의 경우 promotor의 구조 및 codon 사용 빈도 등이 일반적인 미생물의 유전자의 구조와는 상이하여, 대장균계나 *Bacillus*와 같은 숙주계를 직접적으로 사용하여 대량발현을 시키는 일이 불가능하므로 *dnrF* 유전자를 PCR방법으로 대장균용 발현벡터 pET-22b에 도입하여 IPTG로 발현을 유도하였다. 그러나 외래단백질의 과발현으로 인해 불용성·비활성의 inclusion body를 형성함을 확인하고, 활성형의 aklavinone-11 hydroxylase 발현을 유도하기 위한 최적배양조건을 검토하였다.

**재료 및 방법**

**실험 재료**

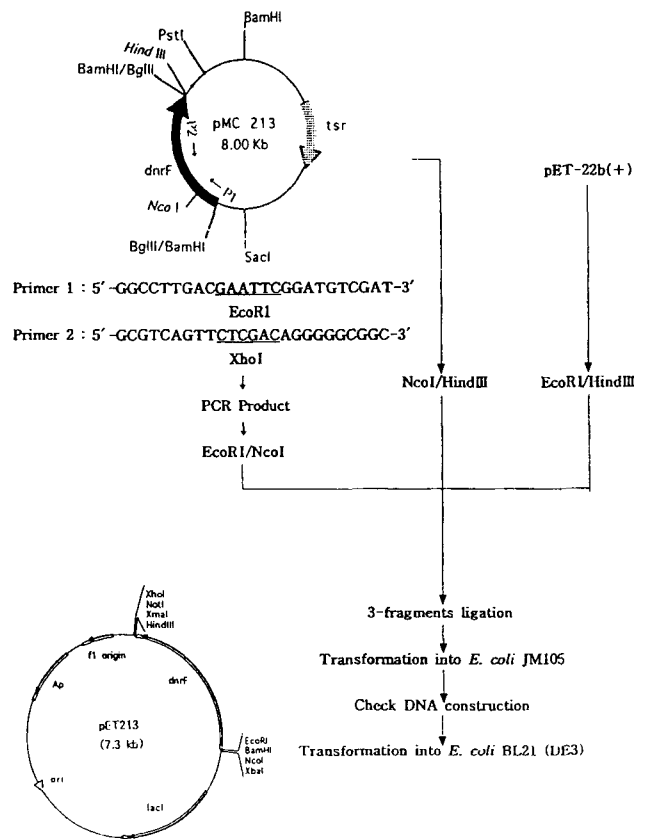
사용 균주 및 vector Aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 발현을 위해서는 *E. coli* BL21(F *omp T hsdSB* ( $r_{\beta}$ - $m_{\beta}$ )[*gal dcm* (DE3)]을 숙주세포로 이용하였는데, 이는 T7 RNA polymerase가 *lacUV5* promoter에 연결된 상태로 염색체 DNA 내에 존재하고 있는 균주이다. 효소반응에 사용하기 위한 기질인 aklavinone의 준비는 *dnrF* 유전자의 기능이 block된 *Streptomyces peucetius* ATCC 27952의 변이주 pKN8 [9]를 이용하였다. 효소반응에 첨가하기 위한 균주로는 *Streptomyces lividans* TK24를 이용하였다.

배지 및 성장 조건 *E. coli* BL21은 LB 액체 배지에 배양한 후 20% glycerol stock으로 보존하였고, 유전자 발현을 위한 배양은 최소배지인 M9배지[13]를 사용하였다. *S. peucetius*는 방선균 배양 배지 중 이차대사물 생산 배지인 NDYE 액체 배지[ $\text{NaNO}_3$  4.3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.23 g, HEPES 4.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.12 g, yeast extract 5 g, maltose 45.04 g,  $10 \times \text{trace element}$  2 ml/l]에서 4~5일 동안 배양했으며, *S. peucetius* ATCC 27952의 배양은 28°C에서 실시하였다. *E. coli* BL21의 plasmid선별은 50 mg/ml의 ampicillin이 첨가된 배지를 사용하였다. *S. lividans* TK24는 YEME 액체 배지[4]를 사용하여 배양하였다.

**실험 방법**

**Aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 고발현계 구축**

*dnrF* 유전자의 고발현을 위한 대장균계 벡터는 T7-promoter를 갖고 있는 pET-vector를 사용하였으며, 이 promoter에 연결하기 위하여 각각 *EcoRI*과 *XhoI* 효소 인식 부위를 갖는 2개의 primer[primer 1; 5'-GGCC TTGACGAATTCGGATGTCGAT-3', primer 2; 5'-GCGTCAGTTCTCGACAGGGGGCGGC-5']를 사용하



**Fig. 1. Construction of expression vector for the aklavinone 11-hydroxylase gene (*dnrF*) in *E. coli*.**

였다.

두 primer로 PCR 반응을 한후의 합성된 DNA를 Gene Clean으로 회수하여 *EcoRI*과 *NcoI*으로 자른후, pMC 213을 *NcoI/HindIII*로 처리한 단편과, pET22b를 *EcoRI/HindIII*로 처리한 단편을 한꺼번에 3단편 ligation 방법으로 ligation 시켜, 최종적으로 pET213을 얻었는데, 그 구조는 pMC213에 연결되어 있던 *dnrF* 유전자의 promoter 부분만이 pET vector의 T7-promoter 에 연결될 수 있는 구조로 바뀌었고, down stream의 유전자는 전장이 연결되어 있는 상태이다(Fig. 1) pET213의 DNA 중 PCR방법으로 증폭시킨 *EcoRI/HindIII*단편의 160 bp의 염기배열은 T7 promoter primer를 이용하여 확인하였다. pET213으로부터 발현될 DnrF 단백질은 대장균의 periplasmic space로의 단백질 이송을 위한 22개의 아미노산으로 구성된 PelB peptide이외에 multicloning site에서 유래된 11개의 아미노산으로 구성된 additional peptide가 DnrF단백질의 N-terminal에 부가되며 DnrF 단백질의 7번째 aspartic acid로부터 489번째의 asparagine까지의 483 a.a로 구성된 polypeptide가 연결된 fusion protein이 만들어지도록 고안되었고 이러한 fusion protein의 예상 분자량은 55.9 KDa이었다(Fig. 2).

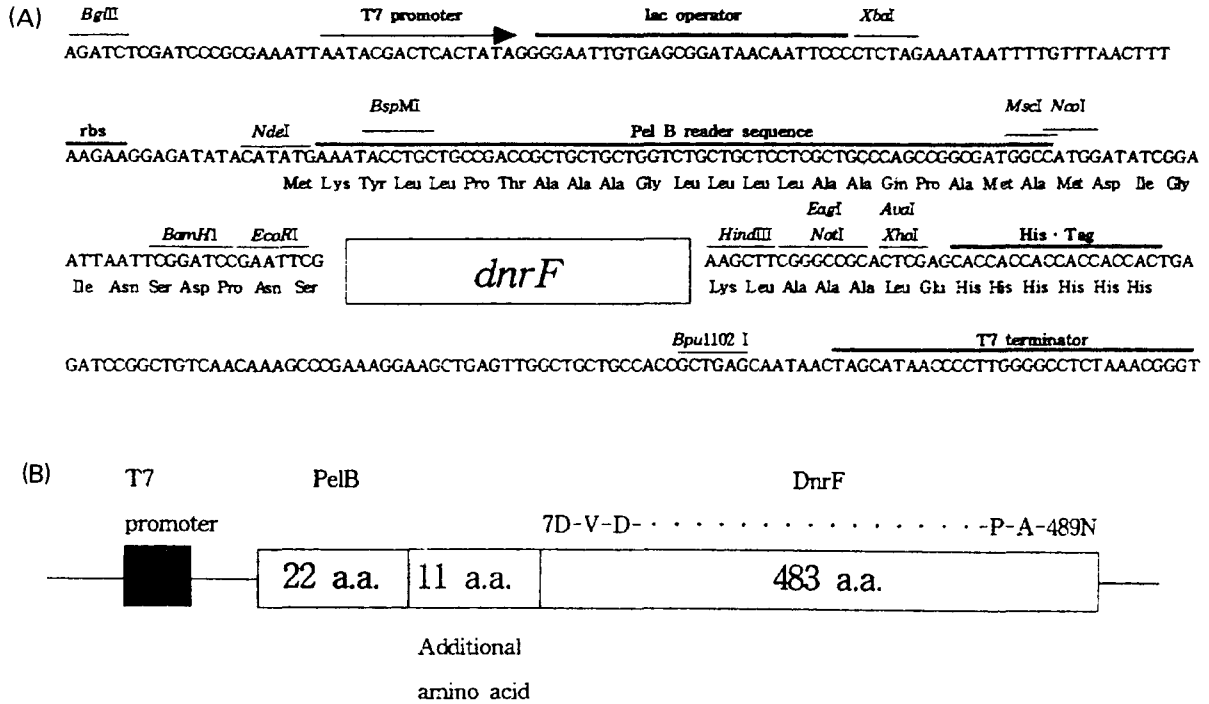


Fig. 2. Nucleotide sequence of the *dnrF* inserted region in pET213(A) and construction of expected fusion protein(B).

pET213을 *E. coli* BL21 host 에 도입시킨후 IPTG로 유전자발현을 유도시킨후 효소 활성을 측정하여 대량발현 여부를 조사하였다.

**Aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 대량 발현**

IPTG를 이용한 aklavinone 11-hydroxylase gene의 대량 발현은 Smith 등의 방법을 변형하여 실시하였다 [15]. *E. coli* BL21을 LB 액체 배지에 ampicillin(50 µg/ml)과 함께 접종하여 12시간 배양한 후 3000 rpm에서 10분간 centrifuge하여 균체만을 모은 후 동량의 M9액체배지를 이용하여 suspension하였다. 3000 rpm에서 10분간 다시 centrifuge한 후 M9배지에 resuspension하여 ampicillin(50 mg/ml) 100 µl와 함께 1 ml을 100 ml의 M9액체 배지에 접종하여 2시간 배양한 후, IPTG를 1 mM을 첨가하여 3시간 동안 발현시킨 다음 3000 rpm에서 20분간 centrifuge후 균체만을 모아 -20℃에 보관하였다. *E. coli* BL21을 이용한 aklavinone-11 hydroxylase의 발현유도실험은, 배양온도를 37℃와 28℃로 변화시키고, IPTG의 최종농도를 각 배양온도에서 0 mM에서 0.1 mM의 농도로 변화시켜 사용하였다(Fig. 3).

**Aklavinone 11-hydroxylase를 이용한 polyclonal antibody의 준비**

항체를 제작하기 위하여, 항원단백질인 aklavinone 11-hydroxylase를 SDS-PAGE 및 electroelution 방법으로

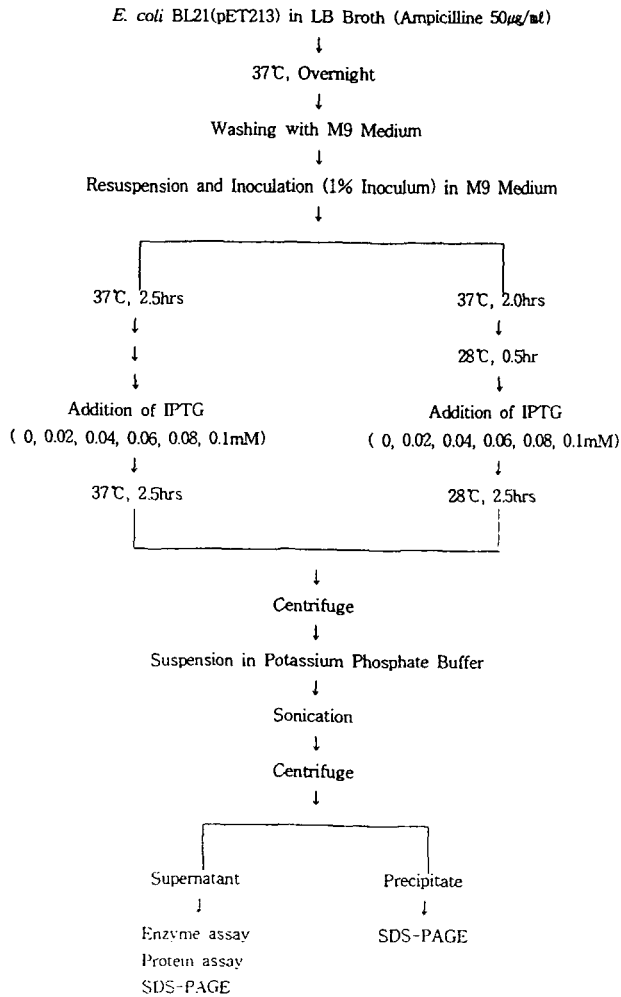
정제하였다. -20℃에 보관하였던 균체에 100 mM potassium phosphate buffer 10 ml을 넣어 suspension하여 1분씩 5번 sonication한후 5000 rpm에서 10분간 centrifuge하여 침전물만을 모은후 다시 100 mM phosphate buffer를 동량으로 첨가하여 resuspension한후 30 µl씩 eppendorf tube에 채취하여 SDS-PAGE에 이용하였다.

준비된 protein sample에 2×SDS sample buffer(glycerol 50 g, mercaptoethanol 25 ml, 1M Tris · Cl(pH 6.8) 125 ml, 10.5 g SDS/500 ml)를 동량 첨가하여 5분간 끓인 후 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 staining solution(Coomassie brilliant blue R 0.05%, MeOH 50%, acetic acid 10%, H<sub>2</sub>O 40%)에 20분간 염색한 후 destaining solution(MeOH 10%, 물90%)에 방치하여 단백질의 band를 확인하였다.

SDS-polyacrylamide gel로부터의 단백질의 회수는 Horinouchi 등의 방법을 이용하여 수행하였다[5]. SDS-PAGE gel 상으로부터 band를 잘라내어 dialysis bag에 넣고 10 mA의 세기로 overnight electroelution한 후 증류수 1 l에 2번 dialysis한 뒤 - 20℃에 보관하였다.

준비된 단백질과 Freund's adjuvant를 mouse 1마리 당 각각 100 µl씩 혼합하여 주사하고 10, 17, 24일째에 다시 boost injection한 후, 1주 후에 bleeding하여 serum을 채취하였다.

**항체의 역가 측정**



**Fig. 3. Experimental procedure for the production of aklavinone 11-hydroxylase in a soluble form under the conditions of different IPTG concentration and culture temperature.**

Immunoprotein의 형성을 확인하기 위하여 Nunc사의 immunomodule kit를 이용하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하였다. Antigen을 coating buffer(5.9% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 9.3% NaHCO<sub>3</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>/liter, pH 9.6)과 5 µg/ml로 희석하여 kit의 각 well당 50 µl씩 coating하여 overnight incubation시킨 후, 1× PBS(phosphate-buffered saline)으로 3번 washing하고, blocking solution(3% BSA in 1×PBS)으로 blocking하였다. PBS로 다시 washing한 채취한 serum을 dilution하여 각 well당 50 µl씩 분주한 후 실온에서 1시간 반응시킨 후, 1시간 동안 반응시킨 후 substrate buffer(4 mg orthophenyldiamine, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 ml citrate buffer)를

50 µl씩 분주하여 20분간 반응시킨 후, stopping buffer (2.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 50 µl씩 분주한 뒤 ELISA reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하여 antiserum의 형성을 확인하였다.

**Aklavinone 기질의 준비**

효소반응을 위한 기질은 *S. peucetius* ATCC 27952의 *dnrF* 결손 변이주(pKN8)의 배양액으로부터 추출하여 준비하였다. 균주를 NDYE 액체 배지에서 4~5일 동안 배양한 배양액에 oxalic acid를 3 g/100 ml의 비율로 첨가하여 55°C에서 45분간 가수분해시킨 후 10N NaOH를 사용하여 pH를 8.5로 조정하였다. 반응액에 동량의 Chloroform:MeOH=(9:1)을 넣고 잘 혼합하여 대사 산물을 용출시킨 후 3000 rpm에서 20분간 centrifuge하여 용매층을 회수하여 감압농축후 소량의 MeOH로 녹였다. 대사 산물의 확인은 TLC와 HPLC를 이용하였다[6, 8]. TLC 분석의 경우 plate는 silica gel을 사용하고, 전개용매는 aglycone type solvent로 hexane:chloroform:MeOH=5:5:1을 이용하였다. HPLC분석의 경우 ODS-A column을 이용하였고 mobile phase로는 42% acetonitrile, 0.075% phosphoric acid, 0.16% SDS가 혼합된 3차 증류수를 이용하였다.

**단백질의 정량**

각각의 배양 조건에서 성장한 균체의 단백질의 양을 측정하기 위해서 Bradford 분석법을 이용하였다[14]. 배양한 균체에 각각 300 µl의 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충액(pH 7.5)을 넣어 현탁시키고, 초음파분쇄기로 분쇄한 후 10000 rpm에서 30분간 원심분리하여 얻어진 침전물과 supernatant를 이용하여 각각의 protein의 양을 측정하였는데, 이때 BSA(bovine serum albumin)를 표준품으로 이용하여 standard curve를 작성한 후 측정하였다.

**Aklavinone 11-hydroxylase의 효소반응**

Aklavinone 11-hydroxylase의 효소반응은 Filippini 등의 *in vitro* 방법을 변형하여 실시하였다. Aklavinone (20 mg/ml) 20 µl, 100 mM NADPH 5 µl, enzyme assay buffer(1M phosphate buffer, pH 7.5) 200 µl와 효소 용액 100 µl을 첨가하여 3차 증류수를 이용하여 최종 2 ml로 조정한다. 다음, 28°C shaker에서 2시간 반응하였다. 여기에 동량의 chloroform:MeOH=(9:1)을 첨가하여 잘 혼합한 다음 3000 rpm에서 10분간 centrifuge하여 용매층을 회수하여 rotary evaporator로 농축한 후 소량의 MeOH로 녹여 HPLC분석에 이용하였다. HPLC의 분석의 경우 aklavinone을 분석할 때와 동일한 mobile phase, column을 이용하였다.

### Western blot analysis

pET213을 도입한 *E. coli* BL21로부터 유도된 protein 중에서 목적 단백질인 DnrF의 염기 배열로부터 예상되는 위치를 명확히 밝히기 위해서 SDS-PAGE를 통하여 total protein을 분리한 뒤 Pharmacia사의 multiphore electrophoresis kit를 이용하여 electrotransfer 방법에 의해 nitrocellulose membrane에 옮겼다.

Ponceau S staining으로 transfer된 protein band를 확인한 후 1×TBS(Tris-buffered saline:20mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5)으로 washing한 후 blocking solution(3% gelatin in 1× TBS) 100 ml을 넣어 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 1×TTBS(1×TBS containing Tween 20)으로 washing후 blocking solution과 1:1,000으로 희석한 primary antibody를 넣고 실온에서 overnight incubation하였다. 1×TTBS로 10분씩 3번 washing한 후 blocking solution에 1:3,000으로 희석한 secondary antibody(conjugated Horseradish peroxidase)를 넣고 1시간 동안 반응시키고 1×TTBS로 washing한 후 HRP color reagent A (4-chloro-1-naphthol in diethylene glycol)와 HRP color reagent B(hydrogen peroxide)를 포함한 HRP color development buffer를 이용하여 1분간 발색시켜 band의 형성을 확인한 후 건조시켜 보관하였다.

### 결과 및 고찰

#### 대장균 발현벡터를 사용한 Aklavinone 11-Hydroxylase 유전자의 발현

pET213을 도입한 대장균을 1 mM IPTG로 발현유도를 시킨 결과, 효소활성은 전혀 나타나지 않았으나, 염기 배열로부터 예상되는 55 kDa의 위치에 다량의 단백질이 생성되었음을 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 단백질의 크기로 판단하면 PelB leader sequence가 제거되지 않은 상태였지만, 이와 같은 leader sequence나 이와 연결된 11개의 추가 아미노산의 존재가 효소 활성에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 예상되었다. 또한 DnrF단백질의 N-terminal에서 6개의 아미노산이 제거되었는데 이의 효소 활성에 미치는 영향도 거의 없을 것으로 예상되었다. 일반적으로 *E. coli*를 숙주로 하여 외래유전자를 대량으로 발현시키는 경우 phase contrast microscope로 볼 수 있는 cytoplasmic granule을 형성한다. 이와같은 granule은 다량의 외래단백질의 형성으로 단백질의 folding이 제대로 일어나지 않아 발생하는 것으로 추정되며, 이들은 과발현될 때 insoluble mass로 형성되는 것으로 활성이 없는 형태이며 inclusion body라고 부르고 있다.

한편, pMC213을 도입한 *Streptomyces lividans* 1326을 이용하여 동일 유전자를 대량발현시킨 결과 효소 활성은

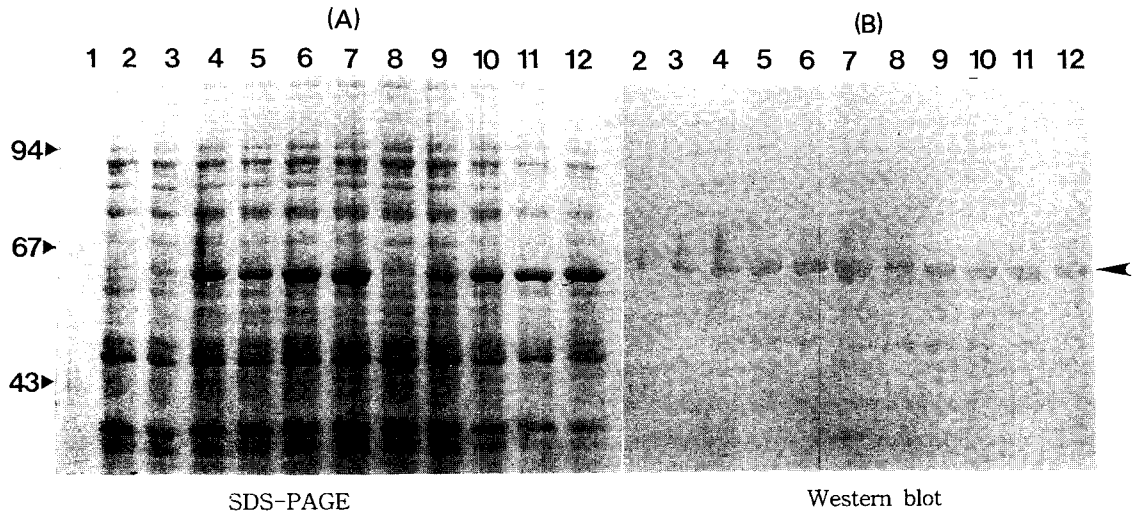
나타났으나 SDS-PAGE 상에서의 단백질의 관찰이 불가능하였고, 또한 단백질의 정제시 효소 활성이 소실되어 정제가 불가능하였다(data not shown). 이러한 효소 활성의 소실의 원인은 세포 내의 어떤 저분자물질이 효소 활성에 필요하기 때문일 것으로 추정된다. Aklavinone 11-hydroxylase 효소를 다른 유도체의 합성에 이용하기 위하여는 효소의 정제가 필수적인데, 효소 정제시 효소를 함유하는 fraction을 검출하기 위한 방법의 일환으로, 이 단백질을 인식할수 있는 항체를 제작하기 위하여 55 KDa위치에 생성된 단백질을 회수하여 electroelution을 통해 정제를 실시하고 이를 SDS-PAGE로 확인하였다.

#### Aklavinone 11-Hydroxylase 유전자의 대량발현 조건

*dnrF* 유전자의 *E. coli*를 이용한 과발현도 inclusion body형성을 유도하는 것으로 판단되어, 대장균계에서 활성형의 aklavinone 11-hydroxylase를 가장 능률적으로 발현시킬 수 있는 배양조건을 조사하였다. 배양조건은 성장속도를 늦추게 하기 위하여 배양온도를 낮게하는 방법과, 갑작스런 IPTG에 의한 발현유도현상을 억제하기 위하여 IPTG의 농도를 조절하는 방법을 사용하였다.

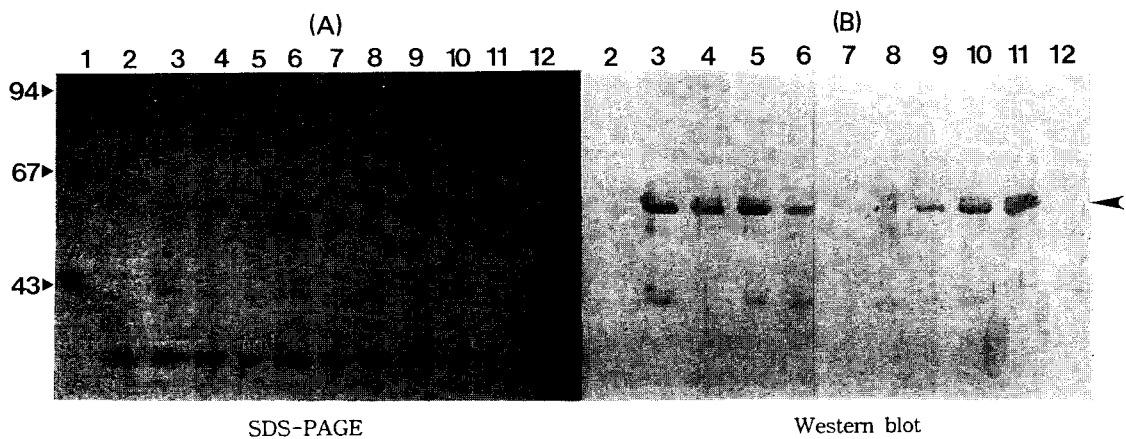
37℃에서 배양했을 경우에는 0.02 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도하였을 때 가장 높은 conversion률을 보였으며 0.04 mM, 0.06 mM IPTG를 첨가 하였을 때도 50%이상의 conversion률을 보였다. 28℃ 배양의 경우, 0.02 mM IPTG에서는 conversion이 거의 일어나지 않았으며 0.08 mM IPTG를 첨가했을 때도 50% 이상의 conversion률을 보였다. 즉, 28℃ 배양의 경우 37℃ 배양의 경우보다 IPTG 농도가 높아야 expression이 원활히 일어나며 그에 따른 conversion rate도 높아진다는 것을 알 수 있다.

이러한 결과를 바탕으로, 침전물과 supernatant를 각각 SDS-PAGE를 실시하여 각 배양조건에서 나타나는 단백질의 양상을 비교하여 보았다(Fig. 4, 5). 그 결과, 37℃의 배양조건에서는 IPTG의 농도가 0.04 mM이상에서는 대부분의 단백질이 inclusion body를 형성하여 supernatant내의 활성형 단백질의 양이 현저히 감소함을 알 수 있었고(Fig. 4: lane 4-7, Fig. 5: lane 4-7), 28℃에서 배양하는 경우 전반적으로 침전물에서 발견되는 inclusion body의 양은 감소한 반면, 0.06 mM이상의 IPTG 농도에서도 활성형 단백질이 다량으로 supernatant에 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 4: lane 8-11 Fig. 5: lane 8-11). 단백질의 양으로부터 판단하였을 때, 28℃에서 배양하고 0.06 mM의 IPTG로 발현을 유도하였을 때 aklavinone 11-hydroxylase 효소의 발현양이 최대가 됨을 확인하였는데, 이는 HPLC를 통한 효소활성 분석의 결과와 일치한다(Fig. 6). 본 실험의 결과 PelB leader sequence와 N-terminal의 6개의 아미노산이 제거된 DnrF단



**Fig. 4. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of the insoluble cellular protein prepared from *E. coli* BL21(pET213) with anti-DnrF polyclonal antibodies.**

Lane 1 represents the low molecular weight size marker. *E. coli* cultures were incubated at 37°C (lane 2~lane 7) or 28°C (lane 8~lane 12). The final concentration of IPTG used for induction was 0.02 mM (lane 3 and lane 8), 0.04 mM (lane 4 and lane 9), 0.06 mM (lane 5 and lane 10), 0.08 mM (lane 6 and lane 11), 0.1 mM (lane 7 and lane 12). The band for aklavinone 11-hydroxylase is indicated by arrow.



**Fig. 5. SDS-PAGE (A) and Western blot analysis (B) of the soluble cellular protein prepared from *E. coli* BL21(pET213) with anti-DnrF polyclonal antibodies.**

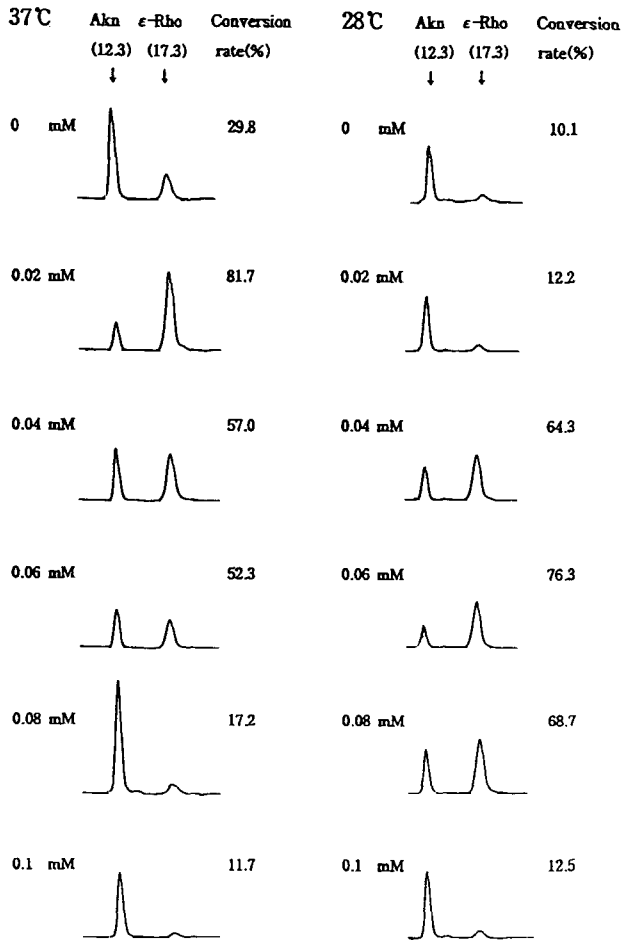
Lane 1 represents the low molecular weight size marker. *E. coli* cultures were incubated at 37°C (lane 2~lane 7) or 28°C (lane 8~lane 12). The final concentration of IPTG used for induction was 0.02 mM (lane 3 and lane 8), 0.04 mM (lane 4 and lane 9), 0.06 mM (lane 5 and lane 10), 0.08 mM (lane 6 and lane 11), 0.1 mM (lane 7 and lane 12). The band for aklavinone 11-hydroxylase is indicated by arrow.

백질과의 fusion protein은, 효소 활성에 큰 영향없이 활성형의 단백질로 생산될 수 있음을 확인하였다.

**요 약**

일반적으로 *Streptomyces*류는 성장이 늦고 유지가 어려운 반면, *E. coli*는 배양기간이 짧고 유전자 조작도 간편한 장점이 있기 때문에, *E. coli*를 이용하여 유용단백질을 생산하는 연구가 일반적인 흐름이다. 그러나 *E. coli*에서 외래유전자를 도입하여 대량으로 생산을 시키는 경우에 비용해성의 inclusion body를 형성하는 경우가 많으므로

용해성의 활성형 단백질을 생산하기 위하여는 여러 가지 조건을 고려하여야 한다. 본 논문에서는 aklavinone 11-hydroxylase gene(*dnrF*)을 *E. coli* BL21에서 발현시킬 때의 배양조건을 배양온도와 IPTG 농도의 두가지 요소를 조합하여 변형시키는 방법으로, 활성형 단백질의 생산을 최대화하고 inclusion body의 형성을 최소화하는 배양조건을 조사하였다. 그 결과, 37°C에서 배양했을 때에는 0.02 mM의 IPTG를 첨가하였을 때 inclusion body를 가장 적게 만들고, 그에 따라 생산되는 효소활성도가 가장 높았다. 반면, 28°C로 배양온도를 낮추었을 때에는 0.06 mM의 IPTG를 첨가하였을 때 aklavinone 11-hy-



**Fig. 6. HPLC analysis of the aklavinone 11-hydroxylase activity expressed in *E. coli* under different cultural conditions.**

The cultural temperature and the final concentration of IPTG used in this experiment are indicated. AKN (retention time, 12.3 min) and  $\epsilon$ -Rho (retention time, 17.3 min) mean the peak for aklavinone and  $\epsilon$ -rhodomycinone, respectively. Conversion rate was calculated from the area of the peak for  $\epsilon$ -rhodomycinone and aklavinone, by the formula

$$\text{of, conversion rate (\%)} = \frac{\text{area of } \epsilon\text{-rhodomycinone}}{\text{area of aklavinone} + \text{area of } \epsilon\text{-rhodomycinone}} \times 100$$

droxylase효소가 최대로 생산됨을 SDS-PAGE 및 효소 활성측정으로 확인하였다. IPTG농도를 0.1 mM로 높인 경우에는 28°C, 37°C에서 모두 aklavinone 11-hydroxylase효소가 과발현되어 inclusion body를 가장 많이 생성하였음을 알 수 있었다.

방선균에서 동일 유전자를 대량발현시키는 경우 발현된 단백질의 효소 활성은 있으나 SDS-PAGE상에서의 단백질의 관찰이 불가능하였고, 동시에 단백질의 정제시 효소활성이 소실되어 정제가 불가능하였다. 이러한 효소활성의 소실의 원인은 세포내의 어떤 저분자물질일 것으로 추정되며 본 연구에서 제작한 antibody를 이용하면, 효소의 정제가 용이하게 수행될 것이다. 특히 대장균계

에서의 활성형 효소의 최적발현조건에서 세포를 배양하거나, inclusion body의 refolding을 실시한 후, 항체를 이용한 Western blot assay를 지표로 효소를 정제하면, 미지의 cofactor의 정체도 밝혀지고 aklavinone 11-hydroxylase류의 효소 특성 연구에 큰 도움이 될 것이다.

또한 이 효소를 이용한 다양한 종류의 bioconversion을 실시하여 그동안 background 때문에 생성된 product의 검출이 불가능했었던 소량의 생성산물의 분석도 가능할 것으로 판단되어 금후의 bioconversion연구에 기대하는 바가 크다.

## 감사의 말

본 연구는 1997년 명지대학교 자연과학 연구소 연구비 지원에 의하여 행하였으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Dickens, M. L., J. Ye, and W. R. Strohl. 1995. Analysis of clustered genes encoding both early and late steps in daunomycin biosynthesis by *Streptomyces* sp. strain C5. *J. Bacteriol.* **177**: 536–543.
- Filippini, S. M., M. Solinas, U. Breme, M. B. Schluter, D. Gabellini, G. Biamonti, A. L. Colombo, and L. Garofano. 1995. *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis gene, *dnrF*: sequence and heterologous expression. *Microbiol.* **141**: 1007–1016.
- Hong, Y. S., C. K. Hwang, S. K. Hong, Y. H. Kim, and J. J. Lee. 1994. Molecular cloning and characterization of the aklavinone 11-hydroxylase gene of *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952. *J. Bacteriol.* **176**: 7096–7101.
- Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, and J. M. Ward. 1985. *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*, p. 239. *The John Innes Foundation, Norwich*.
- Horinouchi, S., M. Kito, M. Nishiyama, K. Furuya, S. K. Hong, K. Miyake, and T. Beppu. 1990. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**: 49–56.
- Hwang, C. K. 1994. The biosynthesis of anthracycline antibiotics: Cloning and characterization of a gene cluster linked to doxorubicin resistance gene of *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952. *Ph.D. Thesis of Chosun University, Korea*.
- Hwang, C. K., H. S. Kim, Y. S. Hong, S. K. Hong, and J. J. Lee. 1995. Expression of *Streptomyces peucetius* for doxorubicin resistance and aklavinone 11-hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133 and production of hybrid aclacinomycin. *Antimicrob. Agent and Chemo.* **39**:

- 1616–1620.
8. Jhodo, O., H. Tone, R. Okamoto, and A. Yoshimoto. 1993. Microbial glycosidation of some anthracycline antibiotics by an antibiotic-negative mutant of aclarubin producer. *J. Antibiotics* **46**: 1219–1230.
  9. Kim, Y. H., J. J. Lee, S. K. Hong, Y. S. Hong, C. K. Hwang, H. S. Lee, and H. S. Kim. 1994. A survey for the microbial metabolism and its application to the microbial transformation, pp. 175–209. *Report for the Korean Ministry of Science and Technology*.
  10. Niemi, J. and P. Mantsala. 1995. Nucleotide sequences and expression of genes from *Streptomyces purpurascens* that cause the production of new anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. *J. Bacteriol.* **177**: 2942–2945.
  11. Otten, S. L. and C. R. Hutchinson. 1990. Cloning and expression of daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *S. peucetius* subsp. *caesius*. *J. Bacteriol.* **172**: 3427–3434.
  12. Rajgarhia, V. B. and W. R. Stohl. 1997. Minimal *Streptomyces* sp. strain C5 daunorubicin polyketide biosynthesis genes required for aklavinone acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**: 2690–2696.
  13. Ronald, M. A. and C. P. Lawrence. 1993. *Handbook of Microbial Media*, p. 529. CRC press.
  14. Shen, B. and C. R. Hutchinson. 1996. Deciphering the mechanism for the assembly of aromatic polyketides by a bacterial polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6600–6604.
  15. Smith, D. B. and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31–40.
  16. Tsukamoto, N., I. Fujii, Y. Ebizuka, and U. Sankawa. 1994. Nucleotide sequence of the *aknA* region of the aklavinone biosynthetic gene cluster of *Streptomyces galilaeus*. *J. Bacteriol.* **176**: 2473–2475.

(Received October 15, 1997)