

대장균에서 대량발현된 *Streptomyces peucetius* 유래 Aklavinone 11-Hydroxylase 효소의 최적 가용화 조건

민우근 · 홍영수¹ · 최용경¹ · 이정준¹ · 홍순광*
명지대학교 이과대학 생명과학과, ¹KIST 생명공학 연구소

Optimization of Refolding Conditions for the Aklavinone 11-Hydroxylase of *Streptomyces peucetius* Overexpressed in *Escherichia coli*. Min, Woo-Keun, Young-Soo Hong¹, Yong-Kyung Choe¹, Jung-Joon Lee¹, and Soon-Kwang Hong*. Department of Biological Science, Myong Ji University, Yong-in 449-728, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, Taejeon 305-600, Korea - The aklavinone 11-hydroxylase which was overexpressed using T7 promoter in *E. coli* could be detected in SDS-PAGE only in insoluble precipitate without any detectable enzyme activity. The insoluble enzyme was solubilized in 6M guanidine · HCl solution and their refolding ability was tested under various conditions. When the enzymatic activity was checked by the bioconversion experiment, stepwise dialysis against 6M, 3M, 1M guanidine · HCl and finally 100 mM potassium phosphate buffer of the solubilized protein gave the best bioconversion efficiency. The aklavinone 11-hydroxylase showed its enzymatic activity in the reaction buffer containing NADPH with vigorous shaking. The enzymatic activity was lost during partial purification and regained by the addition of crude extract of *S. lividans* in the reaction mixture. This effect was confirmed to due to some low-molecular weight component(s) in the crude extract, because the addition of dialyzed crude extract could not recover the enzymatic activity.

Key words: refolding conditions, aklavinone 11-hydroxylase

항암제중 가장 널리 사용되고 있는 doxorubicin의 생합성에 관하여 연구하기 위하여, doxorubicin 생산균인 *Streptomyces peucetius* ATCC 27952로부터 doxorubicin 내성유전자(*drrAB*)를 cloning하였다[3]. 클로닝된 단편의 분석결과, *drrAB*의 upstrem 부위에 한 개의 ORF가 발견되었으며, 이 ORF는 염기배열로부터 추정되는 아미노산 배열을 분석한 결과 flavin type hydroxylase와 높은 유사성을 갖는 것으로 사료되었다[2]. 또한, 일반적인 FAD 또는 NAD(P)의존성 효소의 N말단과 C말단에 존재하는 잘 보존된 ADP 부위의 결합부위와 FAD의 ribityl group과의 결합부위에 해당하는 두가지의 보존된 아미노산 배열이 존재하는 것으로 판단되었다. 이러한 ORF의 기능을 확인하기 위하여, ORF를 포함하는 2.3 kb DNA단편을 *Streptomyces lividans* 1326에 도입하였고, 이 형질전환체는 배양액에 첨가한 aklavinone을 ϵ -rhodomycinone으로 전환시키는 활성이 확인되어, 이 DNA 단편에 aklavinone 11-hydroxylase 유전자(*dnrF*)가 함유되어 있는 것으로 판단하였다. 또한 생합성에서 유사한 경로를 공유하고 있는 aclacinomycin생산주 *Streptomyces galilaus* ATCC 31133에 *dnrF*유전자를 도입시킨 결과, 11-hydroxyaklacinomycin이라는

hybrid antibiotics를 생산하였고, 이들은 기존의 aclacinomycin에 비하여 약효가 증가된 화합물로 판정되었다[4].

본 연구실에서는 aklavinone 11-hydroxylase 효소의 기능을 이용한 효소변환기술을 개발하기 위하여, 우선 aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 대량발현을 시도한 바 있다. 방선균 유래의 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-22b(+)에 도입하여 IPTG로 발현을 유도하였다. 그러나 외래단백질의 과발현으로 인해 불용성·비활성의 inclusion body를 형성함을 확인하고, 활성형의 aklavinone-11 hydroxylase발현을 유도하기 위한 최적배양조건을 검토한 결과, 37C에서 0.02 mM의 IPTG로 발현유도를 시키는 경우가 가장 활성이 뛰어난 것으로 보고한 바 있다[8]. 그러나, 실제 생산된 활성형 aklavinone 11-hydroxylase의 양은 소량으로, 효소 정제 및 효소 이용에 어려움이 많았다. 따라서, 불용성·비활성의 inclusion body를 대량으로 생산하게 하는 조건에서 이를 다시 활성형으로 변환시킬 수 있는 refolding 방법을 검토함으로써 최적의 생체의 반응계를 수립하고자 하였다.

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

Aklavinone 기질의 준비

효소반응을 위한 기질은 *S. peuceitius* 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 가수분해 시킨 후 10N NaOH를 사용하여 pH를 8.5로 조정하였다. 반응액에 동량의 Chloroform:MeOH=9:1을 넣고 잘 혼합하여 대사 산물을 용출시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 용매층을 회수하여 감압농축후 소량의 MeOH로 녹였다. 대사 산물의 확인은 TLC와 HPLC를 이용하였다[3, 5]. 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.

Aklavinone 11-hydroxylase의 효소반응

Aklavinone 11-hydroxylase의 효소반응은 Filippini 등의 *in vitro* 방법을 변형하여 실시하였다[1]. Aklavinone(20 mg/ml) 20 μ l, 100 mM β -NADPH 5 μ l, enzyme assay buffer(1M phosphate buffer, pH 7.5) 200 μ l와 효소 용액 100 μ l, *S. lividans* TK24의 crude extract 100 μ l를 첨가하여 3차 증류수를 이용하여 최종 2 ml로 조정한 다음, 28°C shaker에서 3시간 반응하였다. 효소 반응에 이용하기 위한 crude extract는 *S. lividans* TK24를 YEME 액체 배지 100 ml에 배양한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체만을 모은 후, 10 mM potassium-phosphate buffer (pH 7.5) 10 ml을 첨가하여 현탁시키고, 1분씩 5번 sonication한 후, 15,000 rpm에서 10분간 재원심분리하여 얻은 상층액을 정량하여, 단백질 농도를 1 μ g/ μ l로 조정하여 사용하였다. 여기에 동량의 chloroform:MeOH=9:1을 첨가하여 잘 혼합한 다음 3,000 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

Aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 대량 발현

Aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 발현을 위해서는 *E. coli* BL21(F', *omp* T, *hsdS* β (r_{β} , m_{β})[*gal*, *dcm*, (DE3)]을 숙주세포로 이용하였는데, 이는 T7 RNA polymerase가 *lacUV5* promoter에 연결된 상태로 염색체 DNA내에 존재하고 있는 균주이다.

이 균주를 숙주로 하여, pET-22b(+)-백터의 T7 pro-

moter에 *dnrF* 유전자의 coding 영역을 연결시킨 발현용 벡터 pET-213을 도입시켜, 대량발현을 시도하였다.

IPTG를 이용한 aklavinone 11-hydroxylase 유전자의 대량 발현은 Smith 등의 방법을 변형하여 실시하였다[10]. *E. coli* BL21을 LB 액체 배지에 ampicillin(50 μ g/ml)과 함께 접종하여 12시간 배양한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체만을 모은 후 동량의 M9액체 배지[9]에 현탁하였다. 3,000 rpm에서 10분간 다시 원심분리를 실시한 후 M9배지에 재현탁하여 ampicillin(50 mg/ml) 100 μ l와 함께 1 ml을 100 ml의 M9 액체 배지에 접종하여 2시간 배양한 후, IPTG를 최종 농도 1 mM로 첨가하여 3시간 동안 발현시켜 aklavinone 11-hydroxylase의 inclusion body형성을 유도한 다음, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 균체만을 모아 -20°C에 보관하였다.

Inclusion body의 형성과 refolding 연구

Inclusion body를 활성형으로 변환하기 위한 refolding은 Katsuzumi 등의 방법[6, 7]을 변형하여 수행하였고, 대략적인 실험 개요를 Fig. 1에 나타냈다. 400 ml의 M9 액체배지에서 1 mM의 IPTG로 발현유도한 균체에 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) 20 ml를 첨가하여 현탁시킨 후 초음파 파쇄를 실시하였다. 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물만을 모은 후, 6M guanidine-HCl(pH 8.5)를 동량 첨가하여 유리병으로 완전히 녹인 후, 10,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하여 pH 8.5로 조정한 후 실온에 12시간 방치하였다. 이것을 5 ml씩 취하여 Fig. 1에 나타낸 방법으로 (1) one step dialysis, (2) discontinuous dialysis, (3) continuous dialysis로 나누어 refolding을 실시하고, 10,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 다시 상층액을 취하여 효소 활성 분석에 이용하였다.

이와 같이, inclusion body를 3가지의 다른 방법을 이용하여 soluble form으로 바꾼 후, 각각을 이용하여 효소 반응을 수행한 뒤, HPLC를 이용하여 효소활성을 측정하여 refolding에 있어서의 최적 조건을 조사하였다. 이 때 효소 활성에 있어 NADPH 이외의 다른 cofactor의 필요 여부를 알아보기 위하여 *S. lividans* TK24의 crude extract를 첨가하였는데 crude extract를 바로 첨가하는 방법과 투석한 후 첨가하는 방법을 사용하였다. 각각의 refolding조건에 따른 가용화된 aklavinone 11-hydroxylase의 활성을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Crude extract를 바로 첨가하여 효소 반응을 하였을 때는 6M guanidine-HCl의 농도를 3M, 1M의 순으로 단계적으로 조정하고, 최종적으로 100 mM의 인산 완충액에 평형화시키는 discontinuous dialysis를 실시한 경우에 가장 높은 conversion율을 보였으며, peristaltic pump를

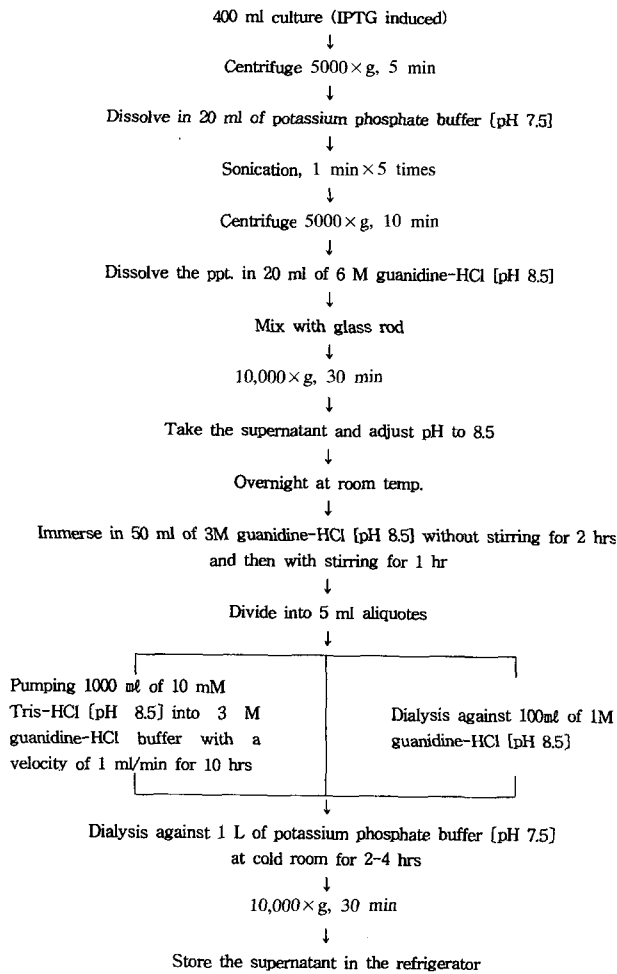


Fig. 1. Refolding procedure of the insoluble aklavinone 11-hydroxylase overexpressed in *E. coli*.

사용하여 연속적으로 guanidine-HCl의 농도를 감소시키는 continuous dialysis를 한 경우에도 60%이상의 conversion률을 보였다. 그러나 one step dialysis를 하였을 때는 10%정도의 낮은 conversion율을 보였는데 이는 투석시 외부 용액의 농도가 급격하게 낮아짐으로써 guanidine이 빠른 속도로 빠져나감으로 인해 folding이 제대로 일어나지 않은 것으로 판단된다. 이러한 결과를 바탕으로 discontinuous dialysis를 실시한 효소에 *S. lividans* TK24의 crude extract를 4°C에서 투석하여 첨가했을 경우에는 효소 활성이 10% 미만으로 현저히 감소함을 확인하였는데, 이것은 aklavinone 11-hydroxylase의 효소 반응에 NADPH 이외에 *S. lividans* TK24의 crude extract내에 존재하는 어떤 저분자 물질을 필요로 한다는 것을 시사하고 있다.

방선균유래의 유전자는 유전자 구조 및 해석기구의 차이로 인하여 방선균에서만 발현되는 특징을 보이고 있다. 물질변환에 많은 가능성을 갖고 있는 aklavinone-11

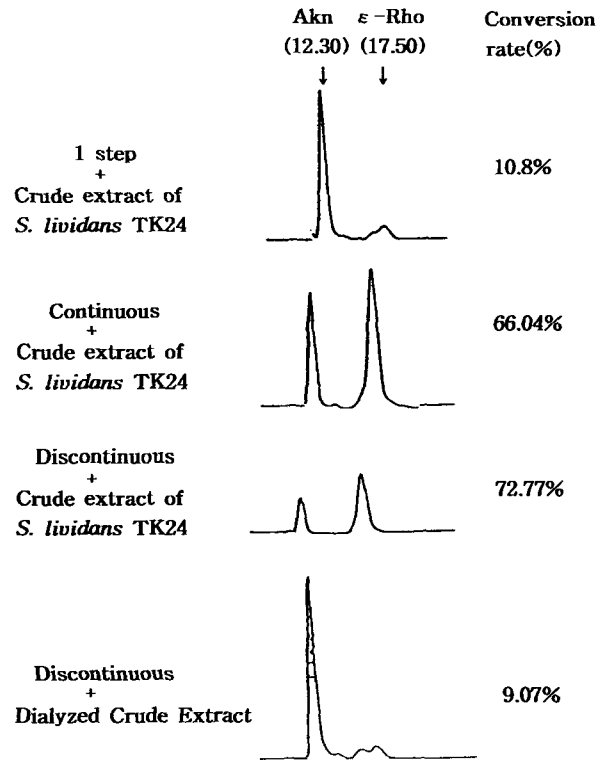


Fig. 2. HPLC analysis of the refolded aklavinone 11-hydroxylase activity.

Three kinds of dialysis method were used in this experiment as shown in Fig. 1. To supplement some compounds which are necessary for the enzymatic reaction, the crude extract prepared from *S. lividans* TK24 was added in the reaction mixture. Conversion rate was calculated from the area of peak for ϵ -rhodomycinone and aklavinone, by the formula of, conversion rate(%)=

$$\frac{\text{area of } \epsilon\text{-rhodomycinone}}{\text{area of } \epsilon\text{-rhodomycinone} + \text{area of aklavinone}}$$

hydroxylase를 이용하기 위하여 우선 aklavinone-11 hydroxylase유전자의 대량발현계를 구축하였다. 발현의 편의를 도모하기 위하여 aklavinone-11 hydroxylase유전자(*dnrF*)를 방선균용 high copy-number plasmid pIJ702를 이용하여 *S. lividans*에 도입하여 그활성을 조사한 결과, 아주 강한 효소활성을 탐지하였다. 그러나, SDS-polyacrylamide gel 전기영동에서 해당하는 단백질의 구분이 불가능하였으며, 효소활성을 기준으로 정제를 실시한 경우 효소활성이 소실되어 더 이상의 정제가 불가능하였다(unpublished data). 따라서, 배양기간이 짧고 유전자 조작도 간편한 *E. coli*를 이용하여 aklavinone-11 hydroxylase 유전자를 대량발현시키는 연구를 실시하였다. 발현용 벡터인 plasmid pET-22b(+)¹의 T7-promoter에 *dnrF*유전자를 연결하여 IPTG로 발현유도를 시키는 과정에서, 대장균의 배양온도와 IPTG 농도를 조합하여 변형시키는 방법으로, 활성형 단백질의 생산을

최대화하고 inclusion body의 형성을 최소화하는 배양조건을 조사하였다. 그 결과, 37°C에서 배양을 실시하고 0.02 mM의 IPTG를 첨가하였을 때 inclusion body를 가장 적게 만들고, 그에 따라 생산되는 효소활성도 가장 높게 된다는 사실을 보고한 바 있다[8]. 그러나, 이러한 조건에서 발현된 효소는 양이 적어 효소 정제 및 효소이용에 제한이 되었다. 따라서 과량으로 불용체의 inclusion body를 만들게 한 후, 이를 가용화 시켜 효소활성을 얻게 함으로서 보다 많은 양의 효소확보가 가능할 것으로 판단하였다. 이러한 취지에서 본 연구의 결과를 활용하면, aklavinone 11-hydroxylase의 정제 및 생체의 반응계 확립에 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

본 연구결과는, 활성형의 aklavinone 11-hydroxylase 효소의 정제를 위하여 다량의 inclusion body를 대장균계에서 만들게 하고, 이중 inclusion body만을 회수하여 aklavinone 11-hydroxylase의 함유율을 높이고, refolding을 실시하여 효소정제를 원활히 하기 위한 것이다. 이와 같은 방법을 이용하면 간단한 정제단계로 효소정제가 가능할 것으로 판단되어, aklavinone 11-hydroxylase 효소를 이용한 연구에 많은 도움이 될 것으로 판단된다. 또한 전 논문에서 제작한 항체를 이용한 Western blot assay를 지표로 효소를 정제하면, 미지의 cofactor의 정체도 밝힐수 있으며 aklavinone 11-hydroxylase류의 효소 특성 연구에도 큰 도움이 될 것이다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(961-0100-001-2) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. 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. *Microbiology* **141**: 1007-1016.
2. 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.
3. 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*, pp. 239. *The John Lines Foundation, Norwich*.
4. 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 Chemother.* **39**: 1616-1620.
5. 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. Antibiot.* **46**: 1219-1230.
6. Katsuzimi, O., Y. Miyake, H. Wakayama, and T. Miyake. 1988. Effects of protein disulfide-isomerase on the refolding of human pro-urokinase cloned and expressed in *Escherchia coli*. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1735-1739.
7. Katsuzimi, O. Y., Miyake, H. Wakayama, and T. Miyake. 1988. Thioredoxin-catalyzed refolding of recombinant protein: Refolding of human pro-urokinase. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 2969-2972.
8. Min, W. K., Y. S. Hong, Y. K. Choe, J. J. Lee, and S. K. Hong. 1998. Overexpression of the aklavinone 11-hydroxylase gene from *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 in *Escherchia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(1): 61-67.
9. Ronald, M. A. and C. P. Lawrence. 1993. *Handbook of Microbial Media*, p. 529. CRC press.
10. Smith, D. B. and K. S. Johnson. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherchia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.

(Received February 17, 1998)