

재조합 대장균에서 *fadB* 유사효소의 Polyhydroxyalkanoates 합성에 미치는 역할의 규명

최 종 일 · 박 시 재 · † 이 상 업

한국과학기술원 생명화학공학과, 생물공정연구센터 및 대사공학 국가지정연구실, ¹한국과학기술원 바이오시스템학과
(접수 : 2004. 3. 3., 게재승인 : 2004. 8. 26.)

In Vivo Analysis of *fadB* Homologous Enzymes Involved in Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in Recombinant *Escherichia coli*

Jong-Il Choi, Si Jae Park, and Sang Yup Lee[†]

Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical & Biomolecular
Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology

¹Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea

(Received : 2004. 3. 3., Accepted : 2004. 8. 26.)

In vivo characterization of FadB homologous enzymes including PaaG, YdbU and YgfG for medium-chain-length (MCL) polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis was carried out in *fadB* mutant *Escherichia coli*. Previously, it was reported that amplification of FadB homologous enzymes such as PaaG and YdbU in *fadB* mutant *E. coli* resulted in enhanced biosynthesis of MCL-PHA by greater than two fold compared with control strain. In this study, we constructed *paaG fadB* double mutant *E. coli* WB114 and *ydbU fadB* double mutant *E. coli* WB115 to investigate the roles of PaaG and YdbU in biosynthesis of MCL-PHA. Inactivation of *paaG* and *ydbU* genes in *fadB* mutant *E. coli* harboring *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaC2* gene reduced the MCL-PHA production to 0.16 and 0.16 PHA g/L, respectively from 2 g/L of sodium decanoate, which are much lower than 0.43 PHA g/L obtained with *fadB* mutant *E. coli* WB101 harboring the *phaC2* gene. Also, we identified new FadB homologous enzyme YgfG, and examined its roles by overexpression of *ygfG* and construction of *ygfG fadB* double mutant *E. coli* WB113.

Key Words : *paaG*, *ydbU*, *ygfG*, *fadB*, recombinant *E. coli*, PHA

서 론

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 다량의 탄소원 존재 하에 영양분 제한 조건에서 탄소 및 에너지 저장 물질로서 세포질 내에 축적되는 hydroxycarboxylic acid로 이루어진 polyester 구조의 물질이다(1, 2). PHAs를 이루고 있는 단량

체는 현재까지 약 150 종류가 알려져 있으며(3), 단량체 내의 탄소 원자 수에 따라 polypropylene과 유사한 기계적 물성을 갖고 있는 short-chain-length (SCL) PHA에서 탄성체 성질을 갖고 있는 medium-chain-length (MCL) PHA까지 다양한 응용 범위를 갖고 있다(1). *Escherichia coli*는 다른 PHA 생산 균주들보다 여러 우수한 장점들을 갖고 있으며, 가장 경제적으로 SCL-PHA를 생산할 수 있는 균주로 보고되었기 때문에, *E. coli*를 이용한 MCL-PHA의 생산에 관한 많은 연구가 이루어지고 있다(1, 4).

MCL-PHA를 이루는 탄소 원자의 수가 6-12인 단량체의 전구체 물질인 MCL (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA (R3HA-CoA)는 fatty acid β -oxidation이나 생합성 경로를 통해서 얻어질 수 있다(1, 2). *Pseudomonas* 균주에서 얻어진 MCL-PHA synthase를 fatty acid β -oxidation이 손상된 재조합 *E. coli*에 cloning하여 MCL-PHA를 합성하는 연구들이 발표되었다

† Corresponding Author : Metabolic and Biomolecular Engineering National Research Laboratory, Department of Chemical & Biomolecular Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Department of BioSystems and Bioinformatics Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea

Tel : +82-42-869-3930, Fax : +82-42-869-3910

E-mail : leesy@kaist.ac.kr

(5-9). 이러한 연구들은 enoyl-CoA, 3-ketoacyl-CoA, (S)-3-hydroxyacyl-CoA들로부터 PHA synthase의 기질이 되는 R3HA-CoA가 합성된다는 것을 예상할 수 있게 한다. 특히 *fadB*가 비활성화된 재조합 *E. coli*에서는 아직까지 확인되지 않은 효소들에 의하여 β -oxidation 중간산물들이 R3HA-CoA로 변환되는 것으로 알려졌다(10). 최근에는 *FadB*와 유사한 효소들이 *fadB*가 비활성화된 재조합 *E. coli*에서의 MCL-PHA 생산에 필요하다는 것이 밝혀졌다(11). 또한 이러한 *FadB* 유사 효소들을 과다 발현시킬 경우 축적된 MCL-PHA의 함량이 증가한다는 것이 밝혀졌다(11).

따라서 본 논문에서는 이러한 *FadB* 유사 효소인 *PaaG*와 *YdbU*가 비활성화된 재조합 *E. coli*들을 제작하여 *E. coli* 내에서의 MCL-PHA 생합성에 대한 이들 효소들의 역할을 확인하였다. 또한 새로운 *FadB* 유사 효소인 *YgfG*를 탐색하였으며, MCL-PHA 생합성에서의 *YgfG* 역할을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에서 사용된 균주와 plasmids는 Table 1에 표시하였다. *E. coli* XL1-Blue는 plasmid 제작을 위한 균주로만 사용하였다. *paaG*, *ydbU*, *ygfG*가 제거된 mutant *E. coli* strains의 제작은 bacteriophage λ 의 red operon을 이용한 insertional inactivation 방법을 사용하였으며(6, 12), 각각의 유전자를 chromosome 상에서 pACYC184에서 유래한 tetracycline 저항 유전자로 치환하였다. PCR을 이용하여 chromosomal 상에서의 insertion을 확인하였다. *E. coli*에서의 유전자 염색체 서열은 보고된 *E. coli* K12의 genome sequences를 이용하였다(13). *E. coli ygfG*는 Table 2에서 보여진 primers를 사용하여, p10499A의 *EcoRI-HindIII* sites에 cloning 하였다. Polymerase chain reaction (PCR)은 Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)를 이용하여 PCR Thermal Cycler MP (Takara Shuzo Co., Shiga, Japan)로 수행하였다. DNA sequencing은 Bigdye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Co., Boston, MA, USA)과 Taq polymerase를 사용하여 ABI Prism™ 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer Co.)로 분석하였다.

배양 조건

유전자 조작을 위한 재조합 *E. coli*의 배양은 Luria-Bertani 배지 (LB, 10 g of Bacto-tryptone, 5 g of Bacto-yeast extract, 5 g of NaCl per liter)를 사용하였다. MCL-PHA의 생산을 위하여, 재조합 *E. coli*는 100 mL의 LB 배지에 탄소원으로 2 g/L 농도의 sodium decanoate (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 30°C, 250 rpm에서 96시간 배양하였다. 필요할 경우 항생제 ampicillin (Ap, 50 mg/L), chloramphenicol (Cm, 34 mg/L), tetracycline (Tc, 5 mg/L)를 배지에 첨가하였다.

분석 방법

PHA 농도와 조성은 fused silica capillary column (Supelco SPB™-5, 30 m (0.32 mm ID 0.25 mm film, Bellefonte, PA,

USA)를 갖는 gas chromatography (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)를 이용하여 분석하였다(14). 균체 농도와 PHA 분율은 이전에 보고된 방법(15)을 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or Plasmid	Relevant Characteristics	Reference or Source
<i>E. coli</i> strains		
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, suppE44, relA1, I, lac, F'[proAB lac^R lacZ(M15, Tn10 Stratagene^a tet)]</i>	
W3110	<i>F mcrA mcrB IN(rrnD'rrnE)1</i> (KCTC ^b
WB101	W3110 (<i>fadB::Km</i>)	6, 12
WB113	W3110 (<i>fadB::Km YgfG::Tc</i>)	This study
WB114	W3110 (<i>fadB::Km PaaG::Tc</i>)	This study
WB115	W3110 (<i>fadB::Km ydbU::Tc</i>)	This study
Plasmids		
p10499A	pTrc99A derivative; Ap ^r ; <i>gntT104</i> promoter	12
pMCS104613C2	pBBR1MCS derivative; <i>gntT104</i> promoter, <i>Pseudomonas</i> sp. 61-3 <i>phaC2</i> gene	12
p10499YgfG	p10499A derivative; <i>E. coli ygfG</i> gene	This study

^aStratagene Cloning System, La Jolla, CA, USA.

^bKorean Collection for Type Cultures, Daejeon, Republic of Korea.

Table 2. Primers used in PCR experiments^a

Sequence	Gene	Template
GGA ATT CAT GAA TTT ATC CAG ACG CAA T	<i>ygfG</i>	<i>E. coli</i> W3110 chromosome
CCC AAG CTT TTA ATG ACC AAC GAA ATT AGG		

^aRestriction enzyme sites are shown in boldface type.

결과 및 고찰

fadB homologous mutant *E. coli* strains 제작

보고된 *paaG*와 *ydbU*가 재조합 *E. coli*에서 PHA 생합성에 어떻게 관여하는가를 확인하기 위하여, *fadB* mutant *E. coli* strain WB101에서 *paaG*와 *ydbU*가 비활성화된 균주를 제작하였다. 그 결과, WB101에서 각각 *paaG*와 *ydbU*가 비활성화된 WB114와 WB115를 제작하였다. PHA polymerase로는 *Pseudomonas* sp. 6-19 *phaC2*(16)를 사용하여 재조합 *E. coli*에서의 PHA 생산을 확인하였다. *phaC2*를 갖는 재조합 WB101과 제작된 재조합 WB114, WB115 균주들을 sodium decanoate를 탄소원으로하여 LB 배지에서 배양한 결과는 Table 3에 표시하였다. Table 3에서 보여지듯이 *paaG*와 *ydbU*가 각각 제거된 WB114와 WB115는 원래의 모균주인 WB101과 비슷한 균체 농도를 가졌지만, PHA 농도와 함량은 크게 감소하였다. WB101이 0.43 g/L PHA 농도와 44.6 wt% PHA 함량을 가졌지만, WB114와 WB115는 각각 0.16 g/L과 16.2 wt%, 0.16 g/L과 15.8 wt%의 낮은 PHA 농도와 함량을 가졌다. 하지만, 단량체의 분율은 모두 비슷한 값을 가졌다. 이러한 결과들로부터 *paaG*와 *ydbU*는 *fadB*가 제거된 균

Table 3. Results of flask cultures of mutant *E. coli* strains harboring pMCS104613C2 and/or a p10499A derivative containing *fadB* homologous gene *ygfG*^a

Strain	Condition	DCW (g/L)	PHA conc. (g/L)	PHA content (wt%)	Monomer composition			
					3HB	3HHx	3HO	3HD
WB101	pMCS104613C2 ^b	0.98(±0.01)	0.43(±0.01)	44.6(±1.3)	0	9(±2)	37(±2)	54(±3)
WB114	pMCS104613C2	1.05(±0.1)	0.16(±0.03)	16.2(±2.0)	0	10(±3)	41(±3)	49(±4)
WB115	pMCS104613C2	1.08(±0.1)	0.16(±0.02)	15.8(±2.1)	0	9(±3)	40(±3)	51(±3)
WB113	pMCS104613C2	1.03(±0.1)	0.20(±0.02)	19.9(±1.8)	0	11(±2)	42(±2)	47(±3)
WB101	pMCS104613C2+ p10499A ^c	0.88(±0.01)	0.16(±0.01)	17.9(±0.9)	0	9(±2)	38(±2)	53(±2)
WB101	pMCS104613C2 + p10499YgfG	0.88(±0.04)	0.20(±0.03)	23.2(±1.3)	0	12(±3)	42(±4)	46(±4)

^aCells were cultivated for 96 h at 30°C in LB medium supplemented with 2 g/L of sodium decanoate. Cultures were carried out in triplicates.

^bData were taken from (12).

^cData were taken from (6).

주에서 β -oxidation pathway에서 얻어진 enoyl-CoA를 PHA polymerase의 기질로 사용되는 R3HA-CoA로 변환시키는데 관여한다는 사실을 확인할 수 있었다.

새로운 FadB homologous enzyme YgfG

E. coli genome sequence에서 FadB와 유사한 enzyme을 탐색한 결과 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 새롭게 FadB와 유사성을 갖는 YgfG를 확인하였다(24% identity of 128 homologous amino acids). 새롭게 탐색된 *ygfG*가 이전에 보고된 *paaG*와 *ydbU*와 같은 역할을 하는가를 확인하기 위하여 *ygfG*가 과다 발현되는 *E. coli*를 제작하여 PHA 생합성을 실험하였다. *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaC2*와 *E. coli* *ygfG*가 각각의 plasmid에서 발현이 되는 *E. coli* WB101 (pMCS104613C2 + p10499YgfG)를 2 g/L sodium decanoate가 첨가된 LB 배지에서 배양한 결과 *ygfG*가 과다 발현되지 않은 *E. coli* WB101 (pMCS104613C2 + p10499A)보다 높은 PHA 농도와 함량을 가졌다. *E. coli* WB101 (pMCS104613C2 + p10499A)에서의 PHA 농도와 함량은 각각 0.16 g/L와 17.9 wt%였지만, *E. coli* WB101 (pMCS104613C2 + p10499YgfG)는 0.20 g/L PHA 농도와 23.2 wt% 함량을 가졌다. 하지만, 이전의 보고에서 PaaG와 YdbU를 과다 발현 시킬 경우 PHA의 생산이 2배 이상 증가한 경우와 비교한다면, YgfG의 과다 발현은 PHA의 생산에 크게 영향을 미치지 않는 것이다. Table 3에서 보여지듯이, *E. coli* WB101에 pMCS104613C2 vector와 p10499A 유래의 vector를 모두 갖는 경우는 pMCS104613C2 vector 하나만을 갖는 경우보다 낮은 PHA 농도와 PHA 함량을 가졌다.

또한, *E. coli* WB101에서 *ygfG*가 비활성화된 WB113을 제작하여 배양한 결과 PHA 농도와 함량은 각각 0.20 g/L와 19.9 wt%를 가졌으며, 이러한 값들은 WB101에서 얻어진 값들보다 낮았으며, *paaG*와 *ydbU*가 제거된 mutants에서 얻어진 값들과 유사한 값을 가졌다. 최근에 YgfG는 tricarboxylic acid cycle에서 유래한 succinyl-CoA를 propionyl-CoA로 전환하는데 관여한다는 사실이 밝혀졌는데 (17), 새롭게 탐색된 YgfG는 이러한 기능 외에 PaaG나 YdbU와 마찬가지로 FadB와 homology를 갖는 enzyme으로서 fatty acid pathway에서 PHA synthesis로 전구체를 공급하는 역할을 한다는 사실을

확인하였다.

요 약

재조합 *E. coli*를 이용한 MCL-PHA의 생산에서 fatty acid pathway로부터 PHA 생합성 전구체 물질들이 만들어진다는 사실과 함께 이에 관여하는 enzymes이 밝혀지고 있다. 본 논문에서는 protein homology search로부터 탐색된 *paaG*와 *ydbU* genes의 PHA 생합성에서의 역할을 확인하기 위하여 *paaG*와 *ydbU* gene이 각각 knock-out된 mutant *E. coli* strains를 제작하였다. 제작된 mutant *E. coli*들은 모균주들보다 낮은 PHA 농도와 함량을 가졌으며, 이러한 결과들로부터 *paaG*와 *ydbU*는 fatty acid pathway에서 PHA synthesis의 전구체 물질들을 공급한다는 사실을 확인하였다. 또한, 새로운 FadB homologous enzyme YgfG를 탐색하였으며, *ygfG* gene이 overexpression된 균주와 *ygfG* mutant를 제작하여 PHA 합성을 실험한 결과 *ygfG*도 *paaG*나 *ydbU*와 유사한 역할을 한다는 사실을 밝혔다. 이러한 연구결과들은 *E. coli*에서의 MCL-PHA 단량체들의 합성 경로를 확인하여 효과적인 PHA 생산 균주를 제작할 수 있게 할 것이다.

감 사

이 연구는 과학기술부 국가지정연구소 (National Research Laboratory) 사업과 BK21 program의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Lee, S. Y. (1996), Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 1-14.
- Madison, L. L. and G. W. Huisman (1999), Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 21-53.
- Steinbüchel, A. and H. E. Valentin (1995), Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acid, *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 219-228.
- Choi, J. and S. Y. Lee (1999), Efficient and economical recovery of

- poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals, *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 546-553.
5. Qi, Q., B. H. A. Rehm, and A. Steinbüchel (1997), Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2, *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 155-162.
 6. Park, S. J. and S. Y. Lee (2003), Identification and characterization of a new enoyl coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *E. coli*, *J. Bacteriol.* **185**, 5391-5397.
 7. Ren, Q., N. Sierro, B. Witholt, and B. Kessler (2000), FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* **182**, 2978-2981.
 8. Taguchi, K., Y. Aoyagi, H. Matsusaki, T. Fukui, and Y. Doi (1999), Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain, *FEMS Microbiol. Lett.* **176**, 183-190.
 9. Tsuge, T., K. Taguchi, S. Taguchi, and Y. Doi (2003), Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation, *Int. J. Biol. Macromol.* **31**, 195-205.
 10. Snell, K. D., F. Feng, L. Zhong, D. Martin, and L. L. Madison (2002), YfcX enables medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) formation from fatty acids in recombinant *Escherichia coli fadB* strains, *J. Bacteriol.* **184**, 5696-5705.
 11. Park, S. J. and S. Y. Lee (2004), New *fadB* homologous enzymes and their use in enhanced biosynthesis of medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates in *fadB* mutant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.* In press.
 12. Park, S. J., J. P. Park, S. Y. Lee, and Y. Doi (2003), Enrichment of specific monomer in medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) by amplification of *fadD* and *fadE* genes in recombinant *Escherichia coli*, *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 62-70.
 13. Blattner, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao (1997), The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* **277**, 1453-1462.
 14. Braunnegg, G., B. Sonnleitner, and R. M. Lafferty (1978), A rapid gas chromatographic method for the determination of poly(-hydroxybutyric acid in microbial biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 29-37.
 15. Choi, J., S. Y. Lee, K. Shin, W. G. Lee, S. J. Park, H. N. Chang, and Y. K. Chang (2002), Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 371-374.
 16. Matsusaki, H., S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, and Y. Doi (1998), Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3, *J. Bacteriol.* **180**, 6459-6467.
 17. Aldor, I. S., S. Kim, K. L. Jones Prather, and J. D. Keasling (2002), Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurim, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3848-3854.