

Thraustochytrium sp. 26185 균주에서의 $\Delta 5$ desaturase 유전자 클로닝 및 *Pichia pastoris* 내에서의 기능적 발현

정 태 호 · 이 수 진 · 오 효 정 · 김 근 중 · † 허 병 기
인하대학교 공과대학 생물공학과 생물산업기술연구소
(접수 : 2005. 1. 14., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

Cloning of a $\Delta 5$ desaturase from *Thraustochytrium* sp. 26185 and Functional Expression in *Pichia pastoris*

Tae-Ho Chung, Su-Jin Lee, Hyo-Jeong Oh, Geun-Joong Kim, and Byung-Ki Hurt

Department of Biological and Chemical Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2005. 1. 14., Accepted : 2005. 4. 23.)

Polyunsaturated fatty acids, that is PUFAs, are important constituents of membranes particularly found in the retina and central nervous system. In microorganism-based PUFAs biosynthesis, the genus *Thraustochytrids* is well evaluated for their potential as a promising candidate in the practical production of PUFAs, such as AA and DHA. In this study, we attempted to optimize a method of total nucleic acid extraction from this microorganism as a preliminary experiment. Using the extracted nucleic acid and degenerated primers for direct PCR, we isolated a $\Delta 5$ desaturase gene that contained 1320-nucleotide and encoded 439 amino acids. This gene exhibited an expected function, when expressed in *P. pastoris* in the presence of appropriate exogenous substrate, as an evidence for $\Delta 5$ desaturase activity (conversion of DGLA to AA). These results and information could provide a basis for the construction of engineered strains suitable for the practical production of PUFAs.

Key Words : *Thraustochytrium*, polyunsaturated fatty acid, $\Delta 5$ desaturase, *P. pastoris*, nucleic acid extraction

서 론

노화억제, 항산화 등의 기능성 물질에 대한 중요성이 점차 확산되고 있다. 특히 다중불포화지방산 (PUFAs)의 생리활성 기능과 항산화 기능이 규명되면서 산업계와 학계는 PUFA의 안정적 생산에 많은 관심을 기울이고 있다(1). 다양한 형태의 여러 PUFA 중 arachidonic acids (AA, 20:4n-6)는 생체 내에서 세포막의 주요 구성성분일 뿐만 아니라 prostacyclins, leukotrienes 등과 관련한 대사조절물질의 생합성에 반드시 필요한 전구체이다(2). 하지만 AA, eicosapentaenoic acids (EPA, 20:5n-3) 등의 고도불포화지방산은 인간을 포함하는 포유동물에서는 직접 생합성되지 않고, 식물물을 통하여 섭취되는 linoleic acid로부터 전환되어지나 그 전환효율이 매우 낮아,

성장기 혹은 질환시에 외부로부터 공급되어야 한다(3).

PUFA 생산은 현재까지 화학합성이 어려운 이유로 대부분 돼지의 간, 난황 및 어유로부터 분리된 후 정제되어 공급되어지고 있다. 그러나 어유의 제한된 생산량, 상대적으로 낮은 AA와 EPA 함량, 그리고 제품화과정 중에서 야기되는 지방산의 변형 등이 문제점으로 지적되고 있다(4). 이러한 천연물로부터 추출공정을 통한 PUFA 생산시 발생하는 여러 한계점을 극복하고자, PUFA 생산능이 보고된 미생물을 통하여 경제적으로 유용한 PUFA를 생산하려는 생물학적 연구가 많이 진행 중이다. 1998년 Yazawa 등(5)에 의해 EPA를 생산하는 박테리아가 동정되고, 최근 Metz 등(6)에 의해 항생제 생산에 관여하는 PKS (polyketide synthase)와 유사한 시스템으로 Eukaryote cell 내에서의 PUFA 생산 가능성이 보고되어져 다양한 미생물들의 PUFA 생산 가능성이 제시되고 있다. 실제, 최적배양조건 탐색과 고농도 배양기법 등을 통한 중규모의 대량배양에 관한 연구결과가 많이 보고되고 있으며, 부분적으로 *Mucor spp.*, *Mortierella spp.*와 같은 low fungi 류의 미생물에 의한 octadecatrienoic acids (GLA, 18:3n-6), AA 생산은 예상수율

† Corresponding Author : Department of Biological and Chemical Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-8676, Fax : +82-32-872-4046,

E-mail : biosys@inha.ac.kr

에 점점 근접해 가고 있는 추세이다(7-9). 그러나 일반적으로 야생형 균체로서 *fungi* 류와 같은 진균류가 지닌 제약 조건, 예로 배양기간이 길고 성장과정 중에 발생하는 심한 morphogenesis에 의한 배양액 내의 점도 증가 등의 이유로 공정제어가 어렵다는 문제점이 수반된다. 또한 상대적으로 단단한 세포벽으로 인해 원하는 지방산의 추출이 어렵다는 점과 PUFA 생합성에 관련된 효소들의 활성이 자연적으로 환경에 순응한 결과로 생체 조절시스템 내에서 엄격히 제어되어 있어 그 생산능에는 한계가 있게 된다(10).

이러한 문제점을 해결하기 위하여 이들 균주를 대상으로 관련효소의 안정성과 역가를 목표로 PUFA 생산에 유리한 균주를 개발하거나, 이중숙주세포 내에서 PUFA 생합성경로를 재구축하여 목표 지방산을 생산해 내는 신공정 개발에 관한 많은 연구가 진행 중이며(11, 12), 이를 위한 제반과정으로서 PUFA 생합성경로의 이해를 바탕으로 한 주요 효소를 발굴과 기능적 발현은 반드시 수행되어야 한다. 현재까지 알려진 PUFA 생합성 경로는 크게 순차적인 desaturation과 elongation의 반응을 통한 FAS pathway와 새로이 발굴된 PKS-like module에 의해 가능하다고 할 수 있으며, 본 연구의 실험균주를 포함하는 *Thraustochytrids* 속은 두 생합성 경로에 의한 PUFA 생산이 모두 가능하다고 보고 되어졌다(13).

본 연구는 $\Delta 4$ desaturation 의존적 FAS (fatty acid synthesis) pathway에 의한 지방산 생합성 경로가 보고된 *Thraustochytrium sp.* 26185 균주를 대상으로, 관련 유전자의 용이한 획득을 위하여 효율적인 nucleic acids 추출법을 개발한 후 이를 이용하여 AA 생합성 관련 주요효소인 $\Delta 5$ desaturase를 genomic DNA로부터 직접 cloning을 시도하였다. 여러 균주 개발방법 중 homologous site-specific recombination을 이용한 knock-out의 유도가 가능한지 검토하기 위하여 확보된 유전자 단편과 cDNA로부터 획득되어진 기존의 $\Delta 5$ desaturase 유전자와 서열을 비교하였다. 획득된 유전자의 기능적 발현에 있어 이중숙주세포의 chromosomal DNA 내로 관련유전자의 삽입이 가능한 *P. pastoris*를 사용하여 그 기능을 규명하고자 하였다. 얻어진 결과를 바탕으로 기존에 사용되어진 발현시스템과의 비교를 통해 PUFA 생합성관련유전자 발현시스템으로서의 유용성 여부에 대하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 미국 ATCC에서 분양받은 *Thraustochytrium sp.* 26185로서 FAS 경로에 의한 PUFA 생합성이 확인된 균주이다(14). 균주 배양을 위하여 Weete 등(15)이 사용한 2% (w/v) glucose, 0.3% (v/v) yeast extract, 1% (v/v) 미네랄염이 포함된 인공해수배지를 부분적으로 보완, 제조하여 사용하였다(14). 클로닝과 plasmid 증식, 대량추출을 위한 *E. coli* XL1-Blue의 배양은 LB 배지에서 수행되었고, plasmid가 포함된 균주의 선별과 유지는 ampicillin 50 ppm이 첨가된 배지를 이용하였다. 진행세포 내에서의 기능적 발현을 위한 숙주세포로는 *Pichia pastoris* 균주 중 GS115

(AOX1, his4)를 이용하였다. GS115의 기본배양에는 YPD (1% yeast extract, 2% Difco peptone, 2% glucose)를 사용하였고, 유전자 삽입 후 균주의 선별과 단백질의 발현을 위한 배지의 조성은 배양액 1 L를 기준으로, 13.4 g yeast nitrogen base without amino acid 800 mL과 histidine이 제외된 10X dropout solution (L-Isoleucine (300 mg/L) L-Valine (1500 mg/L), L-Adenine hemisulfate salt (200 mg/L), L-Arginine HCl (200 mg/L), L-Leucine (1000 mg/L), L-Lysine HCl (300 mg/L), L-Methionine (200 mg/L), L-Phenylalanine (500 mg/L) L-Threonine (2000 mg/L), L-Tryptophan (200 mg/L) L-Tyrosine (300 mg/L) L-Uracil (200 mg/L)) 100 ml을 혼합하였다. 여기에 최종부피 1 L를 기준으로 2% (w/v) glucose를 첨가한 GM (glucose medium) 배지와 탄소원으로서 glucose 대신에 0.5% (v/v) methanol을 넣어준 MM (methanol medium) 배지를 별도로 제조하였다(16).

배양 조건

실험균주로서 26185는 2주마다 1.4% agar plate 상에서 계대 배양하였다. 핵산추출을 위한 균체는 50 mL 인공해수배지가 포함된 250 mL 플라스크에 균주를 접종한 후, 27°C, 180 rpm 조건으로 4~5일간 배양하여 확보하였다. *E. coli* 균주는 37°C, 180 rpm에서 배양하였으며, 숙주세포인 GS115 균주의 형질전환과 활성유도를 위한 세포 배양은 30°C, 230 rpm의 호기성 조건에서 수행하였다.

Genomic DNA 추출

인공해수배지에서 4~5일 배양된 50 mL 배양액 중 3~5 mL을 취하여 세포만을 회수하고 STES buffer (0.8 M Tris-HCl (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 0.03 M EDTA, 0.3% SDS) 200 μ l에 분산한 후 0.1 mm glass bead를 약 3 mg을 첨가하였다. 세포 파쇄는 Fast Prep™ FP120 (Bio101, USA) 기기를 이용하여 수행하였다. 여기에 protease K를 20 μ g 넣고 상온에서 20~30분 동안 방치한 후, 4°C에서 원심분리 (12,000 rpm으로 10분)하여 상등액을 취하였다.

다음으로 상등액과 같은 부피의 (phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1))를 첨가하여 10분 동안 inverting 한 후 냉장 원심분리 (13,000 rpm, 10분)하고 상등액을 회수하는 작업을 3번 반복하였다. 이 과정을 통하여 용출된 nucleic acid가 포함된 상등액에 2배 부피의 100% 에탄올을 처리한 후, 15분간 원심분리하여 침전물을 획득하였다. 상등액을 제거한 침전물을 70% 에탄올로 철저하게 세척한 후, 상온이나 MicroVac™ (TOMY, Japan) 기기를 이용하여 건조시킨 다음, 멸균된 삼차증류수 혹은 TE buffer에서 서서히 녹였다(Fig. 1) (17).

PCR을 통한 $\Delta 5$ des 증폭 및 발현

$\Delta 5$ des 유전자 증폭을 위하여 회수된 nucleic acid에 RNase를 처리하여 gDNA만을 분리하였고, PCR 수행시 template로 이용하였다. 클로닝과 GS115 균주 내로의 유전자 도입을 위해 제작된 primer는 Kozak sequence를 포함하였고 관련된 균체에서 보고된 서열 (AF489588)을 바탕으로 고안되었다. N-terminal: '5-tggatccaccatgggtATGGCAAGGGCAFCGAG; C-

terminal: '5-ttgaattcTCAGTCTGCTTCTTGGT. Cloning을 위해 각각의 primer에 *Bam*H I 과 *Eco*R I 제한효소 인식서열을 삽입하였다. PCR 수행 후 특이적으로 증폭된 유전자 단편 (1.3 kb)을 gel elution하는 방법으로 수거한 후 서열을 분석하였다. GS115 발현 벡터 제작을 위하여 서열이 확인된 유전자 단편을 *Bam*H I 과 *Eco*R I 제한효소로 절단하고 같은 과정으로 준비된 pPIC3.5 (*E. coli* - *pichia* shuttle vector)에 삽입하여 재조합 plasmid를 제조하였다.

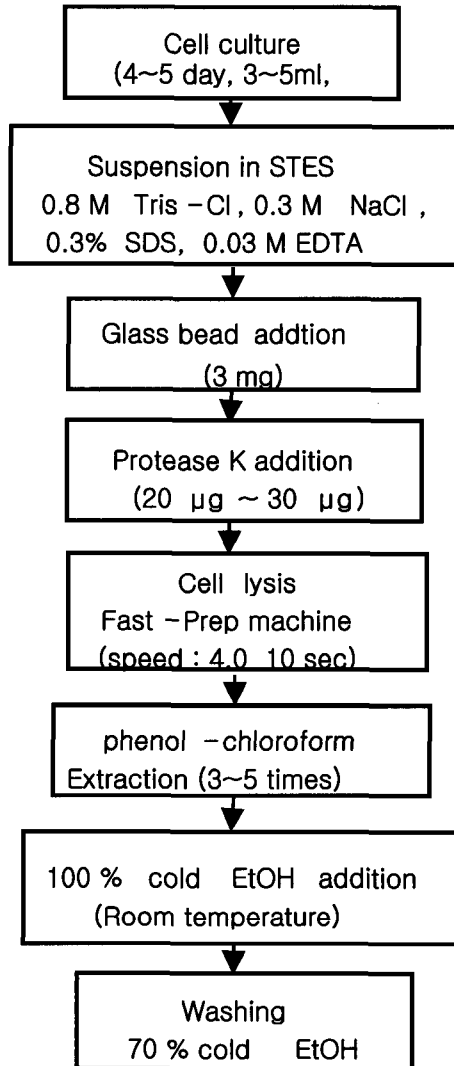


Figure 1. Established total nucleic acids extraction methods from *Thraustochytrium sp.* 26185.

***P. pastoris* GS115 내로의 유전자 도입**

준비된 재조합 plasmid를 *E. coli* 내로 형질전환 하여 배양한 후 Mini-prep kit (Promega, USA)를 이용하여 회수하였다. 환형으로 회수된 plasmid 를 *Sal*I으로 처리하고 20~30 µl GS115 electro-competent cell과 혼합한 후 10~20분간 대기하였다. 다음으로 8 K Ω, 330 µF 조건으로 1.9 ~ 2.1 kV 전기충격을 가하여 GS115 genome 내로의 유전자의 도입을 유도하였고 histidine이 제외된 GM 배지에 도말하여 positive colony를 선별하였다.

GS115 균주의 chromosomal DNA로의 정확한 제조합 DNA 삽입 여부는 선별된 positive colony들을 대상으로 *AOX1* (alcohol oxidase I) 서열에 바탕을 둔 primer (N-terminal: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', C-terminal: 5'-GCAAATGGCATTCTGACA TCC-3')를 제작하여 PCR로 확인하였다(18).

***P. pastoris* 내에서의 단백질 발현**

PCR 과정을 통해 $\Delta 5$ *des* (1.5 kb)와 *AOX1* (2.2 kb) 유전자가 확인된 제조합 GS115 균주를 선별한 후 다음과 같은 기질을 이용하여 반응을 유도하는 방법으로 단백질의 발현여부를 확인하였다. 먼저 30°C, 230 rpm 조건으로 20 mL GM 배지에서 24시간 동안 배양하여 균체를 확보한 후, induction을 위해 cell만을 수확하고 MM 배지 (20 ml)에 24시간 현탁 배양하였다. 다음으로 induction 과정이 수행된 cell만을 다시 모은 후 5 mL MM 배지에서, 0.1% (v/v) tertitol, 0.02% Biotin과 8Z, 11Z, 14Z-eicosatrienoic acid (DGLA, 20: 3 n-6, Cayman 사) 500 µM을 첨가하여 30°C, 230 rpm의 조건으로 48시간동안 반응을 유도하였다. 반응액을 3000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 cell만을 모은 후 GC와 GC/MS를 통해 지방산의 조성을 분석하였다. 대조군으로서 pPIC 3.5 벡터만이 삽입된 GS115 균주를 동일조건하에서 분석하였다.

지방산 분석

GC 분석을 위한 에스테르 반응과 지방산의 추출은 다음과 같이 Guy Lepage(19)의 방법을 변형하여 사용하였다. 반응액에서 균체만을 회수하고 0.1 M NaHCO₃로 철저히 세척한 후 70°C에서 18~20시간 동안 건조하였다. 건조시료에 methanol : sulphuric acid (24 : 1) 용액 2 mL를 첨가하고 100°C에서 1시간 동안 반응시켜 균체 내의 지방산들을 methyl-ester 형태로 전환시켰다. 여기에 1.1 mL 헥산과 1 mL DDW를 첨가하여 교반한 후 헥산층만을 분리하여 지방산의 조성을 분석하였다. 분리된 시료의 지방산 조성분석은 HP 19091J-413 capillary Column과 FID detector가 장착된 Gas chromatography (HP 6890, USA)를 사용하였으며, oven의 온도는 150°C (2 min) + 7°C/min + 219°C (0.1°C/min), detector 온도는 300°C이었다. GC/MS 분석에는 DB-5 (30 m x 0.25 mm) column과 5673 Network Mass Selective detector를 사용하였다. 기준물질로 heptadecanoic acid (17:0), eicosapentaenoic acid (EPA 20:5), AA (20:4). DGLA (20:3) adrenic acid (ADA 22:4 n-6) 단일성분을 구입하여 비교 분석에 이용하였다(Cayman).

결과 및 고찰

26185 균주에서 genomic DNA 추출

실험균주인 *Thraustochytrium sp.* 26185는 세포벽이 β -glucan 등의 단단한 물질로 구성되어져 있어 일반적인 gDNA 추출방법을 사용하면, 세포벽 파쇄 단계에서 가해진 전단응력에 의한 절편화가 유발되어 유전자 획득을 위한 PCR 수행시 원하는 유전자의 재현성 있는 증폭을 확인할 수 없었다(20, 21). 따라서 본 실험에서는, 안정적인 gDNA를 추출하는 과정에서 고려되어야 할 중요한 인자로서

26185 균주의 효율적인 파쇄법을 설정하고, gDNA 추출법을 개발하고자 하였다. 이를 위하여 세포로부터 gDNA 용출 전까지의 모든 과정을 철저한 냉장 조건하에서 진행하였으며, 세포벽 파쇄를 위해 STES buffer 처리 후, 첨가되는 bead 양은 여러 조건의 탐색을 통해 0.15 ~ 0.2 mg glass bead / mg cell mass로 고정해서 사용하였다. 전단용력이 조절 가능한 기기를 사용하여 실험균주의 세포벽 파쇄에 적합한 최적조건 (speed 4, 10 sec)에서 실험 과정을 수행함으로써 세포가 파쇄되는 정도에 대한 재현성을 확보할 수 있었으며, 이를 통하여 추출되는 gDNA의 질편화를 최소화할 수 있었다. 또한 DNase와 RNase 등의 오염원을 제거하기 위해 protease K와 PCI 용액을 사용하여, 획득되는 gDNA의 순도를 높이고자 하였다.

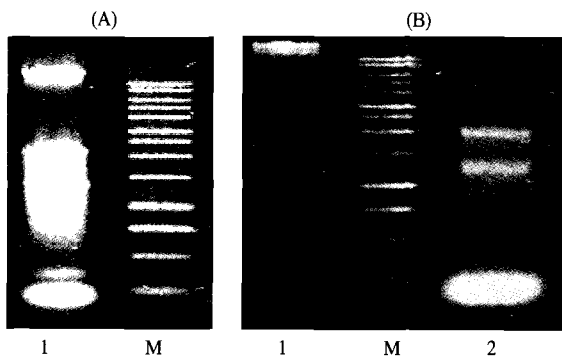


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of total nucleic acids obtained from 26185.

- A : Lane 1, Total nucleic acids from 26185; M, 1 Kb ladder.
 B : Lane 1, total DNA after RNase treatment;
 Lane 2, total RNA after DNase I treatment.

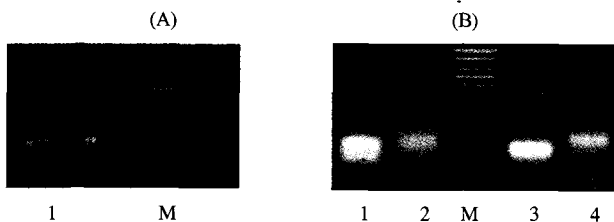


Figure 3. Evaluation of total nucleic acids by direct- and RT-PCR.

- A : Lane 1, direct PCR (18srDNA : 1Kb) ; M, 1Kb ladder
 B : Each lane showed an amplified fragment by RT-PCR with primer used (lane 1, des 6; lane 2, des 8; lane3, des 9; lane4, des 12 primer).

추출과정을 통해 얻어진 추출물을 전기영동장치를 사용하여 분리한 결과 gDNA 뿐만 아니라 mRNA를 포함하는 전체핵산 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 다음 과정으로 추출된 nucleic acid가 분자생물학적 도구 활용에 적합한지를 판단하고자, RNase 처리를 통하여 gDNA를 분리한 후 direct-PCR에 template로 이용해 본 결과, 해당크기 (1 Kb)의 18srDNA를 성공적으로 증폭할 수 있었으며 무작위로 절편화된 DNA 조각에 의한 반응저해와 같은 현상은 발견되지 않았다(Fig. 3A). 병행하여 DNase I를 처리하여 얻은 RNA로부터 cDNA를 합성한 후, 이것을 주형으로 여

러 desaturase 관련 탐침유전자 증폭을 위해 제작된 primer로 RT-PCR을 수행한 결과 예상크기 (140 bp)의 유전자단편이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B).

종합적으로 본 연구에서는 실험균주인 *T. 26185*에 적합한 개량된 추출방법을 마련할 수 있었을 뿐만 아니라, 이 추출방법을 *E. coli*와 *S. cerevisiae*와 같은 다른 균주에 적용해 보았을 시에도, Fig. 4와 같은 결과를 얻을 수 있어서 본 연구의 추출방법이 nucleic acid 추출에 일반적으로 사용할 수 있는 가능성을 제시할 수 있었다.

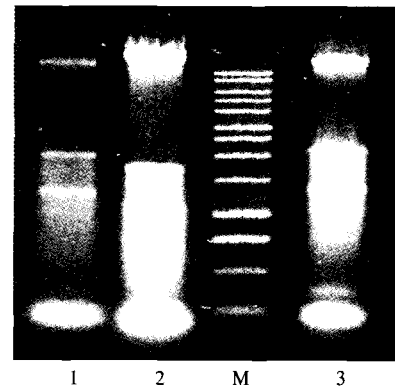


Figure 4. Extraction of total nucleic acids from various microorganisms using our Protocol (Lane 1, Tauschytrium sp. 26185; lane 2, Escherchia coli; lane 3, Saccharomyces Cerevisiae; M, 1 Kb ladder).

Δ5 des 유전자 증폭

정립된 nucleic acids 추출방법을 통해 gDNA만을 순수분리한 후 PCR을 통해 Δ5 des 관련 유전자를 증폭한 결과, 1.3 kb보다 약간 큰 크기로 재현성 있게 증폭되는 유전자 단편을 회수할 수 있었다. 이를 pPIC 3.5 벡터에 클로닝한 후 sequencing하여 전체적으로 1320개의 염기서열로 구성되어 있으며 전형적인 ATG와 TGA를 시작과 종결 코돈으로 하는 439개의 아미노산으로 구성되어진 full ORF를 확인할 수 있었다. 아미노산 서열을 CDD, PSORT 프로그램을 이용하여 분석해 본 결과 N-terminal 부근에서 서열 12~66까지 cytochrome b5 도메인이 보존되어 있으며 transmembrane 도메인 부분으로 추정되는 네 부분을 확인할 수 있었다. 또한 기존의 전형적인 front-end desaturase의 특징인 histidine box (HXXXH, QXXHH)도 염기서열 513, 622, 1134에 해당하는 세 부분에서 확인되었다. 본 실험에서 확보된 유전자 단편은 gDNA로부터 direct-PCR 과정을 통하여 획득하였으며, 기존에 보고된 26185 균주의 cDNA로부터 유래한 Δ5 des 유전자서열 (NCBI, AF489588)과 비교하였을 시 전체염기서열의 크기는 1320 bp로 일치하였으나 789(G→A), 941(T→C) 두 부분에서 다른 염기로 구성되어 있음을 확인하였다. 789번째 염기서열 변화에 의한 아미노산의 변화는 없었으나 941번째 염기서열 변화에 의해 메티오닌이 트레오닌으로 번역되는 결과를 확인하였다. 이같은 결과는 같은 균주를 이용하였으나 생명체 내에서 수시로 일어날 수 있는 돌연변이에 의한 것인지, 아님 형질전환과정과 PCR 수행과 같은 실험과정에서 유발된 결과인지는 확인 중이다.

염기서열분석결과를 통하여 진행세포인 26185 균주 유

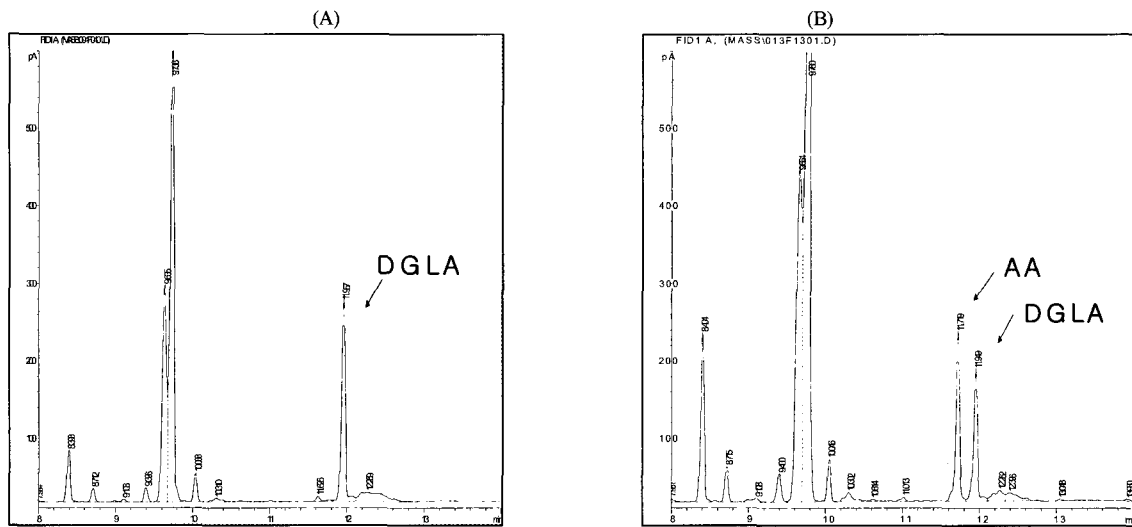


Figure 5. GC profile of whole cell based uptake assay with exogenous DGLA substrate. A : empty pPIC 3.5 in GS115. B : FAD5/pPIC 3.5 in GS115

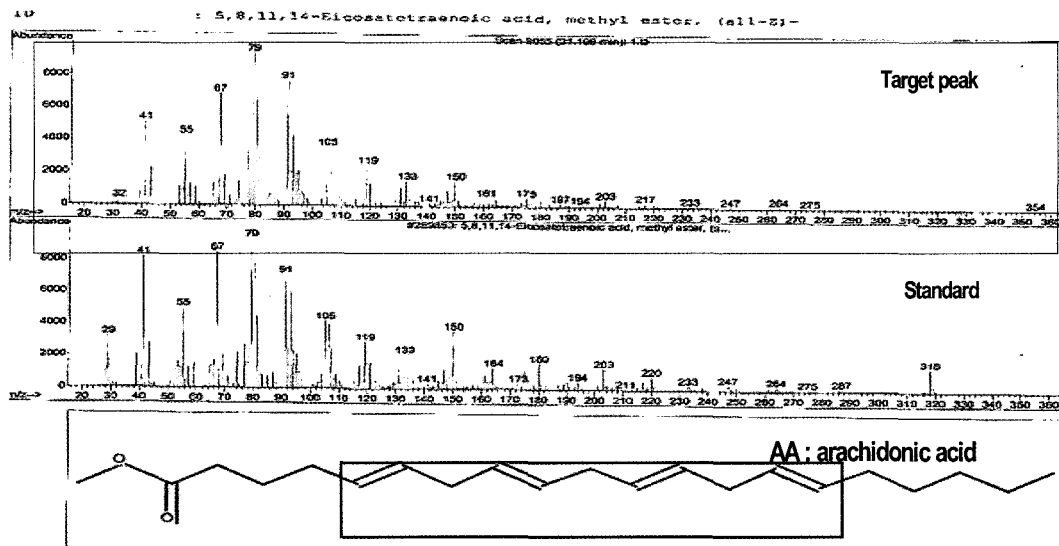


Figure 6. GC/MS profile of putative AA peak from FAD5/pPIC3.5 in GS115.

래의 $\Delta 5$ des 유전자의 경우 gDNA 로부터 mRNA로 가공되는 과정 중 시작코돈과 종결코돈 사이에 가공되어 없어지는 intron 서열이 없음을 유추할 수 있었다. 이러한 정보는 야생형 균주를 대상으로 하여 UV, 돌연변이 유발물질 등을 이용한 무작위적 돌연변이방법이 아닌 chromosomal DNA 상의 $\Delta 5$ des 유전자를 site-specific recombination과 같은 유전학적 형질전환 방법을 이용하여 직접적으로 치환, 변형하는데 유용하게 사용될 것으로 기대되어지고 관련된 다른 효소군의 탐색에 있어서도 gDNA library를 활용할 수 있다는 사실을 제안할 수 있었다.

형질전환 GS115 균주 선별 및 기능적 발현

세포내 발현용 벡터인 pPIC 3.5에 $\Delta 5$ des 유전자가 삽입된 재조합 plasmid를 electroporation 방법으로 GS115에 형질전환한 후 histidine이 결핍된 GM 배지에서 1차 선별하고 AOX

primer를 이용한 colony PCR을 수행하여 2차 선별하였다. PCR 결과물을 전기영동한 후, 겔 상에서 온전한 크기의 $\Delta 5$ des와 AOX1 (2.2 Kb) 유전자가 확인된 GS115 균주를 대상으로 기질 (DGLA)을 첨가하고 반응을 유도하였다.

GC분석결과 대조군으로서 pPIC 3.5 벡터만이 삽입된 GS115 균주에서는 DGLA가 세포내로 uptake되는 현상만 발견되었으나, $\Delta 5$ des 유전자로 형질 전환된 경우 첨가해 준 DGLA를 기질로 $\Delta 5$ desaturase와 반응하여 생성된 product peak를 확인할 수 있었다(Fig. 5). 밝혀진 FAS pathway 상에서 예상되는 반응 product는 AA로서 GC상에서 단일성분 AA의 RT (retention time)와 생성된 반응 product의 RT를 비교하였을 시 11.72 min으로 일치하였다. 증가된 이중결합 위치, 분자량 등을 좀더 확인하기 위하여 peak를 대상으로 GC/MS로 분석해 본 결과 mass peak $m/z = 318$ 로 지방산 말단의 COOH기가 COOCH₃기로 변형된

methyl arachidonic ester임을 확인 하였다(Fig. 6). 이를 통하여 FAS pathway를 통한 AA생합성에 관련한 주요 효소인 $\Delta 5$ desaturase를 coding하는 유전자를 T. 26185 균주로부터 확보할 수 있었으며 이중숙세포 내에서의 발현을 통하여 그 기능을 규명할 수 있었다. 또한 $\Delta 5$ des로 형질 전환된 GS115 균주를 대상으로 DGLA가 아닌 AA나 ADA와 같은 다른 fatty acid를 기질로 하여 반응을 유도해 본 결과, cell 내로 단순히 uptake되는 현상만이 보였다. 이는 $\Delta 5$ des 유전자의 효소활성에 있어 기질의 탄소수 뿐만 아니라 여기에 기형성된 이중결합수와 위치에 밀접하게 연관된 특이적인 desaturation 기능이 있음을 의미한다.

연구 진행과정 중, 기능적 발현의 증거로서 $\Delta 5$ des 유전자가 삽입된 형질전환 GS115 균주로부터 induction 과정을 통한 과발현 유도 후 단백질을 수거하여 실험에 이용해 보고자 하였다. 결과로, 전형적인 whole cell 혹은 crude extract 형태의 활성측정과 SDS-PAGE를 수행하였을 시 뚜렷한 차이점 등이 관찰되지 않았다. 이는 front-end desaturase 구조상 membrane에 insertion된 형태로 발현되는 특성과 결부된 것으로 유추되었으며, $\Delta 5$ des 유전자와 관련된 문헌조사에서도 단백질을 활용한 기능적 활성규명의 예는 극히 드물다는 사실과 잘 결부되는 결과로 추정할 수 있었다.

본 연구의 관심 대상인 $\Delta 5$ des 유전자를 포함하여 현재까지 FAS pathway 생합성경로와 관련된 전체반응은 30여 종 이상의 특징적인 효소가 관여하고 있다고 알려져 있다. 특히 AA 생합성에 관련된 유전자는 다양한 생물종을 대상으로 하여 확보되어져 많은 연구결과가 보고되어지고 있고 대부분의 경우 본 연구에서와 같이 이중숙세포에서의 발현을 통하여 그 기능을 규명하였다. 특히 다른 고등 생물체보다 조작이 수월한 미생물을 숙주세포를 사용하였을 경우에는 대부분 *S. cerevisiae*를 이용하였으며, desaturase 유전자가 삽입되어 형질전환 균주를 낮은 온도 (18~25°C)에서 배양하며 동시에 단백질의 발현을 유도하는 방법으로 활성을 규명하였다(14, 21-23). 이와 다르게, 본 연구에서 사용되어진 $\Delta 5$ desaturase의 발현시스템의 경우, 같은 Yeast에 속하나 균체 성장속도와 induction 과정이 많이 다른 *P. pastoris* 균주를 사용, 정상온도에서 세포배양을 함으로써 3~4일에 반응유도가 가능했으며, 사용된 기질(DGLA)의 양에 비례하는 뚜렷한 반응물의 전환을 확인할 수 있었다. 이러한 현상에 대한 원인으로서는 여러 가지 경우를 고려한 검증이 필요하겠지만, 관련 유전자가 숙주세포의 gDNA 내로 삽입되는 안전한 형태의 재조합시스템을 사용한 결과라 유추되어진다. 또한 짧은 배양기간은 배양액 내로 첨가해 준 기질의 변성에 의한 오염을 최대한 막을 수 있었으며 동시에 배양액 부피를 조절함으로써 균체와 기질과의 농도조절이 원활하여 과생된 빠른 기질수송도 하나의 원인이라 사료되어진다.

결론적으로 26185로 균주로부터 AA 생합성과 관련된 주요 효소인 $\Delta 5$ des 유전자를 확보함에 있어, 기존방법과 달리 gDNA로부터 direct-PCR을 통해 확보하고 기존에 밝혀진 염기서열과의 비교를 통하여 차이점을 분석한 후, *P. pastoris*를 이용한 발현시스템을 통해 기능을 규명하였다.

새롭게 사용되어진 *P. pastoris* 내에서의 발현결과는 앞으로 발굴되어질 여러 PUFA 생합성 관련유전자의 단백질 활성규명에 유용하게 사용되어질 수 있다고 기대되어지며 상술된 바와 같이, 확보된 $\Delta 5$ des 유전자는 현재 26185 야생형 균주내로의 유전자 도입을 통한 균주개발에 있어, recombinase에 의존적이거나 독립적인 재조합 균체의 개발에 있어 모델시스템으로 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대되어진다.

요 약

불포화지방산의 생합성능이 뛰어나다고 알려진 *Thraustochytrids* 균주 중 26185를 대상으로 arachidonic acid (AA C20:4 n-6)를 포함하는 PUFA 생산에 관여하는 유전자의 하나로서 key enzyme인 desaturase를 보다 효율적이고 안정적인 방법으로 cloning한 후 결과물을 분석하였다. 이를 위해 실험균주인 26185 균주를 대상으로 효율적인 전체 nucleic acids 추출법을 개발하였으며 관련된 기법의 활용을 통해 일반적으로 활용이 가능한 효과적 방법임을 확인하였다. 확보된 유전체를 통한 direct PCR의 결과물을 기존에 알려진 cDNA 합성방법에 의한 결과물과 비교하였을 때 동일한 결과물임을 확인하였다. 이는 *Thraustochytrids* 관련 균주로부터 지방산 생합성에 관련된 효소군을 탐색하는 방법이 cDNA 합성방법에 의하지 않고 보다 직접적으로 진행될 수 있음을 제안할 수 있는 하나의 결과물로 생각되어진다. 획득된 유전자를 같은 진핵세포인 *P. pastoris*를 숙주로 하여 유전자를 도입하고 활성을 재현성 있게 규명함으로써 인공진화 혹은 재조합균체의 개발이 가능하다는 사실을 부분적으로 제시할 수 있었다.

감 사

이 연구는 한국학술진흥재단 지정 인태대학교 중점연구소의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Gill, I. and R. Valiverty (1997), Polyunsaturated fatty acids: occurrence, biological activities and application, *Trends Biotechnol.* **15**, 401-409.
- Dyerberg, J. Linolenate (1986), Derived Polyunsaturated Fatty Acids Prevention of Atherosclerosis, *Nutrition Reviews* **44**(4), 125-134.
- Tanaka, T., J. Hirano, and T. Funada (1992), Concentration of Docosahexaenoic acid in Glyceride by Hydrolysis of Fish Oil with *Candida cylindracea* Lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 1210-1214.
- Haraldsson, G. G., B. G. Gudmundsson, and G. Almarsson (1993), The Preparation of Homogeneous Triglycerides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase, *Tetrahedron Lett.* **34**(36), 5791-5794.
- Yazawa, K., Okazaki, N., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, Numao, N. and Kondo, K (1998), Production of eicosapentaenoic acid by marine bacteria, *Journal of Biochemistry* **103**, 5-7.
- Metz, J. G., P. Roessler, D. Facciotti, et al. (2001), Polyketide Synthases Produce Polyunsaturated Fatty Acids in Both Prokaryotes and Eukaryotes, *Science* **293**, 290-293.

7. Ward, O. P., P. K. Bajapai, and P. Bajapai (1991), Arachidonic acid production by fungi, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(4), 1255-1258.
8. Shimizu, S. and J. Ogawa (1997), Production of useful fatty acids by microbial processes, *Recent Res. Devel. in Oil Chem.* **1**, 267-286.
9. Ha, S. J., C. S. Park, and Y. W. Ryu (2004), Selection of Organic Nitrogen Source and Optimization of Culture Condition for the Production of Arachidonic Acid from *Mortierella alpina*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**(1), 78-83.
10. Zhou, H. and Z. Chen (2002), Direction evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis, *Biochemical engineering*, 104-110.
11. Kamada, N., J. Ogawa, and S. Shimizu (1999), Production of 8, 11-Cis Eicosadienoic Acid by a $\Delta 5$ and $\Delta 12$ Desaturase-defective Mutant Derived from the Arachidonic Acid-Producing Fungus *Mortierella alpina* 1S-4, *JAACS* **76**, 1269-1274.
12. Hong, H., N. D. Dalta, W. Reed, and X. Qiu (2002), High-level production gamma-linolenic acid in *Brassica juncea* using a $\Delta 6$ desaturase from *Pythium irregulare*, *Plant Physiol.* **129**, 354-362.
13. Xiao, Q. (2003), Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7,10,13,16,19): two distinct pathways, *Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **68**, 181-186.
14. Xiao, Q., H. Hong, L. M. Samuel (2001), Identification of a $\Delta 4$ Fatty Acid Desaturase from *Thraustochytrium* sp. Involved in the Biosynthesis of Docosahexanoic Acid by Heterologous Expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*, *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 31561-31566.
15. Weete, J. D. and R. Dute (1997), Lipids and Ultrastructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, *Lipids* **32**(8), 839-845.
16. Joan, L. and J. M. Cregg (2000), Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastrois*, *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 45-66.
17. Helmut, B. and J. Zeyer (2003), mRNA Extraction and Reverse Transcription-PCR Protocol for Detection of nifH Gene Expression by *Azotobacter vinelandii* in Soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1928-1935.
18. <http://www.tcd.ie/Genetics/staff/Noel.Murphy/recombinant/> (2003).
19. Guy, L. and C. R. Claude (1984), *J. Lipid Reseach* **25**, 1391-1396.
20. Caiqing, M. and B. Rinkevich (2001), A simple, Reliable, and Fast Protocol for Thraustochytrid DNA Extraction, *Mar. Biotechnol.* **3**, 100-102.
21. Oh, H. J. (2004), Study on the synthetic pathway and related genes of PUFA in a hyper-producing strain *Thraustochytrium aureum* BK1, M. S. Thesis, Inha university, Incheon.
22. Domergue, F., U. Zähringer, and E. Heinz (2002), Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricorutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* **269**, 4105-4113.
23. Jennifer, M. and P. Mukerji (1999), Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids, *PNAS* **97**(15), 8384-8289.
24. Huang, Y. S., P. Mukerji, and S. Knutzon (1999), Cloning of $\Delta 12$ - and $\Delta 6$ -Desaturase from *Mortierella alpina* and Recombinant Production of γ -Linolenic Acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Lipids* **34**(7), 649-659.