

세균 유래 단백질연결효소 Transglutaminase의 클로닝과 효모에서의 발현

김현영^{1*} · 오동순² · 김종화²

¹우석대학교 기초과학연구소, ²우석대학교 제약공학과

Expression and Cloning of Microbial Transglutaminase in *S. cerevisiae*

Hyoun-Young Kim^{1*}, Dong-Soon Oh² and Jong-Hwa Kim²

¹Institute of Basic and Natural Science, Woosuk University,

²Department of Pharmaceutical Engineering, Woosuk University

(Received May 26, 2008. Accepted June 25, 2008)

ABSTRACT: A Ca²⁺-independent microbial transglutaminase (mTGase) from the actinomycete *Streptomyces mobaraensis* IFO13819 is a useful enzyme in the food industry. It consists 406 amino acid residues, which comprised leader and pro region of 75 amino acid residues and the structure region of 331 amino acid residues. Pro and structure gene of TGase were cloned into the yeast shuttle vector pYAEG-TER and then used to transform *Saccharomyces cerevisiae* 2805. Expression of mTGase in recombinant was confirmed with Northern hybridization and the maximal activity of TGase was shown 26 mU/ml.

KEYWORDS: Heterologous gene expression, *Kluyveromyces marxianus*, Microbial transglutaminase, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces mobaraensis*

단백질의 식품학적 기능을 개선시키는 수단으로 여러 종류의 효소가 이용되고 있는데, 주로 단백질을 선택적으로 절단하는 가수분해형 효소와 중합하는 여러 가교형성 효소가 있다(Kim *et al.*, 1992; Kim and Kang, 1995; Whitaker, 1997).

가교형성 효소는 주로 단백질을 교차결합시켜 조직의 안정화를 이루는데 중요한 생리적 과정으로 이러한 예로는 단백질의 이황화 결합, 콜라겐의 탄력소의 알돌-알디민 축합반응, 수정란막의 Tyr-Tyr결합, 인노의 N- α (β -aspartyl)lysine 결합, 그리고 transglutaminase(TGase, protein-glutamine γ -glutamyl-transferase, EC 2.3.2.13)에 의한 N- α (β -glutamyl)lysine 교차결합 등이 있다(Cross and Sizer, 1959; Pisano *et al.*, 1968; Anfinsen, 1973; Lou, 1975). 가교형성 효소 중 대표적인 효소인 TGase는 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group과 활성부위의 시스테인이 반응하여 acyl-enzyme 중간체를 형성한 후 아민류의 1차 아민 혹은 lysyl 잔기의 ϵ -NH₂ 사이의 동종 펩타이드 교차결합 형성을 촉매함으로써 단백질을 변형시키는 효소이다(Yokoyama *et al.*, 2004). 반응계에 아민이 존재하지 않으면 TGase는 glutaminyl 잔기의 γ -carboxamide group의 가수분해를 촉매한다. Lysyl 잔기의 ϵ -amino group이 기질로써 사용될 때 ϵ (γ -glytamyl)lysine 결합을 통해

peptide chain이 이루어진다(Yoo *et al.*, 2003b). TGase의 가교형성은 단백질을 구조적으로 변형시키고 단백질 식품의 기능적인 특성을 변화시킴으로써, 식품의 물성변화를 유도하여 다양한 식품의 제조를 가능하게 한다. 따라서 단백질 가교결합에 TGase를 응용함으로써 식품의 질을 향상시키고, 식품이외의 다른 분야에도 응용함으로써 TGase의 다양한 역할을 기대할 수 있다(Motoki and Seguro, 1998; Yoo *et al.*, 2003a). TGase를 첨가함으로써 대두 단백질을 비롯한 각종 단백질의 겔(gel)화로 다양한 영역에 활용 가능하며, 가열에 의하여 겔화 되지 않는 단백질의 겔화도 가능하고, 가열없이 겔화도 가능하다. 또한 단백질과 기름의 emulsion 상이나 당, 염류 등의 존재하에서도 겔화가 가능한 특성을 가지고 있다(Motoki and Seguro, 1996). TGase의 작용결과 형성된 결합은 단백질의 용해도를 개선시키며, 함수율을 증진시킨다. 또한 열에 대한 안정성을 증가시키며 산침전 저항성의 제고가 가능하다. 따라서 기능성이 개선된 각종 단백질식품을 제조할 수 있으며, 고온이나 식품 성형 후에 겔이 녹는 것을 방지할 수 있고, 계면활성제나 변성제의 처리에도 용해되지 않게 할 수 있다(Motoki and Seguro, 1996, 1998). 식물성단백질을 동물성의 고기형태로 전환 할 수 있으며 부스러기 고기나 액상의 단백질을 덩어리 형태로, 단백질 용액을 필름 형태로 제조도 가능하다(Motoki and Seguro, 1996). 이러한 특성들은 식품공정에서 실질적으로 다양하

*Corresponding author <E-mail : kangwon@woosuk.ac.kr>

게 이용되고 있다(Yoo *et al.*, 2003b).

식품가공에 있어 동물 유래의 TGase의 상업적인 이용은 효소의 높은 생산 비용이 문제가 되었으나 *Streptomyces mobaraensis*의 변종에서 생산된 미생물 세포외 효소인 TGase의 발견 이후 경제적인 문제가 해결되어 식품분야에서의 응용연구가 활발히 진행되고 있다(Ando, 1989). 미생물 유래의 이 효소는 동물에서 추출한 TGase와는 다르게 칼슘 농도에 영향을 받지 않는 칼슘 비의존성 효소라는 점, 또한 동물 유래의 TGase에 비해 열에 비교적 안정하고, 작용 pH 범위도 넓은 특성을 지니고 있어 식품 분야에 널리 응용 되고 있다(Lee *et al.*, 1995; Seota, 1997; Tasi *et al.*, 1998).

Guinea pig의 liver(Ikurak and Mokito, 1992), bovine plasma(Kurth and Rogeners, 1984)에서 유래된 TGase나 미생물 유래의 TGase를 활용하여 대두 글로빈과 우유 카제인의 성질 개량에 관한 연구, 몇몇 필수아미노산을 결합시킴으로 영양을 보강하는 연구(Motoki *et al.*, 1984), 산업적으로 응용하기 위하여 유장 단백질, 소, 돼지, 닭 및 어류의 actinomycin을 이용하여 단백질 겔을 만드는 연구가 수행된 바 있다(Cozzolino *et al.*, 2003; Yokoyama *et al.*, 2004). Kuraishi 등(1996)은 microbial transglutaminase (mTGase)를 작은 육류조각에 첨가함으로써 탄성과 조직 그리고 맛이 향상됨을 보고하였고, Kumazawa 등(1995)은 어류제품에서 mTGase 처리는 원료의 신선도 유지와 조직의 질이 향상됨을 보고하였다. 또한 Motoki 그리고 Seguro(1998)은 유제품인 요거트에 mTGase를 첨가함으로써 물리적인 충돌이나 온도의 변화에 따라 일어날 수 있는 내용물의 분리 현상을 막을 수 있음을 보고하였다. 또한 Sakamoto 등(1996)은 국수와 파스타에 mTGase를 처리함으로써 조리 후 조직이 나빠짐을 예방하고, 제품의 탄력이 향상됨을 보고하였다. TGase는 다양한 동물의 조직, 어류, 미생물 등에서 발견되나(Yasueda *et al.*, 1994), 동물유해의 TGase는 효소원의 활용이 힘들고, 제한된 양과 분리 및 정제의 어려움이 있다. 또한 TGase 1U에 50\$ 정도로 매우 비싼 효소이기 때문에 상업적으로 이용하기엔 높은 비용이 문제가 되고 있다(Iceson and Apelbaum, 1987; Ando *et al.*, 1989; Yasueda *et al.*, 1994).

현재까지 mTGase를 다량으로 얻기 위한 많은 연구가 진행되었으나 적절한 발현 system을 찾지 못하였다. 이에 TGase 고발현 시스템을 찾고자 하는 연구로 *S. mobaraensis* IFO13819의 mTGase를 효모 발현 벡터에 클로닝하고 mTGase의 활성을 측정하였다.

S. mobaraensis IFO13819 TGase 유전자는 leader, pro, 그리고 structure 유전자로, 약 1.1 kb의 염기서열(nucleotide)로 407개의 amino acid로 구성되어있다(Fig. 1). Kim 등(1999)은 *Aspergillus ficuum* endoinulinase의 *inu2* 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시 세포외로 유도하기 위해 사용한 *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556

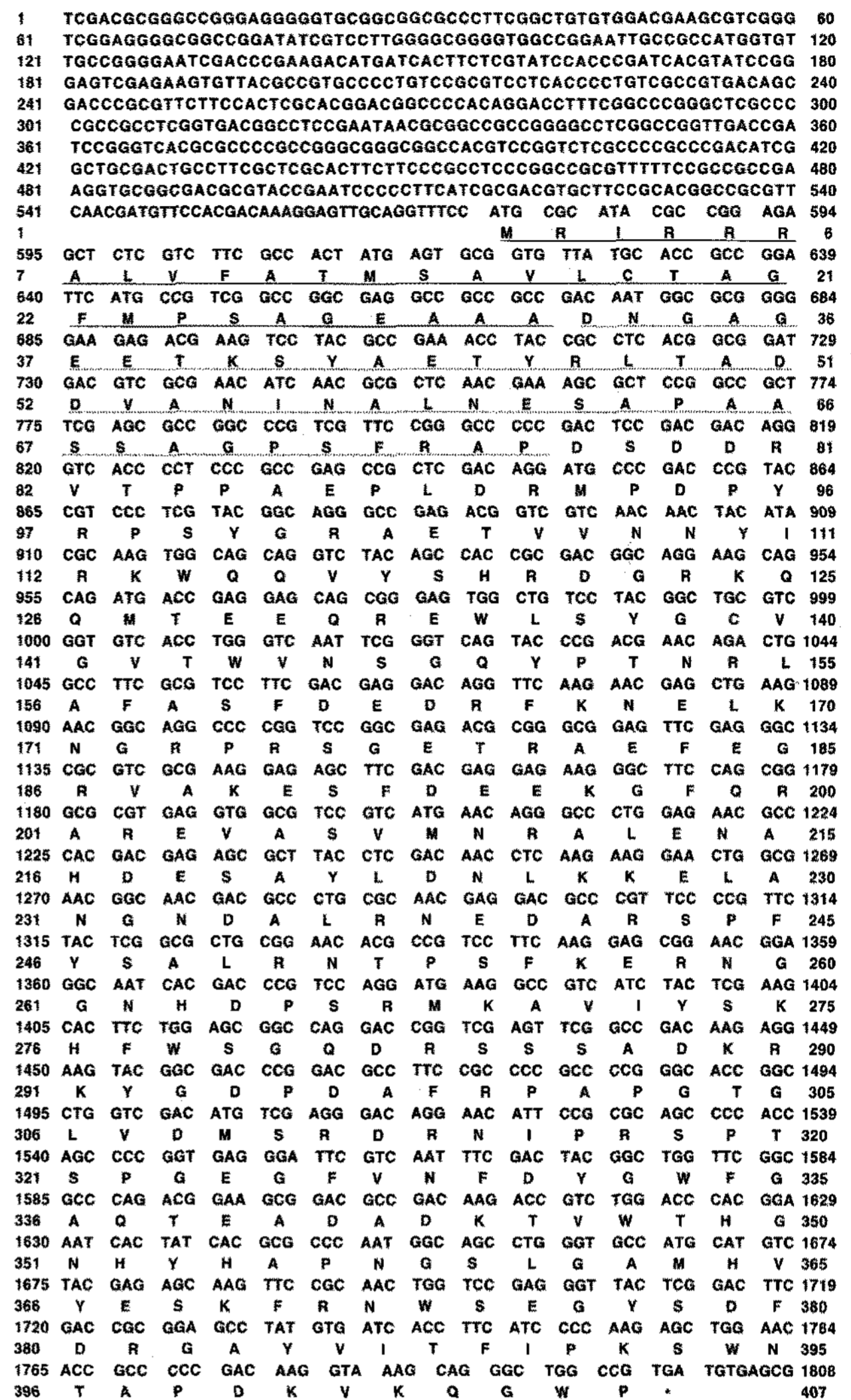


Fig. 1. Nucleotide sequence of the transglutaminase gene from *S. mobaraensis* with the deduced amino sequence given below (GeneBank accession number: AF531437). Leader and pro sequences are indicated by solid and dotted lines, respectively.

의 inulinase-encoding 유전자(*inu1*)의 signal sequence를 이용하였다. Yokoyama 등(2000)은 *E. coli* 또는 다른 host에서 mTGase를 발현시킬 때 mTGase 효소 활성화에 pro-peptide가 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 효모에서 mTGase 적절한 발현과 세포외로 유도하기 위해, *K. marxianus* CBS 6556의 inulinase-encoding 유전자(*inu1*)의 signal sequence와 *S. mobaraensis* TGase pro sequence를 forward primer에 포함하여 PCR을 수행하였다. Forward primer(5'-ACG CGG ATC CAT GAA GTT AGC ATA CTC CCT CTT GCT TCC ATT GGC AGG AGT CAG TGC TTC AGT TAT CAA TTA CAA GAG AGA CAA TGG CGC GGG GGA AGA-3')와 reverse primer(5'-GCG GGA TCC TCA CGG CCA GCC CTG CTT TA-3')를 사용하였다. PCR 조건은 95°C로 3분간 hot start한

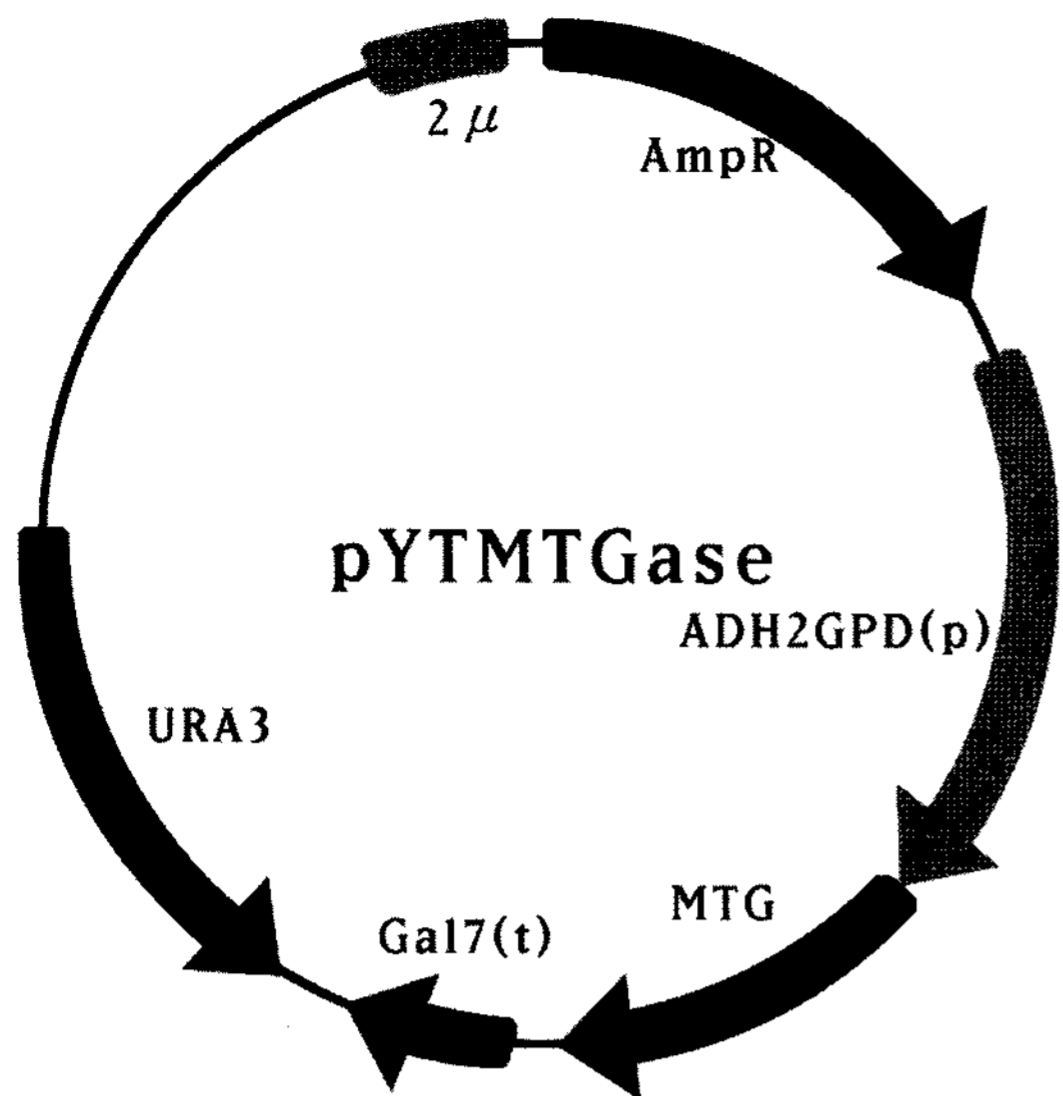


Fig. 2. Structure of plasmid pYTMTGase. This plasmid was constructed for TGase expression in yeast *S. cerevisiae*. MTG contains signal sequence of *K. marxianus* CBS 6556 *inul* and pro, structural gene of *S. mobaraensis* transglutaminase.

후, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초로 35회를 수행하고 final extension은 5분간 반응시켰다. 약 1.1 kb의 PCR 산물을 전기영동 한 후 겔에서 추출하여 pGEM-T easy vector(Promega, WI)에 cloning하여 pGmTG라 명명하였다.

DNA 염기서열 확인 후, 효모발현 벡터에 cloning하기 위해 pGmTG를 *Bam*HI 제한효소로 절단하여 절편(fragment)을 준비하였다. 효모발현 벡터는 episomal shuttle vector YEp352에 프로모터로는 ADH2(alcohol dehydrogenase II) 유전자의 upstream activating sequence와 GPD(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) TATA element의 hybrid promoter를, terminator는 GAL7 terminator로 구성된 pYAEG-TER(Park *et al.*, 2000)를 전북대학교 생물과 학부 분자생물학과 균학 실험실에서 분양받았고 벡터도 *Bam*HI으로 절단하여 클로닝하였다. 이렇게 하여 얻은 클론을 pYTMTGase로 명명하였다(Fig. 2). *S. cerevisiae* 2805(*MATα pep::HIS3 prb 1-δ Can 1 GAL2 his3 ura3-52*)에 형질전환 한 후 단일 집락(single colony)을 분리하였다. 형질전환체에서 mTGase가 발현될 수 있는지 그리고 활성을 지니고 있는지를 Northern hybridization과 발색반응을 수행하여 확인하였다.

pYTMTGase의 프로모터는 알콜에 의해 유도될 수 있는 것을 사용하였기 때문에 일정시간 배양 중에 에탄올을 배양액의 0.6%(v/v)로 첨가하였고 약 16시간을 더 배양하여 pellet에서 RNA를 얻고 배양 상등액에서는 mTGase의 활성은 Fork와 Cole(1986) 방법에 따라 측정하였다.

야생형 균주(recipient strain)에서는 mTGase의 전사체

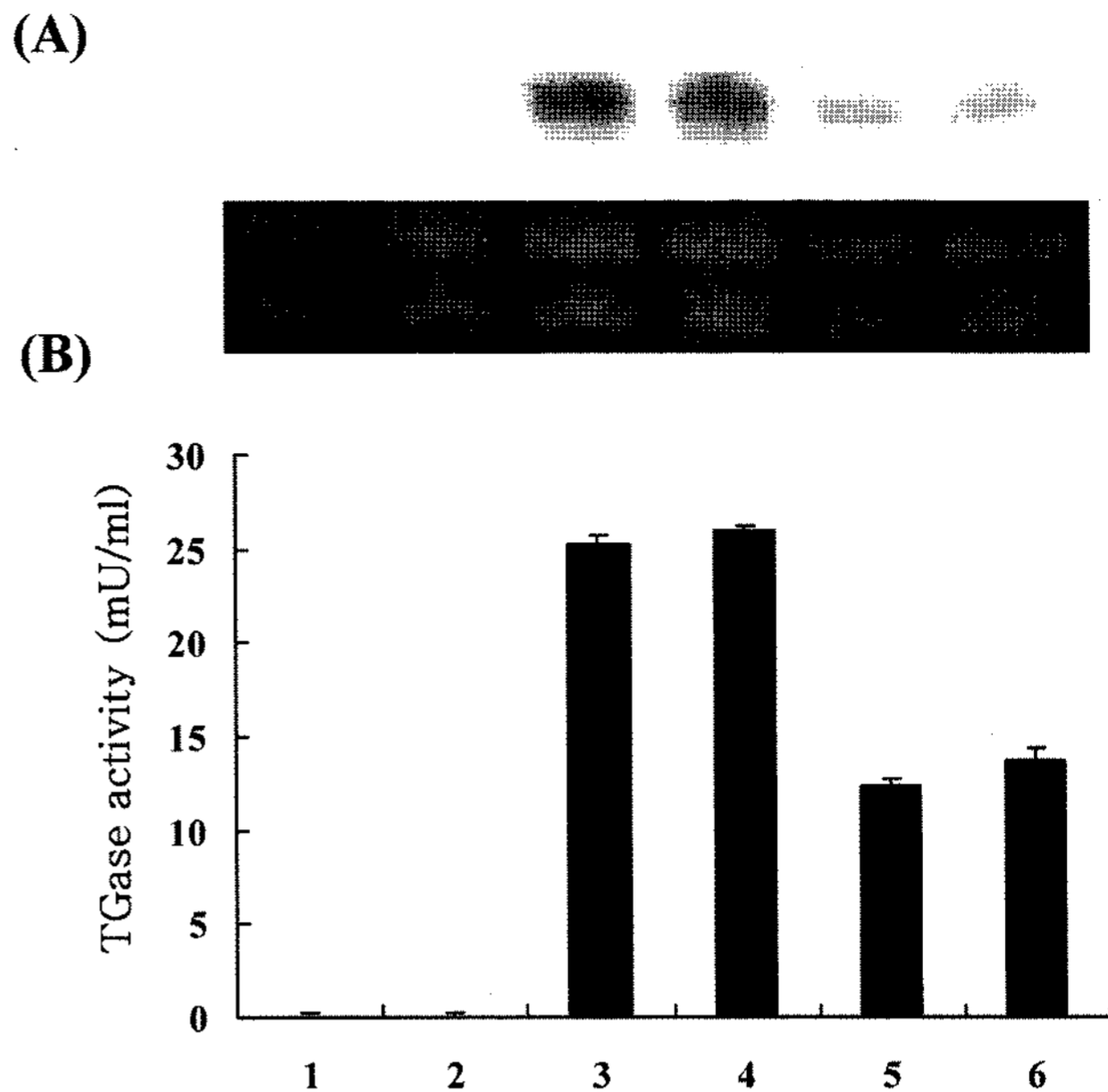


Fig. 3. (A) Confirmation of the transcript of TGase in *S. cerevisiae*. (B) Measurement of extracellular TGase activity. Lane 1; vector, lane 2; vector with ethanol induction, lane 3; transformant 1, lane 4; transformant 1 with ethanol induction, lane 5; transformant 2, lane 6; transformant 2 with ethanol induction.

를 확인하지 못하였으나 형질 전환체 1번과 2번에서 TGase의 전사체가 확인되었고, 각 형질 전환체에서 알콜에 의해 전사체의 양은 증가하지 않았다(Fig. 3A). 발현된 mTGase의 활성을 발색반응으로 측정하였는데 야생형 균주에서는 mTGase의 활성이 없었으며, 형질전환체 1에서 알콜을 첨가하지 않은 시료에서는 25.2 mU/ml 그리고 알콜을 첨가한 시료에서는 26.0 mU/ml 측정되었다. 형질전환체 2 또한 각각 12.4 그리고 13.7 mU/ml로 측정되었다(Fig. 3B). 형질 전환체 1과 2에서 알콜에 의한 효과는 미미한 것으로 나타났으며, 이 mTGase 활성 수준은 원래의 균주의 활성보다 매우 낮다. 이는 에탄올 첨가의 시기와 양 적절하지 않은 것으로 사료되며 장시간 배양에 의한 용존산소의 고갈로 에탄올 발효에 의해 에탄올을 첨가하지 않은 시료에서도 TGase 발현이 유도되는 것으로 사료된다. 또한 mTGase의 활성이 낮은 이유는 다음과 같이 추측된다. *S. cerevisiae*와 *S. mobaraensis* mTGase의 codon usage에서의 선호도 차이에 의해 번역이 제대로 이뤄지지 않아서 발현 효율이 저하, 당사슬의 부가(glycosylation)에 의한 mTGase 효소 활성이 감소, 그리고 발현 후, mTGase의 pro peptide와 structure peptide의 부적절한 분리 등이다. 이러한 문제점을 해결함으로써 mTGase의 활성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 또한 mTGase를 발현시키는 숙주를 다양화해야 필요성이 있다.

효소를 동식물 혹은 미생물에서의 정제 및 산업화 이용 및 효소를 이용한 식품의 고부가가치 제품의 생산에 관한

연구는 비교적 오래전부터 시도되어 왔는데, 국내의 경우는 효소의 탐색 등은 활발히 진행되고 있으나 식품산업과 관련한 효소를 이용한 고부가가치 제품의 생산에 관한 연구 개발 분야는 타 분야에 비해서 미우 미진한 상태이다. 현재 미국 및 일본 등에서 TGase를 이용한 단백질 식품의 고품질화는 활발하게 진행되고 있으나 이러한 연구는 대부분 실험실 규모이거나 상품화는 도입수준으로 볼 수 있다. 고발현 TGase를 최적화 배지 및 배양조건에서 대량 배양하고 단백질 정제과정을 거쳐 산업용 효소를 생산함으로써 mTGase 분리 및 정제하고 정제된 mTGase를 활용하여, 대두를 활용한 콩단백질 제품을 고기형태, film형태, 국수형태 등으로 제조하거나, 어육제품, 유제품, 곡물 제품 등의 제조에도 활용함으로써 각종 식품의 제조에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

방선균 *Streptomyces mobaraensis* IFO13819 유래 transglutaminase(mTGase)는 칼슘 비의존성으로 식품산업에서 유용하게 이용되고 있는 효소이다. mTGase는 406개의 아미노산으로 구성되어 있는데 leader와 pro 부위는 75개, 구조 부위는 331개의 아미노산으로 구성되어 있다. mTGase의 pro와 구조 유전자를 pYAEG-TER 벡터에 클로닝하고 *Saccharomyces cerevisiae* 2805에 형질전환하였다. 형질전환체에서 mTGase의 발현을 Northern hybridization을 통해 확인하였으며, 최대 26 mU/ml의 mTGase의 활성을 측정할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(KRF-2006-353-C00053) 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. and Motoki, M. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* 53:2613-2617.
- Anfinsen, L. B. 1973. Principle that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230.
- Cozzolino, A., Di Pierro, P., Mariniello, L., Sorrentino, A., Masi, P. and Porta, R. 2003. Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38:289-295.
- Cross, A. J. and Sizer, I. W. 1959. Oxidation of triamine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J. Biol. Chem.* 234:1611-1614.
- Folk, J. E. 1980. Transglutaminase. *Annu. Rev. Biochem.* 49:517-531.
- Iceson, I. and Apelbaum, A. 1987. Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiol.* 84:972-974.
- Ikurak, S. R. and Mokito, M. 1992. Use of transglutaminase in quality-improvement and processing of food proteins. *Commenta. Agric. Food Chem.* 2:389-407.
- Kim, C. H., Kim, H. S. and Kang, Y. J. 1992. The hydrolysis conditions of rapeseed protein by proteinase. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25:513-518.
- Kim, H.-S., Lee, D. H., Ryu, E. J., Uhm, T.-B., Yang, M.-S., Kim, J. B. and Chae, K. S. 1999. Expression of the *imu2* gene for an endoinulinase of *Aspergillus ficumm* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Letters* 21:621-623.
- Kim, H.-E., Rui, Q. and Chae, K.-S. 2005. Increased production of exoinulinase in *Saccharomyces cerevisiae* by expressing the *Kluyveromyces marxianus* INU1 gene under the control of the INU1 promoter. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 15:447-450.
- Kim, H. S. and Kang, Y. J. 1995. Deamination on glutamyl and asparagyl residues of protein by Neutrase. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 27:794-798.
- Fork, J. E. and Cole, P. W. 1986. Structural requirement of specific substrate for guinea pig liver transglutaminase. *J. Biol. Chem.* 240:2951-2960.
- Kuraishi, C. and Soeda, T. (eds.) American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Kurth, L. and Rogeners, P. J. 1984. Transglutaminase catalyzed crosslinking of myosin to soya protein, casein, and gluten. *J. Food Sci.* 49:573-576.
- Lee, H. G., Chung, M. S. and Choi, Y. J. 1995. A review on application of transglutaminase for animal food products. *Kor. J. Sci.* 15:252-256.
- Lou, M. F. 1975. Isolation and identification of L-aspartyl-L-lysine and L- ϵ -glutamyl-L-ornithine from normal human urine. *Biochemistry* 14:3503-3508.
- Motoki, M. and Seguro, K. 1996. Characteristics of microbial transglutaminase and its application on food. Proceedings of the international symposium on recent advances in bioindustry, pp. 79-86.
- Motoki, M. and Seguro, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Food Sci. Technol.* 9:204-210.
- Motoki, M., Nio, N. and Takinami, K. 1984. Functional properties of food protein polymerized by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* 48:1257-1261.
- Park, E.-H., Shin, Y.-M., Lim, Y.-M., Kwon, T.-H., Kim, D.-H. and Yang, M. S. 2000. Expression of glucose oxidase by using recombinant yeast. *J. Biotech.* 81:35-44.
- Pisano, J. J., Finlayson, J. S. and Peytron, M. P. 1968. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII ϵ -(γ -glutamyl)lysine. *Science* 160:892-893.
- Sakamoto, H., Yamazaki, K., Kaga, C., Yamamoto, Y., Ito, R. and Kurosawa, Y., 1996. Strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during chinese noodle processing. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi* 43:598-602.
- Seota, K. 1997. A study of new protein ingredient by transglutaminase. *Shouhin Kougok* 12:18-25.
- Tasi, G. J., Lin, S. M. and Jiang, S. T. 1998. Transglutaminase from *Streptococcus lactis* and application to minced fish product. *J. Food Sci.* 61:1234-1238.
- Whitaker, J. R. 1997. Enzymatic modification of proteins applicable to foods. pp. 99-155. In: Food proteins improvement through chemical and enzymatic modification. Ed. R. E. Feeny. American Chemical Society, Washington, DC, USA.

- Yasueda, H., Kumazawa, Y. and Motoki, M. 1994. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus Major*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 2041-2045.
- Yokoyama, K., Nakamura, N., Seguro, K. and Kubota, K. 2000. Overproduction of microbial transglutaminase in *Escherichia coli*, *in vitro* refolding, and characterization of the refolded form. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1263-1270.
- Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y. 2004. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:447-454.
- Yoo, J.-S., Chun, G.-T. and Jeong, Y.-S. 2003a. The effect of dissolved oxygen on microbial transglutaminase Production by *Sterptovercillium mobaraense*. *Kor. J. Biotechnol.* 18:155-160.
- Yoo, J.-S., Shin, W.-S., Chun, G.-T., Kim, Y.-S. and Jeong, Y.-S. 2003b. The separation of transglutaminase produced from *Streptomyces mobaraensis* and its application on model food system. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 35:260-265.