

*Corynebacterium glutamicum*에서 발현된 L-Threonine Aldolase를 이용한 파킨슨병 치료제 L-threo-2,3-Dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS)의 합성

백상호*

전북대학교 생활과학대학 식품영양학과 & 인간생활과학연구소

Synthesis of L-threo-2,3-Dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) by Thermostable L-Threonine Aldolase Expressed in *Corynebacterium glutamicum* R. Baik Sang-Ho*. Department of Food Science and Human Nutrition, and Research Institute of Human Ecology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea – In order to examine efficient L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) synthesis process using whole cell biocatalyst, a thermostable L-threonine aldolase (L-TA), which cloned from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and improved for stability, was expressed in a *Corynebacterium glutamicum* R strain. The constructed *Corynebacterium* expression vector, pCG-H44(1) successfully expressed L-TA in *C. glutamicum* R strain, but showed very low expression level. In order to improve the expression level, the expression vector named pCG-H44(2) was reconstructed by eliminating 1 nucleotide between SD sequence and start codon of L-TA. The pCG-H44(2) vector plasmid was able to overexpress L-TA approximately 3.2 times higher than pCG-H44(1) in *C. glutamicum* R strain (CGH-2). When the whole cell of CGH-2 was examined in a repeated batch system, L-threo-DOPS was successfully synthesized with a yield of 4.0 mg/ml and maintain synthesis rate constantly after 30 repeated batch reactions for 130 h.

Key words: L-threo-2,3-Dihydroxyphenylserine, L-threonine aldolase, whole cell conversion, *Corynebacterium*

서 론

β -Hydroxy amino acid의 유도체의 일종인 L-threo-2,3-dihydroxyphenylserine(L-threo-DOPS)는 체내의 방향족 탈탄산효소에 의해 천연형태의 노르아드레날린으로 전환되어 파킨슨병의 주요 증상을 완화시키며 매우 유효한 치료약품으로 알려져 있다[3]. 현재, L-threo-DOPS는 화학적 방법으로 합성되고 있으나, 다단계의 복잡한 보호 과정이 요구되며 또한 최종적으로 합성된 화합물은 4종류의 이성질체 혼합물로 이루어져 있다[13]. 즉, 입체활성의 L-threo-DOPS (2S,3R)와 그 외의 비활성체인 L-erythro-DOPS(2R,3S), D-threo-DOPS(2S,3S) 그리고 D-erythro-DOPS(2R,3R)의 혼합물이 동시에 합성된다. 따라서 목적하는 입체활성체인 L-threo-DOPS만을 선택적으로 회수하기 위해서는 복잡한 분리 및 광학분리공정을 필요로 하기 때문에 제조공정비용이 높은 단점이 있다[15].

한편, L-threo-DOPS는 효소적인 일단계 합성법에 의해서도 합성이 가능한 것으로 알려져 있는데 이러한 아미노산의 탄소와 탄소의 연결을 촉매시키는 효소로서는 L-threonine

aldolase를 이용한 합성법이 알려져 있다[4, 11-15]. 일반적으로 L-threonine aldolase는 주로 L-threonine을 분해하여 글리신과 알데히드로 분해하는 효소이지만 글리신과 각종 알데히드를 기질로 이용하여 가역적으로 L-threo-DOPS와 같은 β -hydroxy amino acid의 유도체들을 일단계반응으로 합성 가능하게 하는 유용한 효소촉매로 주목 받고 있다[6, 21, 25]. 현재까지 세균[12-15], 효모[10, 16] 그리고 포유동물[8, 20, 23] 유래의 다양한 aldolase가 밝혀져 있으나, 이러한 aldolase들을 이용한 L-threo-DOPS의 합성은 낮은 효소활성 또는 비특이적 이성질체의 생성 등과 같이 아직 해결되어야 할 문제점이 많이 남아있다[1, 21]. 또한 효소를 이용하여 유용물질을 합성하기 위해서는 효소를 추출 정제하여 고정화시키는 등의 방법이 중요한 고려의 대상이나 고비용이 소요되어 경제적이지 못하다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 고효율의 효소의 개발 및 열안정화 효소의 개발뿐 아니라 이와 더불어 효소반응프로세스의 개발도 중요하게 고려해야 할 요소중의 하나이다. 일반적으로 이러한 효소반응기에는 정제효소 또는 부분 정제된 효소를 이용하여 고정화시키는 방법이 산업적으로 가장 보편화된 방법이나, 최근에는 재조합기술의 발전과 함께 whole cell 자체를 biocatalyst로 이용하는 방법 또한 많이 연구되고 있다[5, 21]. 이는 효소의 분리 및 정제과정이 필요하지 않으며 또한 whole cell자체를 효소의 고정화 담체로 이용할 수 있기 때문에 효율적인 물

*Corresponding author

Tel: 82-63-270-3857, Fax: 82-63-270-3854

E-mail: baiksh@chonbuk.ac.kr

질생산 효소반응프로세스를 구축하기 쉬운 장점을 가지고 있다.

본 연구자들은 이전의 연구에서 *S. coelicolor* A3(2)의 게놈정보를 이용하여 L-threo-DOPS의 효소적 합성이 가능한 신규의 aldolase의 cloning 및 *Escherichia coli*에서의 고발현에 성공하였으며 본 유전자를 Error-prone PCR과 고효율 스크리닝 시스템을 이용하여 열안정성이 증대된 유전자를 확보할 수 있었다[1]. 또한, 이 열안정화 효소 유전자를 포함한 재조합 대장균을 whole cell biocatalyst로 이용하여 β -hydroxy amino acid의 유도체인 L-threo-DOPS를 효소적 방법에 의해서 합성이 가능함을 보고한 바 있다 [1]. 그러나, 본 연구방법에 사용된 재조합대장균은 장기간의 whole cell 반응시에는 *E. coli*의 lysis에 의해서 효소가 *E. coli* 밖으로 배출되어 균체분리용 막을 사용한 연속식 반응기의 설계시 효소가 누출되어 반응효율을 저하시킬 수 있다는 문제점이 예상되었다. 따라서 L-TA 유전자의 재조합 whole cell biocatalyst를 이용하여 L-threo-DOPS를 효율적으로 생산하기 위해서는 더욱 안정한 재조합용 균주의 개발에 대한 필요성이 대두되었다. 따라서 본 연구에서는 *S. coelicolor* A3(2)유래의 L-TA를 이용한 효소적 합성법의 효율을 높인 공정을 개발하고자 열안정성이 확보된 L-TA 유전자의 *Corynebacterium* 발현시스템을 구축하였으며 이의 재조합 whole cell biocatalyst를 이용한 L-threo-DOPS 합성의 효율성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 배지

Isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG), glycine, 그리고 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 Wako chemicals(Japan)에서 구입하여 사용하였다. L-threonine과 ortho-phthalaldehyde(OPA)는 Lancaster사(Alfa Aesar Co. Ltd., USA)에서 구입하여 사용하였다. Research Institute of Innovative Technology for the Earth(RITE, Kyoto)에서 분양받은 *Corynebacterium glutamicum* R의 배양에는 A배지(Table 1)를 사용하였으며, *E. coli*의 배양은 Luria-Bertani(LB)배지를 사용하였다. 형질 전환된 *C. glutamicum* R 및 *Escherichia coli*의 배양에는 50 μ g/ml chloramphenicol의 항생물질을 첨가하여 선택배지로 사용하였다.

실험균주 및 vector plasmids

본 연구에서 사용한 숙주세포로는 *E. coli* JM109(*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(*r_k⁻*, *m_k⁺*), *relA1*, *supE44*, λ -, Δ (*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lacI^qZAM15*])로서 plasmid 회수 및 대장균 발현용으로 사용하였다. L-Threonine aldolase(L-TA) 유전자 공여 plasmid는 *S. coelicolor* A3(2) 유래의 error-prone PCR과 high-throughput screening(HTS)

Table 1. Composition of A-media for *Corynebacterium glutamicum* R strain.

| | |
|---|---------------|
| Urea | 2 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 7 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0.5 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g |
| Yeast extract | 2 g |
| Vitamin assay Casamino acids | 7 g |
| Metal solution ^{*1} | 1 ml |
| 0.02% Biotin solution ^{*2} | 1 ml |
| 0.03% Thiamin solution ^{*3} | 2 ml |
| 50% Glucose | 80 ml |
| Distilled Water | Up to 1000 ml |

Adjust the pH to 7.0.

*Metal solution (100 ml): 0.6 g FeSO₄·7H₂O, 0.42 g MnSO₄, 1~2 drop Conc. H₂SO₄.

에 의해서 열안정성을 향상시킨 L-TA유전자인 H44 변이효소를 대장균 발현용 vector plasmid인 pTrc99(A)에 cloning한 plth-SCA3(2)-H44(H177Y)을 사용하였다[1]. *Corynebacterium*에서 L-TA의 발현을 위한 숙주는 *C. glutamicum* R strain을 사용하였으며, vector로는 *Corynebacterium-E. coli* shuttle vector인 pCRB1를 RITE의 Yukawa박사로부터 공여 받아 사용하였다[11].

C. glutamicum R 발현용 재조합 vector plasmid의 제작 및 형질전환

C. glutamicum R 발현용 재조합 vector를 구축하기 위하여 열안정화 L-TA, H44를 포함한 plth-SCA3(2)-H44를 *E. coli*에서 정제한 후, plth-SCA3(2)-H44의 DNA를 주형으로 한 중합연쇄 반응(PCR)을 이용하여 목적하는 L-TA 유전자를 증폭시켰다. PCR에 사용된 primers는 N말단과 C말단에 각각 EcoRI/PstI의 제한효소부위를 포함하도록 설계하였다. PCR 반응은 50 ng의 template DNA을 주형으로 5 U/ μ l LA Taq polymerase, 1 \times high GC buffer, 2.5 mM dNTP 그리고 25 pmol oligonucleotide primers를 포함하는 용액을 사용하였으며 94°C에서 40초, 60°C에서 30초 그리고 72°C에서 2분간 29회 반복하였다. PCR 증폭 단편을 QIAGEN PCR Purification kit을 사용하여 정제한 후, EcoRI/PstI으로 제한효소 처리한 후 얻어진 L-TA 유전자 단편을 동일하게 EcoRI/PstI으로 제한효소 처리한 *Corynebacterium* 발현용 vector plasmid인 pCRB1에 재조합하고 *E. coli* JM109을 형질전환시켜 재조합 vector plasmid pCG-H44(1)을 구축하였다. 구축된 vector plasmid pCG-H44(1)를 *E. coli* JM109로부터 정제한 후, electroporation에 의해서 발현용 숙주인 *C. glutamicum* R을 형질전환시켰다[11].

단백질 및 L-threo-DOPS의 분석.

발현된 단백질의 분석에는 12.5%의 polyacrylamide gel을

사용하여 전개 분리 후 Coomassie brilliant blue을 사용하여 염색하였다[17]. L-threo-DOPS의 분석은 HPLC(HITACHI; column, COSMOSIL 5C18-MS 4.6×150 mm; 이동상, 0.1% (w/v) 1-heptanesulfonic acid sodium salt/10% MeOH)을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

L-TA유전자의 발현용 재조합 vector plasmid의 구축

Whole cell biocatalysis을 이용한 파킨슨병 치료제인 L-threo-DOPS 합성용 생물반응기의 효율적인 프로세스를 구축하기 위하여 비자화성 세포벽을 지닌 *C. glutamicum* R을 이용한 whole cell biocatalysis 반응계를 구축하였다. 본 연구에 사용한 *C. glutamicum* R strain은 일반적으로 사용되는 대장균과 달리 비자화성 세포벽으로 구성되어 균체 자체가 견고하기 때문에 사용된 촉매의 효율적인 반복이용이 가능하다는 장점을 가지고 있다. *C. glutamicum* R strain이 whole cell biocatalyst를 이용하여 유용한 화학물질을 생산하는데 있어 일반적인 범용 숙주인 대장균보다 더 유리한 것으로 알려져 있다[5, 11, 25].

C. glutamicum R strain를 숙주로 L-TA 유전자를 발현시키기 위하여 lacP에 의한 유도발현계 vector plasmid를 구축하였다(Fig. 1). 열안정화 L-TA, H44를 포함한 plth-SCA3(2)-H44를 EcoRI/PstI으로 절단하여 cohesive 말단의 L-TA을 만든 후 *Corynebacterium-E. coli* shuttle vector인 pCRB1의 lacP의 하류에 삽입하여 5861 bp의 *Corynebacterium* 발현용 vector plasmid pCG-H44(1)을 구축하였다. 사용된 pCRB1은 pUC계열의 클로닝용 vector plasmid로서 chloroamphenicol 내성 선택 marker와 lacP를 지닌 pHSG398 vector plasmid를 개량하여 *C. glutamicum* R을 숙주로 외래 유전자의 고발현을 가능하게 제작된 *Corynebacterium* 발현용 vector plasmid이다. 구축된 pCG-H44(1)를 heat shock

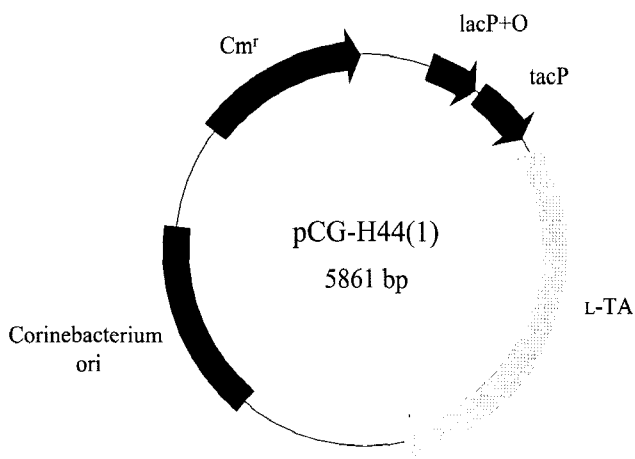


Fig. 1. Construction of vector plasmid for overexpression of L-TA in *C. glutamicum* R.

법에 의해서 *E. coli* JM109을 형질전환시킨 후 plasmid를 회수하여 삽입된 L-TA, H44의 염기배열을 결정된 결과, 열안정화에 영향을 미치는 치환아미노산인 H177Y는 보존되어 있었으나 그 외의 염기배열에서는 PCR에 의한 돌연변이는 없었다.

C. glutamicum R strain 숙주에서의 발현 및 활성체크

구축한 pCG-H44(1)를 이용하여 형질전환시킨 후 얻어진 재조합 *C. glutamicum*(CGH44-1)을 chloroamphenicol 50 µg/ml 함유한 A배지에 접종한 후 33°C에서 15시간 진탕배양하였다. 배양액을 6,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 균체를 회수 후, 20 mM 인산칼륨완충액(pH 8.0)을 사용하여 1회 세정하였다. 습균체 0.5 g을 1.5 ml의 0.5 mM dithiothreitol(DTT)과 0.01 mM pyridoxal phosphate acid를 함유한 20 mM 인산칼륨완충액(pH 8.0)에 현탁하였다. 조효소액은 현탁 균체를 초음파로 2회 처리한 후 14,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액으로 하였다. pCG-H44(1)에서 목적하는 열안정성 L-TA의 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 분석하였다(Fig. 2). *S. coelicolor* A3(2) 유래 L-TA는 1071 bp의 DNA와 356개의 아미노산으로 구성되어 있는 단백질로서 추정되는 단량체의 분자량은 37 kDa이며 gel filtration의 결과 다른 미생물유래 L-TA과 마찬가지로 homotetramer로 추정된다. *C. glutamicum* R strain에서 발현시킨 L-TA의 SDS-PAGE 분석 결과, Fig. 2의 2번 lane에서 보여지는 것처럼 CGH44(1)에서는 Fig. 2, 3번 lane에서 보이는 L-TA 유전자를 포함하지 않은 조효소액과 비교하여 약 37kDa의 L-TA의 발현이 관찰되었으나 예상외로 발현량이 매우 낮음을 확인할 수 있었다. 또한 Table 2에서 보이는 것처럼 CGH44 조효소액의 L-threo-DOPS 합성 효소활성을 조사한 결과, CGH44 조효소액 단백질 mg당 0.433 mg을 합성함을 알 수 있었다. 이전의 연구에서 *S. coelicolor* A3(2) 유래 L-TA를 대장균에서 발현시켰을 경우 pET계열의 발현vector계에서는 L-TA 발현량이 매우 낮았으나, pTrc99A vector plasmid에 재삽입하고 N말단의 염기배열을 Met-Asn(5-GTGAAC-3)에서 Met-Glu-Phe-Asn(5-ATGGAATTC AAC-3)로 변환시켜 구축(2염기의 삽입)한 경우 목적하는 *S. coelicolor* A3(2) 유래 L-TA를 대장균에서 전체 단백질의 약 15% 이상 고발현시킬 수 있었다. 또한 조효소액 단백질 mg당 1.62 mg의 L-threo-DOPS를 합성 하였다(whole cell 반응의 경우 약 4.0 mg/ml). 이러한 연구결과는 구축된 재조합 *C. glutamicum* R인 CGH44(1)의 경우 대장균에 비해서 L-TA의 발현량이 매우 낮아 L-threo-DOPS 합성수율도 낮은 것으로 예상할 수 있다.

L-TA 유전자의 고발현용 재조합 vector plasmid의 재구축

외래단백질의 재조합 숙주에서의 발현 정도는 vector, promoter, RBS(Ribosomal-Binding Site), gene fusion

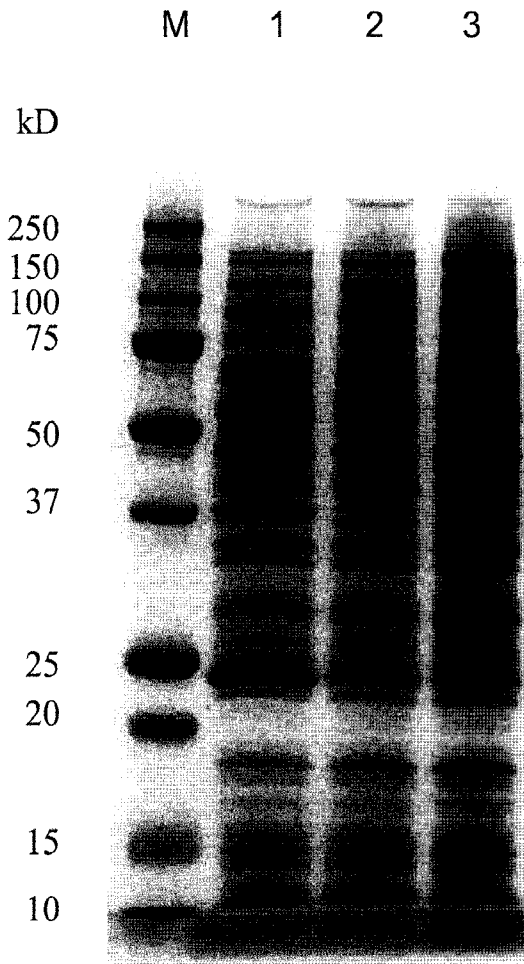


Fig. 2. Expression of L-TA from *S. coelicolor* A3(2) in *C. glutamicum* R strain. Expressed proteins were analyzed on a 12.5% polyacrylamide gel after a staining with Coomassie brilliant blue. Lane M; molecular mass standard, lane 1; cell-free extract of *E. coli*, pCG-H44(2) expression vector, constructed with the a nucleotide deleted pCRB1 vector plasmid between SD sequence and start codon, lane 2; cell-free extract of *E. coli*, transformed by pCG-H44(1) expression vector, constructed with the intact pCRB1 vector plasmid containing thermostable L-TA gene; lane 3, cell-free extract of *E. coli*, pCRB1 expression vector only.

Table 2. Comparison of L-threo-DOPS synthesis activity of two constructed vector plasmid for *C. glutamicum* R strain.

| Constructed vector plasmid | Synthesized L-threo-DOPS concentration | Protein (mg) | Specific activity (mg L-threo-DOPS/mg) |
|----------------------------|--|--------------|--|
| CGH44-1 [pCG-H44(1)] | 0.352 | 0.975 | 0.433 |
| CGH44-2 [pCG-H44(2)] | 1.22 | 1.06 | 1.38 |

partner 및 transcriptional terminator 등과 같은 여러 요인들이 관여하는 것으로 알려져 있다[2, 19]. 본 연구에서 *C. glutamicum* R strain를 숙주로 L-TA 유전자를 이용한 L-

threo-DOPS 합성 whole cell 생물반응기를 구축하고자 하였으나 예상외로 L-TA의 발현량이 낮아 효율성이 저하될 것이 예상되었다. 따라서 *Corynebacterium* 발현용 vector plasmid를 재구축함으로써 L-TA의 발현량을 향상시키고자 하였다. Fig. 2의 pCG-H44(1)의 lacP의 하류에 존재하는 Shine-Dalgarno(SD) 배열과 삽입된 L-TA 유전자의 개시코돈 사이의 염기를 하나 삭제한 5860 bp의 *Corynebacterium* 발현용 vector plasmid pCG-H44(2)을 재구축하였다. 구축된 pCG-H44(2)을 *C. glutamicum* R strain에 형질전환시킨 재조합 균주(CG44-2)를 사용하여 전술의 pCG-H44(1)을 형질전환시킨 CGH44-1과 동일한 조건하에서 삽입한 *S. coelicolor* A3(2) 유래 열안정화 L-TA의 발현을 유도하였다. *C. glutamicum* R strain에서 발현시킨 L-TA의 SDS-PAGE 분석 결과, Fig. 2의 1번 lane에서 보여지는 것처럼 CGH44-2에서는 Fig. 2의 2번 lane에서 보이는 CGH44-1 조효소액과 비교하여 약 37 kDa의 L-TA이 뚜렷하게 관찰되어 고발현되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 Table 2에서 보이는 것처럼 CGH44-2 조효소액의 L-threo-DOPS 합성 효소활성은 CGH44-1 조효소액 단백질 mg당 0.433 mg보다 많은 단백질 mg당 1.38 mg을 합성함을 알 수 있었다. 따라서 vector plasmid의 재구축을 통하여 단백질의 합성량이 약 3.2 배 상승된 것을 알 수 있다.

C. glutamicum R 숙주균을 이용한 L-threo-DOPS의 합성

재조합 *C. glutamicum* R을 이용하여 고발현된 L-TA를 이용한 L-threo-DOPS의 최적합성조건을 찾기 위하여 합성반응조건에 대하여 검토하였다. 최적반응 pH를 검토한 결과 Fig. 3(a)에서 보이는 것처럼 pH 8.0 이상, pH 5.0 이하의 산알칼리영역에서는 효소활성이 약했으며 pH 7.0에서의 L-threo-DOPS의 합성활성이 가장 높았다. Buffer의 종류에 따른 *Corynebacterium* 재조합 L-TA의 whole cell 반응시 L-threo-DOPS의 합성량을 최적활성 pH인 7.0에서 세종류의 buffer를 사용하여 비교한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7.0의 0.1 M citric acid buffer에서 동일 pH의 0.1 M sodium phosphate buffer와 0.1 M potassium phosphate buffer에 비해서 높은 L-threo-DOPS의 합성활성을 보였다. 재조합 L-TA의 whole cell 반응시 최적온도를 20~50°C의 범위에서 측정된 결과, 30°C에서 높은 L-threo-DOPS의 합성활성을 보였다. 40°C에서는 L-threo-DOPS 합성능이 5시간 이후 감소되는 경향을 보였으며, 50°C에서 초기 합성능도는 가장 높았으나 시간의 경과와 함께 급격히 감소되는 경향을 보였다. 따라서 *Corynebacterium* 재조합 L-TA의 whole cell 반응시 최적온도는 30°C가 가장 적합할 것으로 사료되었다. L-threo-DOPS의 최적합성을 위한 계면활성제에 대하여 검토한 결과, Fig. 4에서 보여지는 것처럼, 계면활성제를 첨가하지 않은 조건보다 계면활성제를 첨가한 경우 더 많은 L-threo-DOPS가 합성되었다. 사용된 두종류의 계면활

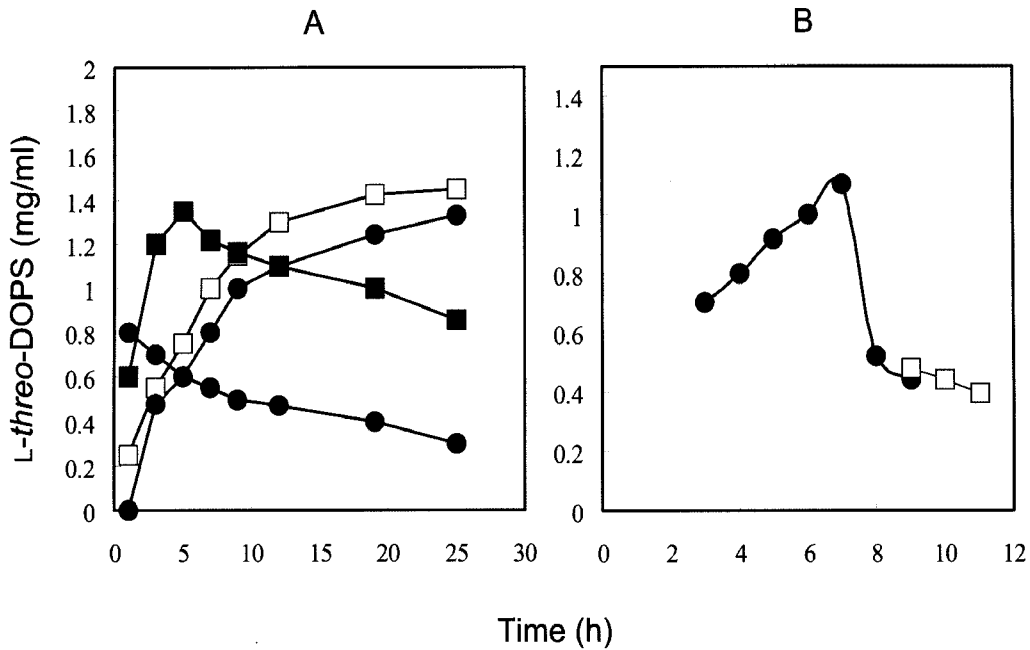


Fig. 3. Properties of the recombinant *C. glutamicum* R harboring thermostable L-TA from *S. coelicolor* A(3). A. Optimal temperature was determined in a temperature range from 20°C to 50°C for 25 h. B. For estimating the optimal pH, whole cells of the recombinant *C. glutamicum* R harboring thermostable L-TA was mixed (0.5 g/ml) with substrate solutions adjusted with each buffer solutions of various pH ranges: pH 3-9, 100 mM Britton-Robinson buffer (filled circles); pH 9-11, 100 mM glycine-NaOH buffer (unfilled squares). All the measurement was conducted in triplicate.

성제 중 TritonX-100가 Tween20보다 더 높은 L-threo-DOPS의 합성활성을 보였기 때문에 계면활성제의 종류에 따라 L-threo-DOPS의 합성에 차이가 나타남을 시사하였다. 이러한 결과는 계면활성제가 고밀도의 기질과 whole cell사이의 mass transfer rate를 향상시켜주기 때문으로 추정된다.

재조합 *C. glutamicum* R과 대장균을 이용한 L-threo-DOPS의 합성 비교.

최적조건하에서 L-threo-DOPS의 *C. glutamicum* R의 whole cell 합성활성을 재조합 *E. coli*와 비교하였다. 이전의 연구에서 열안정성이 향상된 L-TA인 H44의 경우 Fig. 4에서 보여지듯 *S. coelicolor* A(3)의 wild type L-TA을 발현시킨 대장균에 비해서 안정적으로 L-threo-DOPS를 합성할 수 있었으나, 20회 이상 반복회분식 반응에서 100시간 이후 점차 합성능이 감소되어짐을 알 수 있었다. 그 결과, wild type L-TA의 경우 약 2.0 mg/ml을 합성하였으며, 열안정화 효소인 H44의 경우, 약 4.0 mg/ml의 합성을 보여 효소의 반응을 향상시킬수 있었다. 그러나 반응이 100시간이상 연장되면서 그 반응효율은 더욱 감소되어 최종적으로 wild type L-TA의 경우 약 1.6 mg/ml을 합성하였으며, 열안정화 효소인 H44의 경우, 약 3.4 mg/ml의 합성을 보였다. 그러나, 본 연구에서 구축한 CGH44-1의 경우 반응의 시간이 연장되어짐에도 불구하고 최종적으로 검토한 반응시간 내에서 약 4.0 mg/ml의 L-threo-DOPS를 합성함을 알 수 있었다. 이러한 결과는, 효소의 열안정화 및 *Corynebacterium*의 도입에 의해

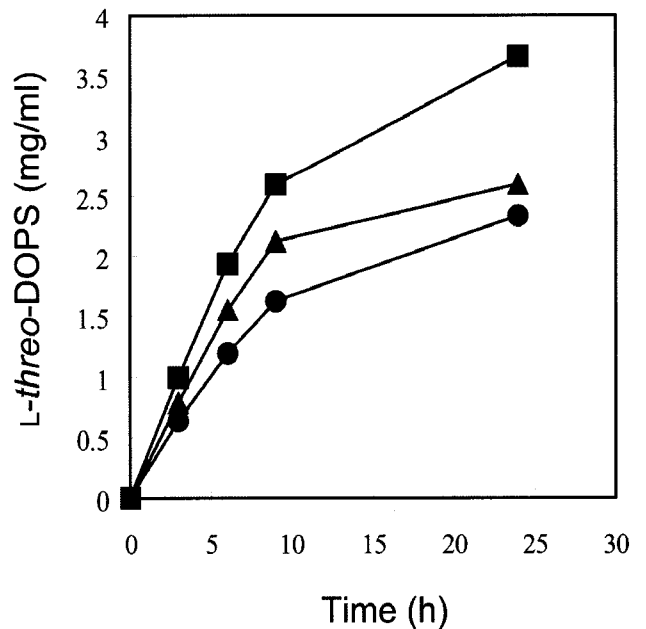


Fig. 4. Effect of buffers used for L-threo-DOPS synthesis reaction. Effect of buffer addition on the L-threo-DOPS synthesis reaction activity using whole cell L-TA catalyst expressed in *C. glutamicum* R strain was determined. The whole cell of L-TA expressed in *C. glutamicum* R strain (1 g wet weight) was incubated in each buffer solution containing substrate for L-threo-DOPS and the synthesized L-threo-DOPS was measured by HPLC. Symbols: filled triangles, 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0); filled circles, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH7.0); filled squares, 0.1 M citric acid buffer (pH7.0).

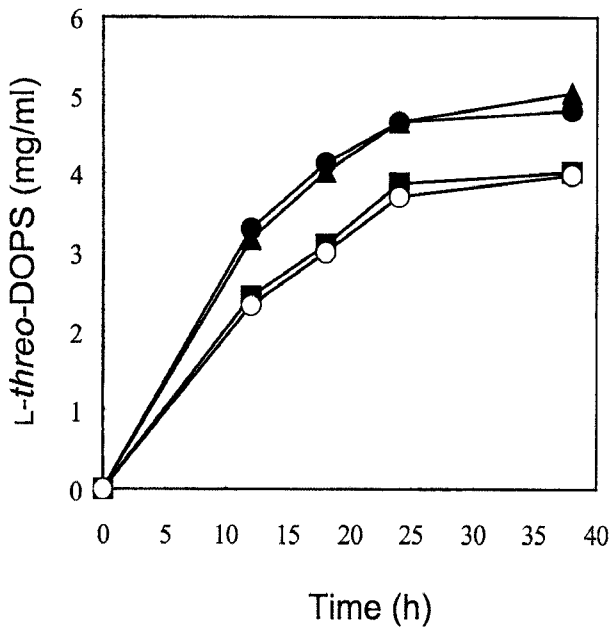


Fig. 5 Effect of surfactant for L-threo-DOPS synthesis by recombinant whole cell catalyst of L-TA expressed in *C. glutamicum* R strain. For estimating the optimal surfactant, the whole cell of CGH44-2 was incubated in buffer solutions containing each two surfactants: 0.5% (w/v) TritonX-100 (filled circles), 0.1% (w/v) TritonX-100 (filled triangles), 0.5% (w/v) Tween20 (filled squares), 0.1% (w/v) Tween20 (unfilled circles), and the synthesized L-threo-DOPS was measured by HPLC.

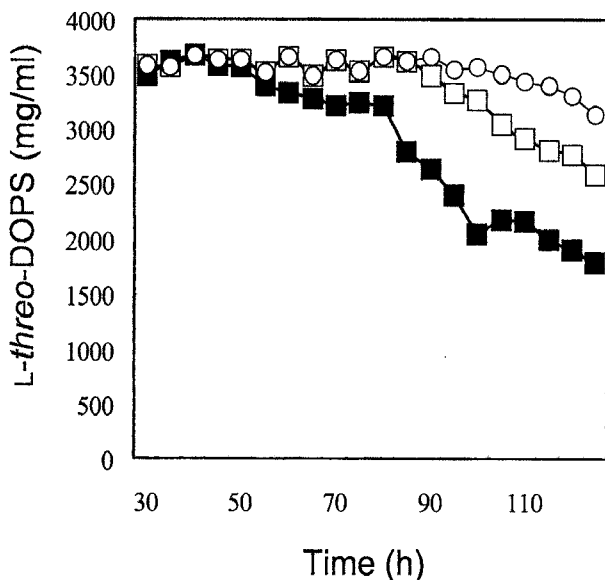


Fig. 6 Comparison of synthesis reaction of L-threo-DOPS by a whole-cell conversion reaction using recombinant *C. glutamicum* R and *E. coli* harboring thermostable L-TA. The enzymatic synthesis of L-threo-DOPS by *E. coli* cells harboring the wild-type L-TA (filled squares) or H44 mutant enzyme (unfilled squares) and *C. glutamicum* R cells harboring H44 mutant enzyme (unfilled circles) were performed in 50-ml falcon tubes with a vigorous shaking at 30°C for 5 h. *E. coli* cells were harvested by a centrifugation (10,000 rpm, 10 min), resuspended by a substrate solution, and followed by a continuous shaking at 30°C for the next whole-cell conversion reaction.

서 효율적이고 안정적으로 L-threo-DOPS를 합성 가능한 반응프로세스의 구축이 가능함을 시사한다.

요 약

Erro-prone PCR에 의해서 열안정성이 향상된 *Streptomyces coelicolor* A(3) 유래의 L-threonine aldolase를 *Corynebacterium glutamicum* R에서 과잉발현시키기 위하여 *Corynebacterium*용 vector plasmid인 pCRB1의 SD배열과 개시코돈사이의 1염기를 제거한 고발현용 vector plasmid인 pCG-H44(2)를 구축하였다. pCG-H44(2)에 의해서 형질전환된 *C. glutamicum* R 균주(CGH44-2)에서 L-TA를 발현시킨 결과, 기존의 *Corynebacterium*용 vector plasmid인 pCRB1(CGH44-1) 보다 L-TA의 발현량이 높았다. L-threo-DOPS의 합성을 위한 최적조건은 30°C, 0.1 M citric acid buffer(pH 7.0)이었으며, 0.1% TritonX-100를 첨가하였을 경우 보다 높은 활성을 보였다. 최적조건하에서 CGH44-2를 whole cell biocatalyst로 이용한 반복회분식반응에서 재조합대장균을 속주로 이용한 경우보다 재조합 *Corynebacterium*을 이용하였을 경우, 목적하는 L-threo-DOPS의 합성이 안정적으로 이루어졌다.

감사의 글

본 연구에 사용된 *Corynebacterium*용 vector plasmid를 제공해주신 RITE의 Yukawa 박사님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Baik, S. H., H. Yoshioka, H. Yukawa, and S. Harayama. 2007. Synthesis of L-threo-3,4-dihydroxyphenylserine (L-threo-DOPS) with thermostabilized low-specific L-threonine aldolase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 721-727.
- Gold, L., D. Pribnow, T. Schnerder, S. Shinedling, B. S. Singer, and G. Stormo. 1981. Translational initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 365-403.
- Goldstein, D. S. 2006. L-Dihydroxyphenylserine (L-DOPS): a norepinephrine prodrug. *Cardiovasc. Drug Rev.* **24**: 189-203.
- Greenberg, W. A., A. Varvak, S. R. Hanson, K. Wong, H. J. Huang, P. Chen, and M. J. Burk. 2004. Development of an efficient, scalable, aldolase-catalyzed process for enantioselective synthesis of statin intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 5788-5793.
- Hannemann, F., C. Virus, and R. Bernhardt. 2006. Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J. Biotechnol.* **124**: 172-181.
- Herbert, R. B., B. Wilkinson, G. J. Ellames, and E. K. Kunec.

1993. Stereospecific lysis of a range of β -hydroxy- α -amino acids catalyzed by a novel aldolase from *S. amakusaensis*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 205-206.
7. Hui, A., J. Hayflick, K. Dinkelspiel, and H. A. de Boer. 1984. Mutagenesis of the three base pair preceding the start codon of the β -galactosidase mRNA and its effect on translation in *E. coli*. *EMBO. J.* **3**: 623-629.
 8. Karasek, M. A. and D. M. Greenberg. 1957. Studies on the properties of threonine aldolases. *J. Biol. Chem.* **227**: 191-205.
 9. Kataoka, M., M. Ikemi, T. Morikawa, T. Miyoshi, K. Nishi, M. Wada, H. Yamada, and S. Shimizu. 1997. Isolation and characterization of D-threonine aldolase, a pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme from *Arthrobacter* sp. DK-38. *Eur. J. Biochem.* **248**: 385-393.
 10. Kumagai, H., T. Nagatae, H. Yoshida, and H. Yamada. 1972. Threonine aldolase from *Candida humicola*: purification, crystallization and properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **258**: 779-790.
 11. Kurusu, Y., M. Kainuma, M. Inui, Y. Satoh, and H. Yukawa. 1990. Electroporation-transformation system for *Corynebacteria* by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 443-447.
 12. Liu, J. Q., T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, and H. Yamada. 1998. Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **255**: 220-226.
 13. Liu, J. Q., S. Ito, T. Dairi, N. Itoh, S. Shimizu, and H. Yamada. 1998. Low-specific L-threonine aldolase of *Pseudomonas* sp. NCIMB 10558: purification, characterization and its application to β -hydroxy- α -amino acid synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 702-708.
 14. Liu, J. Q., T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, and H. Yamada. 2000. Diversity of microbial threonine aldolases and their application. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **10**: 107-115.
 15. Liu, J. Q., M. Odani, T. Yasuoka, T. Dairi, N. Itoh, M. Kataoka, S. Shimizu, and H. Yamada. 2000. Gene cloning and overexpression of low-specific D-threonine aldolase from *Alcaligenes xylosoxidans* and its application for production of a key intermediate for parkinsonism drug. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 44-51.
 16. Liu, J. Q., S. Nakata, T. Dairi, H. Misono, S. Shimizu, and H. Yamada. 1997. GLY1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-*allo*-threonine and L-threonine to glycine: expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **245**: 289-293.
 17. Nielsen, T. B. and J. A. Reynolds. 1978. Measurements of molecular weights by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **48**: 3-10.
 18. Ohashi, N., S. Nagata, K. Ishizumi, and K. Maeshima. 1984. Process for producing threo-3(3,4-dihydroxyphenyl)serine. European patent 0084928.
 19. Ra, K. S., H. S. Baik, Y. S. Lee, and J. W. Choi. 2000. Effect of random Shine-Dalgarno sequence on the expression of bovine growth hormone gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Life Sci.* **10**: 422-430.
 20. Roberto P., L. Roberto, T. Lucia, C. John, P. Maria, and M. Enrico. 1991. DL-allothreonine aldolase in rat liver. *Biochem. Soc. Trans.* **19**: 346-347.
 21. Schmid A., J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. G. Wubbolts, and B. Witholt. 2001. Industrial Biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.
 22. Schoemaker H. E., D. Mink, and M. G. Wubbolts. 2003. Dispelling the myths - biocatalysis in industrial synthesis. *Science* **14**: 1694-1697.
 23. Schirch, L. V. and T. Gross. 1968. Serine transhydroxymethylase: identification as the threonine and allothreonine aldolase. *J. Biol. Chem.* **243**: 5651-5655.
 24. Shepard, M. G., E. Yelverton, and D. Y. Goeddel. 1982. Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites. *DNA.* **1**: 123-131.
 25. Straathof A. J., S. Panke, and A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 548-556.

(Received May 1, 2008/Accepted May 26, 2008)