

대장균으로부터 재조합 levansucrase의 세포 외 발현 및 chaperone과의 공발현을 이용한 levan의 합성

문태권*, 이지선*, 오민석*, 노현정*, 최낙식**, 이우일*

*건양대학교 의료신소재학과

** (주) 케이프로텍

e-mail:lee0519@konyang.ac.kr

Extracellular expression of recombinant Levansucrase from *E. coli* and co-expression with chaperone

Tae-Kwon Moon*, Ji-Seon Lee*, Min-Seok Oh*, Hyeon-Jeong Noh*,

Nak-Sik Choi**, Woo-Yiel Lee*

*Dept. of Biomedical Materials, Konyang University

**Kprotec Inc.

요약

본 논문에서는 *Bacillus subtilis* 유래의 levansucrase gene(sacB)을 이용하여 유전자 재조합 과정을 통해 pSLevB를 획득하였으며, 이를 *E.coli* BL21 (DE3)을 이용하여 형질전환 후 chaperone과의 co-expression을 진행함으로써 발현되는 단백질의 refolding 과정을 생략할 수 있도록 공정을 단순화하였다. 재조합 levansucrase의 발현은 SDS-PAGE를 통하여 분석하였으며, chaperone의 영향으로 native state로의 발현이 함께 일어났음을 확인할 수 있었다. 효소반응을 통해 재조합 levansucrase를 이용한 levan 생합성을 진행하였으며, FT-IR을 이용하여 생성물의 구조를 확인하여 levan 합성을 확인하였다. 재조합 levansucrase는 DNS method를 이용하여 효소 활성도를 측정하였다.

1. 서론

바이오 폴리머는 동물, 식물, 박테리아, 균류 등에서 자연적으로 합성된 물질로 최근 지속 가능한 환경 친화적인 연구에 관심이 증가함에 따라 많은 천연 생체 고분자가 합성 고분자를 대체하고 있다. 한 예로 미생물 발효에 의한 다당류를 생산하는 연구가 있으며, 이는 식품과 제약, 의료 및 환경 등의 다양한 분야에 사용될 수 있다.

Levan은 과당의 천연 중합체인 fructan의 일종으로 β (2-1) 결합이 주쇄를 이루는 inulin과 달리 자당 대부분이 β (2-6)의 glycoside 결합을 주로 이루는 선형의 polyfructan이다. Levan이 가지는 일반적인 특성은 물에는 녹으나 alcohol에 의해 침전된다는 것이다. 이는 levan의 β (2-6) 결합의 특징으로 볼 수 있으며, β (2-1) 결합으로 형성된 가지 결합은 인장과 응집력을 갖게 한다. 저분자량의 levan (M.W<5,000)은 식물에 저장 탄수화물의 형태로 존재하며 미생물 유래의 levan은 수천 ~ 수만 단위의 높은 분자량을 가진다. [1]

Levan의 생합성에는 성장하는 levan 사슬의 비환원성 과당 말단기 탄소의 수산기에 fructofuranosyl기를 첨가해주는 효소인 levansucrase (sucrose-6-fructocyltransferase)가 관여한다. *Bacillus subtilis* 유래의 levansucrase는 473개

의 아미노산으로 구성되며, 52,971 Da의 질량을 가진다. 이 중 29개의 아미노산은 signal peptide로 세포 외 분비에 관여한다. [2]

재조합 단백질 생산 시 대장균(*Escherichia coli*, 이하 *E.coli*)는 빠르고 키우기 편한 장점으로 가장 많이 사용되는 숙주 세포이다. 그러나 *E. coli*에서 단백질을 발현할 때 가장 큰 문제점은 단백질이 봉입체(inclusion body)로 형성되어 생산성이 저하된다는 것이다. 이를 해결하는 방안으로 단백질의 접힘을 도와주는 chaperone 분자를 공발현하는 방법이 있다. [3]

본 연구에서는 *Bacillus subtilis*로부터 signal peptide가 포함된 Levansucrase 유전자(*sacB*)를 획득하고 이를 pRSET 벡터에 삽입하여 재조합 발현 벡터인 pSLevB을 구축하였다. pSLevB는 *E.coli* BL21 (DE3)에 형질전환 하였으며 이를 chaperone과의 공발현을 통해 수용성의 활성이 있는 levansucrase를 발현하여 levan을 생산하였다.

2. 실험 방법

2.1 재료

클로닝 및 발현용 균주로 사용한 DH5 α 와 BL21 (DE3)을 포함하여 클로닝 과정에서 사용되는 Taq DNA polymerase

는 iNtRON사(Korea)에서 구입하였다. 제한효소로 사용한 Nde I, Nco I 은 Enzymics사(Korea)에서 구매하였으며, T4 DNA ligase (NEB, UK), pRSET_A (ThermoFisher, USA), SOB broth (Biosesang, Korea)을 클로닝에 사용하였다. Chaperone 발현 벡터는 pG-Tf2 (Takara, Japan)을 사용하였다. 분석 과정에서는 3,5-Dinitrosalicylic acid (SAMCHUN, Korea), Dextrose (DAEJUNG, Korea), Potassium sodium tartrate (JUNSEI, Japan), Sodium hydroxide (SAMCHUN, Korea), Acetic acid (SAMCHUN, Korea) 등을 사용하였다. 그 밖에 사용한 시약과 buffer는 모두 일급을 구매하여 사용하였다.

2.2 levansucrase 발현 벡터 pSLevB 구축

*Bacillus subtilis*의 gDNA를 template DNA로 사용하여 PCR을 진행, levansucrase gene (sacB)를 증폭하였다. Signal peptide의 서열을 포함한 sacB를 증폭하기 위해 pF: 5' -GGGAATTCCATATGATGAACATCAAAAAGTTTGC-3' 와 pR: 5' -CATGCCATGGTTATTTGTTAACTGTTAATTGTCC-3' 을 사용하였다. PCR 반응 후 spin column을 이용하여 정제하였고, sacB의 증폭은 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. 증폭된 sacB와 pRSET을 제한효소 Nde I 과 Nco I 으로 처리하고 T4 ligase를 이용하여 벡터와 DNA를 1:5 비율로 혼합하였다. Ligation 반응물을 *E.coli* BL21 (DE3)에 형질전환 하였으며, 항생제 ampicillin (100 µg/ml)이 포함된 SOB agar 배지에서 배양하였다. 재조합 벡터 pSLevB는 colony PCR 진행 후 전기영동을 통하여 확인하였다.

2.3 pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 발현 및 정제

발현용 균주 BL21 (DE3)에 pG-Tf2 벡터를 형질전환한 후 재조합 발현벡터 pSLevB를 공형질전환하였다. 이후 항생제 ampicillin과 chloramphenicol을 포함한 SOB agar 배지에 배양함으로써 1차 선별을 진행하였다. 선별된 colony를 취하여 ampicillin과 chloramphenicol을 함유한 SOB 배지에 배양하였다. 배지에서의 발현량을 비교하기 위하여 SOB broth와 TB broth에서 각각 배양하였다. 이후 tetracycline을 추가로 첨가하여 본배양을 진행하였으며, 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가 후 37°C에서 4시간 발현하였다. 발현이 완료된 후 균주를 원심분리하여 상층액과 pellet을 분리하고 각각 SDS-PAGE를 실시하여 levansucrase의 발현 여부를 분석하였다.

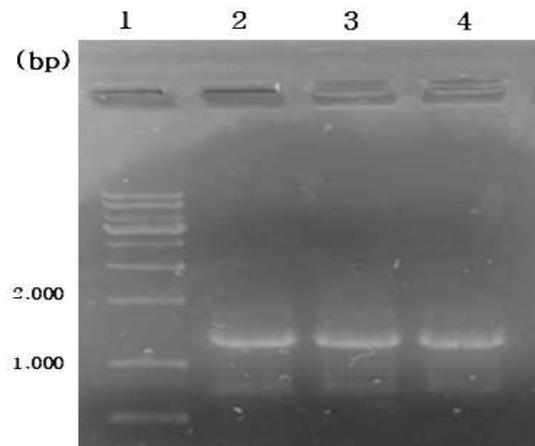
2.4 Levan 합성과 재조합 levansucrase의 활성도 측정

생성된 재조합 levansucrase는 sucrose를 기질로 하여 500 mM sodium acetate buffer, pH 6.0 조건에서 levan 생성 효소반응을 진행하였다. 이후 유기 용매에서 녹지 않는 levan의 특징을 이용하여 ethanol에 침전 후 16시간 동결건조하였다. 회수한 levan은 FT-IR을 통해 구조 분석을 진행하였으며, 3,5-dinitrosalicylic acid을 사용하여 환원당을 rochelle salt로 발색하여 흡광도를 측정하는 DNS method를 통해 효소 반응의 부산물인 glucose를 분석하고 재조합 단백질의 활성도를 측정하였다.

3. 실험 결과

3.1 발현 벡터 pSLevB의 유전자 재조합 확인

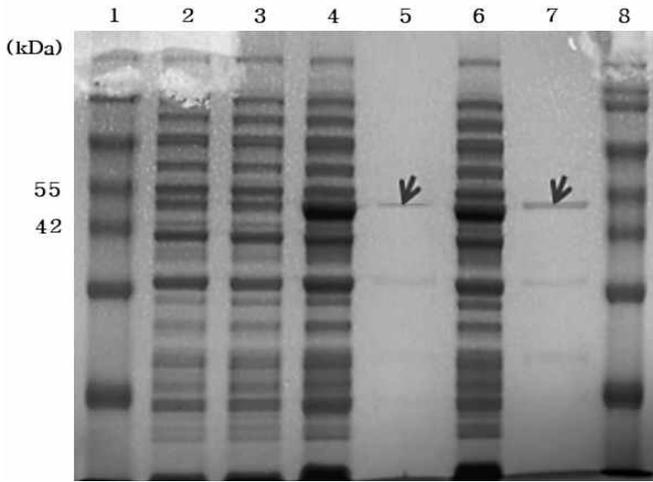
항생제를 첨가한 SOB agar 배지에 키움으로써 균주에 벡터가 삽입됨을 1차적으로 확인하였으며 colony PCR을 통해 2차로 확인하였다. Agarose gel 전기영동 분석 결과 1,000~2,000 bp에서 밴드가 나타남으로 pSLevB가 구축되었음을 확인하였다.



[그림 1] Colony PCR product의 agarose gel electrophoresis 결과. Lane 1: DNA Ladder, Lane 2: pSLevB01, Lane 3: pSLevB02, Lane 4: pSLevB03

3.2 재조합 pSLevB&pG-Tf2의 BL21 (DE3)에서의 발현 결과

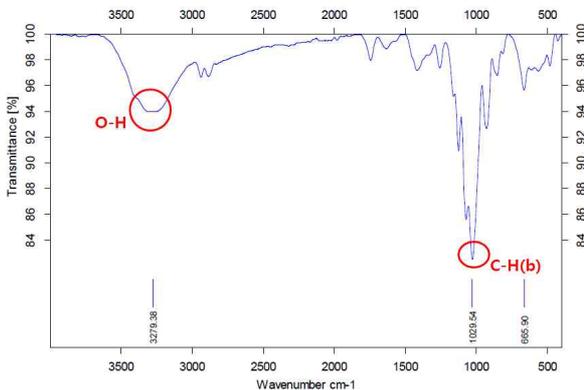
pSLevB가 형질전환된 BL21 (DE3)를 SOB 배지와 TB 배지에 각각 접종하고 유도 물질인 IPTG를 첨가 후 4시간 동안 발현을 진행하였으며, 원심분리 후 상층액과 pellet을 각각 sampling하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 그 결과, pellet과 상층액 모두 TB 배지에서 발현량이 높음을 확인할 수 있었으며, 재조합 levansucrase는 52.9 kDa에서 나타난 band로 발현이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.



[그림 2] SDS-PAGE 분석을 통한 pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3) 발현 확인 (lane 1 : Smart color protein marker, lane 2 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 음성대조군(SOB), lane 3 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 음성대조군(TB), lane 4 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 pellet(SOB), lane 5 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 media(SOB), lane 6 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 pellet(TB), lane 7 : pSLevB&pG-Tf2/BL21 (DE3)의 media(TB), lane 8 : Smart color protein marker)

3.2 Levan 합성 결과 및 재조합 levansucrase의 활성도 측정

동결건조를 진행한 후 powder 형태의 levan을 회수하였으며, 그 무게는 0.945 g이었다. 회수한 levan은 Fourier Transform Infrared (FT-IR, Cary 630, Agilent Technologies)을 이용하여 Attenuated total reflectance(ATR) 방식으로 4000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1} 의 파동 범위에서 측정하였다. FT-IR를 standard와 비교 결과, 3,279 cm^{-1} 과 1,029 cm^{-1} 에서 각각 hydroxyl group과 C-H 결합의 peak를 확인할 수 있었다.



[그림 3] Soluble state levan의 FT-IR 결과

DNS method를 사용하여 재조합 levansucrase의 활성도를 측정하였다. Sucrose가 포함된 sodium acetate buffer와 반응시킨 효소 반응물을 DNS solution과 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 생성된 glucose의 양은 1.01 mg/ml 으로 확인되었으며, 이를 통하여 재조합 levansucrase는 sucrose를 기질로 하여 다량의 levan 중합체를 합성할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구는 기능성 바이오 소재인 levan의 대량 생산을 위해 signal peptide가 포함된 levansucrase과 chaperone과의 공발현을 통해 refolding 공정을 생략하고 native state의 단백질 생산에 대해 연구하였다. 단백질 발현 분석 결과 배지 성분 안에 levansucrase 효소 성분이 나온 것으로 보아 세포 외 발현이 확인되었으며, 환원당 정량분석의 결과로 chaperone과의 공발현을 통해 soluble protein 형태의 levansucrase 효소의 glucose 수득량을 확인함으로써 native state 단백질의 발현이 되었음을 확인하였다. 향후 단백질 발현과 효소 반응 시의 조건 변화를 통해 native state의 단백질 생산량을 더 늘릴 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- [1] Yoo, S. H., Yoon, E. J., Cha, J., & Lee, H. G. (2004). Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *International journal of biological macromolecules*, 34(1-2), 37-41.
- [2] Abdel-Fattah, A. F., Mahmoud, D. A., & Esawy, M. A. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51(6), 402-407.
- [3] Hannig, G. and S. C. Makrides 1998. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 16, 54-60