

(S)-ketoprofen ethyl ester에 대해 높은 광학활성이 있는 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 유래 esterase의 PCR-Cloning과 정제

최기섭, 김지연, 김근중, 유연우
아주대학교 분자과학기술학과
전화(031) 219-2455, FAX(032) 216-8777

Abstract

The comparative study of enzymes that catalyze a similar reactions but have different substrate spectrum and/or stereospecificity is a powerful approach to understanding the reaction mechanism between the relative enzymes, and it was also an useful tool to cloning the related enzyme, without the typical cloning from DNA library of genomic pools. For this purpose, we conducted an approach that the comparison at the molecular and protein level of esterases, from various sources including a previously identified (S)-stereospecific esterase of *Pseudomonas* sp. ES1. As expected, we found an esterase family genes that shared a high similarity at the protein and genetic level in the identical genus *Pseudomonad*. The striking structural and biochemical identity strongly suggested the family genes to be an identical one. We, hence, aligned the family genes and designated a degenerated primer for PCR-cloning using six *Pseudomonas* strains as templates. As a result, a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 was cloned and high-level expressed with high selectivity to (R,S)-ketoprofen ethyl ester. The enzyme exhibited a high ester-hydrolyzing activity to (S)-ketoprofen but did not hydrolyzed the opposite stereoisomer. Further characteristics were discussed in our presentation.

서론

류마티스성 관절염 및 통증의 치료제로 쓰이는 Ketoprofen(rac-2-[3-benzoyl phenyl] propionic acid)은 비스테로이드계 소염진통제로서 2-aryl-substituted propionic acid를 공통적으로 가지고 있는 profen의 한 종류이다. 이들은 체내의 prostaglandin 생합성 촉매제인 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서 결국 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다. 2-arylpropionic acid의 (S)-isomer가 (R)-isomer의 약리적 활성보다 매우 강하고 (R)-isomer의 잠재적인 부작용의 우려 때문에 비대칭적 합성이나 kinetic resolution에 관한 연구에 관심이 집중되고 있다.^{1) 3)}

Enantioselectivity에 많이 사용되는 효소들은 protease, lipase, esterase 등의 가수분해효소들이 주를 이루고 esterase는 수용성기질에서 ester 결합을 분해하거나 형성하는데 관여한다. 상업적으로 사용되는 esterase의 대부분은 포유류에서 유래된 것이며 돼지의 간에서 분리한 esterase가 유기적 합성에 종종 사용되어져왔고 몇몇 미생물의 esterase들이 cloning 되었지만 chiral compound의 광학분할에는 적은 수만이 사용되어졌다.^{2) 5)}

본 연구에서는 기존에 (S)-ketoprofen에 광학활성을 갖는 균주로서 동정되어진 효소들의 생화학적 특성과 유전정보를 활용하여 관련된 효소들을 탐색한 후, 분석된 결과를 바탕으로 PCR-cloning을 시도하였다. 결과적으로, 단백질 혹은 유전자 수준에서 연관성이 추정되어지는 하나의 esterase family를 *Pseudomonas* 속의 균주들로부터 확인할 수 있었다. 따라서 *Pseudomonas* 속의 esterase와 연관된 degenerate primer를 제작하여 공시균주에서 PCR을 수행한 후 그 생성물들을 *E. coli*에 cloning하였고, 그 중 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767의 clone에서 기대한 활성을 갖는 재조합 esterase를 얻을 수 있었다.

재료 및 방법

Esterase를 cloning하기 위해 *E. coli* XL1-Blue와 pTrc99A vector를 사용하였고 공시균주에서 PCR을 수행하기 위하여 degenerate primer를 제작하였으며 반응액은 normal PCR 조건을 사용하였다(Figure 1). 반응은 denaturation 을 94°C에서 1분, annealing은 52°C에서 1분 그리고 extending은 72°C에서 50초간 실시하였다.

단일 과정을 통하여 단백질을 순수분리하기 위하여 putative esterase gene을 pMAL vector 에 cloning 한 후, *E. coli* cell을 ampicillin (100ug/mL)이 첨가된 Luria-Bertani 액체배지에서 초기 대수증식기(OD₆₀₀ 0.5)까지 배양한 후 IPTG(최종 농도 0.3 mM)를 넣어서 2시간 30분동안 유전자 발현을 유도하였다. 세포 파쇄후 분리한 상등액을 sephadex G-25 column chromatography 방법으로 염을 제거한 후 amylose resin을 사용한 affinity chromatography를 사용하여 MBP (maltose binding protein)와 결합된 MBP- esterase fusion protein을 분리하였다.⁴⁾

α -Naphthyl acetate를 이용하여 activity staining 하였다. Native PAGE한 gel을 50 mM Tris-Cl pH 8.0 buffer 100mL에 침지한 후 α -Naphthyl acetate (4.6 mg/0.5mL ethoxyethanol)를 첨가한다. Fast Blue RR solution(10 mg/5mL H₂O)을 점적하여 효소활성이 있는 band를 확인하였다.²⁾

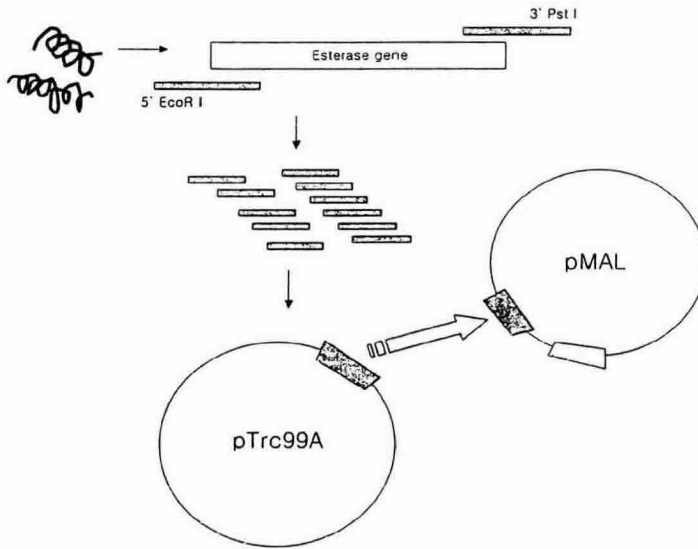


Figure 1. Schematic diagram of cloning using degenerate primers and Normal PCR

결과 및 토의

Degenerate primer를 이용한 PCR 실험에서 *Pseudomonas putida* KCTC 1642, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2450, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 2344, *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767의 genomic DNA를 template로 사용한 반응만이 기대했던 크기의 유전자 단편을 확인할 수 있었다. 또한 transformation한 후에 agar plate상에서 activity staining을 하였을 때 1642와 2344의 경우에는 활성을 확인할 수 없었고 2450은 PCR 생성물이 agarose gel 전기영동시에 smear한 band를 형성하였다. pTrc99A를 주형으로 한 PCR생성물을 sequencing한 결과 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 유래의 esterase의 경우, GeneBank에서 기존에 발표된 esterase들과 아주 높은 상동성의 결과를 보여주었다(Figure 2). Esterase 효소들에서 보이는 active site의 보존적인 서열(G-X-S-X-G)을 볼 수 있었으며 carboxyl esterase와 아미노산 서열상에서 90% 이상의 상동성을 보이고 nucleotide 서열비교에서도 80% 이상의 상동성을 확인할 수 있다.

간편한 정제와 효소의 특성분석을 위해 *Pseudomonas fluorescens* KCTC 1767 유래의 gene product를 제한효소 *EcoRI*과 *PstI*으로 절단한 후 pTrc99A vector로부터 MBP fusion protein을 생성하는 pMAL vector에 subcloning 하였다. 정제된 MBP fusion protein은 대략 77,000 dalton 정도임을 SDS-PAGE상에서 확인하였고 실제 esterase 부분은 약 34,000 dalton 정도임을 확인할 수 있었으며 이는 전체염기서열로부터 추정된 분자량과 잘 일치함을 알 수 있었다(Figure 3). 새로이 분리된 효소

의 ee값이 100 %로 (S)-ketoprofen에 대해서만 특이적으로 반응하며 높은 전환율을 갖는다. 반응시, rac-ketoprofen ethyl ester가 불용성 기질이므로 Triton X-100을 첨가하여 micelle을 형성시킨 후 효소반응을 유도하며, shaking을 통해 기질들의 재응집을 방지해야 재현성 있는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 이 효소는 lipase들이 가지는 특성인 interfacial activity를 나타내지 않으며 수용성기질에서 잘 반응하고 지용성 기질은 계면활성제를 첨가하여 기질을 수용액상에서 emulsion 형태로 만들어야 반응을 할 수 있었다. 몇몇 보고에 의하면 Triton X 계열의 계면활성제의 첨가가 효소의 활성을 저해한다는 보고가 있었으나, 본 실험에서는 활성의 감소가 일어나지 않았다. 이러한 결과들을 바탕으로 보다 새로운 효소의 탐색을 위한 genomic DNA pool 의 확보와 PCR-cloning 을 진행중이다.

```

1
MLPAEALYDWQRMVDTLAAEAPWW
TPGQGHGYEAITYGWLVGELLRRADG
RGPGESIVARVARPLGLDFHVGLADEE
FYRVAHIARSKGNMGDEAAQRLQVM
MREPnamttrafanppsiltstnkpe
WRRMQQPAANGHGNARSLAGFYSGL
LDGSLLES DMLEQLTREHSIGPDKTLL
TQTRFGLGCLDQPQLPNATFGLGPR
AFGHPGAGGSVGFADPEHDVAFGFVT
NTLGPYVLM DPRAQKLVGILAGCLZ
257

```

Fig 2. Amino acid sequence of *P.fluorescens* KCTC 1767 esterase.



Figure 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified MBP-esterase fusion protein. Lane 1 Crude. Lane 2,3,4 fusion protein.

참고문헌

1. 이정복, 아주대학교 대학원 분자과학기술학과 석사학위논문(2001)
2. V.Khalameyzer, I.Fischer, U. T. Bornscheuer, and J. Altenbuchner(1999), App. Envr. Microb, 65(2), 477-482
3. Teresa Sanchez, Juan J. Moreno (1999), Eur. J. Pharm, 370, 63-67
4. J.W. Kim, Y. S. Shim and S. S. Yoon (1997), Korean J. Dairy Sci, 19(1), 17-24
5. N. Krebsfnger, F.Zocher, J. Altenbuchner, and U.T. Bornscheuer, (1998), 22, 641- 646