

Pseudoalteromonas carrageenovora 유래 Arylsulfatase의 cloning과 재조합 *E. coli*에서 과발현

임재명¹, 김형락², 김성구¹, 남수완^{*}

^{*}동의대학교 생명공학과, ¹부경대학교 생물공학과, ²부경대학교 식품생명과학과
전화 (051) 890-2276, FAX (051) 890-1619

Abstract

A marine aerobic Gram-negative bacterium, *Pseudoalteromonas carrageenovora*, has been known to hydrolyze carrageenans, the sulfated galactans of red algae, and to desulfate oligo kappa-carrageenans. Recently, the gene encoding arylsulfatase (aryl-sulfate sulfohydrolase, E.C.3.1.6.1) of *A. carrageenovora* was cloned and the nucleotide sequence was reported. Enzymatic hydrolysis of sulfate groups in agaropectin simplifies the process of agarose preparation. In order to overproduce the enzyme, the arylsulfatase gene (*astA*, 984 bp ORF) from *P. carrageenovora* genome was amplified by PCR and subcloned into the pET21a vector. When the constructed plasmid pAST-A1 was introduced into *E. coli* BL21(DE3), the transformant on LB plate containing IPTG showed the hydrolyzing activity for *p*-nitrophenyl sulfate. Most of arylsulfatase activity was found in the cell lysate, but at 50 ~ 5000 μ M IPTG concentration the activity was found both in the culture supernatant and the cell lysate. The molecular weight of the recombinant enzyme was estimated to be 34 kDa by SDS-PAGE.

서 론

Arylsulfatase는 *p*NPS (*p*-nitrophenyl sulfate) 또는 MUFS(methylumbelliferyl sulfate)와 같은 phenolic ester sulphate, sulfonated polysaccharide을 aryl compounds와 무기황으로 가수분해하여 세균에 황을 제공하는 것으로 생각되고 있다¹⁾. 해양 환경에는 sulfur 이온이 풍부하여, arylsulfatase 활성이 구성적으로 발현된다고 *Alcaligenes metalcaligenes*으로부터 보고되었다²⁾. 해양성 다당체를 분해하는 균주인 *Pseudoalteromonas carrageenovora*의 arylsulfatase는 병원성에 관련된 *Mycobacterium leprae*, *Porphyromonas gingivalis*의 arylsulfatase와 유사성이 20 ~ 25%인 것으로 보아 병원성에 관여하지 않고, sulfonated polysaccharide의 desulfatation에 관여한다. Agar는 galactose 다당체로 구성

되어 있으며, galactose로만 구성되어진 agarose와 겔가지에 황이나 pyruvate등이 결합되어 있는 agarpectin으로 구성되어 있다. Agarose의 생물학적 생산 공정을 개발하기 위해 arylsulfatase 과발현 생산이 필요하다. 이에 본 연구는 재조합 대장균에서 *P. carrageenovora* 유래 arylsulfatase를 대량 생산하는데 있어 최적의 과발현 조건을 찾고, 재조합 효소의 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 발현 plasmid 구축

*P. carrageenovora*로부터 genomic DNA를 추출하여 primer-1 : 5'-CGGGATCCCATGCAA TTAGTATTATA-3'와 primer-2 : 5'-CCAAGCTTTTAGCGTTTTAGTTCGTAAC-3'를 사용하여 PCR함으로써 자체 signal peptide를 포함한 arylsulfatase 유전자 (0.98 kb)를 증폭하였다. 증폭된 유전자를 *Bam*HI과 *Hind*III로 절단하여 대장균 발현 pET21a vector(Novagen, U.S.A)에 subcloning하여 plasmid pAST-A1 (6.4 kb)를 구축하였다.

형질전환 및 배지

A. carrageenovora 배양 배지는 Zobell's 2216e 배지 (1% beef extract, 1% peptone, 0.75 vol. sea water, 0.25 vol. top water)이며, 대장균 형질전환균주 선별 배지는 LBAIP (1% tryptone, 0.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 30 μ g-ampicillin/ml, 1 mM IPTG, 200 mM pNPS)였다. 구축된 plasmid pAST-A1을 *E. coli* BL21(DE3)에 CaCl₂법으로 형질전환하여 *E. coli* BL21(DE3) /pAST-A1 형질전환균주를 얻었다.

IPTG 농도 영향

IPTG 농도의 최적화는 시험관 (2 × 20 cm) 배양을 통해 대수 증식기 초기인 OD₆₀₀=0.5일 때 1 μ M에서 5 mM까지 첨가하여 유도 후 4시간과 8시간째 각각 arylsulfatase 발현 양상 및 발현량을 측정하였다.

재조합 단백질 분석 및 효소 활성 측정

Sampling한 배양액을 5,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체와 상등액을 분리한 후, 균체는 0.05 mM 인산완충액(pH 7.5)에 재현탁하여 sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 sample을 다시 10,000 rpm에서 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하여 재조합 arylsulfatase를 SDS-PAGE (10% acrylamide gel)로 확인하였다. 효소 1 unit는 40°C에서 50 mM pNPS로부터 1분간 1 μ mole의 p-nitrophenol를 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

발현 plasmid 구축

Sulfonated polysaccharide의 탈황을 촉매하는 것으로 알려진 *P. carrageenovora* 유래 arylsulfatase 유전자(*astA*)를 genomic DNA로부터 PCR를 통해 984 bp의 유전자를 증폭하였다. 이를 대장균에서 발현시키기 위해서 *E. coli* 발현 vector인 pET21a에 PCR 증폭한 arylsulfatase 유전자를 subcloning하여 pAST-A1를 구축하였다. *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시킨 후 재조합 대장균에서 발현되는지를 확인하기 위해 plate 상에서 pNPS 분해 활성을 확인하였다(Fig. 2). T7 polymerase 없는 형질전환균주(DH5α/pAST-A1)에서는 sulfatase 활성이 나타나지 않았으며, T7 polymerase가 존재하는 *E. coli* BL21(DE3) 형질전환 균주인 *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1만이 sulfatase 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

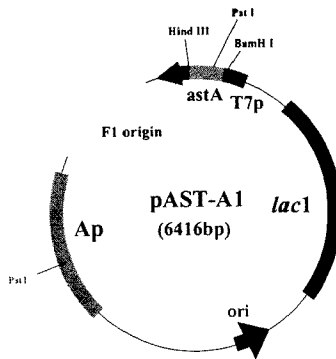


Fig. 1. Schematic diagram of arylsulfatase expression plasmid, pAST-A1.

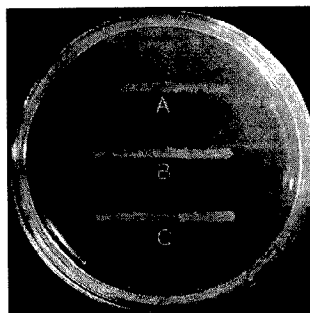


Fig. 2. Arylsulfatase activity of *E. coli* transformants. The cells were grown on LB medium containing 200 mM pNPS and 1 mM IPTG.

- A, *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1
- B, *E. coli* BL21(DE3)/pET21a
- C, *E. coli* DH5α/pAST-A1

IPTG 영향

형질전환균주 (*E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1)를 초기 대수 증식기($OD_{600}=0.5$)에 IPTG 를 농도별로 첨가하여 균체증식과 *astA* 과발현의 최적인 IPTG 농도를 결정하였다. IPTG 농도에 따라 균체 농도와 arylsulfatase 활성을 측정된 결과는 Fig. 3.에 나타내었다. IPTG 10 μ M에서 8시간째 arylsulfatase 효소활성은 최대 2.04 unit/ml을 나타냈으며, 이 때 균체 농도는 $OD_{600}=3.46$ 으로 IPTG 첨가하지 않은 대조구($OD_{600} = 4.98$)에 비해 상당히 낮았다. 4시간째에서 균체 농도는 $OD_{600} = 2.4$, arylsulfatase 발현량은 상등액에서 0.25 unit/ml, 세포파쇄물의 soluble fraction에서 0.85 unit/ml로 나타났으며, 8시간째 균체 농도는 $OD_{600} = 2.06$, arylsulfatase 발현량은 상등액에서 1.05 unit/ml, 세포파쇄물의 soluble fraction에서 0.80 unit/ml로 나타났다. 8시간째에서 상등액의 arylsulfatase 발현량이 높은 것은 세포 용혈 때문인 것으로 사료된다. 이런 현상은 pBluescript SK II(+)에 *astA*를 삽입한 형질전환 균주(*E. coli* DH5 α /pBlue-astA)에서도 나타났으며, 이 형질전환균주는 IPTG 유도전에도 arylsulfatase가 발현되며, 최대 균체 농도는 $OD_{600} = 0.3$, 최대 효소활성 0.3 unit/ml 였다. 활성 대부분이 배양 상등액에서 측정되는 것으로 보아 대장균이 *astA*의 활성형 발현에 의해 세포 용혈이 발생하는 것으로 보인다. 이상의 결과, 최적 IPTG 농도는 목적에 따라서 5 - 50 μ M로 사용할 수 있다. 즉, 배양 상등액으로 활성형 효소를 생산하는 것을 목적으로 하는 경우 50 μ M의 IPTG 농도가, 균체 증식 및 세포내 활성형 재조합 단백질 생산을 목적으로 하는 경우 5-10 μ M의 IPTG 농도를 사용할 수 있을 것으로 보인다.

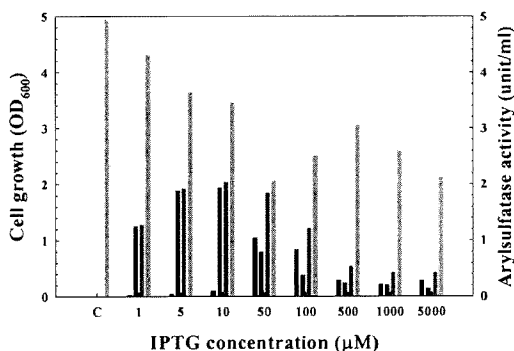


Fig. 3. Cell growth and arylsulfatase activity at 8 hr after IPTG induction in *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1. IPTG solution with various concentrations was added at 2 hr and there after at 8 hr cells were harvested.

- , Arylsulfatase activity in culture supernatant
- ▨, Arylsulfatase activity in soluble fraction of cell lysate

재조합 arylsulfatase의 분석

SDS-PAGE를 사용하여 *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1 재조합 균주에서 생산된 arylsulfatase의 분자량 및 발현 양상을 확인하였다. 대조구는 유도 물질 IPTG를 넣지 않은 것이며, 시험구에서는 약 34 kDa의 arylsulfatase 단일 band를 확인하였다(Fig. 4). *astA*의 크기는 984 bp로서 약 36 kDa의 단백질 크기이나, 자체 signal peptide(25 amino acids)가 절단되며 발현되는 것으로 보인다. 이는 이전에 보고된 내용(대장균에서 발현시 34 kDa 보다 36 kDa이 더욱 많이 발현됨)²⁾과 차이가 있는 것으로 보인다. IPTG 농도별 cell lysate의 soluble 및 insoluble 분획을 SDS-PAGE를 통해 분석한 결과, 용입 체로 형성된 arylsulfatase도 존재한다는 것을 확인하였다.

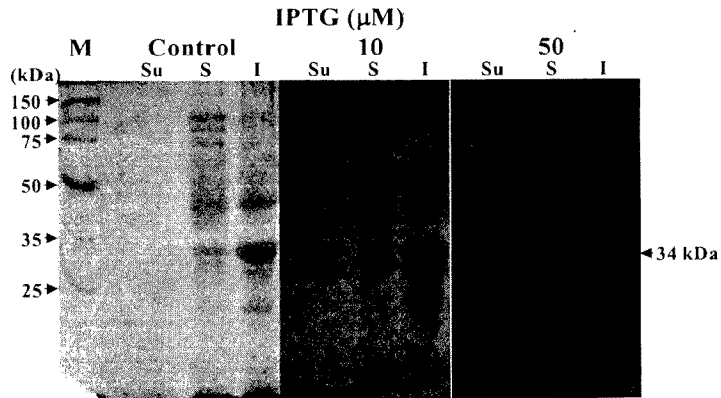


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of *E. coli* cell lysates after 8 hr IPTG induction.

Su, culture supernatant
 S, soluble fraction of cell lysate
 I, insoluble fraction of cell lysate

참고문헌

1. Michael A. Kertesz. "Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria"(1999) *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 135
2. Barbeyron T, Potin P, Richard C, Collin O, Kloareg B. "Arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*"(1995). *Microbiol.*; **141**, 2897