

Development of Olfactory Biosensor Using Olfactory Receptor Proteins Expressed in *E.coli*

성중환, 고휘진, 박태현

서울대학교 응용화학부, 세포 및 미생물공학 실험실
(전화) 02-880-8020 박태현

Abstract

Olfactory receptor protein ODR10 was expressed in *E.coli* as fusion protein with GST and His6 Tag. Crude membrane extract of the expressed protein was coated on the surface of quartz crystal microbalance, and the interaction of the ODR10 with several odorants was examined. Although the expression level was very low, quartz crystal microbalance showed that the expressed protein interacted most strongly with diacetyl(butanedione), which is known to bind to the ODR10 protein selectively. The interaction between ODR10 and diacetyl was 5~10 times stronger than the interaction between ODR10 and other odorants. Thus, *E.coli* cells expressing the olfactory receptor protein could be used as an olfactory biosensor. Also, such system could be used to test which olfactory receptor reacts specifically with which odorant molecules, since there has been no cheap and convenient way to test the interaction of olfactory receptors and odorant molecules yet.

서론

인간과 동물의 후각 기관은 극미량의 냄새 분자까지도 짧은 시간 안에 구별해 낼 수 있는 매우 예민한 기관이다.1) 예를 들면 2-isobutyl-3-methoxypyrazine의 경우 0.002ppb의 농도까지 구별이 가능하며, a-terpinethiol의 경우 0.00002ppb의 농도까지 구별이 가능하다.2) 와인이나 향수의 품질 평가와 같이 냄새나 향을 평가해야 하는 경우 현재까지는 전문적인 훈련을 받은 사람들로 이루어진 평가단에 의해 평가가 이루어지는 경우가 대부분이며, 객관적이고 정량적으로 냄새나 향을 측정하는 기구는 개발되어 있지 못하다.

그 동안의 연구 결과에 의하면 냄새를 맡게 되는 과정은 냄새를 가진 기체 분자가 후각 신경 세포의 표면에 있는 후각 수용체 단백질과 반응을 하면서 시작한다고 알려져 있다.3) 냄새 분자가 후각 수용 단백질과 반응을 한 후의 신호 전달 과정에 대한 연구는 1991년에 최초로 후각 수용체 단백질의 유전자가 분리되고 후각 수용 단백질이 G-protein coupled receptor(GPCR)의 한 종류라는 사실이 밝혀지면서 활발하게 진행되어 왔다.4)

후각 수용 단백질의 유전자는 포유류의 경우 1000가지 종류가 존재하며 GPCR family 중 가장 개수가 많은 것으로 알려져 있다.5) 인간 및 여러 생물체의 전체 유전체의 결과로 후각 수용 단백질의 종류가 밝혀진 후 각각 어떤 냄새 분자와 결합을 하는가에 대한 연구가 이루어져 왔으며 일부분의 후각 수용 단백질의 경우에 특이적으로 결합하는 냄새 분자가 존재한다는 것이 밝혀졌다.6,7)

Quartz Crystal Microbalance는 수정 진동자의 압전 효과를 이용한 센서로 ng단위의 미세한 질량 차이를 실시간으로 감지할 수 있어 냄새 분자가 후각 수용체 단백질과 결합을 하는지 알아보는데 이상적이다. 또한 진동수의 변화량이 결합하는 질량과 비례한다고 알려져 있어 정량적인 비교도 가능하다.

ODR10이라는 단백질은 *C. elegans*에서 발견되는 후각 수용 단백질의 하나로 diacetyl을 인식하는 것으로 알려진 신경세포에서 집중적으로 발견이 되며, diacetyl과 특이적으로 결합하여 G-protein 신호전달 체계를 활성화시킨다.8) 본 연구에서는 ODR10을 대장균에서 발현을 시킨 후 발현된 후각 수용 단백질이 냄새 분자인 diacetyl과 특이적으로 반응한다는 것을 증명함으로써 대장균에서 후각 수용 단백질을 발현시키는 시스템이 냄새를 측정하기 위한 바이오센서로 응용될 수 있는 가능성이 있다는 것을 보여주었다.

재료 및 방법

실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* DH5와 BL21(DE3)이며 모두 LB 배지에서 배양하였다. 발현 벡터는 pGEX 4T-1과 pET32a 두 가지를 사용하여 발현 양을 비교하였으며 PCR을 통해 ODR10 유전자의 C 말단에 hexa-histidine tag를 삽입하였다. LB 배지 50ml에 접종을 한 후 37C에서 배양하다가 OD 0.8~1.0 사이에서 IPTG를 최종농도 0.5mM이 되도록 넣어주었으며 그 후 37C에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 세포를 수확하였으며 lysis buffer(20 mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5% triton X-100, PMSF 5mM, Leupeptin 5mM, Pepstatin 5mM)에서 sonicator로 세포를 파괴하였다. 원심분리로 분리한 후에 상층액을 취해서 crystal의 표면에 올려놓은 채로 6시간 동안 상온에서 건조시켰다. 완전히 건조가 된 후에 diacetyl의 headspace에서 air sample을 취해서 주사기로 뿌려주면서 진동수의 변화량을 측정하였다.

결과 및 고찰

두 종류의 발현 벡터를 사용해서 실험을 해 본 결과 두 가지 모두 SDS PAGE로는 발현된 단백질을 확인할 수 없었고, anti-His antibody를 사용한 western blot으로 pGEX4T-1/odr10/His6으로 발현이 된 것을 확인할 수 있었다. (Fig 1)

pGEX/odr10/His6 vector로 발현시킨 대장균 세포를 Quartz Crystal의 표면에 붙인 후 diacetyl

을 뿌리면서 진동수 변화를 측정한 결과, IPTG로 induction을 한 경우가하지 않은 경우에 비해 3.4배 진동수 변화폭이 컸다. (Fig 2) Induction 하지 않은 경우에도 진동수의 변화가 적게나마 있는 이유는 발현 벡터의 프로모터가 leaky해서 소량의 후각 수용 단백질이 발현되고 있거나, diacetyl이 대장균 세포막의 lipid 성분과 결합하기 때문인 것으로 보인다. 또한 diacetyl의 농도를 변화시켜가면서 주입했을 경우의 진동수 변화를 측정해본 결과 농도에 따라 정량적인 관계가 있는 것으로 나타났다.

Dacetyl이 ODR10과 특이적으로 결합하는지 알아보기 위해 diacetyl 이외의 다른 냄새 분자들을 주입한 후 진동수 변화량을 측정한 결과, diacetyl을 주입하였을 때가 다른 냄새 분자를 주입하였을 경우에 비해 5배에서 10배 정도 진동수 변화량이 컸던 것으로 나타났다.(Fig4)

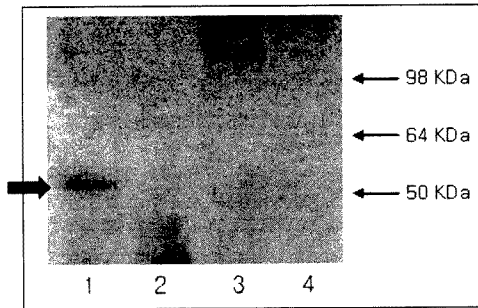


Fig 1. Western Blot Analysis :
lane1: pGEX/odr10/His6,
lane2: pGEX/odr10/His 6 Not Induced
lane3: pET/odr10/His6
lane4: pET/odr10/His6 Not Induced

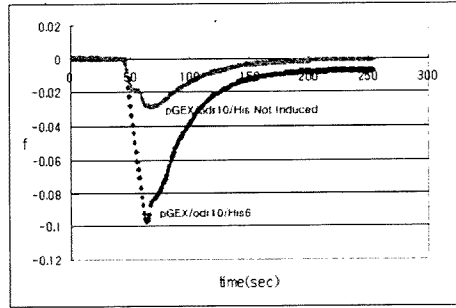


Fig2. QCM Analysis
ODR10 단백질이 발현된 경우가 그렇지 않은 경우보다 진동수의 변화폭이 더 크다

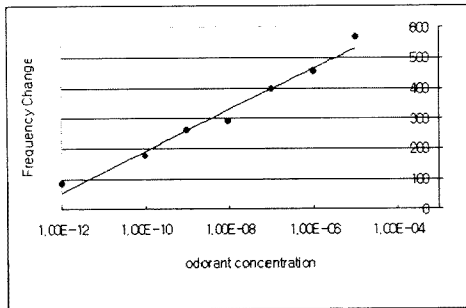


Fig 3. Diacetyl의 농도에 따른 진동수 변화량의 차이 : 농도가 높을수록 진동수 변화량이 커진다.

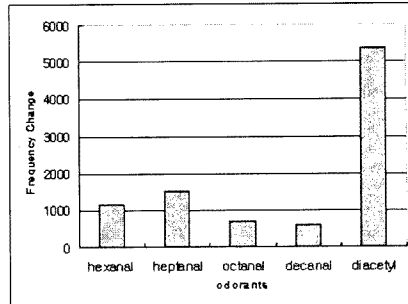


Fig 4. 여러 종류의 냄새분자에 대한 반응정도

요 약

본 연구에서는 후각 수용 단백질인 ODR10를 GST와 Histidine tag를 각각 N 말단과 C 말단

에 삽입한 후 두 가지의 발현 벡터에 넣어 대장균에서 발현시켰다. 부분 정제된 단백질을 QCM의 수정진동자에 코팅한 후 여러 종류의 냄새 분자와의 상호 작용을 관찰하였다. 발현 양은 적었지만 QCM 실험 결과 발현된 단백질이 diacetyl과 반응한다는 것을 알 수 있었다. ODR10 단백질과 diacetyl의 결합 정도는 다른 냄새 분자와 비교했을 때 5~10배 정도 차이가 났으며 이를 통해 후각 수용 단백질을 발현시킨 대장균 세포들을 후각센서를 개발하는데 사용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한 현재까지는 1000가지 이상 존재한다고 알려진 후각 수용 단백질들이 어떤 냄새 분자와 특이적인 결합성을 가지는지 조사하기 위해서는 복잡하고 시간이 오래 걸리는 실험을 해야 했었지만, 대장균에서 발현시키는 시스템을 통해 경제적이고 효율적으로 조사를 할 수 있게 되었다.

참고문헌

1. Chen Z., Lancet D. "Membrane proteins unique to vertebrate olfactory cilia: Candidates for sensory receptor molecules" (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol(81), 1859-1863
2. Gardner J. W., Barlett P. N. "A brief history of electron noses" (1994), Sensors and Actuators, Vol(18/19), 211-220
3. Getchell T. V., Margolis F. L., Getchell M. L. "Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction"(1984), Prog. Neurobiol., Vol(23), 317
4. Buck L. & Axel R. "A novel multigene family may encode odorant receptors, a molecular basis for odor recognition"(1991), Cell, Vol(65), 175-187
5. Firestein S. "How the olfactory system makes sense of scents"(2001), Nature, Vol(413), 211-218
6. Touhara K. "Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons"(1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA Neurobiology, Vol(96), 4040-4045
7. Buck L. "Combinatorial receptor codes for odors"(1999), Cell, Vol(96), 713-723
8. Zhang Y. "The *Caenorhabditis elegans* seven-transmembrane protein ODR-10 functions as an odorant receptor in mammalian cells"(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Neurobiology, Vol(94), 12162-12167