

Enhanced thermostability and substrate susceptibility of esterase using directed evolution

최기섭, 김지희, 김근중¹, 유연우*

아주대학교 분자과학기술학과, ¹인하대학교 생물공학과

Tel (031)219-2449, FAX (031)216-8777

Abstract

A stereoselective-hydrolysing enzyme was cloned from *Pseudomonas fluorescens* KCTC1767 which had high enantiomeric activity toward (*S*)-ketoprofen ethyl ester. Analyses of typical properties resulted in low thermostability and substrate specificity. A round error-prone PCR and StEP(STaggered Extension Process) was adopted to evolve this character. As a result, the best clone 6-52 was selected which was represented to increased thermostability(40 fold) compared to wild type enzyme in 5 0°C. Additionally, specific activity toward (*S*)-ketoprofen ethyl ester and *p*-nitrophenyl derivatives improved 3 fold and 1.5 fold, respectively. DNA sequence analyses was showed some exchanged amino acid residue that was L120P, I208V, T249A, D287H and T357A. Which the 120th's leucine substituted for proline was presumed structurally important residue concerning with catalytic activity.

서 론

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(1). 이들은 체내의 prostaglandin 생합성 촉매제인 cyclooxygenase의 활성을 감소시킴으로서 결국 prostaglandin 저해제로 작용하여 통증을 완화시킨다. 2-arylpropionic acid의 (*S*)-isomer가 (*R*)-isomer의 약리적 활성보다 매우 강하여 비대칭적 합성이나 kinetic resolution에 관한 연구에 관심이 집중되고 있다(2).

Ketoprofen ethyl ester를 광학분할하기 위하여 hydrolase를 탐색하였으며, esterase를 최종 후보군으로 선정하였다. 기존의 문헌들에서 *Pseudomonas* sp. 유래의 esterase들이 광범위한 기질특성을 보이며 넓은 범위의 pH에서 최적활성을 갖는 것으로 보고되었으

로, ketoprofen ethyl ester에도 광학활성을 가질 것으로 예상하여 *Pseudomonas* sp. 균주들을 대상으로 esterase gene을cloning 하였다. 정제된 효소의 일반적인 특성을 규명하였고, small-scale conversion 에 대한 연구결과를 보고하였다(3). 본 효소는 1146개의 nucleotide로 구성된 monomer이며 pH 8.5와 35°C에서 최적활성을 나타내었다.

재료 및 방법

Bacterial strains and plasmids

P. fluorescens KCTC1767과 유전자 cloning을 위한 숙주세포로 쓰인 *E. coli* XL1_blue의 배양을 위해서는 LB 배지를 사용하였으며, cloning에는 pTrc99a, pMALc2x와 pQE30 vector system을 사용하였고, 배양과 분리를 위해서는 제조사의 사용지침서에 따라 실험하였다.

Error-prone PCR

Normal PCR 조건에서 MgCl₂의 농도와 반응 cycle의 변화를 통해 error를 유발하는 실험을 수행하였다. 1.5 ~ 4 mM로 넣어주는 normal PCR조건과 달리 7 mM MgCl₂를 넣어 주었고 35 cycle을 45 cycle로 늘려주었다. 7 mM MgCl₂의 조건에서 염기서열이 두, 세 개 바뀌는 정도의 error rate를 보였다.

Staggered extension process (StEP)

Error prone PCR에 의해 gene당 2~3개의 base가 변환된 clone을 template로 하였다. Staggered extension process의 반응 조건은 DDW, 10x buffer, 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 10 pmole Primer F/R, 0.15 pmole template를 넣어서 반응 부피를 총 50 uL로 만들었다. Forward primer는 *Bam*HI 으로 reverse는 *Pst*I으로 제한효소 부분을 넣어 자체 제작한 것을 이용 하였다. 94°C에서 5분간 반응 후 95 cycle로 94°C 30초, 50°C 20초씩 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 처리하여 반응을 종료하였다.

Primary screening

Error prone PCR을 진행한 후 activity staining에 의해서 2000여종의 mutation이 예상되는 균주를 얻었다. 이 균주들을 멸균된 이쑤시개를 이용하여 96well plate에 옮겨서 LB(Amp⁺) 200 uL을 넣고 37°C, 24시간 동안 정지 배양하였다. 배양이 끝난 후 충분히 자랐음을 확인하고 즉시 온도를 50°C로 올려서 2시간 동안 방치 하여 activity staining에 의한 색변화를 보고 1차 screening을 하였다.

Secondary screening

Staggered extension process를 한 후 고온에서 wild type보다 안정성이 향상된 균주를 200여개정도 얻었으며 error prone PCR만으로 진행하여 나온 결과보다 훨씬 다양한 균

주들을 선별할 수 있었다. 또한 primary screening 역시 동일 O.D에서 반응 한 후, activity staining을 하였기 때문에 재현성도 높게 나왔다. 선별된 200여개중 일부만 선별하여 protein을 affinity chromatography에 의해서 정제하고 3 μ g의 정제된 효소를 사용하여 열 안정성을 확인하였다. 고온에서 안정함을 보이는 효소들을 재 선별하여 다양한 온도와 반응 시간에 따른 활성을 분석하였고, 최종 선별된 변이 효소는 반응액에 15% ethanol을 첨가하여 활성변화를 테스트하였다.

결과 및 고찰

최적 온도 및 열 안정성

정제한 효소를 수집하여 효소의 최적반응온도와 열 안정성에 대한 실험결과 최적 반응온도는 35 $^{\circ}$ C이었다. 열 안정성은 30, 35 $^{\circ}$ C에서는 대조군에 비하여 90% 이상의 residual activity를 나타내었지만, 50 $^{\circ}$ C에서는 50% 수준으로 급격히 감소하였으며, 55 $^{\circ}$ C 이상에서는 효소의 활성을 모두 잃었다(Figure 1). Wild type보다 최적온도는 동일하였으나 열에 대한 안정성에서는 wild type은 45 $^{\circ}$ C에서 활성이 급속히 잃고 50 $^{\circ}$ C에서는 활성이 없는 것과 비교하여 향상된 열안정성을 보였다. 단, 다른 선별 효소로서 8-37, 9-26, 10-11도 최적온도는 동일하였으나 열 안정성은 wild type보다 높게 나왔다.

유기용매의 영향

여러 가지 유기용매 중 극성용매인 acetone, ethanol, methanol, butanol, propanol에 기질이 용해되는 반면 benzene, toluene, cyclohexane과 같은 비극성 용매에는 기질이 용해되지 않았다. 기질을 용해시킨 유기용매도 완충용액에 첨가하였을 때 기질의 용해도가 감소하면서 우유 빛의 콜로이드를 형성하였다. Acetone을 사용하였을 때 대조군에 비하여 99%의 활성을 나타냈고 wild type에서 methanol이 99%활성을 나타낸 것과는 달랐다. 실험에 사용된 다른 유기용매에서는 효소활성이 저해되었다. 유기용매의 종류에 따른 효소의 광학활성은 변화를 나타내지 않았고, ee_p value는 90% 이상을 유지하였다(Figure 2).

기질 특이성

Esterase 들은 carboxylic acid 계열의 ester화합물에 대하여 폭 넓은 기질 특이성을 가지는 것으로 알려져 있다(4). 본 실험에서는 *p*-nitrophenol 에 결합된 acyl chain의 길이에 따른 반응성에 대해 조사하였다. *p*-nitrophenyl acetate에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 *p*-nitrophenyl butyrate에서는 활성이 20% 감소하였고, *p*-nitrophenyl caprylate에서는 매우 낮은 활성을 보였다(Figure 3). 일반적으로 lipase는 acyl chain의 길이가 C8~C16일 때 가장 높은 활성을 가지며 esterase는 C2또는 C4에서 가장 활성이 높고 C8에서는 활성이

20%이하로 줄어드는 것으로 보고되었다(5). Ketoprofen ethyl ester에 대한 specific activity는 85 mM/mg-protein/min이었고, Km값은 0.2 mM을 보였으며 Vmax는 90 mM/mg-protein/min 이었다.

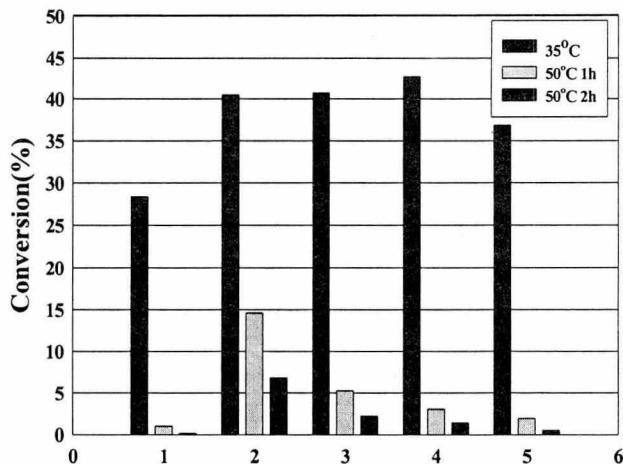


Figure 1. Enantioselective hydrolysis of the mutants in various temperature range and reaction time. (1: wild type, 2: 6-52, 3: 8-37, 4: 9-26, 5: 10-11)

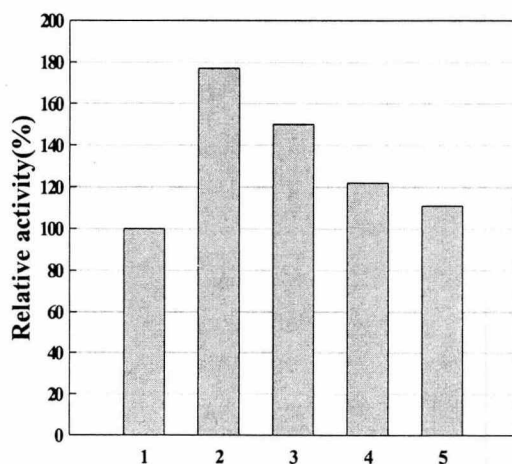


Figure 2. Enantioselective hydrolysis of the mutants in 15% Ethanol. (1: wild type, 2: 6-52, 3: 8-37, 4: 9-26, 5: 10-11)

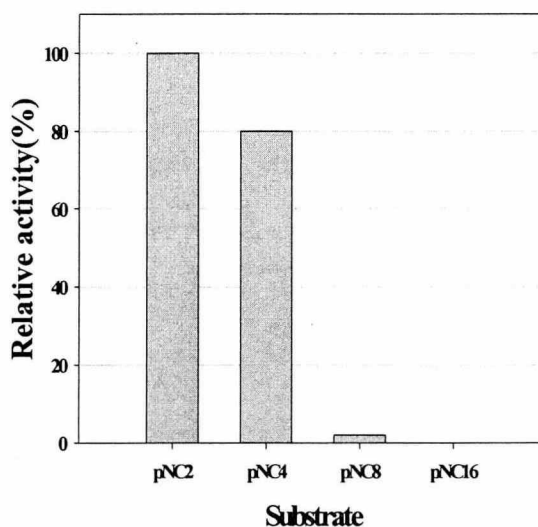


Figure 3. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl derivatives using the mutant 6-52.

참고문헌

1. Patel, R. N. (2000), "Stereoselective Biocatalysis", *Marcel Dekker . Inc.*
2. Margolin, A. L. (1993), "Enzymes in the synthesis of chiral drugs", *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 266-280.
3. G. S. Choi, J. Y. Kim, J. H. Kim, Y. W. Ryu, G. J. Kim (2003)," Construction and characterization of a recombinant esterase with high activity and enantioselectivity to (*S*)-ketoprofen ethyl ester", *Protein Expr. Purif.* **29**, 85-93.
4. G. A. Chasse, A. M. Rodrigues, M. L. Mak, E. Deretey, A. Perczel, C. P. Sosa, R. D. Enriz, I. G. C Csizmadia (2001), "Peptide and protein folding", *J. Molecular structure* **537**, 319-361.
5. A. Man, F. Liu, N. A. Somers et al. (2001), "Mapping the substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening: lipases from *Bacillus thermocatenulatus* and *Ophiostoma piliferum*, esterases from *Pseudomonas fluorescens* and *Streptomyces diastatochromogenes*", *Tetrahedron: Asymmetry* **12**, 545-556.