

재조합 alcohol dehydrogenase의 발현 및 기능분석

공광훈 · 심은정 · 박희중 · 김은호 · 조성희 · 박성우* · 김영만**

중앙대학교 자연과학대학 화학과

*국립과학수사연구소 법과학부

**한국과학기술연구원 특성분석센터

(1999. 4. 29. 접수)

The Expression and Functional Analysis of Recombinant Alcohol Dehydrogenase

Kwang-Hoon Kong, Eun-Jung Shim, Hee-Joong Park, Eun-Ho Kim, Sung-Hye Cho,
Sung-Woo Park* and Young-Mann Kim**

Department of Chemistry, Chung-ang University, Seoul, 156-756, Korea

*Forensic Science Department, National Institute of Scientific Investigation, Seoul, 158-097 Korea

**Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science & Technology, Seoul, 136-791 Korea

(Received April 29, 1999)

요 약: *Bacillus stearothermophilus*의 염색체 DNA로부터 polymerase chain reaction 법을 이용하여 ADH의 구조유전자를 증폭시킨 후, 발현 벡터 pGEX-KG에 삽입시켜 glutathion S-transferase와 융합 단백질로 대장균에서 대량 발현시켰다. 재조합 ADH는 37°C에서 1 mM의 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside로 단백질의 발현을 유도시켰으며, 발현된 단백질은 glutathione affinity 컬럼을 이용하여 정제하였다. 재조합 ADH는 에탄올에 높은 기질특이성을 나타내었으며 최적 pH와 온도는 각각 pH 9.0과 70°C이었다. 또한 이 재조합 ADH는 본래의 효소보다 열에 안정하였다. 이 효소는 알코올 측정을 위한 효소학적 방법과 알코올의 공업적 생산에 이용될 수 있다.

Abstract: The alcohol dehydrogenase (ADH) gene from *Bacillus stearothermophilus* was amplified by the polymerase chain reaction. The amplified DNA was inserted into the expression vector pGEX-KG, and expressed it as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST) in *E. coli*. The recombinant ADH was produced by induction with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside at 37°C and purified by glutathione affinity chromatography. The recombinant ADH exhibited high substrate specificity for ethanol. The activity of the recombinant ADH proceeded optimally at pH 9.0 and 70°C. The recombinant ADH was highly stable against high temperature. This thermostable alcohol dehydrogenase can be used for the enzymatic determination of alcohol and for the industrial production of alcohol.

Key words: alcohol dehydrogenase, *Bacillus stearothermophilus*, expression in *E. coli*

1. 서 론

Alcohol dehydrogenase (ADH, alcohol : NAD oxidoreductase, EC 1.1.1.1)는 생체내에서 알코올 대사계에 중요한 효소이다. 이 효소는 조효소로 NAD⁺를 이용하여 알코올을 산화시키며 대부분은 활성부위에 구리 이온을 함유하고 있는 metalloprotein이다.^{1,2}

ADH는 박테리아로부터 사람에게 이르기까지 거의 모든 생물 중에 분포되어 있으며, 기질의 특성에 따라 일차 알코올을 산화하는 primary-ADH (p-ADH)와 이차 알코올을 산화하는 secondary-ADH (s-ADH)로 나뉜다. 이 둘은 구조적으로는 매우 유사함에도 불구하고 활성부위의 작은 차이로 인해 서로 다른 기질 특이성을 보인다.

*Bacillus stearothermophilus*는 최적성장 온도가 55°C 인 호열성 균주로서 세포질 단백질의 1~2% 정도로 ADH를 생산하고 있으며, 생산된 ADH는 열에 안정할 뿐만 아니라 보통의 변성 시약에도 안정하다고 보고되고 있다.³ 또한 호열성 균주에서 분리한 ADH는 대부분 s-ADH에 속하지만, *Bacillus stearothermophilus*의 ADH는 일차 알코올에 높은 선택성을 보이는 p-ADH에 속한다.⁴

안정성이 우수한 ADH는 음주 운전의 규제, 의료분야, 공업공정 및 식품제조 공정 등에서 요구되는 알코올 측정을 위한 바이오센서와 chiral 알코올을 비롯한 각종 알코올류의 생공업적 생산 등에 이용되고 있다.^{5,7} 본 연구에서는 안정한 효소를 대량으로 생산하기 위해, *Bacillus stearothermophilus* NCA1503의 유전체 DNA를 주형으로 polymerase chain reaction법을 이용하여 ADH 구조 유전자를 증폭한 다음 이를 GST와 융합 단백질로 발현하였다. 또한 발현된 재조합 효소의 특성을 상세히 조사하여 다른 종의 효소와 비교·분석하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 세포배양과 염색체 DNA의 분리

한국 유전자은행으로부터 분양 받은 *Bacillus stearothermophilus* NCA 1053 (ATCC 29609)을 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride ; pH 7)에서 12-14시간 동안 55°C로 배양하였다. 배양한 균은 10,000×g로 10분 동안 원심분리하여 집균하였다. ADH 유전자 증폭을 위하여 배양한 *Bacillus stearothermophilus*를 집균한 후, 끓는 물에 5분간 처리하여 crude 상태의 유전체 DNA를 얻었다.

2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

*Bacillus stearothermophilus*의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 합성한 primer (primer N: 5'-GCTGCAG-AATTCTCATGAAGGCTGCTGTTGTGGAACAATTT-3', primer C: 5'-GCGCGCAAGCTTATTAATCTATTTT-AACACGACGCGGCC-3')를 DNA thermal cycler (Bio-Rad, USA, Gene cyler)를 이용하여, ADH 유전자를 증폭하였다. PCR의 반응 혼합물은 주형 DNA 2 μmol, dNTP mixture (Takara Shuzo Co, Japan) 2.5 mM을 8 μL, primer N과 C 각 5 μmol, Taq polymerase (Takara Shuzo Co, Japan) 1 μL, 10× Reaction Buffer

(100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂) 10 μL, 증류수를 가하여 최종 반응량 100 μL로 하여, 반응 조건은 94°C-1분, 55°C-2분, 72°C-3분을 1 cycle로 하여 35 cycles까지 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하고 분리하였다. Gel에서 분리한 유전자는 ULTRAFREE[®]-MC (Millipore)로 정제하였다.

2.3. 발현벡터의 작성과 재조합 효소의 발현

정제된 ADH 유전자와 발현벡터 pGEX-KG[®]를 제한효소 *EcoR* I (Takara Shuzo Co, Japan)과 *Hind* III (Takara Shuzo Co, Japan)로 37°C에서 1시간 정도 반응시켜 절단한 다음, ligase (Takara Shuzo Co, Japan)를 이용하여 재조합 ADH plasmid를 작성하였다. 그 결과 생성된 pKG-ADH를 대장균 BL21에 형질 전환시켰다. pKG-ADH로 형질전환시킨 대장균을 ampicillin (Sigma Co, USA) 50 μg/mL이 포함된 LB 배지에서 37°C로 약 2-3시간 정도 배양하였다. OD₆₀₀이 0.6이 되었을 때 발현유도체인 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (Promega Co, USA)를 투여하여 8시간 더 배양한 후, 10,000×g로 10분간 원심분리하여 집균하였다.

2.4. 재조합 효소의 정제

pKG-ADH로 형질전환시킨 대장균을 대량배양하여 얻은 균체를 1% Triton, 0.1% β-mercaptoethanol, 0.2 mM PMSE, 1 mM ZnCl₂를 포함하는 potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 두세 번 세척 후, 초음파파쇄기 (Sonic & Materials INC.)를 이용하여 균체를 파괴한 다음, 20,000×g로 10분간 원심분리하였다. 이 상층액을 60°C에서 10분간 처리한 후 다시 20,000×g로 10분간 원심분리하였다. 여기서 나온 상층액을 1 mM ZnCl₂를 포함하는 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 8시간씩 3번 투석을 하였다. 투석한 용액을 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 평형시킨 glutathione affinity column (Sigma Co, USA)에 흡착시켰다. 컬럼내의 불필요한 단백질을 제거하기 위해 200 mM KCl을 포함하고 있는 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 충분히 세척한 다음, 10 mM glutathione을 포함하고 있는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용출시켰다. 용출된 분획중 ADH 활성과 GST 활성을 갖는 분획만을 모아

서 1 mM ZnCl₂를 포함하는 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 투석하였다. 이렇게 정제된 효소들의 순도를 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

2.5. 효소의 활성도 측정과 단백질 정량

ADH의 활성도는 Sakoda와 Imanaka의 방법³을 사용하여, 60°C에서 340 nm의 흡광도를 측정하였다. 표준 활성반응혼합물은 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 1 mM NAD⁺, 100 mM 에탄올을 혼합하여 1 mL가 되도록 하였다. NADH의 molar absorbance coefficient는 6,220 M⁻¹·cm⁻¹이며, ADH 활성의 1 unit은 표준 활성 반응 조건에서 NADH 1 mol의 발생을 촉매하는 효소의 양으로 정의하였다.^{9,10}

단백질 농도는 Bradford 방법¹¹에 의해 측정하였으며, 정량 시약은 Bio-Rad 제품을 사용하였다. γ -Globulin을 표준단백질로 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

2.6. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

12.5% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 Laemmli의 방법¹²에 따라 전기영동하였으며, 영동이 끝난 겔은 coomassie brilliant blue R-250 (Sigma Co, USA)으로 염색하였다. 이 때 분자량 표준 단백질로 phosphorylase B (92.5 kDa), bovin serum albumine (66.2 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa)을 포함하고 있는 SDS molecular weight standard markers (Bio-Rad, USA)를 사용하였다.

2.7. 효소의 속도론적 연구

ADH 활성에 대한 기질농도의 효과는 55°C에서 결정되었다. 기질 에탄올의 농도는 10~100 mM의 범위에서 변화시켰으며, 표준 활성 측정 조건에서 여러 농도의 에탄올 20 μ L를 반응시켰다. 효소의 Michaelis-Menten constant (K_m)와 최대 속도 (V_{max})는 Lineweaver Burk plot에 의해 결정되었다. 효소활성에 대한 pH의 효과는 다음의 완충용액들 (20 mM)을 사용하여 결정하였다: sodium acetate buffer, pH 4.0-6.0; sodium phosphate buffer and potassium phosphate buffer, pH 6.0-8.0; Tris-HCl buffer, pH 8.0-10.0; glycine-NaOH buffer, pH 8.0-10.0. 각각의 pH에서 표준 활성

측정 조건으로 활성을 측정하였다. 효소의 최적온도는 표준 활성 측정 조건에서 온도를 25°C에서 85°C까지 변화시키면서 활성을 측정하였다.

2.8. 안정성

효소의 열안정성은 효소를 2 mM β -mercaptoethanol을 포함하고 있는 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)에서 각 시간별로 50°C, 60°C, 70°C에서 방치시킨 다음, 얼음에서 온도를 낮춘 후 잔존활성을 측정하였다. 또한 25°C에서 85°C까지의 온도에서 30분동안 방치시킨 후, 얼음에서 온도를 낮춘 후 잔존활성을 측정하였다. 장기간 보관에 따른 안정성 실험에서는 20% glycerol과 보호소인 1 mM NAD⁺가 포함된 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Polymerase chain reaction (PCR)과 발현벡터의 작성

ADH 유전자를 PCR로 증폭시켜 1.0% agarose gel 전기영동에 의해 1,041 bp의 PCR 산물을 확인하였다. 형질전환시킨 pKG-ADH의 유전자 확인은 배양한 균주로부터 유전자를 적출하여 1.0% agarose gel 전기영동으로 확인한 결과, pGEX-KG의 유전자 크기는 각각 5,000 bp에서 확인되었고 삽입된 ADH 유전자는 1,041 bp에서 확인되었다.

3.2. 재조합 ADH의 대량발현 및 정제

재조합 ADH 대량발현의 유도과정에서 유도제인 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside를 1 mM 투여하였을 때 세포질 단백질의 30%정도로 목적단백질이 가장 많이 유도되었다. 또한 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside를 투여한 후, 3시간 정도 배양하였을 때가 목적 단백질의 발현양이 가장 적절하였다. 이 균체를 lysis buffer로 두 세 번 세척 후, 30 watts에서 15-20분동안 초음파 파쇄기로 세포막을 부수었다. 이 과정은 얼음위에서 행하였다. 발현벡터 pKG-ADH에 의해 대량발현된 GST-ADH 융합 단백질의 분자량은 SDS-PAGE에서 61 kDa으로 확인되었다 (Fig. 1의 lane 1). 대량발현된 재조합 효소는 glutathione affinity column을 이용하여 정제를 하였다. 융합 단백질로 정제된 효소는 SDS-

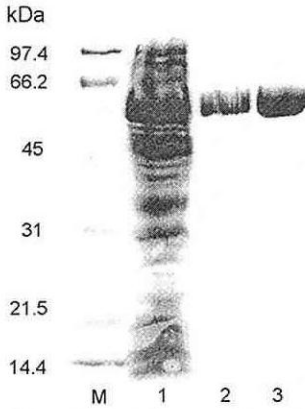


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the recombinant ADH produced by *E. coli*. Lane M, molecular weight standard markers (Bio-Rad); lane 1, total protein from *E. coli* cell lysates of pKG-ADH vector transformants; lane 2 and 3, the purified protein.

Table 1. Substrate specificity of the recombinant ADH

Substrate	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
Methanol	1.6	4
Ethanol	36.9	100
Isoamyl alcohol	7.3	20
n-Buthanol	10.4	28

PAGE상에서 단일밴드를 나타내었으며, 분자량은 61 kDa으로 확인되었다. (Fig. 1의 lane 2, 3).

3.4. 재조합 ADH의 효소학적 특성

여러 알코올에 대한 재조합 ADH의 기질 특이성을 Table 1에 나타내었다. 효소는 에탄올에 대해 비활성이 높게 나타났다. 반면에 메탄올, 부탄올, isoamyl alcohol에 대해서는 비활성이 20%이하로 낮게 나타났다. 이러한 재조합 ADH의 기질특이성은 식물과 다른 미생물 효소들과 유사하였다.^{13,14} Green 등은 탄소사슬이 긴 알코올에 대한 ADH의 낮은 활성은 기질 결합자리의 pocket이 작기 때문이라고 시사하였다.¹⁵ 한편 재조합 ADH의 에탄올에 대한 비활성은 36.9 U/mg으로 나타났다. Sakoda와 Imanaka 연구에서 *Bacillus stearothermophilus* NCA1503 유래 ADH의 에탄올에 대한 비활성은 같은 조건에서 약 30 U/mg이라고 보고되었다.³ 이러한 결과로부터 재조합 ADH는 본래 효소의 에탄올에 대한 비활성보다 약간 높다는 사실을 알 수 있었다.

ADH 활성에 대한 기질농도의 효과는 60°C에서 조사

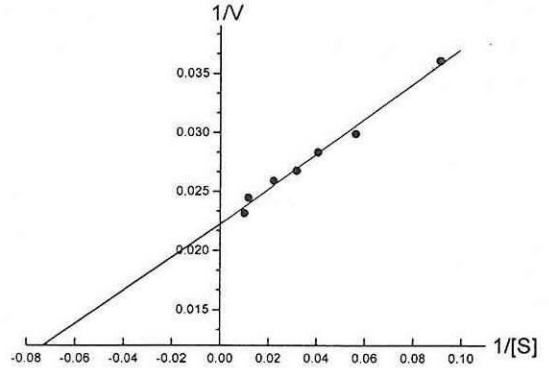


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of ethanol oxidation by the recombinant ADH. The concentration of ethanol was varied in the range of 10 ~ 100 mM. Michaelis-Menten constant (K_m) and the maximum velocity (V_{max}) of the recombinant ADH were determined Lineweaver-Burk plot.

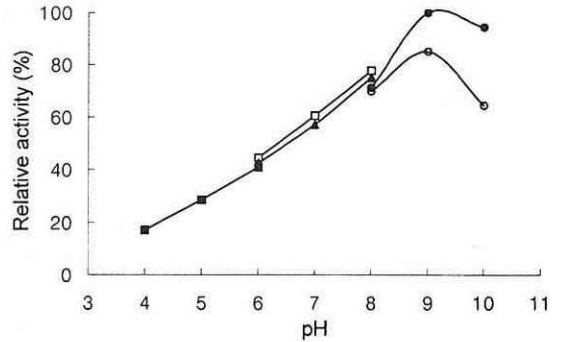


Fig. 3. Effect of pH on the recombinant ADH. Optimum pH of the enzyme was determined by using the following buffers (200 mM) at the indicated pH: sodium acetate buffer (■), from 4.0 to 6.0; sodium phosphate buffer (▲) and potassium phosphate buffer (□), from 6.0 to 8.0; Tris-HCl buffer (●), from 8.0 to 10.0; glycine-NaOH buffer (○), from 8.0 to 10.0. The maximum activity was considered as 100%.

되었다. 에탄올에 대한 재조합 ADH의 Michaelis-Menten constant와 최대 속도는 Lineweaver-Burk plot에 의해 결정되었다(Fig. 2). 에탄올에 대한 재조합 ADH의 K_m 값은 6.77 mM이며, V_{max} 값은 45.05 U/mg이었다. 에탄올에 대한 다른 종 ADH의 K_m 값은 7.0 mM, human isozyme mixture¹⁶, 5~10 mM, yellow yam tubers¹⁷, 21 mM, 효모¹⁸로 보고되고 있다. 재조합 ADH는 K_m 값이 비교적 낮은 편에 속하며, 이것은 기질과의 높은 결합력을 나타내는 것이다.

효소의 에탄올 산화반응에 대한 pH의 효과는 Fig. 3

에 나타내었다. 재조합 ADH의 최적 활성은 pH 9.0에서 나타났다. 이 효소의 최적 pH는 포유동물의 간 (pH 10~11)⁹; 박테리아와 효모 (pH 8.5~10.0)^{18,19}의 효소들과 유사하였다. 반면에 식물 ADH들은 낮은 최적 pH를 보인다고 보고되었다.^{14,17,20}

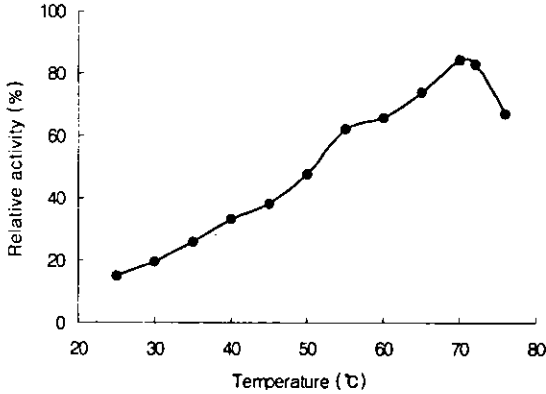


Fig. 4. Effect of temperature on the recombinant ADH.

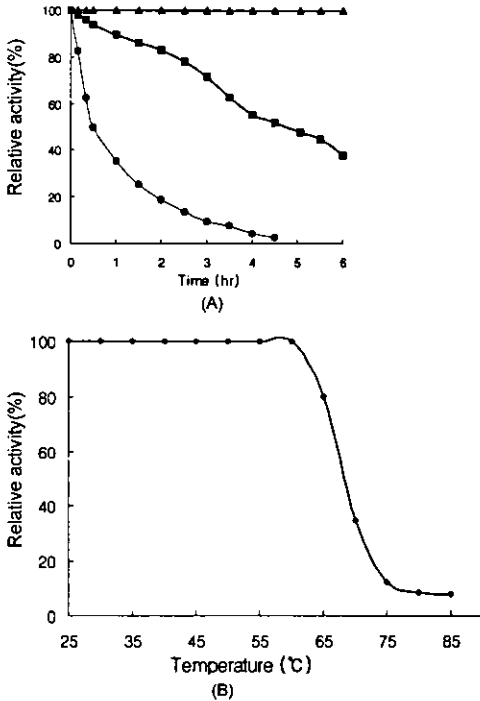


Fig. 5. Thermostability on the recombinant ADH. A) Remaining ADH activity after incubation at 50°C (▲), 60°C (■) and 70°C (●) for each period of time. B) Remaining ADH activity after incubation for 30 min at each temperature.

효소활성에 대한 온도의 효과를 알아 보기 위하여, 효소활성을 25°C에서 85°C까지 조사하였다. 재조합 ADH의 최적온도는 70°C이며, 80°C에서도 약 70%의 활성을 보인다 (Fig. 4). 이러한 결과로부터, 대부분의 박테리아나 효모의 효소들은 40°C보다 낮은 최적온도를 보이는 반면²¹⁻²³ 재조합 ADH는 다른 종의 효소보다 높은 최적 온도를 보인다는 것을 알 수 있었다.

3.5. 재조합 ADH의 열안정성

재조합 ADH의 열안정성 실험결과를 Fig. 5에 나타내었다. 열에 대한 효소의 안정성을 결정하기 위하여, 효소액을 50°C, 60°C, 70°C에서 6시간까지 가열하였으며, 얼음 위에서 1분간 냉각한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 (Fig. 5-[A]) 효소는 50°C에서는 6시간까지도 활성을 그대로 유지하였으며, 60°C에서도 5시간까

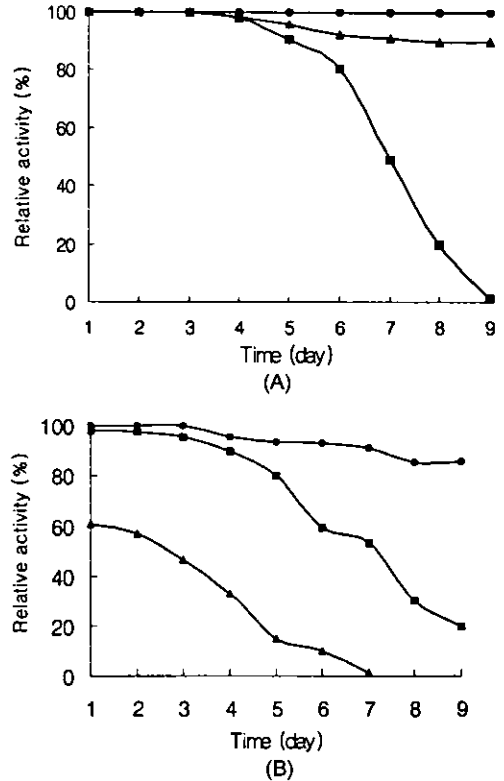


Fig. 6. Stability on the recombinant ADH. The activity was assayed after incubation for each period. The condition of incubation was varied in temperatures and in contents of buffer, respectively. The temperatures of incubation were A) 25°C and B) 4°C. The buffer contains 20% glycerol (▲), cofactor NAD⁺ (■), and none (●).

지 50%의 활성을 유지하였다. 70°C에서는 50%의 활성을 잃는데 30분이 소요되었다. 효소를 30분 동안 온도를 변화시키면서 가열한 후 잔존활성을 측정할 실험결과는 Fig. 5-[B]에 나타내었다. 그 결과 효소는 60°C에서 30분 가열하여도 안정함을 보였다. 65°C이상에서는 온도가 증가함에 따라 효소활성은 급격히 감소하였으나, 85°C에서조차도 완전히 활성을 잃지 않았다. 이상의 결과로부터, 재조합 ADH는 열에 매우 안정하다는 사실을 알 수 있었다.

또한 효소를 장기간에 걸쳐서 보관하면서 잔존 활성을 측정할 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 25°C와 4°C에서 9일간 보관하면서 활성을 측정할 결과, 25°C에서 효소만을 그대로 보관한 경우, 효소 활성을 잃지 않았으며, glycerol 20%를 함께 첨가한 경우에도 안정하였다. 그러나, 조효소인 NAD⁺와 함께 보관한 경우에는 4일까지 안정하였으나, 다른 경우에 비하여 안정성이 다소 떨어졌다. 한편 4°C에서 같은 조건으로 실험한 결과는 25°C에 비하여 안정성이 다소 떨어졌으며, 이 경우에도 효소만을 보관한 경우가 가장 안정하였다.

4. 결 론

이상의 결과로부터 본 연구에서는 *Bacillus stearothermophilus*로부터 polymerase chain reaction 법을 이용하여 ADH의 구조유전자를 증폭시킨 후, 발현 벡터 pGEX-KG에 삽입시켜 glutathione S-transferase와 융합 단백질로 대장균에서 효과적으로 발현시켰으며, GSH affinity chromatography를 이용하여 한단계의 간단한 정제법을 확립하였다. 정제된 재조합 ADH는 본래의 효소와 유사한 생화학적 특성을 나타내었으나, 이 재조합 ADH는 본래의 효소보다 안정하였다. 이 안정한 ADH는 알코올 측정을 위한 효소학적 방법과 알코올의 공업적 생산에 이용될 것이다.

감사의 글

본 논문은 1998년도 과기부 연구비의 지원에 의하여 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. J. Jeffery, L. Cummins, M. Carlquist and H. Jornvall, *Eur. J. Biochem.*, **120**, 229-234 (1981).
2. A. D. Neale, R. K. Copes, J. M. Kelley and R. E. H. Wettenhall, *Eur. J. Biochem.*, **154**, 119-124 (1986).
3. H. Sakoda and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, **174**, 1397-1402 (1992).
4. A. A. Ismaiel, C. X. Zhu, G. D. Colby and J. S. Chen, *J. Bacteriol.*, **175**, 5097-5105 (1993).
5. J. Zhao and R. P. Buck, *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 681-687 (1991).
6. M. Gotoh and I. Karube, *Anal. Lett.*, **27**, 273-284 (1994).
7. S. Miyamoto, T. Murakami, A. Saito and J. Kimura, *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 563-567 (1991).
8. K. L. Guan and J. E. Dixon, *Anal. Biochem.*, **192**, 262-267 (1991).
9. R. Takenoshita and T. Togi, *Shin Seigakaku jikken*, (Tokyo) **1**, 269-285 (1989).
10. L. Lumeng, W. F. Bosron and T. K. Li, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 1547-1551 (1979).
11. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
12. U. K. Laemmli, *Nature* (London) **227**, 680-685 (1970).
13. R. Cannio, M. Rossi and S. Bartolucci, *Eur. J. Biochem.*, **222**, 345-352 (1994).
14. S. M. Li, Z. X. Wang and L. Heide, *Plant Cell Reports*, **15**, 786-790 (1996).
15. D. W. Green, H. W. Sun and B. V. Plapp, *J. Biol. Chem.*, **268**, 7792-7798 (1993).
16. R. Pietruszko, K. Voigtlander and D. Lester, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1296-1297 (1978).
17. U. Oluoha, *Plant Science*, **107**, 1-7 (1995).
18. C. M. Hansgens, J. Vonck, J. Van Beeumen, E. F. Van Bruggen and T. A. Hansen, *J. Bacteriol.*, **175**, 2859-2863 (1993).
19. K. N. Truscott, P. B. Hoj and R. K. Scopes, *Eur. J. Biochem.*, **222**, 277-284 (1994).
20. S. M. Li, Z. X. Wang and L. Heide, *Plant Cell Reports*, **15**, 786-790 (1996).
21. A. Steinbuechel and H. G. Schlegel, *Eur. J. Biochem.*, **141**, 555-564 (1984).
22. K. M. Madyastha and T. L. Gururaja, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 540-546 (1995).
23. I. Bruchhaus and E. Tannich, *Biochem. J.*, **303**, 743-748 (1994).