

*E. coli*에서 GroEL/ES chaperone 공발현에 의한 활성형 cyclodextrin glucanotransferase의 생산 증대

권미정¹ · 박소림¹ · 김병우¹ · 김성구² · 남수원*

*동의대학교 생명공학과, ¹동의대학교 미생물학과,
²부경대학교 생명공학과

Improvement of production of active cyclodextrin glucanotransferase by coexpression GroEL/ES chaperone in *E. coli*

Mi-Jung Kwon¹, So-Lim Park¹, Byung-Woo Kim¹, Sung-Koo Kim² and Soo-Wan Nam*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

¹Dept. of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

²Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Abstract

Molecular chaperones prevent the misfolding of newly synthesized polypeptides in the cell. The coexpression of molecular chaperones could be expected to improve the production of soluble and active recombinant proteins. In this study, the effect of coexpression of *E. coli* GroEL/ES chaperone on the active production of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in *E. coli* was investigated. Two plasmids, pTCGT1 and pGro7 in which the *cgt* and the *groEL/ES* genes are under the control of T7 promoter and *araB* promoter, respectively, were co-transformed into *E. coli*. With a series of cultures of recombinant *E. coli* cells, the optimal concentrations of IPTG and L-arabinose were found be 1 mM and 0.3 mg/ml, respectively. When IPTG and L-arabinose were added at 0.8~1.0 OD₆₀₀ and 0.4~0.5 OD₆₀₀, active CGTase production was increased significantly. This coexpression condition resulted in 1.5-fold increased level of soluble CGTase (0.7~0.73 unit/ml), compared to the level of CGTase in the single expression (0.36~0.56 unit/ml). An SDS-PAGE analysis revealed that about 33.6% of CGTase in the total CGTase protein was found in the soluble fraction by coexpression of GroEL/ES chaperone.

Key words – Coexpression, cyclodextrin glucanotransferase, GroEL/ES chaperone, *Escherichia coli*

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 82-51-890-2276, Fax : 82-51-891-7740

E-mail : swnam@dongeui.ac.kr

서 론

재조합 단백질을 생산하는 숙주 세포계 중에서 대장균 (*Escherichia coli*)은 그 어느 발현계보다 중요하다 [1,11]. *E. coli*는 유전학적, 분자생물학적 지식이 가장 많이 알려져 있어 발현계로 널리 쓰이고 있지만, 아직도 *E. coli*에서 제대로 발현되지 않는 유전자들도 다수 존재한다. 그러나 *E. coli*에서 재조합 단백질 생산 시 가장 큰 문제점은 발현된 단백질의 빠른 분해, 응집 (aggregation) 또는 봉입체 (inclusion body)에 의한 생산성 저하이다 [4]. 따라서 활성형 재조합 단백질의 효율적인 생산을 위해 단백질 folding을 도와주는 chaperone 분자와의 공발현이 해결책으로 제시되고 있다. *E. coli*의 분자 chaperones으로 GroEL, GroES 및 DnaK, DnaJ, GrpE등이 알려져 있다. DnaK, DnaJ, GrpE chaperone 분자는 부분적인 folding을 매개하고 polypeptide aggregation을 보호하기 위해 초기 polypeptide 사슬과 상호 작용한다 [2,17]. GroEL/ES는 folding을 완성시키고 부분적으로 folding된 protein과 상호작용한다 [18,19]. 이와 같은 chaperone 분자와의 공발현은 *E. coli*에서 활성형 protein의 생산성을 증가시킨 몇몇의 예가 보고되었다 [8,9,12,13]. 그리고 (DnaK, DnaJ, GrpE), (GroEL, GroES) 두 teams은 *in vivo*에서는 단백질 folding이 별개로 작용하지만, 각각은 cooperative하게 작용한다. Folding 이외에도 chaperones은 단백질의 응집, 안정성, heat response의 조절, 단백질 분비 등에도 영향을 미친다[5,12,13].

이 folding 기전은 최근까지도 커다란 의문점으로 남아 있으나, 최근에 일본의 鳥取(Tottori) 大學의 Kawata [6]등을 중심으로 생체내에서 단백질의 folding 반응은 어떤 단백질에 의해서 도움을 받는 것으로 밝혀 냈으며, 이 단백질은 folding 도중에 polypeptide 구조에 특이적으로 결합하여 정확한 folding 반응을 촉진시키는 절대적인 기능을 가지고 있는 것으로 보고되었다 [9].

대장균 유래의 GroE는 subunit 분자량 약 60,000 Da의 GroEL과 subunit 분자량 약 10,000 Da의 GroES의 2종류의 단백질로 이루어져 있고, GroEL의 2 ring 중의 윗쪽에 ATP가 결합한 구조만이 GroES와 부착하여 GroEL과 GroES는 complex를 형성한다. 이 때 단백질 folding은 GroEL의 원통 구조에서 GroES를 덮개로 하여 일어나고, GroEL에 부

착되어 있던 ATP의 가수분해의 의해 GroEL과 GroES는 분리되고 단백질은 folding 되어 활성형으로 되돌아간다 [16].

본 실험에서 사용할 target 단백질은 *Bacillus macerans*의 cyclodextrin glucanotrasferase (CGTase)로 약 70 kDa의 분자량으로 *E. coli*에서 비가용성 봉입체 형태로 발현됨을 확인하여 [3,15] GroEL/ES chaperone과 공발현을 통해 수용성 및 활성형의 CGTase을 발현·생산하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 plasmids

재조합 단백질의 발현을 위해 *E. coli* BL21(DE3)[F, *ompT*, *rB*, *mb*, (DE3)]를 주요 숙주세포로 사용하였다. pET-21 vector에 *B. macerans* 유래 *cgt*가 subcloning 되어 있는 pTCGT1 plasmid 내 *cgt* 발현은 T7 promoter에 의해 조절되고 ampicillin 내성 유전자를 가지고 있다 [15]. 그리고 pGro7 plasmid 내 groEL/ES 발현은 *araB* promoter에 의해 조절되고, pACYC184가 기본 plasmid로 chloramphenicol 내성 유전자를 함유하고 있다 [13].

Co-transformation

pGro7과 pTCGT1을 *E. coli* BL21(DE3)에 co-transformation 시켰다. 형질전환된 *E. coli* 세포는 20 µg/ml ampicillin (pTCGT1의 선별)과 20 µg/ml chloramphenicol (pGro7의 선별)이 첨가된 LB agar 배지에서 선별하였다. pTCGT1만 함유한 균주는 20 µg/ml ampicillin이 첨가된 LB agar배지에서 선별하였다.

배지와 배양 조건

E. coli 배양에는 LB medium (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)을 사용하였다. *cgt* 단독 발현을 위한 배지에는 20 µg/ml ampicillin이 함유된 LB 배지에서 배양하였고, groEL/ES와 *cgt* 공발현 배지는 20 µg/ml ampicillin과 20 µg/ml chloramphenicol이 함유된 LB 배지에서 배양하였다. *cgt* 발현을 위해 0.8~1.0 OD₆₀₀ 일 때 1 mM IPTG를 첨가하였고, groEL/ES 발현을 위해 0.4~0.5 OD₆₀₀ 일 때 0.3 mg L-arabinose/ml를 첨가하였다. L-arabinose의 최적농도를 결정하기 위해 10 ml LB tube에서 배양

하였다. 그리고 공발현 시 IPTG의 첨가 시기를 결정하기 위해 working volume 80 ml의 baffled flask에서 배양하였다.

Colony 활성 염색

선별된 형질전환체의 전분 가수분해 활성의 검출을 위해 iodine 방법 [7]에 의해 전분이 함유된 CS 배지 (1% Soluble starch, 0.5% Bacto-peptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄)로 실험하였다. 즉, 숙주세포인 BL21(DE3)과 pTCGT1 단독 발현, pGro7과의 공발현 형질 전환체등 3종을 CS 배지 (1 mM IPTG와 1 mg L-arabinose/ml의 함유 배지)에 도달하여 37 °C에서 20 시간 배양하여 iodine 증기로 colony 활성 염색을 하였다.

SDS-PAGE 분석

생산된 CGTase의 응집 또는 가용화 정도를 알아보기 위해 세포 배양액 8 ml을 원심분리하여 침전물만 분리한 후 2 ml의 50 mM 인산완충액 (pH 6.0)에 현탁하여 1 분 동안 초음파 파쇄하였다. 그리고 2,500 rpm에서 10 분간 원심분리 하여 상등액을 가용성 분획 (soluble fraction), 침전물을 다시 1 ml의 50 mM 인산완충액 (pH 6.0)에 재현탁하여 비가용성 분획 (insoluble fraction)으로 분리하였다. 각각의 가용성 및 비가용성 분획을 8% SDS-PAGE로 분석하였다. CGTase와 GroEL/ES 단백질은 Coomassie brilliant blue 염색으로 확인하였고, gel은 Image Analyzer (Image Master VDS, Pharmacia Biotech., USA)로 scanning 분석하였다.

CGTase 활성 측정

CGTase의 활성은 Leujeune등 [9]에 의해 제안된 methyl orange 법으로 측정하였다. 이 방법은 낮은 온도 (16°C)와 낮은 pH에서 methyl orange와 CD 사이에 inclusion complex를 형성시킴으로써 CGTase의 활성을 유용하게 측정할 수 있는 방법이다. 반응은 1% 수용성 전분 용액 (50 mM 인산완충액, pH 6.0)과 0.03 mM methyl orange 용액 (50 mM 인산완충액, pH 6.0)을 50 mM 인산완충액 (pH 6.0)과 잘 섞고, 이 혼합액에 시료 용액을 50 µl 가하여 50 °C에서 5 분간 반응시켰다. 반응 후 75 µl의 6 N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16 °C에서 15 분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와 같은 조건에서 분당 1 µmol의 α-CD를 생성하는 효소량을 1 unit

로 정의하였다.

결과 및 고찰

Colony 활성 염색

숙주세포인 BL21(DE3)과 pTCGT1 단독 발현, pGro7과의 공발현 형질전환체를 CS 배지 (cgt와 groEL/ES 유도제를 첨가하지 않은 배지, 1 mM IPTG와 1 mg L-arabinose/ml의 함유 배지)에 도달하여 37 °C에서 20 시간 배양 후 iodine 증기에 의해 colony 활성 염색을 한 결과, 유도제 비첨가 배지에서는 전분 분해 활성이 전혀 나타나지 않은 반면, 유도제 첨가한 pTCGT1 단독 발현과 pGro7과의 공발현에서 큰 전분 분해 환을 형성하여 CGTase의 활성을 나타내었다 (Fig. 1A, 1B). 이 결과로 CGTase 단독발현과 GroEL/ES 공발현에서 모두 성공적으로 CGTase가 발현됨을 알 수 있었다. CGTase 단독발현인 경우 생산된 CGTase의 대부분은 비가용성 분획체로 생산됨은 이미 보고된 바 있다 [3,15].

L-arabinose 농도에 따른 CGTase의 활성과 GroEL/ES와의 공발현 효과

CGTase를 soluble한 형태의 발현을 증가시키기 위해 GroEL/ES와의 공발현을 행하였다. 먼저 GroEL/ES 발현에 있어서 L-arabinose의 최적 농도를 결정하였다. CGTase 발현을 위한 IPTG 최적 농도는 1 mM로 결정되었으며, 10 ml LB (20 µg/ml ampicillin과 20 µg/ml chloramphenicol 포함) tube에서 0.4~0.5 OD₆₀₀ 일 때 0~1 mg/ml 농도의 L-arabinose를, 0.8~1.0 OD₆₀₀ 일 때 1 mM의 IPTG를 첨가

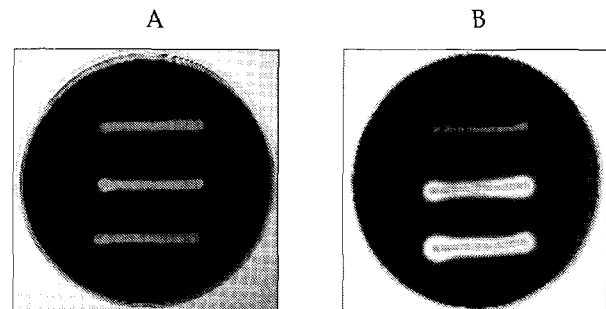


Fig. 1. Activity staining of host and recombinant *E. coli* cells without induction (A) and with induction (B). For the induction of *cgt* and *groEL/ES* genes, 1 mM IPTG and 1 mg/ml L-arabinose were added on the CS medium. a, BL21 host cell; b, BL21/pTCGT1; c, BL21/pTCGT1+pGro7.

하였다. IPTG 첨가 후 4 시간 동안 유도한 후 균체를 회수 하였다. 그 결과 균체증식은 L-arabinose 농도가 증가할수록 조금씩 증가하였고, 가용성 분획에서의 CGTase 활성은 0.3 mg L-arabinose/ml에서 가장 높은 0.66 unit/ml로 나타났다 (Fig. 2A). 그리고 CGTase와 GroEL/ES 단백질의 발현 양상을 알아보기 위해, 균체를 가용성과 비가용성 분획으로 나누어 SDS-PAGE를 행하였다. 그 결과 60 kDa의 GroEL은 대부분 가용성 분획에서 나타났고, CGTase band는 GroEL/ES의 공발현에 의해 가용성 분획에서 70 kDa의 뚜렷한 CGTase band를 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 이것은 과 생산된 GroEL/ES chaperone 단백질이 CGTase 봉입체를 가용화하며, 또한 unfolding 된 CGTase 단백질을 활성형의 3차 구조로 환원시키는 역할을 한 것으로 사료된다 [14].

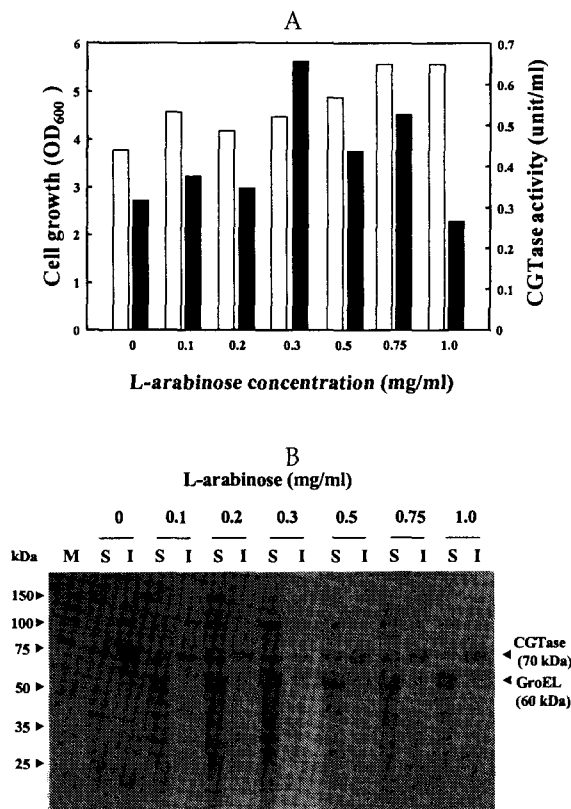


Fig. 2. Effect of L-arabinose concentration on the cell growth (□) and CGTase activity (■) in the recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pTCGT1+pGro7. The cell was grown 10 ml LB in which L-arabinose (0~1.0 mg/ml) was added at the early-exponential phase, and IPTG (1 mM) was added at the mid-exponential phase.

IPTG 첨가 시기에 따른 soluble CGTase의 생산 GroEL/ES chaperone의 최적 유도 시간을 결정하기 위해 working volume 80 ml baffled flask에 접종 후 배양 2 시간 쯤 0.3 mg L-arabinose/ml을 첨가하고, 이후 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 시간 쯤 각각 1 mM의 IPTG를 첨가하였다. 그 결과, L-arabinose 첨가 후 1.5 시간 유도시킨 후 1 mM IPTG를 첨가하는 것이 0.73 unit/ml로 가장 높게 나타났다 (Fig. 3). 그리고 CGTase 활성은 IPTG 첨가 후 2.5 시간 경과 후 (배양 6시간 쯤) 활성이 최고 수준에 달하고, 그 이후에는 큰 활성의 증가가 없거나 감소하였다. 이는 배양 4시간 동안 세포의 성장이 급속히 이루어지면서 6시간 이후로 산물의 생성도 빨라지게 되고, 과잉 생산된 단백질의 응집되는 속도도 빨라지게 되었기 때문이다. L-Arabinose를 첨가하고 1.5 시간 후 IPTG 첨가한 경우, 배양 12 시간 쯤 가용성 및 비가용성 분획을 전기영동하고 (Fig. 4) CGTase band (70 kDa)를 Image analyzer로 scanning 분석하였다. CGTase 단독 발현에서는 가용성 분획에서 CGTase band 비율이 18.8%로 나타났고, GroEL/ES 공발현에서는 27.9%로 약 32%가 증가하였다 (Table 1). 그리고 단독 발현에서는 CGTase 총 단백질 중 20.8%가 가용성 분획으로 전환되

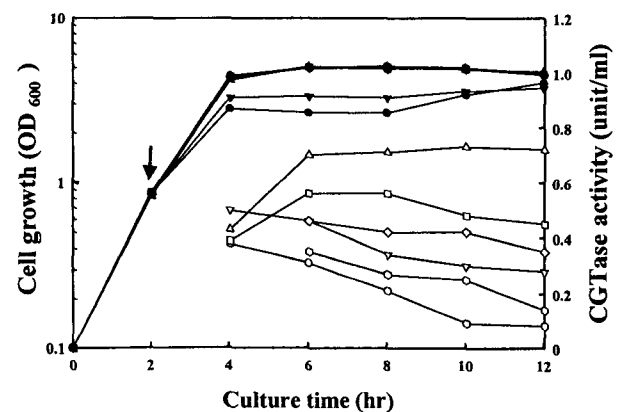


Fig. 3. Effect of L-arabinose induction time on the cell growth and CGTase activity in the recombinant *E. coli* BL21(DE3)/pTCGT1+pGro7. Cells were grown on 80 ml LB medium, in which L-arabinose (0.3 mg/ml) was added at the early-exponential phase (2 h), and 1 mM IPTG at the various time (0~2.5 h after L-arabinose induction). Arrow indicates the addition time of L-arabinose. ○, 0 h; ▽, 0.5 h; □, 1.0 h; △, 1.5 h; ◇, 2.0 h; ◊, 2.5 h. Closed symbols, Cell growth. Open symbols, CGTase activity.

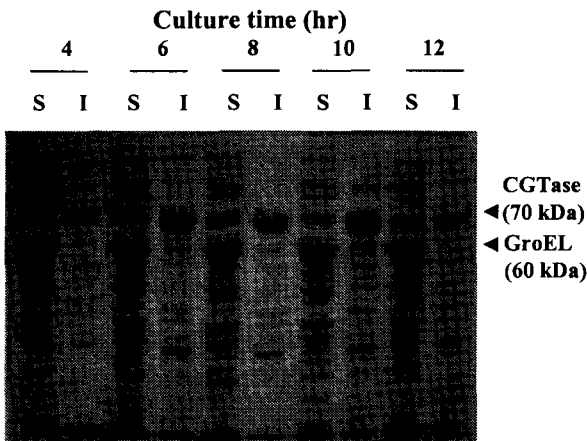


Fig. 4. SDS-PAGE analyses of CGTase expression and GroEL/ES coexpression system.

Cells were grown on 80 ml LB medium in which L-arabinose (0.3 mg/ml) was added at the early-exponential phase (2 h), and 1 mM IPTG at 1.5 h after L-arabinose induction, were harvested, disrupted, and separated into soluble (S) and insoluble (I) fractions

Table 1. Comparison of cell growth and soluble CGTase activity between CGTase expression and chaperone-coexpression systems

Plasmid (Induced protein)	Cell growth (OD ₆₀₀)	CGTase activity (unit/ml)	Percentage of CGTase protein (%)	
			soluble	insoluble
pTCGT1 (CGTase)	4.85	0.56	18.8	71.4
pTCGT1+pGro7 (CGTase GroEL/ES)	4.71	0.72	27.9	58.6

였지만, 공발현에서 33.6%가 가용성 분획으로 전환되었다. 이 결과는 GroEL/ES chaperone과의 공발현으로 비가용성 CGTase의 많은 양이 가용성 CGTase 단백질로 전환되었음을 나타낸다.

이상의 결과로부터 CGTase와 GroEL/ES의 공발현계는 CGTase의 용해도 향상 및 활성형 생산에 효과가 큰 있는 것으로 사료된다.

요 약

Chaperone 분자는 세포 내에서 새로 합성된 polypep-

tides의 misfolding을 보호하는 역할을 가진다. 이런 chaperone 분자와의 공발현은 활성형 재조합 단백질의 생산을 증가를 기대할 수 있다. 본 연구에서는 *E. coli*에서 *B. macerans* 유래 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)의 활성형 생산에 GroEL/ES chaperone과의 공발현의 효과에 대해 조사하였다. *cgt*와 *groEL/ES* 유전자를 발현하는 pTCGT1과 pGro7은 각각 T7 promoter와 *araB* promoter에 의해 조절되고 이들을 *E. coli* cell에 co-transformation 시켰다. 재조합 *E. coli*에서 IPTG와 L-arabinose의 최적 농도를 결정하기 위해 행한 결과 1 mM IPTG, 0.3 mg L-arabinose/ml 에서 가장 높은 CGTase 활성을 나타내었다. 그리고 tube에서는 L-arabinose와 IPTG를 각각 0.4~0.5 OD₆₀₀과 0.8~1.0 OD₆₀₀에서 첨가하였을 때 활성형 CGTase의 생산이 증가되었다. GroEL/ES 공발현 조건에서는 가용성 CGTase 활성이 0.7~0.73 unit/ml로 단독 발현의 0.36~0.56 unit/ml에 비해 약 1.5 배 정도 증가함을 알 수 있었다. SDS-PAGE 분석에서는 GroEL/ES 공발현 조건에서 총 CGTase의 33.6%정도가 가용성 형태로 생산됨을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 기초 연구 (No. 2000-2-20200-006-3)의 지원에 의하여 이루어졌습니다.

참 고 문 헌

- Georgiou, G. 1996. Expression of proteins in bacteria, pp. 101-127, In Protein Engineering, J. L. Cleland and C. S. Craik (eds.), principles and practice, Wiley Liss, New York.
- Gragerov, A., E. Nudler, N. Komissarova, G. A. Gaitanaris, M. E. Gottesman, and V. Nikiforov. 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10341-10344.
- Han, N. S. and B. Y. Tao. 1999. Enhancement of solubility of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase by thioredoxin fusion. *Food Sci. Biotechnol.* **8**, 276-279.
- Hannig, G. and S. C. Makrides 1998. Strategies for

- optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **16**, 54-60
5. Hartl, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
 6. Kawata, Y., K. Nosaka, K. Hongo, T. Mizobata and J. Nagai. 1994. Chaperonin GroE and ADP facilitate the folding of various proteins and protect against heat inactivation *FEBS Letter* **345**, 229-232
 7. Kim, C. S., N. S. Han, D. H. Kweon, and J. H. Seo. 1999. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 230-233
 8. Kondo, A., J. Kohda, Y. Endo, T. Shiromizu, Y. Kurokawa, K. Nishihara, H. Yanagi, T. Yura, and H. Fukuda. 2000. Improvement of productivity of active horseradish peroxidase in *Escherichia coli* by coexpression of Dsb proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **90**, 600-606.
 9. Lee, S. C. and P. O. Olins. 1992. Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 2849-2852.
 10. Lejeune, A., K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1989. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal. Biochem.* **181**, 6-11.
 11. Makrides, S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512-538.
 12. Nishihara, K., M. Kanemori, H. Yanagi, and T. Yura. 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884-889.
 13. Nishihara, K., M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi, and T. Yura. 1998. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699.
 14. Okazaki, A., K. Katsumata and K. Kuwajima. 1997. Hydrogen-exchange kinetics of reduced and alpha-Lactalbumin Bound to the Chaperonin GroEL. *J. Biochem.* **121**, 534-541
 15. Park, Y. C., C. S. Kim, N. S. Han, and J. H. Seo. 1995. Expression of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus macerans* in recombinant *Escherichia coli*. *Foods Biotechnol.* **4**, 290-295
 16. Sigler, P. B., Z. Xu, H. S. Rye, S. G. Burston, W. A. Fenton, and A. L. Horwich. 1998. Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 581-608
 17. Szabo, A., T. Langer, H. Schroder, J. Flanagan, B. Bukau, and F. U. Hartl. 1994. The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system-DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10345-10349.
 18. Weissman, J. S., C. M. Hohl, O. Kovalenko, Y. Kashi, S. Chen, K. Braig, H. R. Saibil, W. A. Fenton, and A. L. Horwich. 1995. Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell* **83**, 577-587.
 19. Weissman, J. S., H. S. Rye, W. A. Fenton, J. M. Beechem, and A. L. Horwich. 1996. Characterization of the active intermediate of a GroEL-GroES-mediated protein folding reaction. *Cell* **84**, 481-490.

(Received August 5, 2002; Accepted November, 2002)