

광학활성 Phenyl Oxirane 제조용 유전자 재조합 생촉매 개발

이수정 · 이은정 · 김초희 · 이지원 · 김희숙 · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과

Development of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing Epoxide Hydrolase for the Preparation of Chiral Phenyl Oxirane

Soo Jung Lee, Eun Jung Lee, Cho Hee Kim, Ji Won Lee, Hee Sook Kim and Eun Yeol Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering,
Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract

Epoxide hydrolase (EH) gene from *Aspergillus niger* #33 was cloned from cDNA library generated by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide sequence analysis revealed that the deduced amino acid sequence was almost similar to that of *A. niger* LCP521 previously reported. The cloned EH gene was transformed into *Saccharomyces cerevisiae* and expressed by addition of galactose. The recombinant *S. cerevisiae* showed hydrolytic activity toward racemic phenyl oxirane substrate based on chiral GC analysis, and can be used as a potential biocatalyst for the preparation of chiral phenyl oxirane.

Key words – *Aspergillus niger*, epoxide hydrolase, cloning, chiral phenyl oxirane

서 론

에폭사이드(epoxide)는 불안정한 삼각환구조와 산소원자의 전기음성도로 기인한 극성으로 인해 반응성이 우수하여 nucleophile, electrophile, acid·base, oxidizing·reducing agent 등과 다양한 반응을 시킬 수 있다[4]. 이러한 우수한 반응성과 더불어 광학적으로 순수한 광학활성 에폭사이드(chiral epoxide)는 고부가가치 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용될 수 있다.

광학활성 에폭사이드는 *Aspergillus niger*, *Rhodotorula*

glutinis, *Agrobacterium radiobacter*, *Corynebacterium* sp. 등 다양한 종류의 미생물들이 가지고 있는 epoxide hydrolase (EH)를 이용하여 라세믹 에폭사이드로부터 특정 이성질체 한가지만을 diol로 가수분해시키는 입체특이성 분할(entantioselective resolution) 반응을 통해 제조할 수 있다 [8,10]. EH는 cofactor를 요구하지 않고, 발현유도(induction) 과정을 거치지 않아도 효소가 구성적으로(constitutive) 발현되며, monooxygenase 등의 산화환원효소에 비해 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 응용성이 큰 생촉매로 평가 할 수 있다.

EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조기술 개발에 있어서, 지금까지의 연구들에서는 주로 EH 활성이 있는 전 세포(whole-cell) 자체를 생촉매로 사용하는 경우가 많았다.

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax: 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ks.ac.kr

이 경우, 전체 단백질 대비 EH 발현량이 매우 적어 생산성 향상에 제한이 있을 수 있다. 따라서, EH 유전자를 클로닝한 후 고효율로 발현시킨 재조합 생축매를 개발하는 경우, 광학활성 에폭사이드 제조 공정의 경제성 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 논문에서는 chiral phenyl oxirane 제조용 생축매를 개발하기 위하여, 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체특이성 가수분해능이 우수한 EH 활성을 가지고 있는 *A. niger* #33로부터 EH 유전자를 클로닝하고 *Saccharomyces cerevisiae*를 숙주세포로 사용하여 발현시킨 유전자재조합 생축매를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

배지 및 미생물 배양조건

A. niger #33는 액체배지(glucose 10 g/L, corn-steep liquor 20 g/L)에서 27°C, 250 rpm 조건에서 3일간 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 100 mM potassium phosphate buffer(pH 8.0)로 두 번 세척한 균체를 실험재료로 사용하였다.

Total RNA 분리 및 cDNA 합성

A. niger #33로부터 total RNA의 분리는 Chomczynski 과 Sacchi의 방법을 이용하였다[5]. 분리 정제한 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 Gibco사의 first strand cDNA synthesis kit를 사용하였다[2].

PCR을 이용한 *A. niger* #33 EH 유전자의 증폭 및 클로닝

A. niger #33의 cDNA library로부터 EH 유전자를 증폭하기 위하여 PCR을 사용하였다. PCR에 사용한 primer들은 Gene Bank 등에 보고된 EH의 mRNA sequence를 참조하여 제작하였다. 효모인 *S. cerevisiae*에 발현시키기 위한 primer로는 *KpnI*과 *NotI*의 restriction site가 들어있는 5AnEHF(*KpnI*): 5'-cgggtaccatgtccgctccgttcgccaagt-3'와 3AnEHR(*NotI*): 5'-gcggcgcctactctgccacacctgctcg- 3'를 사용하였다. PCR 산물을 먼저 pEZ-T vector(RNA사, Korea)에 삽입시킨 다음 pEZ-T/*AnEH* plasmid DNA로부터 *S. cerevisiae*용 vector인 pYES2 vector에 *A. niger* EH 유전자를 삽입하기 위하여 pEZ-T/*AnEH* plasmid DNA를 *KpnI*

및 *NotI*으로 가수분해하고 전기영동한 후 1200 bp DNA 조각을 gel로부터 추출하였다. 같은 효소로 가수분해한 pYES2 vector에 EH 유전자를 삽입시킨 다음 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 EH 유전자가 올바른 방향으로 cloning되었는지를 확인하였다. 확인된 plasmid들은 T7 및 SP6 등과 같은 universal primer들을 이용하여 유전자서열을 확인하고 단백질서열을 결정하였다.

*S. cerevisiae*에 재조합 EH의 발현 및 분석

Invitrogen사의 S.C. EasyComp™ Transformation Kit를 이용하여 만든 *S. cerevisiae* competent cell 50 µl에 1 µg recombinant DNA를 섞은 다음 30°C water bath에서 1시간 동안 water bath에서 반응을 통해 형질전환체를 얻었다. EH 유전자의 발현은 galactose 첨가를 통해 유도하였다. 즉, 5 ml YNBCAD 배지에 형질전환체를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 전배양을 행하고 전배양액을 YPD배지(1% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone)로 OD600=0.25가 되도록 희석한 후 6시간 정도 배양하였다. Galactose가 2% 되도록 첨가하고 30°C에서 48시간 및 60시간 배양하여 얻은 배양액을 원심분리하여 *S. cerevisiae* pellet을 얻어 EH 활성 분석을 위한 생축매로 사용하였다. 배양하는 동안 glucose 양은 DNS 또는 enzyme kit를 사용하여 측정하였고, 단백질의 발현정도는 SDS-PAGE 전기영동으로 확인하였으며 대조군은 pYES2 vector만 들어있는 *S. cerevisiae* 형질전환체를 사용하였다.

입체선택적 가수분해 반응 및 가스 크로마토그래피(GC) 분석

재조합 *S. cerevisiae* 200 mg을 10 ml의 100 mM 인산완충액 (pH 8.0)에 현탁시킨 후 10~20 mM 농도로 라세믹 phenyl oxirane 기질을 주입하였다. 30°C, 250 rpm에서 교반시키면서 반응을 진행시킨 후, 반응용액을 pentane 또는 cyclohexane으로 추출하고 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess 값 및 EH 활성을 평가하였다[2].

결과 및 고찰

RT-PCR을 이용한 *A. niger* #33 유래의 EH 유전자 클로닝

A. niger #33으로부터 분리한 total RNA로부터 first

strand cDNA를 합성하였으며 PCR을 사용하여 얻은 EH DNA를 *S. cerevisiae* 발현 vector인 pYES2 vector에 sub-cloning하는 과정은 Fig. 1과 같았다. 먼저 PCR product를 pEZ-T vector에 subcloning하여 pEZ-T/AnEH#33가 들어간 형질전환체들을 얻었으며, 제한효소로 가수분해 실험을 통해 EH유전자가 삽입되었음을 확인하였다. T7 및 SP6 primer를 이용하여 확인된 DNA 서열로부터 유추하여 아미노산 서열을 분석한 결과, 기존문헌에 보고된 *A. niger* LCP521과 85% 수준의 sequence identity를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). pEZ-T/AnEH#33를 *KpnI* 및 *NotI*으로 가수분해하여 전기영동한 다음 1200 bp 정도의 band를 잘라 gel로부터 DNA 조각을 추출하고 같은 효소로 자른 pYES2 vector에 삽입시켰다. pYES2/AnEH#33 plasmid가 들어간 형질전환체들로부터 plasmid DNA를 정제한 후 *A. niger* EH 유전자 존재여부 및 pYES2 vector에 올바른 방향으로 삽입되었음을 확인하고 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 발현실험에 사용하였다.

*S. cerevisiae*에서의 재조합 EH 발현 및 입체특이성 가수분해 반응

A. niger #33의 EH 유전자를 재조합한 pYES2/AnEH#33

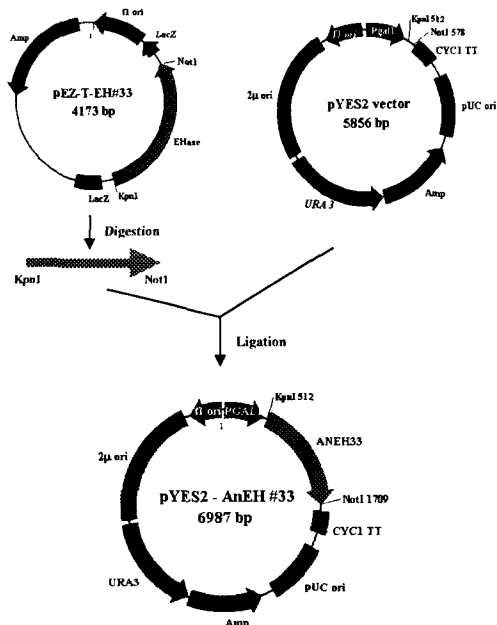


Fig. 1. Construction scheme for pYES2/AnEH#33 plasmid containing *A. niger* #33 epoxide hydrolase gene.

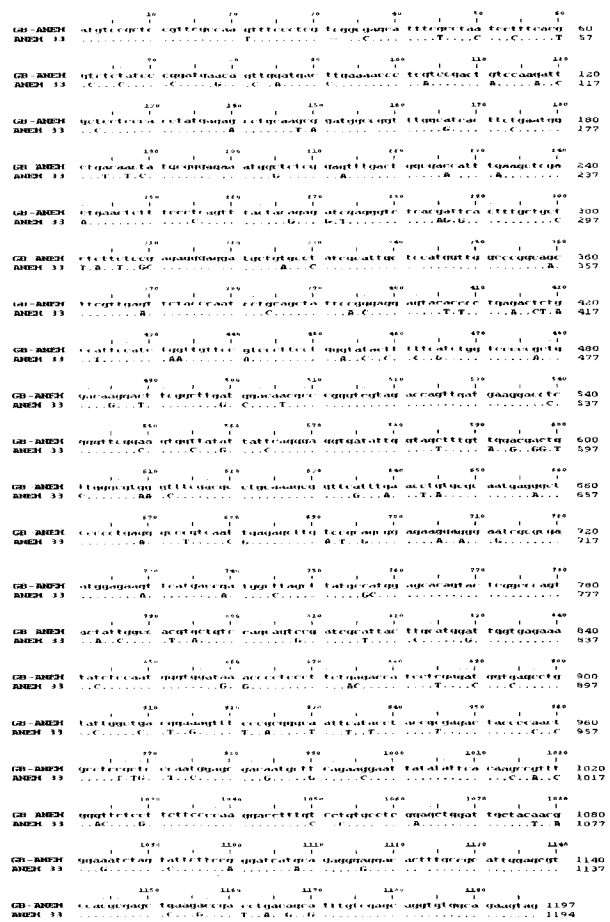


Fig. 2. DNA sequences of *A. niger* #33 EH and homology analysis with *A. niger* LCP521. Dots indicate identical sequences. (GB-ANEH, DNA sequence of EH from LCP521; ANEH #33, DNA sequence of EH from *A. niger* #33).

plasmid를 가지는 *S. cerevisiae*로부터 EH 발현 조건은 다음과 같았다. 5 ml YNBCAD 배지에 *S. cerevisiae* 형질전환체를 접종하여 30°C에서 24시간동안 전배양을 행하고 전배양액을 YPD배지(1% glucose, 1% yeast extract, 2% peptone)로 OD600=0.25가 되도록 희석한 다음 6시간 정도 배양하였다. pYES2에 있는 GAL promoter를 이용한 발현을 위하여 galactose가 2% 되도록 첨가하고 30°C에서 48시간에서 60시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 재조합 *S. cerevisiae* pellet을 생촉매로 사용하여 라세믹 phenyl oxirane 기질에 대한 입체특이성 가수분해 반응을 실시하였다. 재조합 *S. cerevisiae* 균체 200 mg(dry cell weight)을 100 mM phosphate buffer (pH 8.0) 용액 10 ml

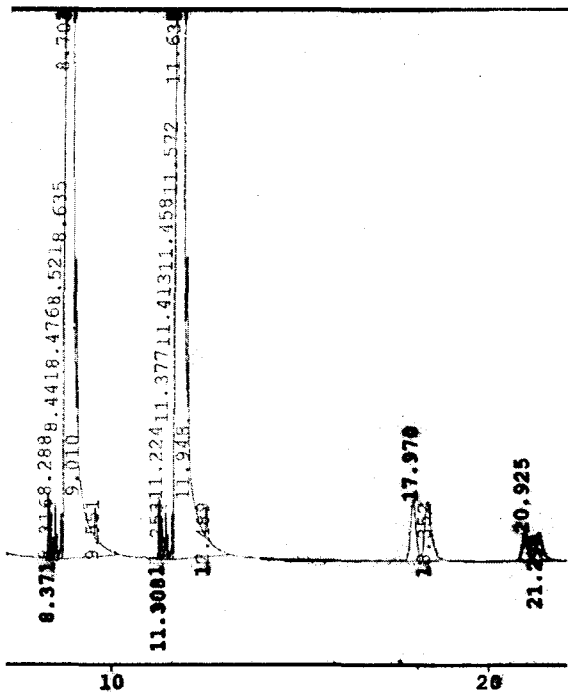


Fig. 3. Chiral GC chart for enantioselective hydrolysis of racemic phenyl oxirane by recombinant *S. cerevisiae* as a biocatalyst. Two peaks at 17 min are from control experiment and two peaks at 21 min are from reaction mixture for enantioselective hydrolysis by recombinant *S. cerevisiae*.

에 넣고 10 mM racemic phenyl oxirane을 주입한 후 30 °C, 250 rpm에서 반응을 진행하였다. 반응과정 중 일정량을 샘플링하여 cyclohexane으로 추출하고 chiral GC 분석을 통해 입체특이성 가수분해 반응을 모니터링하였다. 효소 반응기에서 약 24 시간 반응 후 반응액을 chiral GC로 분석을 한 결과, 재조합 *S. cerevisiae*는 라세믹 phenyl oxirane에 대하여 가수분해능을 보여주었으며(Fig. 3), wild-type의 *A. niger* 생축매보다는 낮지만 입체특이성 가수분해 활성을 확인할 수 있었다. 일반적으로 EH의 촉매 활성점은 Asp(192), His(374)와 Asp(348) 등이 catalytic triad를 이루면서 활성점을 구성하고 있는 것으로 밝혀져 있는데, 본 연구에서 클로닝한 EH gene의 경우에서도 Asp, His, Asp가 존재함을 아미노산 서열 분석을 통해 확인하였다[1,6,9]. 또한, 효소 활성점에 존재하고 있는 두 개의 tyrosine (Tyr251, Tyr314)의 phenolic hydroxyl 기능이 oxirane ring과 수소결합을 형성하면서 기질을 촉매 활

성점 중심부위에 위치시키면서 기질에 대한 입체선택성을 보이며, 반응의 첫 번째 단계인 nucleophile로 작용할 수 있는 aspartate의 carboxylate기가 에폭사이드 링에 친핵성 공격을 함으로써 에스테르 결합 (covalent enzyme-substrate 에스테르 중간체 형성)을 형성하는데 도움을 주는 것으로 예상되고 있다[2,3,7,11,12]. pYES2/*AnEH#33*의 EH 유전자에도 이러한 Tyr기 두개가 존재하고 있음을 확인할 수 있었음에도 불구하고 입체특이성이 낮게 나온 결과들로부터 기존의 문헌에서 제시되고 있는 입체특이성을 결정짓는 Tyr 이외에 또 다른 기능이 존재하고 있음을 예상할 수 있으며, 발현과정에서 숙주세포내에서의 folding 문제점을 생각할 수 있다. 현재 클로닝한 *A. niger*의 EH를 고효율로 발현시키는 연구는 진행중이며, 결과적으로 나오게 될 고기능성 재조합 EH는 광학활성 phenyl oxirane 제조용 청정 생물공정의 생산성 향상에 크게 기여할 수 있을 것이다.

요 약

Aspergillus niger #33로부터 RT-PCR 및 PCR방법을 이용하여 epoxide hydrolase (EH)유전자를 클로닝 하고 염기서열을 분석한 결과 *A. niger* LCP521 유래의 EH와 85%수준의 유사성을 가지고 있었다. 클로닝된 EH 유전자를 *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환 시킨 후 galactose를 inducer로 사용하여 발현시켰다. 유전자 재조합 *S. cerevisiae*는 라세믹 phenyl oxirane기질에 대하여 입체선택적 가수분해능이 있음을 확인할 수 있었으며, 이러한 유전자 재조합 EH는 광학활성 에폭사이드 제조를 위한 생축매로 응용될 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 청정생산기술사업 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다. 이수정 연구조원은 2002년도 Brain Busan21사업 연구 장학금을 지원 받았음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Arand, M., F. Muller, A. Mecky, W. Hinz, P. Urban,

- D. Pompon, R. Kellner and F. Oesch. 1999. Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu404 with Asp leads to a strongly increased turnover rate. *Biochem. J.* **337**, 37-43.
- Arand, M., H. Hemmer, H. Durk, J. Baratti, A. Archelas and R. Furstoss. 1999. Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. *Biochem. J.* **344**, 273-280.
 - Argiriadi, M. A., C. Morisseau, M. H. Goodrow, D. L. Dowdy, B. D. Hammock and D. W. Christianson. 2000. Binding of alkylurea inhibitors to epoxide hydrolase implicates active site tyrosines in substrate activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 15265-15270.
 - Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
 - Chomczynski, P. and N. Szcchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
 - Nardini, M., I. S. Ridder, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, R. Rink, D. B. Janssen and B. W. Dijkstra. 1999. The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *J. Biol. Chem.* **274**, 14579-14596.
 - Rink, R., J. H. L. Spelberg, R. J. Pieters, J. Kingma, M. Nardini, R. M. Kellogg, B. W. Dijkstra and D. B. Janssen. 1999. Mutation of tyrosine residues involved in the alkylation half reaction of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 results in improved enantioselectivity. *J. Am. Chem Soc.* **121**, 7417-7418.
 - Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
 - Visser, H., J. A. M. de Bont and J. C. Verdoes. 1999. Isolation and characterization of the epoxide hydrolase-encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5459-5463.
 - Weijers, C. A. G. M. and J. A. M. de Bont. 1999. Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: versatile tools in biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **6**, 199-214.
 - Yamada, T., C. Morisseau, J. E. Maxwell, M. A. Argiriadi, D. W. Christianson and B. D. Hammock. 2000. Biochemical evidence for the involvement of tyrosine in epoxide activation during the catalytic cycle of epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* **275**, 23082-23088.
 - Zou, J., B. M. Hallberg, T. Bergfors, F. Oesch, M. Arand, S. L. Mowbray and T. A. Jones. 2000. Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implication for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases. *Structure* **8**, 111-122.

(Received December 17, 2002; Accepted February 7, 2003)