대장균에서 chaperone 분자와 저온배양에 의한 CGTase의 가용성 발현 증대

박소림[1] · 김성구[1] · 권미정[2] · 남수완*

동의대학교 생명공학과, [1]부경대학교 생물공학과, [2]네오팜

Received October 10, 2003 / Accepted November 20, 2003

Enhancement of Soluble Expression of CGTase in *E. coli* By Chaperone Molecules and Low Temperature Cultivation. So-Lim Park[1], Sung-Koo Kim[1], Mi-Jung Kwon[2] and Soo-Wan Nam*. *Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, [1]Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, [2]Neo Pharm, BVC-307, KRIBB, 52 Oeun-Dong, Yuseong-Gu, Daejeon, 305-806, Korea* – The synergistic effect of lowered incubation temperature and GroEL/ES expression on the production of soluble form of *B. macerans* cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) was studied in recombinant *E. coli*. pTCGT1 and pGro11 carrying the *cgt* and *groEL/ES* genes under the control of T7 promoter and *pzt-1* promoter, respectively, were co-introduced. Tetracycline (10 ng/ml) and IPTG (1 mM) were added at the early-exponential phase (2 hr) and mid-exponential phase (3 hr). Low temperature cultivation at 25℃ with groEL/ES expression improved the activity of CGTase by two fold, compared to 37℃ cultivation without chaperones. SDS-PAGE analysis revealed that about 69% of CGTase in the total CGTase protein was found in the soluble fraction by overexpression of GroEL/ES and cultivation at 25℃, whereas 20% of CGTase was detected in the soluble fraction when *E. coli* was cultivated at 37℃ without chaperone. The amount of soluble CGTase from 25℃ culture with chaperone was 3.5-fold higher than that of 37℃ culture without chaperone. Therefore the expression of GroEL/ES and low temperature cultivation greatly enhanced the soluble production of CGTase in *E. coli*.

Key words – low temperature cultivation, CGTase, GroEL/ES, *Escherichia coli*

재조합 단백질을 생산하거나 유전자 조작을 위한 숙주세포로 대장균이 주로 이용되지만 재조합 단백질 생산 시 native 상태로 접히지 못한 단백질들이 축적되어 봉입체(inclusion body)를 형성하는 문제점이 있다[8]. 이러한 문제점들의 해결책으로 GroEL/ES나 DnaK/DnaJ/GrpE 같은 molecular chaperone을 이용해 생산된 단백질의 접힘을 촉진시키는 방법이 제시되어져 왔다[21,23,27]. DnaK/DnaJ/GrpE는 nascent polypeptide와 반응하여 비가역적인 aggregation을 막고, partial folding을 촉진시키는 것으로 알려졌으며[3,20] GroEL/ES는 이미 접혀진 단백질과 부분적으로 반응하여 접힘을 보다 완벽하게 할 수 있도록 도와주는 역할을 한다[24,25]. 이와 같은 mloecular chaperone 들과 목적단백질의 공동발현은 protein folding을 도와 활성형 형태의 단백질 생산에 큰 영향을 미친다[4,8,12,14,15].

본 실험에서 사용한 목적 단백질은 *Bacillus macerans* 유래의 cyclodextrin glucanotransferase (E.C. 2.4.1.19, CGTase)로 starch로부터 cyclodextrins을 생산하는 효소이다. Cyclodextrin은 개수에 따라 여러 가지 복합체를 형성할 수 있는 능력을 가졌기 때문에 산업적으로 아주 유용한 물질로 식품, 의약품, 농산품, 화장품 등 여러 분야에서 활용도가 높은 물질이다. CGTase를 *E. coli*에서 발현시켰을 때 불용성의 봉입체로 생성된다는 것이 이전 연구에서 밝혀졌다[5,6,17]. 이러한 봉입체 형성의 주요단계는 peptide translation, protein folding, 그리고 부분적으로 접혀진 단백질들의 응집체 형성이 그 원인일 것으로 보고 있으며, 전체단계는 translational rate, peptide concentration, diffusion kinetics에 의존하고, 그리고 이러한 parameter들 역시 chaperone처럼 pH, 염농도, 온도 같은 환경적 요인에 영향을 받는다. 이전 연구에서 CGTase와 GroEL/ES를 공동발현 시켰을 때 가용성 형태로 CGTase가 생산됨을 보고한 바 있다[9,10]. 다른 연구에서는 배양 온도와 봉입체 형성간의 관계가 가용성 단백질 생산 증대의 다른 방안으로 제시되기도 했는데[19~21,26], 그 중 β-glucosidase는 GroEL/ES 발현 생산과 함께 25℃에서 저온 배양했을 때, 37℃에서 단독 발현시킨 것에 비해 20배나 향상된 단백질 활성도를 보였다[18]. 이는 낮은 배양 온도에서 생장속도의 감소에 따른 단백질 생산속도 감소로 세포 내 저농도 단백질 환경에서 봉입체의 형성이 억제되기 때문이라고 설명되고 있다. 본 연구에서는 *B. macerans* CGTase를 기존 배양 온도(37℃)보다 낮은 저온(30℃ 또는 25℃)에서 배양하는 동시에 chaperone과 공동발현시켜 가용성효소 생산에 미치는 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주와 plasmids

재조합 단백질의 발현을 위한 숙주세포로 *E. coli* BL21

*Corresponding author
Tel : +82-051-890-2276, Fax : +82-051-890-1619
E-mail : swnam@deu.ac.kr

(DE3)[F, *ompT*, r_B^-, m_B^-, (DE3)]를 사용하였다. *B. macerans* 유래의 *cgt*가 subcloning 되어있는 pTCGT1 plasmid[16]는 T7 promoter, ribosome-binding site (SDsequence)와 분비신호 서열[11]을 가지고 있다. *groEL/ES*를 지니고 있는 pGro11은 pACYC184가 기본 plasmid로 chloramphenicol 내성유전자를 가지며 *groEL/ES* 발현은 *Pzt*-1 promoter에 의해 조절된다[14].

형질전환

pTCGT1와 pGro11을 1 μg 사용하여 *E. coli* BL21 (DE3)에 도입시켰으며 형질전환 된 *E. coli*는 20 μg/ml ampicillin (pTCGT1의 선별)와 20 μg/ml chloramphenicol (pGro11의 선별)이 함유된 LB agar 배지에서 선별하였으며 pTCGT1만 함유한 균주는 20 μg ml ampicillin이 첨가된 LB agar 배지에서 선별하였다.

배지와 배양 조건

E. coli 배양을 위해 LB 배지(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl)을 사용하였다. pTCGT1과 pGro11을 함께 지닌 균주는 20 μg/ml ampicillin과 20 μg/ml chloramphenicol이 함유된 LB배지에서 배양, pTCGT1만을 지닌 균주는 20 μg/ml ampicillin을 함유한 LB배지에서 배양하였다. 37℃에서 전 배양한 후 80 ml flask로 옮겨 25℃, 30℃, 37℃에서 배양하였으며 *groEL/ES*와 *cgt* 유전자의 발현을 위해 각각 tetracycline 10 ng/ml과 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 1 mM을 대수증식기 초기(early-exponential phase: 2 hr)와 대수증식기 중기(mid-exponential phase: 3 hr) 때 첨가하였다[9].

SDS-PAGE 분석

생산된 CGTase의 응집정도를 알아보기 위해 배양이 끝난 세포만을 모아 sonication을 한 뒤 4,000×*g*에서 10분 동안 원심 분리하여 가용성과 비가용성분획으로 나눈 뒤 각각의 분획을 SDS-PAGE (8% gel)로 분석하였다. Gel은 Coomassie brilliant blue로 염색하였고 Image Analyzer (Image Master VDS, Pharmacia Biotech., NJ, USA)로 scanning하여 분석하였다.

CGTase 활성 측정

CGTase 활성측정은 methyl orange method로 측정하였다[13]. 효소 반응 조건은 0.03 mM methyl orange, 1% soluble starch, 효소 용액 50 μl을 50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 전체 양이 1.5 ml이 되게 잘 섞은 다음 50℃에서 반응시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1.0 unit는 1분당 1 μmol의 α-cyclodextrin을 생산하는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

CGTase 활성의 비교

가용성 단백질 생산에 대한 chaperone의 효과를 알아보기 위해 *E. coli*에 pTCGT1과 pGro11을 함께 도입시킨 대장균주를 LB배지에서 배양하면서 tetracycline 10 ng/ml과 IPTG 1 mM을 대수증식기 초기(2 hr)와 대수증식기 중기(3 hr)에 첨가하여 각각의 유전자 발현을 유도하였으며 25℃, 30℃, 37℃ 온도에서 배양하였다. 단독배양에서는 37℃보다 30℃와 25℃ 배양 시 균체증식속도가 조금씩 감소하는 것으로 나타났고 공동발현시에는 초기성장속도에 있어 이러한 현상이 더 두드러져 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1). pTCGT1를 단독으로 발현시켰을 때 활성 측정 결과, 37℃의 0.48 unit/ml에서 30℃의 0.84 unit/ml, 25℃의 0.94 unit/ml로 25℃에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, chaperone과 공동발현시킨 것 역시 37℃의 0.83 unit/ml에서 30℃의 1.09 unit/ml, 25℃의 1.11 unit/ml로 25℃ 배양 시 CGTase활성이 더

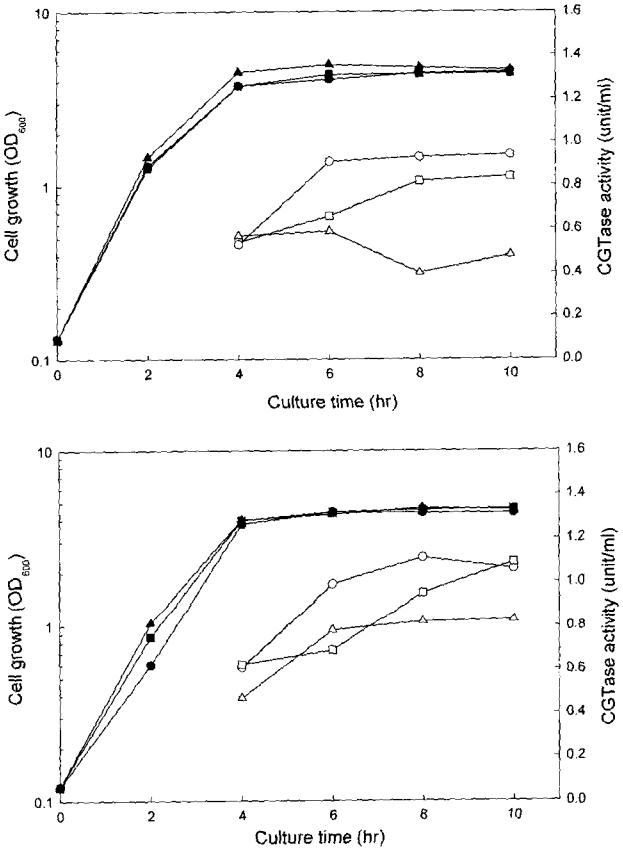

Fig. 1. Time profiles of cell growth and CGTase activity. *E. coli* BL21/pTCGT1 (A) and *E. coli* BL21/pTCGT1+pGro11 (B) were cultivated in the flask at 25℃, 30℃, and 37℃.
Closed symbols, Cell growth ; Open symbols, CGTase activity (●,○), 25℃; (■,□), 30℃; (▲,△), 37℃

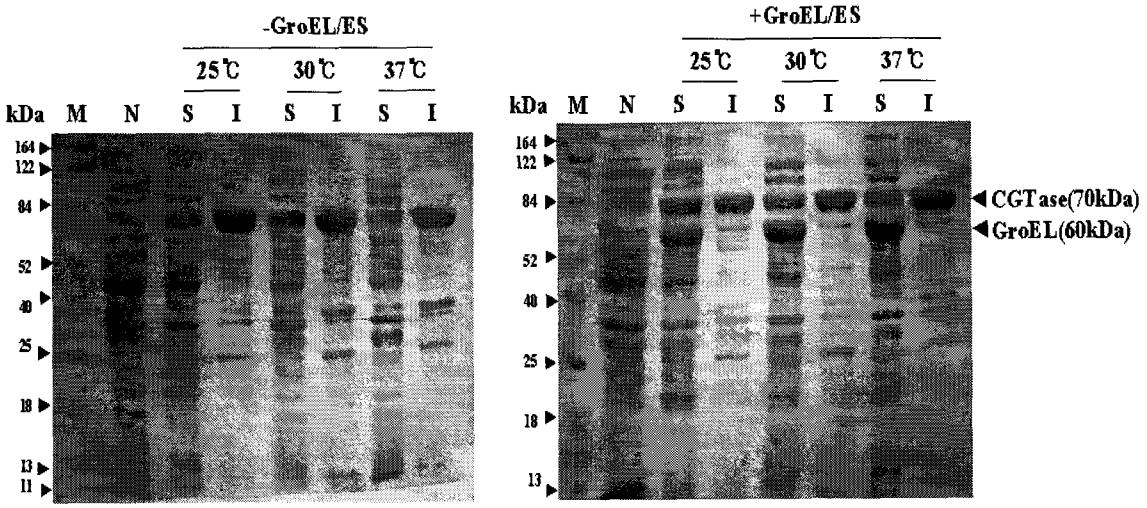

Fig. 2. SDS-PAGE analyses of recombinant CGTases produced at 25℃, 30℃, and 37℃. Expression of CGTase and GroEL/ES were induced by addition of 10 ng/ml tetracycline at 2 hr and 1 mM IPTG at 3 hr. After 10 hr of cultivation, cells were harvested. After disruption, soluble (S) and insoluble (I) fractions were obtained by centrifugation. M, molecular makers; N, whole cell lysate of transformants before IPTG induction.

높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 세 가지 조건 모두에서 25℃ 배양이 훨씬 높은 CGTase 활성을 나타냈다.

가용성 분획의 분석 및 가용화 정도의 측정

SDS-PAGE에서 대부분의 CGTase들이 불용성 형태로 대량 발현되어 있으며 chaperone과의 공동발현과 저온 배양 시 가용성 형태로의 전환정도를 눈으로 쉽게 확인 할 수 있었다. 단독 배양 시 37℃보다 25℃의 분획에서 더 많은 양의 CGTase band를 볼 수 있으며 chaperone과 공동발현 시킨 경우 역시 25℃에서 37℃보다 더 많은 가용성 CGTase가 생산됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

SDS-PAGE bands를 Image Analyzer로 분석한 결과, pTCGT1만을 지닌 대장균을 37℃에서 단독 배양시킬 경우 불용성에서부터 가용성으로의 전환 수율이 20%, specific activity는 0.12 unit/ml · OD_{600}(Table 1)을 나타내는 반면, 25℃에서 GroEL/ES와 공동발현시켰을 경우 전체 CGTase의 69%가 넘는 양이 가용성 분획에서 발견되었으며 specific activity는 0.25 unit/ml. · OD_{600}로 훨씬 더 높게 나타났다. 이는 37℃에서의 단독배양보다 가용성 CGTase 생산은 3.5배, specific activity는 2배 증가된 값으로 가용성 CGTase 생산증가에 비해 specifc activity가 크게 증가하지 못한 것은 GroEL/ES와 공동발현 시킬 경우 발현된 전체 CGTase의 양이 단독배양보다 10% 이상 감소했기 때문인 것으로 사려되어진다. 이전 연구에서 GroEL/ES(pGro7)와 CGTase를 37℃에서 공동발현시켜 27.9%의 가용성 CGTase를 생산한 경우[9,10]와 비교할 때 같은 조건에 단순히 온도만 낮춘 25℃배양으로 더 높은 33%(Table 1)의 soluble 형태의 CGTase를 생산해냈다. 이 역시 가용성 효소 생산에는 저온배양이 유리함을 증명하며 GroEL/ES와의 공동발현이 병행될 때 가용성 CGTase의 생산에 훨씬 더 유리하다는 것을 본 실험결과로 확인할 수 있었다.

Table 1. Ratio of CGTase protein in the soluble and insoluble forms. Each fraction was separated on 8% SDS-PAGE, followed by Coomassie staining, and scanned by the Image Analyzer. The total amount of CGTase produced was taken as 100%.

Condition		CGTase		
		Soluble (%)	Insoluble (%)	Specific Activity* (unit/ml · OD_{600})
pTCGT1	37℃	20	80	0.12
	30℃	20	80	0.19
	25℃	33	67	0.20
pTCGT1+ pGro11	37℃	45	55	0.18
	30℃	50	50	0.23
	25℃	69	31	0.25

*Activity and cell concentration were at 8 hr of cultivation.

25℃에서 가용성 CGTase의 높은 발현양상은 저온에서는 세포내에서 CGTase의 생성속도가 낮아지기 때문이다. 일반적으로 과생산된 단백질의 빠른 축적은 봉입체의 생성을 증가시키는 경향을 보이는 것으로 알려져 있다. 온도를 낮춰 25℃에서 배양 할 경우 CGTase 단백질의 생산 속도가 37℃에서 보다 훨씬 느려지게 되고, 그만큼 생성된 단백질의 양도 줄어들게 되어 세포 내 단백질 농도가 낮아지게 되는데, 이러한 환경은 세포내 insoluble protein들이 응집체를 형성하는데 불리한 조건으로 작용해 궁극적으로 봉입체의 형성을 방지하는 역할을 하는 것으로 판단된다[18].

β-Glucosidase를 목적 단백질로 사용한 실험의 경우 GroEL/ES와 함께 25℃ 배양 시 68%가 넘는 양이 가용성 형태로 발현되었고, 대조군에 비해 20배가 넘는 활성을 보였으며[18], D-carbamoylase를 18℃에서 GroEL/ES와 함께 발현 시 목적 단백질 전체의 80%가 가용성 형태로 발현됐으며 4~5배 증가된 활성을 나타냈다[2]. 그리고 human C1 inhibitor을 20℃에서 GroEL/ES와 공발현시킨 경우 soluble 형태의 생산이 5배나 증가했으며 활성 역시 4.5배 정도 향상됐음이 실험으로 보고된 바 있다[22].

이와 같이 GroEL/ES와의 공발현과 저온 배양의 공동작용은 불활성형 효소를 활성형으로 전환시켜 활성형 CGTase의 가용화(solubilization)에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 이러한 연구결과는 *E. coli*에서 활성형, 가용화 형태로 상업적 재조합 단백질 생산 시 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

*E. coli*에서 *B. macerans* 유래 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)의 활성형 생산에 GroEL/ES chaperone과의 공발현과 저온 배양의 공동작용 효과에 대해 조사하였다. 실험에 사용된 *cgt*와 *groEL/ES* 유전자를 발현하는 pTCGT1과 pGro11은 각각 T7 promoter와 *Pzt*-1 promoter에 의해 조절되고 이들을 *E. coli*에 도입시켰다. 대수증식기 초기(2 hr)와 대수증식기 중기(3 hr)에 tetracycline 10 ng/ml 과 IPTG 1 mM을 첨가하여 각각의 유전자를 발현시켰다. CGTase 활성과 specific activity 측정 시 37℃에서 pTCGT1 단독 발현 보다 25℃에서 chaperone과 함께 발현시킨 경우 2배나 높은 활성이 측정됐으며, SDS-PAGE 분석결과 37℃에서 단독 발현 시킬 경우 20% 정도 가용성 형태로 발현되던 것이 25℃에서 chaperone과 공발현 시에는 거의 3.5배가 넘는 69%가 가용성으로 전환됨을 알 수 있었다. 이와 같이 분자 chaperone과 25℃에서의 저온 배양은 *E. coli*에서 활성형질 가용성 CGTase의 생산 증가에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단의 목적 기초 연구(NO. 2000-2-20200-006-3)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Chrunyk, B. A., J. Evans, J. Lillqust, P. Young and R. Wetzel. 1993. Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1β. *J. Biol. Chem.* **268**, 18053-18061.
2. Dipti, S., S. Rakesh and M. V. Rakesh. 2001. Chaperone-assisted overexpression of an active D-carbamoylase from *Agrobacterium tumefaciens* AM10. *Proteion Expression Purif.* **23**, 374-379.
3. 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.
4. 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.
5. Jin, H. H., N. S. Han, D. K. Kweon, Y. C. Park and J. H. Seo. 2001. Effects of environmental factors on *in vivo* folding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 92-96.
6. Kim, C. I., M. D. Kim, Y. C. Park, N. S. Han and J. H. Seo. 2000. Refolding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase expressed as inclusion bodies in recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 632-637.
7. Klein, J. and P. Dhurjati. 1995. Protein aggregation kinetics in an *Escherichia coli* strain overexpressing a *Salmonella typhimurium* CheY mutant gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1220-1225.
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. Kwon, M. J., S. L. Park, S. K. Kim and S. W. Nam. 2002. Overproduction of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* by coexpression of GroEL/ES chaperone. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1002-1005.
10. Kwon, M. J., S. L. Park, B. W. Kim, S. K. Kim and S. W. Nam. 2002. Improvment of production of active cyclodextrin glucanotransferase by coexpression GroEL/ES chaperone in *E. coli*. *Kor. J. Life Sci.* **12**, 688-693
11. Lee, P. K. C. and B. Y. Tao. 1994. High-level expression of cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* using a T7 promoter expression system. *Starch* **46**, 67-74.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. 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.
17. Piatak, M., J. A. Lane, W. Laird, M. J. Bjorn, A. Wang and M. Williams. 1988. Expression of soluble and fully functional ricin a chain in *Escherichia coli* is temperature sensitive. *J. Biol. Chem.* **263**, 4837-4843.
18. Sachiko, M., Y. Yu, S. P. Singh, J. D. Kim, K. Hayashi and Y. Kawata. 1998. Overproduction of β-glucosidase in active form by an *Escherichia coli* system coexpressing the chaperonin GroEL/ES. *FEBS Microbiol Lett.* **159**, 41-46.
19. Standberg, L. and S. O. Enfors. 1991. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1669-1674.
20. 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.
21. Thomas, J. G., A. Ayling and F. Baneyx. 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197-238.
22. Lamark, Y., M. Ingebrigsten, C. Bjornstad, T. Melkko, T. E. Mollnes and E. W. Mielsen. 2001. Expression of active human C1 inhibitor serpin domain in *E. coli*. *Protein Expression Purif.* **22**, 349-358.
23. Wall, J. G. and A. Pluckthun. 1995. Effects of over-expressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 507-516.
24. 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.
25. 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.
26. Wetzel, R. and B. A. Chrunyk. 1994. Inclusion body formation by interleukin-1β depends on the thermal sensitivity of a folding intermediate. *FEBS Lett.* **350**, 245-248.
27. Ziemienowicz, A., D. Skowyra, J. Zeilstra-Ryalls, O. Fayet, C. Georgopoulos and M. Zylicz. 1993. Both the *Escherichia coli* chaperone systems, GroEL/GroES and DnaK/DnaJ/GrpE, can reactivate heat-treated RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **268**, 25425-25431.