

## 무세포 단백질합성 시스템 기반의 epoxide hydrolase 발현 및 활성 분석

이옥경 · 김희숙 · 이은열<sup>1\*</sup>

경성대학교 공과대학 식품공학과, <sup>1</sup>해양·극한생물 분자유전체 연구단

Received August 12, 2005 / Accepted October 7, 2005

**Assay of Epoxide Hydrolase Activity Based on PCR-linked *in vitro* Coupled Transcription and Translation System.** Ok Kyung Lee, Hee Sook Kim and Eun Yeol Lee<sup>1\*</sup>. Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, <sup>1</sup>Marine and Extreme Genome Research Center, Ansan 426-755, Korea – Cell-free expression is a powerful tool for rapid protein analysis, enabling an efficient identification of gene without cumbersome procedure of transformation and cell culture. Epoxide hydrolase (EH) gene of *Rhodotorula glutinis* was simply amplified by PCR, and the resultant gene was expressed *in vitro* using a coupled transcription/translation system. The cell-free expressed EH protein mixture exhibited the enantioselective hydrolysis activity toward (*R*)-styrene oxide, representing that cell-free protein synthesis system can be used for the rapid expression of an enantioselective enzyme for an efficient identification of the chiral activity.

**Key words** – cell-free protein synthesis, enantioselective hydrolysis, epoxide hydrolase, coupled transcription/translation system

광학활성 에폭사이드(enantiopure epoxide)는 광학활성의약품 합성에 사용되는 고부가가치 중간체이다[2]. 라세믹 에폭사이드의 (*R*)-과 (*S*)-이성질체에 대한 입체가수분해 활성 차이를 이용하여 특정 이성질체만을 diol로 분해·제거함으로써 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조할 수 있다. 이러한 동력학 분할(kinetic resolution) 방법은 저가의 라세믹 기질로부터 고부가가치 광학활성 에폭사이드를 제조할 수 있어, 산업화 가능성이 높은 기술이다. 유기합성적 동력학 분할법은 적용되는 기질이 제한적이며, 중금속 촉매 등을 사용하는 등 환경오염적 특성이 많아 이에 대한 대안으로 생촉매를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조기술 개발이 활발히 진행되고 있다[1,3].

Epoxide hydrolase (EH)는 에폭사이드를 입체선택적으로 가수분해하는 효소로, NADH 등의 cofactor를 요구하지 않으며, whole-cell biocatalyst로 사용할 수 있으며, 안정된 구조를 가지고 있어 상업적 유용성이 높은 효소이다[10]. 최근에 EH를 이용하여 광학활성 styrene oxide, *p*-nitrostyrene oxide, 3-chlorostyrene oxide 등을 고순도로 제조하는 기술이 개발되고 있으며, 다양한 기질에 대하여 활성이 있는 신규 EH 생촉매들도 활발히 개발 중에 있다[4].

유전자 library로부터 특정 효소 활성을 검색하기 위해서는 유전자를 단백질로 발현하여 그 특성을 평가해야 한다. *Escherichia coli* 등 살아있는 미생물 숙주를 이용하여 후보 유전자들을 발현하는 경우, DNA를 숙주 세포에 형질 전환시킨 다음 세포를 배양하고, 배양된 세포로부터 목적 단백질을

분리하고, 분리된 단백질의 활성을 평가하는 등 여러 단계가 요구되므로 발현된 단백질의 특성 확인까지 시간이 오래 걸려 대용량의 유전자 library를 검색하기에는 효율적인 방법이 되지 못한다. 이러한 문제를 극복하기 위하여, 리보솜 등의 protein synthesis machinery를 추출한 cocktail 용액을 이용하여 *in vitro*에서 단백질을 합성하는 무세포 단백질 합성법(cell-free protein synthesis system)이 개발되었다[5-8]. 무세포 단백질 합성법에서는 숙주세포 자체에 의한 외래단백질 발현을 저해하는 현상이 없으며, 반응조건을 조절하여 단백질 생산량을 용이하게 변화시킬 수 있으며, 단백질 분해효소가 없으므로 발현된 단백질의 안정성을 높일 수 있으며, 무엇보다도 신속하게 유전자발현이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 무세포 단백질 합성법은 후보 유전자를 신속하게 발현시킬 수 있으므로 신규 유전자 기능 규명에 효율적으로 사용될 수 있다[5,7]. 그러나 광학활성 효소의 경우 무세포 단백질 발현환경에서 입체선택성을 주는 기질 binding site의 3차원 구조가 변경되어 입체선택성을 잃어버릴 수도 있다. 이 경우 무세포 단백질 발현과정 중에서 입체선택성을 잃어버린 것인지 아니면, 원래 효소가 입체선택성이 없는 것인지를 구분할 수 없기 때문에 screening 방법으로는 적합하지 못하다. 따라서 본 연구에서는 무세포 단백질 합성법을 통해 입체선택성을 유지시키면서 광학활성 EH 유전자를 발현할 수 있는지를 검증하기 위하여, 무세포 단백질 합성시스템을 이용하여 *Rhodotorula glutinis*의 EH를 발현시키고 입체선택적 가수분해 활성을 평가하였다.

### 재료 및 방법

PCR을 이용한 *R. glutinis* EH 유전자 증폭  
*R. glutinis* EH 유전자를 재조합한 pET21b(+)/R.gEH plasmid

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : eylee@ks.ac.kr

DNA를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 로부터 정제한 후 이를 template DNA로 사용하였다[9]. Primer로는 pET21b(+) vector 상의 T7 promoter의 염기서열 일부인 5'-agatctcgatcccgaaattaatcagac-3'과 T7 terminator 염기서열 일부인 5'-ttcagcaaaaaccctcaagaccgttta-3'을 사용하였다. PCR 조건은 변성 온도 94°C, annealing 온도 58°C, 합성 온도 72°C이었고, 총 30 cycle을 수행하였다. Agarose gel 전기영동을 통하여 1,230 bp에서 확인된 PCR product를 PCR purification kit (Quagen)를 사용하여 정제한 후, 0.1% DEPC를 16시간 처리하였다. DEPC 처리한 PCR product와 동량의 phenol: chloroform: isoamylalcohol 혼합용액(PCI)으로 처리하고, ethanol로 침전시켜 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 농도의 DNA를 얻어 무세포 단백질 합성용 template로 사용하였다.

#### Coupled transcription/translation system을 이용한 무세포 단백질 합성

*R. glutinis* EH 선형 유전자를 *E. coli* 기반의 coupled transcription/translation cocktail (EcoPro<sup>TM</sup> T7 system, Novagen)을 사용하여 무세포 단백질 합성을 실시하였다. 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 또는 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 농도의 DNA를 template로 사용하였고, 5 mM methionine, EcoPro<sup>TM</sup> extract를 첨가하고(total volume: 15  $\mu$ l) 37°C에서 2시간동안 발현시켰다.

#### 무세포 단백질 합성 반응을 통한 *R. glutinis* EH 발현 확인

EH 단백질의 발현 여부를 알아보기 위하여 12% SDS-PAGE 전기영동 및 항체를 이용한 immunoblotting을 수행하였다. SDS-PAGE에서 분리한 단백질을 nitrocellulose paper에 전기적으로 이행시킨 후 polyclonal anti-hexahistidine antibody 및 peroxidase conjugated polyclonal secondary antibody를 사용하여 immunoblotting을 수행하였다.

#### 자외선 분광기를 이용한 EH 활성 측정 방법

EH 활성 분석에 사용한 4-(*p*-nitrobenzyl)pyridine (NBP) 시약은 methoxyethanol에 녹인 230 mM stock solution을 사용하였다. 무세포 단백질 발현 시스템을 이용하여 얻은 반응물 용액 150  $\mu$ l와 213  $\mu$ l의 LB배지에 styrene oxide (60 mM stock solution)을 33.4  $\mu$ l 첨가하여 최종농도가 2 mM이 되게 하였다. NBP용액 300  $\mu$ l를 첨가하고 triethylamine 300  $\mu$ l를 첨가한 다음 진탕배양기 (39°C, 250rpm)에서 시간대별로 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 560 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 대조군으로는 무세포 단백질 발현 cocktail 용액을 넣어 동일한 조건에서 반응시킨 것을 사용하였다.

#### 입체선택적 가수분해 반응 및 GC 분석

무세포 단백질 발현 반응물 150  $\mu$ l를 100 mM potassium phosphate (pH 8.0)에 현탁시킨 후, 2 mM styrene oxide를

기질로 사용하여 30°C, 250 rpm에서 3시간 반응시켰다. 대조군으로는 2 mM styrene oxide 기질과 무세포 단백질 합성용 cocktail 용액을 넣어 동일한 조건에서 반응시킨 것을 사용하였다. 무세포 단백질 합성과정을 통해 제조된 EH 단백질 용액의 입체선택적 가수분해 활성을 평가하기 위하여 chiral GC 분석을 수행하였다. (*R*)-과 (*S*)-styrene oxide에 대한 분리능이 있는 Supelco  $\beta$ -Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25  $\mu$ m film thickness)칼럼을 사용하였다. 이동가스로는 질소를 사용하였으며, GC 분석조건으로는 split ratio는 1:20, flow rate는 0.5 ml/min으로 2  $\mu$ l의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector, detector의 온도는 각각 100, 220, 220°C이었다.

## 결과 및 토론

#### 무세포 단백질 합성 cocktail을 이용한 EH 유전자 발현

최근에 genome database로부터 EH 단백질 아미노산 서열특성을 이용한 gene mining 방법을 통해 putative EH 유전자 정보를 대량으로 얻을 수 있다. 그러나 서열 정보만으로는 그 유전자의 특성을 직접 확인할 수는 없으므로, 해당 유전자를 클로닝하고 대장균 등에서 발현하여 효소 활성을 측정해야만 한다. 이 방법은 유전자들을 형질전환을 통해 숙주에 도입하고 세포를 배양한 다음, 단백질을 분리하여 효소 활성을 분석하므로 많은 시간이 요구된다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 무세포 단백질 합성법을 고려할 수 있다. PCR을 통해 얻은 특정 유전자를 coupled transcription/translation system을 이용하여 *in vitro*에서 단백질을 합성하는 경우, 형질전환 및 세포 배양 등의 실험과정을 생략할 수 있으므로 효율적으로 단백질을 발현할 수 있다.

무세포 단백질 합성법을 통해 입체선택성을 유지시키면서 광학활성 EH 유전자를 발현할 수 있는지를 검증하기 위하여, *R. glutinis*의 EH 유전자를 무세포 단백질 합성법을 이용하여 발현시켰다. 단백질 발현을 확인하기 위하여 12% SDS-PAGE와 hexahistidine antibody를 이용한 immunoblotting 실험을 실시하였다. Fig. 1에서와 같이 Coomassie blue로 염색하였을 때에는 발현된 단백질 band를 확인할 수 없었으나 (a), 면역학적 염색을 행한 결과 45 kDa 위치에서 hexahistidine과 융합된 *R. glutinis* EH 단백질의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 1(b)).

#### 자외선 분광기를 이용하여 발현된 EH의 활성 평가

일반적으로 HPLC나 GC를 이용하여 EH의 활성을 분석하는 경우, 시료의 전처리 및 긴 분석시간 등의 문제점으로 인하여 신속한 분석이 어렵다. EH 활성을 가장 손쉽게 확인하는 방법으로는 에폭사이드를 NBP와 반응시켜 색갈변화 반응을 유도하고, 그 흡광도변화를 측정하여 EH 활성을 평가

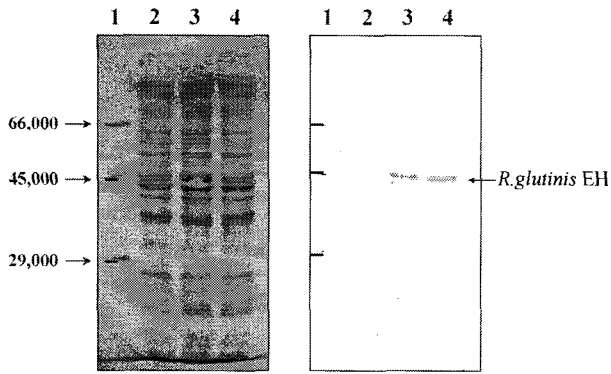


Fig. 1. SDS-PAGE and immunoblotting analysis of *R. glutinis* epoxide hydrolase expressed *in vitro* using the coupled transcription/translation system. (a) Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. (b) Proteins on 12% SDS-PAGE gel were transferred electrically to nitrocellulose membrane and immunoblotted with polyclonal hexahistidine antibody (Lane 1, size marker; lane 2, negative control (in the absence of DNA); lane 3, DNA concentration 0.5 µg/µl; lane 4, DNA concentration 1 µg/µl. The expressed EH proteins were indicated by the arrow).

할 수 있다[11]. 이 방법에서는 EH의 가수분해 활성에 의해 diol로 분해되고 남은 에폭사이드 기질을 NBP와 반응시켜 색깔 반응을 유도시킨 다음 560 nm에서 흡광도를 측정하고, EH를 넣지 않은 대조군 실험과 비교하여 흡광도 감소를 측정함으로써 EH 활성을 평가할 수 있다. EH의 가수분해 반응 후 남은 에폭사이드 기질은 NBP와 반응하여 시간이 경과할수록 흡광도 수치가 증가하므로 negative control과의 대조 실험이 필요하다. 무세포 단백질 합성법을 이용하여 발현시킨 EH 단백질을 포함하고 있는 반응물 용액에 racemic styrene oxide 기질을 넣어 가수분해 반응을 실시한 다음, NBP 반응을 수행하고 흡광도를 측정된 결과, 대조군 대비 560 nm에서의 흡광도가 상대적으로 더 감소되었다(Fig. 2). 따라서 무세포 단백질 합성법을 이용하여 발현한 EH 단백질이 에폭사이드 기질에 대하여 가수분해 활성이 있음을 알 수 있었다.

**무세포 단백질 합성법으로 발현된 EH의 입체선택성 활성 평가**

자외선 분광기법으로 분석하는 경우 발현된 EH 단백질이 에폭사이드 기질에 대한 가수분해 활성이 있음을 용이하게 판단할 수는 있으나, 입체선택성 활성 유지에 대한 평가는 불가능하다. EH와 같이 입체선택적 활성이 중요한 효소를 무세포 단백질 합성법으로 발현해도 입체선택성을 유지할 수 있는지를 평가하는 것이 본 연구의 중요 목적이므로, 무세포 단백질 합성법을 통해 발현된 EH 단백질의 입체선택성을 확인하기 위하여 chiral GC분석을 수행하였다. 발현된

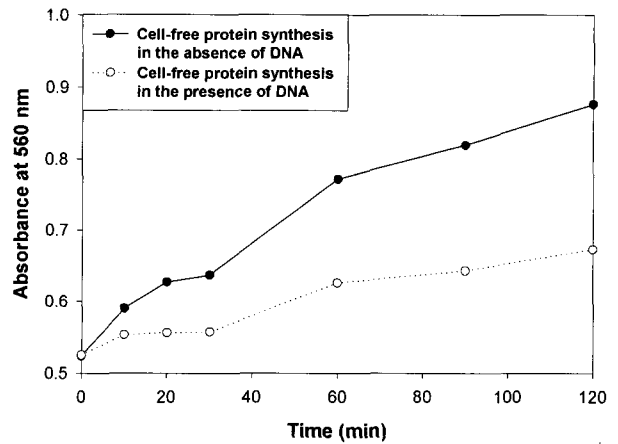


Fig. 2. NBP assay for the determination of the EH activity from the cell-free synthesized protein mixture. The control was the expression cocktail in the absence of any DNA.

EH 단백질을 생촉매로 사용하고, 2 mM styrene oxide 라세믹 기질에 대한 입체선택적 가수분해 반응을 실시한 결과, wild type *R. glutinis* 세포처럼 (*R*)-styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해 활성을 보여주어 올바른 형태로 발현되었음을 알 수 있었다(Fig. 3). 따라서 입체선택성이 있는 EH 유전자를 간단히 PCR로 증폭하고 무세포 단백질 합성 시스템을 이용하여 손쉽게 발현해도 입체선택적 가수분해 활성을 얻을 수 있었다. 이러한 방법은 bioinformatics 등을 이용한 putative EH 유전자 탐색 및 활성 검색, metagenome library 등의 유전자 library로부터 입체선택성이 있는 EH 유전자 탐색 등에 효율적으로 응용될 것으로 기대된다.

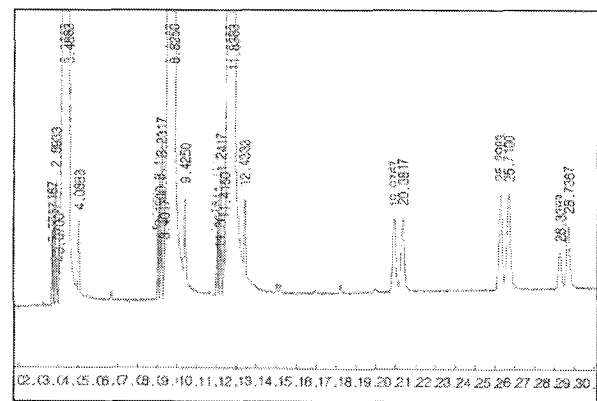


Fig. 3. Chiral GC chart for the enantioselective hydrolysis of racemic styrene oxide by *R. glutinis* EH expressed *in vitro* using the coupled transcription/translation system. Two peaks at 20 min are from racemic styrene oxide standard. Two peaks at 26 min are from the control experiment for negative control in the absence of DNA. Two peaks at 29 min are from the reaction mixture of the enantioselective hydrolysis by the cell-free synthesized EH protein mixture.

## 요 약

Coupled transcription/translation cocktail을 이용하여 *R. glutinis* EH 유전자를 *in vitro*에서 합성하고 활성을 평가하였다. SDS-PAGE 및 immunoblotting을 통하여 45 kDa 크기의 EH 단백질이 발현되었음을 확인하였고, NBP assay 및 chiral GC 분석을 통해 발현된 단백질이 (*R*)-styrene oxide에 대한 입체선택성이 있음을 확인하였다. 따라서 무세포 단백질 합성 시스템을 이용하여 입체선택성을 유지시킨 EH 유전자 발현이 가능하며, 이러한 방법은 putative EH 유전자 탐색 등에 효율적으로 응용될 것이다.

## 감사의 말

이옥경은 Brain Busan 21 scholarship 수혜자임.

## 참 고 문 헌

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biol.* **5**, 112-119.
2. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
3. Choi, W. J., E. C. Huh, H. J. Park, E. Y. Lee and C. Y. Choi. 1998. Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis. *Biotechnol. Tech.* **12**, 225-228.
4. Genzel, Y., A. Archelas, Q. B. Broxterman, B. Schulze and R. Furstoss. 2002. Microbiological transformation 50: selection of epoxide hydrolase for enzymatic resolution of 2-, 3-, or 4-pyridyloxirane. *J. Mol. Catal. B: Enzy.* **16**, 217-222.
5. Jung S. T., S. H. Kang, T. J. Kang, R. G. Kim, S. H. Suh, J. H. Woo, E. Y. Lee and C. Y. Choi. 1999. An efficient translational termination of human erythropoietin in *Escherichia coli* by altering the base following a stop codon. *Biotechnol. Letters* **13**, 761-764.
6. Jung, G. Y., E. Y. Lee, Y. -E. Kim, B. W. Jung, S.-H. Kang and C. Y. Choi. 2000. Stabilization effect of zeolite on DHFR mRNA in a wheat germ cell-free protein synthesis system. *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 193-195.
7. Kang, S. H., T. J. Oh, R. G. Kim, T. J. Kang, S. H. Hwang, E. Y. Lee and C. Y. Choi. 2000. An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. *J. Microbiol. Methods* **43**, 91-96.
8. Katzen, F., G. Chang and W. Kudlicki. 2005. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends in Biotechnol.* **23**, 150-156.
9. Lee, E. Y., S.-S. Yoo, H. S. Kim, S. J. Lee, Y.-K. Oh and S. Park 2004. Production of (*S*)-styrene oxide by recombinant *Pichia pastoris* containing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*. *Enzy. Microbial Technol.* **35**, 624-631.
10. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
11. Zocher, F., M. Enzelberger, U. Bornscheuer, B. Hauer and R. Schmid. 1999. A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity. *Analitica Chemica Acta* **391**, 345-351.