

PCR 기반의 무세포 단백질 발현 시스템을 이용한 절단 트랜스아미나제의 고속생산

¹권 용 찬 · ²박 경 문 · † 김 동 명

¹충남대학교 공과대학 신소재공학부 정밀공업화학과, ²홍익대학교 과학기술대학 화학시스템공학과
(접수 : 2006. 5. 28., 게재승인 : 2006. 7. 22.)

Rapid Preparation of Truncated Transaminases using a PCR-based Cell-free Protein Synthesis System

Yong-Chan Kwon¹, Kyung-Moon Park², and Dong-Myung Kim^{1†}

¹Department of Fine Chemical Engineering and Chemistry, School of Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea.

²Department of Chemical System Engineering, Hongik University, Jochiwon, Chungnam 339-701, Korea
(Received : 2006. 5. 28., Accepted : 2006. 7. 22.)

In this work, we attempted the application of cell-free protein synthesis technology for the rapid generation of truncated enzymes. Truncated DNAs of a transaminase were PCR-amplified and directly expressed in cell-free protein synthesis reactions. Variants of the transaminase were rapidly prepared and analyzed for their enzymatic activity. Described method that combines the PCR and cell-free protein synthesis technologies will offer a versatile platform for the rapid generation of optimally modified protein species.

서 론

최근 유전자 시퀀싱 기술의 급격한 발전으로 인해 다양한 종의 신규 유전자 정보가 폭발적으로 증가하고 있고, 이들 유전 정보들을 효과적으로 단백질의 형태로 번역해야 하는 필요성이 대두됨에 따라 짧은 시간 내에 단백질의 고속 발현/분리/정제가 가능한 무세포 단백질 발현 시스템에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(1). 세포배양공정을 통한 기존의 단백질 생산 공정에 비하여, 무세포 단백질 발현 시스템은 짧은 시간 내에 다 종의 단백질을 생산할 수 있으며, 또한 목적 단백질 발현 조건을 정밀하고 정확하게 조절할 수 있는 등의 다양한 장점을 가지고 있다.

최근까지 무세포 단백질 발현 시스템은 반응액 1 밀리리터당 수~수십 마이크로그램에 불과한 낮은 생산성으로 인해 실용적인 단백질 생산수단으로서 인식되지 못하여 왔다. 그러나 최근 수년간의 연구 결과를 통하여 기존 무세포 단백질 발현 시스템의 낮은 생산성은 주로 세포파괴

액 내에 존재하는 효소들에 의한 주요 기질 (에너지원, 아미노산)의 고갈에 기인하는 것임이 밝혀졌고(2, 3), 이러한 문제점을 해결하기 위한 수단으로서 연속확산식 무세포 단백질 발현 반응기의 사용(3) 및 개선된 ATP 재생 시스템의 도입(4) 등과 같은 방법들이 제시되어 왔다. 그 결과, 현재 무세포 단백질 발현 반응의 생산성은 반응액 1 밀리리터당 수 밀리그램 수준까지 보고되고 있다(5).

본 연구에서는 이러한 고 효율 무세포 단백질 생산 시스템의 특성을 활용하여, 특정 효소의 활성을 위해 요구되는 최소 유전자 서열을 단시간 내에 탐색할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 플라스미드에 클로닝된 유전자를 단백질 발현의 주형으로 사용하는 기존의 무세포 단백질 발현 방식은 플라스미드 벡터로의 클로닝 및 플라스미드의 증폭을 위하여 많은 시간이 요구되었다. 따라서 본 연구에서는 플라스미드로의 클로닝 및 세포배양을 통한 증폭과정을 거치지 않고, PCR 과정에서 증폭된 절단 유전자를 직접 무세포 단백질 합성 반응을 통해 발현하고 발현된 효소의 활성을 측정함으로써 다양한 형태로 설계된 절단 유전자로부터 말단 절단에 따른 효소 활성의 변화를 빠른 시간 내에 확인하고자 하였다.

일반적으로, PCR 증폭된 유전자 등과 같은 선형 DNA는 무세포 단백질 생산 시스템의 세포파괴액 내에 존재하는 핵산분해효소들에 의해서 빠르게 분해되기 때문에 이를

† Corresponding Author : Department of Fine Chemical Engineering and Chemistry, College of Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Tel : +82-42-821-5899, Fax : +82-42-823-7692

E-mail : dmkim@cnu.ac.kr

이용한 단백질 합성의 수율은 낮은 수준에 머물러 왔으나 (7, 8), 최근 본 연구팀은 선형 DNA의 3'-말단에 T7 terminator 서열을 도입시켜서 exonuclease에 대한 mRNA의 안정성을 향상시키고 또한 endonuclease인 RNase E의 활성을 제거한 세포파쇄액을 이용함으로써 선형 유전자로부터 전사된 mRNA의 안정성을 크게 증가시킬 수 있고, 이를 통해서 플라스미드를 사용한 경우와 대등한 수준까지 단백질의 생산성을 높일 수 있음을 보고한 바 있다(6). *Vibrio fluvialis*로부터 클로닝된 트랜스아미나제 (Vf)를 모델 효소로 사용한 본 연구에서는, 이러한 결과를 PCR 기법을 통해 해당 유전자의 3'-말단 서열이 순차적으로 제거된 유전자들을 무세포 발현에 적용하였다. 이를 통하여, 약 5 시간 이내의 짧은 시간 내에, 다양한 길이로 증폭된 변형 유전자들로부터 발현되는 C-말단 절단 효소들의 활성 변화를 측정할 수 있었다.

PCR기법을 통한 유전자의 고속 변형/증폭과 무세포 단백질 발현시스템을 통한 유전자 고속/병렬 반응의 특성을 결합한 본 연구의 결과는 아미노산의 구성 및 서열의 조작을 통해 최적화된 활성 및 기능을 구현하는 효소의 창출에 요구되는 주요한 기술적 기반을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

사용한 균주 및 플라스미드

본 연구에서는 *Vibrio fluvialis*로부터 클로닝된 트랜스아미나제 (Vf)를 모델 효소로 사용하였고, Vf의 유전자 서열을 pIVEX2.3d 벡터 (Roche Applied Science)에 도입하여 플

라스미드 pIVEX2.3d-Vf를 제작하였다. 리보솜 및 기타 번역인자들을 제공하기 위하여 대장균 유래의 세포 파쇄액이 사용되었고, 특히 PCR증폭을 통해서 얻은 선형 DNA를 주형으로 사용하기 위하여 RNase E의 활성이 제거된 균주 [BL21-star(DE3), Invitrogen]로부터 세포 파쇄액을 제조하였다. 세포 파쇄액의 제조는 Kim 등에 의해 기존에 보고된 방법(9)을 따랐다.

무세포 발현을 위한 유전자의 PCR증폭

무세포 단백질 발현을 위한 DNA는 pIVEX2.3d-Vf 플라스미드를 주형으로 사용한 2단계 PCR증폭을 통해서 획득하였다. 트랜스아미나제 Vf의 5'-말단과 상보적인 서열을 일차 증폭을 위한 순방향 프라이머로 사용하였고 역방향 프라이머들은 각각 Vf의 C-말단 쪽의 아미노산이 60개씩 제거된 상태로 증폭되도록 고안되었다. 이후 Mega 프라이머를 사용한 이차 PCR과정을 통하여, 증폭된 유전자의 5'-말단에는 T7 promoter와 리보솜 결합부위 (RBS)가, 3'-말단에는 T7 terminator가 도입되도록 하였다(Table 1 참조).

PCR증폭에 사용한 완충용액, dNTP, DNA 중합효소는 모두 New England BioLabs에서 구입하였고, 증폭된 PCR산물은 Promega사의 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-Up 키트를 사용하여 정제하였다. 기타 시약들은 Sigma사로부터 구입하여 별도의 정제 없이 사용하였다.

무세포 단백질 발현 반응

무세포 단백질 발현을 위한 표준 반응액의 조성은 다음과 같다. 57 mM Hepes-KOH (pH8.2), 1.2 mM ATP, 각 0.85 mM의 GTP, UTP, 및 CTP, 0.64 mM cAMP, 200 mM potassium glutamate, 80 mM ammonium acetate, 34 $\mu\text{g/ml}$

Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Oligonucleotide	Orientation	Sequence(5' -3')
T7P-15UP ^a	Forward	TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGG
Vf-0	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTAGGCAACCTCGGCAAAGAC
Vf-60	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTAGTCGAACGGCGTCTTGTCT
Vf-120	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTACAGCGCAATAGCACAGCC
Vf-180	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTAATAGGTCACGCAGCCCCA
Vf-240	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTAGGCGCCCTCGCGCTGGAT
Vf-300	Backward	ATGATGATGATGATGATGTTAGGTCACGCCGTGATAGGC
Mega-F	Forward	TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG
Mega-B	Backward	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATATGTCGACTTATT AATGATGATGATGATGATG

^aFifteen extra base pairs were added to the 5' end of the T7 promoter in pK7 for its optimal transcription by T7 RNA polymerase

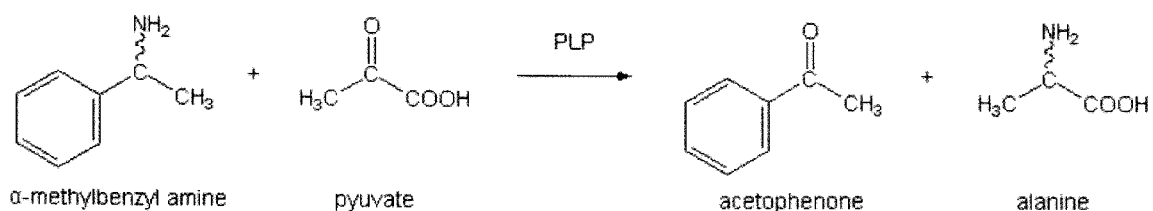


Figure 1. Assay scheme for the expressed transaminases.

folinic acid, 17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T7 RNA polymerase, 각 2.0 mM의 20 종 아미노산, 67 mM creatine phosphate (CP), 24% (v/v) S30 세포파쇄액. 무세포 단백질 발현 반응은 37°C 회분식 반응기에서 2시간동안 이루어졌으며 발현된 단백질의 크기는 13% Tricine-SDS-PAGE(10)를 통해서 확인하였다.

트랜스아미나제 Vf의 활성 스크리닝

트랜스아미나제 Vf의 활성을 스크리닝하기 위한 분석반응에서, 아민 공여체로는 10 mM의 α -methylbenzyl amine이, 아민 수여체로서는 50 mM의 pyruvate가 사용되었다(Fig. 1). 50 mM의 인산완충액 (pH 7.5)를 이용하여 pH를 유지하였고, 아민전이반응을 위한 조효소로서 20 μM 의 pyridoxal-5'-phosphate를 가하여 주었다. 분석 반응은 아민 공여체, 아민 수여체와 조효소의 혼합물에 무세포 발현 반응액을 가함으로써 시작되었으며 37°C 회분식 반응기에서 1시간동안 이루어졌다. 1시간의 반응 후 16% 과염소산을 분석 반응액에 1 : 1의 비율로 첨가하여 종결시키고 원심분리 후 상등액을 취하여 HPLC (Waters)을 이용해 생산물인 acetophenone을 분리하였다. acetophenone의 양은 254 nm에서의 흡광도로부터 측정되었다.

결과 및 고찰

본 연구에서 사용된 PCR 증폭 선형 DNA는 두 단계에 걸친 PCR 증폭 과정을 거쳐서 만들어졌다. 일차 PCR을 통해 C-말단 아미노산이 60개씩 제거된 트랜스아미나제 발현을 위한 ORF를 증폭하였고, 이차 PCR과정을 통해 여기에 T7 terminator 서열을 첨가하였다. 이차 PCR의 정확성과 효율을 증가시키기 위해서는 일차 PCR산물을 agarose 겔에서 분리하여 정제한 후 이차 PCR의 주형으로 사용하는 것이 효과적이었다. 이차 증폭 후 PCR산물들의 크기와 양은 0.8% agarose 겔 분석을 통해서 확인 후 무세포 단백질 발현의 주형으로 사용되었다(Fig. 2).

무세포 단백질 발현 반응액 15 μl 당 0.1 μg 의 플라스미드 또는 약 2 μg 의 PCR산물을 사용하여 정상 길이 혹은 절단된 형태의 트랜스아미나제를 발현하였다. 37°C에서 두 시간동안의 회분식 반응을 통해 발현된 단백질은 13%의 Tricine-SDS-PAGE 후 Coomassie blue염색에 의해 확인하였다. Fig. 2에서 보이는 바와 같이, 플라스미드를 주형으로 사용한 경우나 ORF 전체에 대한 PCR산물을 주형으로 사용한 경우 정상적인 길이의 트랜스아미나제가 발현됨이 아크릴아미드 겔 상에서 뚜렷이 확인되었으며 PCR을 통해 3'-말단을 줄여나간 변이 PCR산물들은 줄어든 유전자의 길이에 비례하여 짧은 크기의 단백질들을 생성함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이때 사용된 세포 파쇄액은 RNase E의 C-말단 477개 아미노산이 제거되도록 유전자 조작된 대장균 균주인 BL21-Star(DE3)로부터 제조되었으며, 정상세포 [BL21(DE3)]로부터 추출된 세포 파쇄액을 사용하였을 경우 PCR증폭된 유전자로부터의 단백질 생성은 미미하여 Coomassie blue로 염색된 gel 상에서 확인될 수 없었다(data not shown).

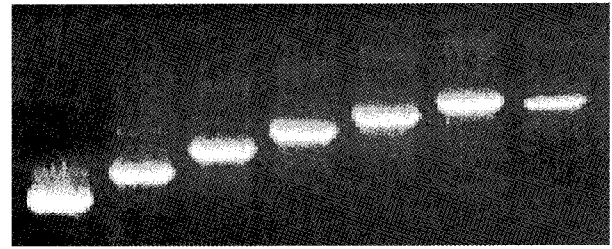


Figure 2. PCR-preparation of the truncated templates for cell-free protein synthesis. After the first PCR step using the forward primer and different backward primers to generated the truncated templates, second PCR reactions were conducted to add the regulatory elements to the ORFs. Details are described in Materials and Methods. The numbers of truncated amino acid residues are indicated.

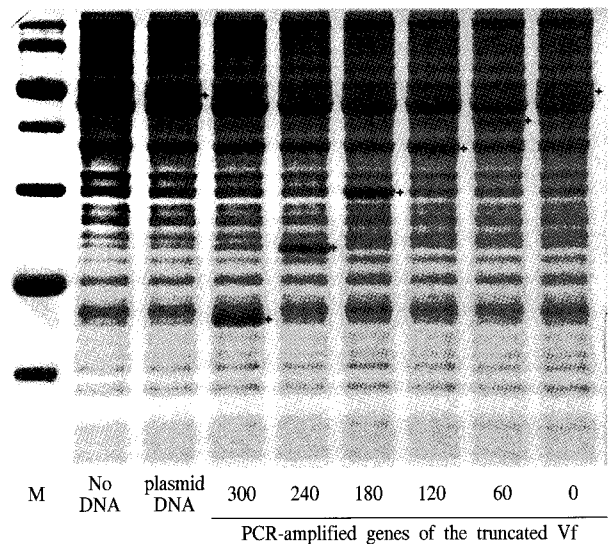


Figure 3. Expression of the PCR-truncated genes. 2 μl of the reaction mixture was loaded on Tricine-SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue.

BL21-Star(DE3) 세포 추출액을 이용하여 발현된 절단 트랜스아미나제의 활성은 pyruvate의 아민전이반응을 통해 생성된 acetophenone을 HPLC로 분리하여 254 nm에서 측정함으로써 결정되었으며 acetophenone 피크는 약 22분경에서 관찰되었다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이, wild type의 트랜스아미나제로부터 60개씩의 아미노산이 제거됨에 따라 점차적으로 효소 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 60개의 아미노산 제거된 트랜스아미나제의 경우 약 60%의 효소활성 감소가 관찰되었고, 120개 이상의 아미노산을 제거해낸 트랜스아미나제는 그 효소 활성을 나타내지 않았다.

본 연구의 목적은 PCR을 통해 다양한 길이로 절단된 유전자를 증폭하고 이를 무세포 발현하여 변형 단백질을 고속으로 합성할 수 있음을 입증하는 것이었으며 발현되는 변형 단백질들의 명확한 분리를 위하여 비교적 많은 양의 아미노산 잔기들을 C-말단으로부터 제거하였다. 한편, 일반적으로 트랜스아미나제는 세포 내에서 이량체를 형성하

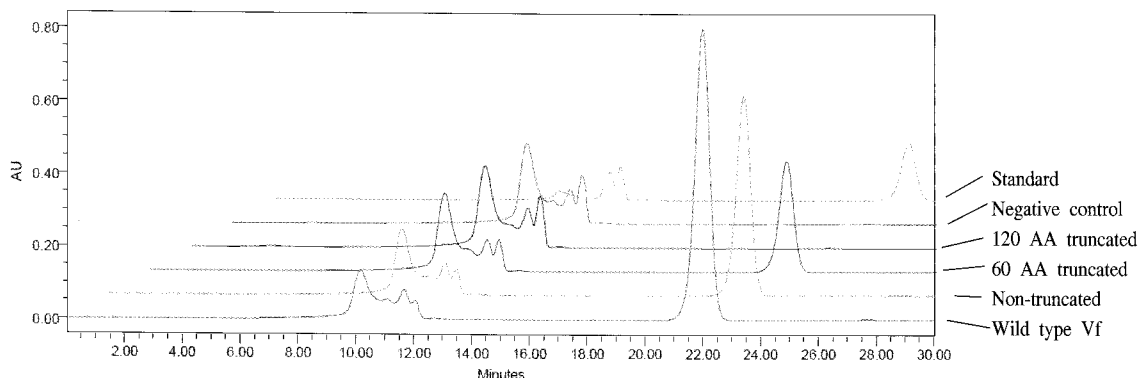


Figure 4. HPLC analysis of the cell-free expressed Vf variants.

고 이러한 이량체의 형성에는 각 단량체의 C-말단 서열이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, C-말단의 아미노산잔기가 대량으로 제거된 트랜스아미나제 Vf는 이량체를 형성하지 못하고 이로 인해 전혀 효소활성을 나타내지 못할 것으로 예상하였으나, 60개의 아미노산이 제거된 경우에도 상당한 활성이 유지되는 결과를 얻을 수 있었다.

PCR을 통해 변형/증폭된 유전자 서열의 무세포 단백질 발현 기술은 본 연구를 위해서 사용한 트랜스아미나제 뿐만 아니라, 유전자 서열이 알려진 다양한 종류의 효소들의 변형체의 고속합성 및 활성분석을 가능하게 함으로써 효소의 최적화된 활성 및 기능의 연구에 요구되는 기술적인 기반을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

PCR증폭기술 및 무세포 단백질 발현 기술의 융합을 통하여, 여러 형태로 서열의 일부가 결손된 단백질들을 고속으로 발현할 수 있는 시스템을 구축하였다. Exonuclease 및 endonuclease에 대한 mRNA의 안정성 향상을 통하여, PCR 증폭을 통해 획득한 선형 DNA로부터 안정적인 단백질 발현이 가능하였다. 동일한 플라스미드로부터 출발하여 수 시간 이내에 C-말단의 아미노산서열이 순차적으로 제거된 다양한 형태의 트랜스아미나제 Vf의 활성변화를 확인할 수 있었으며 이같은 기술은 각종 효소 단백질의 서열-활성 상호관계의 연구를 위한 유용한 기반을 제공할 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역산업공통기술개발사업의 지원 (과제번호: 10021962)을 통해서 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 트랜스아미나제의 유전자를 제공하여 주신 서울대학교 김병기 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Katzen, F., G. Chang, and W. Kudlicki (2005), The past, present and future of cell-free protein synthesis, *Trends Biotechnol.* **23**, 150-156.
- Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov, and Y. B. Alakhov (1988), A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield, *Science* **242**, 1162-1164.
- Kim, D. M. and C. Y. Choi (1996), A semicontinuous prokaryotic coupled Transcription/Translation system using a dialysis membrane, *Eur. J. Biochem.* **239**, 881-886.
- Kim, D. M. and J. R. Swartz (1999), Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system, *Biotechnol. Bioeng.* **66**, 180-188.
- Kim, T. W., C. Y. Choi, and D. M. Kim (2006), Rapid production of milligram quantities of proteins in a batch cell-free protein synthesis system, *J. Biotechnol.* (in press)
- Ahn, J. H., H. S. Chu, T. W. Kim, I. S. Oh, C. Y. Choi, G. H. Hahn, C. G. Park, and D. M. Kim (2005), Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1346-1352.
- Lesley, S. A., M. A. Brow, and R. R. Burgess (1991), Use of in vitro protein synthesis from polymerase chain reaction-generated templates to study interaction of *Escherichia coli* transcription factors with core RNA polymerase and for epitope mapping of monoclonal antibodies, *J. Biol. Chem.* **266**, 2632-2638.
- Pratt, J. M., G. J. Boulnois, V. Darby, E. Orr, E. Wahle, and I. B. Holland (1981), Identification of gene products programmed by restriction endonuclease DNA fragments using an *E. coli* in vitro system, *Nucleic Acids Res.* **9**, 4459-4474.
- Kim, D. M., T. Kigawa, C. Y. Choi, and S. Yokoyama (1996), A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*, *Eur. J. Biochem.* **239**, 881-886.
- Schagger, H. and G. Jagow (1987), Tricine sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* **166**, 368-379.