

## Tyrosine Phenol-Lyase의 고속탐색기술 개발 및 방향성 분자진화

최수림<sup>1</sup> · 나유진<sup>1</sup> · 김도영<sup>1</sup> · 송재준<sup>1</sup> · 홍승표<sup>2</sup> · 성문희<sup>2,3</sup> · 이승구<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>한국생명공학연구원 시스템미생물연구센터, <sup>2</sup>바이오리더스, <sup>3</sup>국민대학교 생명나노화학학과

**High Throughput Screening and Directed Evolution of Tyrosine Phenol-Lyase. Choi, Su-Lim<sup>1</sup>, Eugene Rha<sup>1</sup>, Do Young Kim<sup>1</sup>, Jae Jun Song<sup>1</sup>, Seung-Pyo Hong<sup>2</sup>, Moon-Hee Sung<sup>2,3</sup>, and Seung-Goo Lee<sup>1,\*</sup>.**  
<sup>1</sup>Laboratory of Microbial Function, KRIBB, Daejeon, Korea, <sup>2</sup>Bioleaders Corporation, Daejeon, Korea, <sup>3</sup>Kookmin University, Seoul, Korea – Rapid assay of enzyme is a primary requirement for successful application of directed evolution technology. Halo generation on a turbid plate would be a method of choice for high throughput screening of enzymes in this context. Here we report a new approach to prepare turbid plates, by controlling the crystallization of tyrosine to form needle-like particles. In the presence of tyrosine phenol-lyase (TPL), the needle-like tyrosine crystals were converted to soluble phenol rapidly than the usual rectangular tyrosine crystals. When an error-prone PCR library of *Citrobacter freundii* TPL was spread on the turbid plate, approximately 10% of the colonies displayed recognizable halos after 24 hours of incubation at 37°C. Representative positives from the turbid plates were transferred to LB-medium in 96-wellplates, cultivated overnight, and assayed for the enzyme activity with L-tyrosine as the substrate. The assay results were approximated to be proportional to the halo size on turbid plates, suggesting the screening system is directly applicable to the directed evolution of TPL. Actually, two best mutants on the turbid plates were identified to be 2~2.5 and 1.5-fold improved in the activity.

**Key words:** Tyrosine phenol-lyase, needle-like tyrosine crystal, turbid plate, error-prone PCR, high throughput screening

### 서 론

Tyrosine phenol-lyase(TPL, EC 4.1.99.2)는 티로신을 페놀과 피루브산으로 가수분해하는  $\alpha,\beta$ -제거반응, 같은 기질로부터 페놀과 세린을 생성하는  $\beta$ -치환반응을 촉진하는 효소로서, 다양한 방향족 아미노산 및 유도체의 합성 및 분해에 이용될 수 있다[2, 6, 8]. TPL은 특히 파킨슨병 치료제인 L-DOPA, 바세도우씨 병 치료제인 티로신의 합성을 위한 산업용 생물촉매로도 이용되고 있으며, 티로신을 유도 물질로 첨가한 배지에서 배양한 *Citrobacter freundii*, *Erwinia herbicola* 등의 장내 미생물과 *Symbiobacterium toebii* 등의 고온성 미생물 배양액에서 주로 발견되어 왔다[1, 4, 7].

최근 유전자를 다변화하여 돌연변이 효소 라이브러리를 제조하고 생물촉매 활성이 개선된 돌연변이를 획득하는 방향성 분자진화기술(directed molecular evolution)이 의약품중재, 정밀화학물질 등의 생물학적 합성을 위한 생물촉매기술의 개발에 널리 이용되고 있다[5]. 이러한 방향성 분자진화기술의 효과적인 적용을 위해서는 변이유발PCR(error-prone PCR),

DNA 셔플링(shuffling) 등 유전자변이 라이브러리의 제조기술과 함께, 목적형질을 획득한 돌연변이체를 간편하게 발굴하기 위한 고속탐색기술의 개발이 필수적으로 요구된다[9].

Iwanori 등은 2% 티로신과 0.85%의 4-아미노안티피린(aminoantipyrine)을 한천배지에 첨가하고 TPL 활성에 의하여 티로신이 분해되어서 나타나는 적색 투명환(red halo)을 관찰함으로써 자연에서 분리한 미생물로부터 TPL 활성을 탐색한 바 있다[3]. 그러나 이 방법은 많은 양의 티로신을 첨가하게 되므로 투명환이 관찰되기까지 장시간이 소요되고 불용성 티로신의 분해가 고도로 진행되어야만 한다. 따라서, 고속의 정량적 관찰을 요하는 방향성 분자진화연구에는 적용하기 어려운 단점이 있다.

본 논문에서는 난용성 티로신을 배지에 직접 첨가하는 방법을 대신하여, 세포독성이 적은 친수성 공용매(cosolvent)에 티로신을 고농도로 용해시키고, 평판배지에서 미세 티로신 결정체를 석출시키는 새로운 방법을 적용하여 TPL 활성을 손쉽게 감지하는 새로운 고속탐색기술을 개발하고자 하였다. 이 방법으로 제조한 미세 티로신 결정체는 TPL 활성에 의하여 쉽게 분해 및 가용화될 뿐만 아니라, 불규칙한 니들 형태의 결정을 사용하므로 광 산란도가 높아서 낮은 티로신 농도에서도 쉽게 불투명 평판배지(turbid plate)를 형성하는 장점이 기대되었다.

\*Corresponding author

Tel: 82-42-860-4373, Fax: 82-42-860-4489

E-mail: sglee@kribb.re.kr

## 재료 및 방법

### 미생물 및 플라스미드

대부분의 유전자 조작은 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 를 숙주로 이용하였고, 항시적 고발현 벡터인 pHCEIIB(Bioleaders, Korea)를 사용하는 경우에는 재조합 단백질 발현에 보다 유리한 *Escherichia coli* JM83(F<sup>-</sup> *ara*  $\Delta$ (*lac-proAB*) *rpsL* (Str<sup>r</sup>)[ $\phi$ 80 *dlac* $\Delta$ (*lacZ*)M15] *thi*)를 사용하였다. 재조합 대장균의 배양에는 100  $\mu$ g/ml 암피실린(Amp)을 함유하는 Luria-Bertani 배지(LB, 10 g of tryptone, 5 g of yeast extract, 10 g of NaCl per liter)를 사용하였다.

### 미세 티로신 함유 불투명 평판배지의 제조

Dimethylsulfoxide(DMSO)와 2 N 염산을 혼합한 용매에 티로신을 첨가하고, 1시간 이상 교반하여, 400 mM 티로신 용액을 제조하였다. 결과적으로 티로신 용액 100 m는 티로신(Sigma, USA) 7.24 g, dimethylsulfoxide(Junsei, Japan) 75 ml, 2N 염산 (Junsei, Japan) 25 ml를 함유하였다.

LB-한천배지에서 티로신을 직접 석출시키는 불투명 평판배지의 제조는 다음과 같이 진행되었다. 먼저 LB-한천배지를 멸균한 후, 열 증탕에서 55°C가 되도록 온도를 조절하였고, 1/20 부피의 고농도 티로신 용액을 가한 후 NaOH를 사용하여 pH 7로 조정하였다. 이어서 배지에 거품이 생기지 않도록 서서히 교반하면서 온도를 55°C에서 45°C로 감소시키고 미세한 티로신 결정이 배지에서 대량 발생하도록 하였다. 미세결정 티로신을 함유하는 불투명 배지는 대형 평판플레이트(24 $\times$ 24 cm<sup>2</sup>, SPL, Korea)에 분주하고 급속하게 굳도록 제조하였다.

### 돌연변이 유전자 라이브러리 제조

유전자 라이브러리의 제조를 위하여 GenemorphII Random Mutagenesis Kit(Stratagene, USA)를 사용하여 변이 유발 PCR을 수행하였다. 주형으로는 아미노산배열을 유지하면서 제한효소 *Nde*I의 작용부위를 제거한 *Citrobacter freundii* 유래 TPL(TPL *Nde*I)를 사용하였고, 정방향 프라이머로는 5'-CTC AAG ACC CGT TTA GAG GCC C, 역방향 프라이머로는 5'-ATG CGT CCG GCG TAG AGG AT를 사용하였다. 변이 유발 PCR은, 먼저 95°C에서 2분간 불활성화시킨 후, 95°C에서 30초간 불활성화, 55°C에서 30초간 primer 결합, 72°C에서 2분간 DNA 합성반응을 30회 반복함으로써 유전자 증폭 및 돌연변이 발생을 수행하였다. 정제된 PCR 산물과 항시적 발현벡터 pHCEIIB(BioLeaders, Korea)에 *Nde*I과 *Hind*III를 순차적으로 처리하였고, shrimp alkaline phosphatase(Roche, USA)로 탈인산화시켜서 사용하였다. 준비된 도입 DNA와 벡터는 볼 비 4:1이 되게 섞은 후 T4 DNA 라이게아제(Takara, Japan)를 넣어 4°C에서 24시간 반응시킨 후, 정제하여 돌연변이 라이브러리 제조에 이용하였다.

일렉트로포레이션(electroporation)은 상기 준비한 세포에 DNA를 섞어서 전기충격(18 kV/cm, 25  $\mu$ F)을 가한 후 SOC배지 1 ml를 첨가하여 37°C에서 130 rpm으로 1시간 배양하여 수행하였다. 그 밖의 유전자 조작은 일반적인 방법에 의하여 진행하였다[11].

전체 돌연변이 라이브러리의 회수는 LB-Amp 평판 배지(150 $\times$ 20 mm)에 균체 농도가 약 5,000개가 되게 도말하고 37°C에서 6시간 배양한 후 시료를 30°C로 옮겨 다시 12시간을 더 배양하여 얻었으며, 생성된 콜로니는 10 ml의 보존용액(storage buffer)으로 현탁하여 회수하였다. 보존용액은 2xTY(15 ml), 50% 글리세롤(9 ml), 20% 포도당(3 ml) 및 멸균수(3 ml)를 섞어 제조하였다. 위 시료는 다시 원심분리(5000 $\times$ g, 15 min, 4°C)하여 수득하고 보존 용액을 첨가하여 최종 OD<sub>600</sub>가 100이 되게 현탁한 후 시료를 400  $\mu$ 씩 분주하여 -70°C에 보관하였으며, 일부는 DNA를 분리하여 -20°C에 보관하였다.

### TPL활성의 측정

TPL 활성 유전자를 보유하는 *E. coli* JM83을 LB-Amp 배지를 분주한 96-wellplate(Bioneer, Korea)에 접종하고 HT-MegaGrow(Bioneer, Korea)에서 37°C에서 14시간 배양하였다. 효소활성의 측정은 배양액(35  $\mu$ l)에 동량의 celLytic B(Sigma, USA)를 가하여 세포를 용해시킨 다음, 기질용액 70  $\mu$ l(2 mM 티로신, 20  $\mu$ M pyridoxal 5'-phosphate, 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0))을 첨가하고, 37°C에서 15분 동안 정지 반응하여 수행하였다. TPL반응에 의하여 생성된 페놀의 양은 반응액 50  $\mu$ l에 동량의 0.1 N NaOH를 섞은 후 0.6% 4-aminoantipyrine 15  $\mu$ l, 0.6% potassium persulfate 15  $\mu$ l를 첨가하고, 상온에서 10분간 발색시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하는 방법으로 결정하였다[10]. 이하에서 TPL활성 1 unit은 1분 동안 1  $\mu$ mole의 페놀을 생성하는 효소의 양을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 니들형 미세 티로신 함유 불투명 평판배지

불투명 평판배지에서 투명한 관찰을 통하여 TPL활성을 개량하는 방향성 분자진화기술을 개발하기 위해서는 세포 독성이 적으면서도 티로신을 고농도로 녹일 수 있는 용매의 선정이 필요하였다. 이를 위하여 다양한 친수성 혼합용매를 조사한 결과 DMSO와 2 N 염산(HCl)을 혼합한 공용매(cosolvent)에 난용성 티로신을 첨가하고, 지속적으로 교반하는 경우에 400 mM 이상의 농도까지 티로신이 녹는 것을 확인하였다. 이 농도는 물에 대한 티로신 용해도의 약 100 배에 이르는 것으로서, DMSO가 미생물의 보존제로 이용되는 등 세포독성이 적은 물질임을 감안하면, 본 연구의 목적에 잘 부합하는 용매인 것으로 판단되었다. 20 mM 티로신

을 함유하는 LB 한천배지의 온도조절을 통하여 미세 티로신 결정에 대량 발생시킬 수 있었고 이를 이용하여 저농도의 티로신을 함유하는 불투명 평판배지를 성공적으로 제조하였다.

재결정화를 통하여 제조된 티로신 결정을 현미경 관찰한 결과, 상용 티로신 결정이 컬럼형 입에 반하여(Fig. 1A), 본 연구에서 제조된 티로신 결정은 니들(needle)형으로 확인되었다(Fig. 1B). 니들형의 결정이 불규칙하게 흩어져 있는 경우, 빛의 산란도가 높으므로 Iwamori 등[3]의 방법에 비하여 5배 이상 낮은 농도에서도 불투명한 평판배지를 형성하는 특징이 있었고, 개별 입자의 표면적이 현저히 확대되어서 균질한 현탁 상태를 안정적으로 유지하는 장점이 있었다.

슬라이드글라스 위에 컬럼형과 니들형 티로신 입자를 올려놓은 후, *C. freundii* TPL(사용량 0.04 unit)을 가하여 티로신 분해 및 가용화 속도를 관찰한 결과, 컬럼형 티로신 입자는 3시간까지도 결정이 잔존하였으나(Fig. 2A), 동일한 농도의 니들형 티로신에서는 1.5시간 이후 결정이 관찰되지 않았다(Fig. 2B), 이 결과는 니들형 티로신의 경우 효소반응에 의한 분해속도가 현저하게 빨라지게 됨을 보여주는 것이다.

**TPL 분자진화를 위한 변이유발PCR 라이브러리**

본 연구에서 개발된 고속탐색기술을 *C. freundii* 유래 TPL 유전자의 방향성 분자진화에 적용하기 위하여 변이유발PCR에 의한 돌연변이 라이브러리를 제조하였다. 돌연변이 유전자는 항시적 발현벡터인 pHCEIIB에 클로닝 하였고, *E. coli* JM83에 형질전환하여 TPL유전자의 라이브러리를 제조하였다. 이상의 유전자 라이브러리 제조 과정은 반복된 연구를 기초로 최적화된 것이며 이후 분자진화연구에서 라이브러리



Fig. 1. Microphotograph of L-tyrosine crystals. (A) general column-type and (B) needle-type prepared in this work.

제조에 기반기술로 활용되고 있다. 제조된 변이 유발 PCR 라이브러리의 품질 평가는 형질전환체 희석액을 다양한 배율로 희석하고 LB-Amp평판배지에 도말하여 37°C에서 16 h 배양한 후 콜로니 수를 측정하는 방법에 의해 수행하였다. 계산을 통하여 확인된 총 라이브러리의 크기는 약 32,000개였으며, 이 중 10개의 콜로니를 무작위로 선별하여 콜로니 PCR을 수행한 결과, 대부분 TPL 유전자를 함유하는 양질의 라이브러리로 확인되었다.

변이 유발 PCR에 의한 유전자 변이의 비율 및 선형 분포를 조사하기 위하여 라이브러리로부터 10개의 콜로니를 무작위로 취하여 DNA 배열을 분석한 결과, 돌연변이 비율은 1.377 kb 당 2~6염기로서 1 kb당 1~2개 아미노산의 변화가 일어날 것으로 예측되었다. 유전자 변이가 일어난 위치도 일부 구간에 편향되지 않고 전체 유전자에서 고르게 분포되어 나타났다.

**불투명 평판배지에서 TPL활성의 측정 및 고속탐색기술**

*C. freundii* 유래 TPL 유전자를 발현하는 *E. coli* DH5α를 상기 방법으로 제조한 불투명 평판배지에 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 배양하여, TPL활성에 의한 투명환 형성을 관찰하였다. 그 결과, 활성보유 대장균을 직접 스트리크(streak)한 경우 뿐만 아니라(Fig. 3A), 대장균 희석액을 도말하여 나타난 단일 콜로니에서도 선명한 투명환이 형성되어서(Fig. 3B), 미세 티로신 입자를 함유하는 평판배지를 사용하여 TPL활성을 간편하게 감지할 수 있는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구의 고속탐색기술을 실제 돌연변이 라이브러리의 검색에 이용하고자 하였다. 앞서 제조한 TPL라이브러리를 대형 티로신 평판배지(20x20 cm<sup>2</sup>)에 도말하고 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 콜로니 주변에서 투명환의 형성을 관찰한 결과, 대략 10%의 콜로니 주위에서 투명환 형성이 확인되었다. 투명환을 나타낸 96개의 콜로니를 선별하여 하나의 소형 평판배지에 수집한 후, 24시간 배양하여 얻은 콜로니 및 투명환을 Fig. 4A에 나타내었다.

각 투명환을 정량적으로 측정하기 위하여 Image analyzer (Biorad, USA)를 이용하여 평판 배지의 후면을 촬영하였으

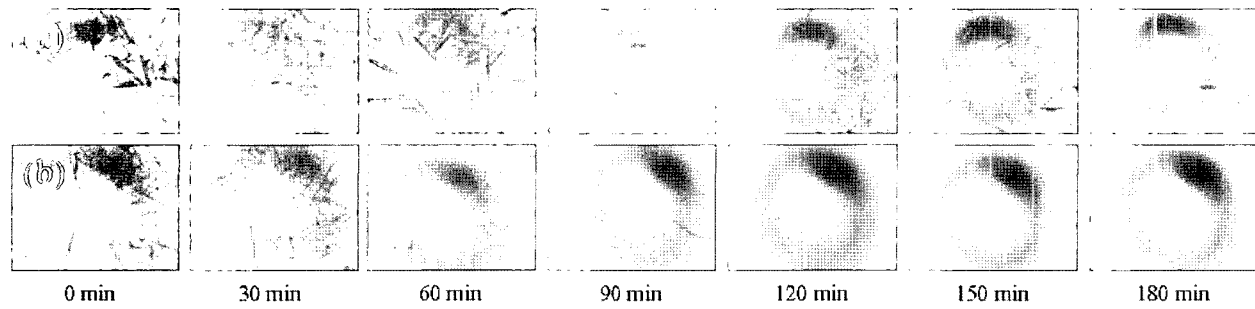


Fig. 2. Degradation and solubilization of L-tyrosine crystal by tyrosine phenol-lyase. (A) General column-type and (B) needle-type prepared in this work.

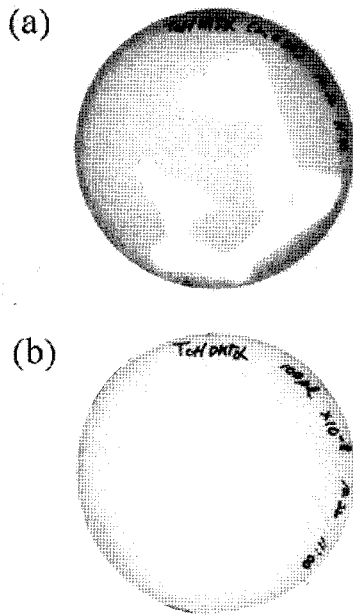


Fig. 3. Observation of TPL activity on L-tyrosine turbid plate. Halos surrounding (A) the streak and (B) single colonies.

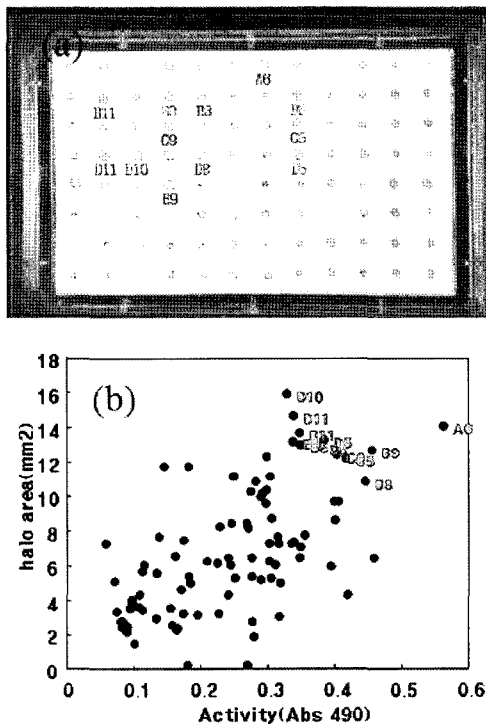


Fig. 4. Correlation of halo sizes and tyrosine phenol-lyase activities. (A) Image analysis of L-tyrosine turbid plate and (B) the proportional increase of halo size with the enzyme activity.

며, 개별 콜로니의 실제 TPL 활성과 비교함으로써, 투명환의 크기와 효소활성의 상관관계를 분석하고자 하였다. 그 결과, Fig. 4B에 나타났듯이 투명환이 크게 관찰된 모든 콜

로니(12개)가 실제 효소활성도 높게 관찰되어서, 미세 티로신 입자로부터 생성된 투명환의 크기와 TPL활성이 정량적인 비례관계에 있는 것으로 확인되었다. 실제로 평판배지에서 가장 선명한 투명환을 형성한 두 개의 돌연변이주(mTPLa, mTPLb)를 분리하여 티로신 분해활성을 검정한 결과, 야생형에 비하여 각각 2~2.5배 및 1.5배 증가된 활성을 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 염기서열 분석을 통하여 돌연변이 위치를 확인한 결과 mTPLa의 경우 Asp2 잔기가 라이신으로 변이되었고, mTPLb의 경우 Ile93이 발린으로, Lys328이 아르기닌으로 변이된 돌연변이주로 확인되었다.

이상에서 살펴본 바와 같이, 본 연구의 TPL 고속 스크리닝 방법을 이용하게 되면, 대량 라이브러리로부터 효소 활성을 고속 스크리닝 할 수 있게 되어, TPL을 합성하는 미생물을 스크리닝 할 수 있으며, 또한, TPL의 효소 변이체 라이브러리에서 활성이 개선된 변이 효소를 분리하는데 유용하게 이용될 수 있어, TPL의 방향성 분자진화(directed molecular evolution) 연구에서 유용하게 사용될 수 있었다. 또한, TPL의 활성도 측정은 투명환의 크기를 비교하여 분석되어지므로, 기존에 분석 방법에 비해 시간과 비용을 월등히 줄일 수 있고, 따라서 TPL과 같은 대량 고속 분석을 요하는 산업용 효소의 개량에 적합한 기술로 판단되고 있다.

## 요 약

티로신 및 방향족 아미노산 유도체의 생물학적 합성에 이용되는 유용 효소인 tyrosine phenol-lyase(TPL) 활성을 평판배지에서 정량적으로 감지할 수 있는 기술을 개발하였다. 불투명 평판배지(turbid plate)의 제조과정은 먼저, 2 N 염산과 DMSO로 조성된 공용매에 난용성 티로신을 400 mM 농도로 녹여서 배지에 가하고, 온도를 조절하여 니들형 티로신을 형성하도록 결정화를 유도하는 것이었다. 니들형 티로신은 일반적인 컬럼형에 비하여 약 5~6배 낮은 농도인 3.6 g/L에서도 불투명 평판배지를 제조할 수 있었으며, 효소활성에 의하여 쉽게 분해되고, TPL활성의 고감도 고속탐색기술 개발에 적합하였다. 이 불투명 평판배지에 변이유발PCR법으로 제조한 TPL 라이브러리를 도말하고, 단일 콜로니 주변에서 형성되는 투명환의 크기와 실측한 TPL활성을 비교한 결과 직접적인 비례관계가 있음을 확인하였다. 따라서 난용성 물질의 미세입자를 평판배지에서 직접 발생시킨 후, 효소활성에 의한 투명환의 형성을 정량 관찰하는 본 연구의 방법은 신규 고효능 TPL의 분리 및 방향성 분자진화 등을 위한 고속탐색기술에 유용하게 사용될 수 있다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지원 청정생산기술 개발사업의 연구비 지원(#10007946)에 의하여 수행되었습니다.

## REFERENCES

1. Barbolina, M. V., R. S. Phillips, P. D. Gollnick, N. G. Faleev, and T. V. Demidkina. 2000. *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase: the role of asparagine 185 in modulating enzyme function through stabilization of a quinonoid intermediate. *Protein Eng.* **13**: 207-215.
2. Faleev, N. G., S. N. Spirina, V. S. Ivoilov, T. V. Demidkina, and R. S. Phillips. 1996. The catalytic mechanism of tyrosine phenol-lyase from *Erwinia herbicola*: the effect of substrate structure on pH-dependence of kinetic parameters in the reactions with ring-substituted tyrosines. *Z Naturforsch [C]*. **51**: 363-370.
3. Iwamori, S., S. Yohino, K.-I. Ishiwata, and N. Makiguchi. 1991. Structure of tyrosine phenol-lyase genes from *Citrobacter freundii* and structural comparison with tryptophanase from *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 147-151.
4. Kiick, D. M. and R. S. Phillips. 1988. Mechanistic deductions from kinetic isotope effects and pH studies of pyridoxal phosphate dependent carbon-carbon lyases: *Erwinia herbicola* and *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase. *Biochemistry* **27**: 7333-7338.
5. Kuchner, O. and F. H. Arnold. 1997. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol.* **15**: 523-530.
6. Kumagai, H., H. Yamada, H. Matsui, H. Ohkishi, and K. Ogata. 1970. Tyrosine phenol lyase. I. Purification, crystallization, and properties. *J. Biol. Chem.* **245**: 1767-1772.
7. Lee, S. G., S. P. Hong, Y. H. Choi, Y. J. Chung, and M. H. Sung. 1997. Thermostable tyrosine phenol-lyase of *Symbiobacterium* sp. SC-1: gene cloning, sequence determination, and overproduction in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **11**: 263-270.
8. Lee, S. G., S. P. Hong, M. S. Kwak, N. Esaki, and M. H. Sung. 1999. Characterization of thermostable tyrosine phenol-lyase from an obligatory symbiotic thermophile, *Symbiobacterium* sp. SC-1. *J. Biochem. Mol. Biol.* **32**: 480-485.
9. Olsen, M., B. Iverson, and G. Georgiou. 2000. High-throughput screening of enzyme libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**: 331-337.
10. Otey, C. R. and J. M. Joern. 2003. High-throughput screen for aromatic hydroxylation, in *Methods in Molecular Biology: Directed enzyme evolution* pp 141, Human Press Inc., NJ.
11. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

(Received Jan. 18, 2006/Accepted Mar. 17, 2006)