

*Rhodotorula glutinis*의 epoxide hydrolase 고효율 발현 유전자 재조합 *Escherichia coli* 생촉매 개발

이수정 · 김희숙*

경성대학교 공과대학 식품공학과

Received February 2, 2006 / Accepted April 5, 2006

Development of Recombinant *Escherichia coli* Expressing *Rhodotorula glutinis* Epoxide Hydrolase. Soo Jung Lee and Hee Sook Kim*. *Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea* – The epoxide hydrolase (EH) of *Rhodotorula glutinis* which has a high enantioselectivity against aromatic epoxide substrates was expressed to high levels in *Escherichia coli* based on codon usage. We analysed the preference of codon usage between the yeast, *R. glutinis*, and bacteria, *E. coli*. *E. coli*, Rosetta(DE3)pLysS, harbors pRARE plasmid with tRNA genes for rare-codons was employed as a host strain. The recombinant *E. coli* expressing *R. glutinis* EH showed an enhanced enantioselective hydrolysis activity toward racemic styrene oxide. Enantiopure (S)-styrene oxide with a high enantiopurity of 99% ee (enantiomeric excess) was obtained from racemic substrates.

Key words – Epoxide hydrolase, *Rhodotorula glutinis*, enantioselective hydrolysis, *Escherichia coli* Rosetta, codon usage

서 론

Epoxide hydrolase (EH, EC3.3.2.3)는 에폭사이드 기질을 diol로 가수분해시키는 효소로써 박테리아, 효모, 곰팡이, 동물, 식물 등의 원핵세포나 진핵세포에서 다양하게 발견되고 있다[1,9,11]. 미생물 유래의 EH는 라세믹 에폭사이드 기질로부터 (R)- 또는 (S)-이성질체 중 한 가지 광학이성질체를 입체선택적으로 가수분해시켜 제거시킴으로써 광학적으로 순수한 에폭사이드를 제조하는 공정에 이용할 수 있는 효소로 평가되고 있어 최근 많은 연구의 대상이 되고 있다[3].

광학활성 에폭사이드(enantiopure epoxide)는 분자구조에 있는 epoxide ring의 반응성이 우수하여 고부가가치 광학활성 중간체로서 광학활성 의약품, 농약 및 기능성 식품 합성용 중간체로 널리 사용되고 있다[2]. EH를 이용한 광학활성 에폭사이드 제조공정에 있어서, EH 활성이 우수한 whole-cell 자체를 생촉매로 사용하는 경우 전체 단백질 대비 EH 발현량이 적어 생산성 향상에 제한이 있으며, 효소를 분리하여 사용하는 경우 대량배양으로 인한 단백질 분리에 어려운 점이 많고, 시간적으로나 비용적인 면에서 많은 불편이 따른다. 이러한 점들을 고려할 때 고효율로 EH를 발현할 수 있는 재조합 생촉매(recombinant biocatalyst)를 개발하므로써 광학활성 에폭사이드 생산 공정에서 경제성 향상에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 이미 보고된 연구개발 결과를 분석해보면, wild type *Rhodotorula glutinis* 대비 *R. glutini-*

nis EH를 *Pichia pastoris*에 overexpression 시켰을 경우, activity가 7~10배가량 상승했으며, (R)-형, (S)-형이 혼합되어 있는 라세믹 styrene oxide 500 mM의 높은 초기농도에서 전체대비 40% 이상(이론수율 50%)의 순수한 (S)-styrene oxide (99% > ee)를 얻을 수 있었다[4]. 그러나 *P. pastoris*의 경우 염색체 DNA에 EH 단백질이 상동성 재조합되어 재조합 유전자의 안정성과 숙주세포의 유기용매 저항성 등이 좋았으나 외래유전자를 1개 또는 몇 개밖에 재조합시키지 못하므로 발현시킨 단백질의 양은 SDS-PAGE 상에서 확인이 곤란할 정도였다. Visser 등은 *R. glutinis*의 epoxide hydrolase를 pKK223-3 vector에 cloning하여, 재조합 단백질 발현용 숙주로 널리 사용되는 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 발현시킨 결과, wild type 대비 1.7배의 활성을 보였으며, SDS-PAGE 상에서 발현을 확인할 수 없을 정도였다고 보고하였다[10]. 또한 저자들이 *E. coli* BL21(DE3)을 이용하여 *Aspergillus niger* EH 유전자를 발현하였을 때, EH 단백질 발현 효율이 매우 낮았으나, codon usage를 고려한 *E. coli* 숙주세포를 사용하여 발현시켰을 경우 라세믹 styrene oxide 20 mM에 대하여 생촉매량 10 mg dcw/ml에서 약 14분 정도의 반응을 통해 30% 정도(이론수율 = 50%)의 높은 수율로 광학순도 99% 이상인 (S)-styrene oxide을 얻을 수 있었다[5]. *R. glutinis*의 경우에도 발현효율이 낮은 이유로 고려할 수 있는 것 중 효모인 *R. glutinis*와 박테리아인 *E. coli*의 codon usage 선호도의 차이를 들 수 있다. *R. glutinis*의 EH 유전자에서는 많이 사용되나 *E. coli*에서는 거의 사용되지 않는 codon들로는, CGG (Arg), CGA(Arg), GGA(Gly), CCC(Pro), CCT(Pro) 등이 있으며 이 codon들은 *E. coli*에서는 0.3~0.8% 정도밖에 사용되지 않는다[7]. 따라서 위의 codon들에 대한 tRNA 유전자

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4713, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : hskim@ks.ac.kr

plasmid를 가지는 숙주세포를 사용하므로써 목적 단백질의 발현을 고효율로 유도할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 codon usage를 고려하여 다양한 방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *R. glutinis* EH를 고효율로 발현시키기 위하여 *E. coli* rare codons에 대한 tRNA 유전자를 가지는 숙주세포인 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS 균주를 사용하였으며 유전자 재조합 EH의 촉매적 특성을 분석하고, 광학활성 styrene oxide 제조용 생촉매로서의 가능성을 평가하였다.

실험 및 방법

균주 및 DNA 조작

R. glutinis ATCC 201718의 epoxide hydrolase (EH) 유전자를 cloning 하기 위하여 DH5a를 사용하였고 발현용 숙주세포로는 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen, USA)를 사용하였다. 세포로부터 plasmid DNA를 정제할 때는 Qiagen사 (Hilden, Germany) 제품인 Qiagen Miniprep Kit를 사용하였고 PCR 산물 또는 agarose gel로부터 DNA를 정제할 때는 Qiagen사의 Qiagen PCR Purification Kit 및 Qiaquick Gel Extraction Kit 등을 사용하였다.

R. glutinis EH 발현벡터 제작

*R. glutinis*의 EH 유전자를 *E. coli*에 발현시키기 위하여 *P. pastoris*에 발현시킬 때 사용하였던 plasmid DNA (pGEM-T/RgEH Y2)를 template로 사용하였다[4]. Forward primer (5RgEH-EcoRI)로 5'-tcgaattcggatcgacacacacattcgcgt - 3'를, reverse primer (3RgEH-XhoI-no stop)로 5'-tctctgagctctccacatgacgcaa - 3'를 사용하였다. 먼저 PCR로 얻은 EH 유전자를 Promega사(Wisconsin, USA)의 pGEM-T easy vector에 삽입시킨 다음 *E. coli* DH5a competent cell에 형질전환 시켜 X-gal (80µg/ml), IPTG (final conc. 0.5 mM) 및 ampicillin (50 µg/ml)이 함유된 LB plate에서 positive colony를 선별하였다. 제한효소를 이용하여 *R. glutinis*의 EH 유전자가 올바르게 삽입되었다고 판단되는 plasmid DNA의 유전자서열을 DNA sequencing을 통해 확인하였다. 확인된 pGEM-T/RgEH plasmid DNA를 *E. coli* expression vector인 pET-21b(+) vector에 삽입시키기 위하여 EcoRI 및 XhoI으로 가수분해하고 0.8% agarose 전기영동을 행한 후 약 1230 bp DNA 조각을 gel로부터 추출하여 pET-21b(+) vector에 삽입시켰다. 삽입된 pET-21b(+)/RgEH DNA를 DH5a competent cell에 형질전환시킨 다음 ampicillin (50 µg/ml)이 함유된 LB plate에 배양하여 positive colony를 선별하였다. 단백질을 발현시키기 위하여 정제한 pET-21b(+)/RgEH plasmid DNA 약 0.1 µg을 Rosetta competent cell 50 µl에 전기충격법을 이용하여 형질전환시킨 후 ampicillin (50 µg/ml)과

chloramphenicol (34 µg/ml)이 함께 함유된 LB plate에 16시간 동안 37°C에서 배양하여 positive colony를 얻었다.

*E. coli*를 이용한 재조합 EH의 발현 및 분석

*R. glutinis*의 EH 유전자를 가지고 있는 재조합 Rosetta seed culture를 주배양액에 넣고 OD₆₀₀값이 0.5가 될 때까지 배양한 후 IPTG를 최종농도 1 mM이 되도록 첨가하고 3시간 30분 동안 더 배양하였으며 대조군으로는 IPTG를 첨가하지 않고 배양한 균을 사용하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 cell pellet을 효소활성과 전기영동의 시료로 사용하였다. 발현된 세포현탁액과 Laemmli buffer의 혼합액을 95°C에서 5분간 가열, 변성시키고 12% gel상에서 SDS-PAGE를 행하여 세포단백질을 분리하였으며, Coomassie Blue 염색 및 immunoblotting analysis를 행하여 발현정도를 비교하였다. Immunoblotting 분석에 사용한 1차 항체로는 anti-hexahistidine polyclonal antibody (H-15, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA), 2차 항체로는 peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG polyclonal antibody (Jackson Immunoresearch, USA)를 사용하였고, CN/DAB (4-chloro-1-naphthol/ 3,3'-diaminobenzidine, Pierce, USA)을 발색시약으로 사용하였다.

입체선택적 가수분해 반응 및 가스 크로마토그래피(GC) 분석

유전자 재조합 *E. coli* 생촉매 40 mg (dry cell weight)을 10 ml의 100 mM 인산완충액 (pH 8.0)에 현탁시킨 후 0.5 - 20 mM 농도로 다양한 라세믹 에폭사이드 기질을 주입하였다. 반응기로는 screw-cap 플라스크 또는 jacketed glass 효소 반응기를 사용하였으며, 30°C, 250 rpm에서 교반시키면서 반응을 진행시켰다. 반응용액을 cyclohexane으로 추출한 후, 유기용매 층을 GC로 분석하여 enantiomeric excess (ee = $\frac{(S-R)}{(S+R)} \times 100(\%)$) 값 및 EH 활성을 평가하였다. 기질인 라세믹 styrene oxide 및 광학적으로 순수한 (R)- 및 (S)-styrene oxide 표준품은 시약 등급을 구입하여 사용하였다. 광학활성 styrene oxide의 ee값 및 수율을 계산하기 위하여 (R)-이성질체와 (S)-이성질체에 대한 분리능이 있는 Supelco사 (Pennsylvania, USA)의 β-Dex 120 (0.25 mm ID, 30 m length, 25 µm film thickness) 컬럼을 사용하였으며 split ratio는 1:100, flow rate는 0.5 ml/min으로 1 ml의 시료를 주입하여 분석하였고, column, injector 및 detector의 온도는 각각 100, 220, 220°C이었다[6].

결과 및 고찰

R. glutinis EH의 codon usage 선호도 분석 및 숙주세포 선택

기존 문헌에 따르면, *R. glutinis* EH 유전자를 클로닝하여 *E. coli*를 숙주세포로 사용하여 얻은 유전자 재조합 *E. coli* 경

우, 단백질 발현정도 및 그 EH 활성이 높지 않았다[10]. 일반적으로 고효율로 발현된 유전자 재조합 미생물의 경우, wild type 균주보다 촉매능이 우수하며, 효소를 분리·정제하여 사용하지 않아도 생촉매로써의 가능성이 높기 때문에 상업적 가치가 매우 높다. 따라서 고효율 유전자 재조합 *E. coli* 생촉매를 개발하고자 할 때 codon usage를 고려하여 *R. glutinis* EH 유전자를 고효율로 발현시키는 것은 상업적 측면에서 중요한 일이다.

*E. coli*에서 주로 사용되지 않는 codon을 살펴보면, 주로 arginine, glycine, leucine 등의 codon 중에서 주로 rare codon들이 존재함이 알려져 있다[8]. *E. coli*의 지수성장기에서 높게 발현되는 195종의 단백질 유전자들을 중심으로 codon usage를 살펴보면 arginine을 coding하는 여섯 개의 codon 중에서 AGG(0.3%), AGA(0.6%), CGG(0.8%), CGA(1.1%)가 rare codon이며, glycine은 GGA(2.0%), isoleucine은 AUA(0.6%), leucine은 CUA(0.8%), proline은 CCC(1.6%) 등이 rare codon이다. *R. glutinis* EH 유전자가 위에 제시되어 있는 *E. coli* rare codon을 사용하는 빈도가 높다면, codon usage 차이에 따라 번역이 제대로 이뤄지지 않아서 발현 효율이 저하될 수 있으므로 *R. glutinis* EH 유전자에 대한 codon을 조사해 보았다(Table 1). Arginine의 경우 *E. coli*에서 rare codon인 AGG, CGA가 높은 비율로 사용되고 있음을 알 수 있었으며 EH gene에 있는 총 14개의 arginine 중 rare codon이 3개가 존재하고 있어 21.4%의 높은 비율로 rare codon이 사용되고 있음을 알 수 있었다. Proline의 경우에서도 총 39개 중에서 19개의 rare codon이 있어 48.7%의 높은 비율로 존재하고 있었다. 따라서 *R. glutinis* EH gene에는 *E. coli*의 rare codon 존재 비율이 다소 높아 고효율로 발현됨이 어려움을 알 수 있었다.

고효율 발현을 위하여 *R. glutinis* EH gene 전체를 *E. coli* 선호도가 높은 codon으로 변경시키는 것은 시간과 비용이 많이 드는 비효율적인 방법이다. 특정 codon의 usage가 낮은 이유는 그 codon에 해당하는 tRNA의 양이 부족한 것이

Table 1. A list of rare codons used in *R. glutinis* EH gene

Amino acid	Rare codon	Fraction I (%) ^a	Fraction II (%) ^b
Arg	AGA	0	0
	AGG	14.3	0
	CGA	7.1	0
	CGG	0	0
Gly	GGA	23.1	1.5
Leu	CUA	0	0
Pro	CCC	25.6	2.5
	CCU	23.1	2.2

^afraction of codon usage of the same amino acid in *R. glutinis* EH.

^bfraction of codon usage of the whole 409 amino acids in *R. glutinis* EH.

므로, 이러한 특정 tRNA를 coding하고 있는 plasmid를 host에 넣어주는 경우 rare codon usage 문제를 해결할 수 있을 것이다. 따라서 *R. glutinis* EH gene을 효율적으로 발현하기 위하여 Arg, Ile, Gly, Leu 및 Pro 등의 rare codon 관련 tRNA 유전자를 가지고 있는 *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS 균주를 숙주로 사용하였다.

R. glutinis EH 유전자 발현 및 특성 분석

이전 연구[4]에서 제작하여 사용하였던 *P. pastoris* 용 재조합 *R. glutinis* EH를 주형으로 하여 PCR을 행한 후 Fig. 1에서와 같이 *E. coli* 발현 vector인 pET-21b(+) vector에 sub-cloning하였다. *R. glutinis* EH 유전자가 들어있는 pET-21b(+)/RgEH plasmid DNA를 Rosetta competent cell에 전기충격법을 이용하여 형질전환시켰으며, EH 단백질의 발현정도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 immunoblotting 분석을 수행한 결과는 Fig. 2와 같았다. *R. glutinis* EH는 1230개 nucleotide, 409개의 아미노산으로 이루어졌으며 분자량은 46.3 kDa 크기의 단백질로써 SDS-PAGE 상으로도 46 kDa 정도의 단백질이 과발현된 것을 관찰할 수 있었으며 His-tag antibody를 이용한 immunoblotting을 행한 결과에서도 같은 크기의 단백질을 관찰할 수 있었다.

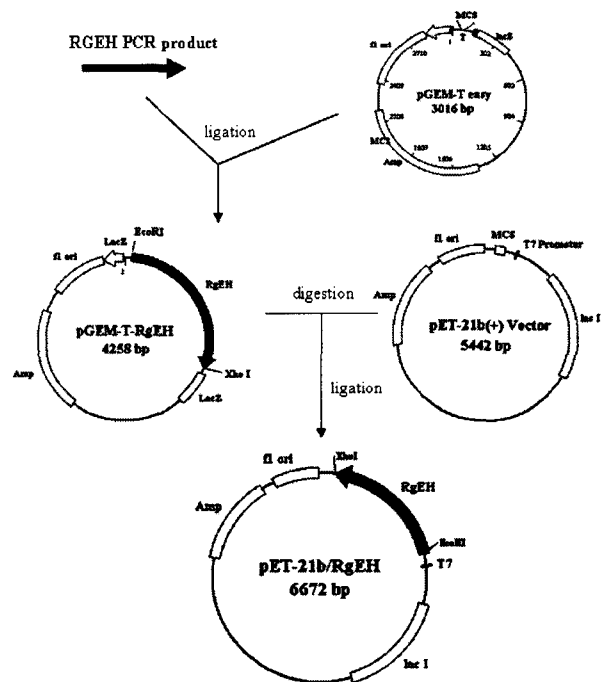


Fig. 1. Construction scheme for pET-21b(+)/RgEH plasmid containing *R. glutinis* EH. Amplified PCR product was ligated into pGEM-T easy vector. RgEH DNA fragment and linear pET-21b(+) Vector digested with *EcoRI* and *XhoI* were ligated together.

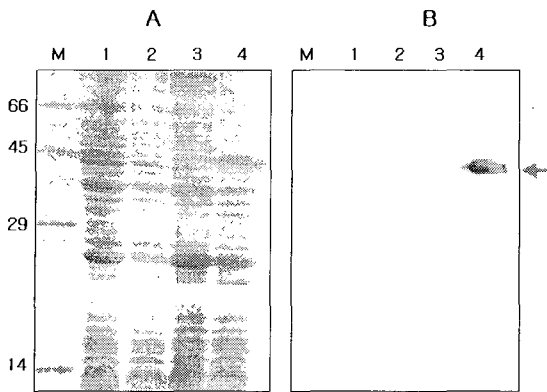


Fig. 2. SDS-PAGE and immunoblotting analysis of recombinant *R. glutinis* EH in *E. coli* Rosetta. EH protein were expressed as the cells were induced with 1 mM IPTG for 3.5 hours. (A) Proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. (B) Proteins on 12% SDS-PAGE gel were transferred electrically to nitrocellulose membrane and immunoblotted with polyclonal hexahistidine antibody. Lane 1, 2: Rosetta cell with vector only without induction or with induction, lane 3, 4: recombinant Rosetta without induction or with induction, M : standard protein marker. Arrow indicates hexahistidine fusion *R. glutinis* EH.

재조합 *E. coli*가 입체선택적 가수분해 활성이 있는지를 확인하기 위하여 재조합 Rosetta 세포를 생축매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 기질에 대한 입체특이성 가수분해 반응을 실시하였다. 재조합 균체 40 mg/ml (dry cell weight)을 100 mM phosphate buffer (pH 8.0)용액에 넣고 20 mM racemic styrene oxide를 주입한 후 30°C, 250 rpm에서 반응을 진행하였으며 반응과정 중 일정량을 샘플링하여 cyclohexane으로 추출하고 chiral GC 분석을 통해 입체특이성 가수분해 반응을 모니터링 하였다. 효소 반응기에서 10분 및 20분 반응 후 반응액을 chiral GC로 분석한 결과, 재조합 Rosetta는 styrene oxide에 대하여 입체특이적인 가수분해활성을 보여주었다 (Fig. 3). 본 연구실에서 *R. glutinis* EH gene을 *E. coli* BL21 (DE3)에 발현시킨 경우 대비 Rosetta에 발현시켰을 경우 약 3배 정도 활성이 높았던 것도 codon usage와 관련이 있는 것으로 설명될 수 있을 것이다(data not shown).

재조합 Rosetta 생축매 특성분석 및 회분식 (S)-styrene oxide 제조

반응액의 styrene oxide 분석을 위해 1 ml의 반응액을 취한 후 1 ml cyclohexane으로 추출하고 유기 용매층을 GC로 분석하여 ee값 및 EH 활성을 평가하였다. *R. glutinis*의 EH유전자를 가지도록 재조합한 Rosetta 균주를 이용하여 (R)-styrene oxide와 (S)-styrene oxide에 대한 재조합 RgEH의 초기 분해 속도를 Fig. 4에 나타내었다. 기질농도를 완충용액에 최대용

해농도인 6 mM로 하였을 때, (R)-styrene oxide에 대한 초기 분해속도가 1600 nmol/min/mg dcw으로 700 nmol/min/mg dcw인 (S)-styrene oxide에 비하여 기질 특이적 EH 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 또한 (R)-styrene oxide 및 (S)-styrene oxide 모두 농도가 낮을 때는 분해속도가 선형적으로 증가하지만, 높을 때는 점차 감소하여 점진적으로 최대치에 도달하는 경향을 보였다.

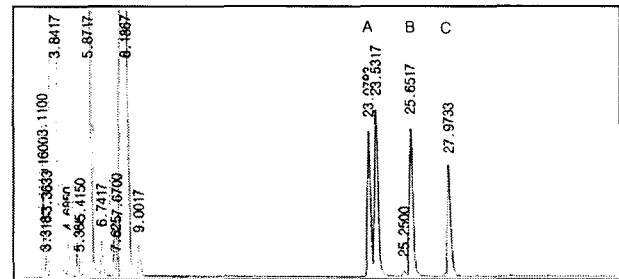


Fig. 3. Chiral GC analysis of racemic styrene oxide substrate after the enantioselective hydrolysis using recombinant Rosetta with pET-21b(+)/RgEH. (R)-enantiomer peak of B, C is disappeared due to the enantioselective hydrolysis by recombinant EH. A: Rosetta with pET-21b(+) vector only, B: recombinant Rosetta with pET-21b(+)/RgEH (10 min reaction), C: recombinant Rosetta with pET-21b(+)/RgEH (20 min reaction).

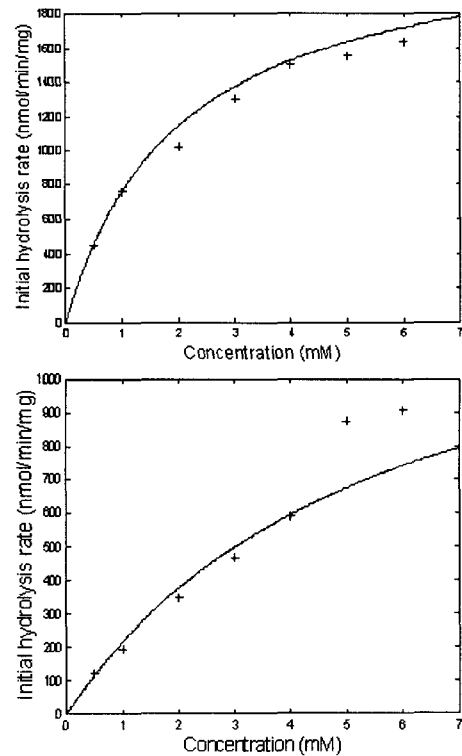


Fig. 4. Effect of substrate concentration on the initial hydrolysis rate of substrate, (R)-styrene oxide (A) and (S)-styrene oxide (B) by recombinant *R. glutinis* EH in Rosetta.

요 약

방향족 에폭사이드 기질에 대한 입체선택적 가수분해능이 우수한 *Rhodotorula glutinis*의 epoxide hydrolase (EH)를 codon usage를 고려한 *Escherichia coli* 균주에서 고효율로 발현할 수 있었다. 효모인 *R. glutinis*와 박테리아인 *E. coli*에서의 codon usage 선호도를 분석하고 그 차이를 고려하여 *E. coli*에서 잘 사용되지 않는 rare codon에 대한 tRNA 유전자정보가 들어 있는 pRARE plasmid를 함유한 *E. coli* 균주인 Rosetta(DE3)pLysS를 숙주세포로 사용하였다. *R. glutinis* EH를 발현시킨 재조합 *E. coli*를 생촉매로 사용하여 라세믹 styrene oxide 혼합물과 반응시켰을 때, (R)-styrene oxide에 대한 입체선택적 가수분해활성이 wild type *R. glutinis* 대비 매우 향상됨을 관찰할 수 있었다. 또한 라세믹 기질로부터 입체적으로 고순도인 99% ee 값을 갖는 광학적으로 순수한 (S)-styrene oxide를 얻을 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2005학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Archelas, A. and R. Furstoss. 2001. Synthetic applications of epoxide hydrolases. *Current Opinion in Chem. Biology* **5**, 112-119.
2. Besse, P. and H. Veschambre. 1994. Chemical and biological synthesis of chiral epoxides. *Tetrahedron* **50**, 8885-8927.
3. Lee, E. Y. 2002. Epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution for the production of chiral epoxides. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 321-325.
4. Lee, E. Y., S.-S. Yoo, H. S. Kim, S. J. Lee, Y.-K. Oh and S. H. Park. 2004. Production of (S)-styrene oxide by recombinant *Pichia pastoris* containing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*. *Enzy. Microbial Technol.* **35**, 624-631.
5. Lee, S. J., H. S. Kim and E. Y. Lee. 2005. Enhanced heterologous expression of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase and application to stereoselective hydrolysis of racemic epoxides. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **17**, (submitted).
6. Manoj, K. M., A. Archelas, J. Baratti and R. Furstoss. 2001. Microbiological transformations. Part 45: A green chemistry preparative scale synthesis of enantiopure building blocks of Eliprodil: elaboration of a high substrate concentration epoxide hydrolase-catalyzed hydrolytic kinetic resolution process. *Tetrahedron* **57**, 695-701.
7. Nakamura, Y., T. Gojobori and T. Ikemura. 2000. Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 292.
8. Novy, R., D. Drott, K. Yaeger and R. Mierendorf. 2001. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Newsletter of Novagen* **12**, 1-3.
9. Steinreiber, A. and K. Faber. 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current Opinion in Biotechnol.* **12**, 552-558.
10. Visser, H., S. Vreugdenhil, J. A. M. de Bont and J. C. Verdoes. 2000. Cloning and characterization of an epoxide hydrolase-encoding gene from *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 415-419.
11. 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.