J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. **50**(2), 107-110 (2007)

Articles

과량 생산된 대장균 laccase의 정제 및 특성

홍준혁 · 김현정 · 김우연*

중앙대학교 산업과학대학 생명공학과

Purification and Characterization of Overproduced *E. coli* Laccase

June-Hyuk Hong, Hyun-Jung Kim and Woo-Yeon Kim*

Department of Biotechnology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

Received May 21, 2007; Accepted June 4, 2007

The putative laccase gene, *yacK* of *Escherichia coli*, K-12 is not expressed in lab culture conditions. The laccase gene was amplified by PCR and subcloned into pET28a vector. The laccase overproduced in *E. coli* harboring pET28a was purified by His-affinity column chromatography. The purified laccase, which has the apparent molecular weight of 55,000 on the SDS-polyacrylamide gel showed enzyme activity on the guaiacol solution and agar plate. Optimun temperature and pH were around 65°C and 5.0, respectively.

Key words: *E. coli* laccase expression, His-affinity column purification

서 론

Laccases(EC1.10.3.2)는 구리를 함유하는 multicopper oxidase의 일종이다. Multicopper oxidase는 진핵생물에 널리 분포하는 금속이온 함유 효소로 독특한 구조를 가지며 특이한 분광적 성질을 가진다.[1] Laccase는 페놀류 기질을 산화시킬 수 있다는 점과 구리를 함유한다는 점에서 tyrosinase와 유사하다. 그리고 laccase는 tyrosinase와 같은 glycoprotein으로서 전체 분자량의 10-45%가 탄수화물로써 이루어져 있으며 곰팡이 laccase는 55,000-99,000, 식물의 laccase는 110,000-140,000에 해당하는 분자량을 가진다. 그러나 laccase는 반응 후 라디칼을 가지는 생성물을 만드는 점에서 tyrosinase와 확연히 구별된다. 대부분 laccase는 3개의 구리 이온을 함유하며, 단백질 구조 내에 구리 결합자리를 3개 가지고 있다. 이 중 1개의 구리 이온은 type-1 구리 결합자리에 위치하는데, 효소가 청색을 띄는 원인이 된다. Type-2 구리 결합자리 역시 한 개의 구리 이온을 함유한다. Type-3 결합자리의 구리는 구리 이온 2개가 단단하게 결합을 이루어 존재하는데, type-2 구리와도 결합을 이룬다. Laccase는 guaiacol, 4-methylcatechol, α-naphthol, *p*-phenylenediamine, 2, 7-diaminofluorene, syringaldazine 등의 기질을 산화시키며, laccase의 반응을 저해하는 물질로 naphthalenediol, cinnamic acid, azide, halogenide ion 등이 알려져 있다.

Laccase는 박테리아,[2] 식물,[3,4] 곰팡이,[5,6] 그리고 곤충[7,8]에 다양하게 분포하고 있지만, 동물에서는 발견되지 않은 것으로 알려져 있다. 식물에서 laccase는 coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohol 등의 물질을 lignin으로 합성하는 데 관여하는 것으로 보인다. 곰팡이는 세포외 및 세포내 laccase를 생산한다. 특히 white rot basidiomycetes에서는 laccase가 peroxidase와 함께 lignin의 분해에 작용하며, 또한 색소의 형성이나 포자를 단단하게 만드는 데 영향을 미친다.[9] 곤충에서 laccase는 alkylquinone을 quinone methide로 바꾸는 작용을 촉진하는 데, 이러한 반응은 곤충에 있어 외골격을 형성하는 데 중요한 역할을 한다.[8,10]

본 실험에서 사용한 *yacK* 유전자(GenBank No. AAC7234.1)는 *Escherichia coli*의 laccase로 추정되는 multicopper oxidase로 알려져 있으며, phenoloxidase, ferroxidase 활성을 가지고 있다.[11] *yacK* 유전자는 28개의 아미노산으로 구성된 leader sequence를 가지고 있어, *E. coli*에서 생성된 단백질은 periplasm까지 분비된다.[12] 본 실험에서는 식물이나 곤충에 비교하여 연구가 거의 되지 않은 *E. coli* K-12의 laccase를 발현시키고 정제하여 앞으로 생체 내에서 그 기능을 밝히는 예비실험을 하고자 하였다.

재료 및 방법

대장균 균주와 Plasmid. Laccase 유전자(*yacK*)의 클로닝과 발현을 위해 사용한 대장균 균주는 K-12인 MG1655와 XL1-BlueMRF'(Stratagene, La Jolla, USA), BL21(DE3)(Novagen, Madison, USA)이었다. 그리고 플라스미드로는 Novagen에서 구입한 pET28a를 사용하였다.

*Corresponding author
Phone: 82-31-670-3063; Fax: 82-31-675-0405
E-mail: wykim@cau.ac.kr

***yacK* gene 클로닝.** 대장균 laccase 유전자(*yacK*)는 K-12인 MG1655로부터 분리한 chromosomal DNA로부터 PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 증폭하였다. *yacK* gene의 PCR에 사용된 각각 26mer인 primer는 *yacK* forward(5'-GACGGATCCATGCAACGTCGTGATTT-3')와 *yacK* backward (5'-CAGAAGCTTGTTATACCGTAAACCCT-3')이었다. Forward primer에는 *Bam*HI, backward primer에는 *Hin*dIII 제한효소 절단 자리를 넣었다. 증폭된 PCR 산물들을 제한효소 *Bam*HI과 *Hin*dIII로 절단한 후 동일효소로 절단한 pET28a와 ligation하여 클로닝하였다. 이 때 사용한 균주는 XL1-BlueMRF'이었다. 재조합 벡터를 *yacK*-pET28a 라고 명명하였다.

Guaiacol agar plate 제조. 본 실험에서는 laccase 단백질 정제 후 역가를 측정하기 위한 기질로 guaiacol을 사용하였다. 액상 LB agar(Bacto tryptone 1 g, yeast extract 0.5 g, NaCl 1 g, Agar 1.5 g/100 m*l*, pH 7.7) 에 최종 농도 0.1%가 되도록 guaiacol을 첨가하였고, 또한 최종 농도 1 mM이 되도록 $CuSO_4$를 첨가한 후 배지를 제조하였다.

Laccase 과량 생산. *yacK*-pET28a 플라스미드를 BL21(DE3)에 형질전환 시켰다. 이 균주를 OD 0.6이 되도록 키운 후, 최종 농도 1 mM이 되도록 IPTG(isopropyl thiogalactoside)를 첨가하여 4시간 더 배양하였다. IPTG를 첨가하지 않은 것을 대조구로 이용하여 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis[13]를 통해 laccase 단백질 생성을 확인하였다.

Laccase 정제 및 투석. *yacK*-pET28a 플라스미드를 가진 BL21(DE3)를 IPTG를 첨가하여 laccase가 과량생산되도록 한 후, 4°C, 8000 rpm에서 원심분리하였다. 이렇게 얻은 균체를 His-affinity column용 1X lysis buffer(50 mM sodium phosphate, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole, 1 mM PMSF, pH 8.0) 4 m*l*에 다시 녹인 후 Qiagen(Valencia, USA)에서 제시하는 방법에 의해 단백질을 정제하였다. 정제를 통해 얻어진 laccase의 imidazole을 제거하기 위해 imidazole이 포함되지 않은 1X lysis buffer에 대하여 투석을 실시하였다.

Laccase activity 확인. 0.1% guaiacol(1 mM $CuSO_4$ 포함) LB agar plate를 이용하여 발현 균주의 laccase 역가를 확인하였다. 용액상의 laccase의 역가는 Doerge 등의 방법[14]에 의거하여 16 mM의 guaicol과 1 mM $CuSO_4$가 포함된 반응액에서 3분간 반응한 후 420 nm의 흡광도를 측정하여 조사하였다.

결과 및 고찰

***yacK* 유전자 클로닝.** K-12인 MG1655 균주로부터 분리해 낸 chromosomal DNA를 template으로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pET-28a에 클로닝하고 이를 XL1-BlueMRF'에 형질 전환 후, kanamycin 내성 colony를 선별하였다. 분리한 플라스미드를 *Bam*HI과 *Hin*dIII 효소로 분해하여 insert를 확인하였다.

Laccase의 과량 생산, 정제 및 역가 확인. *yacK*-pET28a 플라스미드를 BL21(DE3) 균주에 형질전환 시켰다. 형질전환된 BL21(DE3) 균주를 600 nm에서 OD 0.6이 될 때까지 배양한 후 1 mM 이 되도록 IPTG 를 첨가한 후, 4시간 더 배양하였다.

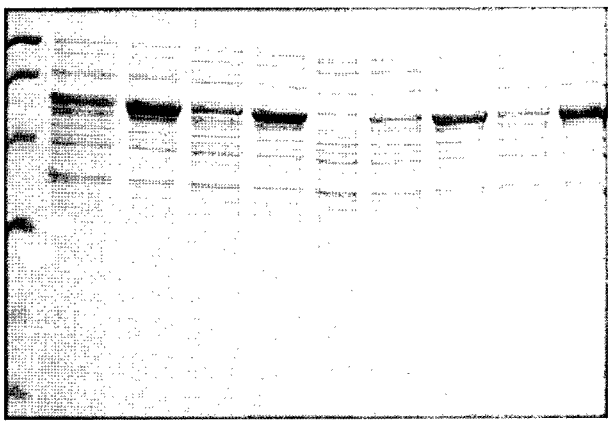

Fig. 1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the laccase produced in *E. coli* BL21(DE3). Lane 1, molecular weight size marker; lanes 2, 4, 7, and 9, pET28a-*yacK* in BL21(DE3) before induction; lanes 3, 5, 8, and 10, pET28a-*yacK* in BL21(DE3) after induction; lane 6, pET28a in BL21(DE3).

Fig. 2. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the laccase purified using His-affinity chromatography. Lane 1, molecular weight size marker; lane 2, input (cell extract); lane 3, flow through; lane 4, binding buffer fraction #9; lane 5, binding buffer fraction #16; lane 6, 60 mM imidazole wash #2; lane 7, 60 mM imidazole wash #5; lane 8, 60 mM imidazole wash #7; lane 9, 60 mM imidazole wash #9; lane 10, 1 M imidazole elution #1; lane 11, 1 M imidazole elution #2; lane 12, extract of cells without IPTG treatment (control).

IPTG 첨가하기 전과 후의 비교에는 12% SDS polyacrylamide gel을 통한 전기영동 방법을 이용하였다. Fig. 1에서 lane 2, 4, 7, 9와 확연히 구별되게 lane 3, 5, 8, 10에서 분자량 55,000 부근의 band가 진해진 것으로 보아 IPTG에 의한 induction으로 단백질이 과량 발현된 것을 알 수 있었다.

pET28a 벡터는 His-tag을 포함하고 있어 단백질 발현 시, 단백질의 N-말단 부위에 His-tag이 붙은 형태의 단백질을 만들게 된다. 과량 생산된 laccase 단백질을 정제하기 위하여 resin에 nickel을 붙여줌으로써, nickel과 histidine의 친화성을 이용하여 단백질을 정제하는 방법인 His-affinity column chromatography를 이용하였다. 정제 정도를 12% SDS-polyacrylamide gel을 통한 전기영동법을 이용하여 확인하였다. Fig. 2에서 laccase는 60 mM imidazole wash 단계에서 가장 진한 band를 보였고, 보통의 His-chromatography column 정제에서 단백질이 용리되는 1 M imidazole elution단계에서는 거의 laccase band를 볼 수가 없었다. 일반적인 단백질과 달리 1 M imidazole elution 단계에

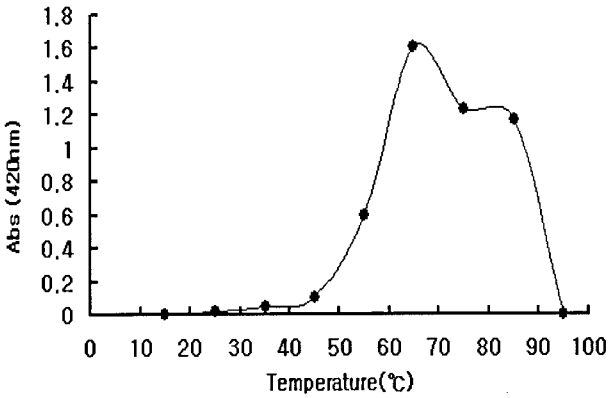

Fig. 4. Optimum temperature for *E. coli* laccase.

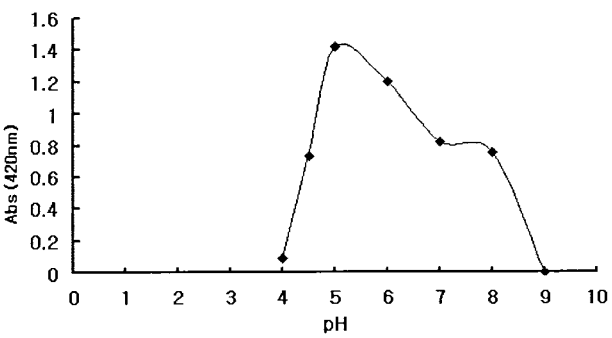

Fig. 5. Optimum pH for *E. coli* laccase.

Fig. 3. Activity assay on guaiacol agar plate. Left, wash buffer (control); right, peak (wash fraction #5).

서 단백질이 분리되어 나오지 않고, 60 mM imidazole wash 단계에서 단백질이 용리되어 나오는 현상이 His-affinity column chromatography를 이용한 laccase 정제의 특징이라 할 수 있다. 이는 아마도 구리를 포함하는 laccase 단백질의 경우, laccase 내부에 있는 구리이온이 과량생산된 단백질에 있는 Histidine tag과 결합하여 상대적으로 재조합 laccase 내의 Histidine-tag의 기능이 상쇄됨으로써, His-affinity 칼럼 내에 있는 구리와의 결합이 약해져 wash 단계에서 거의 모든 laccase 단백질이 분리되어 나오기 때문일 것이다. 정제된 laccase 단백질의 역가를 확인하기 전에 정제 시 wash buffer에 첨가되어 있던 imidazole이 역가에 미치는 영향을 없애기 위하여 투석을 통해 imidazole을 제거하였다.

정제된 laccase와 기질인 guaiacol만 반응시켰을 경우, laccase는 guaiacol을 산화시키지 못하였고, 구리 이온을 첨가하였을 때 비로소 기질 산화 반응을 일으키는 것을 확인하였다. 이는 아마도 구리 결합단백질인 laccase의 구리가 재조합 단백질 내에 있는 Histidine-tag과 결합하여 그 역할을 제대로 하지 못하기 때문일 것이다. 따라서 laccase 역가 확인을 위해 LB plate에 guaiacol과 구리 이온을 첨가하고 pH를 조정하였다. 정제한 laccase와 그리고 60 mM imidazole을 포함하는 wash buffer에 의한 영향을 조사하기 위하여 대조구로 wash buffer와 정제 laccase를 별도로 배지에 떨어뜨린 후, 4-5시간 정도의 반응시간을 주었다. 그 결과, Fig. 3에서 보이는 바와 같이 60 mM imidazole이 포함된 wash buffer만을 떨어뜨린 곳에서는 반응이 일어나지 않았고, 정제 laccase를 떨어뜨린 자리는 붉은 갈색으로 변화하였다. Laccase의 특성을 예비적으로 조사하기 위하여 정제된 대장균 laccase의 최적온도와 최적 pH를 조사하였다. Guaicol을 기질로 사용하였을 경우 그림 4와 5에서 보여주듯이 65°C와 pH 5 부근에서 최적의 값을 나타내었다. 대장균 laccase의 최적 온도와 pH가 보고되지 않았지만, 기질로서 2'-2-azinobis-(3-ethylbenzthianoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 사용한 경우, 곰팡이 *Fome lignous* laccase의 최적 온도는 55°C이며 최적 pH는 2.4로 보고된 바 있다.[15] 대장균 laccase의 최적 온도와 pH가 대장균의 생장 최적 조건과 차이가 나는 것은 아마도 guaicol이 생리적 기질이 아니기 때문일 수도 있으며, 향 후 생리적 기질 발견 후에 최적 온도와 pH를 조사해 보아야 할 것이다.

앞으로 본 실험에서 정제한 laccase를 이용하여 이의 특성을 알아내는 보다 자세한 실험을 수행하며 이것이 결실된 돌연변이균을 이용하여 생리적인 변화를 조사한다면, 이 효소의 대장균 내에서의 역할을 일부 밝힐 수 있을 것이다.

초 록

일반적 대장균 배지 조건에서는 발현되지 않는 대장균 K-12의 laccase gene(*yacK*)을 PCR로 증폭한 후 pET28c에 클로닝하여 과량 발현시켰다. 과량 생산된 laccase를 His-affinity 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. SDS-PAGE 방법으로 확인한 과량 발현된 단백질의 분자량은 약 55,000이었으며, guaiacol 용액과 agar 배지에서 역가를 보여주었고 최적 온도는 65°C, 최적 pH는 5이었다.

Key words: 대장균 laccase 발현, His-affinity column 정제

감사의 글

본 연구는 2004년도 중앙대학교 교내연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. and Machonkin, T. E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563-2605.
2. Alexandre, G. and Zhulin, L. B. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* **18**, 41-42.
3. Mayer, A. M. and Harel, E. (1979) Polyphenoloxidases in plant. *Phytochemistry* **18**, 193-215.
4. Mayer, A. M. (1987) Polyphenoloxidase in plants-recent progress. *Phytochemistry* **26**, 11-20.
5. Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., Dsouza, T. M. and Reddy, C. A. (1994) Laccase and other lignocillulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India. *Bot. Marina* **37**, 515-523.
6. Pelaez, F., Martinez, M. J. and Martinez, A. T. (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* **99**, 37-42.
7. Andersen, S. O. (1985) Sclerotization and tanning of the cuticle, *In*: G. P. Kerkut and L. I. Gilbert (eds). *Comparative Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol. 3. Pergamon Press, New York, pp 59-74.
8. Andersen, S. O., Peter, M. G. and Roepstorff, P. (1996) Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Physol.* **113B**, 689-705.
9. Dean, J. F. D. and Eriksson, K. E. L. (1994) Laccase and the deposition of lignin. *Holzforschung* **48**, 21-33.
10. Peter, M. G. and Wollenberg, U. W. (1997) Phenol-oxidizing enzymes: Mechanisms and applications in biosensors. Frontiers in Biosensorics I, pp 63-82.
11. Kim, C. W., Lorenz, W., Hoopes, T. and Dean, J.F.D. (2001) Oxidation of phenolate siderophores by the Multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli yacK* gene. *J. Bacteriol.* **183**, 4866-4875.
12. Link, A., Robinson, J., K. and Church, G. M. (1997) Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**, 1259-1313.
13. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
14. Doerge, D. R., Divi, R. L. and Churchwell, M. I. (1997) Identification of the Colored Guaiacol Oxidation Product Produced by Peroxidases. *Anal. Biochem.* **250**, 10-17.
15. Liu, W., Chao, Y., Liu, S., Bao, H. and Qian, S. (2004) Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fome lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 174-181.