

## 대장균에서 단백질 분비에 대한 *Agarivorans albus* YKW-34의 Agarase 시그널펩티드의 효과

이주영<sup>1,2</sup> · 송대근<sup>2</sup> · 손진기<sup>1</sup> · 판철호<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>강릉원주대학교 해양생물공학과, <sup>2</sup>한국과학기술연구원 강릉분원 천연물소재센터

### Effect of Agarase Signal Peptide from *Agarivorans albus* YKW-34 on Protein Secretion in *Escherichia coli*

Joo Young Lee<sup>1,2</sup>, Dae-Geun Song<sup>2</sup>, Jin-Ki Son<sup>1</sup>, and Cheol-Ho Pan<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Marine Bioscience and Technology, Division of Marine Bioscience Engineering, Kangnung-Wonju National University, Gangneung 210-702, Korea

<sup>2</sup>Natural Products Research Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST) Gangneung Institute, Gangneung 210-340, Korea

Received January 13, 2010; Accepted March 23, 2010

**To overcome the limitation of *E. coli* expression system such as inclusion body formation and disulfide bond failure, we tried to express the heterologous protein as a secreted form. We adopted agarase signal peptide (ASP; 23 amino acid residues) from *Agarivorans albus* YKW-34 which is one of marine bacteria. When we used ASP to express  $\beta$ -agarase, about 42% activity was detected in media.**

**Key words:** *Agarivorans albus*, *Escherichia coli*, recombinant protein, secretion, signal peptide

1970년대 유전자 재조합 기술이 발전하면서 대장균에서의 재조합 단백질 생산이 시작되었고, 현재는 여러 종류의 세균, 효모, 곰팡이, 곤충세포, 식물세포, 동물세포 등에서도 재조합 단백질의 생산이 이루어지고 있다. 2000년의 산업용 효소 전체 시장은 약 15억 달러, 국내 효소 시장은 약 400억 원 규모로 추산되며, 1980년대 중반까지는 천연효소를 사용하였으나, 이후부터 재조합 효소가 사용되기 시작하면서 빠르게 천연효소 시장에 침투하였다[Oh, 2004]. 점차 증가하고 있는 재조합 단백질의 생산은 사용 목적과 생산 규모에 따라서 여러 종류의 발현 시스템을 사용하고 있으나 가장 많이 이용하는 것은 대장균이다. 이는 유전자 재조합 기술 초기부터 사용되어 분자 생물학적 연구와 발현 시스템에 대한 연구가 가장 많이 되어 있으며 경제적으로도 장점이 있기 때문이다[Baneyx, 1999]. 그러나, S-S 결합이나 번역 후 수식을 필요로 하는 단백질의 경우에는 발현에 실패할 수 있으며, 대량 발현의 경우에는 단백질의 비특이적인 응집이 일어나는 등 대장균에서 재조합 단백질 생산을 위하여 극복해야 할 문제가 여전히 존재한다[Waldo,

2003]. 따라서, 이러한 문제를 해결하기 위하여 발현 수준을 조절하는 프로모터의 사용[Makrides, 1996], 대장균의 유전적 개량[Lara 등, 2006], chaperon co-expression[Kapust와 Waugh, 1999], 재조합 단백질의 분비[Mergulhão 등, 2005]와 같은 방법을 개발하여 사용하고 있다.

본 연구에서는 해양 미생물인 *Agarivorans albus* YKW-34로부터 agarase 유전자 *AgaB34*를 분리하는 과정에서 agarase가 대장균 세포 밖으로 분비되는 현상을 관찰하여, *AgaB34*의 추정 시그널펩티드가 대장균에서 재조합 단백질 분비를 위한 신호로 사용될 수 있는지를 확인하고자 하였다[Fu 등, 2009]. 그래서, *AgaB34*로부터 N-말단 23개 아미노산 잔기에 해당하는 추정의 시그널펩티드를 ASP로 명명하였고, ASP 유무에 따른 대장균에서 단백질 분비 발현의 양상을 관찰하기 위하여 발현 플라스미드를 제작하였다. *AgaB34*를 주형으로 agarase의 N-말단부터 open reading frame(ORF) 전체를 polymerase chain reaction(PCR)으로 증폭하여 발현 벡터인 pET23b(Merck, Darmstadt, Germany)에 클로닝하여 발현 플라스미드 pET23b-agarase(WT)를 얻었으며, ASP를 제외한 부분만을 PCR로 증폭하여 역시 발현 벡터인 pET23b에 클로닝하여 발현 플라스미드 pET23b-agarase( $\Delta$ ASP)를 얻었다(Fig. 1). 각 발현 플라스미드의 염기서열 분석을 통하여 유전자의 변이가 없음을 확인하고 다음 실험을 진행하였다.

\*Corresponding author  
Phone: +82-33-650-3652; Fax: +82-33-650-3679  
E-mail: cheolpan@gmail.com

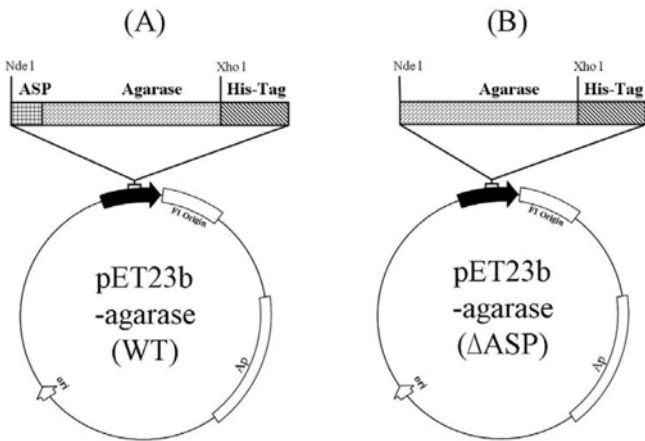


Fig. 1. Constructs of (A) pET23b-agarase (WT) and (B) pET23b-agarase (ΔASP) expression plasmid.

각각의 발현 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)(Merck, Darmstadt, Germany)에 형질전환하고, 형질전환 균주를 200 mL Luria-Bertani(LB) 액체 배지에 접종하여 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였고, 600 nm 흡광도가 0.5에 이르렀을 때, 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위하여 isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)를 0.5 mM 되도록 첨가하였다. IPTG를 넣고 배양 온도를 30°C로 낮추어 200 rpm으로 진탕 배양하면서 세포 안팎의 agarase 활성을 측정하였다(Fig. 2). Agarase의 활성 측정은 균주를 키우면서 매 시간마다 채취한 균체의 용균액과 배양액을 사용하여 환원당을 측정하는 비색법을 사용하였다[Miller, 1959]. 즉, 기질로 0.1% agarose 용액을 사용하였고 시료와 기질을 섞어 37°C에서 반응시키고 환원당과 반응하는 dinitrosalicylic acid 용액을 넣어 반응시켜 575 nm 흡광도를 측정하여 효소 활성을 계산하였다. 효소 활성 1 U은 분당 1 μmol의 D-galactose를 생산하는 효소량으로 정의하였다. 한편 각 시료의 단백질량은 Bicinchoninic acid 방법을 사용하여 측정하였다[Smith 등, 1985].

Fig. 2에서 보듯이 IPTG 첨가 이후 pET23b-agarase(ΔASP) 형질 전환체는 세포내에서만 agarase 활성을 측정할 수 있었으나, pET23b-agarase(WT) 형질 전환체의 경우에는 배양액에서도 agarase 활성을 측정할 수 있었다. 이 결과는 배양액의 agarase 활성이 autolysis가 아닌 분비에 의한 것임을 간접적으로 보여주고 있다. 10시간 배양 후 균체와 배양액을 분리하여, 각각의 agarase 활성과 단백질량을 측정하여 비교함으로써 pET23b-agarase(WT) 형질 전환체의 경우에는 배양액의 비활성이 세포 내에서 보다 3배 정도 높게 나타남을 알 수 있었다

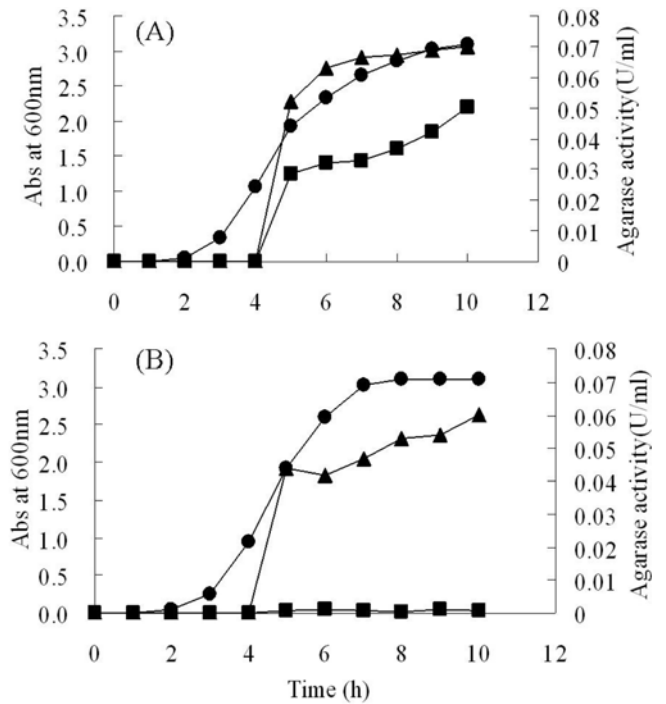


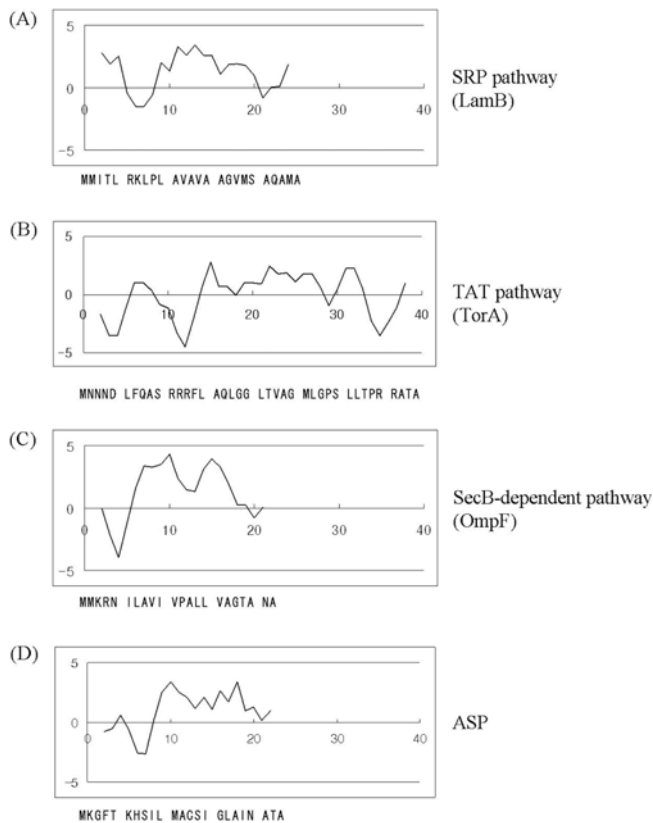
Fig. 2. Cell growth (●) and intracellular (▲) and extracellular (■) agarase activity of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with (A) pET23b-agarase(WT) and (B) pET23b-agarase (ΔASP). Results are the representative of three independent experiments.

(Table 1).

해양 미생물인 *Agarivorans albus* YKW-34에서 분리한 추정 시그널펩티드인 ASP는 23개의 아미노산 잔기(MKGFTKHSILM ACSIGLAINATA)로 구성되어 있으며 Fig. 2의 결과로부터 대장균에서 단백질의 분비를 매개할 수 있음을 확인하였다. 대장균에서 작동하는 것으로 알려진 시그널펩티드를 살펴보면 각각의 단백질 분비 경로마다 특징을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 우선 type I 경로의 경우 일련의 아미노산 잔기가 재조합 단백질의 C-말단에 붙어 발현되는 것으로 보고되었다[Fernández와 de Lorenzo, 2001; Gentshev 등, 2002; Koronakis, 2003]. 따라서 ASP는 type I과는 다른 경로로 단백질을 분비시킴을 알 수 있다. 한편, type II 경로에는 signal recognition particle(SRP), twin-arginine translocation(TAT), SecB-dependent pathway의 3가지 경로가 보고되었다[Mergulhão 등, 2005]. 각 경로에 해당하는 시그널펩티드의 아미노산 조성을 보면, SRP pathway는 높은 비극성을 가지는 아미노산 잔기들로 구성되어 있고, TAT pathway는 두 개의 arginine이 연속으로 배열되는 특징을 가지며, SecB-dependent pathway의 경우

Table 1. Agarase production from *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET23b-agarase (WT) and pET23b-agarase (ΔASP), respectively. Results are the representative of three independent experiments

	Agarase (WT)		Agarase (ΔASP)	
	Supernatant	Cell lysate	Supernatant	Cell lysate
Total Protein (mg)	18.9	78.2	18.1	94.1
Total Activity (U)	7.18	10.01	-	8.61
Specific Activity (U/mg)	0.38	0.13	-	0.09



**Fig. 3. Hydropathy plots of each signal peptide of type II secretion pathway and ASP by Kyte-Doolittle scale [Kyte and Doolittle, 1982]. (A) SRP pathway (LamB) [Pratap and Dikshit, 1998], (B) TAT pathway (TorA) [Barrett *et al.*, 2003], (C) SecB-dependent pathway (OmpF) [Choi and Lee, 2004], (D) ASP in this study**

에는 18~30개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 N과 C-말단에는 극성, 가운데 부분에는 비극성인 아미노산 잔기로 구성되는 특징을 가지고 있다. 본 연구의 ASP는 전체 23개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, N과 C-말단에는 극성, 가운데 부분에는 비극성인 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, arginine 잔기는 존재하지 않으므로 type II의 SecB-dependent pathway를 통하여 재조합 단백질을 분비시키는 것으로 추측할 수 있다 (Fig. 3).

pET23b-agarase(WT) 형질 전환체의 경우, 세포내에 50% 이상의 agarase 활성이 잔류하는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 agarase의 생산 속도가 분비 속도보다 빠르기 때문으로 생각되며, 재조합 단백질을 효과적으로 분비 생산하기 위해서는 시그널펩티드의 사용과 동시에 분비 경로를 활성화할 수 있는 방법이 고려되어야 할 것이다. 이를 위하여 ASP의 분비 경로를 보다 잘 이해하기 위한 후속 연구가 진행 중이며, 진핵세포 유래의 재조합 단백질의 분비생산 연구가 함께 진행 중이다.

### 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02) 지원으로 수행되었음.

### 참고문헌

- Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 263-292.
- Barrett CML, Ray N, Thomas JD, Robinson C, and Bolhuis A (2003) Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm* **304**, 279-284.
- Choi JH and Lee SY (2004) Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 625-635.
- Fernández LA and de Lorenzo V (2001) Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Mol Microbiol* **40**, 332-46.
- Fu XT, Pan CH, Lin H, and Kim SM (2009) Gene cloning, expression, and characterization of a  $\beta$ -agarase, AgaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 257-264.
- Gentschev I, Dietrich G, and Goebel W (2002) The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol* **10**, 39-45.
- Kapust RB and Waugh DS (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**, 1668-1674.
- Koronakis V (2003) TolC-the bacterial exit duct for proteins and drugs. *FEBS Lett* **555**, 66-71.
- Kyte J and Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.
- Lara AR, Vazquez-Limón C, Gosset G, Bolívar F, López-Munguía A, and Ramírez OT (2006) Engineering *Escherichia coli* to improve culture performance and reduce formation of by-products during recombinant protein production under transient intermittent anaerobic conditions. *Biotechnol Bioeng* **94**, 1164-75.
- Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512-538.
- Mergulhão FJM, Summers DK, and Monteiro GA (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances* **23**, 177-202.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-428.
- Oh SH (2004) Trends in the market of the industrial enzyme. *Food industry and nutrition* **9**, 10-17.
- Pratap J and Dikshit KL (1998) Efficient of signal peptide changes on the extracellular processing of streptokinase form *Escherichia coli* requirement for secondary structure at the cleavage junction. *Mol Gen Genet* **258**, 326-333.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85.
- Waldo GS (2003) Genetic screens and directed evolution for protein solubility. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 33-38.