

## 싸리에서 isoflavone synthase 유전자의 분리 및 생화학적 특성

김 봉 규\*

건국대학교 생명공학과, 건국대학교 생명분자정보학 센터

### Cloning and Characterization of Isoflavone synthase from *Lespedeza bicolor*

Bong-Gyu Kim\*

Department of Bioscience and Biotechnology, Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

Received March 2, 2010; Accepted March 17, 2010

**None of genes from *Lespedeza bicolor* involved in isoflavonoid biosynthesis have been biochemically characterized. An isoflavone synthase from *Lespedeza bicolor* was cloned. To verify its catalytic activity, a fusion protein of LbIFS with P450 reductase from rice was made. Using this construct, production of isoflavone from flavanone was confirmed.**

**Key words:** *Biotransformation, isoflavonone, isoflavones synthase, Lespedeza bicolor*

이차대사 산물 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 플라보노이드는 지금까지 약 10,000종류 이상이 보고되고 있다[Tahara, 2007]. 플라보노이드는 페닐프로판노이드 합성경로를 통하여 만들어지며 구조적 특성에 따라 크게 flavanones, flavones, flavonols, isoflavones, anthocyanins, flavans 등으로 나뉘어진다[Forkmann과 Heller, 1999]. 이들 중 이소플라본은 몇 가지식물에서 발견되기도 하지만, 주로 콩과 식물(*Fabaceae*)에 한하여 제한적으로 존재하는 것으로 알려져 있으며[Reynaud 등, 2005] 식물병원성 미생물이나 곰팡이의 공격, UV와 같은 환경재해로부터 식물을 보호해주는 방어신호물질로 작용한다[Akashi 등, 1999]. 콩과 식물이 질소 고정균과 공생관계를 이룰 때 서로를 인지할 수 있도록 도와 주는 신호전달 물질로도 작용한다[Ferguson과 Mathesius, 2003]. 이소플라본은  $\beta$ -estradiol 과 유사한 구조를 하고 있기 때문에 호르몬과 관련된 질병에 유익할 뿐만 아니라 심장병예방, 골다공증예방 및 항산화, 항염, 항암 효과 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다[Veitch 등, 2007]. 예를 들어 genistein은 topoisomerase II와 tyrosinase의 활성을 억제하여 암세포의 분화를 억제하고[Akiyama 등, 1987], 2'-hydroxygenistein은 MCF-7 유방암 세포에 대하여 높은 항증식성을 보이는 것으로 보고되었다[Choi 등, 2009].

이소플라본은 플라보노이드 생합성의 일반적인 생합성 경로를

통하여 만들어진 flavanone(naringenin, eriodictyol, liquiritigenin 등)들을 기질로 하여 이소플라본 합성효소(isoflavone synthase)에 의해서 촉매 된다[Akashi 등, 1999]. 이소플라본 합성 유전자는 한약재로 많이 사용되고 있는 감초로부터 처음 분리 보고 하였으며, 대두, 레드 클로버 등과 같은 콩과 식물에서 주로 분리되고 되었다[Akashi 등, 1999; Jung 등, 2000; Kim 등, 2003].

싸리(*Lespedeza bicolor*)는 다양한 이소플라본 유도체들을 가지고 있는 것으로 보고 되고 있다[Maximov 등, 2004]. 하지만, 지금까지 싸리에서 이소플라본 생합성에 관련된 유전자들에 대한 연구가 거의 이루어져 있지 않다. 이소플라본 생합성에 중요한 역할을 담당하고 있는 isoflavone synthase 유전자를 클로닝 하고 기능적으로 분석함으로써 싸리에서 이루어지는 이소플라본 생합성과정을 이해하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

싸리로부터 이소플라본 합성유전자를 분리하기 위하여 RT-PCR방법을 이용하였으며, 프라이머는 Kim 등(2003)이 사용한 것과 동일하게 사용하였다. 종자를 파종한 후 약 50일 정도 성장한 싸리 묘묘의 전 부위를 액체질소로 곱게 갈아 Qiagen plant total RNA isolation kit(Qiagen, Germany)로 total RNA를 분리하였으며 Kim 등(2003)에서 사용된 방법과 동일한 방법으로 cDNA를 합성하였고, Kim 등(2003)의 연구에서 사용된 동일한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 약 1.0 kb의 PCR산물을 얻었고, pGEMT-easy(Promega, USA) 벡터에 subcloning하여 염기서열을 결정하였다. NCBI 데이터베이스에서 blast를 실시한 결과 *Vigna unguiculatam*, *Glycine max* 이소플라본 합성유전자와 92%, 91%의 유사성을 보였다.

\*Corresponding author

Phone: +82-2-450-3764; Fax: +82-2-3437-6106

E-mail: dkimbk@hanmail.net

doi:10.3839/jabc.2010.011

**Table 1. Bioconversion of flavones and flavanones by whole cell biotransformation with *E. coli* expressing *LbIFS-RCPR***

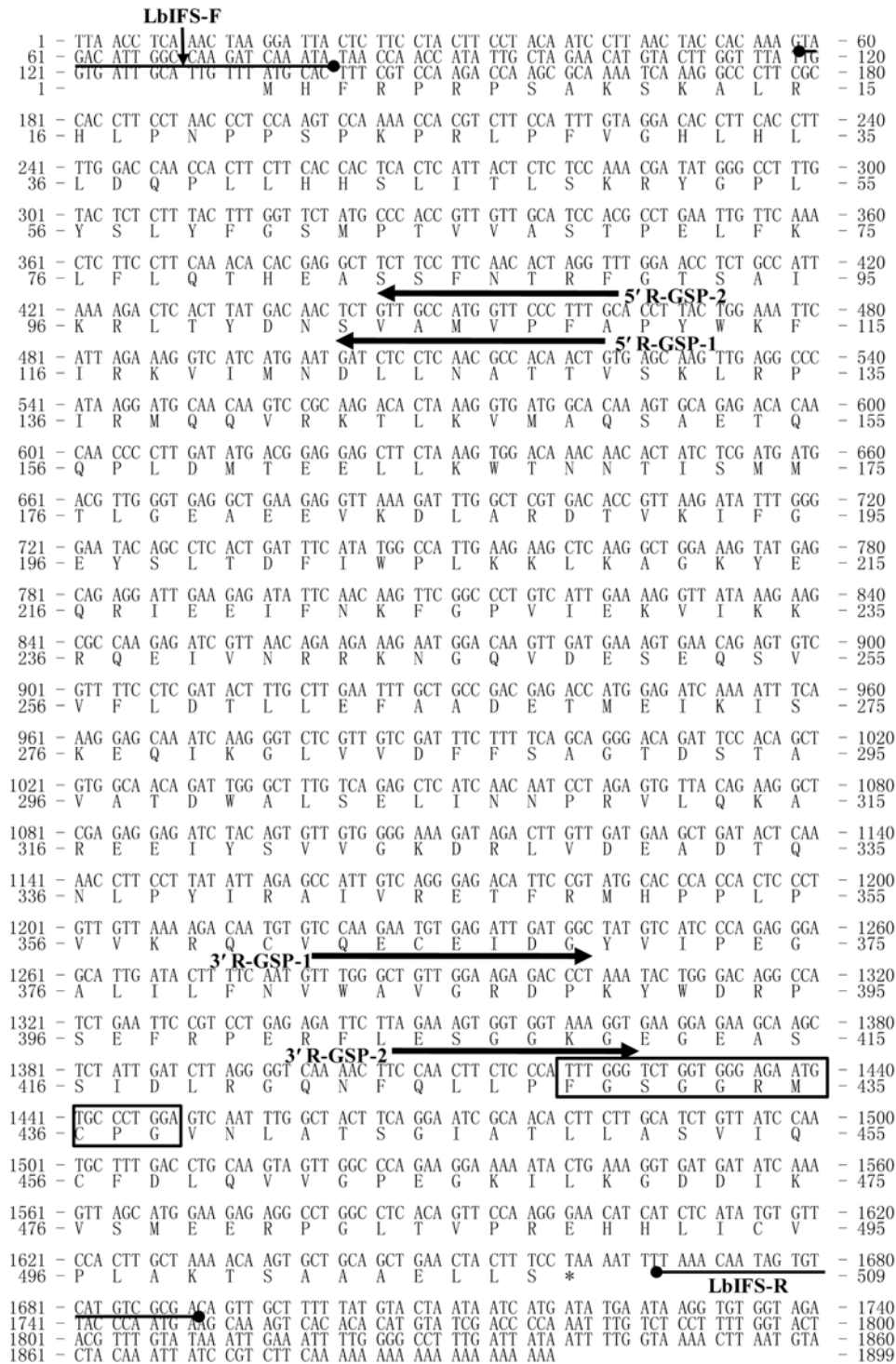
Substrate	Structure	Biotransformation	Substrate	Structure	Biotransformation
Apigenin		nd	Naringenin		genistein
Luteolin		nd	Sakuranetin		nd
Eriodictyol		nd	liquiritigenin		daidzein
Homo-eriodictyol		5,7,4'-trihydroxy-3'-methoxyisoflavone	Pinocembrin		nd

nd: not detected

전체 IFS합성유전자를 얻기 위하여 5'과 3' RACE(rapid amplification of cDNA ends)를 실시하였다. 5' RACE를 위한 프라이머는 5'-GCAAAGGGAACCATGGCAAC-3', 5'-CAGTTGTGGCGTTGAGGAGATC-3'이었으면, 3' RACE를 위한 프라이머는 5'-TTGGGCTGTTGGAAGAGACCC-3', 5'-TCCAACCTCTCCCATTTGGG-3'이었다. 5' RACE를 실시한 결과 약 600 bp의 염기서열을 얻을 수 있었으며, 전사 개시 코돈을 포함하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 1). 3' RACE 결과 약 550 bp의 PCR 산물을 얻었으며 종결 코돈을 포함하고 있었다. Full length 싸리 이소플라본 합성유전자는 *LbIFS*로 명명하였다. *LbIFS*는 1,529 bp의 ORF(open reading frame)로 구성되어 있고, 약 57.3 kDa의 단백질을 코딩하고 있는 것으로 예상되었다. Blast 분석 결과 *Vigna unguiculata*, *Lotus japonicas*, *Medicago truncatula*의 이소플라본 합성유전자와 각각 93, 92, 91%의 높은 유사성을 나타냈으며, P450 유전자들의 특징인 cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature[Nebert과 Gonzalez, 1987] 가 아미노산 429번째에서 438번째에 존재하고 있었다(Fig. 1).

플라보논의 B링 이동을 촉매하는 이소플라본 합성유전자(IFS)는 플라보노이드의 hydroxylation을 촉매하는 flavonoid 3' hydroxylase(F3' H), flavonoid 3'5' hydroxylase(F3'5H), flavonoid 6 hydroxylase(F6H), C링의 2번 탄소와 3번 탄소 사이에 이중 결합을 형성을 촉매 하는 flavonone synthase II 등과 마찬가지로 cytochrome P450s(CYP450s)에 속한다[Winkel-Shirley B, 2001; Kim 등, 2009]. CYP450 들은 반응을 촉매 하기 위하여 cytochrome P450 reductase(CPR)의 도움을 받아 NADPH로부터 전자를 제공받아야 한다[Akashi 등, 1999; Jung 등, 2000]. 대장균에서는 전자전달을 도와 주는 CPR유전자가 없기 때문에

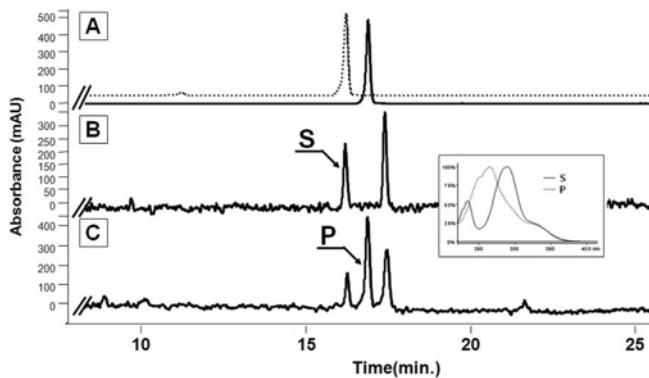
CYP450 유전자들을 기능적으로 발현시키기가 어렵다. 또한, CYP450s과 CPR 유전자는 소포체의 막에 targeting 될 수 있는 signal peptide를 가지고 있는데 대장균은 이러한 기관을 가지고 있지 않기 때문에 단백질의 번역 과정 중에 오류로 인하여 정상적으로 기능을 할 수 있는 단백질을 만들지 못한다[Akashi 등, 1999; Jung 등, 2000]. 대장균에서 이런 문제점을 해결하고 *LbIFS* 유전자를 기능적으로 발현시키기 위하여 CPR유전자와 키메라 유전자를 제작하였다. 먼저 웹사이트 Pôle Bioinformatique Lyonnais에 포함되어 있는 MLRC SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 프로그램([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_mlrc.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_mlrc.html))을 이용하여 *LbIFS*의 소포체의 membrane anchorage domain를 조사하였다. 그 결과 *LbIFS*는 N-말단에 13개의 아미노산이 helix motif를 가지는 것으로 예측되었다. CPR은 이전 연구에 의하면 벼에서 클로닝한 유전자가 IFS의 반응시 좋은 전자전달 효율을 보이는 것으로 보고 되었기 때문에 이번 연구에서는 벼의 CPR유전자(*RCPR*)를 사용하였으며 Kim 등(2009)이 보고한 바와 같이 동일하게 N-말단을 제거하였다. Leonard와 Koffas(2007)의 연구에 의하면 IFS유전자와 CPR유전자를 각각 클로닝 하여 발현시키는 것보다 transcriptional fusion을 시키는 것이 더 효율적이라는 것을 보였기 때문에 본 연구에서도 동일한 방법으로 transcriptional fusion 시켰다. 먼저 *LbIFS*의 N-말단의 membrane anchorage domain으로 예측된 13개의 아미노산을 제거하고 *RCPR*과 transcriptional fusion시키기 위하여 5'-ATGGATCCCATGCTTCGCCACCTTCCTAA-3'(밀줄 BamH I, 이텔릭체 initiation codon)와 5'-ATCGTCGACCCGAAAGTAGTTTCAGCTGCA-3'(밀줄 Sal I) 프라이머를 제작하였다. Forward 프라이머에는 아미노산 15개를 제거하고 첫 번째 코돈을 ATG로 교



**Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of isoflavone synthase (LbIFS) cloned from *Lespedeza bicolor*.** The nucleic acid sequence of the LbIFS is expressed on the top line, and deduced amino acid sequence is shown lower. The stop codon is marked with an asterisk. Primer sites used for a RACE and RT-PCR were presented by arrows with the primer name, respectively. The cytochrome P450 cysteine heme-iron ligand signature ([FW]-[SGNH]-x-[GD]-{F}-[RKHPT]-{P}-C-[LIVMFAP]-[GAD]) predicted by the ExPASy program (<http://www.expasy.ch/prosite/>) was boxed.

체하였다. 또한 reverse 프라이머는 종결 코돈을 제거하고 RCPR과 서로 독립적으로 삼차구조를 형성할 수 있도록 도와 주기 위하여 Gly-Ser-Thr linker 를 도입 하였다. RCPR의 클로닝은 Kim 등(2009)과 동일한 방법을 이용하였다. 제작된 두 프라이머를 사용하여 LbIFS을 PCR방법으로 증폭하였다. PCR 산

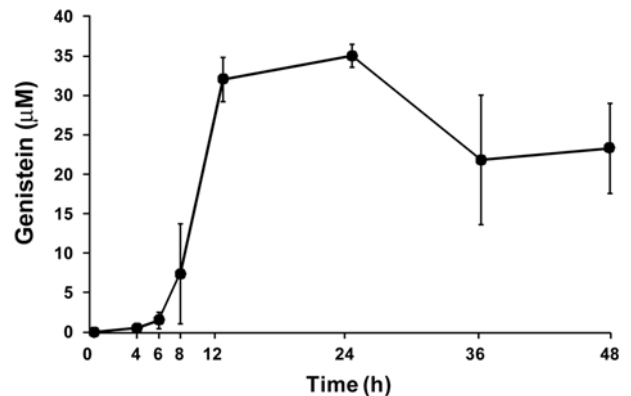
물은 PCR purification kit(Bioneer, Daejeon, Korea) 를 이용하여 정제한 후 제한효소 BamH I과 Sal I으로 처리하였다. 이를 RCPR과 연결하기 위해 대장균 단백질 발현 벡터인 pGEX에 클로닝 되어 있는 RCPR유전자가 들어 있는 construct(Kim 등, 2009)를 사용하여 LbIFS를 클로닝 하였다. 최종 construct는



**Fig. 2. HPLC analysis of reactants produced by whole cell biotransformation with *E. coli* harboring of *LbIFS-RCPR* using HPLC.** A: authentic compounds (dotted line: naringenin, solid line: genistein). B: reaction product with pGEX vector as control (S: naringenin). C: reaction product with *LbIFS-RCPR* (P: reaction product). Inset box indicates UV-spectra of authentic compounds (S: naringenin, P: genistein).

DNA 염기서열 분석을 통하여 확인하고, *LbIFS-RCPR*로 명명하였으며, 최종적으로 *E. coli* BL 21(DE3)에 형질전환 하였다.

*LbIFS-RCPR*은 대장균에서 발현이 이루어 졌지만, 발현 양이 적고 또한 효소의 안정성이 떨어져 *in vitro* assay 를 수행할 수 없었다. 이러한 결과는 이미 래드 클로버 IFS 유전자를 이용하여 대장균에서 수행한 연구에서 보고된 바 있다[Kim 등, 2009]. 따라서 본 연구에서는 *LbIFS-RCPR*의 기능을 알아보기 위하여 *in vitro* assay는 실시하지 않고 생물전환 방법을 적용하였다. 먼저 50 µg/mL의 엠포실린을 포함하고 있는 LB배지에 *LbIFS-RCPR*을 포함하고 있는 대장균을 접종하였다. 밤새도록 배양된 대장균 세포는 새로운 LB배지에 접종하여 37°C에서 배양하여 OD600에서 0.6-0.7에 도달하였을 때 최종농도 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 30°C에서 6시간 배양하였다. 재조합 단백질의 유도 후 원심분리를 이용하여 대장균을 회수 하였다. 대장균은 엠포실린(50 µg/mL), IPTG(0.1 mM/mL), 기질(60 µM/mL; apigenin, luteolin, naringenin, eriodictyol, homoeriodictyol, liquiritigenin, pinocembrin, sakuranetin) 이 첨가된 LB배지에 OD 600에서 5.0 정도의 세포 밀도로 현탁 하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 동량의 에칠아세테이트를 첨가하여 반응물을 두 번 추출하였으며, 반응물은 speed vacuum dryer를 이용하여 건조하였다. 최종적으로 DMSO 60 µL에 반응물을 녹여 Kim 등(2009)의 방법에 따라 HPLC분석을 실시하였다. 그 결과 naringenin, liquiritigenin, homoeriodictyol을 기질로 사용하였을 때 대조구에서는 관찰되지 않은 새로운 peak이 생성된 것을 확인할 수 있었고(Fig. 2, Table 1), 새롭게 나타난 peak을 LC-MS분석한 결과 기질에 비하여 분자량이 2Da이 줄어든 것을 보였고 UV 흡광도 또한 줄어든 것을 보였다(Fig. 2). 하지만, apigenin, luteolin, eriodictyol, pinocembrin, sakuranetin을 기질로 사용하였을 때는 대조구와 동일한 HPLC 분석결과를 보였다. 이러한 결과는 *LbIFS-RCPR*이 2번 탄소와 3번 탄소의 이중결합 존재유무가 기질 반응성에 중대한 영향을 끼치는 것을 알 수 있다[Kim 등, 2003]. *LbIFS*가 naringenin을 기질로 사용하는 반면 sakuranetin은 기질로 사용하지 못하는



**Fig. 3. Biotransformation kinetics of naringenin with *E. coli* expressing *LbIFS-RCPR*.** After 12 h induction with 200 rpm shaking at 25°C, the cells were harvested and resuspended with 15 mL of fresh LB medium supplemented 0.1mM IPTG and 50 µg/mL of ampicillin. Cell density was adjusted at OD600=5. 100 µM of naringenin was added and the culture was incubated with 200 rpm shaking at 30°C. The reaction products were harvested along with the time course and were extracted twice with an equal volume of ethyl acetate, and the reaction products were quantified by HPLC (Kim *et al.*, 2009). Solid circles are mean values calculated from measurements taken from three independent cultures and vertical line represents error bars.

것을 보였는데 이것은 *LbIFS*가 기질과 반응을 할 때 7번 위치의 hydroxyl 그룹이 중요한 역할을 하는 것으로 보인다[Kim 등, 2003]. Eriodictyol은 기질로 사용되지 않는 반면 homoeriodictyol은 기질로 하는 것을 보였다. 이것은 B링에 위치한 3'의 hydroxyl 그룹이 *LbIFS*의 기질 반응성을 저해하는 것으로 보인다. 이러한 결과는 앞서 다른 식물들에서 보고한 이소플라본 합성유전자들의 기질사용 범위와 비슷한 특성을 보인다[Akashi 등, 1999; Jung 등, 2000; Kim 등 2003].

배양시간에 따른 genistein의 생산성을 알아보기 위하여 naringenin을 기질로 사용하여 생물전환을 실시하였다. *LbIFS-RCPR*을 가지고 있는 대장균은 37°C에서 OD 600에서 0.6이 되도록 배양한 후 최종농도 0.1 mM의 IPTG를 첨가하였다. 그 후 25°C에서 12시간 단백질을 유도하고 새로운 LB배지 15 mL에 세포의 밀도가 OD600에서 5가 되게 현탁하여 엠포실린(50 µg/mL)과 IPTG(0.1 mM), 100 µM naringenin을 첨가하여 30°C에서 배양하면서 시간별(4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h)로 반응물을 회수하여 분석 하였다. 배양 후 약 4시간부터 반응물이 생성되기 시작하여 24시간 후 약 35 µM까지 증가하였다(Fig. 3). 하지만, 24시간 이상 배양하여도 더 이상의 반응물 증가는 이뤄지지 않고, 반응물이 오히려 줄어드는 경향을 보였다(Fig. 3).

대장균과 효모 같은 미생물은 배양하기가 쉽고 대부분의 생합성 경로가 알려져 있고, 유전자 조작이 간단한 장점들을 가지고 있기 때문에 플라보노이드 생물전환용 host로 많이 이용된다[Leonard와 Koffas, 2007; Kim 등, 2009]. 하지만, 플라보노이드 생산에 있어 대장균과 효모같은 host에 특정한 한가지 또는 두 가지 이상의 유전자를 도입함으로써 경제성에 부합하는 생산량까지 만들어내기에는 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 이소플라본 생산에 있어 앞서 보고된 다수의 연구와 *LbIFS-RCPR*유전자를 가지고 연구한 결과에서도 생산성은 그렇

게 높지 않았다[Leonard과 Koffas, 2007; Kim 등, 2009]. 이런 한계를 극복하기 위하여 앞으로 다양한 연구가 이루어져야 할 것이다. 그 중 하나가 반응 중에 들어가는 NADPH와 같은 cofactor를 안정적으로 공급해주기 위하여 생물전환 host의 대사를 조절하는 연구이다. 또한 식물의 유전자를 대장균에서 발현시키기 때문에 대장균이 잘 이용하지 않는 코돈을 식물의 유전자가 가지고 있는 경우도 많기 때문에 대장균이 잘 사용하는 코돈으로 optimization하는 연구가 이루어져야 하며, 생물전환에 사용될 수 있는 높은 효소활성을 보이는 유용한 유전자를 탐색하는 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

### 감사의 글

이 논문은 바이오그린 21사업(OFP 11-30-68(NIAS)) 및 연구재단 중점연구소(2009-0093824) 지원에 의한 논문임.

### 참고문헌

- Akashi T, Aoki T, and Ayabe SI. (1999) Cloning and functional expression of a cytochrome P450 cDNA encoding 2-hydroxyisoflavanone synthase involved in biosynthesis of the isoflavonoid skeleton in licorice. *Plant Physiol* **121**, 821-828.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, and Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**, 5592-5595.
- Choi JN, Kim D, Choi HK, Yoo KM, Kim J, and Lee CH (2009) 2'-Hydroxylation of genistein enhanced antioxidant and antiproliferative activities in MCF-7 human breast cancer cells. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1348-1354
- Ferguson JA and Mathesius U. (2003) Signaling interactions during nodule development. *J Plant Growth Regul* **22**, 47-72.
- Forkmann G and Heller W (1999) Biosynthesis of flavonoids. In: Barton D, Nakanishi K, and Meth-Cohn O (eds.), *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Elsevier Science Ltd., Oxford, pp. 713-748.
- Jung W, Yu O, Lau SM C, O'Keefe D P, Odell J, Fader G, and McGonigle B. (2000) Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nat Biotech* **18**, 208-212.
- Kim BG, Kim SY, Song HS, Lee C, Hur HG, Kim SI, and Ahn JH (2003) Cloning and expression of the isoflavone synthase gene (IFS-Tp) from *Trifolium pretense*. *Mol Cells* **15**, 301-306.
- Kim DH, Kim BG, Jung NR, and Ahn JH (2009) Production of genistein from naringenin using *Escherichia coli* containing isoflavone synthase-cytochrome P450 reductase fusion protein. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1612-1616.
- Leonard E and Koffas MAG. (2007) Engineering of artificial plant cytochrome P450 enzymes for synthesis of isoflavones by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **73**, 7246-7251.
- Maximov OB, Kulesh NI, Stepanenko LS, and Dmitrenok PS. (2004) New prenylated isoflavanones and other constituents of *Lespedeza bicolor*. *Fitoterapia* **75**, 96-98.
- Nebert DW and Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* **56**, 945-993.
- Reynaud J, Guilet D, Terreux R, Lussignol M, and Walchshofer N. (2005) Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. *Nat Prod Rep* **22**, 504-515.
- Tahara S. (2007) A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1387-1404.
- Veitch NC. (2007) Isoflavonoids of the leguminosae. *Nat Prod Rep* **24**, 4170464.
- Winkel-Shirley B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol* **126**, 485-493.