

재조합 *Pichia pastoris* GS115에서 $\Delta 5$ -desaturase의 발현과 그 활성

배경동*

Expression of $\Delta 5$ -desaturase Gene in a Recombinant *Pichia pastoris* GS115 Strain and Its Activity

Bae, KyungDong*

접수: 2011년 12월 8일 / 게재승인: 2011년 12월 20일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: It has been known that $\Delta 5$ -desaturase (TAD5) in the biosynthetic pathway of long chain polyunsaturated fatty acids of *Thraustochytrium aureum* is responsible for the conversion of di-homo- γ -linolenic acid (C20 : 4) into arachidonic acid (C20 : 4). The genetic sequence analysis on TAD5 of *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 used in this study showed that it has two amino acid changes when compared to that of *Thraustochytrium aureum* TAD5 first reported in 2003. Accordingly, *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 TAD5 was named TAD5_1. TAD5_1-inserted methylotropic *Pichia pastoris* was prepared and then cultured with a precursor fatty acid, di-homo- γ -linolenic acid. GC analysis confirmed that a certain amount of the precursor fatty acid was converted into arachidonic acid. In this study, not only a recombinant *Pichia pastoris* with the typical activity of $\Delta 5$ -desaturase which plays an essential role in the biosynthesis of LCPUFAs was successfully made but also the preparation potential of a recombinant *Pichia pastoris* strain which may synthesize eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) that are important in maintaining and improving human's brain function was proposed.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, delta 5 desaturase,

di-homo- γ -linolenic acid, arachidonic acid, *Pichia pastoris*, *Thraustochytrium aureum*

1. 서론

포막을 이루는 구성성분인 arachidonic acid (C20 : 4; n-6) 와 docosahexaenoic acid (C22 : 6; n-3) 같은 long chain polyunsaturated fatty acid (LCPUFAs)는 인체 뇌조직세포의 지방산 중 30% 이상 차지하는 필수성분으로서 두뇌신경 및 시각기능의 발달에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [1-4]. 따라서 이러한 LCPUFAs를 음식물로부터 섭취하여 보충하는 것은 인체두뇌기능 유지에 필수적이라고 할 수 있으며 특히 신생아의 두뇌발달에 아주 중요한 것으로 보고되고 있다 [5]. 또한, arachidonic acid 및 eicosapentaenoic acid (C20 : 5; n-3)와 같은 LCPUFAs는 인체 내에서 다양한 생물학적 기능을 가진 프로스타글린딘, 류코트리엔과 같은 eicosanoids를 합성하는 전구체인데, eicosanoids는 혈관평창을 유도함으로써 혈액내의 백혈구 및 단백질을 조직 내로 용이하게 침투시켜 면역학적 염증반응을 일으키고, 혈압을 조절하고, 혈액을 응고시키며 또한 세포간 신호전달을 유발시키는 등 다양한 기능을 가지고 있다 [6]. Arachidonic acid는 동물의 간과 부신에 상당량이 존재하며 *Mortierella alipina*, *Porphyridium cruentum*와 *Thraustochytrium* sp. 같은 미생물에서도 발견되며 특히 *Thraustochytrium* sp.와 같은 *Thraustochytrids*는 상당한 양의 LCPUFAs를 생산한다는 점에서 아주 특이하다고 할 수 있다 [7-9]. n-6 LCPUFA인 arachidonic acid와 n-3 LCPUFA인 eicosapentaenoic acid의 생합성 경로 (Fig. 1)를 살펴보면 두 전구체 linolenic acid와

인하대학교 생물공학과/베르나바이오테크코리아 백신연구소
Biological Engineering Dept., College of Engineering, Inha University,
Inharao 100, 402-715, Korea
Tel: +82-(0)10-2434-4029, Fax: +82-32-232-3029
e-mail: baekd@inha.ac.kr, kyungdong.bae@crucell.kr

α -linolenic acid는 $\Delta 6$ -desaturase에 의해 탈포화되어 각각 γ -linolenic acid와 stearidonic acid로 전환되고 이후 $\Delta 6$ -elongase에 의해 di-homo- γ -linolenic acid와 eicosatetraenoic acid로 신장되며 이는 다시 $\Delta 5$ -desaturase에 탈포화되어 최종 산물인 arachidonic acid와 eicosapentaenoic acid가 형성 된다. 이 경로에서 최종산물의 합성에 중요한 역할을 하는 $\Delta 5$ -desaturase가 해양미생물, 선충, 규조류, 이끼, 고등식물을 비롯한 다양한 생물체에서 발견된 후 클로닝되었고, 이들 효소가 공통적으로 di-homo- γ -linolenic acid를 탈포화하여 arachidonic acid로 전환시킬 수 있음이 확인되었다 [10-15]. 본 연구에서는 대표적 해양미생물인 *Thraustochytrium aureum*의 $\Delta 5$ -desaturase 유전자를 클로닝하여 기존에 밝혀진 *Thraustochytrium sp.*의 $\Delta 5$ -desaturase인 FAD5와의 상동성을 검토하였고, 이 유전자를 메탄올자화효모인 *Pichia pastoris*에 삽입하여 di-homo- γ -linolenic acid를 arachidonic acid로 전환시킬 수 있는 재조합 *Pichia pastoris*의 제조가능성을 살펴보았다.

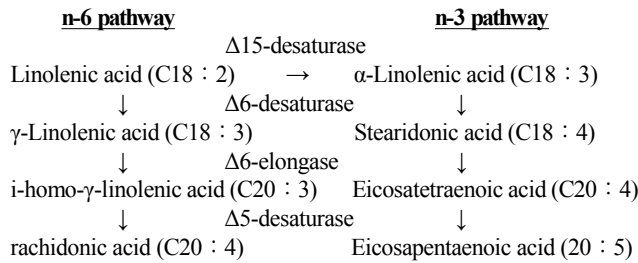
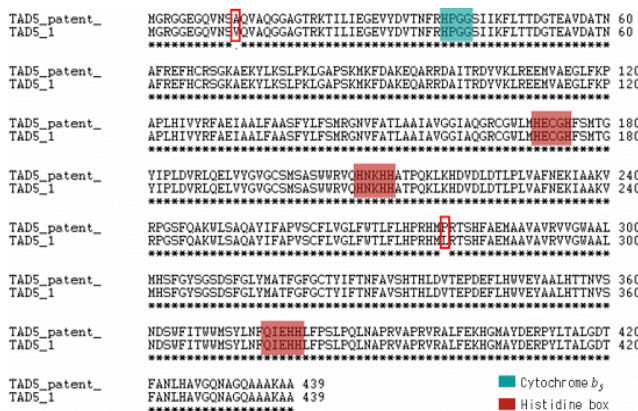


Fig. 1. Biosynthetic pathways of long chain polyunsaturated fatty acids.



Conserved motifs such as cytochrome b5 heme binding domain and histidine boxes are shaded and two amino acid changes are boxed.

Fig. 2. Sequence comparison of TAD5 and TAD5_1.

2. 재료 및 방법

2.1 균주 및 배양조건

Thraustochytrium aureum ATCC 34304를 American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 구입한 후 인공해수

배지 (Artificial sea water medium)에 접종하여 25°C 180 rpm 조건으로 3일간 진탕 배양하였다. 또한 메탄올자화효모 *Pichia. pastoris* GS115를 MGY 배지에서 진탕 배양하였다. 발효 후 발효액을 원심분리하고 균체를 회수하여 Chow and Kafer 방법에 따라 각각의 균체로부터 genomic DNA를 분리하였다 [16].

2.2 $\Delta 5$ -desaturase 유전자 증폭 및 클로닝

문헌조사 (US patent)를 통해 *Thraustochytrium aureum*의 $\Delta 5$ -desaturase 유전자 (Tad5) 서열 [17]을 확인한 후 유전자 증폭을 위한 primer를 제작하였다. BamHI 제한효소 자리를 포함한 5'-aaggatccaccatgggtATGGGACGCGGCG-3'를 forward primer로, NotI 제한효소 자리를 포함한 5'-ttgccgcccCTAAGCGGCCTTGCCGCCG-3'를 reverse primer로 사용하였다 (각 제한효소에 대해서는 밀줄참조). 이 두 primer를 이용한 유전자 증폭은 genomic DNA를 94°C에서 10분간 최초로 denaturation 시킨 뒤, denaturation (94°C 2분), annealing (65°C 1분) 및 extension (72°C 1.5분) cycle을 35회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 10분간 extension시키는 PCR조건으로 실행하였다. 이 증폭된 유전자를 0.8% agarose gel에서 전기영동 후 상업용 kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 정제하였다. 정제 유전자와 T7A cloning vector (RBC Bioscience, Taiwan)를 ligation하여 재조합 plasmid를 얻었고 이를 *Escherichia coli* XL1-blue에 형질도입 후 재조합 대장균 클론을 제조하였다. 또한, 이를 배양하여 대량의 plasmid 얻은 후 유전자 서열 (Tad5_1)분석에 이용하였고 문헌조사를 통해 확인한 서열 (Tad5)과 동등성을 비교하였다.

2.3 *P. pastoris* GS115에서 TAD5_1의 발현

재조합 plasmid를 BAMHI/NotI double digestion하여 얻은 유전자 절편을 inducible promoter AOX1를 가진 yeast expression vector pPIC3.5에 삽입하여 pPIC/Tad5_1을 제조한 후 이를 electroporation method [18]를 이용하여 *Pichia. pastoris* GS115의 genome에 삽입하였고 histidine이 없는 배지에서 배양하여 형질전환 균주를 선별하였다. pPIC/Tad5_1으로 형질전환된 *Pichia. pastoris* GS115에서 *Thraustochytrium aureum*의 $\Delta 5$ -desaturase (TAD5_1)는 다음과 같은 방법으로 발현되었다. 먼저, 재조합 *Pichia. pastoris*를 1% 글리세롤 함유 MGY 배지에 접종하여 28°C 250 rpm에서 48시간 동안 배양한 후 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 남은 균체를 induction을 위한 MM 배지로 이송하였다. 그리고 이를 18°C 250 rpm으로 48시간 동안 배양한 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 균체를 0.1%의 tergitol이 포함된 MM 배지로 옮기고 기질로 0.02 mg/mL di-homo- γ -linolenic acid를 첨가하여 18°C 250 rpm으로 72시간 동안 배양하였다. 이때, 대조군으로는 pPIC3.5 vector가 형질도입된 균주를 사용하였다.

2.4 지방산패턴 분석 및 TAD5_1 활성확인

상기 배양액을 원심분리한 후 상층액을 제거하고 남은 균체에 증류수를 넣어 세척한다. 이 과정을 3회 반복한 후 최종적으로 얻은 세척된 균주를 15 mL 시험관에 담아 오븐에 넣어

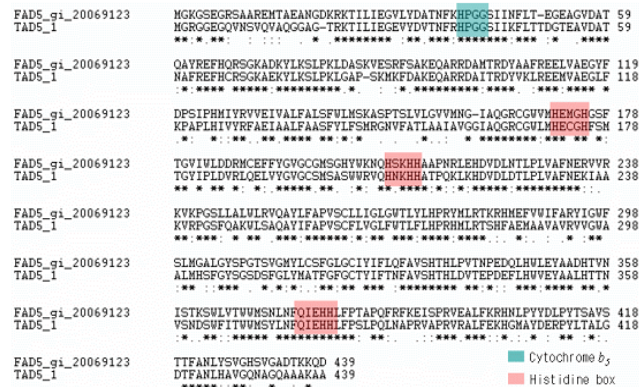
Table 1. Fatty acid pattern of vector-transformed *Pichia pastoris* and recombinant *Pichia pastoris*, and $\Delta 5$ -desaturation activity of recombinant *Pichia pastoris*

Fatty acid	Vector-transformed <i>Pichia pastoris</i>		Recombinant <i>Pichia pastoris</i>	
	without DGLA	with DGLA	without DGLA	with DGLA
Palmitic acid (16 : 0)	7.96	8.85	8.66	10.49
Palmitoleic acid (16 : 1)	4.54	5.42	3.92	4.24
Stearic acid (18 : 0)	4.74	2.34	4.58	3.12
Oleic acid (18 : 1)	35.31	40.34	32.95	33.44
Linoleic acid (18 : 2)	30.79	26.93	25.76	23.69
Alpha-linolenic acid (18 : 3)	12.01	12.59	12.32	10.26
di-homo- γ -linolenic acid (20 : 3)	ND	ND	6.53	7.89
Arachidonic acid (20 : 4)	ND	ND	ND	2.17

DGLA: di-homo- γ -linolenic acid.

완전히 건조시키고 황산-메탄올 용액 (황산:메탄올=5:100, 부피비) 3 mL을 첨가하였다. 여기에 질소가스를 충전한 뒤 100°C 오븐에 넣어 1시간 동안 반응시키고 실온이 될 때까지 방치한 후 증류수 2 mL과 hexane 1 mL을 첨가하여 완전히 교반하였다. 이 교반액을 3000 rpm으로 10분간 원심분리 하면 ester화 LCPUFAs를 포함한 fatty acid methyl esters (FAMES)가 hexane층에 추출되고 마지막으로 이 추출액을 gas chromatography (HP6890 series, Agilent)를 이용하여 FAMES 패턴을 분석하였고 di-homo- γ -linolenic acid를 arachidonic acid로의 전환활성을 확인하였다.

하고 있음을 확인하였고, 또한 171~175, 208~212 및 376~380번째 아미노산 사이에 membrane-bound desaturase의 보존서열로 알려진 3개의 histidine box가 있음을 알 수 있었다. 이 TAD5_1의 아미노산 서열을 다른 *Thraustochytrium* species의 $\Delta 5$ -desaturase인 FAD5 (*Thraustochytrium* sp. ATCC21685 delta-5 fatty acid desaturase)와 소프트웨어 프로그램 ClustalW를 이용하여 서열정렬분석 (sequence alignment analysis)한 결과 두 효소간에 57%의 상동성이 있음을 확인하였다. 더불어, 재조합 *Pichia pastoris* 균주에서 발현하여 추출한 FAMES를 분석한 결과, *Pichia pastoris*의 기본 지방산 패턴은 TAD5_1의 삽입유무에 관계없이 동일하였고 기질 지방산으로 di-homo- γ -linolenic acid를 배지에 첨가한 경우에 균주 내에 2가지 새로운 지방산 피크가 나타났는데 이를 지방산 라이브러리와 비교한 결과 각각 di-homo- γ -linolenic acid와 arachidonic acid임을 확인할 수 있었다 (Fig. 4, Table 1). 이것은 재조합 *Pichia pastoris*가 배지로부터 di-homo- γ -linolenic acid를 온전히 흡수할 수 있으며 또한 이중 일부를 arachidonic acid로 전환할 수 있다는 것을 의미하는데, 이는 *Pichia pastoris*의 genome에 삽입된 $\Delta 5$ -desaturase인 TAD5_1가 di-homo- γ -linolenic acid를 arachidonic acid로 탈포화한다는 점에서 아주 흥미로운 연구결과라 할 수 있다 (Table 1). Long chain polyunsaturated fatty acids는 인체의 두뇌신경과 시각기능의 발달에 아주 중요하기 때문에 해양미생물 또는 재조합균주를 이용한 대량생산에 상당한 연구가 이루어지고 있고 최근 연구에 의하면 해양미생물 중 *Thraustochytrid* species가 상당량의 LCPUFAs를 생산한다고 보고되고 있다 [19-23]. 본 연구에서는 *Thraustochytrid* species의 하나인 *Thraustochytrium aureum* ATCC34304의 TAD5_1을 *Saccharomyces cerevisiae*와는 달리 yeast crabtree effect가 없어 고농도배양이 아주 용이한 메탄올자화효모 *Pichia pastoris*의 genome에 삽입하여 LCPUFAs 형성에 핵심적인 역할을 하는 $\Delta 5$ -desaturase의 전형적 활성을 나타내는 재조합 *Pichia pastoris*를 제조하는데 성공하였다. 본 연구의 가장 큰 성과는 첫째, 현재 시장에서 가장 각광을 받고 있으며 두뇌기능유지에 필수적인 eicosapentaenoic acid (EPA)와 docosahexaenoic acid (DHA)를 합성할 수 있는 재조합 *Pichia pastoris*를 제조할 수 있는 가능성과 둘째, 재조합



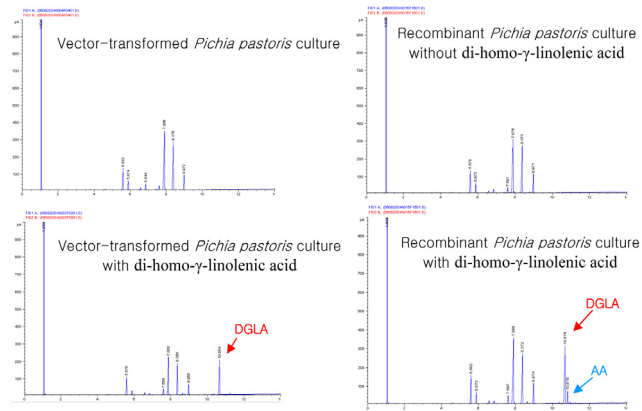
Asterisks indicate the identical amino acids of two delta $\Delta 5$ -desaturases.

Fig. 3. Homology comparison of TAD5_1 and FAD5 using a sequence alignment analysis tool, ClustalW.

3. 결과 및 고찰

*Thraustochytrium aureum*의 $\Delta 5$ -desaturase 유전자 (Tad5_1)의 서열분석결과 문헌조사를 통해 밝혀진 서열 (Tad5)과 2개의 뉴클로티드 (12번째 및 279번째 염기)가 다르다는 것이 밝혀졌다 (Fig. 2). Tad5_1 ORF를 상세히 분석해 보면 이는 총 1320개의 염기로 구성되어있고 439개의 아미노산을 인코딩하고 있다. 이 유전자의 서열분석결과 $\Delta 5$ -desaturase의 N 말단부위에서 공통적으로 발견되는 HPGG motif, 즉 N-terminal cytochrome b5-like heme binding domain을 포함

*Pichia pastoris*의 고농도 배양을 통해 LCPUFAs를 대량 생산할 수 있는 잠재적 가능성을 확인했다는 점이라고 생각한다. 앞으로 상기에 언급한 두 가지 분야에서 진전을 위한 추가연구를 진행할 계획이다.



DGLA: peak of di-homo- γ -linolenic acid AA: peak of arachidonic acid.

Fig. 4. Analyses of FAMES extracted from wild type *Pichia pastoris* cultures and recombinant *Pichia pastoris* strain cultures.

References

- Horrobin, D. F. (1992) Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid. *Prog. Lipid Res.* 31: 1-8.
- Leonard, A. E., B. Kelder, E. G. Bobik, L. T. Chuang, J. M. P. Barnes, J. M. Thurmond, P. E. Kroeger, J. J. Kopchick, Y. S. Huang, and P. Mukerji (2000) cDNA cloning and characterization of human $\Delta 5$ -desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem. J.* 347: 719-724.
- Drexler, H., P. Spiekermann, A. Meyer, F. Domergue, T. Zank, P. Sperling, A. Abbadi, and E. Heinz (2003) Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: strategies, problems and first results. *J. Plant Physiol.* 160: 779-802.
- Crawford, M. A., K. Costeloe, K. Ghebremeskel, A. Phylactos, L. Skirvin, and F. Stacey (1997) Are deficits of arachidonic and docosahexanoic acids responsible for the neural and vascular complications of preterm babies? *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 1032-1041.
- Uauy, R. and A. D. Dangour (2006) Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids. *Nutr. Rev.* 24-33.
- Kinsella, J. E., B. Lokesh, S. Broughton, and J. Whelan (1990) Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 6: 24-44.
- Gunstone, F. D., J. L. Harwood, and F. B. Padley (1994) *The Lipid Handbook*. 2nd ed., Chapman & Hall, London, England.
- Burja, A. M., H. Radianingtyas, A. Windust, and C. J. Barrow (2006) Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: screening of strains and optimization of omega-3 production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1161-1168.
- Qiu, X., H. Hong, and S. L. MacKenzie (2001) Identification of a $\Delta 4$ fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *Biol. Chem.* 276: 31561-31566.
- Sayanova, O., M. A. Smith, P. Lapinskas, A. K. Stobart, and G. Dobson (1997) Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta 6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4211-4216.
- Huang, Y. S., S. Chaudhary, J. M. Thurmond, E. G. Bobik, L. Yuan, G. M. Chan, S. J. Kirchner, P. Mukerji, and D. S. Knutzon (1999) Cloning of delta 12- and delta 6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 34: 649-659.
- Michaelson, L. V., C. M. Lazarus, G. Griffiths, J. A. Napier, and A. K. Stobart (1998) Isolation of a $\Delta 5$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*. *J. Biol. Chem.* 273: 19055-19059.
- Michaelson, L. V., J. A. Napier, M. Lewis, G. Griffiths, C. M. Lazarus, and A. K. Stobart (1998) Functional identification of a fatty acid $\Delta 5$ -desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* 439: 215-218.
- Grike, T., H. Schmidt, U. Zahring, R. Reski, and E. Heinz (1998) Identification of a novel delta 6 acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant J.* 15: 39-48.
- Domergue, F., J. Lerchl, U. Zahring, and E. Heinz (2002) Cloning and functional characterization of phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 269: 4105-4113.
- Chow, T. Y. K. and E. Kafer (1993) A rapid method for isolation of total nucleic acids from *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics Newsletter* 40: 25-27.
- Mukerji, P., Y. S. Huang, T. Das, J. Thurmond, and S. L. Pereira (2003) Desaturase genes and uses thereof. *US Patent* 6,635,451.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Warude, D., K. Joshi, and A. Harsulkar (2006) Polyunsaturated fatty acids: biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26: 83-93.
- Simpoulos, A. P. (1989) Summary of NATO advanced research workshop on dietary w3 and w6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality. *J. Nutr.* 199: 521-528.
- Takahata, K., K. Monobe, M. Tada, and P. C. Weber (1998) The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 2079-2085.
- Barnes, J. M. P., T. Das, E. Bobik, A. E. Leonard, J. M. Thurmond, L. T. Chuang, Y. S. Huang, and P. Mukerji (2000) Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8284-8289.
- Kaewsuwan, S., E. B. Cahoon, P. F. Perroud, C. Wiwat, N. Panvisavas, R. S. Quatrano, D. J. Cove, and N. Bunyaphatsara (2006) Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* $\Delta 5$ -desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 281: 21988-21997.