

## Expression and Isolation of Limonoid UDP-glucosyltransferase, a Bitterness-reducing Enzyme, in *E. coli*

Somi K. Cho<sup>1,2</sup>, Young-Mee Kim<sup>3</sup>, Minyoung Kim<sup>1</sup>, Doseung Lee<sup>1,2</sup>, Jae Hoon Kim<sup>1,2,4</sup>, SePill Park<sup>1</sup>, Key Zung Riu<sup>1,2,4</sup> and Dong-Sun Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Subtropical Horticulture Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>3</sup>Department of Medicine, School of Applied Marine Science, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea.

<sup>4</sup>Citrus Genetic Resources Bank, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

## 감귤의 고미제거 효소인 limonoid UDP-glucosyltransferase의 대장균 내에서의 발현과 이의 분리

김소미<sup>1,2</sup> · 김영미<sup>3</sup> · 김민영<sup>1</sup> · 이도승<sup>1,2</sup> · 김재훈<sup>1,2,4</sup> · 박세필<sup>1</sup> · 류기중<sup>1,2,4</sup> · 이동선<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부, <sup>2</sup>제주대학교 아열대원예산업연구소,

<sup>3</sup>제주대학교 아열대열대생물 유전자 은행센터

### Abstract

Limonoids are abundant as bitter taste in citrus fruit and other plants. Interestingly, limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT) effectively ameliorates the bitterness from limonoid. The high level of LUGT expression in *Escherichia coli* can result in the formation of insoluble aggregates known as inclusion bodies. We isolated the soluble LUGT protein when this inclusion body was renatured with  $\beta$ -cyclodextrin treatment after protein denaturation by urea. Our present results suggest that the isolation of LUGT from inclusion body in cells leads to shed light to characterize the enzyme for food industry purposes.

Key words : *Citrus grandis* Osbeck, expression, limonoid UDP-glucosyltransferase

### 서 론

생체분자들에 부착된 당쇄 (sugar-chain)는 세포의 암화 및 암전이, 박테리아의 숙주세포에의 감염, 면역세포와 신경세포의 분화유도, 식물유래 2차 대사산물(phytochemical)의 생리활성조절 등 분자인식을 통한 신호전달매개체로 알려지면서 그 중요성이 인식되고 있으며 상기 물질들의 다양한 당쇄 구조를 생성하는데 관여하는 효소가 당전이 효소 (glucosyltransferase; GT)이며, 당전이 효소는 당공여체인 당핵산염 (sugar-nucleotide)으로부터 당을 기질 (단당류, 다당류, 단백질, 당단백질, 지질, 당지질)에 전이하여 새로운 당쇄를 형성하는 일련의 효소를 총칭한다(1). 동물 세포의 경우에는 세포막에 부착된 형태뿐만 아니라 분비성

형태의 효소로 존재함이 여러 종류의 당전이 효소들에서 발견되는 일반적인 현상으로 밝혀졌으며 이는 세포내에서 다양한 기질에 대해 효율적인 생합성반응이 일어나기 위해 두 가지 형태의 당전이 효소가 존재함이 생물체에게 유리할 것임을 시사하고 있으나(2), 식물유래 당전이 효소들의 세포 내 분포 및 topology에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.

2003년 이후 분자생물학적 방법(sequence-based homology search) 등을 이용하여 공통서열을 지닌 모든 GT를 애기장대 유전체로부터 밝혀내고 재조합 단백질을 만든 후 GT의 기질특이성과 그와 관련된 생물학적인 기능에 대해 연구 결과들이 급증하였으며(3), 클로닝된 식물 당전이 효소 유전자들의 세포 내 위치 (subcellular localization)에 대해서는 세포질(4,5), 액포(6), endomembrane(7), 혹은 cytochrome P450-연결된 소포체(endoplasmic reticulum; ER) 등에 존재한다고 보고되었다(8).

\*Corresponding author. E-mail : dongsunlee@jejunu.ac.kr  
Phone : 82-64-754-3343, Fax : 82-64-756-3351

리모노이드 화합물은 이차 대사산물이며, triterpene 유도체로서 감귤류의 과일에는 상당량의 리모노이드 화합물들이 존재하며 주로 성숙한 과일이나 씨앗 중에 존재하는데 가장 많이 존재하는 것은 limonin과 nomilin으로 알려져 있고, 과실이 성숙해가면서 쓴 맛을 내는 aglycone 형태보다 쓴 맛이 사라진 limonoid glucoside (LG; 당체 리모노이드)로 전환된다고 밝혀졌다(9). 리모노이드는 항암 효과와 심혈관질환예방 효능을 지닌 생리활성 성분이며(10), 한편으로는 인라인 착즙 방법에 의한 감귤 주스 제조 시 주스 중에 혼입되어 감귤 가공제품의 강한 쓴맛을 나타내는 원인 물질로서 소비자 기호에 문제가 되고 있다(11). 쓴맛 성분 제거가 고품질·기능성 감귤 가공 제품을 개발을 위해 매우 중요한데 일본 연구자들에 의해 *Citrus unshiu* Marc.로부터 limonoid UDP-glucosyltransferase (LUGT) 유전자가 클로닝 되어 박테리아에서 생산이 시도되었으나 효소활성이 매우 미약하여 산업적 적용이 어려웠으며(12), 따라서 LUGT (limonoid UDP-glucosyltransferase) 유전자의 효율적인 생산과 활성유지에 관한 연구개발이 필요하다.

본 연구는 감귤 당유자의 과실유래의 LUGT의 생화학적 특성을 연구하기 위하여, 유전자를 대장균에서 과발현시켜 LUGT 단백질을 분리정제하였으며 이의 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

제주 재래 감귤인 당유자 (*Citrus grandis* Osbeck)는 서귀포시 남원읍 하에리에 위치한 농촌진흥청 난지농업연구소 감귤시험장 시험포에서 생육중인 묘목으로부터 2008년 11월에 과실을 채취하여 -70°C에 500 g을 보관하여 voucher specimen으로 하였으며, 본 시험재료로 사용하였다. 제조 회사가 지정되지 않은 시약들은 Sigma Aldrich Co (MO)에서 구입하여 사용하였다.

### RNA분리 및 reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

당유자를 액체질소와 함께 막자사발에서 분쇄한 후, 0.1g을 microtube로 옮긴 후, Trizole reagent (Invitrogen)을 사용하여 total RNA를 분리하였다. 분리한 당유자의 total RNA 1 µg을 cDNA 합성에 사용하였으며, 합성과정은 ImProm-II reverse transcription system (Promega)의 방법에 준하여 수행하였다. 대장균에서 LUGT 발현을 위한 cloning vector는 pET30a(+) (Novagen)를 사용하였으며, PCR를 위한 primers는 N-말단 부위에는 *NdeI* site를 갖는 5'-ggcatatggg-aactgaatctcttg-3'를, C-말단부위에는 *Sall* site를 갖는 5'-cagtgacaactgtgacacgtgtcca-3'를 각각 사용하였다. PCR 조건은 95°C 5분, 95°C 1분, 55°C 1분, 68°C 1분 30초(30

cycles), 68°C 10분으로 수행하였으며, 그 결과 Fig. 1와 같이 약 1.5 kb 크기의 DNA 단편을 회수하여 DNA 염기배열을 결정하였다.

### LUGT 유전자 클로닝

대장균에서 LUGT 발현을 위한 클로닝 벡터는 pET30a(+) (Novagen)를 이용하였다. pET30a(+)와 RT-PCR 산물들을 제한효소 *NdeI*과 *Sall*으로 각각 double digestion 하여 T4 DNA Ligase을 사용하여 ligation 한 후 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하여 Kanamycin 함유된 LB agar plate에서 배양하였다.

### 대장균에서 LUGT 과발현

전배양한 LUGT 유전자를 갖는 plasmid를 포함한 대장균을 항생제 (kanamycin 100 µg/mL)가 포함된 LB 배지에 1~3% 접종하여 흡광도 600 nm에서 0.5가 되는 지점까지 대장균을 배양하여 IPTG를 0.5 mM이 되도록 첨가하여 37°C에서 5시간동안 배양하였다. 배양이 종료된 대장균은 얼음에서 10분간 방치한 후, 원심분리 (6,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 대장균을 모으며, PBS 용액으로 1회 세척하여 LUGT 단백질 정제에 사용하였다.

### LUGT 단백질 정제

불용성인 재조합 LUGT 단백질의 분리와 정제를 위하여 대장균에서 발현된 단백질을 변성시킨 후, refolding하는 방법을 이용하였다 (13). 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0)에서 세척한 후, 원심분리 (18,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체에 cold buffer (2M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0, 2% Triton X-100)에서 현탁하여 초음파 처리로 용균처리를 하였다. 파쇄된 용액을 원심분리 (18,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 얻은 침전물에 가용화 buffer (8M urea, 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0, 10 mM imidazole, 10 mM β-mercaptoethanol)을 첨가하여 실온에서 1시간동안 교반하였다. 원심분리 (18,000 rpm, 30 min, 4°C)하여 상등액을 회수하였다.

원심상등액을 가용화 buffer로 평형화된 Ni-NTA resin을 함유한 buffer와 혼합하여 상온에서 1시간동안 천천히 교반한 후, empty column에 혼합액을 부어서 column을 packing 하고 20 mM imidazole을 함유한 가용화 buffer를 사용하여 bed volume의 10배정도를 용출하여 1차 세척하였다. 20 mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, pH 8.0, 10 mM imidazole, 10 mM beta-mercaptoethanol, 20 mM imidazole을 함유한 2차 세척액으로 다시 column을 세척하고 10 mM β-cyclodextrin을 함유한 2차 세척액으로 결합한 단백질의 refolding을 유도한 후, bed volume의 10배정도의 2차 세척액으로 column을 세척하였다. 최종적으로 용출 buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

0.3M NaCl, 0.25M imidazole, pH 8.0)을 사용하여 LUGT을 용출하였다.

### 결과 및 고찰

#### 유전자 클로닝

농촌진흥청 난지농업연구소에서 채취한 제주 재래 감귤인 당유자의 과실에 존재하는 LUGT 유전자를 RT-PCR의 방법으로 분리한 결과 약 1.5 kb 크기의 DNA 단편을 얻었다 (Fig. 1). 당유자 LUGT는 1,536 bp (511 amino acids)로 약 56 kDa이었다. Plasmid vector인 pET30a(+) vector에 클로닝하여 재조합 plasmid DNA을 얻었으며, *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하였다.

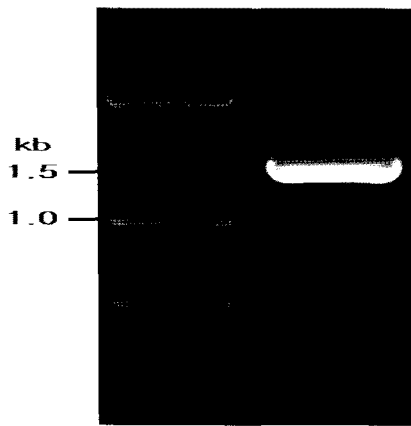


Fig. 1. RT-PCR of LUGT from *Citrus grandis* Osbeck.

#### 대장균에서의 LUGT 단백질 발현조건

LUGT/pET30a(+) vector를 지닌 형질전환체 *E. coli* BL21(DE3) 세포내에서 LUGT의 발현을 유도 및 최적화하기 위하여 IPTG의 농도, 온도, 시간을 조절하여 최적 조건을 발견하였다. 그 결과로서 LUGT 유도발현 최적 조건으로 0.5 mM IPTG 조건에서 37°C에서 5시간동안 배양하는 것이 최적이었다 (Fig. 2). IPTG 농도는 0.5 mM IPTG 농도에서 최적이었으며, 특히 37°C 배양온도 0.5 mM IPTG 농도에서 배양시간을 3, 4, 5시간동안 변화를 주어 검토한 결과, 5시간이 최적이었다. 그리고 1 mM과 0.1 mM의 IPTG 농도변화 및 배양온도 감소(37°C에서 20°C로 감소)는 단백질 발현량의 상당한 감소가 SDS-PAGE 상에서 관찰되었다.

LUGT 단백질의 분리를 위하여, LUGT 유전자를 함유한 형질전환 대장균을 LB (kanamycin 함유) 배지에서 하룻밤 배양하고, 1 liter LB (kanamycin 함유) 배지에 접종하여 0.5 mM IPTG 첨가한 후 37°C에서 5시간 동안 유도하여 배양액을 원심분리 하였다. 회수한 균체를 LUGT 단백질 정제에 사용하였다.

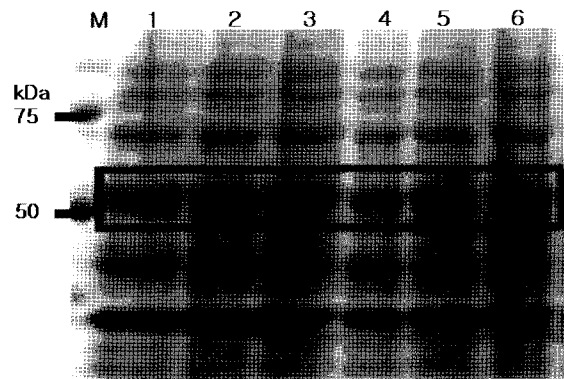


Fig. 2. LUGT expression in *E. coli*.

Total extracts of cells that were grown on each induction condition were loaded on SDS-PAGE. Band in red square marker showed LUGT protein. Lane 1-3: 0.5 mM IPTG, lane 4-6: 1 mM IPTG, 1 and 4: 3h induction, 2 and 5: 4h induction, 3 and 6: 5h induction.

#### LUGT 단백질 정제

Native 상태로 대장균 세포내에서 당유자 LUGT 단백질의 가용성을 검토한 결과, SDS-PAGE 상에서 LUGT는 가용성 상태로 존재하지 않고 insoluble 상태로 존재하였다 (Fig. 3). 대부분이 불용성inclusion body 상태인 것으로 확인되었다. 즉, 균체파쇄하여 원심분리한 후, 원심 상등액과 침전물을 각각 회수하여 SDS-PAGE한 결과, 원심상등액(lane 4)에서는 LUGT가 확인이 되지 않는 반면, 침전물 (lane 3)에서 LUGT가 확인되었다. 즉, 대장균에서 발현되는 대부분의 LUGT는 inclusion body로 존재하는 것으로 확인되었다.

이러한 불가용성 침전물을 단백질 변성제인 urea를 함유한 buffer에서 천천히 교반하여 가용화시킨 후, 원심분리하여 상등액을 회수하여 Ni-NTA resin과 혼합하여 결합하도록 하였다. Column에 충전하여 충분한 양의 buffer로 세척한 후, 10 mM β-cyclodextrin을 함유한 buffer를 사용하여 단백질의 refolding을 유도하였으며 0.25 M imidazole을 사용하여 단백질을 용출한 후 SDS-PAGE 한 결과, Fig. 3의 lane 5에서 보는 바와 같이 순수한 LUGT 단백질을 회수하

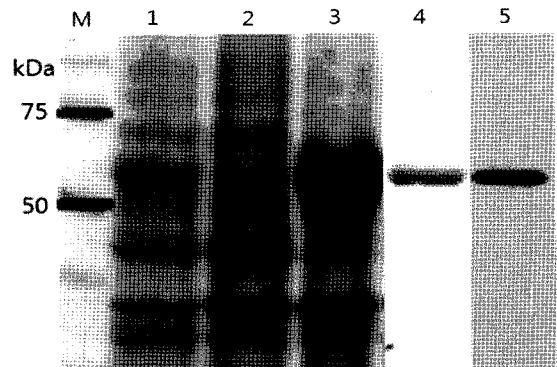


Fig. 3. SDS-PAGE pattern of LUGT protein.

1:total extracts of cells, 2:supernatant after centrifugation of cell extracts, 3:precipitate after centrifugation of cell extracts, 4:purified LUGT after denaturation and renaturation, 5:purified LUGT spot by Western blot.

었다. Ni-NTA column으로 정제한 LUGT 단백질은 C-terminal 부분에 6개의 histidine으로 tagging되어 있으므로 His-Tag 항체를 사용하여 Western blotting 방법으로 확인한 결과, 동일한 크기의 위치에서 단일의 단백질 밴드를 확인하였다 (lane 5).

## 요 약

Limonoid는 항바이러스 및 항균제로서의 치료적인 목적으로 널리 연구되고 있는 성분으로 감귤에서 풍부하게 존재한다. 그러나 성분 자체의 쓴맛으로 인하여 기호성이 저하되므로 이를 해결하는 노력이 필요하며 제품 개발이 요구되고 있는 실정이다. 이러한 쓴맛을 제거할 수 있는 훌륭한 효소로써 LUGT가 주목되고 있으며, 이에 효소의 특성화 연구를 위하여 분리 및 정제를 시도하였다. Plasmid vector인 pET30a(+)을 사용하여 대장균에서 효소 생성을 위한 최적 발현조건을 검토한 결과, 0.5 mM IPTG 조건에서 37°C에서 5시간동안 배양하는 것이 최적 과발현 조건이었다. 그러나 세포내 효소 발현은 불용성의 inclusion body로 존재하므로 단백질 변성제인 urea와 재생제인  $\beta$ -cyclodextrin을 사용하여 순수분리가 가능하였다. 이러한 방법은 LUGT의 당단백질의 특성연구는 물론 이를 이용한 제주 감귤의 고부가가치를 위한 기초연구에 많은 도움을 줄 것으로 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 2009년도 제주대학교 학술연구지원사업에 의하여 연구되었습니다.

## 참고문헌

- Ito Y, Hagihara S, Matsuo I, Totani K (2005) Structural approaches to the study of oligosaccharides in glycoprotein quality control. *Curr Opin Struct Biol*, 15, 481-489
- Cho SK, Cummings RD (1997) A soluble form of a 1,3-galactosyltransferase functions within cells to galactosylate glycoproteins. *J Biol Chem*, 272, 13622-13628
- Bowles D, Isayenkova J, Lim E-K, Poppenberger B

- (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Curr Opin Plant Biol*, 8, 254-263
- Yazaki K, Inushima K, Kataoka M, Tabata M (1995) Intracellular localization of UDPG:p-hydroxybenzoate glucosyltransferase and its reaction product in *Lithospermum* cell cultures. *Phytochemistry*, 38, 1127-1130
- Achmine L, Huhman DV, Tarag MA, Sumner LW, Blount JW, Dixon RA (2005) Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J*, 41, 875-887
- Anhalt S, Weissenböck G (1992) Subcellular localization of luteolin glucuronides and related enzymes in rye mesophyll. *Planta*, 187, 83-88
- Ibrahim RK (1992) Immunolocalization of flavonoid conjugates and their enzymes. In: Stafford HA, Ibrahim RK, eds. *Phenolic metabolism in plants*. NY: Plenum Press, 25-61
- Jones P, Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: transquillizers and stimulant controllers. *Planta*, 213, 164-174
- Ruberto G, Renda A, Tringali C, Napoli EM, Simmonds MSJ (2002) Citrus limonoids and their semi-synthetic derivatives as anti-feedant agents against *Spodoptera frugiperda* larvae. A structure-activity relationship study. *J Agric Food Chem*, 50, 6766-6774
- Miller EG, Fanous R, Rivera-Hidalgo F, Binnie WH, Hasegawa S (1989) The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 10, 1535-1537
- Hasegawa S, Bennett RD, Herman Z, Fong CH, Peter OU (1989) Limonoid glucosides in Citrus. *Phytochemistry*, 28, 1717-1720
- Kitaab M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in Citrus. *FEBS Lett*, 469, 173-178
- Nomura Y, Ikeda M, Yamaguchi N, Aoyama Y, Akiyoshi K (2003) Protein refolding assisted by self-assembled nanogels as novel artificial molecular chaperone. *FEBS Lett*, 553, 271-276