

Cloning of Geranylgeranyl Pyrophosphate Synthase (CrtE) Gene from *Kocuria gwangalliensis* and Its Functional Co-expression in *Escherichia coli*Yong Bae Seo<sup>1†</sup>, Gun-Do Kim<sup>1†</sup> and Jae Hyung Lee<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea<sup>2</sup>Basic Science Research Institute, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received July 12, 2012 / Revised July 31, 2012 / Accepted August 7, 2012

A gene encoding a novel geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase from *Kocuria gwangalliensis* has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. The deduced amino acid sequence showed 59.6% identity with a putative GGPP synthase (CrtE) from *K. rhizophila*. An expression plasmid containing the *crtE* gene was constructed, and *E. coli* cells containing this plasmid produced a recombinant protein with a theoretical molecular mass of 41 kDa, corresponding to the molecular weight of GGPP synthase. Due to the lack of *crtE*, *crtB*, and *crtI* in *E. coli*, the biosynthesis of lycopene was only obtained when the plasmid pCrtE was co-transformed into *E. coli* expressing the pRSrtBI-carrying carotenoid biosynthesis *crtB* and *crtI* genes, which were sub-cloned from *Paracoccus haundaeensis*. The biochemical studies on the expressed proteins were performed via HPLC. The results obtained from this study will provide a wider base of knowledge regarding the primary structure of CrtE cloned from *K. gwangalliensis* at the molecular level.

**Key words** : *Kocuria gwangalliensis*, carotenoid, geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), lycopene, geranylgeranyl pyrophosphate synthase (CrtE)

## 서 론

이소프레노이드(isoprenoid)는 자연계에 널리 존재하는 물질로 이소프렌(C<sub>5</sub>) 단위가 반복적으로 구성된 생체분자이며, 현재까지 약 55,000개 정도의 물질이 이소프레노이드 또는 테르페노이드(terpenoid)로 알려져 있다[4,8]. 이러한 이소프레노이드를 전구체로 하여 생산되는 생체 내 대사산물로는 카로티노이드(carotenoid), 세포막 성분인 스테롤(sterol), 단백질의 당화과정(glycosylation)에 첨가되는 돌리콜(dolichol), 전자전달계의 유비퀴논(ubiquinone), 전사과정의 isopentenylated tRNA, 호르몬으로 앱시스산(abscisic acid), 시토키인(cytokinins), 지베렐린(giberellic acid), 스테로이드 호르몬 등이 있으며 이들은 신진대사와 세포의 구조에 매우 중요한 역할을 한다[1,3].

이소프레노이드를 전구체로 하여 생산되는 다양한 생리활성 물질군 중 카로티노이드 생합성 과정을 살펴보면 Fig. 1에서와 같이 farnesyl pyrophosphate (FPP)와 isopentenyl pyrophosphate (IPP)가 축합되어 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)가 생산된다. 이러한 GGPP 생합성에 관

여하는 geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPP synthase; CrtE)는 prenyltransferase 그룹에 속하는 효소로 두 개의 동일한 폴리펩티드로 이루어져 있으며, 이들 대부분은 전구체를 mono-, sesqui-, diterpenoids로 만드는 역할을 하기 때문에 생체 내에서 테르페노이드 생합성의 중요한 분지점 효소로서 보고되고 있다[2,21]. GGPP synthase에 의해 합성된 GGPP는 생물체마다 서로 다른 역할을 다양하게 수행하고 있으며, 진핵생물의 경우 prenylation된 단백질의 C<sub>20</sub> 지질 일부를 합성하기 위한 필수적인 전구체이며, 식물과 다양한 미생물의 경우는 카로티노이드 생합성에 있어서 필수적인 전구체이다[11].

카로티노이드를 생합성하는 식물 및 미생물에서 이들이 생산하는 첫번째 카로티노이드는 파이토엔(phytoene)이며, 이는 두 분자의 GGPP가 축합될 때 생성된다. 이처럼 C<sub>30</sub>, C<sub>40</sub> 및 C<sub>50</sub>의 카로티노이드가 생체 내에서 생합성 되기 위해서는 카로티노이드 생합성 경로에서 GGPP가 반드시 필요한 기질이 된다. 이러한 GGPP를 생합성하는 GGPP synthase는 *crtE*에 의해 암호화 되어 있으며, 현재까지 세균에서 밝혀진 *crtE*는 *Kocuria rhizophila* (accession no. NC010617) [20], *Micrococcus luteus* (accession no. ZP06502819) [23], *Arthrobacter arilaitensis* (accession no. YP003916548) [9], *Clavibacter michiganensis* (accession no. YP001711260) [22], *Sanguibacter keddiei* (accession no. YP003314051) [6], *Paracoccus haundaeensis* (accession no. AY957386) [12] 등에서 클로닝 되어 보고되었다.

본 연구에서는 *Kocuria gwangalliensis* [16]의 genomic DNA

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5618, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : haehoo76@pknu.ac.kr

# Yong Bae Seo and Gun-Do Kim are contributed equally for the work.

# The GenBank accession number for the CrtE nucleotide sequence reported here is JN582050.

에서 GGPP 생합성에 관여하는 GGPP synthase를 암호화하는 *crtE* 유전자를 클로닝하여 대장균에서 발현시킨 후, 본 저자에 의해 연구 및 보고된 *P. haeundensis*의 카로티노이드 생합성 유전자 (*crtB* 및 *crtI*)와 새롭게 분리된 *K. gwangalliensis*의 *crtE* 유전자를 이용하여 라이코펜 생합성을 유도하였다. 또한 이들 유전자에 의해 발현되는 효소들의 작용에 의해 생산된 라이코펜을 HPLC를 이용하여 대장균에서 라이코펜 생산 유무를 검증하였다. 이와 같은 연구 결과는 새로이 밝혀진 *K. gwangalliensis*가 생합성하는 카로티노이드의 조절 메커니즘을 이해하고 비카로티노이드 생합성 균주에서 카로티노이드의 생산 및 생산증대 연구에 대한 기초 데이터를 제공할 것이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 부산 광안리 연근해에서 분리·동정된 핑크색 색소를 생성하는 *K. gwangalliensis*을 PPES-II [(0.2 g Polypeptone, 1.0 g Bacto soytone, 1.0 g Proteose peptone, 1.0 g Bacto yeast extract, 3% NaCl, 0.1% Ferric citrate, 1 distilled water (DW)] 배지에서 25°C 교반 배양 하였으며, 형질전환에 사용된 대장균 균주 XL1-blue [endA1 gyrA96 (nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ (lacZ) M15] hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) ]와 BL21 (DE3) [F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>+</sup>) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])] 는 Luria-Bertani (LB; 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 1% NaCl) 배지에서 37°C 교반 배양하여 사용하였다.

### Genomic DNA 분리 및 Cosmid library구축

*K. gwangalliensis*의 genomic DNA 분리는 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)을 사용하여 추출하였으며, 그 과정은 다음과 같다. 멸균된 1.5 ml tube에 배양액 1 ml을 넣고 14,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 침전시킨 후 침전물을 취해 200 μl의 lysis buffer와 20 μl의 단백질 분해효소 K (proteinase K)를 첨가 후, 56°C에서 1시간 반응시

켰다. 침전물이 완전히 분해되면 200 μl의 binding buffer를 넣고 60°C에서 10분간 반응시킨 후 100 μl의 이소프로판올 (isopropanol)을 넣고 섞어준 후, binding column에 옮긴 다음 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리 후, 500 μl의 washing buffer을 넣고 8,000 rpm에서 1 분간 원심분리 하였으며 이를 2회 실시 하였다. 원심분리가 끝난 후 binding column을 1.5 ml 멸균 튜브에 옮겨 100 μl elution buffer을 넣고 5분간 상온에서 반응한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심 분리하여 genomic DNA을 분리하였다. 또한, Cosmid genomic library 제작은 Sambrook 과 Russell의 방법[15]을 일부 변경하여 genomic library를 구축하였다.

### GGPP synthase (*crtE*) 클로닝 및 염기서열 결정

*K. gwangalliensis*의 cosmid genomic library로부터 GGPP synthase (*crtE*) 유전자의 클로닝을 위하여 계통학적으로 유연 관계가 높은 균주들로부터 GGPP synthase의 보존된 영역을 NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) conserved domains site에서 검색하여 이를 기반으로 degenerate primer을 디자인 하였다(Table 1). Degenerate primer을 이용 PCR을 수행하여 부분 단편을 증폭하였다. *crtE* 유전자의 open reading frame (ORF)을 클로닝 하기 위하여 DNA walking speedup premix kit (Seegene, Seoul, Korea)을 이용하였다. DNA walking kit을 이용하여 증폭된 유전자는 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 각각 클로닝 하였으며, 각 클론들의 DNA 염기서열을 분석하여 최종적으로 *crtE* 서열을 확보하였고, 이를 NCBI GeneBank에 등록하였다.

### *K. gwangalliensis* GGPP synthase (CrtE) 염기서열 분석

*K. gwangalliensis* 유래 CrtE 효소의 1차 구조 및 염기서열 분석은 NCBI GeneBank database의 BLAST algorithm을 이용하여 기존 세균에서 밝혀진 bacteria type의 phytoene desaturase의 아미노산 서열을 확보한 후, 아미노산 서열을 비교 분석하여 상동성을 조사하였다. 아미노산의 multiple sequence alignment는 Clustal W 프로그램을 사용하였으며, 계

Table 1. Primers used in this study

Primers	Nucleotide sequences	Remark
CE-F	5'-AGCTAW(A/T)TGATGCKK(G/T)CCC-3'	Degenerate primer
CE-R	5'-TCGGG(G/C)CGTCTGCAM(A/C)CCC-3'	Degenerate primer
K <sub>g</sub> CrtE -F1	5'-AAGAAGTGGACGCCTACTTCGA-3'	
K <sub>g</sub> CrtE -F2	5'-AAGACCGCCACTACTCGTTCG-3'	Target gene cloning forward primer
K <sub>g</sub> CrtE -F3	5'-TGGCCGATGCACAGGACGCACT-3'	
K <sub>g</sub> CrtE -R1	5'-TCGAAGTAGGCGTCCAGTTCTT-3'	
K <sub>g</sub> CrtE -R2	5'-ACAACACGTCGTCCAACTCACC-3'	Target gene cloning reverse primer
K <sub>g</sub> CrtE -R3	5'-CGCTCGAGTGCCTGTGCAT-3'	
K <sub>g</sub> CrtE -EN	5'-CATATGATGAACTCTCCACGG-3'	K <sub>g</sub> CrtE expression ( <i>Nde</i> I)
K <sub>g</sub> CrtE -EH	5'-AAGCTTCTTCTCCGATGCAGC-3'	K <sub>g</sub> CrtE expression ( <i>Hind</i> III)

통수(phylogenetic tree) 분석을 위해서는 neighbor-joining method를 이용하는 프로그램인 NEIGHBOR (Mega, version 4.0)를 사용하여 작성하였다[14].

대장균 발현 벡터의 구축 및 라이코펜 생합성을 위한 재조합 DNA 구축

확보된 *crtE* 유전자를 대장균에서 과발현시키기 위해서 pColdI vector (Takara, Shiga, Japan)의 *Nde*I과 *Hind*III site를 이용하여 *crtE* 유전자를 클로닝 하였다. 이를 위해서 T-vector에 클로닝 된 *crtE* 유전자의 5'-말단과 3'-말단에 각각 *Nde*I과 *Hind*III site를 가지는 primer (Table 1)를 이용하여 PCR로 증폭하였다. PCR product 및 pColdI vector를 *Nde*I과 *Hind*III 제한효소로 처리한 후 대장균 발현벡터에 클로닝하여 pCcrTE 재조합 DNA를 구축하였으며, 이를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하여 형질전환된 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 ampicillin 50 µg/ml가 함유된 LB 배지에 O.D.<sub>600</sub>=0.5 일 때까지 37°C에서 배양한 후, 0.1 mM IPTG (isopropyl-β-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 16°C에서 과발현을 유도하였고, 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분석하였다. 재조합 단백질의 대장균 내 발현 유무 확인을 위하여 Western blot 분석법 이용하였으며, 12% SDS-PAGE gel에 의해 분리된 C-말단 부위에 6X-histidine tag를 가진 재조합 단백질을 electro-transfer를 이용하여 nitrocellulose (NC) membrane로 이동시켰으며, 이들 재조합 단백질의 확인을 위해 1차 항체는 goat antiserum against 6-His tag를 사용하였으며, 2차 항체는 alkaline phosphate가 결합된 goat antibody against goat IgG 항체를 사용하였다. 또한, 이들 항체의 결합에 의한 NC membrane 상에서의 발색을 위한 시약은 BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 시약을 사용하여 대장균 내 재조합 단백질인 KgCrtE의 발현 유무를 확인하였다[18]. 또한, 대장균 BL21 (DE3)에서 라이코펜(lycopene) 생합성을 위해 *P. haeundaensis*의 *CrtB* (Phytoene synthase), *CrtI* (Phytoene desaturase) 유전자를 대장균 동시 발현벡터인 pRSFDuet1 vector (Novagen, Quincy, MA, U.S.A.)에 클로닝하여 pRSctBI 재조합 DNA를 구축하였다. 이를 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환하여 선별하였다. 대장균에서 라이코펜을 생합성 하기 위해서 위의 두 재조합 DNA (pCcrTE와 pRSctBI)를 BL21 (DE3)에 공발현(co-expression)시켜 16°C 및 37°C에서 24시간 배양하여 라이코펜 생합성을 유도하였다.

대장균에서 생합성 된 라이코펜의 추출 및 분석  
대장균에서 생합성된 라이코펜은 HPLC를 사용하여 분석하였다. 형질전환된 대장균 균주에서 색소를 추출하기 위하여 90% acetone으로 3분간 homogenizer 하여 색소를 추출하고, 13,000 rpm로 2분간 원심분리하여, 상층액만 주사기 필터

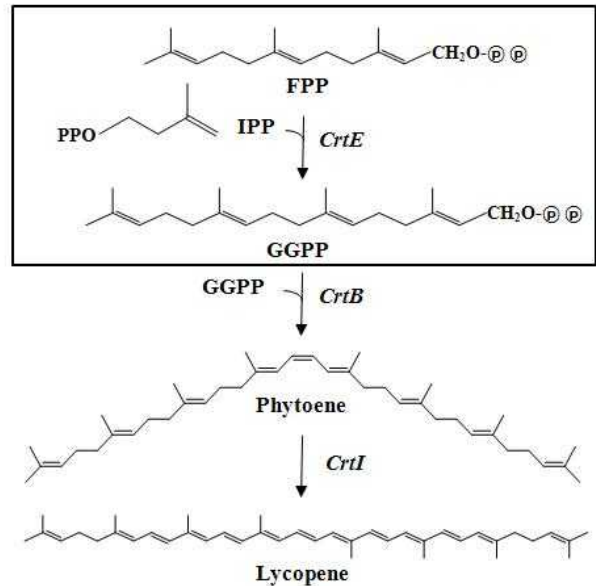


Fig. 1. Summary of lycopene biosynthetic pathway. Abbreviations used: FPP, farnesyl pyrophosphate ; IPP, isopentenyl pyrophosphate (diphosphate); CrtE, GGPP synthase; GGPP, geranylgeranyl pyrophosphate; CrtB, Phytoene synthase; CrtI, Phytoene desaturase.

(0.22 µm nylon filter)를 이용해 여과하였다. HPLC 분석을 위하여 20 µl의 샘플을 주입하고 분리시간은 30분 동안 진행하였다. HPLC는 Bio-rad (Hercules, CA, U.S.A.) 사의 Automated Biologic HR system (#750-0047)를 이용하였다. Column은 Nova-Pak HR 6 U C18 column (3.9×300 mm)을 사용하였고 column 온도는 40°C이다. 색소 추출을 위한 용매는 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), acetonitrile, methanol, ethyl acetate가 이용되었다. HPLC 작동 중 용매의 농도는 다음과 같다: 14% 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 84% acetonitrile, 2% methanol (0-15 min), 68% methanol과 32% ethyl acetate (15-20 min). Post-running은 10분간 이루어졌으며 사용된 용매의 농도는 시작할 때의 용매 농도와 같다. 컬럼 내의 유속은 분당 1 ml이 되게 하였다[17]. 분리된 각각의 카로티노이드들은 photodiode array detector를 이용하여 absorption maxima인 280 nm와 470 nm에서 측정하여 표준물질과 비교 분석하였으며, 라이코펜 및 GGPP standard는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

결과 및 고찰

*K. gwangalliensis* GGPP synthase (*crtE*) 유전자 클로닝

*K. gwangalliensis*로부터 분리한 genomic DNA를 이용, cosmid genomic library를 제작하였으며 분리한 genomic DNA와 cosmid genomic library를 주형으로 사용하여 PCR을 수행

하였다. 또한 GGPP synthase (*crte*) 클로닝을 위한 oligonucleotide 제작은 이미 밝혀진 다양한 세균 GGPP synthase의 염기서열을 비교 분석하여 conserved domain에서 degenerate primer을 제작하였다(Table 1). 이들을 기반으로 하여 PCR을 수행한 결과 약 600 bp 정도의 부분 염기서열을 얻을 수 있었다. 이렇게 밝혀진 부분 염기서열을 토대로 target specific primer를 디자인하여(Table 1), DNA walking kit을 이용하여 약 1.3 kbp 정도의 PCR product를 증폭하였고, 이를 TA 클로닝 한 후 유전자 염기서열 분석기를 이용하여 *K. gwangalliensis* GGPP synthase (*Kgcrte*) 유전자의 서열을 밝혔다(Fig. 2). 클로닝된 *Kgcrte*의 ORF는 1,158 bp, 총386개의 아미노산으로 구성되어 있으며 1,159-1,161 bp에 종결 코돈인 TAA 서열이 존재하고 있었다. 개시 코돈을 결정하기 위하여 Shine-Dalgarno 서열과 Morran 등[13]에 의해 밝혀진 그람 양성 세균에서의 ribosome binding site를 검색하였다. 그 결과 원핵

생물에서 공통적으로 나타나는 AGGA 서열이 개시 코돈 상단 6 bp에 존재하고 있었다. 또한, *Kgcrte*에 의해 발현되는 GGPP synthase의 예상 분자량(M.W.) 및 등전점(pI)은 각각 41.0 kDa과 약산성의 5.73을 가지는 것으로 분석되었다.

GGPP synthase (*Kgcrte*)의 아미노산 서열 분석

*KgCrte*의 아미노산 서열을 토대로 예상되어지는 단백질의 2차 구조는 SABLE website (<http://sable.cchmc.org>)를 활용, transmembrane domain의 검색은 TMpred (Prediction of Transmembrane Regions and Orientation) algorithm (<http://www.ch.embnet.org>)을 사용하여 분석하였다. *KgCrte* 단백질의 2차 구조는 1개의  $\beta$ -sheet, 17개의  $\alpha$ -helix 및 18개의 random coil로 구성되어 있었다(Fig. 2). Transmembrane domain은 3부분이 존재하는 것으로 분석되었으며, transmembrane domain의 위치는 N-terminus를 inside로 하여

-78	CCTACCGGGACGAACTCCGGGATCGGCCCACTCAGGCAGCGGACCCGGGAGCCCTGACAACCGGGAGGATCACGG	
	<b>M N S P R L T D T H Q P F P V P L R G G A V A T</b>	24
1	ATGAACTCT CCACGGTTG ACGACACC CACCAGCCC TTTCCCGTG CCGCTGCGC GCGGGGGCG GTTGCCACG	
	<b>S D P A W D D F C V A V A E E L D A Y F D G L K</b>	48
73	TCCGATCCC GCCTGGGAC GACTTCTGC GTGGCCGTG GCGAAGAA CTGGACGCC TACTTCGAC GGTCTCAAG	
	<b>D T V R C S P G F P V L R S R I R E Q V T G G K</b>	72
145	GACACGGTT CGATGCAGC CCGGGTTT CCGGTGCTG CGCTCGCGG ATTCGTGAG CAGGTACAG GCGGAAAK	
	<b>L L R P R L T R L A W R A F G G R A E P V M D G</b>	96
217	TTGCTCGCG CCGGCTCTG ACCCGCCTG GCCTGGCGG GCCTTCGGC GGACGCGCG GAGCCCGTC ATGGACGGC	
	<b>A T R N A P D P D C V R L A A S F E L L H A A L</b>	120
289	GCGACCCGC AACGCCCC GATCCGAT TCGGTGCGC CTGGCGGCG TCCTTCGAG CTACTGCAT GCCGCCCTT	
	<b>L V H D D V V D R D P V R R G R P T V G E L Y R</b>	144
361	CTGGTGCAC GACGACGTG GTGACCCG GATCCCGTG CGTCGCGGG CCGCCACAG GTGGGGGAG CTCATCCGC	
	<b>R D A H S A G A P S D E A Q H L G E A V A I I G</b>	168
433	AGGGAACGG CACAGTGGG GGGGCACCG TCGGACGAA GCCCAACAC CTGGGTGAG GCGGTGCGG ATCATCGGC	
	<b>G D L L L A G A L Q L A T T C T T D P V R L Q A</b>	192
505	GGTGACCTG CTGCTGGCC GGGGCCCTT CAACTGGCC ACCACGTGC ACCACTGAT CCGGTTGCA TTACAAGCC	
	<b>V S A V V F D A V T A S A A G E L D D V L L S M</b>	216
577	GTGTCGCGG GTGGTGTTC GATGCTGTG ACGGCATCG GCGCCGGT GAGTTGGAC GACGTGTGT TTGTTCCAT	
	<b>H R Y G Q Q H P A V Q D I L N M E R L K T A T Y</b>	240
649	CATCGTAC GGACAGCAA CACCCGCG GTGCAGGAC ATCCTCAAC ATGGAACGG CTCAAGACC GCCACCTAC	
	<b>S F E A P L R A G A L L A G A N Q E D A A R L A</b>	264
721	TCGTTGAGG GCCCGGCTC AGGGCCGGC GCGTTGCTG GCTGGTGCA AACAGGAA GACGCGGCT CGCCTCGCG	
	<b>Q A G S R I G V A Y Q V V D D V L G T F G D P R</b>	288
793	CAGCGGGGT TCGCGATC GCGTGGCC TACCAGGTG GTGGACGAC GTTCTGGGA ACCTTCGGG GACCCGAGA	
	<b>L T G K S T E A D L R E G K A T V L T A H G M Q</b>	312
865	TTGACCGGA AAATCCACC GAAGCGGAC CTGCGCGAG GGCAAGGCC ACCGTGCTC ACGGCTCAC GGGATGCAG	
	<b>D A R A R K A L A G F A A G N V T V A Q V K A A</b>	336
937	GACGCCGA GCCCGTAAA GCACTTGCC GGATTCGCC GCCGAAAC GTCACGGTG GCGCAGGTC AAGGCTGCC	
	<b>L A Q A G A E T S A V K L A A E L V A D A Q D A</b>	360
1009	CTGGCACAG GCCGGGCC GAGACCAGT GCCGTGAAA TTGGCCGCG GAGCTTGTG GCCGATGCA CAGGACGCA	
	<b>L E R L P L P E A E R A E L S A I C H Y V L H R</b>	384
1081	CTCGAGCGG CTGCGGCTG CCGGAGGCG GAACGTGCC GAGCTCAGT GCCATTTGT CATTACGTG CTGCATCGG	
	<b>R K *</b>	387
1153	AGGAAGTAAAGTGACTCGAGGTATCCCGCGCGCACCCCTTGCCGCTGTACACCCGACCGCGGCGCGCGCGG	

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Kocuria gwangalliensis* Crte. The nucleotide sequence is numbered to the left and the amino acid to the right. The bold type indicates the initiator codon. The asterisk and bold type indicate the stop codon. The putative Shine-Dalgarno (SD) sequences for ribosome-binding site are italic and bold type. The putative helical, beta-sheet and transmembrane regions are dash-line, underline and shadow box. The nucleotide sequence has accession number JN582050 in the GenBank database.



163-183 아미노산, 192-209 아미노산, 323-342 아미노산 위치에서 transmembrane helices가 존재하는 것으로 추정되었다 (Fig. 3).

KgCrtE의 보존된 영역과 계통학적 유연관계를 밝히기 위하여 GenBank에 등록된 기존 세균에서 밝혀진 GGPP synthase의 아미노산 서열을 대상으로 multiple alignment를 작성하였다(Fig. 4). 또한, 작성된 multiple alignment를 바탕으로 KgCrtE의 계통학적 유연관계를 알아보기 위하여 phylogenetic tree 분석을 하여 Fig. 5에 나타내었다. Protein blast (BLASTP) 분석 결과, GGPP synthase는 테르페노이드 생합성에 있어서 중요한 분지점 효소이며 단백질 prenylation 뿐만 아니라 diterpenes 생합성에 작용하는 효소로서[5], 공통적으로 두 개의 아스파르트산이 풍부한 영역[DDXX(XX)D]이 존재하는 것으로 알려져 있고[7,19], 이들 두 부분의 아스파르트산이 풍부한 지역이 allylic 기질과 isopentenyl diphosphate (IPP)의 결합 자리로 작용하는 것으로 알려져 있다[6]. 본 연구에 밝혀진 KgCrtE의 multiple alignment 분석에서 살펴보면 5군데의 conserved region을 찾을 수 있었으며 Fig. 4에 Domain I-V로 표시하였다. Domain II와 V는 아스파르트산이 풍부한 부분으로써 motif를 포함하고 있었다. Domain II의 motif인 DDvvD는 세균 GGPP synthase에서 확인 가능하였고, 이들의 기능은 기질의 결합에 관여하는 것으로 여겨지며, Domain V에 존재하는 DD(XX)<sub>6</sub>D motif는 Ashby *et al.* [10]에 의해 밝혀진 allyl isoprenoid binding site로 추정된다. 두 영역의 motif는 촉매 활성화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 여겨진다.

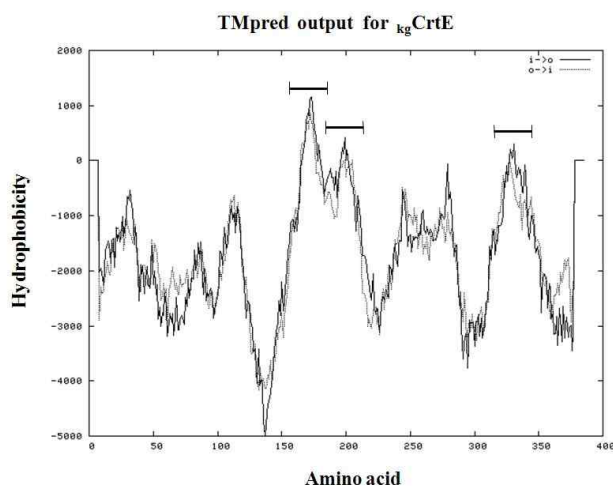


Fig. 3. Predicted hydropathy profiles for the deduced amino acid sequence of KgCrtE of *K. gwangalliensis*. Potential transmembrane regions are marked with a horizontal line above the profiles. Transmembrane domains of KgCrtE located in 163-183, 192-209, and 323-342 amino acids.

KgCrtE의 계통학적 유연 관계를 밝히기 위하여 bacteria-type의 GGPP synthase의 아미노산 서열을 multiple alignment 분석한 결과 *Kocuria rhizophila* (59%, accession no. NC010617), *Micrococcus luteus* (15%, accession no. ZP06502819), *Arthrobacter arilaitensis* (38%, accession no. YP003916548), *Clavibacter michiganensis* (46%, accession no. YP001711260), *Sanguibacter keddiei* (39%, accession no. YP003314051), *Agromyces mediolanus* (30%, accession no. AAM94362), *Beutenbergia cavernae* (32%, accession no. YP002880993), *Brevibacterium linens* (35%, accession no. ZP05914711), *Corynebacterium efficiens* (25%, accession no. NP737253), *Paracoccus haundensis* (33%, accession no. AY957386)로 밝혀졌다. 이들 서열 중 상동성이 가장 높은 것은 같은 속(Genus)에 속하는 *K. rhizophila*의 GGPP synthase였으며, 가장 낮은 것은 *Micrococcus luteus*가 생합성하는 GGPP synthase로 밝혀졌다.

#### 대장균에서 GGPP synthase (KgCrtE)의 발현과 확인

대장균에서 KgGGPP synthase의 발현 유무를 확인 위하여 pColdI vector의 *Nde*I/*Hind*III site에 *KgcrtE* 유전자를 클로닝 하였으며, 이를 위해 N-말단과 C-말단에 *Nde*I/*Hind*III site를 가지는 primer를 제작(Table 1)하여 *KgcrtE* 유전자를 PCR로 증폭한 후 제한효소를 처리하여 pColdI vector에 sub-cloning하여 재조합 DNA 구축하고, 이를 pCCrtE로 명명하였다(Fig. 6A). 그리고, 대장균에서 라이코펜의 생합성을 유도하기 위하여 대장균 동시 발현벡터인 pRSFDuet-1 vector의 multiple cloning site (MCS) 1과 MCS2에 각각 *P. haundensis*의 *CrtB* (Phytoene synthase), *CrtI* (phytoene desaturase) 유전자를 클로닝 하였다. MCS1에 *CrtB* 유전자를 삽입하기 위해서 N-말단과 C-말단에 각각 *EccR* I과 *Not* I 제한효소 자리를 MCS2에는 *CrtI* 유전자를 삽입하기 위해서 N-말단과 C-말단에 각각 *Nde*I과 *Xba*I 제한효소 자리를 이용하여 재조합 DNA, pRSCrtBI를 구축하였다(Fig. 6B).

대장균에서 *KgcrtE* 유전자의 발현을 위해 pCCrtE 재조합 DNA를 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환 하였으며, 선별된 균주를 암피실린(ampicillin) 50 µg/ml가 함유된 LB 배지에 O.D.<sub>600</sub>=0.5 일 때까지 37°C에서 교반 배양한 후, IPTG 최종 농도 0.1 mM을 첨가한 후 16°C에서 교반배양 하여 과발현을 유도하였고, 12% SDS-PAGE에서 단백질 발현 패턴을 분석하였다. 대장균 BL21 (DE3)에서 발현되는 KgGGPP synthase의 최적 발현시간은 IPTG 첨가 후 약 17시간 정도였으며, 이들의 분자량은 앞서 아미노산 서열로 예측 분석한 약 41 kDa과 일치하였다(Fig. 7A). 또한, 대장균 BL21 (DE3)에서 과발현된 KgGGPP synthase는 Western blot 분석법을 이용하여 검증 확인하였으며 이를 Fig. 7B에 나타내었다.

공발현 시스템을 통해대장균에서생산된 카로티노이드의  
추출 및 분석  
대장균 BL21 (DE3)에서 발현된 KgCrtE 효소의 활성을 검

증 위하여, 먼저 대장균에서의 라이코펜 생합성 유무를 확인  
하였다. 대장균의 경우 메발론산 경로를 통하여 FPP와 IPP를  
생합성 하지만 *crtE*, *crtB*, *crtI* 유전자가 없기 때문에 라이코펜

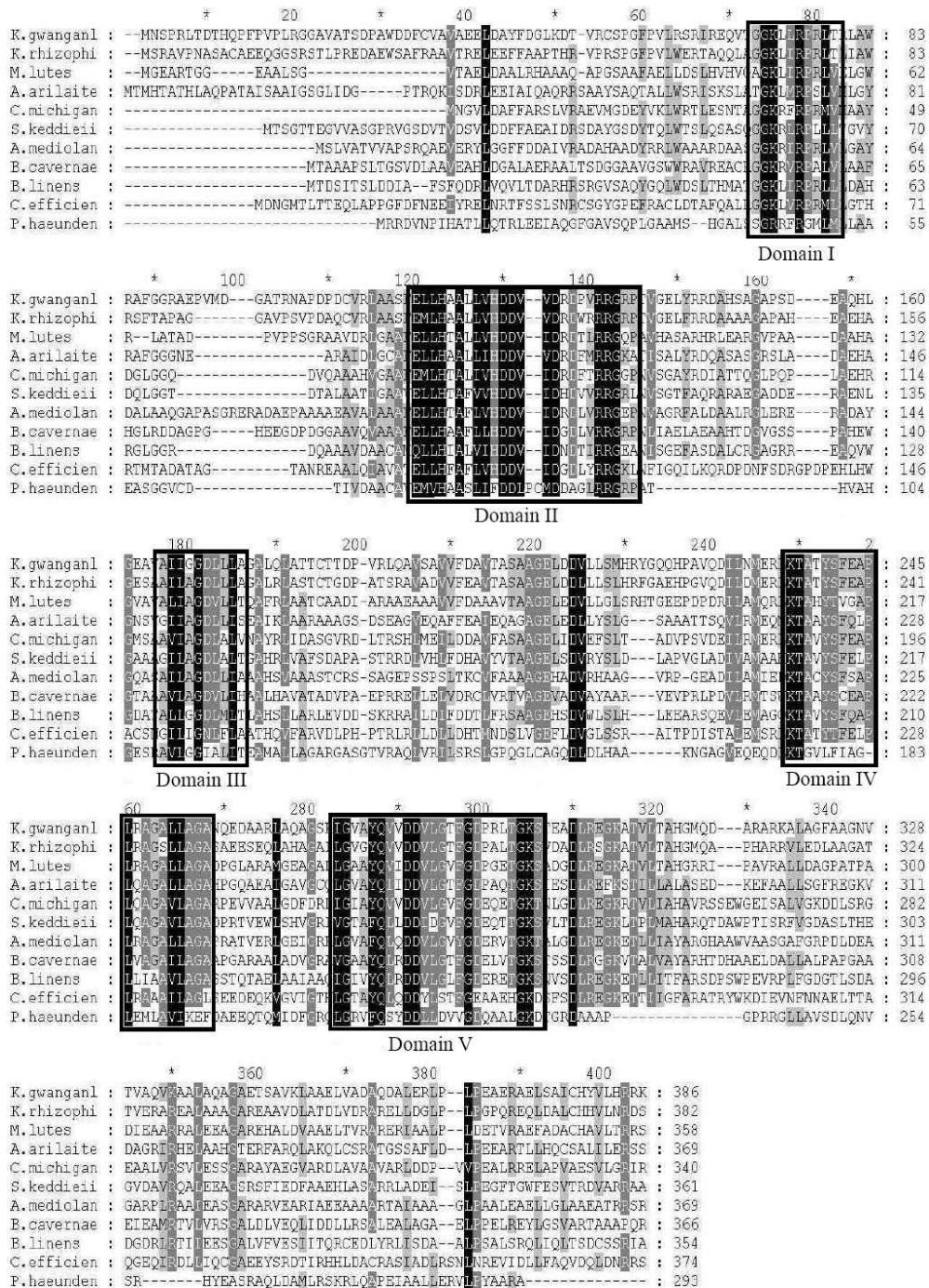


Fig. 4. Multiple alignment of deduced amino acid sequences of KgCrtE and other bacteria. The amino acid sequences are obtained from GeneBank: *kocuria rhizophila* (NC010617), *Micrococcus lutes* (ZP06502819), *Arthrobacter arilaitensis* (YP003916548), *Clavibacter michiganensis* (YP001711260), *Sanguibacter keddiei* (YP003314051), *Agromyces mediolanus* (AAM94362), *Beutenbergia cavernae* (YP002880993), *Brevibacterium linens* (ZP05914711), *Corynebacterium efficiens* (NP737253), *Paracoccus haeundansis* (AY957386), *Kocuria gwangalliensis* (JN582050)

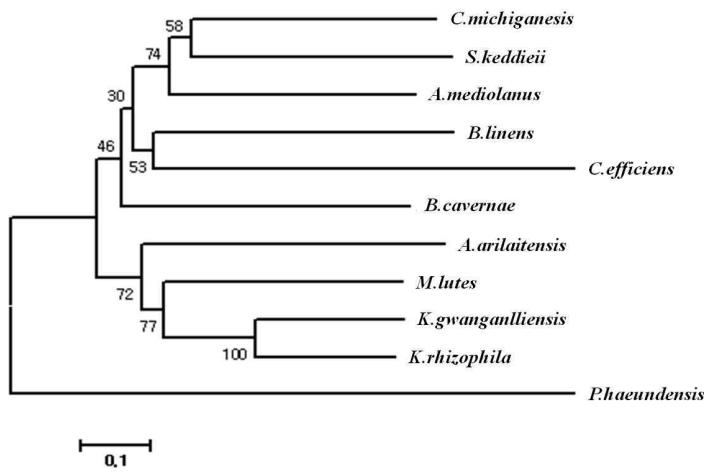


Fig. 5. A molecular phylogenetic tree of CrtI based on the NJ method. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support based on 1,000 replicated datasets. Bar, 0.1 substitutions per amino acids position.

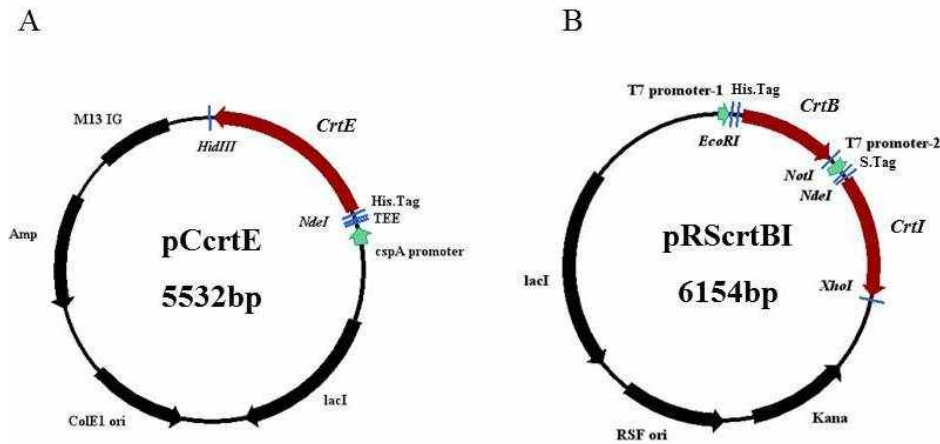


Fig. 6. Constructions of the lycopene biosynthesis gene expression plasmid. (A) The pCrtE plasmid carried the geranylgeranyl pyrophosphate biosynthesis gene (KgCrtE) of *K. gwangalliensis*. (B) pRSctBI carried the lycopene biosynthesis gene cluster composed of two structural genes (*crtB* and *crtI*) of *P. haundensis*.

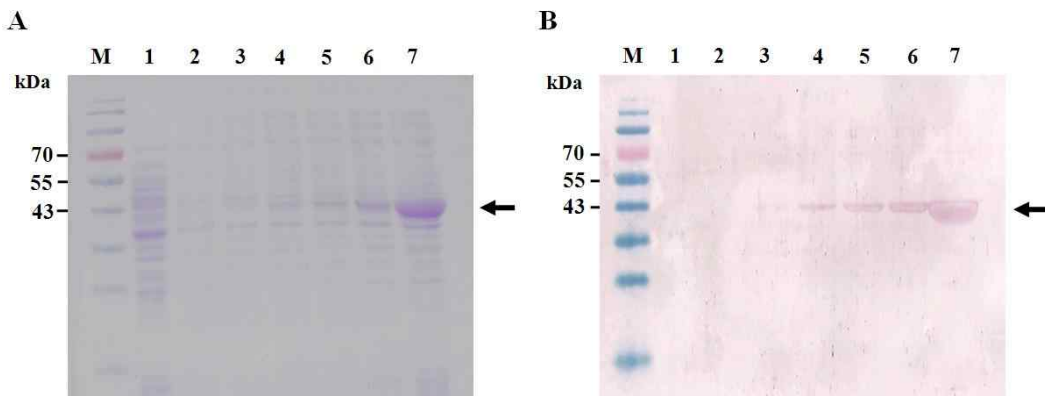


Fig. 7. Analysis of KgGGPP synthase (CrtE) by SDS-PAGE and Western blotting. Lane M, standard protein molecular weight markers; Lane 1, uninduced cell extracts as control; lanes 2-7, induced cell extracts 0, 1, 3, 5, 7, and 17 hr after IPTG induction, respectively. (A) The expressed proteins were resolved by 12% SDS-PAGE. (B) Western blot analysis of the expressed proteins. Proteins were electrotransferred from the SDS-PAGE gel to a nitrocellulose membrane, probed with goat antiserum against 6-His tag, and incubated with alkaline phosphatase coupled goat antibody against goat IgG. The nitrocellulose membrane was developed using the BCIP/NBT.

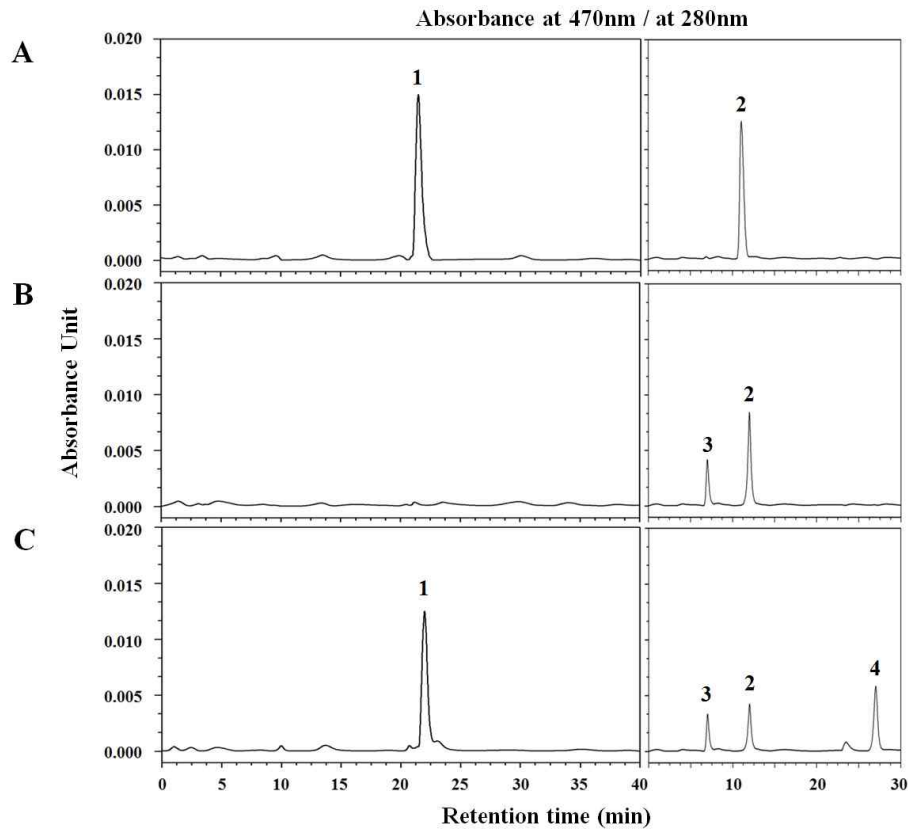


Fig. 8. HPLC analysis of carotenoids expressed in *E. coli*. Carotenoids are detected at absorbance 280 nm and 470 nm. (A) Lycopene and GGPP standard. (B) *E. coli* containing plasmid pCrtE. (C) *E. coli* containing pCrtE and pRScrtBI. Peak 1, lycopene; Peak 2, GGPP; Peak 3, putative FPP or IPP; Peak 4, phytoene.

을 생합성 하지는 못한다. 이러한 특징을 이용하여 대장균 BL21 (DE3)에 앞서 구축된 두 재조합 DNA을 형질전환 시켜 이들을 공발현 시켰다. 그리고 형질전환된 균주에서 생산되는 라이코펜은 실험 방법에서 서술한 것처럼 추출하여 HPLC 분석법을 이용하여 생합성 유무를 확인하였다. 카로티노이드는 종류에 따라 각각의 서로 다른 최대 흡수(absorption maxima) 파장대를 가지고 있다. 파이토엔(Phytoene) 등의 absorption maxima는 280 nm이며, 라이코펜의 경우 absorption maxima는 470 nm로 알려져 있다[24]. 본 연구에서 생산된 이들 카로티노이드는 표준물질과 더불어 HPLC 분석을 통하여 각각의 absorption maxima인 280 nm와 470 nm에서 측정하였으며, 분석된 결과는 Fig. 8에 나타냈었다. Fig. 8A는 표준물질 라이코펜과 GGPP이며, 라이코펜의 경우 absorption 470 nm에서 retention time 22 분(peak 1)에서 분리되었으며, GGPP는 absorption 280 nm, retention time 13 분(peak 2)에서 분리되어 짐을 확인할 수 있다. Fig. 8B는 pCrtE 재조합 DNA가 형질전환된 대장균에서 생산된 추출물을 HPLC로 분석한 결과로서, 표준물질을 활용한 분석 결과(Fig. 8A)와 비교하였을 때 동일한 시간대의 retention time에서 GGPP가 생산됨을 확인할

수 있다. 또한 peak 3 (retention time 8 분)의 경우 대장균에서 생산되는 FPP 또는 IPP로 추정되며, 본 연구에서는 대장균에서 생산되는 카로티노이드를 중심으로 연구하였기 때문에 따로 이들을 비교 분석하지는 않았다. 마지막으로 Fig. 8C의 결과는 pCrtE와 pRScrtBI 재조합 DNA를 공발현 시켜 생산된 카로티노이드계 물질을 추출하여 HPLC 분석을 실시한 결과로서, 표준물질의 분석 결과와 비교한 결과 absorption 470 nm에서 retention time 22 분대에서 라이코펜이 생산됨을 확인할 수 있었고 absorption 280 nm, retention time 8 분(peak 3), 13 분(peak 2), 27 분(peak 4)에서 각각 FPP (or IPP), GGPP, Phytoene이 생산됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과들을 종합하여 추론하면, 대장균 형질전환체에서 생합성된 KgCrtE는 그 효소적 특성을 잃지 않고 정상적으로 기능을 수행하고 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 *K. gwangalliensis*로부터 카로티노이드 생합성 경로의 첫 번째 물질을 생합성하는 GGPP synthase를 암호화 하는 *ctfE*의 클로닝과 KgCrtE 단백질의 1, 2차 구조 분석을 통한 이 효소의 구조적 특징을 분석, 효소활성의 검증을 위해 BL21 (DE3)에서 GGPP 및 라이코펜의 생합성을 유도하여



CrtE의 기능적 활성 유무를 HPLC 분석법을 통해 표준물질과 비교 검증하였다. 따라서, 본 연구의 결과는 새로운 카로티노이드 생합성 유전자의 발굴과 비카로티노이드 생합성 균주에서의 다양한 카로티노이드 생산을 위한 기초 데이터로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2008년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2008-359-F00012).

### References

- Amar, Y., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish Shellfish Immunol.* **16**, 527-537.
- Breitenbach, J., Visser, H., Verdoes, J. C., van Ooyen, A. J. and Sandmann, G. 2011. Engineering of geranylgeranyl pyrophosphate synthase levels and physiological conditions for enhanced carotenoid and astaxanthin synthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Biotechnol. Lett.* **33**, 755-761.
- Chemler, J. A., Yan, Y. and Koffas, M. A. 2006. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* **23**, 5-20.
- Christianson, D. W. 2008. Unearthing the roots of the terpenome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 141-150.
- Engprasert, S., Taura, F., Kawamukai, M. and Shoyama, Y. 2004. Molecular cloning and functional expression of geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Coleus forskohlii* Briq. *BMC Plant Biol.* **4**, 18
- Fernandez-Garayzabal, J. F., Dominguez, L., Pascual, C., Jones, D. and Collins, M. D. 1995. Phenotypic and phylogenetic characterization of some unknown coryneform bacteria isolated from bovine blood and milk: description of *Sanguibacter* gen. nov. *Let. Appl. Microbiol.* **20**, 69-75.
- Hemmi, H., Noike, M., Nakayama, T. and Nishino, T. 2003. An alternative mechanism of product chain-length determination in type III geranylgeranyl diphosphate synthase. *Biochem.* **270**, 2186-2194.
- Hunter, W. N. 2007 The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 21573-21577.
- Irlinger, F., Bimet, F., Delette, J., Lefevre, M. and Grimont, P. A. D. 2005. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov. novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 457 - 462.
- Lin, J., Jin, Y. J., Zhou, X., and Wang, J. Y. 2010. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Jatropha curcas*. *Biotechnol.* **9**, 3342-3351.
- Lee, J. H. and Kim, Y. T. 2006. Cloning and characterization of the astaxanthin biosynthesis gene cluster from the marine bacterium *Paracoccus haunhaensis*. *Gene* **370**, 86-95.
- Lee, J. H., Kim, Y. S., Choi, T. J., Lee, W. J. and Kim, Y. T. 2004. *Paracoccus haunhaensis* sp. nov., a Gram-negative, halophilic, astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1699-1702.
- Morran, C. P. Jr., Lang, N., Le Grice, F. J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A. L., Pero, J. and Losick, R. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**, 339-346.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. pp. 4.7-4.10. 3th eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Seo, Y. B., Kim, D. E., Kim, G. D., Kim, H. W., Nam, S. W., Kim, Y. T. and Lee, J. H. 2009. *Kocuria gwangalliensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 2769-2772.
- Seo, Y. B., Choi, S. S., Nam, S. W., Lee, J. H. and Kim, Y. T. 2009. Cloning and characterization of the zeaxanthin glucosyltransferase Gene (*crtX*) from the astaxanthin-producing marine bacterium, *Paracoccus haunhaensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1542-1546.
- Seo, Y. B., Hwang H. H. and Kim, Y. T. 2011. Molecular characterization and tissue expression of carboxypeptidase H (CPH) gene in flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **16**, 374-382.
- Sitthithaworn, W., Kojima, N., Viroonchatapan, E., Suh, D. Y., Iwanami, N., Hayashi, T., Noji, M., Saito, K., Niwa, Y. and Sankawa, U. 2001. Geranylgeranyl diphosphate synthase from *Scoparia dulcis* and *Croton sublyratus*. Plastid localization and conversion to a farnesyl diphosphate synthase by mutagenesis. *Chem. Pharm. Bull.* **49**, 197-202.
- Takarada, H., Sekine, M., Kosugi, H., Matsuo, Y., Fujisawa, T., Omata, S., Kishi, E., Shimizu, A., Tsukatani, N., Tanikawa, S., Fujita, N. and Harayama, S. 2008. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila*. *J. Bacteriol.* **190**, 4139-4146.
- Wang, K. and Ohnuma, S. 1999. Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 445-451.
- Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., De Boer, S. H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R. I. and Stead, D. E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Rev. Plant Pathol.* **75**, 721-763.
- Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H. R., Chandra, G., Chater, K. F., Dover, L. G., Goh, E. B., Kahan, T., Kaprelyants, A. S., Kyrpides, N., Lapidus, A., Lowry, S. R., Lykidis, A., Mahillon, J., Markowitz, V., Mavrommatis, K.,

Mukamolova, G. V., Oren, A., Rokem, J. S., Smith, M. C., Young, D. I. and Greenblatt, C. L. 2010. Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium. *J. Bacteriol.* **192**, 841-860.

24. Xu, Z., Tian, B. Sun, Z., Lin, J., and Hua, Y. 2007. Identification and functional analysis of a phytoene desaturase gene from the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology* **153**, 1642-1652.

초록 : 코쿠리아 광안리엔시스( *Kocuria gwangalliensis* )의 제라닐제라닐 피로인산염 합성 효소의 클로닝과 대장균에서 공발현을 통한 효소 활성화에 관한 연구

서용배<sup>1</sup> · 김군도<sup>1</sup> · 이재형<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>부경대학교 미생물학과, <sup>2</sup>부경대학교 기초과학연구소)

*Kocuria gwangalliensis*로부터 카로티노이드 생합성 경로의 첫 번째 단계 기질인 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)를 생합성하는 GGPP synthase (CrtE)를 암호화하고 있는 *crtE*를 클로닝 하여 이를 KgGGPP로 명명하였다. 기존 세균에서 밝혀진 GGPP synthase의 아미노산 서열을 NCBI에서 검색하여 KgGGPP synthase의 아미노산 서열과 비교한 결과 *Kocuria rhizophila*와 59.6%의 상동성을 가지는 것을 확인하였다. *crtE* 유전자를 대장균에서 발현 시키기 위하여 pCrtE 재조합 DNA를 구축하였고, 이를 대장균에서 발현시킨 결과 약 41 kDa의 재조합 단백질이 과발현 됨을 확인 할 수 있었으며, 이 단백질은 기존 세균에서 밝혀진 GGPP synthase와 유사한 분자량을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. CrtE 재조합 단백질의 활성을 분석하기 위하여 대장균 내에서 라이코펜의 생합성을 유도 하였다. 대장균의 경우 메발론산 경로를 통하여 FPP와 IPP를 생합성 하지만 *crtE*, *crtB*, *crtI* 유전자가 없기 때문에 라이코펜을 생합성 하지는 못한다. 대장균 내에서 라이코펜의 생합성을 위해서는 *crtE*, *crtB*, *crtI* 유전자의 발현이 필수적으로 요구되기 때문에 *crtB*, *crtI* 유전자의 경우는 *P. haeundensis*에서 유래한 유전자를 이용하여 pRSctBI 재조합 DNA를 구축하여 그 발현을 유도하였다. 상기 두 재조합 DNA를 대장균에서 공발현 시켰으며, HPLC 분석법을 이용하여 대장균 내에서 라이코펜의 생산 유무에 따른 KgGGPP synthase의 활성을 분석하였다.