

DNA shuffling을 이용한 *Alcaligenes faecalis* T1의 PHB depolymerase 활성 증진

신동성 · 남진식 · 이영하*

충남대학교 자연과학대학 미생물학과

Alcaligenes faecalis T1의 poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) depolymerase 활성 증진을 위해 DNA shuffling 방법을 이용하였다. 제조된 *A. faecalis* T1의 PHB depolymerase 돌연변이 유전자의 library를 *Pseudomonas syringae*의 ice nucleation protein 유전자를 포함하는 발현벡터 pJHC11에 클로닝하여 약 7,000개의 형질전환체를 얻었다. 탄소원으로 PHB 또는 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)를 포함하는 M9 최소배지를 이용하여 형질전환체들로부터 활성이 서로 다른 돌연변이주들을 선별하였다. 이들의 PHB depolymerase 활성은 평판배지에서의 halo 형성 및 배양 상등액을 이용한 탁도 감소 실험으로 확인하였으며, 형질전환체들 중에서 shuffling 전의 대조군에 비하여 사용된 기질에 따라 효소활성이 1.8-3.2배 증진된 II-4 돌연변이주를 얻었다. DNA 염기서열의 분석을 통하여 II-4의 PHB depolymerase에는 3개의 아미노산 치환(Ala209Val, Leu258Phe, Asp263Thr)이 이루어졌음을 확인하였다. 여러 가지 돌연변이주의 아미노산 서열의 변화를 분석한 결과, PHB depolymerase의 catalytic triad 주위에 기존 아미노산에 비하여 보다 소수성인 아미노산으로의 치환이 소수성 기질인 PHB에 대한 분해 활성 증진에 기여하는 것으로 추정되었다.

Key words □ *Alcaligenes faecalis* T1, DNA shuffling, PHB depolymerase, poly(3-hydroxyalkanoate)

Poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs)는 다양한 종류의 미생물들이 불균형의 영양조건하에서 탄소원 및 에너지원으로 세포 내에 축적하는 저장성 고분자 물질이다. PHAs는 생분해성(biodegradability)과 생체적합성(biocompatibility)이 우수하기 때문에 정밀화학, 의학, 농업 등의 다양한 분야에서 활용이 가능한 생물소재로 많은 관심을 모으고 있다(2). 일반적으로 PHAs는 단위체(monomer)의 탄소수에 따라 short-chain-length PHAs (SCL-PHAs; C₃-C₅)와 medium-chain-length PHAs (MCL-PHAs; C₆-C₁₄)로 구분되는데(2), SCL-PHAs가 결정성이 높은 열가소성 고분자인데 반하여 MCL-PHAs는 결정성이 낮은 탄성체 혹은 점착성 고분자의 성질을 보인다(4, 9).

자연계에서의 PHA 생분해는 미생물이 세포 밖으로 분비하는 extracellular PHA depolymerase에 의하여 이루어진다(5, 10, 12, 13). PHA depolymerase는 기질 특이성에 따라 SCL-PHA depolymerase와 MCL-PHA depolymerase로 나누어지며, 대부분의 PHA 분해미생물들은 이중 하나의 효소만을 분비하는 것으로 알려져 있다(11). PHA depolymerases는 N-말단에 25-37개의 아미노산으로 구성된 signal peptide를 가지고 있으며, PHA의 에스터 결합을 가수분해하는 기능의 catalytic domain, 기질에 대해 효소의 흡착에 관여하는 기능의 substrate-binding domain을 갖고 있다. 또한 catalytic domain과 substrate-binding domain 사이에

linker peptide가 존재하며, 다른 종류의 esterases와 마찬가지로 G-X-S-X-G의 아미노산 서열로 이루어진 lipase box를 가지고 있다(5, 20).

지금까지 가장 많은 연구가 이루어진 *Alcaligenes faecalis* T1의 poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase(PhaZ_{Afa})는 PHB 뿐만 아니라 3-hydroxyvalerate (3HV)가 낮은 함량으로 포함된 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(3HB-co-3HV)] 공중합체도 분해할 수 있는 대표적인 SCL-PHA depolymerase이다(5, 15). PhaZ_{Afa}는 N-말단에 catalytic domain (¹Ala-³⁰⁰Ser), C-말단에 substrate-binding domain (⁴⁰¹Ala-⁴⁶¹Pro), 그리고 linker peptide (³⁰¹Gly-⁴⁰⁰Ser)로 이루어져 있다(20). 또한 PhaZ_{Afa}에 의한 PHAs의 가수분해에는 catalytic domain에 존재하는 catalytic triad (¹³⁹Ser, ²¹⁴Asp 그리고 ²⁷³His)의 역할이 매우 중요한 것으로 알려져 있다(20). 그러나 지속적인 연구 보고에도 불구하고 PHA 가수분해에 대한 분자적 수준의 기작 및 기질특이성에 대한 규명은 이루어지지 않고 있는데, 이는 PHA depolymerases에 대한 삼차원적 구조 및 각 domain의 기능에 관한 아미노산의 정보가 충분히 축적되지 못하고 있기 때문으로 생각된다.

한편, 광학활성을 지닌 의약품들을 생산하기 위한 chiral 합성 단위체(synthons)의 사용 요구성이 최근 크게 증대되고 있다. PHAs의 가수분해 결과 생성되는(R)-(-)-hydroxycarboxylic acid 형태의 단위체는 chiral center를 가지고 있고, 특히 OH와 COOH를 functional group으로 가지고 있기 때문에 여러 가지 chiral 화합물을 합성하기 위한 전구물질로 유용하게 사용될 수

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-821-6413, Fax: 042-822-7367
E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr

있다(11, 16). 이러한 PHAs의 단위체는 PHA depolymerase의 가수분해 반응에 의하여 쉽게 얻을 수 있기 때문에, 활성이 뛰어나거나 여러 종류의 PHAs를 기질로 인지할 수 있는 PHA depolymerase의 확보는 산업적으로도 매우 의미가 있다(11).

Stemmer (21)에 의해 처음 고안된 error-prone PCR 기법의 DNA shuffling은 유전자 조각들을 무작위적으로 섞어 다양한 돌연변이 라이브러리를 만들어내고, 이로부터 원하는 특성의 유전자를 선발함으로써 새로운 유전자 혹은 개량된 단백질을 얻을 수 있는 기술이다. 따라서 이 기술은 최근 산업적 효소 및 의약품 단백질의 개량, 단백질의 구조 분석 등의 목적에 광범위하게 이용되고 있다(6). 이러한 유전자 진화 기술은 유전자상의 유사도가 50% 이상인 종 사이에서 DNA shuffling을 수행하여 서로의 장점을 지닌 chimeric product의 형성을 유도하는 family shuffling (6, 8, 22)과 한 종에서의 유전자를 대상으로 무작위적 돌연변이를 유도하는 single gene shuffling 방법이 있다(19). 그러나 PHA와 관련된 분야에서 DNA shuffling과 *in vivo* evolution 기술의 이용은 최근 PHA synthase 유전자를 대상으로 효소 활성 증진을 목적으로 시도된 바 있으나(1, 17, 23), PHA depolymerase 활성과 관련된 연구는 아직까지 보고되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 *A. faecalis* T1의 PHB depolymerase의 활성을 증진시키기 위하여 *phaZ_{Afa}*에 대해 single gene DNA shuffling을 이용한 돌연변이화를 유도하고, 기질인 PHB를 대상으로 효소활성이 증진된 돌연변이주를 선별하고자 하였다. 또한 3HV 함량이 높은 P(3HB-co-3HV)와 대표적인 MCL-PHA인 poly(3-hydroxyoctanoate) (PHO)를 대상으로 기질특이성의 변화가 이루어진 돌연변이주의 선별 가능성을 모색하였다. 선별된 돌연변이체에 대해서는 염기서열의 분석을 통하여 치환된 아미노산과 효소학적 특성 및 활성의 변화와의 관계를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

균주, plasmid 및 배양조건

본 실험에 사용된 *Alcaligenes faecalis* T1 균주는 Saito 교수(15)로부터 분양받았다. 또한 본 실험에서 사용된 대장균 및 plasmid들의 특징은 Table 1에 정리하였다. 대장균은 Luria-Bertani (LB) 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였다. 돌연변이 선별 배지로는 M9 최소배지($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12.8 g; KH_2PO_4 , 3 g; NaCl, 0.5 g; NH_4Cl , 1.0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.49 g; CaCl_2 , 0.015 g; glucose, 4 g; thiamin, 0.1 g; DW, 1 L)를 사용하였으며, 별도로 0.2% (w/v)의 PHB, P(3HB-co-3HV) 혹은 PHO 현탁액을 첨가하였다. 또한 형질전환체의 선별을 위하여서는 배지에 ampicillin (100 µg/ml)을 첨가하였다. Plasmid DNA의 분리는 Qiagen plasmid extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하였으며 대장균의 형질전환, 제한효소 절단, ligation 및 agarose gel 전기영동 등은 Sambrook 등의 방법(18)에 따라 수행하였다.

PHAs의 합성

본 실험에 사용된 PHB와 P(3HB-co-3HV)는 *Ralstonia eutropha*

Table 1. Bacterial strain and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15)</i> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96the-1 relA1</i>	
pGEM-T easy vector	<i>Amp^r</i> , contain <i>lacZ</i> promoter This plasmid is used for PCR cloning	Promega Co.
pSHNC	<i>Amp^r</i> , contain <i>lacZ</i> promoter and <i>phaZ_{Afa}</i>	Park (16)
pJHC11	<i>Amp^r</i> , contain <i>lacZ</i> promoter and INPNC This plasmid is used for cloning of mutated <i>phaZ_{Afa}</i>	Jung <i>et al.</i> (7)
pJSH11	<i>Amp^r</i> , contain <i>lacZ</i> promoter, INPNC, and <i>phaZ_{Afa}</i>	This study
pJSH12	<i>Amp^r</i> , contain <i>lacZ</i> promoter, INPNC, and <i>phaZ_{Afa}</i> in which start codon was deleted	This study

KHB-8862(4)로부터, PHO는 *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347(9)로부터 생산하였으며, 동결건조된 세포들로부터 Soxhlet extractor를 이용하여 PHA를 추출한 후 정제하여 사용하였다. 정제된 PHAs의 조성 분석 및 현탁액 제조는 앞서 발표된 방법에 의해 수행하였다(10).

*phaZ_{Afa}*의 PCR 증폭

pSHNC로부터 *phaZ_{Afa}*의 증폭을 위하여 *Hind* III site를 포함 하는 primer 1 (5'-CCCAAGCTTAGGTCGTCATGGACAATTGCC-3')과 *Sma* I site를 포함하는 primer 2 (5'-CCCGGGGTGAGAAGACTGTGGCGACGGAT-3')를 제조하였다. *phaZ_{Afa}*의 PCR 증폭 조건은 주형 DNA 50 ng, 10 pmol primer, 10×반응완충용액[100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 0.01% gelatin] 5 µl, 200 µM dNTP, 2.5 unit Taq DNA polymerase (Solgent, Korea)를 첨가하여 총 반응액을 50 µl로 하였다. PCR 반응은 초기에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 증폭반응을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 연장하였다. 전 과정은 thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Norwalk, USA)로 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동하여 확인한 후 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 이를 pGEM-T easy vector 내로 클로닝한 후 *E. coli* DH5α를 이용하여 형질전환 하였다. 삽입된 *phaZ_{Afa}*를 주형으로 pGEM-T easy vector 상의 SP6와 T7를 변형한 primer 3 (5'-CTATTTAGGTGACACTATAGAA-3')과 primer 4 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3')를 이용하여 위의 PCR 반응과 동일한 조건하에서 DNA를 증폭하였다.

DNase I의 처리

DNase I의 반응은 반응완충용액[50 µM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM MgCl_2] 내에 primer 3과 4로 증폭된 5 µg의 주형 DNA와 0.075 unit의 DNase I (Sigma, St. Louis, USA)을 첨가하여

실온에서 15분간 수행하였으며, 반응 후 반응액을 100°C에서 15분간 유지하여 DNase I의 활성을 제거하였다. DNA 절편들을 3% low melting agarose gel에서 전기영동한 후 DNA band들 가운데 100 bp 이하만을 정제하여 DNA를 회수하였다.

Reassembly PCR

Reassembly PCR의 수행을 위하여 총 반응액 50 µl 내에 DNase I에 의하여 잘리어진 100 bp 이하의 DNA 절편들을 20 ng/µl 되도록 첨가하고, 10×반응완충용액 5 µl, 150 µM dNTPs, 10 unit의 Taq DNA polymerase (Solgent, Korea)를 첨가하였다. PCR 반응은 초기에 94°C에서 10분간 DNA를 변성시킨 후 94°C에서 1분, 54°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 증폭반응을 50회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 연장하였다. 재조합된 *phaZ_{Afa}*를 증폭하기 위하여 reassembly PCR 산물 1.5 µl (60 ng)를 주형으로 하고 10 pmol primer 5 (5'-AGGTGACACTATAGAATACTCAAGC-3')와 primer 6 (5'-GACTCACTATAGGGCGAATTGG-3')을 이용하여 총 반응액 50 µl 내에 10×반응완충용액 5 µl, 200 µM dNTP, 5 unit의 Taq DNA polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 위에서 기술한 *phaZ_{Afa}*의 PCR 증폭 반응과 동일하며 총 35회의 반응을 수행하였다.

돌연변이 library의 제조 및 스크리닝

Reassembly PCR 산물내에 위치한 *Hind* III와 *Sma* I site를 제한 효소로 절단하고, 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 약 1.5 kb의 DNA band를 QIAEXII Gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 이를 *Hind* III와 *Sma* I으로 잘려진 발현벡터 pJHC11 내에 클로닝한 후 *E. coli* DH5 α에 재조합된 plasmid를 형질전환 방법으로 도입하였다. 형질전환체의 선별은 ampicillin (100 µg/ml)이 첨가된 LB agar plate를 이용하였다. 돌연변이주들의 선별배지는 각각 0.2%의 PHB, P(3HB-co-13 mol% 3HV), P(3HB-co-30 mol% 3HV) 또는 PHO가 탄소원으로 첨가된 M9 최소고체배지에 1 mM IPTG를 도말한 배지를 사용하였으며 형질전환체들을 대상으로 replica plating 방법을 수행하였다. 이를 37°C에서 2-3일 배양한 후 대조군 (pJSH11 균주)보다 더 큰 halo를 형성하는 colony와 활성이 다른 변이주들을 선별하고자 하였다.

염기서열 분석

선별된 형질전환체들의 plasmid DNA의 분리는 Qiagen plasmid extraction kit를 이용하여 분리하였으며, 유전자 염기서열 분석은 ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, USA)를 사용하였다. 유전자의 염기서열과 아미노산 서열에 대한 유사성 검색은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST databases를 통해 비교하였다.

PhaZ_{Afa} 효소의 발현 및 활성의 측정

발현벡터 자체인 pJHC11, *phaZ_{Afa}*가 pJHC11내에 클로닝된

pJSH11, 개시 코돈이 제거된 *phaZ_{Afa}*가 pJHC11내에 클로닝된 pJSH12를 포함하는 균주들을 대조군으로 사용하였다. 대조군과 선별된 돌연변이체들은 ampicillin (100 µg/ml)을 첨가한 LB 배지에서 30°C, 16시간 배양한 후, 분광광도계(V-550, Jasco, Japan)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 생장을 측정하였다. 각각의 배양액(OD=1)을 각각의 기질을 포함하는 100 ml의 M9 최소배지에 1 ml 접종하여 180 rpm, 30°C에서 10시간 동안 배양하여 OD가 0.8이 되도록 한 후, 1 mM IPTG를 첨가하여 180 rpm, 25°C에서 8시간 동안 추가 배양하고 배양액을 회수하여 효소원으로 사용하였다. PhaZ_{Afa}의 효소활성의 측정을 위한 반응액(2 ml)에는 PHB, P(3HB-co-13 mol% 3HV) 혹은 P(3HB-co-30 mol% 3HV) 현탁액 0.1 ml과 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액 1.8 ml, 그리고 0.2 ml의 효소원으로 구성되었으며, 효소원을 첨가한 시점을 반응 시작점으로 하여 기질 혼탁도의 감소를 흡광도 650 nm에서 측정하였다(10).

결 과

DNA shuffling

클로닝된 *phaZ_{Afa}*를 포함하는 pSHNC를 대상으로 제한효소인 *Hind* III와 *Sma* I을 각각 포함한 primer 1과 2를 이용하여 PCR을 수행한 결과 약 1.5 kb DNA 단편을 얻은 후 pGEM-T easy vector에 클로닝하였다. 이로부터 벡터내의 SP6와 T7 primer를 변형한 primer 3과 4로 PCR을 수행하여 *Hind* III와 *Sma* I의 제한효소 부분과 *phaZ_{Afa}*를 포함하는 약 1.7 kb의 PCR 산물을 얻었다(Fig. 1A). 얻어진 PCR 산물에 DNase I을 처리하여 100 bp 이하의 작은 DNA 절편들이 분리되었음을 확인한 후(Fig. 1B), gel로부터 elution하여 100 bp 이하의 DNA 절편들만 분리하였다. Reassembly PCR은 100 bp 이하의 *phaZ_{Afa}*의 DNA 단편들이 서로 주형과 primer가 되어 다양한 크기의 PCR 증폭 산물을 형성함으로써 전체적으로 다양한 크기의 DNA band들을 형성하였다

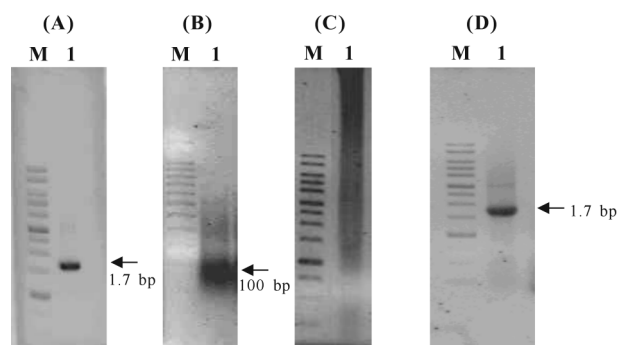


Fig. 1. The process of DNA shuffling. (A) A 1.7 kb DNA fragment encoding *phaZ_{Afa}* amplified by PCR with primer 3 and 4. (B) The PCR products digested by DNase I. (C) DNA fragments reassembled into a full-length gene in absence of primers. (D) PCR products of the *phaZ_{Afa}* obtained by PCR in the presence of primer 5 and 6 using reassembled fragments. Lane M indicates the size marker of 100 bp ladder (B) or 1 kb ladder (A, C, and D).

(Fig. 1C). 재조합된 DNA 중에서 *phaZ_{Afa}*의 염기서열과 유사한 1.7 kb의 PCR 산물을 증폭하고자 primer 5와 6을 사용하여 PCR을 수행한 결과, 약 1.7 kb의 DNA band (Fig. 1D)를 얻었으며, 이 가운데에 DNA shuffling에 의하여 재조합된 *phaZ_{Afa}*가 포함되어 있을 것으로 예상하였다. 이를 제한효소 *Hind* III와 *Sma* I으로 처리하고 같은 제한효소로 처리된 발현벡터 pJHC11에 클로닝하여 약 7,000여개의 형질전환체들을 얻음으로써 돌연변이 library를 제조하였다.

돌연변이 library의 스크리닝

돌연변이 library로부터 PHA depolymerase 활성이 증진된 형질전환체를 얻기 위하여 0.2% PHB, P(3HB-co-13 mol% 3HV), P(3HB-co-30 mol% 3HV) 또는 PHO를 기질로 첨가한 M9 최소 고체배지 상에서 약 7,000여개의 형질전환체들을 대상으로 효소 활성(halo 형성)을 비교하고, *PhaZ_{Afa}*의 발현에 의해 halo를 형성하거나 돌연변이에 의해 기존의 활성을 잃어버린 것들을 선별하였다. 선별된 균주들의 halo 형성능을 동일 배지에서 재확인 후 대조군(pJSH11 균주)보다 PHB 및 P(3HB-co-30 mol% 3HV) 배지에서 halo 형성능이 우수한 돌연변이주들 중에서 II-4를 최종적으로 선별하였다(Fig. 2). 그러나 본 연구에서는 MCL-PHA인 PHO를 첨가한 M9 최소배지에서는 halo를 나타내는 돌연변이주를 얻을 수 없었다(Fig. 2c).

염기서열의 결정 및 주돌연변이 분석

선별된 돌연변이주 II-4와 활성이 약한 돌연변이주 그리고 기존의 PHB와 P(3HB-co-3HV)에 대한 *PhaZ_{Afa}*의 분해 활성을 잃어버린 돌연변이주를 대상으로 염기서열을 분석하였다(Fig. 3). 효소활성이 증진된 II-4의 치환된 부위는 c727t (Ala209Val), c870t (Leu258Phe), c872t (silent) 그리고 a886c (Asp263Thr) 4 곳으로 조사되었고, 치환은 catalytic triad인 Asp과 His의 인접한 부위에서 일어났음을 알 수 있었다. 또한 효소활성이 완전히 사라진 돌연변이주인 II-2는 g479a (Asp127Lys), g674a (silent), c679a (Phe194Glu) 그리고 a886c (Asp263Thr)가 치환되었으며, 매우 약한 가수분해 활성을 가진 돌연변이주로 선별된 22-2의 경우에는 t591a (Leu165Met), g628t (Cys177Phe), c679a (Phe194Glu), g703t (Gly202Val) 그리고 a886c (Asp263Thr) 5곳

의 돌연변이가 나타났다. 효소활성이 사라진 돌연변이주인 II-2의 경우는 active site인 Ser 잔기와 catalytic triad인 Asp의 인접한 아미노산에서 치환이 일어났음을 알 수 있었다. 그러나 II-4에서 나타난 Asp263Thr 치환의 경우에는 효소활성이 일부 혹은 전부 상실된 돌연변이주에서도 나타남으로써 이 부위가 효소활성과 밀접한 관계를 유지하지는 않을 것으로 보인다.

돌연변이 II-4의 *PhaZ_{Afa}* 효소활성 측정

대조군으로 각각 pJHC11, pJSH11과 pJSH12 벡터를 포함하는 균주들과 선별된 II-4를 배양한 후, 배양액 내에 존재하는 *PhaZ_{Afa}*의 효소활성을 각각의 기질에 대한 흡광도의 감소 정도로 조사하였다. 각 기질의 반응 정도에 따라 PHB의 분해는 20시간, P(3HB-co-30 mol% 3HV)의 분해는 18분, P(3HB-co-13 mol% 3HV)의 분해는 95분 동안 반응시간을 달리하여 수행하였으며, 각각의 가수 분해 양상을 시간대 별로 확인하였다. 기질의 자발적인 반응(14)에 의하여 분해 반응 초기에는 흡광도가 증가하였고, 대조군인 pJHC11과 pJSH11을 포함하는 균주에서는 P(3HB-co-30 mol% 3HV)와 P(3HB-co-13 mol% 3HV)에 대한 흡광도가

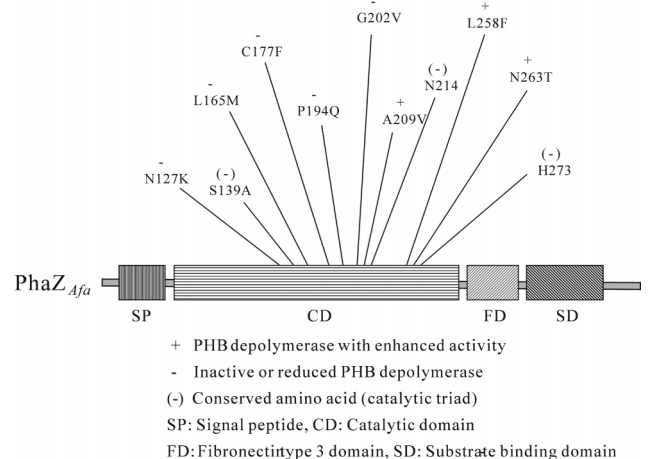


Fig. 3. The mutations of the *phaZ_{Afa}* by DNA shuffling. The following random mutations were induced; II-4: Ala209Val, Leu258Phe, and Asp263Thr; II-2: Asp127Lys, Phe194Glu, and Asp263Thr; 22-2: Leu165Met, Cys177Phe, Phe194Glu, Gly202Val, and Asp263Thr.

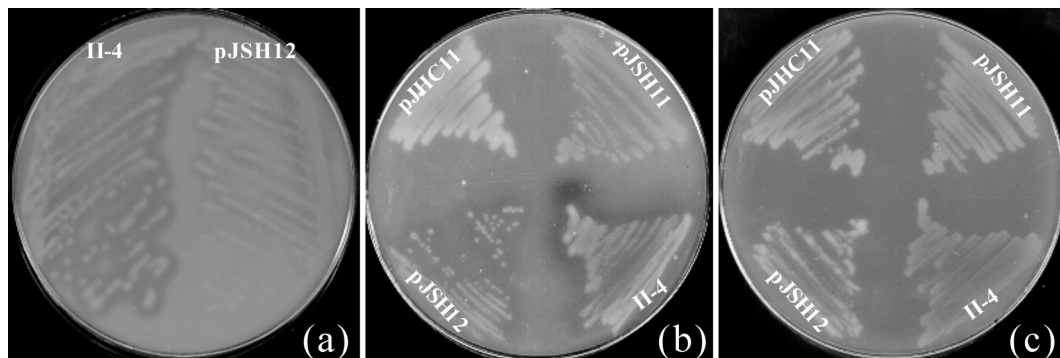


Fig. 2. Biodegradation of PHB (a), P(3HB-co-30 mol% 3HV) (b), and PHO (c) by pJHC11 strain, pJSH11 strain, pJSH12 strain, and II-4 mutant grown on M9 minimal agar medium containing respective polymers (0.2% w/v) for 2 days at 30°C.

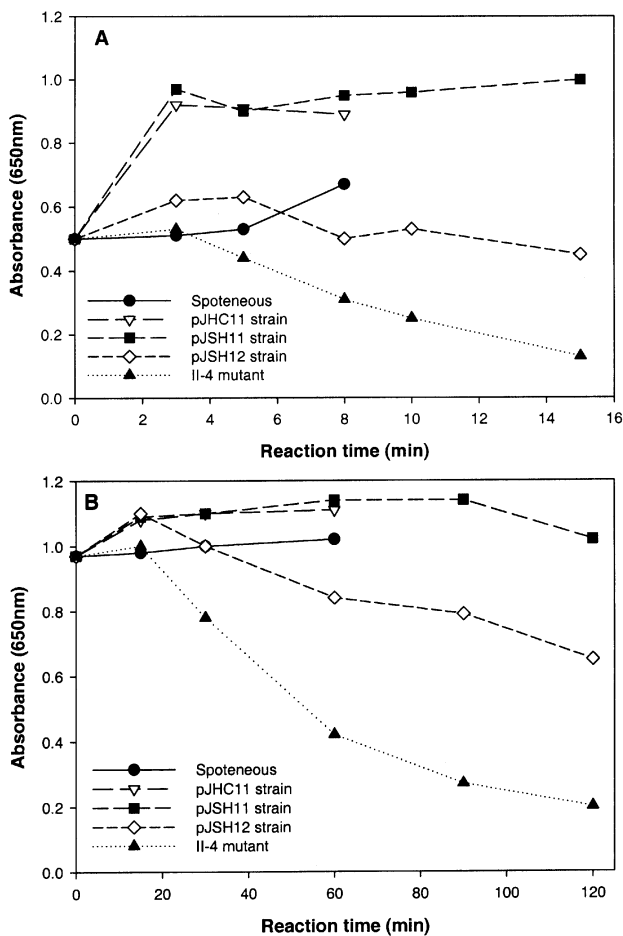


Fig. 4. Hydrolysis activities in culture supernatants of pJHC11 strain, pJSH11 strain, pJSH12 strain, and II-4 mutant for P(3HB-co-13 mol% 3HV) (A) and P(3HB-co-30 mol% 3HV) (B). The reaction was carried out in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) at 37°C.

반응 초기에 급격하게 증가하였다(Fig. 4). 반면에 pJSH12를 포함하는 균주는 반응 초기에 흡광도가 약간 증가하는 것을 보인 후 급격히 흡광도가 감소되었다. 또한 선별된 돌연변이체 II-4의 경우에는 반응 초기부터 급격히 흡광도가 감소함을 보였으며 그 분해 활성 정도가 대조군과 비교하여 월등히 높게 나타났다. II-4의 고분자에 따른 활성의 증진 정도는 PHB에서는 기존의 활성보다 1.8배(자료 미제시), P(3HB-co-30 mol% 3HV)에 대해서는 약 2.2배 그리고 P(3HB-co-13 mol% 3HV)에 대해서는 약 3.2배의 활성이 증진되었다(Fig. 4).

고 찰

다른 미생물의 lipase 또는 PHA depolymerase를 대장균에서 발현시키고자 했을 때 숙주세포의 독성 효과로 인하여 발현 및 분비가 효율적으로 일어나지 못하는 것으로 알려져 있다(3, 20). 본 연구에서 이용한 *PhaZ_{Afa}*의 경우도 대장균에서 단독으로 발현시켰을 때 재조합 단백질이 불용성의 inclusion body를

형성하거나 형질전환체가 잘 증식하지 못하고 유전자의 발현이 현저히 떨어지지만, anchoring motif로 알려진 *Pseudomonas syringae*의 ice nucleation protein(INP)을 삽입한 발현벡터의 경우에는 대장균에서의 *PhaZ_{Afa}*의 발현이 안정적으로 이루어짐이 보고된 바 있다(16). INP의 전체 유전자를 이용할 경우에는 삽입하는 DNA의 크기에 제한을 받으므로 본 실험에서는 INP의 N-말단과 C-말단 부분(INPNC)만을 삽입한 발현벡터를 이용하여 대장균의 세포 표면에 외래 유전자를 발현하였다(pJSH11). 그 결과, extracellular PHB depolymerase인 *PhaZ_{Afa}*는 배양액 또는 고체 배지 내로 원활히 발현되었으며, 또한 INPNC와 *phaZ_{Afa}*간의 확실한 융합이 이루어지도록 개시 코돈을 제거한 경우에도(pJSH12) 마찬가지로 *PhaZ_{Afa}*의 분비가 일어났다. 이로써 INPNC와 융합된 *phaZ_{Afa}*는 periplasm을 거치면서 signal peptide가 잘려지고 *PhaZ_{Afa}*는 단독으로 분비될 수 있음을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 DNA shuffling을 이용하여 약 7,000여개의 형질전환체를 획득하였고, 이것을 PHB, P(3HB-co-13 mol% 3HV), P(3HB-co-30 mol% 3HV) 및 PHO를 기질로 하는 각각의 선별 배지에서 스크리닝하여 대조군(pJSH11 균주)보다 활성이 증가된 돌연변이주를 선별하였다. 그 결과, SCL-PHA인 PHB와 P(3HB-co-3HV)를 기질로 사용하여 대조군 보다 분해활성이 우수한 돌연변이주 II-4를 선별할 수 있었으나, MCL-PHA인 PHO를 기질로 인식하여 분해할 수 있는 돌연변이주는 얻을 수 없었다. 이러한 결과는 같은 PHA depolymerases임에도 불구하고 SCL-PHA depolymerases와 MCL-PHA depolymerases간에는 domain 구성의 차이를 비롯하여 기질 특이성 면에서 뚜렷한 차이가 있다는 앞서의 보고(3, 10, 11)와 관련 있을 것이라 추정된다.

DNA shuffling에 의하여 얻어진 II-4의 효소활성은 대조군에 비하여 PHB에 대해서는 1.8배, P(3HB-co-30 mol% 3HV)에 대해서는 약 2.2배 그리고 P(3HB-co-13 mol% 3HV)에 대해서는 약 3.2배의 활성이 증진되었다. 이러한 효소활성의 증진은 DNA shuffling을 이용한 다른 효소들의 활성 증진에 대한 보고들에 비하면 매우 낮은 수준이라 할 수 있다. 기질에 대한 효소활성 실험에서 pJHC11과 pJSH11을 포함하는 균주의 경우에는 P(3HB-co-30 mol% 3HV)와 P(3HB-co-13 mol% 3HV)에 대한 흡광도가 반응 초기에 급격하게 증가하였는데, 이것은 PHA의 합성 시 polymerization되는 방향의 수직 축을 따라 분자의 결합 정도가 약하게 이루어지는 고분자의 특성에 의해서 가수 분해 활성이 없이도 자발적인 반응만으로 큰 단편들로 분해됨으로써 흡광도가 증가된다는 기존의 보고로 해석될 수 있다(14).

PHB와 P(3HB-co-3HV)를 기질로 제공하여 대조군과 비교했을 때 활성이 증가한 돌연변이체인 II-4와 기존의 효소활성이 사라진 돌연변이를 대상으로 염기서열을 분석한 결과, 대부분의 아미노산 치환이 catalytic domain 내에서 이루어진 반면에 substrate binding domain에서의 아미노산 치환은 발견되지 않았다. 효소활성이 사라진 돌연변이체의 아미노산 치환 부위는 주로 catalytic domain의 앞부분에 해당되는 곳으로서 active site인 Ser과 catalytic triad인 Asp의 인접한 부분에서 다양한 돌연변이가 나타났으며, 효소활성이 증진된 II-4의 돌연변이 부

분은 catalytic triad인 Asp와 His의 인접 부위에서 나타났다 (Ala209Val, Leu258Phe, Asp263Thr). 염기서열 분석으로부터 효소활성이 사라진 경우에는 active site인 Ser 주변이 다른 아미노산으로 치환됨으로써 아미노산의 특성이 미세하게 변화하게 되고 이로 인하여 PHB depolymerase의 활성이 방해받는 것으로 사료된다.

또한 II-4의 치환된 부위들을 자세히 살펴보면, Ala209Val은 지방족 잔기(aliphatic side chain)를 가지는 아미노산으로 Ala 보다 좀더 소수성의 아미노산인 Val으로 치환되었고, Leu258Phe는 지방족 잔기를 가지는 소수성의 Leu이 방향족 잔기(aromatic side chain)를 가지는 동일한 특성의 Phe으로 치환되었다. Asp263Thr의 경우에 Asp와 Thr은 서로 유사한 구조를 하고 있으며 두 가지 아미노산 모두 극성의 특성을 가지고 있으나 Thr이 좀더 소수성의 아미노산이다. 그러므로, catalytic triad 내의 주요한 변화는 charge relay에 관여하는 아미노산 주변에서 기존의 아미노산보다 소수성의 성질을 가지는 아미노산들이 치환된 것으로 추정되었는데 이로부터 다음과 같은 두 가지 현상을 유추할 수 있다. 첫 번째는 이러한 아미노산의 변화가 charge relay를 수행하는 아미노산의 역할이 원활하도록 하는 방향으로 진행되었을 것이라는 것이고, 두 번째는 좀더 소수성을 띠는 아미노산이 형성됨으로써 소수성의 기질인 PHA의 가수분해 시에 기질의 가수분해 부위를 잡아주는 역할을 할 수 있을 것이라는 점이다. 그러나 PHB depolymerase에서의 아미노산의 치환과 효소활성의 변화에 대한 보다 자세한 이해를 위해서는 향후 보다 많은 돌연변이체의 분석 및 효소의 삼차원적 구조 분석 등에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 중점연구소 지원사업(과제번호: KRF-2000-005-D00003)의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Amara, A.A., A. Steinbüchel, and B.H.A. Rehm. 2002. *In vivo* evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 477-482.
- Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450-472.
- Braaz, R., S.L. Wong, and D. Jendrossek. 2002. Production of PHA depolymerase A from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 237-241.
- Chung, S.H., G.G. Choi, H.W. Kim, and Y.H. Rhee. 2001. Effect of levulinic acid on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* KHB-8862. *J. Microbiol.* 39, 79-82.
- Iwata, T., Y. Doi, S. Nakayama, H. Sasatsuki, and S. Teramachi. 1999. Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 169-176.
- Joern, J.M., P. Meinhold, and F.H. Arnold. 2002. Analysis of shuffled gene libraries. *J. Mol. Biol.* 316, 643-656.
- Jung, H.C., J.H. Park, S.H. Park, J.M. Lebeault, and J.G. Pan. 1998. Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 348-354.
- Kikuchi, M., K. Ohnishi, and S. Harayama. 2000. An effective family shuffling method using single-stranded DNA. *Gene* 243, 133-137.
- Kim, D.Y., S.B. Jung, G.G. Choi, Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2001. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolyester containing cyclohexyl groups by *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 29, 145-150.
- Kim, D.Y., J.S. Nam, and Y.H. Rhee. 2002. Characterization of an extracellular medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase from *Pseudomonas alcaligenes* LB-19. *Biomacromol.* 3, 291-296.
- Kim, D.Y. and Y.H. Rhee. 2003. Biodegradation of microbial and synthetic polyesters by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 300-308.
- Klingbeil, B., R.M. Kroppenstedt, and D. Jendrossek. 1996. Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 142, 215-221.
- Merrick, J.M., R. Steger, and D. Dombroski. 1999. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules(PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 129-134.
- Murase, T., Y. Suzuki, Y. Doi, and T. Iwata. 2002. Nonhydrolytic fragmentation of a poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystal revealed by use of a mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. *Biomacromol.* 3, 312-317.
- Nojiri, M. and T. Saito. 1997. Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *J. Bacteriol.* 179, 6965-6970.
- Park, S.H. 2002. Display of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase on the surface of *Escherichia coli*. MS thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea.
- Rehm, B.H., R.V. Antonio, P. Spiekermann, A.A. Amara, and A. Steinbüchel. 2002. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate)(PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: *in vitro* evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. *Biochim. Biophys. Acta.* 1594, 178-190.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Shibuya, H., S. Kaneko, and K. Hayashi. 2000. Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling. *J. Biochem.* 349, 651-656.
- Shinohe, T., M. Nojiri, T. Saito, T. Stanislawski, and D. Jendrossek. 1996. Determination of the active sites serine of the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases of *Pseudomonas lemoignei*(PhaZ5) and of *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141, 103-109.
- Stemmer, W.P. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10747-10751.

22. Suenaga, H., M. Mitsuoka, Y. Ura, T. Watanabe, and K. Furukawa. 2001. Directed evolution of biphenyl dioxygenase: emergence of enhanced degradation capacity for benzene, toluene, and alkylbenzenes. *J. Bacteriol.* 183, 5441-5444.
23. Taguchi, S., A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, H. Nakamura, and Y. Doi. 2001. Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate(PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an *in vivo* assay system. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 65-71.

(Received May 9, 2003/Accepted May 28, 2003)

ABSTRACT : Enhancement of PHB depolymerase Activity from *Alcaligenes faecalis* T1 by DNA Shuffling
Dong-Sung Shin, Jin Sik Nam, and Young Ha Rhee* (Department of Microbiology,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)

To prepare evolved PHB depolymerase with increased activity for PHB or P(3HB-co-3HV) compared to the activity of the original PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1, random mutation of the cloned PHB depolymerase gene was performed by using a DNA shuffling method. A library of mutated PHB depolymerase genes from *A. faecalis* T1 was fused to the ice nucleation protein (INP) gene from *Pseudomonas syringae* in pJHC11 and approximately 7,000 transformants were isolated. Using M9 minimal medium containing PHB or P(3HB-co-3HV) as the carbon source, mutants showing alteration in PHB depolymerase activity were selected from the transformants. The PHB depolymerase activity of the transformants was confirmed by the formation of halo around colony and the turbidity decrease tests using culture supernatants. The catalytic activity of PHB depolymerase of the best mutant II-4 for PHB or P(3HB-co-13 mol% 3HV) was approximately 1.8-fold and 3.2-fold, respectively, higher than that of the original PHB depolymerase. DNA sequence analysis revealed that three amino acid residues (Ala209Val, Leu258Phe, and Asp263Thr) were substituted in II-4. From the mutational analysis, it was presumed that the substitution of amino acids near catalytic triad to more hydrophobic amino acids enhance the catalytic activity of PHB depolymerase from *A. faecalis* T1.