

Efficient solubilization of salbostatin biosynthetic proteins forming inclusion bodies in *Escherichia coli*

이상희/ 명지대학교 생명과학정보학부

1. 서론

지금까지 당뇨병은 완치가 어려운 난치병으로 알려져 있으며, 또한 현재 세계인구의 5%가 당뇨병 환자로 추정되어지고 있다. 인슐린에 의한 치료 가능한 제 1형 당뇨병 환자는 전체 당뇨병 환자의 약 10% 미만이며, 약 90% 정도의 환자는 인슐린 비의존형 당뇨병 환자인 것으로 보고되어지고 있다(6). 인슐린 비의존형 제 2형 당뇨병 치료제로는 소장 점막 내 세포에 위치하고 있는 효소인 α glucosidase의 활성을 억제하여 다당류가 단당류로 분해되는 것을 억제함으로써 혈당 수치를 낮추는 α glucosidase inhibitor가 사용되고 있다. 이 α glucosidase inhibitor 치료제로서 대표적인 acarbose, miglitol, voglibose 등이 사용되고 있고, 전체 당뇨병시장의 약 90%정도를 제 2형 당뇨병 관련약물들이 점유하고 있다(7).

이 중 가장 강력한 억제력을 가지는 voglibose의 경우 생산단계에 있어서 중요한 중간 유도체인 valienamine의 생산을 validamycin을 효소 분해하여 생산하고 있으며 이 중간 유도체의 효율적인 생산 여부가 voglibose의 생산에 가장 큰 역할을 담당하고 있다(1). 따라서 valienamine을 생합성하여 대량생산 할 수 있다면 voglibose의 생산에 큰 기여를 할 수 있을 것이다. Salbostatin은 방선균인 *Streptomyces albus*가 생산하는 valienamine을 포함한 이탄당으로 구성되어 있다(1). 만약 valienamine을 포함하는 여러 물질 중에서 가장 간단한 모양을 가지는 salbostatin의 생합성 기작을 연구한다면, 제 2형 당뇨병 치료제로 가장 강력한 활성을 가지는 voglibose의 전구체인 valienamine의 효율적인 생산을 기대할 수 있다. 따라서 salbostatin의 생합성 기작의 이해가 필요하다.

2. 대장균 대량발현 시스템을 이용한 salbostatin 생합성 유전자의 발현

Salbostatin의 생합성 유전자는 2002년에 보고되었고, 이 각각의 유전자들의 유사성이 제 2형 당뇨병 치료제로 몇몇의 유전자에 대해서만 그 기능을 확인한 acarbose의 생합성 유전자와 비슷한 것으로 보고되었다(2, 3, 4, 5). 따라서 salbostatin의 생합성 유전자들의 기능과 역할에 대해 이해하기 위해서 각각의 유전자들을 발현하고, 분리하여 그 기능과 역할을 증명해야 한다. Salbostatin의 생합성 유전자들은 acarbose에서 그 기능을 확인한 salQ, salL, salO로 이어지는 생합성 경로를 가질 것으로 예상되어진다(2, 4, 5).

그러나 방선균 단백질을 코딩하는 생합성 관련 유전자들이 대장균 발현 시스템에서 정상적으로 발현되지 않고, inclusion body를 형성하는 문제점이 발생하고 있다.

지금까지 생합성 관련 유전자들의 발현실험은 일반적인 대장균 발현 시스템에서 사용되고 있는 T7 RNA polymerase에 기초한 발현시스템에서 여러 가지 발현조건 (예, 발현 온도, IPTG 농도)을 변화시켜 정상적인 발현을 유도해왔으나 이 역시 inclusion body를 형성하는 결과를 얻었다. 따라서 단백질 folding에 관여하는 chaperone protein을 코딩하는 발현벡터를 동시에 삽입하여 정상적인 단백질을 유도할 수 있는 chaperone plasmid를 병용하는 실험을 진행하였다. 그리고 일반적인 대장균 발현 시스템이 아닌, 대장균 ColdShock 유전자 cspA promoter를 이용한 단백질 발현 실험을 진행하였다.

그 결과 일반적인 T7 RNA polymerase에 기초한 대장균 발현 시스템에서는 정상적으로 발현되지 않던 생합성 유전자들이, 어떤 유전자에서는 ColdShock promoter를 이용한 발현 시스템에서, 어떤 유전자에서는 chaperone plasmid를 병용하는 발현 시스템에서 정상적으로 발현되는 결과를 얻을 수 있었다.

3. 고효율의 가용성 단백질(SalQ, SalL 및 SalO) 발현

일반적인 T7 RNA polymerase에 기초한 발현 시스템으로는 pET-30(a)(Novagen)을 사용하였다. 그리고 chaperone protein을 co-expression하는 plasmid는 pGro7(GroE ; TakaRa)를 사용하였으며, cspA promoter를 이용한 발현 시스템으로는 pCold I(TaKaRa)를 사용하였다 (그림 1)

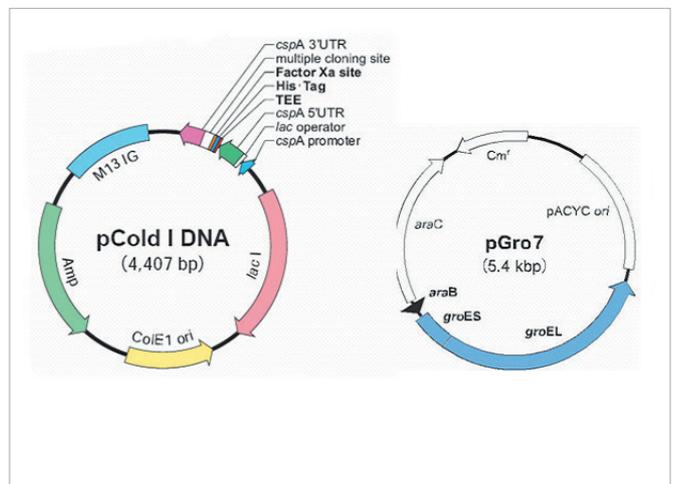
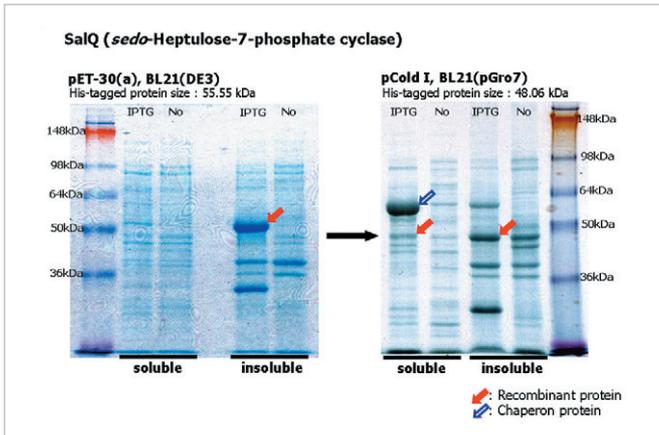


그림 1. pCold I DNA와 pGro7의 모식도

이중단백질 발현에 있어서 pET-30(a)에 클로닝된 생합성 유전자에 대해서는 발현 호스트로 *E. coli* BL21 (DE3)를 사용하였으며, 발현 조건은 30 °C에서 3시간 동안 1mM IPTG 농도에서 발현되었다. 또한 pGro7이 동시에 발현되는 조건은 항생제 marker로서 chloramphenicol과 inducing agent로 arabinose(0.5mg/ml)가 사용되었다. 그리고 pCold I에 대한 발현 조건은 15°C에서 24시간 동안 1mM IPTG 농도에서 발현되었다(그림 2, 3, 4). 그리고 목적유전자의 발현방법은 다음과 같다.

- (1) 목적유전자를 pET-30(a), pCold I 발현벡터에 삽입하여 발현용 plasmid를 제작 (cloning)
- (2) 발현용 plasmid를 발현용 대장균(*E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21 with pGro7)으로 형질전환 (transformation)
- (3) 각각의 발현용 plasmid에 적당한 항생제가 포함된 배지(pGro7이 동시에 발현되는 형질전환된 대장균의 경우에는 chloramphenicol과 arabinose가 첨가된 배지사용)에 형질전환된 대장균을 접종하고, 37 °C에서 배양
- (4) Cell density (OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.5) 부근에서 배양액에 IPTG를 첨가하고 (pCold I의 경우에는 15°C에서 30분간 방치), 30°C에서 3시간(pCold I의 경우에는 15°C에서 24시간) 진탕배양
- (5) 집균, 파쇄
- (6) SDS-PAGE으로 목적산물의 발현 양을 확인

그림 2. pET 발현시스템과 pCold I 및 pGro7의 동시발현시스템간의 발현양상 비교



(SalQ)

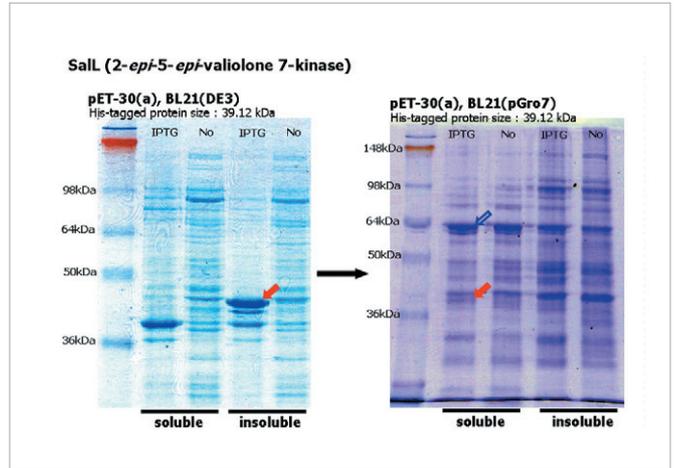


그림 3. pET 시스템과 pET 및 pGro7의 동시발현 시스템간의 발현양상 비교 (SalI)

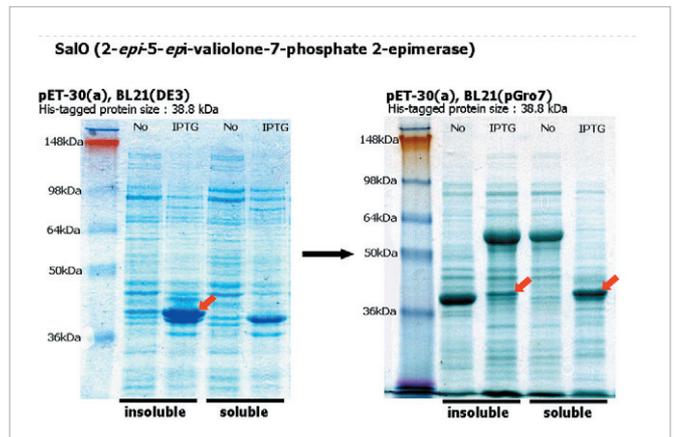


그림 4. pET 시스템과 pET 및 pGro7의 동시발현 시스템간의 발현양상 비교 (SalO)

4. 결론

일반적인 대장균 발현 시스템인 T7 RNA polymerase에 기초한 발현시스템은 짧은 시간에 많은 양의 이중 단백질을 발현 시킬 수 있는 대량발현 시스템이다. 하지만 목적단백질이 정상적으로 발현되지 못하고, 대부분 또는 전부를 inclusion body 상태로 발현시키는 단점을 가지고 있다. 따라서 일반적인 발현시스템에서 정상적으로 발현되지 못하는 이중 단백질에 대해서는 새로운 발현 시스템이 필요하게 된다. 새로운 발현 시스템에는 대장균 ColdShock 유전자인 *cspA* promoter를 이용한 이중 단백질 발현 시스템과 단백질 folding에 관여하는 chaperone protein을 co-expression하는 발현 시스템이 있다. 이는 일반적인 T7 RNA polymerase에 기초한 발현 시스템에서 정상적으로 발현 되지 못하는 이중단백질에 대해 결과적으로는 정상적으로 발현되는 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이번 실험과 같은 GC 비중이 상대적으로 많은 방선균 같은 종의 이중 단백질의 발현실험을 위해서 chaperone을 동시 발현시키는 방법이나, Coldshock promoter를 이용한 발현 시스템의 이용이 타월한 것으로 보인다.

5. 참고문헌

1. Mahmud, T. (2003) The C7N aminocyclitol family of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **20**:137-166.
2. Zhang, C. S., Stratmann, A., Block, O., Bruckner, R., Podeschwa, M., Altenbach, H. J., Wehmeier, U. F. and Piepersberg, W. (2002) Biosynthesis of the C(7)-cyclitol moiety of acarbose in Actinoplanes species SE50/110. 7-O-phosphorylation of the initial cyclitol precursor leads to proposal of a new biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **277**:22853-22862.
3. Floss, H. G. (1997) Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Nat. Prod. Rep.* **14**:433-452.
4. Stratmann, A., Mahmud, T., Lee, S., Distler, J., Floss, H. G and Piepersberg, W. (1999) The AcbC Protein from Actinoplanes Species Is a C7-cyclitol Synthase Related to 3-Dehydroquinase Synthases and Is Involved in the Biosynthesis of the α -Glucosidase Inhibitor Acarbose. *J. Biol. Chem.* **274**:10889-10896.
5. Mahmud, T., Lee, S. S. and Floss, H. G. (2001) The Biosynthesis of Acarbose and Validamycin. *Chem. Rec.* **1**:300-310.
6. Lo V., Noviasky J., Nashelsky J. (2005) Statin therapy in patients with type 2 diabetes. *Am. Fam. Physician.* **72**(5):866-868.
7. Asano, N. (2003) Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology.* **13**(10):93R-104R.



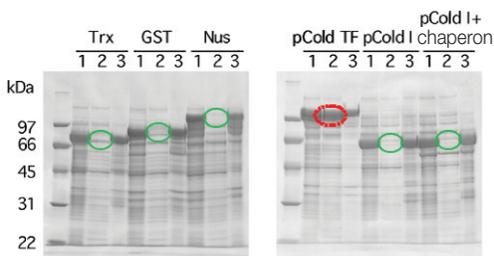
이상희 (sangheelee@mju.ac.kr)
명지대학교 생명과학정보학부

- 1981.03~1988.02 서울대학교 자연과학대학 미생물학과 (이학사)
- 1988.03~1990.02 서울대학교 자연과학대학 미생물학과 (이학석사)
- 1990.03~1993.08 서울대학교 자연과학대학 미생물학과 (이학박사)
- 1993.06~1995.02 미국 Wisconsin-Madison 대학교 약대 (Postdoc)
- 1995.03~2003.08 영동대학교 생명공학부 유전공학과 (부교수)
- 2003.09~현재 명지대학교 자연과학대학 생명과학정보학부 (부교수)
- 2003.06~현재 영국 응용미생물학회 편집위원
- 2005.01~현재 영국 IBC(국제인명센터), 부이사장
- 2005.01~현재 미국 Academic Journals Inc. (18 Journals), 편집자

Cold shock protein expression

Takara's pCold TF DNA

- High Purity-High Yield : 50~400 mg protein/1 L
- 대부분의 *E. coli* strain 사용가능
- Chaperon plasmid vector와 동시사용 가능 :
가용성 단백질의 발현량 증대



1 : 전체 단백질, 2 : 가용성 단백질, 3 : 불용성 단백질

	TEE 서열	His · Tag 서열	Factor Xa절단 서열
pCold I DNA	○	○	○
pCold II DNA	○	○	×
pCold III DNA	○	×	×
pCold IV DNA	×	×	×



SHOCKING!!