

Article

E. coli 유래 *pheA* 유전자의 되먹임제어 저항성 돌연변이의 구축과 그 단백질의 생화학적 특성 연구

카오틴팻¹ · 이상현² · 홍광원³ · 이성행^{1*}

¹조선대학교 의과대학 세분분자의과학고실, ²고려대학교 대학원 생명공학과, ³동국대학교 식품생명공학과

Development of the feedback resistant *pheA*^{FBR} from *E. coli* and studies on its biochemical characteristics

Thinh-Phat Cao¹, Sang-Hyun Lee², KwangWon Hong³, and Sung Haeng Lee^{1*}

¹Department of Cellular and Molecular Medicine, Chosun University School of Medicine, Gwangju 61452, Republic of Korea

²Department of Biotechnology, Graduate School, Korea University, Seoul 02841, Republic of Korea

³Department of Food Science and Biotechnology, Dongguk University-Seoul, Goyang 10326, Republic of Korea

(Received September 1, 2016; Revised September 22, 2016; Accepted September 23, 2016)

ABSTRACT: The bifunctional PheA protein, having chorismate mutase and prephenate dehydratase (CMPD) activities, is one of the key regulatory enzymes in the aromatic amino acid biosynthesis in *Escherichia coli*, and is negatively regulated by an end-product, phenylalanine. Therefore, PheA protein has been thought as useful for protein engineering to utilize mass production of essential amino acid phenylalanine. To obtain feedback resistant PheA protein against phenylalanine, we mutated by using random mutagenesis, extensively screened, and obtained *pheA*^{FBR} gene encoding a feedback resistant PheA protein. The mutant PheA protein contains substitution of Leu to Phe at the position of 118, displaying that higher affinity (about 290 μ M) for prephenate in comparison with that (about 850 μ M) of wild type PheA protein. Kinetic analysis showed that the saturation curve of PheA^{FBR} against phenylalanine is hyperbolic rather than that of PheA^{WT}, which is sigmoidal, indicating that the L118F mutant enzyme has no cooperative effects in prephenate binding in the presence of phenylalanine. *In vitro* enzymatic assay showed that the mutant protein exhibited increased activity by above 3.5 folds compared to the wild type enzyme. Moreover, L118F mutant protein appeared insensitive to feedback inhibition with keeping 40% of enzymatic activity even in the presence of 10 mM phenylalanine at which the activity of wild type PheA^{WT} was not observed. The substitution of Leu to Phe in CMPD may induce significant conformational change for this enzyme to acquire feedback resistance to end-product of the pathway by modulating kinetic properties.

Key words: *E. coli*, aromatic amino acid biosynthesis, chorismate mutase/prephenate dehydratase, enzyme assay, feedback inhibition resistance (FBR), phenylalanine production, random mutagenesis

방향족 아미노산들은 그 자체 또는 염산과 같은 효소보조제의 생합성 전구 물질이어서 유용한 식품첨가물이다(Krishnaswamy, 2001; Krishnaswamy and Madhavan Nair, 2001). 구조상 환상 구조의 아민기를 벤젠으로 치환이 가능하여 산업적으로 유용한 염료, 플라스틱 같은 폴리머의 전구체로 사용될 수 있다(Masuo *et al.*, 2016). 특이하게도 방향족 아미노산의 생합성 경로는 미생물에만 특정되고 인간 간세포에는 발생경로에

서 제외되어 있어서, 의학적으로 *Mycobacterium tuberculosis* 등의 병원성 미생물 치료제의 타겟이 될 수 있다(Parish and Stoker, 2002). 위와 같은 다양한 생물학적 유용성 때문에 방향족 아미노산인 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판은 오래전부터 화학적으로 합성되어 왔으나, 현재는 포도당 또는 미생물 생합성 경로의 중간 물질 탄소원으로부터 직접 발효 및 미생물의 특정 효소를 이용하는 미생물전환(microbial conversion)법을 이용하여 생산하고 있다(Hwang, 1985; Parish and Stoker, 2002). 그 예로써, 방향족 아미노산중 L-페닐알라닌은 동물사

*For correspondence. E-mail: sunglee@chosun.ac.kr;
Tel.: +82-62-230-6381; Fax: +82-62-233-6337

료 첨가제 뿐아니라(Aida, 1986), 펩타이드 감미료인 아스파탐(aspartame)의 원료 물질로써 쓰여지고 있다(Alleva *et al.*, 2011). *E. coli* 에서 방향족 아미노산들의 합성은 phosphoenolpyruvate (PEP)와 erythrose-4-phosphate (E4P)의 효소적 중합으로 시작하여 chorismate를 만드는 shikimate pathway라고 알려진 공통경로를 통한다(Parish and Stoker, 2002) (Fig. 1).

이 생합성 경로에서 페닐알라닌은 *pheA* 유전자에 의해 암호화되는 chorismate mutase/prephenate dehydratase (CMPD 또는 PheA)라는 이중기능효소(bifunctional enzyme)에 의하여 chrismate로부터 합성이 시작된다. 이 효소는 shikimate pathway에 의하여 생성된 chrismate를 prephenate로 전환하는 chorismate mutase 기능과, 다음 반응인 prephenate를 phenylpyruvate로 전환 시키는 prephenate dehydratase 기능을 한 효소에서 동시에 가지고 있다(Fig. 1). 이 두가지 기능이 융합된 PheA 단백질은 386개의 아미노산으로 구성되어 있고, 합성경로의 마지막 산물인 L-페닐알라닌에 의하여 다른자리입체성 조절(allosterically regulated)을 받는다고 알려져 있다(Pohnert *et al.*, 1999; Prakash *et al.*, 2005) (Fig. 1). 이러한 사실은, 세포 안에서 이 PheA 단백질의 활성체는 이량체로 존재하지만, 페닐알라닌의 세포내 농도 증가에 따라 각 단량체의 기질 결합 부위간의 협동적 결합으로 인한 높은수준의 다량체 상태(oligomeric state)로 전환된 효소결합체가 발견됨으로써 증명되어 지고 있다(Davidson, 1987). 또한, 페닐알라닌 생합성 경로에서 다른자리입체성조절을 받는 조절단백질로서의 PheA

단백질의 가장 중요한 특징은 경로의 마지막 산물인 페닐알라닌에 의하여 되먹임제어에 저항성(feedback inhibition)을 갖게 된다는 점이다(Garner and Herrmann, 1985; Muday and Herrmann, 1990; Gunel-Ozcan *et al.*, 1997). 위와 같은 생화학적 저해 시스템은 산업적으로 유용한 물질의 미생물전환법 및 발효법에 의한 생산 측면에서 극복해야할 요소이다(Choi and Tribe, 1982). 이를 극복하기 위하여, 단백질공학적 방법으로 페닐알라닌에 의한 되먹임제어가 해제(feedback inhibition resistance)된 PheA^{FBR} 단백질을 디자인 하는 것이 고려되어 질 수 있다. 하지만, 이러한 시도는 이 단백질의 삼차원적 구조가 규명이 선행되어야 하나, 아직까지 *E. coli*와 같은 그람 음성균으로부터 CMPD 융합단백질 형태의 구조가 보고 된 바 없다. 따라서, 두 가지 기능을 가진 도메인들(CM/PD)이 융합된 PheA 단백질에서 정확한 기질 결합 부위와 다른자리입체성 조절 부위에 대한 정보가 부재하므로, 되먹임제해를 구조적으로 저항성을 나타낼 수 있는 정확한 부위를 예측할 수가 없는 실정이다. 이에, 본 연구에서는 방향족 아미노산 생산에 산업적으로 유용하게 쓰일 수 있는 되먹임제어에 저항성을 보이는 *pheA*^{FBR} 유전자를 확보하기 위하여, 무작위적돌연변이 유발법(random mutagenesis)을 이용하여 유전자원을 확보하고, 그 유전자 산물인 PheA^{FBR} 단백질의 생화학적 연구를 통하여 돌연변이 위치의 기능을 다른자리입체성조절 측면에서의 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 명시하였다. *E. coli* JH24 균주는 페닐알라닌 생합성 관계 효소들 중 *pheA* 유전자를 결손시켜, 본 연구의 목적에 최적화 시켰다. pLC150 플라스미드는 pBC322 (pBR322- Δ tet) 플라스미드에 *E. coli*의 *pheA* 유전자를 함유하는 DNA 절편은 *EcoRI*-*Bam*HI 제한효소 부위에 클로닝하여 구축하였다. PheA 단백질의 분리정제를 위하여, 이에 상응하는 DNA 절편을 pLC150을 template로 사용하여 올리고뉴클레오타이드 프라이머로(*pheA*For: 5'-GGTGGTCATATGACATCGGAAAACCCGTTACTGGCGC-3', *pheA*Rev: 5'-ACCACCGAATTCTCAGGTTGGATCAACAGGCACTACG-3') PCR하여 획득하였다. 얻어진 1.1 kb의 DNA 절편을 *NdeI*-*EcoRI* 제한 효소로 절단하여, 과발현 벡터인 pET28a(+에 클로닝하였다.

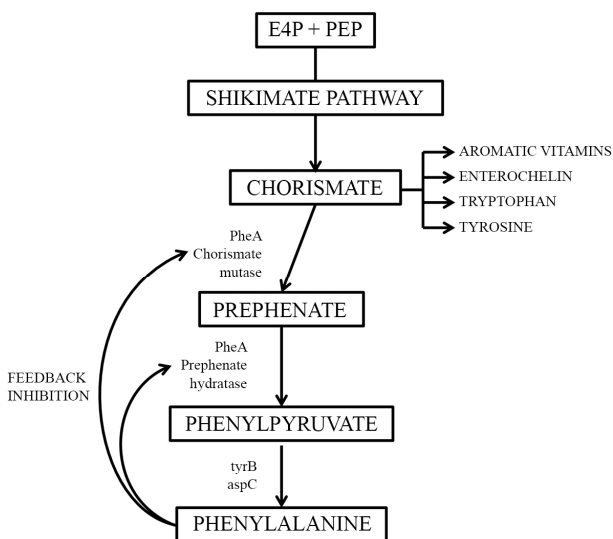


Fig. 1. Biosynthetic pathway of phenylalanine in *Escherichia coli*. The bifunctional enzyme PheA functions as a chrismate mutase-prephenate dehydratase (CMPD) and is negatively regulated by an end-product phenylalanine. E4P, erythrose-4-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate.

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains		Genotype	Reference or source
W3110	wild type		C. Yanofsky
JH24	<i>supE</i> , <i>supF</i> , <i>hsdR</i> , <i>gal</i> , <i>pheA</i> [−]		this work
BL21 (DE3)	F [−] <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B[−]m_B[−])</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)		Novagen
DH5α	F [−] <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K [−] m _K ⁺), λ [−]		ThermoFisher
Plasmids	Description	Size (kb)	Reference or source
pLC150	Ap ^r , pBR322-Δ <i>tet</i> - <i>pheA</i> ^{WT}	4.4	this work
pLC151	Ap ^r , pBR322-Δ <i>tet</i> - <i>pheA</i> ^{FBR}	4.4	this work
pBC322	Ap ^r , pBR322-Δ <i>tet</i>	3.2	this work

무작위적 돌연변이 유발법을 통한 *pheA*^{FBR} 유전자 돌연변이 유도 및 선별

pheA 유전자는 이미 클로닝된 플라스미드(pLC150)를 얻어 사용하였다(Hwang et al., 1985) (Table 1). *pheA*^{WT} 유전자가 클로닝된 플라스미드(pLC150)로 형질전환된 *E. coli* JH24(*pheA*⁻)를 대수기까지 배양한 후, 돌연변이 유발물질인 nitrosoguanine (NTG)를 citrate buffer (pH 5.5)를 이용하여 50 mg/ml 농도로 맞추어 JH24/pLC150 형질 전환된 *E. coli*과 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 위의 처리에서 반응 후 잔존하는 NTG를 제거하기 위하여, NTG가 처리된 *E. coli*를 원심분리한 뒤 phosphate buffer (pH 7.0)로 두 번 세척하였다. 이 *E. coli*들을 세척 즉시 완전배지(LB broth)에서 24시간 배양 후, NTG가 처리된 pLC150 플라스미드를 추출하였다. 이 추출된 pLC150을 제한효소 *NdeI*-*EcoRI*로 처리한 후 다시 새로운 플라스미드에 클로닝하여 JH24(*pheA*⁻)에 형질전환시킨 후, 페닐알라닌 구조 유사체(analogue)인 p-fluorophenylalanine (p-FP)과 m-fluorophenylalanine (m-FP)을 5 mg/ml 농도로 포함하는 최소고체 배지에서 3~7일 동안 37°C에서 배양하였다. 생성된 *E. coli* 군락으로부터 pLC150 플라스미드를 추출하여 *pheA* 유전자의 염기서열을 결정하였다.

세포조효소액(crude extract) 추출 및 단백질 발현

원심분리로 회수된 *E. coli* (JH24/pLC150)을 적당한 부피의 완충용액(50 mM Tris-Cl, pH 8.2, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol)에 현탁시켜 초음파 파쇄 한 후(Sonics Vibra Cell), 30,000 × g에서 30분간 원심분리하여 lysate에서 비용해성 부분을 제거하였다. 나머지 세포조효소액을 효소활성 측정에 사용하였다. *PheA* 단백질 과발현은 pET28a(+)-*pheA*^{WT} 또는 *pheA*^{FBR}를 포함하는 *E. coli* BL21(DE3)을 Kanamycin (50 μg/ml)이 포함된 LB 배지에서 대수기(OD₆₀₀~0.6)까지 37°C

에서 배양한 후, 1 mM IPTG로 37°C에서 5시간 동안 과발현을 유도하였다. 분리 정제를 위한 세포조효소액 준비는 사용한 완충용액(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM DTT)을 제외하고 위와 동일하게 시행하였다.

단백질 분리 및 동정

N-말단에 6x His tag을 가진 *PheA*^{WT} 또는 *PheA*^{FBR} 단백질을 발현된 세포조효소액을 Ni-NTA affinity resin (Qiagen)이 충전된 컬럼을 통과시킨 후, 50 mM imidazole이 함유된 완충용액으로 결합하지 않은 *E. coli* 단백질들을 씻어 내고 원하는 단백질을 용출용액(50 mM Tris-Cl; pH 7.5, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole)을 이용하여 회수하였다(Fig. 2). 얻어진 단백질에서 N-말단에 6x His tag을 thrombin 처리로 제거하기 위하여, 단백질 용액을 투석하여 NaCl의 농도를 150 mM로 낮춘 후에 7 unit의 α-thrombin (Hematologic Technology Inc.)을

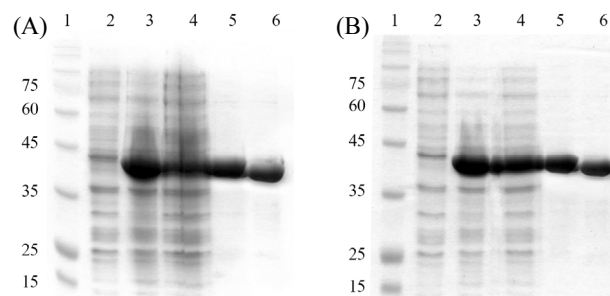


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of purified *PheA*^{WT} (A) and L118F mutant *PheA*^{FBR} (B). Bacterial lysate and purified recombinant proteins were analyzed using 12% SDS-PAGE as described in 'Materials and Methods'. Notably, 6 x His tag was removed by treating with thrombin, resulting in producing the lower molecular weight protein (lane 6) than that uncut protein (lane 5). Lanes: 1, molecular marker (kDa); 2, crude extract from non-induced cells; 3, crude extract from induced cells; 4, unbound fractions from Ni-NTA agarose column; 5, purified 6x His tag protein (~43 kDa); 6, thrombin-digested protein (~41 kDa).

가하여 상온에서 5시간 동안 반응하였다. 잘려진 6x His tag과 남아있는 thrombin을 제거하기 위하여 prephenate dehydratase (PD) 활성 측정 용액(50 mM Tris-Cl; pH 8.2, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol)으로 평형을 이룬 HiLoad™ 16/600 Superdex 200 pg column (GE Health)에 위 단백질 용액을 통과 시켜 size-exclusion chromatography를 시행하였다. 최종적으로 얻어진 단백질은 효소활성 측정 실험에 사용되었다.

Prephenate dehydratase (PD) 효소 활성 측정

pheA 유전자 산물인 PheA^{WT} 및 PheA^{FBR} 단백질의 효소활성은 prephenate dehydratase의 활성측정으로 확인하였다 (Davidson *et al.*, 1972). 이 효소의 반응 산물인 phenylpyruvate는 알칼리용액에서(1.5 M NaOH) 강한 자외선 영역 파장(320 nm)에서 흡광도를 보인다. 0.4 ml의 0.5 mM prephenate 용액(Tris-Cl, pH 8.2, 20 mM β -mercaptoethanol)을 미리 37°C에서 항온처리한 후, 세포조효소액 또는 순수 분리된 단백질(20 μ l)을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 효소반응은 0.8 ml의 1.5 M NaOH 용액을 첨가하여 정지시키고, 원심분리 후 상층액의 흡광도를 320 nm에서 측정하였다(Biochrom Libra S22). 생성된 phenylpyruvate의 농도는 320 nm에서의 몰흡광계수(17,500)를 이용하여 계산하였다. 대조실험군(blank)인 기질 자체에 대한 흡광도는 단백질 첨가 전에 NaOH 용액을 가한 상층액의 흡광도를 이용하여 측정하였다. 효소활성은 위 실험 조건에서 prephenate 1.0 μ M 기질을 전환시키는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

효소 동력학(enzyme kinetics) 지표 결정

PheA 단백질의 기질인 prephenate에 대한 농도의존성 동력학적 지표 결정 실험은 각 기질 농도에 대하여 triplicate 실험에 의한 통계적 처리에 의하여 수행되었다. K_m과 V_{max}는 Sigmaplot curve-fitting 프로그램(JandelScientific)을 사용하여 계산되었다.

결 과

되먹임저해 저항성 *pheA*^{FBR} 유전자 선별

아미노산 유사체(analogue)는 상응하는 아미노산 생합성 단계에 관여하는 주요 효소(key enzyme)를 저해한다. 그러므로 야생균주는 이러한 유사체가 존재하는 환경에서는 필요한 아미노산을 정상적으로 합성 할 수 없기 때문에 성장이 저해된다. 마찬가지로, 유사체 대신 상응하는 아미노산이 제공되

면 그 저해가 지속된다(Dopheide *et al.*, 1972). 이러한 관찰은 해당 아미노산 유사체에 의하여 더 이상 활성이 저해되지 않는 주요 효소의 돌연변이 단백질 또한 더 이상 그 아미노산에 의하여도 되먹임저해를 받지 않는 것을 의미한다. 따라서 이러한 돌연변이 유전자를 가지고 있는 미생물은 그 아미노산 생합성 과정의 조절 메커니즘을 상실하여 특정 아미노산의 축적이 일어난다(Hwang *et al.*, 1985; Pohnert *et al.*, 1999). 방향족 아미노산인 페닐알라닌 생합성 과정에서 주요 효소인 PheA 단백질을 대상으로 페닐알라닌에 의한 되먹임제어 저항성(feedback resistance) 돌연변이 유전자를 확보하기 위하여 NTG를 이용한 무작위적 돌연변이법을 사용하였다. *pheA* 유전자를 함유한 pLC150 플라스미드로 형질전환된 페닐알라닌 요구주(auxotroph)인 *E. coli* JH24를 NTG로 처리한후, 5 mg/ml의 페닐알라닌 유사체인 m-PF 또는 p-PF를 포함하는 최소배지에서 3-7일이 지난 후 최종적으로 p-PF 함유 배지에서만 8개의 콜로니를 얻을수 있었다. 이 유전자들은 다시 새로운 벡터(pBC322)에 클로닝 시켜 벡터부분의 손상에 의한 실험적 오류를 없애고자 하였다. 얻어진 유사체 저항성 유전자들의 페닐알라닌에 대한 저해도를 알아보기 위하여, 이 p-PF에 저항성이 있는 플라스미드를 함유하는 *E. coli* JH24의 세포조효소액에 포함된 PheA 단백질의 기능인 prephenate dehydratase (PD)의 활성을 0-10 mM 페닐알라닌 존재하에서 측정하였다. 플라스미드를 함유하지 않은 JH24 균주 자체의 세포조효소액에서는 예상대로 활성이 측정되지 않았다. *E. coli* 야생균주인 W3110의 세포조효소액은 1 mM 페닐알라닌 존재하에서 약 91%의 활성이 저해 되었고, 5 mM에서는 활성이 거의 측정되지 않았다(Table 2). 반면에 *E. coli* JH24/pLC150 (pBR322: *pheA*^{WT})에서 얻어진 추출물은 페닐알라닌이 존재하지 않는 조건에서 균주자체보다 약 6배의 활성을 보였고, 5 mM의 페닐알라닌 존재하에서도 약 20%의 활성이 남아 있었다. 이는 gene dosage 효과에 의한 되먹임제어 저항성인 것으로 사료된다. 이와 비교하여, 8종류의 유사체 저항 가능성을 가진 돌연변이 중에서 한 종류의 클론만이 페닐알라닌에 대해 유의한 정도의 활성 저항성을 나타내었다. 이 유전자를 *pheA*^{FBR}이라 명명하고, 이를 포함하는 플라스미드를 pLC151 (pBR322: *pheA*^{FBR})이라 명명하였다(Table 1). 이 유전자의 산물인 PheA^{FBR} 단백질은 야생형 단백질과 비교하여 약 3.5배 이상의 활성을 보였다. 또한, *E. coli* JH24/pLC150 세포조효소액은 1 mM 및 5 mM 페닐알라닌 농도에서 보여준 활성과 비교하여 7.2배 및 15배의 활성을 나타내었다(Table 2). *E. coli* JH24/pLC150 세포조효소액의 활성이 측정 되지 않는 10 mM 페닐알라닌 존재하에서도 *E. coli* JH24/pLC151의 추출물은 여전히 5배 정도의

Table 2. Enzyme activities and feedback inhibition of prephenate dehydratase by phenylalanine in *E. coli*

Strain ^a	Specific activities (U/mg protein) ^b			
	0 mM (Phe)	1 mM (Phe)	5 mM (Phe)	10 mM (Phe)
W3110	0.37 (100)	0.035 (9.4)	ND (ND)	ND (ND)
JH24	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)
JH24/pLC150	1.98 (100)	0.85 (42.9)	0.35 (17.7)	0.06 (3)
JH24/pLC151	7.44 (100)	6.11 (82.1)	5.18 (69.6)	4.86 (65.3)

(), Relative Activity (%)

ND, Not Detected

^aCultures for enzymatic analysis were grown in minimal medium agar lacking methionine (0.2 g/L).^bCrude extract was used as enzyme sources for all the strains

활성(4.86 U/mg)을 유지하고 있었다. 이는 pLC151 추출물은 0 mM 페닐알라닌 존재 하에서의 저항성과 비교하여 10 mM 페닐알라닌 존재하에서도 65.3%의 저항성을 유지한다는 것을 의미한다. 또한, 높은 농도의 페닐알라닌(5, 10 mM) 존재하에서의 야생 유전자 함유 세포조효소액(pLC150) 보다 각각 4배와 22배의 증가된 저항성을 나타내었다(Table 2). 위 결과는 선별된 돌연변이 유전자 단백질이 세포내 생화학 경로에서 주요 효소로써 어느 정도 조절능력이 상실(deregulated)되었고, 해당 경로의 마지막 산물에 의한 되먹임저해에 대한 민감도에 저항성을 획득했다고 판단되어 진다. 하지만, 위 실험은 동일한 플라스미드 숫자와 발현정도를 가정한 상태에서의 해석이므로, 각 형질전환된 *E. coli*의 배양 조건 및 세포조효소액 준비 과정에서 나타난 실험의 부정확성이 있을 수 있다. 따라서 정확한 되먹임제어 저항성 돌연변이 유전자의 정보와 그 산물에 대한 효소동력학적 관점에서의 해석이 필요하므로, *pheA*^{FBR} 유전자의 염기서열 결정과 그 단백질의 분리정제를 실시하였다.

pheA^{FBR} 유전자의 염기서열 결정과 야생 유전자와 비교분석

되먹임저해에 대한 민감도에 저항성을 나타내는 유전자(*pheA*^{FBR})의 돌연변이 부위를 정확히 알기 위하여, 총 1,158 뉴클레오타이드에 대한 염기서열을 결정하였다(Macrogen). 그 결과 야생유전자 서열의 352번째 시토신이 티민으로 치환(C→T)되었다(Table 3). 이 뉴클레오타이드 치환은 유전자 산물인 단백질에서 야생 PheA^{WT} 단백질의 118번째 아미노산인 류신(Leu, CTT)이 페닐알라닌(Phe, TTT)으로 전환됨을 의미한다. 아미노산 수준에서 류신이 페닐알라닌으로의 치환은 아미노산 잔기의 화학적 특성 및 구조적으로 큰 변화가 일어난 것으로 판단된다. 류신의 잔기는 크기는 상대적으로 다른 아미노산에 비하여 작지만 단백질 삼차구조에서 대표적인 소수성 성질에 기여한다. 하지만, 페닐알라닌은 다른 방향족 아미노산인 티로신(Tyr)과 트립토판(Trp)에 비하여 상대적으로 더

Table 3. Location of mutation and change in the corresponding amino acid in PheA^{FBR}

Nucleotide position	Amino acid position	Change
352	118	Leu118 → Phe118 (CTT → TTT)

큰 소수성 성질을 나타내지만, 잔기의 상대적인 크기는 류신에 비하여 비대하다. 따라서 이 치환은 단백질의 삼차원 구조상의 변화를 초래할수도 있다. 더 나아가, 페닐알라닌은 주위의 다른 방향족 아미노산과 고리구조-매개성 stacking을 통한 강한 결합을 할 수 있어 단백질의 전체적인 구조와 기능에 변화가 예상된다.

과발현 단백질의 정제

세포조효소액을 이용한 선행된 활성 연구로 되먹임제어 저항성 유전자를 선별한 후, 선별된 PheA^{FBR} 단백질의 되먹임제어 저항의 메커니즘을 치환된 아미노산과 연계하여 정확하게 이해하기 위하여 효소동력학 연구를 수행하였다. 효소동력학 연구는 분리정제된 PheA^{WT}와 PheA^{FBR} 단백질이 준비되어야 하기 때문에, 각 단백질을 *E. coli*에서 대량발현 시키기 위하여 pET28a(+) 과발현 벡터에 클로닝하여 각 단백질을 대량 발현시켰다.

과발현 과정을 거친 세포를 분쇄하고 원심분리를 통하여 불용성 물질들을 제거하여 목적 단백질을 함유하는 용해성 상등액(Fig. 2: lanes 2 and 3)을 Ni-NTA resin에 통과시켰다. 이어서 resin에 결합하지 않거나 약하게 결합한 단백질을 씻어낸 후(Fig. 2: lane 4), 높은 imidazole 농도의 완충용액으로 N-terminal에 6x His tag을 함유한 PheA^{WT}와 PheA^{FBR} 단백질을 추출하였다(Fig. 2: lane 5). 그림에서와 같이 발현정도는 높았으며, His tag과 친화도가 높은 resin에 목적 단백질의 크기(~43 kDa)와 결합하는 정도로 보아 정상적인 전사과 번역을 거

친 융합단백질이 발현되었음을 알 수 있었다. 얻어진 단백질은 His-tag과 목적단백질 사이에 단백질 분해효소인 thrombin 절단 부위를 포함하기 때문에, 이 단백질 분해 효소를 이용하여 His-tag을 함유한 부위(~2 kDa)를 절단하였다. 최종적으로 얻어진 단백질은 예상과 같이 ~41 kDa 크기의 고순도로 정제되었다(Fig. 2: lane 6). 이 결과는 구축된 과발현 시스템으로 용해성 목적 단백질이 발현되었고, 효소동력학 연구에 적합한 농도와 순도로 순수분리 되었다는 것을 의미한다.

PheA^{FBR} 단백질의 효소동력학적 연구

PheA^{WT}와 PheA^{FBR} 단백질의 효소동력학적 특성 연구는 돌연변이된 아미노산 부위가 효소 전체의 기능에 미치는 역할을 이해 하는데 필수적이다. 따라서 PheA 단백질의 기능인 prephenate dehydratase (PD)의 활성에 대한 동력학적 변수와 페닐알라닌 존재시 활성을 비교 연구하였다(Table 4). 기질인 prephenate에 대한 PD의 동력학적 변수들은 Michaelis-Menten equation에 의한 초기속도로 측정되었다(Table 4). PheA^{WT}와 PheA^{FBR}의 K_{cat} 은 거의 비슷하나, 기질인 prephenate와의 친화도를 나타내는 K_m 은 PheA^{WT} (0.847 mM)이 PheA^{FBR} (0.287 mM) 보다 약 3배 정도 높았다. 하지만, 효소효율도의 척도인 K_{cat}/K_m 은 PheA^{FBR}이 약 3배 더 높았다. 이는, PheA^{FBR} 단백질이 PheA^{WT} 보다 기질 친화도가 더 높으며, 더 효율적으로 반응을 촉매한다는 것을 의미한다.

본 연구에서 선별된 PheA^{FBR} 단백질의 정확한 되먹임제어 저항성에 대한 동력학적 성상을 알아보기 위하여, 분리정제된 단백질로 PD 활성에 대한 되먹임저해(feedback inhibition) 실험을 수행하였다(Fig. 3). 이 단백질 활성의 조절자인 페닐알라닌이 1 mM 존재시, 야생주단백질(PheA^{WT})은 95%의 활성을 잃었지만 선별된 PheA^{FBR} 단백질은 같은 페닐알라닌 농도에서 50%의 활성을 유지하고 있었다(Fig. 3). 그 이상의 페닐알라닌의 농도(5-10 mM)에서는 PheA^{FBR}은 거의 30-40%의 활성을 유지하는 반면, 야생주의 활성은 거의 보이지 않았다. 이 결과는 PheA^{FBR} 단백질에서 일어난 L118F 아미노산치환 돌연변이가 PheA^{WT} 단백질이 정상적으로 되먹임제어를 받는 세포내 페닐알라닌 농도(0.6-1 mM)에서도 50% 이상 저해를

받지 않는 효과를 가져왔다고 판단된다.

위 두 단백질의 기질친화도와 활성과의 관계를 더 정확히 알기 위해, 일정 농도의 페닐알라닌 존재시 기질농도 의존적 활성을 측정하였다(Fig. 4). 페닐알라닌이 각각 0, 0.2와 0.5 mM 존재시, 기질을 0-2 mM로 변화시킨 결과, 동력학적 성상은 서로 상이한 결과를 보였다. PheA^{WT} 단백질은 페닐알라닌 존재시 기질포화도 커브(substrate saturation curve)가 sigmoidal 하지만(Fig. 4A), PheA^{FBR} 단백질은 같은 조건에서 hyperbolic 커브를 보였다(Fig. 4B). 이 결과는, 야생단백질은 조절자의 존재시 효소활성 자리들이 기질과 협동적(cooperative)인 방법으로 결합을 보인다는 것을 시사한다. 반면에, 돌연변이 단백질은 조절자의 존재와 상관없이 기질과 단독적인 방법으로 결합하는 것으로 사료된다.

고 찰

본 연구에서는 *E. coli*에서의 방향족 아미노산 생합성 경로를 조절하는 주요 효소인 PheA 단백질의 되먹임제어 저항성 돌연변이(PheA^{FBR})를 선별하고, 그 효소의 효소동력학적(enzyme kinetics) 성상을 연구하였다. 되먹임제어 저항성 돌연변이 유전자를 고농도의 페닐알라닌 유도제 존재하에서 선별하였다. 이 돌연변이는 118번째 아미노산인 류신(Leucine)이 페닐알

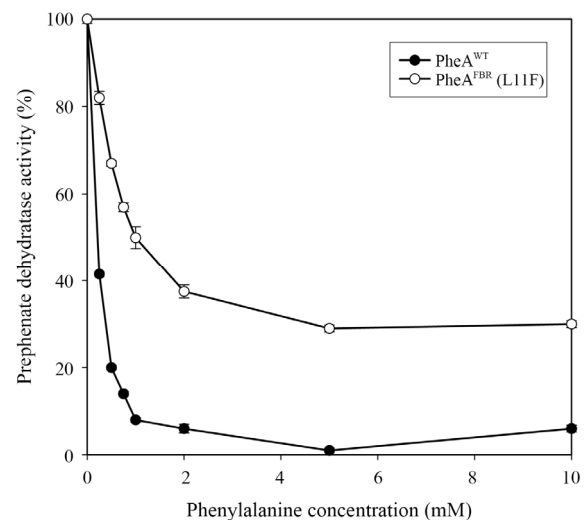


Fig. 3. Effect of phenylalanine on PheA activities. The prephenate dehydratase activity was measured in the presence of various phenylalanine concentrations. PheA^{FBR} (open circle) sustains its activity by 40-50% at 1 and 2 mM phenylalanine concentrations, respectively, at which the activity of PheA^{WT} (closed circle) is almost negligible. All experiments were performed with triplicate for statistics.

Table 4. Determination of kinetic parameters of WT and L118F mutant PheA^{FBR}

Protein	Prephenate		
	K_{cat} (min ⁻¹)	K_m (mM)	K_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
WT	2061	0.847	2433
L118F	2027	0.285	7112

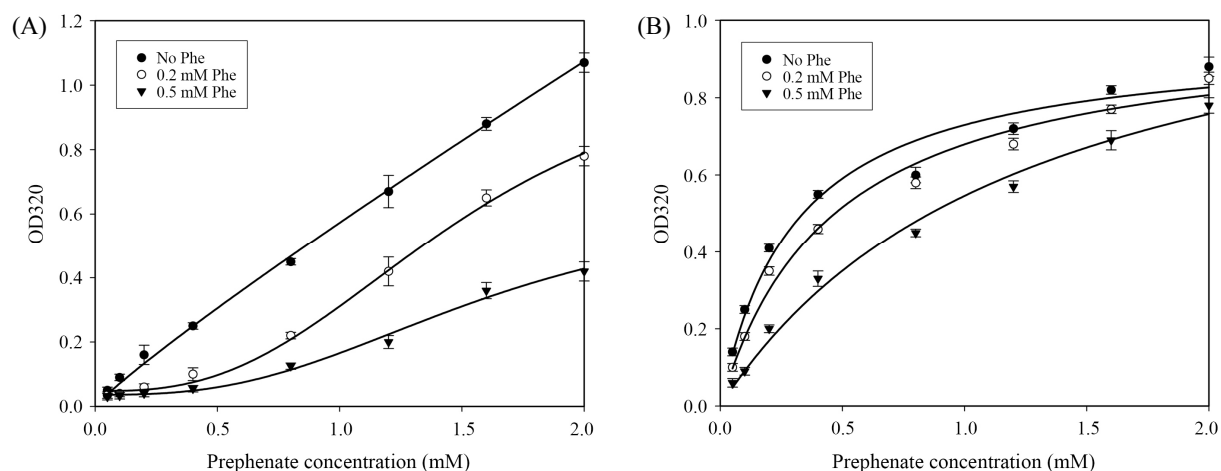


Fig. 4. Substrate dependent PheA function in the presence of phenylalanine. The prephenate dehydratase activity was examined as functions of PheA^{WT} (A) and PheA^{FBR} (B) proteins in the fixed inhibitor (Phe) concentrations (0, 0.2, and 0.5 mM). PheA^{WT} shows sigmoidal fitting in the presence of end-product phenylalanine (A), whereas the mutation occurred at L118F in PheA^{FBR} changes inhibitor-dependent binding of substrate to hyperbolic (B), indicating that the amino acid substitution might prevent the oligomerization of mutant protein. Data are averages of triplicate determinations and were fitted to Michaelis-Menten equation.

라닌(Phenylalanine)으로 치환된 돌연변이로 판명되었다 (Table 3). 효소 활성은 발현주의 세포조효소액과 고순도로 분리정제된 단백질 모두 비슷한 활성을 보였다. 흥미롭게도, 야생주 단백질과 그 활성을 비교해 볼 때, 3배 이상의 활성 증가를 보였다 (Table 4). 방향족 아미노산들인 타이로신 또는 트립토판에 의한 조절을 받지 않는 돌연변이 단백질은 보고된 바 있으나 (Choi and Tribe, 1982; Hwang et al., 1985), 페닐알라닌에 의한 저해 저항성 돌연변이는 보고된 바 없었다. 따라서, 본 연구에서 무작위적 돌연변이 방법에 의해 선별된 *pheA*^{FBR} 유전자는 방향족 아미노산 생합성 경로의 조절기작을 더 세밀하게 이해하는데 유용하게 이용될 것으로 사료된다. 효소동력학 연구의 결과, 이 돌연변이는 야생주단백질의 페닐알라닌 의존성 기질 전환을 협동적(cooperative)인 기질과의 결합에서 단독적인 결합 방법으로 변환 시키는 것으로 판단된다. 이 현상은, *E. coli* 내 야생 PheA 단백질은 단량체(monomeric)로 존재하지 않고 다량체(multimeric)로 존재함을 입증하고 있다. 이것은 기존의 보고들(Baldwin et al., 1981) 효소 동력학적으로 입증하는 결과이다. 그 이유는, 최소배지에서 *E. coli* 내에 축적되어지는 페닐알라닌의 농도는 0.6–1.6 mM로 알려져 있는데 (Brown, 1970), 이 실험은 야생에서의 정상적인 세포내 농도와 근접한 ~0.5 mM 페닐알라닌 존재하에서 실시하였기 때문에, *E. coli* 내에서 PheA 단백질의 다량체로의 존재가 페닐알라닌의 축적에 따른 조절효소를 효율적으로 제어할 수 있도록 고안되었다는 것을 보여준다. 이런 동력학적 연구의 결과와 단백질 자체의 기능 사이에 상관관계를 설명하기 위하여,

이 단백질의 삼차원적 구조 연구가 필수적이라 하겠다. 그러나, 현재까지 보고된 *E. coli*의 PheA 단백질은 그람양성균의 단백질과는 달리 N-말단 부분의 *chrmate mutase* (CM)와 C-말단 부분의 *prephenate dehydratase* (PD) 기능을 모두 가지고 있는 융합단백질이다 (Tan et al., 2008). 단백질 2차 구조를 분석한 결과, CM 도메인(1-89 aa)과 PD 도메인(103-376 aa)으로 나누어져 있고, 생화학적 연구 및 다른 미생물의 PD 단백질 구조 연구에서 309–312와 329–332 아미노산으로 이루어진 motif가 페닐알라닌이 결합하는 조절부위(regulatory region)로 알려져 있다 (Liberles et al., 2005; Vivan et al., 2006). 하지만, 본 연구의 PheA^{FBR} 단백질에서 발견된 치환은 페닐알라닌 결합부위가 아닌 CM과 PD 도메인의 중간 또는 PD 도메인의 도입부에서 형성되었다. 이 결과는 돌연변이(L118F)에서 나타나는 되먹임제어 저항성이 조절자 결합 부위의 변환으로 초래된 페닐알라닌 친화도 증가로 인한 효과가 아니라는 것을 의미한다. 아마도 이 돌연변이 부위는 이 융합기능 효소의 새로운 조절기능을 가진 도메인일 가능성이 크다고 사료된다. 이를 정확히 규명하기 위하여 삼차원구조 분석이 요구된다.

적 요

*E. coli*의 PheA 단백질은 *chorismate mutase* and *prephenate dehydratase* (CMPD) 활성을 가지며 마지막 산물인 페닐알라닌에 의하여 되먹임제어가 되는 생합성 경로의 주요 조절 효

소 중의 하나이다. 그러므로, 이 PheA 단백질은 필수 아미노산 중의 하나인 페닐알라닌의 대량 생산에 이용하기 위한 단백질 공학의 타겟이 될 수 있다. 이러한 목적으로 PheA 단백질의 마지막 생산물인 페닐알라닌에 의한 되먹임저해 저항성 유전자를 선별하였다. 이 유전자의 산물인 PheA^{FBR}은 118번째 류신이 페닐알라닌으로 치환되었고, 기질인 prephenate에 대한 친화도가 야생주단백질과 비교하여 약 3.5배 정도 높았다. PheA^{FBR}은 세포내에서 축적되어져 되먹임저해를 하는 페닐알라닌 농도에서(약 1 mM와 10 mM)에서도 50%와 40%의 활성을 유지 하고 있었고, 페닐알라닌 존재하에서 기질의 결합 성향이 협동적(cooperative) 모드에서 단독적(hyperbolic) 모드로 전환되었다. 이는 기존 연구와 비교해 볼 때, 이 돌연변이 부위는 이 융합기능 효소인 PheA 단백질의 새로운 조절 부위의 존재를 암시 한다. 효소 동력학적 결과는 PheA 단백질의 되먹임저해 저항성 획득이 아미노산 돌연변이에 의한 단백질 구조의 변화 유도에 의한 것으로 생각된다. 더 나아가, 본 연구에서 선별된 돌연변이 유전자는 생물전환법을 이용한 필수아미노산 생산에 산업적으로 응용 가능성이 있다.

감사의 말

본 연구는 2013년 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 일반연구기지원사업(NRF-2013R1A1A2057465)의 지원을 받아 수행되었다.

References

- Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K., Yamada, H. 1986. Biotechnology of amino acid production, pp. 188. *Progress in Industrial Microbiology*. 24. Tokyo: Kodansha; Ltd, Amsterdam: Elsevier Science Publ.
- Alleva, R., Borghi, B., Santarelli, L., Straffella, E., Carbonari, D., Bracci, M., and Tomasetti, M. 2011. *In vitro* effect of aspartame in angiogenesis induction. *Toxicol. In Vitro* 25, 286-293.
- Baldwin, G.S., McKenzie, G.H., and Davidson, B.E. 1981. The self-association of chorismate mutase/prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K12. *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 76-85.
- Brown, K.D. 1970. Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 104, 177-188.
- Choi, Y.J. and Tribe, D.E. 1982. Continuous production of phenylalanine using a *Escherichia coli* regulatory mutant. *Biotechnol. Lett.* 4, 6.
- Davidson, B.E. 1987. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 412, 8.
- Davidson, B.E., Blackburn, E.H., and Dopheide, T.A. 1972. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K-12. I. Purification, molecular weight, and amino acid composition. *J. Biol. Chem.* 247, 4441-4446.
- Dopheide, T.A., Crewther, P., and Davidson, B.E. 1972. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli* K-12. II. Kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 247, 4447-4452.
- Garner, C.C. and Herrmann, K.M. 1985. Operator mutations of the *Escherichia coli* aroF gene. *J. Biol. Chem.* 260, 3820-3825.
- Günel-Ozcan, A., Brown, K.A., Allen, A.G., and Maskell, D.J. 1997. *Salmonella typhimurium* aroB mutants are attenuated in BALB/c mice. *Microb. Pathog.* 23, 311-316.
- Hwang, S.O., Gil, G.H., Cho, Y.J., Kang, K.R., Lee, J.H., and Bae, J.C. 1985. The fermentation process for L-phenylalanine production using an auxotrophic regulatory mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 6.
- Krishnaswamy, K. 2001. Perspectives on nutrition needs for the new millennium for South Asian regions. *Biomed. Environ. Sci.* 14, 66-74.
- Krishnaswamy, K. and Madhavan Nair, K. 2001. Importance of folate in human nutrition. *Br. J. Nutr.* 85 Suppl 2, S115-124.
- Liberles, J.S., Thorolfsson, M., and Martinez, A. 2005. Allosteric mechanisms in act domain containing enzymes involved in amino acid metabolism. *Amino Acids* 28, 1-12.
- Masuo, S., Zhou, S., Kaneko, T., and Takaya, N. 2016. Bacterial fermentation platform for producing artificial aromatic amines. *Sci. Rep.* 6, 25764.
- Muday, G.K. and Herrmann, K.M. 1990. Regulation of the *Salmonella typhimurium* aroF gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 2259-2266.
- Parish, T. and Stoker, N.G. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 148, 3069-3077.
- Pohnert, G., Zhang, S., Husain, A., Wilson, D.B., and Ganem, B. 1999. Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on the mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* p-protein. *Biochemistry* 38, 12212-12217.
- Prakash, P., Pathak, N., and Hasnain, S.E. 2005. pheA (Rv3838c) of *Mycobacterium tuberculosis* encodes an allosterically regulated monofunctional prephenate dehydratase that requires both catalytic and regulatory domains for optimum activity. *J. Biol. Chem.* 280, 20666-20671.
- Tan, K., Li, H., Zhang, R., Gu, M., Clancy, S.T., and Joachimiak, A. 2008. Structures of open (R) and close (T) states of prephenate dehydratase (PDT)--implication of allosteric regulation by l-phenylalanine. *J. Struct. Biol.* 162, 94-107.
- Vivan, A.L., Dias, M.V., Schneider, C.Z., de Azevedo, W.F. Jr., Basso, L.A., and Santos, D.S. 2006. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of prephenate dehydratase from *Mycobacterium tuberculosis* h37rv. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62, 357-360.