

대장균에서 사람 ALDH2 유전자의 발현

곽보연 · 이기환 · 정한승
진로그룹 종합연구원 생명과학팀

Expression of Human ALDH2 Gene in *Escherichia coli*

Bo-Yeon Kwak, Ki-Hwan Lee and Han-Seung Jeong

Bioscience Team, Jinro Group Research Institute, Yongin 449-910, Korea

Abstract

Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase(ALDH2) is mainly responsible for the oxidation of acetaldehyde generated during alcohol oxidation *in vivo*. To investigate the role of ALDH2 in alcohol metabolism, it was needed to get solubilized enzyme. The cDNA of ALDH2 is isolated from cDNA library and ligated to several expression vectors for *E. coli*. At almost expression system to be constructed, the broad expression band of ALDH2 was detected. But, the large part of the expressed protein consisted as inclusion body, the yield of solubilized enzyme was not more than 5% of the total expressed amount. Recombinant ALDH2 was verified from the several expression systems.

Key words : human ALDH2, expression

서 론

Aldehyde dehydrogenase(ALDH ; aldehyde : NAD^+ oxido-reductase, EC 1.2.1.3)는 alcohol dehydrogenase(ADH ; alcohol : NAD^+ oxido-reductase, EC 1.1.1.1)와 함께, 사람의 알코올대사 과정에서 주된 경로를 이루고 있다. ALDH는 여러 가지 동위효소로 존재하는데, 전기영동도에 따라 3가지로 분류되며, 이들 중에서 미토콘드리아에 주로 존재하는 ALDH2는 K_m 값이 낮고 반응성이 높아 체내에 흡수된 알코올이 변하여 생긴 알데히드를 제거하는 역할을 주로 담당하고 있다¹⁾. 이 ALDH2 효소 중 487번째 아미노산 잔기가 글루타민산에서 라이신으로 변이된 사람은 얼굴이 붉어지는 홍조현상을 보이는 등, 적은 양의 알코올에도 민감한 반응을 보이게 되고, 혈중 아세트알데히드의 농도가 높다^{2, 3)}. 특히 이러한 변이효소를 가진 사람은 서양인에는 거의 없고, 동양인과 미국 인디언의 10~40%를 차지하는 점은 흥미롭다⁴⁾.

ALDH2의 유전자는 Hsu 등에 의하여 규명되었는

데, 13개의 exon으로 구성된 517개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다^{5, 6)}. 변이효소는 염기서열 상에서 487번째 아미노산에 대한 코돈이 GAA에서 AAA로 염기 한 개가 바뀐 것이며, 이러한 ALDH2의 유전적 다변성을 측정하는 방법이 여러 논문에서 언급되었는데, 당 팀에서는 *Eco57I*를 이용하는 간편한 방법을 설정한 바 있다⁷⁾.

그러나 이들 효소를 발현시키고 정제한 결과는 배양액 1 리터당 3mg 수준의 결과가 발표된 이후⁸⁾, 더 이상의 논문이 발표되지 않고 있으며, 따라서 이 효소가 알코올대사에 미치는 영향을 직접적으로 탐구하는 실험이 진행되지 못하고 있는 상태이다.

본 논문에서는 알코올대사 과정에 미치는 ALDH의 역할을 연구하기 위하여, 우선 재조합 ALDH 효소를 제조하고자 하였다. 유전자를 cDNA library에서 스크리닝한 후, 이를 정상적으로 발현시키고자 여러 가지 발현벡터를 사용한 실험의 결과를 비교하여 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

FLAG Biosystem(pFLAG-1 벡터, *E. coli* JM 109)은 IBI사에서, pGP1-2 벡터와 *E. coli* BL21 (DE3), DH5 α , N99cI⁺, N4830-1, TG1은 ATCC에서, pAL781 벡터와 pTrxFus 벡터는 Invitrogen사에서, pEZZ18 벡터와 IgG sepharose 6FF column은 Pharmacia사에서, QIA express system(pQE30 벡터, Ni-NTA column)은 QIAGEN사에서 각각 구입하였으며, 기타 시약은 Sigma사, 배지는 Difco사의 제품을 구입하여 사용하였다. T7 프로모터와 integrase 유전자를 가지는 pT7-7 벡터는 연세대 유승구 교수로부터 얻었다. ALDH 유전자는 PCR 방법으로 probe를 제조하여 cDNA library에서 스크리닝하여 사용하였다⁹⁾.

2. Primer의 합성

Primer는 다음과 같이 GENOSYS에 의뢰하여 제조하였다.

primer 14: ATGAAGCTTATGAGTTCTTCTGAGG

primer 15: AGGATCCTTATGAGTTCCTCTGAGG

primer 32: AGTCAGCCGCCGCCACCCAGGCCGT

primer 404: GCCGCGGTACCATGTCAGCCGCCGC

primer 412: ACATATGTCAGCCGCCAC

3. FLAG Biosystem을 이용한 ALDH의 발현

pFLAG-1 벡터에서 OmpA signal peptide-FLAG peptide-Enterokinase 부위 바로 다음에 mature ALDH 유전자가 위치하도록, 벡터를 *Hind*Ⅲ로 절단한 후, Mung bean nuclease를 처리하여 blunt-end로 만들고, primer 32와 14를 이용하여 ALDH를 PCR로 합성하고 이를 절단한 pFLAG1에 삽입하여 pJLF32를 제조하였다(Fig. 1-a).

제조한 pJLF32는 *E. coli* JM109와 DH5 α 에 형질전환시켰으며, 각각의 균주를 50 μ g/ml ampicillin을 함유한 LB 배지에 접종한 후, 대수기에 접어들 때까지 약 2시간 배양하여 최종 농도 1~4mM이 되게 IPTG를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 약 8시간 동안 ALDH를 발현시켰다. 이를 원심분리하여 초음파로 세포를 파쇄한 후, 상등액과 침전물 부분으로 나누고 Laemmli의 방법¹⁰⁾에 의하여 SDS-PAGE 상에서 발현을 확인하였다.

4. T7-7 plasmid system에 의한 ALDH의 발현

T7 프로모터를 가진 pT7-7 벡터와 primer 412와 14번으로 PCR하여 합성한 ALDH 유전자를 *Nde* I / *Hind*Ⅲ로 절단 연결하여, 발현벡터 pJLT412를 제조하였다(Fig. 1-b).

pLT412 벡터를 염색체 상의 *lac* 프로모터에 의해 T7 RNA polymerase가 발현되는 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켜 IPTG로 유도시켜 ALDH를 발현시켰다. 확인은 3)의 방법과 동일하게 행하였다.

5. ThioFusion Expression system에 의한 ALDH의 발현

pTrxFus 벡터의 P_L 프로모터-thioredoxin-enterokinase 부위 다음에 ALDH 유전자가 위치하도록 제한효소 *Kpn* I / *Bam*HI을 사용하여 절단하고, primer 404와 15로 합성한 ALDH 유전자를 동일한 제한효소로 절단하여 벡터 pJLS+3을 제조하였다(Fig. 1-c).

먼저 pJLS+3을 wild type λ CI repressor를 항상 발현하고 있는 *E. coli* N99cI⁺에 형질전환하여 DNA 지도로 확인한 후 λ CI repressor의 발현이 *trp* 프로모터에 *trp* repressor의 작용과 attenuation에 의하여 조절되도록 설계된 *E. coli* GI698에 다시 형질전환시켰다. 이렇게 제조된 균주를 트립토판이 없는 배지에서 배양하다가 트립토판을 넣어 ALDH를 유도시킨 후 3)의 방법으로 확인하였다.

6. QIA express system에 의한 ALDH의 발현

pLP33⁹⁾을 *Sac* I / *Hind*Ⅲ 절단하여 Factor Xa site를 포함한 ALDH 유전자 절편을 얻고, 이를 T5 프로모터와 두 개의 *lac* operator를 가진 pQE30 벡터의 6 \times His affinity tag sequence 다음에 위치하도록 하여 pJLQ30 벡터를 제조하고(Fig. 1-d), 이를 *E. coli* TG1에 형질전환시켰다. 이 균주를 50 μ g/ml의 ampicillin을 함유한 LB 배지에서 배양하여 대수기에 접어들 때(약 2시간) IPTG를 최종농도 2mM이 되게 첨가하여 ALDH를 발현시키고, 3)의 방법으로 확인하였다.

결과 및 고찰

제조한 발현벡터들을 도입한 형질전환 대장균을 대상으로 ALDH2의 발현을 측정한 결과, FLAG system(Fig. 2-a), T7-7 sytem(Fig. 2-b), thiofusion expression system(Fig. 2-c), QIA express system(Fig. 2-d)을 이용한 계에서는 모두 ALDH2가 발현되어 전기영동으로 확인할 수 있었다. 그러나 이들 대부분은 inclusion body 형태로 pellet 부분에서 나타났으며

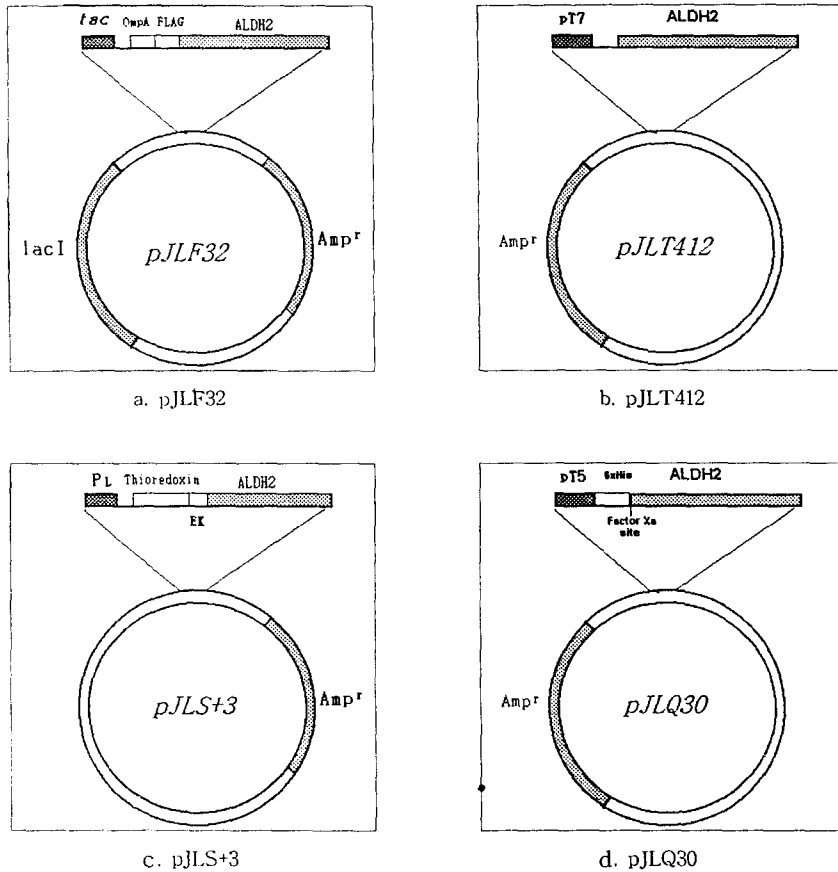


Fig. 1. Maps of ALDH expression vectors constructed.

효소 활성을 나타내지 않았으나, pJLQ30은 ALDH가 약 5% 정도만이 가용화된 상태로 발현되었다. ALDH2는 단백질에 glycosylation된 곳이 없으므로 알려져 있는데도, 안정한 구조를 이루지 못하고 inclusion body를 형성한 결과는 85%가 insoluble하였던 사람의 class 3 ALDH의 경우와 유사하다¹¹⁾. 사람의 ALDH2는 17개의 signal peptide가 있어, 이것이 미토콘드리아로 운반되면서 안정된 낮은 농도를 유지하나, 재조합체의 경우, 대장균체 내에 post-translation 과정을 수행하는 기능이 없으므로 mature protein에 해당하는 유전자만을 클로닝하였기에, 과발현의 양상을 띠게 된 것으로 판단된다.

이들 벡터계 외에, secretion 벡터인 pEZZ18의 Protein A 프로모터-signal sequence-2×immunoglobulin binding Z-domain 다음에 ALDH 유전자를 넣어 제조한 pJLZ18에서는 발현되지 않았다. P_L 프로모터에 의해 T7 RNA polymerase가 heat 유도되도록 고안된 벡터인 pGP1-2 (ATCC40175)와 함께 pJLT

412를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 inclusion body의 형성을 억제함으로써, 폴딩이 된 ALDH2를 제조하려고 시도하였으나, inclusion body의 감소 현상을 보이지 않았다. 또한, pJLS+3을 temperature-sensitive한 *cI857* repressor를 발현하고 있는 *E. coli* N4830-1에 형질전환시킨 후 LB 배지에 배양하여 heat 유도 (30 \rightarrow 40 $^{\circ}$ C)에 의해 ALDH2 발현을 유도하였으나 결과는 동일하였다. 이 밖에 각각의 시스템에서 온도변화, 배양 pH 변화, 포도당 첨가, 진탕배양기 회전속도 변화 등의 실험에서도 inclusion body의 감소는 나타나지 않았다.

pJLQ30에 의해 발현된 것 중, inclusion body 부분을 urea, guanidine-HCl 등의 detergent로 완전히 denaturation 시킨 후 Ni-NTA column으로 정제하여 refolding을 시도하였다. pH, 온도, 시간, 산화환원 전위 등의 여러 가지 요인을 변화시키면서 refolding하였으나 활성을 가진 단백질은 얻을 수 없었다.

현재 inclusion body를 억제하고 가용화된 재조합

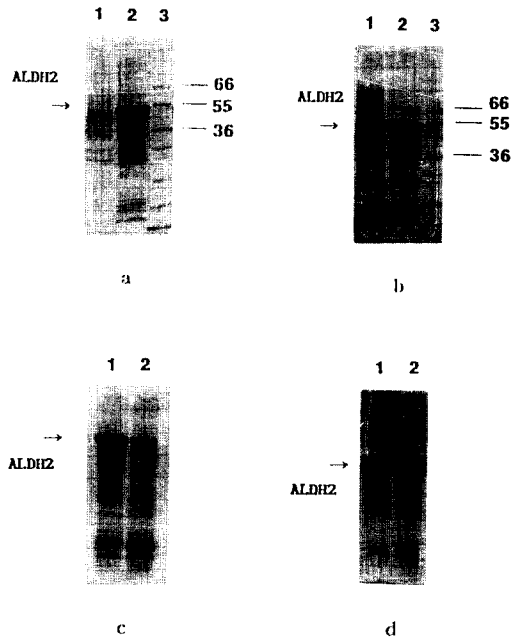


Fig. 2. SDS-PAGE patterns of ALDH2 gene expression in *E. coli* strains. Markers are a. pJLF32, lane 1 ; supernatant, lane 2 ; pellet, lane 3 ; protein size marker : b. pJLT412, lane 1 ; supernatant, lane 2 ; pellet, lane 3 ; protein size marker : c. pJLS+3, lane 1 ; pellet, lane 2 ; supernatant : d. pJLQ30, lane 1 ; pellet, lane 2 ; supernatant.

ALDH2 효소를 발현시키는 벡터 /숙주계에 대한 연구를 계속 진행중이다.

요 약

사람의 미토콘드리아에 있는 aldehyde dehydrogenase(ALDH2)는 체내에서 알코올 대사 과정 중에 생성되는 아세트알데히드를 산화시키는 주된 역할을 담당하고 있다. 이 ALDH2가 알코올 대사에 미치는 영향을 연구하기 위하여 가용화된 효소가 필요하다. 알려져 있는 유전자의 염기서열 데이터를 바탕으로 ALDH2의 cDNA는 cDNA 라이브러리에서 선별하였으며, 이를 여러 가지 대장균 발현벡터에 연결하였다. 제조한 발현 벡터를 형질전환시킨 대장균을 사용하여 단백질의 발현을 확인한 결과 대부분의 계에서 ALDH가 과발현되고 있었다. 그러나 발현된 단백질의 대부분은 inclusion body로 형성되어, 실제로 가용화된 효소의 양은 전체 발현된 양의 5% 이하였고 이들 몇 가지 발현 system

으로 재조합 ALDH2의 발현을 확인하였다.

참고문헌

1. Smith, M. : Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenase, *Adv. Hum. Genet.*, 15, 249-200 (1986).
2. Shibuya, A., Yasunami, M. and Yoshida, A. : Genotype of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase loci in Japanese alcohol flushers and nonflushers, *Hum. Genet.*, 82, 14-16 (1985).
3. Mizoi, Y., Yamamoto, K., Ueno, Y., Fukunaga, T. and Harada, S. : Involvement of genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenases in individual variation of alcohol metabolism, *Alcohol Alcohol*, 29, 707-710 (1994).
4. Goedde, H. W., Agarwal, D. P., Fritze, G., Meier-Takmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L. Z., Fang, B., Lisker, R., Paik, T. K., Rothhammer, F., Saha, N., Segal, B., Srivastava, L. M. and Czeizel, A. : Distribution of ADH2 and ALDH2 genotype in different populations, *Hum. Genet.*, 88, 344-346 (1992).
5. Enomoto, N., Takada, A. and Data, T. : Genotyping of the aldehyde dehydrogenase 2(ALDH2) gene using the polymerase chain reaction: Evidence for the single point mutation in the ALDH2 gene of ALDH2 deficiency, *Gastroenterol. Jpn.*, 26, 440-447 (1991).
6. Chao, Y.-C., Liou, S.-R., Chung, Y.-Y., Tang, H.-S., Hsu, C.-T., Li, T.-K. and Yin, S.-J. : Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase genes and alcoholic cirrhosis in Chinese patients, *Hepatology*, 19, 360-366 (1994).
7. Lee, K.-H., Kwak, B.-Y., Kim, J.-H., Yoo, S.-K., Yum, S.-K. and Jeong, H.-S. : Genetic polymorphism of cytochrome P-4502E1 and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in a Korean population, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21(6), (in press, 1997).
8. Zheng, C.-F., Wang, T. and Weiner, H. : Cloning and expression of the full-length cDNAs encoding human liver class 1 and class 2 aldehyde dehydrogenase, *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 17(4), 828-831 (1993).
9. 정한승 : Genetic and enzymatic characterization of human alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase, 서울대학교 대학원 화학과 박사학위논문 (1994).
10. Laemmi, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680 (1970).
11. Hsu, C., Chang, C., Shibuya, A. and Yoshida, A. : Human stomach aldehyde dehydrogenase cDNA and genomic cloning, primary structure, and expression *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 267, 3030-3037 (1992).