

대장균에서 Selenocysteine을 가지고 있는 Formate Dehydrogenase H의 최적화 생산

사영승, 김용환*

Optimized Production of Selenocysteine Containing Formate Dehydrogenase H in *Escherichia coli*

Young Seung Sa and Yong Hwan Kim*

접수: 2011년 1월 27일 / 게재승인: 2011년 6월 2일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Much interest has been recently focused on the production of large quantities of hydrogen, due to its potential importance in our economy and needs in the petroleum and chemical industries. Formate dehydrogenase H (FDH-H) from *Escherichia coli* containing selenocysteine that oxidizes formate to carbon dioxide with the release of hydrogen is a component of the anaerobic formate hydrogen-lyase complex of *E. coli*. To make full use of FDH-H, we need effective expression condition. In this approach, we investigated the effect of pH on FDH-H stability and observed the effect of selenite and formate concentration on the activity of FDH-H. Additionally, coexpression of selenocysteine insertion genes were tried to improve the expression of FDH-H. The highest level of FDH-H expression was achieved by coexpression of selenocysteine insertion genes (pSUABC) as well as by the addition of 10 μ M selenite and 10 mM formate. At this optimized condition, a 2.6 fold elevation of expression of FDH-H was achieved.

Keywords: formate dehydrogenase H, FDH-H, selenocysteine, pSUABC plasmid

1. 서론

Selenocysteine (SeCys)은 21번째 아미노산으로 알려져 있으며 사람, 동물, 박테리아의 대사활동에 관여하는 glutathione peroxidase, formate dehydrogenase, glycine reductases와 같은 몇몇 효소들의 활성 중심에 반드시 필요한 아미노산이다 [1]. 이 아미노산은 TGA codon으로부터 전사되는데 TGA는 종결코돈으로 단백질 번역의 종결을 유도한다. 따라서 종결코돈을 SeCys으로 해독 할 수 있는 특별한 tRNA가 요구된다. *Escherichia coli* (*E. coli*)에서는 *selA*, *selB*, *selC* 그리고 *selD*와 같은 몇몇 유전자들이 SeCys을 단백질로 합성하는데 관여하는 것으로 알려져 있다 [2]. Formate hydrogen-lyase (FHL)의 한 단위체인 formate dehydrogenase H (FDH-H)는 79 kDa의 폴리펩타이드로 formate를 산화시켜 이산화탄소와 전자를 만들어내는 반응을 촉매화하는 효소이다 [3,4]. FDH-H의 활성을 위해서는 SeCys뿐만 아니라 Fe₄S₄ cluster, molybdopterin guanine dinucleotide (MGD) 조효소 등 다양하고 복잡한 구조들이 요구되어 많은 연구에도 불구하고 FDH-H의 대량 생산은 어려움을 겪고 있다 [5-9]. 대장균 유래 FDH-H의 경우 일반적인 formate dehydrogenase와 달리 NADH를 조효소로 필요로 하지 않으며, 직접 methyl viologen과 같은 electron mediator로부터 전자를 전달받을 수 있는 특징이 있다. 최근 이렇게 직접 전자를 전달받을 수 있는 formate dehydrogenase가 이산화탄소와 formate간의 산화환원을 가역적으로 진행할 수 있다는 사실이 보고되었다 [11]. 따라서 본 연구에서는 대장균에서 유래하며 전자를 전달받을 수 있는 FDH-H를 이용하여 이산화탄소와 formate간의 가역적인 산화환원 반응을 진행하기 위한 일차 연구단계로

광운대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea
Tel: +82-2-940-5675, Fax: +82-2-941-1785
e-mail: metalkim@kw.ac.kr

FDH-H의 최적생산을 시도하였다. 이러한 FDH-H의 발현에 있어서 발현 시스템의 확립과 동시에 중요한 것이 발현 조건 및 환경이다. 따라서 본 연구에서는 먼저 회수된 FDH-H의 pH 안정성을 알아보고, selenite, formate의 투여량에 따른 FDH-H의 효과적인 생합성 양상을 비교하여 최적 생산 조건을 탐색하였다. 또한 *selA*, *selB*, *selC* 그리고 *selD*의 유전자를 가지고 있는 pSUABC 플라스미드를 형질전환 시켜 SeCys 생합성 능력을 증진시킨 대장균을 이용하여 비교실험을 진행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 박테리아 균주와 플라스미드

이 실험에서 사용된 BW25113 *E. coli* 균주는 NBRP (NIG, Japan)에서 pET22b (+) 플라스미드는 Novagen (WI, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. Sodium selenite와 sodium formate는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 전처리 없이 사용하였으며, pSUABC 플라스미드는 Dr. Elias Arnér (Sweden)에게 분양 받아 사용하였다. 그리고 western blot 실험을 위해 primary antibody인 anti-His mouse monoclonal antibody와 secondary antibody인 rabbit anti-mouse IgG polyclonal antibody는 Abcam (UK)에서 구매하였다. 기타 화학물질은 BD, Duchefa, Novagen, Bio-Rad 그리고 Sigma-Aldrich에서 구입하여 전처리 없이 사용하였다.

2.2. 유전자 클로닝 및 형질전환

FDH-H를 발현하는 *fdhF* 유전자는 GenScript Inc. (USA)에서 합성하여 사용하였다. 이 유전자는 총 2145개의 핵산으로 구성되었으며 C-terminal에 hexa-histidine을 암호화하고 있는 유전자를 융합하여 (Fig. 1(a)) western blot 수행을 위한 항체 표식자로 사용하였다.

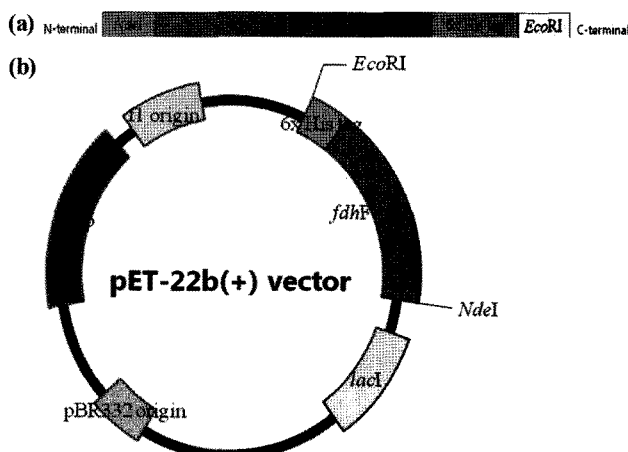


Fig. 1. (a) Scheme of *fdhF* gene. (b) Map of the expression plasmid pET22b (+).

pUC57 복제 플라스미드에 재조합 되어온 *fdhF* 유전자는 제한효소 *Nde I*, *EcoR I*으로 처리하였고, 동일한 제한효소

로 절단된 pET22b (+)에 T4 DNA 리가아제 (Fermentas)를 이용하여 접합시켰다 (Fig. 1(b)). 이렇게 재조합된 플라스미드는 BW25113에 형질전환 하였으며, pSUABC 플라스미드를 추가로 형질전환 시켜 동시발현 비교실험을 진행하였다. 유전자 조작과 박테리아로의 형질전환은 Sambrook et al. [10]에 의해 기술된 방법을 토대로 행하였다.

2.3. 균주의 배양 및 유도

미생물 배양을 위해 Luria-Bertani (LB) 액체배지 (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L)를 사용하였고, 조제된 배지는 Ar 가스로 15 min 동안 purging하였다. 125 mL serum bottle에 조제된 배지를 50 mL씩 옮겨 넣고 밀봉 후 121°C, 15 min 조건에서 멸균하였다.

멸균 뒤 주사기를 이용하여, 혐기 배양을 위해 멸균된 glucose 5 g/L를 넣어주었으며 플라스미드를 가진 균주를 유지할 수 있도록 chloramphenicol 1 mM을 투입하였다. Selenite와 formate의 투여량에 따른 FDH-H의 효과적인 발현양상을 비교하기 위하여 0~100 μ M, 0~100 mM을 각각 넣어주었다. 멸균, 밀봉된 배지에 미리 배양한 3 mL의 균주를 접종 후 37°C, 150 rpm에서 OD₆₀₀ 2.0이 될 때까지 배양하였다.

2.4. 균주의 회수

배양이 끝난 균주는 4000 rpm에서 20 min 동안 원심분리하여 상층액과 분리시켜 회수하였다. 회수된 세포는 N₂ 90%, H₂ 5%, CO₂ 5%의 조성을 가지고 있는 anaerobic chamber (Coy Manufacturing Co., Ann Arbor, USA)로 옮겨 실험을 진행하였다. 옮겨진 세포를 Ni-NTA Fast Start Kit (QIAGEN)을 이용하여 세포 내 단백질을 회수하였다. 먼저 Lysozyme과 Benzonase가 첨가된 Native Lysis Buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0) 2.0 mL로 현탁시켜 흔들어 섞어주며 30분간 얼음에서 반응시킨 뒤, pH가 다른 Native Lysis Buffer 2.0 mL로 희석 시켜줌과 동시에 pH를 조절하여 13000 rpm에서 30 min 동안 원심분리 하였다. 원심분리 하여 분리된 상층액을 회수하여 활성 측정과 western blot 분석을 위하여 보관하였다.

2.5. 효소의 활성 측정

FDH-H의 활성 측정은 Reda et al. [11]에 의해 기술된 방법을 토대로 진행 되었다. 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM sodium formate 그리고 1 mM benzyl viologen dichloride의 반응용액 1 mL에 회수된 단백질 상등액 20 μ L를 넣고 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 578 nm에서 측정하였다. 활성 unit은 25°C의 반응용액에서 1분 동안 1 μ mol의 benzyl viologen을 환원시키는 양으로 정의 되었다.

2.6. Western Blot

전기영동을 위한 시료는 분리된 전체 단백질과 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)를 1:1로 혼합한 후 5분간 90°C로 열처리 하여 변성시켜 사용하였다. 전기영동은 10% SDS, 30% acrylamide mix (Bio-Rad), 10% ammonium persulfate

(Sigma-aldrich), 1.5 M Tris, TEMED를 혼합하여 제작한 SDS gel과 Tris glycine buffer를 이용하여 20 mA에서 90분간 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 western blot을 위하여 100 V에서 100분간 Nitrocellulose transfer membrane에 transfer 시켰다. Transfer된 membrane은 5% skim milk로 60분간 blocking 하고, 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS buffer로 15분에 걸쳐 3회의 세척과정을 거쳤다. 세척된 membrane은 1차 anti-His mouse monoclonal antibody를 5% skim milk로 1/1000로 희석하여 60분간 반응 시키고 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS buffer로 3회의 세척과정을 거쳤다. 세척 후 5% skim milk에 Alkaline Phosphatase가 융합된 2차 rabbit anti-Mouse IgG polyclonal antibody를 1/2000로 희석하여 다시 60분간 반응 시키고 동일한 세척과정을 거친 후 membrane을 1-Step™ NBT/BCIP (Bio-Rad)과 용액과 반응시켜 반응을 보인 밴드를 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

먼저 pH가 FDH-H의 활성과 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 활성 측정 용액의 pH를 5~8로 변화시켜주며 측정해본 결과 (Fig. 2), FDH-H가 pH 8에서 최고의 활성을 나타내며 pH가 낮아짐에 따라 활성 또한 급격하게 감소하는 것을 관찰하였다. 이어서 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동일한 샘플을 pH가 다른 Native Lysis Buffer에서 1시간을 보관해준 뒤 남아있는 활성을 비교했다. 실험 결과 Fig. 2에서 보듯이 pH 5.5에서 1시간 동안 보관한 FDH-H가 pH 8.0에서 보관한 FDH-H에 비해 2.4배 높은 활성을 유지하였다. 이는 높은 pH에서 FDH-H의 3차 단백질 구조가 망가져 그 활성을 잃는 것으로 판단되며, 이 실험 결과는 FDH-H가 pH 5~6.5 사이에서 안정하고, pH 7.5~9 사이에서 최고의 활성을 나타낸다는 이전에 보고된 결과와도 일치함이 확인되었다 [12].

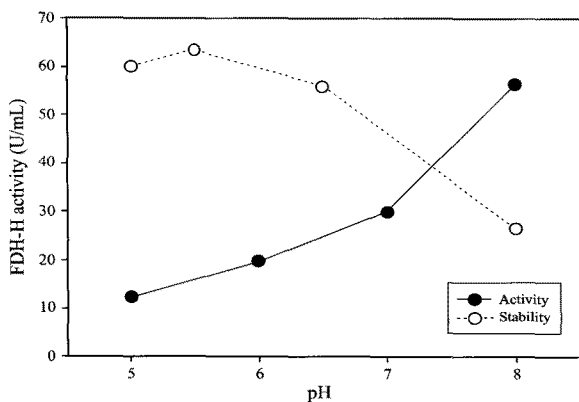


Fig. 2. Effect of pH on FDH-H catalytic activity and stability. Stability: each activity represents residual activity after 1 h storage at the indicated pH.

위의 결과를 통해 pH가 FDH-H의 활성과 안정성에 미치는 영향은 알 수 있었지만 그 발현량이 적어 발현을 유도해

줄 수 있는 조건들을 찾아 줄 필요가 있었다. 따라서 selenite와 formate의 투여량의 변화에 따른 발현 정도의 차이를 비교 해주었다. 균주 배양시 selenite의 투여 농도를 0 μM, 10 μM, 30 μM, 50 μM, 100 μM로 다르게 하여 활성을 비교해준 결과 selenite의 농도가 10 μM 일 때 활성이 1.2배 증가하였지만, 10 μM이상의 농도에서 발현해 주었을 때는 그 활성이 감소하였다 (Fig. 3). 이는 selenite가 SeCys의 합성 재료로써 혐기 FDH의 합성에 요구되지만 [13], 그 독성으로 인해 농도가 증가하면 저해제로 작용하기 때문인 것으로 판단된다 [14]. E. coli 발현 시스템을 통하여 FDH를 생산 할 때, formate는 FDH의 발현을 유도해 준다고 보고된 바 있다 [15,16]. 따라서 formate의 농도에 변화를 주어 효율적인 발현 조건을 잡아줄 필요가 있었다. Fig. 4는 selenite를 투여하지 않은 상태에서 formate의 농도를 0 mM, 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM로 변화를 주어 발현한 뒤 활성을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다. 10 mM의 농도의 formate에서 발현해 주었을 때 가장 높은 활성을 유지하였으며, 농도가 높아짐에 따라 활성이 점차 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 혐기조건에서 이미 상당량의 glucose가 formate로 전환되었기 때문에 이를 통하여 FDH-H가 발현된 것으로 추정된다. E. coli에서 TGA 종결코돈을 SeCys으로 해독 할 수 있도록 도와주는 유전자 selA, selB, selC 그리고 selD를 가진 pSUABC 플라스미드를 BW25113에 형질전환 뒤 발현하였다. western blot 발색 반응을 통하여 발현 정도를 비교하는 동시에 BW25113과 활성을 비교하였다. Western blot 발색 반응결과 FDH-H의 분자량 79 kDa과 동일한 72~95 kDa 위치에서 뚜렷한 밴드가 나타났으며 (Fig. 5) pSUABC 플라스미드의 동시발현을 통해 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으나 활성도의 증가는 미미 하였다 (Table 1).

Table 1. Effect of coexpression with pSUABC plasmid and optimized expression condition on the production of FDH-H in E. coli

	Wild type BW25113	Coexpression with pSUABC plasmid	Optimized condition*
Activity (U/mL)	48.5	56.4	125.3

*: Coexpression of pSUABC and supplemented with 10 M selenite and 10 mM formate.

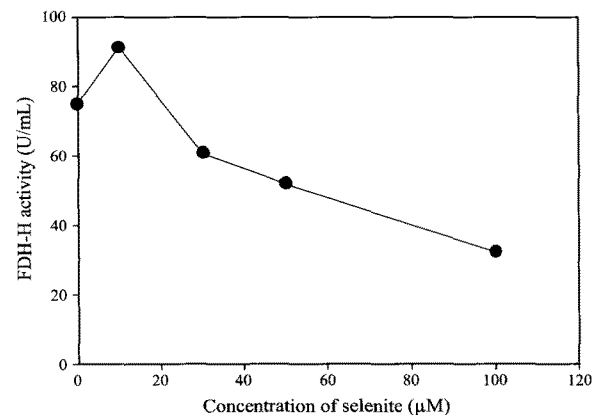


Fig. 3. Effect of selenite concentration on the activity of FDH-H.

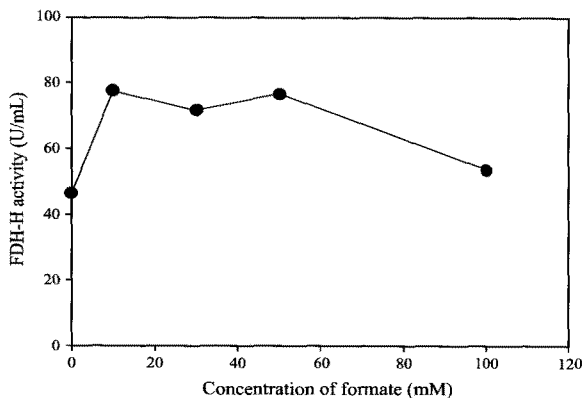


Fig. 4. Effect of formate concentration on the activity of FDH-H.



Fig. 5. Effect of coexpression with pSUABC plasmid. Western blotting of soluble fraction of FDH-H. Lane ① expression in pET22b (+) plasmid; Lane ② expression in pET22b (+) plasmid and coexpression with pSUABC plasmid

이를 통하여 *E. coli*에서의 FDH-H 발현의 limiting factor 가 TGA 종결코돈에 있지 아니하고 다른 요소에 있음을 알 수 있었다. 위의 결과를 종합하여 최적화된 발현 조건은 10 μ M selenite, 10 mM formate 그리고 pSUABC 플라스미드 동시 발현이라는 것으로 확인하였고, 최적화된 조건으로 발현 결과 FDH-H의 활성이 2.6배 증가한 것을 볼 수 있다 (Table 1).

감사

본 연구는 한국연구재단 (2009-0082832)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Böck, A., K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, and F. Zinoni (1991) Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol. Microbiol.* 5: 515-520.
- Zhang, Y., H. Romero, G. Salinas, and V. N. Gladyshev (2006) Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. *Genome Biol.* 7: R94.
- Sawers, G. (1991) The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 6: 57-88.
- Cox, J. C., E. S. Edwards, and J. A. Demoss (1981) Resolution of distinct selenium-containing formate dehydrogenases from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 145: 1317-1324.
- Gladyshev, V. N., S. V. Khangulov, M. J. Axley, and T. C. Stadtman (1994) Coordination of selenium to molybdenum in formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*. *PNAS* 91: 7708-7711.
- Mnatsakanyan, N., K. Bagramyan, and A. Trchounian (2004) Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate. *Cell Biochem. Biophys.* 41: 357-366.
- Zinoni, F., A. Birkmann, W. Leinfelder, and A. Böck (1987) Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. *PNAS* 84: 3156-3160.
- Raaismakers, H. C. and M. J. Romao (2006) Formate-reduced *E. coli* formate dehydrogenase H: the reinterpretation of the crystal structure suggests a new reaction mechanism. *J. Biol. Inorg. Chem.* 11: 849-854.
- Takahata, M., T. Tamura, K. Abe, H. Mihara, S. Kurokawa, Y. Yamamoto, R. Nakano, N. Esaki, and K. Inagaki (2008) Selenite assimilation into formate dehydrogenase H depends on thioredoxin reductase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 143: 467-473.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., pp. 6-31. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Reda, T., C. M. Plugge, N. J. Abram, and J. Hirst (2008) Reversible interconversion of carbon dioxide and formate by an electroactive enzyme. *PNAS* 105: 10654-10658.
- Axley, M. J., D. A. Grahame, and T. C. Stadtman (1990) *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase: purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* 265: 18213-18218.
- Shum, A. C. and J. C. Murphy (1972) Effects of selenium compounds on formate metabolism and coincidence of selenium-75 incorporation and formic dehydrogenase activity in cell-free preparations of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 110: 447-449.
- Wilber, C. G. (1980) Toxicology of selenium: a review. *Clin Toxicol.* 17: 171-230.
- Ruizherreria, J. and A. Alvarez (1972) A physiological study of formate dehydrogenase: formate oxidase and hydrogenlyase from *Escherichia coli* K-12. *Antonie van Leeuwenhoek* 38: 479-491.
- Pecher, A., F. Zinoni, C. Jatisatienr, R. Wirth, H. Hennecke, and A. Böck (1983) On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in *Enterobacteriaceae* *Arch. Microbiol.* 136: 131-136.
- Rossmann, R., G. Sawers, and A. Böck (1991) Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate and pH: definition of the formate regulon. *Mol. Microbiol.* 5: 2807-2814.