

2010년 2월
석사학위논문

활성이 개선된 알긴산 분해효소 (alyVI)
개발에 관한 연구

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

김 미 선

활성이 개선된 알긴산 분해효소 (alyVI)
개발에 관한 연구

Study on the development of improved alginate lyase (alyVI)

2010년 2월 25일

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

김 미 선

활성이 개선된 알긴산 분해효소 (alyVI)
개발에 관한 연구

지도교수 조 훈

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함




2009년 10월

조선대학교 대학원

첨단부품소재공학과

김 미 선

김미선의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	최 철 희	
위 원	조선대학교 교수	유 지 강	
위 원	조선대학교 교수	조 훈	

2009년 11월

조선대학교 대학원

CONTENTS

LIST OF FIGURES	III
LIST OF TABLES	V
ABSTRACT	VI
제 1 장 서론	1
제 2 장 본론	6
제 1 절 실험재료	6
1. 실험시약	6
가. <i>AlyVII</i> -GST fusion protein의 클로닝	6
나. 대장균에 의한 단백질 발현과 정제	6
다. <i>AlyVII</i> mutant 제작	6
2. 실험기구	7
가. GPC를 이용한 분자량 분석	7
제 2 절 실험방법	8
1. <i>AlyVII</i> -GST fusion protein의 클로닝	8
가. Ay221030-pGEX-4T-1 클로닝 plasmid 제작	8
나. Gene <i>alyVII</i> 의 pGEX-4T-1 vector로 도입	10
2. 대장균에 의한 단백질 발현과 정제	12
가. 단백질 발현과정	12
나. 단백질 정제	14
다. 단백질 정량	14
3. <i>AlyVII</i> 의 wild type으로부터 mutant 제작	15
4. 활성 측정 실험	19
가. TBA 활성 실험	19
나. TBA 발색 원리	19
5. Michaelis-Menten & Lineweaver-Burk kinetics	21

6. GPC를 이용한 alginate 분해 산물의 분자량 측정	23
제 3 절 실험결과	24
1. TBA를 이용한 mutant 활성측정 결과	24
가. Mutant D226A 의 활성 비교	24
나. Mutant H171A, K174A, K174E, K218A 및 K218E	28
다. Mutant L224V, D226A/F228G 및 L224V/D226G/F228G	30
라. Mutant H200A, N217A 및 N217D 활성 비교	32
2. GPC를 이용한 alginate 분해 산물의 분자량 측정	35
제 3 장 결 론	37
제 1 절 결 론	37
제 2 절 고 찰	41
Reference	42

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Types of alginate	3
Fig. 2. Ribbon structure of <i>alyVI</i> without signal peptide	4
Fig. 3. The nucleotide sequence of gene <i>alyVI</i>	5
Fig. 4. Full length type and N53-C338 type of alginate lyase, <i>alyVI</i> on 12% SDS-PAGE	9
Fig. 5. The result of assay test with full length and N53-C338 type of enzyme	11
Fig. 6. Procedure of cloning <i>alyVI</i> into pGEX-4T-1	11
Fig. 7. Function of IPTG to transcription of mRNA from DNA	13
Fig. 8. SDS-PAGE of Wild type, L224V/D226G, Y306F, F228G, K218E and K174A	16
Fig. 9. The principle of TBA assay	20
Fig. 10. Michaelis-Menten plot and Lineweaver-Burk plot	22
Fig. 11. Michaelis-Menten plot of mutants D226A, D226G, D226K, F228A F228D, F228G, F228K, F228L and L224V/D226G	26
Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of mutants D226A, D226G, D226K, and L224V/D226G	26
Fig. 13. Lineweaver-Burk plot of mutants F228A, F228D, F228G, F228K, and F228L	27
Fig. 14. Schematic view of the interactions of alginate with <i>alyVI</i>	27
Fig. 15. Michaelis-Menten plot of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E	29
Fig. 16. Lineweaver-Burk plot of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E	29
Fig. 17. Michaelis-Menten plot of mutants L224V, D226A/F228G and L224V/D226G/F228G	31

Fig. 18. Lineweaver-Burk plot of mutants L224V, D226A/F228G and L224V/D226G/F228G	31
Fig. 19. Michaelis-Menten plot of mutants H200A, N217D and Y306F	33
Fig. 20. Lineweaver-Burk plot of mutants H200A, N217D and Y306F	33
Fig. 21. Residues of <i>alyVI</i> in the mechanism of alginate degradation	34
Fig. 22. GPC data of alginate and its products degraded by the wild type of <i>alyVI</i> and mutant L224V/D226G	36
Fig. 23. Schematic representation of alginate degradation mechanism	39
Fig. 24. Relative activities (%) of each mutant from alginate	40

LIST OF TABLES

Table 1. Retention time of standard materials with different molecular weights	7
Table 2. Two types of PCR primer sequences about ay221030	8
Table 3. Concentration of alginate lyase mutants	16
Table 4. The primer sequence of <i>alyVI</i> mutants	17
Table 5. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants D226A, D226G, D226K, F228A, F228D, F228G, F228K, F228L and L224V/D226G	25
Table 6. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E	28
Table 7. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants L224V, D226/F228G and L224V/D226G/F228G	30
Table 8. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m value of mutants N217D and Y306F	32
Table 9. Comparison of average molecular weight between sodium alginate and its degraded products	35

ABSTRACT

Study on the development of improved alginate lyase (alyVI)

Kim Mi Sun

Advisor: Prof. Cho Hoon, Ph.D.

Department of Advanced Parts and Materials Engineering,

Graduate School Of Chosun University

Alginate is a gelling polysaccharide found in great abundance as part of the cell wall and intracellular material in the brown seaweeds. It is composed of three different types, homopolymeric G blocks, homopolymeric M blocks and heteropolymeric G/M blocks, which can be degraded through the β -elimination by alginate lyases.

Alginate appears to play a key role in the stabilization of biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and some other pseudomonas, with most *Pseudomonas* strains producing large amounts of extracellular alginates. Because of the high molecular mass and negative charge of bacterial alginate, the polysaccharide is highly hydrated and viscous. Alginates occupy the majority of the extracellular polymeric substance (exopolysaccharide; EPS) of mucoid *P. aeruginosa* and have been implicated in the development and maintenance of the mechanical stability of biofilms and prevents antibiotic uptake.

The gene of *alyVI* is encoded for the alginate lyase of marine bacterium *Vibrio*

sp.QY101. It was cloned by using PCR, sequenced and then expressed in *E. coli*. Through the assay test of alginate lyase, it was confirmed that 52 amino acids of *alyVI* in N-terminal region behaves as a signal peptide which leads the *alyVI* enzyme to outside of the plasma membrane in *E. coli*. Molecular weight of *alyVI* was 34 kDa after elimination of the signal peptide.

Several mutants of *alyVI* (W165A, W165D, W165G, W165R, H171F, H171A, K174E, K174A, K218E, K218H, K218A, L224V, D226G, D226K, D226A, D226L, F228A, F228G, F228L, F228D, F228K, Y306F, K308A, K308E, K308H, Y312F, Q314K, Q314H, L224V/D226G, D226A/F228G and L224V/D226G/F228G) were produced by using site-directed mutagenesis to achieve better activity of alginate lyase. Mutants were transformed, expressed as glutathione *S*-transferase (GST) fusion enzymes in *E. coli*, purified by using GSH-agarose affinity chromatography, and tested by thiobarbituric acid (TBA) assay.

It was shown that three residues in *alyVI*, His-200, Asn-217, and Tyr-306, are involved in the interaction with alginate. Mutants W165A, W165D, W165G, W165R, H171F, K218H, K308A, K308E, Y312F, K308H, Q314K and Q314H were found to be inactive. However, mutants L224V/D226G, F228G and D226A had higher activity than the wild type. Especially, the activity of L224V/D226G was increased nearly 2-fold. Therefore, improved mutants of *alyVI* will be valuable for the therapeutic management of cystic fibrosis patients.

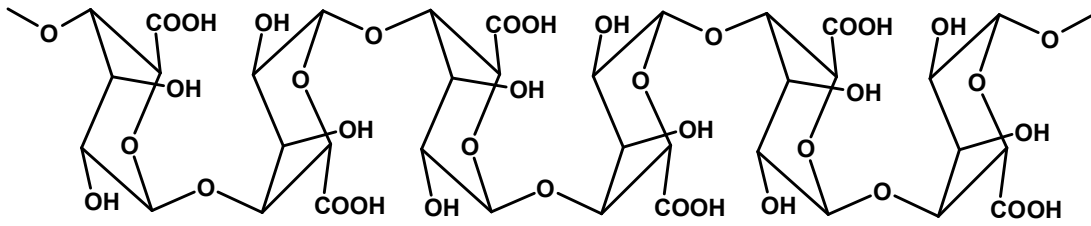
제 1 장 서 론

육상자원이 고갈되어가는 이 시점에서 전 세계적으로 주목 받고 있는 것은 바다이다. 그 중에서도 해조류 산업이 각광 받고 있는데, 각 중 정부 부처들이 해조류 산업과 관련된 연구소 및 기업들에 연구비를 더 많이 지원해 줄 정도로 해조류를 이용한 고부가 가치 산업이 이슈화 되고 있다. 해조류는 녹조류, 갈조류 및 홍조류로 나누어지는데, 갈조류 중 미역과 다시마, 홍조류인 김을 포함한 생산량이 매년 700 여만 톤으로 국내 수산물 규모의 약 25%를 차지하고 있어 식품가공 및 의약품 개발 등의 다양한 연구가 진행되고 있다. 그 중에서도 갈조류의 세포벽을 구성하고 있는 다당류인 알긴산의 이용 범위를 확대하기 위한 연구가 활발하다[33].

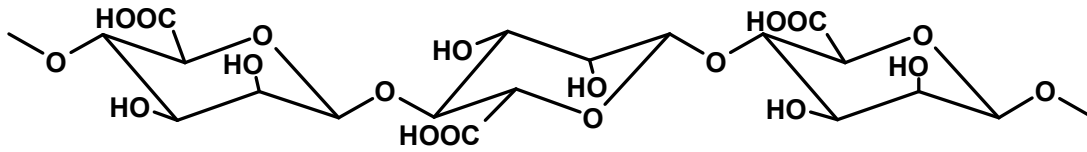
일반적으로 알긴산은 β -D-mannuronate (M type)와 C5 epimer인 α -L-guluronate (G type)형태이거나 M type과 G type이 적절히 포함된 heteropolymer (polymer MG) 형태로 구분할 수 있으며 겔 형성능력은 두 가지 다른 uronic acid 비율에 의해 결정되어진다[1-3]. 특이하게도 박테리아에 의해 유래된 알긴산은 위와 같은 해조류 알긴산과는 달리 β -D-mannuronate의 2번 또는 3번 위치에 O-acetylation이 되어있으며 대부분이 polymannuronate로 이루어져있다[4]. 알긴산은 칼슘 이온의 존재 하에서 형성되면, 안정제, 유화제 등으로써 식품, 화장품 및 의약품으로 사용 될 수 있으며, 고정화 담체로써 세포나 효소의 고정화에 이용되기도 한다[5]. 최근 일본 와세다 대학에서는, 알긴산의 불용성과 점성을 효율적으로 이용하여 나노 반창고를 만들어 병원에서 수술 후 봉합체로서 이용이 기대되는 물질을 만들었다고 한다<1>. 또한 콜레스테롤을 낮추고<2> 유해산소를 억제하는 기능 등이 밝혀지면서 건강식품으로서의 효과도 기대되고 있는 등 연구 범위가 다양하다. 그 중 한 분야로 알긴산 분해 효소에 관한 연구가 있는데 최근, 알긴산 분해산물인 올리고당이 갖는 여러 가지 기능이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산 분해 시, 당이 생성된다면 알코올을 만들어 낼 수도 있기 때문에 대체에너지 차원에서도 그 가치가 크다. 또한 인간의 질병 중, 유전적 질환으로 미국에서 발병률이 높은 낭포성 섬유증은 환자의 경우 *Pseudomonas aeruginosa* 균에 감염되면 *Pseudomonas aeruginosa*가 세포 외부에 알긴산을 분비하여 biofilm을 형성함으로써 항생제에 대해 내성을 갖게 되므로 치료가 힘들게 된다. 따라서 효율적으로 분리 정제된 alginate lyase는 낭포성 섬유증 치료를 위한 항생제 보조제로 활용될 수 있는 등 그 쓰임이 다양하다[6].

Alginate lyase는 갈조류[8-9], 연체동물[10-11], 해양으로부터 분리한 곰팡이[12], 세균[13-14] 등으로부터 정제하여 그 특성이 보고되어 있기도 하다. Alginate lyase는 작용하는 부위의 종류에 따라 β -D-mannuronate (mannuronate lyase)와 α -L-guluronate (guluronate lyase)[5] 두 가지를 모두 분해할 수 있는 hetero type이 있다. 약 40년 전에는 16가지의 alginate lyase를 encoding하는 gene이 발견되었는데 alyP [15], algL [16], alxM [17], A1-I [18], alyA [19-20], AlyI I [21], algL [22-23], alyL [24], alyVG1, alyVG2 and alyVG3 [25] 그리고 alyPEEC [26]이 있으며 이중 alyP, alxM, alyA, alyPG, alyVG1, alyVG2 및 alyVG3는 G type만을 선택적으로 분해하고[25] alyPEEC은 알긴산의 G type과 M type을 모두 분해하는 것으로 알려져 있다 [27].

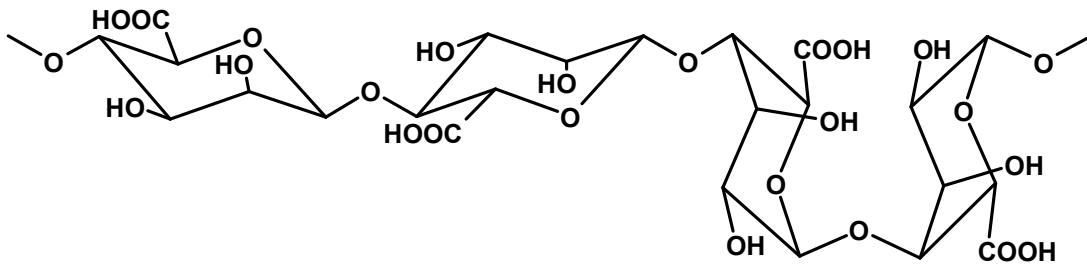
본 연구에서는 해양 미생물 중 *Vibrio* 종인 *QY101* 으로부터 추출된 alginate lyase를 encoding 하고 있는 유전자인 *alyVI* (Fig. 1)[28]를 바탕으로 site-directed mutagenesis 기술과 3D computational study를 이용해 분해 기전을 규명하고, alginate lyase의 활성을 증가시켜 alginate 분해를 효율적으로 유도하는 실험을 하였다. *QY101*에서 추출한 효소는 G type만을 분해하는 것과 hetero type이 있는데, 본 실험에 사용된 유전자는 G type만을 선택적으로 분해하는 효소이다. *AlyVI*의 338개 아미노산 중 약 52개 아미노산이 signal peptide임을[28] 바탕으로 활성증가를 위해 만들어진 32개의 mutant는 모두 52 아미노산이 제거된 상태로 클로닝 되었다.



Poly-α-L-Guluronate



Poly-β-D-Mannuronate



Poly-β-D-Mannuronate and Poly-α-L-Guluronate

Fig. 1. Types of alginate; poly β-D-mannuronate, poly α-L-guluronate, poly β-D-mannuronate and poly α-L-guluronate.

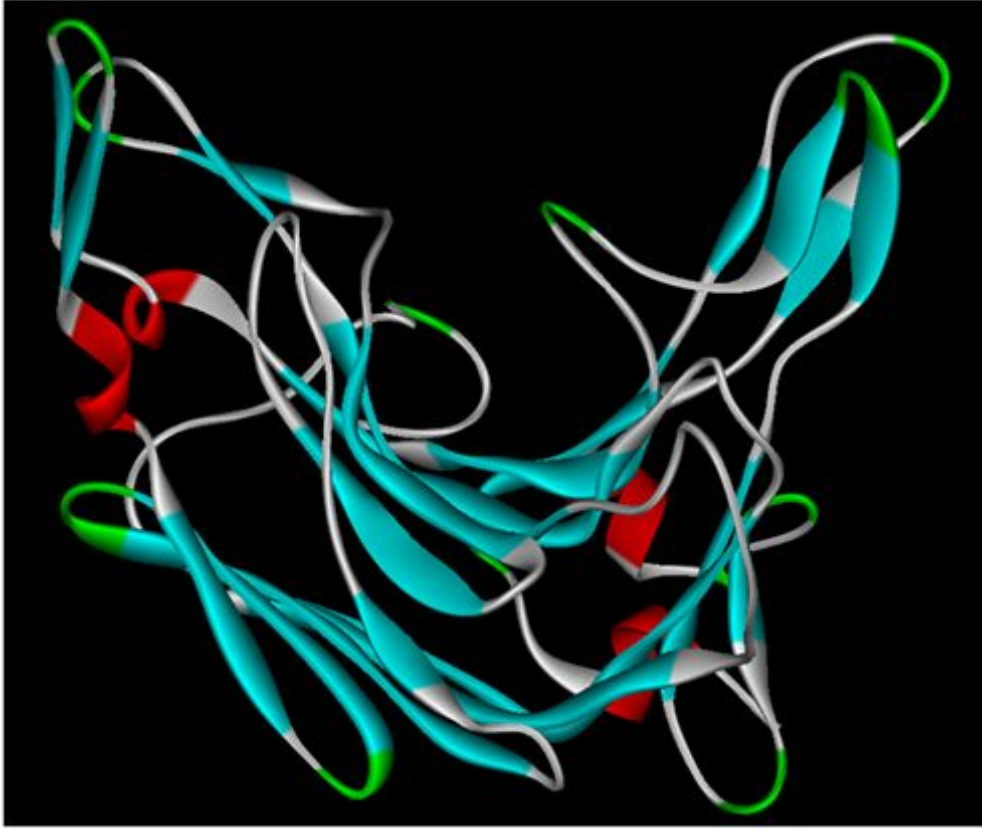


Fig. 2. Ribbon structure of *alyVI* without signal peptide.

1 tctaaattac gcttcccat cgaacatgca aaaggatttg catgatcgtt cagagaatca
61 ttactaagcc gtatacgaaa accaacctca ttgactctag ctctagctcc ataactagaa
121 aaattgtatt gagatgtgtt tttgggatcg gtagctcaaa gctctgtcaa caaaatgtaa
181 aaccgctcct tagcca**atga** aaacctcatg gtttatcgat aaagtttgct caccttttgt
241 attacaaatt atttttatgt tcaactatca acaaccttta aaatacctca aagttgctgc
301 gtttatctct agtggattat tactcgctgg ctgtgaagct aatgctaaaa gccaacaagc
361 agagcttaaa acatgcacag attgcaattg gaacatcgag caatggaaaa tcacccttcc
421 agttagtggg gacgattact acaacaatgg ccgtagcagc gcagccgagc tcattcccca
481 agaatgtaat ggtaaagagt acttaacca cgacactcat cttccttggg tctctcgtga
541 gtctgttaat ggccaagaac gctcaaaatt caccgttgat cttgggtggc aagtttcaac
601 tacagcaaac acaaaatagc ctcgttcggg acttcgtgaa ttgtataagt tcaataccga
661 aaatcgatgc agcactaaag accaaaactg ggcggttaaca gggacacatg aacttaaagc
721 gacagtgagc gttgatcagt tcccgaataa agacgtgaca ggcagtgacc caaaagtcgt
781 tctcggccaa attcattgga aagacattaa acaagcgcta gtgaaattgc agtgggatgg
841 tgaataaag ccggtacgtg ttgttctgaa cgattcattt ctaccaggaa acaaaatgtg
901 tagcgactgt cagccattca gtgtcaacct aggagtcgca cctgcaaacc tggattggga
961 ttacacgatt cgccctgatg agcaaggat ttaccittca acactcatta atgacgaatt
1021 atcagagcgc ttcttacctt gggcatcga aacagaagat cgtgatggta acaaggttac
1081 gttgtcaaaa gcatggttaa aggaagagta ctactttaaa gccggctttt acgcccfaat
1141 aaagccttca agagagtttg ctggtaagat attctcgggt agcttttcga agatcaatat
1201 tgatcataga **tag**agtgtca ccccatcagt tgtgtctaaa atcactactg atacttgaaa
1261 acggcgtgtg ggtatctcat ccatacgccg tttatcact gatacgcca cgacatcgca
1321 actcgctaag ttaaacttgc gttcaaatga cctcgctaa gcaagg

Fig. 3. The nucleotide sequence of gene *alyVI*, pubmed locus number ay221030.

제 2 장 본 론

제 1 절 실험재료

1. 실험시약

가. *AlyV*-GST fusion protein의 클로닝

GST vector인 pGEX-4T-1 (Amersham Co., USA) vector 내 삽입할 DNA 단편을 만들기 위한 PCR 과정 중 nPfu DNA polymerase (Biostream Co., Korea)를 사용하였다. Vector와 DNA 말단을 제한효소 EcoRI과 XhoI (TaKaRa Co., Japan)을 처리하여 T4 DNA ligase (Invitrogen Co., USA)를 넣고 vector와 DNA 단편을 연결하였다. 형질전환에 사용된 숙주로는 XL-10 gold ultra competent cell (Stratagene Co., USA)이고 plasmid 정제를 위해 Intron (Korea) 사의 DNA plasmid purification kit를 사용하였다.

나. 대장균에 의한 단백질 발현과 정제

대장균을 배양하기 위해 정제수 1 L당 LB broth (Difco Co., USA) 25 g을 넣은 배지를 만들어 사용하였다. 단백질을 만들어 내도록 작용하는 발현유도제로 Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside, IPTG (Sigma Co., USA)를 첨가하였고 단백질 정제를 위해 GE healthcare 사 (USA)의 GST 4B sepharose와 단백질 투석을 위한 dialysis tube (Spectra., USA)를 이용하였다.

다. *AlyV* mutant 제작

*AlyV*를 주형으로 하여 PCR 기술을 이용하여 mutant를 제작하는 과정 중 부위 directed mutagenesis kit (Stratagene Co., USA)를 이용하였다.

2. 실험기구

가. GPC를 이용한 분자량 분석

HPLC 장비로 시스템을 제어하는 SIMADZU (Japan)사의 SCL-10A, 용매를 pumping 하는 장치로 LC 6AD, 굴절률을 이용한 검출기로써 RID-10A, 오븐인 CTO-10A 그리고 시료 자동 주입기로 SIL-10ADvp 장치를 이용하였다. Column으로는 PSS (Polymer standard service., Germany)사의 분석용 GPC column을 사용하였는데 분자량을 최대 800 kDa까지 측정할 수 있다. 또한 Class-VP라는 프로그램을 사용하여 다시 GPC 데이터로 변환하는 과정 중 표준곡선을 만드는 데 사용한 시료로는 PSS사의 pulluran을 사용하였다. Table 1은 각기 다른 분자량을 갖고 있는 pulluran 물질의 분자량 대별 시간을 나타낸 것이다.

Table 1. Retention time of standard materials with different molecular weights

Molecular weight (Da)	Retention time (min)
788,000	20.062
112,000	22.997
11,800	26.172
342	32.045

제 2 절 실험방법

1. *AlyV*-GST fusion protein의 클로닝

가. Ay221030-pGEX-4T-1 클로닝 plasmid 제작

(1) PCR primer 제작

Vivrio 균종인 QY101에서 추출한 alginate lyase, *alyVI* cDNA를 이용하여 primer를 제작하였다. 그러나 *alyVI*는 signal peptide를 갖는 유전자임을 참고문헌 [28]에서 찾아 볼 수 있었다. 단백질 구조 분석 프로그램(Signal IP 3.0)을 이용하여 *alyVI*에 signal peptide의 존재여부와 어디에 있는지를 다시 확인 하였고 그 결과 약 52개 아미노산이 효소의 N말단 부근에 약 52개 아미노산의 signal peptide 서열을 갖고 있음을 알 수 있었다. 이를 증명하기 위한 실험으로 *alyVI*의 N말단에 완전한 아미노산을 갖고 있는 것과 N말단으로부터 52 아미노산을 제거한 DNA fragment를 각각 pGEX-4T-1에 클로닝 및 대장균에서 발현하여 단백질 분리 후 활성실험을 하였다. Fig 5에서 볼 수 있듯 막 밖으로 빠져나온 효소와 임의로 52 아미노산을 제거하여 만든 효소의 활성이 거의 비슷함을 확인하였다. 따라서 mutant를 만들기 위해 모든 primer 제작 시 개시코돈을 제외한 52 아미노산이 제거되도록 하였다. 5'말단과 3'말단에는 제한효소 부위(*Eco*R1, *Xho*I)를 삽입하였다.

Table 2. Two types of PCR primer sequences for ay221030

Type 1	Full length	Forward	5'-GTTGTTGAATTCAAAACCTCATGGTTTATCGAT-3'
		Reverse	5'-GGTGGTCTCGAGCTATCTATGATCAATATTGAT-3'
Type 2	N53-C338	Forward	5'-GTTGTTGAATTCGAACAAGCAGAGCTTAAACA-3'
		Reverse	5'-GGTGGTCTCGAGCTATCTATGATCAATATTGAT-3'

※ N53-C338, without signal peptide (52 amino acid)

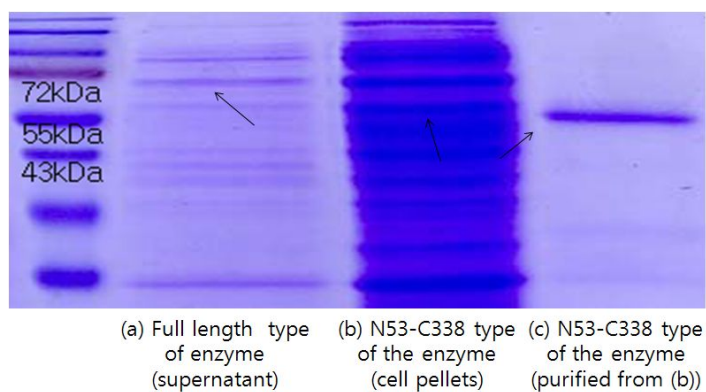


Fig. 4. Full length type and N53-C338 type of the alginate lyase, *alyVI* on 12% SDS-PAGE. Molecular weights of full length and N53-C338 of enzyme were 38.3 kDa and 32.5 kDa respectively calculated by using ExPaSy proteomics tools. Because that of GST is 25 kDa, bands of each enzymes were observed in 63 kDa and 57 kDa. (a) Full length type of enzyme was released from cells to culture medium (b) N53-C338 type of enzyme was obtained from supernatant (C) N53-C338 type of enzyme was purified from (b).

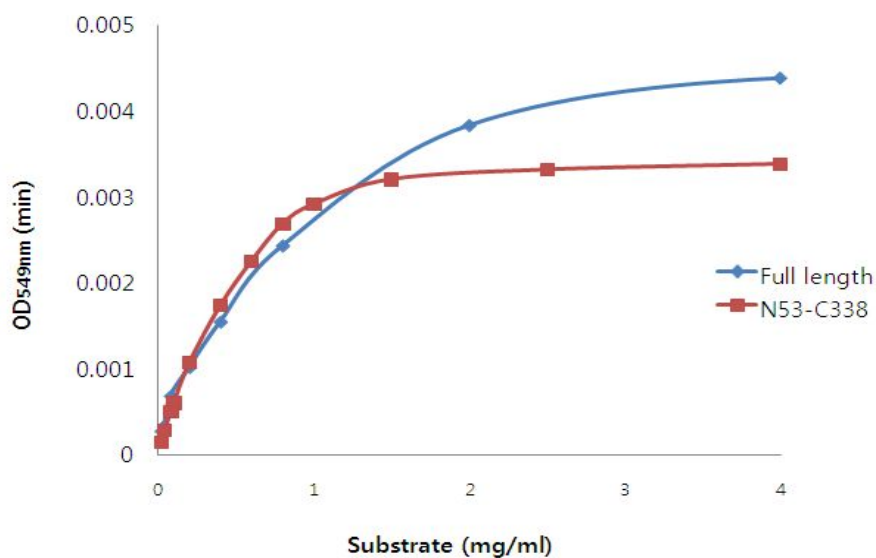


Fig. 5. The result of assay test with full length and N53-C338 type of *alyVI*.

나. Gene *alyVI*의 pGEX-4T-1 vector로 도입

앞서 언급하였던 것과 같이 signal peptide를 제거하기 위해 52개 아미노산이 제거되도록 제작한 PCR primer로 vector에 도입할 DNA 단편을 제작하였다. PCR 반응은 95°C에서 1 분 동안 변성, 55°C에서 30 초 동안 부착, 72°C에서 2 분 30 초 동안 신장하여 30 cycle 동안 반응시켰다. 다음으로 PCR purification kit를 이용하여 불순물을 제거하고, PCR 반응이 잘 이루어졌는지 확인하기 위해 1% agarose gel 상에서 약 5 µL를 전기영동 하여 800 bp 위치에서 band를 확인하였다. 그 후 vector와 같이 제한효소(*EcoRI*, *XhoI*)를 37°C에서 4시간 동안 처리한 후 gel purification 하여 20 µL로 추출하였다. 또한, 1 µL의 vector와 6 µL의 PCR 단편 그리고 2 µL의 5x ligation buffer와 T4 DNA ligase 1 µL를 처리 후 25°C에서 4시간 반응시켰다. XL-10 gold ultra-competent cell 50 µL에 5 µL의 클로닝 된 plasmid를 넣고 30 분간 얼음에서 반응시킨 후 42°C에서 30 초간 열 충격을 주어 형질전환 시키고 다시 2 분 동안 얼음에서 반응 시켰다. 그 다음 SOC배지(Terrific Broth) 250 µL를 넣고 37°C의 진탕 배양기에서 1 시간 반응시킨 뒤 암피실린이 첨가된 LB agar 배지에 모두 도말하였다. 37°C 배양기에 16~18 시간 보관하여 colony 형성을 확인하였다.

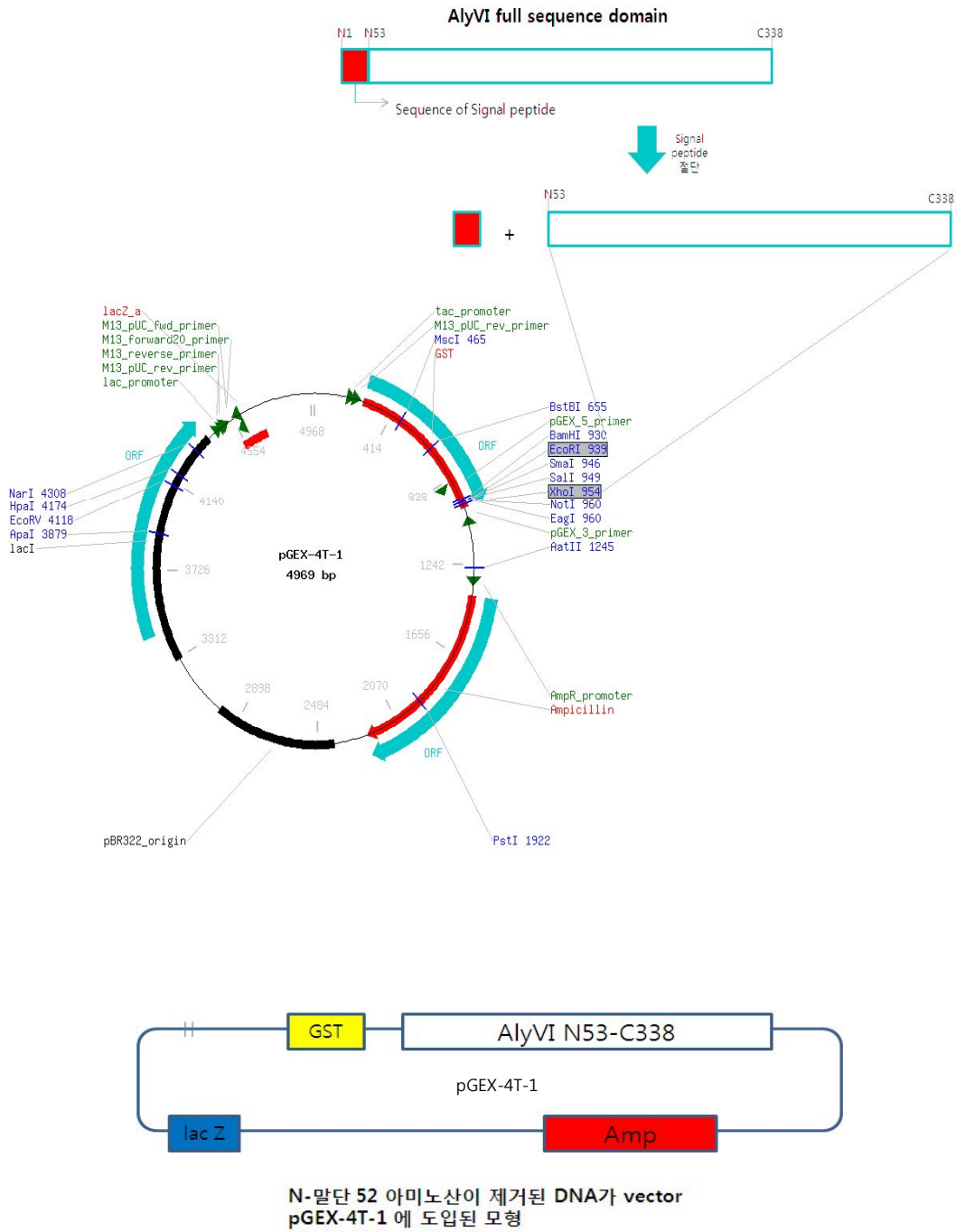


Fig. 6. Cloning procedure of alyVI into pGEX4T-1<3>.

2. 대장균에 의한 단백질 발현과 정제

가. 단백질 발현과정

배지로부터 얻은 colony를 분리하여 암피실린이 들어있는 5 mL LB 배지에 넣고 37°C 진탕 배양기에서 약 16 시간 동안 진탕 배양하여 colony 수를 증가시켰다. Colony의 농도가 600 nm에서 흡광도가 0.6~0.8이 되면 배양을 멈추고 6000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 바닥에 모인 cell pellet만 분리하기 위해 상층액을 제거한 후 DNA plasmid purification kit를 사용하여 plasmid를 정제하였다. 클로닝 성공 여부를 확인하기 위해 제한효소로 처리 후 전기영동 하여 vector와 DNA size를 확인한 뒤 서열을 확인하였다.

서열이 확인된 colony는 plasmid의 순도를 위해 다시 XL-10 gold competent cell에 형질전환 하여 colony를 만들고 다시 정제하여 얻어진 plasmid를 이용해 단백질 발현 균주로 대표적인 BL-21 competent cell에 형질전환 하여 colony를 생산하였다. 이렇게 얻어진 colony는 단백질을 대량으로 만들기 위해 암피실린이 포함된 3 L LB배지에서 넣고 600 nm에서 optical density가 0.6~0.8이 될 때까지 키운 뒤 IPTG가 1 mM 되도록 첨가하였다.

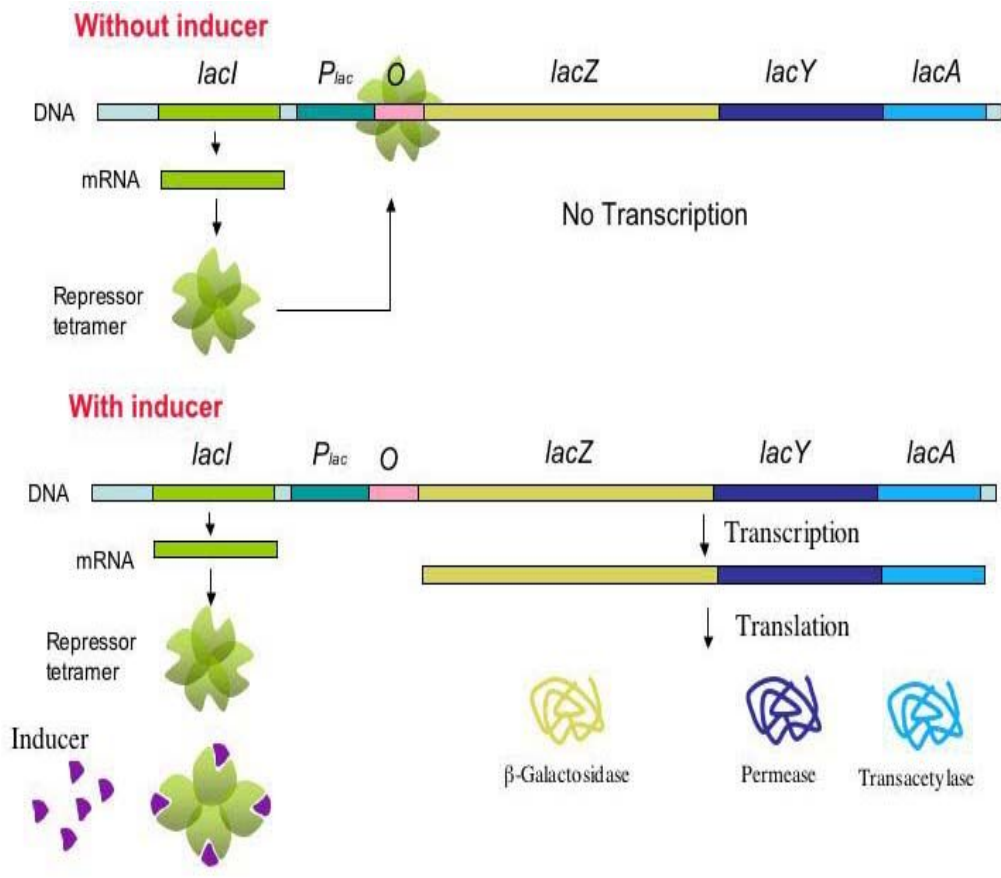


Fig. 7. Function of IPTG to transcription of mRNA from DNA. IPTG induces the transcription of the gene coding for beta-galactosidase, an enzyme that promotes lactose utilization, by binding and inhibiting the LacI repressor. In cloning experiments, the *lacZ* gene is replaced with the gene of interest and IPTG is then used to induce gene expression<4>.

나. 단백질 정제

단백질 발현 과정이 끝난 후 7000 g에서 20 분간 원심분리 하여 상층액은 제거하고, 가라앉은 cell pellet을 lysis buffer (1x PBS buffer; pH 7.4, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT 첨가) 100 mL에 잘 현탁시킨 후 1 회당 30 초 동안 sonication 하여 이를 6 회 정도 하였으며, 다시 8000 g에서 20 분 동안 원심분리 하여 enzyme을 분리했다. Cell이 분쇄되면서 나온 효소를 분리하기 위해 상층액만 수거하여 새 튜브에 옮긴다음, GST 4B sepharose 400 μ L를 넣고 4°C에서 12 시간 이상 binding시켰다. Beads를 수거하기 위해 2000 g에서 10 분 동안 원심분리 하였고 상층액을 먼저 여과한 뒤 beads를 column에 넣고 washing buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT 첨가)로 600 nm에서 흡광도가 0.01이 될 때까지 washing하였다. Washing이 끝난 beads에는 elution buffer (50 mM Tris-HCl buffer : pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1 mM DTT 및 10 mM reduced glutathione) 10 mL을 넣고 5 분 동안 상온에서 반응 시킨 뒤 단백질을 추출하였다. 정제 과정이 끝난 후 50,000 Mw 용 dialysis tube를 이용하여 투석함으로써 glutathione를 제거하였다.

다. 단백질 정량

정제 된 단백질의 농도를 측정하기 위해 Bradford법을[31] 이용하여 측정하였다. 우선 표준곡선을 만들기 위해 bovine serum albumin을 농도 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.3125 mg/mL 및 0.10625 mg/mL이 되도록 계산하여 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 희석한 뒤 20 μ L씩 만들고 96 well에 Bradford 용액 200 μ L를 분주한 후 표준시료와 정제된 단백질 2 μ L씩을 Bradford 용액이 담긴 well에 넣고 잘 섞어준 뒤 594 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선을 작성하여 시료들의 농도를 계산 한 결과 table 3과 같다.

3. *AlyVI*로부터 mutant 제작

52개 아미노산이 제거된 *alyVI*를 GST vector pGEX-4T-1에 삽입된 plasmid를 주형으로 point mutagenesis 기술을 이용하여 mutant 제작에 들어갔다. Mutant는 총 32개이며 유전자 *alyVI*를 기준으로 165, 171, 174, 200, 217, 218, 224, 226, 228, 306, 308 및 312번째 아미노산을 바꾸어 single point mutant, 2개 아미노산을 바꾼 mutant 3개 아미노산을 바꾼 mutant로 제작하였다. PCR 반응을 하기위해 10 ng/ μ L의 주형 3 μ L와 10 ng/ μ L의 primer 1.5씩 첨가하고 site-directed mutagenesis kit의 reaction buffer와 quick solution buffer, dNTP 및 pfu turbo polymerase를 첨가하여 부피를 50 μ L로 맞춘 후 95 $^{\circ}$ C에서 50 초 동안 변성, 60 $^{\circ}$ C에서 50 초 동안 부착, 68 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 신장하여 18 cycle 반응 시켰다. PCR 반응이 끝난 후 Dpn1 1 μ L를 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 처리하여 주형을 제거하였다. 반응이 종료된 2 μ L를 채취하여 ultra-competent cell 50 μ L와 2 μ L mercaptoethanol을 넣어 10 분 동안 반응시킨 후 얼음에서 30 분간 반응시키고 30 초간 42 $^{\circ}$ C에서 열충격을 주어 plasmid가 잘 들어갈 수 있도록 하였다. 얼음에서 2 분간 반응시킨 후 SOC배지 250 μ L를 넣어 37 $^{\circ}$ C 진탕 배양기에서 1 시간 동안 배양하였다. 250 μ L 모두를 암피실린이 들어있는 LB agar배지에 도말하여 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 16 시간 동안 배양하여 colony를 얻을 수 있었다. Colony를 다시 LB배지에 배양한 후 6,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 cell pellet을 모아 DNA plasmid purification을 통해 순도가 높고 많은 양의 mutant plasmid를 만들었다. 단백질 발현을 위해 이 plasmid를 다시 BL-21 competent cell에 형질전환 하여 colony를 배양하였다.

Table 3. Yields of wild type and mutants from 3L cultures

Enzyme	Concentration (mg/mL)	Enzyme	Concentration (mg/mL)
Wild type	0.162	F228A	0.280
H171A	0.205	F228D	0.477
K174A	0.365	F228G	0.261
K174E	0.284	F228K	0.135
K218A	0.430	F228L	0.285
K218E	0.584	Y306F	0.105
L224V	0.301	L224V/D226G	0.222
D226A	0.275	D226G/F228G	0.279
D226G	0.200	L224V/D226G/F228G	0.562
D226K	0.135		

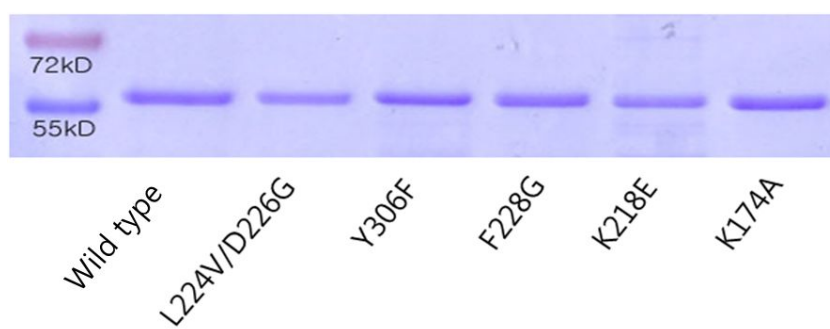


Fig. 8. SDS-PAGE of wild type, L224V/D226G, Y306F, F228G, K218E and K174A.

Purified 2 μ g of enzymes were loaded on 12% acrylamide gel.

Table 4. The primer sequences of *alyVI* mutants

Num.	Mutant	Primer type	Primer sequence
1	W165A	Forward	5'AAAGACCAAAAAC <u>CGCT</u> GCGGTAACAGGG3'
		Reverse	5'CCCGTGTACCGCAGCGT <u>TTTTGGTCTTT</u> 3'
2	W165D	Forward	5'AAAGACCAAAAAC <u>GACG</u> GCGGTAACAGGG3'
		Reverse	5'CCCGTGTACCGCGTCG <u>TTTTGGTCTTT</u> 3'
3	W165G	Forward	5'AAAGACCAAAAAC <u>GCGC</u> GCGGTAACAGGG3'
		Reverse	5'CCCGTGTACCGCGCCG <u>TTTTGGTCTTT</u> 3'
4	W165R	Forward	5'AAAGACCAAAAAC <u>CGCT</u> GCGGTAACAGGG3'
		Reverse	5'CCCGTGTACCGCCG <u>TGTTTTGGTCTTT</u> 3'
5	H171A	Forward	5'GTAACAGGGACAACGGA <u>ACTTAAAGCG</u> 3'
		Reverse	5'CGCTTTAAGTTCAGCTGTCCCTGTTAC3'
6	H171F	Forward	5'GTAACAGGGACATTTGA <u>ACTTAAAGCG</u> 3'
		Reverse	5'CGCTTTAAGTTCAAATGTCCCTGTTAC3'
7	K174A	Forward	5'ACACATGAACTTGCTGCGACAGTGAGC3'
		Reverse	5'GCTCACTGTGCGAGCAAGTTCATGTGT3'
8	K174E	Forward	5'ACACATGAACTTGAAGCGACAGTGAGC3'
		Reverse	5'GCTCACTGTGCTTCAAGTTCATGTGT3'
9	H200A	Forward	5'GGCCAAATTCATGAAGGTAAAGACATT3'
		Reverse	5'AATGTCTTTACCTTCATGAATTTGGCC3'
10	K218E	Forward	5'GATGGTGAAAATGCTCCGGTACGTGTT3'
		Reverse	5'AACACGTACCGGAGCATT <u>TTTCACCATC</u> 3'
11	K218A	Forward	5'GATGGTGAAAATGAACCGGTACGTGTT3'
		Reverse	5'AACACGTACCGGTTCA <u>TTTTCACCATC</u> 3'
12	N217D	Forward	5'TGGGATGGTGAAGATAAGCCGGTACGT3'
		Reverse	5'ACGTACCGGCTTATCTTCACCATCCCA3'
13	L224V	Forward	5'GTACGTGTTGTTGTCAACGATTCATTT3'
		Reverse	5'AAATGAATCGTTGACAACAACACGTAC3'
14	D226A	Forward	5'GTTGTTCTGAACGCTTCATTTCTACCA3'
		Reverse	5'TGGTAGAAATGAAGCGTTGACAACAAC3'
15	D226G	Forward	5'GTTGTTCTGAACGGTTCATTTCTACCA3'
		Reverse	5'TGGTAGAAATGAACCGTTGACAACAAC3'
16	D226K	Forward	5'GTTGTTCTGAACAAATCATTCTACCA3'
		Reverse	5'TGGTAGAAATGATTTGTTGACAACAAC3'
17	D226L	Forward	5'GTTGTTCTGAACCTGTCATTTCTACCA3'
		Reverse	5'TGGTAGAAATGACAGGTTGACAACAAC3'
18	F228A	Forward	5'CTGAACGATTCAGCTCTACCAGGAAAC3'

		Reverse	5'GTTTCCTGGTAGAGCTGAATCGTTCAG3'
19	F228D	Forward	5'CTGAACGATTCAGACCTACCAGGAAAC3'
		Reverse	5'GTTTCCTGGTAGGTCTGAATCGTTCAG3'
20	F228G	Forward	5'CTGAACGATTCAGGTCTACCAGGAAAC3'
		Reverse	5'GTTTCCTGGTAGACCTGAATCGTTCAG3'
21	F228K	Forward	5'CTGAACGATTCAAAACCTACCAGGAAAC3'
		Reverse	5'GTTTCCTGGTAGTTTTGAATCGTTCAG3'
22	F228L	Forward	5'CTGAACGATTCACTGCTACCAGGAAAC3'
		Reverse	5'GTTTCCTGGTAGCAGTGAATCGTTCAG3'
23	Y306F	Forward	5'AAGGAAGAGTACTTCTTTAAAGAAGGT3'
		Reverse	5'ACCGGCTTTAAAGAAGTACTCTTCCTT3'
24	K308A	Forward	5'GAGTACTACTTTGCTGCCGGTCTTTAC3'
		Reverse	5'GTAAAGACCGGCAGCAAAGTAGTACTC3'
25	K308E	Forward	5'GAGTACTACTTTGAAGCCGGTCTTTAC3'
		Reverse	5'GTAAAGACCGGCTTCAAAGTAGTACTC3'
26	K308H	Forward	5'GAGTACTACTTTGATGCCGGTCTTTAC3'
		Reverse	5'GTAAAGACCGGCATCAAAGTAGTACTC3'
27	Y312F	Forward	5'AAGGAAGAGTACTTCTTTAAAGAAGGT3'
		Reverse	5'ACCGGCTTTAAAGAAGTACTCTTCCTT3'
28	Q314K	Forward	5'GGTCTTTACGCCAAAATAAAGCCTTCA3'
		Reverse	5'TGAAGGCTTTATTTTGGCGTAAAGACC3'
29	Q314H	Forward	5'GGTCTTTACGCCAAAATAAAGCCTTCA3'
		Reverse	5'TGAAGGCTTTATTTTGGCGTAAAGACC3'
30	L224V/ D226G	Forward	5'GTTGTTGTCAACGGTTCATTT CTACCAGGAAACAAAATG3'
		Reverse	5'CATTTTGTTTCCTGGTAGACC TGAACCGTTAAAAACAAC3'
31	D226A/ F228G	Forward	5'GTTGTTCTGAACGCCTCAGGT CTACCAGGAAACAAAATG3'
		Reverse	5'CATTTTGTTTCCTGGTAGACC TGAGGCGTTCAGAACAAC3'
32	L224V/ D226G/ F228G	Forward	5'GTTGTTGTCAACGGTTCAGGT CTACCAGGAAACAAAATG3'
		Reverse	5'CATTTTGTTTCCTGGTAGACC TGAACCGTTGACAACAAC3'

※ The underlined bases indicate the bases that were changed.

4. 활성 측정 실험

가. Thiobarbituric acid (TBA) 활성 실험

효소의 양은 기질과의 반응액 500 μL 중 20 μg 이 사용되도록 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 정량하여 tris-HCl buffer (pH 8.0, 1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT)로 희석한 용액 250 μL 를 각 농도별 sodium alginate 250 μL 와 40°C에서 20 분 동안 반응시켰다. 기질의 농도는 0.02 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.8 mg/mL, 및 1 mg/mL로 정하여 측정하였다. 20 분이 끝나고 난 후 기질 효소 반응액 중 효소의 활성을 제거한 상태에서 TBA 값을 측정하기 위해 10 분 동안 100°C에서 가열하였고, 식힌 후 반응액 200 μL 만 분리하여 실험을 시작하였다. 반응액으로 0.125 N H_2SO_4 에 0.025 N의 HIO_4 이 섞여 있는 용매를 250 μL 넣고 상온에서 20 분간 반응시켰다. 그리고 0.5 N HCl과 2% sodium arsenite가 섞인 용매를 500 μL 넣고 잘 섞어서 2 분 동안 반응시킨 후 0.3% TBA시약 2 mL을 첨가하여 10 분 동안 100°C 수조에서 가열하였더니 붉은색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 정확한 값으로 측정하기 위해 549 nm에서 흡광도를 측정하였다[31].

나. TBA 발색 원리

TBA 실험은 원래 유지의 산패도를 측정하는 방법 중 하나로 화학물질에 의한 유지의 불포화 결합에서 반응이 일어나 최종적으로 생성되는 malonaldehyde와 TBA 시약이 2:1 반응으로 반응하여 붉은색의 복합체를 형성하는 원리를 이용한 것이다. 이러한 불포 결합은 alginate 분해효소에 의해 분해된 alginate 분해 산물로서 생성되는 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepyranosyluronate에도 존재하므로 Fig 9와 같이 분해산물을 HIO_4 로 전처리 후 TBA와 반응시키면 이 당이 얼마나 생성되는가를 측정함으로써 각 효소의 활성도를 측정할 수 있다.

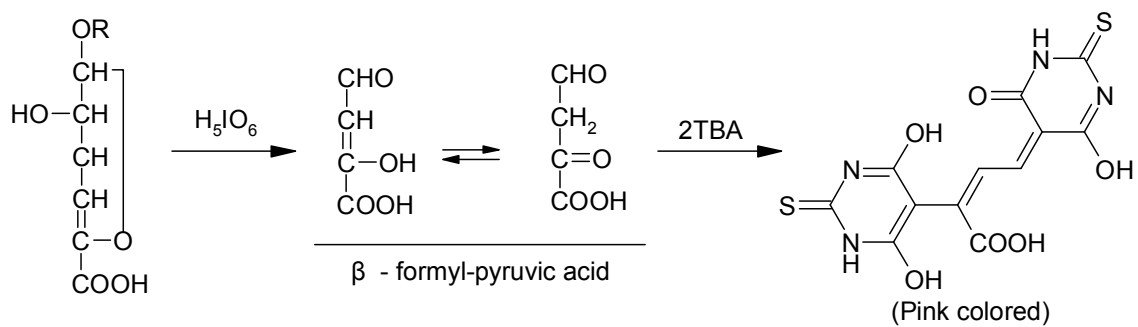
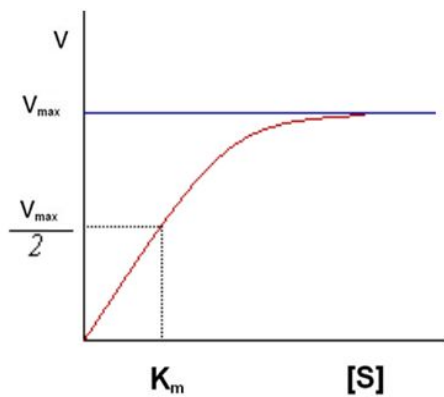


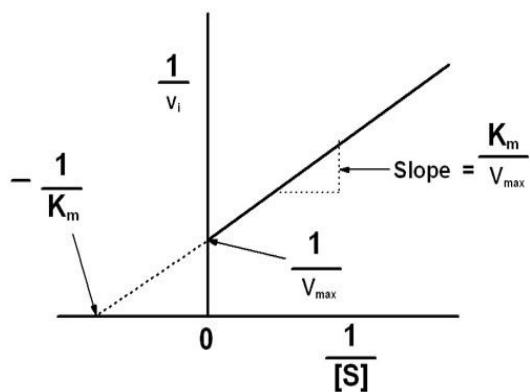
Fig. 9. The principle of TBA assay.

5. Michaelis-Menten & Lineweaver-Burk kinetics

TBA 실험에서 얻은 결과값을 바탕으로 Michaelis-Menten plot 과 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하였다. K_m 값은 기질에 대한 효소의 친화력을 나타내는 것으로 K_m 값이 클수록 활성이 약하여 기질과의 결합력이 약한 것이고 K_m 값이 작을수록 기질과의 결합력이 강한 것이다. 반면 K_{cat} 값은 대사 회전수라 하여 단위시간 당 기질이 분해산물로 바뀌는 수를 말하는데 K_{cat} 값은 주로 V_{max} 값을 단위시간으로 나누어 준다. 또한 K_{cat} 값이 클수록 분해산물이 많고 이는 효소의 활성이 높다는 의미를 갖는다. 즉 효소는 K_m 값이 작을수록 K_{cat} 값은 클수록 활성이 높아지는데 그 결과 K_{cat} 값을 K_m 값으로 나눈 K_{cat}/K_m 값은 효소에 대한 활성도라 정의 될 수 있고 여러 효소들의 활성 비교가 가능하다. 이 실험에서는 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하기 위해 Michaelis-Menten plot을 구한 뒤 이를 x축과 y축 값에 역수를 취하여 도시한 Lineweaver-Burk plot을 이용하였다. 또한, Lineweaver-Burk plot에서 R^2 값이 0.99이상 이 되도록 그리고 그에 대한 방정식을 이용해 K_m 값과 K_{cat} 값을 구하였다. 특히 K_{cat} 값은 효소 1 μg 이 단위시간 1 분 동안 분해산물을 얼마나 낼 수 있는 지로 정의하기 위해 반응에 사용되었던 효소 총량인 20 μg 과 반응시간 20 분을 나누어 주어 구하였다.



Michaelis-Menten plot



Lineweaver-Burk plot

Fig. 10. Michaelis – Menten plot and Lineweaver–Burk plot. K_m is the Michaelis – Menten constant, V_{\max} is the maximum reaction velocity, and $[S]$ is the substrate concentration.

6. GPC를 이용한 alginate 분해 산물의 분자량 측정

직접적으로 alginate lyase에 의해 분해된 alginate 분해 산물의 분자량 분포도의 변화를 확인하기 위해 Gel performance chromatography (GPC) column을 이용한 분자량 측정 실험에 들어갔다. 먼저 HPLC에 column을 장착하지 않은 상태에서 0.05% buffer로 washing하였고 GPC 분석용 column을 장착한 뒤 0.1 mmHg에서 유속이 1 mL/min이 되도록 하고 다시 1 시간 반 동안 흘려준 뒤 용매를 순수여과 물로 바꾼 후 2 시간 동안 흘려주어 기기를 안정화 시켰다. Sample 측정 시 유속은 1 mL/min으로 하였고, 굴절률을 이용하여 분자량 크기를 분리하는 검출기를 사용하였다. 그리고 표준시료로서 pulluran을 사용하였고 분자량 대가 380,000 Da, 459,000 Da 및 5,600 Da 인 각각의 pulluran을 분석하여 표준곡선을 작성하였다. 시료는 alginate와 wild type 효소로 분해된 물질 그리고 mutant 중 가장 활성이 좋은 L224V/D226G 효소로 분해된 물질을 각각 1.0~1.5 g/L로 하여 100 μ L씩 흘려주어 측정하였다.

효소로 분해된 sample을 만들기 위해서, signal peptide를 제거하지 않은 상태에서 단백질이 *E. coli* 세포 안에서 발현 될 때 signal peptide에 의해 세포막 밖으로 빠져나올 수 있도록 하였다. 따라서 *alyVI*가 형질전환 되어있는 대장균을 키운 후 7,000 rpm에서 원심분리를 하여 *E. coli*를 pellet으로 분리하고 상층액에 있는 단백질을 효소액으로 사용하였다. 이 상층액 1 L에 sodium alginate 100 g 넣고 37°C에서 하루 동안 교반 시킨 후 100% 알코올 1 L를 넣으면 침전물을 형성하는데 이것을 감압 증류하여 걸러낸 다음 40°C 오븐에서 건조시키고 남은 용매도 수거하여 동결건조 시켰다. 각각의 sample들을 2 g/L로 정량한 후 주사기 필터로 여과한 다음 HPLC autosampler 용 유리병에 담아 분석을 하였다.

제 3 절 실험결과

1. TBA를 이용한 mutant 활성측정 결과

가. Mutants D226A, D226G, D226K, F228A, F228D, F228G, F228K, F228L 및 L224V/D226G 활성 비교

알긴산 분해효소를 encoding 하고 있는 유전자 *alyVI*의 226번째 아미노산인 aspartic acid를 각각 glycine, alanine 및 lysine 등의 다른 아미노산으로 바뀐 mutant D226G, L224V/D226G, D226A 및 D226K의 활성 실험 결과는 Table 5와 같았다.

Wild type 과 비교해 볼 때 D226G는 K_m 값과 K_{cat} 값이 wild type의 그것과 다르지만 K_{cat}/K_m 값은 같았기 때문에 활성에 큰 변화가 없음을 확인하였다. 특히 L224V/D226G는 224번째의 아미노산인 leucine을 valine으로 바꾸어 줌과 동시에 226번째의 아미노산이 glycine으로 바뀐 것이었는데 K_{cat}/K_m 값을 비교해 볼 때 wild type 보다 활성이 약 2배 더 좋다는 것을 알 수 있었다. 또한 226번째 아미노산이 alanine으로 바뀐 경우에는 활성이 다소 떨어졌고, alanine으로 바꾼 경우는 수치가 증가했으나 미미하였다.

또한, 228번째 아미노산인 phenyl alanine을 각각 lysine, glycine, alanine, aspartic acid 및 leucine와 같은 다른 아미노산으로 바뀐 mutant F228K, F228G, F228A, F228D 및 F228L의 활성실험 결과 wild type과 비교해 볼 때 phenyl alanine을 중성 아미노산으로 바꿔 주었던 mutant F228G와 F228A를 제외한 나머지 mutant들은 K_{cat}/K_m 값이 떨어지는 경향을 보였으며 K_m 과 K_{cat} 값 모두 wild type에 비해 효소의 활성을 감소시키는 경향을 보였다. 차이는 약하지만 F228G의 경우는 증가하였으며 Michaelis-Menten plot에 나타난 곡선에서도 그 차이를 볼 수 있었다. 그러나 F228A의 경우에는 K_{cat} 값이 특히 감소하면서 F228G보다 K_{cat}/K_m 값이 떨어졌고 wild type과 비슷한 활성을 갖고 있는 것을 확인하였다.

Table 5. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants D226A, D226G, D226K, F228A, F228D, F228G, F228K, F228L and L224V/D226G

Enzyme	K_m (mg/mL)	K_{cat}	K_{cat}	Relative ratio
Wild type	0.448	3.14	7.01	1.00
D226A	0.535	5.97	11.16	1.59
D226G	0.433	3.32	7.67	1.09
D226K	0.396	3.04	7.68	1.10
F228A	0.403	2.88	7.15	1.02
F228D	0.259	0.92	3.57	0.57
F228G	0.453	4.60	10.15	1.45
F228K	0.463	1.84	3.97	0.57
F228L	0.404	0.31	0.78	0.11
L224V/D226G	0.543	7.50	13.81	1.97

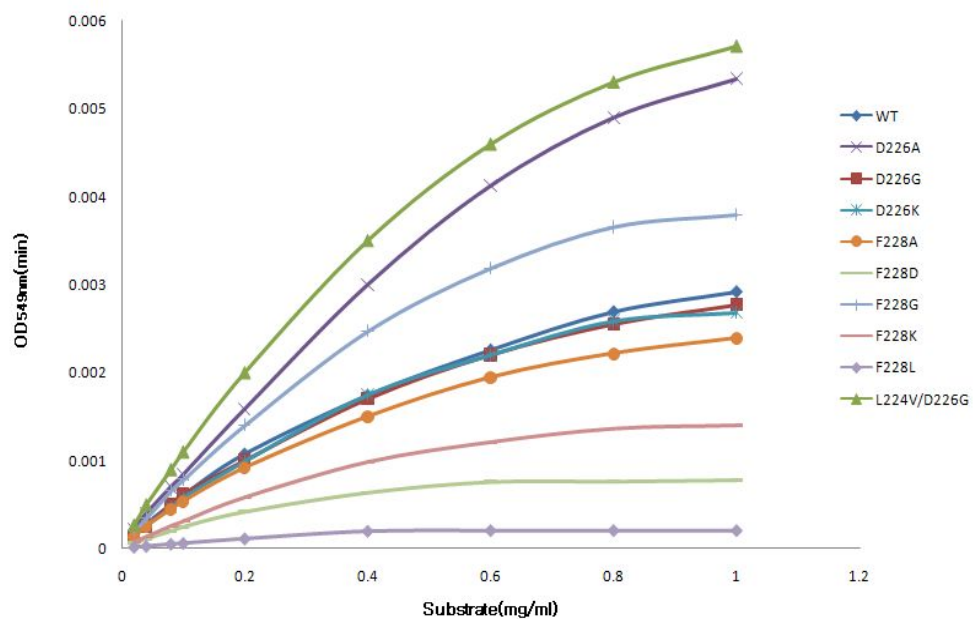


Fig. 11. Michaelis-Menten plot of mutants D226A, D226G, D226K, F228A, F228D, F228G, F228K, F228L and L224V/D226G.

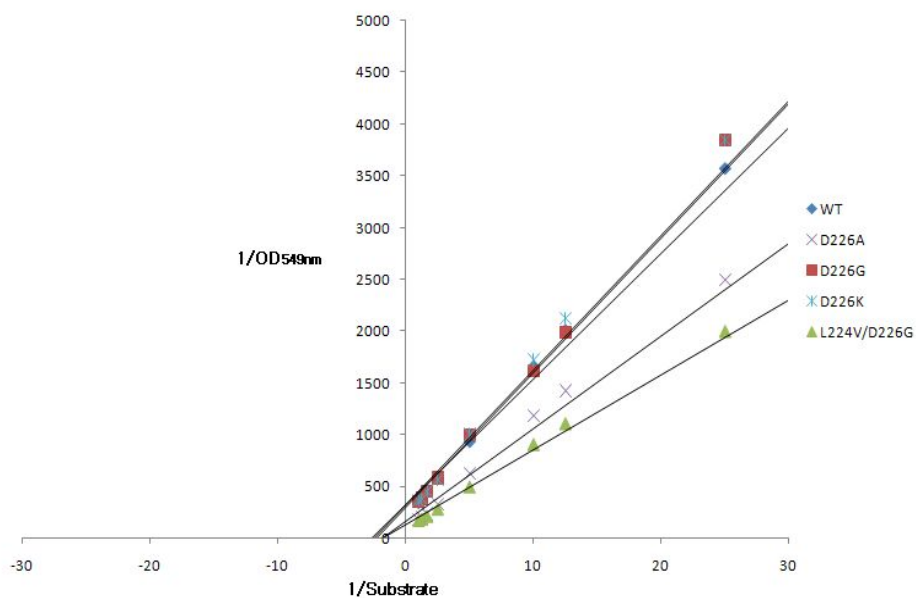


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of mutants D226A, D226G, D226K and L224V/D226G.

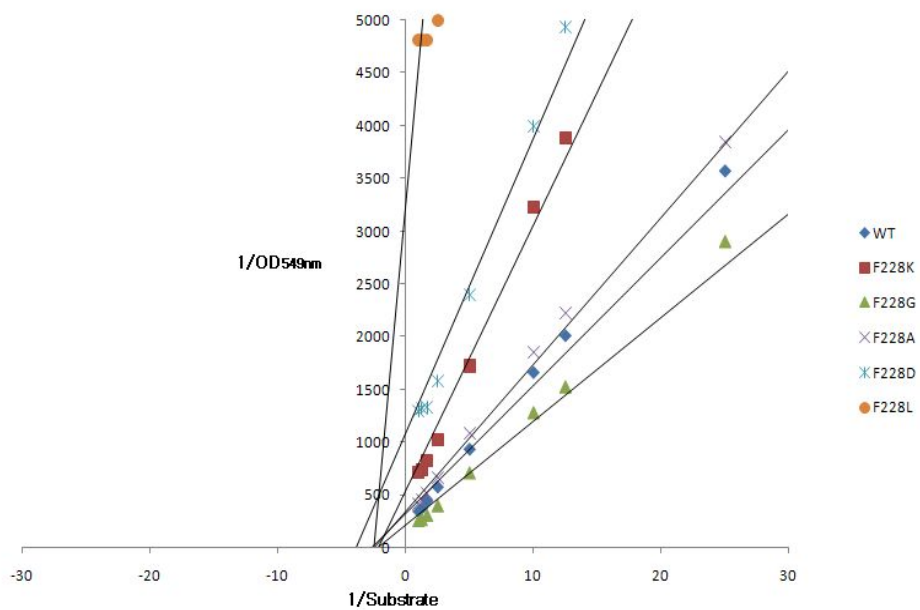


Fig. 13. Lineweaver-Burk plot of mutants F228A, F228D, F228G, F228K and F228L.

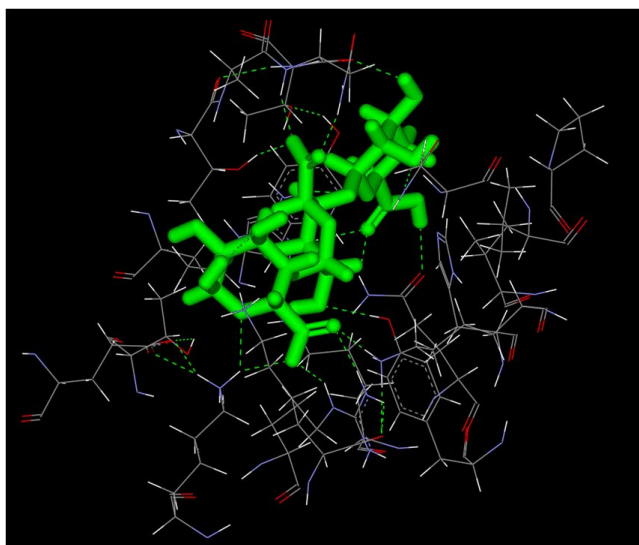


Fig. 14. Schematic view of the interactions of alginate with alyVI.

나. Mutants H171A, K174A, K174E, K218A 및 K218E 활성비교

알긴산 분해효소를 encoding 하고 있는 유전자 *alyVI*의 174번째 아미노산인 lysine을 각각 alanine 그리고 glutamic acid와 같은 다른 아미노산으로 바꿔준 mutant K174A, K174E의 활성 실험 결과는 Table 6과 같았다.

Wild type과 비교해 볼 때 양전하를 갖는 아미노산인 lysine을 중성 아미노산인 alanine으로 바꿔 주었던 mutant K174A의 활성이 1/2 정도로 떨어졌으며 음전하를 갖는 아미노산인 glutamic acid로 바꿔준 mutant K174E 역시 활성이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 한편 218번째 아미노산인 lysine을 각각 alanine 및 glutamic acid와 같은 다른 아미노산으로 바꿔준 mutant K218A와 K218E의 활성 test 결과는 wild type과 비교해 볼 때 양전하를 갖는 아미노산인 lysine을 중성 아미노산인 alanine으로 바꿔 주었던 mutant K218A의 경우 활성이 떨어졌지만 음전하를 갖는 아미노산인 glutamic acid로 바꿔준 K218A의 경우 mutant K174A에서 활성이 현저히 떨어졌기 때문에 K218A의 경우도 떨어질 것이라 예측 되었지만 활성에 큰 변화가 없음을 보였다.

또한 분해 기작으로 작용할 수 있는 171번째 histidine을 alanine으로 바꾸어준 경우 활성은 현저히 감소되었음을 확인하였다.

Table 6. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E

Enzyme	K_m (mg/mL)	K_{cat}	K_{cat}	Relative ratio
Wild type	0.448	3.14	7.01	1.00
H171A	0.491	0.63	1.28	0.18
K174A	0.414	1.68	4.06	0.58
K174E	0.287	0.32	1.11	0.16
K218A	0.374	2.34	6.26	0.89
K218E	0.34	2.68	7.88	1.12

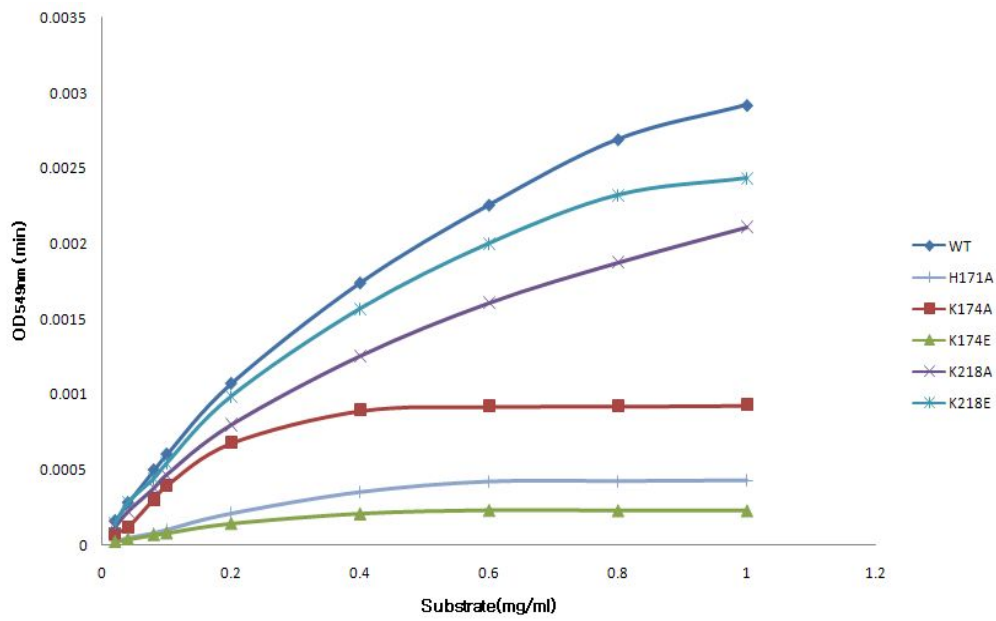


Fig. 15. Michaelis-Menten plot of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E.

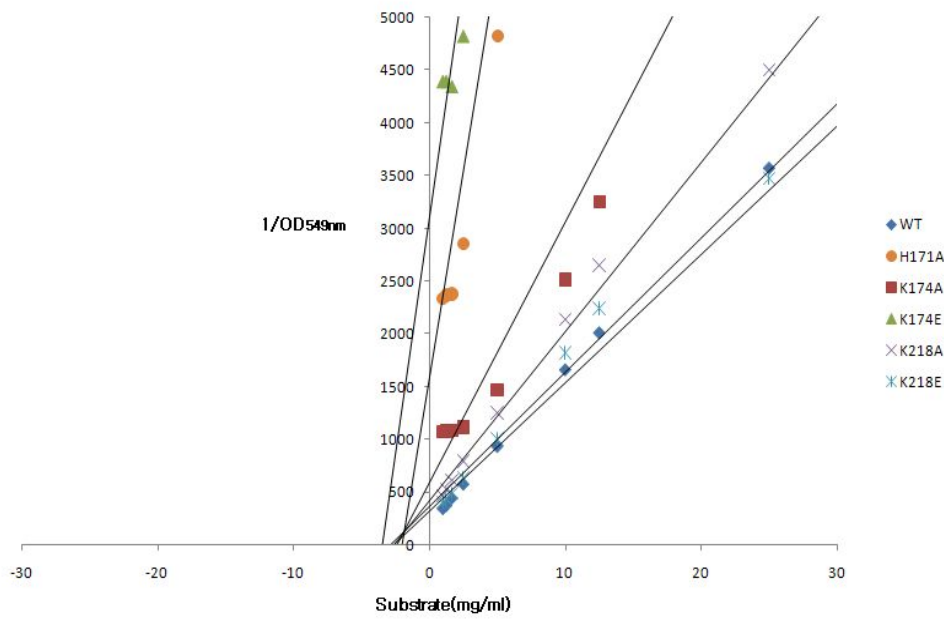


Fig. 16. Lineweaver-Burk plot of mutants H171A, K174A, K174E, K218A and K218E.

다. Mutants L224V, D226A/F228G 및 L224V/D226G/F228G 활성 비교

이전의 실험결과를 바탕으로 wild type 보다 활성이 좋았던 mutant는 L224V/D226G 였기 때문에 224번만 바꾼 mutant, L224V/D226G에 228번 mutant 중 활성이 가장 좋았던 F228G를 접목시킨 mutant, 그리고 226번의 single mutant 중 활성이 가장 높았던 D226A와 228번 mutant들 중 가장 활성이 높았던 F228G를 접목시킨 mutant를 만들어 활성을 비교해 보았다. 그 결과 만들어진 mutant는 L224V, D226A/F228G 및 L224V/D226G/F228G였고 활성 test 결과는 Table 7과 같았다.

Mutant 모두 wild type과 비슷한 활성도를 갖는 것으로 확인됐다. L224V/D226G/F228G는 K_m 값과 K_{cat} 값이 wild type의 것과 다르지만 K_{cat}/K_m 값은 같았기 때문에 활성에 큰 변화가 없음을 확인하였다. 단지 주목할 만한 특징은 3개의 mutant 모두 wild type에 비해 K_m 값이 낮아 기질과의 친화력이 더 좋았지만 K_{cat} 값이 작아 상쇄 되어 wild type의 K_{cat}/K_m 값과 별 차이가 없거나 다소 떨어지고 있다는 것이었다.

Table 7. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants L224V, D226/F228G and L224V/D226G/F228G

Enzyme	K_m (mg/mL)	K_{cat}	K_{cat}	Relative ratio
Wild type	0.448	3.14	7.01	1.00
L224V	0.431	3.19	7.40	1.06
D226A/F228G	0.414	2.82	6.81	0.97
L224V/D226G/F228G	0.432	3.1	7.10	1.02

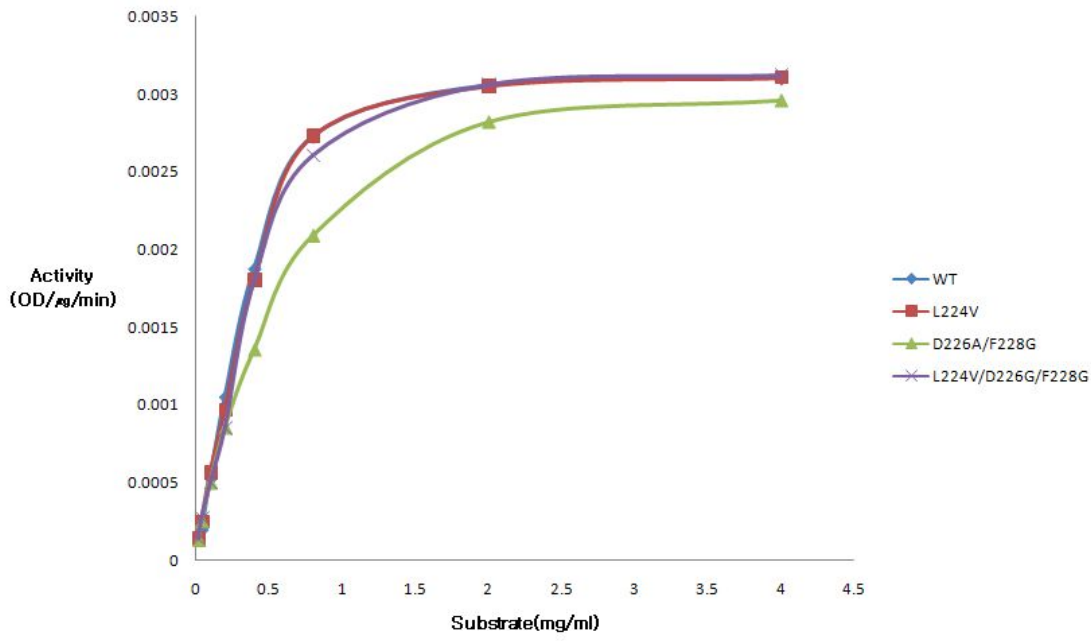


Fig. 17. Michaelis-Menten plot of mutant L224V, D226A/F228G and L224V/D226G/F228G.

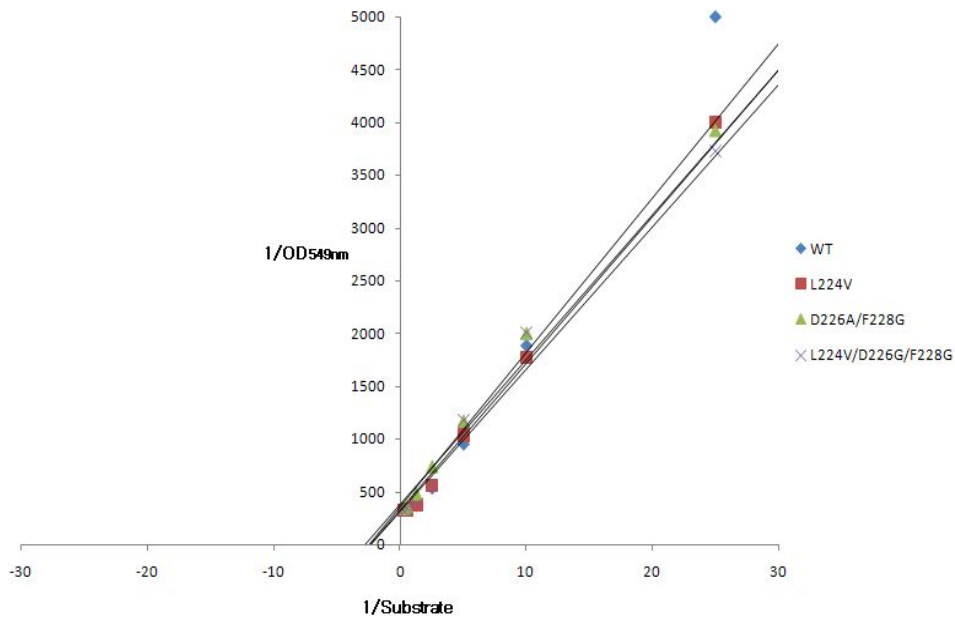


Fig. 18. Lineweaver-Burk plot of mutant L224V, D226A/F228G and L224V/D226G/F228G.

라. Mutants H200A, N217A 및 N217D 활성 비교

미국 Kentucky 약학대학에서 3D computational study를 통해 만들어진 *alyVI* 효소의 3D model을 바탕으로 200번째 아미노산인 histidine과 217번째 아미노산인 asparagine 그리고 306번째 아미노산인 tyrosine이 alginate 분해 mechanism에 관련되어 있는 것으로 나타났다.

따라서 본 실험 중 이 아미노산의 작용기의 역할을 완전히 제거하기 위해 다른 아미노산들로 바꾸었다. 그 결과 306번째 아미노산인 tyrosine을 각각 phenylalanine으로 바꿔 준 Y306F와 200번째 histidine을 alanine으로 바꾼 H200A 그리고 aspartic acid를 alanine으로 바꾸어준 N217A의 활성이 모두 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히 tyrosine의 벤젠고리에 붙은 OH기가 제거된 형태가 phenylalanine 형태임을 봤을 때 벤젠고리에 붙은 OH기의 활성에 대한 기능을 짐작해 볼 수 있었다. Histidine 또한 비공유 전자쌍을 갖는 아미노기와 상호작용이 클 것이라 예측할 수 있었다.

H200A와 N217A의 활성도가 table 7에서 나타나지 않은 것은 이들의 활성이 완전히 없었기 때문에 kinetic 값을 계산할 수 없기 때문이었다. 예상대로라면 Y306F 역시 활성은 완전히 없어져야 했지만 활성이 있음을 보였는데 이는 *alyVI*가 M type과 G type을 모두 분해하므로 두 가지 작용 mechanism을 갖고 있기 때문일 것으로 판단된다(Fig. 21). 또한 217번째 asparagine을 구조가 비슷하지만 산소를 한 개 더 갖고 있는 aspartic acid로 바꾸어 준 경우 활성은 감소하지 않았다. 이러한 사실로서 217번째의 활성은 아미노산의 음전하 분포가 분해 mechanism에 중요한 역할을 하고 있음을 뒷받침 해주었다. 특히 K_m 값을 비교해 볼 때 기질과의 친화력은 다소 떨어지는 것을 보였지만, K_{cat} 값이 떨어지므로써 K_{cat}/K_m 값을 보완하였다는 것을 알 수 있었다.

Table 8. K_m , K_{cat} and K_{cat}/K_m values of mutants N217D and Y306F

Enzyme	K_m (mg/mL)	K_{cat}	K_{cat}	Relative ratio
Wild type	0.448	3.140	7.01	1.00
N217D	0.526	3.959	7.50	1.07
Y306F	0.759	1.390	1.83	0.26

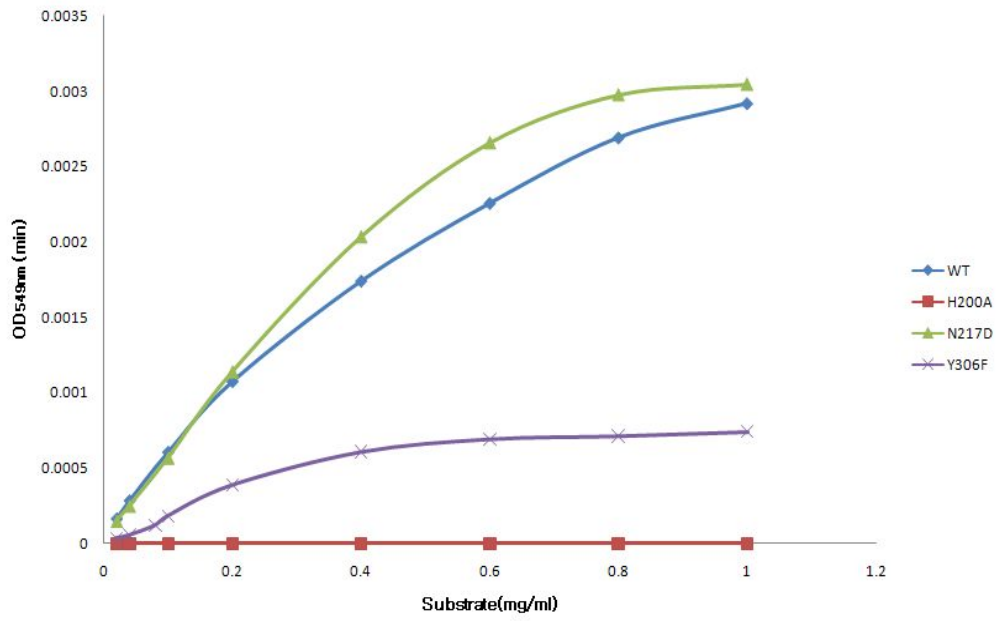


Fig. 19. Michaelis-Menten plot of mutants H200A, N217D and Y306F.

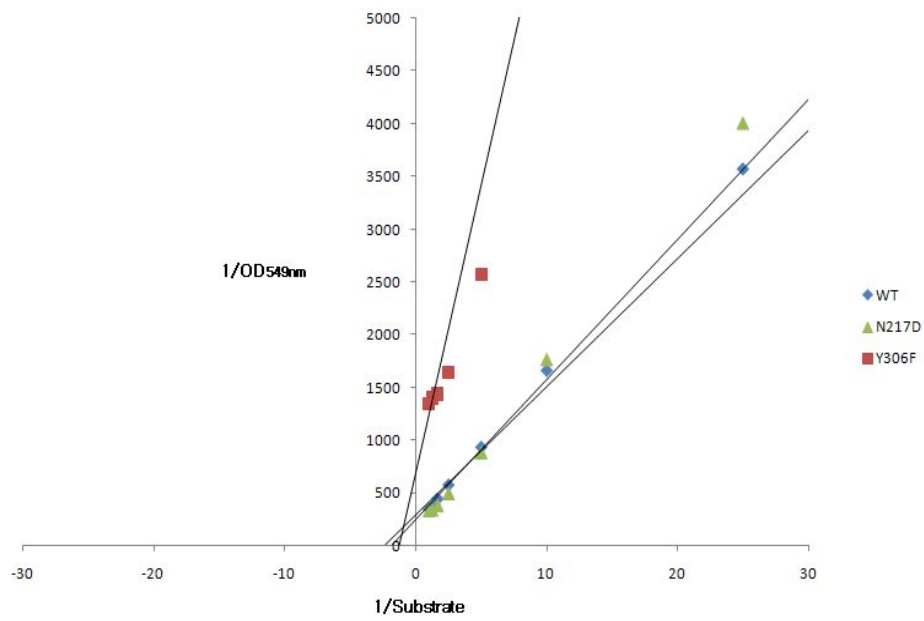


Fig. 20. Lineweaver-Burk plot of mutants H200A, N217D and Y306F.

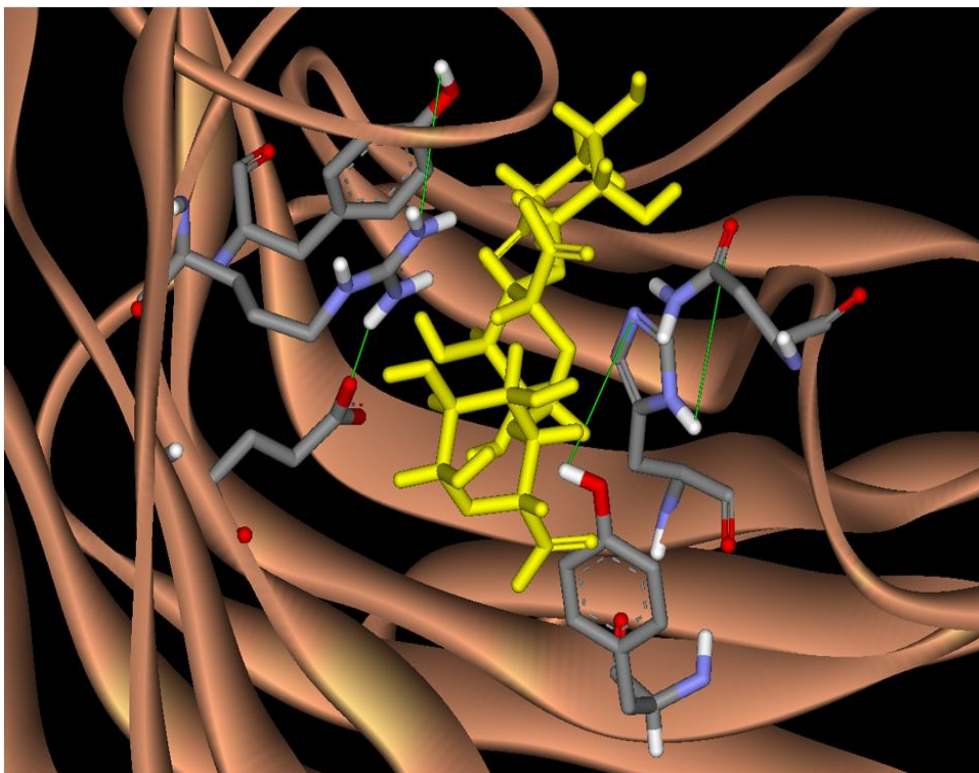


Fig. 21. Residues of *alyVI* in the mechanism of alginate degradation.

2. GPC를 이용한 alginate 분해 산물의 분자량 측정

Table 9는 효소를 처리하지 않은 순수한 alginate 및 alginate 분해 산물 중 wild type 으로 분해한 sample 그리고 mutant 중 가장 활성이 좋았던 L224V/D226G로 분해한 sample들의 GPC 실험 결과를 나타낸 것이다. Wild type 및 mutant L224V/D226G로 분해한 것 모두 alginate에 비해 Mn, Mw, Mz 및 Mw/M의 수치가 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 또한 mutant L224V/D226G의 평균분자량이 wild type에 비해 다소 감소되어 있는 것을 확인 할 수 있었는데 이는 TBA 활성 측정에서 나타내었던 결과와 일치한다고 볼 수 있다.

Table 9. Comparison of average molecular weight between sodium alginate and its degraded products

Type of sample	Mn(Da)	Mw(Da)	Mz(Da)	Mw/Mn
No enzyme	601,901	2,386,985	27,621,329	3.96574
Wild type	349,846	1,281,910	7,093,282	3.66421
L224V/D226G	252,990	877,042	3,030,262	3.46671

※ Mn (Number-average molecular weight) = $\sum MiNi/\sum Ni$

Mw (weight-average molecular weight) = $\sum Mi^2Ni/\sum MiNi$

Mz (Z-average molecular weight) = $\sum Mi^3Ni/\sum Mi^2Ni$

Mw/Mz (Molecular weight distribution)

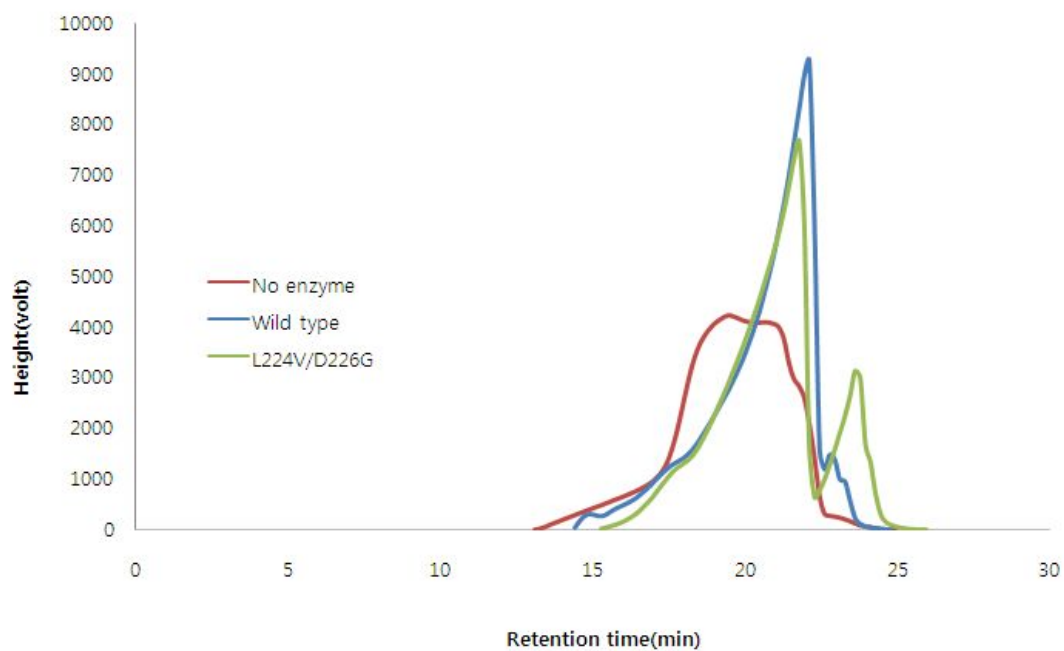


Fig. 22. GPC data of alginate and its products degraded by the wild type of *alyVI* and mutant L224V/D226G.

제 3 장 결 론

제 1 절 결 론

본 실험에서는 알긴산 분해효소의 활성을 증가시키기 위한 연구로 알긴산 분해효소를 encoding 하고 있는 유전자 *alyVI*를 이용하여 32개의 mutant를 만들어 활성을 실험하였다. 각 mutant의 wild type에 대한 상대적인 활성도를 비교한 그래프는 Fig 24과 같다.

226번째 아미노산인 aspartic acid를 다른 아미노산으로 바꾸어 주었을 경우 alanine으로 바꾸어주었을 때와 224번째 valine으로 바뀌즘과 동시에 226번째 아미노산을 glycine으로 바꾸어 주었을 때 즉 mutant D226A와 L224V/D226G가 wild type 보다도 활성이 증가했음을 확인 할 수 있었다. Aspartic acid는 작용기로 COO^- 를 갖고 있어서 음전하를 띄고 있는 산성 아미노산 중 하나이다. 그런데 이것을 중성 아미노산 이면서 methyl기를 갖고 있는 alanine으로 바꾸어 주었더니 활성이 증가하였다는 것은 기질과 효소의 결합력에 음전하를 많이 띄고 있는 산성 아미노산 보다는 중성 아미노산이 더 효율적으로 작용할 수 있다는 결과이다. 또한 226번째를 똑같이 중성 아미노산인 glycine으로 바꾸었더니 활성에 변화는 없었으나 224번째의 leucine을 valine으로 동시에 바꾼 mutant의 활성이 wild type의 2배가량 증가함을 확인 할 수 있었다. Leucine의 경우에는 butyl 잔기가, valine의 경우엔 propyl 잔기가 있는데 propyl 잔기가 있으면서 근처 226번째에 charge가 없는 수소기만 있을 경우 bulky한 형태의 aspartic acid를 glycine으로 바꾸어 줌으로써 입체적 장애를 최소화하여 alginate가 효소의 활성부위에 효율적으로 결합할 수 있다고 볼 수 있었다. 즉, 224번째와 226번째는 단백질이 접히는 과정에서 상호 작용을 많이 하는 부분이고 서로 많은 영향을 줄 것이라는 사실을 알 수 있었다. 그러나 226번째 aspartic acid를 반대 전하인 양전하를 띄고 있는 lysine로 바꾸어준 경우 염기성 아미노산으로 바꾸면 활성을 더 떨어뜨리는 효과를 보이기도 하였다.

Phenylalanine을 갖고 있는 228번째 서열을 glycine으로 바꾸어 준 경우 wild type 보다 증가함을 볼 수 있었는데 이 역시 덩치가 큰 phenylalanine을 수소기만 갖고 있는 glycine으로 바꾸었을 때 기질과 효소가 결합하는데 대한 장애를 최소화하는 것으로 설명될 수 있었다. Alanine으로 바꾸어 준 경우는 F228G에 비해 다소 떨어졌으나

원래 활성은 보존하고 있는 경향을 보였고 아미노산이 charge를 띄는 경우는 wild type의 활성에 비해 떨어졌다.

174번이나 218번의 lysine의 전하를 중성으로 바꾸거나 음전하로 바꾼 경우에 전반적으로 활성이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 171번째 histidine의 경우에는 성격이 완전히 다른 alanine으로 바꾸어 주었더니 활성이 완전히 떨어지는 것을 보였는데 이는 histidine이 활성에 직접적인 영향을 일으키는 부분일 수 있을 것이라 생각되었다.

또한, L224V/D226G의 활성이 매우 좋았기 때문에 L224V가 미치는 영향을 확인하기 위하여 single point mutant인 L224V를 만들어서 활성 실험을 한 결과 활성이 L224V/D226G보다는 떨어졌지만 wild type 보다는 좋은 경향을 보였기 때문에 226번만 바꾼 D226G보다 L224V와 함께 작용하면 좋은 활성을 갖는다는 사실을 알 수 있었다. 226번째에서 single point로서 가장 활성이 높았던 D226A와 228번째에서 가장 높았던 F228G를 함께 만든 D226A/F228G는 각각의 single point mutant였을 때보다 다소 낮아지는 경향을 확인하였다.

3D model을 이용해 찾은 binding 부위에서 분해 mechanism에 주로 작용하는 아미노산이 200번, 217번 및 306번임을 확인한 바 있다. 이것은 histidine을 alanine으로 바꾸어준 H200A와 asparagine을 alanine으로 바꾸어준 경우 그리고 tyrosine을 phenylalanine으로 바꾸어 준 결과 활성이 완전히 없어지는 것으로 검증 될 수 있었다. asparagine을 aspartic acid로 바꾸어 준 경우 활성을 그대로 유지하고 있었기 때문에 분해 mechanism에 $-O^-$ 가 중요하게 작용하고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 23). 또한 Y306F의 경우, 활성이 완전히 없어지지 않은 점과 3D model로(Fig. 20) 미루어 볼 때 *alyVI*의 alginate 분해 mechanism이 두 가지로 존재할 것이라는 것을 추측해 볼 수 있었다.

위에서 언급했던 mutant들을 제외한 나머지 mutant W165A, W165D, W165G, W165R, H171F, K218H, K308A, K308E, Y312F, K308H, Q314K 및 Q314H는 활성이 완전히 없음을 확인하였다. 특히 165번의 tryptophan을 다른 아미노산으로 바꾼 mutant는 모든 mutant의 활성이 완전히 제거되어 버리는 것을 통해 165번의 아미노산인 tryptophan이 alginate를 분해하기 위한 효소의 중요 부위임을 확인할 수 있었다.

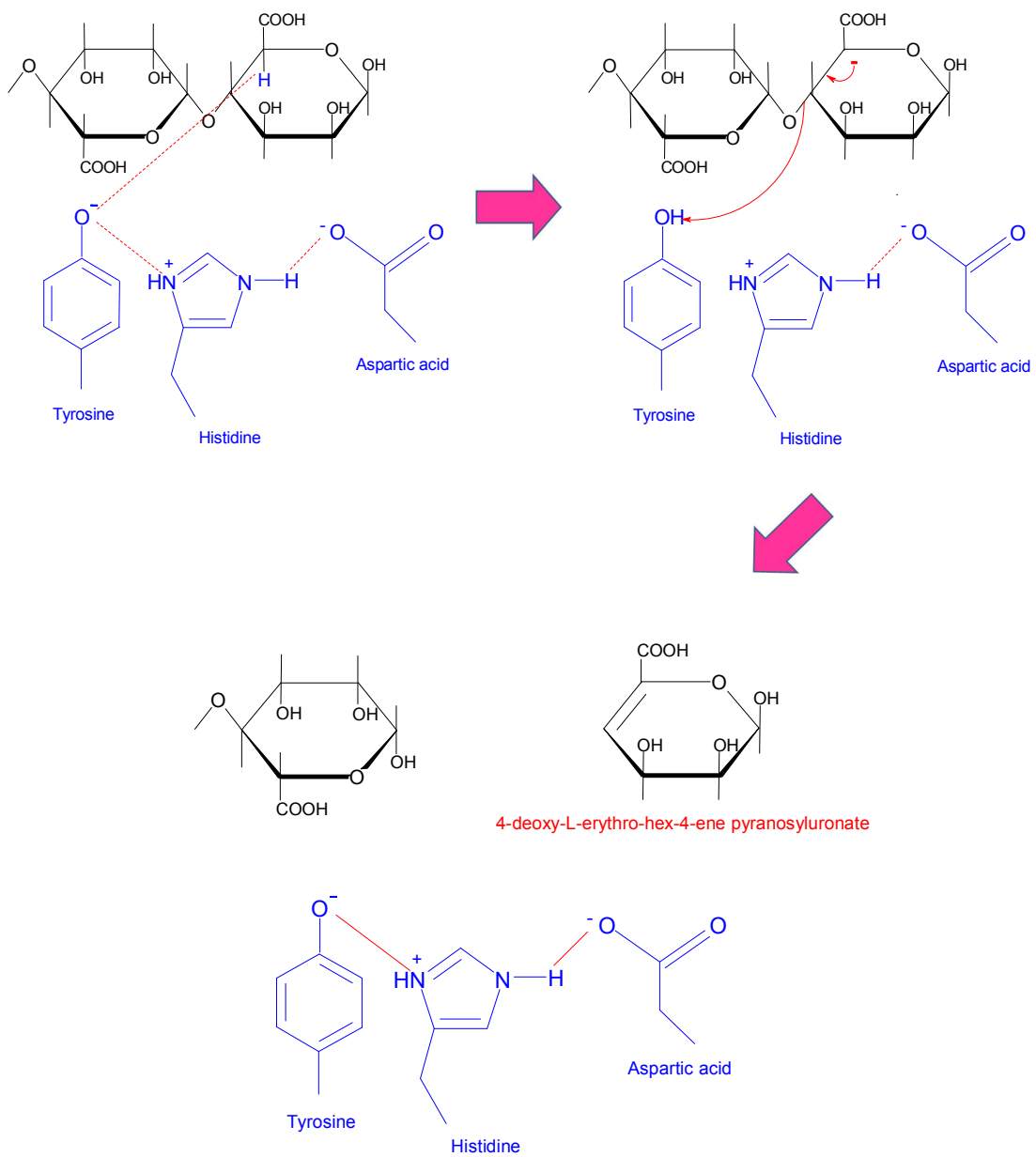
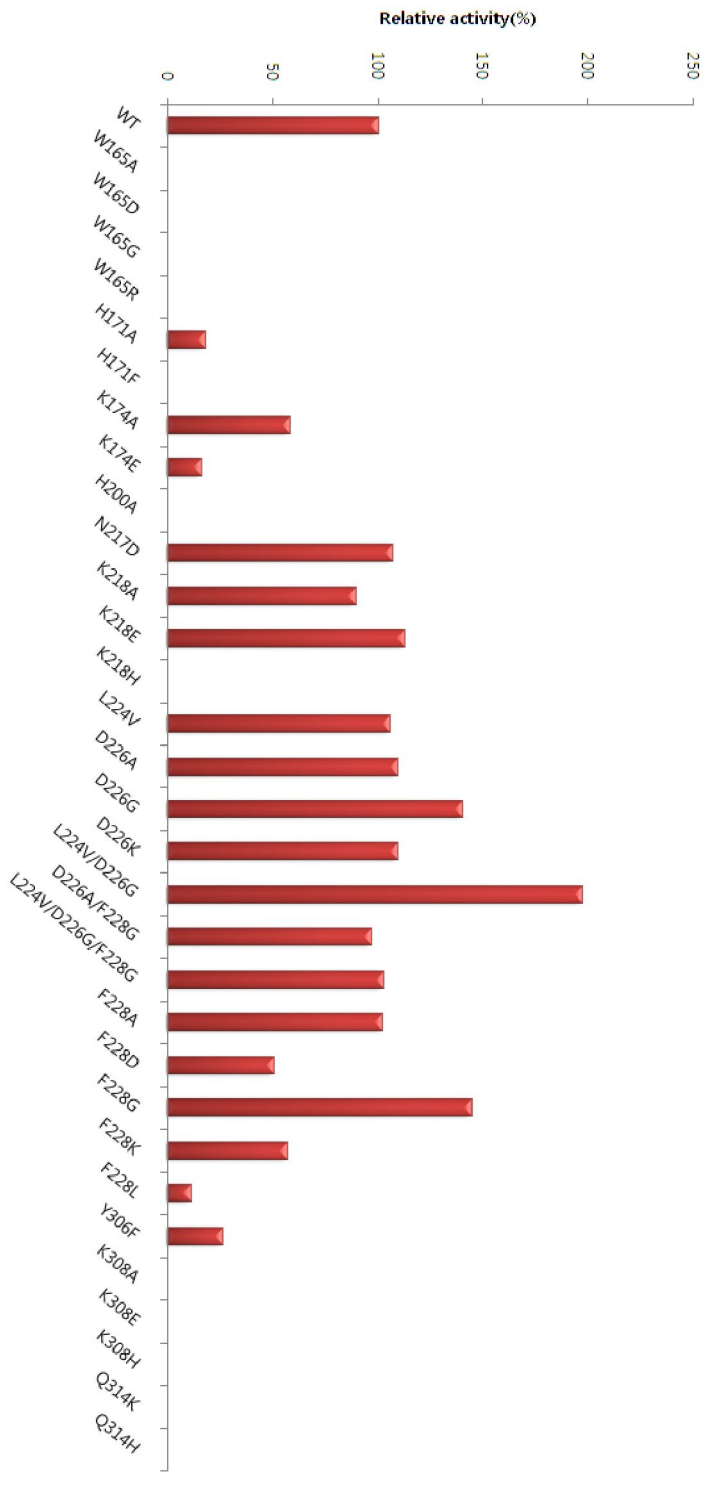


Fig. 23. Schematic representation of alginate degradation mechanism.

Fig. 24. Relative activities (%) of each mutants from alginate



제 2 절 고찰

Mutant를 이용한 활성 실험에서 사용한 기질은 sodium alginate였다. 그러나 cystic fibrosis와 같은 질병에서는 미생물 *pseudomonas aeruginosa*가 생산해 내는 것이기 때문에 서론에서 언급하였듯이 알긴산에 acetyl기가 붙어 있는 것이 대부분이다. 본 실험의 목적은 cystic fibrosis와 같은 질병 치료의 개선을 위한 부분도 있기 때문에 acetyl화 되어있는 알긴산의 분해에도 집중하였다. 따라서 *alyVI*에 대한 mutant 중 활성이 가장 좋았던 L224V/D226G, D226A 및 F228G 그리고 wild type을 이용하여 같은 조건에서 기질만 acetyl화 된 알긴산을 사용하여 활성을 측정하였으나 알긴산 나트륨에 비해 활성이 다소 떨어짐을 확인하였다. 따라서 acetyl화된 알긴산과 알긴산 나트륨을 모두 분해 할 수 있는 mutant를 만든다면 더 좋은 연구가 될 수 있다고 본다.

Reference

- [1] Haug A. and Larsen B. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginate. *Acta Chem, Scand* 16, 1908~1918 (1962).
- [2] Haug A., Larsen B and Smidarod O. Structure on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem, Scand* 21, 691~704 (1967).
- [3] Haug A., Myklestad S., Larsen B and Smidarod O. Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. *Acta Chem, Scand* 21, 768~778 (1967).
- [4] Skjak-Brak G., Grasdalen H and Larsen B. Monomer sequence and acetylation pattern in sae bacterial alginates. *Carbohydr. Res.* 154, 239~250 (1986).
- [5] Gacesa P., Alginates. *Carbohydrate polymers.* 8, 341~354 (1988).
- [6] Govan I. R. and Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60, 539~574 (1996).
- [7] Gacesa P. Enzymic degradation of alginates. *Int J Biochem* 24, 545~552(1992).
- [8] Shiraiwa Y., Abe K., Sasaki S. F., Ikawa J and Nishizawa K. Alginate lyase activities in the extrats from several brown algae. *Bot.* 18, 97~104 (1975).
- [9] Watanabe T. and Nishizawa K. Enzymatic studies on alginate lyase from *Un-daria pinnatifida* in relation to texture-softening prevention by ash-treatment (Haiboshi). *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish* 48, 243~249 (1982).
- [10] Elyakova L. A. and Favorov V. V. Isolation and certain properties of alginate ly-ase VI from the *mollusc Littorina* sp, *Biochem. Biophys. Acta.* 358, 341~354 (1974).
- [11] Nisizawa K., Fujibayashi S. and Kashiwabara S. Alginate lyase in the

- hepato-pancreas of a marine mollusc *Dolabella auricula*. J. Biochem 64, 25~37 (1968).
- [12] Wainwright M. and Sherbrock-Cox V. Factors influencing alginate degradation by marine fungi; *Dendryphiella salina* and *D. arenario*. Bot. 24, 489~491 (1981).
- [13] Boyd J. and Turvey T. R. Isolation of a poly- α -L-guluronate lyase from *Klebsiella aerogenes*. Carbohydrate Res. 57, 163~171 (1977).
- [14] Davidson I.W., Sutherland I.W. and Lawson C. J. Purification and properties of an alginate lyase from marine bacterium. J. Biochem. 159, 707~713 (1976).
- [15] Marki H., Mori A., Fujiyama K., Kinoshita S., and Yohida T. Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding an alginate lyase from *Pseudomonas sp. OS-ALG-9*, J. Gen. Microbiol. 139, 987~993 (1993).
- [16] Boyd A., Ghosh M., May T. B., Shinabarger D., Keogh D. and Chakrabarty A. M. Sequence of the algL gene of *Pseudomonas aeruginosa* and purification of its alginate lyase product. Gene 131, 1~8 (1993).
- [17] Malissard M., Duez C., Guinand M., Vacheron M. J., Michel G., Marty N., Joris B., Thamm I. and Ghuysen J. M. Sequence of a gene encoding a alginate lyase active on *Pseudomonas aeruginosa* alginate. FEMS Microbiol. Lett. 110, 101~106 (1993)
- [18] Yonemoto Y., Tanaka H., Hisano T., Sakaguchi K., Abe S., Yamashita T., Kimura A. and Murata K. Bacterial alginate lyase gene: nucleotide sequence and molecular route for generation of alginate lyase species. J. Ferment. Bioeng. 75, 336~342 (1993).
- [19] Baron A. J., Wong T. Y., Hicks S. J., Gacesa P., Willcock D. and McPherson M.J. Alginate lyase of *Klebsiella pneumoniae* subsp. aerogenes; gene cloning,

sequence analysis and high-level production in *Escherichia coli*. Gene 143, 61~66 (1994).

- [20] Chavagnat F., Duez C., Guinand M., Potin P., Barbeyron T., Henrissat B., Wallach J. and Ghuysen J. M. Cloning sequencing and overexpression in *Escherichia Coli* of the alginate lyase-encoding *aly* gene of *Pseudomonas alginovora*: identification of three classes of alginate lyases. Biochem. J. 319, 575~583 (1996).
- [21] Kraiwattanapong J., Ooi T. and Kinoshita S. Cloning and sequence analysis of the gene (*alyII*) coding for and alginate lyase of *Pseudomonas sp.* OS-ALG-9. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 1853~1857 (1997).
- [22] Ertesvag H., Erlie F., Skjak-Brak G., Rehm B. H. and Valla S. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. J. Bacteriol. 180, 3779~3784 (1998).
- [23] Pecina A., Pascual A. and Paneque A. Cloning and expression of the *algL* gene, encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase: purification and characterization of the enzyme. J. Bacteriol. 181, 1409~1414 (1999).
- [24] Preston L. A., Wong T. Y., Bender C. L. and Schiller N. L. Characterization of alginate lyase from *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 182, 6268~6271 (2000).
- [25] Sugimura I., Sawabe T. and Ezura Y. Cloning and sequence analysis of *Vibrio haliotocoli* genes encoding three types of polyguluronate lyase. Biotechnol. 2, 65~73 (2000).
- [26] Sawabe T., Takahashi H., Ezura Y. and Gacesa P. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene(*alyPEEC*) encoding the extracellular alginate lyase. Carbohydr. Res. 335, 11~21(2001).
- [27] Song K., Yu W. G., Han F., Han W. J. and Li J. B. Purification and

characterization of alginate lyase from marine bacterium *Vibrio sp. QY101*,
Acta Biochim. Biophys. Sin. 35, 473~477.

[28] Han F., Gong Q. H., Song K., Li J.B. and Yu W. G. Cloning, sequence analysis and expression of gene *alyVI* encoding alginate lyase from marine bacterium *Vibrio sp. QY101*. *Talyor & Francis* 15, 344~350 (2004).

[29] Kong I.S., Kim Y. O. and Kim G. T. Charateristics of recombinant alginate lyase of a marine bacterium. *Pseudomonas sp. J. Korean Fish. Soc.* 29(5), 637~642 (1996).

[30] Tai H.H., Cho H., Hamza A. and Zhan C. G. Key NAD⁺ binding residues in human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 447~453 (2005).

[31] Weissbach. A and Hurwtz J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extract of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* 234, 705-709 (1959).

[32] 김상진, 해양 바이오산업 발전에 대한 소고, *생물 산업*, 15, 16-18 (2002).

[33] 김상진, 미국 해양생명공학 연구 동향, *미생물과 산업*, 2 8(2002).

Internet sites

<1> 조선일보 - “해조류의 놀라운 변신”

http://news.chosun.com/부위/data/html_dir/2009/11/06/2009110601382.html

<2> 중앙일보 - “혈당·콜레스테롤도 낮춰준다! 고혈압 예방 위한 최고의 식품”

http://article.joins.com/article/article.asp?Total_ID=3904764

<3> <http://www.addgene.org/pgvec1>

<4><http://images.google.co.kr/imghp?hl=ko>

저작물 이용 허락서

학 과	첨단부품소재공학	학 번	20087144	과 정	석사
성 명	한글 김미선	한문 金美善	영문 KIM MI SUN		
주 소	광주 광역시 남구 월산 3 동 337-63 번지				
연락처	E-mail : k1mm1@naver.com				
논문제목	활성이 개선된 알긴산 분해효소 (alyVI) 개발에 관한 연구				
	Study on the development of improved alginate lyase (alyVI)				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의() 반대()

2010년 2월

저작자: 김 미 선 (인)

조선대학교 총장 귀하