

본 발명은 오픈플록사신 알킬 에스테르에 대한 광학선택적 가수분해능을 가진 에스터라아제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 광학선택적 가수분해능을 가진 에스터라아제는 오픈플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되어질 수 있다. 또한 상기 광학선택적 가수분해능을 가진 에스터라아제를 재조합 기술을 이용하여 대량생산함으로써 의약품 산업에도 크게 기여 할 수 있을 것이다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 포함하며, (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머만을 선택적으로 가수분해하는 에스터라아제.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO:1에 나타난 핵산서열에 의해 암호화되는 펩타이드인 에스터라아제.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 상기 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르중 알킬은 프로필, 또는 부틸인 에스터라아제.

청구항 4.

SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열로 이루어지며, (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 선택적으로 분해하는 에스터라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO:1에 나타난 핵산서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6.

제 4항 또는 제5항에 따른 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 7.

제 1 항에 따른 에스터라아제를 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물에 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 에스터라아제를 pH8.0 내지 pH9.5에서 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물에 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법.

청구항 9.

제 7 항에 있어서, 에스터라아제를 30℃ 내지 40℃에서 (R),(S)-오플록사신 알킬 에스테르 혼합물에 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 오플록사신 알킬 에스테르에 대한 광학선택적 가수분해능을 가진 에스터라아제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 및 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것이다.

리파아제(glycerol ester hydrolase EC 3.1.1.3)는 자유 지방산과 글리세롤로부터 에스테르 결합을 합성하고 또는 이를 가수분해하며, 이들 반응식은 도 1에 나타내고 있다. 리파아제는 리피드와 물의 계면에서 작용하는 serine hydrolase이다. 활성부위에 보존된 5개 아미노산으로 구성된 펩타이드(Gly-X-Ser-X-Gly)에 상기 세린이 존재하면, 상기 세린에 친핵성 공격을 하여 효과적으로 다양한 에스테르 결합을 가수분해한다.

리파아제는 다양한 미생물, 예컨대 박테리아, 곰팡이, 및 효모 등이 생산하며, 리파아제를 암호화하는 많은 유전자가 클로닝되었다. 박테리아의 리파아제는 8개의 군으로 구분되며 특히 *Pseudomonas*속 균주의 리파아제에 대해 광범위한 연구가 진행되어 왔다. 효모의 리파아제는 *Candida rugosa*, *Trichosporon fermentans* 등이 있으며 기타 곰팡이 리파아제로는 *Geotrichum candidum*, *Rhizopus delemar*, *Thermomyces lanuginose* 및 *Rhizopus miehei* 등이 보고되고 있다. 상업적으로 이용가능한 미생물 리파아제의 예를 아래 표 1에 나타내고 있다.

[표 1]

Origin	Organism producing lipase	Application
Yeast (Fungal)	<i>Candida rugosaa</i>	Organic synthesis
	<i>Candida antarctica</i> A/B	Organic synthesis
	<i>Thermomyces lanuginosusb</i>	Detergent
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Food processing
Bacterial	<i>Pseudomonas menodocina</i>	Detergent
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Detergent
	<i>Pseudomonas glumae</i>	Detergent
	<i>Bacillus pumilus</i>	Detergent
	<i>Burkholderia cepaciac</i>	Organic synthesis
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Organic synthesis, biotransformations, chemicals
	<i>Pseudomonas sp.</i>	Organic synthesis
	<i>Chromobacterium viscosumd</i>	Organic synthesis, biotransformations, chemicals
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Organic synthesis, technical grade
<i>Achromobacter sp.</i>	Technical grade	

리파아제는 가장 중요한 산업적 촉매로서 예를 들면, 식품, 화장품, 향수, 가죽, 종이, 제약산업, 및 세제 등의 분야에서 널리 사용되어 왔다. 상업적으로 유용한 리파아제는 곰팡이와 박테리아에서 유래된 것이다. 특히 리파아제는 유기 용매중에서도 여전히 활성을 유지하며, 통상 정확한 화학선택성(chemoselectivity), 위치선택성(regioselectivity), 광학선택성(enantioselectivity)을 가지저서, cofactor가 필요하지 않으며 부반응도 일으키지 않는다. 이러한 특성으로 인해 리파아제는 다양한 생물공학적인 분야에서 매우 중요한 촉매에 해당할 뿐만 아니라 유기 화학에서도 중요한 생촉매로서 사용된다. 또한 리파아제는 광학적으로 순수한 화합물을 얻기 위해서 라세메이트 혼합물의 분리에도 사용된다.

Quinolone계 항생제인 오픈플록사신(9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-[4-methyl-1-piperazinyl]-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-esteric acid)은 (S)-오픈플록사신 (레보플록사신)과(R)-오픈플록사신이 1:1로 혼합되어 있는 광학이성질체로서, 기존에 항생제 내성을 가지는 전염성 미생물에 대해 높은 항생효과를 보이는 것으로 알려져 있으며, 특히 레보플록사신(levofloxacin)은 rac-오픈플록사신과 (R)- 오픈플록사신에 비해 항생효과가 탁월한 것으로 보고되었다. 레보플록사신은 동물 및 박테리아로부터 유래되는 광학선택성 에스테라제를 이용하여 오픈플록사신 에스테르로부터 제조된다. 그 예로서, 돼지 간의 리파아제는 라세믹 오픈플록사신 부틸 에스테르로부터 (S)-오픈플록사신 에스테르를 광학선택적으로 가수분해한다(Lee 등 Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 15:313-317, 2000). 또한 *Bacillus niacini* EM001 에스테라제는 라세믹 오픈플록사신 프로필 에스테르로부터 (R)-오픈플록사신을 광학 선택적으로 가수분해한다(Kim 등, J. Mol. Catal. B: Enzym. 27:237-241, 2004).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 오픈플록사신으로부터 레보플록사신만을 생산하는 새로운 생촉매 (biocatalyst)로써 유용하게 사용되고, 오픈플록사신 알킬 에스테르에 대한 광학선택적 가수분해능을 가진 에스테라아제, 이를 암호화하는 뉴클레오타이드, 이를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

본 발명은 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머의 에스테르 결합만을 선택적으로 가수분해하는 에스테라아제에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머의 에스테르 결합만을 선택적으로 가수분해하는 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 가수분해하는 에스테라아제를 생산하는 균주에 관한 것이다.

본 발명은 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 가수분해하는 에스테라아제를 이용하여 레보플록사신을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명에 따른 광학선택적 가수분해능을 가진 에스테라아제는 *Bacillus niacini* EM001에 의 경우 (R)-오픈플록사신을 광학 선택적으로 가수분해하는 것인데 비해, (S)-오픈플록사신을 분해하는 특성을 가져 매우 유용하다.

이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

본 발명에 따른 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)에난티오머만을 선택적으로 가수분해하는 에스테라아제는 SEQ ID NO:2 에 나타난 아미노산 서열로 이루어지는 폴리펩타이드이고, 더욱 바람직하게는 본 발명에 따른 에스테라아제는 SEQ ID NO:1에 기재된 핵산서열에 의해 암호화되는 폴리펩타이드이다.

상기 효소 기질인 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르중 알킬은 탄소수 1 내지 6의 알킬일 수 있으며, 바람직하게는 프로필 또는 부틸이다. 본 발명에 따른 에스테라아제는 광학선택적으로 (R),(S)-오픈플록사신 프로필 에스테르 또는 (R),(S)-오픈플록사신 부틸 에스테르중에서 (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르 또는 (S)-오픈플록사신 부틸 에스테르만을 선택적으로 가수분해하여, (R),(S)-오픈플록사신 프로필 에스테르의 경우, (S)-오픈플록사신 프로필 에스테르를 선택적으로 분해하여 결과적으로 20%의 eep(the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈플록사신 (레보플록사신)을 생성하는 것을 확인하였

다. 또한, (R),(S)-오픈플록사신 부틸 에스테르의 경우에도, (S)-오픈플록사신 부틸 에스테르만을 선택적으로 분해하였으며 결과적으로 51%의 eep(the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈플록사신 (레보플록사신)을 생성하는 것을 확인하였다.

본 발명에 따른 에스테라아제는 염기서열 분석 결과 보통 알려진 에스테라아제의 활성부위에 일반적으로 conserve 되어 있는 GHS162LG 모티프 (Gly-X-Ser-X-Gly)가 발견되었고 또한 에스테라아제 활성에 필수적인 the triad serine, aspartic acid, histidine이 단백질 서열로부터 분석되었는바, 이러한 사실로부터 에스테라아제 활성에 필요한 필수적인 서열은 보존되어 있는 것이 확인되었다. 기존의 에스테라아제와 비교하여 보면, *Pseudomonas aeruginosa*의 *predicted dienelactone hydrolase*(약 40%의 상동성), *E. coli*의 *α/β superfamily hydrolase* (28% 상동성), *Pyrococcus furiosus*의 *lysophospholipase* (22% 상동성), *Bacillus licheniformis*의 *Esterase/lipase/thioesterase* (32% 상동성), *Streptomyces sp.*의 *triacylglycerol acylhydrolase* (16% 상동성), *Prochlorococcus marinus*의 *esterase/lipase/thioesterase active site* (17% 상동성) 및 *Legionella pneumophila*의 *hydrolase* (30% 상동성) 등 여러 균주 유래의 lipase 또는 esterase와 일정 정도만의 상동성을 보여 신종의 에스테라아제임을 알 수 있다.

본 발명에 따른 에스테라아제는 약 37KDa의 분자량을 가진다. 본 발명에 따른 에스테라아제는 pH 8.5에서 최적의 활성을 보이며 pH는 8.0-9.5사이의 범위에서 활성을 보이는 약 알칼리성 에스테라아제이다. 또한, 본 발명에 따른 에스테라아제는 30도에서 최적의 활성을 보이며, 약 30도에서 40도 사이의 범위에서 활성을 보인다.

본 발명에 따른 에스테라아제는 tributylrate(C4)에서 가장 높은 활성을 보였으며, C10 기질 이상의 활성은 없는 것으로 확인되어 주로 짧은 사슬만을 분해하는 보통의 에스테라아제와 같은 기질 특이성이 확인되었다.

본 발명은 또한 상기 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 관한 것으로서, SEQ ID NO:2에 나타난 아미노산 서열을 암호화하는 핵산서열로 이루어지며, (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물로부터 (S)-에난티오머의 에스테르 결합만을 광학선택적으로 가수분해하는 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드이고, 더욱 바람직하게는 SEQ ID NO:1에 나타난 핵산서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드이다.

본 발명은 상기 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 적용가능한 벡터로는 각 숙주용으로 개발된 다양한 벡터 및 프로모터등을 사용할 수 있다. 원핵세포, 예컨대 대장균을 형질전환용 숙주로 하는 경우에는 lac, T7, ara, trc등 다양한 종류의 대장균 프로모터를 이용한 발현 벡터를 이용하여 재조합 단백질 생산이 가능하다.

본 발명은 또한 상기 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이며, 상기 형질전환체는 원핵세포, 진핵세포 또는 곤충일 수 있다. 상기 숙주의 예로는 대장균, 효모, bacillus, 방선균, 유산균, 및 곤충등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 형질전환방법은 외래 유전자를 포함하는 벡터를 형질전환하는 통상의 방법을 모두 포함한다.

본 발명은 또한 pH는 8.0-9.5, 작용온도는 약 25도에서 40도에서 (R),(S)-오픈플록사신 알킬 에스테르 혼합물을 본 발명의 에스테라아제로 반응시켜 레보플록사신을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기 에스테라아제는 *Vibrio sp* GMD 509세포의 배양물, 또는 에스테라아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포의 배양물로부터 분리한 에스테라아제 일 수 있다. 본 발명의 일례에서 상기 에스테라아제를 생산하는 재조합 *E.coli*에서 에스테라아제는 내포체 형태로 발현되며, 통상의 내포체 형태로 발현되는 수불용성 단백질의 분리 및 정제방법으로 에스테라아제를 얻을 수 있다. 예컨대, 상기 형질전환 세포를 파쇄한 후 얻어진 수불용성 단백질을 우레아를 이용하여 refolding하고, 얻어진 상등액을 talon resin으로 붙이고, 300mM 이미다졸로 용출하여 재조합 단백질을 얻을 수 있다. 또한, 재조합 에스테라아제 단백질을 분리를 용이하게 하기 위하여 다양한 affinity tag과 단백질 수용성에 도움을 주는 tag을 이용할 수 있다. 예컨대, His-tag, GST-tag, Flag-tag, MBP-tag, T7-tag, Trx, CBP-tag등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 통상의 재조합 단백질 제조방법, 이의 생산방법, 및 발현방법을 사용하여 본 발명에 따른 재조합 리파제 단백질을 생산 및 분리할 수 있다.

하기 예시적인 실시예를 들어 본 발명을 더욱 자세히 설명할 것이나, 본 발명의 보호범위가 하기 실시예로 한정되는 의도는 아니다.

실시예 1: 오픈플록사신 에스테르에 대하여 광학 선택성을 가지는 에스테라아제의 유전자 클로닝

1-1. *Vibrio sp.* GMD509 균주의 탐색방법 및 균주 동정

거문도 근처에 있는 모기여섯(Mogiyeo 수심(depth) 12m)에 서식하는 군소과의 Aplysiae Kurodai의 알로부터 채취된 시료를 멸균 해수에 넣어 현탁 후, 기본배지 (3% Sea Salts)에 1% tributyrin (C4) emulsion이 첨가된 TBN 고체 배지 (agar plate)에 도말하였다. TBN 고체 배지(agar plate)는 1% TBN을 0.1% Bacto yeast extract, 0.5% Bacto tryptone, 0.001% FePO₄ · 4H₂O, 3% sea salt가 혼합된 배지 1 L와 혼합하여 초음파 분쇄기를 이용해서 emulsion 한 후, 1.5% 박토 Bacto agar를 첨가하여 만들었다. 도말한 플레이트는 25°C에서 24시간 동안 배양하였고, tributyrin (C4)를 분해하여 투명환을 형성하는 균주를 1차 선택하였다. 1차 선택된 균주를 대상으로 16S rDNA분석을 실시하였다. 16S rDNA분석을 통하여 *Vibrio sp.*와 99%이상 유사한 상동성을 가진 균을 확인하여 이를 *Vibrio sp.*로 분류하였고, 이 중에서 에스페리아제를 생산하는 균주를 최종 확인하여 이를 *Vibrio sp.* GMD 509라 명명하였다. (도 11 및 도 2) *Vibrio sp.* GMD 509를 확인하기 위하여 실시한 16S rDNA분석에서 사용한 프라이머의 서열을 하기 표 2에 나타낸다.

[표 2]

Primer	Specificity	Sequence (5'-3')	Site	Reference
27F	Bacteria	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	8-27	Giovannoni, 1991
357F	Bacteria	5'-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG-3'	337-357	Amann <i>et al.</i> , 1990 Stahl <i>et al.</i> , 1989
802F	Bacteria	5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3'	785-802	Lee <i>et al.</i> , 1993 Woese, 1987
1241F	Bacteria	5'-ACA CAC GTG MTA CAA TGG-3'	1225-1241	Kato <i>et al.</i> , 1997
518R	Universal	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3'	534-518	Kato <i>et al.</i> , 1997
1055R	Bacteria	5'-CAC GAG CTG ACG ACA GCC AGT-3'	1074-1055	Lee <i>et al.</i> , 1993 Woese, 1987
1088R	Bacteria	5'-GCT CGT TGC GGG ACT TAA CC-3'	1171-1088	Lee <i>et al.</i> , 1993 Woese, 1987
1522R	Bacteria	5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'	1541-1522	Giovannoni, 1991

F: Forward, R: Reverse

Site is as *E. coli* numbering

M = C:A , W = A:T, R = A:G, N = A:C:G:T

상기 표2에서, 27F 및 1522R의 참고자료(Reference)는 Giovannoni, S.J. 1991. The polymerase chain reaction. p. 177-201. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, N. Y.이고, 357F의 참고자료(Reference)는 Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleider. 1994. Identification of uncultured bacteria; A challenging task for molecular taxonomists. ASM news 60: 360-365. 및 Devereux R, Delaney M, Widdel F, Stahl DA. Natural relationships among sulfate-reducing eubacteria. J Bacteriol. 1989 Dec;171(12):6689-95.이며, 802F, 1055R 및 1088R의 참고자료(Reference)는 Lee, S., C. Malone, and P.F. Kemp. 1993. Use of multiple 16S rRNA targeted fluorescent probes to increase signal strength and measure cellular RNA from natural planktonic bacteria. Mar. Eco. Prog. Ser. 101:193-201. 및 Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbio. Rev. 51:221-271.이고, 1241F 및 518R의 참고자료(Reference)는 Kato, C. and D. H. Bartlett. 1997. The molecular biology of barophilic bacteria. Extremophiles 1:111-116.이다.

1-2. 사용된 균주와 플라스미드

Vibrio sp. GMD 509 균주가 광학 선택성을 가지는 에스테라아제의 유전자 클로닝을 위하여 source로 사용되었다. *E. coli* DH5a 균주는 플라스미드 DNA의 형질전환을 위하여 사용되었다. 벡터 pBluescript SK(+)II는 클로닝을 위하여 사용되었다. 재조합 단백질의 제조를 위한 발현 벡터로는 pET24a(+), 숙주세포로는 *E. coli* BL21 (DH3)를 사용하였다. 에스테라아제 유전자 클로닝에 사용된 균주 및 플라스미드에 대해 하기 표 3에 정리하였다.

[표 3]

Strains or Plasmids	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>Vibrio sp</i> GMD509	Producer of ofloxacin ester-enatioselective esterase, isolated to egg of sea hare	본 발명
<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>supE44 ΔlacI169(Φ80lacZ ΔM15) hsdR7 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA</i>	New England Biolabs
Plasmids		
pBluescript SK II (+)	Cloning vector, Amp ^r , lacZ/MCS	Strata gene
pLSY	Amp ^r , pBluescript sk (+) II containing 2.1 kb insert of <i>Vibrio sp.</i> , GMD 509 DNA with esterase gene	본발명

1-3. 배지와 배양 조건

Vibrio sp. GMD 509 균주는 ZoBell 배지 (0.5% Bacto peptone, 0.1% Bacto yeast extract, 0.001% FePO₄)를 사용하여 배양하였으며, *E. coli* DH5a 균주는 Luria-Bertani (LB) 배지 (0.5 % NaCl, 1 % Bacto yeast extract, 1 % Bacto tryptone)를 사용하여 각각 25 °C와 37 °C에서 배양하였다. *E. coli* DH5a 균주는 경우에 따라 100 ug/ml ampicillin과 IPTG, 그리고 X-gal이 첨가된 배지에서 배양하였다. LB-Tributyryn (TBN) 고체 배지는 재조합 클론의 라이브러리 탐색을 위하여 제조되었다. LB-TBN 고체 배지를 제조하기 위하여 1 % TBN 은 1 L의 LB 배지와 혼합되었고 TBN emulsion 위하여 sonication을 수행하였으며 1.6 %의 Bacto agar를 첨가하였다.

1-4. 게놈 DNA(Genomic DNA) 추출

Vibrio sp. GMD 509로부터 genomic DNA의 추출은 Hancock Lab (<http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/showmethod.php?methodid=15>)에 묘사된 방법을 응용하여 수행하였다. *Vibrio sp.* GMD 509를 ZoBell 액체 배지 100 ml에 36 시간 배양 후 균만 회수하여 TNE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) 5 ml에 현탁하였다. 0.5 M EDTA(pH 8.0) 0.6ml 과 20mg/ml lysozyme 0.2 ml를 넣고 얼음에 15 분간 방치한 후에 37 °C 배양기에서 약 1 시간 동안 반응시킨다. 반응 후에 10 % SDS 0.7 ml과 50 ug/ml Proteinase K (Promega, U.S.A) 0.2 ml를 넣고 65 °C에서 30 분간 반응 후 Phenol : Chloroform 정제를 수행하였다. 상등액에 1/10 부피의 3 M NaOAc와 2 배 부피의 100 % 에탄올 첨가 후 -80 °C에서 30 분간 반응 시키고 원심분리 하여 DNA를 침전 시켰다. 70 % 에탄올로 세척하였고 건조 후에 100 μl의 증류수에 현탁하였다. 추출된 DNA는 1 % TAE gel을 이용하여 확인하였다.(도 3)

1-5. 게놈 라이브러리의 구축

Vibrio sp. GMD 509의 genomic 라이브러리는 pBluescript sk II (+) vector에 의하여 구축되었다. *Vibrio sp.* GMD 509로부터 genomic DNA를 분리하여 추출된 genomic DNA를 제한 효소인 HindIII를 사용하여 무작위로 잘라서 약 2-7 kb

의 크기의 DNA 단편들을 low melting temperature agarose gel로 분리하였다. 분리된 단편을 동일한 제한 효소 사이트로 자른 pBluescript sk (+) II vector와 결합하였다. 결과적으로 얻어진 플라스미드를 E. coli DH5a에 E. coli DH5a competent cell에 heat shock 처리하여 형질전환하여, genomic library를 구축하였다.(도 4)

실시에 2: 클로닝된 에스테라아제 유전자 특성 분석

2-1. *Vibrio sp.* GMD 509의 genomic 라이브러리로부터 에스테라아제 유전자의 탐색

상기에 의해서 얻어진 형질전환체를 E. coli DH5a 형질전환체를 100 ug/ml의 ampicillin, 0.1 M IPTG, 그리고 50 mg/ml X-gal을 포함하는 LB-TBN 고체배지에 도말하여 37 °C에서 48 시간 동안 배양하였다. 배지에 배양한 전체 760,000개의 형질전환체 중 기질을 분해하여 투명환을 생성하는 흰색 점락을 선별하였다. 선별된 clone을 100 ug/ml의 ampicillin과 0.1 M IPTG가 함유된 LB 배지에서 24 시간 배양한 후, 원심 분리하여 전체 세포를 얻었다. 해당 형질전환체에 함유된 플라스미드를 pLSY으로 명명하였다.

2-2. DNA 서열분석

클로닝된 형질전환체중 가장 활성이 좋은 형질전환체를 대상으로 여러 가지 제한 효소를 이용하여 크기를 확인하였으며, 전체 염기 서열 분석을 수행하였다. 전체 염기 서열 분석은 LB-TBN plate에서 환의 크기가 가장 큰 pLSY 플라스미드를 특성분석을 위해 분리하고, 제한효소 HindIII 로 처리하여 약 2.1 kb 크기의 절편을 획득한 후, 획득된 2.1 kb의 전체 DNA 염기서열을 결정하는 방식으로 수행하였다. T7 primer와 T3 primer를 이용하여 1번째 염기 서열을 얻었으며, 그 안쪽 부분은 specific primer를 제작하여 전체 염기 서열 분석을 수행하였다. Deduced amino acid sequence는 단백질 상동성과 domain composition 분석을 위하여 complete nonredundant protein sequence database (NCBI)를 이용하였다. Potential signal peptides는 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) program을 이용하였고, 단백질 서열의 비교는 CLUSTALW program을 이용하였다.

염기서열 분석 결과 에스테라아제 유전자라고 추정되는 부분에서 1,017 bp로 구성된 해독틀(open reading frame(ORF))을 포함하고 있으며 338 개의 아미노산으로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한, 약 20 번째 부분에 signal sequence 유사 부분도 확인하였다. 분석결과 예측된 해독틀(open reading frame(ORF))은 338 개 아미노산으로 구성된 37 kDa의 단백질에 대한 정보를 함유하고 있는 것으로 분석되었다. 시작 코돈(initial codon)은 ATG였고, TAA로 종결되었다. 리보솜 결합 가능 부위(potential ribosome binding site(TTGGAGT))가 시작 코돈(initial ATG codon)으로부터 17 bp 앞쪽에서 발견되었다. 함유된 단백질 정보의 분석결과 보통 알려진 에스테라아제의 활성부위에 일반적으로 보존되어 있는 GHS162LG 모티프(GHS162LG motif(Gly-X-Ser-X-Gly))가 발견되었다.

또한 에스테라아제 활성에 필수적인 세린, 아스파르트산, 히스티딘이 단백질 서열로부터 분석되었다(S162, D263, H294). 이러한 사실로부터 에스테라아제 활성에 필요한 필수적인 서열은 보존되어 있지만 기존의 알려진 에스테라아제와는 상당히 다른 신종의 에스테라아제로 사료되었다. BLASTP를 이용한 아미노산 서열 분석의 결과, *Pseudomonas aeruginosa*의 predicted diene lactone hydrolase와 약 40%의 상동성을 확인하였다. 또한 E. coli의 α/β superfamily hydrolase (28% 상동성), *Pyrococcus furiosus*의 lysophospholipase (22% 상동성), *Bacillus licheniformis*의 Esterase/lipase/thioesterase (32% 상동성), *Streptomyces sp.*의 triacylglycerol acylhydrolase (16% 상동성), *Prochlorococcus marinus*의 Esterase/lipase/thioesterase active site (17% 상동성), *Legionella pneumophila*의 hydrolase (30% 상동성)등 여러 균주 유래의 리파아제 및 에스테라아제와 상동성을 보이는 것으로 추정하여, 에스테라아제 유전자임을 확인하였다.(도 5) 도 5는 *Vibrio sp.* GMD 509에서 추출된 에스테라아제와 다른 리파아제간의 아미노산 서열의 비교한 것으로 lane 1은 esterase GMD 509의 서열이고, lane 2는 diene lactone hydrolase *Rhodospirillum rubrum*의 서열이며, lane 3은 Esterase/lipase/thioesterase family active site *Prochlorococcus marinus* MIT 9313의 서열이고, lane 4는 lipase (putative secreted protein) *Streptomyces coelicolor* A3(2)이다.

실시에 3: 재조합 단백질 생산 system 확립

3-1 발현 system 확립

클로닝된 (S)-오픈록사신 프로필 에스테르의 선택적 활성을 보인 에스테라아제의 발현을 통한 재조합 단백질의 조제와 대량생산을 위해 pET24a(+) system을 이용하였다. 용이하게 순수분리하기 위해 His-Tag을 접합시켰고, NdeI, XhoI site를 포함하는 primerpET24a(+)의 NdeI, XhoI site에 NdeI, XhoI site를 포함하는 primer를 (Forward : 5'-CGACCCGGCATATGAATTGGACACATTTACTGTTTCATACCTC - 3', Reverse : 5' -

CTCCACATCTCGAGTCGATTTAGAAAGTCAACAATGTCATTCAATATC - 3') 제작하고 에스테라아제 유전자의 해독틀을 포함한 pLSY를 주형으로 하여 Ex-taq 폴리머레이즈(polymerase)(Takara, Co.)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 얻은 결과물을 벡터와 결합한 후, DH5α에 형질전환 하여 후보군을 얻고, 이로부터 DNA 플라스미드 프랩(DNA plasmid prep)하여 이를 시퀀싱한 후, 돌연변이나, 해독틀 돌연변이(frame shift)가 일어나지 않은 완전한 DNA가 클로닝 되었음을 확인하였다. 이후 BL21(DE3) 균주에 형질전환하여 LB medium에 kanamycin (100 ug/ml)이 첨가된 medium에서 IPTG로 발현하였다(도 6). 도 6에 나타난 것과 같이 pET24a(+)에 의해 발현된 재조합 단백질은 성공적으로 잘 발현되었다.

3-2 재조합 단백질의 생산

pET24a(+)에 클로닝된 에스테라아제 유전자의 발현을 위해 LB 배지에 카나마이신 (100 ug/ml)이 첨가된 배지에서 종배양(seed culture)한 후 동일한 배지(medium)에 1 % 접종하여 3 시간 배양 후 IPTG를 최종 1 mM의 농도로 첨가하여 18 °C에서 18 시간 동안 발현시켰다.

3-3 재조합 단백질의 분리

다량의 에스테라아제를 분리하기 위하여 E. coli에서의 발현 system을 이용하였다. 순수분리의 용이를 위해 His-Tag을 접합시켰고, His-tag 분리는 His-bind purification kit (Novagene, Co.)를 이용하여 분리하였다.

실시예 4: Vibrio sp GMD 509의 에스테라아제의 반응 특이성 분석

4-1 최적 온도 분석

정제된 효소의 최적 반응 온도를 알아보기 위하여, 효소 반응 온도를 5~70°C 범위로 조정하여 각 온도에서의 활성을 측정하였다. 측정 방법은 정제된 효소 10 ul과 기질인 10mM p-nitrophenyl caproate (C6) 10 ul, 50 mM Tris·HCl 980 ul를 섞은 후 5~70 °C에서 5분간 반응 후 405 nm에서 흡광을 측정한다.

측정 결과, 30°C에서 최적 활성을 보였고, 5°C에서는 20 %, 40 °C에서는 74 %로 40도 이후에는 효소 활성이 큰 폭으로 떨어지는 것을 확인하였다. 대부분 균주의 성장 온도보다 약 10~15 °C 정도 높은 온도에서 최적 활성을 보이는 반면, GMD 509의 경우, 성장 온도가 25°C인 반면 비슷한 온도에서 최적 활성을 나타내는 것을 확인하였다. (도 7)

4-2 최적 pH 분석

정제된 효소의 최적 반응 온도를 알아보기 위하여, 효소 반응 pH를 pH 4에서 11범위로 조정하여 각 pH에서의 활성을 측정하였다. 최적 pH를 측정하는 방법은 정제된 효소 10 ul과 기질인 10 mM p-nitrophenyl caproate (C6) 10 ul, 50 mM의 여러 가지 범위의 buffer (pH 4~11) 980 ul를 섞은 후 30 °C에서 5 분간 반응 후 405 nm에서 흡광을 측정하는 방법을 사용하였다. 사용한 buffer는 sodium acetate (pH 4~6), sodium phosphate (pH 6~7), Tris-HCl (pH 7~8.5), CHES (=2-[N-cyclohexylamino]ethanesulfonic acid; pH 8.5~10), CAPS(=3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid; pH 10~11)를 각각의 pH에 맞도록 조정하여 사용하였다.

에스테라아제 활성에 미치는 반응 용액의 pH의 영향을 조사한 결과, pH 8.5에서 최적의 활성을 보였으며 pH 9.0에서는 96%, pH 9.5에서는 70%의 활성을 보였으며 pH 10에서는 34%로 급감하는 성향을 보였다. pH 8.0 ~ 9.5 사이의 범위에서 활성을 보이는 약 알칼리성 에스테라아제임을 확인하였다. (도 8)

4-3 기질 특이성 분석

정제된 효소의 기질 특이성을 알아보기 위하여, 효소 반응의 기질을 변경하여 각 기질마다의 활성을 측정하였다. 기질에 대한 활성의 측정 방법은 정제된 효소 10 ul과 기질인 10 mM p-NP series (C2, C4, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18) 10 ul과 50 mM Tris-HCl 980 ul를 섞은 후 최적 온도인 30 °C에서 5 분간 반응 후 405 nm에서 흡광을 측정하는 방법을 사용하였다. p-NP C2~C14의 기질은 acetonitrile을 첨가하여 제조하였으며, p-NP C16~C18의 경우, 쉽게 녹지 않기 때문에 증류수와 0.1% Triton X-100을 섞어서 제조하였고, 열을 가하여 녹인 후 사용하였다.

측정 결과, 에스테라아제, 리파아제 모두에서 높은 기질 특이성을 나타내는 tributyrate (C4)에서 가장 높은 활성을 보였으며 C2에서는 24 %, C6에는 64%의 활성을 보였으며, C10 기질 이상의 활성은 없는 것으로 확인되었다. 보통의 에스테라아제의 경우 tributyrate에서 높은 활성을 보이는 것 외에 C10개 미만의 짧은 체인을 주로 분해하며, 리파아제의 경우 마

찬가지로 tributyrate에서 가장 높은 활성을 보이며 긴 체인에서 약간의 활성을 보이는 것을 확인할 수 있다. *Vibrio sp* GMD 509의 경우도 주로 짧은 체인만을 분해하여 통상의 에스터라아제와 같은 결과를 나타내었다. LB-TBN plate와 LB-TCN plate에서 활성을 테스트 해 본 결과에서도 전혀 활성을 보이지 않아 *Vibrio sp* GMD 509의 에스터라아제도 보통의 에스터라아제와 동일한 기질 특성을 보임을 나타냄이 확인되었다. (도 9)

4-4 오픈록사신 에스테르에 대하여 광학 특이적인 효소의 활성 탐색

pLSY 플라스미드를 대량 발현시켜 얻은 단백질을 이용하여 오픈록사신 에스테르에 광학 선택적인 에스터라아제 효소 반응을 확인하였다. 0.1 M 인산완충용액을 제조하였으며 기질로는 (R),(S)-오픈록사신 프로필 에스테르와 (R),(S)-오픈록사신 부틸 에스테르를 사용하였다. 인산완충용액 1 ml에 5 mM의 오픈록사신 프로필 에스테르 혹은 오픈록사신 부틸 에스테르와 효소 500 ul (130 ug)을 넣어 효소 반응을 개시하였다. 효소 반응은 30 °C 에서 48 시간 동안 수행한 후, 100 °C 끓는 물에 10 분간 정치하여 효소의 반응을 정지시키고 동량의 메탄올을 첨가한 뒤 vortexing하였으며 원심 분리하여 그 상등액을 회수하여 레보플록사신분석에 사용하였다. 분석은 Hewlett Packard-Model 1050 HPLC system을 사용하여 330 nm에서 측정하였으며 고정상으로 Shiseido사의 CAPCELL PAK C18 (250 mm x 4.6 mm) column을 사용하였다. 그리고 이동상은 증류수와 메탄올을 85:15로 혼합하여 9 mM의 L-이소류신(L-isoleucine)과 3 mM의 copper(II) sulfate pentahydrate를 첨가한 뒤 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다.

(R),(S)-오픈록사신 프로필 에스테르의 경우, (S)-오픈록사신 프로필 에스테르를 선택적으로 분해하여 결과적으로 20%의 eep(the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈록사신 (레보플록사신)을 생성하는 것을 확인하였다. 또한, (R),(S)-오픈록사신 부틸 에스테르도 마찬가지로 (S)-오픈록사신 부틸 에스테르를 선택적으로 분해하였으며 결과적으로 51%의 eep(the enantiomeric excess of the product)로 (S)-오픈록사신 (레보플록사신)을 생성하는 것을 확인하였다. (도 10)

본 발명은 상술한 실시예에 한정되지 않으며, 첨부된 특허청구범위에 의해 정해지는 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 많은 변형이 가능함은 물론이다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명인 광학선택적 가수분해능을 가진 에스터라아제의 효소 반응 최적화를 통해 오픈록사신으로부터 레보플록사신만을 대량으로 생산할 수 있다면, 본 발명은 새로운 생촉매 (biocatalyst)로서 유용하게 사용될 수 있을 것이고, 나아가 의약품 산업에도 크게 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1는 에스터라아제가 트리아실글리세롤을 글리세롤과 지방산으로 가수분해하는 반응식을 나타내고,

도 2는 본 발명의 일례에 따른 *Vibrio sp* GMD 509를 스크리닝하는 사진이며,

도 3은 본 발명의 일례에 따른 *Vibrio sp* GMD 509 게놈 DNA를 보여주는 전기영동 사진이고,

도 4는 본 발명의 일례에 따른 *Vibrio sp* GMD 509 게놈 DNA 라이브러리의 제조를 나타내는 모식도이며,

도 5는 본 발명에 따른 *Vibrio sp* GMD 509에서 추출된 에스터라아제와 다른 리파아제간의 아미노산 서열을 비교한 것이고,

도 6은 에스터라아제 유전자를 pET24a(+)에 의해 발현된 재조합 단백질의 발현정도를 나타내는 전기영동 사진이며,

도 7은 본 발명에 따른 *Vibrio sp* GMD 509에서 추출된 에스터라아제의 온도에 따른 활성을 나타낸 것이며,

도 8은 본 발명에 따른 *Vibrio sp* GMD 509에서 추출된 에스터라아제의 pH에 따른 활성을 나타낸 것이고,

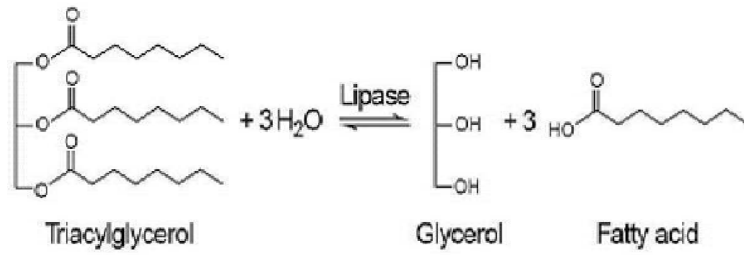
도 9는 본 발명에 따른 *Vibrio sp* GMD 509에서 추출된 에스터라아제의 특정 기질에 대한 활성을 나타낸 것이며,

도 10은 본 발명에 따른 *Vibrio sp* GMD 509에서 추출된 에스테라아제의 광학특이적 가수분해 활성을 나타낸 것으로 S Peak는 (S)-오픈록사신 (레보오픈록사신)의 활성을, R Peak는 (R)-오픈록사신을 나타낸 것이고,

도 11은 본 발명에 일례에 따른 *Vibrio sp* GMD 509 16S rDNA의 염기 서열이다.

도면

도면1



도면2

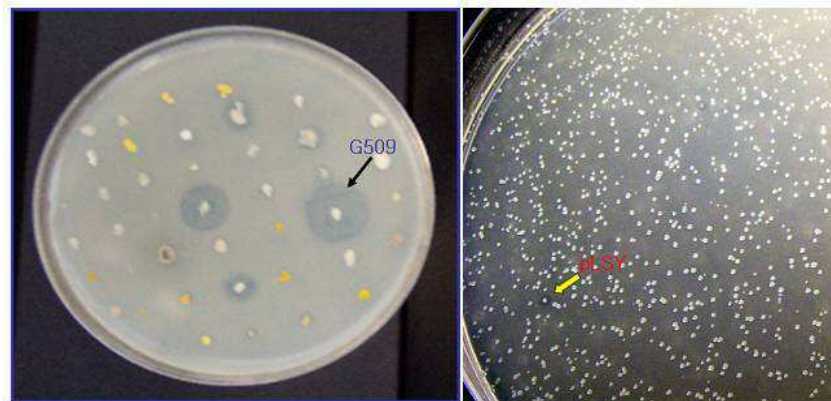
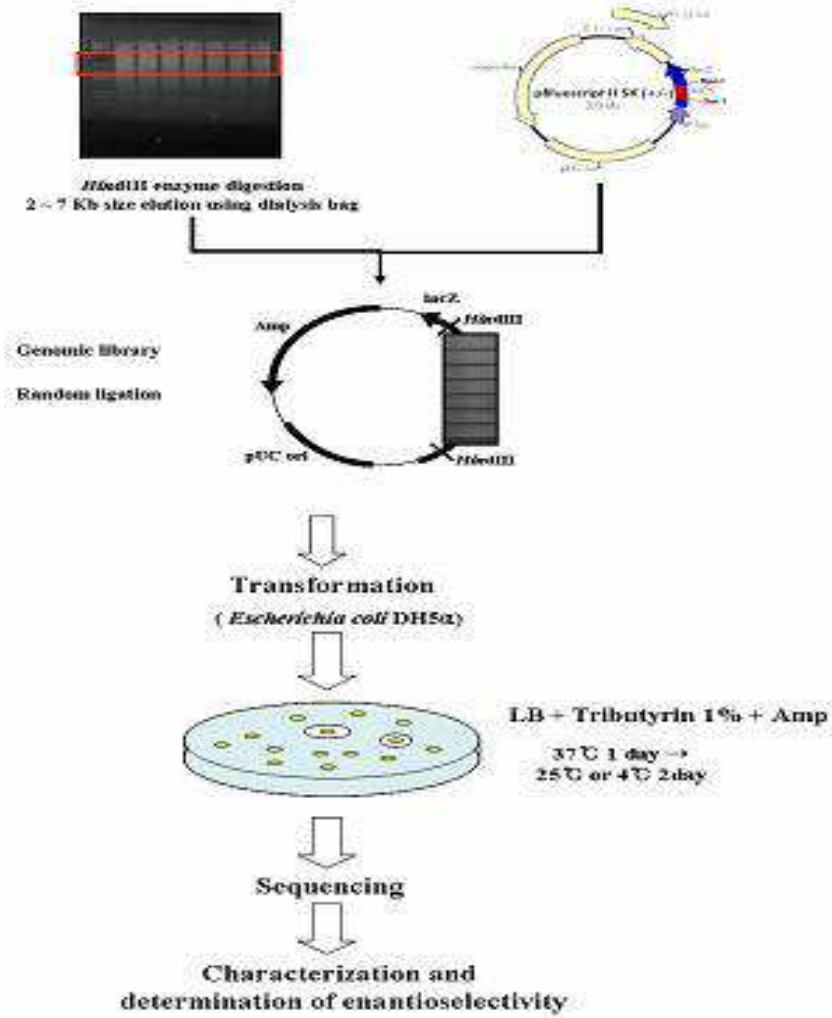


Fig. Screening of lipase activity of strain G509

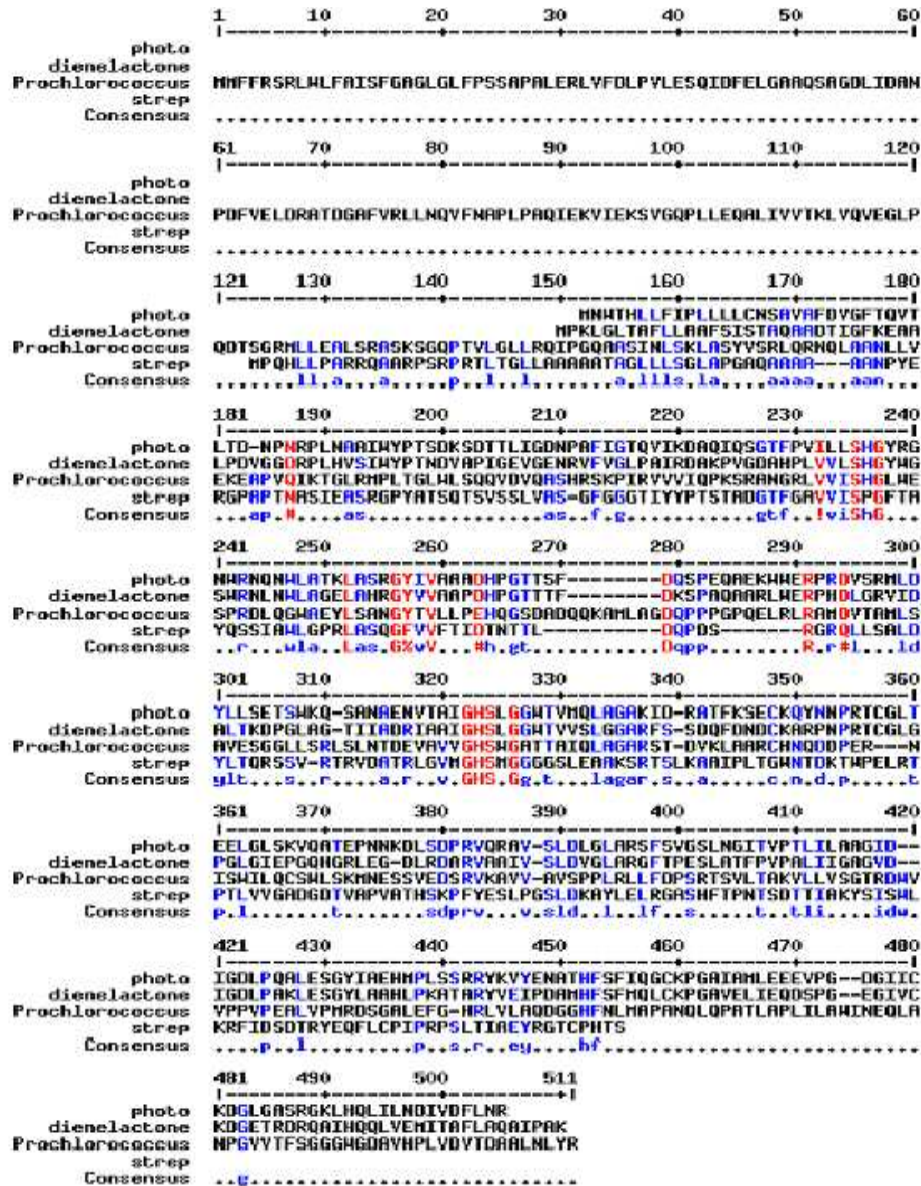
도면3



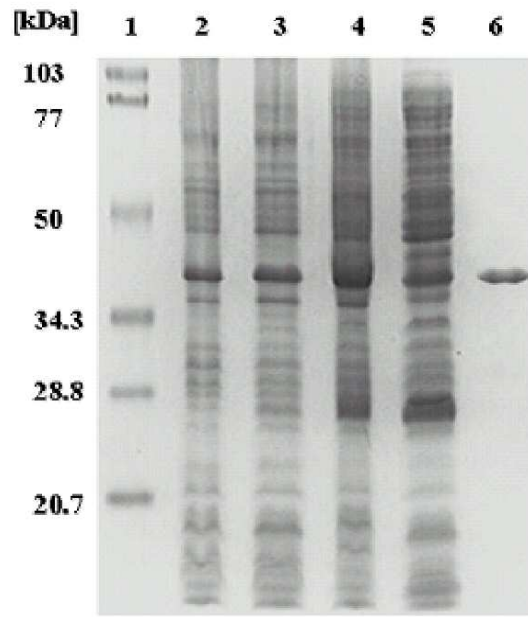
도면4



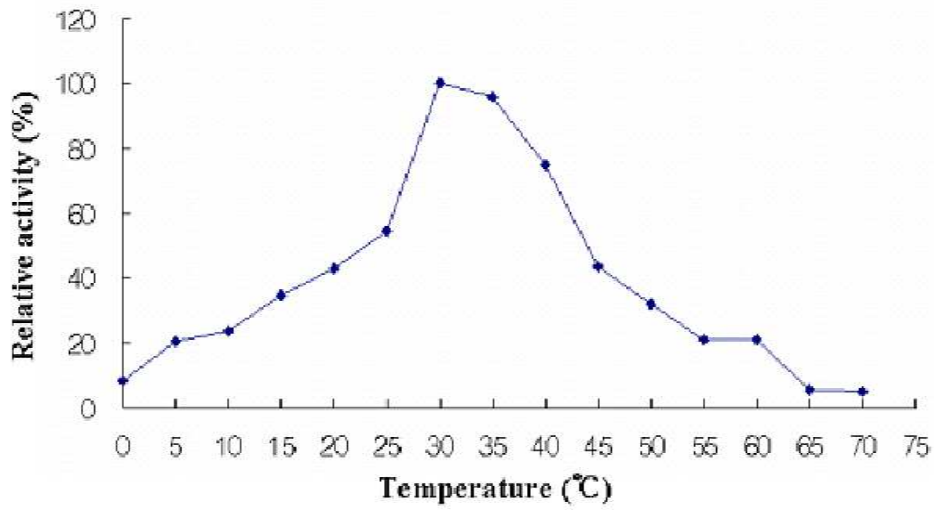
도면5



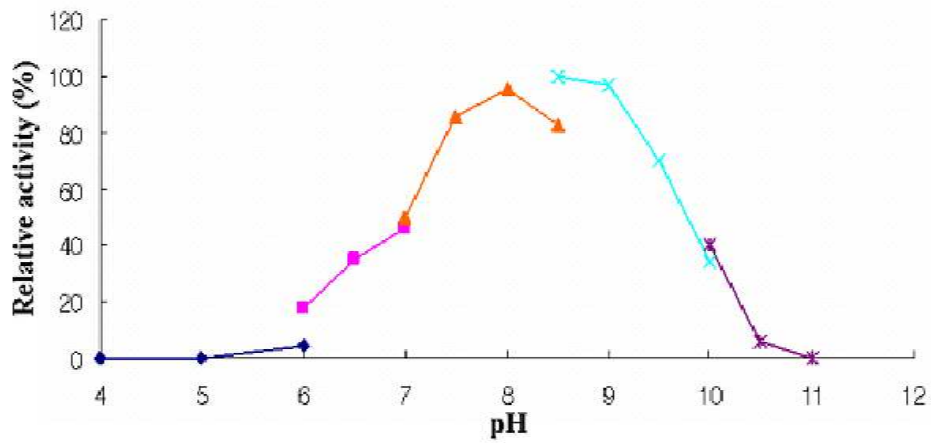
도면6



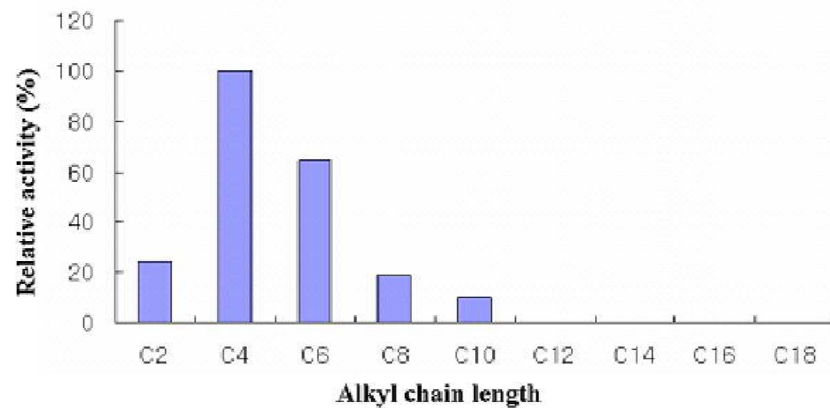
도면7



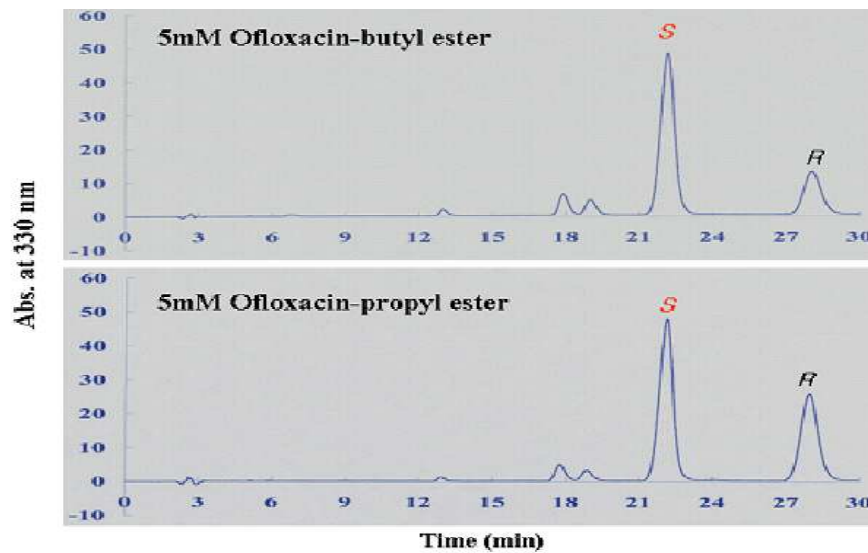
도면8



도면9



도면10



도면11

Vibrio sp GMD 509의 16S rDNA

GGTCAGATTGAATGCGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACACT
AACAAATCCTTCGGGTGCGTTAATGGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA
AATTGCCCTTGA TGTGGGGGATA ACCATTGGAAAACGATGGCTAATACCGCATAATGCCCTACG
GGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAAGATATGCCCTAGGTGGGATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
ACACTGGAACTGAGAAACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGCAC
AATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTGAAA
GTACTTTTCAGTTGTGAGGAAGGGGGTGTAGTTAATAAGCTGCATCTCTTGACGTTAGCAACA
GAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTCATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCG
GGGCTCAACCTCGGAACTGCATTTGAAACTGGTGAAGTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAG
AATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGTGGCGAAGGCGG
CCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCAACGCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTT
CGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGAGATTAAAACCTCAAAT
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAG
AACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAGCCAGCGGAGACGCGAGGTGTGCCCTTCGGGAGC
TCTGAGACAGGTGCTGCAATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAATGTTGGGTAAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTCATGTCGGGAACTCCAGGGAGACT
GCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATGGCCCTTACGAGTA
GGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGCATACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAAGCGA
ATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA TGAAGTCGGA
TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTCAACACATGGGAGTGGGCTGCAA AAGAAGTGGGTAGTTTAACTTCGGGGAGGA
CGCTCAACACTTTGTGGTTCA TGA CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAGGGG

서열목록

서열목록 전자파일 첨부