

세 가지 균주 유래의 N-acetylneuraminate lyase 비교;  
*Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium perfringens*.

이정오, 김병기♣

서울대학교 응용화학부

전화 (02) 880-7528, (02) 874-1206♣

The N-acetylneuraminate lyase(NALase) from *Escherichia coli* was cloned and it was compared to that from *Haemophilus influenzae* and *Clostridium perfringens*. NALase from *E. coli* was expressed in very high level(about 6U/mg). The ManNAc Km value of three enzymes was almost the same. Pyruvate inhibited the NALase from *E. coli* at lower concentration than the others and the NALase from *H. influenzae* was inhibited by GlcNAc in lower level than the others. The crude extract has about 30 times more activity than the cell for the substrate and product diffusion limit problem. The pH stability of three enzymes at pH 11 was also checked for its importance in the direct synthesis of Neu5Ac from GlcNAc and pyruvate at high alkaline condition.

### 서론

N-acetyl-D-neuraminic acid (Neu5Ac)는 당지질, 당단백질의 말단에 위치하여 세포간 상호작용, 세포간 고착, 생물학적인 반응에 관여하는 amino sugar의 일종이다. 또 Neu5Ac는 암세포에서 더 많은 양이 들어있어서 암의 진단 지표로도 응용할 수 있다. Neu5Ac는 자연적으로는 식용새둥지물질, 우유, 달걀 노른자등에서 얻고, 화학적으로 합성을 하기도 하는데 화학합성은 protection, 반응, deprotection, purification등 복잡한 단계를 거쳐야 되기 때문에 위치특이성이 높은 효소합성이 유리하다. Neu5Ac는 Neu5Ac lyase를 이용하여 N-acetylmannosamine(ManNAc)과 pyruvate를 기질로 사용하여 합성하는데 ManNAc는 비싼 물질이어서 GlcNAc을 epimerization시키는 단계가 하나 더 필요하다. GlcNAc에서 ManNAc를 만드는 방법은 지금까지 high alkaline condition (pH 10.5이상)에서 epimerization(1)하는 것과 GlcNAc 2-epimerase를 이용하여 중성조건에서 epimerization(2)하는 두 가지 방법이 제시되고 있다.

전환율을 높이는 다른 한 방법으로 값이싼 pyruvate를 과량으로 첨가해주는데 pyruvate는 최종산물인 Neu5Ac와 pKa 값이 매우 비슷하기 때문에 Neu5Ac의 분리에 어려움이 있다. 이를 해결하기 위한 방안으로 합성 후 잔존하는 pyruvate를 pyruvate decarboxylase를 써서 제거하기도 한다.

Neu5Ac lyase는 지금까지 *E. coli*, *T. vaginalis*, *H. influenzae*, *C. perfringens* 등에서 클로닝 되었다. 분리정제한 효소로 실험한 결과 *H. influenzae* 유래의 NALase가 *E. coli*보다 2-3배정도 specific activity가 더 높다는 연구결과도 있다. 이 논문에서는 Neu5Ac를 효소합성하는데 더 효과적인 촉매 형태를 알아보기 위해 세 가지 효소 중 *E. coli*, *H. influenzae*, *C. perfringens* 유래의 효소의 성격을 규명하고 세포와 세포추출물을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

GlcNAc, ManNAc, Neu5Ac는 Sigma에서 구입하였고, sodium pyruvate는 Boehringer mannheim에서 구입하였다. 다른 시약들은 모두 분석수준의 시약들이다.

### *E. coli* 유래의 NALase 클로닝

Genomic DNA는 *E. coli* C600에서 일반적인 방법대로 준비했고, 이미 발표된 *E. coli* 유래의 NALase 유전자 순서에 따라 제작한 primer를 가지고 PCR을 수행했다. PCR로 증폭한 유전자 부분을 NcoI과 XhoI으로 자르고 똑같은 제한효소로 자른 pET15b 벡터에 T4 DNA ligase를 사용하여 붙여 넣어 pNAN15b를 만들었다. *Haemophilus influenzae* 유래의 NALase를 만드는 유전자(3)는 pkktac vector에 들어간 형태로 호주의 Glenn G. Lilley한테서 받았고, *Clostridium perfringens* 유래의 nanA는(4) Roland schauer 그룹에서 pET14 벡터에 들어간 형태로 받았다. 세 가지 재조합유전자는 모두 *E. coli* BL21- $\lambda$ DE3에 transformation시켰다.

### NALase 생산

세 가지 재조합유전자를 가진 *E. coli* BL21- $\lambda$ DE3를 15ml LB(100ppm ampicillin) 30°C에서 키우다가 OD=1에서 IPTG(0.5mM)로 induction시켰고 7h 후에 harvest하여 50mM, pH 7.2 phosphate buffer로 두 번 씻은 후 2.5ml, 50mM, pH7.2 phosphate buffer에 재부유한 후, 음파분쇄하여 세포추출물을 제조했다.

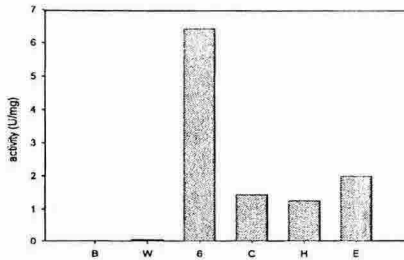
### NALase 활성화 측정

Neu5Ac 분해방향의 활성화는 Neu5Ac 10mM을 기질로 사용하여 37°C에서 반응시킨 후 생성된 ManNAc와 pyruvate 농도를 측정하여 알아보았다. 이외의 모든 실험은 ManNAc와 pyruvate를 기질로 사용하여 Neu5Ac가 생성되는 초기속도를 측정함으로써 상대적인 활성도를 비교하였다.

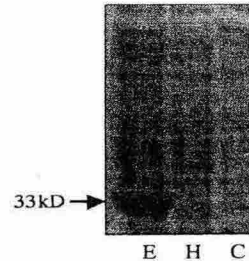
### HPLC 분석조건

AmineX HPX-87H column을 사용하였고, 40°C에서 전개액은 4mM 황산수용액을 0.6ml/min으로 흘려보내 210nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰



**Fig. 1** NALase activity assayed in the direction of Neu5Ac decomposition  
 B: *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3), W: *E. coli* C600, G, C, H and E are *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) with pET15b+nanA from *E. coli*, pET14b+nanA from *C. perfringens* pkktac+nanA from *H. influenzae* pkktac+nanA from *E. coli* respectively. All strains were induced at the OD value of 1 with IPTG 0.5mM and harvested 7h after induction. The initial Neu5Ac concentration was 10mM.



**Fig. 2** SDS-PAGE: crude extract of *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) with pNAN15b, H: crude extract of *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) with pkktac+nanA from *H. influenzae*, C: *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) with pET14b+nanA from *C. perfringens*

Fig 1., Fig 2에서 볼 수 있듯이 클로닝한 NALase가 발현이 잘됨을 볼 수 있다. 다른 두 NALase가 host strain인 *E. coli* 입장에서 볼 때 외래단백질이기는 하지만 pkktac 벡터에서 발현되는 *E. coli* 유래의 NALase의 specific activity와 비교해보면 pET15b 벡터가 NALase 발현에 더 효과적임을 볼 수 있다.

세 효소의 ManNAc 농도를 변화시키면서 Km 값도 측정했는데 모두 330mM 정도의 비슷한 수치였다(Table 1). Fig. 3에서 볼 수 있듯이 pyruvate에 의한 활성저해현상도 관찰했는데 *E. coli* 유래의 NALase가 pyruvate 저농도에서 저해되는 특징을 보인다. GlcNAc에 의한 활성저해는 서로 비슷한 양상을 보이는데 *H. influenzae*가 활성저해를 가장 적게 반응을 볼 수 있었다(data not shown). Neu5Ac를 GlcNAc 2-epimerase를 사용하지 않고 GlcNAc와 pyruvate로부터 NALase를 사용하여 직접 합성하기 위해서는 pH 10이상에서 반응을 수행해야 된다. 따라서 NALase pH 10이상에서 안정성이 상당히 중요한 의미를 갖는데 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 *H. influenzae* 유래의 NALase가 pH 10.5에서 안정성이 가장 좋았다.

Table 1. ManNAc Km value of three different source.

NALase	<i>E. coli</i>	<i>H. influenzae</i>	<i>C. perfringens</i>
Km(mM)	333	334	331

세포추출물과 세포에 대해서도 기질저해를 살펴보았는데 예상할 수 있듯이 세포가 세포추출물보다 저해 받는 양상이 늦게 나타나는 경향을 볼 수 있었다. 활성도는 기질과 생성물의 이동제한 때문에 세포추출물이 세포보다 약 30배 이상 활성도가 높게 나타나는 것을 볼 수 있었다.

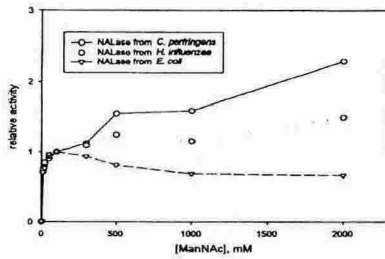


Fig. 3. Pyruvate inhibition mode of NALases from three different sources. Each activity measured at the different pyruvate concentration were normalized by the activity measured at the pyruvate concentration of 100mM.

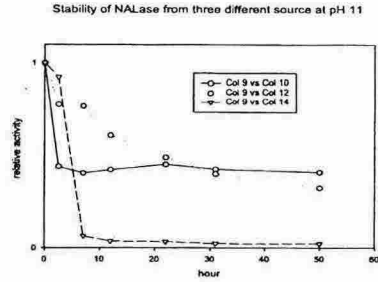


Fig. 4 Stability of NALase from three different source

## 요약

pNAN15b와 *E. coli* BL21( $\lambda$  DE3)를 써서 클로닝한 *E. coli* 유래의 NALase는 높은 수준으로 발현이 되었다. *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Clostridium perfringens* 세 가지 균주 유래의 NALase를 비교해본 결과 *E. coli* 유래의 NALase가 발현이 잘되어 전체 활성도는 높았지만 활성저해를 받는 경향이나 pH 11에서의 안정성을 보면 *H. influenzae* 유래의 NALase가 Neu5Ac 합성에 더 유리한 특성을 갖고 있어서 *H. influenzae* 유래의 NALase를 *E. coli*에서 충분히 발현할 수 있다면 *H. influenzae* 유래의 NALase가 더 효과적이라고 할 수 있다.

## 참고문헌

1. M. Mahmoudian, "An efficient process for production of N-acetylneuraminic acid using N-acetylneuraminic acid aldolase" (1997), *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 393-400
2. Isafumi Maru, "Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acyl-D-glucosamine-2-epimerase and N-acylneuraminate lyase", (1998), *Carbohydrate Research*, 306, 575-578
3. Glenn G. Lilley "Expression in *Escherichia coli* of the Putative N-Acetylneuraminate Lyase gene (*nanA*) from *Haemophilus influenzae*: Overproduction, Purification, and Crystallization", (1997), *Protein Expression and Purification*, 12, 295-304
4. Christina Traving, "Cloning, sequencing and expression of the acylneuraminate lyase gene from *Clostridium perfringens* A99", (1997), *Glycoconjugate journal*, 14, 821-830