

Enzymatic *in vitro* glycosylation using peptide-*N*-glycosidase F

이지연, 박태현

서울대학교 응용화학부

전화 (02) 880-8020, FAX (02) 875-9348

Abstract

The possibility of the enzymatic *in vitro* glycosylation using peptide-*N*-glycosidase F was examined. Oligosaccharide chains in the glycoproteins are important for the biological activity, solubility, immunogenecity, recognition, and prevention of degradation. After 4 h incubation of deglycosylated glycoprotein with excess glucose oligomer and ammonia in acetone at 50°C, upper shift of protein band was observed on SDS-PAGE. And the different deglycosylation characteristics of glucose oxidase and fetuin were investigated.

서론

여러 의약품 단백질들이 재조합 DNA 기술로 생산되고 있는데 이 중에서 많은 경우가 당단백질이다. Glycosylation 은 그들의 생물학적 활성, 용해도, 면역작용, 인지작용, 단백질 분해효소에 의한 분해 방지 등의 역할을 한다. 재조합 단백질 생산에 많이 이용되는 원핵세포들은 대량생산의 장점을 지니지만, 번역 후 과정들을 가지지 못함으로 인해서, EPO 나 β -interferon 과 같은 당단백질은 *E.coli* 에서보다 포유동물세포에서 생산되었을 때 훨씬 높은 생물학적 활성을 보인다. 포유동물세포 시스템은 당단백질 생산이 가능하지만, 생산단가가 높고 수율이 낮다. 원핵세포 시스템에서 nonglycosylated 형태의 단백질을 대량생산 한 후, *in vitro* 상에서 glycosylation 할 수 있다면 매우 효율적인 당단백질의 생산이 가능하므로 이를 위하여 peptide-*N*-glycosidase F 를 사용하여 *in vitro* 상에서의 효소를 사용한 glycosylation 의 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

효소와 당단백질

PNase F (peptide-*N*-glycosidase F, peptide- N^4 (*N*-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase F, EC 3.5.1.52)는 Boehringer Mannheim 의 제품을 사용했다. 1 unit 은 1 nmol 의 dansyl fetuin glycopeptide 가 37°C, pH 7.2 에서 1 분 동안 가수분해되는 효소 활성으로 정의된다. Glucose oxidase (from *Aspergillus niger*, Type X-S), fetuin (from fetal calf serum)와 periodic acid Schiff (PAS) staining 에 사용된 reagents 들은 Sigma 에서 구입하였다. Glucose oligomer (MALTRIN[®] M100)는 Grain Processing Co 의 제품을 사용하였다.

Deglycosylation

Glucose oxidase 의 denaturation 을 위해서는 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 0.1%되게 첨가하고 100°C에서 5 분 동안 끓여주었다. Deglycosylation 은 1~2 μ g 의 당단백질에

0.2~0.4U 의 PNGase F 를 넣어 37°C 에서 4~20 시간동안 incubation 하였다. Buffer 는 25mM EDTA 가 첨가된 100mM sodium phosphate, pH 7.2 를 사용하였다. Deglycosylation 여부는 SDS-PAGE 후 Coomassie Blue 와 PAS staining 방법을 사용하여 분석하였다.

Glycosylation

Glycosylation 은 deglycosylation 과정에 의해 얻어진 deglycosylated 단백질을 사용하여 수행하였다. Deglycosylation 후에 진공펌프를 사용하여 물을 제거하였다. 그리고 올리고당이 들어 있는 여러 종류의 용매들을 20 μ l 첨가하고 여러 온도, 기질 농도에서 4~8 시간동안 incubation 하였다.

결과 및 고찰

Deglycosylation

Nonglycosylated 단백질을 얻기 위해서 PNGase F 로 deglycosylation 을 수행하였는데 glucose oxidase 와 fetuin 의 deglycosylation 특성은 매우 다르게 나타났다. Glucose oxidase (GOD)는 native 한 형태로는 deglycosylation 이 일어나지 않지만 SDS 로 denaturation 되었을 때에는 완전한 반응이 일어났다. 이는 탄수화물에 특이적인 PAS staining 으로도 확인할 수 있었다. 이에 반해서 fetuin 은 denaturation 여부에 관계 없이 deglycosylation 이 일어난다(Fig. 1). 일부 당단백질들은 올리고당의 steric hindrance 로 인해 PNGase F 의 접근을 제한하여 native 한 형태로는 deglycosylation 이 일어나지 않는다. Glucose oxidase 는 올리고당의 heterogeneity 로 인해 상하로 넓은 밴드가 나타나지만 deglycosylation 반응을 거치면 가늘고 선명하게 된다. 2 μ g 의 glucose oxidase 는 0.4U 의 PNGase F 에 의해 완전히 deglycosylation 된다.

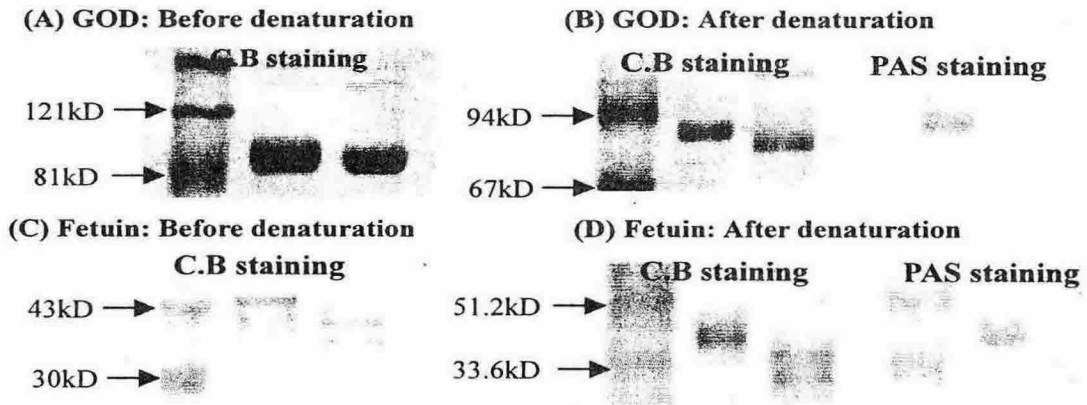


Fig. 1. Deglycosylation of glucose oxidase and fetuin

(A) Lane 1: marker; Lane 2: control (5 μ g GOD); Lane 3: 5 μ g GOD+1.0U PNGase F (B) Lane 1: marker; Lane 2: control (3 μ g GOD); Lane 3: 3 μ g + 0.3U PNGase F, reaction time: 20hr (C) Lane 1: marker; Lane 2: control (1.5 μ g fetuin); Lane 3: 1.5 μ g + 0.3U PNGase F, reaction time: 4hr (D) Lane 1: marker; Lane 2: control (2 μ g fetuin); Lane 3: 2 μ g fetuin + 0.5U PNGase F, reaction time: 20hr

Glucose oxidase 는 분자량 160~170 kDa 정도의 이합체 단백질로 FAD cofactor 두 개가 단단하게 결합되어 있다. 8 개의 잠재적인 *N*-linked glycosylation sites 가 존재하고 일부가 glycosylation 되어 있다. Glucose oxidase 의 올리고당은 high-mannose 형태로 분자량의 11~20% 정도를 차지한다. 따라서 SDS-PAGE 상에서 분자량은 약 80~85 kDa 정도이고 deglycosylation 에 의해 약 5~10 kDa 정도 분자량의 감소가 나타난다.

Fetuin 은 fetal calf serum 에서 발견되는 48 kDa 정도의 당단백질로 3 개의 잠재적인 *N*-linked glycosylation sites 가 있고 이 중에서 약 2.4 개가 glycosylation 되어 있다.

Fetuin 은 denaturation 여부와 관계 없이 deglycosylation 정도는 거의 동일하다. Fetuin 은 하나의 밴드로 나타나지 않는데 이것은 이 실험에 사용된 fetuin 이 완전히 정제된 것이 아니기 때문이라고 생각된다. 또한 과량의 PNGase F 에도 불구하고 deglycosylation 결과를 보면 glucose oxidase 와 달리 하나의 밴드로 나타나지 않았다.

Glycosylation

단일 밴드로 나타난 deglycosylated glucose oxidase 를 사용하여 glycosylation 을 수행하였다. PNGase F 에 의한 역가수분해를 위해서는 두 가지 접근법을 생각할 수 있다. 그 하나는 역반응의 기질인 올리고당과 암모니아의 농도를 증가시키는 것이고, 다른 하나는 반응 온도를 바꾸어 평형을 이동시키는 것이다.

수용액상에서는 과량의 올리고당을 사용하여도 glycosylation 을 관찰할 수는 없었다. 이는 정반응, 즉 deglycosylation 의 기질인 물이 과량으로 존재하기 때문일 것으로 생각되어 물의 함량을 줄이기 위해 다른 용매들을 사용하였다. 첫번째로는 많은 수산기를 지녀서 효소와 기질의 용해도를 증가시킬 수 있다는 장점을 가지는 poly ethylene glycol (PEG) 을 사용해 보았으나, 수용액에서와 마찬가지로 겔에서 밴드의 이동이 관찰되지 않았다. 따라서 glycosidase family 를 이용한 반응에서 용매로 사용되던 acetone, acetonitrile, *t*-butyl alcohol 을 사용하였다. PNGase F 가 이들 용매에서 활성이 있는지를 deglycosylation 반응으로 확인한 뒤에 deglycosylation 된 glucose oxidase 를 이용하여 여러 조건에서 glycosylation 시켜 보았다. 그 결과 acetone 에서 50 °C 로 4 시간동안 과량의 glucose oligomer 를 첨가하여 반응시켰을 때 glucose oxidase 의 밴드가 deglycosylation control 과 비교하여 위로 올라갔음을 알 수 있었다. 이는 glucose oligomer 의 결합으로 인한 glucose oxidase 의 분자량 증가 때문이다.

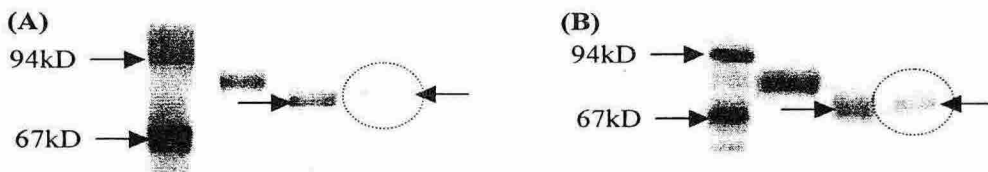
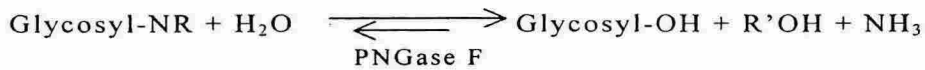


Fig. 2. Reglycosylation of glucose oxidase in acetone

(A) Lane 1: marker; Lane 2: 2µg GOD; Lane 3: deglycosylated GOD (2µg + 0.4U PNGase F); Lane 4: reglycosylated GOD (2µg + 0.4U PNGase F + excess glucose oligomer at 50 °C, rxn time: 4hr) (B) Lane 1: marker; Lane 2: 2µg GOD; Lane 3: deglycosylated GOD (2µg + 0.4U PNGase F); Lane 4: reglycosylated GOD (2µg + 0.4U PNGase F + excess glucose oligomer + NH₄Cl at 50 °C, rxn time: 4hr)



N-당단백질은 위의 반응에 의해서 암모니아가 생성된다. 그러므로 과량의 glucose oligomer 외에 암모니아를 ammonium chloride (NH₄Cl)를 이용하여 첨가해 주었다. 과량의 NH₄Cl을 첨가한 결과 위로 이동된 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

Reglycosylation 된 밴드가 원래 밴드보다 아래에 있는 것은 glucose oxidase에 붙어있던 올리고당보다 reglycosylation에 사용된 올리고당의 분자량이 더 작기 때문이다. 올리고당의 존재 여부는 당단백질의 생물학적인 활성에 매우 중요하지만, 그 정확한 구조는 중요한 요인이 아니라고 알려져 있다. 그렇지만 올리고당의 authentic moiety는 종종 당단백질의 생물학적 활성에서 필수적일 때가 있다. 이를 위해 intact한 올리고당은 화학적 deglycosylation 방법인 hydrazinolysis에 의해서 값싸게 회수될 수 있다.

요약

재조합 단백질 생산에서 문제가 되고 있는 번역 후 과정인 glycosylation을 *in vitro* 상에서 수행하였다. 원핵생물 시스템에서 재조합 단백질을 생산하고, 이후 효소를 이용하여 올리고당을 붙여 원래의 당단백질과 유사한 단백질을 생산하는 것이 산업적으로 경쟁력을 가질 수 있으므로 이를 위하여 glucose oxidase와 fetuin을 모델 당단백질로, 가수분해 효소인 peptide-N-glycosidase F의 역반응 활성을 이용하여 glycosylation을 시도하였다. 역가수분해로의 평형 이동을 위하여 그 기질인 올리고당과 암모니아를 과량 첨가하고, 반응 온도를 높였다. Glucose oxidase의 경우에는 denaturation했을 때 완전한 deglycosylation이 일어났지만, fetuin의 경우에는 그렇지 못했다. Glucose oxidase의 glycosylation은 수용액상에서는 불가능 했지만 acetone을 media로 사용하여 50°C에서 4시간동안 반응시켰을 때 SDS-PAGE 분석 결과 reglycosylation이 일어나 단백질 밴드가 위로 올라감을 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, "Glucose oxidase from *Aspergillus niger*." (1990) *J. Biol. Chem.*, 256(7), 3793-3802
2. Kobata A, "Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins" (1992) *Eur. J. Biochem.*, 209, 483-501
3. Meynial-Salles I, Combes D, "In vitro glycosylation of proteins: An enzymatic approach" (1996) *J. Biotech.*, 46, 1-14.
4. Takasaki S, Kobata A, "Asparagine-linked sugar chains of fetuin: Occurrence of tetrasialyl triantennary sugar chains containing the galβ1→3GlcNAc sequence" (1986) *Biochemistry*, 25, 5709-5715
5. Tarentino AL, Gomez CM, Plummer TH, "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F" (1985) *Biochemistry*, 24, 4665-4671