

Biosynthesis and Applications of TDP-4-keto-6-deoxyglucose

이희찬, 송재경, 류광경, 오종민*, 김병기*, 강선엽**, 이주호**, 심성보**
선문대학교 생체분자재설계연구소(IBR), 서울대학교 응용화학부*, (주)진켄**
전화 (041) 530-2376, FAX (041) 541-1724

ABSTRACT

TDP-glucose 4,6-dehydratase (TDPDH) gene.

*Thermus caldophilus*로부터 TDP-glucose 4,6-dehydratase (TDPDH) 유전자를 분리하고 염기서열을 결정하고, 결정된 염기서열에 해당하는 유전자를 발현벡터에 삽입하고, 발현벡터를 대장균에 형질전환시켜 배양함으로써 TDP-glucose 4,6-dehydratase를 대량 생산하였다. 본 연구의 TDP-glucose 4,6-dehydratase는 주반응으로 TDP-4-keto-6-deoxy-glucose를 합성하고, 여러 가지 당을 디옥시당으로 합성하는 효과가 있다.

서론

본 반응은 주 반응으로 TDP-glucose를 TDP-4-keto-6-deoxy-glucose로 합성하는 반응으로, 부반응으로 glucose, mannose 등 일부 당을 4-keto-6-deoxy-hexose로 합성에 관한 것이다. 고온성 박테리아인 *Thermus caldophilus* GK24로부터 TDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자를 분리하고, 그의 유전자 염기서열을 결정한 후, 발현벡터를 이용하여 대장균을 형질전환시켜 배양함으로써 내열성 TDP-glucose 4,6-dehydratase를 용이하게 대량생산하는 방법에 관한 것이다.

당산화환원효소 (TDP-glucose 4,6-dehydratase)는 TDP-glucose를 NAD^+ 조효소와 함께 산화와 환원반응으로부터 glucose의 C-6이 환원되고 C-4가 산화하여 TDP-4-keto-6-deoxyglucose로 전환하는 촉매로 알려져 있다. 당산화환원효소는 TDP로 활성화된 당을 전환시키는 TDP-glucose 4,6-dehydratase와 CDP로 활성화된 당을 전환시키는 CDP-glucose 4,6-dehydratase가 알려져 있다 (1,2). 핵산으로 활성화된 당만이 촉매하는 것으로 알려져 있다.

TDP-glucose 4,6-dehydratase는 여러 가지 미생물에서 다양하게 발견되고 있다 (3,4,5). 미생물에서는 TDP-glucose가 항생제의 디옥시당의 전구체로서 작용하며, 디옥시당을 포함하는 항생제는 반드시 TDP-4-keto-6-deoxy-glucose를 거쳐야 한다 (6). 일반적으로 생물학적 활성을 지닌 이차 대사물질은 디옥시탄수화물을 포함하고 있다. 이차대사물질의 glycone은 항생제의 생물학적 활성 및 affinity에 직간접으로 관여하고 있는 중요한 부분이며 항생제의 내성에도 중요한 역할을 한다. 다양한 디옥시탄수화물을 aglycone에 결합하여 기존 항생제 보다 훨씬 강력하고 내성이 극복된 항생제의 개발에 노력을 기울이고 있다. 다양한 디옥시탄수화물을 합성하기 위하여 중간체인 4-keto-6-deoxyglucose 다량으로 합성되어야 하며, 본 발명의 목적은 내열성 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 효소를 공급하고 본 효소를 이용하여 핵산으로 활성화되지 않은 glucose, mannose 혹은 glucose-1-phosphate 등을 4-keto-6-deoxyglucose, 4-keto-6-deoxymannose,

1-phospho-4-keto-6-deoxyglucose 으로 합성에 응용하는데 있다. 본 발명의 또 다른 목적은 dTDP-glucose 4,6-dehydratase의 유전자 염기서열을 결정하고 이 유전자를 포함하는 발현벡터 및 그에 의해 형질전환된 재조합으로써 신규한 내열성 재조합 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 효소를 대량 생산함에 있다. 본 연구에서는 고온성 박테리아인 *Thermus caldophilus* GK24로부터 내열성 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자를 분리하고, 염기서열 및 아미노산서열을 결정하고, 이 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하고 이 발현벡터로 대장균을 형질전환시킨 다음, 이 형질전환된 대장균을 배양하여 재조합 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자 발현을 유도한 후, 균체를 회수하고 상기 효소를 정제하여 정제된 dTDP-glucose 4,6-dehydratase를 TDP-glucose는 물론 glucose, mannose 및 glucose-1-phosphate와 반응시켜 데옥시당 합성을 하였다.

결과 및 고찰

dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자의 분리는 다음 과정에 의해 분리하였다. *Thermus caldophilus* GK24 의 total DNA를 이용하여 genomic library를 multiple-copy cosmid vector인 SuperCos나 pIJ486을 이용하여 E.coli XLI-blue에서 genomic DNA library를 만든 다음, PCR primer는 알려진 5개의 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase의 amino acid sequence를 바탕으로 제작하였다. 알려져 있는 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자인 graE, chlE, strE, orf2와 rfbB를 비교하여 유사성이 가장 높은 펩타이드와 단순한 genetic codon을 택하여 PCR primer를 제작한다. PCR primer의 제작은 일반적으로 *Thermus* 계통 균주의 유전자 G/C 함유량은 69% 이며 이를 바탕으로 하며, 방선균의 G/C 함유량은 첫 번째 codon은 50%의 G/C가 있고, 두 번째 codon은 75%의 G/C가 있으며 마지막 codon의 G/C 함유량은 90% 이상이기 때문에 primer 제작에 있어서 이러한 codon의 비율을 바탕으로 하여 2개의 primer를 합성한다. 특히 높은 동일성과 단순한 genetic codon을 보이는 곳을 선택하여 JKS1 및 JKS2 primer를 합성된 primer는 *Thermus caldophilus* genomic 유전자로부터 PCR 방법으로 340 bp dehydratase DNA probe를 얻었고, 유전자 분석으로 확인하였다. *Thermus caldophilus* library로부터 cosmid pSMTC1을 분리하였고 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase를 포함하고 있는 BamHI 4.2 kb 유전자 단편을 pBluscript 벡터에 재조합하여 pTH80을 얻었다. pTH80은 deletion 방법으로 template를 제작하여 자동염기서열 분석기로 분석하였다. *Thermus caldophilus* GK24 로부터 클론된 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 유전자는 994 개의 뉴클레오티드로 구성되어 있으며 G+C content가 73% 이었다. 아미노산 서열은 도2에 나타난 바와 같이 332개로 구성되어 있으며 계산된 분자량은 35 kDa 이었다. 다른 종으로부터 분리된 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase의 아미노산 서열을 비교한 결과 40 - 55%의 동질성을 보여주었다.

dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 유전자를 발현하기 위하여 PCR primer를 합성하였다.

Sense primer TDPD-1은 ATG start condon을 포함하고, 발현벡터에 클로닝하기 위해 제한효소 자리 EcoRI을 변형하여 삽입한다. Antisense primer TDPD-2 는 start condon으로 1012-1034번째 염기에 위치하고 HindIII 제한효소자리가 갖도록 변형하여 제작한다. 주형은 pHD80으로 하고 상기 primer를 사용하여 65. C의 annealing, 74. C의 polymerization, 94. C denaturing 온도에서 PCR을 수행하여 약 1kb의 DNA band를 agarose 전기영동으로

확인하였고 PCR로 얻은 유전자 단편과 과 발현벡타인 pRSET-B를 EcoRI과 HindIII 제한 효소로 처리한 다음 함께 ligation 한 후, 대장균 BL21(DE23)에 전이하여 E.coli BL21(DE23)/pTHE10을 얻었다. E.coli BL21(DE23)/pTHE10을 LB broth에 접종하였다. 37. C에서 밤새 배양된 균을 5%(v/v)의 양으로 새로운 배지에 접종하여 37. C에서 2시간 배양한 후, 약 0.05 mM IPTG를 첨가하고 25. C에서 약 10 시간 계속 배양하여 유전자의 발현을 유도하였다. 원심분리에서 균체를 회수한 다음, 완충용액 (50 mM Tris, pH7.5)에 균체를 현탁시키고 유리 bead 와 homogenazer를 사용하여 세포를 파쇄하였다. 위의 결과 얻어진 재조합 유전자로부터 얻어진 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase 활성도를 측정 한 결과, 배양액 mL당 unit의 활성을 보여주고 있다.

E. coli BL21(DE23)/pTHE10을 500mL 배양하여 원심분리 후 균체를 회수하였다. 완충용액에 균체를 현탁시킨 후, homogenizer로 세포를 파쇄하였다. 이 현탁액을 원심분리한 후, 상층액을 회수하였다. 상층부분을 85. C에서 25분간 열처리하여 대장균 유래의 단백질을 침전시킨 후, 원심분리하여 변성된 단백질을 제거한다.

약 38kDa의 재조합 dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase가 단일 단백질로서 정제됨을 나타내고 약 20 배로 정제되었다.

dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase를 dTDP-glucose와 반응시킨 결과 dTDP-glucoses는 100% dTDP-4-keto-6-deoxyglucose로 전환되지만, UDP-glucose는 기질의 유사성에도 불구하고 반응성을 보여주고 있지 않다. glucose 와 TDP의 반응은 8%의 4-keto-6-deoxyglucose로 glucose-1-phosphate와 TMP은 15%의 전환이 되고, mannose와 TDP는 20%의 전환, mannose-1-phosphate와 TMP는 30%가 4-keto-6-deoxy-mannose로 전환된다.

start codon

ATGAACCTC	CTCGTCACCG	GCGCCGCCGG	CTTCATCGGC	TCCCCTACG	TCCGCTCCCT
GCTCGCGGCC	GACGCCCCCG	ACGCGCCGCG	GATCACCGTG	CTGGACGCCC	TCACCTACGC
CGGCACCCCTC	GACAACCTCG	AACTCGACCA	CCCGCGCCTG	GAGTTCGTGC	AGGGCGACAT
CCGGGACGCC	GAAGTGGTGG	GCAAGCTGAC	CGCCGAGGCC	GACCACGTGG	TCCACTTCGC
CGCCGAGTCC	CACGTGGACC	GCTCCATCCT	CACCGCCTCC	GACTTCGTCC	TCACCAACGT
CGTCGGCACC	CAGGTCTCTG	TCGACGCCGC	CCTGCGCCAC	GGCGTCGGCA	CCTTCGTGCA
CGTGTCCACC	GACGAGGTCT	ACGGCTCGAT	CGCCTCGGGC	TCGGCCACCG	AGGAGTACCC
GCTGGAGCCC	AGCTCCCCGT	ACTCCGCCTC	GAAGGCCTCC	TCCGACCTGC	TCGCCCTCGC
CTACCACCGC	ACCCACGGCC	TGGACGTCG	CGTCACCCGC	TGCTCCAACA	ACTACGGGCC
GCACCAGTTC	CCCGAGAAGG	TCATCCCGCT	CTTCGTACC	AACCTCTCG	ACGGGAAGAA
GGTCCCCCTC	TACGGCGAGG	GCCTCAACGT	CCGCGACTGG	CTGTACGTCG	ACGACCACTG
CGCCGGCGTG	GAATTCGTCC	GCACCCAGGG	CCGGCCCCGC	GAGGTCTACA	ACATCGGCGG
CGGCACCGAA	CTACCAACA	AGGAACTCAC	CGGCCTCCTC	CTCGACGCTC	GCGGCGCCGG
CTGGGACAGC	GTGGAGTACG	TCGAGGACCG	CAAGGGCCAC	GACCTGCGCT	ACTCCGTCGA
CTGGAGCAAG	GCCCGCGACG	AACTCGGCTA	CCGGCCCCGC	CACGACTTCA	CCACCGGCCT
CGCCGAGACC	GTCGCCTGGT	ACCGGGACAA	CCGTGCCTGG	TGGGAACCGC	TCAAGCAGCG
CGTCACCGGA	GGCCGGTCTG	GA (stop codon)			

Figure 1. *Thermus caldophilus*로부터 분리한 하기 염기서열을 갖는 내열성 dTDP-4-keto-6-deoxyglucose

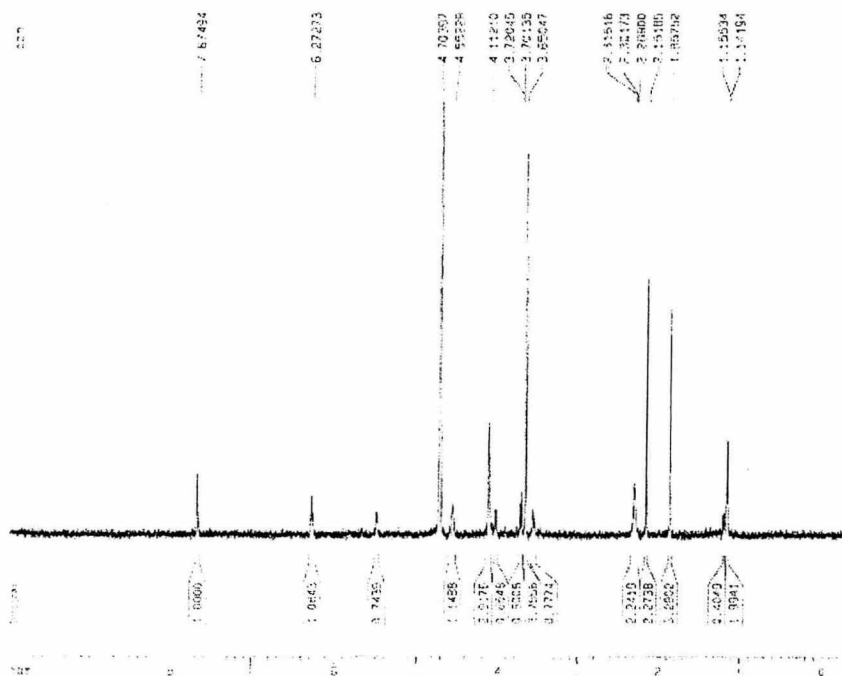


Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ of TDP-4-keto-6-deoxyglucose

참고문헌

1. Raymond, Y. Y., Russell N., Thorson, J. S., Liu, L-d, Liu, H-w., (1992) Mechanistic studies of the biosynthesis of 3,6-dideoxyhexose in *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. Biol. Chem* 267, 5869-5875.
2. Torson, J. S., Lo, S. F., Liu, H-w, (1993) Molecular basis of 3,6-dideoxyhexose biosynthesis: Elucidation of CDP-ascylose biosynthetic genes and their relationship to other 3,6-dideoxyhexose pathways. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 5827-5828.
3. Thompson, M. W., Strohl, W. R., Floss, H. G.,(1992), Purification and characterization of TDP-D-glucose 4,6-dehydratase from anthracycline-producing streptomycetes. *J. Gen. Microbiology.* 138, 779-786.
4. Vara, J. A., Huchinson, C. R., (1989), Purification of thymidine-diphospho-D-glucose 4,6-dehydratase from an erythromycin-producing strain of *Saccharopolyspora erythraea* by high resolution liquid chromatography. *J. Biol. Chem* 263, 14992-14995.
5. Yoo, J. C., Han, J. M., Sohng, J. K., (1999) Expression of *orf7* as dTDP-glucose 4,6-dehydratase gene cloned from *Streptomyces antibioticus* Tü99 and biochemical characteristics of recombinant protein. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 9, 206-212.
6. Sohng, J. K., Oh, T.J., Kim, C. G., (1998) Method for cloning biosynthetic genes of secondary metabolites including deoxysugar from actinomycetes. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 31, 475-483