

E. coli ATCC 21990이 생산하는 Aminoglycoside-3'-Phosphotransferase (APH(3'))의 Densitometric TLC Assay

이정환 · 김계원* · 김기태 · 나규흠 · 김학주 · 양종익 · 김수일¹
동아제약(주) 연구소, ¹서울대학교 농화학과

Densitometric TLC Assay of Aminoglycoside-3'-Phosphotransferase (APH(3')) Produced by *E. coli* ATCC 21990

Lee, Jeong-Hwan, Gye-Won Kim*, Ki-Tae Kim, Kyu-Heum Na,
Hack-Jook Kim, Junn-Ick Yang and Su-Il Kim¹

Research Laboratories of Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up, Yongin-gun 449-900, Korea
¹Department of Agricultural Chemistry, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — A rapid and simple quantitative assay method for aminoglycoside-3'-phosphotransferase (APH(3')) derived from *E. coli* ATCC 21990 was developed using the thin layer chromatographic densitometry, 3'-phosphorylated kanamycin B (3'-PKMB), product of APH (3') reaction, was separated from reaction mixtures by developing on the silica gel TLC plate with chloroform-methanol-ammonia water (3:4:3). The quantity of the 3'-PKMB was measured by densitometry after color development by ninhydrin method. Densitometric TLC assay for APH (3') was showed a good quantitative result and reproducibility. Sensitivity of this assay was 1.56 nmol of 3'-PKMB and could be analyzed many samples at same time. This method may be applicable for the analysis of inactivating enzymes of aminoglycoside antibiotics.

Aminoglycoside 항생제는 주로 그람음성 세균 및 항산성균에 작용하는 항생제로 개발되어 사용되어 왔으나 사용 빈도수의 증가와 더불어 내성균의 출현이 빈발하게 되었다. 그 주요 내성 기전으로는 phosphotransferase, adenylyltransferase, acetyltransferase 등의 효소들에 의한 항생제의 특정위치의 구조변경에 의한 불활성화가 주 요인으로 보고되고 있다(1-3). 이러한 불활화 효소를 이용하여 항생제의 특정위치를 구조변경 후 그 위치에 또다른 작용기를 도입함으로써 내성균주에 보다 효과적으로 작용할 수 있는 항생제를 개발하기 위한 시도가 있었다(4, 5).

본 연구에서는 kanamycin B(KMB)의 3' 위치 수산기를 인산화하고 다시 수소로 치환하여 3'-phosphotransferase를 갖는 내성균에 유효한 항생제인

Tobramycin을 생산하는 연구를 수행하고자 하였다. KMB의 3'-PKMB로의 인산화 반응 최적화와 aminoglycoside-3'-phosphotransferase(APH(3'))의 고생산성 균주 선발 등의 실험에 효율적인 APH(3') 분석방법이 요구되었으나 지금까지 APH(3')의 분석방법은 생물검정법(6-8), 방사성 동위원소 이용분석법(9-11), 분광광도측정법(12) 등이 보고되고 있다. 생물검정법은 효소반응산물이 아닌 미반응 KMB를 정량하는 간접측정이라는 면과 하루 경과 후 검정균의 저지환을 읽어 정량해야 하는 불편함이 단점으로 나타났다. 방사성동위원소 이용 분석법은 취급이 까다롭고 시간이 많이 소요되며, 분광광도 측정법으로는 APH(3') 역가를 측정하기 위해 pyruvate kinase, lactate dehydrogenase 효소를 도입해야 하고 반응산물의 직접측정이 아닌 미반응 DPNH의 간접측정이며 그 반응조건 또한 까다로운 단점이 있었다.

KMB로부터 Tobramycin을 생산하는 공정을 확립

Key words: aminoglycoside-3'-phosphotransferase, densitometry

*Corresponding author

하기 위해서는 APH(3')의 대량 생산균주 선별, 효소특성연구, 효소반응계 등을 개발해야 하며 이를 위한 KMB 3'-phosphotransferase 측정방법으로 효소반응산물인 3'-PKMB를 정량하며 단시간내에 여러 시료들을 간편하게 측정할 수 있는 실험법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약

Kanamycin B(KMB)는 일본의 Meiji로부터 구입하여 사용했으며, 기타 시약은 모두 특급품을 사용하였다.

사용균주

APH(3') 생산균주로 *E. coli* ATCC 21990을 ATCC로부터 구입하여 사용하였다.

배지 및 배양방법

Nutrient agar에 KMB를 무균 여과하여 100 µg/ml 농도로 첨가한 후 계대배양했으며, 본 배양은 nutrient broth에 KMB를 50 µg/ml 농도로 첨가하여 37°C에서 18시간 동안 진탕배양하였다.

조효소액의 조제

배양액을 10,000×g에서 20분간 원심분리(Dupont, RC5C)하여 균체를 회수한 후 Tris-Magnesium-Potassium(TMK) 완충용액(Mg·Acetate 10 mM, Dithiothreitol 10 mM, KCl 60 mM, Tris 58 mM, pH 7.4 with 5 N-HCl)로 2회 세척하였다. 균체의 습윤중량 1g에 TMK 완충액 10 ml을 첨가하여 잘 현탁한 뒤 0°C에서 초음파 마쇄기(B. Braun, braun-sonic 1510)로 300 watt에서 1분씩 3회 처리하였다. 다시 4°C에서 10,000×g로 30분간 원심분리 후 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

인산화 반응

Fig. 1은 인산화 반응과 이를 이용한 분석방법을

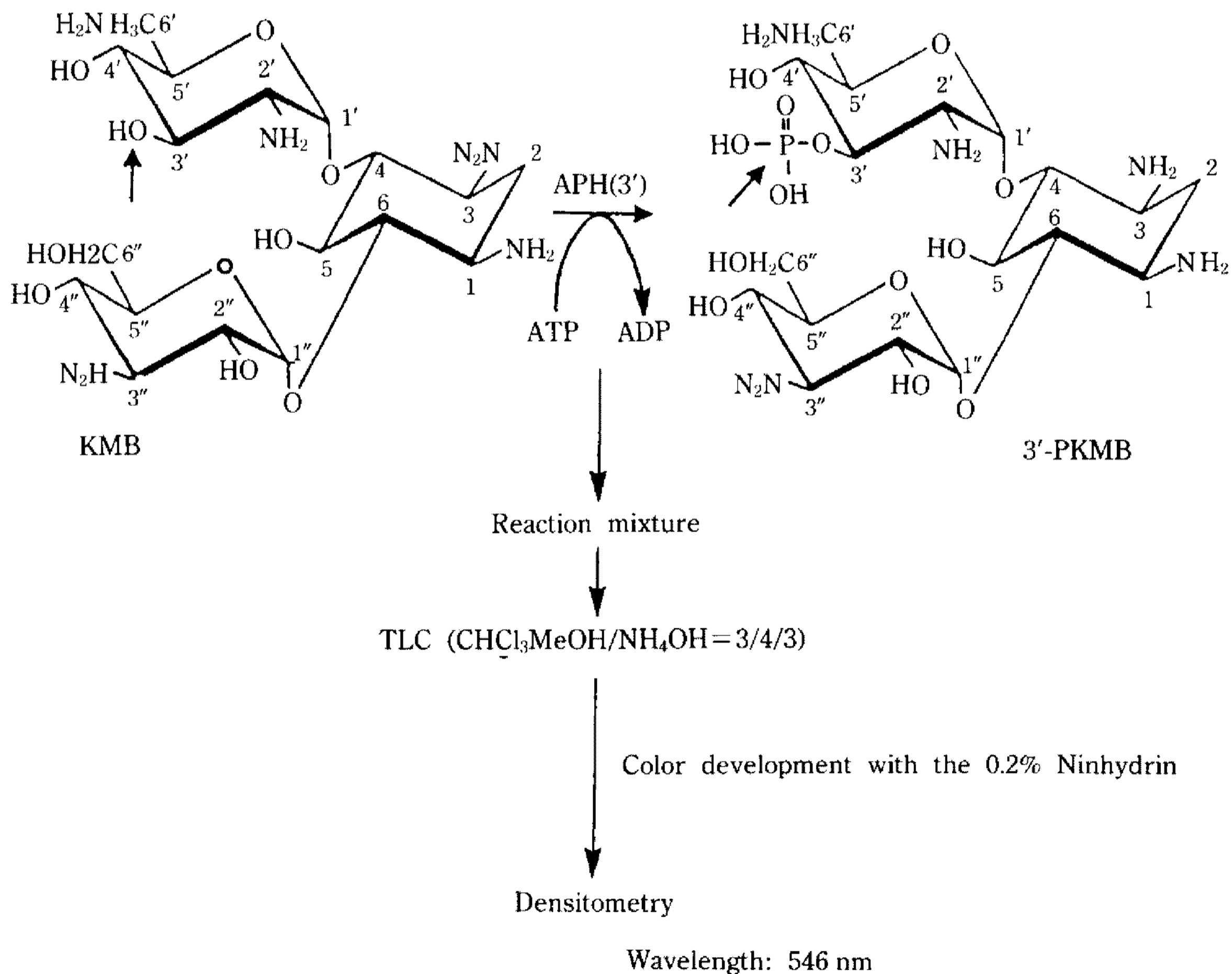


Fig. 1. Scheme of densitometric TLC assay of APH (3').

개략적으로 나타낸 그림이다. APH(3')은 magnesium 존재하에서 kanamycin 1 mol당 ATP 1 mol을 소모하면서 3' 위치의 수산기를 인산화하는 것으로 알려져 있다(13-15). 본 실험에서는 TMK 완충액에 KMB를 5 mM, ATP를 20 mM이 되게끔 첨가하여(pH 7.4) APH(3') 분석용 기질로 고정 사용하였고, 반응 기질 5 ml에 조효소액 2 ml를 첨가하여 37°C에서 반응을 수행하며, 5분 간격으로 200 μ 씩 채취하여 90°C에서 10분간 가열하여 반응을 증지시켰다.

3'-PKMB의 정량

TMK 완충액에 ATP가 28 mM이 되도록 첨가한 용액에 인산화 반응 종결 후 반응물에서 분리정제한 뒤 구조규명과 성분분석을 통하여 최종 확인된 3'-PKMB를 녹여 표준용액으로 만든 후 각 반응 시료와 같이 silica gel TLC plate(Sigma, T-6770)에 0.8 cm 간격으로 5 μ 씩 점적 건조 후 전개용매(CHCl₃:MeOH:NH₄OH=3:4:3)에서 40분간 실온에서 전개하였다. 전개가 끝난 plate를 건조 후 ninhydrin 0.2%(in ethanol)용액을 분무하고 드라이어를 사용하여 가열하였다. 발색된 3'-PKMB 부분만을 TLC

scanner(Camag)를 사용하여 546 nm에서 densitometry를 실시함으로써 정량하였다.

결과 및 고찰

반응물의 TLC 결과

Fig. 2는 표준물질 및 반응물, 기질에 첨가된 여러 물질의 TLC 후 결과이다. 각각의 R_f값은 KMB가 0.39, 3'-PKMB 0.26, Tris가 0.73으로 KMB와 3'-PKMB는 40분 전개로 분리가 충분하였으며 3'-PKMB의 이동치 부근에서는 여타 간섭이 없음을 확인하였다.

3'-PKMB와 Ninhydrin 흡착물의 Spectrum

3'-PKMB 용액(0.02%(w/v) in H₂O) 1 ml에 ninhydrin 용액 1 ml를 가하여 105°C에서 10분간 가열 후 400~800 nm의 범위에서 분광광도계(Varian, DMS 100S)로 scanning한 결과(Fig. 3) 567.4 nm에서 최대치를 보였으며, 이로부터 TLC scanner의 수은램프 여러 파장 중 근접한 546 nm에서 ninhydrin에 의해 발색된 3'-PKMB에 대한 densitometry를 실시하였다.

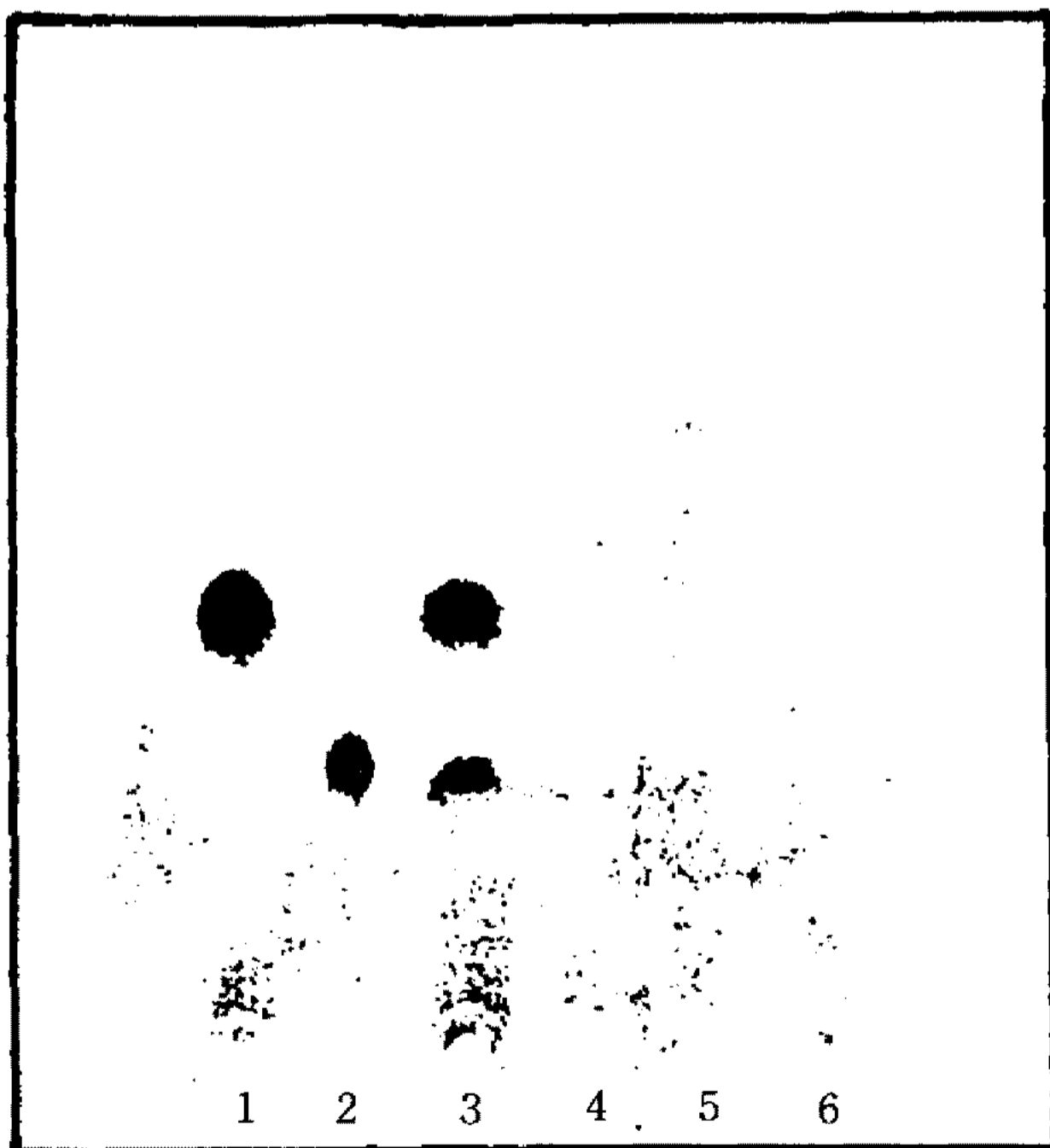


Fig. 2. Thin-layer chromatography of KMB, 3'-PKMB and APH (3') reaction mixture (solvent: chloroform/methanol/ammonium hydroxide=3/4/3).

Lane 1: KMB, lane 2: 3'-PKMB, lane 3: APH (3') reaction mixture, lane 4: ATP, lane 5: TMK buffer, lane 6: crude APH (3').

3'-PKMB의 정량

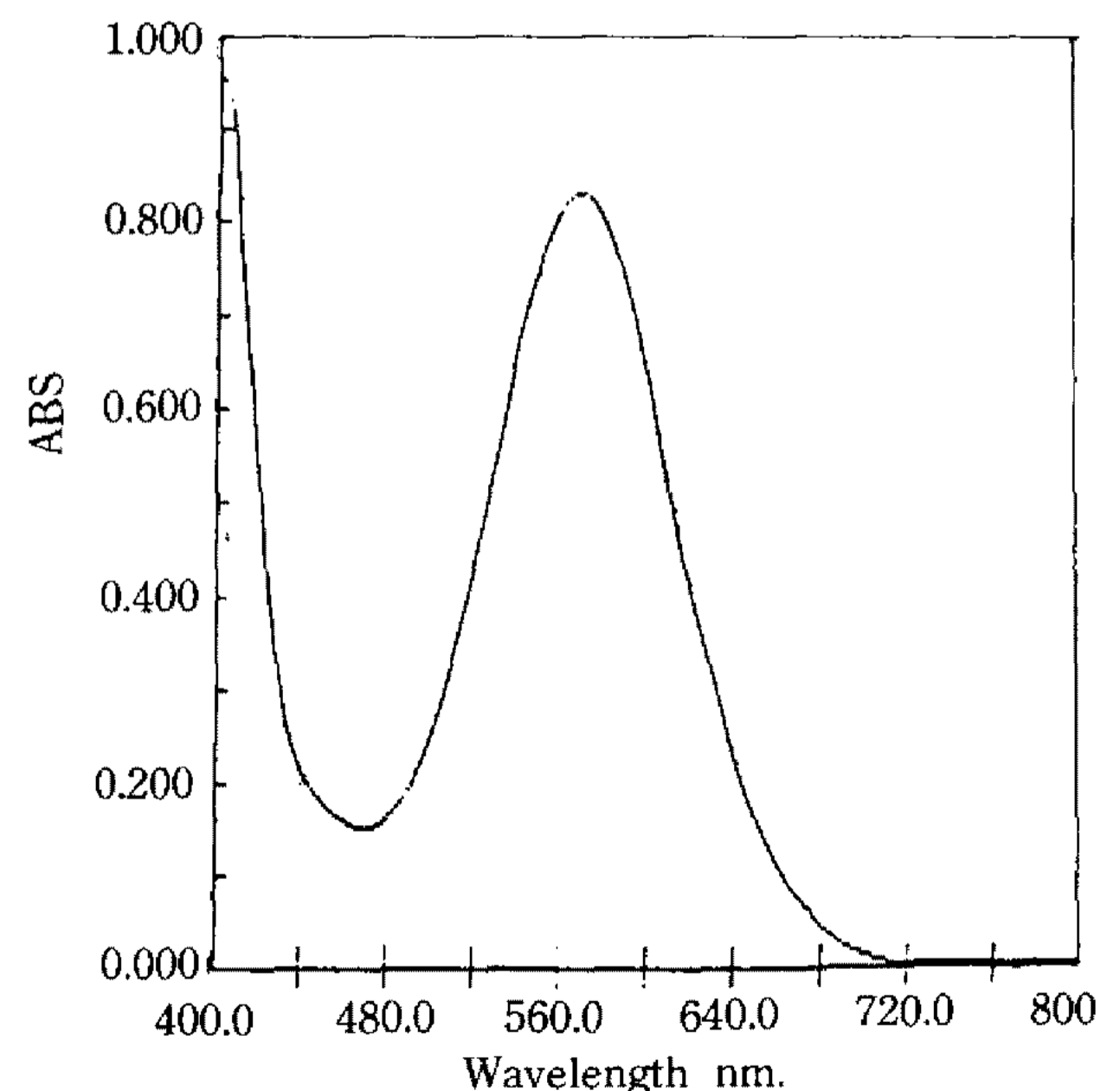


Fig. 3. Visible spectrum of ninhydrin-3'-PKMB adduct. One ml of 0.02% (w/v) 3'-PKMB dissolved in H₂O was mixed with 1 ml of 0.2% (w/v) ninhydrin in ethanol and heated at 105°C for 10 minutes.

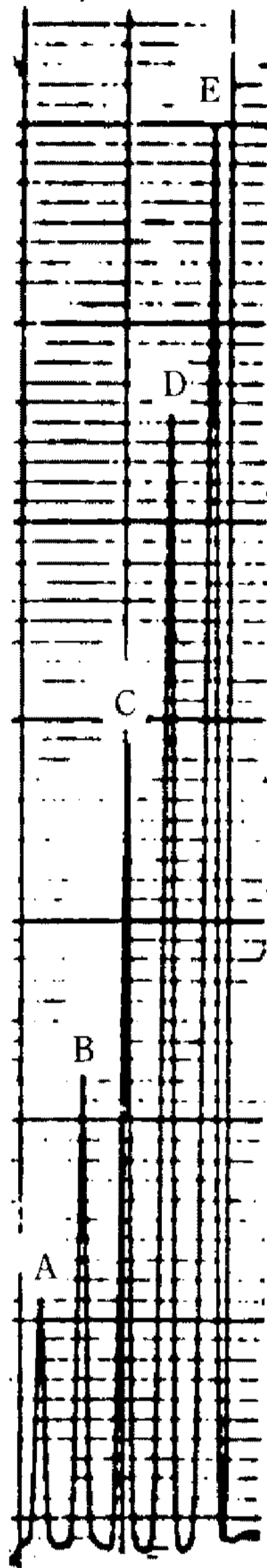


Fig. 4. Densitogram of various 3'-PKMB concentrations.
 A: 0.3125 $\mu\text{mol/ml}$; B: 0.625 $\mu\text{mol/ml}$; C: 1.25 $\mu\text{mol/ml}$;
 D: 2.5 $\mu\text{mol/ml}$; E: 5 $\mu\text{mol/ml}$.

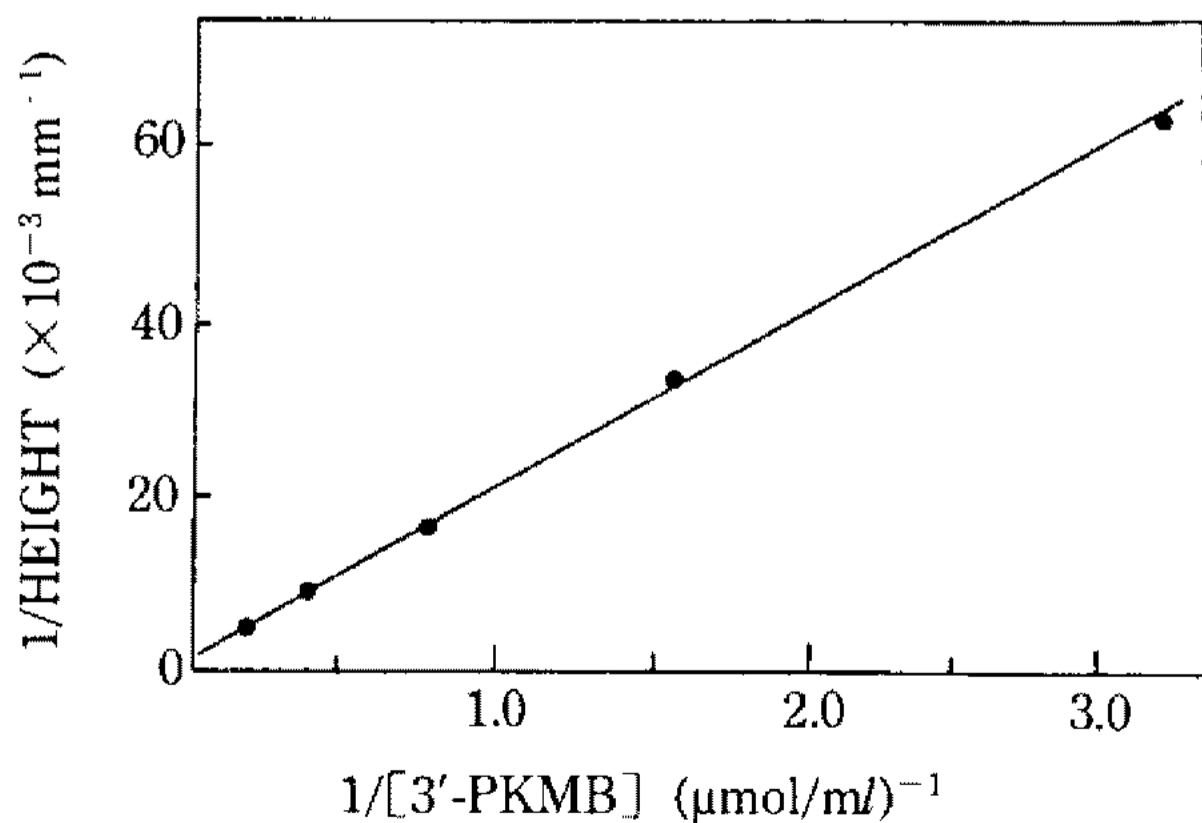


Fig. 5. Standard curve for the determination of 3'-PKMB concentration using the densitometric TLC assay.

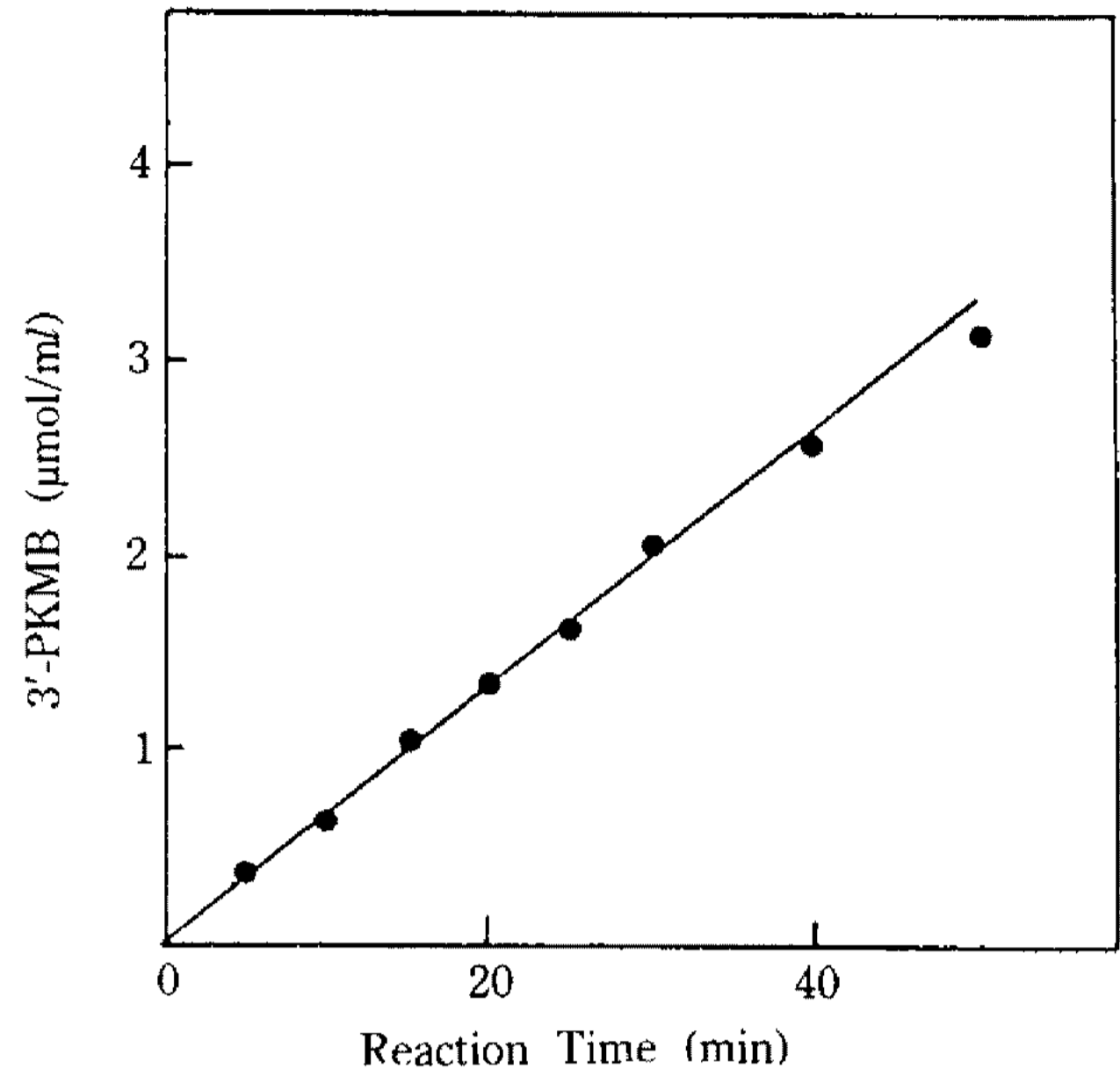


Fig. 6. The time course of APH (3') activity.
 The reaction was performed with 7 ml of reaction mixture containing 2 ml of crude enzyme solution and substrates at 37°C.

Fig. 4는 3'-PKMB 표준물질을 농도별로 점적하여 TLC 후 densitometry를 실시하여 얻은 densitogram이며, 각 peak 높이 및 3'-PKMB 농도의 역수를 취하여 표준곡선을 작성한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 농도에 따른 선형성은 우수한 것으로 확인되었으며, 측정 감도 또한 1.56 nmol로서 비교적 감도도 좋은 것으로 생각되었다. 시료의 3'-PKMB 정량은 상기 표준곡선을 이용하여 행하였으며 silica gel thin layer plate 1장에 각 농도의 표준용액 5개와 시료 20개의 점적이 가능하여 많은 수의 시료분석이 한번의 TLC로서 단시간내에 가능하였다.

반응시간과 효소양에 따른 선형성

3'-PKMB 정량방법을 APH(3') 분석에 적용키 위해 반응시간에 따른 3'-PKMB 생성 및 APH(3')양에 따른 선형성을 평가한 결과, 반응시간에 따른 3'-PKMB 생성은 약 40분까지는 시간에 비례하는 것으로 관찰되었으며(Fig. 6), 효소양을 농도별로 첨가하여 30분 반응 후 3'-PKMB 생성을 정량한 결과(Fig. 7) 효소의 양이 80 mIU까지는 거의 일직선의 관계를 보이고 있음을 확인하였다.

상기한 결과로부터 본 방법은 TLC 후 densitometry를 실시하여 타 효소반응물의 간섭없이 3'-PKMB만을 특정적으로 정량함으로써 APH(3') 역가의 간

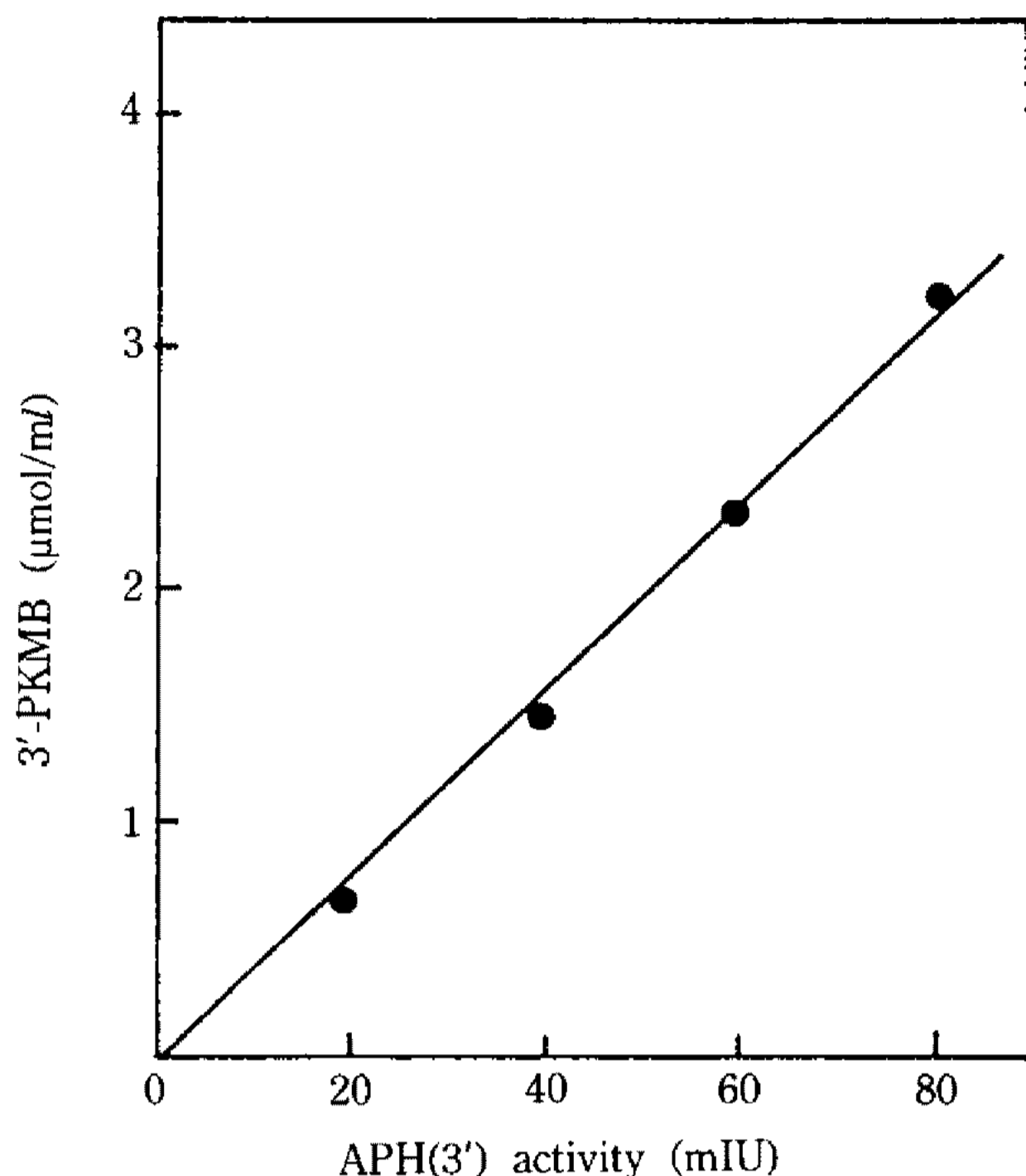


Fig. 7. Continuous determination of APH (3') activity. The reaction was performed with 700 μ l of reaction mixture containing 200 μ l of crude enzyme solutions (20, 40, 60, 80 mIU) and substrates at 37°C for 30 minutes.

편하고 신속한 정량적 분석이 가능하였으며, Tobramycin의 전물질인 3'-PKMB 생산을 위한 APH(3') 고생산성 균주선발, 반응 및 정제 최적화 등 전공정에서의 적용이 가능하였다.

요 약

E. coli ATCC 21990의 aminoglycoside-3'-phosphotransferase(APH(3'))의 신속하고 간편한 정량적 방법을 TLC densitometry를 이용하여 확립하였다. APH(3') 반응생산물인 3' 위치에 인산화된 kanamycin B(3'-PKMB)는 silica gel plate에서 chloroform-methanol-methanol-ammonia water(3 : 4 : 3) 전개용매로 반응물에서 분리되었고, 3'-PKMB의 양은 ninhydrin으로 발색 후 densitometry로 측정하였다. APH

(3')의 densitometric TLC assay는 좋은 정량적 결과와 재현성을 보였고, 3'-PKMB에 대한 감도는 1.56 nmol이었으며 많은 시료의 분석이 한번의 실시로 가능하였다. 이 방법은 aminoglycoside 항생제의 불활화 효소 분석에 응용이 가능하리라 여겨진다.

참고문헌

1. Benveniste, R. and J. Davies: *Biochemistry*, **10**, 1787 (1971)
2. Benveniste, R. and J. Davies: *FEBS Lett.*, **14**, 293 (1971)
3. Benveniste, R. and J. Davies: *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 471 (1973)
4. Umezawa, H.: *Carbohydr. Res.*, **43**, 183 (1984)
5. Shirafuji, H., M. Kida, I. Nogami and M. Yoneda: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1566 (1980)
6. Osmu, D., S. Kondo, N. Tanaka and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **22**, 273-282 (1969)
7. Umezawa, H., Y. Matsushashi, M. Yagisawa, H. Yamamoto, S. Kondo and T. Takeuchi: *J. Antibiotics*, **27**, 358 (1974)
8. Matshuhashi, Y., M. Kagisawa, S. Kondo, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **28**, 442 (1975)
9. Ozane, B., R. Benveniste, D. Tipper and J. Davies: *J. Bacteriol.*, **100**, 1144 (1969)
10. Kobayashi, F., T. Koshi, J. Eda, Y. Yoshimura and S. Mitsuhashi: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 1 (1973)
11. Umezawa, Y., M. Yagisawa, T. Sawa, T. Takeuchi and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **28**, 845 (1975)
12. Goldman, P. and D.B. Northrop: *BBRC.*, **69**, 230 (1976)
13. Okanishi, M., S. Kondo, Y. Suzuki, S. Okamoto and H. Umezawa: *J. Antibiotics*, **20**, 132 (1976)
14. Umezawa, H., M. Okanishi, R. Utahara, K. Maeda and S. Kondo: *J. Antibiotics*, **20**, 136 (1967)
15. Umezawa, H., M. Okanishi, S. Kondo, K. Hamana, R. Utahara, K. Maeda and S. Mitsuhashi: *Science*, **157**, 1559 (1967)

(Received June 12, 1991)