

사람의 O-linked N-acetyl-β-D-glucosaminidase 유전자의 분석과 재조합 발현

강대욱* · 서현호¹

창원대학교 보건·생화학과, ¹진주 산업대학교 환경공학과

세포질과 핵단백질의 serine과 threonine 잔기에 O-linked N-acetyl-β-glucosamine (O-GlcNAc)의 첨가는 고등 진핵 세포에서 흔히 일어나는 번역 후 단백질의 변형 중 하나로서 단백질의 인산화와 유사한 세포 내 신호전달에 관여하는 것으로 보인다. O-GlcNAc의 첨가와 제거는 O-GlcNAc transferase (OGT)와 O-linked N-acetyl-β-D-glucosaminidase (O-GlcNAcase) 효소에 의해 각각 촉매된다. 두 가지 종류의 사람 유래 O-GlcNAcase 유전자(O-GlcNAcase, v-O-GlcNAcase)를 cloning하고 세 가지의 융합단백질로 대장균에서 생산을 시도하였다. O-GlcNAcase의 기질 유사체인 p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (pNP-β-D-GlcNAc)를 기질로 사용하여 효소활성을 측정할 결과 v-O-GlcNAcase는 활성을 나타내지 않았다. 여러 종류의 amino sugar 기질 유사체를 사용하여 O-GlcNAcase의 활성을 측정하였으나 오직 pNP-β-D-GlcNAc만이 활성을 보였다. Blast 검색으로 분석한 결과 아미노 말단의 hyaluronidase-like domain (hyaluronidase-유사 영역)과 카르복시 말단의 N-acetyltransferase 영역 두 곳의 conserved domains이 존재하였다. 효소촉매에 중요한 영역을 밝히기 위해 여러 deletion mutants(결손 변이체)를 제작한 후 효소활성을 측정하고 Western blot으로 분석하였다. Hyaluronidase-유사 영역, 유전자 내부와 N-acetyltransferase 영역을 제거할 경우 효소활성이 사라졌으나 아미노 말단의 55개 아미노산과 카르복시 말단의 truncation은 활성을 일부분 유지하였다. 위의 사실에 기초하여 hyaluronidase-유사 영역은 효소활성에 중요하고 카르복시 말단의 N-acetyltransferase 영역은 조절기능으로 작용하는 것으로 추정된다.

Key words □ N-acetyltransferase domain, deletion mutants, O-GlcNAc, OGT, O-GlcNAcase, GST, hyaluronidase-like domain, thioredoxin

핵이나 세포질에 존재하는 단백질의 serine이나 threonine의 hydroxyl group(수산기)에 한 분자의 O-linked N-acetyl-β-D-glucosamine (O-GlcNAc)에 의한 변형은 거의 모든 진핵세포에서 일어나는 번역 후 수식으로 1980년대 중반부터 이러한 현상과 생물학적 의의에 관한 연구가 본격적으로 진행되어 지금까지 O-GlcNAc으로 수식되는 수 십 종 이상의 단백질이 발견되었다(5, 15, 17). 1984년 Torres와 Hart 등은 생쥐 lymphocyte의 단백질에 O-당 결합을 한(O-glycosidically linked) GlcNAc 단당류가 존재함을 처음으로 발견하고 대부분의 O-GlcNAc로 수식된 단백질은 세포 내에 존재함을 제안하였으며 몇 년 후 서로 다른 두 연구진에 의해 핵의 세포질에 있는 단백질에서 O-GlcNAc에 의한 번역 후 수식이 일어남을 밝혔다. 이러한 발견은 종래의 학술 즉 당쇄(glycosylation)는 대부분 세포 외로 분비되는 단백질이나 막 단백질에서 일어나며 전통적으로 당쇄는 단백질의 구조적 안정성에 영향을 주며 세포 내 신호전달이나 조절에 관여하지 않는다는 것과 상반되는 중요한 현상으로 O-GlcNAc에 의한 단백질의 당쇄를 새로운 시각에서 연구하는 계기가 되었다(15, 16).

이러한 O-GlcNAc에 의한 단백질의 변형은 O-GlcNAc 단백질

자체의 변화양상과는 독립적으로 O-GlcNAc level 이 매우 빠르게 변하는 것이 확인되었으며 이는 단백질에 부착되어 있는 O-GlcNAc 분자가 단순한 단백질 구성체의 일부로서 뿐만 아니라 마치 인산화와 유사하게 그 제거와 부착의 과정이 기능적이고 역동적인(dynamic) 조절기구로 작용할 수 있음을 의미한다(10, 17). O-GlcNAc으로 변형되는 단백질로는 핵공 단백질들(nuclear pore complexes)을 비롯하여 세포골격(cytoskeletal) 단백질들, 종양 억제인자(tumor suppressor), proto-oncogenes, chromatin과 작용하는 단백질, hnRNPs, RNA polymerase II의 촉매 소단위체, 전사인자, 호르몬 수용체, 탈인산 효소(phosphatase), 인산화 효소(kinase) 등이 알려져 있다. 이들 단백질들은 기능적으로 서로 연관성은 없지만 공통점은 이들이 인산화되는 단백질이고 다른 세포 내 단백질과 가역적으로 multimeric complexes를 형성한다는 것이다. O-GlcNAc과 O-phosphate는 단백질의 같은 아미노산 잔기나 근처의 아미노산 잔기에 변형되는 것으로 밝혀졌으며 RNA 중합효소의 카르복시 부위, c-myc의 58번 threonine과 estrogen 수용체의 16번 serine 등에서 O-GlcNAc과 인산에 의해 변형이 됨을 확인하였다. 이러한 사실은 O-GlcNAc 변형이 인산화 정도를 조절함으로써 세포의 여러 단백질의 활성이나 신호전달에 관여함을 암시한다(10, 14).

OGT는 쥐의 간 세포질에서 처음으로 분리되었으며 사람과 선

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-279-7664, Fax: 055-279-7664
E-mail: dokang@changwon.ac.kr

총의 클로닝된 OGT 유전자는 상동성이 80% 정도로 아주 높다. OGT는 아미노 말단에 9-12개의 TPRs(tetratricopeptide repeats)가 존재하며 이 부위가 단백질간의 상호작용에 관여하며 OGT의 안정성과 trimerization에 필수적이며 단백질 기질에 대해 활성을 나타내기 위해서는 이 부위가 꼭 필요하다. 그리고 OGT의 tyrosine 잔기가 인산화되거나 O-GlcNAc로 변형이 된다는 것이다(4, 7, 9, 11).

O-GlcNAcase는 거의 모든 조직에서 발현되며 주로 세포질에 분포하며 lysosome에 있는, 최적 pH가 산성인 hexosaminidase A/B와 다르게 최적 pH가 중성 근처이기 때문에 hexosaminidase C라고 명명하기도 한다. 1998년 Meese 등(6)은 사람의 뇌막암 환자에서 hyaluronidase 활성을 나타내는 916개의 아미노산 잔기로 된 약 130 kDa의 단백질을 발견하고 MGEA5 (meningioma-expressed antigen 5)라고 명명하였다. Hyaluronidase 활성을 나타내었기 때문에 새로운 종류의 사람유래 hyaluronidase로 분류하였으나 여러 kinetic data와 proteomic study를 통해 O-GlcNAcase로 밝혀졌다. 1년 뒤 같은 연구진에 의해 677개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 MGEA5의 카르복시 영역을 제외한 나머지 부위와 거의 같은 다른 단백질, MGEA5의 splicing variant인 MGEA5s (v-O-GlcNAcase)를 발견하였다(2). MGEA5는 아미노 말단 부위에 세균의 Mu toxin과 상동성을 가지며 촉매영역으로 추정되는 hyaluronidase-유사 영역을, 그리고 카르복시 말단에는 N-acetyltransferase 영역을 각각 함유하고 있으며 후자는 기질과 상호 작용하는 부위로 추측된다. MGEA5s에서는 MGEA5에 있는 N-acetyltransferase 영역이 없다(1, 2).

본 연구에서는 OGT 유전자에 비해 상대적으로 덜 연구가 진행된 O-GlcNAcase 유전자를 세 가지 다른 융합 단백질(GST, thioredoxin, 6 x histidine)로 발현을 시도하였으며 효소활성에 필수적인 영역을 규명하기 위해 여러 종류의 결손 변이체들을 만들고 효소활성측정과 Western blot으로 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

대장균 숙주는 *E. coli* TOP10[F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*]과 *E. coli* BL21[F⁻ *ompT* *hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *gal* *dcm* (DE3)]을 Invitrogen (Carlsbad, USA)에서 구입하여 사용하였다. O-GlcNAcase를 GST와 융합단백질로 발현하기 위해 plasmid pGEX-5X-3 (Amersham)을, thioredoxin과 융합단백질로 생산하기 위해 plasmid pThioHisA (Invitrogen)를 각각 사용하였다. 사람 뇌의 cDNA library에서 클로닝한 O-GlcNAcase과 v-O-GlcNAcase의 아미노 말단에 6개의 histidine이 융합된 재조합 단백질을 생산하기 위해 각각의 유전자가 pBADHisA(Invitrogen)의 *Bgl*I와 *Pvu*II 부위에 클로닝된 pBADHisA/MGEA5와 pBADHisA/MGEA5s를 NIH (National Institutes of Health)의 Hanover 박사로부터 확보하였다(Fig. 1).

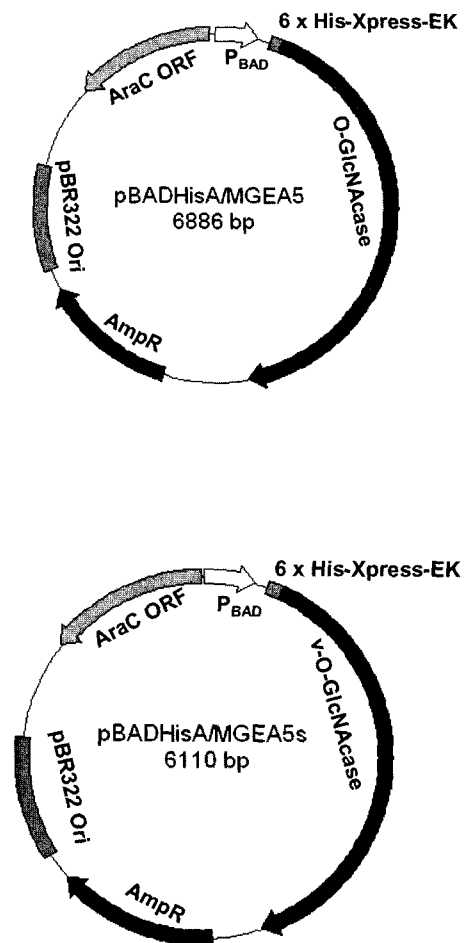


Fig. 1. Plasmid maps of recombinant plasmid pBADHisA/MGEA5 and pBADHisA/MGEA5s.

대장균 배양 및 형질전환

대장균은 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하여 37°C, 200 rpm에서 진탕 배양하였다. 대장균의 형질전환은 CaCl₂법(13)으로 실시하였으며 100 μg/ml의 ampicillin이 함유된 LB 한천배지를 사용하여 재조합 plasmid를 함유한 대장균 형질전환체를 선별하였다.

O-GlcNAcase 결손 변이체의 제조

O-GlcNAcase 활성에 필요한 유전자 부위를 밝히기 위해 유전자 내에 존재하는 제한효소 인식부위를 사용하여 아미노 말단, 유전자 내부 및 카르복시 말단으로 나누어 각 부위를 삭제하여 제작한 여러 형태의 변이체를 Table 1에 나타내었다. 우선 O-GlcNAcase 아미노 말단의 55개 아미노산 잔기를 제거하기 위해 pBADHisA/MGEA5를 제한효소 *Bgl*III와 *Pst*I으로 처리하고 양 끝을 blunt end로 전환한 후 연결하여 MGEA5-ΔN55라고 명명하였다. 제한효소 *Pst*I과 *Apa*I을 처리하여 hyaluronidase-유사 영역을 모두 포함하는, 55번 아미노산과 295번 아미노산 사이의 241개 아미노산이 제거된 변이체 MGEA5-ΔN(55-295)를 제작하

Table 1. Deletion mutants constructed in this study

Deletion mutants	No of deleted amino acid residues	Restriction enzymes treated
MGEA5-ΔN55	55(1-55)	<i>Bgl</i> III & <i>Pst</i> I
MGEA5-ΔN(55-295)	241(55-295)	<i>Pst</i> I & <i>Apal</i>
MGEA5-ΔC(610-874)	265(610-874)	<i>Spe</i> I & <i>Sma</i> I
MGEA5-ΔC30	30(987-916)	<i>Eco</i> RI & <i>Pvu</i> II
MGEA5-ΔC43	43(974-916)	<i>Sma</i> I & <i>Pvu</i> II
MGEA5-ΔC60	60(957-916)	<i>Msc</i> I & <i>Pvu</i> II
MGEA5-ΔC120	120(797-916)	<i>Bam</i> HI & <i>Pvu</i> II
MGEA5-ΔC140	140(777-916)	<i>Nde</i> I & <i>Pvu</i> II
MGEA5-ΔC154	154(763-916)	<i>Bbv</i> CI & <i>Pvu</i> II

였다. O-GlcNAcase의 카르복시 말단 부위에 있는 N-acetyltransferase domain을 제거하고자 제한효소 *Spe*I과 *Sma*I를 처리하여 610번에서 874번 아미노산이 제거된 변이체 MGEA5-ΔC(610-874)를 얻었다. 추가로 카르복시 말단에서 순차적으로 아미노산이 제거된 변이체 6종류를 제작하였다. O-GlcNAcase 유전자의 3'말단에 있는 *Pvu*II와 *Eco*RI를 처리하여 카르복시말단 아미노산 30개를 제거한 변이체 MGEA5-ΔC30을 일차적으로 제작하였다. 추가로 *Pvu*II/*Sma*I, *Pvu*II/*Msc*I, *Pvu*II/*Bam*HI, *Pvu*II/*Nde*I 및 *Pvu*II/*Bbv*CI 등을 처리하여 카르복시말단 아미노산 43개, 60개, 120개, 140개, 및 154개 제거된 변이체 MGEA5-ΔC43, MGEA5-ΔC60, MGEA5-ΔC120, MGEA5-ΔC140 및 MGEA5-ΔC154 등을 각각 제작하였다. 이들 변이체 유전자가 함유된 재조합 plasmid pBADHisA를 *E. coli* TOP10에 각각 형질전환하고 효소활성을 측정하였다.

대장균에서 O-GlcNAcase의 발현

다른 융합 단백질로 발현하여 O-GlcNAcase의 발현 정도를 비교하기 위해 6×His tagging 이외에 GST와 thioredoxin과 융합 단백질 발현도 시도하였다. 대장균에서 O-GlcNAcase를 GST와 융합단백질로 생산하기 위해 재조합 plasmid pBADHisA/MGEA5를 제한효소 *Bgl*III와 *Pvu*II로 처리하여 2.7 kb의 O-GlcNAcase 유전자를 정제하고 제한효소 *Bam*HI과 *Pvu*II를 처리한 pGEX-5X-3에 cloning한 재조합 plasmid pGEX-5X-3/MGEA5를 제작하고 *E. coli* BL21에 형질전환하였다. 또한 thioredoxin과 융합단백질로 생산할 목적으로 pThioHisA를 제한효소 *Bgl*III와 *Pvu*II로 처리하고 정제하여 이미 정제한 O-GlcNAcase 유전자를 클로닝하고 pThioHisA/MGEA5라 명명하고 *E. coli* Top10에 형질전환하였다.

각 재조합 plasmid로 형질전환된 대장균에서 O-GlcNAcase의 발현을 유도하기 위해 하루 밤 배양한 배양액을 100 μg/ml의 ampicillin을 함유하고 있는 100 ml LB 배지에 접종하고 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 37°C에서 배양하였다. pBADHisA/MGEA5 형질전환체는 L-arabinose를 최종 농도가 0.02% 되게 첨가하고, pGEX-5X-3/MGEA5와 pThioHisA/MGEA5의 형질전환체는 IPTG가 0.1 mM이 되게 첨가한 후 30°C에서 4시간 배양하고 3,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 세포를 회수하였

다. 세포를 5 ml의 lysis buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 10 mM Imidazole, 100 μg/ml of lysozyme, 0.1% Triton X-100, EDTA-free protease inhibitor mix)에 현탁시키고 얼음에서 1 sec on/1 sec off로 1분간 3회 초음파 처리에 의해 세포를 파괴하였다. 4°C에서 20,000×g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 효소용액으로 사용하였다.

O-GlcNAcase의 활성 측정과 기질 특이성 조사

효소용액 5 μl를 함유한 80 μl의 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5를 37°C에서 5분간 배양한 후 기질인 10 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (pNP-β-D-GlcNAc)용액 20 μl를 첨가하고 섞은 후 37°C에서 30분간 배양하여 반응을 시킨 후 0.5 M Na₂CO₃ 용액 0.9 ml를 첨가하여 반응을 중지시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다(4). O-GlcNAcase와 v-O-GlcNAcase의 기질 유사체에 대한 특이성을 조사하기 위해 상기의 방법에 따라 2 mM의 pNP-β-D-GlcNAc, pNP-α-D-GlcNAc, p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide (pNP-β-D-GalNAc), p-nitrophenyl-β-D-glucose (pNP-β-D-Glc), pNP-β-D-Glucuronide, pNP-β-D-fucose 및 pNP-β-D-N, N'-diacetylchitobiose 등을 각각 함유한 반응액을 만들고 O-GlcNAcase와 v-O-GlcNAcase의 효소활성을 측정하였다.

SDS-PAGE and Western blot

O-GlcNAcase 결손 변이체들의 활성과 생성된 단백질의 양과의 관계를 비교, 분석하기 위해 Laemmli(8)의 방법에 따라 7% SDS-PAGE를 실시한 후 단백질을 PVDF membrane (Invitrogen)으로 전기적으로 이동을 하였다. 이후는 Invitrogen의 Western blot kit에 나타난 과정에 따라서 생쥐의 항 Xpress epitope (Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys)에 대한 일차 항체(Invitrogen)와 이차 항체인 alkaline phosphatase가 연결된 염소의 항 생쥐 항체(Invitrogen)를 사용하여 ECL 방법을 통해 O-GlcNAcase의 단백질 밴드를 확인하였다.

결과 및 고찰

O-GlcNAcase의 상동성 검색

O-GlcNAcase는 Meese 등(6, 7)에 의해 뇌막암 환자의 혈액에서 발견된 항원으로 이 단백질을 암호화하는 유전자를 클로닝하고 MGEA5 (meningioma-expressed antigen 5)로 명명하였다. 이 유전자의 염기서열로부터 유추된 총 아미노산 잔기는 916개이고 SDS-PAGE에서 확인한 분자량은 130 kDa이었다. 한편 아미노산 677개의 잔기로 구성되고 SDS-PAGE에서 분자량이 75 kDa으로 확인된 변종 O-GlcNAcase (v-O-GlcNAcase)를 암호화하는 MGEA5의 splice variant 형태인 유전자(MGEA5s)도 동일 연구진에 의해 발견되었다(2). v-O-GlcNAcase는 O-GlcNAcase의 카르복시 말단 부위가 제거된 형태이고 대부분의 아미노산 서열은 서로 일치하지만 v-O-GlcNAcase의 카르복시 말단 16개 아미노산은 O-GlcNAcase와 유일하게 서로 다른 잔기들이다. NCBI의 BLAST를 사용하여 이들 단백질과 상동성이 있는 다른 단백질을 검색한 결

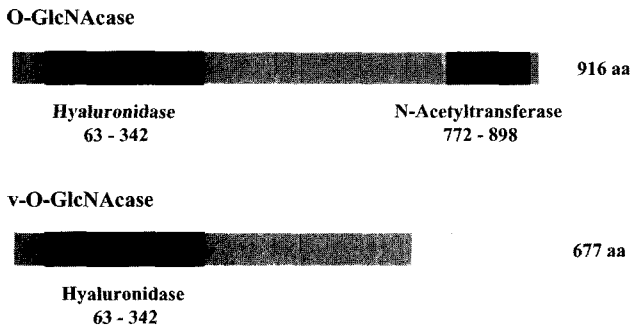


Fig. 2. Domain structures of O-GlcNAcase and v-O-GlcNAcase. O-GlcNAcase and v-O-GlcNAcase have the same N-terminal region, but v-O-GlcNAcase has no N-acetyltransferase domain in the C-terminal region.

과 두 단백질의 아미노 말단부위에 hyaluronidase-유사 영역과 O-GlcNAcase의 카르복시 말단부위에 N-acetyltransferase 영역의 보존된 두 영역을 발견하였다(Fig. 2). 아미노산 63번에서 342번째 잔기 사이에 위치하는 hyaluronidase-유사 영역은 세균 *Clostridium perfringens*의 Mu 독소와 *Streptococcus pyogenes*의 putative hyaluronidase와 높은 상동성을 나타내었다. 또한 v-O-GlcNAcase에는 존재하지 않으며 O-GlcNAcase의 카르복시 말단부위에 있는 N-acetyltransferase domain은 *Agrobacterium tumefaciens*와 *Streptomyces coelicolor*의 N-acetyltransferase와 상동성이 높게 나타났다.

결손 변이체의 제작 및 분석

재료 및 방법에서 기술한 대로 제조할 plasmid pBADHisA/MGEA5로부터 만든 MGEA5 결손 변이체 9종류를 제작하고 제한효소 *Bgl*III와 *Pvu*II를 처리한 후 아가로스 젤 전기영동을 통해

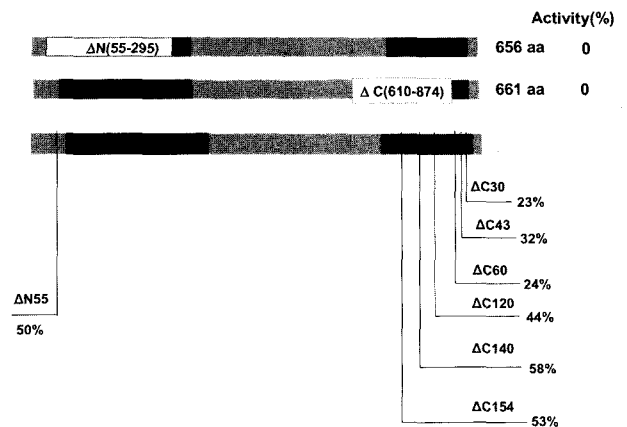


Fig. 3. O-GlcNAcase activities of deletion mutants. *E. coli* cells transformed with each deletion mutants were grown up to $A_{600} = 0.5$ in 5 ml of LB media supplemented with 100 μ g/ml of ampicillin and then expression was induced with 0.02% L-arabinose for 4 hr at 30°C. Cells were harvested and sonicated in 0.5 ml of lysis buffer. O-GlcNAcase activity of supernatant was assayed and expressed as percentage to intact O-GlcNAcase activity.

각 변이체에서 제거된 크기를 확인하고 대장균에 형질전환한 후 배양하면서 O-GlcNAcase의 발현을 유도한 각 변이체의 효소활성을 Fig. 3에 나타내었다. O-GlcNAcase의 hyaluronidase-유사 영역이나 카르복시 말단 영역의 N-acetyltransferase 영역을 대부분 제거할 경우 효소활성이 없었다. 이들 변이체 O-GlcNAcase의 세포 내 단백질 수준을 확인하기 위해 항 Xpress 항체를 이용한 Western blot을 수행한 결과 각 변이체에 해당되는 단백질 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 따라서 제거된 영역들은 O-GlcNAcase의 활성에 꼭 필요한 부위임을 알 수 있다. 반면에

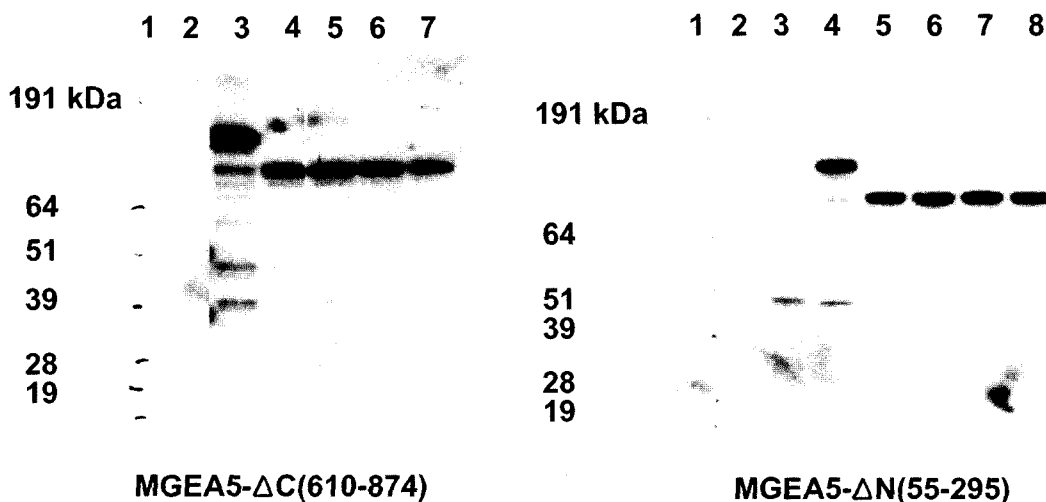


Fig. 4A. Western blot analysis of deletion mutants. Protein samples of deletion mutants were prepared as described in Materials and Methods. About 20 μ g were analysed in SDS-PAGE and proteins were electro-transferred to PVDF membrane. Membrane was probed with anti-Xpress antibody and then goat anti-mouse IgG-AP conjugate. Protein bands were detected by ECL. In MGEA5- Δ N(55-295) gel: lane 1, molecular standard; 2, empty vector; 3, MGEA5s; 4, MGEA5; 5-8, MGEA5- Δ N(55-295) mutants and in MGEA5- Δ C(610-874) gel: lane 1, molecular standard; 2, empty vector; 3, MGEA5; 4-7, MGEA5- Δ C(610-874) mutants.

hyaluronidase 유사 영역의 바깥 부분에 있는 아미노말단의 아미노산 55개를 제거한 MGEA5-ΔN55 변이체는 온전한 O-GlcNAcase 활성의 50%를 유지하였다. 또한 카르복시 말단을 끝에서 순차적으로 제거한 변이체들도 20-50%의 활성을 보였다. 각 변이체들 간의 단백질 수준을 비교한 Western blot 결과를 Fig. 4B에 나타내었다. 대체로 변이체들의 단백질 수준은 야생형 O-GlcNAcase에 비해 낮게 나타났으며 특히 아미노말단 55개 아미노산이 제거된 MGEA5-ΔN55와 카르복시말단 154개 아미노산이 제거된 MGEA5-ΔC154 변이체의 단백질 수준이 매우 낮았다. 이러한 부위는 효소활성에는 직접적인 영향이 없으나 단백질의 안정성에 영향을 미치는 것으로 추측된다. 이러한 삭제 변이체들의 제작과 분석의 결과를 통해 hyaluronidase-유사 영역은 효소의 촉매에 관여하지만 카르복시 말단영역의 N-acetyltransferase 영역은 효소의 촉매에는 직접 관여하지 않고 활성을 조절하는 부위로 작용할 것으로 사료된다. 이러한 사실은 Schultz 등(12)이 O-GlcNAcase에는 두 개의 촉매 영역, 즉 hyaluronidase-유사 영역과 카르복시 말단영역의 N-acetyltransferase 영역, 이 존재한다는 가설과 상반되는 실험결과이다.

O-GlcNAcase의 발현

재조합 plasmid pBADHisA/MGEA5와 pBADHisA/MGEA5s로 형질전환된 *E. coli* TOP10을 배양하면서 L-arabinose로 발현을 유도하고 pNP-GlcNAc을 기질로 사용하여 효소활성을 측정한다. 결과 O-GlcNAcase는 높은 활성을 나타내었고 염색한 SDS-PAGE gel에서도 약 130 kDa의 밴드를 확인할 수 있었다. 그러나 v-O-GlcNAcase의 경우는 같은 기질에 대해 활성이 없었고 SDS-PAGE gel 상에서도 밴드를 확인할 수 없었을 뿐만 아니라 Western blot에서는 약 75 kDa의 양성 신호를 관찰할 수 있었다. O-GlcNAcase의 생화학적 연구를 위해 추가로 GST와 thioredoxin 융합단백질로 발현한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 이렇게 융합단백질로 발현하면 O-GlcNAcase의 항체가 없어도 6×His, GST 및 thioredoxin 등의 항체를 이용해 Western blot으로 생성된 O-

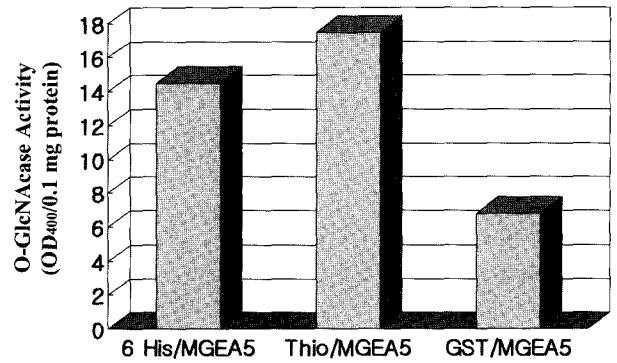


Fig. 5. Comparison of O-GlcNAcase activity of constructs expressed as three fusion partners. *E. coli* transformants of pBADHisA/MGEA5, pThioHisA/MGEA5 or pGEX-5X-3/MGEA5 were cultivated in 5 ml of LB media supplemented with 100 μg/ml of ampicillin until the absorbance at 600 nm reaches 0.5. O-GlcNAcase expression was induced in the presence of 0.02% L-arabinose (pBADHisA/MGEA5) and 0.1 mM IPTG (pGEX-5X-3/MGEA5 and pThioHisA/MGEA5) followed by additional culture at 30°C for 4 hr. Enzyme activities of each cell extract were determined.

GlcNAcase의 분석이 가능할 뿐만 아니라 Ni²⁺ 친화성 수지를 이용하면 단일조작으로 단백질을 용이하게 정제할 수 있는 장점이 있다. 효소활성은 thioredoxin 융합이 가장 높았고 6×His tag은 중간을 나타내었으며 GST 융합이 가장 낮은 효소활성을 나타내었다. O-GlcNAcase의 발현 정도를 비교하기 위해 SDS-PAGE로 확인한 결과 각 융합단백질에 해당하는 크기의 밴드를 관찰할 수 있었는데 GST 융합도 단백질 발현수준은 높게 나타났다. 이것은 다른 융합 상대에 비해 GST의 분자량이 크기 때문에 O-GlcNAcase의 folding에 영향을 주어 특히 활성을 감소시킨 원인으로 해석된다.

기질 특이성

대장균에서 아미노말단에 6×His tagging으로 발현한 재조합 O-GlcNAcase와 v-O-GlcNAcase의 여러 기질 유사체에 대한 반

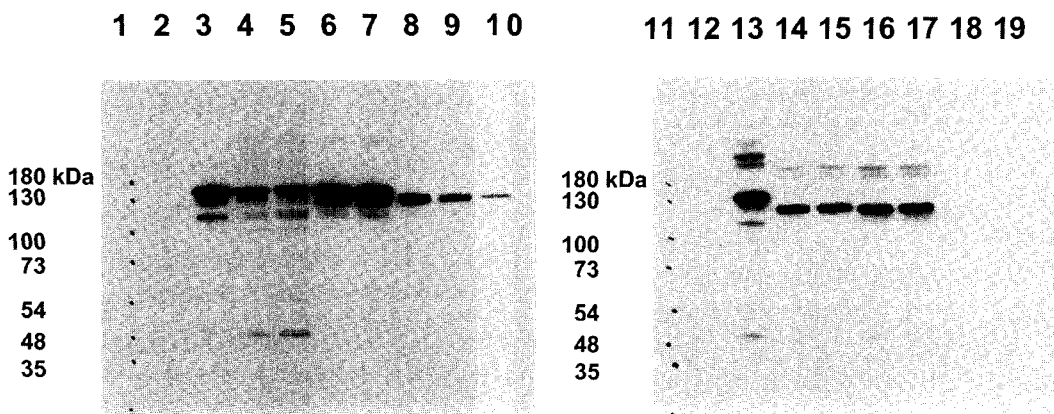


Fig. 4B. Western blot analysis of deletion mutants. Lanes 1 and 11, molecular standards; 2 and 3, empty vector; 3 and 13, MGEA5; 4 and 5, MGEA5-ΔC30; 6 and 7, MGEA5-ΔC43; 8 and 9, MGEA5-ΔC60; 10 MGEA5-ΔN55; 14 and 15, MGEA5-ΔC120; 16 and 17, MGEA5-ΔC140; 18 and 19, MGEA5-ΔC154.

Table 2. Substrate specificity of O-GlcNAcase and v-O-GlcNAcase

Substrates	O-GlcNAcase	v-O-GlcNAcase
pNP-β-D-GlcNAc	+	-
pNP-α-D-GlcNAc	-	-
pNP-β-D-GalNAc	-	-
pNP-β-D-Glc	-	-
pNP-β-D-glucuronide	-	-
pNP-β-D-fucose	-	-
pNP-β-D-N,N'-diacetyl chitobiose	-	-

응성을 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 기질로 사용한 7종류의 당 유도체에 대해 오직 O-GlcNAcase만이 pNP-β-D-GlcNAc에 대해 활성을 나타내었다. v-O-GlcNAcase는 사용한 어떤 기질에 대해서도 활성을 보이지 않았다. α-와 β-glycosidic 결합 중 β-결합이 분해되었으며 당 유도체의 관점에서 보면 N-acetylglucosamine (GlcNAc)만이 기질로 작용하였고 N-acetylgalactosamine (GalNAc)와 2번 탄소위치에 acetylamine기가 없는 glucose (Glc) 모두 반응성이 없었다. 따라서 acetyl기가 효소-기질간의 결합에 중요한 기능을 할 것으로 유추되며 O-GlcNAcase의 N-acetyltransferase 영역이 당의 acetyl기와 상호 작용할 것으로 추측된다(5). v-O-GlcNAcase에 반응성이 있는 당유도체의 합성이나 세포 내 당단백질의 발견은 이 효소의 세포 내 기능의 연구를 촉진할 것으로 기대된다.

O-GlcNAcase는 쥐 비장의 세포질에서 정제가 최초 보고된 이후로 사람의 뇌에서도 정제가 되었으며 사람의 O-GlcNAcase 유전자는 서로 다른 연구진에 의해 독립적으로 진행된 연구에서 각각 클로닝되었다(3). Hart 등(4)은 사람 뇌에서 변형된 단백질에서 O-GlcNAc를 절단하는 활성이 있는 N-acetylglucosaminidase를 암호화하는 cDNA를 클로닝하였다. Meese 등(6)은 뇌막암 환자에서 hyaluronidase 활성이 있으며 세균의 hyaluronidase와 상동성이 있으나 기존에 발견된 사람의 hyaluronidase와는 상동성이 전혀 없는 유전자를 클로닝하고 새로운 종류의 사람 hyaluronidase 유전자로 MGEA5라고 명명하였다. 이후의 여러 연구결과를 토대로 MGEA5 단백질은 hyaluronidase 활성뿐만 아니라 O-GlcNAcase 활성도 있으며 O-GlcNAcase와 동일한 효소임이 확인되었다. Meese 등에 의해 발견된 변형체인 MGEA5s (v-O-GlcNAcase)는 pNP-β-D-GlcNAc에 활성이 없으며 주로 핵에 존재하나 O-GlcNAcase는 이 기질에 대해 활성을 나타내며 세포질에 분포하고 있는 것이 확인되었다.

본 논문에서는 O-GlcNAcase와 v-O-GlcNAcase 효소의 생화학적 및 세포 내 기능을 연구하기 위한 기초연구로서 대장균에서 재조합 발현계를 확립하였으며 여러 결손 변이체를 제작하고 분석하였다. 효소활성이 없는 결손 변이체는 세포의 표현형질에 영향을 주지 않고 이 단백질의 세포내 위치를 밝히는데 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

참고문헌

- Comtesse, N., D. Heckel, A. Racz, N. Brass, B. Glass, and E. Meese. 1999. Five novel immunogenic antigens in meningioma: cloning, expression analysis, and chromosomal mapping. *Clinical Cancer Res.* 5, 3560-3568.
- Comtesse, N., E. Maldener, and E. Meese. 2001. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytosolic hyaluronidase and a β-N-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 634-640.
- Dong, D.L., and G.W. Hart. 1994. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-β-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* 269, 19321-19330.
- Gao, Y., L. Wells, F.I. Comer, G.J. Parker, and G.W. Hart. 2001. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic β-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, 9838-9845.
- Hanover, J.A. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J.* 15, 1865-1876.
- Heckel, D., N. Comtesse, N. Brass, N. Blin, K.D. Zang, and E. Meese. 1998. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Human Mol. Genet.* 7, 1859-1872.
- Kreppel, L.K., M.A. Blomberg, and G.W. Hart. 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9308-9315.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lubas, W.A. and J.A. Hanover. 2000. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase: domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 275, 10983-10988.
- Miller, M.W., M.R. Caracciolo, W.K. Berlin, and J.A. Hanover. 1999. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 51-60.
- Roos, M.D. and J.A. Hanover. 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271, 275-280.
- Schultz, J. and B. Pils. 2002. Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Lett.* 529, 179-182.
- Seidman, C.E. 2002. *Escherichia coli*, plasmids, and bacteriophages, In F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (ed.), Short Protocols in Molecular Biology. 5th ed. John Wiley & Sons Inc. New York, N.Y.
- Sweitzer, T.D., D.C. Love, and J.A. Hanover. 2000. Regulation of nuclear import and export. *Current Topics in Cellular Regulation* 36, 77-94.
- Wells, L., K. Vosseller, and G.W. Hart. 2001. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 29, 2376-2378.
- Wells, L., S.A. Whelan, and G.W. Hart. 2003. O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 435-441.
- Zachara, N.E. and G.W. Hart. 2002. The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem. Rev.* 102, 431-438.

(Received 27 May, 2004/Accepted 9 June, 2004)

ABSTRACT : Analysis of Human O-GlcNAcase Gene and the Expression of the Recombinant Gene.
Dae-Ook Kang* and Hyun-Hyo Suh¹ (Department of Biochemistry and Health Science, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea, ¹Department of Environmental Engineering, The Jinju National University, Jinju 660-758, Korea)

Dynamic modification of cytoplasmic and nuclear proteins by O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on Ser and Thr residues is ubiquitous in higher eukaryotes. And this modification may serve as a signaling modification analogous to protein phosphorylation. Addition and cleavage of O-GlcNAc are catalyzed by O-linked GlcNAc transferase (OGT) and O-linked N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase), respectively. Two types of human O-GlcNAcase gene were cloned and expressed as three fusion proteins in *Escherichia coli*. O-GlcNAcase activity showed in the order of thioredoxin fusion > 6 × His tag > GST fusion. O-GlcNAcase had enzymatic activity against only pNP-GlcNAc of seven tested substrate analogs. Blast search revealed that O-GlcNAcase has two conserved domains, amino terminal hyaluronidase-like domain and carboxy terminal N-acetyltransferase domain. Extensive deletion studies were done to define catalytically important domains. The deletions of hyaluronidase-like domain and N-acetyltransferase domain abolished enzyme activity. But, N-terminal 55 amino acid deletion and C-terminal truncation showed lower activity. Based on deletion analysis, we suggest that hyaluronidase-like domain is essential for enzyme activity and carboxy terminal N-acetyltransferase domain may be modulatory function.