

사람의 O-linked-N-acetyl-β-D-glucosaminidase 유전자를 함유한 대장균의 배양조건과 효소학적 특성

강대욱* · 조용권 · 서현호¹

창원대학교 보건·생화학과, ¹진주 산업대학교 환경공학과

단백질의 serine이나 threonine의 수산기에 N-acetyl-β-D-glucosamine (O-GlcNAc)으로 변형되는 당쇄는 대부분의 진핵세포에서 광범위하게 일어나는 번역 후 수식의 일종으로 여러 세포 내 현상에 관여하고 있다. O-GlcNAc의 변형 정도는 O-GlcNAc transferase (OGT)와 O-linked N-acetyl-β-D-glucosaminidase (O-GlcNAcase)에 의해 조절된다. O-GlcNAcase의 효소활성 조절물질을 탐색하기 위한 시험관 내 검정계를 확립하기 위해 재조합 O-GlcNAcase의 생산을 시도하였다. O-GlcNAcase 발현을 최적화하기 위한 배양조건을 검토한 결과 유도 배양 온도 30°C, 유도제인 L-arabinose 0.02%, 유도 배양 시간 5시간 등으로 나타났다. 위의 조건에서 대장균 형질전환체를 배양하면서 한 시간 간격으로 배양액을 채취하여 세포를 파괴하고 얻은 효소용액의 활성은 배양 후 3시간에서 5시간까지는 급격히 증가하였으나 그 이후는 거의 증가하지 않았다. Western blot으로 발현된 단백질 양을 조사한 결과는 활성 그래프와 비슷한 양상을 보였다. 이렇게 생산한 O-GlcNAcase의 최적 반응 조건은 pH 6.5, 반응 온도 45°C, 기질의 농도 2 mM, pH 6.5로 나타났다.

Key words □ O-GlcNAcase, induction, optimal pH, optimal temperature, reaction time, Western blot

1984년 Hart 등의 연구진은 lymphocyte 당단백질의 성분 분석 중 N-acetylglucosamine 이 단당의 형태로 단백질에 부착되어 있는 새로운 형태의 당쇄가 존재함을 발견하였으며, 서로 다른 두 연구진의 계속된 연구에서 O-GlcNAc 단백질의 분포양상을 확인한 결과 대부분의 O-GlcNAc 단백질이 세포질 혹은 핵질 내에 존재함을 확인하였다(17). 이는 세포막에 존재하거나 세포 외로 분비되는 단백질에서만 당쇄가 일어나며 이러한 당쇄는 단백질의 구조적 안정성에 영향을 주며 세포 내 신호전달이나 조절에 관여하지 않는다는 기존의 학설을 뒤엎는 획기적인 발견이다. 또 하나의 중요한 발견은 O-GlcNAc 단백질 자체의 변화양상과는 독립적으로 O-GlcNAc level 이 매우 빠르게 변화한다는 사실로서, 이는 단백질에 부착되어 있는 O-GlcNAc 분자가 단순한 단백질 구성체의 일부로서 뿐만 아니라 마치 인산화와 유사하게 그 제거와 부착의 과정이 기능적이고 역동적인 조절기구로 작용할 수 있음을 시사한다(3, 8).

공여체 UDP-GlcNAc으로부터 GlcNAc을 단백질로 첨가하는 효소는 UDP-GlcNAc: polypeptide O-N-acetylglucosaminyltransferase (OGT)이며 변형된 단백질에서 O-GlcNAc을 분해하는 효소는 O-linked N-acetyl-β-D-glucosaminidase (O-GlcNAcase)이다. 이러한 OGT/O-GlcNAcase 쌍의 작용은 kinase/phosphatase 쌍의 작용과 같은 기질에 대해 상반적으로 작용하여 O-GlcNAc와 인산에 의한 번역 후 변형으로 다양한 형태의 변형된 단백질이 존재할 수

있다. 즉 인산화가 많이 될수록 O-GlcNAc 변형이 줄어들고 O-GlcNAc 변형이 높을수록 인산화 정도는 낮게 된다(14, 19).

뇌에 있는 단백질들 중 신경섬유(neurofilament), clathrin assembly protein(AP-3, AP-180), microtubule-결합 단백질, synapsin I, ubiquitin carboxyl hydrolase-L1, Tau, β-amyloid 전구체 등이 O-GlcNAc 변형이 많이 일어나며 Alzheimer를 앓고 있는 사람의 뇌에서는 Tau 단백질이 과 인산화되고 AP-3에서는 O-GlcNAc 변형 정도가 아주 낮은 사실이 밝혀졌다(4, 5, 6). O-GlcNAc 변형과 인산화는 상반적이므로 Tau의 과 인산화는 O-GlcNAc 변형이나 대사의 기능 이상이 원인인 것으로 추정된다. 또 다른 간접적인 증거는 흥미롭게도 OGT 유전자는 X-염색체의 Parkinson's disease의 locus와 그리고 O-GlcNAc 유전자는 10번 염색체의 Alzheimer disease locus에 해당된다는 것이다(12).

O-GlcNAc은 췌장의 β-세포에서 인슐린 저항성과 세포 내 포도당 농도의 감지기능에 관여하는 것으로 보이며 OGT mRNA는 다른 기관에 비해 췌장의 β-세포에서 풍부하게 존재함이 밝혀졌다(1, 2, 7). 과량의 영양분 유입이나 제 2형 당뇨병으로 인한 고혈당은 hexosamine biosynthetic pathway의 최종 산물인 UDP-GlcNAc 농도를 증가시켜 O-GlcNAc 변형이 높아져 결국은 β-세포 상실을 초래한다(9, 10). 이것은 당뇨병이 세포 내 O-GlcNAc 수준과 관련이 있음을 시사한다. 실제로 β-세포 독소인 streptozotocin과 alloxan은 각각 O-GlcNAcase와 OGT의 비가역적인 저해제임이 보고되었다. OGT를 근육과 지방 세포에서 과 발현하여 인슐린 저항성과 hyperleptinemia를 유발함이 보고되었는데 이것은 O-GlcNAc 변형이 영양분 감지와 제 2형 당뇨병

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

발병에 관여하는 직접적인 실험적 증거이다(16). 따라서 β -세포의 O-GlcNAc 변형정도를 낮추는 OGT 저해제나 O-GlcNAcase 활성제를 탐색하면 당뇨병 치료에 대한 새로운 각도에서 접근할 수 있을 것이다.

핵이나 세포질 단백질의 O-GlcNAc에 의한 단백질의 변형은 생명현상에 필수적이며 지금까지 초점이 된 인산화와 더불어 세포의 신호전달과 조절하는 기작이다. 더구나 이러한 비정상적인 O-GlcNAc 변형은 암, 당뇨 및 Parkinson's disease나 Alzheimer와 같은 퇴행성 신경질환 등의 발병과 밀접한 관련이 있음이 밝혀지고 있다(8). 각 질병에서 비정상적으로 O-GlcNAc 변형이 과도하게 일어나는 단백질을 O-GlcNAc 특이 항체와 프로테움 기술을 통해 발견하면 각 질병의 진단을 위한 표지 단백질(marker protein)로 사용될 것으로 기대된다. 또한 세포 내에서 OGT나 O-GlcNAcase와 상호 작용하는 단백질을 탐색하고 이들의 상호 작용을 조절하거나 이들 두 효소활성을 조절하는 화합물을 탐색하면 기초 연구뿐만 아니라 위에 열거한 난치성 질병의 발병 기작 규명이나 치료에 매우 유익하게 응용될 가능성이 높다.

본 논문에서는 이러한 점에 착안하여 O-GlcNAcase의 활성을 조절하는 화합물을 탐색하기 위한 *in vitro* 탐색계 확립의 기초연구로서 사람 뇌의 O-GlcNAcase 유전자가 클로닝된 재조합 plasmid pBADHisA/MGEA5의 대장균 형질전환체의 배양조건을 최적화하고 생산된 효소의 여러 생화학적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

대장균 숙주는 *E. coli* TOP10[F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcr* BC) ϕ 80lacZAM15 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. 사람 뇌의 cDNA library에서 cloning한 O-GlcNAcase의 아미노 말단에 6개의 histidine이 융합된 재조합 단백질을 생산하기 위해 L-arabinose에 의해 유도되는 P_{BAD} promoter를 가진 pBADHisA (Invitrogen)의 *Bgl*I와 *Pvu*II 부위에 클로닝된 pBADHisA/MGEA5를 사용하였다.

대장균 형질전환체의 배양조건 확립

(1) 배양시간에 따른 효소활성

대장균 형질전환체를 100 μ g/ml의 ampicillin이 함유된 4 ml의 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하여 37°C, 200 rpm에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 배양액 500 μ l를 50 ml LB 배지(100 μ g/ml의 ampicillin) 접종하고 600 nm에서 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양한 후 2% L-arabinose 용액 0.5 ml를 첨가하고 30°C, 200 rpm에서 진탕 배양하면서 한 시간 간격으로 배양액 1 ml를 채취하였다. 세포를 초음파 처리로 파괴하고 상등액을 회수하여 효소활성을 측정하였다.

(2) 유도온도와 효소활성

O-GlcNAcase 발현의 유도제인 0.02% L-arabinose의 존재 하

에 유도온도를 20, 25, 30, 37 및 42°C로 각각 달리하면서 (1)에서 결정한 배양시간인 5시간 배양한 후 원심분리로 세포를 회수하였다.

(3) L-Arabinose 농도와 효소활성

(2)에서 결정한 최적 온도 30°C를 사용하여 유도제인 L-arabinose의 최적 농도를 결정하기 위해 30°C에서 L-arabinose의 농도를 0.01, 0.01, 0.002, 0.03 와 0.04%로 유지하고 30°C에서 5시간 배양한 후 세포를 회수하였다.

(4) 최적 배양조건에서 대장균의 배양

대장균 형질전환체의 하룻밤 배양액 1.0 ml를 100 ml LB 배지(100 μ g/ml의 ampicillin) 접종하고 600 nm에서 흡광도가 0.5 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 2% L-arabinose 용액 1 ml를 첨가하고 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하면서 한 시간 간격으로 배양액 1 ml를 채취한 후 원심분리로 세포를 회수하였다.

대장균 세포의 파괴 및 효소용액의 조제

각 조건에 맞게 배양하면서 채취한 대장균 세포를 0.5 ml의 lysis buffer (20 mM phosphate buffer, pH 7.4, 100 μ g/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 10,000 \times g로 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하여 효소용액으로 사용하였다.

SDS-PAGE and Western blot

확립한 배양조건하에서 대장균 형질전환체를 배양하면서 배양 시간에 따른 O-GlcNAcase의 활성과 단백질 양과의 관계를 비교, 분석하기 위해 Laemmli(11)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 일차 항체(Invitrogen)와 이차 항체인 alkaline phosphatase가 연결된 염소의 항 생쥐 항체(Invitrogen)를 사용하여 ECL 방법을 통해 O-GlcNAcase의 단백질 밴드를 확인하였다

O-GlcNAcase의 활성 측정

효소용액 5 μ l를 함유한 80 μ l의 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 μ l를 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(3). 여기서 효소용액, 반응시간, 반응온도, 기질의 농도, 반응 pH 등을 변화시키면서 최적 반응조건을 결정하였다.

O-GlcNAcase의 반응조건 조사

(1) 효소용액의 양에 따른 활성

앞서 기술한 방법에 의해 제조한 효소 용액을 1 µg/ml로 희석하고 0.1, 0.5, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 및 40 µl을 각각 넣고 2 mM 기질의 존재 하 37°C에서 30분간 반응을 시켰다.

(2) 반응시간과 효소활성

효소용액 5 µl를 사용하고 10, 20, 30, 40, 50, 60, 및 90분간 반응시키고 활성을 측정하였다.

(3) 기질의 농도와 효소활성

효소용액 5 µl, 온도 37°C에서 기질인 pNP-β-D-GlcNAc의 농도를 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 mM로 유지하고 30분간 반응을 시킨 후 효소활성을 측정하였다.

(4) 반응온도와 효소활성

효소용액 5 µl, 기질의 농도 2 mM의 조건으로 반응온도 20, 25, 30, 37, 45, 50, 60, 70, 80°C에서 효소 반응을 30분간 진행한 후 활성을 측정하였다.

(5) 반응 pH와 효소활성

효소용액 5 µl, 기질의 농도 2 mM, 반응온도 45°C의 조건 하 pH의 범위가 2.0-12.0 인 반응 완충액을 사용하여 30분간 반응시키고 활성을 측정하였다.

(6) 용매의 효소활성에 대한 영향

이상에서 결정한 최적 반응조건을 토대로 일반적으로 천연물을 녹이는데 많이 사용되는 메탄올, DMSO와 chloroform 등이 O-GlcNAcase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 이들 용매를 2, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 20%되게 첨가하고 효소용액 5 µl, 기질의 농도 2 mM, 반응온도 45°C, 반응 pH 6.5의 조건으로 30분간 반응시켰다.

결과 및 고찰

대장균 형질전환체의 배양조건 확립

(1) 배양시간에 따른 효소활성

30°C에서 유도 배양시간에 따른 효소의 활성을 Fig. 1에 나타내었다. 배양시간 2시간까지는 활성을 거의 보 이지 않다가 3시간부터 효소활성이 증가하기 시작하여 4시간 후에는 급격히 증가하였다. 그 이후는 거의 일정하게 유지되었다. 본 결과로부터 배양시간은 5시간으로 정하였다.

(2) 배양온도에 따른 효소활성

O-GlcNAcase가 발현되는 유도 조건하(L-arabinose 0.02%)에서 20, 25, 30, 35, 42°C에서 5시간 배양한 후 효소활성을 비교하였다(Fig. 2). 온도가 너무 높거나 낮으면 세포의 생육에 장애가 생겨 전반적으로 활성이 낮았으나 25, 30, 37°C에서는 상대적으로 높은 활성을 나타내었으며 30°C에서 가장 높은 활성을 보였다. 일반적으로 유도배양온도를 37°C보다 낮은 온도를 유지하면

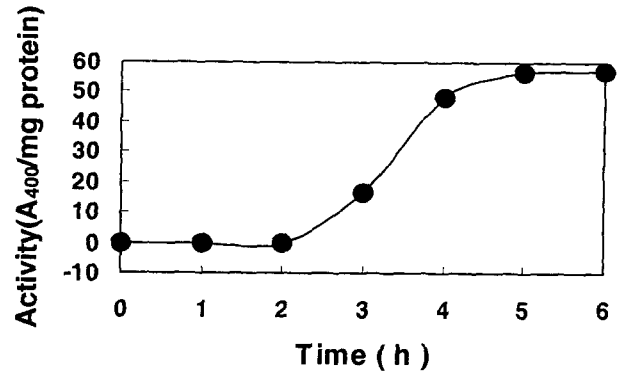


Fig. 1. The effect of induction time on activity. *E. coli* cells transformed with pBADHisA/MGEA5 were grown in LB broth supplemented with 100 µg/ml of ampicillin at 37°C. When the absorbance at 600 nm reaches 0.5, L-arabinose was added to 0.02% and cultivated for 6 hr at 30°C. About 1 ml of culture was taken at the interval of an hour and analyzed for enzyme activity.

inclusion body의 생성을 감소시켜 활성형의 효소가 증가하게 되는 것이 잘 알려져 있다.

(3) L-Arabinose 농도에 따른 효소활성

P_{BAD} promoter를 활성화시키는 유도제로 작용하는 L-arabinose의 처리 농도에 따른 효소의 활성을 조사하였다(Fig. 3). 0.02%의 농도로 배지에 첨가할 경우 효소의 활성이 가장 높았다. 이상의 결과로부터 O-GlcNAcase 유전자를 함유한 대장균의 기본적인 배양조건을 확립하였다.

(4) 최적 조건에서 배양시간에 따른 효소의 활성

L-Arabinose의 농도는 0.02%, 배양온도는 30°C와 37°C에서 6시간 배양하면서 효소활성을 비교하였다(Fig. 4). 배양시간 3시간까지 모두 낮은 활성을 보였으나 그 이후로는 급격히 증가하여 배양 후 5시간에 거의 최대에 도달하였다. 배양 후 5시간부터는

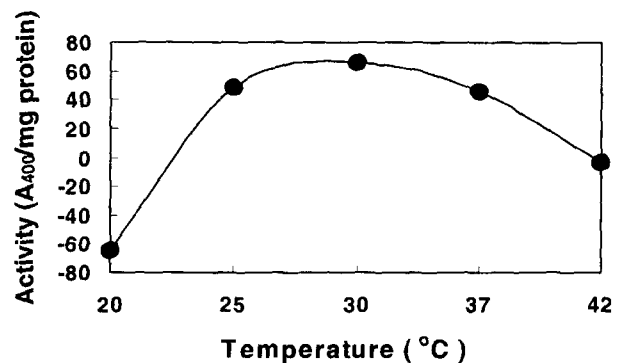


Fig. 2. The effect of induction temperature on activity. O-GlcNAcase synthesis was induced by adding L-arabinose to 0.02% to the *E. coli* cultures and followed by additional cultivation for 5 hr at indicated temperature: 20, 25, 30, 37 and 42°C. *E. coli* cells were harvested and analyzed for enzyme activity.

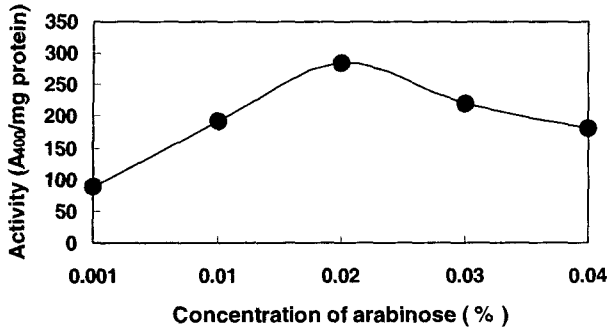


Fig. 3. The effect of arabinose concentration on activity. *E. coli* cultures were grown in the presence of with varying concentration of L-arabinose(0.001, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04%) for 5 hr at 30°C. *E. coli* cells were harvested and analyzed for O-GlcNAcase activity.

거의 일정하게 유지하였다. 전체적으로 37°C보다 30°C에서 유도 발현하는 것이 높은 활성을 나타내었다. 배양온도 30°C에서 합성된 O-GlcNAcase 단백질 양을 분석하기 위해 O-GlcNAcase의 아미노 말단에 있는 Xpress epitope(Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)에 대한 항체(Invitrogen)를 사용하여 Western blot를 실시하였다(Fig. 5). 배양시간이 진행됨에 따라 효소활성의 증가에 비례하여 단백질 band의 두께와 진하기가 증가하였다. 이것은 배양시간에 따른 효소활성을 측정된 Fig. 4와 비슷한 양상을 나타내었다.

O-GlcNAcase의 반응조건 조사

(1) 효소용액 양과 활성과의 관계

반응조건에서 효소에 의해 기질이 포화되는 효소용액의 양을 알고 직선범위에 있는 효소 양을 선택하고자 기질의 농도는 2 mM로 고정하고 효소용액(1 µg/ml)의 양에 따른 O-GlcNAcase

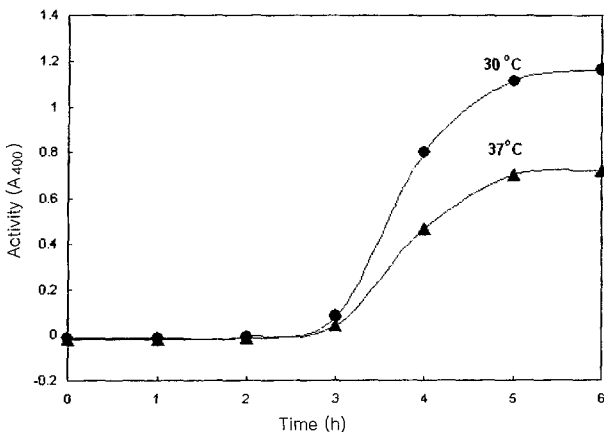


Fig. 4. Time course of O-GlcNAcase activity of *E. coli* cells grown at 30°C (●) and 37°C (▲). *E. coli* transformants were grown in LB broth supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and 0.02% L-arabinose for 6 hr at 30°C and 37°C, respectively. Cells were sampled at the interval of one hour and lysed with bead beater. O-GlcNAcase activity of supernatant of cell extract was determined.

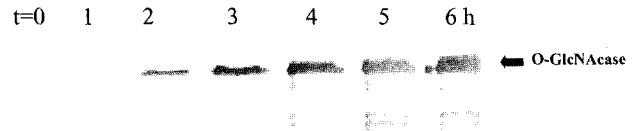


Fig. 5. Western blot analysis of *E. coli* cells grown at 30°C. While cultivating *E. coli* cells at 30°C, 1.0 ml of culture was taken at the interval of an hour. Protein samples were prepared by sonication of cells. About 20 µg were analysed in SDS-PAGE and proteins were electro-transferred to PVDF membrane. Membrane was probed with anti-Xpress antibody and then goat anti-mouse IgG-AP conjugate. Protein bands were detected by ECL. The numbers on the top denote culture time. O-GlcNAcase bands were marked by an arrow.

활성을 조사한 결과 10 µl 이상에서는 plateau에 도달하여 활성이 일정하게 유지되었고 10 µl까지는 직선관계를 보였다(Fig. 6). 따라서 직선 영역에 위치하는 효소용액의 양을 5 µl로 정하였다.

(2) 반응시간과 활성과의 관계

효소 용액 5 µl와 기질 2 mM 사용하고 최적 반응시간을 정하기 위해 반응시간에 따른 활성을 37°C에서 측정하였다. 반응시간 40분까지 직선적으로 증가하였으나 40분 이후에서는 포화상태에 도달하였다(Fig. 7). 따라서 직선범위에 있는 시간인 30분을 반응시간으로 정하였다.

(3) 기질의 농도와 활성과의 관계

정해진 조건(효소용액 양: 5 µl, 반응시간: 30분)하에서 최적 기질농도를 정하기 위해 기질의 농도에 따른 O-GlcNAcase 활성간의 관계를 조사하였다(Fig. 8). 2 mM 까지 거의 직선적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 일정한 값을 유지하였다. 직선 영역에 있는 가장 높은 농도인 2 mM을 선택하였다.

(4) 반응온도와 활성과의 관계

앞서 정한 조건들을 사용하여 O-GlcNAcase의 최적 온도를 구

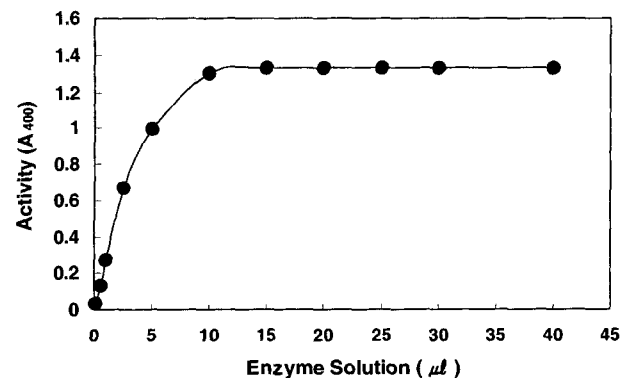


Fig. 6. O-GlcNAcase activity with respect to the amount of enzyme solution. O-GlcNAcase activity was assayed for 30 min in 100 µl of reaction mixture containing 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5, 2 mM pNP-GlcNAc and varying amount of enzyme solution.

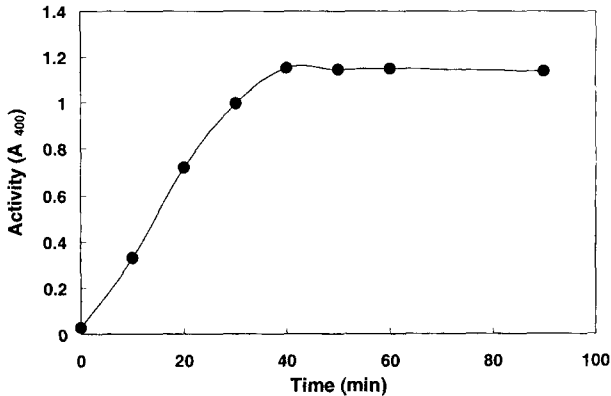


Fig. 7. The effect of reaction time on O-GlcNAcase activity. O-GlcNAcase activity of 5 μ l sample was assayed in 100 μ l of reaction mixture containing 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5, 2 mM pNP-GlcNAc for indicated time: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 90 min.

하기 위해 반응온도를 20°C에서 80°C까지 변화시키면서 활성을 조사한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 45°C에서 활성이 가장 높았고 37°C와 50°C에서도 서로 비슷한 수준으로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 반응온도를 45°C로 정하였다.

(5) pH와 활성과의 관계

마지막으로 반응 pH와 활성과의 관계를 조사한 결과를 보면 pH 6.5가 최적이었으나 그 이외의 pH 영역에서는 활성이 급격하게 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 지금까지의 정한 반응조건을 요약하면 효소용액의 사용량은 5 μ l(5 μ g), 반응시간은 30분, 기질의 농도는 2 mM, 반응온도는 45°C 그리고 반응 pH는 6.5 등이었다. 이러한 반응조건은 기존에 발표된 결과와 거의 유사한 양상을 보여준다(3, 18). 대장균 형질전환체의 배양조건 확립과 재조합 O-GlcNAcase의 반응조건 확립의 결과는 천연물에서 O-GlcNAcase 활성 조절물질의 탐색을 위한 기초 연구로서 유용할 것으로 기대된다.

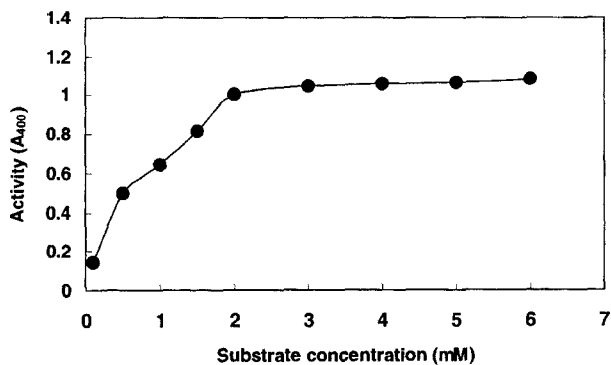


Fig. 8. Effect of substrate concentration on O-GlcNAcase activity. O-GlcNAcase activity of 5 μ l sample was assayed for 30 min in 100 μ l of reaction mixture containing 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5 and varying concentration of pNP-GlcNAc: 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 mM.

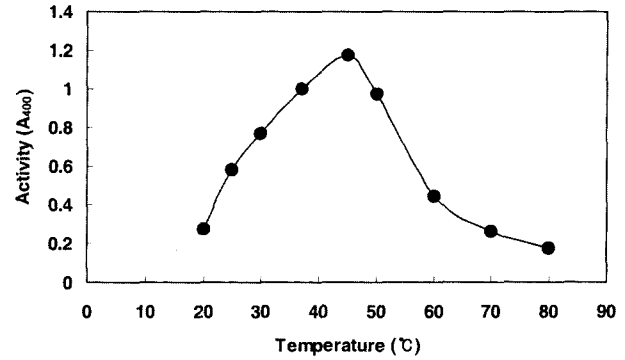


Fig. 9. Effect of temperature on O-GlcNAcase activity. O-GlcNAcase activity of 5 μ l sample was assayed for 30 min in 100 μ l of reaction mixture containing 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5 and 2 mM pNP-GlcNAc at varying temperature: 20, 25, 30, 37, 45, 50, 60, 70, 80°C.

활성에 대한 용매의 영향

천연 유기물질을 용해시키는데 사용되는 대표적인 용매 3종에 대한 O-GlcNAcase 반응성을 조사하였다. O-GlcNAcase는 시험한 용매 중 chloroform에 대해 가장 민감하게 활성이 감소하여 5% chloroform의 존재 시 활성이 20%로 감소하였다. Methanol의 경우 O-GlcNAcase에 대한 영향이 가장 적었다. 7.5%에서는 80% 이상의 활성을, 20%에서도 80% 정도의 활성을 유지하였다. DMSO는 중간 정도로 영향을 주었다(Fig. 11).

본 연구에서는 사람 뇌에서 유래한 재조합 O-GlcNAcase의 생산성 높이기 위한 배양 조건을 확립하였으며 또한 대장균에서 histidine tag로 발현한 이 효소의 반응에 영향을 주는 인자들의 효과를 조사하였다. 이러한 결과는 O-GlcNAcase의 활성을 조절하는 천연물을 탐색하기 위한 *in vitro* 탐색계를 확립하기 위한 기초 자료로 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

단백질의 O-GlcNAc 변형은 세포 내 여러 신호전달과정에 관여하고 조절하는 작용을 하며 심지어는 서론에서 기술한 바와 같이 당뇨, 신경질환, 암 등과도 관련이 있는 증거들이 발표되고

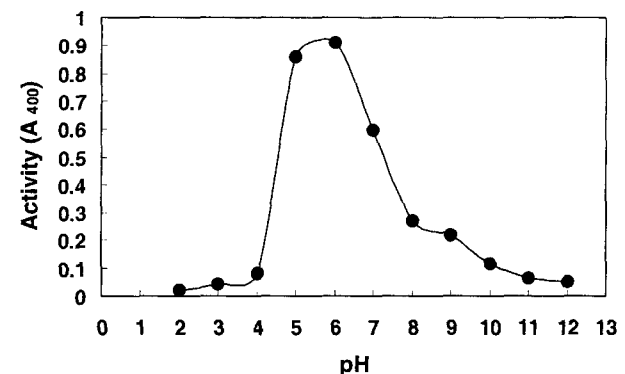


Fig. 10. Effect of pH on O-GlcNAcase activity. O-GlcNAcase activity of 5 μ l sample was assayed at 45°C for 30 min in 100 μ l of reaction mixture containing 2 mM pNP-GlcNAc and 20 mM buffer varying pH range from 2.0 to 12.0.

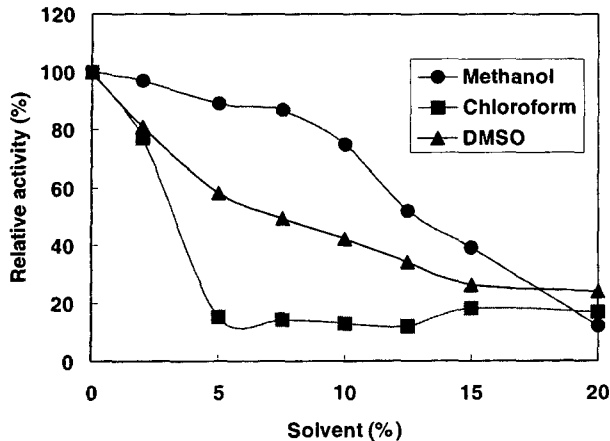


Fig. 11. Effect of solvents on O-GlcNAcase activity. O-GlcNAcase activity of 5 μ l sample was assayed at 45°C for 30 min in 100 μ l of reaction mixture containing 20 mM citrate-phosphate, pH 6.5, 2 mM pNP-GlcNAc and varying concentration of each solvent.

있다(18, 19, 20). 이 중 당뇨에 관한 연구가 가장 광범위하게 연구된 분야이다. 단백질의 O-GlcNAc 변형은 세포의 영양분 감지로 작용하여 O-GlcNAc 변형이 과량으로 일어나면 β -세포의 치사를 초래함이 보고되었다(13, 15). 또한 당뇨병 환자의 췌장세포에는 O-GlcNAc 변형된 단백질이 정상 조직보다 훨씬 많이 존재함이 발견되었다. 그러므로 OGT나 O-GlcNAc의 활성을 조절하는 천연물을 탐색하면 여러 생명현상을 밝히기 위한 molecular probe로 사용될 가능성이 높을 뿐만 아니라 이러한 질병을 연구하거나 치료하는데 유용하게 이용될 가능성이 높다.

참고문헌

- Akimoto, Y., L.K. Kreppel, H. Hirano, and G.W. Hart. 1999. Localization of the O-GlcNAc transferase in rat pancreas. *Diabetes* 48, 2407-2413.
- Akimoto, Y., L.K. Kreppel, H. Hirano, and G.W. Hart. 2000. Increased O-GlcNAc transferase in pancreas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 43, 1239-1247.
- 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 beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, 9838-9845.
- Griffith, L.S. and B. Schmitz. 1995. O-Linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 424-431.
- Griffith, L.S. and B. Schmitz. 1999. O-Linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to per-

- turbations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 262, 824-831.
- Griffith, L.S., M. Mathes, and B. Schmitz. 1995. β -Amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Neurosci. Res.* 41, 270-278.
- Hanover, J.A., Z. Lai, G. Lee, W.A. Lubas, and S.M. Sato. 1999. Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic β -cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 38-45.
- Hanover, J.A. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J.* 15, 1865-1876.
- Kondra, R.J. and J.E. Kudlow. 2002. The role of O-linked protein glycosylation in β -cell dysfunction. *Int. J. Mol. Med.* 10, 535-539.
- Kudlow, J.E. 2002. The O-GlcNAcase theory of diabetes: commentary on a candidate gene for diabetes. *Mol. Genet. Metabol.* 77, 1-2.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lendon, C. and N. Craddock. 2001. Susceptibility gene(s) for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Trends Neurosci.* 24, 557-559.
- Liu, K., K.L. Andrew, E. Chin, and J.E. Kudlow. 2000. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β -cell: linkage of O-linked GlcNAc to β -cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2820-2825.
- Lubas, W.A., D.W. Frank, M. Krause, and J.A. Hanover. 1997. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9316-9324.
- McClain, D.A. and E.D. Crook. 1996. Hexosamine and insulin resistance. *Diabetes* 45, 1003-1009.
- McClain, D.A., W.A. Lubas, R.C. Cooksey, M. Hazel, G.J. Parker, D.C. Love, and J.A. Hanover. 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 10695-10699.
- Torres, C.R. and G.W. Hart. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes: evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 259, 3308-3317.
- Wells, L., Y. Gao, J.A. Mahoney, K. Vosseller, C. Chen, A. Rosen, and G.W. Hart. 2002. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic β -N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.* 277, 1755-1751.
- 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. 2004. O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *Trends Cell Biol.* 14, 218-221.

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

ABSTRACT : Culture Conditions of *E. coli* Harboring Human O-Linked N-Acetyl- β -Glucosaminidase Gene and Enzymatic Properties

Dae-Ook Kang*, **Yong-Kweon Cho**, 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)

Protein modification by N-acetyl- β -D-glucosamine (O-GlcNAc) on the hydroxyl groups of Ser or Thr ubiquitously occurs in eukaryotic cells and is involved in many cellular phenomena. The level of O-GlcNAc-modified protein is regulated by OGT and O-GlcNAcase enzymes. We have tried to produce recombinant O-GlcNAcase in *E. coli* as an effort to establish *in vitro* screening system for modulators of O-GlcNAcase. The culture conditions for improvement of O-GlcNAcase productivity, were as follows: induction temperature, 30 °C; the concentration of L-arabinose, 0.02% and induction time, 5 hr. Under these culture conditions, *E. coli* cells containing O-GlcNAcase gene had no enzyme activity until up to 3 hr culture. However, O-GlcNAcase activity dramatically increased from 3 to 5 hr culture. It almost maintained the same level after 5 hr culture. Western blot analysis verified the amount of expressed O-GlcNAcase increased with culture time, being consistent with activity data. The optimal reaction condition determined in this study was as follows: protein quantity, 5 μ g; reaction time, 30 min; reaction temperature, 45°C; substrate concentration, 2 mM; reaction pH, 6.5. Methanol had little effect on O-GlcNAcase activity and 90% of activity were retained at 10%. Only 15% residual activity were detected at 5% of chloroform.