

형광펩타이드를 이용한 Oligosaccharyltransferase Assay 방법 연구

김성훈[#]

스위스 연방 공과대학교 미생물 연구소

[#]현재소속: 한국생명공학연구원 오믹스 융합 연구센터

Comparison of Oligosaccharyltransferase Assay Methods Using a Fluorescent Peptide

Seonghun Kim[#]

Institut für Mikrobiologie, Departement Biologie, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich,
8093 Zürich, Switzerland

[#]Present address: Integrative Omics Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Daejeon 305-333, Republic of Korea

(Received December 8, 2009/Accepted January 8, 2010)

Oligosaccharyltransferase (OTase) catalyzes the transfer of a lipid-linked oligosaccharide (LLO) to the nascent polypeptide. Most eukaryotes have an OTase composed of a multisubunit protein complex. However, the kinetoplastid *Leishmania major* and the bacterium *Campylobacter jejuni* have only a single subunit for OTase activity, Stt3p and PglB, respectively. In this study, a new *in vitro* assay for OTase was developed by using a fluorescent peptide containing N-glycosylation sequon, Asn-Xaa-Thr/Ser, where Xaa can be any amino acid residue except Pro. *L. major* Stt3p and *C. jejuni* PglB as a model OTase enzyme demonstrated the formation of glycopeptides from a fluorescent peptide through OTase activities. For separation and measurement of the glycopeptides produced by the OTases, Tricine-SDS-PAGE, a lectin column and fluorospectrophotometer, and HPLC were applied. Comparison of these assay methods for analyzing a fluorescent glycopeptide showed HPLC analysis is the best method for separation of glycopeptides and nonglycosylated peptides as well as for quantify the peptides than other methods.

Keywords: fluorescent peptide, N-glycosylation, lipid-linked oligosaccharide, oligosaccharyltransferase, PglB, Stt3p

진핵생물에서의 단백질의 N-결합 글리코실화(N-linked glycosylation)는 대표적인 번역 후 변형 과정의 하나로, 단백질의 분비 및 막단백질의 자리옮김(translocation), 단백질의 폴딩, 단백질 품질 조절(protein quality control), 단백질의 올리고머화 및 단백질의 분류(sorting)를 결정하는 중요한 역할을 한다(3, 8, 9). 진핵생물에서 글리칸(glycan)의 합성은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)에서 이루어진다(3). 소포체에서 일어나는 당쇄 합성의 시작은 돌리콜 피로인산(dolichol pyrophosphate, PP-Dol)에 여러 개의 당전이 효소(glycosyltransferase)에 의해 UDP-GlcNAc, GDP-Man, UDP-Glc를 글리칸 공여체(donor)로 사용하여 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine,

GlcNAc), 만노즈(mannose, Man), 글루코스(glucose, Glc)가 전달되며, 최종적으로 지질과 연결된 올리고당(lipid-linked oligosaccharide, LLO) 형태의 복합 글리칸(complex glycan)인 Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol이 된다(3). 세포질(cytoplasm)에서 7개의 당전이효소(glycosyltransferase)에 의해 순차적으로 Man₅GlcNAc₂-PP-Dol 형태의 당쇄를 합성한 후, 세포질에서 합성된 당쇄가 ATP 의존적인 flippase Rft1에 의해 소포체 막 안쪽인 루멘(lumen)으로 플리핑(flipping)이 일어나게 된다. 다시 플립된 당쇄는 소포체 내에 존재하는 나머지 당전이효소에 의해 4개의 만노즈와 3개의 글루코스가 순차적으로 전달되어 최종적으로는 Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol로 생합성이 이루어진다. 이렇게 합성된 지질과 연결된 올리고당은 소포체 루멘에서 올리고당 전이효소(oligosaccharyltransferase, OTase)에 의해

* For correspondence. E-mail: seonghun_kim@hotmail.com,
seonghun@kribb.re.kr; Tel: +82-42-860-4378; Fax: +82-42-860-4594

단백질 합성을 위해 트랜스로콘(translocon) 시스템으로부터 번역되는 N-x-S/T를 포함하는 펩타이드의 N-글리코실화 시퀀(sequon)에 한번(en bloc)에 전달된다(2, 3).

*Campylobacter jejuni*에서 발견된 원핵생물의 N-글리코실화 메커니즘은 진핵생물과 유사한 메커니즘을 보여준다(14, 22). *C. jejuni* 세포질에서 완전히 글리칸이 합성된 후 flippase인 PglK에 의해 당쇄가 원형질막 주위공간(periplasmic space)로 옮겨지게 되고, 세포내막에 위치하는 올리고당 전이효소인 PglB에 의해 원형질막 공간에 위치하는 단백질에 당쇄를 전달하게 된다(14, 22, 23). 원핵생물인 *Campylobacter*에서의 N-글리코실화 메커니즘이 진핵생물과 다른 점은 다음과 같다. 진핵생물의 경우 LLO의 합성에 지질 연결체로 돌리콜포로인산을 사용하는 반면에, 원핵생물에서는 언디카프레닐포로인산(undecaprenyl-pyrophosphate, PP-Und)을 사용한다. 최종적으로 합성된 LLO는 전자의 경우 Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol인 tetradecasaccharide를, 후자의 경우 GalNAc₂[Glc]GalNAc₃BacNAc-PP-Und인 heptasaccharide를 사용한다(23). N-글리코실화 시퀀을 포함하는 수용체인 펩타이드는 전자는 Asn-Xaa-Ser/Thr (Xaa 위치에 Pro를 제외한 모든 아미노산)의 시퀀을 사용하는 반면에, 후자는 N-말단의 -2 위치에 음전하를 갖는 아스파르트산(aspartate, Asp) 혹은 글루탐산(glutamate, Gln) 잔기를 포함하는 Asp/Gln-Xaa₁-Asn-Xaa₂-Ser/Thr (Xaa₂ 위치에 Pro를 제외한 모든 아미노산)의 시퀀을 사용한다(14, 16, 22).

LLO의 글리칸을 N-글리코실화 시퀀을 갖는 펩타이드에 전달해주는 역할을 하는 당전이효소인 OTase는 고등 진핵생물의 경우 8개 이상의 서브유닛(subunit)으로 구성된 복합체 형태의 효소로 알려져 있다(3, 6, 8, 9). OTase 서브유닛 중에서 Stt3p, Wbp1, Ost1p Swp1p가 OTase의 활성을 갖게 하는 필수 구성요소로 알려져 있으며, 특히 Stt3p는 효소 촉매 작용에 직접적으로 관여하는 서브유닛으로 추측하고 있다(6, 8, 21, 23-25). 세포내 및 세포의 구조 분석결과(topology mapping assay)를 통해 Stt3p 단백질은 11 트랜스멤브레인(transmembrane) 도메인을 갖고 있으며, 루멘 방향으로 커다란 수용성 도메인을 갖는 N_{cytosol}-C_{lumen} 형태의 단백질이라는 것이 규명되었다(12). 하지만 박테리아 OTase인 PglB의 경우, 진핵생물과 달리 다중 서브유닛으로 구성된 복합 단백질이 아닌 단일 서브유닛으로 효소의 활성을 갖는 것으로 알려져 있다(14). 흥미롭게도 PglB의 아미노산 서열은 진핵생물의 OTase의 필수 구성요소 중 효소 촉매 활성을 갖는 Stt3p와 상당한 서열 유사성을 보이고 있으며, 효소의 촉매활성 기작 또한 유사할 것으로 추정하고 있다(13, 14).

최근에는 병원성 프로토조아(protozoa) 중 운동핵편모충류(kinetoplastid) 속에서 박테리아 OTase와 유사하게 하나의 서브유닛만으로 OTase의 활성을 갖는 효소가 *Trypanosoma*와 *Leishmania* 종에서 보고되었다(1, 7, 18). *Saccharomyces cerevisiae*에서 자체의 Stt3p 코딩 유전자를 제거한 변이주를 이용한 *Leishmania major*와 *Trypanosoma brucei* Stt3p paralogue 코딩 유전자들의 세포내 상보성(complementation) 실험은 운동핵편모충류의 Stt3p가 진핵생물에서 OTase 활성을 위해 필

수적으로 요구되는 Wbp1, Ost1p, Swp1p의 다른 서브유닛들 없이도 효소의 활성을 갖는 것을 보여준다(4, 5, 15). 하지만 이 실험은 *S. cerevisiae* Δ stt3 단일 변이주 및 Δ ost1, Δ ost2이 중 돌연변이주를 사용했기 때문에, 발견된 *L. major*와 *T. brucei* Stt3p 단백질과 효모 세포 내에서 OTase의 다른 서브유닛 간에 어떠한 상호 작용이 있는지는 아직 알 수 없다(4, 15). 따라서, 다른 서브유닛의 영향을 배제한 완전히 분리 정제된 *L. major*와 *T. brucei* Stt3p의 세포의 활성측정이 필요하다고 하겠다.

현재 이용되고 있는 OTase 활성 측정법은 방사성 동위원소를 이용한 방법으로, LLO의 수용체(acceptor)인 펩타이드나 LLO 자체를 세포내 라벨링을 통한 후, 효소 반응 후에 합성된 당-펩타이드를 컬럼으로 분리하여 방사성동위원소의 양을 측정하는 방법을 사용하고 있다(7, 10). 전자의 경우 높은 핵종인 ¹²⁵I으로 표시된 N α -Ac-Asn-[¹²⁵I]-Tyr-Thr-NH₂를 사용하여 인체에 위험하며, 후자의 경우 경우 ¹⁴C으로 표시된 GDP-[¹⁴C]-Man나 UDP-[¹⁴C]-Glc를 사용하는데 세포의 성장에 따라 라벨링 되는 LLO의 양이 일정하지 않다는 단점을 가지고 있다(7, 10).

따라서, 본 연구에서는 방사성 동위원소를 사용하지 않는 형광을 띄는 펩타이드를 이용하여 정량적으로 OTase의 세포의 활성 측정법을 개발하고자 하였다. 본 연구에 사용한 OTase는 단일 서브유닛으로 OTase 활성을 갖는 *L. major* Stt3p와 *C. jejuni* PglB 단백질을 *S. cerevisiae*와 *Escherichia coli*를 이용한 이중숙주 발현 시스템을 통해 생산하였다. 각 균주로부터 최적화된 막단백질 분리정제 방법(19)을 통해 얻어진 OTase를 *S. cerevisiae*와 *C. jejuni*에서 추출한 지질과 연결된 올리고당과 형광 펩타이드와 반응시켜 N-글리코실화된 펩타이드를 Tricine SDS-PAGE, fluorospectrophotometer, HPLC로 각각 분석하였다(Fig. 1).

L. major Stt3p와 *C. jejuni* PglB 단백질의 생산을 위해서는 *S. cerevisiae* YSK002와 *E. coli* C43(DE3)/pBAD-PglB_{10xHis}를 사용하였다(11, 14). *S. cerevisiae* YSK002와 *E. coli* C43(DE3)/pBAD-PglB_{10xHis}는 YPD (1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)와 TB (12% Bacto-tryptone, 24% Bacto-yeast extract, 4% glycerol)을 이용하여 30°C와 37°C에서 각각 배양하였다. 각 균주에서의 OTase 단백질의 분리는 Kim (11)의 방법에 따라 n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM)을 이용하여 세포막으로부터 단백질을 용해 시켰으며, HitrapTM NiNTA affinity 컬럼(GE healthcare)과 Sepharose 12 컬럼(GE healthcare)의 두 단계 정제 방법을 거쳐 단백질을 분리하였다(11). 최종적으로 분리된 단백질은 PD-10 컬럼(GE healthcare)을 이용하여 염을 제거하였다.

L. major Stt3p의 OTase 반응을 위한 글리칸 공여체(glycan donor)로 사용한 Man₉GlcNAc₂-PP-Dol은 소포체의 Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol 생합성에서 글루코스를 공급해주는 전구체인 돌리칠인산 글루코스(dolichyl-phosphate glucose)의 합성에 관여하는 당전이 효소인 ALG5 효소를 코딩하는 유전자가 결핍된 *S. cerevisiae* YG485 (Δ alg5) (*MATa ade2-101*

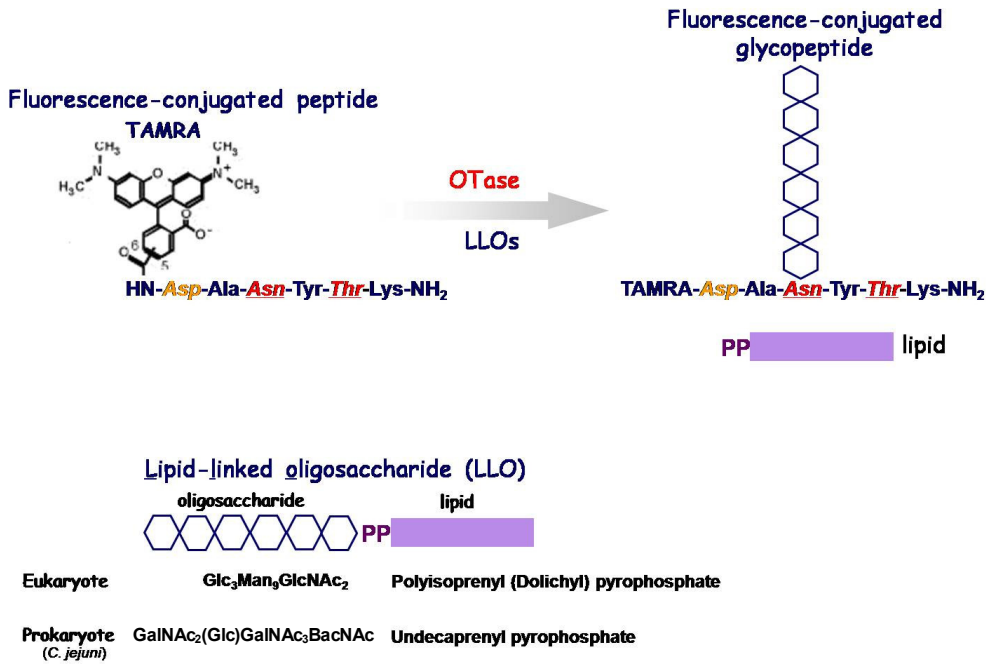


Fig. 1. Schematic OTase assay procedure using a fluorescent peptide.

his3D200 lys2-801 ura3-52 ALG5::HIS3)에서 추출하였다(9, 21). 효모 균주를 YNBD drop out 배지(6.7% yeast nitrogen base, 2% glucose)를 사용하여 25°C에서 2.0 OD₆₀₀ ml⁻¹까지 배양한 후, 균체 회수하였다. 회수된 균체는 lysis buffer [50 mM Tris-HCl; pH 8.0, 250 mM NaCl, EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland), 1 mM PMSF]에 세포를 재현탁 시킨 후, French press를 이용하여 1,000 psi에서 5회 통과시켜 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포는 2,700×g에서 15분간 원심분리를 통해 파쇄되지 않은 세포와 세포 찌꺼기를 제거한 후 상등액을 Kelleher 등(9)의 방법에 따라 LLO를 추출하였다. 최종적으로 추출된 LLO는 SpeedVac으로 완전히 건조 시킨 후, CHCl₃:CH₃OH:H₂O (10:10:3)에 다시 녹여 분주한 후 -80°C에 저장하였다. *C. jejuni* PglB OTase 반응을 위한 글리칸 공여체로 사용한 GalNAc₂[Glc]GalNAc₃BacNAc-PP-Und는 *C. jejuni*의 글리칸을 생합성하는 효소를 코딩하는 유전자 군에서 *pglB* 유전자가 결여된 오페론(operon)을 포함하는 pACYC-Pgl_{mut} (14, 16, 22)로 형질 전환된 *E. coli* SCM6에서 추출하였다. *E. coli* SCM6/pACYC-Pgl_{mut}에서 LLO는 Reid 등(17)의 방법에 의해 추출하였으며, 최종적으로 추출된 박테리아 LLO는 건조 후 CHCl₃:CH₃OH:H₂O (3:1:1)에 다시 녹여 분주한 후 -80°C에 저장하였다.

OTase 활성을 측정하기 위해 잠재적인 N-결합 글리코실화 시퀀스 Asn-Xaa-Ser/Thr (여기서 Xaa는 Pro.을 제외한 모든 아미노산)을 포함하는 펩타이드는 화학 합성하였다. 합성된 Asp(D)-Ala(A)-Asn(N)-Tyr(Y)-Thr(T)-Lys(K) 펩타이드의 N-말단에는 형광단으로 5/6-carboxyltetramethyl rhodamine (TAMRA)과 C-말단에는 아민(amine)을 각각 도입하였다. 형광 펩타이드를 이용한 방법은 기존의 방사선동위원소를 사용하는 방법에 비해

안전하며, 반응물의 형광 측정을 통하여 HPLC, fluorospectrophometer 및 형광을 측정할 수 있는 여러 분석기기를 이용하여 당-펩타이드를 분석할 수 있다는 장점이 있다. 본 실험에서 합성한 형광 펩타이드는 진핵생물 OTase 뿐 아니라 박테리아 *C. jejuni* PglB의 글리코실화를 확인하기 위해 N-글리코실화 시퀀스의 -2 위치에 해당하는 아미노산에 음전하를 띠는 아스파르트산(Asp, D)을 추가하여 펩타이드 합성을 하였다.

L. major Stt3p와 *C. jejuni* PglB를 효소 반응은 20 µl의 지질과 연결된 올리고당을 글리칸 공여체로 5 µl의 0.01 mM 합성 형광펩타이드 TAMRA-D-A-N-Y-T-K-NH₂를 글리칸 수용체로 이용하였다. 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)/1 mM MnCl₂/0.1% TritonX-100 완충용액을 사용하여 30°C에서 12시간 효소 반응 시킨 후, 생성된 당-펩타이드와 미반응한 형광펩타이드를 Tricine SDS-PAGE, 렉틴 컬럼 및 fluorospectrophometer, 그리고 HPLC를 이용하여 분석하였다.

Tricine SDS-PAGE를 이용한 형광 당펩타이드 분석방법은 Kohda 등(13)에 의해 제안된 방법을 변형한 방법으로, 펩타이드의 분리능을 높게 하기 위하여 15-25% SDS-PAGE를 사용하는 대신에, 본 연구에서는 5 kDa 이하의 펩타이드 분석에 용이한 Tricine SDS-PAGE를 사용하였다(20). 간략하게 분석 방법을 설명하면 다음과 같다. OTase의 효소 반응에 의해 LLO로부터 형광 펩타이드에 글라이칸이 전달되면, 전이된 글리칸에 의해 당-펩타이드의 분자량이 2-3 kDa의 증가하게 된다. 반응 후 당-펩타이드와 미반응한 펩타이드를 Tricine SDS-PAGE로 분리하여 반응하지 않은 펩타이드와 글리코실화가 된 펩타이드의 형광 정도를 이미지 분석을 통해 OTase의 활성을 정량을 하게 된다.

효소 반응 후 반응물에 5× Laemmli buffer를 넣고 95°C에

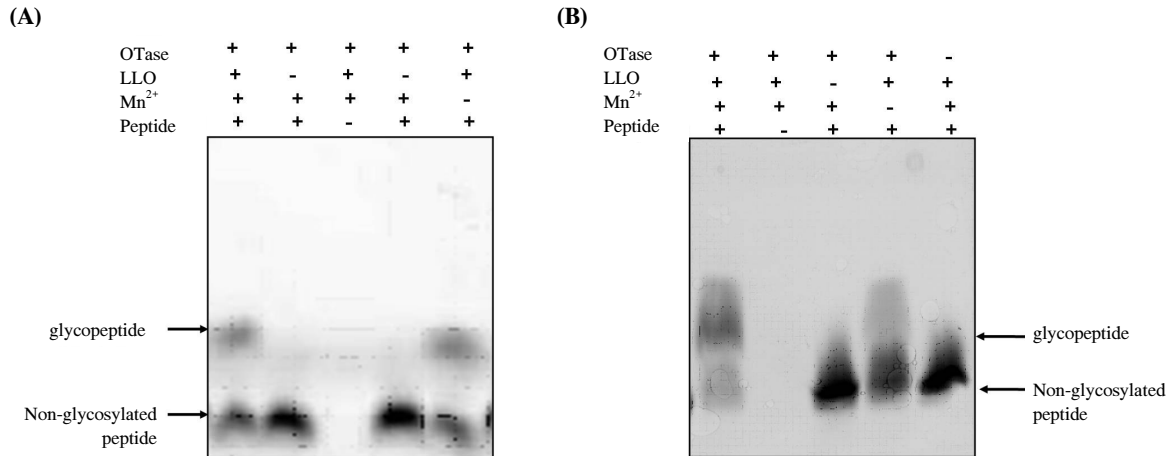


Fig. 2. *In vitro* glycosylation reaction catalyzed by *L. major* Stt3p and *C. jejuni* PglB with a fluorescent hexapeptide (TAMRA-DANYTK-NH₂) containing the *N*-glycosylation sequon (Asn-x-Thr). (A) Tricine SDS-PAGE analysis of the reaction mixture of *in vitro* *L. major* Stt3p assay with the yeast LLO, Man₉GlcNAc₂-PP-Dol. (B) Tricine-SDS-PAGE analysis of the reaction mixtures of the *in vitro* *C. jejuni* PglB assay with the bacterial lipid-linked oligosaccharide, GalNAc₂[Glc]GalNAc₃BacNAc-PP-Und. The glycosylated and nonglycosylated fluorescent peptides produced by OTase *in vitro* reaction were analyzed by using a method modified from that described by Kohda *et al.* (13).

서 5분간 가열한 후, SDS-PAGE에 로딩하여 50 mV로 전기영동 하였다. 그 후 젤을 530 nm BP 필터가 장착된 Molecular Imager[®] PhorosFX[™] (Bio-Rad)를 이용하여 excitation (Ex) 532 nm-emission (Em) 555 nm하에서 이미지를 분석하였다. 이미지의 밝기 조정은 Quantity One[®] software (Bio-Rad)를 사용하였으며 high, medium, 그리고 low sample intensity는 프로그램에 내장된 변수값을 사용하였다. *L. major* Stt3p와 *C. jejuni* PglB 모두 효소 반응 후, 생성된 당-펩타이드는 미반응한 형광 펩타이드에 비해 상당한 분자량 차이를 나타내면서 Tricine SDS-PAGE에서 관찰되었다(Fig. 2). Figure 2의 데이터는 Quantity One[®] software를 이용하여 high intensity에서 이미지를 얻었다. Low intensity에서는 미반응한 펩타이드만이 관찰되었고, medium intensity에서는 당-펩타이드의 시그널이 약하게 측정 되었기 때문에 high intensity에서 Tricine SDS-PAGE 이미지를 분석하였다(자료 미제시). 흥미롭게도 금속이온을 넣지 않은 반응물에서도 형광을 나타내는 당-펩타이드가 관찰되었는데, 이것은 반응에 사용한 LLO 추출 시 MgCl₂을 첨가하기 때문에 남아있는 미량 금속이온이 반응에 영향을 준 것으로 판단된다.

비록 Tricine SDS-PAGE와 이미지 분석을 통하여 OTase의 반응산물인 당-펩타이드를 측정할 수 있지만, Kohda 등(13)이 보고한 것과는 다르게, 전기영동시 마다 데이터의 재현이 쉽지 않고, 전기영동 중에 저항의 증가로 펩타이드의 전개되는 패턴이 매번 바뀐다는 단점이 발견됐다. 또한 정제된 단백질에 포함된 막단백질 분리시 필수적으로 사용되는 계면활성제의 양에 따라 젤 상에서 펩타이드의 전개 정도가 변하며 퍼짐 현상이 관찰되기도 하였다(Fig. 2). 특히 영상 분석 과정에서 이미지의 흑백대비로 결과를 측정하기 때문에 결과의 신빙성에도 문제가 있다고 할 수 있다.

L. major Stt3p의 효소 반응에 의해 Man₉GlcNAc₂-PP-Dol

으로부터 형광 펩타이드에 전달되는 효모 유래의 글리칸은 고만노즈(high mannose) 형태로, 효소반응에서 생성된 당-펩타이드와 미반응 펩타이드를 당쇄 특이적인 렉틴을 사용하여 분리할 수 있다. Jack bean 유래의 Concanavaline A는 고만노즈 형태의 당쇄에 강한 친화력을 가지고 있다(10). 이러한 특성을 이용하여 당-펩타이드와 미반응 형광펩타이드의 분리를 시도하였다(Fig. 3A). *L. major* Stt3p에 의한 형광 펩타이드와 효모 유래의 LLOs의 반응물을 Concanavaline A-conjugated Sepharose (ConA-Sepharose)가 충전된 컬럼에 로딩하였다. 20% 아세토나이트릴(acetonitrile, ACN)을 이용하여 컬럼을 5회 세척하여 미 반응한 형광 펩타이드를 제거한 후 최종적으로 80% ACN을 이용하여 컬럼으로부터 당-펩타이드를 용출해냈다. 용출된 용액으로부터 당-펩타이드를 Ex 546_{nm}-Em 568_{nm}를 갖는 범위에서 fluorospectrophotometer RF5301-PC (Shimadzu, Japan)로 분석하였다.

Fluorospectrophotometer로 측정한 ConA sepharose 컬럼으로부터 용출된 형광 당-펩타이드의 양을 조사한 결과 *L. major* Stt3p와 형광펩타이드, LLO, Mn²⁺을 함께 반응을 시킨 반응물의 경우 Arbitrary unit (A.U.) 160 이상으로 높게 나타났으며, 금속이온을 첨가하지 않은 샘플에서도 120 A.U. 이상으로 높은 형광이 측정됐다(Fig. 3B). LLO나 형광 펩타이드가 들어 있지 않은 반응물의 경우 형광도가 거의 측정되지 않았으며, 효소의 반응이 일어나지 않은 OTase를 넣어주지 않은 반응물의 경우도 5% 미만으로 형광도가 낮게 나타났다. 이론적으로 효모 유래의 LLOs는 Glc₃Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, Man₉GlcNAc₂-PP-Dol, Man₅GlcNAc₂-PP-Dol로 구성되어 있어 고만노즈 구조를 가지고 있기 때문에 만노즈 글리칸에 선택적인 결합을 하는 Con A-lectin을 사용하면 효소 반응물에서 비글리코실화된 펩타이드와 섞여 있는 글리코실화된 펩타이드만을 선택적으로 분리할 수 있게 된다(10).

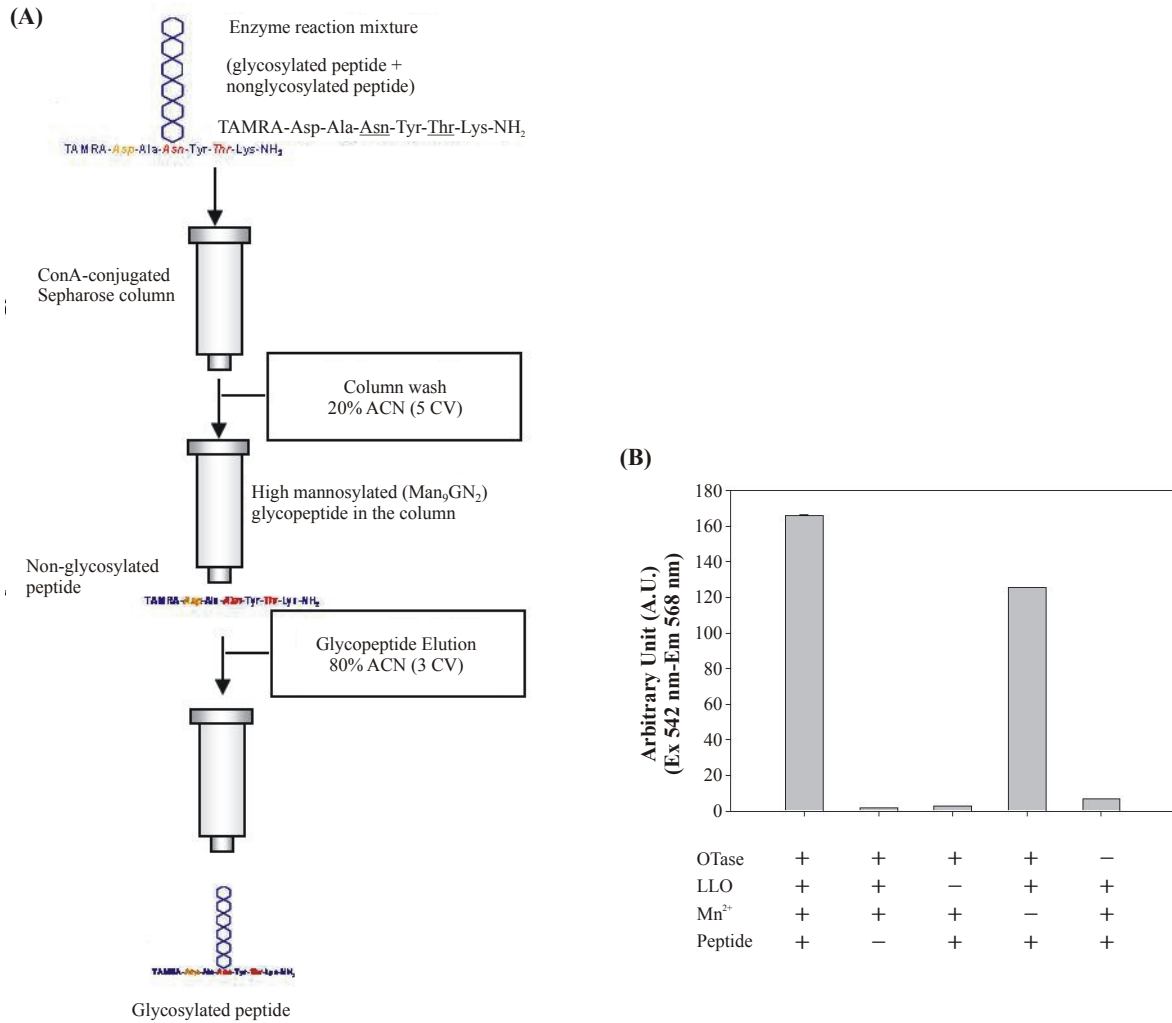


Fig. 3. Schematic procedure for separation of glycopeptides and nonglycosylated peptides in the enzyme reaction mixture by using ConA-Sepharose column (A) and quantification of glycopeptides eluted from ConA-Sepharose column (B). *L. major* Sit3p enzyme reaction was carried out described in the text. The enzyme reaction was terminated by the addition of 10 μ l of ice-cold acetonitrile (ACN). The reaction mixture was applied to 0.1 ml ConA-conjugated Sepharose equilibrated with the reaction buffer and then the unbound nonglycosylated fluorescent peptide was washed from the column with 20% (v/v) ACN (5 \times 0.1 ml). 100 μ l of 80% (v/v) ACN was applied three times onto the column for elution of glycosylated fluorescent peptides. The fluorescence of the TAMRA in glycopeptide captured by ConA column was measured with excitation and emission wavelengths of 542 nm and 568 nm, respectively. All enzyme activities were determined in triplicate.

하지만 본 방법은 정량적 측정법으로 상대적으로 분석 방법이 간단하고 빠르다는 장점이 있지만, 이론과 달리 컬럼으로부터 용출해 낸 형광 당-펩타이드 분획 내에 상당히 많은 양의 미반응 형광 펩타이드가 존재한다는 것을 MALDI-TOF 질량 분석을 통해 밝혀냈다(자료 미제시). MALDI-TOF-MS 스펙트럼에서 당-펩타이드에 비해 상대적으로 미반응 형광 펩타이드가 검출되어 본 방법은 OTase 분석 방법에는 적당하지 않은 것으로 판단된다.

당쇄가 부가된 형광 펩타이드의 HPLC 분석을 위하여 효소 반응 후 반응물을 C18 Sepak 카트리지를(Waters, USA)에 흘려 준 후 10% ACN으로 카트리지를 세 번 세척한 후, 당-펩타이드와 미반응한 형광펩타이드를 90% ACN으로 용출하였다. 용출된 펩타이드를 SpeedVac으로 완전히 건조시켰다. 건조한 펩

타이드를 다시 HPLC의 이동상 용매 A에 녹인 후, 원심분리기를 이용해 1,300 rpm에서 10분간 원심분리하여 25 μ l 상등액을 분석에 사용하였다. 당-펩타이드와 미반응한 펩타이드는 Reprisil[®] C-18 reverse phase 컬럼(4.6 \times 100 mm; Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany)을 사용하여, RF-10AXL 형광측정기(Shimadzu, Japan)가 부착된 Dionex HPLC 시스템(Sunnyvale, USA)으로 측정하였다. 이때 이동상은 0.1% trifluoroacetic acid가 포함되어 있는 증류수(이동상 A)와 100% ACN (이동상 B)을 사용하였다. 이동상을 A 용액과 B 용액을 부피비 9:1의 비율로 시작하여 5분 후에 35분까지 A 용액과 B 용액이 5:5의 비율로 농도 구배가 되도록 하였으며, 이때 이동상의 흐름속도는 0.5 ml/min이었다. 당-펩타이드와 미반응 형광 펩타이드는 Ex 542_{nm} - Em 568_{nm}에서 형광

도를 측정하였다.

HPLC를 이용한 측정법은 앞서 언급한 두 방법에 비해 정확한 정량 분석을 할 수 있는 방법으로, RP-C18 컬럼으로 글리코실화된 펩타이드와 미반응한 펩타이드를 분리한 후 형광측정기로 펩타이드의 상대적인 양을 측정하는 방법이다. 위의 분석 조건에서 형광 펩타이드를 이용하여 HPLC 분석 측정한계를 조사한 결과 0.1 nM 농도까지 측정이 가능하였으며, 이때 TAMRA-DANYTK-NH₂의 흡광계수(extinction coefficient)는 $5.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 로 계산되었다. HPLC의 RP-C18 컬럼에서 미반응한 형광 펩타이드는 체류시간(retention time)이 18-19분경에 측정이 되는 반면, 당쇄가 전달된 당-펩타이드는 전이된 글리칸의 친수성으로 인하여 체류시간이 빠른 17-18분경에 측정되었다(Fig. 4). *L. major* Stt3p (Fig. 4A)와 *C. jejuni* PglB (Fig. 4B)의 효소 반응물에서 모두 당-펩타이드가 관찰되었으며, 모두 미반응 펩타이드의 체류시간 보다는 1-2분 정도 빠른 시간에서 당-펩타이드가 관찰되었다.

HPLC의 FD에서 펩타이드와 미반응한 펩타이드의 상대적인 값으로 볼 때 *L. major* Stt3p에 의한 형광 펩타이드의 N-글리코실화 반응은 상당히 효율적으로 일어나는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). HPLC 크로마토그램에서 글리코실화된 형광 펩타이드의 피크가 넓게 나타나는 것은 효소반응에 관여하는 LLO의 비균질성(heterogeneity) 및 반응 중에 형광 펩타이드의 분해에 의해 일어나는 현상일 것으로 추정된다. 효소 반응에 의한 당-펩타이드를 확인하기 위해서 N-글리코실화 결함을 갖는 아스파라진 잔기에서 글라이칸을 제거할 수 있는 PNGase F hydrolase 처리를 통해서 HPLC 크로마토그램에서 OTase 반응 후 생성된 글리코실화된 펩타이드의 피크가 움직이는 것을 관찰하였다. *L. major* Stt3p의 효소 반응물에 PNGase F를 5시간 처리한 후, Glycanase를 처리한 효소 반응물의 전-후를 HPLC로 동일 조건에서 분석하였다. 비록 PNGase F 처리시간이 짧아 당-펩타이드의 피크가 완전히 글리칸이 없는 형광 펩타이드 쪽으로 움직이지는 않았지만, 분석 결과 PNGase F에 의해 당-펩타이드에서 당쇄가 절단되어 형광 펩타이드로 피크가 상당히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A).

C. jejuni PglB의 효소 반응물의 HPLC 분석 결과는 *L. major* Stt3p와 달리 미반응한 형광 펩타이드 피크 앞에 여러 개의 당-펩타이드로 추정되는 피크가 관찰된다(Fig. 4B). 앞서 언급한 *L. major* Stt3p의 효소 반응물의 HPLC 크로마토그램 분석결과에서 보여지는 글리코실화 된 펩타이드의 넓은 피크와 유사한 현상으로, *C. jejuni* LLO 준비시 컬럼 정제과정 없이 리피드 층의 분획을 획득하여 효소 반응에 이용했기 때문에, 사용한 LLO에 다양한 글리칸 형태의 LLO가 존재한다고 생각된다. 따라서 PglB 반응 후 생성되는 당-펩타이드 또한 다양한 형태의 N-글리칸을 갖는 당-펩타이드가 PglB에 의해 생합성 되었을 가능성이 있다. 이를 확인하기 위해서 MALDI-TOF-질량 분석기를 이용하여 PglB 효소 반응산물을 분석하였다. 질량 분석 스펙트럼 확인 결과 GalNAc₂[Glc]GalNAc₃BacNAc 이외에 GalNAc₅BacNAc, GalNAc₁[Glc]GalNAc₃BacNAc 등의 다양한 글라이칸을 갖는 당쇄 구조의 질량값이 확인 되었다(자료

미제시). 이 결과는 *E. coli* SCM6/pACYC-Pgl_{mut}에서 추출된 LLO가 다양한 형태의 글리칸을 갖고 있으며, 세포내에서 LLO 합성 시 단일 형태가 아닌 LLO 합성에 관여하는 당전이 효소의 활성에 따라 비균질한 글리칸을 갖는다는 것을 암시해준다고 할 수 있다.

본 연구에서는 올리고당전이효소(OTase)의 세포의 활성 측정 방법을 개발하기 위하여 진핵생물과 원핵생물의 모델 단백질로 단일 서브유닛으로 OTase 활성을 갖는 *L. major* Stt3p와 *C. jejuni* PglB 단백질을 이용하였다. 형광 펩타이드와 지질과 연결된 올리고당과의 반응을 통해 생합성된 당-펩타이드를 Tricine SDS-PAGE, 렉틴 컬럼 및 fluorospectrophotometer, RP-C18 컬럼을 이용한 HPLC 분석을 수행하였다. 3가지 분석 방법을 비교한 결과 HPLC를 이용한 분석방법이 미반응한 형광 펩타이드의 방해 없이 당-펩타이드를 정량적으로 분석할 수 있었으며, RP-C18 컬럼을 통해 반응에 이용한 LLO의 비균질성까지 측정할 수 있었다. 향후 본 결과는 OTase의 효소 반응에 기반한 세포의 글리코실화 반응 기술 개발 및 LLO와 펩타이드를 이용한 화학-효소(chemoenzymatic)에 의한 당-펩타이드 합성에 응용할 수 있는 기초 자료로 활용될 것으로 판단된다.

적요

단백질의 N-글리코실화는 대표적인 번역 후 변형 중의 하나로 진핵생물 뿐 아니라 원핵생물에서도 발견된다. N-글리코실화는 단백질 상의 N-글리코실 서열인 N-x-S/T 위치에 지질과 연결된 올리고당(lipid-linked oligosaccharide, LLO)으로부터 올리고당 전이효소(oligosaccharyltransferase, OTase) 활성에 의해 글리칸(glycan)이 전달되어 당단백질의 합성이 이루어진다. 본 연구에서는 OTase의 세포내 활성을 측정하기 위하여 5/6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA)이 도입된 형광펩타이드 TAMRA-DANYTK-NH₂를 이용하였다. OTase 활성 측정은 단일 서브유닛으로 효소의 활성을 갖는 운동핵 편모충류인 *Leishmania major* Stt3p와 병원성 미생물인 *Campylobacter jejuni* PglB를 진핵생물과 원핵생물의 모델 효소로 각각 사용하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 *C. jejuni* 유래 LLO와 형광 펩타이드를 반응시켜 당-펩타이드를 합성하였다. 합성된 당-펩타이드를 미반응한 형광펩타이드와 분리 및 당-펩타이드의 정량 분석을 위하여 Tricine SDS-PAGE, ConA 렉틴 컬럼 및 fluorospectrophotometer, HPLC를 사용하였으며, 당-펩타이드 분석을 통해 각 방법의 장단점을 비교하였다. 비교 분석 결과 Tricine SDS-PAGE를 이용한 형광 이미지 분석과, 렉틴 컬럼을 통해 분리된 당-펩타이드의 fluorospectrophotometer 정량법에 비해, HPLC를 이용한 방법이 OTase에 의해 생성된 당-펩타이드를 분석하는데 더 정확하고 정량적인 값을 제시하는 것으로 확인되었다.

감사의 말

Author really appreciates Prof. Dr. Markus Aebi, Institut

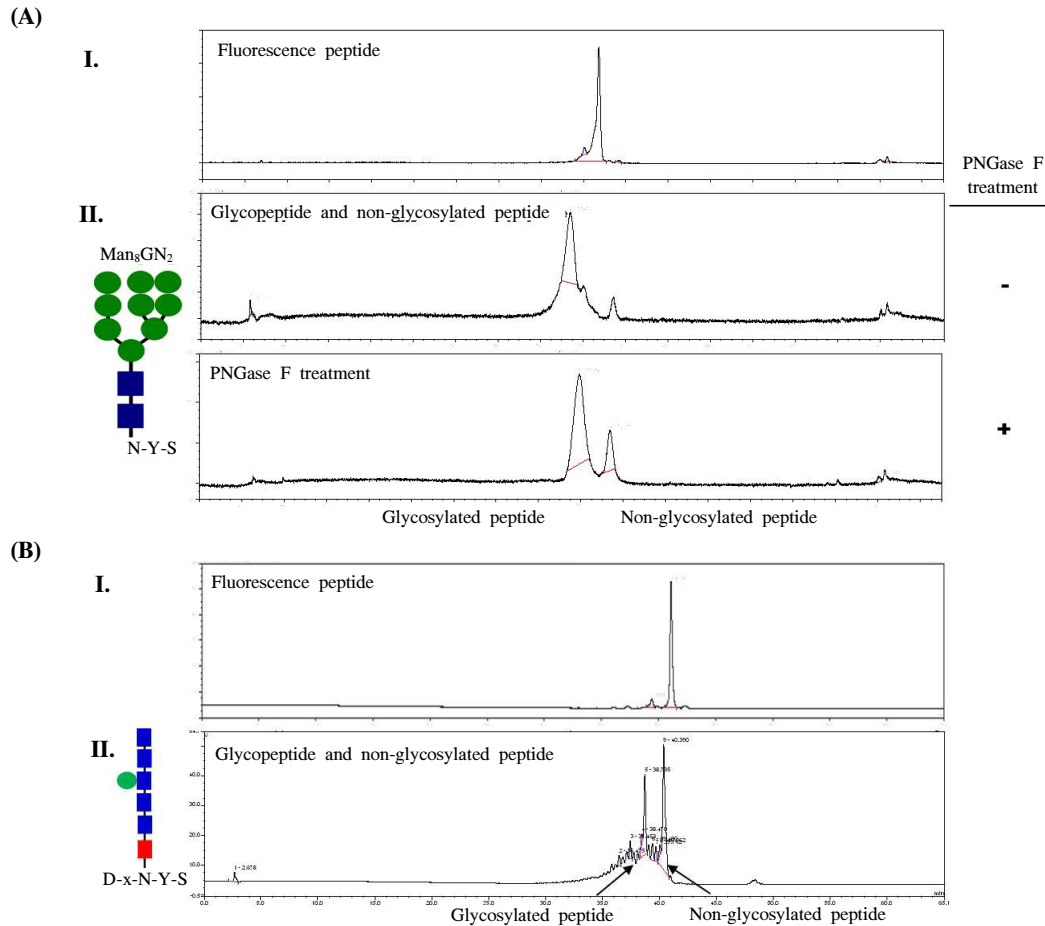


Fig. 4. HPLC analysis of glycosylated fluorescent peptides produced by *L. major* Stt3p (A) and *C. jejuni* PglB (B) reactions. Oligosaccharyltransferase assay was carried out at 30°C for 12 h in 25 μ l of 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 1 mM $MnCl_2$, crude lipid-linked glycan, 0.01 mM a fluorescence peptide as glycan acceptor, and the purified *L. major* Stt3p or *C. jejuni* PglB. The resulting products were clarified by passing through C18 Sepak cartridge (Waters, Milford, USA). The cartridge was washed with 10% acetonitrile three times, and the glycopeptide and nonglycosylated peptides were eluted with 90% acetonitrile. The fluorescent peptides were analyzed by HPLC system (Dionex) equipped with a Fluorescence Detector using a reverse-phase C18 column (4.6 \times 100 mm; Dr. Maisch HPLC GmbH, Ammerbuch-Entringen, Germany). Chromatogram I shows a substrate peak, a nonglycosylated fluorescent peptide, and the arrow in chromatogram II indicates the peak of the glycosylated fluorescent peptide after the enzyme reaction.

für of Mikrobiologie, Departement Biologie, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, for scientific discussion and for supporting this work. Author is also grateful to members of the Aebi lab for fruitful discussion, to the staffs in Institut für of Mikrobiologie, ETH Zürich, for excellent technical support. This work was supported by the Korea Research Foundation Grant (KRF-2006-D00071) funded by the Korean Government (MOEHRD) and by ETH Zürich.

참고문헌

1. Castro, O., F. Movsichoff, and A.J. Parodi. 2006. Preferential transfer of the complete glycan is determined by the oligosaccharyltransferase complex and not by the catalytic subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 14756-14760.
2. Chavan, M., A. Yan, and W.J. Lennarz. 2005. Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. *J. Biol. Chem.* 280, 22917-22924.
3. Helenius, A. and M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73, 1019-1049.
4. Hese, K., C. Otto, F.H. Routier, and L. Lehle. 2009. The yeast oligosaccharyltransferase complex can be replaced by STT3 from *Leishmania major*. *Glycobiology* 19, 160-171.
5. Izquierdo, L., B.L. Schulz, J.A. Rodrigues, M.L. Güther, J.B. Procter, G.J. Barton, M. Aebi, and M.A. Ferguson. 2009. Distinct donor and acceptor specificities of *Trypanosoma brucei* oligosaccharyltransferases. *EMBO J.* 28, 2650-2661.
6. Karamyshev, A.L., D.J. Kelleher, R. Gilmore, A.E. Johnson, G. von Heijne, and I. Nilsson. 2005. Mapping the interaction of the STT3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex with nascent polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* 280, 40489-40493.
7. Kelleher, D.J., S. Banerjee, A.J. Cura, J. Samuelson, and R. Gilmore. 2007. Dolichol-linked oligosaccharide selection by the oligosaccharyltransferase in protist and fungal organisms. *J. Cell Biol.* 177, 29-37.
8. Kelleher, D.J. and R. Gilmore. 1994. The *Saccharomyces cerevisiae*

- oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J. Biol. Chem.* 269, 12908-12917.
9. Kelleher, D.J. and R. Gilmore. 2006. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology* 16, 47R-62R.
 10. Kelleher, D.J., D. Karaoglu, and R. Gilmore. 2001. Large-scale isolation of dolichol-linked oligosaccharides with homogeneous oligosaccharide structures: determination of steady-state dolichol-linked oligosaccharide compositions. *Glycobiology* 11, 321-333.
 11. Kim, S. 2009. Optimization of the purification of *Leishmania major* Stt3p expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Submitted.
 12. Kim, H., G. von Heijne, and I. Nilsson. 2005. Membrane topology of the STT3 subunit of the oligosaccharyl transferase complex. *J. Biol. Chem.* 280, 20261-20267.
 13. Kohda, D., M. Yamada, M. Igura, J. Kamishikiryo, and K. Maenaka. 2007. New oligosaccharyltransferase assay method. *Glycobiology* 17, 1175-1182.
 14. Kowarik, M., S. Numao, M.F. Feldman, B.L. Schulz, N. Callewaert, E. Kiermaier, I. Catrein, and M. Aebi. 2006. N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science* 314, 1148-1150.
 15. Nasab, F.P., B.L. Schulz, F. Gamarro, A.J. Parodi, and M. Aebi. 2008. All in one: *Leishmania major* STT3 proteins substitute for the whole oligosaccharyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 19, 3758-3768.
 16. Nita-Lazar, M., M. Wacker, B. Schegg, S. Amber, and M. Aebi. 2005. The N-X-S/T consensus sequence is required but not sufficient for bacterial N-linked protein glycosylation. *Glycobiology* 15, 361-367.
 17. Reid, C.W., J. Stupak, M.M. Chen, B. Imperiali, J. Li, and C.M. Szymanski. 2008. Affinity-capture tandem mass spectrometric characterization of polyprenyl-linked oligosaccharides: tool to study protein N-glycosylation pathways. *Anal. Chem.* 80, 5468-5475.
 18. Samuelson, J., S. Banerjee, P. Magnelli, J. Cui, D.J. Kelleher, R. Gilmore, and P.W. Robbins. 2005. The diversity of dolichol-linked precursors to Asn-linked glycans likely results from secondary loss of sets of glycosyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 1548-1553.
 19. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth. 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 105-117.
 20. Schägger, H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1, 16-22.
 21. Spirig, U., M. Glavas, D. Bodmer, G. Reiss, P. Burda, V. Lippuner, S. te Heesen, and M. Aebi. 1997. The STT3 protein is a component of the yeast oligosaccharyltransferase complex. *Mol. Gen. Genet.* 256, 628-637.
 22. Wacker, M., M.F. Feldman, N. Callewaert, M. Kowarik, B.R. Clarke, N.L. Pohl, M. Hernandez, E.D. Vines, M.A. Valvano, C. Whitfield, and M. Aebi. 2006. Substrate specificity of bacterial oligosaccharyltransferase suggests a common transfer mechanism for the bacterial and eukaryotic systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7088-7093.
 23. Weerapana, E. and B. Imperiali. 2006. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 6, 91R-101R.
 24. Yan, Q. and W.J. Lennarz. 2002. Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. *J. Biol. Chem.* 277, 47692-47700.
 25. Zufferey, R., R. Knauer, P. Burda, I. Stagljär, S. te Heesen, L. Lehle, and M. Aebi. 1995. STT3, a highly conserved protein required for yeast oligosaccharyl transferase activity *in vivo*. *EMBO J.* 14, 4949-4960.