

## *Escherichia coli* B의 Glycogen Synthetase반응에 의한 글리코겐 생합성기작

양 지 영

부경대학교 식품공학과

### Mechanism of Glycogen Biosynthesis by Glycogen Synthetase from *Escherichia coli* B

Ji-Young Yang

Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

#### Abstract

Glycogen synthetase[EC 2.4.1.21] in *E. coli* B was isolated and purified by sonication, ultracentrifugation, DEAE cellulose chromatography and gel chromatography. In the case of using glycogen or maltotriose as a primer in the enzyme reaction, 64% and 23.7% of labelled ADP-glucose were incorporated into primer, respectively. 8.1% of labelled ADP-glucose was polymerized into glycogen in enzymatic reaction without a primer.

**Key words:** *E. coli* B, glycogen synthetase, glycogen biosynthesis, primer

#### 서 론

Glycogen synthetase(EC 2.4.1.21)는  $\alpha$ -1,4의 결합을 갖는 glucan을 제조하기 위하여 ADP-glucose가 증합되는데 관여하는 효소이다. 이 반응은 글리코겐 생합성과정 중의 한단계이다. 대장균에서 글리코겐 생합성의 조절은 (i) ADP glucose pyrophosphorylase(EC 2.7.7.27)에 의해 촉매되어지는 생합성 단계 중의 대사산물인 AMP와 fructose-1,6-biphosphate에 의한 allosteric control; (ii) guanosine 3'-biphosphate 5'-biphosphate과 cyclic AMP에 의해 유전자 *glgC*와 *glgA*의 유전형질발현의 stimulation; (iii) cAMP and  $\sigma^2$ 에 의한 생체내에서 유전자 전사단계의 조절 등을 포함하고 있다(1).

글리코겐 생합성에 대해서는 많은 보고가 있었다. 1940년대에 phosphorylase에 의한 가설이 글리코겐 생합성기작을 설명하기 위한 모델로 제일 먼저 제시되었다. 즉, phosphorylase에 의해 포도당이 glucose-1-phosphate로 전환되고 이 화합물이 세포내로 이동한 후 primer에 붙어나간다고 설명하였다. 그러나 이는 시험관내에서 phosphorylase라는 효소가 발견되었을 뿐 생체내에 기작에 대해서는 밝혀지지 못한 것이었다. 1959년에 UDP-glucose가 glucose-1-phosphate대신에 글

리코겐 생합성에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있다고 보고하였다. UDP-glucose는 동물조직 내에서 glycogen synthetase에 의해 전구체에 증합되는 반면에 미생물에서는 ADP-glucose가 그 역할을 한다(2). Barengo와 Krismann(3)은 primer protein이 있다고 제안하였으며 Lomako 등(4)은 글리코겐이 없는 단백질을 분리하여 이 단백질의 자가촉매반응에 의해 글리코겐 생합성의 전구물질의 만든다고 보고하였다. Gahan과 Cornard(5)는 글리코겐이 없는 단백질을 분리하여 *de novo* 생합성에 의한 글리코겐 생합성과정을 보고하였으며 이 경우 글리코겐의 환원성말단에 포도당이 합성되어져 간다고 보고하였다. 1970년에 Behrens와 Leloir(6)은 UDP-glucose로부터 dolichol-1- $\alpha$ -D-glycopyranosyl pyrophosphate라는 lipid acceptor에 포도당을 전이시켜 주는 glycogen synthetase를 분리하였다고 보고하고 있다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면 글리코겐은 glycogenine 또는 전구체에 합성효소가 작용하여 합성된다고 하나 이러한 전구체의 필요성에 대해서는 명확한 과학적 증거가 밝혀져 있지는 않은 상황이다.

본 연구에서는 순수하게 분리된 glycogen synthetase의 작용기작에 대해 보고하고자 한다. 특히, 전구체의 필요성 여부 및 효소반응에 있어서 반응물의 형성변화

에 대해 살펴보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 배지

효소를 생산하기 위한 대장균의 배양을 위해 최소배지(1% glucose, 1.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.86%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.6% yeast extract)를 사용하였다. 배지의 pH는 NaOH를 사용하여 7.2로 조절하여 사용하였으며 균주의 보관시 2% agar를 첨가하여 사면배지를 제조하여 사용하였다.

### Glycogen synthetase의 조제

*E. coli* B를 최소배지에 접종시켜 37°C 배양기에서 15시간 배양시킨 후 15,000rpm, 20분간 원심분리에 의해 균체를 회수한 후 균체를 냉동에 보관하면서 효소원으로 사용하였다. 해동된 균체는 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 2번 세척한 후 5mM dithiothreitol과 10mM  $\text{MgCl}_2$ 를 함유한 냉각된 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁시켰다. 이 현탁액은 sonicator(Branson Sonifier 250, USA)를 사용하여 균체를 파쇄시켰다. 파쇄된 균체는 12,000rpm, 15분간 원심분리에 의해 상등액을 취하고 이 상등액을 70,000×g, 90분간 초고속원심분리를 행하였다. 이때 생성된 침전물은 5mM dithiothreitol과 10mM  $\text{MgCl}_2$ 가 함유된 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁시켰다. 이 현탁액 ml당 2 I.U.의 미리 전처리된  $\alpha$ -amylase를 첨가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 천천히 흔들면서 냉장실에 하루밤 방치시켰다. 이 반응물은 5mM DTT가 함유된 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.5)를 사용하여 4배 희석시킨 후, 79,000×g, 90분간 초고속 원심분리하였다. 이 때 상등액을 취하여 효소정제실험을 행하였다. 3mM DTT와 5% sucrose를 함유한 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 평형을 이룬 DEAE-cellulose column(0.8×52cm)에 효소액을 넣고 0.6M NaCl로 gradient시켜 2L의 같은 buffer로 용출시켰다. 효소활성이 있는 부위를 모아 polyethylene glycol로 농축, 15시간 투석시켰다. Sephadex-G-200 column(40×2.5cm)을 사용하여 농축된 효소액을 같은 buffer로 정제하여 효소활성이 있는 부위를 모아 polyethylene glycol로 농축시킨 후 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

### Glycogen synthetase 활성측정

효소반응은 ADP- $^{14}\text{C}$ glucose(0.02ml), rabbit glycogen(0.05ml), Tris-acetate buffer(0.01ml), potassium

acetate(0.01ml), magnesium acetate(0.01ml), glutathione (0.01ml) 그리고 bovine serum albumin(0.01ml)를 혼합시켜 반응시킨다. 효소반응은 총반응액의 부피가 0.2ml 되도록 효소액을  $10^{-4}$ 에서  $2 \times 10^{-3}$  unit 정도 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨다. 효소반응은 2ml의 75% methanol-1% KCl를 첨가하여 중지시킨다. 5분간 정치시키고 반응액을 5분간 원심분리시킨 후, 상등액은 제거시키고 침전된 글리코젠은 2ml의 75% methanol-1%KCl로 두 번 세척한 후 침전물을 1ml 증류수에 녹인 후 0.5ml를 취하여 5ml의 Bray's solution과 섞은 후 liquid scintillation spectrometer를 사용하여 방사능량을 측정한다.

### 효소반응물의 분리

효소반응후 반응물의 중합도를 조사하기 위하여 시료를 bio-gel P4로 충전된 column에 loading한 후 증류수로 용출시켜 반응물을 분리시킨 후 각 분획의 방사능량을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 글리코젠 전구체 효소반응

글리코젠 생합성 과정시 전구체가 필요한지에 대한 실험을 행하기 위하여 우선 효소반응시 전구체로서 토끼의 글리코젠을 사용하여 효소반응을 시킨 후 그 반응물을 bio-gel P4 크로마토그래피를 행한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 총 145,000cpm의 방사능량을 지니며 ADP-glucose의 농도로서 595pmol에 해당되는 기질을 사용하여 효소반응 후 침전물에서 93,000cpm이 검출되었다. 이는 64.1%에 해당되는 381pmol의 ADP-glucose가 글리코젠 생합성 반응에 관여하였음을 알 수 있었다. 이 전구체에 결합된 시료 중 93,000cpm의 방사능량을 지니는 시료를 bio-gel 크로마토그래피를 행한 결과 fraction I구획에서 18,288cpm의 방사능을 지니는 peak를 얻을 수 있었으며 그 외에도 4개의 작은 peak들과 fraction II의 분획이 검출되었다. 효소반응시 글리코젠을 전구체로 행한 결과 약 64%의 ADP-glucose가 글리코젠에 합성되었음을 확인할 수 있었다.

Preiss와 Greenberg(7,8)은 글리코젠 생합성실험에서 포도당 공여체로 ADP-glucose와 deoxy ADP-glucose를 사용하여 둘다 공여체로 작용함을 보고하였으며, 전구체로서 토끼의 글리코젠을 사용한 경우 40 $\mu\text{mol}$ 의 공여체로부터 각각 6.5 $\mu\text{mol}$ 과 4.7 $\mu\text{mol}$ 의 포도당이 전이되었으나 전구체를 사용하지 않은 경우 0.04 $\mu\text{mol}$

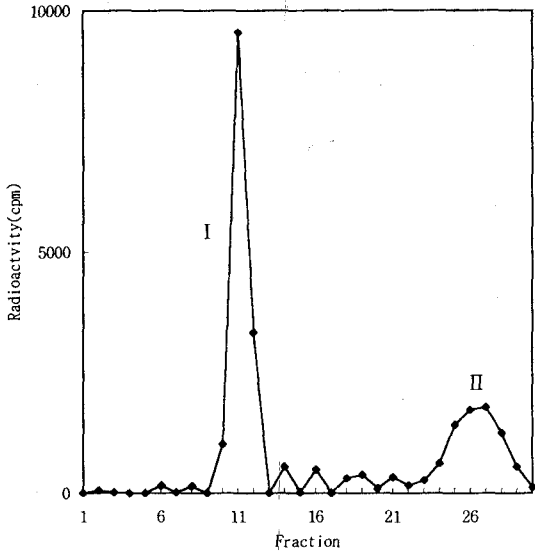


Fig. 1. Gel chromatogram of products by glycogen synthetase using a rabbit glucogen as a primer.

mol의 포도당만이 전이되었다고 보고하였다. 또한 Fox 등(9)은 토끼의 글리코젠을 2.5mg/ml의 농도로 효소반응에 사용하여 1 $\mu$ mol의 ADP-glucose로부터 25.1nmol의 포도당이 전이되었다고 보고하고 있다. 본 연구에서는 효소반응의 조건이 다르기는 하지만 다른 연구자에 비해 높은 비율로 ADP-glucose로부터 포도당이 글리코겐에 전이되었다.

Maltotriose 전구체 효소반응

글리코겐 생합성과정시 분자량이 작은 전구체에 대해서는 당의 전이반응이 일어나는지 확인하기 위하여 삼당당인 maltotriose를 사용하여 효소반응을 시킨 후, 그 반응물을 bio-gel P4 크로마토그래피를 행한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 총 70,000cpm의 방사능량을 지니고 ADP-glucose로서 297pmol에 해당되는 기질을 사용하여 효소반응시킨 후 반응액을 bio-gel 크로마토그래피를 행한 결과, 소당류 외에도 fraction I과 fraction II구획에서 각각 9,984cpm과 6,664cpm의 방사능을 고중합체의 분획을 관찰하였다. 이는 전구체로 글리코겐을 사용하였을 경우보다는 중합도가 낮은 영역에서 14.2%의 fraction I과 9.5%의 fraction II에 해당되는 중합체를 합성하였으며 maltotriose를 전구체로 사용한 경우에도 ADP-glucose의 포도당이 전이되어 분자량이 큰 화합물로 중합되어감을 확인할 수 있었다. 이는 Greenberg 등이 paper chromatography에서 분석한 생성물보다도 중합도가 큰 화합물이 생성되었음을

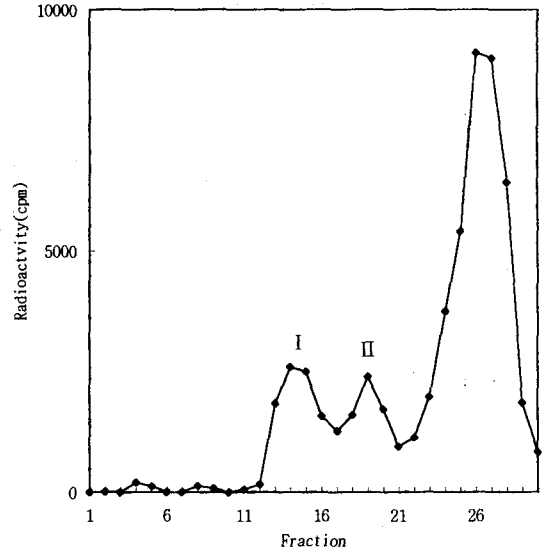


Fig. 2. Gel chromatogram of products by glycogen synthetase using maltotriose as a primer.

확인할 수 있었다.

Preiss와 Greenberg(7)은 전구체로 maltose와 maltotriose를 사용하여 포도당의 전이여부를 확인하였으며 maltotriose가 maltose보다는 좋은 전구체로 반응하였다고 보고하고 있으며 특히 사용된 효소량에 비례적으로 전이량이 증가함을 관찰하였다. Maltose를 전구체로 하여 반응시킨 후 paper chromatography로 반응물을 분석한 결과 15분 반응시 maltotriose와 maltotetrose가 검출되었으며 60분 반응시에는 maltopentose가 확인하였으며 그 생성물의 양도 증가한다고 보고하고 있다. Fox 등(9)은 1 $\mu$ mol의 ADP-glucose를 사용하여 여러 탄수화물에 전이반응을 행한 결과 25mM maltotriose의 경우 13.5nmol이 전이되었으며 방사능량을 측정하여 확인하였으나 그 생성물의 종류에 대해서는 밝히지 않고 있다.

de novo 효소반응

글리코겐 생합성과정시 전구체없이 ADP-glucose만으로 효소반응을 시켜 글리코겐 생합성에 대한 반응을 알아보기 위하여 전구체에 해당되는 화합물을 전혀 사용하지 않고 효소반응을 시킨 후, 그 반응물을 bio-gel P4 크로마토그래피를 행한 결과 Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 총 70,000cpm의 방사능량을 갖고 ADP-glucose로서 297pmol에 해당되는 기질을 사용하여 효소반응시킨 후 반응액을 bio-gel 크로마토그래피를 행한 결과, 소당류 외에도 fraction I과 fraction II구획에서

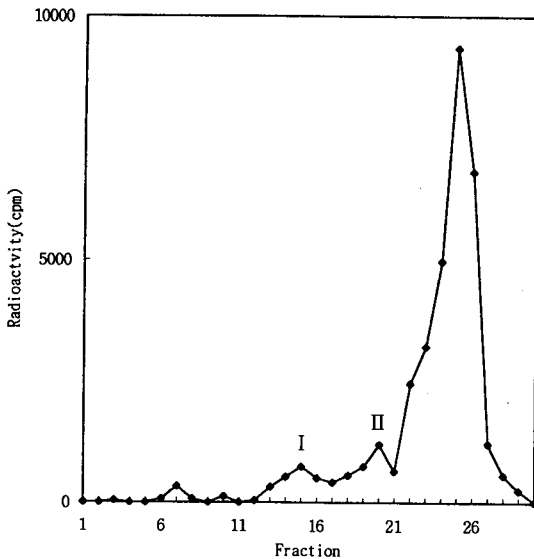


Fig. 3. Gel chromatogram of products by glycogen synthetase without a primer.

각각 2,552cpm과 3,144cpm의 방사능량을 갖는 고중합체의 분획을 관찰하였다. 전구체를 사용하여 반응하였을 때와는 달리 전이되는 ADP-glucose의 수율이 낮기는 하였지만 전구체에 해당하는 물질이 없더라도 ADP-glucose만으로 포도당이 전이되어 *de novo* 생합성이 이루어져 3.6%의 fraction I과 4.5%의 fraction II에 해당되는 중합된 생성물이 생성되었음을 확인할 수 있었다.

Fox 등(9,10)은 전구체가 없었을 때 글리코젠 생합성실험을 행하지는 못하였으나 glucose를 전구체로 사용하였을 경우 전이반응이 일어나지 않았다고 보고하고 있고, 실험결과를 제시하지는 않았지만 전구체를 사용하지 않은 경우 Gahan 등의 실험결과와 유사하게 일정유도기간을 거친 후 반응시간에 비례적으로 중합되어 간다고 보고하고 있다.

## 요 약

*E. coli* B로부터 글리코젠이 없는 glycogen synthetase를 분리정제시킨 후 이 효소를 사용하여 글리코젠 생합성과정 중 전구체의 필요성에 대해 조사하였다. 글리코젠 생합성반응시 전구체로 토끼의 글리코젠을 사용한 경우 포도당 공여체인 ADP-glucose의 64%가 glycogen에 전이되었으며, maltotriose를 공여체로 사용한 경우에는 23.7%의 전이반응이 일어났으며 글리

코젠보다는 낮은 분자량을 갖는 fraction 2개의 peak를 관찰하였다. 또한 전구체를 사용하지 않고 효소반응을 시켰을 경우에도 8.1%의 ADP-glucose가 전이반응을 일으켰으며 maltotriose반응시와 비슷한 fraction에서 중합체가 형성되었음을 관찰할 수 있었다.

## 감사의 말

본 논문은 1996년도 한국과학재단 후반기 Post-Dr. 연구지원사업의 연구결과의 일부이며 지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Yang, H., Liu, M. Y. and Romeo, T. : Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in *Escherichia coli* via the CsrA gene product. *J. Bacteriol.*, **178**, 1012(1996)
2. Ryman, B. E. and Whelan, W. J. : New aspects of glycogen metabolism. *Adv. in Enzymology*, **34**, 285(1971)
3. Barengo, R. and Krisman, C. R. : Initiation of glycogen biosynthesis in *Escherichia coli* studies of the properties of the enzymes involved. *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 190(1975)
4. Lomako, J., Lomako, W. M. and Whelan, W. J. : A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.*, **2**, 3097(1988)
5. Gahan, L. C. and Conrad, H. E. : An enzyme system for *de novo* biosynthesis of glycogen in *Aerobacter aerogenes*. *Biochemistry*, **7**, 3979(1968)
6. Behrens, N. H. and Leloir, L. F. : Dolichol monophosphate glucose: An intermediate in glucose transfer in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **540**, 153(1970)
7. Preiss, J. and Greenberg, E. : Biosynthesis of bacterial glycogen. III. The adenosine diphosphate-glucose: $\alpha$ -4-glucosyl transferase of *Escherichia coli* B. *Biochemistry*, **4**, 2328(1965)
8. Greenberg, E. and Preiss, J. : Biosynthesis of bacterial glycogen. II. Purification and properties of the adenosine diphosphoglucose: glycogen transglucosylase of *Arthrobacter* species NRRL B1973I. *J. Biol. Chem.*, **240**, 2341(1965)
9. Fox, J., Kawaguchi, K., Greenberg, E. and Preiss, J. : Biosynthesis of bacterial glycogen. Purification and properties of the *Escherichia coli* B ADP glucose: 1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -glucosyltransferase. *Biochemistry*, **15**, 849(1976)
10. Fox, J., Govons, S. and Preiss, J. : Glycogen synthase from *Escherichia coli* B. *Methods in Enzymology*, **540**, 539(1975)

(1998년 8월 19일 접수)