

Agrobacterium sp. ATCC31750에 의한 beta-1,3-glucan 합성 대사경로의 주요 단백질 검출

김려화 · †이중헌
조선대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2004. 9. 18., 게재승인 : 2004. 10. 24.)

Identification of Key beta-1,3-glucan Synthesis Enzymes in Agrobacterium sp. ATCC31750

Ryo-Hwa Kim and Jung-Heon Lee†
Department of Chemical Engineering, Chosun University, Guangju 501-759, Korea
(Received : 2004. 9. 18., Accepted : 2004. 10. 24.)

Matrix Assisted Laser Desorption ionization Time of Flight (MALDI-TOF) was used for enzymes identification related to β -1,3-glucan synthesis. *Agrobacterium* sp. ATCC31750 was cultivated with two stage Continuous Stirrer Tank Reactor (CSTR) and the cells were harvested and their protein profiles were analysed by two dimensional electrophoresis. The specific enzyme spot was treated with trypsin and analysed by MALDI-TOF to get peptide molecular weight. The peptide molecular weights were matched with *Agrobacterium tumefaciens*'s Data Base from the matrix science site, then could identify the available key enzymes. In this study, we identified key metabolite of synthesis of beta-1,3-glucan, such as glucose-6-phosphate isomerase, phosphoglucomutase, β -1,3-glucan synthase and glucokinase, and we also identified uracil phosphoribocyl transferase and Ribosome recycling factor also.

Key Words : beta-1,3-glucan(curdlan), MADI-TOF, 2D-SDS-PAGE

서론

1990년대 초부터 SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), FD(Field Desorption), FAB(Fast Atom Bombardment), MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption ionization)와 같은 질량분석법이 많이 개발되고 응용되기 시작하였다. 그 중에서도 MALDI는 고분자 물질에 대하여 시료의 분해 없이 기화/이온화가 가능한 방법으로 일반적으로 질량이 크고 열에 불안정한 생체 고분자나 합성고분자에 아주 이상적으로 적용될 수 있는 방법으로 알려졌다. 또한 TOF (Time of Flight) 분석기와 결합하여 고분자 연구에 있어 가장 각광 받고 있는 질량 분석법이다. MALDI-TOF 질량분석법은 1988년 독일의 Hillenkamp 등에 의하여 개발된 이온화 법으로 200,000 Da 이상의 물질에 대하여서도 빠르고 정확한 분자량 측정이 가능한 분석법이다(1-3). 또한 분자량과 등전점으로 단백질을

분리하는 2차원 전기영동장치와 MALDI-TOF를 병용한 단백질 검출법은 NCBI, Swiss plot, Matrix science 등 많은 웹사이트에 DB가 많이 축적되어 있으므로 겔 은염색으로 나타난 점 (spot)에서 뽑아낸 적은 양의 단백질로도 그 단백질을 정확하게 동정할 수 있다. 단백질 동정에 관련된 연구논문들을 보면 대부분 2D와 MALDI-TOF로 단백질을 동정하였다(4-10).

본 연구에서는 글루칸 합성균주인 *Agrobacterium* sp. ATCC31750(11, 12)에서 β -1,3-Glucan 합성에 중요한 작용을 하는 주요 효소들을 MALDI-TOF를 이용하여 검출하였다. Curdlan은 beta-1,3-glucose로 연결된 단일고분자로서 물에 불용성이며 *Agrobacterium* sp. 균주에 의해 배지 내에 탄소원이 충분히 존재하며 질소원이 고갈되었을 때 생합성된다(13, 14). 1962년 Harada와 그의 동료들에 의해 처음 발견된 이래로 그들의 특이한 물성 특히, 액상에서는 가열에 의해 탄력성 있는 비가역적인 gel을 형성하는 특징이 있기에 식품분야와 비 식품분야에서 많은 관심을 기울여 왔다. 이러한 curdlan의 잠재적 이용가능성 때문에 생산 공정과 관련된 화학적 물리적 특성연구는 많이 수행되어 오고 있으나 커들란의 합성 대사에 관련된 연구는 많지 않다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Chosun University, Donggu, Kwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-7159, Fax : +82-62-230-7226
E-mail : leejh@mail.chosun.ac.kr

본 연구에서는 커들란 합성대사 과정을 알아보고자 *Agrobacterium* sp.와 98.4%의 유사성을 갖고 있는 *Agrobacterium tumefaciens*의 단백질 데이터베이스의 정보에 근거하여 2D 겔에서 커들란 합성에 중요한 작용을 하는 단백질들을 찾았다. 추정된 단백질들은 MALDI-TOF로 펩타이드 질량을 분석하여 그 펩타이드 값을 Data Base에 있는 단백질 펩타이드 값과 비교하여 단백질을 확인하였다.

재료 및 방법

균주 배양방법 및 재료

본 실험에서는 *Agrobacterium* sp. ATCC 31750을 균주로 사용하였으며, 균주의 특성에 따라 2 stage CSTR을 진행하였다. 배지는 Sugar 100 g/L, NH₄Cl 4 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L, Trace element 10mL/L로 사용하였고 부피는 2 L로 5 L용 반응기를 사용하였으며 초기 pH는 2개의 반응기 모두 7.0으로 고정한다. 두 반응기에 각각 17시간 키운 활성이 좋은 cell 200 mL씩 넣어 24시간 정도 키우면 Cell 활성이 좋으며 질소원은 거의 고갈되어 간다. 이때부터 CSTR에 들어가며 두번째 반응기의 조건은 curdlan을 생산하기 좋게 pH 5.5로 바꿔준다. 즉 1st stage에서는 유입배지로 인해 질소원이 충족하여 cell이 잘 자라게 하고, 두번째 반응기에서는 질소원이 고갈된 curdlan 생산조건으로 되게 한다.

본 실험에 사용된 시약은 acetonitrile (Sigma), potassium Ferricyanide (Sigma), sodium Thiosulfate (Sigma), ammonium bicarbonate (Sigma), Formic acid (Sigma), Trifluoroacetic acid, free acid (Sigma), A-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (Sigma) 등이다. 기기로는 fermentor (Kobiotech, Korea), sonicator (Fisher), high speed centrifuge (Hanil Inc., Korea), Ettan IPGphor isoelectric Focusing system (Amersham Bioscience, Uppsala Sweden), two dimension SDS-PAGE (Hoefer Inc., San Francisco, USA), Voyer MALDI-TOF (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA)를 사용하였다.

시료 선정 및 처리

시료는 발효시작 약 50시간 지점으로서 첫 번째 반응기의 시료는 curdlan이 생성되지 않은 샘플이고 두 번째 반응기의 시료는 curdlan이 생성되었을 때 시료이다. 선정된 시료는 lysis buffer (8 M Urea, 4% (W/V) Chaps, 3% pharmalyte 3-10)에 녹여 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 분쇄한 후 단백질을 추출하였다.

이차원 전기영동

단백질은 45 µg으로 정량하고 clean up kit (pharmacia)을 사용하여 정제한 후 rehydration buffer (8 M Urea, 2% chaps, 0.5% IPG Buffer, 0.002% Bromophenol blue)에 녹여 Ettan IPGphor isoelectric Focusing system을 이용하여 IEF (isoelectric focusing)을 진행하였다. Strip gel은 pH 3-10 linear form을 사용하였으며 IEF한 strip은 Hoefer SE 600 (Hoefer Inc., San Francisco, USA)에 의해 SDS (sodium dodecyl sulfate) -PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 진행하였다. Gel은 silver staining kit (Amersham Bioscience,

Uppsala Sweden)을 이용하여 염색하였다.

MALDI-TOF를 이용한 protein identification

겔에서 선정된 검은 점은 trypsin 처리를 거쳐 MALDI-TOF로 펩타이드 값을 측정하였다. 측정된 펩타이드 값을 Matrix science (<http://www.matrixscience.com>)의 *Agrobacterium tumefaciens*의 DB와 비교하여 단백질의 종류를 확인하였다. 이미 선행된 연구결과에 따르면 *Agrobacterium tumefaciens*는 *Agrobacterium* sp. ATCC 31750과 98.4%의 유사성을 갖고 있다고 한다.

결과 및 고찰

연속 공정을 이용하여 세포성장 조건 및 글루칸 생산조건으로 발효조의 상태를 제어하며 실험을 진행하였다. 첫 번째 발효조의 조건은 질소원이 존재하는 상태에서 pH는 7.0으로 조절한 연속 반응 조건이며 두 번째 발효조의 조건은 질소원이 고갈되고 세포가 글루칸을 생산하는데 최적인 pH 5.5를 유지하도록 하였다. 연속 발효 실험 결과 일정 시간이 지나면 정상상태에 도달함을 관찰할 수 있었으며 질소원의 농도는 첫번째 반응기에서도 아주 낮게 유지되는 현상을 볼 수 있었다(Fig. 1).

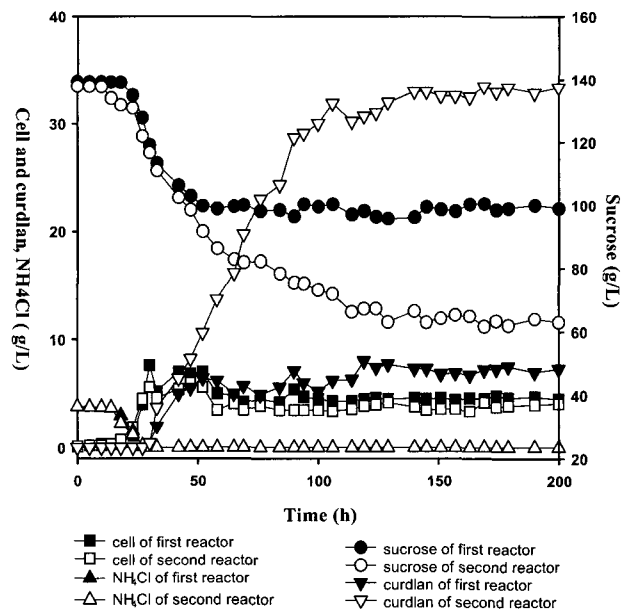


Figure 1. Changes of cell mass, 1,3-beta-glucan, and ammonium concentrations with two stage continuous fermentation.

Fig. 1의 실험결과에서 세포의 성장과 글루칸의 생산이라는 두 가지의 다른 조건에 있는 시료를 채취하기 위하여 발효시작 약 150시간 지점에서 시료를 채취하여 단백질 검출 실험에 응용하였다. 첫 번째 발효기의 시료는 글루칸이 생성되지 않고 세포의 성장만 일어나는 시료이며 두 번째 발효기의 시료는 글루칸이 생성되는 조건하의 세포에 시료이다. 선정된 시료는 lysis buffer (8 M Urea, 4% (W/V) Chaps, 3% pharmalyte 3-10)에 녹여 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를

분쇄한 후 단백질을 추출하였다. 선정된 샘플을 2차원 전기영동을 통하여 고찰하였다(Fig. 2).

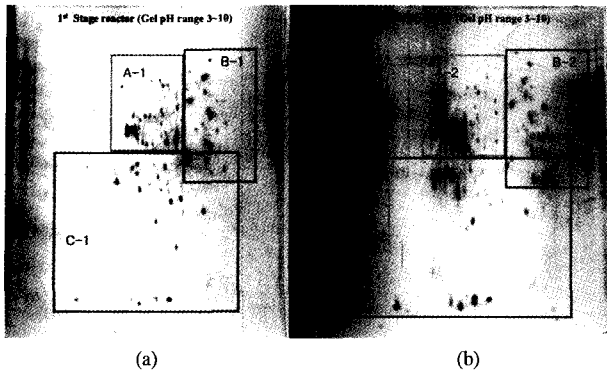


Figure 2. Comparative protein profile analysis for two different fermentation conditions. (a) First fermenter operated under pH 7 and cell growth condition (b) Second fermenter operated under pH 5.5 and glucon production condition with limited nitrogen source. The gel image was divided into three parts for analysis.

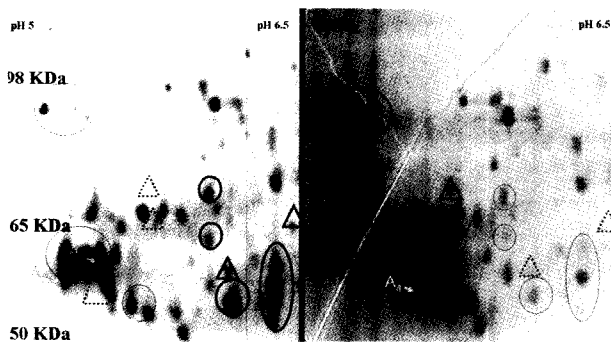


Figure 3. Magnified images of part A-1 and part A-2. Left figure is A-1, and right one is A-2. The triangle symbol means protein formed newly and the circle symbol means protein quantity had been changed.

주요 대사산물들을 검출해 내기 위하여 본 실험에서는 2 단계 반응기에서 각각 성장한 세포의 단백질 발현의 변화를 2D gel (pH range: 3~10)에 걸어 그 결과를 알아보았다(Fig. 2.). 발효 도중의 발현이 증가된 단백질과 발현이 감소된 단백질의 비교하여 주요 대사산물들을 추정하고 밝혀내기 위하여 gel을 A, B, C 3개 부분으로 나누고 주요 대사산물이 많이 들어있는 part A와 part C를 중심으로 단백질 검출실험을 하였다.

Fig. 3은 Fig. 2의 A 부분을 확대한 그림으로 세포성장기의 단백질과 글루칸 생성기의 단백질의 이차원 분포를 보여 주고 있다. A-1와 A-2 부분을 비교하면 단백질의 농도가 증가한 부분과 발현이 A-1에서는 없다가 생성된 부분 및 단백질의 농도가 감소한 점들을 구분할 수 있다. Fig. 3에서는 두 발효조건 사이에서 생성되거나 없어진 단백질을 실선 삼각형 및 점선 삼각형으로 비교하여 나타냈으며 농도가 진해지고 연해진 단백질의 경우는 원 또는 타원형 실선을 사용하여 분류하였다. *Agrobacterium tumefaciens*의 데이터베이스로부터 가능한 효소의 분자량 및 pI 값을 이용하여 겔상의 spot을 지정한 후 시료를 채취해서 MALDI-TOF로 펩타이드의 분자량을 측정하였다. A부분에는 glucon 합성의 다양한 효소들 중에 glucose-6-Phosphate isomerase, β -1,3-glucon synthase 및 phosphoglucomutase 등 주요 대사관여 효소들이 있는 것으로 추정되었다. 겔상의 가능한 효소군을 채취하여 MALDI-TOF로부터 얻은 peak 값을 Matix Science 웹사이트 (<http://www.matrixscience.com>)에서 *Agrobacterium tumefaciens*의 MALDI-TOF 질량 값과 비교하여 매치되는 단백질을 찾았다. Matrix science 검색창의 query 값에 MALDI-TOF로 찍은 peptide peak 값을 넣고 *Agrobacterium tumefaciens*의 DB와 비교해 보면 peptide 값 matching을 통하여 가장 근접하는 단백질들의 순서로 열거해 준다. 그 결과로부터 단백질들을 확인할 수 있었다. 펩타이드 값은 peak의 선정에 따라 결과가 다르게 나타나는 경우가 많으므로 반드시 반복적인 과정을 거쳐야 한다. 질량분석기로 분석한 결과 Fig. 3의 A₁,

Table 1. List of Glucon Synthesis Related Enzymes Identified from Part A

	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
Enzymes	Glucose-6-phosphate isomerase.	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	phosphoglucomutase	1,3-beta-glucon synthase
MW	58,708 Da	55,131 Da	57,802 Da	57,669 Da
pI	5.79	5.97	5.30	5.82
Function	D-Frucose 6-phosphate <=> D-gluco6-phosphate	Glucose-6-phosphate <=> D-6-phospho- δ -glucono-lactone	D-Glucose 6-phosphate <=> α -D-Glucose 1-phosphate	UDP-Glucose <=> 1,3- β -glucon

Table 2. List of Glucon Synthesis Related Enzymes Identified from Part C

	C ₁	C ₂	C ₃
Enzymes	Glucokinase	Uracil phosphoribosyl transferase	Ribosome recycling factor
MW	17,481 Da	23,300 Da	20,632 Da
pI	5.76	6.32	6.19
Function	Glucose <=> α -D-Glucose-6-phosphate	UMP + Pyrophosphate <=> Uracil + 5-Phospho- α -D-ribose 1-diphosphate	Responsible for the release of ribosomes from messenger RNA at th termination of protien biosynthesis.

A₃, 및 A₄ 등이 A₁은 glucose-6-phosphate isomerase, A₃는 phosphoglucomutase, A₄는 β-1,3-glucan synthase로 판명되었다 (Table 1). Fig. 3에서 볼 수 있듯이 A₄인 β-1,3-glucan synthase로 글루칸 합성에 관여하는 효소로 1단 발효기에서는 발현이 되지 않다가 2단 발효기에서 글루칸이 합성이 촉진되면서 다양으로 발현되는 것으로 나타났다.

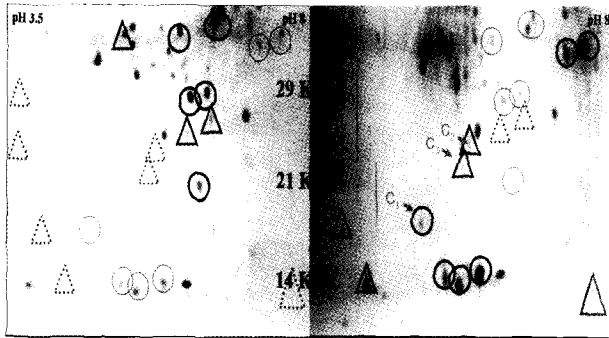


Figure 4. Magnified images of part C-1 and part C-2. The left figure is C-1 and the right one is C-2. The triangle symbol means the protein formed newly and the symbol of the circle means the protein quantity had been changed.

Fig. 4는 Fig. 2에서 분자량이 낮은 부분을 확대한 겔 사진으로 Fig. 3에서와 마찬가지로 up 또는 down regulated 단백질의 분포를 관찰할 수 있다. C-1과 C-2를 비교하여 몇 개의 중요하다고 생각되는 점들을 취하여 전처리를 거친 후 MALDI-TOF로 얻은 peptide 값을 A 부분의 단백질 검출과 같은 방법으로 Matix Science 웹사이트 (<http://www.matrixscience.com>)에서 *Agrobacterium tumefaciens*의 MALDI-TOF 질량 값과 비교하여 매치되는 단백질을 찾았다. 웹사이트의 데이터베이스와 비교하여 찾은 결과 C₁은 glucokinase, C₂는 uracil phosphoribocyl transferase, C₃는 ribosome recycling factor로 밝혀졌다(Table 2). Glucokinase는 글루코즈 대사과정에서 필요한 효소로 세포의 성장 및 글루칸의 생산과정에서 모두 필요한 효소로 C-1과 C-2에서 확실히 나타나는 것을 알 수 있었으나 uracil phosphoribocyl transferase의 경우에는 글루칸의 전구체인 UDP-glucose 합성에 관여하는 효소를 C-1에서는 발현이 되고 있지 않다가 글루칸이 합성될 때 C-2에서는 높게 나타남을 확인할 수 있었다.

요약

본 연구에서는 이차원 전기영동을 통한 단백질분석을 통해 선정한 점들을 MALDI-TOF를 이용하여 peptide 값을 얻었으며 그 peptide 값을 웹 사이트의 데이터베이스와 비교하여 glucose-6-Phosphate isomerase, phosphoglucomutase, β-1,3-glucan synthase, glucokinase와 같은 주요 대사산물들을 검출하였다. 그리고 함께 검출된 단백질에는 uracil phosphoribocyl transferase와 ribosome recycling factor도 있었다. 본 연구에서는 이를 바탕으로 더 많은 연구를 통하여 이미 검출된 단백질에 대한 재검증을 진행하고 더 많은 단백질을 검출하여 β-1,3-glucan이 생성되는 상세한 합성 경로를 밝혀내고자 하였다. 본 연구를 통하여 β-1,3-glucan

합성에 관여하는 단백질들을 밝혀내고 농도를 측정하면 수학적으로 모델링 할 수 있으며, 이를 통하여 세포 내부를 최적화 시켜 글루칸 생산성을 높일 수 있다. 또한, 연속단계의 반응을 찾아 그 반응을 촉진하도록 함으로써 향후 더 높은 생산성을 갖는 변이주를 만드는 것이 가능할 것이다.

감사

본 연구는 과학기술부 지원 국책 시스템생물학 연구지원 사업 (M1-0309-00-0011)으로 추진되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sparkman, D. (2004), Mass Spectrometry PittCon[®] 2004, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **15**, 942-949.
2. Guilhaus, M. (1995), Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrometry* **30**, 1519-1532.
3. Wehr, T. (2003), Coupling Liquid-Phase separations and MALDI-MS, *LCGC North America* **21**(10), 974-982.
4. Kvster, B. and M. Mann (1998), Identifying proteins and post-translational modifications by mass spectrometry, *Structural Biology* **8**, 393-400.
5. Joo, W. A., D. G. Sul, D. Y. Lee, E. I. Lee, and C. W. Kim (2004), proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene, *Mutation Research* **558**, 35-44.
6. Pierleoni, R., M. Buffalini, L. Vallorani, C. Guidi, S. Zeppa, C. Sacconi, P. Pucci, A. Amoresano, A. Casbarra, and V. Stocchi (2004), Tuber borchii fruit body: 2-dimensional profile and protein identification, *Phytochemistry* **65**, 813-820.
7. Rodriguez-Pineiro, A. M., D. Ayude, F. J. Rodriguez-Berrocgal, and M. P. de la Cadena (2004), Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome, *J. chromatography B* **803**, 337-343.
8. Forster, M. J., S. R. Mcdonald, S. T. Weintraub, C. A. Carroll, and R. W. Gracy (2004), Proteomic identification of specific oxidized proteins in Apoe-knockout Mice: Relevance to Alzheimer's Disease, *Free Radical Biology & Medicine* **36**(9), 1155-1162.
9. Rashmi, S., K. Setsuko, and N. Hiroaki (2004), Proteomic analysis of brown planthopper: application to the study of carbamate toxicity, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 425-432.
10. Adriana, M. N., B. Gerard, C. B. Jean, and B. Georges (1999), Identification by mass spectroscopy of three major early proteins associated with virosmes in vaccinia virus-infected cells, *Virus Research* **59**, 1-12.
11. Harada, T., K. Fujimori, S. Hirose, and M. Masada (1966), Growth and β-1,3-glucan 10C3K production by a Mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* in Defined edium, *Agr. Biol. Chem.* **30**, 764-769.
12. Harada, T., M. Terasaki, and A. Harada (1993), Curdlan. In *Industrial Gums*, R. L. Whistler and J. N. VeMiller, Eds., 427-445, Academic, New York.
13. Phillips, K. R. and H. G. Lawford (1983), Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentations, *In Progress in Industrial Microbiology* **18**, M. E. Bushell, Eds., 201-229, Elsevier, Amsterdam.
14. Harada, T. and A. Harada (1996), Curdlan and succinoglycan, In *Polysaccharides in Medical Applications*, S. Dimitrio, Eds., 447-454, marcel Dekker, New York.