한국생물공학회지 제23권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 23, No. 6, 474-478(2008)

대장균의 UDP-glucose regeneration 시스템을 이용한 이당류 합성에 관한 연구

† 오 정 석
조지아 공대 화학생명공학과
(접수 : 2008. 9. 29., 게재승인 : 2008. 11. 3.)

Disaccharide Synthesis using *E. coli* UDP-glucose regeneration system

Jeong Seok Oh†
School of Chemical and Biomolecular Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332-0100
(Received : 2008. 9. 29., Accepted : 2008. 11. 3.)

UDP-glucose regeneration system using metabolic engineeringis unique and efficient strategy for oligosaccharide synthesis. To exploit the efficient UDP-glucose regeneration system, we introduced four enzymes, which would be important in partitioning the flux of UDP regenerationsuch as UDP-glucose pyrophosphorylase, UDP-Kinase gene, UDP-galactose 4-epimerase, and ß-1, 4-galactasyltrasnsferase, into *E. coli* AD202. To determine the optimal expression level for UDP-regeneration, LacNAc concentration was compared depending on IPTG concentration. 0.5 mM IPTG induction showed the higher oligosaccharides synthesis. Using metabolic engineering under optimal IPTG induction, LacNAc synthesis of AD202/pQNGLU increased until 16 h and showed the 1.34 mM. This concentration is 10 times higher than that of control strain at same reaction time. Lactose of AD202/pQNGLU showed the maximum synthesis of 0.39 mM at 16 h and showed the 2.6 times higher than that of control strain.

Key Words : Metabolic engineering UDP-glucose regeneration; Oligosaccharide synthesis; *E. coli* whole-cell biocatalytic synthesis

서 론

올리고 당은 antibody나 protein의 cofactor로서, 박테리아와 바이러스 receptor와 같은 다양한 종류의 생화학적인 합성에 중요한 역할을 해왔고(1, 2), 이를 산업적으로 합성하기 위해서 화학적 또는 생촉매적 합성방법이 고안되었다. 화학적인 합성방법은 여러 단계의 protection과 deprotection을 거치기 때문에 생산성과 합성 수율이 낮아 산업화를 하기에는 비효율적이다(3). 반면에 효소나 whole-cell 시스템을 이용하는 생촉매 방법은 화학적인 방법에 비해서 단계가 단순화 되어 산업적으로 더 실용적이고, 효과적인 방법으로 인식되고 있다(4, 5, 6, 7).

대사공학은 유전자 재조합기술과 분자생물학 및 화학공학적 기술을 이용하여 새로운 대사회로를 도입하거나 기존의 대사회로를 제거, 증폭, 변경시켜 세포나 균주의 대사특성을 원하는 방향으로 바꾸는 일련의 기술이다(8). 대사 공학을 사용한 whole-cell 시스템은 올리고 당 합성에 있어서 큰 장점을 가지고 있다(9, 10, 11, 12). whole-cell 시스템을 이용한 효율적인 올리고 당 합성 방법에 사용되는 제한인자는 NAD나 NADH와 달리 multi-pathway에 의해서 공급되는 인자이다. 따라서 원활한 cofactor공급 시스템 개발이 필요하게 되었다. 가장 잘 알려진 대장균 시스템(13, 14)은 자연적으로 UDP-glucose regeneration 시스템을 가지고 있다(15). 하지만 자연적인 대장균의 UDP-glucose regeneration 효율은 높지 않기 때문에 regeneration 효율을 높이기 위해서 대사공학적인 접근이 필요하다(16). 본 논문에서는 올리고 당 합성 능력을 향상시키기 위해서 대사공학적인 방법을 사용하여 UDP-glucose regeneration 효율을 증가시켜 연구를 수행하였다.

† Corresponding Author : School of Chemical and Biomolecular Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia 30332-0100
Tel : +82-10-5763-1005, Fax : +82-2-3660-0782
E-mail : ojseok@gmail.com

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

Biology reagents 들은 Qiagen, Invitrogen, Promega, 그리고 BioRad에서 구입하였고, 시약들은 Sigma-Aldrich와 Fisher에서 구입하여 사용하였다. 사용한 bacterial strains과 plasmid는 Table 1에 정리해 놓았다

배양 조건은 다음과 같다. LB 배지를 사용하여 30℃, 250 rpm

에서 OD_{600nm}가 0.6-0.7 될 때까지 배양을 수행한 후 IPTG를 첨가하고, 충분한 양의 효소를 발현시키기 위해서 5시간 더 배양하였다. 5시간 배양 후 centrifuge를 통해서 cells을 수집하고 PBS buffer로 세척한 후 reaction buffer {1M Tris-HCl (7.5) 20 mM K_2HPO_4, 2 mM $MnCl_24H_2O$, 200 mM glucose, 5 g/L $MgSO_47H_2O$, 50 mM GluNAc}로 resuspend 시켜 30℃, 250 rpm에서 LacNAc 합성 배양을 수행하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this work

Strain/plasmid	Description	Source/reference
Bacterial strains:		
E. coli JM109	F' *traD36 proA+B+lacIq△(lacZ)M15/△(lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96recA1 relA1 endA1 thi hsdR17*	[20]
E. coli AD202	*ompT::kan*	Dr. Wakarchuk [17]
Plasmids:		
pGEM-T Easy vector	amp^r	Promega
pQE80L	Commercial expressional vector containing T5 promoter and $lacI^q$	Qiagen
pMUEL	pQE80L containing *pgm*, *gal*U and *gal*E: *lgt*B fustion gene	Mao et al.
pT-NDK	pGEM-T easy vector containing *ndk* gene	This study
pQU	pQE80L containing *galU* gene	This study
pQNU	pQE80L containing *ndk* and *galU* gene	This study
pQNGLU	pQE80L containing *ndk*, *gal*E: *lgt*B fustion and *gal*U gene	This study

플라스미드 제작

발현시킬 gene들은 ribosome binding site와 stop cordon를 가지고, 하나의 promoter하에서 발현이 될 수 있도록 플라스미드를 제작하였다. *E. coli* UDP-glucose pyrophosphorylase gene (*galU*)은 JM109 genomic DNA에서 forward primer (ATAT***CTGCAG***TGCGATACAGAAATATGAACAC, *Pst*I)와 reverser primer (TACT***AAGC TT***GATTGCTCAACGCCG, *Hind*III)를 사용하여 증폭 시켰다. 증폭된 *galU* gene (1 kb)은 *pQE80L* 벡터에 삽입이 되어 *pQU* 벡터가 되었다. *E. coli* UDP-kinase gene (*ndk*)은 JM109 genomic DNA에서 forward primer (5'-ATAT***AGATCT***ATGGCTATTGAACGTACTTTTTCC-3, *Bgl*II)와 reverse primer (5'-TA***GGATCC*** TTATTAACGGGTGCGC, *BamH*I)를 사용하여 증폭되었다. 증폭된 *ndk* (428 bp) gene은 pGEM-T Easy vector에 삽입이 되어 pT-NDK 벡터가 되었고. pT-NDK 벡터를 restriction 효소 *Bgl*II와 *Sac*I으로 처리한 후 *Bgl*II과 *BamH*I-*Sac*I을 가진 *ndk* gene 얻었다. 이 *ndk* gene를 *pQU* 벡터에 삽입하여 *pQNU* 벡터를 만들었다. *galE:lgtB* fusion gene (2 kb)은 *pMUEL* 벡터에서 forward primer (5'-AGAG***A GATCT***CACACAGAATTCATTAAAGAGGAG-3, *Bgl*II)와 reverseprimer (5'-CTT***CTCGAG***TCTATCAACAGGAGTCCAAGCT, *Xho*I)를 사용하여 증폭하고, *pQNU*에 삽입하여 *pQNGLU* 벡터를 만들었다.

분석방법

UDP-kinase (Ndk), UDP-glucose pyrophosphorylase (GalU)와 UDP-galactose 4'-epimerase fused with ß-1, 4-galactosyltrasnsferase (GalE : LgtB)의 발현은 SDS-PAGE gel를 통해서 확인하였다. Carbohydrate 농도는 CarboPac PA20 analytical column을 가진 Dionex BioLC system (Sunnyvale, CA)을 사용하여 측정하였다. 측정 방법은 다음과 같다. Dionex ED50 electrochemical detector의 pulsed amperometry (waveform: t=0.41 s, p=-2.00 V; t=0.42 s, p=-2.00 V; t=0.43 s, p=0.60 V; t=0.44 s, p=-0.10 V; t=0.50 s, p=-0.10 V)를 사용하였는데, 200 mM sodium hydroxide (A)와18 MΩ-cm water로 구성된 mobile phase을 사용하였고, linear gradient는 t=0 min, 5 : 95 (A : B); t=5 min, 5 : 95; t=10 min, 20 : 80; t=20 min, 20 : 80; t=21 min, 100 : 0; t=30 min, 100 : 0; t=35 min, 5 : 95; t=50 min, 5 : 95 이다 Lactose and LacNAc 농도는 standard 용액으로 측정한 calibration curves를 사용하여 결정되었다.

결 과

대사공학을 이용한 UDP-glucose regeneration 시스템

Fig. 1에서 보듯이 UDP-glucose regeneration 시스템을 이용하여 올리고 당을 합성하는데 있어서 출발 물질은 UDP-glucose이고, regeneration flux에 관여하는 효소는 4가지이다. 본 연구에서는 효율적인 UDP-glucose regeneration system을 위해서 regeneration flux에 관련된 4가지 효소 (UDP-galactose-4'-epimerase, β-1,4-galactosyltransferase, UDP-kinase, UDP-glucose pyrophosphorylase) 들이 한 벡터에서 각각 발현되는 시스템을 사용하였다(Fig. 2). 대사공학적으로 구축된 UDP-glucose regeneration system의 효율성을 확인하기 위해서 *E. coli* AD202에 vector를transformation 시켰고, 0.5 mM의 IPTG를 첨가하여 regeneration flux에 관련된 효소들의 발현은 SDS-PAGE gel 상에서 확인하였다. Fig. 3에서 보듯이 UDP-galactose-4'-epimerase와 β-1,4-galactosyltransferase의 fusion protein은 68 KD, UDP-glucose pyrophosphorylase은 32 KD 그리고 UDP-kinase 15.3 KD로 정확한 크기의 발현을 확인할 수 있었다.

UDP-glucose regeneration system이 disaccharide 합성에 미치는 영향

새롭게 구축된 UDP-glucose regeneration system에서의 LacNAc 합성에 필요한 최적 효소의 발현량을 정하기 위해서 다양한 IPTG 농도 (0.1, 0.3, 0.5, 1mM)에서 LacNAc 합성 정도를 비교해 보았다. 샘플은 다양한 농도의 IPTG 첨가하고 5시간 동안 효소를 발현시킨 후 reaction buffer에서 20시간 배양을 하였고, 일정량을 취하여 분석하였다. 다양한 IPTG 농도 실험에서 가장 높은 LacNAc 합성 농도는 0.5 mM이다. Disaccharide 합성 정도를 최적의 IPTG 농도에서 시간에 따라 비교해 보았다. Fig. 5A에서 보듯이 *E. coli* AD202/pQNGLU의 LacNAc 농도는 16시간까지 증가하는 경향을 보였고, 최대 LacNAc 농도는 1.34 mM 이다. 이 농도는 대조구인 AD202/pQE80L에 비해서 10배정도 높은 생산성을 보이고 있다. Lactose 농도를 비교해 보면 AD202/pQNGLU의 최대 lactose 농도는 16시간에 0.39 mM로 대조구보다 2.6배 높은 농도를 나타내었다(Fig. 5B). 결론적으로 AD202/pQNGLU의 총 disaccharide 농도는 1.73 mM 이며, AD202/pQE80L 보다 6.5배 높은 생산성을 보였다(Fig. 5C).

고 찰

본 논문에서는 oligosaccharide 합성에 있어서 glucose-6-phosphate에서 UDP-glucose로 가는 carbon flux보다 UDP에서 UTP로 전환시킨 후 UDP-glucose를 재 순환시키는 것이 더 효율적인 flux로 가정하였다(Fig. 1). 왜냐하면 oligosaccharide 합성은 에너지 의존적인 시스템으로 원활한 cofactor의 공급이 제한인자이기 때문이다.

UDP-glucose regeneration을 간략하게 설명하면 다음과 같다. UDP-kinase에 의해서 UDP는 UTP 전환되고, UTP는 UDP-glucose phosphorylase에 의해서 glucose-1-phosphate에서 UDP-glucose를 전환된다. 이때 만들어진 UDP-glucose는 UDP-galactose-4-epimerase와 β-1,4-galactosyltransferase에 의해서 N-acetyllactosamine (LacNAc) 이나 lactose로 전환되면서 UDP를 방출하게 된다. 이때 방출된 UDP는 UDP-kinase에 의해서 다시 UTP가 된다(Fig. 1).

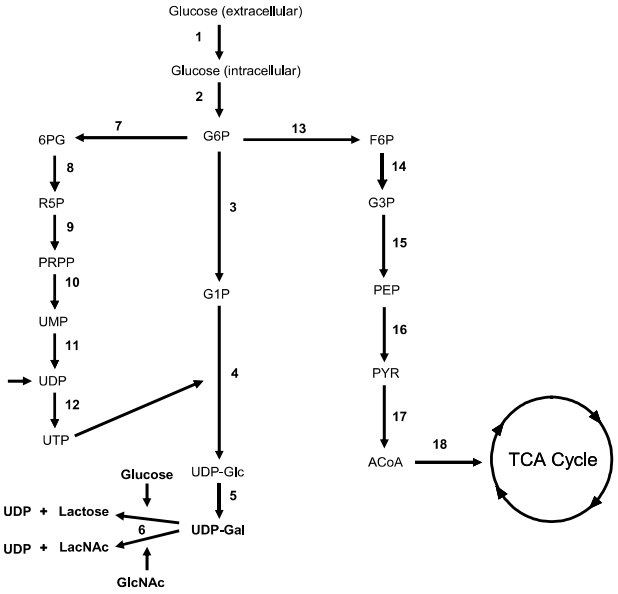

Figure. 1. Metabolic network of UDP-glucose (UDP-Glc) synthesis in *E. coli*. ACoA: acetyl-CoA; ATP: adenosine triphosphate; Glc: glucose; G1P: glucose-1-phosphate; G6P: glucose-6-phosphate; GlcNAc: N-acetylglucosamine; G3P: glyceraldehyde-3-phosphate; KDGP: 2-keto-3-deoxygluconate-6-phosphate; LacNAc: N-acetyl lactosamine; PEP: phosphoenol-pyruvate; 6PG: 6-phosphogluconate; PRPP: 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate; PYR: pyruvate; R5P: ribose-5-phosphate; TCA cycle: tricarboxylic acid cycle; UDP-Gal: UDP-galactose; UDP-Glc: UDPglucose; UDP: uridine diphosphate; UMP: uridine monophsphate; UTP: uridine triphosphate. Enzymes/Proteins: 1: glucose-binding-protein for glucose uptake; 2: hexokinase; 3: phosphoglucomutase; 4: UDP-glucose pyrophosphorylase 5: UDP-galactose-4-epimerase; 6: β-1,4-galactosyltransferase 7: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 8: 6-phosphogluconate dehydrogenase; 9: ribose-phosphate diphosphokinase; 10: orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-50-phosphate decarboxylase; 11: uridylate kinase; 12: UDP kinase; 13: phosphoglucose isomerase; 14: fructose-phosphate kinase and fructose diphosphate aldolase;15: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate mutase, and enolase; 16: pyruvate kinase; 17: pyruvate dehydrogenase multienzyme complex; 18: citrate synthase.

효율적인 효소 발현을 위해서 하나의 vector 시스템을 사용하였다. 각 효소들은 ribosome binding site와 stop cordon을 가지고 T5 promoter에 의해서 발현을 시켰고, SDS-PAGE로 확인을 하였다(Fig. 2, 3).

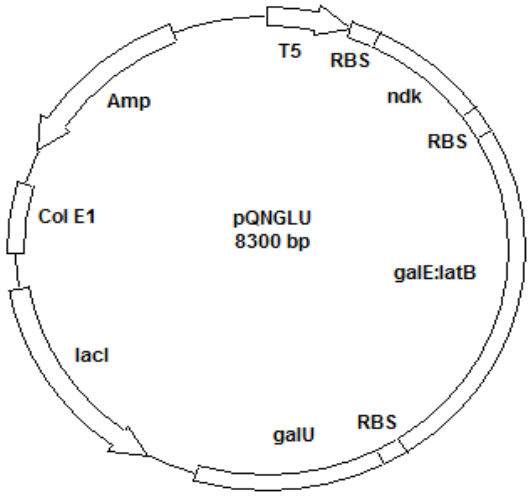

Figure 2. Maps of pQNGLU. Abbreviations are as follows: *Amp*^{R}: ampicillin resistance gene; *ColEI*: *ColEI* origin of replication; *galE*:*lgtB*: fusion gene of UDP-galactose-4-epimerase and β-1,4-galactosyltransferase; *galU*: UDP-glucose pyrophosphorylase gene; *ndk*: UDP-kinase RBS: ribosome binding site; *T5*: T5 promoter.

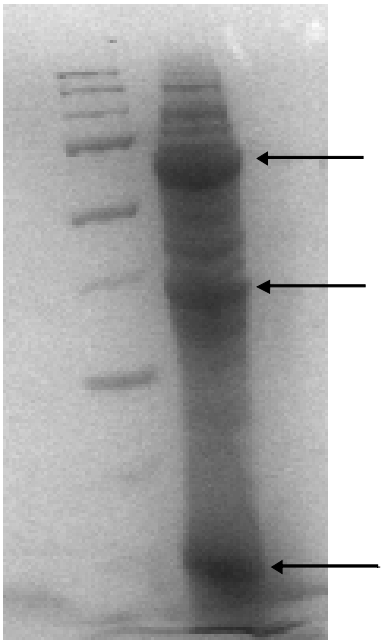

Figure 3. Analysis of expression of Ndk, GalE:LgtB, GalU of AD202/pQNGLU by SDS-PAGE. The 68, 32, and 15.3 kD bands correspond to the fusion protein, GalU and Ndk proteins. The samples were taken 5 h after induction with 0.5 mM IPTG.

UDP-glucose regeneration의 효율은 각 효소들의 발현량에 의존적이다. 따라서 IPTG 농도에 따른 LacNAc 합성 정도를 비교해 보았다(Fig. 4). 0.5 mM IPTG 농도에서 최대의 LacNAc 농도를 나타내었다. 하지만 1 mM IPTG 에서는 0.5 mM IPTG에서 보다 낮은 LacNAc 농도를 나타내었다. 이것은 각 효소들의 overexpression에 의한 metabolic burden(18, 19)으로 추측된다. 대사공학적으로 재구성된 metabolic flux regeneration을 가진 AD202/pQNGLU은 Fig. 5에서 보듯이 원활한 UTP 공급과 효율적인 UDP-glucose 전환에 의해서 대조구인AD202/pQE80L 보다 높은 LacNAc 합성 정도를 보였다(Fig. 5).

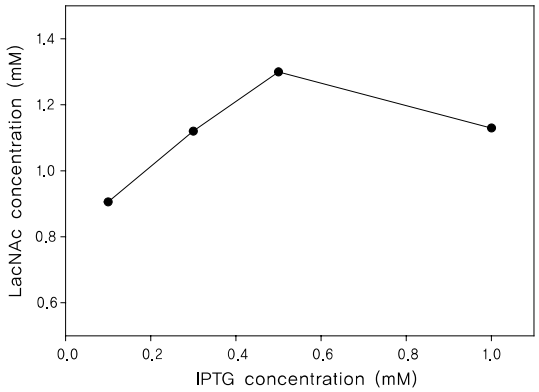

Figure 4. LacNAc production depending on IPTG concentrations. The samples were taken the more 20 h culture after 5 h expression with different IPTG induction, centrifuge cells and resuspend with reaction buffer.

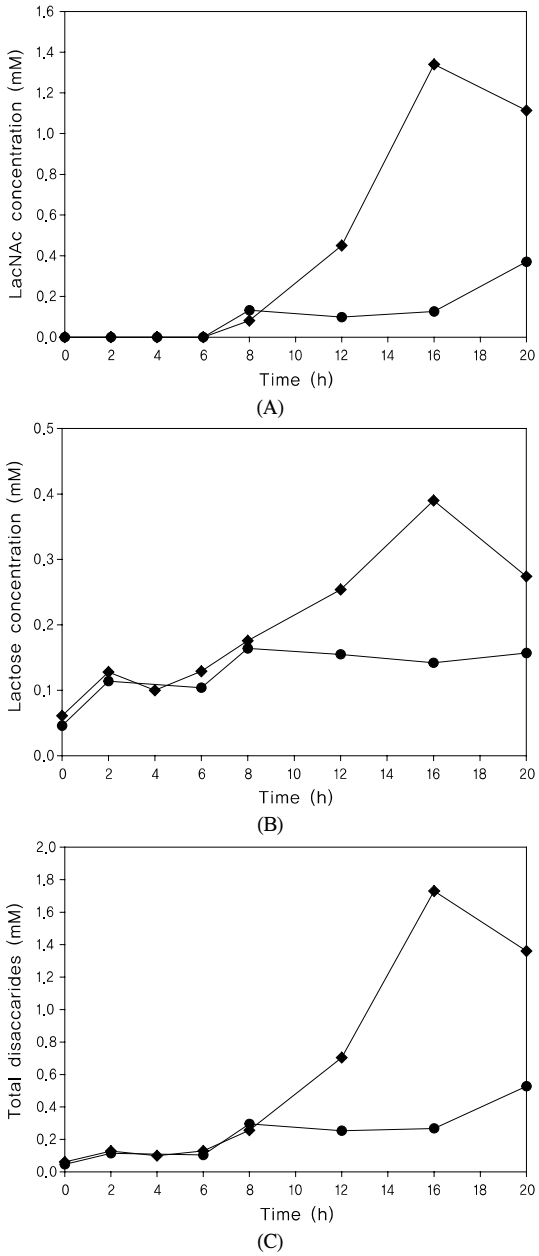

Figure 5. Time course of disaccharide synthesis: (A) LacNAc, (B) Lactose, (C) total disaccharides, (●)AD202/pQE80L, (◆)AD202/pQNGLU.

본 논문에서 metabolic flux regeneration으로 disaccharides 합성을 증가시킬 수 있다는 것을 보여주었다. 이 전략은 또한 다른 oligosaccharides 합성에도 적용시킬 수 있다. 왜냐하면 UDP-glucose는 UDP-galactose나 UDP-glucuronic acid와 같은 다른 UDP-sugars의 starting material 이기 때문이다.

요 약

효율적인 UDP-glucose regeneration system을 구축하기 위해서 재순환 시스템에 관여하는 4가지 효소 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UDP-Kinase gene, UDP-galactose 4-epimerase, and ß-1, 4-galactasyltrasnsferase)들을 *E. coli* AD202에서 발현시켜 Disaccharide 합성 정도를 보았다. Disaccharide는 0.5 mM IPTG 농도에서 가장 높은 농도를 나타내었다. 대조구와 비교한 결과 LacNAc 농도는 1.34 mM로 10배 정도 정가하였고, lactose 농도는 0.39 mM로 대조구보다 2.6배 증가하였다. 총 disaccharide 농도는 1.73 mM 이며, 대조구 보다 6.5배 높은 생산성을 보였다. 본 논문은 결과는 metabolic flux regeneration으로 disaccharides 합성을 증가시킬 수 있다는 것을 보여주었다.

Acknowledgment

이 논문은 2005년도 정부재원 (교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF -2005-214- D00255).

REFERENCES

1. Wong, C.-H. and G. M. Whitesides (1994), Enzymes in Synthetic Organic Chemistry **12**. 1st edition. New York: Oxford.
2. Gabius, H.-J. and S. Gabius (1997), Glycoscience: status and perspectives. Champman and Hall Gmbh. Weinheim, Germany.
3. Flowers, H. M. (1978), Chemical synthesis of oligosaccharides. *Methods Enzymol.* **50**, 93-121.
4. Flitsch, S. L. (2000), Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**(6), 619-625.
5. Koeller, K. M. and C. H. Wong (2000), Complex carbohydrate synthesis tools for glycobiologists: enzyme-based approach and programmable one-pot strategies. *Glycobiology* **10**(11), 1157-1169.
6. Crout, D. H. and G. Vic (1998), Glycosidases and glycosyl transferases in glycoside and oligosaccharide synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**(1), 98-111.
7. Meynial-Salles, I and D. Combes. (1996), In vitro glycosylation of proteins: An enzymatic approach. *J. Biotechnol.* **46**(1), 1-14.
8. Bailey, J. E. (1991), Toward a science of metabolic engineering. Science **252**, 1668-1675.
9. Bettler, E., E. Samain, V. Chazalet, C. Bosso, A. Heyraud, D. H. Joziasse, W. W. Wakarchuk, A. Imberty, and R. A. Geremia. (1999), The living factory : in vivo production of N-acetyllactosamine containing carbohydrates in *E. coli*. *Glycoconjugate J.* **16**, 205-212
10. Endo, T. and S. Koizumi (2000), Large-scale production of oligosaccharides using engineered bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 536–541.
11. Endo, T., S. Koizumi, K. Tabata, S. Kakita, and A. Ozaki. (1999),

Largescale production of N-acetylactosamine through bacterial coupling. *Carbohydrate Res.* **316**, 179–183.
12. Ruffing, A. and R. R. Chen. (2006), Metabolic engineering of microbes for oligosaccharide and polysaccharide synthesis. *Microbial Cell Factories* **5,** 25.
13. Jana, S. and J. K. Deb, (2005), Strategies for efficient production of heterologous proteins in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 289–298.
14. Sorensen, H. P. and K. K. Mortenson. (2005), Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *E. coli*. *J. Biotechnol.* **115**, 113–128.
15. Hokke, C. H., A. Zervosen, L. Ellig, D. H. Joziasse, and D. H. Van den Eijnden. (1996), One-pot enzymatic synthesis of the Gal α13Galβ14GlcNAc sequence with *in situ* UDP-Gal regeneration. *Glycoconj. J.* **13**, 687-692.
16. Ruffing, A., M. Zichao, and R. R. Chen. (2006), Metabolic engineering of *Agrobacterium sp*. for UDP-galactose regeneration and oligosaccharide synthesis. *Metabolic. Eng.* **8**, 465–473.
17. Nakano, H., T. Yamazaki, T. Ikeda, H. Masai, S. Miyataki, and L. Saito. (1994), Purification of glutathione S-transferase fusion proteins as a nondegraded form by using a protease-negative *E. coli* strain, AD202. *Nucleic. Acids. Res*. **22**, 543-544.
18. Rozkov, A. Avignone-rossa, F. ERTL, Jones, D. O'kennedy, J. J. Smith, J. W. Dale, and M. E. Bushell. (2004), Characterization of the Metabolic burden on *Escherichia coli* DH1 cells imposed by the presence of a plasmid containing a gene therapy sequence. *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 909-915.
19. Dave, S.-W. O., P. M. Nissom, R. Philp, S. K.-W. Oh, and M. G.-S. Yap. (2006), Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 during batch fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 391-398.
20. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. (1985), Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.