

# Human Nod1을 자극하는 미생물 유래 Peptidoglycan Fragments의 구조와 합성 연구

## Study for Structures and Synthesis of Human Nod1 Stimulatory Bacterial Peptidoglycan Fragments

이영경 | 공정기술연구단

Young Kyoung Rhee | Processing Technology Research Group

동식물을 망라해서 다세포 개체는 다양한 패턴 인식 수용체(pattern-recognition receptors, PRRs)를 통해 세균 구성요소를 인식하여 활성화되는 선천성 면역계가 존재한다. 선천성 면역계를 작동시키는 PRRs는 현재까지 포유동물에선 toll-like receptors(TLRs), nucleotide-binding oligomerization domain(NOD)-like receptors(NLRs), retinoic acid-inducible gene(RIG)-I-like receptors(RLRs)가 밝혀져 있고 이 수용체들은 세균 표면의 peptidoglycan(PGN)이나 lipopolysaccharides(LPS), lipoteichoic acid 같은 성분을 인식한다(Fig. 1(a), (b)). 2003년에 발표된 일부 논문은 NLRs의 일종인 Nod1과 Nod2와 같은 intracellular receptors로 PGN이 인식된다는 것을 보고했다. PGN을 인식하는 수용체의 단백질은 3가지 주요 domain으로 구성되어 있다. Carboxyl 말단 부위에 있으며, ligand를 인식하는 leucine-rich repeat(LRR) domain, 중심부에 위치하며 self-oligomerization을 촉진하고, ATPase 활성이 있는 NOD domain, amino 말단 부위에 있는 caspase-recruitment domain이 그것이다. 특

히 PGN은 강력한 면역 강화 역할을 하고 항체 생성을 돕는 것으로 알려져 있는 물질이다. PGN은 N-acetylglucosamine(GlcNAc)과 N-acetylmuramic acid(MurNAc) 잔기가 교대로  $\beta$ -1,4 결합된 다당 사슬 구조를 가지고 있고, 이 다당 사슬은 세균 세포벽 구조를 이루고 있는 peptide 망에 연결되어 있다. 보통 peptide 연결 부위에는 L-lysine(보통 Gram+균의 경우에 해당, Fig. 1(c))이나 meso-diaminopimelic acid(meso-DAP)(대부분의 Gram-균 및 일부 Gram+균에 해당, Fig. 1(d)) 같은 diamino acids가 위치한다. 체내의 면역 기능을 활성화시키기 위해 Nod1은  $\gamma$ -D-Glu-meso-diaminopimelic acid(iE-DAP) 같은 DAP-containing fragment를 인식하고, Nod2는 muramyl dipeptide(MDP)(Fig. 1(c), (d))를 인식한다. 이 구조 인식은 실험실에서 화학적으로 합성된 PGN fractions로 확인되었다.

지금껏 여러 연구자들은 Nod1과 Nod2의 유전적 변형이 천식이나 Crohn's disease를 포함한 감염 질환이나 알러지성 질환에 대한 감수성과 연관되어 있음을 밝혀왔다. Nod1의 동질이상(poly-

morphisms)은 어린 시절에 미생물 유래 산물, 천식, 알러지 발생과 역관계를 가지고 있음은 이미 알려져 있다. 세균 침입에 대한 자가포식작용(autophagy response)을 위한 Nod1과 Nod2의 주요 기능은 세균 유입점의 원형질막으로 자가포식 단백질 ATG16L1을 보충하는데 있다는 것이 최근 밝혀졌다. 자가포식 유도 작용은 곤충에서도 iE-DAP 함유 PGN fragments로 확인한 바 있다.

최근 DAP 함유 세균은 주위에 Nod1 ligands를 배출하는 것이 밝혀졌고, 이것은 인체 면역을 영향을 줄 것으로 추측된다. 이런 이유로 본고에서는 대표적인 면역 조절 물질로 알려진 *E. coli* 배양 상등액 유래의 natural human Nod1(hNod1) ligands

의 분리와 구조관련 설명에 대한 최근 연구결과를 요약·정리하고자 한다.

### 세균유래의 Nod1 자극 물질의 구조

DAP-함유 세균은 Nod1 ligands를 주위에 배출시킨다. 다양한 세균의 균체와 배양 상등액은 인체 내 Nod1을 자극하고(Fig. 2) *E. coli*와 *Bacillus* sp. 같은 일부 세균류의 상등액은 균체보다 더욱 강력하게 hNod1을 자극한다. 반대로 hNod2와 TLR4(Fig. 2) ligands의 경우 균체와 비교해 볼 때 상등액에서는 활성이 발견되지 않는다. 이렇듯 보통

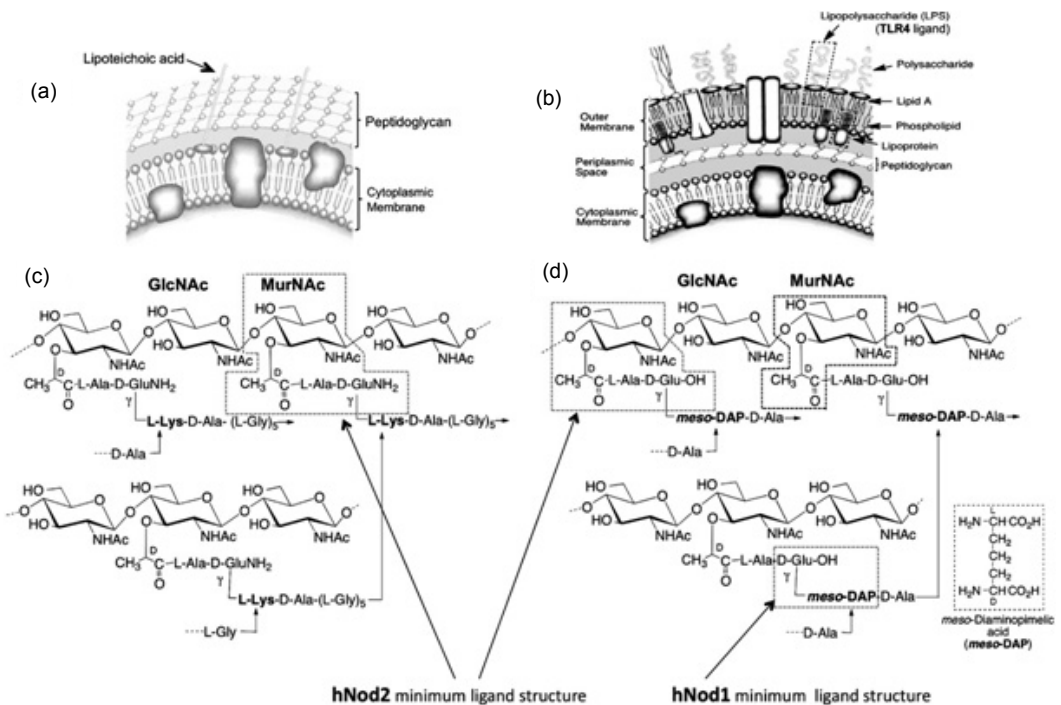


Fig. 1. Bacterial surface structure and peptidoglycan. (a) Gram(+) bacteria, (b) Gram(-) bacteria (c) Staphylococcus aureus (d) *E. coli*

PGN 중의 MDP는 hNod2의 ligand로 알려져 있고, LPS와 친유성(親油性) 말단구조(예를 들어, lipid A)를 포함하는 fragment 구조는 TLR4를 자극하는 것으로 알려져 있다. 또한 Nod1 ligands는 Nods2나 TLR4 ligands에 비해 고압, 산성 또는 염기성 환경 처럼 물리·화학적 스트레스가 많은 조건 중에서도 더 안정하다고 밝혀졌다. 이런 현상은 일반 환경에 존재하는 세균이 Nod1을 통해 숙주의 면역계를 자극하고 결국 일부 환경에서는 알러지로 발전하는 것과 연관되어 있다. 비록 합성 화합물을 이용한 연구에서 hNod1을 자극하는 분자를 인지하기 위해선 그 구조에 iE-DAP를 포함해야한다는 것이 밝혀졌지만, 본 연구팀의 가장 최근 연구 결과에서도 아직 환경 중의 hNod1 ligands 식별에 대해선 설명하지

못하고 있다.

이전의 연구자들은 세포의 생장기 동안 모체 세포벽의 약 60%를 재활용하여 세포벽 성분으로 구성한다고 하였다. 오래된 세포벽이 분해되어 그 fragments가 세포 내로 수송되고 그 구성 성분이 세포벽 생합성에 재이용되는 것이다. 분해성 trans-glycosylases는 이런 재활용 과정에서 세균의 세포벽 분해에 중요한 역할을 하고 이 과정을 통해 *N*-acetyl-1,6-anhydromuramyl[(anh)MurNAc] 부분을 생산한다. 세포벽에서 *N*-acetyl-1,6-anhydromuramyl[(anh)MurNAc] 부분은 1975년 처음 확인되었고 백일해의 원인이 되는 *Bordetella pertussis*에서 발견된 GlcNAc(β1-4)-(anh)MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala(tracheal cytotoxin, TCT)

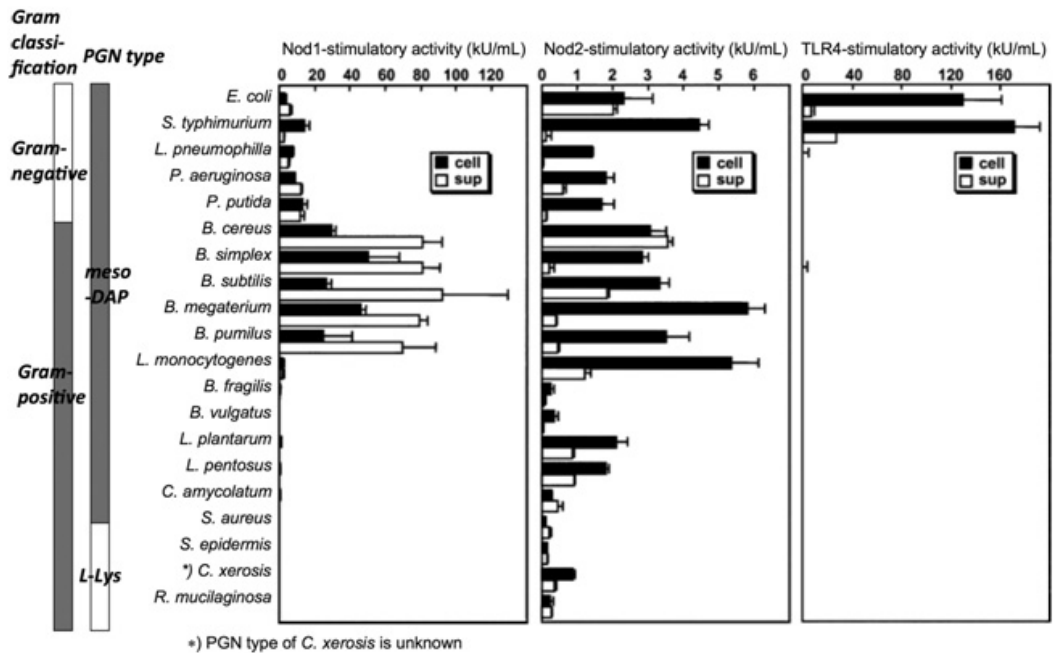


Fig. 2. Human Nod1 and Nod2(receptors of peptidoglycan(PGN)) and TLR4(receptor of lipopolysaccharide (LPS)/lipid A) stimulatory activity in various bacterial cells and culture media.

는 세포벽 재활용 중에 외부로 배출된 fragments로 여겨졌다. 그러나 TCT는 hNod1을 활성화 시키지 않고 오직 murine Nod1(mNod1)만을 활성화 시킨다. 더불어 *N*-acetyl-1,6-anhydromuramyl 부분을 거의 생산하지 않는 것으로 알려진 *sltY*-deficient *E. coli* mutant MHD63(amiA<sup>-</sup>, amiB<sup>-</sup>, amiC<sup>-</sup>)의 배양 상등액은 hNod1 자극을 유도하는 것이 밝혀졌다.

천연의 hNod1 ligands의 분석을 위해 미생물이 hNod ligands를 배양 상등액에 분비하면서도 Nod1 ligands 정제과정을 최대한 단순화시킬 수 있도록 최소한의 무기염류 배지로 배양할 수 있는 *E. coli* K-12 strain을 사용하여 연구가 진행되었다. Nod1

을 자극하는 물질 분획은 Fig. 3의 과정을 거쳐 분리·정제되었다. M9배지에서 *E. coli* K-12를 배양 후, 먼저 open ODS column으로 염류를 제거하고 (desalting), RP-HPLC로 좀 더 정제한다(Fig. 3(a)).

RP-HPLC로 얻어진 분획물로 hNod1과 mNod1 자극 활성이 있는지를 조사하였다. 가장 강력하게 hNod1을 자극하는 분획은 ESIQTOFMS, MS/MS (Fig. 3(b))와 NMR 분석기로 확인되었으며, 수율은 22 L 배양 상등액 중에서 0.15 mg을 얻을 수 있었다. 그 구조는 ESIMS/MS와 NMR 분석기를 통해 DS(anh)-3P(DAP) [GlcNAc-(β1-4)-(anhydro)MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-DAP] 확인되었고, Fig. 3(c)에 제시된 구조를 이루고 있다. DS(anh)-

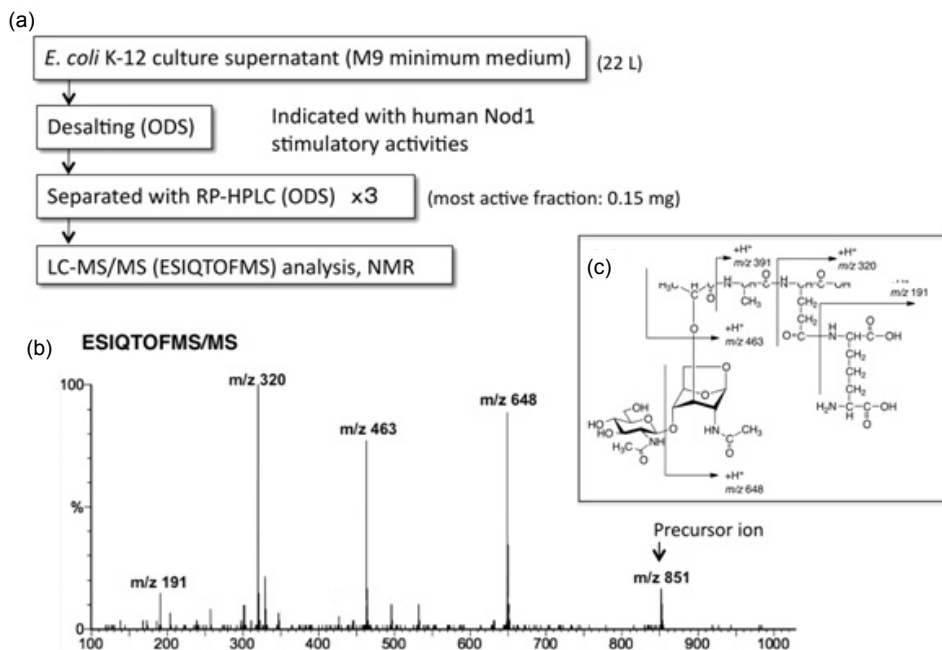


Fig. 3. (a) Isolation of fractions with hNod1 stimulatory activity from *E. coli* K-12 culture supernatant(M9 minimum medium). (b) ESIQTOFMS/MS of the most active fraction from the *E. coli* culture supernatant, (c) MS/MS fragment ion analysis of the most active fraction for human Nod1 stimulatory activity, DS(anh)-3P(DAP), (Pradipta A. R. *et al.* J Biol Chem 2010, **285**, 23607-23613)

3P(DAP)은 mNod1이 아닌 hNod1을 활성화하고, 이 결과는 이전의 연구 결과들과도 일치하였다. *E. coli* 배양 상등액에서의 PGN fragments의 포괄적인 분석을 위해 7-(diethylamino) coumarin-3-carbonyl(DEAC) group으로 fluorescent tag을 달아 MS 분석의 감도를 증가시켰다. DEAC tags는 PGN fragments에서 amides를 생성하기 위한 N-hydroxy-succinimidyl ester 중간 산물을 통해 amino groups에 결합하고, DEAC의 변형 fragments인 DS-4P(DAP), DS(anh)-3P(DAP), MS-5P(DAP), MS(anh)-4P(DAP), MS-3P(DAP)가 ESIMS/MS 분석에서 관찰되었다(Fig. 4). 또한 DS(anh)-4P(DAP)(tracheal cytotoxin)는 특별한 표식 과정 없이도 ESIMS/MS로 확인할 수 있었다.

MS-3P(DAP)나 DS(anh)-3P(DAP)처럼 tripeptide를 포함하는 fragments는 이후에 서술될 합성된 hNod1 ligands를 사용하여 강력한 hNod1 자극 활성이 있다는 것이 입증되었다. 1,6-anhydro- 및 non-anhydro-GlcNAc 부분 모두 활성 분획으로 확인되었고, MurNA를 포함하는 non-anhydro type의 PGN fragments가 배출되었다는 것은 *sltY*-deficient *E. coli* 배양 상등액이 hNod1을 활성화시킨 결과를 설명해준다.

농촌지역과 도시지역의 알러지성 질환 발생 경향은 차이를 나타낸다. 최근 연구에서 어린 시절에 세균 유래의 물질에 노출된 경우, 그 이후 알러지성 감각(allergic sensitization)이 감소한다고 보고되고 있다('hygiene hypothesis'). LPS나 microbial CpG

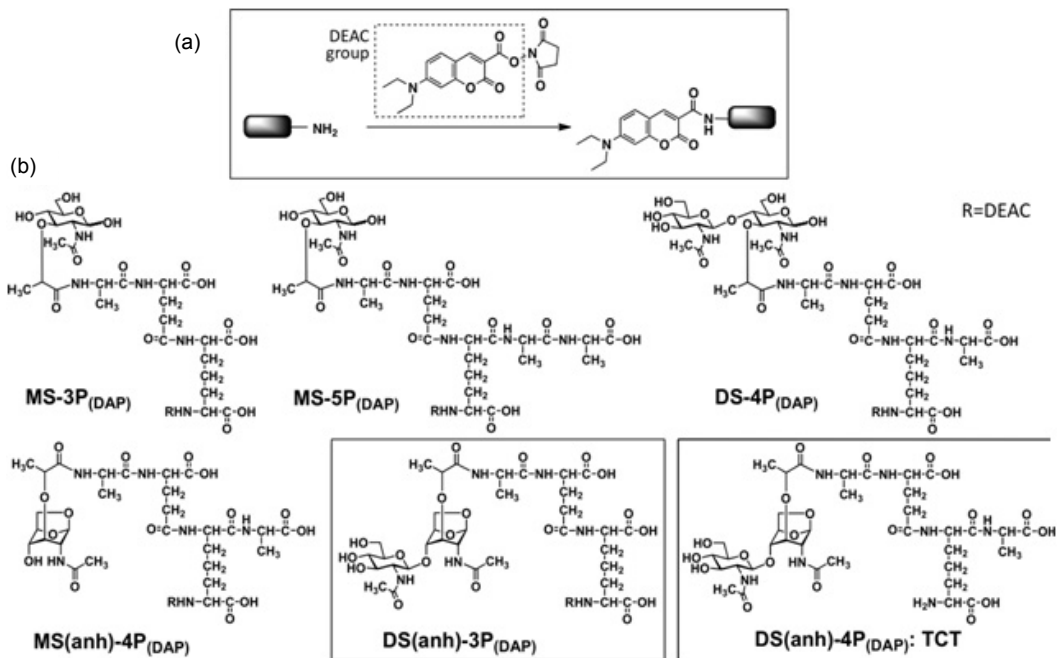


Fig. 4. (a) DEAC labeling reaction of amino groups in the Nod1 stimulatory fraction of the *E. coli* supernatant. (b) Observed peptidoglycan fraction structures from the *E. coli* supernatant with DEAC labeling. DS(anh)-4P(DAP) (TCT) was also observed without labeling.

motifs, 그리고 근래 알려지 예방효과가 있다고 알려진 성분인 *Acinetobacter Iwoffii* 유래 LPS, *Alopecurus pratensis* 유래 arabinogalactan, *Bacillus licheniformis*의 포자를 고려해볼 때, 인체 면역계에 대한 이들의 효과를 조사하기 위해서는 환경 중에 존재하는 hNod1 ligands의 분자 구조를 이해하는 것은 필수적인 일이다.

## PGN fragments를 포함한 MESO-DAP

일반적으로 천연에서 얻을 수 있는 PGN fragments 등을 고순도의 당결합물로 얻는 것은 그 자체의 혼합 특성 때문에 매우 힘들다. 게다가 대량 정제과정에서 다른 면역증강 물질에 오염됐을 가능성을 배제할 수도 없다. 그러므로 면역계 활성화의 핵심 분자 구조를 규명하고, ligands와 수용체의 기능을 조사하기 위하여 DAP나 Lys가 포함된 PGN fragments를 합성하여 사용하고 있다. DAP 구조의

배열에 따른 Nod1 자극 활성의 차이를 조사하고 있다. 조사된 isomers는 *meso*-, (2*S*, 6*S*)-, 및 (2*R*, 6*R*)-, 55의 3가지 DAP isomers와 (2*R*, 6*R*)-, (2*R*, 6*S*)-, (2*S*, 6*R*)-, 및 (2*S*, 6*S*)-DAP(Fig. 5)의 4가지 iE-DAP isomers이다. Natural(2*S*, 6*R*)-*meso*-DAP 구조를 갖는 iE-DAP는 isomerase 중에서 가장 강력한 Nod1 자극 활성을 갖는다. 천연에는 소수 존재하는 (2*S*, 6*S*)-DAP 구조의 경우, 활성은 더 약하지만 확실한 효능을 나타내고, 다른 (2*R*, 6*R*)- 또는 (2*R*, 6*S*)-DAP analogues는 더욱 약한 활성을 갖는다. 이 isomers에 대한 상반된 활성은 관찰되지 않았다. DS-4P-(DAP) (1), TCT (5), 및 기타 fragment 구조의 합성 전략은 Fig. 6에 나타낸 바와 같다.

Monosaccharides DAP-type fragments 및 PGN 중 DAP가 함유되도록 한 peptides 합성을 포함하여 상대적으로 적은 양의 DAP를 함유한 fragments 합성품 이용 연구 후, 연구팀은 DAP-type PGN fragment, tracheal cytotoxin 또는 GlcNAc-(β1-4)-(anh)MurNAc-L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala)를 반복하여 결합한 구조를 최초로 화학적으로 합성

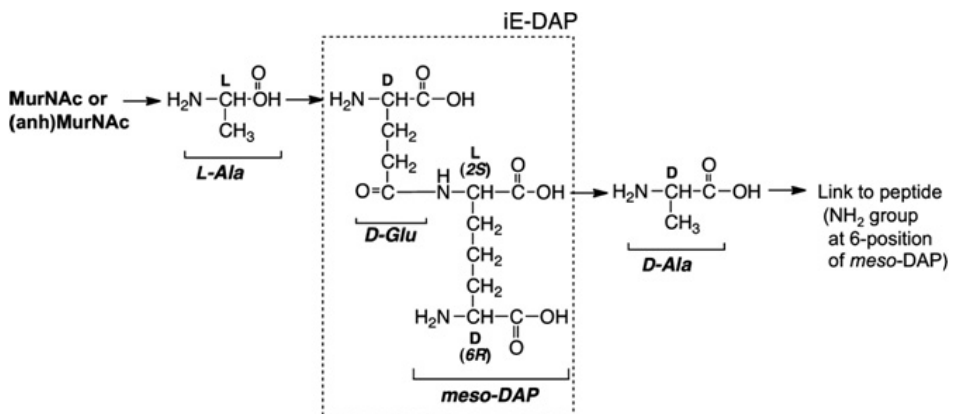


Fig. 5. Peptide moiety of DAP-type peptidoglycan (*Escherichia coli*) and the iE-DAP structure.

하였다. DS-4P(DAP)와 TCT(2-4 및 6-8)의 fragment 구조 또한 같은 방식으로 합성되어졌다(Fig. 6).

Glycan 부분 -14(GlcNTroc(β1-4)MurNTroc) 및 15(GlcNTroc(β1-4)(anh)MurNTroc)을 준비하기 위해, MurNTroc acceptor 9와 GlcNTroc donor 11을 이용하여 14번 화합물을, (anh)MurNTroc acceptor 10 및 GlcNTroc donor 11을 이용하여 15번 화합물을, 0°C에서 Lewis acid trimethylsilyl trifluoromethane sulfonate(TMSOTf)로 활성화시켜 β-결합 선택적으로 당화시켰다. Glycosyl donors 9과 10의 2-위치에서 amino group의 Troc protections은 반응도에, 상호작용에 의해 β-결합 선택적 당화에

효과적인 역할을 한다. 이렇게 얻어진 glycan은 peptides와 중합시킨다. Monosaccharide 12와 13 또한 peptide 부분과의 중합을 통해 monosaccharide fragment 구조 3, 4, 7 및 8의 합성에 사용된다.

직교로 protected *meso*-DAP analogues의 제작에 관해서는 Dzierzbicka에 의해 리뷰된 바 있다. Fig. 5와 같은 TCT를 만들기 위해 양쪽 chiral 중심을 유지하면서 2개의 α-amino acid 유도체(D-serine로부터 유도된 aldehyde(16) sulfone(17))는 Julia-Kochenski 올레핀화 반응을 이용하여 protected *meso*-DAP 전구체 18을 만들기 위해 연결된다. Compound 18은 직교 결합의 protected *meso*-di-

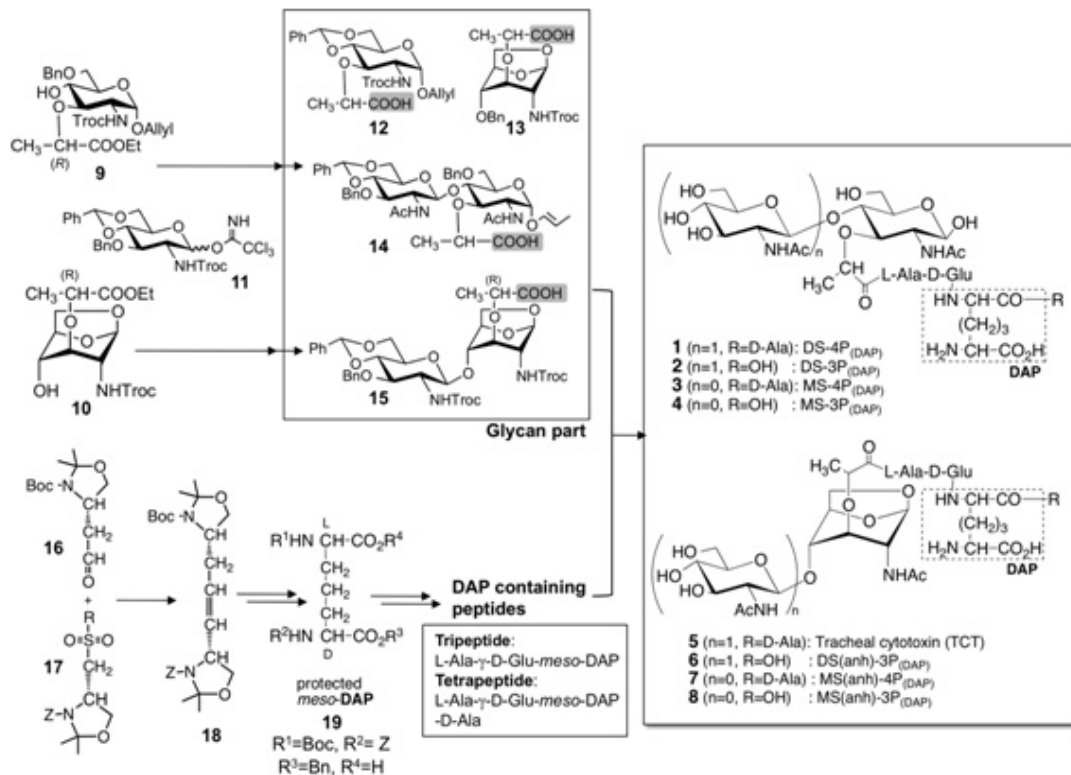


Fig. 6. Synthesis of DAP-type peptidoglycan fragment compounds.

aminopimelic acid 19로 전환되고, tripeptide(L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP)와 tetrapeptide(L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala)가 만들어진다. Glycan 부분의 muramic acid 내 carboxyl group과 peptide 부분의 amine group의 중합과 그 다음으로 진행되는 분리반응으로 인해 최종 목표 화합물인 1~8번이 만들어진다.

GlcNAc-( $\beta$ 1-4)-(anh)MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP-D-Ala-D-Ala의 합성은 세균의 peptidoglycan 재활용 체계에서 효소의 역할을 연구한 Mobashery 연구팀에 의해서도 보고되었다.

## PGN fragments(1-8)의 human Nod1 자극 활성

PGN fragment 1-8(Fig. 6)의 human Nod1 자극 효과는 Nod1 plasmids를 이식한 HEK293T cells

를 사용하여 효능평가를 하였으며, 그 결과를 다음과 같이 보고한 바 있다. Fig. 7에 나타난 바와 같이, anhydromuramic acid [(anh)-MurNAc]를 포함한 화합물인 5(TCT)와 6(DS(anh)-3P(DAP))을 더욱 짧은 peptide chain을 갖는 Fig. 5의 A-iE-DAP(L-alanyl- $\gamma$ -D-glutaminyldiaminopimelic acid)와 iE-DAP( $\gamma$ -D-glutaminyldiaminopimelic acid) 같은 Nod1 ligands와 비교하였다. 이들 화합물 중 5(TCT)만이 human-Nod1을 자극하는 활성이 낮게 나타났으며, 이 결과는 천연물 유래의 TCT를 이용한 연구와 동일한 것이었다. 한편, 6(DS(anh)-3P(DAP))은 A-iE-DAP, iE-DAP, TCT에 비해 그 활성이 매우 높게 나타났다. 이 결과는 *E. coli* 배양 상등액의 활성 분획으로부터 얻은 6(DS(anh)-3P(DAP))의 hNod1 자극 활성이 강하게 나타났다는 연구 결과를 뒷받침 해준다. 이러한 결과는 또한 DAP에 인접한 D-alanine 잔기를 human Nod1이 강하게 인식한다는 것을 보여준다. 그러므로 DAP의 C-2 위치에

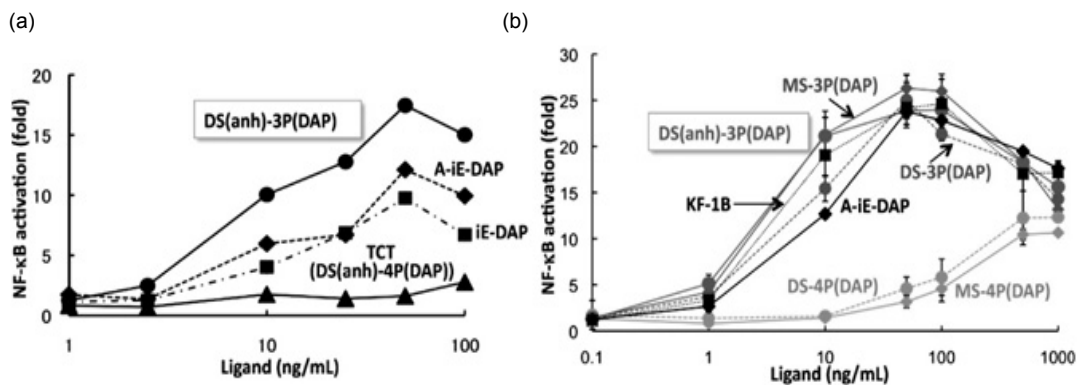


Fig. 7. Stimulation of hNod1 by synthesized PGN fragments.44 (a) iE-DAP( $\gamma$ -D-glutaminyldiaminopimelic acid), A-iE-DAP L-alanyl- $\gamma$ -D-glutaminyldiaminopimelic acid), 5(TCT), and 6(DS(anh)-3PDAP). (b) 1-5. HEK293T cells were transfected with human-Nod1, the indicated amount of each compound was added to the cells, and the ability of each compound to activate NF- $\kappa$ B was determined by a luciferase reporter assay.



free carboxyl group을 갖는다는 것은 hNod1로 인식하는데 유리하다.

또한 PGN fragments인 1(DS-4P(DAP)), 2(DS-3P(DAP)), 3(MS-4P(DAP)), 4(MS-3P(DAP))의 Nod1 자극 활성을 anhydro-MurNAc-containing 6(DS(anh)-3P(DAP)), A-iE-DAP, 그리고 잘 알려진 강력한 ligand C14-iE-DAP(KF1B; *N*-myristoyl-iE-DAP)와 비교 연구하였다(Fig. 7(b)). 이 결과들은 peptide 구조에 의해 나타나는 활성과 유사한 경향을 보여준다. Tripeptide 화합물인 2와 4는 tetrapeptide 화합물인 1과 3 보다 더욱 강력하게 human Nod1을 자극하였다. 이 결과는 Nod1에 인식되기 위해서는 iE-DAP의 N-말단의 치환이 필요하다는 것을 제시하고 있으나 치환된 구조가 정확히 인식되는 것 같지는 않다. hNod1을 자극하기 위한 DAP 중 C-2 위치의 carboxyl group의 중요성 또한 이 결과로 알 수 있다. 이전에 보고된 결과에서 3(MS-4P(DAP))와 4(MS-3P(DAP))는 5 mM의 고농도에서 human Nod1을 자극하는 효과가 유사하게 나타났고, Fig. 7(b)에 나타난 것과 같이 1,000 ng/ml(1.4~1.6 mM) 이상의 고농도에서 3(MS-4P(DAP))와 4(MS-3P(DAP))는 유사한 자극활성을 보였다. 그러나 세세한 hNod1 자극활성이 상대적으로 낮은 농도라고 할 수 있는 0.1~100 ng/ml에서 나타났고 이 농도대에서 PGN fragments 중 4(MS-3P(DAP))가 가장 강력한 활성을, 3(MS-4P(DAP))에 비해서도 더 높은 활성을 보였다. 4(MS-3P(DAP))의 hNod1 활성화 효과는 6(DS(anh)-3P(DAP))와 C14-iE-DAP(KF1B)와 유사한 정도로 높았다.

실험실에서 합성된 DAP-type PGN fragments의 hNod1 자극활성은 화합물의 구조에 따라 고유의 생물학적 활성을 명백하게 보여주며, 세균 배양 상

등액으로부터 분리한 천연 화합물의 활성과 일치하는 결과를 나타낸다.

## 결론

DAP-type의 PGN을 가진 세균은 *E. coli* K-12 배양 상등액 중의 DS(anh)-3P(DAP)로 확인된 구조물과 같은 Nod1 ligands를 주위에 유리시키며, 동시에 다른 PGN fragments도 유리시킨다. 그 구조적 특성은 mass spectrometry 분석의 감도를 높인 DEAC-labeling법을 사용하여 확인하였다. *E. coli* PGN과 TCT의 반복 units을 최초로 총 합성한 것을 포함하여 DAP-type fragment 구조는 실험실에서 합성하였다. 직교된 protected *meso*-DAP를 만드는 새로운 방법을 토대로 합성하였으며, 효과적인 β-결합 선택성 당결합의 결과로 만들어졌다. 그 구조를 해석하기 위해 합성된 화합물은 천연물 유래 구조물과 비교하였다. 그 구조가 확인된 합성 화합물의 hNod1 자극 활성의 결과를 살펴보면, DS(anh)-3P(DAP) 구조는 PGN fragments 중 hNod1을 가장 크게 자극하는 화합물로 나타났고, tripeptide (L-Ala-γ-D-Glu-*meso*-DAP) fragment를 가진 다른 당단백질보다 강력한 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이처럼 주위에 존재하는 안정한 hNod1 ligand 구조에 대한 조명은 인체 면역에 영향을 주고 조절하는 핵심 분자의 더 나은 이해로 이어질 것이다.

## ● 자료출처 ●

Fujimoto Y, Fukase K. Structures, Synthesis, and

Human Nod1 Stimulation of Immunostimulatory Bacterial Peptidoglycan Fragments in the Environment, J Nat Prod, **74**, 518-525, 2011

**이 영 경** 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 공정기술연구단

전문분야 : 미생물, 발효

E-mail : ykrhee@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9319

본 내용은 자료 출처의 원문을 번역 기술한 것입니다.