Homology Modeling and Active Sites of PolyMG-specific Alginate Lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2

Hee Sook Kim*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsoo University, Busan 608-736, Korea

Received December 12, 2013 / Revised January 20, 2014 / Accepted January 23, 2014

Alginates are linear acidic polysaccharides composed with (1-4)-linked α -L-guluronic acid and β -D-mannuronic acid. Alginate can be degraded by diverse alginate lyases, which cleave the alginate using a β -elimination reaction and produce unsaturated uronate oligomers. A gene for a polyMG-specific alginate lyase possessing a novel structure was previously identified and cloned from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2. Homology modeling of KJ-2 polyMG-specific alginate lyase showed it belongs to the PL6 family, whereas three *Azotobacter vinelandii* polyMG lyases belong to the PL7 family of polysaccharide lyases. From $^1\text{H-NMR}$ spectra data, KJ-2 polyMG lyase preferably degraded the M- β (1-4)-G glycosidic bond than the G- α (1-4)-M glycosidic bond. Seventeen mutants were made by site-directed mutagenesis, and alginate lyase activity was analyzed. Lys220Ala, Arg241Ala, Arg241Lys, and Arg265Ala lost alginate lyase activity completely. Arg155Ala, Gly303Glu, and Tyr304Phe also lost the activity by 60.7-80.1%. These results show that Arg155, Lys220, Arg241, Arg265, Gly303, and Tyr304 are important residues for catalytic activity and substrate binding.

Key words : Alginate, alginate lyase, polyMG-specific alginate lyase, homology modeling, site-directed mutagenesis

서 론

해조류 중 갈조류(Phaeophyceae)에는 다시마목(Laminariales), 모자반목(Fucales), 솜털목(Ectocarpales) 등 19종의 목으로 분류되며 그 중, 다시마목에는 Macrocystis속, Laminaria속 및 Undaria속들이 있고, 모자반목에는 Sargassum속 및 Ascophyllum속 등이 있다. 해조류 중 갈조류는 거대조류로서 바이오에탄올로 전환되기 쉬운 laminaran (glucan의 일종)과 mannitol을 함유하고 있으며 그 외에 알긴산, cellulose 및 fucoidan 등은 세포벽 matrix를 이루는 주된 성분이다[6, 27, 31]. 알긴산은 갈조류 건조구성물의 14-37% 차지하며 신재생 바이오에너지를 생산하기 위한 연구들이 진행되고 있다[3, 5, 25, 30]. 해조류 유래 알긴산은 β -D-mannuronate (M) 및 α -L-guluronate (G) 가 α (1-4) 또는 β (1-4) 결합을 한 선형 산성다당류이다(Fig. 1)[7, 9, 12]. 알긴산을 바이오에탄올로 전환시키기 위해서는 먼저 당화시켜야 하며 산가수분해 또는 효소분해가 필요하다. 알긴산을 탄소원으로 사용하는 미생물들은 여러 종류의 알긴산 분해효소들(alginate lyase)을 가지며 이 효소들은

당과 당 사이 결합부분을 β -제거반응으로 분해하는 반응을 촉매하고 비환원 말단에 이중결합을 가진 불포화된 당을 생성한다[1, 4, 16]. PolyM block을 분해하는 polyM-specific lyase (EC 4.2.2.3), polyG block을 분해하는 polyG-specific lyase (EC 4.2.2.11) 및 올리고 알긴산의 비환원 말단부터 불포화우론산 단당체로 분해하는 oligoalginate lyase (EC 4.2.2.-)들이 클로닝되어 특성이 보고되었으며[10, 13, 17, 22, 23] 본 실험실에서 polyMG block을 분해하는 polyMG-specific lyase (EC 4.2.2.-, AFC88009)를 보고한 바 있다[18]. CAZy (Carbohydrate-active enzyme, <http://www.cazy.org/>) 데이터베이스에서는 다당류 분해효소류(polysaccharide lyases family, PLs family)의 구조를 촉매자리와 탄수화물 결합모듈을 토대로 23 종류로 분류하고 있으며, 알긴산 내부분해효소들은 주로 PL5 family ((α/α)6 barrel), PL6 family (parallel β -helix) 또는 PL7 family (β -jelly roll)에 속하며, 알긴산 외부분해효소들은 PL15 family (α /alpha-barrel + anti-parallel beta-sheet) 또는 PL21 family (N-terminal alpha-helical domain, a central two-layered beta-sheet domain, and a C-terminal domain forming a two-layered beta-sheet)에 속하는 것으로 알려져 있다[19].

본 연구에서는 *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 균주의 polyMG-specific lyase가 D-mannuronate- β (1-4)-L-guluronate 결합과 L-guluronate- α (1-4)-D-mannuronate 결합 중 어느 결합에 특이적인지 알기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ spectra를 측정, 분석하였으며 homology-modeling을 이용한 분자구조 예측 및 site-directed mutagenesis 방법을 이용한 효소활성자리를 예측하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4713, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : hskim@ks.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. The chemical composition of guluronate and mannuronate of used substrates

Designation	F _G	F _M	F _{GG}	F _{GM, MG}	F _{MM}	F _{GGM}	F _{MGM}	F _{GGM}	DP _n ^a
Alginate	0.38	0.62	0.11	0.27	0.35	0.06	0.21	0.05	30-40 ^b
PolyG	0.87	0.13	0.87	0.01	0.11	0.01	0.01	0.86	19
PolyM	0.11	0.89	0.01	0.10	0.79	0.01	0.09	0.00	19
PolyMG	0.42	0.58	0.02	0.41	0.16	0.02	0.36	0.00	23

^aDP_n indicates the average degree of polymerization.

^bAlginate (cps=3,500) was degraded to a DP_n = 30-40 by mild acid hydrolysis [2].

재료 및 방법

효소 및 시약

기질로 사용한 알긴산(3500 cps)은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며 polyM block, polyG block 및 polyMG block은 Haug 등의 방법[11]에 따라 준비하였고 각각의 구성성분은 Table 1과 같았다. 단백질을 정제하기 위한 Ni-Sepharose는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)에서, HiTrap desalting column은 GE Healthcare Bio-sciences 사(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. Site-directed mutagenesis kit는 Stratagene 제품(Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며 plasmid 정제 kit는 GeneAll 제품(Seoul, Korea)을 사용하였다. NMR 시료를 용해시키는 D₂O 및 내부표준 시약인 TMSP (0.75% 3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d₄ acid, sodium salt in D₂O)는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

PolyMG lyase에 의하여 분해된 polyMG 분해물 생성 및 FPLC 분석

본 연구에서 사용된 알긴산 분해효소는 이전에 클로닝하였던 *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2의 polyMG lyase를 사용하였다[18]. 먼저 pET21b/KJ-2_alyMG plasmid DNA를 가지는 *E. coli* BL21(DE3) 균주를 ampicillin 함유 LB배지에 배양하고 OD값이 0.4-0.6이 되었을 때 IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 24시간 뒤 세포를 파쇄하고 Ni-sepharose column으로 정제, 탈염한 다음 여러 개의 vial에 200 µg 효소단백질 용액을 나누어 넣고 동결건조한 다음 4°C에 저장하여 두고 실험에 사용하였다. 기질로 사용한 polyMG block은 sodium alginate를 Haug 등 방법[11]에 따라 산 가수분해하여 얻은 다음 동결건조하고 D₂O로 녹인 다음 다시 동결건조하여 사용하였다. D₂O를 이용하여 1% polyMG 기질용액으로 만들었다. D₂O에 녹인 1% polyMG 기질 용액을 800 µl씩 동결건조된 KJ-2 polyMG lyase가 들어있는 microtube에 넣은 다음 40°C에서 반응시키면서 지정된 시간에 꺼내어 끓인 다음 원심분리하여 NMR 시료로 하였다. 또한 polyMG block 분해물은 Superdex peptide column 100/300 GL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)과 235 nm 검출기를 장착시킨 FPLC를 사용하여 분해정도를 분석하였다.

PolyMG block 효소분해물의 1H-NMR spectra 분석

¹H-NMR 분석을 위한 시료의 준비는 Kam 등의 방법[15]에 따랐다. 400 Hz ¹H-NMR spectroscopy (ECX-NMR, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였으며 NMR 스펙트럼은 Grasdalen [9] 및 Zhang 등[33]의 방법에 따라 해석하였다. 시간별 효소반응액 800 µl에 내부표준물질인 TMSP (0.75% 3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteriopropionic acid, Na salt) 10 µl를 가하여 측정하였으며 data 수집은 80°C에서 행하였다. 시료의 spinning, proton spectral width, scan 횟수, relaxation delay, proton pulse angle, 및 data 수집시간 등은 각각 15 Hz, -5~15 ppm, 64, 5 s, 90°, 및 4.098 s 이었다.

KJ-2 polyMG lyase 단백질의 상동성 모델

발현된 KJ-2 polyMG lyase 단백질(GenBank accession No. AFC88010)[18]의 3-D 입체구조를 예측하기 위하여 Swiss-Model workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>) 및 Modeller 7v7 program (<http://salilab.org/modeller/>)을 사용하였다. 상동성 모델링의 주형으로는 *Pedobacter heparinus*로부터 얻은 chondroitinase B의 X-ray 결정구조(pdb code: 1ofl)를 사용하였다. Chondroitinase B 결정구조 위에 KJ-2 polyMG lyase 모델을 겹치고 활성부위를 구성하는 아미노산 잔기를 나타내기 위하여 Python Molecule Viewer (PMV version 1.5.4, <http://mgltos.scripps.edu/>)를 사용하였다.

PolyMG lyase의 활성부위를 찾기 위한 site-directed mutagenesis

Pedobacter heparinus chondroitinase B 아미노산 서열(1ofl)과 KJ-2 polyMG lyase의 아미노산 서열(AFC88009)을 PSI-blastp 방법을 이용하여 정렬하고 chondroitinase B 결정구조와 KJ-2 polyMG lyase 모델을 겹쳐봄으로써 active site를 추정하였으며 돌연변이시킬 목적 아미노산들로 지정하였다. PCR 기술을 이용하여 polyMG lyase를 돌연변이시켰으며 사용한 primer들의 염기서열은 Table 2와 같았다. pET21b 발현vector에 돌연변이 효소유전자들을 삽입한 뒤, 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환시키고 0.7 mM IPTG를 이용하여 단백질을 과발현시켰다. 원심분리한 균에 lysozyme 용액(10 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)를 가하여 -70°C 냉동고에 얼렸다 녹였다를 반복하여 cell lysate를 얻었다. Cell lysate들에 돌연

Table 2. Mutation sites and primer sequences for site-directed of polyMG-specific lyase from *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2

Primer	Direction	5' - oligonucleotide sequence - 3'
Val152Arg	forward reverse	CAACGCGGGGCCCCACCGT <u>GCG</u> CGTAGTGCGCGATGTCACGC GCGTGACATCGCGCACTAC <u>GCG</u> CACGGTGGGCCCCGCGTTG
Arg155Ala	forward reverse	CCACCGTGGTGGTAGTG <u>GCC</u> GATGCCACGCAGGGCC GGCCCTGCGTGGCATCG <u>GCC</u> ACTACCACCACGGTGG
Asn181Ala	forward reverse	CACGCCCTGCGCTGGGCGT <u>CGCC</u> GGCGGTGAAACCTCCGCATC GATGCGGAGGGTTTCACCGCC <u>GCG</u> ACGCCAGCGCAGGGCGTG
Lys220Ala	forward reverse	GAAACCGAGATCATCAGCAGCGCATCCGGGGGCAACACCTATCGC GCGATAGGTGTTGCCCCCGGAT <u>GCG</u> CTGCTGATGATCTCGGTTTC
Lys220Arg	forward reverse	GAAACCGAGATCATCAGCAGCGCTCCGGGGGCAACACCTATCGC GCGATAGGTGTTGCCCCCGGAG <u>CGG</u> CTGCTGATGATCTCGGTTTC
Arg241Ala	forward reverse	TCTGCCGGCGCACTCACA <u>CTG</u> GGCCATGGCAACGGCAACCGGGTG CACCCGTTGCCGTTGCCATGGG <u>CC</u> AGTGTGAGTGCGCCGGCAGA
Arg241Lys	forward reverse	TCTGCCGGCGCACTCACA <u>CTG</u> AAACATGGCAACGGCAACCGGGTG CACCCGTTGCCGTTGCCATGTTT <u>CAG</u> TGTGAGTGCGCCGGCAGA
His242Ala	forward reverse	GCGCACTCACA <u>CTG</u> CGCGCTGGCAACGGCAACCGGG CCCGGTTGCCGTTGCCA <u>GCG</u> CGCAGTGTGAGTGCGC
Asn244Ala	forward reverse	CACTCACA <u>CTG</u> CGCCATGGCGCCGGCAACCGGGTGATCGAC GTCGATCACCCGTTGCCG <u>GCG</u> CCATGGCGCAGTGTGAGTG
Arg265Ala	forward reverse	GGCCGGCACCGGGGGCGTG <u>GCC</u> ATCATCAACGGCGACCAG CTGGTCGCCGTTGATGATG <u>GCC</u> ACGCCCCCGGTGCCGGCC
Arg265Lys	forward reverse	CAAGGCCGGCACCGGGGGCGTGAAATCATCAACGGCGACCAGATC GATCTGGTCGCCGTTGATGATTTT <u>CAC</u> GCCCCCGGTGCCGGCCTTG
Asn268Ala	forward reverse	CGTGCGCATCATCGCCGGCGACCAGAT ATCTGGTCGCCG <u>GCG</u> GATGATGCGCACG
Asn268Asp	forward reverse	CGGGGGCGTGCGCATCATCAAGGGCGACCAGATCGTCAGCA TGCTGACGATCTGGTCGCC <u>TGG</u> ATGATGCGCACGCCCCCG
Gly303Glu	forward reverse	ATCCCCGCTGTCCGAATACGCACCGGTAGTG CACTACCGGTGCGTAATCGGACAGCGGGGGAT
Tyr304Phe	forward reverse	CCCCGCTGTCCGTTTTCGCACCGGTAGTGAAT ATCACTACCGGTGCGAAACCGGACAGCGGGG
His329Ala	forward reverse	GATCAGCTTCGGCGTGGGCGCTGATGAAGCCAAGGGCATCGTG CACGATGCCCTTGGCTTCATCAGCGCCACGCCGAAGCTGATC
Lys333Ala	forward reverse	CGTGGGCCATGATGAAGCCGCGGGCATCGTGGTGGCCGCC GGCGGCCACCACGATGCCCGCGGCTTCATCATGGCCACG

Val152Arg means that valine residue on the 152nd amino acid sequence was changed to arginine residue. Underlined letters indicate the replaced nucleotide bases.

변이된 효소단백질이 함유되어 있는지 SDS-PAGE 전기이동 법으로 확인하였으며 alginate lyase 활성은 β -제거반응에 의하여 생성되는 비환원말단의 이중결합을 TBA method [26]로 확인하였다. KJ-2 polyMG lyase 효소활성에 사용된 기질은 PolyM, polyG 및 polyMG block이며 그 구성은 Table 1에 나타난 바와 같다.

결과 및 고찰

PolyMG lyase에 의하여 분해된 polyMG block의 ¹H-NMR spectra의 분석

해조류의 알긴산은 Fig. 1에서와 같이 D-mannuronate가 약

20개 정도 β (1-4) 결합한 polyM block, L-guluronate가 약 20개 정도 α (1-4) 결합한 polyG block 그리고 D-mannuronate와 L-guluronate가 MGMGMGMM과 같이 무작위적으로 결합되어 있는 polyMG block으로 구성되어 있다[9, 11]. *Sphingomonas* sp. A1 및 *Pseudomonas* sp. KS-408 균주의 polyM lyase는 M-M 및 M-G 결합을 분해하여 β (1-4) 결합에 특이적인 효소로 보고되었다[15, 32]. 반면 *Corynebacterium* sp. Aly1 및 *Streptomyces* sp. Alg5 균주의 polyG lyase는 G-G 및 G-M 결합을 분해하여 α (1-4) 결합에 특이적인 효소이다[17, 22]. Momma 등[21]이 보고한 *Sphingomonas* sp. A1의 알긴산 분해효소 관련 gene cluster를 보면 polyM lyase, polyG lyase 및 oligoalginate lyase 유전자를 가지고 있는 반면, *Stenotrophomonas mal-*

Fig. 1. Schematic diagram of diverse endolytic cleavage by alginate lyases. Alginate is a linear polysaccharide which β -D-mannuronate (M) and its epimer, α -L-guluronate (G), are covalently (1-4)-linked. Upward arrows mean cleavage sites by substrate specific alginate lyases.

trophilia 균주들의 genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>)을 구성하는 유전자들을 분석한 결과 polyM lyase 및 oligoalginate lyase와 단백질서열이 상동성이 있는 유전자만을 가지고 있었다. 그러나 본 연구실에서 분리한 *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 균주로부터 얻은 알긴산 분해효소는 polyM block (9.5%) 또는 polyG block (8.7%) 보다는 polyMG block (100%)에 기질특이성이 있어 polyMG lyase라고 이름

을 붙였다[18]. PolyMG block 중 M- β (1-4)-G를 분해하는지 G- α (1-4)-M을 분해하는지 알아보기 위하여 KJ-2 polyMG lyase를 기질인 polyMG 용액에 넣고 지정된 시간동안 반응을 시킨 후 ^1H -NMR spectra를 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 기질로 사용한 polyMG block의 NMR 분석 결과는 Table 1에와 같이 GG fraction 2%, MM fraction 16% 및 MG+GM fraction 82%를 함유하고 있었다. KJ-2 lyase에 의한 polyMG

Fig. 2. ^1H -NMR spectra of time dependent substrate degradation by KJ-2 polyMG-specific lyase. Each 800 μl 1% polyMG block solution in D_2O was added to lyophilized enzyme in each vial and incubated at 40°C . After incubation for indicated time, reaction mixture was boiled to remove the activity and moved into NMR tube. The signals originated from the underlined residue. The numbers denote proton causing the signal. M or G without underline indicates neighbor residue.

block 분해물의 NMR spectra를 보면 $\underline{M}$ -1-M peak (4.67 ppm)는 거의 감소하지 않았으며 $\underline{GG}$ -5-M peak (4.78 ppm) 역시 거의 감소하지 않아 KJ-2 polyMG lyase는 M - β (1-4)- M 및 G - α (1-4)- M 결합을 분해하지 않는 것으로 보인다. PolyMG block의 내부에 있는 $\underline{G}$ -1 peak (5.07 ppm)이 감소한 이유는 G 앞에 있는 결합의 β -제거 반응에 의해 불포화 비환원말단(Δ)이 되었기 때문이며 그 대신 $\underline{\Delta}$ -4-G (5.85 ppm), $\underline{\Delta}$ -1-G (5.82-5.76 ppm), $\underline{\Delta}$ -1-M (5.25-5.22 ppm) 및 $\underline{\Delta}$ -4-M (5.17 ppm) peak들이 증가한 것으로 설명할 수 있다. 4.74 ppm의 $\underline{MG}$ -5-M peak가 거의 모두 사라졌는데 이는 M - β (1-4)- G 결합이 분해되어 환원말단이 M ($M_{red\beta}$, 4.90 ppm 및 $M_{red\alpha}$, 5.25-5.22 ppm)인 올리고머와 비환원말단이 $\underline{\Delta}$ ($\underline{\Delta}$ -1-M, 5.25-5.22 ppm 및 $\underline{\Delta}$ -4-M, 5.17 ppm)인 올리고머가 생성된 때문이다. 또한 기질의 분해가 끝난 16시간 후 생성물의 경우를 보면 4.71 ppm의

$\underline{M}$ -1-G peak가 어느 정도 남아 있고 4.87-4.87 ppm의 $G_{red\beta}$ peak의 증가가 거의 없는 것을 보아 KJ-2 polyMG lyase는 M - β (1-4)- G 결합은 분해했지만 G - α (1-4)- M 결합은 분해하지 못하였음을 알 수 있었다. 토양 박테리아인 *Azotobacter vinelandii*는 M 과 G 를 함유하는 아세틸알긴산을 생산하는 균주로 먼저 mannuronan을 생산한 다음 C-5-epimerase를 이용하여 mannuronan을 구성하는 M 의 일부분을 G 로 전환시키며 세 종류(AlyA1, AlyA2 및 AlyA3)의 polyMG lyase를 가진다고 하였다[8]. PolyMG block을 기질로 사용하여 *A. vinelandii*의 polyMG lyase를 반응시키고 1H -NMR로 분석한 결과 KJ-2 polyMG lyase와 달리 AlyA1, AlyA2 및 AlyA3 모두가 $G_{red\beta}$ peak는 증가하는 반면 $M_{red\beta}$ peak는 거의 보이지 않아 M - β (1-4)- G 결합보다는 G - α (1-4)- M 결합을 분해하는 효소라고 보고하였다[8].

Fig. 3. Homology modeling of KJ-2 polyMG lyase based on crystal structure of chondroitinase B from *Pedobacter heparinus*. A: crystal structure of chondroitinase B (1ofl.pdb), B: homology model of KJ-2 polyMG lyase by using Modeller 7v7 program, C: superimposed KJ-2 polyMG lyase model on the crystal structure of chondroitinase B, D: active sites and substrate binding sites of chondroitinase B, and E: proposed active sites of KJ-2 polyMG lyase.

KJ-2 polyMG lyase의 상동성 모델 및 활성자리 예측

KJ-2 polyMG lyase 단백질의 3차 입체구조를 예측하기 위하여 *P. heparinus*의 chondroitinase B 결정구조(1ofl.pdb, Fig. 3A)[20]를 기질로 하여 상동성 모델링을 한 결과는 Fig. 3B와 같았다. PolyMG lyase의 단백질 서열을 SwissModel Workspace에서 3-D 입체구조 자동예측장치로 예측하였을 때 *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase AlgE의 A-module (pdb code: 2pyh)[24]과 12.7% 상동성을 가지는 것으로 나타났으며 PL 6 family인 right handed β -helix구조를 가지는 것으로 예측되었으나 AlgE의 활성자리와 polyMG lyase의 활성자리가 겹치지 않았으며 또한 polyM block에 KJ-2 polyMG lyase를 반응시켰을 때 mannuronate를 guluronate로 이성화시키는 epimerase 활성을 나타내지 않았다 (data not shown). KJ-2 polyMG lyase 단백질 서열을 결정구조가 보고된 *P. heparinus*의 chondroitinase B 단백질 서열과 PSI-blastp 하였을 때 Fig. 4와 같이 454개의 아미노산 서열 중 18-345 아미노산 서열만이 이중정렬되었다. 이중정렬된 서열을 이용하여 Modeller 7v7 program에서 상동성 모델링을 한 결과 Fig. 3B와 같은 모델을 얻었으며 주형으로 삼은 chondroitinase B와 겹쳐보았을 때 Fig. 3C와 같이 N-terminal과 C-terminal의 α -helix를 제외(blastp가 안된 부분)한 모든 부분이 잘 겹쳐지는 것을 알 수 있었다(Fig. 3D, Fig. 3E). PolyMG lyase의 Asn181, Glu213, Glu215, Lys220, His242, 및 Arg241잔기들의 측쇄가 chondroitinase B의 활성자리 및 기질 결합부위인 Asn213, Glu243, Glu245, Lys250, His272 및 Arg271 잔기의 측쇄들과 겹치는 것을 관찰할 수 있었으며 chondroitinase B의 Arg184, Glu333 및 Arg364에 해당하는 아미노산 잔기는 없었으나 polyMG lyase의 상동성 모델을

볼 때 단백질 표면에 존재하는 Arg155, Tyr304 및 Lys333잔기들이 활성자리 또는 기질결합에 관여할 것으로 생각되었다. 이제까지 보고된 알긴산 분해효소들을 살펴보면 polyM lyase는 주로 (α/α)6 barrel 구조를 가지는 PL5 family에 속하며 Asn, His, Arg 및 Tyr 이 활성자리이고 그 중 Asn, His 및 Tyr이 catalytic triad로 작용한다고 하였다[32]. 반면 polyG lyase는 주로 β -jelly roll 구조를 가지는 PL7 family에 속하며 Gln, His, Arg 및 Tyr 잔기가 활성자리이고 그 중 Gln, His 및 Tyr 잔기가 catalytic triad로 작용한다고 하였으며[29], 몇몇 알긴산 분해효소들, 즉, *P. aeruginosa*의 PA1167 단백질[28] 및 *A. vinelandii*의 polyMG lyase 단백질들[8]은 PL7 family 이면서도 polyM lyase 활성 또는 polyMG lyase 활성을 나타내기도 하였다. 이와 같이 이제까지 보고된 알긴산 분해효소들은 Asn 또는 Gln과 같이 amide 측쇄를 가진 아미노산과 함께 His, Arg 및 Tyr이 활성자리를 구성하고 있었다[15, 29, 32]. 그러나 Fig. 3B에서와 같이 예측된 KJ-2 lyase는 PL6 family에 속하는 chondroitinase B의 결정구조와 비슷한 parallel β -helix 구조로서 이제까지 보고된 polyM lyase 및 polyG lyase의 구조와는 다르며 Ca^{2+} 이온을 가지는 metalloprotein 으로서 Arg 및 Lys 같은 염기성 아미노산이 풍부하여 산성다당류인 알긴산 기질의 카복실 음이온과 결합하는데 관여할 것으로 생각된다.

Site-directed mutagenesis를 이용한 polyMG lyase mutant들의 효소활성

KJ-2 lyase 단백질의 3-D 구조(Fig. 3B)를 예측하기 위하여 chondroitinase B 결정구조에 해당하는 아미노산 서열(1ofl)과 비교한 것은 Fig. 4와 같았다. N-terminal 부분과 C-terminal

Fig. 4. Amino acid sequence alignment of partial KJ-2 polyMG lyase with chondroitinase B (1ofl.pdb) from *Pedobacter heparinus* by PSI-blastp method. Asterisks under the sequences represent the Ca^{2+} binding sites. Downward triangles indicate the proposed active sites and substrate binding sites of chondroitinase B. Upward arrows under the sequences indicate the amino acid residues mutated by site-directed mutagenesis. Outlined and shadowed boxes indicate identical and similar amino acid residues, respectively.

Fig. 5. 12% SDS-PAGE analysis of the recombinant KJ-2 polyMG lyase mutants. The recombinant cells were cultured at 15°C for 24 h with or without 0.7 mM IPTG. The cell lysates were obtained by thawing and freezing cells suspended with lysozyme solution. Arrow indicates the expressed KJ-2 alginate lyases. M : protein standards, lane 1: BL21 cells with pET21b(+) vector only, lane 2: BL21 cells with pET21b(+)/KJ-2 polyMG lyase wild type gene, lane 2 - lane 19: BL21 cells with pET21b(+)/KJ-2 polyMG lyase mutants described as Table 2.

부분의 α -helix 구조는 예측할 수 없었으므로 454 아미노산 중 18-345 아미노산까지를 비교하였으며 중요하다고 생각되는 14군데의 아미노산 잔기(Fig. 4 서열아래 $\uparrow$)를 돌연변이시켜 17개의 돌연변이체를 얻었다. $\blacktriangledown$ 는 Michel 등[20] 및 Huang 등[14]이 예측한 chondroitinase B의 활성자리 또는 기질 결합자리를 나타내며 *는 Ca^{2+} 이온과의 결합자리이며 $\uparrow$ 는 polyMG lyase의 활성자리 또는 기질과 결합할 것으로 예측되어 돌연변이시킨 잔기들이다. PolyMG lyase의 wild type 및 17개의 돌연변이 유전자들을 함유한 제조합 대장균들을 ampicillin이 함유된 LB배지에 키운 다음 IPTG로 단백질발현을 유도시키고 lysozyme용액을 처리함으로써 세포용해액을 얻었다. 12% SDS-PAGE 전기이동법으로 단백질 발현을 확인한 다음 polyM, polyG 및 MG block을 기질로 하여 효소활성을

측정하였다. Fig. 5에서와 같이 KJ-2 알긴산 분해효소의 wild type 및 돌연변이체들의 단백질 발현은 비슷한 수준이었다. 그러나 cell lysate들의 효소활성을 wild type과 비교하였을 때 Lys220Ala mutant는 alginate lyase 활성이 완전히 소멸되었으나 Lys220Arg의 경우 활성이 거의 유지되었다(Fig. 6). 그러나 Arg241 및 Arg265의 경우 중성인 Ala 또는 염기성인 Lys으로 대체하여도 활성은 소멸된 것으로 보아 Arg241 및 Arg265는 알긴산 분해활성에 중요한 역할을 하는 것으로 볼 수 있다. His242는 polyG lyase, polyM lyase 및 chondroitinase B의 활성자리에 해당하는 잔기임에도 His242Ala mutant의 효소활성에 변화가 없는 것으로 보아 KJ-2 polyMG lyase의 활성자리는 아닌 것으로 보인다. Chondroitinase B는 glycosaminoglycans (GAGs) 중 하나인 dermatan sulfate를

Fig. 6. Alginate lyase activities of KJ-2 polyMG-specific lyase mutants. Cell pellet of 10 ml culture was lysed with 10 mM lysozyme in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0). 0.2% substrate solution was incubated with 20 μ l cell lysate in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) at 40°C for 30 min and boiled for removing the enzyme activity. Used substrates were polyM block (white bar), polyG block (gray bar) and polyMG block (black bar).

분해하는 효소이며 dermatan sulfate는 D-N-acetylgalactosamine- β (1-4)-L-iduronic acid가 β (1-3)결합하고 있으며 iduronic acid의 C2 위치와 galactosamine의 C4 위치에 고도로 황산화되어 있는 선형 산성다당류이다. Huang 등[14]은 효소의 Arg318 및 Arg364 잔기가 기질의 sulfate 부분과 결합하며 환원말단을 분해하는데 Glu333가 염기로서 작용하여 반응을 촉매할 것으로 예측하였다. PolyMG lyase의 경우 Glu333에 해당되는 위치의 Gly303을 Glu로 바꾸었으나 활성을 잃었으며 바로 옆의 Tyr304를 Phe로 돌연변이 시켰을 때 활성이 80.1% 감소한 것으로 보아 알긴산 분해효소들의 활성자리로 알려져 있는 Tyr이 polyM lyase 또는 polyG lyase 등과 단백질 구조는 다르지만 polyMG lyase활성에서도 활성자리로 작용할 것으로 생각된다. Michel 등[20]은 chondroitinase B는 Ca^{+2} 이온이 dimer로 분해되는 자리에 있는 L-iduronic acid의 carboxyl기를 중화시키고 Lys250 및 Arg271이 각각 Brønsted 염기 및 산으로 작용하였다고 하였으며 KJ-2 polyMG lyase 역시 Ca^{+2} 이온과 Lys220 및 Arg241이 같은 역할을 했을 것으로 예측된다. 또한 염기성 아미노산인 Arg265 및 Arg155가 산성인 알긴산 기질과 결합하여 분해작용을 하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

References

- Albrecht, M. T. and Schiller, N. L. 2005. Alginate lyase (AlgL) activity is required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 3869-3872.
- ASTM International. 2010. ASTM F2259-10. Standard test method for determining the chemical composition and sequence in alginate by proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) spectroscopy. Annual book of ASTM standards, Vol. 03.06. ASTM International, West Conshohocken, Penn., USA. Available from <http://www.astm.org/Standards>.
- Beer, L. L., Boyd, E. S., Peters, J. W. and Posewitz, M. C. 2009. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Curr Opin Biotechnol* **20**, 264-271.
- Campa, C., Holtan, S., Nilsen, N., Bjerkan, T. M., Stokke, B. T. and Skjåk-Bræk, G. 2004. Biochemical analysis of the processive mechanism for epimerization of alginate by mannanuronan C-5 epimerase AlgE4. *Biochem J* **381**, 155-164.
- Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol* **26**, 126-131.
- Cho, Y., Kim, H. and Kim, S. K. 2013. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst Eng* **36**, 713-719.
- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr Polym* **8**, 161-182.
- Gimmestad, M., Ertesvåg, H., Heggset, T. M., Aarstad, O., Svanem, B. I. and Valla, S. 2009. Characterization of three new *Azotobacter vinelandii* alginate lyases, one of which is involved in cyst germination. *J Bacteriol* **191**, 4845-4853.
- Grasdalen, H. 1983. High-field, 1H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydr Res* **118**, 255-260.
- Hashimoto, W., Miyake, O., Momma, K., Kawai, S. and Murata, K. 2000. Molecular identification of oligoalginate lyase of *Sphingomonas* sp. strain A1 as one of the enzymes required for complete depolymerization of alginate. *J Bacteriol* **182**, 4572-4577.
- Haug, A. and Larsen, B. 1962. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem Scand* **16**, 1908-1918.
- Haug, A., Larsen, B. and Smidsrød, O. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem Scand* **21**, 691-704.
- Heyraud, A., Colin-Morel, P., Girond, S., Richard, C. and Kloareg, B. 1996. HPLC analysis of saturated or unsaturated oligoguluronates and oligomannuronates: Application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase. *Carbohydr Res* **291**, 115-126.
- Huang, W., Matte, A., Li, Y., Kim, Y. S., Linhardt, R. J., Su, H. and Cygler, M. 1999. Crystal structure of chondroitinase B from *Flavobacterium heparinum* and its complex with a disaccharide product at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol* **294**, 1257-1269.
- Kam, N., Park, Y. J., Lee, E. Y. and Kim, H. S. 2011. Molecular identification of a polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp. strain KS-408 for degradation of glycosidic linkages between two mannuronates or manuronate and guluronate in alginate. *Can J Microbiol* **57**, 1032-1041.
- Kim, H. S., Lee, C. G. and Lee, E. Y. 2011. Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol Bioproc Eng* **16**, 843-851.
- Kim, D. E., Lee, E. Y. and Kim, H. S. 2009. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Mar Biotechnol* **11**, 10-16.
- Lee, S. I., Choi, S. H., Lee, E. Y. and Kim, H. S. 2012. Molecular cloning, purification, and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 1643-1653.
- Lombard, V., Bernard, T., Rancurel, C., Brumer, H., Coutinho, P. M. and Henrissat, B. 2010. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics. *Biochem J* **432**, 437-444.
- Michel, G., Pojasek, K., Li, Y., Sulea, T., Linhardt, R. J., Raman, R., Prabhakar, V., Sasisekharan, R. and Cygler, M. 2004. The structure of chondroitin B lyase complexed with glycosaminoglycan oligosaccharides unravels a calcium-dependent catalytic machinery. *J Biol Chem* **279**, 32882-32896.
- Momma, K., Okamoto, M., Mishima, Y., Mori, S., Hashimoto,

- W. and Murata, K. 2000. A novel bacterial ATP-binding cassette transporter system that allows uptake of macromolecules. *J Bacteriol* **182**, 3998-4004.
22. Osawa, T., Matsubara, Y., Muramatsu, T., Kimura, M. and Kakuta, Y. 2005. Crystal structure of the alginate (poly α -L-guluronate) lyase from *Corynebacterium* sp. at 1.2 Å resolution. *J Mol Biol* **345**, 1111-1118.
23. Park, H. H., Kam, N., Lee, E. Y. and Kim, H. S. 2012. Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. *Mar Biotechnol* **14**, 189-202.
24. Rozeboom, H. J., Bjerkan, T. M., Kalk, K. H., Ertesvåg, H., Holtan, S., Aachmann, F. L., Valla, S., Dijkstra, B. W.. 2008. Structural and mutational characterization of the catalytic A-module of the mannuronan C-5-epimerase AlgE4 from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem* **283**, 23819-23828.
25. Wargacki, A. J., Leonard, E., Win, M. N., Regitsky, D. D., Santos, C. N., Kim, P. B., Cooper, S. R., Raisner, R. M., Herman, A., Sivitz, A. B., Lakshmanaswamy, A., Kashiwayama, Y., Baker, D. and Yoshikuni, Y. 2012. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science* **335**, 308-313.
26. Weissbach, A. and Hurwitz, J. 1959. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia*. *J Biol Chem* **234**, 705-709.
27. Wong, T. Y., Preston, L. A. and Schiller, N. L. 2000. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol* **54**, 289-340.
28. Yamasaki, M., Moriwaki, S., Miyake, O., Hashimoto, W., Murata, K. and Mikami, B. 2004. Structure and function of a hypothetical *Pseudomonas aeruginosa* protein PA1167 classified into family PL-7: a novel alginate lyase with a beta-sandwich fold. *J Biol Chem* **279**, 31863-31872.
29. Yamasaki, M., Ogura, K., Hashimoto, W., Mikami, B. and Murata K. 2005. A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. *J Mol Biol* **352**, 11-21.
30. Yanagisawa, M., Kawai, S. and Murata, K. 2013. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered* **4**, 224-235.
31. Yeon, J. H., Lee, S. E., Choi, W. Y., Kang, do H., Lee, H. Y. and Jung, K. H.. 2011. Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *J Microbiol Biotechnol* **21**, 323-331.
32. Yoon, H. J., Mikami, B., Hashimoto, W. and Murata, K. 1999. Crystal structure of alginate lyase A1-III from *Sphingomonas* species A1 at 1.78 Å resolution. *J Mol Biol* **290**, 505-514.
33. Zhang, Z., Yu, G., Guan, H., Zhao, X., Du, Y., and Jiang, X. 2004. Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio* sp. 510. *Carbohydr Res* **258**, 187-197.

초록 : *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2 균주로부터 얻은 PolyMG-specific 알긴산분해효소의 상동성 모델링 및 활성자리 연구

김희숙*

(경성대학교 공과대학 식품생명공학과)

알긴산은 α -L-guluronic acid와 β -D-mannuronic acid가 (1-4) 결합한 선형 산성다당류이다. 알긴산은 다양한 알긴산 분해효소들에 의하여 분해되는데 β -제거반응으로 비환원 말단에 이중결합이 있는 불포화 우론산 올리고머가 생산된다. 본 연구실에서는 이전에 *Stenotrophomonas maltophilia* KJ-2로부터 새로운 구조를 가진 polyMG lyase를 재조합하였다. KJ-2 polyMG lyase의 단백질구조를 예측하기 위하여 상동성 모델링을 한 결과 *Azotobacter vinelandii*가 생산하는 세 종류의 polyMG lyase들이 모두 PL7 family에 속하는 반면 KJ-2 polyMG lyase는 PL6 family에 속하였다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ spectra를 분석한 결과 polyMG lyase는 M- β (1-4)-G 당쇄결합을 분해하고 G- α (1-4)-M 결합은 거의 분해하지 못하는 것으로 나타났다. 예측된 polyMG lyase 모델을 기초로 하여 14군데 아미노산 잔기를 선택하였으며 17개의 돌연변이체를 만들어 알긴산 분해효소의 활성을 측정하였다. Lys220Ala, Arg241Ala, Arg241Lys 및 Arg265Ala 돌연변이체들은 완전히 알긴산 분해효소의 활성을 잃었으며 Arg155Ala, Gly303Glu 및 Tyr304Phe 돌연변이체들의 분해활성은 19.1-39.3%까지 감소하였다. 이러한 결과들로부터 Arg155, Lys220, Arg241, Arg265, Gly303 및 Tyr304 들은 알긴산 분해효소의 촉매활성과 기질결합에 중요한 잔기들임을 알 수 있다.