

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Sialic acid 生合成相關基因之選殖及其酵素性質之改造

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2311-B-040-001-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

計畫主持人：簡宏堅

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

中文摘要：

生產 sialic acid 需利用 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase 將 GlcNAc 轉換為 ManNAc，再添加 pyruvate，由 sialic acid aldolase 繼續轉換合成 sialic acid，因此本研究即以 epimerase 與 aldolase 基因的選殖、表現、酵素性質分析及催化效能評估為主題。由 *E. coli* 分別表現出豬腎的 2-epimerase (簡稱 RnBP) 及 *Anabaena* CH1 2-epimerase (簡稱 CHCE) 均約有 25% 為可溶性蛋白，產率分別為 45 及 2,000 U/L。RnBP 為 homodimer，在 effector ATP、dATP 及 ADP 存在下活性可增加 10 倍，對 GlcNAc 轉成 ManNAc 有 25% 的轉換率，AMP 則不具有作用。以 UV cross-link 將 α -³²P ATP 共價結合到 2-epimerase 的 ATP 結合部位，競爭性結合的策略分析發現 CHCE 對各種 nucleotides 的親合力為 ATP > GTP > UTP > CTP。在解析度 2.0Å 的 2-epimerase 晶體結構發現 CHCE 為雙元體構造(homodimer)，每一單體由多個 helix 組成桶狀結構，其中包括許多短長 loop 及 sheet，這些 loop 和 sheet 形成一深深的裂縫使整個結構狀似漏斗，唯在 CHCE 晶體結構並無發現 ATP 的結合。由 *E. coli* 表現的 *E. coli* sialic acid aldolase 均為可溶性蛋白，其產率為 4,080 U/L。aldolase 為 homotrimeric，單體分子量為 34 kDa。以 GlcNAc 及 Pyruvate 作為受質進行 epimerase 與 aldolase 兩段式酵素反應，可用以生產 sialic acid。

關鍵詞：Sialic acid；酵素法；Epimerase；Aldolase

英文摘要：

Biosynthesis of sialic acid by reacting N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate in the presence of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and sialic acid aldolase has been described. The research goals of this project are cloning and characterization of epimerase and aldolase genes. An 1,209bp DNA fragment encoding 44.4 kDa protein (designated RnBP) of porcine epimerase was cloned in *E. coli*. Soluble RnBP (25%) was induced to produce 45 U/L. The activity of porcine RnBP increase in 3-fold was observed in the presence of ATP or dATP (but not ADP) and the conversion yield of ManNAc from GlcNAc was 25%. On the other hand, recombinant *E. coli* aldolase was all soluble form and a productivity of 4,080 U/L was obtained. The aldolase is a homotrimeric protein with subunit molecular mass of 34 kDa. The production of sialic acid can be performed by reacting N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate in the presence of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and sialic acid aldolase.

Keywords：Sialic acid；Enzymatic synthesis；Epimerase；Aldolase

前言：

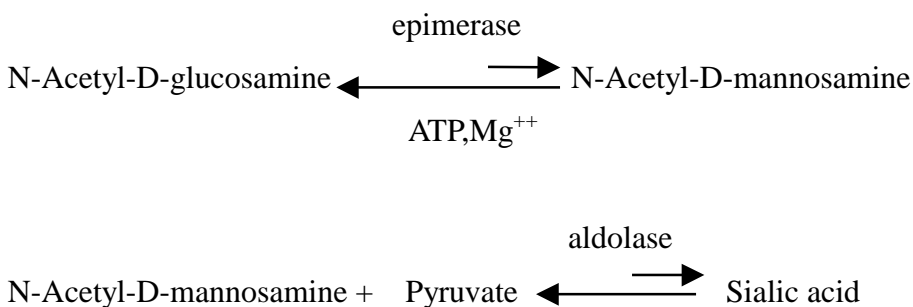
sialic acid 廣泛存在於動物體內構成寡醣基、醣蛋白和醣脂質，在動物的生理代謝上扮演生物訊息傳遞時認識，此外 sialic acid 可當作病菌或病毒感染時的結合子 (receptor)，也是毒素和賀爾蒙的結合子，也可當成結合基去淹蓋結合子的作用 (masking receptors)。另外，sialic acid 是細菌表面多醣類中的成分，是病菌的毒性因子，提供病菌感染時不被免疫系統的補體所消滅。

在應用上，Sialic acid 能促進藥物與體內酵素的接觸，提升藥效。也能阻斷細胞表面上抗原的接觸，使藥物不會被免疫系統消滅而造成排斥，也是病菌、病毒感染或其毒素的結合子 (receptor)，可干擾病菌和病毒的感染(1)，因此已被應用在感冒藥、抗癌藥及心血管藥...等。目前已有許多以 Sialic acid 做為中間物的藥物上市，Sialic acid 約佔成本 1 到 20 %。市售價格 US \$ 14,000/kg，需求逐年成長(3,4)。目前 Sialic acid 可由天然物以抽取法生產(6,7,8)，由蛋黃脫脂、加酸或 protease 水解、脫鹽，再用離子交換樹脂純化(9,10,11)。再者，日本太陽化學為最大供應商，利用化學/生化法，已具雛形，有兩種途徑：

(1) 先用鹼進行 epimerization，再利用 aldolase 酵素(1,2,3,4,5)合成 sialic acid，生產成本約在 US\$1,000 到 1,200/kg。

(2) 以酸水解乳清，再以 UF、heating 處理及脫鹽，再以離子交換樹脂，電泳純化，最後用 sialidase 水解。

此外，兩步生化法為將 epimerase(12)及 aldolase 同時固定化，直接合成 Sialic acid 此法若能成功，最具市場競爭力。兩步生化法的反應機制如下：



在量產 Sialic acid 的製程中，共有兩段反應，其所需要的生物觸媒分別是將 N-acetyl-D-glucosamine 轉換成 N-acetyl-D-mannosamine 的 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase;及將 N-acetyl-D-mannosamine 加上 pyruvate 合成 sialic acid 的 sialic acid aldolase。在此反應過程當中需添加 ATP 以提升 epimerase 的活性，此依賴性質若能解除，對 sialic acid 生產成本的降低將有很大的助力。1990 年 Inoue 等人從豬的腎臟皮質中選殖 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase，並且進行核酸定序。據了解 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase 原來只是一個腎素蛋白 (renin-binding protein)，並不涉及任何生理及生化方面的反應 (1)。一直到 1996 年才由 Maru 等人發現這個結合腎素蛋白是一個具有 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase 活性的蛋白質(13,14,15)，並立刻被應用到 sialic acid 的製程上，一躍成為炙手可熱的生物觸媒，此酵素的售價為 200unit/80mg 新台幣 10 萬元，若大量使用外購的 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase，進行全新的製程開發，極不敷成本，自行生產性質優良 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase，顯然是極為迫切的工作。目前已知能生產 epimerase 的微生物還未發現，僅有從微生物基因體的檔案中(GenBank)發現

Nostoc sp. PCC7120、*Nostoc punctiforme* 和 *Synechocystis* sp. PCC6803 有 epimerase 基因存在，而且與動物的 epimerase 比對發現存在有共同的 conserved motifs。有關於微生物的 epimerase 活性的研究，尚未有任何的報告或專利，是一有待開發的領域。關於這些基因之進一步研究，例如可溶性酵素量的提高，以及酵素反應的方向朝產物 ManNAc 進行，則尚未有文獻報告。因此如何提昇可溶性 epimerase 的量，以及去除反應方向朝基質 GlcNAc 進行，並保留或提昇其轉換成 ManNAc 能力，非常重要，也是很有趣的研究主題。除此之外，解除 epimerase 對 ATP 的依賴性，才能降低生產成本並利用於生物轉換 (bioconversion) 工業生產 sialic acid。Aldolase 目前僅有日本 Toyobo 公司一家進行生產，為由 *E.coli* 經發酵培養後，分離及純化所得酵素。由於 aldolase 酵素反應的方向亦朝 sialic acid 分解的方向進行，因此如何去除反應方向朝基質進行，Toyobo 公司之產品主要提供作為學術研究之用。在專利方面，目前僅日本 Marukin Shoyu 公司取得以 *E. coli* 為生產菌株的專利 (USP4699883,1987)。因此，未來若欲大量生產 sialic acid，aldolase 高產量菌種之取得將為一重要研究方向。

結果與討論：

1. 基因選殖與序列分析：活性分析發現 *Anabaena* CH1 具有 GlcNAc 2-epimerase 活性，因此進行 *Anabaena* CH1 GlcNAc 2-epimerase 基因(*epi*)的選殖與分析。*epi* 基因長 1,167bp，轉譯出來的蛋白質為 43 kDa (CHCE)，序列比對分析結果發現 CHCE 與人類、豬、老鼠、藍綠藻 *Nostoc* sp. PCC7120、*Nostoc punctiforme* 和 *Synechocystis* sp. PCC6803 分別有 38、41、41、97、88 及 70% 的同質性。豬腎 RnBP 基因長 1,209 bp，轉譯出來的蛋白質為 44.4 kDa，其序列與已發表的 GlcNAc 2-epimerases 有 40~90% 的相似度。目前為止，只有人類、豬及老鼠的 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase (GlcNAc 2-epimerase) 被選殖並作酵素性質分析，至於藍綠藻 *Nostoc* sp. PCC7120、*Nostoc punctiforme* 和 *Synechocystis* sp. PCC6803 則只有基因體序列被發表。RnBP 原來被認為只是一個腎素結合蛋白 (renin-binding protein, RnBP) (8)，他會抑制 renin 的活性而與血壓調解有關。但是，研究 RnBP knockout 的老鼠顯示此基因與醣的代謝有直接或間接的關係 (8)；而且利用滲透性細胞株 (cell-permeable) 餵食各種 aminosugar 的研究更進一步發現 RnBP 與 sialic acid 的代謝有關 (9) 在現今的臨床檢驗上，sialic acid 則被視為數種炎症的指標。在應用上，一直到 1996 年才被發現這個結合腎素蛋白是一個具有 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase 活性的蛋白質(6)，進而被用於 sialic acid 的生產，惟因產率不高而未工業量產。。

2. 基因表現與酵素性質分析：由 *E. coli* 表現的 RnBP 只有 25 % 可溶性蛋白，曾經嘗試利用不同的 promoter，不同的 host (yeast) fusion protein 以及各種誘導條件皆無法提升其溶解度。RnBP 在 effector ATP 存在下活性可增加 10 倍，ADP 則不具有作用。除豬腎 RnBP，也有文獻指出 ATP、dATP、ddATP、ADP 及 GTP 會增加人類 RnBP 的活性 (18)。另外，RnBP 對 GlcNAc 轉成 ManNAc 有 25 % 的轉換率，以 ManNAc 為受質則有 75% 轉成 GlcNAc。

3. 分析 2-epimerases 對 nucleotides 結合：

由於 2-epimerase 須與 effector ATP 結合來增加催化效率，因此以 UV 照射的方式可將 ^{32}P ATP 共價結合到 epimerase 的 ATP 結合部位。利用競爭性結合的策略來分析各種 nucleotides 對 RnBP 的親合力，發現 RnBP 對 ATP、GTP、CTP 及 UTP 有相同的親合力，在受質 GlcNAc 或 ManNAc 存在下，皆可提升 RnBP 對 ATP 的親合力，另外，對 ATP 的親合力 RnBP 的 K_m 為 24 μM 根據文獻指出 ATP、dATP 及 GTP 皆可增加 RnBPs 之活性 (18)；human 與 rat RnBP 對 ATP 之 K_m 分別為 73 及 5.5 μM ，因此豬腎 RnBP 對 ATP 之親合力是界於 Rat RnBP 與 human RnBP 之間。

4. 利用 X 光繞射，繼以 Molecular Replacement(MR)的技術解出 2.0Å 解析度的 2-epimerase 晶體結構，2-epimerase 為一雙元體構造(dimer)，形成此 dimer 的力量一部份是氫鍵的力量，另一部份則為凡得瓦爾力。此結構的單元體(monomer)由多個 helix 所組成桶狀結構，其中包括許多短長 loop 及 sheet，這些 loop 和 sheet 形成一深深的裂縫使整個結構像一個漏斗樣。而雙元體 A chain 的第 1,2 個殘基及第 151-164 個殘基；B chain 的第 1-3 個殘基及第 153-165 個殘基為電子雲不明顯的區域，無法完整的建構它們的結構。2-epimerase 在序列比對上是屬於 Six-hairpin glycosyltransferases superfamily 的 N-Acyl-D-glucosamine 2-epimerase family 的一員，從 3D 立體圖可以觀察到 2-epimerase 是用 barrel 的方式做折疊，也符合此 superfamily 共有的折疊特性，是屬於 alpha/alpha toroid 的折疊方式，其中可分為十五個長短不一的 helix 及十三個長短不一的 β -sheet，這些二級結構間則穿差著長短不同的 loop 及 turn。這些 β -helix 在 2-epimerase 的一側圍成了一個像桶子一樣的結構，中間形成了一個很大的凹洞開口朝向另一側；在另一側，則是由多個 β -sheet 及長短不一的 loop 所構成，

且在空間上形成了一個大洞，似乎是要讓受質進入的地，雖然目前尚未能直接觀察此蛋白質的 ATP 結合部位，但是透過此蛋白質晶體結構，對活性區域及反應機構的研究有相當大的助益，進而可以蛋白質工程的方法來提升轉化率及降低 ATP 的依賴性

計畫成果自評：

本計畫研究內容與原計畫相符，達成預期目標，研究成果在學術上有其原創性，亦可做為應用科技領域使用，在國內建立生產 sialic acid 新產程。

參考文獻：

1. Comb, D. G. and Roseman. S. 1960. The sialic acids. The structure and enzymatic synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid. *J. Biol. Chem.* 235, 2529-2537
2. Auge, C., David. S., and Gautheron. C. 1984. Synthesis and immobilised enzyme of the most important silalic anid. *Tetrahedron Lett.* 25, 4663-4664
3. Bednarski, M. D., Chenault, H. K., Simon, E. S., and Whitesides, G. M. 1987. Membrane-enclosed enzymatic catalysis (MEEC): a useful, practical new method for the manipulation of enzymes in organic synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 1283-1285
4. Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism, and biological function of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40,131-234
5. McGuire, E.J. and Binkley, S. B. 1964. The structure and chemistry of colominic acid. *Biochemistry* 3, 247-251
6. Takahashi, S., Takahashi, K., Kaneko, T., Ogasawara, H., Shindo, S., and Kobayashi, M. 1999. Human renin-binding protein is the enzyme N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J. Biochem.* 125, 348-353
7. Maru, I., Ohnishi, O., Ohta, Y., and Tsukada, Y. 1998. Simple and large-scale production of N-acetylneuraminic acid from N-acetyl-D-glucosamine and pyruvate using N-acyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetylneuraminic lyase. *Carbohydr. Res.* 306, 575-578
8. Inoue, H., Takahashi, S., Fukui, K., and Miyake, Y. 1991. Leucine zipper motif in porcine renin-binding protein (RnBP) and its relationship to the formation of an RnBP-renin heterodimer and an RnBP homodimer. *J. Biol. Chem.* 266, 11896-11900
9. Carolyn R. Bertozzi. 2002. GlcNAc 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 291.
10. Takahashi S, Hori K, Takahashi K. 2001. Effects of nucleotides on N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase: comparative biochemical studies. *J Biochem.* 130, 815-821.
11. Takahashi S, Ogasawara H, Takahashi K. Identification of domain conferring nucleotide binding to N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J Biochem.* 131, 605-610.
12. Takafumi Itoh, Bunzo Mikami, Isafumi Maru, Yasuhiro Ohta, Wataru Hashimoto and Kousaku Murata. 2000. Crystal structure of N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase from porcine kidney. *JMB*, 303, 733-744.
13. C. Ramakrishnan, V.S. Dani and T. Ramasarma. A conformational analysis of Worker motif A [GXXXXGKT(S)] in nucleotide-binding and other proteins. *Protein engineering.* 15, 783-798.
14. S. Takahashi, K. Hori, K. Takahashi, H. Ogasawara. Effects of Nucleotides on N-Acetyl-D-Glucosamine 2-epimerase(Renin-Binding Protein):Comparative Biochemical Studies. *J. Biochem.* 130, 815-821.