

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：NSC91-2311-B-040-004-

執行期間：91年08月01日至92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

計畫參與人員：李晏忠、陳美樺、陳昶霖

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 9 月 24 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告 期中進度報告

中進度
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 整合型計畫
計畫編號：NSC 91-2311-B-040-004-
執行期間：91年08月01日至92年07月31日

計畫主持人：簡宏堅
共同主持人：
計畫參與人員：李晏忠、陳美樺、陳昶霖

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究

計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開

查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

中 華 民 國 92 年 09 月 18 日

中文摘要：

以酵素法來生產 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。豬腎的 epimerase 基因長 1,209 bp，轉譯出來的蛋白質為 44.4 kDa(簡稱 RnBP)，由 *E. coli* 表現的 RnBP 約有 25% 為可溶性蛋白，產率為 45 U/L。RnBP 為 homodimer，在 effector ATP 或 dATP 存在下活性可增加 3 倍，對 GlcNAc 轉成 ManNAc 有 25% 的轉換率，ADP 則不具有作用；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 homotetramer，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：

Enzymatic synthesis 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：

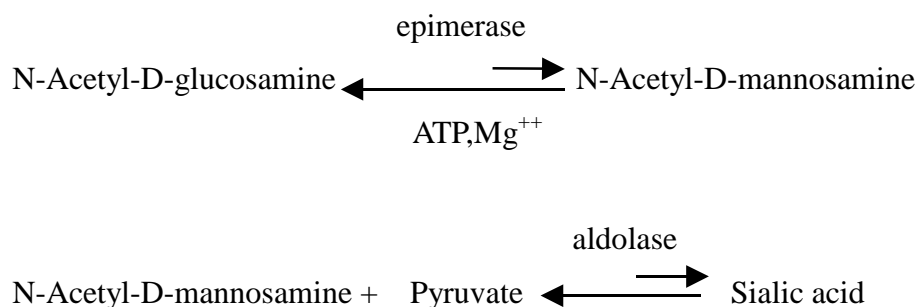
sialic acid 廣泛存在於動物體內構成寡糖基、糖蛋白和糖脂質，在動物的生理代謝上扮演生物訊息傳遞時認識，此外 sialic acid 可當作病菌或病毒感染時的結合子 (receptor)，也是毒素和賀爾蒙的結合子，也可當成結合基去淹蓋結合子的作用 (masking receptors)。另外，sialic acid 是細菌表面多醣類中的成分，是病菌的毒性因子，提供病菌感染時不被免疫系統的補體所消滅。

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. 1.基因選殖與序列分析：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。RnBP 原來被認為只是一個腎素結合蛋白 (renin-binding protein, RnBP) (16)，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糖的代謝有直接或間接的關係 (16)；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 (17)，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 (13,14,15)，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 (fig. 3)，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 α -³²P 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 μ M 根據文獻指出 ATP、dATP 及 GTP 皆可增加 RnBPs 之活性 (18)；human 與 ratRnBP 對 ATP 之 K_m 分別為 73 及 5.5 μ M，因此豬腎 RnBP 對 ATP 之親合力是界於 Rat RnBP 與 human RnBP 之間。

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 immobilized enzyme of the most important sialic acid. *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. Kim, M. J., Hennen. W. Aj., Sweers. H. M., and Wong, C. H. 1988. Enzymes in carbohydrate synthesis :N-acetyl-D-neuraminic acid aldolase-catalysed reactions and preparations of N-acetyl-2-deoxy-D-neuraminic acid derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 6481-6484
5. Kragl, U., Gyax, D., Ghisalba, O., and Wandrey, C. 1991. Enzymatic two-step synthesis of N-acetyl-D-neuraminic acid in the enzyme membrane reactor. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 30, 827-828
6. Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism, and biological function of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40,131-234
7. Schauer, R. *Sialic acids: Chemistry, Metabolism, and function.* (Schauer, R., Ed.). Springer-Verlag, New York, 1982
8. Juneja, L. R., Koketsu, M., Nishimoto, K., Kim, M., Yamamoto, T., and Itoh. T. 1991. Large-scale preparation of sialic acid from chalaza and egg-yolk membrane. *Carbohydr. Res.* 214, 179-186
9. McGuire, E.J. and Binkley, S. B. 1964. The structure and chemistry of colominic acid. *Biochemistry* 3, 247-251
10. Uchida, Y., Tsukada, Y., and Sugimori, T. 1973. Improved microbial production of colominic acid , a homopolymer of N-acetyl-D-neuraminic acid. *Agric. Biol. Chem.* 37, 2105-2110
11. Marugane-Dhoyu, K. K. Preparation of colominic acid. Jap. Pat. Appl. 1-4489;1989.
12. Honda, S., Akao, E., Suzuki, A., Okuda, M., Kakehii, K., and Nakamura, J.1989. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1 – phenyl –3– methyl –5-pyrazolone derivatives. *Anal. Chem.* 180, 351-357

13. Tsukada, Y., Ohta, Y., and Maru, I. 1998. Epimerase. Sequence 4 from patent US 5795767
14. 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
15. 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-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and N-acetylneuraminate lyase. *Carbohydr. Res.* 306, 575-578
16. 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
17. Carolyn R. Bertozzi. 2002. GlcNAc 2-epimerase can serve a catabolic role in sialic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 291.
18. 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.
19. Takahashi S, Ogasawara H, Takahashi K. Identification of domain conferring nucleotide binding to N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase. *J Biochem.* 131, 605-610.
20. 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.
21. Hanno S, Matthias M, and Ole N. Jensen. 2001. Mass spectrometric analysis of a UV-cross-linked protein-DNA complex: Tryptophens 54 and 88 of *E. coli* SSB cross-link to DNA. *Protein science.* 10, 1989-2001.
22. 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.
23. Matti Saraste, Peter R. Sibbald and Alfred Wittinghofer. 1990. The P-loop – a common motif in ATP- and –GTP binding proteins. *TIBS.* 15, 430-434.