

*Arthrobacter luteus*로부터 유래한 염기성 AL-Protease의 효소학적 성질 및 활성 아미노산 잔기의 검색

吳洪祿 · 相菌 泰生* · 船津 勝**

忠南大學校 畜産學科, *日本 九州大學 農藝化學科, **日本 熊本大學 應用微生物工學科
(1984년 4월 6일 접수)

Enzymological Properties of the Alkaline AL-Protease from *Arthrobacter luteus* and Detection of Its Active Amino Acid Residue

Hong-Rock Oh, Yasuo Aizono* and Masaru Funatsu**

Dept. of Animal Science, Chungnam National University, *Dept. of Agricultural Chemistry, Kyushu
University, Fukuoka, Japan, **Dept. of Applied Microbial Technology, The Kumamoto Institute of
Technology, Kumamoto, Japan

(Received April 6, 1984)

Abstract

The enzymatic properties of the alkaline AL-protease, which had been prepared from the crude zymolyase of *Arthrobacter luteus*, was investigated together with its active amino acid residue.

Complete inactivation of the proteolytic activity of AL-protease by either DFP or PMSF was simultaneously accompanied by the loss of its lytic effect on the lysis of yeast cell wall. In the reaction, AL-protease showed the pattern of inactivation to decrease very slowly, as compared to that of chymotrypsin, and that enzyme and DFP were found to react with a molar ratio of 1 : 1.

The preparation of AL-protease exhibited no hydrolytic activity in any substrates of polysaccharases, playing a significant role in the lysis of yeast cell wall. The optimum pH and temperature of AL-protease was pH 10.5 and 65°C, respectively. It also showed stability in the pH range from 5 to 11 and at the temperature below 65°C.

Through the identification of the amino acid residue in the active site of the ³²P-diisopropylphosphorylated(DIP) AL-protease modified specifically with ³²P-labeled DFP, AL-protease was found to be a DFP-sensitive enzyme which has a mole of active serine residue involved in its proteolytic activity per mole of the enzyme.

서 론

현재 효모세포벽 용해 효소로 시판되고 있는 zym-
olyase (endo-β-1,3-glucanase; EC 3.2.1.39)를
*Arthrobacter luteus*의 배양액으로부터 분리, 정제
한 바 있는 Kitamura 등(1)은 zymolyase는 그 단일

의 효소작용에 의해서도 맥주효모 등의 세포벽을 효과적으로 용해한다고 보고하였다. 그러나, 저자 등은 zymolyase 에 관한 일련의 연구과정에서 zymolyase 의 조효소 중에는 zymolyase 의 용해활성을 촉진시키는 모종의 인자가 존재하고 있을 가능성에 주목하게 되었고, 이러한 촉진물질은 Kitamura 등¹⁾이 시행한 맥주효모 세포벽의 용해반응에도 작용하였을 것으로 추정되었다.

따라서, 저자 등은 zymolyase 조효소중의 효모세포벽 용해 촉진인자를 검색, 분리, 정제하여 조사한 결과²⁻⁴⁾, 모종의 용해 촉진인자는 분자량 약 40,500의 열기성 protease 로 구명된 바 있었으나, 이를 보다 확실하게 뒷받침할 만한 효소학적인 근거는 전보⁴⁾의 실험 결과만으로는 불충분하다고 생각되었다. 그러므로, 본 실험에서는 전보⁴⁾에서 polyacrylamide gel (PAG)-전기영동적으로 균일하게 정제되었다고 보고된 바 있는 효모세포벽 용해 촉진인자 (이하 용해 촉진인자로 약함)의 동결건조물이 효소학적으로도 protease의 단일 효소로만 구성된 균일한 불질임을 확인함과 동시에, 몇 가지 효소학적인 성질에 관해서도 조사하였다.

또한, 전보⁴⁾에서 용해 촉진인자로 밝혀진 *Arthroacter luteus* 유래의 열기성 protease(이하 AL-protease 로 칭함)가 DFP (diisopropylphosphorofluoridate)의 화학적 수식(chemical modification)에 의해서 casein 에 대한 분해활성이 완전히 저해되고 있었으므로, 이 효소는 trypsin, chymotrypsin 등의 protease 와 같이 그 활성부위에 serine 잔기를 가진 serine protease 일 가능성²²⁾이 농후하였다. 따라서, 저자 등은 이를 구명하기 위하여 [³²P]-DFP ([³²P]-labeled DFP) 수식작용에 의해서 [³²P]-o-DIP(diisopropylphosphorylation) 화한 시료를 가지고 [³²P]-o-phosphorylserine 잔기의 검색, 동정을 실시하였으므로, 그 결과도 아울러 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 효소 및 기질

Zymolyase 조효소로부터 분리, 정제된 바 있는 AL-protease 는 동결건조된 표준품을, α -chymotrypsin 은 Worthington Biochemical 제품을 사용하였다. *Sacch. saké* 세포, yeast glucan, pachyman, CM-pachyman, yeast phosphomannan, yeast

mannan, luteose 및 glycol chitin 은 전보³⁾에서와 같은 요령으로 조제 또는 분양받았으며, casein 과 hemoglobin 은 Merck사 제품이였다.

2. 시 약

TPCK(tosylphenylalanyl chloromethyl ketone), TLCK (tosyllysinechloromethyl ketone), PMSF (phenylmethanesulfonylfluoridate), NEM (N-ethylmaleimide), PCMB (*p*-chloromercuribenzoic acid), MIAA (monoiodo acetamide) 및 DFP (diisopropylphosphorofluoridate)는 Sigma사 제품을 [³²P]-DFP (87.4 mci/m moles)는 The Radiochemical Centre (Amersham, U.K) 사 제품을 사용하였다. pepsin 의 저해제인 peptinostreptin 은 Daketa 제약연구소 (Osaka, Japan)로부터 분양받았으며, 기타 각종 금속이온은 시판 특급시약을 사용하였다.

3. 효소활성의 측정

효모세포벽에 대한 용해활성(이하 용해활성으로 약함), protease, β -1,3-glucanase 및 다당류 가수분해 효소의 활성은 전보^{2,3)}에 준하여 측정하였다. yeast phosphomannan 의 활성측정에는 환원당법 외에 점도 측정법도 병행하였다. 점도 측정을 위해서 $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 의 항온수중에 30°C 에서 탈이온수 3 ml 가 낙하하는데 24.5 초가 소요되는 Ostwald 점도계를 설치하였고, 여기에 시료 5 mg 을 5 mM 의 tris-HCl 완충액 (pH 7.5, 0.1 M KCl) 2 ml 에 용해하여 주입한 다음, 효소액 1 ml (4 mg/ml)를 가하여 30°C 에서 6 시간 동안 반응시켰다. 반응이 진행되는 동안 시료액의 낙하 소요시간의 변화를 시간별로 측정하였고, 효소액 대신에 완충액을 가한 것을 대조로 하였다.

4. 효소활성의 저해²¹⁾

DFP와 PMSF 는 isopropanol 에 TLCK 와 pepsinostreptin 은 메타놀이 용해하였으되, 반응액에 있어서 유기용매의 최종농도가 5 % 이하가 되도록 조정하였고, NEM, PCMB, MIAA 및 TPCK 는 50 mM 인산완충액 (pH 7.0)에 용해하였다. 조제된 저해제 용액 0.5 ml 에 동일한 인산 완충액에 용해한 효소액 0.5 ml 를 가하여 20°C 에서 12 시간 반응시켰다. 각 반응액의 저해제 농도는 Table 1에 제시된

바와 같았고, 반응 후 잔존 효소활성은 저해제 대신 완충액을 사용한 것을 대조로 하여 상대적 값어치(%)로 표시하였다.

5. 겔 여과(gel filtration)

Yeast phosphomannan을 정제하기 위해서 시료 약 10 mg을 0.1 M KCl를 함유하는 5 mM tris-HCl 완충액(pH 7.5) 4 ml에 용해하여 sephadex G-10 gel column (1.5×150 cm)에 가한 후, 그 탈이온수 용출액을 fraction collector로 2.5 ml씩 분취하였다. 각 분취의 전당(全糖)은 페놀-황산법⁷⁾에 의하여 측정되었다.

6. 방사활성의 측정

Aloka LSC-602형의 액체 scintillation counter를 이용하여 [³²P]의 방사활성을 측정하였다.

7. 전기영동

분석용 PAG (polyacrylamide gel)-전기영동, SDS (sodium dodecyl sulfate)-PAG-전기영동 및 조제용 PAG-전기영동은 전보^{3,4)}에 준하여 실시하였다. SDS-PAG-전기영동 겔의 영동패턴은 Ozumot 82형 densitometer를 사용하여 검출하였으며, 검출이 끝난 겔은 2 mm 두께로 절단되어 방사활성의 측정에 사용되었다.

AL-protease의 활성 아미노산 잔기를 동정하기 위한 고압 여지 전기영동(high-voltage paper electrophoresis)의 시료는 다음과 같이 조제하였다. 즉, Dowex 50W(×8)(200~400 mesh, H⁺ form) 이온교환 크로마토그래피에서 얻어진 해당획분을 모아, 감압증류기로 건조, 고화시켜 얻어진 잔사를 0.9 ml 탈이온수에 용해하였다. 이 용액 0.3 ml에 0.25 μl의 *o*-phosphorylthreonine 수용액(2.8 mg/ml)을 가하여 여지상의 출발점에 송풍세트하였다. 또한, 시료와는 별도로 소량의 *o*-phosphorylserine과 *o*-phosphorylthreonine을 동정을 위한 표지물질로 사용하였다. 전기영동은 Whatman 여지 3MM(10.5×56 cm)와 pyridine-acetic acid-water(1:10:289, v/v/v) 완충액(pH 3.6)을 사용하여 2,000 V, 200 mA의 조건에서 150분 동안 실시하였다. 영동 완료 후, 시료의 전개된 부분을 수직으로 2등분 절취하여, 한 쪽은 0.5 cm 폭으로 절단, 각 절편의 [³²P] 방사활성을 측정하였고, 나머지 한 쪽은 닌히드린 시약에 의한 정색반응에 사용하였다.

8. 효소활성에 미치는 pH, 온도 및 금속이온의 영향

1) pH의 영향

(1) 최적 pH: 0.6%의 변성 casein-용액⁸⁾과 0.6%의 6.5 M 노소 변성 hemoglobin-용액⁹⁾을 각 pH의 0.1 M 완충액(pH 2~5: Na-acetate, pH 6~7: phosphate, pH 8: tris-HCl, pH 9~13: glycine-NaOH)으로 조제하여 여기에 50 μg의 AL-protease를 가한 후, 30°C에서 10분간 반응시켰다. 효소활성은 최고 측정치에 대한 상대적 활성치(%)로 표시하였다.

(2) pH 안정성: 효소 50 μg을 포함하는 각 pH의 시료액(완충액 농도 0.05 M) 0.25 ml를 7°±0.5°C에서 24시간 유지시킨 다음, 0.5 M glycine 완충액(pH 10.0) 0.25 ml를 가하여 30°C에서 casein에 대한 잔존 활성치를 구하였고, 그 값은 최적 pH에서와 같이 상대적 활성치로 표시하였다.

2) 온도의 영향

(1) 최적 온도: 각 온도의 시료구에 효소 50 μg을 가하여 pH 10에서 10분간 반응시킨 후 측정하였다.

(2) 열 안정성: 효소 50 μg가 용해된 시료액(pH 7.5) 1 ml를 각 온도대에서 15분간 유지시킨 다음 빙수중에서 급냉, 30°C, pH 10의 조건하에서 casein에 대한 잔존 활성을 측정하였다.

3) 금속이온의 영향

2 mM의 각종 금속이온의 수용액 및 20 mM의 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 수용액 0.1 ml를 각각 0.1 ml의 효소액(효소 50 μg)에 가하여 실온에서 2시간 방치시킨 다음, 여기에 pH 10의 casein-용액과 30°C에서 30분 반응시켰다. 금속이온 대신 탈이온수를 가한 시료를 대조로 하여 상대적 활성치를 구하였다.

9. 효소의 화학적 수식^{21,22)}

동결건조된 AL-protease 조효소 2.75mg을 1.5 ml의 0.1 M 인산 완충액(pH 7.0)에 용해시켜 여기에 50 μl의 [³²P]-DFP 용액(52.13 μmoles/ml isopropanol)을 가하여 실온에서 6시간 반응 후 다시 10 μl의 DFP(1.0 mmole/ml isopropanol)를 가하여 13시간 반응시켰다. 이어서, 반응액을 Visking tube (18/32 inch)로 탈이온수 중에서 46시간(온도 2°C)

투석하여 과잉의 [^{32}P]-DFP를 제거하였다.

10. Dowex 이온교환 크로마토그래피

[^{32}P]-DFP에 의한 화학수식의 반응 생성물 중에서 조제용 PAG-전기영동에 의하여 정제된 [^{32}P]-DIP-AL-protease의 수용액(640 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 1 ml를 시험관에 취하여 40 °C에서 송풍건조시켰다. 여기에 2 N 염산 0.65 ml를 가하여 감압봉관한 다음, 105 °C에서 16시간 가수분해하였다. 가수분해 완료 후 시료관을 개봉하여, 표지물질로서 *o*-phosphorylserino 수용액(6.1 mg/ml) 70 μl 와 KH_2PO_4 수용액(13.6 mg/ml) 100 μl 를 가하여, 건조제로서 P_2O_5 및 NaOH를 넣은 desiccator 중에서 감압건조시켰다. 건조 고화된 분해물을 10 mM의 염산 1 ml에 용해하여, 동일한 염산액으로 평형화시킨 강산성 양이온 교환수지 Dowex 50 W($\times 8$) (200~400 mesh, H^+)의 column (1.0 \times 67 cm)에 주입하였다. 이어서 10 mM의 염산액으로 용출(20 ml/hr), 1.2 ml씩 분취하였고, 각 획분의 방사활성의 측정과 닥히드린 정색반응을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. AL-protease 활성의 저해 양식

전술한 바와 같이 Zymolyase의 *Sacch. saké* 세포에 대한 용해작용을 촉진시키는 용해 촉진인자의 촉진활성이 오로지 AL-protease의 효소활성에만 의존하는 양자가 동일한 것인지, 그 여부를 구명하기 위해서는 적합한 효소 저해제를 선택하여 검토하는 것이 간편한 방법으로 생각되었다. 따라서 AL-protease의 저해제를 기존의 각종 protease 저해제로부터 검색함과 아울러, 그 저해 양식에 관해서 검토하였다.

1) AL-protease의 저해제 검색^{21,22)}

효소의 serine 잔기 수식을 위하여 DFP와 PMSF를, serine 계 효소의 histidine 잔기 수식을 위하여서는 TPCK와 TLCK를, 그리고 SH계 효소의 SH기에 대해서는 NEM, PCMB 및 MIAA를 사용하여 그 중에서 AL-protease의 저해제를 검색하였다.

그 결과, Table 1에 제시된 바와 같이 DFP 및 PMSF는 casein에 대한 protease 활성 및 용해 촉진 활성을 완전히 저해하고 있었으나, 기타의 저해제는 양 활성 중 그 어느 것에도 저해 작용이 인정되지 않

Table 1. Effect of inhibitors on the proteolytic and the lytic activity of AL-protease

Enzyme (50 μg) was preincubated with inhibitors in 1 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) or deionized water at 20 °C for 12 hours, and that activities were assayed in the same buffer at 30 °C for 30 min. using casein for proteolytic activity and yeast cell for lytic activity as substrates

Inhibitors	Concentration (mM)	Enzyme activity(%)	
		Proteolytic	Lytic
None	0.0	100	100
DFP	1.0	0	0
PMSF	1.0	0	0
NEM	1.0	100	100
PCMB	0.3	100	100
MIAA	10.0	100	100
TLCK	1.0	100	100
TPCK	0.5	87	100
Peptinostreptin	0.2	100	98

Abbreviation: DFP, diisopropylphosphorofluoridate; PMSF, phenylmethanesulfonylfluoridate; NEM, N-ethylmaleimide; PCMB, Pchloromercuribenzoic acid; MIAA, monoiodo acetamide; TLCK, tosyllysinechloromethyl ketone; TPCK, tosylphenylalanylchloromethyl ketone.

았거나, 극히 미미한 정도에 지나지 않았다. 이는, 용해 촉진활성이 DFP 및 PMSF에 의해서 그 효소 활성이 완전히 저해되는 것으로 밝혀진 protease의 활성에 전적으로 의존하는 양자 동일한 것임을 시사하는 것이었다. 따라서, AL-protease는 DFP 및 PMSF를 저해제로 하는 serine protease²²⁾로 추정되었고, 용해 촉진 현상은 바로 AL-protease의 활성으로부터 유래하는 것임이 확인되었다.

다만, TPCK에 의해서 AL-protease의 활성이 13% 정도 저해됨에도 불구하고, 용해 촉진활성에는 아무런 영향을 받지 않았던 현상의 원인은 분명하지 못하였다.

2) DFP에 의한 저해 반응속도

전항의 실험결과에 의해서 추정된 사실을 확실하게 뒷받침하고자 DFP에 의한 저해 반응속도를 조사하였다. 그 결과 <Fig. 1>에서와 같이 serine protease의 일종인 chymotrypsin은 DFP에 의해서 그 활성이 신속히 저해되는 전형적인 패턴을 보이고 있었으나, AL-protease는 DFP에 의한 DIP화의 반응속도가 완만하기 때문인지 효소활성이 완

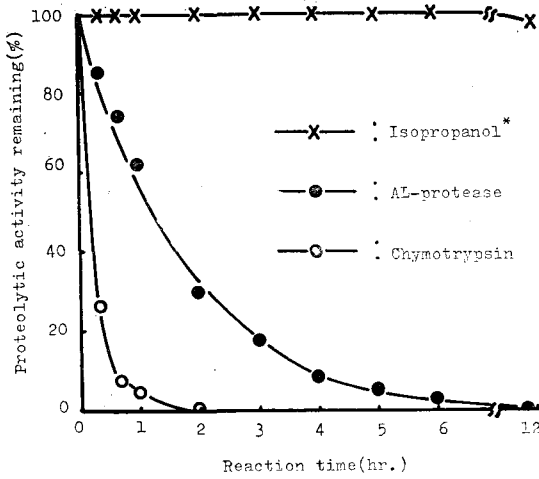


Fig. 1. Rate of inactivation of AL-protease and chymotrypsin by the modification with DFP.

The experimental condition was the same as table 1.

*: Isopropanol, a solvent of diisopropylphosphorofluoridate (DFP), is a control without enzymes.

전히 소멸되기에는 약 12시간 정도나 소요되었다. 이는, AL-protease 가 chymotrypsin 등과 같은 serine protease 이면서도 그 효소화학적 성질에 있어서는 종래의 serine protease 들²²⁾과는 다른 일면을 암시하였다.

3) AL-protease 와 DFP 의 결합비

AL-protease 와 DFP 간의 화학적 수식반응에 있어서 효소에 대한 DFP 의 결합량을 방사활성의 분석이 가능한 [³²P]-DFP 를 저해제로 사용하여 측정하였다. 즉, 화학적 수식반응 후, 뒤에서 서술하게 될 조제용 PAG-전기영동에 의하여 정제된 반응 생성물([³²P]-DIP-AL-protease) 중의 [³²P] 결합량을 그 단백질량과 [³²P]의 방사활성치로부터 산출하므로써 저해반응에 있어서 효소에 결합하는 DFP 의 mole 비를 추정하였다. 그 결과 <Table 2>에서와 같이 효소 1 mole 에 대해서 [³²P] 0.814 mole 이 결합하였음을 나타내었다. 이러한 ³²P의 결합량으로부터 AL-protease 1 분자에 적어도 1 분자의 DFP 가 결합하여 효소활성이 저해되는 것으로 추정되었다²¹⁻²³⁾.

Table 2. Calculation of moles of ³²P incorporated into AL-protease on the modification with ³²P-labelled DFP

Protein	Radio activity of ³² P	³² P/Protein, moles
1.87 mg	2,504×10 ³ cpm	
46.2 nmoles*	37.6 nmoles**	0.814

*: Calculated from the molecular weight of AL-rotease, 40,500

** : Calculated from the radio activity of 1 nmole of ³²P, 66,950 cpm

Abbreviation: DFP, diisopropylphosphorofluoridate

Table 3. Effect of modification with DFP on the proteolytic and the lytic activity of AL-protease

Either protease (50 μg), zymolyase (50 μg) or both enzyme were incubated in 5 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) containing casein or yeast cell as substrates at 30 °C for 40 min.

Enzymes	Reaction mixture		Enzyme activity(%)	
	Isopropanol	(%)	Proteolytic	Lytic
AL-protease		0	100	14.5
AL-protease		5	100	11.6
DIP-AL-protease*	0	0	0	0.0
DIP-AL-protease+ Zymolyase**	0	0	0	2.9
AL-protease+ Zymolyase	0	100	100	100.0
AL-protease+ Zymolyase	5	100	100	92.7
None+ Zymolyase	0	0	0	5.8

*: AL-protease diisopropylphosphorylated (DIP) with diisopropylphosphorofluoridate (DFP) at 20°C for 12 hour

** : Yeast cell wall lytic endo-β-1, 3-glucanase from *Arthrobacter luteus*

4) 반응 생성물의 효소활성의 검토

DFP 와의 반응에 의해서 protease 활성이 완전히 저해된 12 시간의 반응 생성물로부터 과잉의 DFP 를 투석에 의하여 제거시킨 DIP-AL-protease 에 있어서 그 용해 촉진활성의 저해된 정도를 관련물질의 배합을 다르게 구성한 여러가지 반응액을 사용하여 조사하였다. 그 결과, Table 3에서와 같이 DIP-AL-protease 의 단일 효소만으로는 protease 나 용해활성이 조금도 검출되지 않았으나, DFP 의 저해작용을 받지 않은 시료에서는 정상적인 효소활성이 관찰되

었다. 여기에서 DIP-AL-protease+zymolyase의 시료에 약 3% 정도의 용해활성이 검출되었는데, 이것은 DIP-AL-protease가 아닌 zymolyase로 부터 유래한 것임을 알 수 있었다. 또한, 반응액 중 DFP의 용매인 isopropanol 5% 정도의 농도는 AL-protease의 casein에 대한 분해에는 아무런 영향을 미치지 않았으나, AL-protease 및 zymolyase의 용해활성에 대하여서는 미약하나마 그 용해작용을 방해하는 것으로 나타났다.

한편, 저자 등은 전보²⁾에서 SH기 환원시약인 Na₂SO₃나 β-mercaptoethanol이 zymolyase의 용해능을 상승시키는 것으로 보고한 바 있었으나, 본 실험에서 zymolyase와 AL-protease의 협동에 의한 용해상의 상승효과도 상기의 환원제와 같은 수준이었거나, 그 이상의 정도로 추정되었다. 이 밖에, Table 3에 제시된 실험결과 등은 AL-protease의 용해 촉진작용의 메카니즘을 구명하기 위한 별도의 실험결과³⁾와도 일치하는 것으로, 이에 관한 구체적인 언급은 추후의 보고⁴⁾에서 따로 할 예정이다.

2. 다당류 가수분해 활성의 점정

1) 환원당 측정법에 의한 점정

이제까지의 실험으로 zymolyase 조효소 중의 용해 촉진인자의 정체는 열기성 serine protease 임이 밝혀졌으나, 종래 용해 촉진물질로서 주목을 받았던 phosphomannase^{10,11)}를 비롯하여, β-1,6-glucanase,¹²⁾ mannanase¹³⁾ 등에도 용해작용을 가진 것으로 보고

되고 있었기 때문에, 이러한 다당류 가수분해 효소가 AL-protease의 정제 표준품에 혼재하여 있을 가능성을 효모세포벽의 구성물질이 되고 있는 각종 다당류 기질을 사용하여 검토하였다.

AL-protease 0.5 mg을 각각의 기질에 120분 동안 반응시켜 유리되는 환원당을 30분 간격으로 측정하여, zymolyase에 대한 동일한 실험결과와 비교하였다. 그 결과, Table 4에서와 같이 AL-protease는 zymolyase와는 다르게 그 어느 다당류 기질에 대해서도 효소활성의 검출이 전혀 인정되지 않았다.

2) 겔 여과 및 점도측정에 의한 phosphomannase 활성의 점정

일찌기 Lampen 등¹⁰⁾과 같이 현저한 용해 촉진기능을 발휘하는 phosphomannase를 분리, 보고한 바 있었던 Nagasaki는 yeast phosphomannan을 기질로 하는 phosphomannase의 활성 점정에 있어서는 전술한 비와 같은 환원당의 측정결과만 가지고서는 효소활성의 검출에 어려움이 인정되므로, 환원당 측정법과 아울러 겔 여과법 및 점도 측정법을 병행, 검토하여야 한다고 지적¹⁴⁾하였다. 따라서, 시료 중의 phosphomannase의 검출 여부를 겔 여과법 및 점도 측정법에 의하여 재검토하였다.

먼저 Sephadex G-10 gel 여과(Fig. 2-A)의 수차례 반복에 의하여 모아진 정제 yeast phosphomannan의 동결건조품에 AL-protease를 반응시켜, 반응액의 점도변화를 Ostwald 점도계로 측정(Fig. 3)하였

Table 4. Detection of polysaccharide-hydrolytic activity from the preparation of AL-protease and zymolyase*

Enzymes (0.5 mg) was incubated in 2.2ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) at 30°C for 120 min, and the amount of reduced sugar in the hydrozate was determined in the mixture containing 0.9 mM ferricyanide at O.D. 420nm.

Substrates		Hydrolytic activity	
Kinds	Main linkage type	AL-protease	Zymolyase
Yeast glucan	β-1, 3-, β-1, 6-	—	+
Pachymann	β-1, 3-	—	—
CM-pachymann	β-1, 3-	—	±
Luteos	β-1, 6-	—	—
Glycol-chitin	β-1, 4-	—	—
Yeast mannan	(α-1, 6- and α-1, 2-, α-1, 3-	—	—
Yeast phosphomannan	- ¹ M ² -P- ⁶ M ¹ -	—	—

*: Since zymolyase is an endo-β-1, 3-glucanase with the same origin, *Arthrobacter luteus*, as AL-protease and the similar yeast cell wall lytic function to that protease, it was participated in this experiment to compare to the one on the polysaccharide-substrate specificity.

효소학적 성질 및 활성 아미노산 잔기의 검색

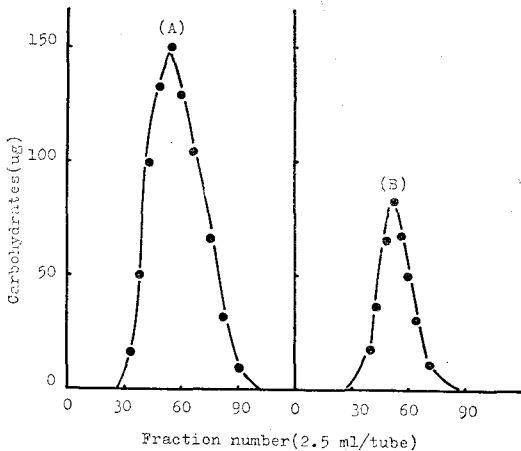


Fig. 2. Elution profiles of phosphomannans by the gel filtration (A) and re-gel filtration (B) on Sephadex G-10.

Experimental condition: column size, 1.5×150 cm; eluent, deionized water; flow rate, 3.2 ml/cm²/hr; carbohydrates analysis, phenol-sulfuric acid method

(A), Phosphomannan (10 mg) was dissolved in 4 ml of 5mM tris-HCl buffer(pH 7.5) containing 0.1 M KCl, and applied on the column.

(B), The phosphomannan (3 mg) obtained by the first gel filtration(A) was incubated in 3 ml of the same buffer containing AL-protease (4 mg) at 30 °C for 6 hours before re-gel filtration.

다. 이어서, 반응액을 점도계로부터 빼내어, 다시 겔 여과를 동일한 요령으로 실시한 결과를 Fig. 2-B에 제시하였다. 그 결과, Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 효소반응의 전후에 있어서 기질의 겔 여과상의 용출패턴 및 점도의 변화는 전혀 인정되지 않았다. 이 실험에서 효소의 농도와 반응시간이 충분하였음에도 이러한 결과를 얻게 된 것으로 미루어 보아, 정제 된 AL-protease의 동결건조품 중에 phosphomannase가 혼재하여 있을 가능성은 인정되지 않았다.

따라서, 이제까지의 실험결과를 종합하여 본다면, zymolyase의 조효소 중에서 발견, 분리된 AL-protease의 동결건조품은 PAG-전기영동적으로도, 효소학적으로도 균일하게 정제된 물질이며, *Sacch. saké* 세포의 용해를 촉진시키는 염기성 serine protease임이 입증된 셈이었다.

3. pH, 온도 및 금속이온의 영향

전항까지의 실험으로 AL-protease의 이화학적인

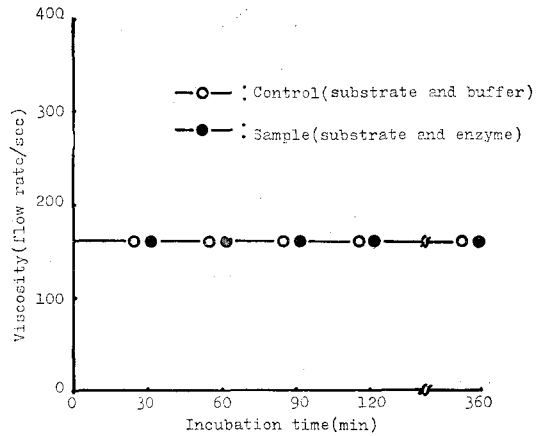


Fig. 3. Detection of phosphomannan activity in the preparation of AL-protease by the viscometric method.

The reaction mixture (3 ml) containing 4mg of AL-protease and 5mg phosphomannan obtained by the gel filtration (Fig. 2-A) were incubated in 5 mM tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.1 M KCl at 30±0.5 °C for 6 hours.

The changes of the substrate on viscosity by the enzymatic hydrolysis were expressed in flow rate time of it in the Ostwald viscometer.

균일성이 입증되었으므로, 본 실험에서는 AL-protease의 활성에 미치는 몇 가지 요인의 영향에 대하여 조사하였다.

1) pH

AL-protease의 casein에 대한 최적 pH는 10.5 부근으로 관찰되었으나 (Fig. 4-A), 6.5 M 변성 hemoglobin에 대해서는 pH 9.0이었다

한편, AL-protease는 Fig. 4-B에서와 같이 pH 5~11 사이의 비교적 넓은 영역에 걸쳐서 안정하였다.

2) 온도

AL-protease는 65 °C 부근에 효소작용의 최적 온도를 가지고 있었으며 (Fig. 5-A), 그 효소 활성은 60 °C까지는 거의 감소되지 않았으나, 70 °C 이상에서는 급격히 소실되었다.

이상과 같이, AL-protease의 최적 pH 및 최적 온도는 종래의 protease 들¹⁵⁾의 그것에 비하여 비교적 높은 알카리 영역 및 고온에 속하는 것으로서, 이 낮은 역시 용해작용에 관여하는 것으로 보고된

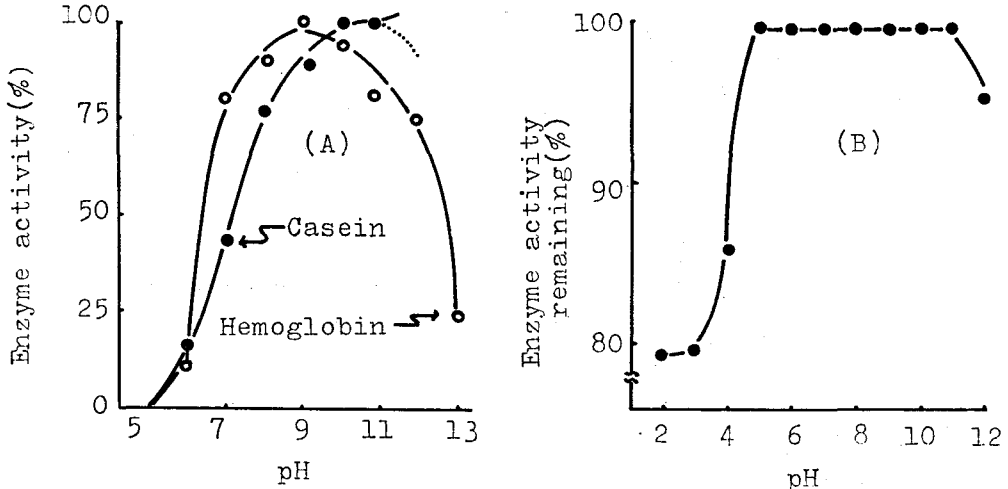


Fig. 4. Effect of pH on activity(A) and on stability(B) of AL-protease.

(A), Protease (50 μ g) activity was measured in the 6ml 0.1 M indicated buffer (pH2~11) at 30 °C for 10 min using casein and 6.5 M urea-denatured hemoglobin as the substrate.

(B), After incubation of the enzyme (50 μ g/0.25 ml) in the 50 mM indicated buffer (pH 2~11) at 7 \pm 0.5 °C for 24 hours, the enzyme activity to casein was measured in the reaction mixture to being adjusted it's pH to 10 at 30 °C for 30min.

Obata¹⁶⁾, Arai¹⁷⁾, Okazaki¹⁸⁾ 및 Kitamura¹⁹⁾ 등의 protease들의 최적 pH 및 최적온도와 거의 일치하는 범위이었다. 이와 같이 용해작용에 관여하는 protease들이 비교적 높은 pH와 고온에서 그 기능을 최대로 발휘하는 현상은 이러한 높은 알카리영역의 pH 조건과 고온도에서 효모세포벽의 구조물이 보다 용이하게 취약화¹³⁾되기 때문인 것으로 추정되었다.

3) 금속이온

일반으로 효소활성은 금속이온에 의하여 활성화되거나, 불활성화는 영향을 받는 경우가 많으므로, AL-protease의 활성화에 미치는 각종 금속이온 및 EDTA의 영향을 조사하였다. 그 결과(Table 5), AL-protease는 Mg⁺⁺ 및 Co⁺⁺이온 등의 중금속에 의하여 그 활성이 약간 저하되고는 있었으나, 그 정도는 대체로 16% 이내로 미미하였으며, EDTA에 의한 활성의 감소는 전혀 인정되지 않았다. 따라서, AL-protease는 그 활성의 발전에 금속이온이 관여하지 않는 효소로 추정되었다.

4. AL-protease의 활성장기의 검색^{21~23)}

AL-protease는 앞의 실험(Table 1)에서 검색된 저해제의 양상으로 보아, 그 활성부위에 serine이 존재하는 protease일 가능성이 시사되었으므로, 이

Table 5. Effect of metal ions and EDTA on AL-protease activity

The enzyme (50 μ g) was preincubated in the 1 mM indicated metal ions except for the EDTA, 10 mM, at room temperature for two hours, and then that activity was measured in the 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) using casein as substrate. All the metal ions were as chloride salts.

Metal ions	Activities remaining
None	100(%)
Na ⁺	100
K ⁺	98
Ag ⁺	88
Ca ⁺⁺	98
Mg ⁺⁺	84
Zn ⁺⁺	100
Cu ⁺⁺	100
Mn ⁺⁺	89
Co ⁺⁺	84
Hg ⁺⁺	95
Pb ⁺⁺	88
Fe ⁺⁺	100
EDTA*	100

*: Ethylenediaminetetraacetic acid

하의 실험에서 활성부위에 존재하는 serine 장기의 검색, 동정을 실시하였다.

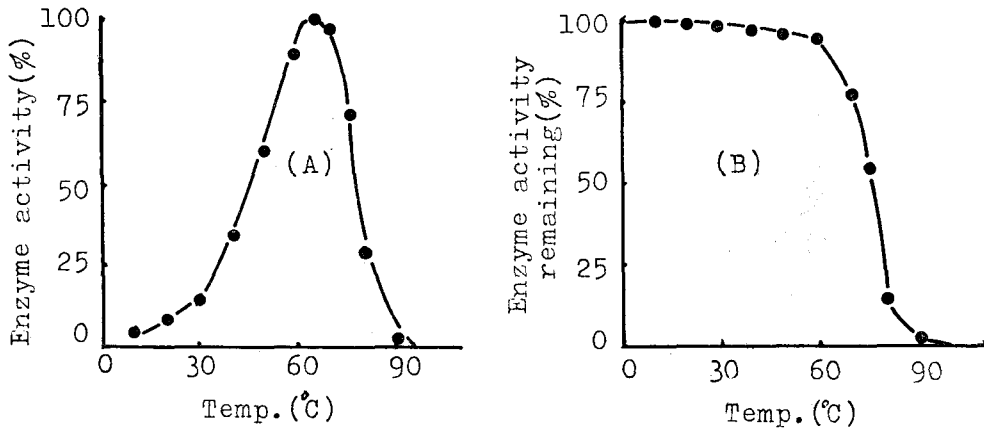


Fig. 5. Effect of temperature on activity (A) and on stability (B) of AL-protease.

(A), Protease (50 μg) activity was measured in the 50 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.0) at indicated temp. (10-90°C) for 10 min using casein as the substrate.

(B), After preincubation of the enzyme (50 μg) in the 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) at the indicated temp. (10-90°C) for 15 min, the mixture was instantly cooled to below 20°C in crushed-ice water, and then that activity was measured under standard condition (pH 10, 30°C, 30 min).

1) [³²P]-DIP-AL-protease의 정제

AL-protease의 조효소 (2.75mg)를 [³²P]-DFP에 의하여 화학적 수식반응을 실시한 후, 반응 생성물 중의 [³²P]-DIP-AL-protease를 분리, 정제하기 위하여 투석이 완료된 생성물에 대하여 조제용 PAG-전기영동을 실시하였다.

그 결과(Fig. 6), 영동의 용출패턴은 미수식 상태의 동일한 시료에 대하여 시행하였던⁴⁾ 바와 같은 모습을 나타내었고, 검출된 4개의 획분 중 미수식 상태에서는 protease 활성이 검출된 바 있었던⁴⁾ P-3과 P-4에 [³²P]가 결합하고 있음이 확인되었다. 그 중, 용해 활성획분인 P-3의 중심부분(fraction No. 63-73)만을 수집하여 차후의 실험에 제공하였으며, 이 부분은 분석용 PAG-전기영동적으로 전보⁴⁾에서 이미 제시하였던 바와 같은 단일 밴드를 나타내고 있었기 때문에 영동상의 제시는 약하기로 한다.

한편, 이 실험에서 단백질의 회수율은 약 98%이었고, 용출된 전 획분에 대한 P-3의 비율은 약 75%이었다. 이러한 실험결과 등은 미수식 상태의 AL-protease의 조효소에 대한 동일한 실험결과⁴⁾와도 잘 일치하고 있었으며, 다만 DFP의 화학적 수식 작용에 의하여 P-3의 protease 활성과 아울러 용해활성이 완전히 상실되었을 뿐이었다.

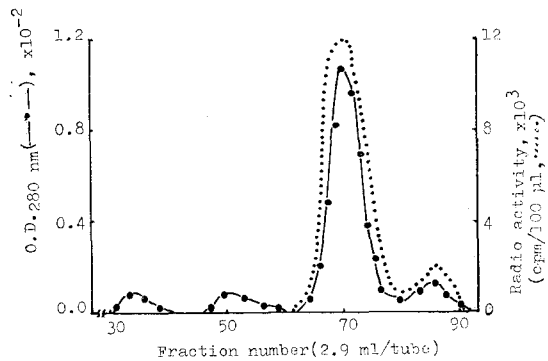


Fig. 6. Elution profile of ³²P-DIP-AL-protease fraction on preparative PAG-electrophoresis

The ³²P-diisopropylphosphorylated (DIP) AL-protease fraction, resulting from the modification of the partially purified preparation of AL-protease with ³²P-labelled DFP, was dissolved in 1.5 ml of 60 mM KOH-acetic acid buffer(pH 4.3) containing 10% sucrose.

The preparative polyacrylamide gel (PAG)-electrophoresis was conducted with current of 8 mA, 190 V for 4 hours and flow rate of 40ml/hr under continuous and cooling system. ³²P-radio activity of the eluent was determined with liquid scintillation counter.

2) [³²P]-방사활성의 SDS-PAG-전기영동 겔내의 분포

앞의 조제용 PAG-전기영동에 의한 정제실험(Fig.

6)에서 AL-protease가 $[^{32}\text{P}]\text{-DFP}$ 에 의하여 바라는 바와 같은 화학적 수식을 받아 그 활성이 저해된 것으로 관찰되었으나, 과연 DFP가 목표로 하는 효소 단백질에 어김없이 결합하였는가는 다시 확인할 필요가 있었다. 따라서 정제된 사료의 SDS-PAG-전기영동의 겔에 있어서 단일 밴드로 검출된 부분의 단백질에 대한 수식상태를 점검하였다. 그 결과(Fig. 7), 전기영동 겔내의 단백질 분포와 검출된 방사활성의 분포가 모두 $R_f=0.43$ 의 지점에서 메인 피크가 관찰되었다. 이는 $[^{32}\text{P}]$ 의 방사활성과 단백질의 분포가 잘 일치하고 있음을 나타내고 있는 것으로, 화학적 수식이 의도대로 이루어졌음을 시사하는 것이었다. 다만 메인 피크 이외에도 미소한 피크가 관찰되기는 하였으나, 이는 전기영동 과정중 단백질의 일부가 자가소화된 결과로 추정되었다.

3) Dowex 이온교환 크로마토그래피²³⁾

$[^{32}\text{P}]\text{-DFP}$ 와 AL-protease 조효소의 반응에서

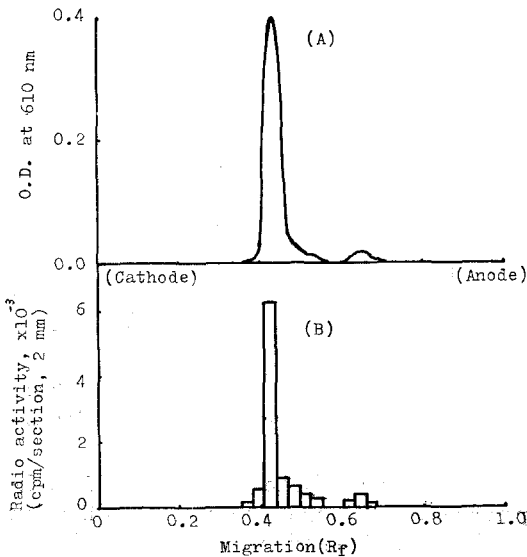


Fig. 7. Densitometric profile (A) and ^{32}P -radio activity (B) of the purified ^{32}P -DIP-AL-protease on the SDS-PAG-electrophoresis.

10 μg of ^{32}P -AL-protease was applied on the SDS-gel column, and the electrophoresis was carried out at pH 7.5 in 10% polyacrylamide gel containing 1% sodium dodecylsulfate (SDS). After being detected the electrophoretic profile of the gel with densitometer at O.D. 610 nm, that distribution of ^{32}P -radio activity over the gel was determined using the sections of the gel cutted a length of 2 mm.

언어진 반응 생성물 $[^{32}\text{P}]\text{-DIP-AL-protease}$ 는 조제용 PAG-전기영동에 의하여 정제되었으나, 그로부터 $[^{32}\text{P}]\text{-phosphorylserine}$ 을 분리하기 위하여 정제된 생성물을 염산으로 가수분해하였고, 가수분해물을 Dowex column에 가하여 이온교환 크로마토그래피를 실시하였다. 그 결과, (Fig. 8)에서와 같이 $[^{32}\text{P}]$ 의 방사활성이 검출된 두 개의 피크가 나타났다, 이 중 P-1은 column에 미흡착된 상태로 곧바로 흘러내린 획분으로서, 다투린으로 정색되지 않는 것으로 보아, P-1은 산 가수분해에 의해서 반응 생성물로부터 유리된 인산의 획분으로 추정되었다. 그러나, P-2는 다투린에 의한 정색곡선과 $[^{32}\text{P}]$ -방사 활성의 검출곡선이 잘 일치하고 있어, P-2는 $[^{32}\text{P}]\text{-아미노산}$ 을 함유한 획분으로 추정되었다.

한편, 이 크로마토그래피에 있어서 양획분의 방사활성의 비율은 각각 60.5와 29.1%이었다.

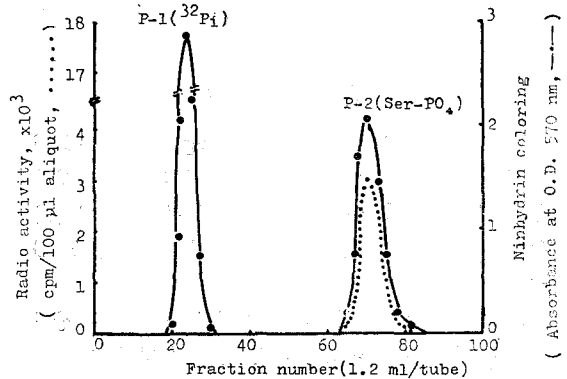


Fig. 8. The chromatogram of acid hydrozates of the ^{32}P -DIP-AL-protease on a column of Dowex 50 W ($\times 8$)

The hydrozate, resulting from the hydrolysis of the ^{32}P -DIP-AL-protease (640 μg) with 2 N HCl for 16 hours at 105°C, was applied on a Dowex 50 W ($\times 8$) column (1.0 \times 67 cm) equilibrated with 10 mM HCl to separate the ^{32}P -phosphorylserine in the acid hydrozates.

The fraction was leuated with 10 mM HCl at a flow rate of 20ml per hour, and its ^{32}P -radio activity and ninhydrin coloring was determined with liquid scintillation counter and spectrophotometer at O.D. 570 nm, respectively.

4) 교압 여지 전기영동에 의한 $[^{32}\text{P}]\text{-phosphorylserine}$ 의 동정

전향의 실험에 의해서 반응 생성물의 산 가수분해물로부터 분리된 $[^{32}\text{P}]\text{-아미노산}$ 획분의 물질은 이

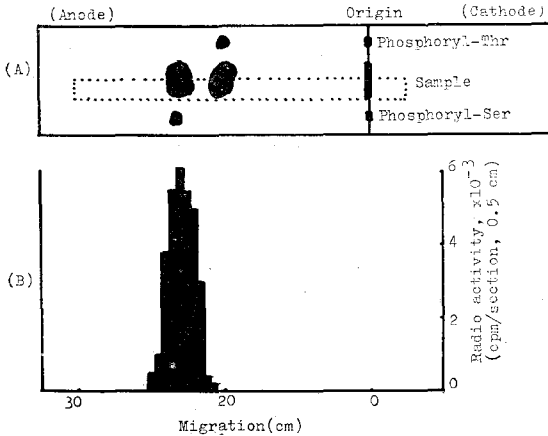


Fig. 9. Identification of the ^{32}P -labelled phosphorylserine in the acid hydrozates of ^{32}P -DIP-AL-protease by the high-voltage paper electrophoresis(A) and that it's radio-activity(B).

^{32}P -labelled phosphorylserine fraction, which was fractionated from the acid hydrozates of the ^{32}P -DIP-AL-protease by the Dowex column chromatography (Fig. 8, P-2), was pooled and dried by rotaly evaporator. The residue was mixed with 15 mg nonlabelled phosphorylserine and phosphorylthreonine as a identical marker.

The electrophoresis was carried out on the Whatman paper 3 MM (10.5×56 cm) with a current of 200 mA, 2,000 V at 40 °C for 150min under pyridine-acetic acid-water (1 : 10 : 289, v/v/v) buffer system as a developer and cooling system.

In order to count the radio-activity, the strips along the indicated dot line was cutted out from the paper, and it was recutted a size of 0.5 cm width to fit into the test tube.

The coloring of that remainder by ninhydrin was developed at 25 °C for 18 hours.

제까지의 실험경위로 보아 ^{32}P -phosphorylserine 으로 간주되었다.

그러나, 아미노산 중에서 특히 threonine 과 유사한 구조를 가지고 있는 serine 은 그 성질상 크로마토그래피에 있어서 threonine 과 거동을 같이하여 양자의 분리가 불충분하게 될 우려가 있었다²³⁾. 때문에 ^{32}P -phosphorylamino acid (P-2)의 획분에서 검출된 ^{32}P -방사활성이 ^{32}P -phosphorylserine 이나 ^{32}P -phosphorylthreonine 의 어느 일방이나 또는 그 양방에서 동시에 유래한 것인지 확인하기 위하여 ^{32}P -phosphorylamino acid 획분(No. 60~80)에 대하여 고압 여지 전기영동을 실시하였다. 그 결과(Fig. 9), 이 실험의 조건하에서는 phosphoryl-

serine 과 phosphorylthreonine 의 스포트는 충분히 분리되었고, 더욱이 ^{32}P -방사활성은 거의 모두 phosphorylserine 이 전가된 스포트로부터만 검출되었다. 즉, ^{32}P -phosphorylamino acid 는 ^{32}P -phosphorylserine 으로 판명되었다.

한편, 31.4 nmole 의 phosphorylserine 을 취하여 전향의 반응 생성물에 대한 가수분해 조건(재료 및 방법 10항 참조)과 동일하게 가수분해시킨 후, 아미노산 자동분석기에 의해서 그 잔존량을 상법²⁰⁾에 따라 측정 한 결과는 30.5%이었다. 이 잔존율은 앞서의 크로마토그래피 (Fig. 8)에서 검출된 ^{32}P -phosphorylamino acid 획분의 방사 활성백분율(29.1%)과 거의 동일한 것임을 알 수 있었다. 이것은 반응 생성물 중의 ^{32}P -phosphorylserine 이 전출한 가수분해의 조건하에서는 약 70% 정도가 파괴되고 있었음을 시사하는 것이었다.

이상의 실험결과 즉, ^{32}P -phosphorylamino acid 획분의 방사활성이 전부 ^{32}P -phosphorylserine 으로부터 유래되었다는 사실은 AL-protease 활성부위 중의 5serine 잔기가 ^{32}P -DFP 에 의하여 특이적으로 수식되고 있었음을 입증하는 것이었다. 따라서, AL-protease 는 예상했던 대로 활성잔기로서 serine 을 가지는 염기성 serine protease 이며, ^{32}P -DFP 와의 결합량으로부터 효소 1분자당 1 mole 의 활성 serine 잔기를 가진 것으로 추정되었다.

요 약

Zymolyase 조효소로부터 분리, 정제되었고, 효모 세포벽 용해 촉진물질로 밝혀진 바있는 *Arthrobacter luteus* 로부터 유래한 염기성 protease(AL-protease)의 효소학적 성질 및 활성 아미노산 잔기를 검색한 결과는 다음과 같다.

1. AL-protease 는 저해제 DFP 및 PMSF 에 의해서 그 protease 활성 및 용해 촉진활성이 동시에 완전히 소멸되었으며, 그 저해 반응속도는 chymotrypsin 에 대한 것에 비하여 대단히 완만하였다. 그 반응에서 AL-protease와 DFP 의 결합 mole 비는 1:1 로 추정되었다.

2. 정제된 AL-protease 의 동결건조품 중에는 종래 효모세포벽 용해반응에 관여하는 것으로 알려진 yeast phosphomannase 를 비롯한 다당류 가수분해 효소들의 활성은 그 어느 것도 인정되지 않았다.

3. AL-protease 의 casein 에 대한 최적 pH 및 최적온도는 pH 10.5 와 65 °C 이었고, 그 활성은 pH 5

~11 사이와 65°C 이하에서 안정하였다. 또한, AL-protease 의 활성에 미치는 여러가지 금속이온의 영향은 인정되지 않았다.

4. [³²P]-DFP 에 의하여 화학수식된 [³²P]-DIP-AL-protease 에 대한 활성부위의 아미노산 잔기를 검색, 동정하기 위하여 조제용 PAG-전기영동, SDS-PAG-전기영동, Dowex 이온교환 크로마토그래피 및 고압 여지 전기영동을 실시하였고, 그 결과, AL-protease 는 활성 부위에 1 분자당 1 mole 의 serine 잔기를 가지는 열기성 protease 로 밝혀졌다.

사 사

이 연구의 수행에 있어서 다량의 zymolyase 조효소를 제공하여 주신 일본 기린맥주주식회사의 종합연구소 및 Kitamura 박사께 깊이 감사한다.

문 헌

1. Kitamura, K., Kaneko, T. and Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **20**, 323 (1974)
2. 吳洪祿, 下田忠久, 船津 勝: 韓國食品科學會誌, **11**, 242(1979)
3. 吳洪祿, 下田忠久, 船津 勝: 韓國食品科學會誌, **12**, 254(1980)
4. 吳洪祿, 相蘭 泰生, 下田 忠久, 船津 勝: 韓國營養食糧學會誌, **12**, 387(1983)
5. Jansen, E. F., Nutting, M.D.F. Jang, R. and Balls, A. K.: *J. Biol. Chem.*, **179**, 189 (1945)
6. Schaffer, N. K., Schmet, L. Harshman, S. Engle, R. R. and Drisko, R. W. *J. Biol. Chem.*, **225**, 197(1957)
7. Hodge, J.E., and Hofreiter, B. T.: "*Method in Carbohydrate Chemistry*", ed. R. L. Whistler and M. L. Wolfrom, Academic Press, New York, **1**, 330(1962)
8. 萩原 文二: "酵素研究法", 赤堀 四郎 編(朝倉書店, 東京), **2**, 240(1956)
9. 吳洪祿, 船津 勝: 韓國營養食糧學會誌, **13**(1984)
10. Nagasaki, S., Neuman, N. P. Arnow, P. Schnable, L.D. and Lampen, J. O.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 158(1966)
11. William, L., McLellan, J.R. and Lampen, J. O.: *J. Bacteriol.*, **95**, 967(1967)
12. Rombout, F. M. and Phaff, H. J.: *Eur. J. Biochem.*, **63**, 121(1967)
13. 富永 嘉男, 長崎 龜: "溶菌酵素", 船津 勝, 鶴大典 編(講談社, 東京), 152(1977)
14. 長崎 龜: 私信(1977)
15. 赤堀 四郎(編): "酵素研究法"(朝倉書店, 東京) **2**, 237(1956)
16. Obata, T., Iwata, H. and Namba, Y. *Agric Biol. Chem.*, **41**, 2387(1977)
17. Arai, M. and Murao, S.: *Agric. Biol. Chem.* **41**, 2293(1977)
18. Okazaki, H.: *J. Ferment. Technol.*, **50**, 580 (1972)
19. Kitamura, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 963 (1982)
20. 高橋 禮子: "生化學實驗講座" **1**., 日本 生化學會 編(東京化學同人, 東京), 42(1976)
21. 高橋 健治: "生化學實驗法" **5**., 日本 生化學會 編(東京化學同人, 東京), 485(1975)
22. Walsh, K. A. and Wilcox, P. E.: "*Method in Enzymology*", ed. -in-chief S. P. Colowick and N. O. Kaplan(Academic Press, New York), **19**, *Proteolytic Enzymes*, ed. G.E. Permann and L. Lorand, 31(1970)
23. Schafter, N.K.: "*Method in Enzymology*", ed. -in-chief S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, **11** (*Enzyme Structure*, ed. C.H. W. Hirs), 702(1967)
24. Dreyer, W. J. and Bynum, E.: "*Method in Enzymology*", ed. -in-chief S. P. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, **11** (*Enzyme Structure*, ed. C. H.W. Hirs), 32(1967)