

Saccharomycopsis lipolytica Isocitrate Lyase의 정제와 성질

조 석 금

안양공업전문대학 식품영양학과

Purification and Properties of Isocitrate Lyase from *Saccharomycopsis lipolytica*

Cho Seok Gum

Department of Food and Nutrition, An Yang Technical
College, An Yang Kyeng ki, 171, Korea

Isocitrate lyase from crude extract of *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC44601 and MX9-11RX8 temperature-sensitive mutant was purified about 54 times and 87 times, respectively by ammonium sulfate fractionation, Toyo peal HW-55F gel filtration and DEAE-Cellulose ion exchange chromatography. The molecular weight of the purified isocitrate lyase from this yeast was estimated to be 230,000 by gel filtration on Sephadex G-200, and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that the enzyme consisted of four identical or similar subunits with a molecular weight of 59,000 and the enzyme showed optimum activity at pH 6.9.

Isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)는 유도성 anaplerotic 경로인 glyoxylate 회로의 지표 효소로서 중요하며 (1) 미생물이 아세트산과 같은 C₂ 화합물 또는 궁극적으로 C₂ 화합물로 전환되는 기질을 탄소원으로 생육할 때에는 TCA 회로의 중간체를 보충하기 위하여 glyoxylate 회로가 절대적으로 필요하게 된다(2~6). 이 회로는 곰팡이(7), 세균(8), 조류(9), 고등식물의 종자(10), 그리고 선충류(11, 12) 등에 존재한다고 알려졌고, 이들로 부터 isocitrate lyase는 정제되어 그 성질이 보고되었다.

온도감수성 변이는 일반적으로 missense 변이의 일종으로(13), 온도의 변화에 따라서 단백질의 생물학적인 활성이 변화하고 아미노산 잔기가 치환된 polypeptide 사슬을 생산한다고 생각되고 있다(14, 15, 16). 한편 효소의 기능을 유전적 결손에 의하여 조사할 때에는 변이에 의하여 생산된 효소 단백질의 성질을 야생형과 비교 조사함으로써 검정할 수 있으며 온도감수성 변이에 대한 연구는 이러한 유전적 연구 뿐만 아니라 발효생산, 육종법 등에도 응용될

가능성이 있다(13).

이런 점에서 필자는 전보(17)에서 온도감수성을 나타내는 MX9-11RX8 변이균주를 분리하여 그 특성을 보고한 바 있으며, 본 연구에서는 허용 온도에서 합성된 이 온도감수성 변이균주와 야생형 균주의 isocitrate lyase를 정제하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

야생형 균주로서 *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 44601과 온도감수성 변이균주로서 전보(17)에서 변이유발하여 분리한 MX9-11RX8 변이균주를 사용하였다.

완전배지와 최소배지는 Fink(18)의 합성배지를 사용하였다. 최소배지는 탄소원으로 glucose를 20 g/l 사용한 경우는 MM-glucose, 탄소원을 0.1 M potassium acetate를 대체한 경우는 MM-acetate로

Key words: Isocitrate lyase, *Saccharomycopsis lipolytica*

표시하였다(19).

효소의 정제

Isocitrate lyase는 Johanson(7) 등의 *Neurospora crassa* isocitrate lyase의 정제 방법에 준하여 다음과 같이 정제하였다. 조효소액의 조제로 부터 정제가 끝날때까지 반응 조작은 모두 약 4°C의 저온에서 행하였다.

조효소액의 조제 : 10l들이 Jar Fermentor (Marubishi Laboratory Equipment Co., LTD, MD-500)를 사용하며 5l의 MM-glucose 중 30°C pH 6.0에서 24시간 동안 통기배양(1 vvm, 3000 rpm)한 균체를 무균적으로 원심분리(4,000×g, 5분)하여 모으고 무균수로서 2회 세척한 후 5l의 MM-acetate(0.02% Adekanol 함유)에 현탁하고 5M acetic acid 용액으로 pH 6.5로 조절하면서 야생형 효모는 30°C, 온도감수성 변이균주는 23°C에서 12시간 동안 다시 통기배양하여 isocitrate lyase를 유도하였다. 유도한 세포는 원심분리로서 집균한 후 3% glycerol 함유하는 50 mM imidazole-HCl 완충액(50 mM imidazole-HCl, 12.5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1.0 mM EDTA-K, 1.0 mM dithiothreitol, pH 7.0)에 현탁하고 French press(大岳製作所, 日本)로서 평균 500 kg/cm²의 압력으로 2회 파쇄하고 원심분리(10,000×g, 20분)하여 그 상등액을 조효소액으로 하였다.

Ammonium sulfate 분획 : 조효소액에 (NH₄)₂SO₄를 0.5~0.75 포화농도가 되도록 첨가하고 효소 단백질을 침전물로 분획하여 20 mM imidazole-HCl 완충액(20 mM imidazole HCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA-K, 1 mM dithiothreitol, pH 7.0)에 용해시킨 다음 동일한 완충액으로 투석하였다.

Toyo Peal HW-55F gel filtration : Toyo Peal HW-55F column (Amicon회사, 3.2×32 cm)에 투석한 시료를 20 mM imidazole-HCl 완충액(pH 7.0)을 사용하여 20 ml/hr 유속으로 상승법에 의하여 흡착시키고 4.5 ml/씩 분취하여 isocitrate lyase 활성과 E₂₈₀에서 단백질 함량을 측정하고 효소활성 최대치의 50% 이상을 가지는 획분을 취하였다.

DEAE-Cellulose ion exchange chromatography: Gel 여과에서 얻어진 효소액을 20 mM imidazole-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형화한 DEAE-Cellulose column(3.2×50 cm)에 주입하고 흡착시킨 다음 이 완

충용액 600 ml와 0.3 M KCl을 함유하는 동일한 완충용액 600 ml와의 직선적 농도구배를 만들어 45 ml/hr의 유속으로 용출시켜 위와 같은 방법으로 얻은 후 한외여과기(Model UHP-62, Ultra filter-U-K-50, 東洋濾紙社, 日本)로서 농축하였다.

2회째의 DEAE-Cellulose column은 20 mM imidazole-HCl 완충액(pH 7.0)에 3.5 mM KCl, 50 mM KCl의 농도 순서대로 단계적으로 11 ml/hr의 유속으로 용출시킨 후 효소를 농축하고 glycerol을 최종농도 10%되도록 가하여 -20°C에서 보존하였다.

효소 활성 측정

Isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)의 활성은 Dixon과 Kornberg(20)의 방법에 의하여 측정하였다. 효소활성 단위는 실온에서 1분간 1 mmol을 형성할 수 있는 양을 1 unit로 표시하였다.

단백질 농도 측정

Lowry법(21)과 자외선 부위의 흡광도를 사용하였다.

KCl 농도 측정

KCl 농도는 conductivity meter(MS 機器, Type CD-35 M-II型)로서 측정하였다.

전기영동

Sodium dodecylsulfate(SDS) polyacrylamide gel 전기영동(22)은 disc형 또는 slab형 gel 영동장치를 사용하였다. Subunit 분자량은 Weber와 Osborn(23)의 방법에 따라 0.1% SDS를 함유하는 12.5% polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하였고, gel의 농도측정은 Chromatoscaner(Model CS-910, 日本 島津製作所)를 사용하였다. 표준단백질은 cytochrome의 monomer(MW, 12,400), dimer(MW, 24,000), trimer(MW, 37,000), tetramer(MW, 49,000), hexamer(MW, 74,000)를 사용하였다.

Gel filtration에 의한 분자량 측정(24)

0.1 M KCl 용액을 함유하는 20 mM imidazole-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형화한 Sephadex G-200 column(1.6×90 cm)에 정제효소와 각 표준단백질 혼합액을 주입시키고 4 ml/hr 유속으로 2 ml/씩 분취하였다. 사용한 표준물질 blue dextran(E₆₂₅), ferritin(E₄₀₀), bovine serum albumin(E₂₈₀), egg albu-

Table 1. Summary of the purification of isocitrate lyase from ATCC 44601 and MX9-11RX8 strains.

Strain	Step	Activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Recovery (%)
ATCC 44601	Crude ex.	552	2768	0.20	100
	Ammonium sulfate	472	1162	0.41	85.5
	Toyo Peal	346	583	0.59	62.7
	1st DEAE	154.6	14.95	10.34	28.0
	2nd DEAE	59.6	5.51	10.82	10.8
MX9-11RX8	Crude ex.	244	3194	0.076	100
	Ammonium sulfate	172	841	0.205	70.1
	Toyo Peal	132	255	0.518	54.1
	1st DEAE	74.4	10.30	7.22	30.5
	2nd DAEA	15.4	2.32	6.64	6.3

Abbreviation: Crude ex. crude extract; Ammonium sulfate, ammonium sulfate fractionation; Toyo Peal, gel filtration (Toyo Peal HW-55F); DEAE, ion exchange chromatography (DEAE-Cellulose).

min(E_{230}), chymotrypsinogen A (E_{230}), cytochrom C (E_{412}) 및 dinitrophenyl alanine (E_{400})의 농도는 흡광도의 측정에 의하여 구하였다.

결과 및 고찰

효소정제

야생형 균주 ATCC 44601과 온도감수성 변이균주 MX9-11RX8의 isocitrate lyase는 MM-acetate 배지에서 유도한 균체를 사용하여 정제하였으며 정제과정의 결과를 Table 1에 나타내었다.

MM-acetate에서 유도한 ATCC 44601 균주의 세포는 MX9-11RX8 변이균주에 비하여 효소 비활성은 약 2.6배로서 전보(17)의 MX9-11RX8 변이균주의 조추출액이 야생형 균주에 비하여 효소의 활성을 85%까지 회복한 것과는 상당한 차이가 있다. 이는 다음 정제를 위한 효소의 보존중 활성의 일부가 실활된 것으로 생각된다. 효소의 최종 정제제품은 비활성이 10.8 U/mg로서 조추출액으로부터 54배 정제되었고 회수율은 10.8%이었으며, MX9-11RX8 변이균주 효소는 비활성이 6.6 mg/mg으로 87배 정제되었고 회수율은 6.3%이었다. 그러나 단계적 농도구배 DEAE-Cellulose chromatography 후 비활성이 반대로 저하한 것은 정제과정 중 효소단백질의 일부가 실활한 것으로 생각된다. 한편 ATCC 44601 균주와 MX9-11RX8 변이균주의 효소는 각 정제과정에서 같은 양상을 나타내었다. 즉 두 균주의 효소활성은 DEAE-Cellulose column에서 모두 3 mM의 이온강

도에서 용출되기 시작하여 48 mM KCl 농도에서 단일 peak를 형성하였다.

각 정제과정의 단백질 분획액을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동한 결과 Fig. 1 (lane 5, 10)에서 보는 바와 같이 분자량 59,000 부근에서 거의 균일한 단일 band를 나타내었다. 그러나 단백질의 두꺼운 band외에 그보다 영동속도가 약간 빠른 얇은 band가 보였다. 이것은 gel 중에 ammonium persulfate의 산화를 받아 band가 나누어진 것으로 보인다. 그러므로 전기영동 전에 2 mM β -mercaptoethanol을 함유하는 완충액 중에서 예비통전하는 등의 조건(25, 26)이 필요하다고 생각된다.

정제효소의 일반적 성질

Isocitrate lyase의 분자량: ATCC 44601 균주와 MX9-11RX8 변이균주의 정제효소를 SDS-disc gel 전기영동한 결과 Fig. 2의 A에서 보는 바와 같이 두 효소 모두 59,000이고 native enzyme의 분자량을 측정하기 위하여 야생균주의 정제효소를 Sephadex G-200 gel filtration한 결과는 Fig. 2의 B와 같이 분자량 230,000을 나타내는 K_{av} 값 0.28 부근에서 약 80%의 회수율로서 단일 peak를 나타내며 용출되었다.

본 정제효소의 subunit 분자량 59,000은 세균(8)의 48,000과 곰팡이(7) 및 고등식물 종자(10)의 67,000의 중간 정도의 크기이며 이들 native enzyme 분자량은 각각 206,000과 27,000 및 264,000으로써 모두 tetramer로 보고되어 있다. 한편 선충류인

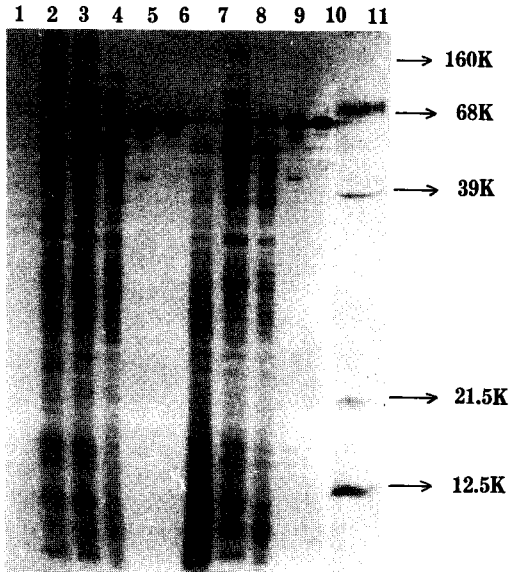


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purification steps of isocitrate lyase from ATCC 44601 and MX9-11RX8 strains.

Samples from ATCC 44601 are in lanes 1 to 5; Samples from MX9-11RX8 are in lanes 6 to 10. The purification steps were: crude extract (lanes 1 and 6), ammonium sulfate fractionation and dialysis (lanes 3 and 8), DEAE-Cellulose chromatography with KCl concentration gradient (lanes 4 and 9), second DEAE-Cellulose chromatography with stepwise increase in KCl concentration (lanes 5 and 10). Lane 11 is the calibration proteins for molecular weight, whose values are shown at the right of gel.

Tubertia aceti(11)의 subunit 분자량은 123,000으로 역시 tetramer로 보고되었다. 따라서 이 효모의 isocitrate lyase도 다른 생물종과 마찬가지로 같거나 비슷한 subunit로 구성된 tetramer인 것으로 추측된다.

최적 pH: 효소활성에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위하여 pH를 달리한 조건하에서 효소활성을 측정한 결과는 Fig.3과 같이 ATCC 44601 균주와 MX9-11RX8 변이균주 모두 pH6.9 부근의 30°C, 50 mM imidazole-HCl 완충액에서 최적작용 pH를 나타내었다.

이것은 세균인 *Pseudomonase indigofera*(8)의 7, 조류인 *Chlorella pyrenoidosa*(9)의 pH7.6, 고등 식물 종자인 *Linum usitatissimum*의 pH7.5 및 선충류인 *Turbartrix aceti*의 pH7.6보다는 낮았지만 pH6.8에서 최적작용 pH를 나타내는 곰팡이인 *Neurospora crassa*(7)의 isocitrate lyase와 비슷한

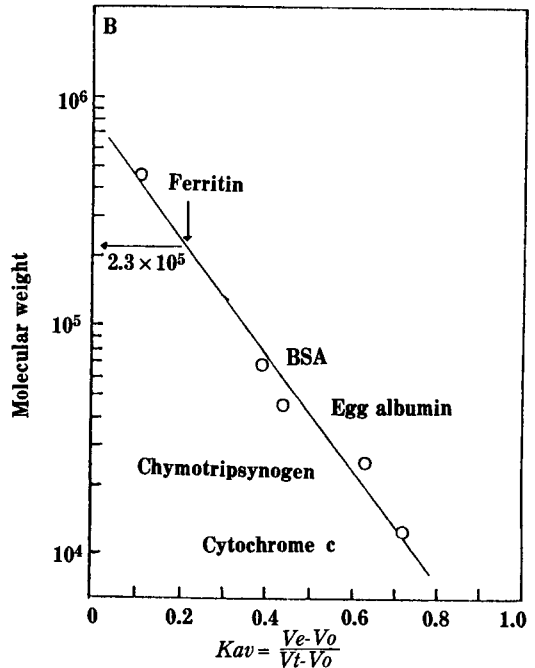
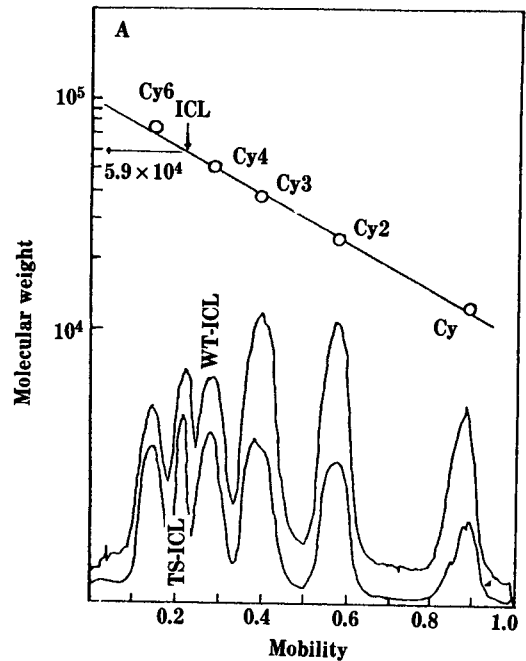


Fig. 2. Estimation of the molecular weight of isocitrate lyase.

Figure A show plot of the standards after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified ICL of wild and temperature-sensitive mutant type strains, and the inset show densitogram. Figure B show plot of the K_{av} values of the wild type purified ICL and the standard proteins on a Sephadex G-200 column vs thier molecular weights.

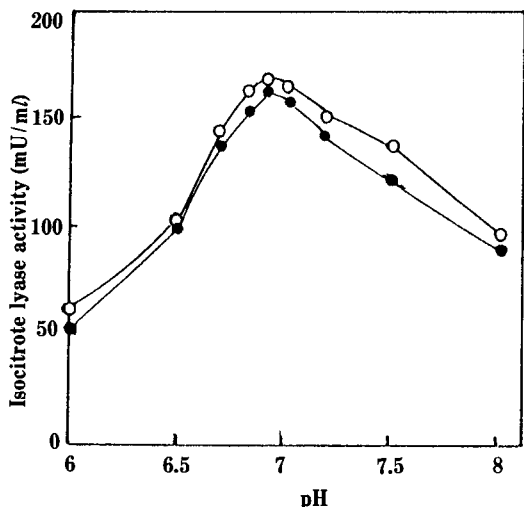


Fig. 3. Effect of pH on the isocitrate lyase activity of ATCC 44601 and MX9-11RX8 strains.

Symbols; ATCC 44601 (—●—), MX9-11RX8 (—○—).

성질을 나타내었다.

요 약

Saccharomyces lipolytica ATCC 44601 과 MX9-11RX8 온도감수성 변이균주의 isocitrate lyase 는 조추출액을 ammonium sulfate 분획, Toyo Peal HW-55F gel filtration, DEAE-Cellulose ion exchange chromatography 등의 방법에 의하여 각각 54배, 87배 분리 정제되었다.

정제효소의 subunit 분자량은 59,000이고 Sephadex G-200 gel filtration에 의한 native enzyme 은 230,000이므로 이 효소의 isocitrate lyase는 같거나 비슷한 subunit 4개로 구성된 tetramer이며, 최적 pH는 6.9이었다.

참고문헌

1. Laporte, D.C., K. Walsh, D.E. Koshland, Jr.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 14068 (1984)
2. Kornberg, H.L.: *Biochem. J.*, **99**, 1 (1966)

3. Ashworth, J.M., H.L. Kornberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 383 (1964)
4. Vanderwinkel, E., M. De vieghere: *Eur. J. Biochem.*, **5**, 81 (1968)
5. Kornberg, H.L., N.B. Madsen: *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 651 (1957)
6. 田口正明, 香月裕彦: 蛋白質 核酸 酵素, **22**, 1712 (1977).
7. Johanson, R.A., J.M. Hill, B.A. McFadden: *Biochem. Biophys. Acta*, **364**, 341 (1974)
8. McFadden, B.A., G.R. Rao, A.L. Cohen, T.E. Roche: *Biochemistry*, **7**, 3574 (1968)
9. John, P.C.L., P.T. Syrett: *Biochem. J.*, **105**, 409 (1967)
10. Khan, F.R., M. Saleemuddin, M. Siddigi, B.B.A. Mcfadden: *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 13 (1977)
11. Reiss, U., M. Rothstein: *Biochemistry*, **13**, 1796 (1974)
12. Colonna, W.J., B.A. McFadden: *Arch. Biochem. Biophys. Acta*, **96**, (1965)
13. 百瀬春生: 日醸工, **56**, 592 (1978).
14. Smith, D.H., J. King: *J. Mol. Biol.*, **145**, 653 (1981)
15. Jarvik, J., D.B. Bostein: *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 2046 (1973)
16. Suzuki, D.: *Science*, **170**, 695 (1970)
17. 조석금: 한국산업미생물학지 **15**, 408 (1987)
18. Fink, G.R.: *Methods Enzymol.*, **17A**, 59 (1970)
19. Matsuoka, M., Y. Ueada, S. Aiba: *J. Bact.*, **144**, 92 (1980)
20. Dixon, G.H., H.L. Kornberg: *Biochem. J.*, **72**, 3 (1959)
21. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1970)
22. Laemli, U.K.: *Nature (London)*, **227**, 680 (1970)
23. Weber, K., M. Osbon: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
24. Andrews, P.: *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965)
25. Johanson, R.A., J.M. Hill, B.A. McFadden: *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 327 (1974)
26. Mitchell, W.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **147**, 171 (1967)