

Saccharomycopsis lipolytica isocitrate lyase의 Kinetic 분석

조 석 금·정 동 효*

안양공업전문대학 식품영양과, *중앙대학교 식품가공학과

Kinetic Analysis of Isocitrate lyase from *Saccharomycopsis lipolytica*

Seok-Gum Cho and Dong-Hyo Chung*

Department of Food and Nutrition, An Yang Technical College, An Yang, Kyung-Ki Do

*Department of Food Technology, Chungang University, Seoul, Korea

Abstract

The analysis of condensation and cleavage reaction was carried out at 30°C and pH 7.0 with purified isocitrate lyase from *Saccharomycopsis lipolytica* ATCC 44601. The K_m values for condensation reaction of glyoxylate and succinate were 0.06 and 0.21 mM, respectively. In the cleavage reaction, glyoxylate was a linear competitive inhibitor with a K_i of 0.22 mM and succinate was a linear noncompetitive inhibitor with a K_i of 0.82 mM. Therefore, these kinetic analyses showed that the enzyme functioned in a ordered reaction with glyoxylate binding before succinate in the condensation reaction. 3-Bromopyruvate(BrP) was found to be irreversibly inactivation showing saturation kinetics, the inactivation half-time was 0.15 min and K_{BrP} was 0.032 mM, and substrate or reactant protected against the inactivation.

서 론

Isocitrate lyase (EC 4. 1. 3. 1)는 *threo*-D_s-isocitrate를 succinate와 glyoxylate로 분해하는 반응을 촉매하는 분지점 효소로서 유도성 보충경로인 glyoxylic acid회로의 지표 효소로서 중요하며^{1,2)}, glyoxylic acid회로는 미생물이나 식물등에 존재한다고 알려져 있다³⁻⁷⁾.

이 효소는 가역적으로 산화환원될 수 있으며 산화된 형태를 촉매적으로 불활성이고 환원된 형태로서 촉매작용을 나타내기 위해서는 EDTA와 thiol 화합물을 필요로 하며^{8,9)} 효소에 저해적인 중금속 이온을 제거하거나 효소의 최적작용을 나타내기

위하여 Mg^{2+} 이온도 필요하다^{9,10)}.

Isocitrate lyase의 kinetic 연구는 곰팡이^{2,11)}, 세균^{9,12)}, 식물¹³⁾등에서 진행되어 이 효소는 glyoxylate와 succinate에 의하여 저해되고, 몇가지 대사 산물에 의하여는 feedback 저해를 일으킨다고 알려져 있다^{11,12)}. 이것은 이 효소가 glyoxylic acid 회로에서 최초의 단계를 촉매하기 때문으로 추측되었다¹⁰⁾. 이와같이 이 효소에 관한 연구는 여러 종(種)들에서 이루어지고 있으나 효모의 citrate lyase에 관한 kinetic 연구는 거의 없다.

이에 저자 등은 전보¹⁴⁾에서 *Saccharomycopsis lipolytica* isocitrate lyase를 분리 정제하여 몇가지 성질을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 정제한 isocitrate lyase의 kinetic 분석을 행하여 몇 가지 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

1988년 1월 8일 수리

Corresponding Author: D.H. Chung

재료 및 방법

재료

Sephadex G-50은 Pharmacia Fine Chemical Co., 3-Bromopyruvate, imidazole 및 phenylhydrazine-HCl은 Eastman Kodak Co.; *three*-Ds-isocitrate-K, glyoxylate, succinate, dithiothreitol 등은 Sigma Chemical Co., 그 외는 일본 Wako 회사제품 시약을 사용하였다.

Isocitrate lyase는 전보¹⁴⁾에서 보고한 바와 같이 정제하여 사용하였다.

Isocitrate lyase의 분석

효소활성은 연속적방법¹⁵⁾으로 측정하였다. 즉 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) 1.11 ml와 50 mM phenylhydrazine-HCl 0.2 ml 및 25 mM *threo*-Ds-isocitrate-K 0.2 ml에 적당량의 효소액을 첨가하여 3 ml의 반응혼합액으로써 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 1분간에 1 μmol의 반응 생성물을 생성하는 효소의 양으로 표시하였다.

측합반응에 대한 Km값은 succinate와 glyoxylate의 측합반응에 의하여 생성한 isocitrate의 양을 과잉의 isocitrate dehydrogenase를 반응 혼합액에 가하여 NADP⁺의 연속적 환원을 spectrophotometer로써 측정하고¹⁶⁾ Lineweaver-Burk secondary plot로 나타내었다.

효소의 개별 반응에 의한 저해는 저해제의 여러 가지 농도에서 *threo*-Ds-isocitrate의 농도를 달리 하면서 저해제로서 glyoxylate를 사용한 때에는 불연속적 방법¹²⁾으로, succinate를 사용한 때에는 연속적 방법¹⁵⁾에 의하여 반응속도를 측정하고 Lineweaver-Burk secondary plot로 나타내었다.

측합반응과 개별반응에 사용한 isocitrate lyase는 0.06 unit를 사용하였다.

3-Bromopyruvate(BrP)에 의한 불활성화

BrP에 의한 정제효소의 불활성화는 Roche등의⁹⁾ 방법에 준하여 측정하였다. 먼저 효소의 완충액중에 존재하는 dithiothreitol(DTT)을 제거하기 위하여 DTT를 함유치 않는 50 mM imidazole-HCl완충액 (pH 7.0)으로 평형화한 Sephadex G-50 column (1.6×60 cm)으로 gel filtration하였다. 다음 상

기완충액 1.11 ml, 50 mM phenylhydrazine-HCl 0.2 ml, 정제효소 0.48 unit와 적당량의 BrP를 최종액량이 2.2 ml되도록 가하여 30°C에서 적당시간 반응시킨 후 50 mM DTT용액을 0.6 ml가하여 불활성화시켰다. BrP에 의한 불활성화 작용이 완전히 소실한 후 25 mM *threo*-Ds-isocitrate용액 0.2 ml를 가하여 잔존활성을 측정하였다.

BrP에 의한 효소의 불활성에 대한 보호효과는 위와같은 방법으로 DTT를 제거한 정제효소 0.48 unit와 적당량의 보호제를 혼합하여 30°C에서 5분간 보온하고 50 μM BrP를 가하여 5분간 불활성화한 후에 50 mM DTT 용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액을 Sephadex G-50 column gel filtration으로 시험 혼합물을 제거한 다음 효소활성을 측정하였다.⁹⁾

결 과

기질농도와 반응속도

효소액의 농도를 일정하게 하고 기질의 농도를 변화시키면서 23°C에서 측정한 반응속도를 Lineweaver-Burk의 방법에 따라 plot한 결과 Fig. 1과 같이 직선의 연장으로부터 구한 *threo*-Ds-isocitrate에 대한 Km값은 0.2 mM이었다.

효소의 측합반응

두 기질인 glyoxylate와 succinate의 농도를 달리한 조건하에서 측합반응 속도를 측정하고 Lineweaver-Burk plot한 결과 Fig. 2과 같다.

측합반응의 속도는 약 0.5분 이내에서는 정상

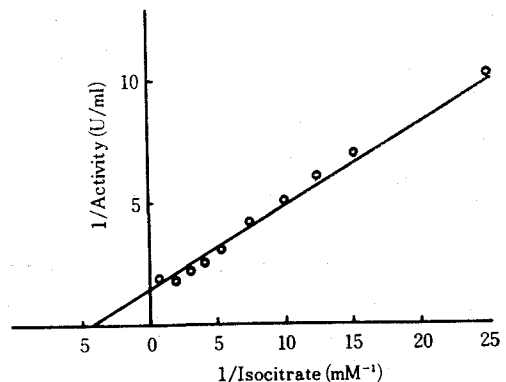


Fig. 1. Lineweaver-Burk plots for the determination of Km value of isocitrate lyase

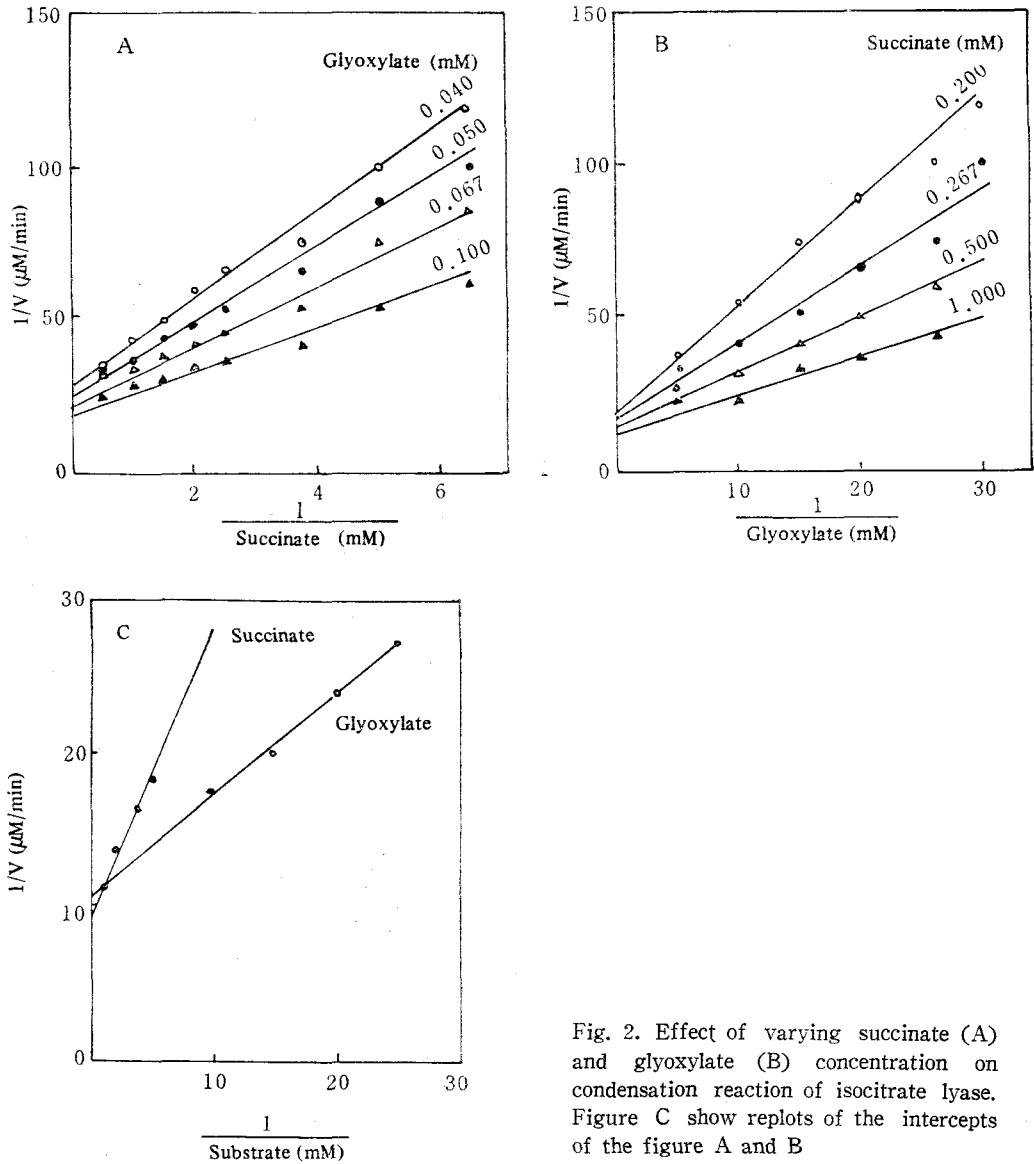


Fig. 2. Effect of varying succinate (A) and glyoxylate (B) concentration on condensation reaction of isocitrate lyase. Figure C show replots of the intercepts of the figure A and B

속도에 비하여 약 30% 낮았으므로 반응속도는 정상상태 속도에 도달한 후 측정하였다. Fig. 2의 A, B에서 보는 바와같이 두 기질은 촉합반응에서 모두 속도 방정식에 대하여 경쟁적이지 않았다. 이들의 intercept replot은 glyoxylate 0.04~0.10 mM과 succinate 0.20~1.00 mM의 서로 상반되는 농도 범위에서 직선을 나타내었으며(Fig. 2의 C), 직선의 연장으로부터 구한 glyoxylate와 succinate의 Km값은 각각 0.06 mM과 0.21 mM이었다.

개별반응의 저해

Isocitrate lyase의 반응 생성물인 glyoxylate와 succinate의 여러가지 농도에서 기질 농도를 달리 하면서 반응속도를 측정하고 Lineweaver-Burk plot한 결과는 Fig. 3과 4와 같다.

Glyoxylate와 succinate는 McFadden 등¹¹⁻¹³⁾이 지적한 바와같이 isocitrate의 개별반응에서 강한 저해를 나타내었다. Glyoxylate는 직선적인 경쟁적 저해를 나타내었지만(Fig. 3), succinate는 직선적인 비경쟁적 저해를 나타내었다(Fig. 4). Glyoxylate와 succinate의 slop replot로부터 얻은

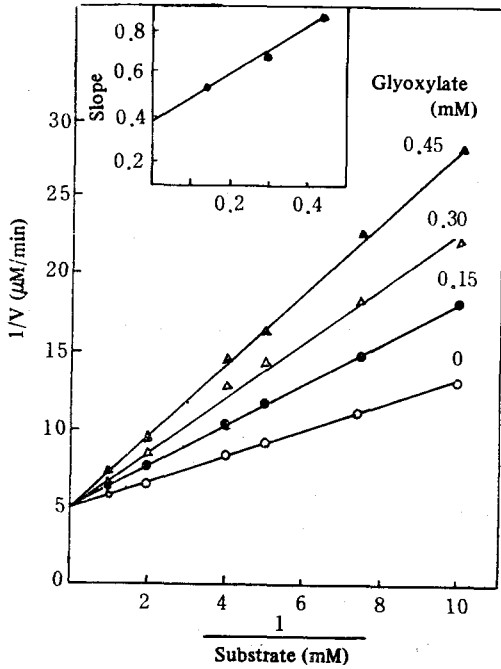


Fig. 3. Inhibition of isocitrate cleavage by glyoxylate
The inset shows a replot of the slopes

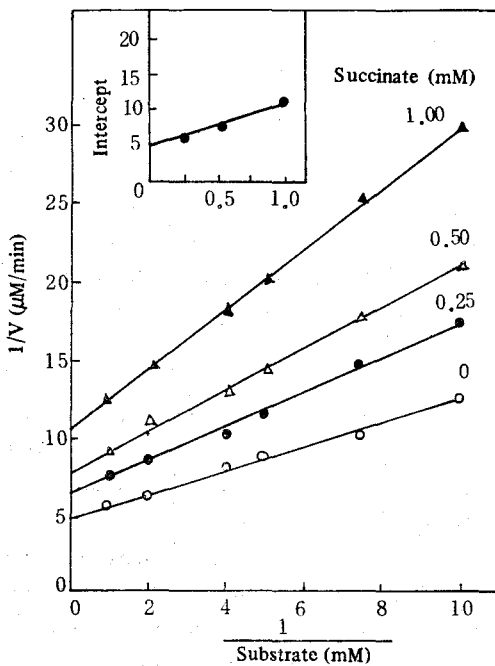


Fig. 4. Inhibition of isocitrate cleavage by succinate
The inset shows a replot the intercept

저해상수 K_i 값은 각각 0.22 mM과 0.82 mM이었다

BrP에 의한 불활성화

BrP에 의한 isocitrate lyase의 불활성화는 DTT를 가한 후 약 30분 후에 완전히 소실하였다. BrP 농도를 달리하면서 효소를 불활성 시킨 경과는 Fig. 5와 같다.

측정한 불활성 반감기(τ)는 $\frac{1}{BrP}$ 에 대하여 Fig. 5의 inset내에 표시하면 직선을 나타내고 반감기는 30°C, pH 7.0에서 0.15분이고 K_{BrP} 는 직선의 기울기로 부터 0.032 mM이었다.

BrP의 불활성화에 대한 보호효과

기질인 isocitrate와 반응생성물인 glyoxylate 및 succinate로서 BrP의 불활성에 대한 효소의 보호효과를 조사한 결과 Table 1과 같이 succinate는 BrP에 대하여 좋은 보호효과를 나타내었지만 gly-

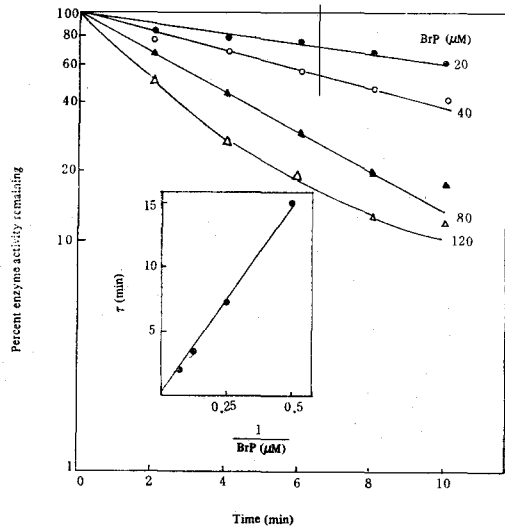


Fig. 5. Semilog plot of the time course of isocitrate lyase inactivation by 3-bromopyruvate(BrP). The inset shows inactivation half-time as a function of the reciprocal of the BrP concentration

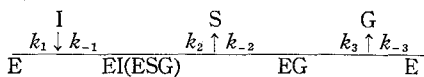
Table 1. Effect of various compounds against inactivation by 3-bromopyruvate

Protective compounds	Concentration (mM)	Recovered activity (%)
None		34
Isocitrate	5	86
Glyoxylate	10	58
Succinate	10	72
Glyoxylate+succinate	10+10	95

oxylate는 그 보다 낮은 보호효과를 나타내었다. 한편 glyoxylate와 succinate를 혼합하였을 때는 거의 대부분의 활성을 회복하고 기질인 isocitrate는 명확한 보호효과를 나타내었다.

고 찰

Isocitrate lyase의 반응 생성물인 glyoxylate와 succinate의 축합반응에서, glyoxylate와 succinate의 서로 상반되는 농도 범위에서 그들의 intercept replot는 직선을 나타내었다(Fig. 2의 C). 그러므로 본 효소의 반응기구는 정서기구(定序機構, ordered mechanism) 또는 고속평형 랜덤기구(rapid equilibrium random mechanism)인것을 나타낸다. 그러나 반응 생성물의 기질에 대한 개별 반응 저해의 실험 결과에서(Fig. 3, 4) 기질인 isocitrate의 측면에서 유리 효소(E)와 결합하는 반응산물 glyoxylate(G)는 직선적인 경쟁적 저해제이었으며, succinate는 효소가 EG 형태로 존재할 때 예상되는 바와 같이 직선적인 비경쟁적 저해를 나타내었다^{17,18}. 따라서 본 결과는 효소의 반응기구가 축합반응에서 glyoxylate가 succinate보다 먼저 결합하는 정서기구인 것을 가리킨다¹¹⁻¹³. 한편 축합반응에서 얻은 Km값은 glyoxylate측면에서 0.06 mM이었고, succinate의 측면에서는 0.2mM이었으며, 개별반응에서 얻은 Ki값은 각각 0.22 mM과 0.82 mM이었으므로 더욱 본 결과를 입증한다. 반응기구는 다음과 같다.



E : enzyme, I : isocitrate, S : succinate,
G : glyoxylate

축합반응에 나타난 직선적인 plot는 평형조건¹⁹이나 어떤 제한된 안정상태 조건²⁰하에서는 랜덤 반응기구를 나타내며 또는 안정상태 조건하에서 정서반응기구²¹를 나타낸다고 보고되어 있다. 그러나 Daron²²과 McFadden^{11,12}은 이 직선적인 plot는 효소의 반응기구가 정서반응 또는 고속평형 랜덤기구의 어느 한쪽을 따른다고 보고하였다. 한편 McFadden등의 세균¹², 곰팡이¹¹ 및 고등식물 종자¹³의 isocitrate lyase kinetic 분석에서 개별반응에 대한 반응 생성물의 저해는 모두 glyoxylate가 직선적인 경쟁적 저해를, succinate가 직선적인 비경쟁적 저해를 나타내었으므로 효소의 반응기구

는 반드시 succinate가 glyoxylate보다 먼저 해리하는 정서반응기구라고 보고된 바 있어 본 결과와 일치하였다. 그리고 *Pseudomonas indigofera*의 isocitrate lyase의 kinetic 분석에서, isocitrate 포화용액에서의 개별반응은 효소의 60%가 EG 형태로 존재하기 때문에 효소에 glyoxylate가 먼저 결합하여야 한다고 보고되어 있다^{9,12}.

본 효소 isocitrate lyase의 3-bromopyruvate(BrP)에 의한 불가역적인 불활성화는 효소의 활성 부위 또는 그 가까이에서 alkyl화하기 전에 가역적으로 결합한다면 예상되는 바와같이^{9,23} 포화 kinetics를 나타내었으며(Fig. 5) isocitrate와 succinate는 불활성화에 대하여 좋은 보호효과를 얻었다(Table 1). 그러나 glyoxylate는 효과가 적었지만 역시 보호하였다(Table 1). BrP가 효소에 alkyl화하여 불활성화하는 방법은 효소활성 부위의 glyoxylate와 succinate부분 또는 glyoxylate와 succinate의 결합부분에 걸쳐서 결합하는 3가지의 가능성이 있다. 따라서 본 결과로 미루어 볼 때 alkyl화제 시약 BrP는 glyoxylate와 succinate에 걸쳐서 효소활성부분을 수식한다고 사료된다. BrP는 isocitrate lyase의 활성 부위에서 cysteine잔기를 alkyl화 함으로써 불가역적으로 불활성하며 반응산물과 기질에 의하여 불활성이 보호되어진다고 알려져 있다^{9,12}. 세균 효소⁹와 곰팡이 효소²²의 BrP에 대한 효소의 친화도는 각각 30°C의 pH 6.8에서 K_{BrP} 30 μ M과 30°C의 pH 7.7에서 K_{BrP} 20 μ M으로서 본 연구 결과는 곰팡이²²보다는 세균의⁹ 결과와 거의 비슷하였다. 한편 곰팡이인 *Neurospora crassa*의 효소²²는 glyoxylate와 succinate의 결합 부위에 걸쳐서 alkyl화하며, 세균인 *Pseudomonas indigofera*의 효소⁹는 succinate결합 부위에 걸쳐서 alkyl화하고 식물인 *Linum usitatissimum*의 효소¹³는 glyoxylate 부위 또는 glyoxylate와 succinate부위에 걸쳐서 alkyl화 한다고 보고되어 있다. 그러므로 본 결과는 *Neurospora crassa*²²의 결과와 같으며, *Pseudomonas indigofera*⁹의 결과와는 상당한 차이가 있다. 그러나 *Linum usitatissimum* 효소¹³는 succinate에 대한 보호효과가 본 효소보다 낮은 것을 제외하면 본 결과와 유사하였다.

결론적으로 본 효도¹⁴의 isocitrate lyase를 세균^{9,12}과 곰팡이^{9,11} isocitrate lyase의 연구 자료를 토대로 비교하면 subunit의 분자량과 최적 pH의 차이로 부터 이들 효소가 다른 기원으로 부터 진

화되었을 가능성은 배제할 수 없지만 BrP의 보호 효과에서 활성 부위의 유사성을 가지고, 효소작용과 같은 kinetic기구와 같은 저해양식을 가지며 특히 활성을 나타내는 데에는 모두 Mg^{2+} 을 필요로 하고 thiol화합물로서 안정화 되었다는 점에서 이들 효소는 아마 같은 기원으로 부터 진화되었을 가능성이 많다고 사료된다.

초 록

Saccharomycopsis lipolytica ATCC 44601에서 정제한 isocitrate lyase 반응산물의 축합반응과 개별반응은 30°C, pH 7.0에서 분석되었다. Glyoxylate와 succinate의 축합반응에서 Km값은 각각 0.06 mM과 0.21 mM이었고, 개별 반응에서 glyoxylate는 직접적인 경쟁적 저해를, succinate는 직접적인 비경쟁적 저해를 나타내었으며 이때 Ki 값은 각각 0.22 mM과 0.82 mM이었다. 그러므로 이 kinetic분석은 이 효소가 축합 반응에서 glyoxylate가 succinate보다 먼저 결합하는 정서반응기구인 것을 나타내었다.

3-Bromopyruvate(BrP)의 불활성화는 포화 kinetics를 나타내면서 효소를 불가역적으로 불활성화 하였으며 반감기는 0.15분이고 K_{BrP} 는 0.032 mM이었으며, 기질과 반응생성물들을 불활성화에 대하여 보호작용이 있었다.

참 고 문 헌

1. Laporte, D.C., Walsh, K. and Koshland, D. E., Jr.: J. Biol. Chem. 259 : 14068(1984)
2. Johanson, R.A., Hill, J.M. and McFadden, B.A.: Biochim. Biophys. Acta, 364 : 341(1974)
3. Ashworth, J.M. and Kornberg, H.L.: Biochim. Biophys. Acta, 89 : 383(1964)
4. Armitt, S., McCullough, W. and Roberts, C.F.: J. Gen. Microbiol., 92 : 263(1976)
5. Vanderwinkel, E. and De Vlieghere, M.: Eur. J. Biochem., 5 : 81(1968)
6. King, H.B. and Casseton, L.A.: Mol. Gen. Genet., 157 : 319(1977).
7. Matsuoka, M., Ueda, Y. and Aiba, S.: J. Bacteriol., 144 : 692(1980)
8. Shio, I., Shio, T. and McFadden, B.A.: Biochim. Biophys. Acta, 96 : 123(1965)
9. Roche, T.E., McFadden, B.A. and Williams, J.O.: Arch. Biochem. Biophys., 147 : 192 (1971)
10. Khan, F.R., Saleemuddin, M., Siddigi, M. and McFadden, B.A.: Arch. Biochem. Biophys., 183 : 13(1977)
11. Johanson, R.A., Hill, J.M. and McFadden, B.A.: Biochim. Biophys. Acta, 364 : 327 (1974)
12. Williams, J.O., Roche, T.E. and McFadden, B.A.: Biochemistry, 10 : 1384(1971)
13. Khan, F.R. and McFadden, B.A.: Plant Physiol., 70 : 943(1982)
14. 조석금 : 한국산업미생물학회지(1988), 투고중
15. Dixon, G.H. and Kornberg, H.L.: Biochem. J., 72 : 3(1959)
16. Stern, J.R.: Methods Enzymol., 3 : 425(1957)
17. Cleland, W.W.: Biochim. Biophys. Acta, 67 : 104(1963)
18. Cleland, W.W.: Biochim. Biophys. Acta, 67 : 173(1963)
19. Alberty, R.A.: J. Am. Chem. Soc., 75 : 1928 (1953)
20. Reiner, J.M.: Behavior of Enzyme System, Minneapolis, Minn., Burgess, pp.103, 107 (1959)[Biochemistry, 3 : 895(1966)]
21. Segal, H.L.: In Enzymes, Vol. 1, 2nd ed., Boyer, P.D., Lardy, and Myrback, K., Ed., New York, N.Y., Academic, p. 38(1959) [Biochemistry, 3 : 895(1966)]
22. Daron, H.H., Rutter, W.J. and Gunsalus, I.C.: Biochemistry, 5 : 895(1966)
23. Goldenberg, D.P., Smith, D.H. and King, J.: Pro. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 7060(1983)