

Thermus aquaticus YT-1 의 내열성 프로테아제 aqualysin I 의 구조와 특징

權 錫 泰
한국과학기술원 유전공학센터

Characterization of aqualysin I structure(a thermophilic alkaline Serine protease) of *Thermus aquaticus* YT-1

Suk-Tae Kwon

Genetic Engineering Center, KAIST

Abstract

Aqualysin I is an alkaline serine protease which is secreted into the culture medium by *Thermus aquaticus* YT-1, an extreme thermophile. Aqualysin I was purified, and its partial amino acid sequence was determined. The gene encoding aqualysin I was cloned into *E. coli* using synthetic oligodeoxyribonucleotides as hybridization probes. The nucleotide sequence of the cloned DNA was determined. The primary structure of aqualysin I, deduced from the nucleotide sequence, agreed with the determined amino acid sequences, including the NH₂- and COOH terminal sequence of the tryptides derived from aqualysin I. Aqualysin I comprised 281 amino acid residues and its molecular mass was determined to be 28350. On alignment of the whole amino acid sequence, aqualysin I showed high sequence homology with the subtilisin type serine protease, and 43% identity with proteinase K, 37-30% with subtilisins and 34% with thermitase. Extremely high sequence identity was observed in the regions containing the active-site residues, corresponding to Asp32, His64 and Ser221 of subtilisin BPN'. Aqualysin I contains two disulfide bonds, Cys67-Cys99 and Cys163-Cys194, and these disulfide bonds seem to contribute to the heat stability of the enzyme. The determined positions of the two disulfide bonds of aqualysin I agreed with those predicted previously on the basis of computer graphics of the crystallographic data for subtilisin BPN'. Therefore, these findings suggest that the three-dimensional structure of aqualysin I is similar to that of subtilisin BPN'. Aqualysin I is produced as a large precursor, which contains NH₂- and COOH- terminal portions besides the mature protease sequence.

서 론

일반적으로 호열성 세균(thermophile)이 생산하

본 논문은 제53차 학술발표회(1988. 7. 2. 충북대학교)
에서 발표된 특강의 내용임.

는 효소는, 상온성 세균(mesophile)이 생산하는 효소와 동일한 기능을 갖고 있지만, 고온과 같은 반응조건에서도 상당히 안정하다고 알려져 있다.¹⁾

호열성 세균으로부터 유래된 효소들의 이와 같은 특성에 관심을 둔 것은 "왜 열에 안정한가" 하는

연구적인 측면에서 내열성의 원인을 규명하는 것과 또다른 면에서, 여러가지 엄격한 반응조건하에서도 안정하게 반응을 촉매하고, 수명이 긴 효소가 산업적으로 필요했기 때문이다.²⁾

열에 대하여 안정한 원인을 해명하려는 가장 유력한 방법으로는, 호열성 세균의 효소와 동일한 기능을 갖고 있는 상온성 세균의 효소를 잘 비교함으로써 새로운 정보를 얻을 수 있다. 그래서 호열성 세균과 상온성 세균의 각 그룹에 속하는 세균들로부터 동일한 기능을 갖고 있는 효소들을 선별하여 아미노산 조성 및 아미노산 배열등을 비교해 왔다.³⁻⁵⁾ 그러나 상온성 세균의 효소와 비교할 수 있는 호열성 세균의 효소의 수가 아직 한정되어 있으며, 또 그 효소의 구조와 기능에 관한 정보도 충분하지 못하기 때문에 내열성의 원인에 대한 결정적인 해답을 지금까지 얻지 못하고 있는 실정이다. 이러한 것은 serine protease에 있어서도 그 예외가 아니었다. 상온성 세균의 serine protease로서는 *Bacillus* 속 균주들이 생산하는 subtilisin들의 경우가 잘 연구되어 있다. 예를 들어 subtilisin BPN',⁶⁾ subtilisin Carlsberg,⁷⁾ subtilisin amylosacchariticus,⁸⁾ subtilisin DY⁹⁾ 등의 아미노산 배열의 상동성은 70~80%로 관찰되었으며 이들의 공통적인 특징의 하나는 Cys 잔기를 함유하고 있지 않았다. 또 일반적인 성질, 아미노산 조성 등이 상기의 subtilisin들과 유사하지만, Cys 잔기를 함유하고 있는 proteinase K¹⁰⁾와 thermitase¹¹⁾의 아미노산 일차구조가 최근에 보고되었다. 이들 효소들은 subtilisin계의 효소들과 proteinase K는 35%, thermitase는 44%의 상동성을 각각 나타내었다. 특히 subtilisin BPN'과 proteinase K는 X선에 의한 결정구조가 해석되어 그들의 삼차구조가 서로 유사한 것으로 나타났다.^{12),13)} 이상과 같이 상온성 세균의 serine protease들에 관한 연구가 많이 진척되어 그 구조와 기능이 거의 알려져 있으나, 호열성 세균의 serine protease로서 현재까지 보고된 것은 *Thermus caldophilus* GK 24의 균체의 protease¹⁴⁾와 *Thermus aquaticus* YT-1의 aqualysin I¹⁵⁾과 aqualysin II¹⁶⁾에 불과하며, 이중에서도 단일 단백질까지 정제되어 그 구조가 확실히 밝혀진 것은 필자가 연구한 aqualysin I 뿐이다.

여기에서 먼저 aqualysin I의 정제로부터 아미노산 일차구조까지 밝힌 과정을 언급한 후, 지금까지 serine protease에서 연구된 결과를 토대로

본 효소의 구조와 기능, 열 안정성 등을 비교 검토하고자 한다.

I. aqualysin I의 특성

Thermus aquaticus YT-1은 미국 국립공원인 Yellowstone의 온천에서 Brock 등¹⁶⁾이 분리한 균으로 생육온도가 75°C 정도이다. Matsuzawa 등¹⁵⁾은 이 균주의 배양액중에서 2종류의 protease 활성을 발견하고 aqualysin I과 aqualysin II라고 명명했다. aqualysin I은 배양후 1일 이내에 많이 분비되는 알칼리성 serine protease로 최적온도가 80°C, 최적 pH는 10.4로서 DFP(diisopropyl fluorophosphate)에 의해 강력한 저해를 받는 효소이다. 또한 필자 등¹⁷⁾은 *T. aquaticus* YT-1의 배양액으로부터 aqualysin I을 정제한 후, SDS 전기영동을 한 결과, 분자량 약 28500의 단일밴드의 단백질을 얻었다. 또 정제된 효소가 실온에서 24 시간동안 변성제(7M urea, 6M guanidine-HCl, 1% SDS)속에서 관찰한 결과 안정하다는 것을 알았다.

II. aqualysin I 유전자의 cloning과 DNA 염기 배열의 분석

aqualysin I 유전자의 cloning

aqualysin I의 전아미노산 배열을 결정하기 위해서, 본 효소의 유전자를 cloning하여 그 염기 배열을 결정하는 방법을 택했다. 최근의 유전자 공학의 진보는 이와같은 방법을 용이하게 했을 뿐

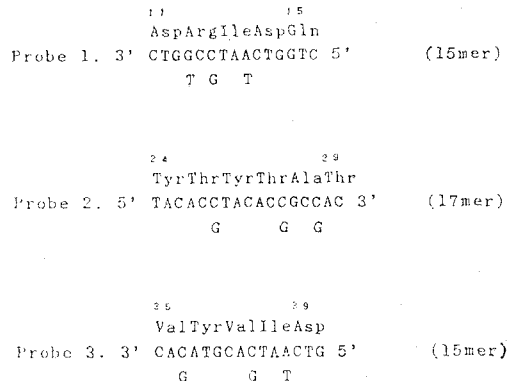


Fig. 1. 합성 oligodeoxyribonucleotides 아미노산 잔기의 번호는 aqualysin I의 N 말단부터의 위치를 나타낸다.

만 아니라, 부위특이적 변이(site-directed mutagenesis) 등의 방법에 의해 cloning 한 후, 그 단백질의 구조와 기능을 해석하는데 도움을 주게 되었다. 또한 *T. aquaticus* YT-1의 aqualysin I은 생산성이 그리 높지 않아서 연구 및 산업적으로 이용하는 데는 불리한 점이 있으나, 이와같은 방법에 의해 어느 정도는 해결될 것으로 기대한다.

aqualysin I의 유전자를 cloning 하기 위해서 먼저 aqualysin I을 정제하여, N 말단 아미노산 배열 및 tryptic peptide 들의 부분적인 아미노산

배열을 결정하였다.¹⁷⁾ 그리고 결정된 이 N 말단 아미노산 배열을 code하는 3 개의 oligodeoxyribonucleotide(oligo DNA)들을 합성했다.¹⁸⁾ 이 oligo DNA 작성에는 *Thermus*속 균주의 DNA제한제와 codon 사용법을 이용했다. *T. aquaticus* YT-1의 균주는 제한효소 Taq I¹⁹⁾을 생산하며, 염색체 DNA의 G+C 함량도 67%로 높았다.¹⁶⁾ Kunai 등²⁰⁾에 의한 *T. caldophilus* GK 24의 lactate dehydrogenase 유전자의 경우, 이용되고 있는 codon의 제 3 문자의 95.5%가 G 또는 C로 보고

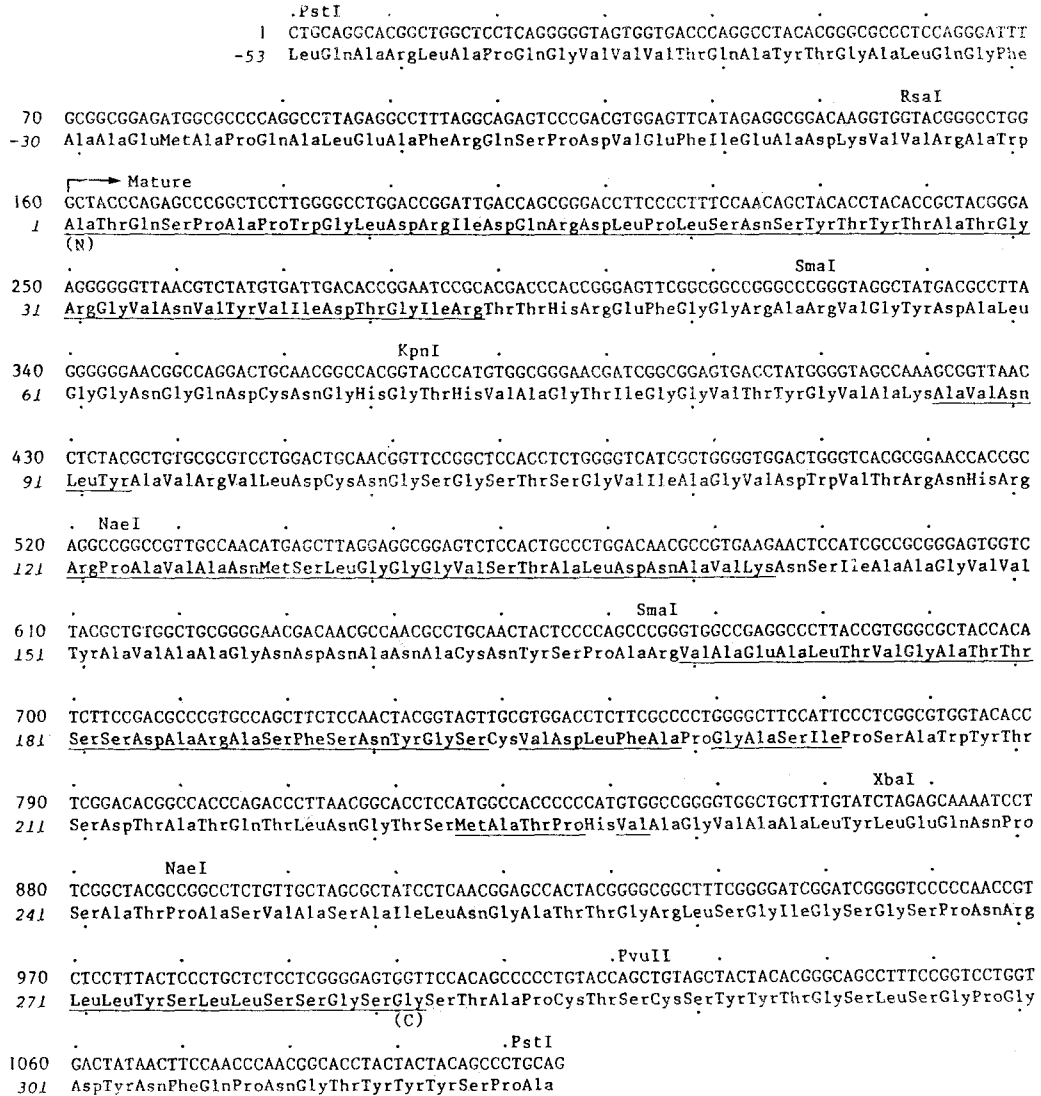


Fig. 2. *T. aquaticus* YT-1의 aqualysin I 유전자 DNA의 염기배열과 번역된 아미노산 배열. 아미노산 번호는 aqualysin I의 N 말단 아미노산부터 시작한다. 밑줄친 부분은 단백질로부터 결정된 아미노산 배열이다. NH₂ 말단은 (N)로, COOH 말단은 (C)로 각각 표시했다.

Table 1. aqualysin I 을 포함한 *Thermus* 속 유전자들의 codon 이용법

1st base	2nd base																
	U				C				A				G				
	TC-LDH	TT-IMDH	TF-MDH	AQ	TC-LDH	TT-IMDH	TF-MDH	AQ	TC-LDH	TT-IMDH	TF-MDH	AQ	TC-LDH	TT-IMDH	TF-MDH	AQ	
U	Phe 0	1	3	0	Ser 3	0	2	0	Tyr* 4	0	1	0	Cys 0	0	0	0	0
	Phe 3	6	10	10	Ser 13	4	8	5	Tyr 8	9	5	7	Cys 4	0	0	1	C
	Leu 2	1	0	0	Ser 0	0	0	0	Trm 0	0	1	0	Trm 0	0	0	1	A
	Leu 1	2	4	1	Ser 6	4	1	0	Trm 0	1	0	0	Trp 3	2	1	4	G
C	Leu 6	4	4	3	Pro* 3	0	4	0	His* 2	0	0	1	Arg* 2	0	1	0	U
	Leu* 5	16	15	12	Pro* 4	8	18	13	His 3	6	5	3	Arg* 3	8	7	10	C
	Leu 1	0	1	0	Pro 1	0	1	0	Gln 1	0	1	1	Arg 0	0	2	0	A
	Leu* 4	14	10	14	Pro 3	8	7	3	Gln 4	8	2	11	Arg 8	18	11	8	G
A	Ile 3	2	0	0	Thr 2	0	0	0	Asn 1	0	0	0	Ser* 2	0	0	0	U
	Ile 6	8	7	16	Thr 15	8	6	10	Asn 18	2	6	11	Ser 5	8	4	4	C
	Ile 0	0	1	1	Thr 1	0	0	1	Lys 1	0	0	0	Arg 0	0	0	0	A
	Met 2	3	6	11	Thr 7	4	6	3	Lys 1	5	15	18	Arg 2	0	6	1	G
G	Val* 4	2	0	1	Ala* 14	1	2	1	Asp 0	0	1	0	Gly* 4	0	1	0	U
	Val 6	8	12	7	Ala 21	36	28	37	Asp 13	11	15	17	Gly 11	8	10	16	C
	Val 2	0	0	1	Ala 0	0	1	1	Glu 0	2	3	3	Gly 9	1	7	3	A
	Val 13	29	20	19	Ala 5	9	12	9	Glu 3	22	27	21	Gly 13	22	19	8	G

별표는 aqualysin I 유전자의 codon 이 다른 유전자의 codon 에 비해 random 한 codon 이용법을 나타낸 것을 표시했다. AQ, aqualysin I; TC-LDH, T. caldophilus lactate dehydrogenase[5]; TT-IMDH, T. thermophilus isopropyl malate dehydrogenase[29]; TF-MDH, T. flavus malate dehydrogenase[30]; Trm; termination codon.

되었으며, Taq I site(TCGA)의 배열도 존재하지 않았다. 그러므로 probe 용의 oligo DNA 합성은 codon의 제 3 문자를 G 또는 C로 했으며, 그 배열이 TCGA 배열이 될 때는 예외로서 제 3 문자를 A 또는 T로 했다. 이렇게 합성된 Fig. 1의 oligo DNA들의 5' 말단을 r-³²P ATP로 표지한 다음, aqualysin I 유전자를 cloning하기 위한 probe로 이용했다.

T. aquaticus YT-1의 균체로부터 염색체 DNA를 조제한 후 Hind III, Bam HI, Sac I, Pst I 등의 제한효소로 완전분해를 했다. 이것들을 agarose gel에 전기영동하여, 표지된 합성 probe들과 agarose 막 hybridization²⁰⁾을 행한 결과 Hind III의 약 7kb, Bam HI의 약 10kb, Sac I의 약 3.5 kb, Pst I의 약 1.1kb의 DNA 단편에 3개의 합성 probe가 공통적으로 hybridize했다. 이들 hybridize하는 부위(Bam HI의 DNA 단편은 제외)를 저용점 agarose gel로부터 분리하여 PUC vector에 각각 삽입시킨 다음 대장균에 transformation²¹⁾을 시켰다. 이들 transformant들에 대해 colony hybridization²²⁾을 행한 결과 Hind III와 Sac I 단편에서 유래한 transformant들로부터는 합성 probe와 hybridize하는 colony는 없었다. 여기에서 사용한 Hind III의 약 7kb, Sac I의 약 3.5kb의 DNA 단편들은 aqualysin I의 완전한 유전자를 충분히 함유할 수 있는 크기이므로 aqualysin I의 발현에 의한 host 균주의 치사에 기인할 가능성이 높다. 이와 유사한 현상은 Jacobs 등²³⁾이 subtilisin Carlsberg의 유전자를 cloning할 때도 보고되었다. 그래서 크기가 가장 적은 pst I 단편을 이용했을 때, 그 transformant들로부터 약 280개의 colony가 합성 probe와 hybridize했다. 이 recombinant plasmid를 함유하고 있는 colony들로부터 12 clone을 선별하여 제한효소에 의한 절단 pattern을 조사한 결과 9 clone이 동일한 것으로 나타났다. dideoxy 방법^{24, 25)}으로 cloning된 DNA 단편의 염기배열을 결정하던 중 aqualysin I의 N 말단 아미노산 배열을 code하고 있는 염기배열이 발견되었다. 이렇게 하여 aqualysin I의 유전자가 cloning된 것이 확인되었다.

aqualysin I의 유전자 구조와 염기배열의 해석

dideoxy방법에 의해 결정된 Pst I 단편(1105bp)의 전 염기배열을 Fig. 2에 나타내었다. 이 DNA 염기배열에 code되는 아미노산 배열은 aqualysin

I의 단백질로부터 결정된 N 말단 및 C 말단(C 말단 결정은 후술함)을 포함한 tryptic peptide들의 아미노산 배열과 완전히 일치했다. aqualysin I의 C 말단 아미노산 배열결정은 Kumazaki 등²⁶⁾이 개발한 방법을 이용하여, C 말단 아미노산을 포함한 peptide를 분리한 후, 그 아미노산 배열을 결정함으로써 Gly(281)이 aqualysin I의 C 말단이라는 것을 알았다.¹⁸⁾ 따라서 DNA 염기배열로부터 결정된 아미노산 잔기수는 281, 분자량은 28350이며, 이것은 단백질의 화학분석에 의한 아미노산 잔기수 및 조성등과 거의 일치한 결과를 나타냈다(Table 2 참조). 또한 이 Pst I 단편의 염기배열에 code되는 아미노산 배열은 중지 codon이 없는 open reading frame으로 되어 있다. aqualysin I의 유전자배열에 code되는 아미노산 배열을 보면, N 말단 아미노산 앞에 Met으로 시작하는 27개의 peptide가 존재하지만, 잘 알려진 signal peptide의 특징²⁷⁾을 갖고 있지 않았으며, 또 C 말단 아미노산 배열 부근에 중지 codon이 존재하지 않았다. 따라서 aqualysin I은 N 및 C 말단의 양쪽에 긴 propeptide를 함유하는 독특한 전구체로 합성되어 mature aqualysin I으로 processing된다고 생각한다.

Thermus 속의 codon usage가 대장균의 codon usage와 상당히 다르다는 것이 보고되어 왔다.²⁸⁾ 현재까지 보고된 *Thermus* 속 유전자의 codon usage를 Table 1에 도시하였다. 다른 *Thermus* 속 유전자의 codon usage는^{5, 29, 30)} 제 3 codon이 G 혹은 C가 될 확률이 90~95% 정도로 높으나, *T. aquaticus* YT-1의 aqualysin I은 75% 정도로 상당히 낮으며, 특히 별표를 친 Leu, Val, Pro, Ala, Tyr 등에서 random한 codon usage를 보였다. 그러나 필자의 연구실에서 밝힌 *T. aquaticus* YT-1의 lactate dehydrogenase 유전자에서는 aqualysin I의 유전자의 codon usage와 다른 상기의 *Thermus* 속 유전자의 codon usage들과 같은 결과를 보였다(미발표 data). 또 후술하겠지만 aqualysin I의 아미노산 1 차 구조는 다른 미생물 serine protease들과 높은 상동성을 보였다. 따라서 이러한 사실들을 종합해 볼 때 aqualysin I은 원래 *Thermus* 속에 존재하던 유전자가 아니라, 진화과정중에 외부에서 들어온 유전자의 가능성이 상당히 높다.

TCGA는 Taq I(*T. aquaticus* YT-1의 제한효소) 혹은 Tth III I³¹⁾(*T. thermophilus* III의

Table 2. aqualysin I 과 subtilisin-type serine protease 들과의 아미노산 조성 비교

Amino acid	Aqualysin I		Proteinase K [10]	Thermitase [11]	Subtilisin	
	DNA sequence	Protein analysis			BPN'[6]	Carlsberg[7]
Lys	2	2	8	10	11	9
His	5	5	4	4	6	5
Arg	15	16	12	5	2	4
Trp	3	4	2	6	3	1
Asp	13	(Asx)28	14	13	11	9
Asn	19	—	17	21	17	19
Thr	25	24	22	22	13	19
Ser	29	28	36	29	37	32
Glu	3	(Glx)9	5	2	4	5
Gln	5	—	7	12	11	7
Pro	11	12	9	12	14	9
Gly	37	38	34	33	33	35
Ala	40	41	32	44	37	41
Val	25	27	19	23	30	31
Met	2	2	5	1	5	5
Ile	9	10	10	14	13	10
Leu	19	19	13	19	15	16
Tyr	12	12	17	15	10	13
Fhe	3	3	6	3	3	4
Cys/2	4	4	5	1	0	0
Total	281	284	277	289	275	274
M _r	28,350	28,500	28,930	28,369	27,537	27,277

제한효소)의 인식배열이다. 그러므로 *T. aquaticus* YT-1의 DNA 배열속에는 TCGA 배열이 존재하지 않을 것이며 만약 존재하더라도 그 인식부위가 methyl화 되어 Taq I에 의해 인식되지 않는 host restriction system²⁹⁾이 존재할 것이라는 보고가 있었다. 따라서 이것을 확인하기 위해 pst I 단편(1105bp)중에서 TCGA 배열을 조사하였으나, 그 배열이 존재하지 않았다.³³⁾ 또한 TCGA의 유사배열로서 NCGA, TNGA, TCNA, TCGN(N는 DNA의 4염기 전부를 표시)에 그 존재수를 조사한 결과, *T. aquaticus* YT-1 DNA의 1105bp 중에는 각각 그 수가 6, 11, 15, 12였다. 이 결과로부터 *T. aquaticus* YT-1 DNA는 분명히 TCGA 배열을 피하고 있다는 것이 확인되었다. 또한 아미노산 배열중에서도 TCGA 배열을 피하기 위한 특수한 codon이 사용된 것도 확인되었다.

III. aqualysin I 과 다른 미생물 serine protease 와의 비교

지금까지 미생물 serine protease는 그 구조와 기능에 대해서 잘 연구되어 왔다. 특히 서론에서 서술한 바와 같이 subtilisin BPN' 및 proteinase K는 그들의 아미노산 일차구조로부터 입체구조까지 상세히 연구되어 있다.¹²⁻¹³⁾ 따라서 aqualysin I의 특징을 보다 확실히 하기 위해 이들과 비교하므로써 많은 지견을 얻을 것으로 생각한다.

아미노산 조성에 대하여

aqualysin I의 아미노산 조성을 다른 미생물 유래의 serine protease와 비교한 결과가 Table 2이다. aqualysin I의 아미노산 조성은 다른 4개의 효소들과 유사했다. subtilisin은 Cys를 함유

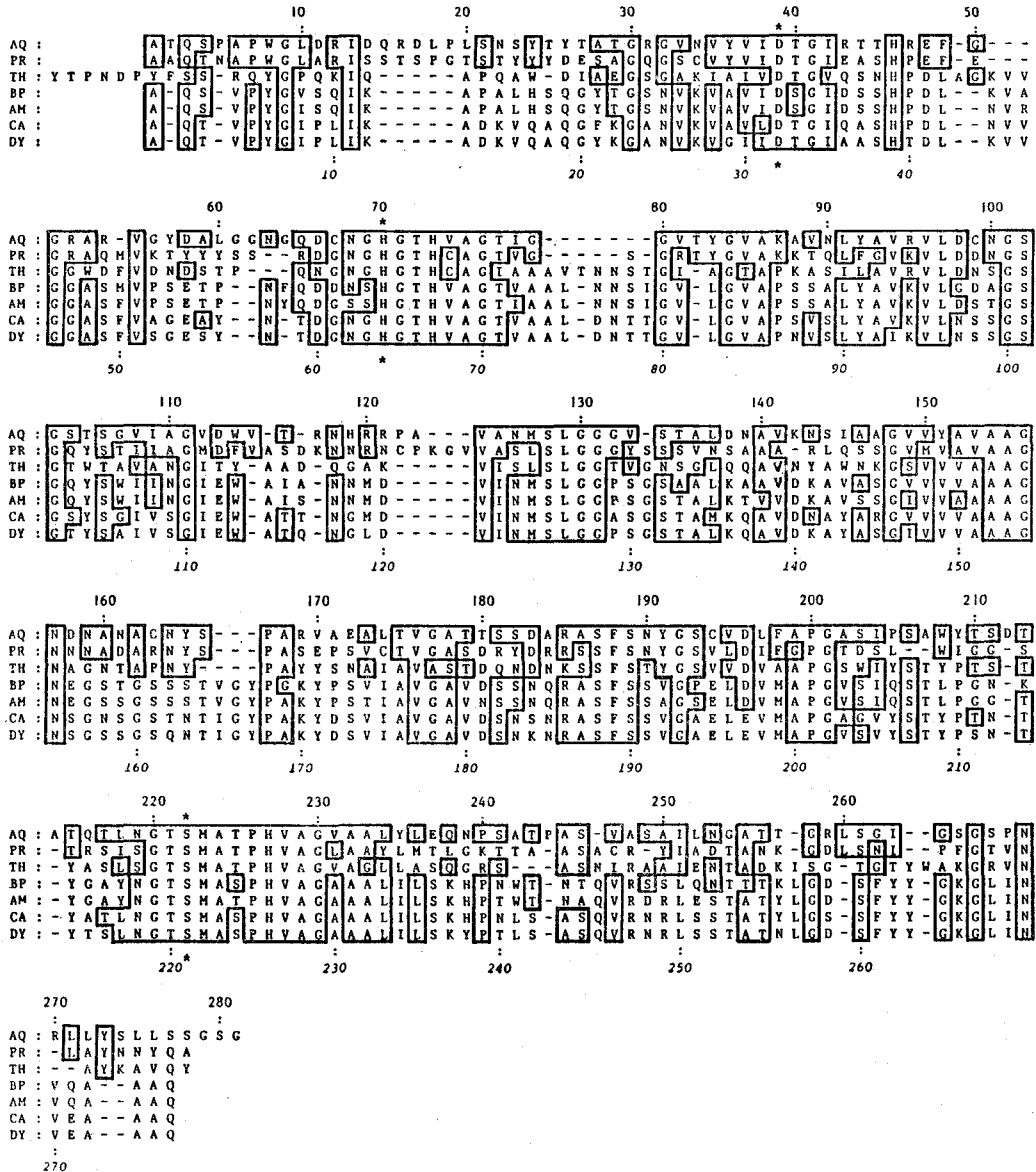


Fig. 3. aqualysin I 과 다른 subtilisin-type serine protease 와의 전 아미노산 배열의 비교
 상단의 번호는 aqualysin I, 하단의 번호는 subtilisin BPN'의 N 말단부터의 위치를 각각 나타낸다. aqualysin I 과 동일한 아미노산 배열장기를 가지는 효소의 아미노산 장기에 대하여 □를 쳤다. 별표(*)는 active-site의 잔기 Asp, His, Ser 를 가리킨다. 약호는 다음과 같다. AQ; aqualysin I, PK; proteinase K, TH; thermitase, BP; subtilisin BPN', AM; subtilisin amylosacchariticus, CA; subtilisin Carlsberg, DY; subtilisin DY.

하지 않으나 aqualysin I은 proteinase K¹⁰⁾ 및 thermitase¹¹⁾와 마찬가지로 cysteine-containing serine protease의 하나라는 것을 알았다. 이 aqualysin I의 4개의 half-cysteine이 분자내에서 cystine(disulfide bond)로 존재하는지 또는 cysteine으로 존재하는지를 Ellman 방법³⁴⁾으로 검토한 결과, 2개의 disulfide bond로 존재하는 것으로 추

측했다.³⁵⁾ aqualysin I은 Lys이 적고 Arg이 다른 효소들 보다 많은 것으로 나타났으나, 이는 단백질의 code 하는 DNA의 G+C 함량이 높은 결과에 기인한 것으로 효열성 세균의 단백질에서 볼 수 있으나, 내열성의 원인은 직접적으로 관련이 없을 것이다. 소수결합이 효소의 내열성에 기여하고 있다는

것이 보고되어 있으나, aqualysin I은 특히 내열성이 높은 것임에도 불구하고 상기의 효소와 비교하여 특별히 소수성 아미노산, Ala, Leu, Val 등이 많지도 않다. 아마 2개의 disulfide bond에 의한 구조의 안정화가 내열성에 크게 기여하고 있다고 생각한다.

아미노산 배열의 상동성

결정된 aqualysin I의 아미노산 배열과 다른 미생물 serine protease의 아미노산 배열을 비교한 것이 Fig. 3이다. aqualysin I은 이들 효소와 상당히 유사했다. 특히 곰팡이 유래의 proteinase K와 더욱 유사했다. 실제 이들과 상동성을 계산해 보면 aqualysin I은 proteinase K와 43%, subtilisin들과 37~39%, thermitase와 34%라는 높은 상동성을 나타내었다. 그러나 aqualysin I은 proteinase K와 같이 여러 개의 Cys 잔기를 함유하고 있음에도 불구하고 아미노산 배열에 있어서 그들의 위치는 완전히 다르다. 따라서 미생물 기원의 알카리성 serine protease에 있어서 disulfide bond의 구조는 진화를 통해 보전된 것이 아니라 안정성등의 부차적 요점에 의해 생긴 것으로 생각할 수 있다. 최근 subtilisin BPN' 등에 cysteine 잔기를 임의로 넣어 disulfide bond를 형성시키므로서 내열성을 증가시키려는 연구가 시도되었다.³⁵⁾

활성 중심의 아미노산 잔기의 상동성

미생물의 serine protease 활성부위에는 Asp, His, Ser의 전하 relay 계를 구성하는 catalytic triad라고 부르는 잔기가 존재하고 있다.³⁶⁻³⁸⁾ aqualysin I에 대하여 그 활성잔기의 위치와 그 부근의 아미노산 배열을 조사한 결과, Asp 39, His 70, Ser 222인 것으로 생각할 수 있다(Fig. 3의 별표 참조), 실제 단백질로부터 ³H-DFP를 이용하여 결정된 활성부위 serine 잔기는 Ser 222였다.¹⁸⁾ 이들 활성부위의 아미노산을 포함한 아미노산 배열의 상동성은 특히 높으며, 활성부위 serine 잔기 부근의 아미노산 잔기들은 잘 보존되어 있었다.

또한 aqualysin I은 subtilisin BPN'³⁹⁾의 X선 결정 구조로부터 얻은 substrate binding site인 S₁, S₂, S₃(Ser 125-Leu 126-Gly 127)와 같은 배열(Ser 128-Leu 129-Gly130)을 갖고 있었다. 이러한 사실은 insulin B chain을 기질로 사용하여 aqualysin I의 기질특이성을 조사한 결과 subtilisin과 유사한 것으로 나타났다.¹⁷⁾

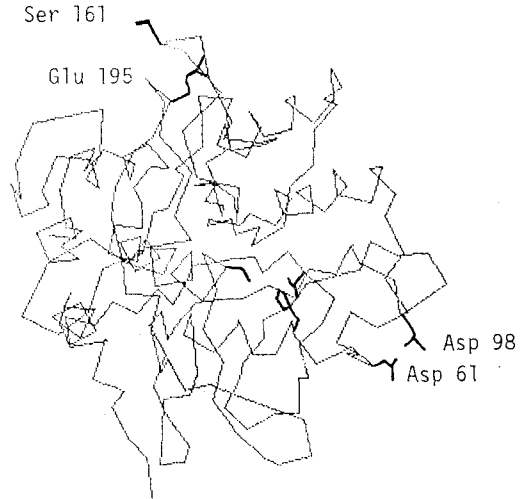


Fig. 4. Subtilisin BPN'의 입체구조
Subtilisin BPN'의 입체구조에서 aqualysin I의 Cysteine잔기에 대응하고 있는 아미노산 잔기[Ser 161(Cys 163), Glu 195(Cys 194), Asp 61(Cys 67), Asp 98(Cys 99)]들의 측사를 표시한 것이다. 중앙 부분에는 활성잔기(Asp, His, Ser)들의 측사를 나타낸 것이다.

입체구조의 대하여

subtilisin BPN'와 proteinase K의 사이에 아미노산 배열의 상동성은 35%이며¹⁰⁾, X선 결정구조 해석으로부터 이들의 입체구조가 유사한 것으로 보고되었다.¹²⁻¹⁹⁾ 아미노산 배열의 비교(Fig. 3 참조)에서 본 것과 같이 aqualysin I은 아미노산 배열에 있어서 이들보다 상동성이 높으며, 또한 활성부위 근처의 아미노산 배열에서도 높은 상동성을 보이므로 aqualysin I의 입체구조는 이들의 입체구조와 더욱 유사하다고 생각된다.

aqualysin I의 입체구조가 subtilisin BPN'과 유사하다고 생각하면, aqualysin I의 Cys 잔기에 대응하고 있는 subtilisin BPN'의 아미노산 잔기의 상대적인 위치로부터 disulfide bond 위치를 추정할 수 있다. aqualysin I의 4개의 Cys 잔기에 대응하는 subtilisin BPN'의 잔기를 Fig. 3에서 조사한 즉 Cys 67이 Asp 61, Cys 99가 Asp 98, Cys 163이 Ser 161, Cys 194가 Glu 195에 해당한다. subtilisin BPN'의 X선 결정구조의 computer graphics에 의해 이들 잔기들의 α-탄소 원자간의 상호거리(disulfide bond의 형성은 cysteine의 α-탄소원자 상호간의 거리가 5~6Å이 적당함)를 비교한 결과 Asp 61-Asp 98 사이가 5.8Å, Ser 161-Glu 195 사이가 12.7Å으로 가장 근접해

있는 것으로 나타났다.³³⁾ 따라서 aqualysin I 은 Cys 67-Cys 99 및 Cys 163-Cys 194의 잔기들 간에 disulfide bond가 형성되어 있다고 추정했다.¹⁸⁾ aqualysin I의 cystein 잔기에 대응하는 위치들을 subtilisin BPN'의 입체구조에 표시한 것이 Fig. 4이다. 이 입체구조에서 추정된 disulfide bond의 위치들은 외부에 존재하고 있었다. 이 부분은 입체구조적으로 보아, 어느 정도 변화가 있어도 활성에는 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각한다. 따라서 Ser 161-Glu 195 사이의 간격이 12.7Å이지만, aqualysin I에서는 그 거리가 더욱 근접해서 실제로 disulfide bond를 형성할 것으로 추측한다.

필자는 단백질로부터 HPLC의 peptide mapping에 의해 분리된 cystine peptide들로부터 2개의 disulfide bond의 위치를 결정했으며³³⁾ 그것은 상기의 추정된 위치와 일치하였다. 이러한 결과는 aqualysin I의 입체구조가 subtilisin과 더욱 유사함을 보여주는 결과이다.

IV. aqualysin I의 전구체의 구조

cloning된 Pst I 단편(1105bp)은 aqualysin I (성숙효소)을 code하는 전 아미노산 배열을 포함하고 있지만, 그 유전자의 전구체의 전구조를 포함하고 있지 않았다. 그래서 Pst I 단편 내에 있는 Xba I 부위(Fig. 2 참조)를 절단해서 ³²P로 각각 표지한 다음 aqualysin I의 5' 상류 및 3' 하류 영역의 유전자를 cloning하기 위한 probe로 사용했다. 이렇게 하여 위에서 언급했던 Sac I의 3.5kb 단편을 Xba I을 중심으로 5' 상류 영역의 약 2.5kb(Sac I-Xba I 단편)와 3' 하류 영역의 약 1.0kb(Xba I-Sac I 단편)을 각각 PUC vector에 cloning했다.³³⁾ 이들 DNA 배열을 결정하므로써 aqualysin I의 전구체의 전구조를 결정했다. aqualysin I의 전구체는 N 말단 영역에 Met으로 시작하는 전형적인 signal peptide를 포함해서 127잔기의 propeptide와 C말단 영역에 105잔기의 propeptide를 각각 갖는 것(분자량 53912)으로 합성되어 aqualysin I(분자량 28350)으로 processing된다고 추측할 수 있다. 실제로 *T. aquaticus* YT-1의 막 fraction의 immunoblotting에서 aqualysin I의 항체와 cross하는 51K의 밴드를 확인할 수 있었다(투고준비중).

E. coli. 유래의 tac promoter(pKK 223-3)을 이용하여 aqualysin I의 완전한 전구체를 구축한

후, *E. coli*. MV 1184에 cloning할 수 있었다. IPTG(isopropyl-β-0-thio-galactopyranoside) 유도에 의해 aqualysin I을 발현시켰으나 활성이 낮았다. 그러나 이 균체를 65°C에서 열처리를 함에 따라 활성이 높아졌다. 또 균체를 열처리 함으로써 aqualysin I이 세포밖으로 excretion 되었으며 C 말단 영역에 있는 propeptide가 excretion 후에 processing된다는 것도 확인하였다(투고준비중).

최근 aqualysin I의 전구체와 유사한 구조를 갖고 있지만 N 말단 영역에 긴 propeptide를 함유하지 않은 gram 음성균인 *Serratia marcescens*의 protease⁴⁰⁾와 *Neisseria gonorrhoeae*의 IgA protease⁴¹⁾가 보고되었다. 이들 전구체들의 공통점은 C 말단의 긴 propeptide 배열이 이 효소의 outer membrane을 통과하는데 필수적이라고 보고했다. 따라서 aqualysin I의 C 말단 propeptide 배열이 이와 유사한 기능을 갖고 있을 것으로 추측하고 있다. 그러나 aqualysin I 전구체의 propeptide들이 단백질의 세포의 분비와 관련하여 *I. aquaticus* YT-1에서 실제 어떤 역할을 하는지는 지금부터의 연구해야 할 과제이다.

V. 맺 음 말

지금까지 aqualysin I에 관한 그 구조와 기능, 열 안정성 등을 다른 미생물 serine protease와 비교하여 살펴보았다. 여기에서 aqualysin I은 다른 미생물 serine protease와 구조와 기능면에서는 유사하지만 2개의 disulfide bond에 의해 내열성과 안정성이 그들보다 뛰어난 것으로 추정했다. 따라서 이러한 것을 정확하게 분석함으로써 내열성이 낮은 유사한 효소들을 단백질 공학의 수법으로 내열성이 높은 효소로 설계할 수 있다.

aqualysin I은 *Thermus*속 균주에서 세포외 분비효소로 처음 cloning 되었으며 따라서 이 aqualysin I은 *Thermus*속 균주의 세포의 분비 기구를 밝히는 중요한 model이 될 것으로 생각한다.

References

1. Ljungdahl, L.G.: in *Advances in Microbial Physiology* 19 : 149(1977)
2. Cowan D., Daniel, R. and Morgan, H.: *Trends in Biotechnology* Vol. 3(3) : 68(1985)
3. Argos, P. Rossmann, M.G., Grau, U.M.,

- Zuber, H., Frank, G. and Tratschin, T.D. *Biochemistry* 18 : 5698(1979)
4. Schar, H.P. and Zuber, H.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360 : 795(1979)
 5. Kunai, K., Machida, M., Matsuzawa, H. and Ohta, T.: *Eur. J. Biochem.* 160 : 433(1986)
 6. Markland, F.S. and Smith, E.L.: *J. Biol. Chem.* 242 : 5198(1967)
 7. Smith, E.L., Delange, R.J., Egans, W.H., London, M. and Markland, F.S.: *J. Biol. Chem.* 243 : 2184(1968)
 8. Kurihara, M., Markland, F.S. and Smith, E.L.: *J. Biol. Chem.* 247 : 5619(1972)
 9. Nedkov, P., Oberthur, W. and Braunitzer, G. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366 : 421(1985)
 10. Jany, K.D., Lederer, G. and Mayer, B.: *FEBS Lett.* 199 : 139(1986)
 11. Meloun, B., Baudys, M., Kostka, V., Hausdorf, G., Frommel, C. and Hohne, W.E. *FEBS Lett.* 183 : 195(1985)
 12. Kraut, J.: *The Enzymes*, 3rd ed., 3 : 547 Academic Press, New York and London. (1971)
 13. Pahler, A., Banerjee, A., Dattagupta, J.K., Fujiwara, T., Lindner, K., Pal, G.P., Suck, D., Weber, G. and Saenger, W.: *EMBO J.* 3 : 1311(1984)
 14. Taguchi, H., Hamaoki, M., Matsuzawa, H. and Ohta, T.: *J. Biochem. (Tokyo)* 93 : 7 (1983)
 15. Matsuzawa, H., Hamaoki, M. and Ohta, T.: *Agric. Biol. Chem.* 47 : 25(1983)
 16. Brock, T.D. and Freeze, H.: *J. Bacteriol.* 98 : 289(1969)
 17. Matsuzawa, H., Tokugawa, K., Hamaoki, M., Mizoguchi, M., Taguchi, H., Terada, I., Kwon, S.-T. and Ohta, T.: *Eur. J. Biochem.* 171 : 441(1988)
 18. Kwon, S.T., Terada, I., Matsuzawa, H. and Ohta, T.: *Eur. J. Biochem.* 173 : 491(1988)
 19. Sato, S., Hutchison III, C.A. and Harris, J.I.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74 : 542(1977)
 20. Silhavy, T.J., Berman, M.L. and Enquist, L.W.: *Experiments with Gene Fusions*, pp. 189~195, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1984)
 21. Hanahan, D.: *J. Mol. Biol.* 166 : 557(1983)
 22. Hanahan, D. and Meselson, M.: *Gene* 10 : 63(1980)
 23. Jacobs, M., Eliasson, M., Uhlen, M. and Flock, J.I.: *Nucleic Acids Res.* 13 : 8913 (1985)
 24. Hattori, M. and Sakaki, Y.: *Anal. Biochem.* 152 : 232(1986)
 25. Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela F.: *Nucl. Acids Res.* 14 : 1319(1986)
 26. Kumazaki, T., Nakako, T., Arisaka, F. and Ishii, S.I.: *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1 : 100(1986)
 27. Heijne, G.V.: *Eur. J. Biochem.* 116 : 419 (1981)
 28. Ikemura, T.: *J. Mol. Biol.* 151 : 389(1981)
 29. Kgyawa, Y., Nojima, H., Nukiwa, N., Ishizuka, M., Nakajima, T., Yasuhara, T., Tanaka, T. and Oshima, T.: *J. Biol. Chem.* 259 : 2956(1984)
 30. Nishiyama, M., Matsubara, N., Yamamoto, K., Iijima, S., Uozumi, T. and Beppu, T.: *J. Biol. Chem.* 261 : 14178(1986)
 31. Shinomija, T. and Sata, S.: *Nucl. Acid Res.* 8 : 43(1980)
 32. Sato, S., Nakazawa, K. and Shinomiya, T.: *J. Biochem.* 88 : 737(1980)
 33. Kwon, S.-T.: Ph D. Thesis, The University of Tokyo. (1987)
 34. Ellman, G.L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70(1959)
 35. Wells, J.A. and Powers, D.B.: *J. Biol. Chem.*, 261 : 6564(1986)
 36. Wright, C.S., Alden, R.A., and Kraut, J.: *Nature(London)*, 221 : 235(1969)
 37. Alden, R.A., Wright, C.S., and Kraut, J.: *Phil. Trans. Roy. Soc. London, Ser. B* 257, 119(1970)
 38. Robertus, J.D., Alden, R.A. Birktoft, J.J. Kraut, J., Powers, J.C. and Wilcox, P.E.: *Biochemistry*, 11 : 2439(1972)
 39. Kwon, S.-T., Matsuzawa, H. and Ohta, T. *J. Biochem. (Tokyo)* in Press. (1988)
 40. Yanagida, N., Uozumi, T. and Beppu, T.J. *Bacteriol.* 166 : 937(1986)
 41. Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. and Meyer, T.F.: *Nature*, 325 : 458(1987)