

## *Intrasporangium*속 방선균의 Chorismate Mutase 성질

조원대<sup>1</sup>·신광순<sup>1</sup>·최용진<sup>2</sup>·양한철<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 식품공학과 <sup>2</sup>고려대학교 유전공학과

### Properties of Chorismate Mutase from *Intrasporangium* sp.

Cho, Won-Dai<sup>1</sup>, Kwang-Soon Shin<sup>1</sup>, Yong-Jin Choi<sup>2</sup>, and Han Chul Yang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Technology, <sup>2</sup>Department of Genetic Engineering, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Two isoenzymes of chorismate mutase(E.C.5.4.99.5) designated as chorismate mutase I(CM I) and chorismate mutase II(CM II), were detected and partially purified from a sp. of *Intrasporangium* isolated from soil. CM I and CM II had pH optima of pH 6.5 and 8.0, respectively and showed the same temperature optimum of 45°C. The activation energy of the enzymatic reaction was estimated to be 14.7Kcal/mole with CM I and 10.8Kcal/mole with CM II. The affinity of isoenzyme CM I for substrate(Km = 1.35mM) was almost the same level as that of CM II(Km = 1.22mM). Both isoenzymes were stable at pH values ranged from pH 6.5 to 9.0, but rapidly denaturated at temperatures above 45°C. CM II was activated about 7% of its activity by Ba<sup>++</sup> or Mg<sup>++</sup> while CM I was slightly inhibited by the same metal ions. Thiol compounds were found not to be necessary for stability of the two enzymes but Co<sup>++</sup> and EDTA had a little stabilizing effect on CM II only. p-Chloromercuribenzoate strongly inactivated the activities of both enzymes but the reducing agents such as dithiothreitol and L-cysteine protected them against the pCMB inhibition.

Chorismate mutase (EC. 5. 4. 99. 5)는 chorismate를 prephenate로 전환시키는, tyrosine과 phenylalanine 두 분지대사 경로의 첫번째 반응을 촉매하는 효소로서 이들 방향족 아미노산 아미노산 생합성 대사 조절에 직접 관계하고 있는 주요 효소중의 하나이다. 이 효소는 생물체의 종류에 따라 단일 효소 활성을 가진 단일 단백질효소(a single species) (1), 단일 효소활성을 가진 몇개의 isoenzyme(two species of chorismate mutase) (2, 3), chorismate mutase와 prephenate dehydratase의 두 효소활성을 가진 효소 복합체(bifunctional enzyme complex) (4) 또는 DAHP synthase, shikimate kinase 및 chorismate mutase의 세 효소활성을 갖는 효소 복합체(trifunctional enzyme complex) (5) 등 여러가지 다양한 형태로 존재하고 있다. 따라서 chorismate mutase의 대사조절 특성 역시 생물체의 종류에 따라 서로 다른 복잡한 양상을 나타내고 있다고 하겠다.

저자 등은 토양에서 분리한 phenylalanine 생산능

이 있는 *Intrasporangium*속 방선균의 phenylalanine 생합성 대사를 연구하면서 최종대사물에 의해 feedback inhibition을 전혀 받지 않는 chorismate mutase I(CM I)과 tyrosine에 의해 feedback inhibition을 받는 chorismate mutase II (CM II)를 분리, 확인하고 이들의 대사조절 특성을 분석하여 전보(6)에 보고한 바 있으며 본보에서는 부분정제한 chorismate mutase I과 II의 효소적 특성을 조사하여 그 결과를 보고한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 시약

본 실험에 사용한 균주는 전보(7)에서 설명한 phenylalanine 생산능이 있는 *Intrasporangium*속 토양 분리 방선균이며 사용 시약중 chorismate는 Gibson 방법(8)에 따라 제조 사용하였고 cithiothreitol, p-chloromercuribenzoate(pCMB) 및 bovine

Key words: Chorismate mutase, properties, *Intrasporangium* sp.

\* Corresponding author

serum albumin 등은 Sigma 제품, 기타 일반 시약은 시판 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

**배지 및 배양조건**

효소 생산을 위한 배지는 buffer 56(9)에 10g/l의 glucose를 첨가한 최소배지를 사용하였으며 기타 전보(6)에 상세한 배양조건하에서 60시간 진탕배양하여 얻은 균체를 효소원으로 이용하였다.

**효소 정제**

전보(6)에 상세한 방법에 따라 ammonium sulfate fractionation, DEAE cellulose chromatography, DEAE sephadex A 50 chromatography 및 sephadex G 200 gel filtration 등의 과정을 거쳐 부분 정제한 효소를 실험재료로 사용하였다.

**효소활성 측정**

Chorismate mutase의 활성은 Cotton과 Gibson 방법(10)에 따라 0.4 μmole chorismate, 0.02 μmole EDTA, 1 μmole dithiothreitol 및 20 μmole tris-HCl 완충용액(pH 7.5)을 함유한 반응액 0.3ml에 효소액 0.1 ml를 첨가, 37°C에서 정확히 10분간 반응시키고 1 N HCl 0.4 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응정지후 계속해서 10분동안 더 반응시킨 다음 1 N NaOH 3.2 ml를 첨가하고 즉시 320 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 생성된 phenylpyruvate

의 농도는 17,500의 molar extinction coefficient를 이용하여 환산하였다.

**단백질 정량**

효소액 중의 단백질은 Lowry 방법(11)에 따라 정량하였다.

**비활성 측정**

Chorismate mutase 1 unit는 37°C, 1분간 반응으로 1 μmole phenylpyruvate를 생산할 수 있는 효소량으로 정의하였으며 비활성은 단백질 mg당 unit 수로 표시하였다.

**결과 및 고찰**

**효소활성에 미치는 pH의 영향**

Mcllvaine buffer(pH 5.0-7.5)와 Atkins-Pantin buffer(pH 7.5-10.0)를 사용, pH 5.0-10.0 사이의 각 pH에서 CM I과 CM II 효소활성의 최적 pH를 조사해 본 결과 Fig. 1과 같이 CM I과 CM II의 최적 pH는 각각 6.5와 8.0으로서 두 효소가 약간의 차이를 보였다. 그러나 CM I은 pH 6.5-9.0, CM II는 pH 7.0-9.0 범위에서 각 효소가 95% 이상의 효소활성을 나타내고 있어 두 효소 모두 비교적 넓은 범위의 최적 pH를 갖고 있음을 알 수 있었다. 이와같은 본 효소의 최적 pH는 식물체(3) 내지는 다른 많은 미생물(16)에서 조사, 보고된 결과와 비슷한 값에 해당된다.

한편 CM I은 pH 6.5, CM II는 pH 8.0으로 조정 한 각종 buffer를 사용, buffer 종류에 따른 효소활성의 영향을 조사해 본 결과 Table 1과 같이 CM I의 경우 Mcllvaine과 Maleate-NaOH buffer가 가장

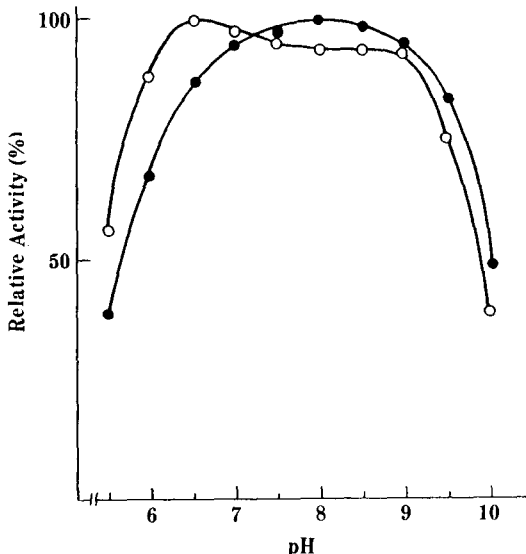


Fig. 1. Effect of pH on the activities of CM I and CM II. The buffers used were Mcllvaine buffer(pH 5-7.5) and Atkins-Pantin buffer (pH 7.5-10). ○, CM I, ●, CM II.

Table 1. Chorismate mutase I and II activity in various buffers.

Buffer solution	Relative activity (%)	
	CM I	CM II
Citrate-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100	—
Maleate-NaOH	100	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -NaOH	96	94
Tris-maleate	91	98
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	93	99
Tris-HCl	—	100
Borate·KCl-Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	—	100

Buffer solutions were adjusted at pH 6.5 for CM I and pH 8.0 for CM II

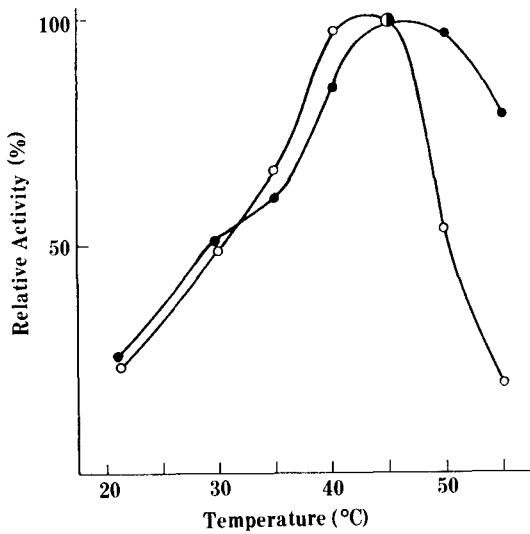


Fig. 2. Effect of temperature on the activities of CM I and CM II.

Enzyme activities were determined in the standard reaction mixture as described under "Materials and Methods" with 2.7 units of CM I (○) and 4.3 units of CM II (●).

효과적이었으나 CM II는 buffer의 종류에 큰 영향을 받지 않았다.

#### 온도의 영향

CM I과 CM II 활성에 미치는 반응온도의 영향을 조사해 본 결과 Fig. 2와 같이 두 효소 모두 45°C 전후에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 그러나 45°C 이상의 온도에서는 CM I은 급격한 활성저하를 보인 반면에 CM II는 비교적 완만히 실활됨으로써 CM II가 더 안정함을 보였다.

Fig. 3은 활성화에너지 측정을 위한 Arrhenius plot으로써 이 plot로부터 계산한 CM I과 CM II의 활성화에너지는 각각 14.7 Kcal/mole과 10.8 Kcal/mole 이었다.

#### 기질농도의 영향

Lineweaver-Burk plot을 이용, 산출한 CM I과 CM II의 Michaelis constant 값은 각각 1.35 mM과 1.22 mM으로써 두 isoenzyme의 기질 친화력은 큰 차이가 없었다(Fig. 4 참조). 고등식물체의 chorismate mutase는 대개의 경우 두 개의 isoenzyme으로 존재하며 isoenzyme간의 기질 친화력은 큰 차이를 나타내고 있다(3). 따라서 이와같은 효소특성의 차이는 세포내 방향족 아미노산 대사조절에도 직접적으로 관계한다고 판단된다. 또한 본방선균 choris-

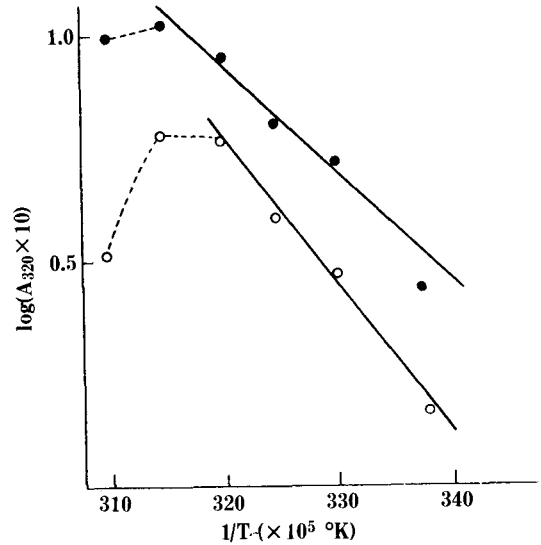


Fig. 3. Arrhenius plot of the initial rate of phenylpyruvate formation against reciprocal of absolute temperature.

2.7 units of CM I (○) and 4.3 units of CM II (●) were used in the standard reaction mixture.

mate mutase의 Km 값은 *E. coli* (chorismate mutase P, 0.045 mM; chorismate mutase T, 0.39 mM) (12, 16)와 *S. typhimurium* (0.08 mM, (13)에 비해 훨씬 높은 값인데 비해 *Pseudomonas aeruginosa* (1.7 mM) (14)와는 비슷하고 *B. subtilis* (2.6 mM) (15) 보다는 낮은 수치에 해당된다.

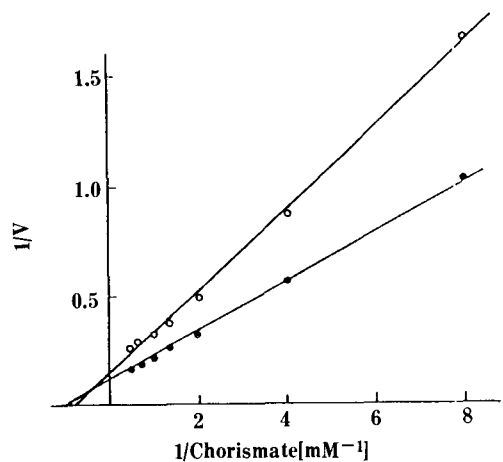


Fig. 4. Lineweaver-Burk plots of CM I and CM II. 2.0 units of the enzymes were used and the activity was assayed in the standard reaction mixture except for chorismate concentration. ○, CM I; ●, CM II.

**Table 2. Effect of metal ions on the activities of chorismate mutase I and II.**

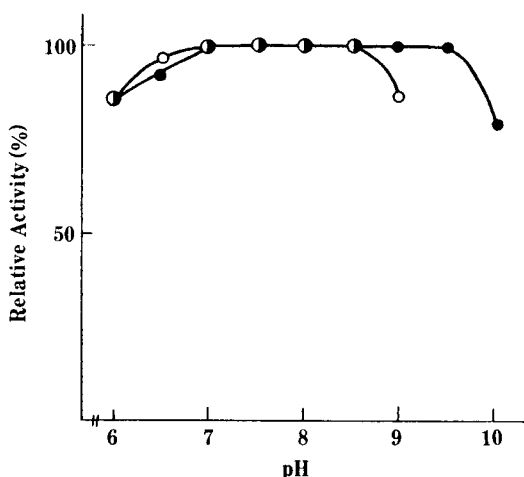
Metal ion	Relative activity (%)	
	CM I	CM II
No addition	100	100
Ba <sup>++</sup>	96	107
Ca <sup>++</sup>	101	105
Mg <sup>++</sup>	98	107
Co <sup>++</sup>	24	23
Cu <sup>++</sup>	1	13
Zn <sup>++</sup>	1	5
Fe <sup>++</sup>	17	71
Hg <sup>++</sup>	5	4

Each metal ion was added into the standard reaction mixture at the concentrations of  $5 \times 10^{-3}M$ .

**금속이온의 효과**

CM I 및 CM II 효소활성에 미치는 각종 금속이온의 효과를 조사해 본 결과(Table 2 참조) 두 isoenzyme은 금속이온 효과에 있어서 뚜렷한 차이를 보였다.

즉 Ba<sup>++</sup>과 Mg<sup>++</sup>은 CM I의 활성은 약간 저해시키는 반면에 CM II는 오히려 약 7% 정도 활성화시키는 효과를 보였다. 그리고 Fe<sup>++</sup>과 특히 Ca<sup>++</sup> 및 Zn<sup>++</sup>은 두 효소활성을 현저히 저해시키고 있으나 CM I이 CM II보다 이들 이온에 대해 훨씬 더 민감하였다.



**Fig. 5. pH stability of CM I and CM II.**

The enzyme preparations were incubated at 4°C and various pHs for 24 hours, and then assayed in the standard reaction mixture. ○, CM I; ●, CM II.

**효소의 안정성**

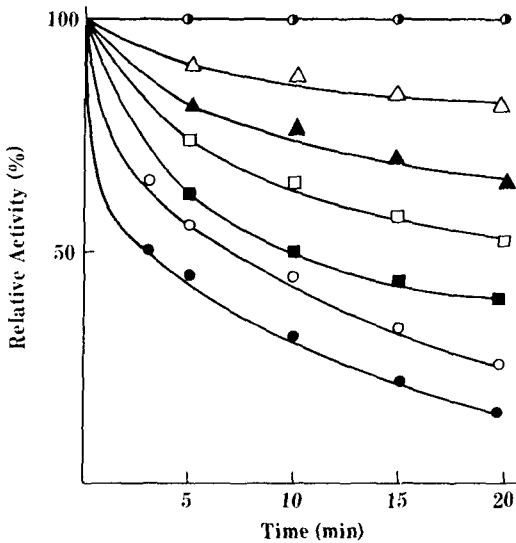
Mcllvaine buffer(pH 5.0-7.5)와 Atkins-Pantin buffer(pH 7.5-10.0)을 사용, Fig. 5와 같이 각 pH에서 CM I과 CM II를 4°C에서 24시간 보존한 후 효소활성을 측정, pH에 따른 효소 안정성을 조사하였다.

CM I은 pH 7.0-8.5에서 매우 안정함을 보였으며 CM II는 CM I에 비해 더욱 넓은 범위의 pH(pH 7.5-9.5), 특히 알칼리성 pH에서 더욱 안정하다는 것을 알 수 있었다. 또 본 시험관은 물론이고 기타 *B. subtilis*를 비롯한 많은 다른 균종의 prephenate dehydratase에 대해 매우 효과적인 remote positive effector(6, 18)의 효과를 나타내는 L-methionine과 L-leucine 그리고 기타 일반 효소 안정제로서 효과가 보고되고 있는 몇가지 다른 시약을 본 효소액에 첨가, 4°C에서 10일간 저장하면서 효소활성 변화를 관찰하여 효소 안정성을 검토하였다. Table 3과 같이 아무것도 첨가하지 않은 조건에서 10일간 저장후의 CM I과 CM II의 잔여활성은 각각 75%와 69%로서 4°C에서 4주간 안정하였다고 보고된 *E. coli*의 chorismate mutase(16) 보다는 못하나 비교적 안정한 효소임을 알 수 있었다. 0.1 mM EDTA 또는 0.1 mM CoCl<sub>2</sub>를 첨가했을 때 CM II 효소만이 약간 안정화 효과를 보였으며 기타 시약의 경우는 특별한 효과를 나타내지 않았다. CoCl<sub>2</sub>에 대해서는 *B. flavum*(17)에서도 안정화 효과가 보고되고 있으나

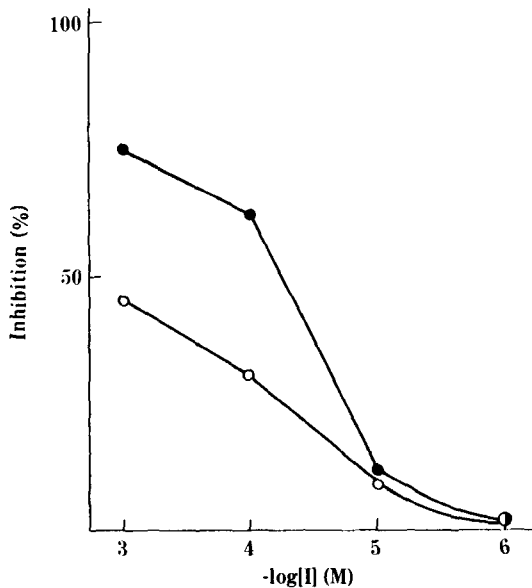
**Table 3. Stability of chorismate mutase I and II.**

Reagent	Enzyme	Storage time (days)			
		0	1	4	10
None	CM I	100	100	100	75
	CM II	100	100	88	69
L-Methionine (1mM)	CM I	100	100	100	68
	CM II	100	100	90	67
L-Leucine (1mM)	CM I	100	100	100	65
	CM II	100	100	91	64
Dithiothreitol (1mM)	CM I	110	105	100	75
	CM II	104	100	97	63
EDTA-2Na (0.1mM)	CM I	108	100	100	70
	CM II	100	100	90	90
Albumin (500µg/ml)	CM I	100	100	100	78
	CM II	100	100	87	64
CoCl <sub>2</sub> (0.1mM)	CM I	100	100	58	23
	CM II	100	100	90	90

The enzyme solutions were stored at 4°C for the period indicated in the table.



**Fig. 6. Thermal stability of CM I and CM II.**  
The enzyme was incubated in 200  $\mu$ mole tris-HCl buffer(pH7.5) at the various temperatures indicated.  $\circ$ , CM I;  $\bullet$ , CM II.  $\circ$ , 30°C;  $\Delta$ , 45°C;  $\square$ , 50°C;  $\diamond$ , 55°C.



**Fig. 7. Inhibition of the activity of CM I and CM II by p-chloromercuribenzoate.**  
The enzyme preparations were incubated in 20  $\mu$ mole tris-HCl buffer(pH 7.5) at 0°C for 10 minutes and the inhibitor was added the concentrations indicated in the figure.  $\circ$ , CM I;  $\bullet$ , CM II.

CM I의 경우는 오히려 불활성화시키는 특이한 현상을 관찰할 수 있었다. 이와같은 현상에 대해서는 앞으로 더 자세한 연구가 있어야 할것 같다.

**Table 4. Effect of pCMB on CM I and CM II activity.**

Addition	Concentration (M)	Relative activity (%)	
		CM I	CM II
None		100	100
pCMB	$1 \times 10^{-3}$	54	23
pCMB <sup>+</sup>			
Dithiothreitol	$1 \times 10^{-6}$	55	23
	$1 \times 10^{-5}$	57	27
	$1 \times 10^{-4}$	60	47
	$1 \times 10^{-3}$	85	70
pCMB <sup>+</sup>			
L-Cysteine	$1 \times 10^{-6}$	55	22
	$1 \times 10^{-5}$	56	22
	$1 \times 10^{-4}$	61	27
	$1 \times 10^{-3}$	90	80

Partially purified CM I and CM II were incubated with pCMB and dithiothreitol or L-cysteine at 0°C for 10minutes.

**열 안정성**

CM I 과 CM II 효소를 Fig. 6에 표시되어 있는 각 온도에서 일정시간 가열처리한 후 잔여 효소활성을 측정, 열안정성을 비교 검토하였다. 본 효소는 열에 대해서 비교적 안정성이 약하며 특히 CM II는 더욱 불안정하였다. 이에비해 *Sorghum bicolor* (3)의 CM I은 60°C에서 5분간 가열해도 전혀 실활되지 않았고 CM II는 55°C에서 5분간 가열함으로써 약 15%의 활성을 상실하였다고 보고하고 있어 방선균 효소보다 훨씬 높은 내열성을 가진 경우라고 하겠다.

**Sulfhydryl 시약 효과**

CM I 과 CM II 효소용액에 대표적 sulfhydryl 시약인 p-chloromercuribenzoate (pCMB)를 Fig. 7과 같이 첨가, 0°C에서 10분간 반응시킨 다음 효소활성을 측정, 활성저해 효과를 검토하였다. CM I 과 CM II 효소 모두 pCMB에 의해 현저한 저해를 받고 있어 두 isoenzyme이 sulfhydryl enzyme임을 알 수 있었다. 또한 동일농도의 pCMB에 대해서 두 효소의 저해농도는 큰 차이를 보임으로서 CM I 과 CM II 효소는 sulfhydryl기를 중심으로 한 catalytic site의 구조적 차이를 암시해 주고 있다.

pCMB 저해는 Table 4와 같이 dithiothreitol이나 L-cysteine과 같은 환원성 물질의 존재에 의해 뚜렷한 저해 완화 효과를 보이고 있어 두 isoenzyme 특히 CM II 효소활성에 미치는 sulfhydryl group의 중요성을 간접적으로 잘 나타내 주고 있다.

## 요 약

*Intrasporangium*속 방선균의 chorismate mutase는 CM I과 CM II의 두 isoenzyme으로 존재하며 최적 pH는 각각 6.5와 8.0이며 최적온도는 다같이 45°C 부근이었다. 활성화에너지는 CM I이 14.7 Kcal/mole과 CM II가 10.8 Kcal/mole로 계산되었으며 각각 1.35mM과 1.22mM의 Km 값을 나타냈다.

그러나 금속이온의 효과에 대해 두 효소가 뚜렷한 차이를 보여 Ba<sup>++</sup>과 Mg<sup>++</sup>이 CM I의 활성은 약간 저해하는데 반해 CM II는 약 7% 활성화시켰다.

두 효소는 비교적 넓은 범위의 pH에서 안정하며 4°C에서 10일간 저장했을 때 CM I이 75%, CM II가 69%의 잔여 효소활성을 보였고 0.1mM EDTA 또는 0.1mM CoCl<sub>2</sub>의 첨가는 CM II만을 약간 안정화시키는 효과를 보였고 CoCl<sub>2</sub>는 CM I에 대해 오히려 불활성화 효과를 나타냈다.

열에 대해서는 불안정했으며 특히 CM II가 더욱 불안정하였다. CM I과 CM II는 pCMB에 의해 현저한 활성저해를 받았으며 저해정도는 두 효소가 큰 차이를 보여 catalytic site의 구조적 차이를 암시해 주고 있다.

## 참고문헌

1. Bode, R., M. Cristian and B. Dieter: Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **365**, 799 (1984).
2. Fiske, M. J., and J.F. Kane: *J. Bacteriol.* **160**, 676 (1984).
3. Singh, B.K., J.A. Connelly and E.E. Conn: *Arch.*

*Biochem. Biophys.* **243**, 374 (1985).

4. Baldwin, G.S. and B.E. Davidson: *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 374 (1983).
5. Nester, E.W., J.H. Lorence and D.B. Nasser: *Biochemistry* **6**, 1553 (1967).
6. 조원대, 최용진, 양한철; 한국산업미생물학회지 **16** 238(1988).
7. 이승엽, 조원대, 최용진, 양한철; 고려대학교 농림논집 **27** 131(1987).
8. Gibson, F.: *Methods in Enzymology vol. 17A*, p. 362 (1970).
9. Monad, J., G. Cohen-Bazire and M. Cohen: *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 585 (1951).
10. Cotton, R.G.H. and F. Gibson: *Biochim. Biophys. Acta* **100**, 76 (1965).
11. Lowry, O.H., J. Rosebrough, A.C. Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 264 (1951).
12. Dopheide, T.A.A., P. Crewther and B.E. Davidson: *J. Biol. Chem.* **247**, 4447 (1972).
13. Schmit, J.C. and H. Zalkin: *Biochemistry* **8**, 174 (1969).
14. Ahmed, S.I. and J.J.R. Campbell: *J. Bacteriol.* **115**, 205 (1973).
15. Lorence, J.H. and E.W. Nester: *Biochemistry* **6**, 1541 (1967).
16. Sampathkumar, P. and J.F. Morrison: *Biochim. Biophys. Acta* **702**, 204 (1982).
17. Sugimoto, S.I. and I. Shiio: *J. Biochem.* **88**, 167 (1980).
18. Fazel, A.M. and R.A. Tensen: *Arch. Biochem. Biophys.* **200**, 165 (1980).

(Received July 8, 1988)