

## 高度 好熱性菌 *Thermus caldophilus* Adenylate Kinase의 정제와 성질

기우경<sup>1\*</sup>·太田 隆久<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 농과대학 식품공학과, <sup>2</sup>東京大学 農学部 酵素学 研究室

### Purification and Characteristics of Adenylate Kinase from Extreme Thermophile *Thermus caldophilus* GK-24

Ki, Woo-Kyung<sup>1\*</sup> and Ohta Takahisa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Geyongsang National University, Jinju 660-300, Korea

<sup>2</sup>Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Tokyo University

The adenylate kinase was purified from an extreme thermophile by adenosine-pentaphospho-adenosine elution from phosphocellulose column. The molecular weight was estimated to be 22,000 by SDS-PAGE and gel filtration. The optimum temperature of the enzyme activity was 80°C and the activation energy was given as 22.4 kcal/mole. The enzyme even showed full activity after incubation at 90°C or in 6M guanidine-HCl at 30°C and retained 75% of its original activity even after 1 hour at 100°C. The Michaelis constants of the enzymes for AMP, ADP, and ATP were 0.01 mM, 0.017 mM and 0.067 mM, respectively.

Adenylate kinase 연구의 대부분은 진핵생물 효소에 대해 이루어졌으며 세균에 대한 연구는 그 예가 적고 효소학적 성질에 대한 상세한 연구도 적다. Bacteria adenylate kinase에 관한 연구는 Rutherford(1) 등이 *Dictyostelium discoideum*의 분화에 있어서의 역할에 대해<sup>1)</sup>와 Spidich(2) 등에 의한 *Bacillus subtilis*에서의 세포내 소장에 대해서 보고하고 있다. 대장균의 경우 온도감수성균 효소와의 비교 연구(3, 4, 5)와 SN-acetyltransferase와의 상호작용 등이 보고하고 있다. 효소학적 연구는 *Thiobacillus neapolitans*(7) *Leuconostoc mesenteriodes*(8) *Pseudomonas denitricans*(9), *Thiobacillus novellus*(10), *Esherichia coli*(10), *Vibrio natrigens*(12)에 대해 연구되었으나 정제된 효소에 대한 연구는 거의 없다. 그러므로 본 연구에서는 원핵생물중 특수조건이라 볼 수 있는 온천물에서 서식하는 세균의 adenylate kinase에 대해 논술코자

한다.

#### 재료 및 방법

##### 효소활성 측정법

통상의 효소활성 측정은 전보(13)와 같이 coupling 효소계를 사용하였다. 단, 측정시 70 nM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)에 0.5 mM AMP를 반응액으로 사용한 것을 달리하였다. 효소반응은 30°C로 예온한 후 반응액 1 ml에 0.06 µg~0.2 µg의 효소를 가했으며 특별한 경우를 제외하고는 AMP와 ADP를 만드는 정반응만을 측정하였다. PEI (polyethyleneimine-impregnated cellulose)를 이용하는 RI 분석도 전보(13)와 같았으나 1 mM ATP, 0.5 mM AMP 70 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0), 0.4 µCi~0.1 µCi [<sup>14</sup>C]nucleotide 0.1% BSA를 함유하는 60 µl의 반응용액을 50°C로 예온한 후 효소

Key words: Adenylate kinase, *Thermus caldophilus*

\*Corresponding author

0.012  $\mu\text{g}$ ~0.12  $\mu\text{g}$ 을 가해 반응을 시키고 PEI-cellulose로 전개후 전보(13)와 같은 방법으로 측정하였다.

**단백질 측정**

단백질 측정은 Lowry 등의 방법에 의해 bovine serum albumin을 표준단백질로서 사용하였다.

**분자량 측정**

분자량 측정에는 Sephadex G-100 gel 여과와 SDS 전기영동을 행하여 추정하였다.

**효소의 정제**

**균체 생산** : 균주는 고도 호열성균 *Thermus caldophilus* GK 24를 사용하여 배양은 Taguchi 등의 방법(13)으로 75°C에서 배양하였고 균체는 -20°C에서 보존한 것을(3개월 이내) 사용하였다.

**효소 추출** : 400g의 동결 균체를 30°C 항온조 내에서 800 ml의 20 mM 인산 완충용액(pH 7.5)을 가해 교반하며 현탁하여 500 kg/cm<sup>2</sup>에서 3회 Manton-Gaulin으로 파쇄하고 4°C에서 20,000×g로 30분간 원심분리하여 상정액(660 ml)을 조효소액으로 하였다. 이하 전 조작을 4°C에서 행하였다.

**유안 분획** : 조효소액에 유안을 30%(108g)되게 가해서 원심분리(12,000 rpm, 40분)한 상정액에 60%(120g)되게 다시 유안을 첨가하여 원심분리(12,000 rpm, 40분)한 침전물을 20 mM 인산 완충용액에 녹여 동일 완충용액으로 투석하였다.

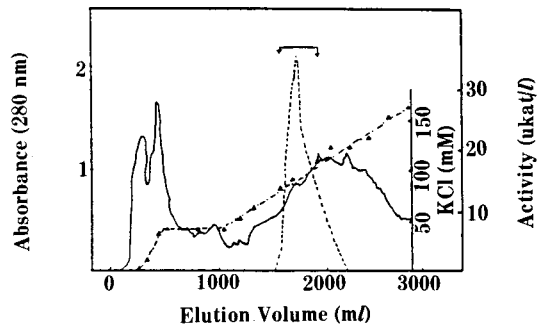
**산처리** : 투석한 효소액을 교반하며 pH가 5.4가 될 때까지 1 M 초산 완충액(pH 5.4)을 서서히 가하고 다시 pH가 5.1이 될 때까지 1 M 초산을 가해서 30분간 원심한 상정액에 소량의 고체 Tris-Base를 가하여 pH를 7.8로 조절한 후 20 mM Tris-HCl 완충액에 대해서 투석하였다.

**DEAE-cellulose chromatography** : 투석한 효소액을 미리 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(3.4 $\phi$ ×66 cm : 660 ml)에 흡착시킨 후 약 2l의 50 mM Tris-HCl로 세척하고 동 완충액을 함유하는 0~250 mM의 KCl 직선농도 균배(pH 7.8)로 용출시켜 비활성도가 높은 부분을 모아(930 ml)투석 튜브에 옮기고 고체 유안으로 농축하고 45분간 20,000 rpm에서 원심분리하여 침전물을 소량의 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.6)에 녹이고 동 완충액으로 투석하였다.

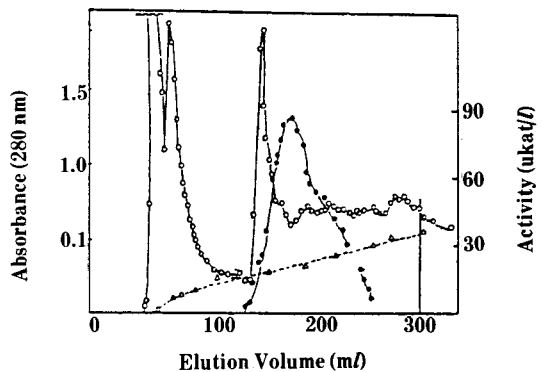
**DEAE-sephadex A-25 chromatography** : 투석한 효소액을 20 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.6)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-25(15 $\phi$ ×69 cm : 120 ml)

column에 흡착시키고 50 mM KCl을 함유하는 20 mM Tris-HCl 완충액으로 column을 씻어준 후 20 mM Tris-HCl 완충액을 함유하는 0.0~0.3 M KCl로서 용출시켜 활성분획을 모우고 175 ml 투석 tube에 넣어 포화 유안용액에 대해 투석하여 침전시킨 후 원심분리하여 침전을 모우고 20 mM imidazole 완충액(pH 7.0)에 녹이고 동일 완충액에 대해서 투석하였다.

**Phospho cellulose column chromatography** : 투석한 효소액을 증류수로서 2배 희석하고 10 mM imidazole-HCl 완충액으로 평형화시킨 phospho cellulose column에 흡착시키고 흡착되지 않는 부분을 20 mM imidazole-HCl 완충액 700 ml로 씻어준 후 효소를 20 mM imidazole-HCl 완충액 중 0~15  $\mu\text{M}$ 의 Ap5A(Diadenosine pentaphosphate, 이하 Ap5A라 표시함)의 직선농도 균배로 용출시켰다.



**Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of adenylate kinase from *Thermus caldophilus* GK-24.** Proteins (—) were measured by the absorbance at 280 nm. The enzyme activities (----) were measured as described in Materials and Methods. The molality of KCl ( $\Delta$ --- $\Delta$ ) in eluted fractions were estimated from conductivity.



**Fig. 2. DEAE-sephadex A-25 column chromatography.** (○) Absorbance at 280 nm; (●) activity in uKat/liter; ( $\Delta$ ) KCl gradient.

활성을 나타내는 부분을 모아 pM-10으로 농축하였으며 필요에 따라 ATP 14mM되게 가하고 유산 침전과 투석을 반복하여 Ap5A를 제거하였다.

**결과 및 고찰**

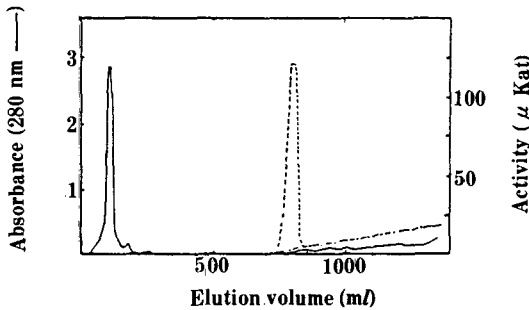
**효소의 정제**

본 adenylate kinase는 산처리와 phosphocellulose column으로부터 Ap5A에 의한 특이적 용출에 의해 효과적으로 정제되었다(Fig. 1).

산처리의 경우 1M Acetate buffer를 가하여 pH를 5.4까지 내린 후 1M Acetic Acid로 pH를 5.1까지 조절하므로 다른 불순단백질의 공침을 억제할 수 있었다(Fig. 2)

효소는 효모 효소와는 달리 AMP에 의한 용출은 효과적이지 않았고 Ap5A gradient elution이 효과적으로 정제되었다(Fig. 3).

Table 1은 Thermus adenylate kinase 정제 결과를 나타낸 것으로 조효소액으로부터 2,400배 정제되



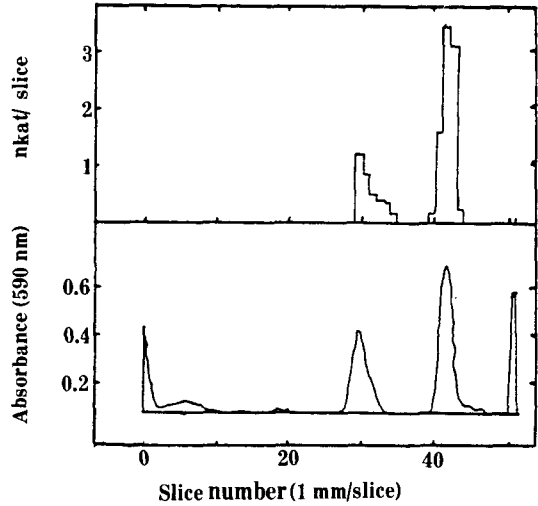
**Fig. 3. Phosphocellulose column chromatography**  
(—) Absorbance at 280 nm; (---) absorbance at 260 nm; (····) activity in uKat/liter.

**Table 1. Summary of purification procedure**

| Steps                     | Total volume (ml) | Total activity (ukat) | Specific activity (mkat/kg) | Yield (%) |
|---------------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------|
| Crude extract             | 660               | 22.8                  | 1.40                        | 100       |
| Ammonium sulfate (30-60%) | 125               | 19.6                  | 2.67                        | 86        |
| Acid treatment            | 280               | 19.5                  | 6.67                        | 85        |
| DEAE-cellulose column     | 930               | 15.6                  | 18.0                        | 68        |
| DEAE-Sephadex A-25        | 175               | 10.1                  | 160                         | 64        |
| Phosphocellulose column   | 64.5              | 5.38                  | 3420                        | 24        |

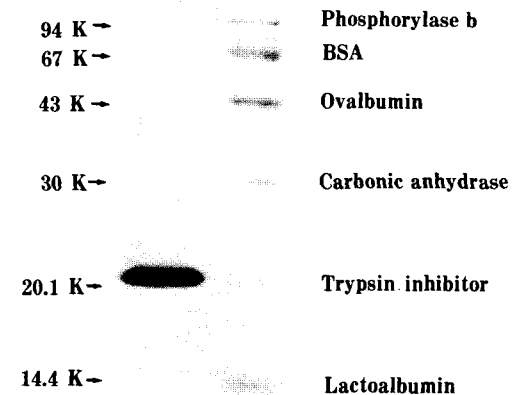
었으며 수율은 24% 이었다(Table 1).

Phosphocellulose column에서 Ap5A로 용출한 효소를 Davis계로 전기영동을 행한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 2개의 효소 활성 band와 6개의 단백질



**Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis**  
(a) enzyme activity staining  
(b) protein staining

The enzyme (3.5 μg) from phosphocellulose column were applied to 7% gel. After electrophoresis, one of the enzyme-loaded gels was sliced by 1mm width. The enzyme was extracted from the sliced gels with 100 ul of 20 mM Tris-HCl buffer for 24hr at 4°C. The other gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 and destained with acetic acid-7% methanol for scanning of the gel at 590nm.



**Fig. 5. Estimation of molecular weight of the enzyme by SDS-PAGE**  
Right lane indicates maker proteins and left lane denotes the purified enzyme (10 ug).

band를 가졌다(Fig. 4).

2개의 단백질 band는 그에 상응하는 효소활성 band를 보였으나 14 mM ATP(14)의 공존하에서 유안 침전을 반복한 결과 한개의 단일 band로 되었다. 이것은 효소가 Ap5A에 대해 극히 affinity가 강하여

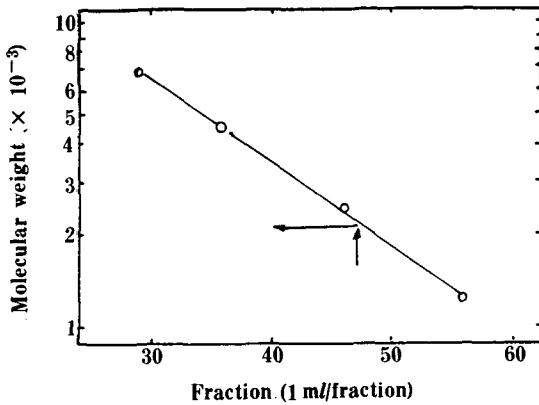


Fig. 6. Estimation of the molecular weight by Sephadex G-100.

The column (0.9×54cm) was equilibrated with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1M KCl. The open circles indicate marker proteins: From left to right; Bovine serum albumin 68,000, Ovalbumin 45,000, Chymotrypsinogen 25,000, and Cytochrome c 12,500. Arrow indicates the position of the enzyme eluted.

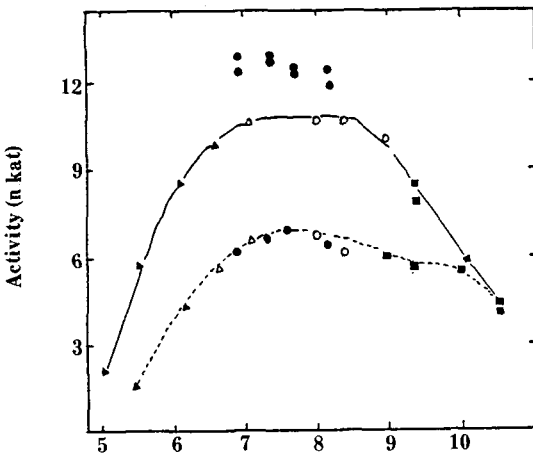


Fig. 7. Optimum pH of the purified enzyme

The optimum pH of the enzyme was determined in the forward and in the reverse reaction; ADP formation, —; AMP and ATP formation, ----. The buffer solutions of the reaction mixture were contained 0.2M NaCl and they were as follows: Mes (▲); HEPES (△); Tris-HCl (●); Glycyl-glycine (○); Glycine (■)

Davis계 전기영동에서도 Ap5A가 효소로부터 유리되지 않았다고 생각된다.

순도

Phosphocellulose column으로부터 용출된 액을 농축하여 비활성을 측정된 결과 일정한 값을 보여준 것과 SDS 전기영동에서 한개의 band를 나타낸 것 및 Ap5A를 제거한 효소 표품이 Davis 전기영동에서 단일의 band를 보여준 점으로 단일의 단백질까지 정제된 것이라 생각된다(Fig. 5).

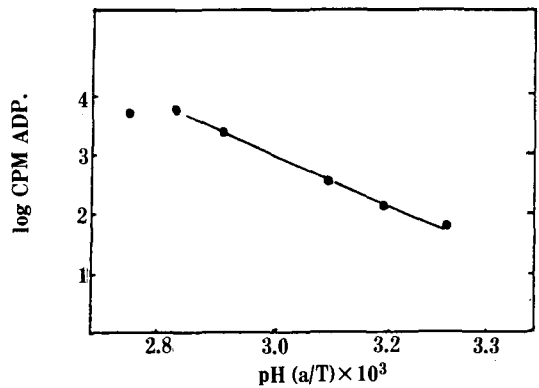


Fig. 8. Arrhenius plot.

The reaction mixture contained 5 mM AMP, 5 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% BSA, 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.6),  $2 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C-AMP}$  and 0.34  $\mu\text{g}$  of enzyme per ml of the reaction mixture.

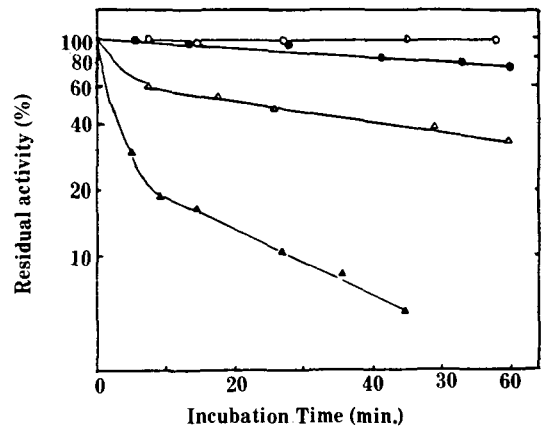


Fig. 9. Thermal stability of the purified enzyme

The purified enzymes (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were incubated in the following conditions: 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.6) at 90°C (●); 50mM potassium phosphate buffer (pH 6.7) at 90°C (△); 50mM borate buffer (pH 9.5) at 90°C (▲); 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.6) at 100°C (○).

### 분자량 측정

정제효소의 분자량은 SDS 전기영동(Fig. 5)과 Sephadex G-100(Fig. 6)에 의해 측정된 결과 동일한 22,500을 보여주었다.

이러한 분자량은 동물의 근육형 효소와 같으며 Mitochondria형 효소보다 적은 값이다. 세균의 효소와 비교하면 *Thiobacillus newellus* (10) 46,300, *Vibrio* (12) 30,000, *E. coli* (6, 11) 27,000, *Leuconostoc* (18) 26,000보다 적고 *Thiobacillus neopolitans* (9) 21,000와 유사한 값을 보여준다.

### 최적 pH

본 효소의 작용 최적 pH는 Fig. 7에 보여준 것과 같이 ADP 생성의 경우 6.5~9.5이며 ATP와 AMP 생성의 경우 6.5~10이었다(Fig. 7).

*Thiobacillus neopolitans* (7)의 경우 AMP와 ATP를 생성하는 역반응의 최적 pH가 6.5~10.5, ADP 생성의 경우 9.5~11로 보고 되고 있으나 그 이외의 효소보다 최적 pH 범위가 넓다.

### 효소반응에 미치는 온도의 영향

ADP를 생성하는 정반응에 충분한 기질농도에서 온도를 변화시켜 가며 측정된 반응속도로 Arrhenius plot를 하였다(Fig. 8).

그림에서 나타난 것과 같이 80°C까지는 직선적이며 최적온도는 80°C였다. 그림의 경사에서 계산한 효소의 활성화 Energy는 ADP 생성반응에서는 22.4 kcal/mole이며 *E. coli* 11.5 kcal *Thiobacillus novellus* (10) 3.5 kcal *Thiobacillus neopolitans* (7) 4.2 kcal에 비해 높은 치였다.

### 안정성

Fig. 9에 보여준 것 같이 본 효소의 열 안정성은 극히 높았다.

안정 pH 범위인 pH 7.6에서는 100°C 1시간 열처리하여 25% 실활하였으나 90°C에서는 전연 실활하지 않았다. 30°C에서는 pH 2.0과 9.5에서는 실활하지 않았으며 90°C에서는 pH 6.7보다 9.5일 경우 더 불안정하였다. *Thermus* 효소는 5M Guanidine-HCl에서는 90분간 60°C에서 효소 역가가 약간 실활 되었으나 6M에서는 30°C에서 90분간 전연 실활을 보여주지 않았다.

### Michaelis 정수

본 효소의 Km치는 AMP에 대해 0.019 ATP에 대해 0.017, ADP에 대해 0.067 mM로서 다른 고등 동물이나 효모 혹은 여러 세균보다 적은 치를 보여 주었다(6.16, 12.5).

### 요 약

고도 호열성균의 Adenylate kinase가 phosphocellulose column의 adenosine-penta-phospho adenosine affinity elution으로부터 균일하게 정제되었다. 분자량은 SDS PAGE와 gel filtration으로부터 22,000의 단량체로 밝혀졌다.

효소반응의 최적온도는 80°C였으며 정반응의 활성화 에너지는 22.4 kcal/mole이었다.

본 효소는 6M guanidine-HCl에 활성을 잃지 않았으며 100°C에서 한시간에 75%의 활성을 유지하였다. AMP, ADP, ATP에 대한 Km치는 0.01 mM, 0.017 mM, 0.067 mM이었다.

### 참고문헌

1. Rutherford, C.L. and B.E. Wright, *J. Bacteriol.* **108**, 269-275 (1971).
2. Spudich, J.A. and A. Kornberg, *J. Bacteriol.* **98**, 69-74, (1969).
3. Glaser, M., W. Nulty and P.R. Vagelos, *J. Bacteriol.* **23**, 128-136 (1975).
4. Esomon, B.E., C.R. Kensil, C.H. Chena and M.J. Glaser, *J. Bacteriol.*, **141**, 405-408, (1980).
5. Glembotski, C., A.G. Chapman and D.E. Atkinson, *J. Bacteriol.*, 1374-1385, (1987).
6. Goelz, S.E. and J.E. Cronan, *Biochem.*, **21**, 189-195, (1982).
7. Mazzotta, M.Y. and E.J. Johnson, *Biochem. Biophys. Acta.*, **321**, 512-525, (1973).
8. O'Rorke, A. and G. O'Cuinn, *Intl. J. Biochem.*, **9**, 723-728, (1978).
9. Terai, H.J., *Biochem.*, **75**, 1027-1036, (1987).
10. Mckellar, I.R.C., A.M. Charles and B.J. Butler, *Arch. Microbiol.*, **124**, 275-284, (1980).
11. Holmes, R.K. and M.F. Singer, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2014-2021, (1973).
12. Ramotar, K. and M.A. Pickrd, *Can J. Microbiol.*, **27**, 1053-1059, (1981).
13. Taguchi, H., M. Yamachita and T. Ohta, *J. Biochem.*, **91**, 1343-1348, (1982).

(Received September 1, 1988)