

한국산 고등균류에 관한 연구(제 5보) 능이 중 단백분해효소의 특성과 N- 말단 아미노산배열

은재순·양재현·이태규·최동성

전주우석대학

(Received October 20, 1989)

Studies on Higher Fungi in Korea (V) —N-Terminal Amino Acid Sequence and Some Properties of Proteolytic Enzyme from *Sarcodon aspratus*—

Jae-Soon Eun, Jae-Hean Yang, Tae-Kyu Lee and Dong-Seong Choi

Jeonju Woosuk University, Jeonju, 565-800, Korea

Abstract—The alkaline protease produced by *Sarcodon aspratus*(Berk) S. Ito. was purified from its fruit bodies. The enzyme was purified by using ammonium sulfate fractionation, tris-acryl CM-cellulose column chromatography and chromatofocusing. The protease migrated as one major band with a molecular weight of about 29,000 dalton on sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The amino acid sequence of the N-terminal residues(21) of the enzyme was determined by automated sequence analysis. The sequence was Val-Thr-Thr-Lys-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Gly-Asn-Ile-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Leu. Comparison of this sequence with the N-terminal sequence of the p-roteinase K from *Tritirachium album* showed high similarity, i. e. 57.8% identical residues. The protease displayed a relatively high stability in sodium dodecyl sulfate.

Keywords □ Alkaline protease, *Sarcodon aspratus*, molecular weight, N-terminal amino acid sequence.

버섯은 영양가는 낮으나 기호 특성과 많은 생리특성^{1,2)}을 겸비한 유망한 기능성 식료자원이며, 부작용이 적다는 점에서 천연의약품의 개발소재로서 그 가능성이 매우 크다.

버섯류가 생성하는 효소는 거의 가수분해효소로 알려져 있으며, 그 중 protease는 주로 carboxyl protease로서 저해제인 S-PI에 극히 높은 감수성을 나타내나, 식용버섯을 중심으로, 일부 버섯에서는 S-PI에 의해 활성저해를 받지 않는다고 보고되었다.³⁾ *Irpex lacteus*가 생산하는 수종의 protease 중 높은 응유활성을 가지고 있는 carboxyl peptidase에 대해서는 kobayashi 등⁴⁻⁷⁾에 의해 보고되었으며, 현재 미생물 rennet로서 실용화되어 있는 *Mucor pusillus*의 protease에 필적하는 것으로 알려져 있다.

한편 *Coprinus macrorrhizus f. microporus*는 드물게 alkaline protease를 생산하고 있음이 알려져 있다.⁸⁾

능이(*Sarcodon aspratus*)는 식용버섯으로 농촌에서 육류를 먹고 체하였을 때 가정의 단방약으로 사용되어 왔고, 또한 육류요리시 사용되어 왔던 점을 중시하여, 새로운 단백소화효소제로서의 개발가능성을 검토하였다. Park^{9,10)}은 능이에는 유리아미노산 21종과 금속원소인 Ca, Fe, Zn, Mg 및 Mn 등이 함유되었다고 하였으며, 최근에 Park¹¹⁾과 Lee¹²⁾ 등은 능이 중에 활성이 높은 protease가 함유되었다고 보고하였다. Lee¹²⁾는 이를 분리 정제하여 제 성질을 조사한 결과 alkaline protease임을 확인하였으며, 본 저자들은 능이 중의 protease가 시판되고 있는 단백소화효소제 보다 단백분해력이

강력하고,¹³⁾ 저장시 안정성이 있으며 endopeptidase 일 가능성을 보고한 적이 있다.¹⁴⁾ 또한 Uhm 등¹⁵⁾과 Rhy¹⁶⁾는 이 protease의 활성부위가 tryptophan과 serine에 있다고 추정하였다.

그러나 아직도 능이 중의 protease에 대한 생화학적인 성질이 충분히 규명되지 않았기 때문에, 본 실험에서는 protease에 대한 분자량측정, sodium dodecyl sulfate에 대한 안정성 및 N-말단 아미노산배열을 21번 잔기까지 동정하였기에 이에 보고하고자 한다.

실험방법

재료 및 시약—본 실험에 사용한 능이는 전북 진안군 운장산에서 채취하여, 동결건조시켜 -50°C 에 보관하면서 사용하였다. 시약은 CBZ-L-phenylalanine-p-nitrophenyl-ester (Sigma Co.), polybuffer 118 gel 및 pharmalyte (pH 8~10.5) (이상 pharmacia Fine chemicals), acrylamide, N,N'-methylene bisacrylamide, N,N',N',N'-tetramethylethylenediamine (이상 Wako Co.) polyvinylidene difluoride (PVDF) sheet (Millipore Co.) 및 amino acid sequence 용 시약 (Applied Biosystem)을 사용하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

기기—Ultracentrifuge (Hitachi 70P-72), Column chromatography system (LKB), Freeze drying apparatus (Labconco) 및 Applied biosystems model 477A/120A protein sequencer를 사용하였다.

효소활성의 측정—단백분해효소의 활성은 Lee의 방법¹²⁾에 준하여 측정하였으며, 합성기질 CBZ-L-phenylalanine-p-nitroester를 사용하여 효소활성을 측정할 경우에는, 효소액 $10\ \mu\text{l}$ (protein으로 $10\ \mu\text{g}$), 1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) $10\ \mu\text{l}$, acetonitrile에 용해한 기질용액 $10\ \mu\text{l}$ ($10\ \text{mg/ml}$), acetonitrile $30\ \mu\text{l}$ 및 H_2O $990\ \mu\text{l}$ 를 함유하는 표준반응액을 37°C 에서 45분 반응시킨 다음, 즉시 $400\ \text{nm}$ 에서 그 흡광도를 측정하였으며 대조와의 백분율을 효소활성도를 나타내었다.

효소의 정제—효소의 정제는 Lee의 방법¹⁴⁾에 의해 ammonium sulfate에 의한 분획, Tris-acryl

CM-cellulose 칼럼크로마토그래피 및 chromatofocusing으로 정제하였으며, 정제된 효소의 확인 및 분자량의 측정을 위한 전기영동은 Hussain 등의 방법¹⁷⁾에 준하였다.

N-말단 아미노산배열의 분석—아미노산배열 결정용 시료제조를 위한 전기영동은 Matusdiara의 방법¹⁸⁾에 따라 행하였다. 즉, gel은 Anderson 등¹⁹⁾이 변형한 Laemmli의 방법에 의해 제조하였고, 30mA에서 12시간 예비 통전하였다. 시료 ($60\ \mu\text{g}$ protein/lane)를 전기영동한 후 gel을 transfer buffer (10mM, 3-cyclohexylamino-1-propane sulfonic acid, 0.5mM dithreitol 및 10% MeOH, pH 11.0)²⁰⁾에 5분 동안 침지하였다. 동시에 별도로 PVDF막을 MeOH로 가볍게 세척하여 사용 직전까지 transfer buffer에 담가 놓았다. PVDF막과 gel을 샌드위치처럼 포개어 블로팅장치 (Mighty Small, Hoeffner)에 삽입시킨 다음, 미리 생각한 transfer buffer 중에서 200mA로 1.5시간 전기용출시켰다. PVDF막을 탈이온수로 5분 세척하고 50% MeOH에 용해한 0.1% coomassie brilliant blue R-250 중에서 5분 염색한 다음, 50% MeOH, 10% AcOH로 5~10분 탈색하였다. 염색된 band를 직경 1cm 크기로 잘라내어 Teflon seal의 중앙에 놓은 다음, sequencer의 upper cartridge block에 setting하였다. 단백질의 아미노산배열은 프로그램 FIL-1을 사용하는 on-line phenylthiohydantoin (PTH) 분석장치를 내장한 Applied biosystem protein sequencer로 분석하였다.

기타분석—gel의 염색은 Fairbanks 등²¹⁾의 방법에 준하였고, 당단백질의 확인을 위한 gel 염색은 Zacharius 등²²⁾의 periodic acid-schiff (PAS) 염색법에 의하였다. 단백질농도는 Lowry 등의 방법²³⁾에 따라 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

분자량 결정—정제된 효소의 밴드프로필 및 분자량을 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 결정하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. 효소단백을 물에 용해하

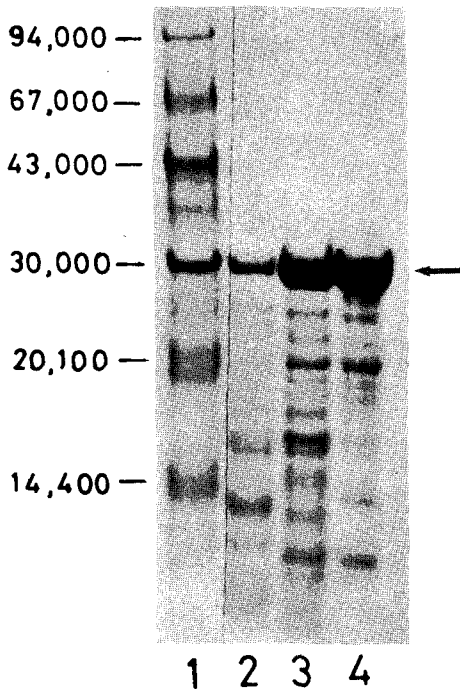


Fig. 1—SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Sarcodon aspratus* protease purified by chromatofocusing.

Sixty micrograms of each of purified enzyme pretreated or not were dissolved in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.1, 3% SDS, 2% mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue and 20% glycerol at 100°C for 5 min. and then analyzed by SDS-PAGE and finally stained with coomassie brilliant blue.

Lane 1; molecular weight standard: phosphorylase b (94,000) bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), -lactalbumin (14,400).

Lane 2; predissolved in H₂O, Lane 3; directly dissolved in sample buffer, Lane 4; pretreated with 0.1 N HCl.

←: indicates the position of the purified enzyme.

고 sample buffer 를 가한 후 전기영동하였으나 주요 band 가 나타나지 않았다(lane 2). 이러한 현상은 농축 동결건조된 효소가 물에 용해됨과 동시에 아주 빠른 속도로 자가소화가 일어난 것이라 생각되어, 효소단백을 sample buffer 에 직접 녹이거나(lane 3), 빙냉한 0.1 N HCl(mg protein/ml 0.1 N HCl)로 변성시킨뒤, 최종농도가 10%가 되도록 TCA 를 가하고, 원심분리하여 얻어진 침전물을

acetone 으로 2회, 세척하고 건조한 후, sample buffer 를 가하면(lane 4), 분자량 약 29,000에 일치하는 곳에 주밴드가 나타났으며, 동시에 저분자량의 위치에도 많은 밴드가 나타났다. 저분자량 영역의 밴드가 능이 protease 의 자가소화물인지 또는 열분해 산물인지는 확실하지 않으나 lane 3, 4 보다 lane 2의 주밴드의 농도 또는 크기가 작고 분자량 20,000 위치의 밴드가 사라진 것으로 보아(lane 2) 자가소화산물일 가능성이 시사되나, 능이 protease 의 native form 의 열분해산물일 가능성도 배제할 수는 없다. Lee¹²⁾는 능이 protease 의 분자량을 30,100, Uhm¹⁵⁾은 13,500(±1,000)으로 보고하였는데, SDS-PAGE 를 이용한 분자량 측정에서는 Lee 의 보고와 거의 일치하였다.

N-말단 아미노산배열의 결정—PVDF 막에 electroelute 시킨 효소단백 중 분자량 약 29,000의 주밴드를 잘라 내어, gas-phase sequenator 로 21 cycle 짜의 아미노산배열까지 자동분석하였으며, 1 cycle 짜는 PTH-유도체의 회수율을 높이기 위하여 2회 반복하였다. 한편 배열분석 중 효소단백의 분해가 일어나, 그 이후의 아미노산배열은 결정하지 못하였다.

1 cycle 짜의 PTH-유도체의 chromatogram 은 Fig. 2와 같고 N-말단 아미노산은 Valine 으로 동정되었다. Fig. 3에 21 cycle 까지의 아미노산배열의 분석결과를 나타내었다. N-말단에서부터 Val-Thr-Thr-Lys-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Gly-X-Ile-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Leu 잔기순이었다. 14번째의 아미노산 잔기는 sequenator 에 의해서는 aspartic acid 로 동정되었으나, p mol ratio 이 6.28로서 너무 낮은 수치를 나타내었고 실제의 graph 상에서도 주 peak 로 간주할만한 peak 가 없었으므로 aspartic acid 로 단정할 수가 없었다. Glycoprotein 의 아미노산배열을 PTH-유도체로 만들어 분석하는 경우 당에 의해서 수식된 아미노산잔기는 동정하기가 어려운 실정이다. N형 glycoprotein 은 asparagine 에 당수식이 일어나며, 실제 varient surface glycoprotein 에 있어서, Asn-X-Ser.(Thr.)배열 중에 존재하는 asparagine 에 glycosylation 이 일어나고, 수식에 관여하는 oligosaccharide 는 glucosamine, mannose, galactose 등²⁴⁾이다. Uhm 등¹⁵⁾은 능이

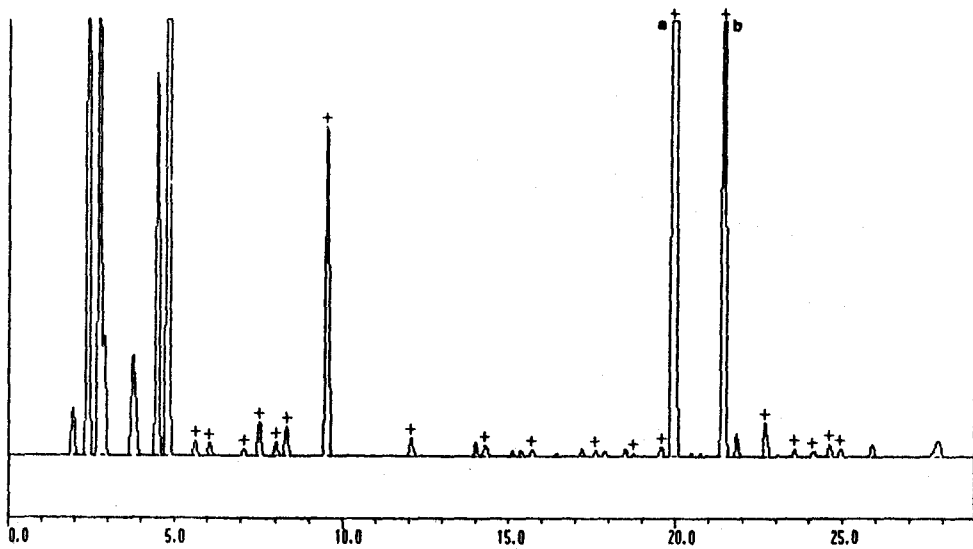


Fig. 2—One cycle chromatogram of PTH-derivative from about 2 n mol of *Sarcodon aspratus* protease. Electroblooded onto PVDF membrane and stained with coomassie brilliant blue R 250. The band was excised from the membrane and sequenced directly. The abscissa shows OD₂₇₀, the ordinate elution time. Peak a is valine, peak b is N, N'-diphenyl thiourea.

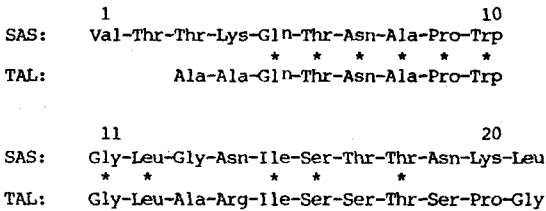


Fig. 3—N-Terminal amino acid sequence of the protease from *Sarcodon aspratus* (SAS) and comparison of these sequences of the proteinase K. from *Tritirachium album* (TAL). *: indicates the position of the identical residues.

protease가 2.1%의 당을 함유하는(분자량으로서 약 610) glycoprotein 이라고 보고하였는데, 이에 의한다면 효소단백 중의 1개의 아미노산잔기에 glycosylation이 일어나 있을 것으로 추정되며, X-Ile-Ser 배열 중 X가 asparagine 잔기일 가능성이 시사되었다. 그러나 당함량이 너무 낮아 정제가 불충분하여 다른 glycoprotein이 혼입되었을 가능성이 있었으므로 능이 protease가 glycoprotein임을 gel 상에서 PAS 염색에 의해 직접 확인하였다. 그 결과는 Fig. 4와 같다. 능이 protease의 위치에 선명한 밴드가 나타난 것으로 보아(lane 2, 3), 능이 protease가 glycoprotein임을 확인할 수

있었고, 이 결과로부터 14번째의 아미노산잔기를 asparagine으로 동정하였으며, 이 아미노산이 당으로 수식되었을 것이라 추정되었다. 동정된 21개의 아미노산잔기 중 5개가 Threonine(23.8%)인 점이 매우 특이하였다.

한편 능이 protease의 아미노산배열은 Jany 등²⁵⁾에 의해 배열이 결정된 *Tritirachium album*에 함유된 proteinase K의 N-말단 아미노산배열과 11개의 아미노산잔기가 상동상을 나타냈다(Fig. 3). Proteinase K는 keratin을 가수분해할 수 있고 pH 7.5~12.0의 최적 pH대를 갖는 subtilisin족에 속하는 serine protease이다.²⁶⁾ 능이 protease도 pH 10.1의 최적 pH를 갖는 serine protease인 것¹⁶⁾과, 능이 protease가 proteinase K와 57.8%의 상동성을 갖고 있는 것으로 보다, 능이 protease도 subtilisin족에 속하는 serine protease임이 시사되었으며, chymotrypsin족에 속하는 다른 효소류의 N-말단 아미노산배열과의 상동성은 크게 인정되지 않았다(data not shown).

SDS 및 열에 대한 안정성—본 실험에 사용한 gel에는 0.1%의 SDS가 함유되어 있고, sample

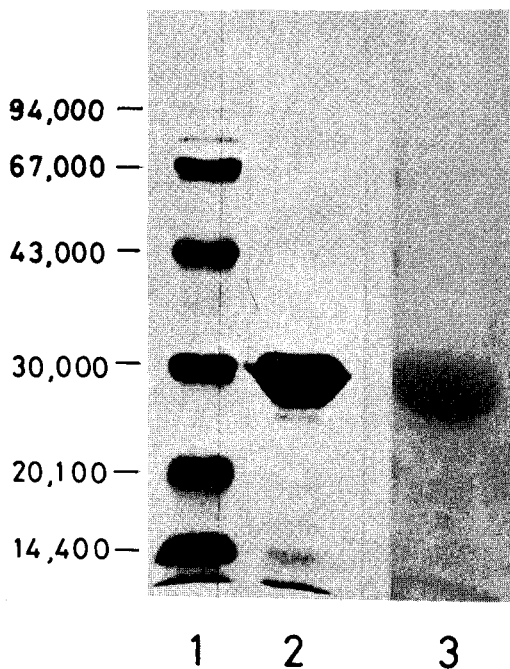


Fig. 4—Confirmation of glycoprotein of *Sarcodon aspratus* protease on SDS-polyacrilamide gel. Twenty (lane 2) or forty (lane 3) miligrams of purified enzyme were pretreated with 0.1 N HCl and dissolved in 66 mM tris buffer, pH 6.8, 3% SDS, 2% mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue and 20% glycerol at 100°C for 5 min. and then analyzed by SDS-PAGE. Lane 1; molecular weight standard, Lane 1 and 2; stained with coomassie brilliant blue, Lane 3; PAS-stained.

buffer 에도 3%의 SDS 가 함유되어 있다. 따라서 능이 protease 의 SDS 에 대한 안정성 및 저항성을 검토하였다. 능이 protease (10 µg/10 µl)를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0%의 SDS 에서 37°C, 30분간 처리하고, 이것을 효소액으로 해서 잔존효소활성을 측정하였다. 0.1%에서는 효소활성을 잃지 않았으나, 0.2%에서부터 효소활성이 완전히 실패되었다. 한편 능이 protease 를 같은 농도의 SDS (total volume 40 µl)에서 처리한 다음 2.5% TX-100-25mM Tris(pH 8.0) 400 µl, H₂O 530 µl 및 acetonitrile 30 µl 를 가한 것을 효소액으로 해서 효소활성을 측정하였을 때는 0.2%까지는 활성을 잃지 않았으나, 0.5%부터 점차 잔존활성이

Table I—The stability of *Sarcodon aspratus* protease to sodium dodecyl sulfate.

SDS (%)	Relative activity (%)*
0	100
0.1	100
0.2	100
0.5	46.7
1.0	43.3
2.0	25.5
3.0	25.0
5.0	0

*: $\frac{\text{O.D. of SDS concentration}}{\text{O.D. of control}} \times 100$

낮아져 5.0%에서는 완전히 실패되었다(Table I). 이들 결과는 능이 protease 가 SDS 에 대해 강한 저항성을 가지고 있으며, 안정함을 시사하는 것이다.

또한 Lee¹²⁾는 능이 protease 가 60°C에서 30분 처리하더라도 잔존활성이 89%로 열에 안정하다고 보고하였기에, 열에 대한 안정성을 좀 더 검토하기 위해, 능이 protease (10 µg/100 µl H₂O)만을 100°C에서 10분 가열한 후 11.2mM Tris-tris buffer (pH 8.0) 900 µl 를 가한 것을 효소액으로 하여 4°C 및 37°C에서 시간경과에 따른 잔존활성을 조사하였으나, 온도차 및 시간경과에 따른 재활성화는 인정되지 않았다(data not shown).

결 론

능이 protease 를 chromatofocusing 으로 정제하여 실험한 결과, SDS-polyacrylamide gel 상에서 분자량 약 29,000의 위치에서 주밴드를 나타냈으며, N-말단에서 21번째 잔기까지의 아미노산 배열은 Val-Thr-Thr-Lys-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu-Gly-Asn-Ile-Ser-Thr-Thr-Asn-Lys-Leu 이었으며, *Tritirachium album* 에 함유된 subtilisin 족에 속하는 proteinase K 의 N-말단 아미노산배열과 57.8%의 상동성을 나타냈다. 또한 능이 protease 는 SDS 에 대해 높은 안정성을 나타냈으며, 100°C 처리 후 재활성은 인정되지 않았다.

감사의 말씀

이 논문은 1986년도 문교부 대학부설연구소 지원 학술연구조성비의 일부로 연구되었으며, 이에 감사 드리는 바이다. 또한 본 실험을 수행하는데 협조하여 주신 나고야대학 Ichihara S. 박사에게도 감사드린다.

문헌

- 1) Mizuno, T.: Development and utilization of bioactive substances from mushroom fungi. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**, 861 (1989).
- 2) Mizuno, T.: Immunostimulativ and cytotoxic antitumor substances from mushroom fungi. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**, 862 (1989).
- 3) Oda K., Terashita T., Kono, M. and Murao, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2339 (1981).
- 4) Kobayashi, H., Kusakabe, I. and Murakami, K.: Purification and characterization of two milk-clotting enzymes from *Irpex lacteus*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 551 (1983).
- 5) Kobayashi, H., Kusakabe, I., Yokoyama, S. and Murakami, M.: Substrate specificity of the milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* on κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1611 (1985).
- 6) Kobayashi, H.: Substrate specificity of the milk clotting enzyme from *Irpex lacteus* on K and κ -casein. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1621 (1985).
- 7) Kobayashi, H.: Purification and characterization of a pepstatin-insensitive carboxyl proteinase from *Polyporus tulipiferae*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2393 (1985).
- 8) Kawai, M.: Some hydrolases of Basidiomycetes. *Hakko and Kogyo* **34**, 834 (1976).
- 9) Park, W.H.: Studies on components of *Sarcodon aspratus* (I) *Kor. J. Mycol.*, **11**(2), 85 (1983).
- 10) Park, W.H.: Studies on components of *sarcodon aspratus* (II) *Kor. J. Mycol.*, **11**(4), 159 (1983).
- 11) Park, W.H.: Studies on Enzymes of the Higher Fungi of Korea(I) *Kor. J. Mycol.*, **14**(1), 25 (1986).
- 12) Lee, T.K.: Purification and some characteristics of the proteolytic enzyme in fruitbody of *Neungee*. *J. Kor. Soc. Food. Nutr.*, **17**(1), 276 (1986).
- 13) J. S. Eun, J. H. Yang, D.Y. Cho and T. K. Lee: Studies on higher fungi in Korea(I): *J. Kor. Pharm. Sci.*, **18**(3), 125 (1988).
- 14) T. K. Lee, J. S. Eun, J. H. Yang, D. Y. Jo and H. C. Yang: Studies on higher fungi in Korea(II). *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19**(2), 81 (1989).
- 15) Uhm, T.B., Ryu, K.S., Kim, M.K., Yoo, J.S., Sohn, H.S. and Lee, T.K.: Structural characteristics of protease from *Neungee*. *Bulletin of the agricultural College Chonbuk Unational Univ.*, (1989).
- 16) Ryu, K.S.: Characterization of a serine protease from *Sarcodon aspratus*. *M.D. Thesis, Chonbuk National Univ.* (1989).
- 17) Hussain, M., Ichihara, S. and Mizushima, S.: Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *E. coli* treated with globomycin. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3707 (1980).
- 18) Matsudiara, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035 (1987).
- 19) Anderson, C.W., Baum, P.R. and Gesteland, R.F.: Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virology*, **12**, 241 (1973).
- 20) Abersold, R.H., Teplow, D.B., Hood, L.E. and Kent, S. B. H.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 4229 (1986).
- 21) Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606 (1971).
- 22) Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H. and Woodlock, J.J.: Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **30**, 148 (1969).
- 23) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 24) Ferguson, M.A.J., Duszeko, M., Lamont, G.S., Overath, P. and Cross, G.A.M.: Biosynthesis of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **261**, 356 (1986).
- 25) Jany, K.D., Lederer, G. and Mayer, B.: *Biol. Chem.*, **367**, 87(1986).
- 26) Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, M., Orth, H.D. and Lang, H.: Proteinase K. from *Tritirachium album* Limber, *Eur. J. Biochem.*, **47**, 91 (1974).