

효모 알코올 탈수소효소 아스파르트산-223 잔기의 루신으로 치환과 보조효소의 특이성

이강만# · 류지원

이화여자대학교 약학대학

(Received August 28, 1992)

Substitution of Asp-223 Residue to Leu in Yeast Alcohol Dehydrogenase and Coenzyme Specificity

Kang Man Lee# and Ji Won Ryu

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—Yeast alcohol dehydrogenase (YADH) has an acidic residue that interacts with the 2'- and 3'-hydroxyl groups of the adenosine ribose of the NAD⁺ coenzyme. The acidic residue of Asp-223 (according to horse liver alcohol dehydrogenase amino acid sequence) is supposed to determine the coenzyme specificity for NAD⁺ rather than NADP⁺. We mutated Asp-223 to leucine and the mutant YADH was expressed in yeast and characterized for the coenzyme specificity. The turnover numbers of mutant enzyme for NAD⁺ and ethanol were decreased 3.5- and 4.8-fold compared to wild-type enzyme, respectively. Contrastively, catalytic specificity for NADP⁺ was increased 13-fold. As a result, the mutant YADH also employed NADP⁺ as a coenzyme.

Keywords □ YADHI, Asp-223, site-directed mutagenesis, Leu, coenzyme specificity.

알코올 탈수소효소는 효소의 구조와 반응성과의 상관 관계에 대한 연구에 있어 꾸준한 관심의 대상이 되어온 효소이다. 여러 생물체에서 알코올 탈수소효소가 발견, 분리, 보고 되었으며, 그 중에서도 말의 간과 효모에서 분리된 효소가 연구 대상의 주를 이루어 오고 있다.^{1,2)} 말의 간에서 분리되는 horse liver alcohol dehydrogenase(HLADH)의 경우 apoenzyme, holoenzyme등의 X-ray 회절자료에 의한 3차 구조가 보고 되었으며,³⁾ 최근 말의 간으로부터 HLADH의 유전자가 클로닝되었다.⁴⁾ 효모에서 분리되는 yeast alcohol dehydrogenase(YADH)의 경우는 아직 X-ray 회절자료에 의한 3차 구조는 확인되지 않았으나, 유전자가 클로닝되어 그 DNA 염기 서열로부터 단백질

질의 아미노산 서열이 알려지고 있다.⁵⁾ HLADH와 YADH는 아미노산서열에서 크게 유사성이 있는 것은 아니지만 반응에 관련되는 부위, 즉 활성부위, 보조 효소 부착부위등에서는 아미노산들이 거의 일치하여 같은 반응 형태를 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 HLADH의 3차 구조를 바탕으로 하여 기질, 보조효소, 효소가 만나서 이루는 산화-환원 탈수소 반응 기전에서 효소 활성부위(active site), 기질 부착부위(substrate binding pocket), 보조효소 부착부위(coenzyme binding site), subunit interface에 관련되는 아미노산 잔기들의 효소 반응과의 상관성이 제시되고 있다. 본 연구에서는 클로닝된 YADH 유전자를 이용하여 보조 효소 이용 특이성에 관련되리라 생각되는 Asp-223 잔기를 위치특이적 변이방법으로 leucine으로 치환하여 보조효소에 대한 효소 특성의 변화를 실험하였다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험방법

균주 및 Vector—Template DNA를 얻기 위해 M13 mp19-YADH I virus (Dr. Bryce V. Plapp, The University of Iowa로부터 분양받음)를, 변이를 위한 host cell로는 *E. coli* CJ236, CSH50, XL1-Blue를, 변이된 YADH I 유전자를 yeast에 형질전환시키기 위한 vector로 YEp13 plasmid와 host로 *Saccharomyces cerevisiae* 301-21 #2(YO2; MATa, *adh1-11*, *adh2*, *leu2*, *trp1*)를 사용하였다. Wild-type YADH I 분리를 위해서는 *Saccharomyces cerevisiae* Y24 균주를 사용하였다.

배지—M13mp19-YADH I을 지니는 *E. coli*의 배양에는 YT배지 (0.8% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5)를, YEp13-YADH I을 함유하는 *E. coli* 배양에는 ampicillin을 50 µg/ml를 포함하는 LB 배지 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.5)를, DNA sequence 확인을 위한 single-stranded template DNA를 얻기 위한 *E. coli* 배양에는 2 YT배지 (1.6% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.5)를 사용하였다. Yeast transformants의 선별을 위해 Sc-Leu 선택배지 (0.72% Sc-Leu powder, 2% glucose, 0.002% tryptophane, 0.0072% DL-threonine)와 antimycin A가 1 µg/ml 함유된 YPD배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)를 사용하였다. YADH 분리를 위한 종배양에는 Sc-Leu배지를 본 배양에는 YPD배지를 사용하였다.

시약 및 기구—Mutation을 위한 oligonucleotide 20-mer TG/GGT/ATT/TTG/GGT/GGT/GAA는 한국 과학재단 기초과학연구지원센터에 의뢰, 합성, 정제하여 사용하였고, T4 DNA ligase, Klenow DNA polymerase, restriction enzyme *SphI*, *EcoRI*은 Pharmacia 제품을, DNA sequencing kit은 USB Sequenase system을 사용하였다. DEAE-Sephrose CL-6B와 Octyl-Sephrose CL-4B는 Pharmacia, SDS-PAGE에 사용한 standard protein marker, 효소활성 측정에 사용한 보조효소 NAD⁺ free acid (Grade III), 속도론적 연구에 사용한 NAD⁺ lithium salt와 NADP⁺ sodium salt는 Sigma 제품을 사용하였다. 기질은 95% 에탄올 (Ducksan Pharmaceutical Co.)을 증류하여 사용하였다. 효소활성 측정에는 Varian Cary 210C spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서의 흡광도

변화를 측정함으로써 활성을 결정하였다.

YADH I gene의 위치특이적 변이와 Yeast에의 형질전환—Two primer를 이용한 위치특이적 변이를 실시하였다.⁷⁾ 변이에 사용된 single-stranded M13 DNA는 uracil을 포함하는 DNA로 *E. coli* CJ236에 ADH I gene을 포함하는 M13mp19를 감염시켜 얻었다.⁸⁾ 변이된 염기의 서열은 Sanger의 dideoxy DNA sequencing 방법으로 확인하였다.⁹⁾ 변이가 확인된 phage를 *E. coli* XL1-Blue에 감염시켜 host cell로부터 double-stranded M13-YADH I DNA를 분리 (Plasmid mini boiling preparation protocol; Stratagene protocol)하였고, 이를 제한효소 *SphI*을 처리하였다. 1% low melting agarose gel 상의 1.6 kb YADH I DNA fragment band를 잘라내어 *SphI*과 bacterial alkaline phosphatase로 처리된 YEp13 plasmid DNA와 연결하였고, 이를 *E. coli* XL1-Blue competent cell에 형질전환하였다. Transformants로부터 double-stranded YEp13-YADH I DNA를 분리(Plasmid mini boiling preparation protocol)하였고 이를 각각 *EcoRI*과 *SphI* 제한효소로 처리하여 agarose gel상의 band형태를 관찰함으로써 1.6 kb ADH I insert의 존재 여부를 확인하였다. Insert를 포함한 YEp13 plasmid를 LiAc를 이용한 방법¹⁰⁾에 따라 *Saccharomyces cerevisiae* 302-21 #2 (YO2)에 형질전환시켰고, transformants는 LEU2 marker gene의 획득여부를 Sc-Leu 선택배지에서 배양하여 확인함으로써 선별하였다. Sc-Leu배지에서 성장이 확인된 transformants는 YPD-antimycin A plate에서의 성장을 확인하여 ADH I gene이 expression 되는지를 시험하였다.

YADH의 분리와 정제—형질전환된 균주를 50 ml Sc-Leu minimal media에서 배양 (30°C, 175 rpm, 48 시간; A₆₀₀ ≈ 5.0)하고 이를 6l YPD media에 접종, 배양 (30°C, aeration, 48시간; A₆₀₀ ≈ 10)하여 cell을 모아 enzyme의 분리 및 정제에 이용하였다. Ganzhorn 등의 방법¹¹⁾에 따라 YADH를 분리 정제하였다. Glass beads를 이용한 cell의 파쇄, 0.2% protamine sulfate 처리, 10-18% PEG 침전, DEAE-Sephrose CL-6B column (1.5×30 cm), Octyl-Sephrose CL-4B column (2.0×20 cm)을 통해 분리하였고 12% SDS-PAGE¹²⁾를 통해 정제정도를 확인하였다.

YADH의 활성측정—효소활성 측정액 [Na₄P₂O₇·10 H₂O 19.62g, semicarbazide·HCl 0.429g, glycine

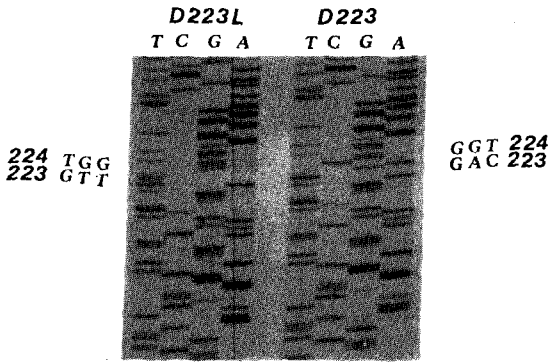


Fig. 1—Confirmation of site-directed mutagenesis in YADH gene at the site of 223 residue from aspartate (GAC) to leucine (TTG).

0.746g, 95% 에탄올 17.1 ml, 증류수 500 ml, pH 9.0] 1 ml에 1.35 mg NAD⁺를 용해하여 30°C 에서 온도 평형시킨 후 990 μl 또는 995 μl를 cuvette에 취하고 효소 희석액 10 μl 또는 5 μl를 adder-mixer로 신속히 첨가하였을 때 340 nm에서의 NADH형성에 따른 흡광도 변화를 측정하였다. 효소활성(U/ml)은 [(ΔA₃₄₀/min × 희석배수)/(6.22 × 첨가된 효소 용액의 부피 ml)]식에 의해 구하였다.

속도론적 연구—각 효소의 보조효소 (NAD⁺ 또는 NADP⁺)와 기질(ethanol)에 대한 kinetic constants를 구하였다. 반응은 40 mM KCl을 포함하는 83 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3) 에서 30°C 로 온도 평형하여 실시하였다. 반응속도는 각 농도의 기질 또는 보조효소에서 initial velocity (ΔA₃₄₀/min)를 구하고 이를 HYPER FORTRAN PROGRAM을 이용하여 computer fitting하여 Km, Vmax를 구하였다.

결과 및 고찰

YADH I gene의 Asp-223 (GAC)이 Leu-223 (TTG)으로 전환되었음을 DNA sequencing으로 확인하였다 (Fig. 1). YEp13 plasmid에 1.6 kb ADH I gene이 도입되어 있음을 제한효소 SphI 처리시의 1.6 kb band의 생성과 제한효소 EcoRI 처리시의 6.0 kb band의 생성으로 확인하였다. YEp13-YADH I에 의해 형질전환된 *Saccharomyces cerevisiae* 302-21 #2 (YO2)는 leucine 비요구성을 획득하였고 YADH I의 expression에 의해 antimycin A에 대해 저항성을 나타내었

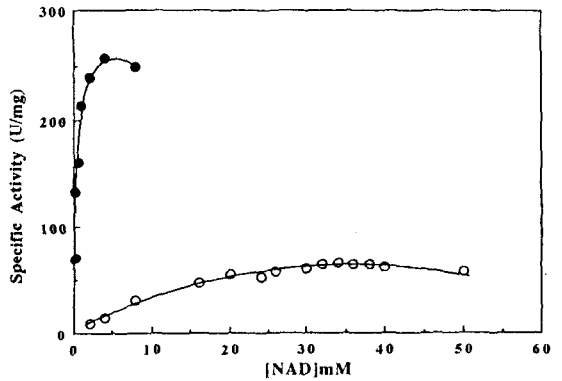


Fig. 2—Saturation curve of NAD⁺. D223 wild-type yeast alcohol dehydrogenase(●-●), D223L mutant yeast alcohol dehydrogenase(○-○).

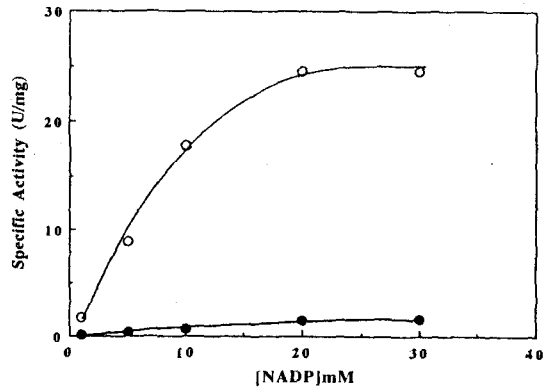


Fig. 3—Saturation curve of NADP⁺. D223 wild-type yeast alcohol dehydrogenase(●-●), D223L mutant yeast alcohol dehydrogenase(○-○).

다.

Yeast transformants와 Y24 균주에서 expression된 YADH I을 분리하였고 그 분리, 정제 정도를 12% SDS-PAGE로 확인하였을 때 90%이상 순수하였다. Octyl-Sepharose 분획중 YADH I 활성이 가장 큰 분획을 속도론적 연구에 사용하였고 이들 최종분획의 효소 활성을 A₂₈₀에서의 YADH I의 흡광계수(1 mg/ml=1.26)를¹³⁾ 이용하여 YADH I의 양을 정량하고 효소활성 측정액을 이용해 활성을 측정하여 specific activity로 구하였다. 이때 wild-type YADH I은 425.77 U/mg을, D223L mutant YADH I은 3.58 U/mg을 나타내어 약 120배의 활성차이를 보였다.

분리된 효소를 이용하여 보조효소와 기질로 NAD⁺ (Fig. 2), NADP⁺ (Fig. 3), ethanol (Fig. 4) 등에 대한

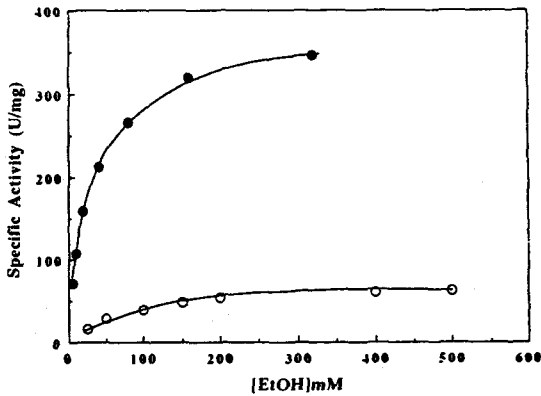


Fig. 4—Saturation curve of ethanol. D223 wild-type yeast alcohol dehydrogenase(●—●), D223L mutant yeast alcohol dehydrogenase(○—○).

반응성을 실험하여 K_m , V_{max} 등의 속도론적 상수를 구하였고 turnover number를 계산하였다(Table D). K_m 값은 D223L enzyme의 경우 NAD^+ 에 대해 30배, 에탄올에 대해 3배가 증가하였고, $NADP^+$ 에 대해서는 2배가 감소되었다. 그 결과 wild-type YADH I의 경우 NAD^+ 에 비해 K_m 값이 80배 정도 작아 NAD^+ 에 대하여 보조효소 특이성^{14,15)}을 나타내는 반면 D223L YADH I은 거의 차이가 없어 두가지 보조효소를 거의 동등히 이용하는 것으로 나타났다. 또한 pH 7.3, 500 mM ethanol, 10 mM NAD^+ 또는 $NADP^+$ 로 활성을 측정하였을 때 D223L이 NAD^+ 의 67%의 활성을 $NADP^+$ 에서 보인 반면 wild-type은 NAD^+ 의 0.2%의 활성을 보였다.

Asp-223이 Gly-223으로 변이된 D223G YADH I의 활성에 관한 보고와¹⁶⁾ 본 실험 결과와의 차이는 Table I에서 보는 바와 같이, Asp-223 잔기가 Leu으로 치환되는 경우 glycine으로 치환되는 경우 보다 $NADP^+$ 에 대한 특이성이 3.6배 정도 떨어지나 wild-type enzyme에 비하여는 2750배가 증가하였다. 이 실험 결과는 산성기를 제거함으로써 NAD^+ 에 대한 보조효소 특이성이 $NADP^+$ 도 공히 이용할 수 있는 상태로 변화함을 보여주는 동시에 치환된 아미노산의 측쇄의 크기와 성질에 따라 특이성에 미치는 영향이 있음을 보여 주고 있다. 따라서 Asp-223이 yeast alcohol dehydrogenase의 보조효소 특이성을 결정하는데 중요한 역할을 한다는 것을 이미 보고된 D223G

Table I—Kinetic constants of D223 wild-type, D223L and D223G^a mutant yeast alcohol dehydrogenase I

Kinetic Constants	YADH	NAD^+	$NADP^+$	Ethanol
K_m (mM)	D223	0.30	24.50	26.50
	D223L	9.10	12.30	78.80
	D223G	18.00	20.00	190.00
V_1 (sec ⁻¹)	D223	157.00	1.67	216.67
	D223L	45.00	21.67	45.00
	D223G	38.00	54.00	—
V_1/K	D223	523.00	0.07	8.17
	D223L	4.95	1.76	0.57
	D223G	2.10	2.70	—

^aData from Fan, F. *et al.* (1991). In that study, $V_1=360$, $K_a=0.16$ and $K_b=17$ for wild-type YADH I were reported.

mutant enzyme과 본 실험의 D223L mutant enzyme의 특성으로부터 확인할 수 있었다. 이는 Asp-223이 NAD^+ 의 adenine ring의 2'-과 3'-OH와 수소결합을 형성하는 반면에 $NADP^+$ 의 2'-phosphate와의 입체장애와 전하반발에 의해 NAD^+ -specificity를 나타낸다는 추정¹⁷⁾을 뒷받침해 주는 결과로 해석할 수 있다.

한편 nicotine amide mononucleotide (NMN)에 대한 활성을 기대하여 10 mM NMN, 500 mM ethanol, 30°C의 조건에서 활성을 확인하기 위하여 실험하였으나 NMN에 대한 활성을 볼 수가 없었다.

결 론

YADH I의 Asp-223을 leucine으로 위치특이적으로 변이시킴으로써 YADH I의 보조효소 특이성을 결정하는데 Asp-223이 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었고, D223L의 $NADP^+$ 에 대한 상대적 친화성의 증가는 음 전하가 상실됨으로써 Asp-223의 carboxyl group과 $NADP^+$ 의 2'-phosphate group간의 정전기 반발이 소실되어 오는 것이라고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 이화여자대학교 교수 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 연구비 지원에 감사드립니다

니다. 본 연구에 사용된 M13 phage 및 *E. coli*, yeast strains를 제공하여 준 Iowa대학교 Bryce. V. Plapp 박사님께 또한 감사드립니다.

문 헌

- 1) Brändén, C. I., Jornvall, H., Eklund, H. and Furugren, B.: Alcohol dehydrogenase. In *Enzymes*, 3rd ed., Vol. 11, pp. 103-190(1975).
- 2) Klinman, J. P.: Probes of mechanism and transition state structure in alcohol dehydrogenase reaction. *Crit. Rev. Biochem.*, **10**, 37-78(1981).
- 3) Eklund, H., Plapp, B. V., Samama, J. P. and Brändén, C. I.: Binding of substrate in a ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14349-14358(1982).
- 4) Park, D. H. and Plapp, B. V.: Isozymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids; cDNA cloning, expression and comparison of active sites. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13296-13302 (1991).
- 5) Bennetzen, J. and Hall, B. D.: The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* and gene for alcohol dehydrogenase I. *J. Biol. Chem.*, **257**, 308-3025(1982).
- 6) Plapp, B. V., Ganzhorn, A. J., Gould, R. M., Green, D. W. and Hershey, A. D.: Structure and function in yeast alcohol dehydrogenase; In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Vol. 3, H. Weiner and T. G. Flynn, eds., New York, Alan R. Liss., pp. 227-236(1987).
- 7) Zoller, M. J. and Smith, M.: Oligonucleotide-directed mutagenesis; A simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.*, **154**, 329-350 (1987).
- 8) Kunkel, T. A., Roberts, J. D. and Zakour, R. A.: Rapid and efficient site-directed mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.*, **154**, 367-382(1987).
- 9) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467(1977).
- 10) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168 (1983).
- 11) Ganzhorn, A. J. and Plapp, B. V.: Carboxyl groups near the active site zinc contribute to catalysis in yeast alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **263**, 5446-5454(1988).
- 12) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685(1970).
- 13) Hayes, J. E., Jr., and Velick, S. F.: Yeast alcohol dehydrogenase; Molecular weight, coenzyme binding and reaction equilibria. *J. Biol. Chem.*, **207**, 225-244(1954).
- 14) Dalziel, K. and Dickinson, F. M.: The activity of liver alcohol dehydrogenase with nicotinamide; Adenine dinucleotide phosphate as coenzyme. *Biochem. J.*, **95**(2), 311-320(1965).
- 15) Tsai, C. S., Senior, D. J. and Al-Kassim, L. S.: Comparative studies on coenzyme specificity of dehydrogenase. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94B**(4), 655-659(1989).
- 16) Fan, F., Lorenzen, J. A. and Plapp, B. V.: An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry*, **30**, 6397-6401(1991).
- 17) Eklund, H., Samama, J.-P. and Jones, T. A.: Crystallographic investigation of nicotinamide adenine dinucleotide binding to horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, **23**, 5982-5996(1984).